



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

# Αξιοποίηση παραπροϊόντων της αρώνιας για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών

Διπλωματική Εργασία



Ειρήνη Ευσταθιάδου  
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ  
ΑΘΗΝΑ 2023

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική αποτελεί απόρροια βιβλιογραφικής και πειραματικής έρευνας που ολοκληρώθηκε το Νοέμβριο του 2022 στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων (Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ).

Επιβλέπων της μελέτης ήταν ο καθηγητής Πέτρος Ταούκης, στον οποίο οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου. Η καθοδήγησή του ήταν πάντοτε κατατοπιστική και οι παρατηρήσεις του καίριες. Ιδιαίτερος όμως θα ήθελα αναφερθεί πως ανά πάσα στιγμή βρισκόταν στη διάθεσή μου. Οι αποκρίσεις του σε κάθε μου προβληματισμό ήταν ταχύτατες και ικανές να δημιουργήσουν ένα παραγωγικό και ασφαλές περιβάλλον.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Δρ. Δημήτριο Τσιμογιάννη και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γιώργο Δημόπουλο, οι οποίοι καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου συνείσφεραν τα μέγιστα. Το υψηλό γνωστικό τους επίπεδο και η πολυετής εργαστηριακή τους εμπειρία έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην πρόοδο της παρούσας μελέτης. Με μεγάλη προθυμία με εκπαίδευσαν πάνω στις διάφορες εργαστηριακές τεχνικές και μου μετέδωσαν τις γνώσεις του, για αυτό και τους ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, με τα οποία συνεργάστηκα αρμονικά και ειδικότερα την Δρ. Βιργινία Γιάννου, τον υποψήφιο διδάκτορα Αθανάσιο Λημναίο και τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Κατσιμίχα που με βοήθησαν στην εκμάθηση επιπρόσθετων εργαστηριακών και αναλυτικών μεθόδων.

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω κάποια αγαπημένα μου πρόσωπα: την φίλη και συνάδελφο Λήδα Κανελλοπούλου, με την οποία αντιμετωπίσαμε από κοινού τις προκλήσεις της σπουδαστικής εμπειρίας και τα μέλη της οικογένειάς μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την υπομονή τους.

## Περίληψη

Η Αρώνια (*Aronia melanocarpa* ή black chokeberry) είναι ένα θαμνώδες φυλλοβόλο φυτό που παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ως καλλωπιστικό φυτό. Ωστόσο, ο καρπός της είναι πολύ πλούσιος σε φαινολικά συστατικά και ως εκ τούτου παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Τα φαινολικά συστατικά είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής, δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην υγεία. Επίσης, στην βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ως φυσική απάντηση στα συντηρητικά πρόσθετα. Η πούλπα αποτελεί έναν πολτό που παράγεται ως παραπροϊόν από την χυμοποίηση της αρώνιας και απορρίπτεται. Αποτελεί όμως μια πηγή πλούσια σε πολυφαινόλες και ιδιαίτερα ανθοκυανίνες. Ακόμη κατά την καλλιέργεια της αρώνιας παράγονται σημαντικές ποσότητες φύλλων και μίσχων, μέρη του φυτού που αν και δεν είναι εξίσου πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά όπως η πούλπα, περιέχουν υπολογίσιμες συγκεντρώσεις.

Για το πρώτο μέρος, φύλλα αρώνιας αρχικά ξηράθηκαν ήπια με αέρα 40°C και κονιοποιήθηκαν. Η σκόνη υποβλήθηκε αρχικά σε εκχύλιση με νερό υπό ανάδευση για 24 ώρες, για τον προσδιορισμό των πολικών ενώσεων των φύλλων. Πραγματοποιήθηκε ακόμη μία διαδοχική εκχύλιση στο στερεό υπόλειμμα. Η αναλογία πρώτης ύλης – διαλύτη επιλέχθηκε 1:30 w/v. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους (ανάλυση Folin – Ciocalteu), την αντιριζική ικανότητα (μέθοδος DPPH) και το περιεχόμενό τους σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις: φαινολικά οξέα και φλαβονόλες (ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης - HPLC). Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων προσδιορίστηκαν στο συνολικό εκχύλισμα και εκφράστηκαν σε ξηρή βάση φύλλων:  $14,6 \pm 1,4 \text{ mg}_{GAE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ολικό φαινολικό περιεχόμενο,  $7,9 \pm 0,8 \text{ mg}_{TE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ουσίες με αντιριζική ικανότητα,  $1,6 \pm 0,17 \text{ mg}_{ChAE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ολικά φαινολικά οξέα και  $2,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{QRE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ολικές φλαβονόλες. Πραγματοποιήθηκε ακόμη εκχύλιση σταθερής κλίνης ημιδιαλείποντος έργου με ακετόνη για 60 λεπτά, για την παραλαβή των μη πολικών ενώσεων των φύλλων (φλαβονοειδή). Παρελήφθησαν σε ξηρή βάση  $1,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{GAE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ολικό φαινολικό περιεχόμενο και  $1,06 \pm 0,03 \text{ mg}_{TE} / \text{g}_{\text{φύλλων}}$  ουσίες με αντιριζική ικανότητα. Με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο ακετονικό εκχύλισμα εντοπίστηκαν καρτοτενοειδή και κάποια πιθανώς τριτερπενικά οξέα. Τα φύλλα της αρώνιας επέδειξαν σημαντική υστέρηση σε φαινολικά συστατικά έναντι του καρπού (23% του φαινολικού περιεχομένου του καρπού), καθώς στα φύλλα δεν βρέθηκαν ανθοκυανίνες, στις οποίες είναι πλούσιος ο καρπός.

Στο επόμενο μέρος πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός της πούλπας της αρώνιας. Η πούλπα υπέστη αρχικά ήπια ξήρανση με αέρα 40°C και κονιοποίηση. Η σκόνη υποβλήθηκε σε εκχύλιση σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου) για 60 λεπτά με τον εξής διαλύτη: μεθανόλη οξινομένη κατά 0,5 % v/v TFA. Η τελική αναλογία πρώτης ύλης - εκχυλίσματος επιλέχθηκε ίση με 1:15 w/v. Η μεθανόλη γενικά αποφεύγεται ως μέσο εκχύλισης στη βιομηχανία γιατί είναι τοξική, όμως ενδείκνυται για αναλυτικούς σκοπούς καθώς παρέχει υψηλές αποδόσεις στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών. Το μέσο οξίνισης (τριφθοροξικό οξύ) προστέθηκε με σκοπό την προστασία των ανθοκυανινών, ασταθών φαινολικών ενώσεων. Στην περίπτωση της πούλπας πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες αναλύσεις με τα φύλλα, αλλά στις φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν προστέθηκαν οι ανθοκυανίνες. Βρέθηκε ότι περιείχε σε ξηρή βάση πούλπας  $49 \pm 8 \text{ mg}_{GAE} / \text{g}_{\text{πούλπας}}$  ολικό φαινολικό περιεχόμενο

(78% του καρπού),  $59 \pm 7 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ουσίες με αντιριζική ικανότητα,  $14 \pm 1 \text{ mg}_{CYE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ανθοκυανίνες,  $0,4 \pm 0,1 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φαινολικά οξέα και  $1,1 \pm 0,3 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φλαβονόλες. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν οι κύριες ανθοκυανίνες και τα κύρια φαινολικά οξέα του καρπού, με τις πρώτες να απαρτίζονται από 4 γλυκοζίτες της κυανιδίνης (κατά σειρά ελαττούμενης συγκέντρωσης: 3-O-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης, 3-O-αραβινοζίτης της κυανιδίνης, 3-O-γλυκοζίτης της κυανιδίνης και 3-O-ξυλοζίτης της κυανιδίνης) και τα δεύτερα να απαρτίζονται από δύο ισομερή εστεροποιημένα οξέα (κατά σειρά ελαττούμενης συγκέντρωσης: χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ). Οι προκυανιδίνες είναι φαινολικές ενώσεις στις οποίες είναι ιδιαίτερα πλούσια η αρώνια, όμως δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός τους στα εκχυλίσματα. Συμπεριλαμβάνονται ωστόσο στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ακόμη μελετήθηκε η κινητική των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων στα 520 nm, όπου οι ανθοκυανίνες απορροφούν μέγιστα. Η εκχύλιση των ανθοκυανινών στα 2 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση, μέχρι τα 15 λεπτά παρουσίαζε αποδόσεις κοντά στην μέγιστη και μετά οι αποδόσεις έπεφταν γραμμικά μέχρι το τέλος της εκχύλισης (60 λεπτά). Στα 60 λεπτά παραλήφθηκαν όλες οι ανθοκυανίνες.

Έπειτα έγινε αλλαγή του διαλύτη σε έναν πράσινο διαλύτη, οπότε επιλέχθηκε το νερό που είναι οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σταθερής κλίνης για 90 λεπτά με απιονισμένο νερό οξινισμένο με κιτρικό οξύ 0,75% w/v. Η τελική αναλογία πρώτης ύλης - εκχυλίσματος προέκυψε ίση με 1:25 w/v. Από αναλύσεις προέκυψε ότι οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων στο συνολικό εκχύλισμα σε ξηρή βάση πούλπας ήταν ίσες με:  $15 \pm 2 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ολικό φαινολικό περιεχόμενο (23% του καρπού),  $14,3 \pm 0,5 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ουσίες με αντιριζική ικανότητα,  $5,33 \pm 0,05 \text{ mg}_{CYE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ανθοκυανίνες,  $0,8 \pm 0,2 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φαινολικά οξέα και  $0,94 \pm 0,02 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φλαβονόλες. Η υδατική εκχύλιση παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερες αποδόσεις σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο (μείωση 69%) και σε ολικές ανθοκυανίνες (μείωση 63%) σε σχέση με την εκχύλιση με μεθανόλη.

Για την εύρεση της επίδρασης της ξήρανσης υπό αέρα στους 40°C στα βιοδραστικά συστατικά της πούλπας πραγματοποιήθηκε ακόμη ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση). Έλαβε μέρος εκχύλιση με τους δύο διαλύτες που έχουν επιλεχθεί (οξινισμένη μεθανόλη, οξινισμένο νερό) στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Η απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο για την μεθανολική εκχύλιση προέκυψε υψηλότερη κατά 4% (49 σε  $51 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ), ενώ για την υδατική εκχύλιση υψηλότερη κατά 53% (15 σε  $23 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ). Η ξήρανση υπό κατάψυξη απέδωσε αυξήσεις στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, ιδιαίτερα στην περίπτωση της υδατικής εκχύλισης, ωστόσο δεν κρίθηκαν ικανοποιητικές. Η λυοφιλίωση ακόμη είναι μία ακριβή και ενεργοβόρα μέθοδος ξήρανσης σε σχέση με την ξήρανση υπό αέρα. Για τις εκχυλίσεις της πούλπας επιλέχθηκε η ξήρανση υπό αέρα στους 40°C.

Με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της υδατικής αλλά και της μεθανολικής εκχύλισης σταθερής κλίνης, η πούλπα υπέστη προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ). Η εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου επιτυγχάνει την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των ιστών και αναμένεται αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχομένων συστατικών. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο απέδωσε αύξηση 39% για την μεθανολική εκχύλιση (49 σε  $68 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ) και 12% για την υδατική εκχύλιση (15 σε  $17 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ).

*Πούλπας*). Με την προκατεργασία ΠΗΠ προέκυψε ικανοποιητική αύξηση φαινολικών συστατικών στην εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη.

Στην συνέχεια για την χρήση του μεθανολικού εκχυλίσματος στην βιομηχανία τροφίμων αντικαταστάθηκε το μέσο οξίνισης της μεθανόλης, από το τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε κιτρικό οξύ. Η μεθανόλη δεν αποτελεί πράσινο διαλύτη, ωστόσο αποτελεί επιτρεπόμενο διαλύτη για εκχυλίσεις υπό την προϋπόθεση να απομακρυνθεί στα επιθυμητά ποσοστά. Η εκχύλιση με μεθανόλη οξινισμένη με 0,75% w/v κιτρικό οξύ επέφερε χαμηλή μείωση (10%) στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (49 σε 44  $mg_{GAE}/g_{\text{πούλπας}}$ ). Συνεπώς η αντικατάσταση του TFA από το κιτρικό οξύ ήταν επιτυχής.

Για να βρεθεί η επιρροή του pH του διαλύτη στην εκχυλισσιμότητα των ανθοκυανινών της πούλπας της αρώνιας, επιλέχθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος από το 0,75% στο 1,5% w/v στο οξινισμένο νερό. Η μείωση του pH στην υδατική εκχύλιση σταθερής κλίνης επέφερε μείωση 12% στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Συνεπώς, η οξίνιση με 0,75% w/v κιτρικό οξύ είναι αποτελεσματικότερη.

Τέλος, εξετάστηκε διαφορετική μέθοδος εκχύλισης. Επιλέχθηκε η εκχύλιση υπό ανάδευση (διαλείποντος έργου) για 24 ώρες με διαλύτη οξινισμένη μεθανόλη 0,5% v/v TFA και οξινισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ. Η μηχανική εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού άρα και στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών του. Η απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου για την μεθανολική εκχύλιση διπλασιάστηκε (49 σε 98  $mg_{GAE}/g_{\text{πούλπας}}$ ), ενώ για την υδατική αυξήθηκε μόνο κατά 7% (15 σε 16  $mg_{GAE}/g_{\text{πούλπας}}$ ). Η μεθανολική εκχύλιση διαλείποντος έργου για 24 ώρες απέδωσε σημαντικά υψηλή αύξηση στην απόδοση του φαινολικών ενώσεων σε σχέση με την εκχύλιση σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου), ωστόσο το ίδιο δεν συνέβη για την υδατική εκχύλιση.

Συμπερασματικά, η πούλπα από την χυμοποίηση της αρώνιας περιείχε σημαντική ποσότητα φαινολικών συστατικών, συγκριτικά και με τα φύλλα του φυτού. Οι εκχυλίσεις με οξινισμένη μεθανόλη στην πούλπα απέδωσαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικού φαινολικού περιεχομένου συγκριτικά με τις εκχυλίσεις με οξινισμένο νερό. Ωστόσο, η μεθανόλη δεν αποτελεί πράσινο διαλύτη, όπως το νερό, και δεν προτιμάται. Στο μέλλον για την αύξηση της απόδοσης της υδατικής εκχύλισης σταθερής κλίνης, προτείνεται ο συνδυασμός προκατεργασιών στην πούλπα (πχ. προκατεργασία με ΠΗΠ και ένζυμα) και η δοκιμή μίγματος νερού με άλλον πράσινο διαλύτη (πχ. μίγμα αιθανόλης-νερού).

**Λέξεις κλειδιά:** αρώνια, εκχύλιση φαινολικών συστατικών, εκχύλιση ανθοκυανινών, παραπροϊόν χυμοποίησης αρώνιας, ξήρανση υπό κατάψυξη, Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

## Abstract

Aronia (*Aronia melanocarpa* or black chokeberry) is a deciduous shrub mainly used as an ornamental plant. The fruit of Aronia is rich in phenolic components and because of that it has attracted the interest of many researchers. Phenolic components are a major part of the human diet, can act as natural antioxidants and have numerous health benefits. In addition, they are used by the food industry as a natural response to preservative additives. The pulp is produced as a by-product from juicing chokeberry and it is discarded. However, it is a rich source of polyphenols, especially anthocyanins and it is not exploited. Even during the cultivation of aronia, significant amounts of leaves and stems are produced, parts of which, are not as rich in bioactive components as the pulp, but contain significant amounts of this component.

On the experimental part, aronia leaves were first mildly air-dried at 40°C and powdered. The powder was extracted with water under stirring for 24 hours to obtain the polar compounds of the leaves. Another sequential extraction was performed on the solid residue. The raw material – solvent ratio was chosen to be 1:30 w/v. The extracts were analyzed for their total phenolic content (Folin – Ciocalteu method), antiradical capacity (DPPH method) and their content in individual phenolic compounds: phenolic acids and flavonols (high performance liquid chromatography - HPLC analysis). The concentrations of phenolic compounds were determined in the total extract and expressed on a dry leaf basis:  $14,6 \pm 1,4 \text{ mg}_{GAE}/g_{leaves}$  total phenolic content,  $7,9 \pm 0,8 \text{ mg}_{TE}/g_{leaves}$  substances with antiradical capacity,  $1,6 \pm 0,17 \text{ mg}_{ChAE}/g_{leaves}$  total phenolic acids και  $2,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{QRE}/g_{leaves}$  total flavonols. A semi-discontinuous fixed bed extraction with acetone was also carried out for 60 minutes to obtain the non-polar compounds of the leaves (flavonoids). Total phenolic content of  $1,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{GAE}/g_{leaves}$  and substances with antiradical capacity of  $1,06 \pm 0,03 \text{ mg}_{TE}/g_{leaves}$  with antiradical capacity were obtained on a dry basis. Carotenoids and some possible triterpenic acids were detected in the acetone extract by high-performance liquid chromatography analysis. Aronia leaves showed a significant lack of phenolic components compared to the fruit (23% of the phenolic content of the fruit), as no anthocyanins were found in the leaves, in which the fruit is rich.

In the second part, the characterization of the aronia pulp was carried out. The pulp was originally mildly air-dried at 40°C and powdered. The powder was extracted using methanol, that was acidified with 0.5% v/v TFA in semi-batch fixed bed for 60 min. The final raw material - extract ratio was equal to 1:15 w/v. Methanol is generally avoided as an extraction medium in the industry because it is toxic, but it is suitable for analytical purposes as it provides high yields in the recovery of phenolic components. The acidifying agent (trifluoroacetic acid) was added to protect the anthocyanins, which are unstable phenolic compounds. In the case of the pulp, the same analyzes were carried out as for the leaves, but in the phenolic compounds identified the anthocyanins. It was found to contain  $49 \pm 8 \text{ mg}_{GAE}/g_{pulp}$  total phenolic content (78% of the fruit),  $59 \pm 7 \text{ mg}_{TE}/g_{pulp}$  substances with antiradical capacity,  $14 \pm 1 \text{ mg}_{CyE}/g_{pulp}$  anthocyanins,  $0,4 \pm 0,1 \text{ mg}_{ChAE}/g_{pulp}$  phenolic acids and και  $1,1 \pm 0,3 \text{ mg}_{QRE}/g_{pulp}$  flavonols on dry pulp basis. In addition, the main anthocyanins and the main phenolic acids of the fruit were identified, the former consisting of 4 glycosides of cyanidin (in order of decreasing concentration: 3-O-galactoside of cyanidin, 3-O-araboside of cyanidin, 3-O. cyanidin glucoside and cyanidin 3-O-xyloside) and the latter to be composed of two isomeric esterified acids (in order of decreasing concentration: chlorogenic and neochlorogenic acid). Procyanides and tannins are phenolic compounds in which chokeberry

is particularly rich, but it was not possible to determine them in the extracts. However, they are included in the total phenolic content. The kinetics of anthocyanins was also studied by photometry of appropriately diluted samples at 520 nm, where anthocyanins absorb maximally. The extraction of anthocyanins at 2 min reached the maximum yield, up to 15 min it showed yields close to the maximum and after that, the yields dropped linearly until the end of the extraction (60 min). After 60 minutes all anthocyanins were received.

Then the solvent was changed to a green solvent, so water was chosen which is economical and environmentally friendly. Fixed bed extraction was performed for 90 min with deionized water acidified with 0.75% w/v citric acid. The final raw material - extract ratio was equal to 1:25 w/v. Analyzes showed that the concentrations of phenolic compounds in the total extract on a dry pulp basis were equal to:  $15 \pm 2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$  total phenolic content,  $14,3 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$  substances with antiradical capacity,  $5,33 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{CyE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$  anthocyanins,  $0,8 \pm 0,2 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$  phenolic acids and  $0,94 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$  flavonols. Aqueous extraction shows significantly lower yields in total phenolic content (69% reduction) and in total anthocyanins (63% reduction) compared to methanol extraction.

In order to investigate the effect of air drying at 40°C on the bioactive components of the pulp, freeze drying (lyophilization) was also carried out. An extraction took place with the two solvents chosen (acidified methanol, acidified water) in the fixed bed setup. The yield in total phenolic content for the methanolic extraction resulted higher by 4% (49 to 51  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$ ), while for the aqueous extraction higher by 53% (15 to 23  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$ ). Freeze-drying yielded increases in total phenolic content, particularly in the case of aqueous extraction, but it was not considered satisfactory. Freeze-drying is also an expensive and energy-intensive drying method compared to air drying. Air drying at 40°C was chosen for pulp extractions.

In order to increase the yield of aqueous and methanolic fixed bed extraction, the pulp was pretreated with Pulsed Electric Fields (PEF). The application of a pulsed electric field achieves the destruction of the cell membrane of the tissues and a more effective extraction of the contained components is expected. It yielded a 39% increase in total phenolic content yield for methanolic extraction (49 to 68  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$ ) and 12% for aqueous extraction (15 to 17  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$ ). PEF pretreatment resulted in a satisfactory increase of phenolic components in acidified methanol extraction.

Subsequently, for the use of the methanolic extract in the food industry, the acidifying agent of methanol was replaced from trifluoroacetic acid (TFA), which is toxic, to citric acid. Methanol is not a green solvent, though it is an allowable solvent for extractions provided and it is removed from the extracts. Extraction with methanol was acidified with 0.75% w/v citric acid resulted in a low decrease (10%) in the yield of total phenolic content (49 to 44  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{pulp}}$ ). Therefore, the replacement of TFA with citric acid was considered successful.

To find the influence of solvent pH on the extractability of anthocyanins of chokeberry pulp, increasing the concentration of citric acid from 0.75% to 1.5% w/v, acidified water was chosen. Lowering the pH in the aqueous fixed-bed extraction resulted in a 12% decrease in total phenolic yield. As a result, the acidification using 0.75% w/v citric acid was more effective.

Finally, a different extraction method was used. Extraction under stirring (intermittent operation) for 24 h with solvent acidified methanol 0.5% v/v TFA and acidified water 0.75% w/v citric acid was chosen. Mechanical extraction for 24 h can be exhausting and can bring

about changes in the structure of the material and therefore in the extractability of its components. The yield of total phenolic content increased by 100% ( $49 \pm 98 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{pulp}$ ), while for aqueous it increased only by 7% (15 to 16  $\text{mg}_{GAE}/\text{g}_{pulp}$ ). Methanolic batch extraction for 24 h showed a significantly high increase in the yield of phenolic compounds compared to semi-batch extraction for 1 h. However, the same was not found for aqueous extraction.

In conclusion, the pulp from aronia juicing contained a significant amount of phenolic components, compared to the leaves of the plant. Extractions with acidified methanol on the pulp yielded significantly higher concentrations of total phenolic content compared to extractions with acidified water. However, methanol is not a green solvent, like water, and is not preferred. In the future, in order to transfer the process to a large scale, the aqueous fixed-bed extraction on aronia pulp with a combination of pretreatments (e.g. pretreatment with PEF and enzymes) and the testing of a more efficient green solvent (e.g. ethanol-water mixture) are proposed.

**Keywords:** chokeberry, phenolic extraction, anthocyanin extraction, chokeberry juicing by-product, freeze drying, Pulsed Electric Fields



## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract .....	5
1. Εισαγωγή .....	13
2. Θεωρητικό Μέρος .....	14
2.1 Aronia melanocarpa .....	14
2.1.1 Ταξινόμηση του φυτού αρώνια .....	14
2.1.2 Συστηματική βοτανική του φυτού .....	14
2.1.3 Συγκομιδή και επεξεργασία .....	15
2.1.4 Χρήσεις – Προϊόντα .....	16
2.1.5 Παραγωγή φυσικού χυμού αρώνιας.....	16
2.1.6 Θρεπτική αξία και χημική σύσταση καρπού αρώνιας .....	17
2.1.7 Η αρώνια ως υπερτροφή.....	17
2.1.8 Διατροφική αξία καρπών .....	18
2.2 Φαινολικά συστατικά.....	18
Οι φαινολικές ενώσεις ως βιοδραστικά συστατικά.....	18
2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση φαινολών.....	19
2.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών .....	20
2.2.3 Φαινολικά οξέα .....	21
2.2.4 Φλαβονοειδή.....	21
2.3 Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της αρώνιας .....	22
2.3.1 Τα φαινολικά οξέα στον καρπό της αρώνιας.....	22
2.3.2 Τα φλαβονοειδή στον καρπό της αρώνιας .....	22
2.3.3 Ανθοκυανίνες .....	22
2.3.4 Φλαβονόλες .....	22
2.3.5 Φλαβανόλες .....	23
2.3.6 Σύγκριση με άλλα μούρα .....	24
2.4 Οφέλη για την υγεία.....	25
2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	25
Οφέλη κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων .....	26
2.4.2 Οφέλη στο μεταβολισμό της γλυκόζης.....	26
2.4.3 Οφέλη στην καταπολέμηση του καρκίνου .....	26
2.4.4 Οφέλη από την αντιφλεγμονώδη δράση της.....	27
2.5 Μέθοδοι προεπεξεργασίας του προς εκχύλιση υλικού .....	27
2.5.1 Ξήρανση.....	27

2.6	Η εκχύλιση ως φυσικοχημικό φαινόμενο .....	29
2.6.1	Γενικά για την εκχύλιση.....	29
2.6.2	Μέθοδοι εκχύλισης .....	29
2.6.3	Τεχνικές προεπεξεργασίας για τη βελτίωση παραλαβής συστατικών από φυτικούς ιστούς .....	31
2.6.4	Διαλύτες εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών .....	33
3.	Πειραματικό μέρος .....	35
3.1	Σκοπός .....	35
3.2	Πρώτες Ύλες και Αποθήκευση .....	35
3.3	Διαγράμματα ροής για κάθε πειραματική ενότητα και συνθήκες επεξεργασίας....	35
3.3.1	Μερικός Χαρακτηρισμός φύλλων αρώνιας .....	35
3.3.2	Χαρακτηρισμός του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας.....	36
3.3.3	Διερεύνηση απόδοσης της εκχύλισης του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας .....	36
3.4	Εκχύλιση φύλλων αρώνιας .....	40
3.4.1	Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου .....	40
3.4.2	Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου .....	41
3.5	Μεθανολική (0,5% v/v TFA) εκχύλιση πούλπας αρώνιας .....	41
3.5.1	Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου .....	42
3.5.2	Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου .....	42
3.6	Μεθανολική (0,75% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας .....	42
3.7	Υδατική (0,75% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας.....	42
3.7.1	Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου .....	43
3.7.2	Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου .....	43
3.8	Υδατική (1,5% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας.....	43
3.9	ΠΗΠ και μεθανολική & υδατική εκχύλιση πούλπας αρώνιας.....	43
3.10	Αντιδραστήρια .....	44
3.11	Συσκευές.....	44
3.11.1	Ξήρανση.....	44
	Εκχύλιση .....	45
3.11.2	Διαχωρισμοί.....	45
3.12	Όργανα .....	46
3.13	Αναλυτικές και παρασκευαστικές μέθοδοι ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης συστατικών .....	48
3.13.1	Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου .....	48
3.13.2	Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου .....	48

3.13.3	Ξήρανση για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας και των ολικών στερεών	48
3.13.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για τις εκχύλισεις της πούλπας της αρώνιας.....	50
3.13.5	Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	50
3.13.6	Προσδιορισμός ολικής αντιριζικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH .....	52
3.13.7	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	54
4.	Αποτελέσματα .....	59
4.1	Εκχύλιση φύλλων Αρώνιας και μερικός χαρακτηρισμός τους .....	59
4.1.1	Παραλαβή ολικών στερεών .....	59
4.1.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	60
4.1.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	62
4.1.4	Μελέτη επιμέρους φαινολικών ενώσεων και άλλων συστατικών.....	63
4.1.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	68
4.2	Χαρακτηρισμός παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας με εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA, ξηραμένο υπό αέρα) .....	69
4.2.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	69
4.2.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	70
4.2.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	70
4.2.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας.....	71
4.2.5	Μελέτη επιμέρους φαινολικών ενώσεων.....	72
4.2.6	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	78
4.3	Σύγκριση λυοφιλωμένης με ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA) .....	80
4.3.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	80
4.3.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	80
4.3.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	81
4.3.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της λυοφιλωμένης πούλπας της αρώνιας.....	82
4.3.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	83
4.4	Σύγκριση στην εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA) της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με την απλή ξηραμένη υπό αέρα πούλπας αρώνιας.....	84
4.4.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	84
4.4.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	84
4.4.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	85
4.4.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της πούλπας της αρώνιας με προκατεργασία ΠΗΠ .....	86

4.4.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	87
4.5	Σύγκριση εκχύλισης ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας με οξινισμένη μεθανόλη (0,75% w/v κιτρικό οξύ) και οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA) .....	88
4.5.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	88
4.5.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	89
4.5.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	89
4.5.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας.....	90
4.5.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	91
4.6	Σύγκριση εκχύλισης υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση στην σταθερή κλίνης (διαλύτης οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA), ξηραμένη υπό αέρα πούλπα) .....	92
4.6.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	92
4.6.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	93
4.6.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	93
4.6.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA.....	94
4.6.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	95
4.7	Χαρακτηρισμός παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας με εκχύλιση με οξινισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ, ξηραμένη υπό αέρα) .....	96
4.7.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	96
4.7.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	97
4.7.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	97
4.7.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας .....	97
4.7.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	98
4.8	Σύγκριση λυοφιλωμένης με ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με απιονισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ).....	100
4.8.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	100
4.8.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	100
4.8.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	101
4.8.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ της λυοφιλωμένης πούλπας της αρώνιας.....	102
4.8.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	102
4.9	Σύγκριση πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ με απλή ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με οξινισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ) .....	104
4.9.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	104
4.9.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	104

4.9.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	105
4.9.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ της λυοφιλωμένης πούλπας της αρώνιας.....	105
4.9.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	106
4.10	Σύγκριση υδατικής εκχύλισης ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας με αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος από 0,75% w/v σε 1,5% w/v .....	108
4.10.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	108
4.10.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	108
4.10.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	109
4.10.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας.....	109
4.10.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	110
4.11	Σύγκριση εκχύλισης υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση στην σταθερή κλίσης (διαλύτης οξινισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ), ξηραμένη υπό αέραπούλπα) .....	111
4.11.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών .....	111
4.11.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	112
4.11.3	Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας.....	112
4.11.4	Χάραξη κινητικής καμπύλης για εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ .....	113
4.11.5	Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων .....	114
5.	Συμπεράσματα .....	116
6.	Βιβλιογραφία.....	120
7.	Συνοτομογραφίες .....	128

## 1. Εισαγωγή

Η αρώνια είναι ένα θαμνώδες φυλλοβόλο φυτό που καλλιεργήθηκε σε μεγάλο βαθμό στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και στον Καναδά. Χρησιμοποιήθηκε, από Αμερικανούς ιθαγενείς οι οποίοι με τα φύλλα και τα κλαδιά του φυτού έφτιαχναν τσάι και φυτικά φάρμακα για την καταπολέμηση του πυρετού και του κουλιακού άλγους. Με το χυμό του καρπού θεράπευαν εκδορές και κοψίματα, ενώ με τους αποξηραμένους καρπούς τρέφονταν τους χειμερινούς μήνες, ενισχύοντας παράλληλα το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Ταυτόχρονα, η αρώνια χρησιμοποιήθηκε για να "μαλακώσει" διάφορα κρέατα και να τα προστατεύσει από μικροοργανισμούς κατά την ωρίμανση ή και ξήρανσή τους .

Η αρώνια άρχισε να ανακτά έδαφος με διάφορες μελέτες και τάσεις της εποχής που την ήθελαν στην κορυφή των τροφίμων λόγω της αντιοξειδωτικής της ικανότητας. Το φυτό, ήρθε στην Ευρώπη μετά το πυρηνικό ατύχημα του Τσέρνομπιλ όταν μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι ήταν ένα από τα φρούτα που αποβάλλει τα βαρέα μέταλλα από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Το 1986, η αρώνια εισήχθη στη χώρα μας πειραματικά από την Βουλγαρία μέσω προγράμματος του Υπουργείου Γεωργίας στην Χαλκιδική. Αργότερα, από το 2000 μέχρι το 2011 διενεργήθηκαν πειράματα από το Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, ενώ το 2007 καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στις Σέρρες.

Σε διεθνές επίπεδο οι εκτάσεις που καλλιεργούνται δεν είναι μεγάλες, αν και η ζήτηση συνεχώς αυξάνεται. Στην Ελλάδα, η δημοτικότητά της είναι ακόμα αρκετά χαμηλά, για αυτό και οι παραγωγοί είναι διστακτικοί ως προς την καλλιέργειά της. Αθροιστικά οι εκτάσεις παραγωγής δεν ξεπερνούν τα 500 στρέμματα και το μεγαλύτερο μέρος τους (> 50 %) βρίσκεται στις Σέρρες.

Η αρώνια είναι πολύ πλούσια σε φαινολικά συστατικά (φυσικά αντιοξειδωτικά) και ως εκ τούτου παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Πιο συγκεκριμένα, οι καρποί της είναι, όπως τα περισσότερα μούρα, πλούσιοι σε αντιοξειδωτικά συστατικά και ιδιαίτερα σε ανθοκυανίνες και προκυανιδίνες οι οποίες αποτελούν και τα δραστικά συστατικά των μύρτιλων και του εκχυλίσματος σταφυλιού. Οι ανθοκυανίνες έχουν επιδείξει αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και κυτταροπροστατευτική δράση, βοηθώντας στην αντιμετώπιση της συστηματικής φλεγμονής που σχετίζεται με διάφορες χρόνιες παθήσεις όπως ο διαβήτης, οι καρδιοπάθειες και η παχυσαρκία. Εκτός από τις πολυφαινόλες, διαθέτει ακόμη πολυπληθή βιοδραστικά συστατικά όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και καροτενοειδή, τα οποία συνδράμουν σημαντικά στα οφέλη του καρπού για την ανθρώπινη υγεία.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στον χαρακτηρισμό των διαφόρων παραπροϊόντων από την χυμοποίηση της αρώνιας καθώς και στην αναζήτηση μεθόδων για τη βελτιστοποίηση της παραλαβής βιοδραστικών συστατικών. Η έρευνα επικεντρώθηκε στα φύλλα της αρώνιας αλλά και στην πούλπα, μέρη του φυτού που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της επεξεργασίας.

## 2. Θεωρητικό Μέρος

### 2.1 Aronia melanocarpa

Αποτελεί ιθαγενές φυτό της Βόρειας Αμερικής, ωστόσο η καλλιέργειά της έχει πλέον διαδοθεί παγκοσμίως, καθώς δύναται να ευδοκιμήσει σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος εδαφικών και κλιματικών συνθηκών. Το φυτό *Aronia melanocarpa* είναι ένας φυλλοβόλος μακρόβιος θάμνος, της οικογένειας των Rosaceae, με ύψος από 1 έως 3 μέτρα. Τα φύλλα της έχουν σχήμα ωοειδή, είναι λεία με ελαφριά οδόντωση στην περίμετρο. Η περίοδος ανθοφορίας του φυτού είναι από τον Μάιο έως και τον Ιούνιο και καρποφορεί στις αρχές του φθινοπώρου. Οι καρποί της έχουν μέγεθος μπιζελιού και χρώμα μελανό – ιώδες. Κρέμονται σε συστάδες έως και 12 μονάδων και συλλέγονται με το χέρι ή και μηχανικά, με έναν συλλέκτη βατόμουρων. Η αρώνια στο παρελθόν χρησιμοποιούταν κυρίως ως καλλωπιστικό φυτό, καθώς έχει διακοσμητικά χαρακτηριστικά. Πλέον όμως είναι γνωστό ότι η βρώση της φέρει ένα πλήθος ωφελειών για την υγεία, καθώς η αντιοξειδωτική της δράση είναι ιδιαίτερα υψηλή σε σχέση με τα περισσότερα είδη φρούτων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων διαδεδομένων υπερτροφών όπως τα δαμάσκηνα, τα βατόμουρα και τα cranberries. Η γεύση των καρπών της αρώνιας είναι ιδιαίτερη και ευχάριστη. Εξαιτίας των ταννινών που περιέχουν παρουσιάζουν επίσης μια στυπτικότητα αρκετά αισθητή. Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (όπως τα σταφύλια ή τα κεράσια) και σε οξέα, που όμως δεν είναι εύκολα αντιληπτά γευστικά (Everhart, 2009).

#### 2.1.1 Ταξινόμηση του φυτού αρώνια

Η Αρώνια (*Aronia melanocarpa* ή black chokeberry) είναι ένας φυλλοβόλος, καρποφόρος θάμνος της οικογένειας των Ροδοειδών (Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα [Magnoliophyta], Ομοταξία: Δικοτυλίδονα [Magnoliopsida], Τάξη: Ροδώδη [Rosales], Οικογένεια: Ροδοειδή [Rosaceae])

Η συστηματική ταξινόμηση του φυτού έχει ως εξής (Σπανός Ι., 2011):

<b>ΒΑΣΙΛΕΙΟ</b>	ΦΥΤΑ
<b>ΚΛΑΣΗ</b>	ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΑ – ΔΙΚΟΤΥΛΗΔΟΝΑ
<b>ΤΑΞΗ</b>	ROSALES
<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	ROSACEAE
<b>ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	ΑΜΥΓΔΑΛΟΕΙΔΗ
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	ARONIA

Τρία είναι τα είδη (species) που μας απασχολούν, τα εξής :

- *Aronia arbutifolia*
- *Aronia melanocarpa* και
- *Aronia prunifolia*

#### 2.1.2 Συστηματική βοτανική του φυτού

Το είδος *Aronia melanocarpa* είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος με πλευρική ανάπτυξη. Το ενήλικο φυτό έχει ύψος που κυμαίνεται από 2 έως 3 μέτρα με πλευρική ανάπτυξη 1 έως 1,5 μέτρα επί της γραμμής φύτευσης. Η ετήσια βλάστηση δεν ξεπερνά τα 30 cm, ενώ αναπτύσσει

ευρύ ριζικό σύστημα που χαρακτηρίζεται από την κεντρική πασσαλώδη ρίζα και πολλές επιφανειακές και λεπτές ρίζες ενώ σχηματίζει πολλές παραφυάδες. Τα φύλλα είναι έχουν σχήμα ελλειπτικό (2-6εκ. μήκος και 1-4εκ. πλάτος) χρώματος πράσινου το καλοκαίρι, ενώ το φθινόπωρο παίρνουν κόκκινες αποχρώσεις ( όπως πορτοκαλί, ροδοκόκκινο, απαλό ροζ). Το φυτό ανθίζει τον Ιούλιο – Αύγουστο σχηματίζοντας ταξιανθίες κόρυμβου με λευκά άνθη που αποτελούνται από 5 πέταλα και 5 σέπαλα. Οι περισσότερες ποικιλίες είναι αυτογονιμοποιούμενες. Ο καρπός είναι μικρός (7-10 mm), στρογγυλού σχήματος, χρώματος απαλού μαύρου στην αρχή και σκούρου μαύρου όταν ωριμάζει. Σε κάθε καρπό περιέχονται 1-5 σπέρματα. Η ωρίμανση του καρπού λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο έως Δεκέμβριο. Στην Ελλάδα ωριμάζει πρώιμα (Αύγουστο - Σεπτέμβριο). Η παραγωγή καρπών αρχίζει από το τρίτο έτος και σταδιακά αυξάνεται (Σπανός Ι., 2011; Νάνος Γ., 2014).

Οι πιο συχνά καλλιεργούμενες ποικιλίες περιλαμβάνουν τις Viking, Nero, και Aron οι οποίες ενδείκνυνται για την μαζική παραγωγή καρπών (Kokotkiewicz A. et al., 2009). Οι διαθέσιμες ποικιλίες στην Ελλάδα είναι οι Viking και Nero, με προτεινόμενη την πρώτη λόγω του ανθεκτικότερου χαρακτήρα της σε υψηλές θερμοκρασίες και του μεγέθους των καρπών της (Μπάρδας Γ., 2012).

### 2.1.3 Συγκομιδή και επεξεργασία

Η συγκομιδή των καρπών της αρώνιας στην Ελλάδα γίνεται χειρωνακτικά με την βοήθεια ειδικής χτένας τον Αύγουστο έως τα μέσα Σεπτεμβρίου. Η απόδοση κυμαίνεται από 3 έως και 10 κιλά εμπορεύσιμων καρπών το 3ο έτος ενώ στο 5ο έτος που το φυτό έχει αναπτυχθεί πλήρως η απόδοση κυμαίνεται στα 10 κιλά/φυτό (Νάνος Γ., 2014). Οι καρποί διατηρούνται νωποί σε ψυγεία στους 2 °C έως 3 μήνες ή διατηρούνται σε καταψύκτες για μεγάλα χρονικά διαστήματα και πωλούνται ως 20 κατεψυγμένοι. Επιπλέον, οι καρποί μπορούν να αποξηραθούν και να πωληθούν σε μορφή σταφίδας ή μπορούν να μεταποιηθούν σε άλλα εμπορεύσιμα προϊόντα, όπως μαρμελάδες, χυμούς, σιρόπι ή κρασί.







Εικόνα 1: Άνθος, φυτό και καρπός αρώνιας.

#### 2.1.4 Χρήσεις – Προϊόντα

Η αρώνια η μελανόκαρπη καλλιεργείται κυρίως για τους καρπούς της (νωποί, καταψυγμένοι και αποξηραμένοι σε μορφή σταφίδας). Οι καρποί της αρώνιας έχουν ξινή γεύση και στυπτικές ιδιότητες, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλους για επεξεργασία, αντί για άμεση κατανάλωση. Λόγω του υψηλού περιεχομένου τους σε ανθοκυανίνες, οι καρποί της αρώνιας μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως συστατικό αντιοξειδωτικών χυμών που προάγουν την υγεία, τσαγιών, και τονωτικών ροφημάτων. Έχει επιβεβαιωθεί ότι η έκθεση του χυμού της αρώνιας σε θερμοκρασία 60°C για 8 ώρες έχει ως αποτέλεσμα μείωση κατά 30% στα επίπεδα των ανθοκυανινών και απώλεια των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Για να αποφευχθεί αυτό, γρήγοροι και συντηρητικοί μέθοδοι ξήρανσης θα πρέπει να εφαρμόζονται. Για την σταθεροποίηση του χρώματος και του περιεχομένου των ανθοκυανινών στους χυμούς αρώνιας, μπορεί να προστεθεί κατά την επεξεργασία ρίζα από *Scutellaria baicalens* που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή. Αυτή η διαδικασία βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα των χυμών της αρώνιας όσον αφορά τη σταθερότητα χρώματος και το περιεχόμενο των ανθοκυανινών (Kokotkiewicz A et al., 2009).

#### 2.1.5 Παραγωγή φυσικού χυμού αρώνιας

Ο φυσικός χυμός της αρώνιας παράγεται με τον ίδιο τρόπο που παράγεται ο χυμός μούρων φράουλας. Η διαδικασία ξεκινάει με την απόψυξη και το πλύσιμο των καρπών. Εν συνεχεία, οδηγούνται σε μία ταινία μεταφοράς, όπου απομακρύνονται και τα άγουρα ή σάπια κλάσματα. Οι καρποί καταλήγουν σε έναν σπαστήρα και παράγεται ο πολτός ο οποίος μεταφέρεται σε έναν προθερμαντήρα. Η θέρμανση βοηθά τους φυτικούς ιστούς να μαλακώσουν, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της διεργασίας και επιπλέον αναστέλλει τη δράση των ενζύμων που μπορεί να καταλύσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις στον πολτό, όπως την αμαύρωση. Στο στάδιο αυτό, είναι αρκετά συχνή η επιπλέον κατεργασία του πολτού με ένζυμα χυμοποίησης (Cellubrix, Pectinex Ultra SPL, Crystalzyme κ.α). Τα ένζυμα μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της απόδοσης χυμοποίησης έως και 20% και στη διαύγαση των χυμών, ενώ έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζουν καθόλου την τιμή της ολικής περιεκτικότητας σε στερεά και της περιεκτικότητας σε σάκχαρα (Siddiq et al., 2018). Για το διαχωρισμό του πολτού σε χυμό και πυρήνα (υπόλειμμα χυμοποίησης) εφαρμόζεται φυγοκέντρηση ή συμπίεση σε πρέσα με διηθητικά φίλτρα. Τέλος, ο χυμός αποστέλλεται για απαέρωση, παστερίωση και συσκευασία.



(α)



(β)

Εικόνα 2: (α) Ο φυσικός χυμός της αρώνιας, (β) το παραπροϊόν της χυμοποίησης έπειτα από ξήρανση και κονιοποίηση

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί εξίσου και στο υπόλειμμα της χυμοποίησης (πυρήνας αρώνιας), παραπροϊόν της διεργασίας το οποίο συχνά απορρίπτεται. Ο πυρήνας της αρώνιας είναι ένα υλικό πολύ πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά, με σημαντικές προοπτικές ως προς την αξιοποίησή του. Από αυτό, δύναται να παραχθούν κόνεις εκχυλισμάτων πλούσιες σε πολυφαινόλες και κυρίως ανθοκυανίνες, μέσω υποβολής του εκχυλίσματος σε λυοφιλίωση (freeze drying) ή ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) (Vagiri et al., 2017). Ιδιαίτερο ρόλο στην ποιότητα του τελικού εκχυλίσματος από τον πυρήνα παίζουν όχι μόνο οι συνθήκες εκχύλισης, αλλά και οι διεργασίες που έχουν προηγηθεί, κατά την παρασκευή του χυμού. Κατά την χυμοποίηση, το 50% του καρπού αποδίδεται στον χυμό και το άλλο 50% στην πούλπα, η οποία απορρίπτεται.

#### 2.1.6 Θρεπτική αξία και χημική σύσταση καρπού αρώνιας

Ο καρπός της αρώνιας είναι βρώσιμος και είναι πηγή θρεπτικών συστατικών (Πίνακας 1). Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι ο χυμός της αρώνιας είναι πλουσιότερος σε κάλιο συγκριτικά με τους υπόλοιπους χυμούς φρούτων (Sidor A. et al, 2019) αλλά δεν διαθέτει υψηλή συγκέντρωση φυτικών ινών όπως διαθέτει ο καρπός της (3.4- 5.8 g/kg). Ακόμη, τα ποσοστά πηκτίνης που βρίσκονται στον καρπό καταστρέφονται κατά τη διεργασία παρασκευής του χυμού. Η χαρακτηριστική στυφή γεύση του καρπού και του χυμού οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών (φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα ανθοκυανινών).

#### 2.1.7 Η αρώνια ως υπερτροφή

Η αρώνια έχει αναγνωριστεί ως φαρμακευτικό είδος και στην διεθνή κλίμακα των φαρμακευτικών φυτών (1-5) κατέχει τις πρώτες θέσεις (κλίμακα 1). Η χημική της σύσταση αποτελεί έναυσμα για την διεξαγωγή ερευνών σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες που μπορεί να έχει στην υγεία. Τα μούρα αρώνιας παρουσιάζουν αυξημένη δημοτικότητα μεταξύ καταναλωτών που αναζητούν να προσθέσουν υπερτροφές στη διατροφή τους. Οι καρποί της αρώνιας είναι, όπως και τα περισσότερα μούρα, πλούσιοι σε αντιοξειδωτικά συστατικά, και συγκεκριμένα σε ανθοκυανίνες και προκυανιδίνες τα οποία αποτελούν και τα δραστικά συστατικά των μύρτιλων και του εκχυλίσματος σταφυλιού. Οι ανθοκυανίνες έχουν επιδείξει αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και κυτταροπροστατευτική δράση, βοηθώντας στην

αντιμετώπιση της συστηματικής φλεγμονής που σχετίζεται με διάφορες χρόνιες παθήσεις όπως ο διαβήτης, οι καρδιοπάθειες και η παχυσαρκία. Η αρώνια έχει, μάλιστα, τη δεύτερη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες συγκριτικά με όλα τα μούρα.

### 2.1.8 Διατροφική αξία καρπών

Η θρεπτική αξία των καρπών της αρώνιας είναι πολύ υψηλή σε σάκχαρα και φυτικές ίνες κατά κύριο λόγο, ενώ περιέχονται σημαντικά ποσά καλίου, μαγνησίου, βιταμίνης C και βιταμίνης K. Πιο αναλυτικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα τα θρεπτικά συστατικά του καρπού ανά 100 γραμμάρια προϊόντος.

Πίνακας 1: Διατροφική αξία καρπών αρώνιας ανά 100 g (USDA National Nutrient database)

Σύσταση	Θρεπτική αξία	Ποσοστό συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης (RDA)
Ενέργεια	47 Kcal	2.5%
Υδατάνθρακες	9.6 g	7%
Πρωτεΐνη	1.4 g	2.5%
Φυτικές ίνες	5.3 g	14%
Χοληστερόλη		
Λίπη	0.5 g	2%
Νάτριο	1 mg	0%
Κάλιο	162 mg	3%
<b>Μέταλλα</b>		
Ασβέστιο	30 mg	3%
Σίδηρος	0.62 mg	8%
Μαγνήσιο	20 mg	5%
Μαγγάνιο	0.646 mg	32%
Ψευδάργυρος	0.53 mg	5%
Ιώδιο	-	-
<b>Βιταμίνες</b>		
Βιταμίνη C	21 mg	35%
Βιταμίνη A	214 IU	7%
Βιταμίνη E	1.17 µg	8%
Βιταμίνη K	19.8 µg	17%
Φολικό οξύ	25 µg	6%

## 2.2 Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις ως βιοδραστικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κύριες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Περιλαμβάνουν πλήθος ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργικότητά τους.

Ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά, αποτελώντας μια τάξη ενώσεων στην οποία ανήκουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (Παπαγεωργίου, 2005). Ο γενικός ορισμός τις περιγράφει ως ενώσεις με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες σε ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή. Στα μη φλαβονοειδή περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα.

Οι φαινολικές ενώσεις περιέχονται κατά βάση σε φυτικούς ιστούς και είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά (Parr & Bolwell, 2000). Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια πολύ μεγάλη υποκατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.

Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (ασταθείς δραστικές ενώσεις που διαθέτουν ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα). Οι ελεύθερες ρίζες συχνά προκαλούν βλάβες στα κύτταρα του οργανισμού, γνωστές ως «οξειδωτικό στρες», οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε ένα πλήθος χρόνιων παθήσεων όπως αθηροσκλήρωση, φλεγμονώδεις νόσους, καρκίνο και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά να δωρίσουν ρίζες υδρογόνου και, ως εκ τούτου, λειτουργούν ως «σαρωτές» και έπειτα «δεσμευτές» ελεύθερων ριζών (Jurikova et al., 2017).

### 2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Τα φαινολικά οξέα λειτουργούν ως ουσίες που τερματίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και λόγω της ιδιότητάς τους να λειτουργούν ως χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων, είναι ικανά να καταλύουν την υπεροξειδάση των λιπιδίων. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (PPH) εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων, αποδίδοντας ταχύτατα ένα άτομο υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες ( $ROO\bullet$ ,  $RO\bullet$ ) όπως φαίνεται και στις παρακάτω αντιδράσεις :



Επίσης, τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και έτσι δεν είναι εύκολο να ξεκινήσει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Τα ενδιάμεσα της φαινόξυ- 2. ρίζας δρουν ακόμη ως ουσίες τερματισμού του πολλαπλασιασμού των ριζών μέσω της αντίδρασής τους με άλλες ελεύθερες ρίζες.



Ωστόσο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, υψηλό pH, παρουσία σιδήρου), τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εκκινήσουν μια πορεία αυτοοξείδωσης και να συμπεριφερθούν ως προοξειδωτικά (Shahidi & Wanasundara, 1992). Η ικανότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή (Assimopoulou et al., 2005). Η φαινόλη η ίδια είναι ανενεργή σαν αντιοξειδωτικό, αλλά τα ορθό- και παρα- διαφαινολικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αυξάνει με την αντικατάσταση ατόμων με αιθυλ- ή η-βουτυλο-ομάδες (Shahidi & Wanasundara, 1992). Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική δράση:

- Μία ο-διφαινολική ομάδα στο δακτύλιο B, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων.
- Έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξο δράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από τον β δακτύλιο.
- Υδροξυλάσες στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξο δράση στους A και C δακτυλίους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (Ratty & Das, 1988).

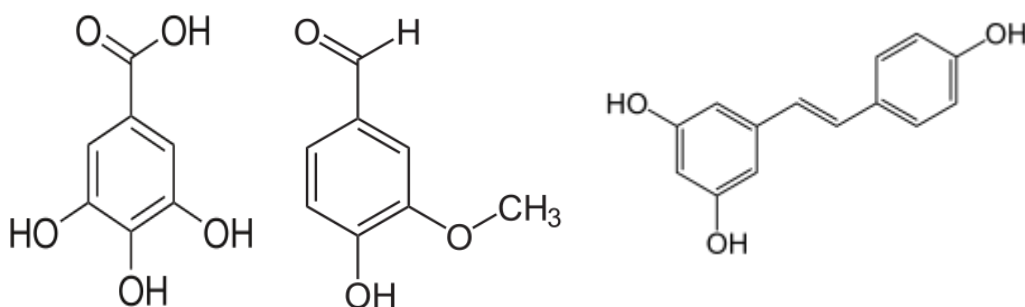
### 2.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών

Ενώ οι πολυφαινόλες είναι πολύ κοινά συστατικά στο διαιτολόγιο των ανθρώπων, δεν είναι και τα πιο ενεργά μέσα στο σώμα, είτε γιατί έχουν μικρή εσωτερική δραστηριότητα είτε γιατί απορροφούνται μόνο ελάχιστα από το έντερο, μεταβολίζονται έντονα ή απομακρύνονται γρήγορα. Επίσης, οι μεταβολίτες που υπάρχουν στο αίμα και στα όργανα σχηματίζονται από τη δραστηριότητα του στομάχου ή του ήπατος και μπορεί να διαφέρουν από τις αρχικές ενώσεις όσο αφορά στη βιολογική δραστηριότητα. Γι' αυτό το λόγο οι γνώσεις της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών είναι ουσιώδεις για την κατανόηση της επίδρασής τους στον ανθρώπινο οργανισμό (Manach et al., 2004). Οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Έμμεσα στοιχεία που δείχνουν την απορρόφησή τους από το έντερο είναι η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες (Assimoroulou et al., 2005). Αυτό έχει παρατηρηθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως είναι το τσάι (Ghiselli et al., 1995; Serafini et al., 1996), το κόκκινο κρασί (Duthie et al., 1998; Fuhrman et al., 1995; Maxwell et al., 1994; Serafini et al., 1998; Whitehead et al., 1995), η αρώνια (Simić et al., 2016; Vagiri & Jensen, 2017; Wu et al., 2004), η μαύρη σταφίδα και ο χυμός μήλου (King & Young, 1999). Πιο εμπειριστωμένα στοιχεία της βιοδιαθεσιμότητας μερικών φαινολικών συστατικών προκύπτουν από τη μέτρηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα και στα ούρα μετά την κατανάλωση είτε των ίδιων είτε τροφίμων που περιέχουν τα συστατικά αυτά. Η χημική δομή των πολυφαινολών καθορίζει το βαθμό και την έκταση της απορρόφησης από το έντερο και τη φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Ορισμένες μελέτες της βιοδιαθεσιμότητας στους ανθρώπους δείχνουν ότι οι ποσότητες των πολυφαινολών που βρίσκονται ανέπαφες στα ούρα ποικίλουν ανάλογα με τη φαινολική ένωση. Τα επίπεδα είναι ιδιαίτερος χαμηλά για την κερκετίνη και τη ρουτίνη, ένα γλυκοζίτη της κερκετίνης (0.3-1.4%), αλλά οι τιμές είναι μεγαλύτερες για τις κατεχίνες στο πράσινο τσάι, τις ισοφλαβόνες στη σόγια, τις φλαβονόνες στα εσπεριδοειδή ή τις ανθοκυανίνες στο κόκκινο κρασί (3-26%) (Wang et al., 1989). Από τις πολυφαινόλες που φτάνουν στον οργανισμό με την τροφή, μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-25%) παρατηρείται στα ούρα. Αυτό δείχνει είτε ότι δεν έχουν απορροφηθεί μέσω του εντέρου είτε ότι μεταβολίσθηκαν από τη χλωρίδα του στομάχου ή από τους ιστούς του σώματος. Οι ίδιες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των ανέπαφων φλαβονοειδών στο ανθρώπινο πλάσμα σπάνια υπερβαίνει το 1 mM, όταν οι ποσότητες των πολυφαινολών που απορροφούνται δεν υπερβαίνουν αυτές που συνήθως απορροφούνται με τη διατροφή. Αυτές οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρούνται συνήθως 1-2 ώρες μετά την κατανάλωση (Aziz et al., 1998; Hollman et al., 1996; Kivits et al., 1997). Εξαιρεση αποτελούν οι πολυφαινόλες που απορροφούνται μόνο μετά από μερική αποικοδόμηση από την εντερική χλωρίδα. Όσο αφορά στη ρουτίνη, η μέγιστη συγκέντρωση της κερκετίνης στο πλάσμα επιτυγχάνεται 9 ώρες μετά την κατανάλωση (Hollman, 2004). Για τα περισσότερα φλαβονοειδή που απορροφούνται από το λεπτό έντερο, η συγκέντρωση στο πλάσμα μειώνεται ταχέως. Η διατήρηση της υψηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα απαιτεί επαναλαμβανόμενη κατανάλωση πολυφαινολών, όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα που έγιναν σε εθελοντές που κατανάλωναν τσάι κάθε δύο ώρες (van het Hof et al., 1999) αν και ο χρόνος ημιζωής των μεταβολιτών που σχηματίζονται στην εντερική χλωρίδα είναι μεγαλύτερος, λόγω του μεγαλύτερου χρόνου παραμονής των πολυφαινολών στο κόλον (Bermúdez-Soto et al., 2007). Χρειάζονται περισσότερες από δύο μέρες για την εντεροδιόλη και την εντερολακτόνη (Nesbitt et al., 1999) να φτάσουν στη βασική συγκέντρωση στο πλάσμα και στα ούρα μετά από κατανάλωση γάλακτος από σόγια και λιναρόσπορο.

### 2.2.3 Φαινολικά οξέα

Οι ενώσεις αυτές περιλαμβάνουν τα υδροξυ- και μεθοξυ-παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως για παράδειγμα τα κουμαρικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε πολλά φυτά τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και ως εστέρες με διάφορους υδατάνθρακες.

- **Βενζοϊκά οξέα, C6-C1:** π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, **γαλλικό οξύ** (εικ.2), συριγγικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ
- **Βενζαλδεΐδες, C6-C1,** με αλδευδομάδα στη θέση της καρβοξυλομάδας: **βανιλίνη** (εικ.2), συριγγική αλδεΐδη
- **Κινναμωμικά οξέα, C6-C3:** κινναμωμικό οξύ, ρ-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ
- **Κινναμωμικές αλδεΐδες, C6-C3,** με αλδεΐδομάδα στη θέση της καρβοξυλομάδας : σιναπαλδεΐδη
- **Στιλβένια**
- **trans-ρεσβερατρόλη** (εικ.3), **cis-ρεσβερατρόλη.**
- **Τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη**
- **Υδρολυομένες τανίνες**
- **Υδρολυομένες τανίνες:** ένα μόριο σακχάρου (κυρίως γλυκόζη) ή πολυσακχαρίτη, με πολλά υδροξύλια εστεροποιημένα με φαινολικά οξέα (κυρίως γαλλικό ή ελλαγικό οξύ).



Εικόνα 3: Χημικός τύπος γαλλικού οξέος, βανιλίνης και ρεσβερατρόλης

### 2.2.4 Φλαβονοειδή

Ο όρος φλαβονοειδή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες όπως τις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή. Στα φλαβονοειδή περιλαμβάνονται ενώσεις που οι δομές του περιλαμβάνουν C6-C3-C6 και αυτές είναι:

- **Φλαβόνες:** απιγενίνη, λουτεολίνη
- **Φλαβονόλες:** κερκετίνη, καμφερόλη
- **Φλαβανόνες:** ναρινγκενίνη, εσπεριτίνη
- **Φλαβανονόλες:** ταξιφολίνη
- **Φλαβανόλες-3 (κατεχίνες):** κατεχίνη, γαλλοκατεχίνη

- **Φλαβανοδιόλες-3,4:** προκυανιδίνη, προδελφιδίνη, προμαλβιδίνη
- **Ανθοκυανίνες:** κυανιδίνη, δελφινιδίνη, παιονιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη, μονογλυκοζίτης-3-μαλβιδίνη, διγλυκοζίτης-3,5 μαλβιδίνη
- **Τανίνες:** από πολυμερισμό φλαβονολών-3, φλαβανοδιολών-3,4.

## 2.3 Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της αρώνιας

### 2.3.1 Τα φαινολικά οξέα στον καρπό της αρώνιας

Γενικά, τα μούρα είναι μια πλούσια πηγή υδροξυκιναμικών οξέων (παράγωγα του κινναμικού οξέος). Το κύριο φαινολικό οξύ του καρπού της αρώνιας είναι το χλωρογενικό οξύ, το οποίο αποτελείται από ένα μόριο καφεϊκού οξέος και ένα μόριο κινικού οξέος συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό. Μαζί με το νεοχλωρογενικό οξύ, θεωρούνται οι κυριότερες μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα μούρα της αρώνιας (Ochmian et al., 2009)

### 2.3.2 Τα φλαβονοειδή στον καρπό της αρώνιας

Οι κύριες υποομάδες φλαβονοειδών που ταυτοποιούνται στον καρπό της αρώνιας είναι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβονόλες (κατεχίνες). Ομοίως με την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, η περιεκτικότητα της αρώνιας σε φλαβονοειδή είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη σε κάθε άλλο είδος της οικογένειάς της (Jakobek et al., 2007).

### 2.3.3 Ανθοκυανίνες

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον γύρω από τη σύσταση της αρώνιας εστιάζεται στις ανθοκυανίνες που περιέχει και που εντοπίζονται στον καρπό με τη μορφή ανθοκυανιδινών (γλυκοζυλιωμένα μόρια ανθοκυανών). Οι μελέτες των Oszmiański et al. (2005) έδειξαν ότι η περιεκτικότητα του καρπού σε ανθοκυανίνες ανέρχεται στο 25 % κ.β. επί της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις, ενώ λίγο αργότερα οι Jakobek et al. (2007) διαπίστωσαν ότι το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να φθάσει και το 41 %. Η κύρια ανθοκυανιδίνη της αρώνιας είναι ο 3-Ο-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης, ακολουθούμενος από τον 3-Ο-αραβινοζίτη της κυανιδίνης και σε μικρότερες περιεκτικότητες οι 3-Ο-γλυκοζίτης και 3-Ο-ξυλοζίτης της κυανιδίνης (Wu et al., 2004).

### 2.3.4 Φλαβονόλες

Εντοπίζονται στον καρπό σε χαμηλότερες περιεκτικότητες από τις ανθοκυανιδίνες. Οι κυριότερες ενώσεις που τις εκπροσωπούν στον καρπό της αρώνιας βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και είναι οι: 3-γαλακτοζίτης της κερκετίνης (υπεροζίτης), 3-γλυκοζίτης της κερκετίνης (ισοκερκετίνη) και ο 3-ρουτινοζίτης της κερκετίνης (ρουτίνη). Σε πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα εντοπίζονται και άλλες ενώσεις όπως η καμπφερόλη. Οι φλαβονόλες έχει βρεθεί ότι καταλαμβάνουν περίπου το 10% της κατά βάρος συνολικής περιεκτικότητας του καρπού σε φαινολικά συστατικά (Jakobek et al., 2007).

### 2.3.5 Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες απαντώνται στην αρώνια κυρίως ως υπομονάδες πολυμερών προανθοκυανιδινών της φλαβαν-3-όλης (συμπυκνωμένες ταννίνες). Οι υπομονάδες συνδέονται κυρίως με C4-C6 και C4-C8 δεσμούς και ο βαθμός πολυμερισμού ποικίλλει από 2 έως 23 μονάδες. Φλαβανόλες υπάρχουν επίσης και σε ελεύθερη μορφή στον καρπό (κατεχίνες και επικατεχίνες), ωστόσο η συγκέντρωσή τους είναι σημαντικά χαμηλότερη (Bräunlich et al., 2013).

Πίνακας 3: Σύγκριση σύστασης καρπών, πούλπας, χυμού και φύλλων του φυτού αρώνιας ως προς τα φαινολικά συστατικά τους (Tomislav Jurendic & Mario Scetar, 2021)

Φαινολικά συστατικά	Φρούτα	Φρούτα	Πούλπα	Χυμός	Φύλλα
	mg/100 g επί ξηρού βάρους	mg/100 g επί νωπού βάρους	mg/100 g επί ξηρού βάρους	mg/100 g επί ξηρού βάρους	mg/100 g επί ξηρού βάρους
<b>Φλαβον-3-όλες</b>					
(-)-Epicatechin	15	32	11	13	
Procyanidins	5182	1646	8192	1579	
Degree polymerization (DP)	23	59	34	23	
<b>Ανθοκυανίνες</b>					
Cyanidin-3-O-galactoside	19-1282	417-636	1120	787	0,2-2
Cyanidin-3-O-glucoside	0,3-42	8-27	79	28	
Cyanidin-3-O-arabinoside	6,2-582	129-299	533	324	0,2
Cyanidin-3-O-xyloside	53	29-38	105	34	
<b>Φαινολικά οξέα</b>					
Chlorogenic acid	16-302	72-111	204	416	184-706
Neochlorogenic acid	92-291	59-100	169	393	143-483
Dihydroxyphenylacetic acid	4-26				5,8-66
Protocatechuic acid	0,4-31				2-9
Rosmarinic acid	23				155
<b>Φλαβονόλες</b>					
Quercetin	12-44	7.1			83-316
Quercetin-3-O-galactoside	37	7-13	47	50	
Quercetin-3-O-glucoside	22	4	27	31	
Quercetin-3-O-rutinoside	15	4	14	28	62-103
Quercetin-3-O-rhamnoside					97-367
Quercetin-3-O-vicianoside		3-5			
Quercetin-3-O-robinobioside		1-5			
Quercetin derivatives unidentified	27		82	47	
Kaempferol		0,5			
<b>Φλαβονόνες</b>					
Eriodictyol-7-O-glucuronide		24			



### 2.3.6 Σύγκριση με άλλα μούρα

Η προσοχή των ερευνητών έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια προς την αρώνια λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα ανθοκυανίνες με τη μορφή παραγώγων κυανιδίνης (Jakobek et al., 2011).

Η αρώνια, αρχικά, διαθέτει υψηλό συνολικό πολυφαινολικό φορτίο (Total Polyphenols - TP). Οι Jakobek et al. (2011), Rop et al. (2010), Benvenuti et al. (2004) και οι Zheng et al. (2003) προσδιόρισαν το πολυφαινολικό φορτίο της αρώνιας και διαπίστωσαν ότι κυμαίνεται από 690 έως 2560 mgGAE (GAE = Gallic Acid Equivalents - ισοδύναμα γαλλικού οξέος) ανά 100 g φρέσκου καρπού. Το εύρος τιμών αυτό είναι αρκετά υψηλότερο από το αντίστοιχο σε κάθε άλλο φυτό της οικογένειάς των Ροδοειδών στην οποία ανήκει, πολλά εκ των οποίων θεωρούνται μάλιστα υπερτροφές (βατόμουρα, σμέουρα, φράουλες, cranberries κ.α.).

Τα φρούτα ποικίλλουν ως προς τις τιμές του pH, την οξύτητα, το βάρος και το χρώμα. Μερικά φρούτα είναι πιο πλούσια σε ολικές φαινολικές ουσίες από άλλα. Για παράδειγμα, τα φραγκοστάφυλα και οι φράουλες έχουν υψηλές συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών (322,4 και 335,47 mg GAE/100 g φρέσκων φρούτων, αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν τα βύσσινα, τα σμέουρα και τα κεράσια (95.20 mg GAE/100 g φρέσκου καρπού) (Samec & Piljac-Zegarac, 2010). Τα βατόμουρα έχουν πολλές φαινολικές ουσίες, οι οποίες είναι παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται στα σμέουρα. (Pantelidis et al., 2007). Οι Lin και Tang (2007) μελέτησαν τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά τεσσάρων διαφορετικών ειδών φρούτων και διαπίστωσαν ότι η αρώνια (ένας τύπος μούρων) είναι μια πλούσια πηγή φαινολικών. Στη συνέχεια, μελέτησαν τα μούρα, τα δαμάσκηνα και τις φράουλες και διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο καλλιέργειας του καρπού και τον τρόπο εξαγωγής του. Επιπλέον, οι κλιματικές και καλλιεργητικές συνθήκες (τύπος εδάφους, έκθεση στο ηλιακό φως και επίπεδα υγρασία), καθώς και ο γενότυπος μπορούν να επηρεάζουν σημαντικά τη σύνθεση του καρπού (Dey & Harborne, 1997). Οι Samec και Piljac-Žegarac (2011) στην έρευνα τους παράλληλα με τα ολικά φαινολικά προσδιόρισαν και τα ολικά φλαβονοειδή σε διάφορους καρπούς και παρατήρησαν ότι καρποί με υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά δεν είναι απαραίτητα υψηλής περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή. Φαίνεται ότι στη φαινολική σύσταση των εξεταζόμενων καρπών συμμετέχουν τα φαινολικά οξέα και άλλα μη φλαβονοειδή συστατικά. Η αντιοξειδωτική δράση καθορίζεται από το είδος, την ποικιλία, την περιοχή, τις καιρικές συνθήκες, το στάδιο ωριμότητας, τις συνθήκες καλλιέργειας και συντήρησης των καρπών (Benvenuti et al., 2006). Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η αντιοξειδωτική ικανοτήτων διάφορων μικρών καρπών εκφραζόμενη σε μολ τροlox/g φρέσκου βάρους ήταν 160.2 για την αρώνια, (Zheng et al., 2003), 14.8–22.6 για τα βατόμουρα (Wang & Jiao, 2000), 36.9–93.1 για τα μαύρα φραγκοστάφυλα (Moyer et al., 2002), 16.8–42.3 για τα μύτριλα (Prior et al., 1998), 8.2–18.5 για τα cranberry (Wang & Stretch, 2001; Zheng et al., 2003), 7.39 για τα σταφύλια (Wang et al., 1996), 18.49 για τα σμέουρα (Proteggente et al., 2002) και 15.36 – 24.37 για τις φράουλες (Proteggente et al., 2002; Wang et al., 1996). Από τις παραπάνω μελέτες είναι φανερό ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των καρπών σε φαινολικά και ανθοκυανίνες και της αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας. Οι καρποί, με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητά τους, μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι καρποί με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, στην οποία ανήκουν οι φράουλες, τα φραγκοστάφυλα και τα σμέουρα και στη δεύτερη ομάδα, οι καρποί με χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως τα κεράσια και τα βύσσινα (Samec & Piljac-Žegarac, 2011). Η αρώνια φαίνεται να ανήκει στη πρώτη ομάδα, με τιμές παρόμοιες με αυτές των μαύρων φραγκοστάφυλων.

Πίνακας 4: Αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών.

Καρποί	Αντιοξειδωτική Ικανότητα (μmol trolox/g φρέσκου βάρους)
Αρώνια	160,2
Βατόμουρα	14.8–22.6
Φραγκοστάφυλλα	36.9–93.1
Μύρτιλα	16.8–42.3
Cranberry	8,2-18,5
Σταφύλια	7,39
Σμέουρα	18,49
Φράουλες	15,36-24,37

Πίνακας 5: Ολικό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες και πολυφαινόλες όπως προσδιορίστηκε από τους Jakobek et al. (2007) για 4 είδη συγγενών καρπών.

	Ολικές Ανθοκυανίνες – TA (mgCGE/kg)	Ολικές πολυφαινόλες – TP (mgGAE/kg)
Κόκκινο βατόμουρο	242 ± 3	1256 ± 133
Μαύρο βατόμουρο	1108 ± 6	2484 ± 234
Φράουλα	232 ± 10	1005 ± 56
Αρώνια	4341 ± 22	10637 ± 571

## 2.4 Οφέλη για την υγεία

Η αρώνια έχει μελετηθεί αρκετά, μέσα από μελέτες στο εργαστήριο, σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε ανθρώπους. Ιστορικά, η αρώνια έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή αλοιφών και επιθεμάτων κατά του κοινού κρυολογήματος. Σήμερα, φαίνεται ότι η κατανάλωσή της μπορεί να επιφέρει οφέλη στην υγεία μέσα από την μείωση τόσο της γενικευμένης οξειδωσης αλλά και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, της καλύτερης διαχείρισης του μεταβολισμού της γλυκόζης (μείωση των επιπέδων γλυκόζης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης στο αίμα) αλλά και της μείωσης της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Για τους παραπάνω λόγους, η αρώνια έχει μελετηθεί ως προς την αντιμετώπιση των καρδιοπαθειών, του διαβήτη αλλά και του καρκίνου.

### 2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των μούρων *Aronia* και των κύριων φαινολικών συστατικών τους έχει τεκμηριωθεί καλά πρόσφατα. Τα φυσικά αυτά προϊόντα αναστέλλουν την δραστηριότητα αρκετών τύπων ριζών μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης που συμβάλλουν σε άλλες βιοδραστηριότητες (Sidor & Gramza-Michalowska, 2019). Τα εκχυλίσματα και αρκετές φαινολικές ενώσεις των μούρων της αρώνιας έδειξαν δραστηριότητα δέσμευσης ριζών όταν δοκιμάστηκαν με 1,1-διφαινυλ-2-πικρυσυλδραζύλιο (DPPH) και ανέστειλαν επίσης την 15-λιποξυγενάση και την οξειδάση της ξανθίνης, οι οποίες είναι οξειδωτικές στη δράση τους. Οι φαινόλες της αρώνιας περιλαμβάνουν την ο-διφαινολική δομή, η οποία είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική δράση, καθώς προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων. Τα προοξειδωτικά ένζυμα, αντίστοιχα, οι πηγές αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) σε

αγγειακά κύτταρα (Sun et al., 2017). Παλαιότερα, αρκετές μικρές φαινολικές ενώσεις απομονώθηκαν από την αρώνια και τα μούρα στην ερευνητική μας ομάδα βρέθηκαν να έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν έγινε δέσμευση ριζών υδροξυλίου και η ομάδα κατεχόλης σε αυτές τις ενώσεις φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμεσολάβηση μιας τέτοιας ιδιότητας (Li et al., 2012). Η αντιοξειδωτική δράση των καρπών της αρώνιας έχουν επίσης διερευνηθεί σε μια κλινική δοκιμή σε 11 υγιείς ανθρώπους εθελοντές, που έπιναν καθημερινά 250 mL χυμού από μούρα Aronia (χυμός Aronia) για διάστημα τριών εβδομάδων. Η αντιοξειδωτική ικανότητα ορού των συμμετεχόντων αυξήθηκε σημαντικά όταν μετρήθηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο, όπου χρησιμοποιήθηκαν κατιόντα σταθερών ριζών DPPH (Nowak et al., 2012).

Οφέλη κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων

Μελέτες σε πληθυσμούς ασθενών με αυξημένες τιμές χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και αρτηριακής πίεσης έχουν δείξει μια πιθανή μείωση των επιπέδων αυτών των δεικτών μετά από 2 μήνες χορήγησης συμπληρώματος (300mg δραστικής ουσίας ημερησίως). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν, ωστόσο, μεγάλη διακύμανση και δεν φαίνεται να ισχύουν για τον υγιή πληθυσμό (Kasprzak-Drozd et al., 2021; Stojkovic et al., 2020; Stojkovic et al., 2021). Επιπλέον, η αρώνια φαίνεται να έχει αντιθρομβωτικές και αγγειοπροστατευτικές ιδιότητες οι οποίες ενισχύουν την καρδιοπροστατευτική της δράση, όπως αυτές φάνηκαν από μελέτες *in vitro*. Τέλος, σε ζωικά μοντέλα, η κατανάλωση αρώνιας φάνηκε να εμποδίζει τη συσσώρευση σπλαχνικού λίπους, το οποίο αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου.

#### 2.4.2 Οφέλη στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Η δράση της κατανάλωσης της αρώνιας όσον αφορά τον μεταβολισμό της γλυκόζης είναι από τις πιο καλά μελετημένες ως τώρα. Εδώ τα αποτελέσματα προέρχονται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα αλλά και ανθρώπους, όπου η κατανάλωση αρώνιας επέδειξε κλινικά σημαντική υπογλυκαιμική δράση. Σε μία μελέτη, μάλιστα, συμπληρωματική χορήγηση 200 ml άγλυκου χυμού από αρώνια για 3 μήνες φάνηκε να μειώνει την γλυκόζη αίματος κατά 31% και την γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη κατά 20% σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

#### 2.4.3 Οφέλη στην καταπολέμηση του καρκίνου

Όλες οι έρευνες σε αυτόν τον τομέα έχουν διεξαχθεί αποκλειστικά *in vitro*, δηλαδή σε εργαστήριο, όπου φαίνεται ότι το εκχύλισμα αρώνιας μπορεί να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσει την απόπτωσή (θάνατό) τους (Rugina et al., 2012; Gao et al., 2018). Ωστόσο, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να περιοριστούν στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάσουν τα υγιή κύτταρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν καταγραφεί από μελέτες σε σειρές καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου στήθους, τραχήλου, παχέος εντέρου και αίματος.

#### 2.4.4 Οφέλη από την αντιφλεγμονώδη δράση της

Όπως τεκμηριώθηκε σε προηγούμενες μελέτες, τα μούρα Aronia εμφανίζουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση για διάφορους τύπους λοιμώξεων, οι οποίες έχουν αποδοθεί στο ισχυρό αντιοξειδωτικό τους υποδοχέα (Sidor et al., 2021; Yang et al., 2021; Jurendic et al., 2019) . Για παράδειγμα, ήταν τόσο υδατικά όσο και αιθανολικά εκχυλίσματα μούρων Arónιας βρέθηκε ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των τροφιμογενών στελεχών του *Escherichia coli*, του *Staphylococcus aureus* και του *Streptococcus pyogenes* (Daoutidou et al., 2021) και των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων τους παρουσίασε διαφορετικά αντιμικροβιακά αποτελέσματα (Denev et al., 2019).

Οι αντιοξειδωτικές φαινολικές ενώσεις και τα τριτερπενοειδή των μούρων της Arónιας έχουν επίσης τεκμηριωθεί για πιθανή δράση έναντι του σοβαρού αναπνευστικού συνδρόμου του SARS-CoV-2. Για παράδειγμα, η δυνατότητα αντι-COVID-19 του ουρσολικού οξέος έχει περιγραφεί πρόσφατα, με βάση τους συγκεκριμένους μοριακούς στόχους και τη σηματοδότηση του σε διαφορετικά μονοπάτια (Al-Kuraishy et al., 2022). Με τη σειρά του, η δράση της κερσετίνης κατά του SARS-CoV-2 έχει αξιολογηθεί σε αρκετές κλινικές δοκιμές COVID-19.

Για να αξιολογηθούν τα οφέλη της κερσετίνης στην πρόληψη του COVID-19, σε ένα τυχαίο δείγμα, έγινε μία κλινική δοκιμή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ενός συμπληρώματος διατροφής με βάση την κερσετίνη, για την πρόληψη της μόλυνσης από COVID-19 για διάρκεια τριών μηνών». Το πείραμα ξεκίνησε στις 12 Ιανουαρίου 2021 και ολοκληρώθηκε στις 25 Μαΐου 2021.

## 2.5 Μέθοδοι προεπεξεργασίας του προς εκχύλιση υλικού

### 2.5.1 Ξήρανση

Η ξήρανση είναι μία μέθοδος συντήρησης τροφίμων που τις περισσότερες φορές προκαλεί σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος. Τα αποξηραμένα προϊόντα είναι γενικά φτωχότερα σε θρεπτικά συστατικά σε σχέση με τα φρέσκα από τα οποία προήλθαν, για αυτό και είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη και καθιέρωση νέων μεθόδων που θα μπορούν να διατηρούν αποδοτικότερα τα οργανοληπτικά στοιχεία, αλλά και τα ωφέλημα συστατικά. Τα εμπορικά προϊόντα αποξηραμένου καρπού arónιας παράγονται γενικά με συμβατικές μεθόδους ξήρανσης τροφίμων (ξήρανση στον ήλιο ή με ρεύμα θερμού αέρα). Τα διαλύματα που παραλαμβάνονται από τη χυμοποίηση του καρπού, ή από τις εκχυλίσσεις του καρπού και του πυρήνα αυτού, κονιοποιούνται συνήθως μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying). Ακολούθως παρουσιάζονται οι συνηθέστερες μέθοδοι ξήρανσης που εφαρμόζονται στην παραγωγή αποξηραμένων καρπών ή/και κόνεων.

#### 2.5.1.1 Ξήρανση στον ήλιο

Λαμβάνει χώρα κατά τους θερινούς μήνες, καθώς το προϊόν χρειάζεται να εκτεθεί για αρκετές μέρες στον ήλιο. Στην Ελλάδα λόγω κλίματος, η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην ξήρανση ενός πλήθους καρπών όπως τα σύκα και οι σταφίδες.

#### *2.5.1.2 Ξήρανση με ρεύμα θερμού αέρα*

Είναι η πιο συνήθης μέθοδος στη βιομηχανία τροφίμων για την ξήρανση φρέσκων καρπών. Οι καρποί τοποθετούνται σε σήραγγες, οι οποίες διαπερνώνται από ρεύμα αέρα θερμοκρασίας έως 75°C. Η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει από 3 έως 8 ώρες, ανάλογα με τη φύση του προϊόντος. Οι Petkovic et al. (2019) διαπίστωσαν ότι η ξήρανση της αρώνιας στους 50°C παρείχε σημαντικά καλύτερη διατήρηση των φαινολικών συστατικών της (και ιδίως των ανθοκυανίνων), από ότι σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (60 ή 70°C). Ωστόσο, οι ξηράσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες γενικά δεν προτιμώνται καθώς είναι πιο απαιτητικές σε ενέργεια και διάρκεια.

#### *2.5.1.3 Ξήρανση με λυοφιλίωση*

Επιτυγχάνεται με κατάψυξη στους -25°C μέχρι να επιτευχθεί η πλήρης στερεοποίηση του προϊόντος και εν συνεχεία εξάχνωση του περιεχόμενου νερού υπό συνθήκες υψηλού κενού. Ως αποτέλεσμα, παραλαμβάνονται υψηλής ποιότητας αφυδατωμένα προϊόντα, τα οποία διατηρούν πλήρως το σχήμα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλά και τα θρεπτικά συστατικά τους. Παρόλα αυτά, είναι μια διαδικασία ιδιαίτερα κοστοβόρα για αυτό και η χρήση της είναι περιορισμένη. Επιπλέον, τα προϊόντα διαθέτουν αρκετά μεγαλύτερο πορώδες σε σχέση με αυτά που έχουν ξηρανθεί με συμβατικές μεθόδους και είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην απορρόφηση υγρασίας εκ νέου (Harguindeguy & Fissore, 2019).

#### *2.5.1.4 Συμπύκνωση*

Εφαρμόζεται σε υγρά τρόφιμα (χυμοί φρούτων, γάλα κ.α) και στοχεύει στη μείωση του διαθέσιμου νερού του τροφίμου. Έτσι παράγονται προϊόντα μειωμένου όγκου και επιπλέον, με συνδυασμό κατάλληλης συσκευασίας, ελαττώνονται/αναστέλλονται οι φυσικοχημικές και βιολογικές δράσεις που προκαλούν την υποβάθμισή του. Συμβατική μέθοδος συμπύκνωσης είναι η θερμική μερική εξάτμιση, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί βελτιστοποιημένες τεχνικές κατάλληλες για θερμοευαίσθητα συστατικά. Ενδεικτικά αναφέρονται η εξάτμιση υπό κενό, η υπερδιήθηση (Ultrafiltration, UF) και η αντίστροφη όσμωση (Reverse osmosis, RO) (Ashurst P., 2016).

#### *2.5.1.5 Ξήρανση με ψεκασμό*

Χρησιμοποιείται στην παραγωγή κόνεων από υγρά τρόφιμα και είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ξήρανσης εκχυλισμάτων. Το υγρό τρόφιμο/εκχύλισμα μετατρέπεται σε νέφος μικρών σταγονιδίων μέσα σε θάλαμο, όπου ταυτόχρονα εισέρχεται αέρας υψηλής θερμοκρασίας (150°C και άνω). Η ξήρανση επιτυγχάνεται σε ελάχιστο χρόνο και παραλαμβάνονται κόκκοι σκόνης που προέρχονται από τα σταγονίδια του τροφίμου. Πολύ συχνά, η ξήρανση με ψεκασμό συνδυάζεται με εγκλεισμό των συστατικών του εκχυλίσματος σε αδρανή πολυμερή-φορείς. Ως αποτέλεσμα, τα ευαίσθητα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων προστατεύονται από την άμεση επαφή τους με το περιβάλλον, όντας στο εσωτερικό μεγαλύτερων δομών (μικροκάψουλες) και αυξάνεται η σταθερότητα της παραγόμενης σκόνης, άρα και η διάρκεια ζωής της (Vidović et al., 2019).

## 2.6 Η εκχύλιση ως φυσικοχημικό φαινόμενο

### 2.6.1 Γενικά για την εκχύλιση

Η εκχύλιση εφαρμόζεται για την παρασκευή ενός αφεψήματος, την παραλαβή ενός αρώματος, μιας χρωστικής, ή μιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας από μια φυτική πρώτη ύλη. Περιλαμβάνει την ανάμειξη του φυτικού υλικού με έναν διαλύτη και, στη συνέχεια, την παρακολούθηση καθώς οι διάφορες ουσίες αρχίζουν να διαλύονται. Μερικές από τις ουσίες που μπορούν να εξαχθούν με αυτόν τον τρόπο είναι έλαια, αρώματα και χρώματα. Το αρχικό μίγμα μπορεί να είναι ένα στερεό ή υγρό φυσικό υλικό ή ένα ακατέργαστο μίγμα μιας αντίδρασης. Ανάλογα με την περίπτωση, εφαρμόζεται και διαφορετική τεχνική.

Διάφορες μέθοδοι εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί με διάφορους στόχους, όπως αύξηση του ρυθμού εκχύλισης, μείωση του απαιτούμενου χρόνου, αυξημένη επιλεκτικότητα, χρήση μη-τοξικών για τον άνθρωπο ή το περιβάλλον διαλυτών, καλύτερα οικονομοτεχνικά αποτελέσματα κ.ά.

### 2.6.2 Μέθοδοι εκχύλισης

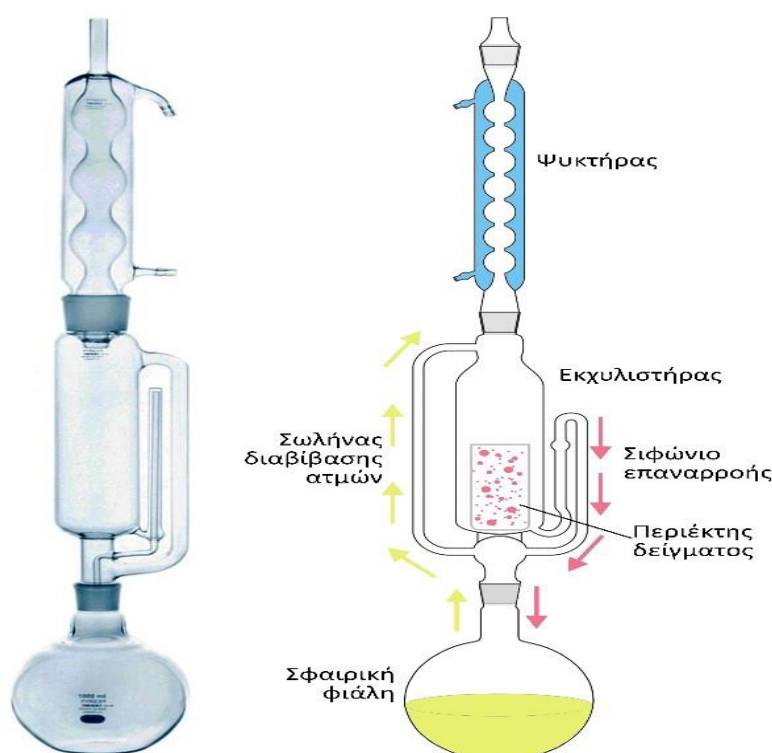
#### 2.6.2.1 Απλή ανάδευση

Ανάδευση είναι η μηχανική διεργασία, με την οποία παρέχεται κινητική ενέργεια στο ρευστό μέσω ενός αναδευτήρα για να επιταχυνθεί η διεργασία της ανάμιξης. Η διεργασία της απλής ανάδευσης έχει ως τελικό στόχο μια ομοιογενή διασπορά. Το διασπειρόμενο υλικό μπορεί να είναι της ίδιας ή διαφορετικής φάσης με το υλικό, μέσα στο οποίο γίνεται η διασπορά. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, το διασπειρόμενο υλικό ήταν σε στερεή μορφή, καρπός της αρώνιας σε μορφή σκόνης, και το μέσω διασποράς σε υγρή μορφή, οι διαφορετικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Σε πολλές διεργασίες, όπως στην εκχύλιση, που χρειάζεται να πραγματοποιηθεί διασπορά στερεών σωματιδίων μέσα σε ένα υγρό, όταν εισάγεται μια μάζα στερεών σωματιδίων μέσα στο προς ανάδευση δοχείο, αυτά συνήθως καθιζάνουν στον πυθμένα και το πρόβλημα της ανάδευσης και ανάμιξης του περιεχομένου του δοχείου είναι η διασπορά τους και ο σχηματισμός ενός διφασικού αιωρήματος. Όταν ο πυθμένας του δοχείου είναι επίπεδος, τα σωματίδια έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στις περιοχές, όπου οι ταχύτητες είναι μικρές, δηλαδή ακριβώς κάτω από τον αναδευτήρα και στις άκρες του, στο σημείο όπου ο πυθμένας συναντά τα πλάγια τοιχώματα του δοχείου. Γι' αυτόν το λόγο, για συστήματα διασποράς στερεών σε υγρά, προτιμώνται δοχεία με καμπύλο πυθμένα.

#### 2.6.2.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet πήρε το όνομα της από τον Γερμανό χημικό Franz Ritter Von Soxhlet και παρότι είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση λιπαρών ουσιών, σήμερα έχει εφαρμοσθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα και για την εκχύλιση άλλων ενώσεων. Σε αυτού του είδους εκχύλισης, ο διαλύτης διατηρείται σε ξεχωριστή φιάλη από το προς εκχύλιση δείγμα, θερμαίνεται και οι ατμοί του, αφού ψυχθούν, καταλήγουν στο δείγμα. Αφού συγκεντρωθεί μία συγκεκριμένη ποσότητα διαλύτη, αυτός εκτρέπεται στην αρχική φιάλη, ώστε να χρησιμοποιηθεί ξανά. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυνατότητα να εκχυλιστεί ένα υψηλότατο ποσοστό των προς εκχύλιση ενώσεων (γι' αυτό και αποτελεί τη

μέθοδο βάσης για τη σύγκριση άλλων μεθόδων εκχύλισης) και η χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών, λόγω της ανακυκλοφορίας αυτών (Azmir et al., 2013).



Εικόνα 4: Τυπική διάταξη εκχυλιστήρα Soxhlet. Σημειώνεται η πορεία των ατμών του καθαρού διαλύτη (κίτρινο) και το εμπλουτισμένου με εκχυλισμένα συστατικά υγρού (ροζ).

Η συσκευή Soxhlet αποτελείται από μια γυάλινη κυλινδρική φιάλη μέσα στην οποία τοποθετείται το προς εκχύλιση φυτικό υλικό μέσα σε ειδική «φύσιγγα» πολυκυτταρίνης, στην οποία τοποθετείται υαλοβάμβακας στο επάνω μέρος. Η κυλινδρική φιάλη είναι κλειστή στο κάτω μέρος της και επικοινωνεί με πλευρικό άνω σωλήνα με σφαιρική φιάλη ζέσεως που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής, η οποία με τη σειρά της επικοινωνεί με το άνω μέρος με κάθετο ψυκτήρα (Εικόνα 4). Στην σφαιρική φιάλη μεταφέρεται οργανικός διαλύτης, που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση και η φιάλη θερμαίνεται με θερμαντικό μανδύα μέχρι το σημείο βρασμού του διαλύτη. Οι ατμοί του διαλύτη περνάνε μέσω του πλευρικού σωλήνα που περιέχει την φύσιγγα με το δείγμα προς εκχύλιση, έτσι πραγματοποιείται ο πρώτος σιφωνισμός. Όταν όμως ο υγρός διαλύτης ξεπεράσει το ύψος της φύσιγγας επανέρχεται αυτόματα στην υποκείμενη σφαιρική φιάλη ζέσεως μέσω δεύτερου πλευρικού σωλήνα σιφωνισμού.

### 2.6.2.3 Εκχύλιση με διαβροχή

Η εκχύλιση με διαβροχή είναι ο ένας απλός και δημοφιλής τρόπος λήψης αιθέριων ελαίων και βιοδραστικών ενώσεων. Ποσότητα του προς εκχύλιση στερεού αναμειγνύεται σε δοχείο με κατάλληλο διαλύτη ώστε να παραληφθούν στον όγκο του διαλύτη τα επιθυμητά συστατικά. Συνήθως εφαρμόζεται ταυτόχρονη ανάδευση που προκαλεί α) ενίσχυση της διάχυση στους πόρους του στερεού και β) συνεχή αφαίρεση του εμπλουτισμένου με συστατικά διαλύματος από την επιφάνεια του στερεού ώστε να αντικαθίσταται με φρέσκο

διαλύτη και να αυξάνεται η απόδοση. Το στερεό παραπροϊόν της διαδικασίας στραγγίζεται ώστε να παραληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα εκχυλίσματος και τέλος το εμπλουτισμένο υγρό διηθείται ώστε να απομακρυνθούν υπολειπόμενα στερεά σωματίδια. (Azmir et al., 2013).

#### 2.6.2.4 Εκχύλιση με εφαρμογή πίεσης

Η εκχύλιση υπό πίεση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιεί υψηλότερες θερμοκρασίες από το σημείο βρασμού για να κάνει τον διαλύτη πιο διαλυτό. Αυτό βοηθά στην ευκολότερη μεταφορά της ουσίας από την υγρή στην αέρια φάση. Η πίεση μπορεί επίσης να βοηθήσει στην είσοδο του διαλύτη στη μήτρα, αλλά και στη μείωση του χαρακτηριστικού της μεγέθους, λόγω αποκοπής μικρών ή μεγάλων κομματιών, αν και αυτά τα οφέλη θεωρούνται αμελητέα (Gil-Chávez et al., 2013; Mustafa & Turner, 2011).

### 2.6.3 Τεχνικές προεπεξεργασίας για τη βελτίωση παραλαβής συστατικών από φυτικούς ιστούς

Τα κύρια μειονεκτήματα των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι η χαμηλή ταχύτητα, η απαίτηση διαλυτών υψηλής καθαρότητας, η χαμηλή εκλεκτικότητα και σε περίπτωση θέρμανσης η πιθανή αποσύνθεση θερμοευαίσθητων συστατικών. Στοχεύοντας στην αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, αναπτύχθηκαν μεταγενέστερα εναλλακτικές, βελτιστοποιημένες μέθοδοι εκχύλισης οι βασικότερες εκ των οποίων παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

#### 2.6.3.1 Εκχύλιση με μικροκύματα

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνικών εκχύλισης, με τη χρήση των οποίων επιτυγχάνεται σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης και στον όγκο των χρησιμοποιούμενων διαλυτών. Η εκχύλιση με μικροκύματα βασίζεται στη δυνατότητα των μικροκυμάτων να θερμάνουν τον εκάστοτε διαλύτη ραγδαία, επιταχύνοντας έτσι τον ρυθμό μεταφοράς μάζας. Έτσι, άρχισε η εφαρμογή των μικροκυμάτων (MW) στην εκχύλιση. Είναι μια εύχρηστη τεχνική, έχει μέτριες προς μικρές απαιτήσεις σε ποσότητες διαλυτών και έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία στην εκχύλιση φαινολικών, όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην εκχύλιση ολικών φαινολικών, αλλά και αλλαγή στη σύσταση του εκχυλίσματος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Μπορεί επίσης να συνδυασθεί ικανοποιητικά με άλλες μεθόδους, όπως απόσταξη με τη χρήση υδρατμών για την εκχύλιση πτητικών ουσιών (Azmir et al., 2013; Galanakis 2012; Gil-Chávez et al., 2013; Peralbo-Molina et al., 2012). Τα μικροκύματα είναι μη ιονισμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας μεταξύ 300 MHz έως 300 GHz και απαντούν μεταξύ των ακτινών X και της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (Letellier & Budzinski, 1999). Στις περισσότερες μεθόδους θέρμανσης (με αγωγή ή συναγωγή), ένα μεγάλο ποσό θερμότητας χάνεται στο περιβάλλον. Με τη χρήση των μικροκυμάτων, η θέρμανση συμβαίνει εκλεκτικά στην ύλη που προορίζεται για θέρμανση και μεταβαίνει κατευθείαν στην ύλη καθώς το δοχείο δεν απορροφά θερμότητα. Πρακτικά, δε χάνεται θερμότητα στο περιβάλλον καθώς το σύστημα είναι κλειστό. Η παραγωγή, όμως, θερμότητας και κατ' επέκταση η αύξηση της θερμοκρασίας ενός δείγματος, δεν σταματά ακαριαία τη στιγμή που διακόπτεται η έκθεση του δείγματος στα μικροκύματα, καθώς χρειάζεται πάντα κάποιος χρόνος μέχρι τα μόρια του δείγματος να "ηρεμίσουν" και να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση (Zlotorzynski, 1995). Η μέθοδος έχει εφαρμοσθεί από τους Simić et al. (2016) κατά το παρελθόν για την εκχύλιση



πολυφαινολών από καρπούς αρώνιας, με αποδόσεις που φτάνουν μέχρι και 420.1 mg/100 g φρέσκου καρπού αρώνιας, για διαλυτή μεθανόλη 53.6%.

#### 2.6.3.2 Εκχύλιση με υπερήχους

Οι υπέρηχοι οφείλουν το όνομά τους στα ηχητικά κύματα που παράγουν με συχνότητες υψηλότερες από εκείνες τις οποίες μπορεί να ανιχνεύσει το ανθρώπινο αυτί. Είναι μηχανικά κύματα με συχνότητες μεταξύ 16 kHz και 100 MHz (Mason & Cordmas, 1996). Τα κύματα υπερήχων με χαμηλές εντάσεις στην περιοχή MHz χρησιμοποιούνται κυρίως για διαγνωστικούς σκοπούς, ενώ τα κύματα υπερήχων στην περιοχή kHz χρησιμοποιούνται για να μεταβάλλουν τις ιδιότητες ενός υλικού (Li, 2014). Οι υπέρηχοι λειτουργούν στέλνοντας ηχητικά κύματα μέσω ενός ελαστικού μέσου. Τα ηχητικά κύματα προκαλούν μετατόπιση των σωματιδίων στο μέσο, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί δύο φάσεις: συμπίεση και αραιώση. Κάτω από μια ορισμένη κρίσιμη απόσταση, το υγρό παραμένει άθικτο, αλλά πάνω από αυτή την απόσταση, το υγρό καταρρέει και σχηματίζονται φυσαλίδες. Αυτές οι φυσαλίδες αυξάνονται κατά τη φάση της αραιώσης, αλλά το μέγεθός τους μειώνεται κατά τη φάση της συμπίεσης. Όταν οι φυσαλίδες φτάσουν σε ένα ορισμένο μέγεθος, απελευθερώνουν πολλή ενέργεια σε μια έκρηξη θερμότητας και πίεσης. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να είναι αρκετά δυνατή. Όταν αυτές οι φυσαλίδες καταρρέουν επάνω στην επιφάνεια ενός στερεού υλικού, η υψηλή πίεση και η θερμοκρασία που απελευθερώνονται παράγουν μικροπίδακες, οι οποίοι κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια. με αποτέλεσμα την εξαγωγή των φυτικών ενώσεων από διάφορα τρόφιμα.

#### 2.6.3.3 Εκχύλιση σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο

Αρχή της μεθόδου είναι η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των ιστών για την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχόμενων συστατικών. Η διπολική φύση των μορίων της μεμβράνης ευνοεί την ανάπτυξη ηλεκτρικού δυναμικού διαμέσω της, προκαλώντας το διαχωρισμό των μορίων που την απαρτίζουν και τελικά τη λύση της. Πολλές φορές εφαρμόζεται ως προεπεξεργασία σε φυτικά υλικά που υποβάλλονται σε συμβατική εκχύλιση, ώστε να μειωθεί η απαιτούμενη ενέργεια και να επιταχυνθεί η διαδικασία (Lopez et al., 2009). Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ). Η επεξεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ) πραγματοποιείται με έκθεση ενός ηλεκτρικά αγώγιμου τροφίμου σε σύντομους παλμούς ηλεκτρικού πεδίου υψηλής έντασης, ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια (Δημόπουλος, 2020). Η διεργασία αυτή στοχεύει στην αύξηση διαπερατότητας των κυττάρων του τροφίμου με στόχο είτε να απενεργοποιήσει παθογόνους μικροοργανισμούς είτε να αυξήσει την εκχυλισιμότητα ενδοκυτταρικών συστατικών. Η επεξεργασία αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της ηλεκτροδιάστασης, δηλαδή τα κύτταρα όταν εκτίθενται σε ηλεκτρικό πεδίο υψηλής έντασης, η κυτταρική τους μεμβράνη αποκτά πόρους με αποτέλεσμα να υφίστανται απώλεια του ενδοκυτταρικού τους περιεχομένου και να υφίστανται θανάτωση. Οι βασικότερες παράμετροι της μεθόδου δίνονται παρακάτω:

- Ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- Ηλεκτρική Αγωγιμότητα
- Σχήμα και εύρος παλμού
- Χρόνος επεξεργασίας
- Συχνότητα παλμών

- Ειδική Ενέργεια

#### 2.6.3.4 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

Ορισμένες βιοδραστικές ουσίες μπορεί να είναι διασκορπισμένες στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου και να συγκρατούνται ισχυρά στο δίκτυο πολυσακχαριτών - λιγνίνης με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβους δεσμούς, μην μπορώντας να έλθουν σε επαφή με το διαλύτη ώστε να εκχυλιστούν. Η προεπεξεργασία με συγκεκριμένα ένζυμα όπως η κυτταρινάση, η α-αμυλάση και η πηκτινάση επιτρέπει τη λύση του κυττάρου και την υδρόλυση του δικτύου πολυσακχαριτών - λιπιδίων. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην εξαγωγή ελαίων από διάφορους σπόρους, διότι αποτελεί τη βέλτιστη εναλλακτική έναντι της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (Puri et al., 2012).

#### 2.6.3.5 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)

Βασίζεται στη χρήση διαλύτη (συνήθως νερού) σε υψηλή πίεση, η οποία προκαλεί ισχυρές μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητές του, άρα και στις δυνατότητές του ως μέσο παραλαβής βιοδραστικών συστατικών. Για παράδειγμα, υπό συνθήκες υψηλής πίεσης το νερό δύναται να αποκτήσει διηλεκτρική σταθερά παραπλήσια της μεθανόλης, άρα να εκχυλίσει αποδοτικά λιγότερο πολικά συστατικά. Επιπλέον, η επιφανειακή τάση και το ιζώδες του μειώνονται αυξάνοντάς τη διαχυτότητά του. Η χρήση συνδυασμού υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας μπορεί να εξασφαλίσει ταχύτερες εκχυλίσεις υψηλής εκλεκτικότητας ενός μεγάλου φάσματος ουσιών (Azmir et al., 2013).

#### 2.6.3.6 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)

Ως κρίσιμο σημείο μιας καθαρής ουσίας ορίζεται η υψηλότερη συνθήκη θερμοκρασίας και πίεσης στην οποία η ουσία μπορεί να βρεθεί σε ισορροπία υγρής – αέριας φάσης. Πέραν των συνθηκών αυτών εκτείνεται μια περιοχή στην οποία η ουσία έχει τη μορφή υπερκρίσιμου υγρού. Το υπερκρίσιμο υγρό είναι βαρύ σαν υγρό αλλά έχει τη διεισδυτικότητα ενός αερίου, με αποτέλεσμα να συμπεριφέρεται σαν εκλεκτικός και αποτελεσματικός διαλύτης. Ως υπερκρίσιμο ρευστό εκχύλισης χρησιμοποιείται συνήθως το CO<sub>2</sub>, παρέχοντας εκχυλίματα υψηλής καθαρότητας, απηλλαγμένων από οργανικούς διαλύτες και ρυπαντές (Lang and Wai, 2001).

### 2.6.4 Διαλύτες εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών

Η απόδοση της εκχύλισης (ειδικά όταν αναφερόμαστε σε κάποια συμβατική μέθοδο), εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την επιλογή του διαλύτη. Βασικό κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, είναι η πολικότητα της ουσίας που στοχεύεται προς παραλαβή. Ο διαλύτης και η ουσία-στόχος θα πρέπει να διαθέτουν παραπλήσιες πολικότητες βάσει της αρχής «τα όμοια εκχυλίζουν τα όμοια». Πέραν τούτου όμως, υπάρχουν αρκετοί ακόμη παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιλογή του διαλύτη όπως είναι το οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος και η τοξικότητα για την ανθρώπινη υγεία (Azmir et al., 2013).

Οι Boeing et al. (2014) διαπίστωσαν υψηλότερες αποδόσεις στην εκχύλιση πολυφαινολών από είδη της οικογένειας των Ροδοειδών με χρήση μίγματος ακετόνης/νερού σε αναλογία 70:30, ενώ για την αποδοτικότερη εκχύλιση των ανθοκυανών κατέληξαν σε μίγμα μεθανόλης/νερού οξινισμένο με οξικό οξύ (αναλογία 70:29,5:0,5). Για την εκχύλιση

φαινολικών συστατικών προτείνεται επίσης η αιθανόλη ως διαλύτης, είτε αυτούσια ή αναμεμιγμένη με νερό.

*Πίνακας 6: Συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις εκχυλίσεις φαινολικών συστατικών και ομάδες πολυφαινολών για τις οποίες ενδείκνυται ο καθένας. Πηγή: Azmir et al., 2013*

<b>Νερό</b>	<b>Αιθανόλη</b>	<b>Μεθανόλη</b>	<b>Χλωροφόρμιο</b>	<b>Ακετόνη</b>
Ανθοκυανίνες	Ταννίνες	Ανθοκυανίνες	Φλαβονοειδή	Φλαβονοειδή
Ταννίνες	Ολικές φαινόλες Φλαβονόλες	Ταννίνες Φλαβόνες Ολικές φαινόλες		

### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Σκοπός

Κατά την διεργασία της χυμοποίησης πραγματοποιείται η έκθλιψη του καρπού κατά την οποία παράγεται το κλάσμα του χυμού και ταυτόχρονα ένα στερεό υπόλειμμα (πούλπα) το οποίο αποτελείται από φλοιούς, σάρκα, σπόρους και δεν χυμοποιείται (παραπροϊόν). Η πούλπα της αρώνιας είναι πολύ πλούσια σε φαινολικά συστατικά (φυσικά αντιοξειδωτικά) και ιδιαίτερα σε ανθοκυανίνες και προκυανιδίνες. Κατά την καλλιέργεια της αρώνιας παράγονται επίσης σημαντικές ποσότητες φύλλων και μίσχων, μέρη του φυτού που αν και δεν είναι εξίσου πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά όπως η πούλπα, εντούτοις περιέχουν υπολογίσιμες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών. Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός των διαφόρων παραπροϊόντων από την επεξεργασία αρώνιας καθώς και η αναζήτηση μεθόδων για τη βελτιστοποίηση της παραλαβής βιοδραστικών συστατικών. Η έρευνα επικεντρώθηκε στα φύλλα της αρώνιας αλλά και στην πούλπα, μέρη του φυτού που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της επεξεργασίας.

#### 3.2 Πρώτες Ύλες και Αποθήκευση

Η πούλπα, τα μούρα και τα φύλλα της Αρώνιας (*Aronia melanocarpa*) προμηθεύτηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Παραγωγών Αρώνιας & Λοιπών Εναλλακτικών Καλλιεργειών Σερρών και προέρχονταν από την σοδειά Οκτωβρίου 2021 . Η αποθήκευση τους έγινε σε καταψύκτη στους -22°C.

#### 3.3 Διαγράμματα ροής για κάθε πειραματική ενότητα και συνθήκες επεξεργασίας

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από 3 βασικές σειρές πειραμάτων που αφορούν τον χαρακτηρισμό του παραπροϊόντος της χυμοποίησης (πούλπας) και των φύλλων της αρώνιας ως προς τα φαινολικά συστατικά και την διερεύνηση της απόδοσης της εκχύλισης του συγκεκριμένου παραπροϊόντος.

##### 3.3.1 Μερικός Χαρακτηρισμός φύλλων αρώνιας

Για τον μερικό χαρακτηρισμό των φύλλων της αρώνιας σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων που περιελάμβανε, την εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη έπειτα από προεπεξεργασία και την ανάλυση των εκχυλισμάτων ως προς το φαινολικό περιεχόμενό τους. Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικοί διαλύτες για την παραλαβή διαφορετικών συστατικών.

Η επιλογή του διαλύτη στηρίχθηκε στην πολικότητα των ομάδων των ουσιών που στοχεύθηκαν προς ανάκτηση. Ένα εκχυλιστικό μέσο παρόμοιας πολικότητας με της ουσίας - στόχου διασφαλίζει μέγιστη διαλυτοποίηση και ευνοεί τη μεταφορά μάζας από το εσωτερικό του φυτικού υλικού προς τον κύριο όγκο του διαλύτη. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι σε εκχυλίσεις μεγάλης κλίμακας προστίθεται ένα πλήθος ακόμη κριτηρίων όπως η τιμή κάθε υποψήφιου διαλύτη, η ασφάλεια για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, η

διαθεσιμότητα, η ευκολία στο χειρισμό κ.α. Για την παραλάβη των πολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το νερό, ενώ για τις μη πολικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης η ακετόνη.

Η ακετονική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στην διάταξη της σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου) που συνδέεται με αντλία τροφοδοσίας. Η υδατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση και όχι στην διάταξη της σταθερής κλίνης, καθώς κατά την υδατική εκχύλιση των φύλλων παρατηρείται ανάπτυξη μεγάλου ιξώδους, πιθανώς λόγω εκχύλισης πολυσακχαριτών. Το αποτέλεσμα είναι ότι αναπτύσσεται πολύ υψηλή πίεση που δεν επιτρέπει την εκχύλιση στην σταθερή κλίνη. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο, αντιριζική ικανότητα, αλλά και τις συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων.

### 3.3.2 Χαρακτηρισμός του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας

Η εκχύλιση για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας έγινε στην διάταξη της σταθερής κλίνης με τον κατάλληλο διαλύτη. Η επιλογή του διαλύτη στηρίχθηκε στην πολικότητα των ομάδων των ουσιών που στοχεύθηκαν προς ανάκτηση. Πολλαπλές έρευνες έχουν δείξει στο παρελθόν ότι οι αλκοόλες, καθώς και τα μίγματα αλκοόλης/νερού αποτελούν βέλτιστα μέσα εκχύλισης αρκετών πολυφαινολών και ιδιαιτέρως των ανθοκυανινών, που είναι και οι πολυτιμότερες φαινολικές ενώσεις της αρώνιας (Roda-Serrat et al., 2020). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι ανθοκυανίνες παραμένουν σταθερότερες σε ελαφρώς όξινα περιβάλλοντα, για αυτό και πολύ συχνά προστίθεται στο διαλύτη ένα μέσο οξίνισης, όπως το υδροχλωρικό, το τριφθοροξικό ή το μυρμηκικό οξύ (Ekici et al., 2014). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω και δεδομένου ότι για την αριστοποίηση των διεργασιών εκχύλισης απαιτείται ο πρωταρχικός προσδιορισμός του ολικού φορτίου των πολυφαινολών του παραπροϊόντος, επιλέχθηκε ως διαλύτης η μεθανόλη, οξινισμένη κατά 0,5 % v/v με τριφθοροξικό οξύ (TFA).

### 3.3.3 Διερεύνηση απόδοσης της εκχύλισης του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας

Για την διερεύνηση της απόδοσης της εκχύλισης αρχικά επιλέχθηκε η αλλαγή του διαλύτη (μεθανόλη με TFA 0,5% w/v) με έναν πράσινο διαλύτη, οπότε πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με απιονισμένο νερό οξινισμένο με κιτρικό οξύ 0,75% w/v. Το απιονισμένο νερό με κιτρικό οξύ αποτελεί έναν οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον διαλύτη, ωστόσο παρουσιάζει μικρότερες αποδόσεις σε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με την μεθανόλη καθώς παραλαμβάνει λιγότερες ανθοκυανίνες.

Έπειτα δοκιμάστηκε διαφορετική μέθοδος ξήρανσης στην πούλπα της αρώνιας, για να βρεθεί αν υποβαθμίζονται οι φαινολικές ενώσεις της αρώνιας με την ξήρανση στους 40°C. Οπότε πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφυλίωση) και η λυοφυλιωμένη πούλπα εκχυλίστηκε και με τους δύο διαλύτες που έχουν επιλεγεί.

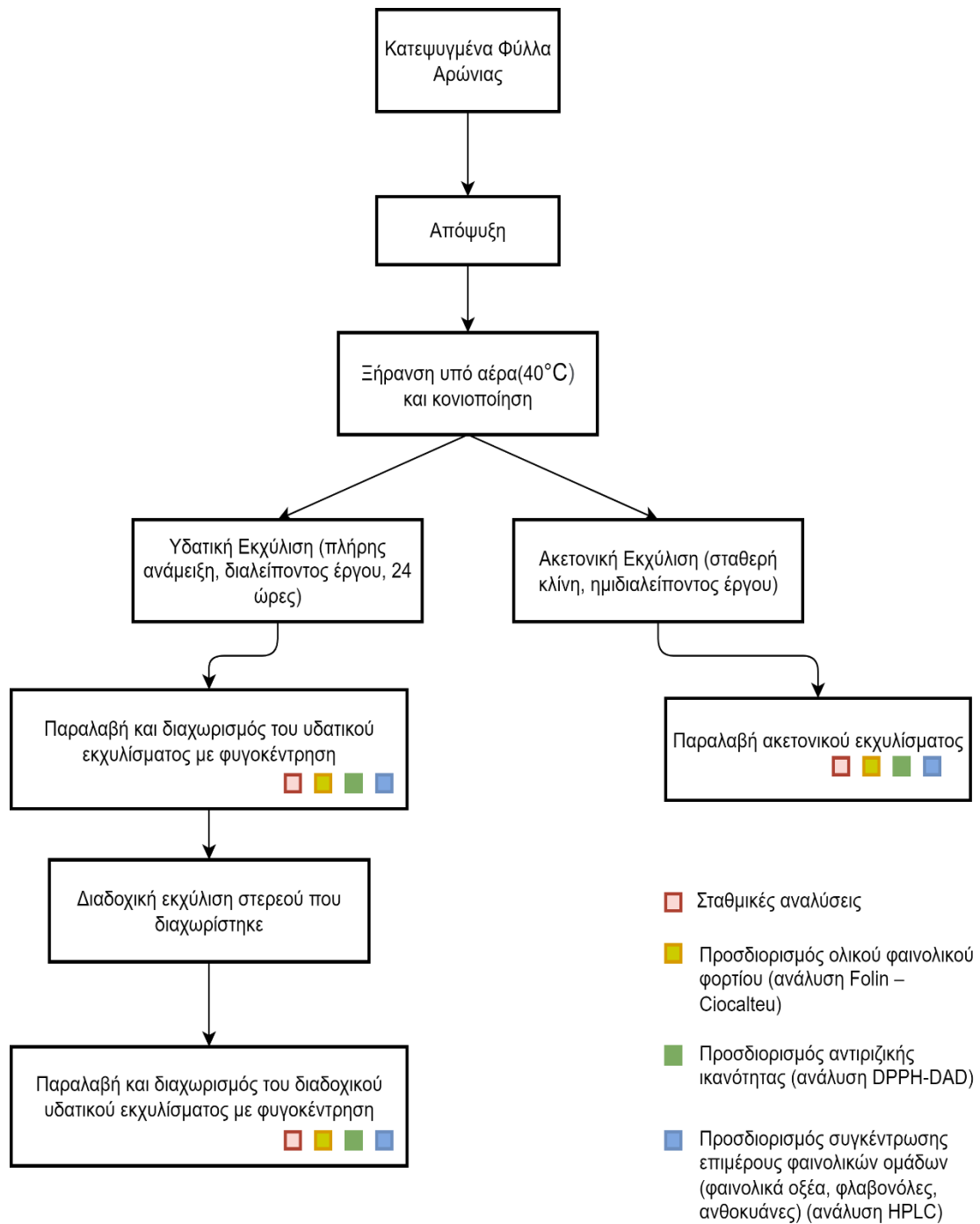
Στην συνέχεια για την διερεύνηση της αύξησης της απόδοσης των βιοδραστικών συστατικών της πούλπας της αρώνιας, πραγματοποιήθηκε προκατεργασία της πούλπας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ), ώστε να επιτευχθεί διάρρηξη στα κύτταρα της πούλπας της αρώνιας και να εκχυλιστούν τα συστατικά της πιο γρήγορα ή σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Η μεθανόλη γενικά δεν αποτελεί πράσινο διαλύτη, ενώ είναι και τοξική για τον οργανισμό. Παρολαυτά, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (Οδηγία 2010/59/ΕΕ), αποτελεί επιτρεπόμενο διαλύτη για εκχυλίσεις υπό την προϋπόθεση ότι η μέγιστη υπολειμματική περιεκτικότητά της στα τρόφιμα ή τα συστατικά τους που παραλήφθηκαν με εκχύλιση να

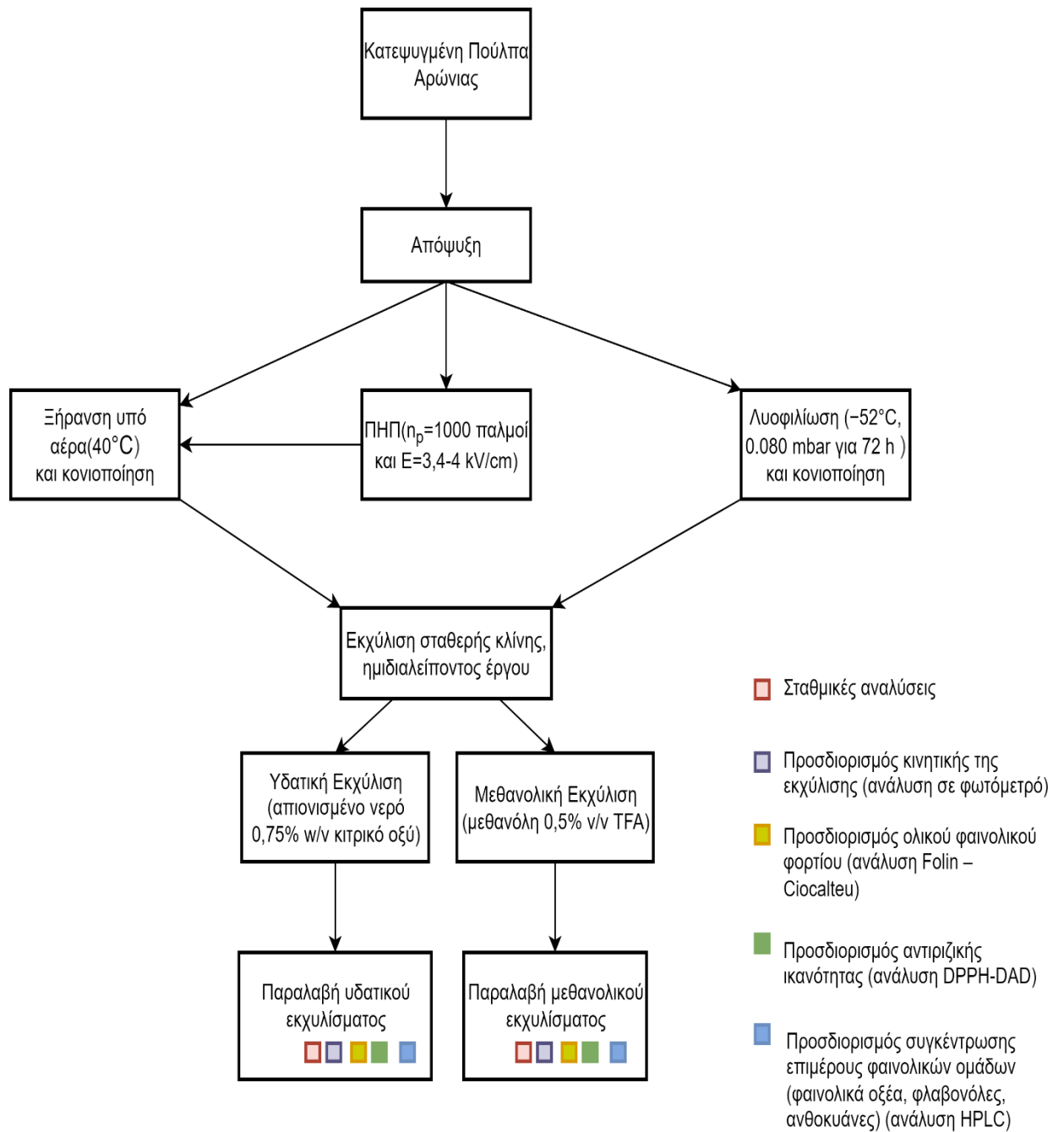
είναι 10 mg/kg. Το τριφθοροξικό οξύ όμως αποτελεί μια τοξική ουσία μη επιτρεπόμενη για ενσωμάτωση σε εκχυλίσματα που θα ενσωματωθούν σε τρόφιμα. Για την αξιοποίηση της υψηλής εκχυλιστικής ικανότητας της μεθανόλης, η οποία παραλαμβάνει πολύ μεγάλο μέρος των ανθοκυανινών, έγινε αντικατάσταση του μέσου οξίνισης από το ισχυρό οξύ TFA στο ήπιο κιτρικό οξύ, το οποίο όμως μπορεί να αξιοποιηθεί στην βιομηχανία τροφίμων. Για αυτό τον λόγο επιλέχθηκε οξινισμένη μεθανόλη με κιτρικό οξύ.

Εξετάσθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος στο οξινισμένο νερό για να βρεθεί η επιρροή του pH του διαλύτη στην εκχυλιστικότητα των συστατικών της πούλπας της αρώνιας.

Τέλος επιλέχθηκε αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης σε εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες. Η εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλιστικότητα των συστατικών του.

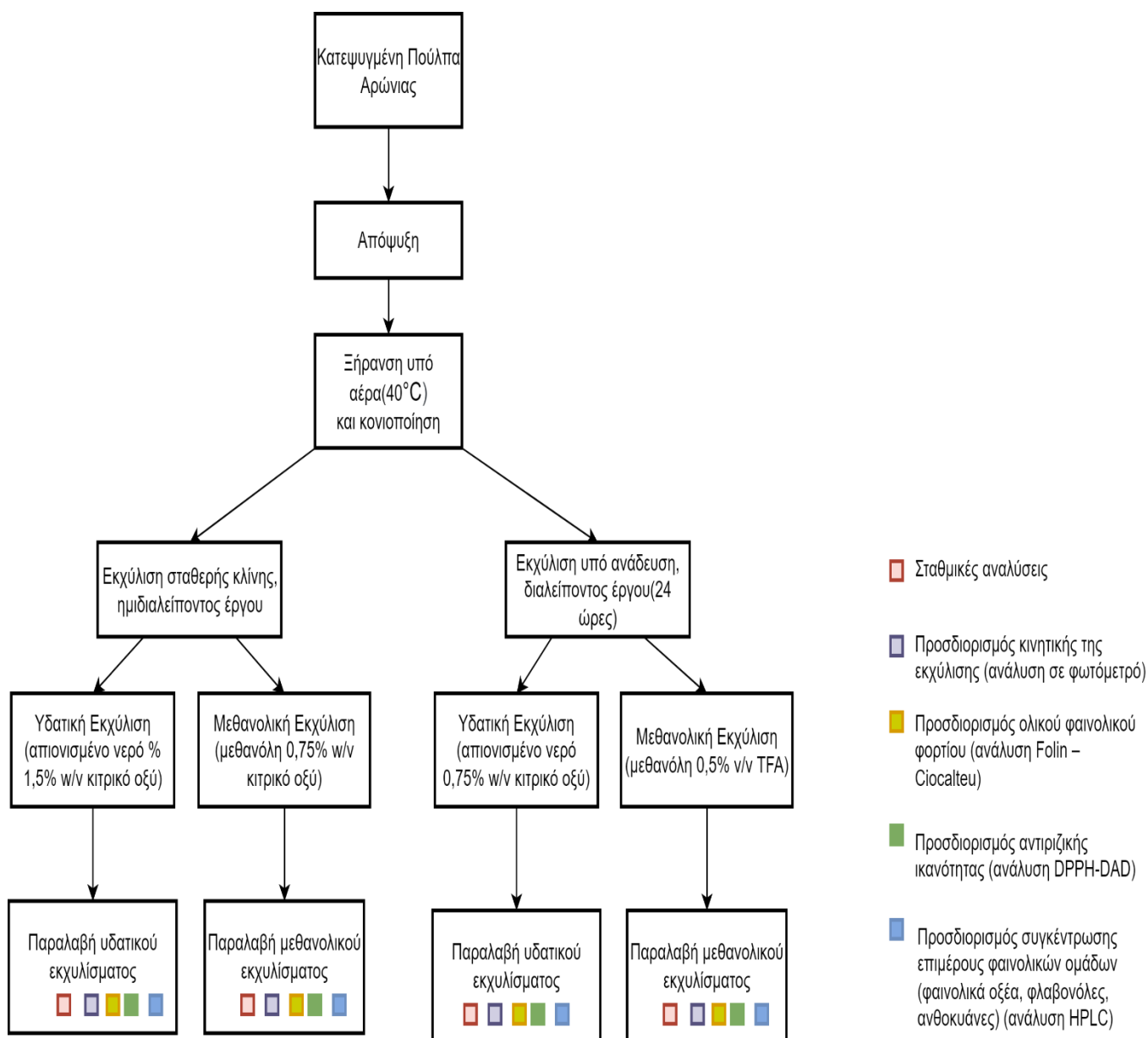


Εικόνα 5:Απεικόνιση της πειραματικής πορείας για τον χαρακτηρισμό των φύλλων της αρώνιας



Εικόνα 6: Απεικόνιση της πειραματικής πορείας για τον χαρακτηρισμό του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας και την διερεύνηση της απόδοσης της εκχύλισης





Εικόνα 7: Εκχυλίσεις του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας για την διερεύνηση της απόδοσης της εκχύλισης (για ξήρανση υπό αέρα)

### 3.4 Εκχύλιση φύλλων αρώνιας

#### 3.4.1 Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου

Η ξηρή σκόνη από τα φύλλα που σχηματίστηκε εκχυλίστηκε πρώτα με απιονισμένο νερό. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν εκχύλιση στερεού-υγρού υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες. Οπότε 20 g ξηρής σκόνης φύλλων εκχυλίστηκαν με 600 mL νερό (αναλογία 1:30 w/v) και μετά τον διαχωρισμό του στερεού υπολείμματος από το εκχύλισμα με φυγοκέντρηση. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε μια επιπλέον διαδοχική

εκχύλιση (τον ίδιο διαλύτη, στην ίδια αναλογία) πάλι για 24 ώρες υπό ανάδευση. Η υδατική εκχύλιση των φύλλων επιλέχθηκε να γίνει υπό ανάδευση και όχι στην διάταξη της σταθερής κλίνης, διότι στην σταθερή κλίνη με την πρώτη επαφή του απιονισμένου νερού με την ξηρή σκόνη των φύλλων δημιουργήθηκε υψηλό ιξώδες και το μίγμα ήταν τόσο πηκτό που δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή του από την έξοδο της κλίνης. Η εκχύλιση με απιονισμένο νερό πραγματοποιήθηκε για την παραλαβή των πολικών ενώσεων των φύλλων της αρώνιας.

#### 3.4.2 Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε νέα εκχύλιση με ακετόνη και διαφορετική μέθοδο. Οπότε 20 g ξηρής σκόνης φύλλων μεταφέρθηκαν σε ανοξείδωτο εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης και εκχυλίστηκαν στην διάταξη της σταθερής κλίνης, που περιγράφεται παρακάτω, με ακετόνη. Η αναλογία στερεού-διαλύτη επιλέχθηκε 1:15 w/v. Η αντλία τροφοδοσίας της διάταξης τέθηκε σε λειτουργία και ξεκίνησε η διαδικασία. Η ογκομετρική παροχή διαλύτη στην κλίνη ρυθμίστηκε σε χαμηλό επίπεδο (περίπου 3 mL/min). Ως χρόνος έναρξης ( $t_0$ ) ορίσθηκε η στιγμή στην οποία η πρώτη σταγόνα εκχυλίσματος εξήλθε από τον εκχυλιστήρα. Η εκχύλιση διήρκησε 60 λεπτά. Η εκχύλιση με ακετόνη πραγματοποιήθηκε για την παραλαβή των μη πολικών ενώσεων των φύλλων της αρώνιας.

#### 3.5 Μεθανολική (0,5% v/v TFA) εκχύλιση πούλπας αρώνιας

Για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών της πούλπας της αρώνιας σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες και μεθόδους.

Αρχικά για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας έλαβε χώρα εξαντλητική εκχύλιση με μεθανόλη οξινισμένη με ισχυρό οξύ και στην διάταξη της σταθερής κλίνης αλλά και σε ανακινούμενο υδατόλουτρο (εκχύλιση υπό ανάδευση). Το οξύ που χρησιμοποιήθηκε είναι το τριφθοροξικό οξύ (TFA).

Η επιλογή του διαλύτη στηρίχθηκε στην πολικότητα των ομάδων των ουσιών που στοχεύθηκαν προς ανάκτηση. Ένα εκχυλιστικό μέσο παρόμοιας πολικότητας με της ουσίας - στόχου διασφαλίζει μέγιστη διαλυτοποίηση και ευνοεί τη μεταφορά μάζας από το εσωτερικό του φυτικού υλικού προς τον κύριο όγκο του διαλύτη. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι σε εκχυλίσεις μεγάλης κλίμακας προστίθεται ένα πλήθος ακόμη κριτηρίων όπως η τιμή κάθε υποψήφιου διαλύτη, η ασφάλεια για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, η διαθεσιμότητα, η ευκολία στο χειρισμό κ.α.

Πολλαπλές έρευνες έχουν δείξει στο παρελθόν ότι οι αλκοόλες, καθώς και τα μίγματα αλκοόλης/νερού αποτελούν βέλτιστα μέσα εκχύλισης αρκετών πολυφαινολών και ιδιαίτερως των ανθοκυανών, που είναι και οι πολυτιμότερες φαινολικές ενώσεις της αρώνιας (Roda-Serrat et al., 2020). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι ανθοκυανίνες παραμένουν σταθερότερες σε ελαφρώς όξινα περιβάλλοντα, για αυτό και πολύ συχνά προστίθεται στο διαλύτη ένα μέσο οξίνισης, όπως το υδροχλωρικό, το τριφθοροξικό ή το μυρμηκικό οξύ (Ekcici et al., 2014). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω και δεδομένου ότι η διερεύνηση των πολυφαινολών του καρπού αποτέλεσε μια διεργασία με αμιγώς αναλυτικούς σκοπούς επιλέχθηκε ως διαλύτης η μεθανόλη, οξινισμένη κατά 0,5 % v/v με τριφθοροξικό οξύ (TFA).

### 3.5.1 Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου

Σε ανοξειδωτο εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης μεταφέρθηκαν 25 g ξηρής σκόνης πούλπας αρώνιας (air dried) και εκχυλίστηκαν με μεθανόλη 0,5% v/v TFA. Η τελική αναλογία στερεού-διαλύτη επιλέχθηκε 1:15 w/v.

Η αντλία τροφοδοσίας της διάταξης τέθηκε σε λειτουργία και ξεκίνησε η διαδικασία. Η ογκομετρική παροχή διαλύτη στην κλίνη ρυθμίστηκε σε επίπεδο περίπου 5-6 mL/min. Για τη μελέτη του ρυθμού εκχύλισης, ελήφθησαν από την έξοδο του εκχυλιστήρα δείγματα όγκου 1 mL σε χρόνους  $t = 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60$  (διαφορικά δείγματα). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια errendorf για την περαιτέρω ανάλυσή τους και το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη σε πωματισμένο γυάλινο περιέκτη. Σε Η ανωτέρω διαδικασία έλαβε χώρα εις διπλούν για την εξαγωγή σφάλματος.

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την πούλπα αρώνιας που λυοφιλιώθηκε για την εξέταση της θερμοκρασίας ξήρανσης του υλικού.

### 3.5.2 Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου

10 g ξηρής σκόνης πούλπας αρώνιας (air dried) εκχυλίστηκαν εις διπλούν σε πωματισμένους γυάλινους περιέκτες με 150 mL μεθανόλης οξινισμένης κατά 0,5% TFA (αναλογία 1:15 w/v) σε ανακινούμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες. Για την μελέτη του ρυθμού της εκχύλισης των πολυφαινολών, ελήφθησαν δείγματα εκχυλίσματος όγκου 1 mL σε χρόνους  $t = 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 1440$  min από την έναρξη της διεργασίας και διαβιβάσθηκαν σε φιαλίδια errendorf για περαιτέρω ανάλυση. Το μίγμα που παρελήφθει με την ολοκλήρωση του πειράματος διαχωρίστηκε με απλή διήθηση και το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε σε γυάλινο σκεύος στην κατάψυξη.

### 3.6 Μεθανολική (0,75% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας

Στην συνέχεια αντικαταστάθηκε το μέσο οξίνισης της μεθανόλης, καθώς τριφθοροξικό οξύ (TFA) χρησιμοποιήθηκε καθαρά και μόνο για αναλυτικούς σκοπούς. Για αυτό το λόγο αντικαταστάθηκε με κιτρικό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων. Οπότε παρασκευάστηκε διάλυμα μεθανόλης οξινισμένης κατά 0,75 % w/v κιτρικό οξύ. Μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 500 mL μεθανόλης και 4,11 g σκόνης μονοένυδρου κιτρικού οξέος και τέθηκαν υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 1-2 λεπτά. Στην συνέχεια 25 g ξηρής σκόνης πούλπας (air dried) εκχυλίστηκαν με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία της σταθερής κλίνης για την πούλπα αρώνιας στην μεθανολική εκχύλιση αλλά με τον διαλύτη που παρασκευάστηκε.

### 3.7 Υδατική (0,75% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας

Το νερό είναι ο φιλικότερος προς το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία διαλύτης και επιπλέον είναι κατάλληλος για την παραλαβή αρκετών φαινολικών συστατικών (υδατοδιαλυτές ενώσεις). Οι Roda-Serrat et al. (2020) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη μέσου οξίνισης και συγκεκριμένα κιτρικού οξέος στο νερό, ευνοεί την εκχύλιση των ανθοκυανών που είναι και οι πιο πολύτιμες φαινολικές ενώσεις της αρώνιας. Βάσει των ευρημάτων της εν λόγω μελέτης, παρασκευάστηκε διαλύτης για τις ανάγκες της εκχύλισης υδατικό διάλυμα

κιτρικού οξέος 0,75% w/v. Πιο αναλυτικά, μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 750 mL μεθανόλης και 5,63 g σκόνης μονοένυδρου κιτρικού οξέος και τέθηκαν υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 1-2 λεπτά. Το δοχείο ανακινήθηκε μέχρι την πλήρη διάλυση του στερεού και το περιεχόμενό του διαβιβάστηκε στον περιέκτη της διάταξης. Ως διαλύτης της εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε οξινισμένο απιονισμένο νερό.

### 3.7.1 Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου

Σε ανοξείδωτο εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης μεταφέρθηκαν 25 g ξηρής σκόνης πούλπας αρώνιας (air dried) και εκχυλίστηκαν με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ. Η τελική αναλογία στερεού-διαλύτη επιλέχθηκε 1:25 w/v. Η αντλία τροφοδοσίας της διάταξης τέθηκε σε λειτουργία και ξεκίνησε η διαδικασία. Η ογκομετρική παροχή διαλύτη στην κλίνη ρυθμίστηκε σε επίπεδο περίπου 6-7 mL/min. Για τη μελέτη του ρυθμού εκχύλισης, ελήφθησαν από την έξοδο του εκχυλιστήρα δείγματα όγκου 1 mL σε χρόνους  $t = 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90$  (διαφορικά δείγματα). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια erpendorf για την περαιτέρω ανάλυσή τους και το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη σε γυάλινο περιέκτη. Σε Η ανωτέρω διαδικασία έλαβε χώρα εις διπλούν. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την πούλπα αρώνιας που λυοφιλιώθηκε για την εξέταση της θερμοκρασίας ξήρανσης του υλικού.

### 3.7.2 Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου

6 g ξηρής σκόνης πούλπας αρώνιας (air dried) εκχυλίστηκαν εις διπλούν σε πωματισμένους γυάλινους περιέκτες με 150 mL οξινισμένο απιονισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ) (τελική αναλογία 1:25 w/v) σε ανακινούμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες. Για την μελέτη του ρυθμού της εκχύλισης των πολυφαινολών, ελήφθησαν δείγματα εκχυλίσματος όγκου 1 mL σε χρόνους  $t = 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 1440$  min από την έναρξη της διεργασίας και διαβιβάστηκαν σε φιαλίδια erpendorf για περαιτέρω ανάλυση. Το μίγμα που παρελήφθει με την ολοκλήρωση του πειράματος διαχωρίστηκε με απλή διήθηση και το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε σε γυάλινο περιέκτη στην κατάψυξη.

### 3.8 Υδατική (1,5% w/v κιτρικό οξύ) εκχύλιση πούλπας αρώνιας

Για να διερευνηθεί η επίδραση της οξίνισης του διαλύτη επιλέχθηκε να αυξηθεί η αναλογία του κιτρικού οξέος από 0,75 % w/v στο 1,5 % w/v. Οπότε μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 750 mL μεθανόλης και 12,3 g σκόνης μονοένυδρου κιτρικού οξέος και τέθηκαν υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 1-2 λεπτά. Στην συνέχεια 25 g ξηρής σκόνης πούλπας (air dried) εκχυλίστηκαν με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία της σταθερής κλίνης για την πούλπα αρώνιας στην υδατική εκχύλιση με τον διαλύτη που παρασκευάστηκε.

### 3.9 ΠΗΠ και μεθανολική & υδατική εκχύλιση πούλπας αρώνιας

Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ). Στον θάλαμο επεξεργασίας όγκου 60 mL και απόστασης ηλεκτροδίων 4 cm (Εικόνα 7.δ) τοποθετήθηκαν 35 g αποψυγμένης πούλπας αρώνιας και απιονισμένο νερό μέχρις ότου πληρωθούν τα κενά. Έπειτα ο θάλαμος τοποθετήθηκε στην μονάδα επεξεργασίας ΠΗΠ

ELCRACK-5kW και έλαβε λειτουργία για  $n_p=1000$  (παλμοί) και ηλεκτρικό πεδίο  $E=3,4-4$  kV/cm. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε 12 φορές για να προκύψει ποσότητα για 4 εκχυλίσσεις στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Αυτή η συνθήκη θεωρείται ακραία και επιλέχθηκε για να δούμε την μεγαλύτερη επίδραση στο υλικό από την επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

Το νερό που προέκυψε από την επεξεργασία ΠΗΠ συλλέχθηκε σε γυάλινο σκεύος και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για να αναλυθεί περαιτέρω στην συνέχεια. Η πούλπα αρώνιας μετά την επεξεργασία ΠΗΠ υπέστη ήπια ξήρανση υπό ρεύμα αέρα στους 40°C (air dried) για 24 ώρες και άλεση τους σε οικιακό μπλέντερ (για περίπου 1 min) προς την δημιουργία σκόνης.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις της ξηρής σκόνης που προέκυψε με μεθανόλη οξινισμένη κατά 0,5 % v/v TFA και απιονισμένο νερό οξινισμένο κατά 0,75 % w/v κιτρικό οξύ με την μέθοδο της σταθερής κλίνης και με τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης.

### 3.10 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν συγκεντρωτικά τα παρακάτω:

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ALDRICH CHEMISTRY
- Acetic acid glacial, CARLO ERBA REAGENTS, Spain
- Acetonitrile HPLC gradient grade, FISHER SCIENTIFIC, U.K.
- Citric acid monohydrate ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )  $M_r = 210,14$ , PENTA CHEMICALS, Czech Republic
- Folin-Ciocalteu's reagent, CARLO ERBA REAGENTS, Spain
- Maltodextrine 18-20 DE, ASTRON CHEMICALS, Greece
- Methanol HPLC gradient grade, FISHER SCIENTIFIC, U.K.
- Sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ) anhydrous  $M_r = 105,99$ , PENTA CHEMICALS, Czech Republic
- Water HPLC gradient grade, FISHER SCIENTIFIC, U.K.
- TFA
- Methanol for analysis
- Acetone for analysis

### 3.11 Συσκευές

#### 3.11.1 Ξήρανση

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν ήπιες ξηράσεις με ρεύμα αέρα (για αφυδάτωση των υλικών), αλλά και πιο ισχυρές θερμικές διεργασίες για τις σταθμικές αναλύσεις που απαιτήθηκαν.



(α)

(β)

(γ)

Εικόνα 8: (α) Ξηραντήρας ρεύματος αέρα για ήπια ξήρανση καρπών και προϊόντων. Deluxe B12, Biosec, Italy (β) Φούρνος για ξήρανση δειγμάτων προς σταθμικές αναλύσεις. WTB E28, Binder, Germany (γ) Λυοφιλωτής Christ Alpha 1-4 LD plus freeze dryer, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany

### Εκχύλιση

Οι εκχυλίσεις της πούλπας και των φύλλων της αρώνιας πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου, με απλή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα και σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.



(α)

(β)

(γ)

Εικόνα 9: (α) : Μαγνητικός αναδευτήρας (stirrer) με πλατώ θέρμανσης για την εκχύλιση με απλή ανάδευση. Are2, Velp Scientifica, Italy (β) υδατόλουτρο με παλινδρομική ανάδευση. GFL Shaking Water Bath 1083 (γ) Περισταλτική αντλία για τη διαβίβαση του διαλύτη εκχύλισης στη σταθερή κλίση. Pump XX 80 002 30, Millipore, USA

### 3.11.2 Διαχωρισμοί

Τα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων προέκυψαν από εκχύλιση με απλή ανάδευση και χρειάστηκε διαχωρισμός του στερεού από το εκχύλισμα μέσω φυγοκέντρου. Για τα εκχυλίσματα της πούλπας της αρώνιας με απλή ανάδευση έγινε διαχωρισμός με απλή διήθηση.



Εικόνα 10: Φυγόκεντρος Heraeus Megafuge, 16/16R,

### 3.12 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων και την παραλαβή των μετρήσεων ήταν δύο αναλυτικοί ζυγοί (2 και 4 δεκαδικών ψηφίων), δύο φωτόμετρα καθώς και δύο διατάξεις ανάλυσης HPLC (high performance liquid chromatography), της οποίας η αρχή λειτουργίας θα παρουσιασθεί εκτενώς στην αντίστοιχη ενότητα.



(α)



(β)

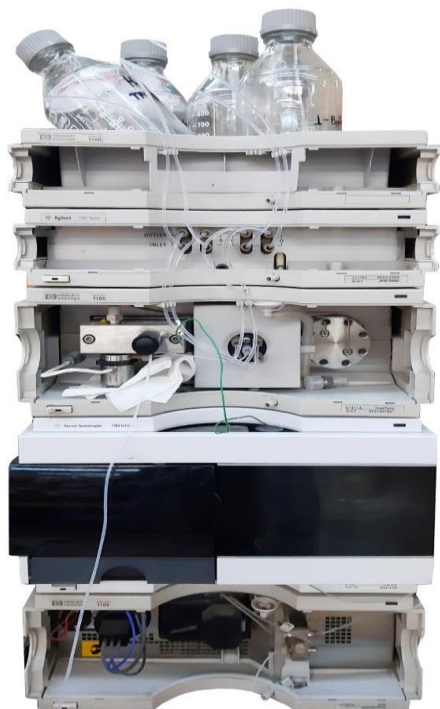


(γ)

Εικόνα 11: (α) Μικροζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων. XT-220A, Precisa, Switzerland (β) Αναλυτικός ζυγός 2 δεκαδικών ψηφίων. 620C, Precisa, Switzerland (γ) Spectrophotometer U-2900, Hitachi, Japan.



Εικόνα 12: SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Japan



Εικόνα 13: Διατάξεις HPLC, Agilent Technologies/Hewlett Packard, Germany. Μονάδες των διατάξεων (1) και (2):

Απαερωτής (1) 1100 G1379A και (2) 1200 G1379B

Περισταλτικές αντλίες (1) και (2) 1100 G1311A

Σύστημα έγχυσης (1) 1260 Infinity Auto Injector (2) χειροκίνητη ένεση

Ανιχνευτής (1) G1315A Diode Array Detector - DAD και (2) 1047A Refraction Index - RI

Στήλη (1) Zorbax Eclipse XDB-C18 250x4.6mm 5μ και (2) Micosorb-MV 100 NH2

Ακόμη πραγματοποιήθηκε επεξεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ). Για την επεξεργασία με ΠΗΠ χρησιμοποιήθηκε η πιλοτική μονάδα ELCRACK-5kW (DIL, Quakenbrück, Germany). Η μονάδα αποτελείται από μία γεννήτρια παραγωγής ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης, ηλεκτρονικό πίνακα ρύθμισης των παραμέτρων επεξεργασίας και ένα ηλεκτρικά μονωμένο κουβούκλιο στο οποίο μπορεί να τοποθετηθεί ποικιλία θαλάμων επεξεργασίας.



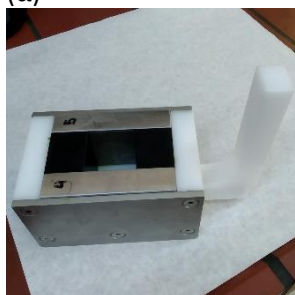
(α)



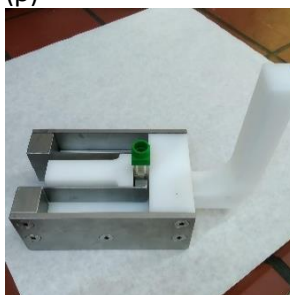
(β)



(γ)



(δ)



(ε)



(στ)

Εικόνα 14: α) Η μονάδα επεξεργασίας ΠΗΠ ELCRACK-5kW β) ηλεκτρόδια υποδοχής θαλάμου επεξεργασίας στη μονάδα γ) θάλαμος επεξεργασίας όγκου 300 mL, απόστασης ηλεκτροδίων 8 cm δ) θάλαμος επεξεργασίας όγκου 60 mL, απόστασης ηλεκτροδίων 4 cm ε) υποδοχέας για κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης (όγκου 0.2-1 mL, απόστασης ηλεκτροδίων 0.2-1 cm στ) κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης απόστασης ηλεκτροδίων 0.2-1 cm.



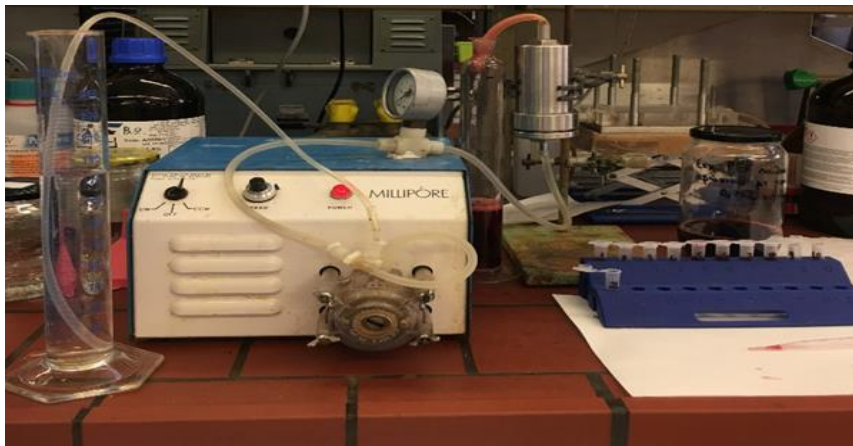
### 3.13 Αναλυτικές και παρασκευαστικές μέθοδοι ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης συστατικών

#### 3.13.1 Εκχύλιση υπό ανάδευση, διαλείποντος έργου

Η μία μέθοδος που επιλέχθηκε για τις εκχυλίσεις των πρώτων υλών ήταν η εκχύλιση στερεού-υγρού υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ή σε υδατόλουτρο με παλινδρομική ανάδευση για 24 ώρες. Η μέθοδος της απλής ανάδευσης περιγράφηκε λεπτομερώς σε προηγούμενη ενότητα.

#### 3.13.2 Εκχύλιση σε σταθερή κλίνη, ημιδιαλείποντος έργου

Το μεγαλύτερο μέρος των εκχυλίσεων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας έγιναν στην διάταξη της σταθερής κλίνης.



Εικόνα 55: Διάταξη εκχύλισης με σταθερή κλίνη (ημιδιαλείποντος έργου). Αποτελείται από τις εξής μονάδες συνδεδεμένες σε σειρά: Περιέκτης διαλύτη, αντλία τροφοδοσίας, ανοξείδωτος εκχυλιστήρας (περιέχει τη σταθερή κλίνη γεμισμένη με ξηρή σκόνη), ογκομετρικός κύλινδρος σύλλεξης εκχυλίσματος. Τα διαφορετικά δείγματα λαμβάνονται απευθείας από την έξοδο του εκχυλιστήρα.

Στον ανοξείδωτο εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης τοποθετήθηκε η ξηρή σκόνη της πρώτης ύλης, που ήταν προς εκχύλιση, και ο κενός όγκος πληρώθηκε με αδρανές υλικό (βαμβάκι). Ο εκχυλιστήρας πωματίστηκε με βιδωτό καπάκι και τοποθετήθηκε σε κατακόρυφη θέση. Στην έξοδο (άνω μέρος) συνδέθηκε λάστιχο σιλικόνης το οποίο κατέληγε σε ογκομετρικό κύλινδρο για την παραλαβή του εκχυλίσματος. Η είσοδος (κάτω μέρος) συνδέθηκε μέσω λάστιχου σιλικόνης σε σειρά με την αντλία τροφοδοσίας (Millipore, USA) και τον περιέκτη του διαλύτη. Η αντλία τροφοδοσίας της διάταξης τέθηκε σε λειτουργία και ξεκίνησε η διαδικασία. Η ογκομετρική παροχή διαλύτη στην κλίνη ρυθμίστηκε σε διαφορετική τιμή ανάλογα με την εκάστοτε εκχύλιση. Ως χρόνος έναρξης ( $t_0$ ) ορίσθηκε η στιγμή στην οποία η πρώτη σταγόνα εκχυλίσματος εξήλθε από τον εκχυλιστήρα.

#### 3.13.3 Ξήρανση για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας και των ολικών στερεών

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας στις πρώτες ύλες των σειρών πειραμάτων (πούλπα, μούρα, φύλλα αρώνιας), προζυγισμένη ποσότητα κάθε υλικού τοποθετήθηκε σε πυρίμαχο, προζυγισμένο περιέκτη και εισήχθη σε κλίβανο (Binder, Germany). Η θερμική

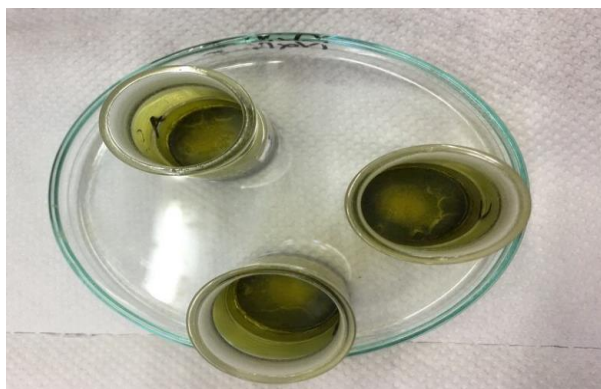
ξήρανση διήρκεσε περίπου 24 ώρες στους 100°C και έπειτα το ξηρό υπόλειμμα αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το μικτό βάρος του δείγματος καταγράφηκε εκ νέου και το ποσοστό της υγρασίας υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{υγρασία} = \frac{GW_{\text{νωπό}(g)} - GW_{\text{ξηρό}(g)}}{NW_{\text{νωπό}(g)}} \times 100\%, \quad (2.1) \quad \text{όπου}$$

GW το μικτό βάρος (gross weight) του δείγματος και

NW το καθαρό βάρος (net weight)

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό της ξηρής μάζας των εκχυλισμάτων. Ορισμένος όγκος (5 mL) του κάθε προς ανάλυση υγρού μεταφέρθηκε με σιφώνιο πλήρωσης σε πυρίμαχο, προζυγισμένο δοχείο και υποβλήθηκε σε θερμική ξήρανση (κλίβανος Binder, 24 h, 100°C). Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης αφέθηκε σε ξηραντήρα και τέλος ζυγίστηκε στον αναλυτικό ζυγό.



Εικόνα 16: Ξηρά θάρη ακετονικής εκχύλισης φύλλων (όγκος προς ξήρανση 5 mL, τρεις επαναλήψεις)

Η κατ' όγκο περιεκτικότητα του υγρού σε ολικά στερεά υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Ολικά εκχυλισμένα στερεά} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{GW_{\text{ξηρό}(g)} - T(g)}{V_s(mL)}, \quad (2.2) \quad \text{όπου}$$

GW το μικτό βάρος (gross weight)

T το απόβαρο και

V<sub>s</sub> ο όγκος του δείγματος

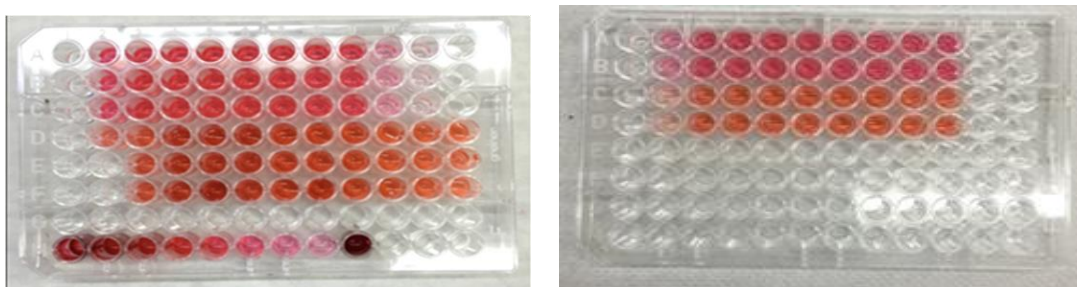
Έπειτα στην πούλπα, τα μούρα και τα φύλλα της αρώνιας πραγματοποιήθηκε ήπια ξήρανση υπό ρεύμα αέρα στους 40°C (air dried) για 24 ώρες και άλεση τους σε οικιακό μπλέντερ (για περίπου 1 min) προς την δημιουργία σκόνης. Η σκόνη από το κάθε υλικό αποθηκεύτηκε σε γυάλινα σκεύη σε δροσερό και σκιερό μέρος. Η πούλπα και τα μούρα της αρώνιας περιέχουν σπόρους, τα οποία δεν αλέστηκαν πλήρως και έμειναν στην σκόνη που προέκυψε. Επιλέχθηκε ήπια θερμοκρασία ξήρανσης για την μικρότερη θερμική καταπόνηση του υλικού.

Ακόμη για την πούλπα της αρώνιας δοκιμάστηκε και ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφυλίωση) ώστε να εξεταστεί εάν επηρεάζει η ξήρανση στους 40°C το υλικό. Οπότε η πούλπα λυοφυλίωθηκε σε συνθήκες -52°C, 0.080 mbar για 72 h με τη χρήση λυοφυλιωτή Christ Alpha 1-4 LD plus freeze dryer και αλέστηκε όπως προηγουμένως.

Βρέθηκε η υπολειπόμενη υγρασία στις ξηρές σκόνες που δημιουργήθηκαν με την ίδια μέθοδο που βρέθηκε η περιεχόμενη υγρασία στις πρώτες ύλες.

#### 3.13.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για τις εκχυλίσσεις της πούλπας της αρώνιας

Τα δείγματα που λήφθηκαν σε διάφορους χρόνους κατά τις εκχυλίσσεις της πούλπας της αρώνιας αναλύθηκαν στο φωτόμετρο SPECTROstar Nano για την εύρεση της κινητικής. Επιλέχθηκε να γίνει ανάλυση της κινητικής μόνο για τις ανθοκυανίνες, καθώς αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών συστατικών της αρώνιας. Οι ανθοκυανίνες απορροφούν μέγιστα στα 520 nm. Για την παρακολούθηση της κινητικής της εκχύλισης, 100 μL από τα κατάλληλα αραιωμένα δείγματα (με τον διαλύτη της εκάστοτε εκχύλισης) σε όλους τους χρόνους που είχαν ληφθεί τοποθετήθηκαν στο microplate του οργάνου και φωτομετρήθηκαν στα 520 nm. Έπειτα χαράχθηκαν οι καμπύλες κινητικής για τις ανθοκυανίνες με άξονες την απορρόφηση στα 520 nm στον y άξονα και τον χρόνο στον x άξονα.



Εικόνα 17: Χρονικά δείγματα από διαφορετικές εκχυλίσσεις τοποθετημένα στα microplate

#### 3.13.5 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η αναλυτική μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) προτάθηκε το 1927 από τους Otto Folin, Vintilă Ciocâlțeu και Willey Glover Denis και χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της τυροσίνης. Αργότερα όμως διαπιστώθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια για ένα πλήθος ακόμα ενώσεων και πλέον χρησιμοποιείται κατά κανόνα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων στα διάφορα διαλύματα. Το εν λόγω αντιδραστήριο είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που προέρχονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον τα οξέα αυτά ανάγονται, ενώ ταυτόχρονα οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται. Ως αποτέλεσμα, παράγονται οξειδία του βολφραμίου και του μολυβδαινίου τα οποία προσδίδουν στο διάλυμα κυανό χρώμα. Το χρώμα αυτό παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm και η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του διαλύματος σε φαινολικές ενώσεις (Everette et al., 2010). Ο μηχανισμός των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα δεν έχει διαπιστωθεί με σαφήνεια, ωστόσο η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη διότι παρέχει αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα ικανοποιητικής ακρίβειας.



Εικόνα 18: Διαλύματα πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

#### 3.13.5.1 Πρωτόκολλο της Μεθόδου

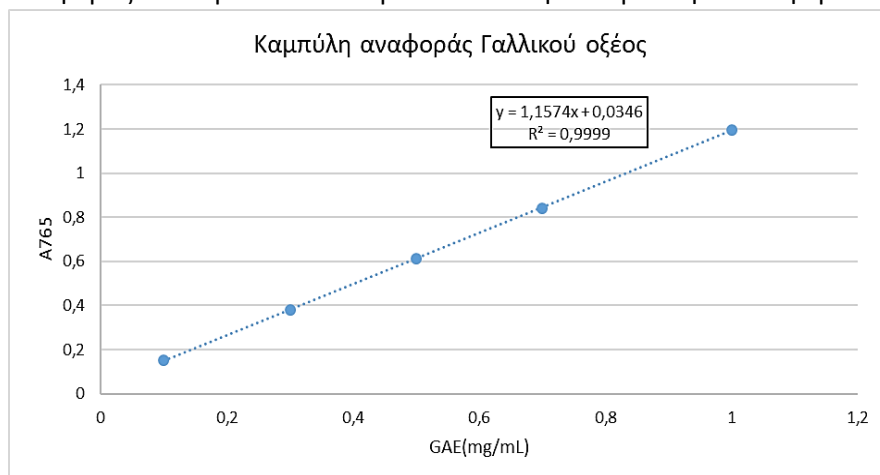
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο F-C ακολουθήθηκαν τα βήματα που προβλέπει το πρωτόκολλο της μεθόδου:

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 7.9 mL απιονισμένο νερό, 0.1 mL από κατάλληλα αραιωμένο δείγμα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε εκχύλιση και 0.5 mL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.
2. Μετά από χρονικό διάστημα επώασης 30 sec - 8 min προστέθηκε 1.5 mL κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και πραγματοποιήθηκε ανάδευση των δειγμάτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες.
3. Παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο ένα τυφλό δείγμα στο οποίο αντί για 0.1 mL αραιωμένου δείγματος τοποθετούνται 0.1 mL του εκάστοτε διαλύτη της εκχύλισης.
4. Τα δείγματα επώαστηκαν για 2 h στους  $20^\circ\text{C}$  απουσία φωτός, καθώς το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu θεωρείται φωτοευαίσθητο.
5. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 765 nm.
6. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση σε πολυφαινόλες βάσει της τιμής απορρόφησης και της καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος και εκφράστηκε ως mg GAE (γαλλικού οξέος)/mL.

#### 3.13.5.2 Χάραξη καμπύλης αναφοράς Folin Ciocalteu

Για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με την χρήση γαλλικού οξέος ως φαινολικό υπόστρωμα. Αρχικά, για την παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος, προστέθηκαν 104.6 mg γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, ακολούθησε διαλυτοποίηση αυτών με 12 mL αιθανόλη (EtOH) και στην συνέχεια έγινε προσθήκη απιονισμένου νερού ως την χαραγή (stock διάλυμα συγκέντρωσης C). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων 0.1C, 0.3C, 0.5C και 0.7C. Τέλος με την μέθοδο Folin-Ciocalteu πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση τους στα 765 nm, οπότε και από τις τιμές των απορροφήσεων κατασκευάστηκε η καμπύλη

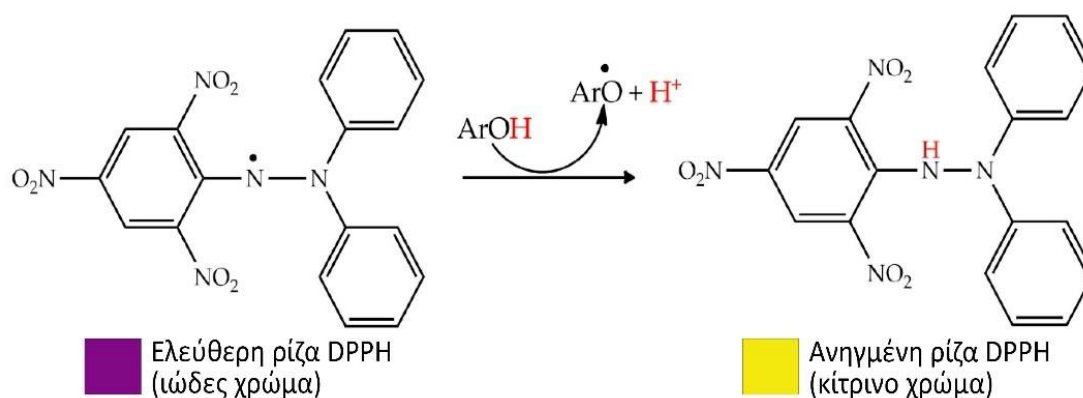
αναφοράς. Παρακάτω παρατίθεται η καμπύλη αναφορά που χαράχθηκε:



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς Γαλλικού Οξέος (GA) που κατασκευάστηκε εργαστηριακά.

### 3.13.6 Προσδιορισμός ολικής αντιρριζικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Σε συνέχεια της μελέτης των φαινολικών ενώσεων, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί μεταξύ αυτών η ποσότητα των φαινολών με αντιρριζική ικανότητα, εκείνων δηλαδή που μπορούν να δωρίσουν πρωτόνια και να λειτουργήσουν ως «δεσμευτές» ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος προσδιορισμού με DPPH αναπτύχθηκε αρχικά από τον Marsden Blois το 1958, όμως στη συνέχεια προτάθηκαν πολλές βελτιστοποιημένες παραλλαγές της. Η βασική αρχή ωστόσο παραμένει η ίδια και στηρίζεται σε ένα κύριο αντιδραστήριο, την ελεύθερη ρίζα του αζώτου α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH), η οποία είναι μία από τις ελάχιστες εμπορικά διαθέσιμες ελεύθερες ρίζες. Η ένωση αυτή διαθέτει χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm, ενώ όταν αναχθεί αποχρωματίζεται. Διαλύοντας ποσότητα αντιοξειδωτικών σε διάλυμα DPPH, μέρος των ελεύθερων ριζών δεσμεύεται από τα αντιοξειδωτικά, οπότε παρατηρείται εξασθένηση του ιώδους χρώματος. Η μεταβολή της απορρόφησης του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών.



Εικόνα 19: Η αντίδραση αναγωγής του DPPH. Ως ArOH ορίζεται η ένωση που λειτουργεί ως δεσμευτής της ελεύθερης ρίζας, εδώ είναι τα φαινολικά συστατικά

### 3.13.6.1 Πρωτόκολλο της Μεθόδου

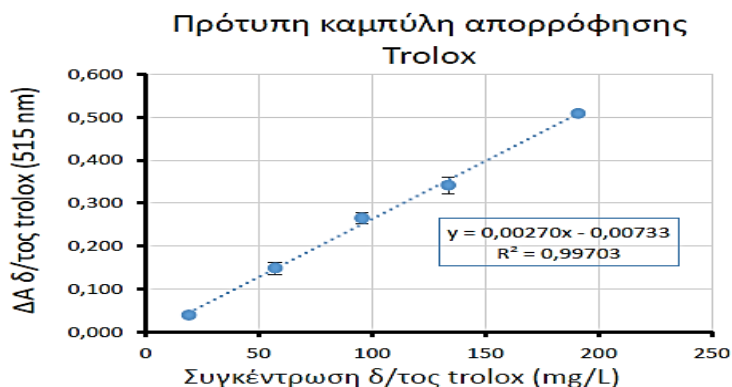
1. Η μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτική ικανότητα με το αντιδραστήριο DPPH προβλέπει τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην παρούσα μελέτη:
2. Παρασκευή διαλύματος DPPH 25 ppm με αραιώση 2,5 mg στερεού DPPH σε 100 mL μεθανόλης.
3. Παρασκευή προς ανάλυση δείγματος με αραιώση 100  $\mu$ L διαλύματος αντιοξειδωτικών σε 3,9 mL διαλύματος DPPH.
4. Επώαση διαλύματος για 30 min. Το αντιδραστήριο DPPH είναι και αυτό ιδιαιτέρως φωτοευαίσθητο οπότε επιλέχθηκε ένα σκιερό μέρος.
5. Φωτομέτρηση του προς ανάλυση δείγματος και του διαλύματος DPPH στα 515 nm (Hitachi, Japan), αφού πρώτα η ένδειξη του οργάνου μηδενίστηκε με τυφλό δείγμα (καθαρή μεθανόλη).
6. Υπολογισμός της διαφοράς απορρόφησης ( $\Delta A$ ) του προς ανάλυση δείγματος από το καθαρό διάλυμα DPPH και προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε φαινολικά με αντιοξειδωτική ικανότητα βάσει της καμπύλης αναφοράς



Εικόνα 20: Διάλυμα DPPH 25ppm σε ογκομετρική φιάλη.

### 3.13.6.2 Χάραξη καμπύλης αναφοράς DPPH

Για την αξιοποίηση των απορροφήσεων που καταγράφηκαν, απαιτήθηκε αρχικά η κατασκευή καμπύλης αναφοράς βάσει της οποίας οι  $\Delta A$  των δειγμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση εκφράστηκαν σε μονάδες συγκέντρωσης. Για το σκοπό αυτό, πρότυπο διάλυμα οξέος Trolox – μεθανόλης υποβλήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις με νερό και προέκυψαν δείγματα συγκεντρώσεων 19, 57, 95, 164 και 191 mgTrolox/L. Εν συνεχεία, παρασκευάστηκαν διαλύματα DPPH βάσει του πρωτοκόλλου της μεθόδου και αφού ολοκληρώθηκε η επώασή τους φωτομετρήθηκαν στα 515 nm (Hitachi, Japan). Από τις μετρήσεις που ελήφθησαν υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες διαφορές  $\Delta A$  και κατασκευάστηκε η ακόλουθη καμπύλη αναφοράς. Η αντιρριζική ικανότητα με βάση την καμπύλη εκφράζεται ως mg ισοδύναμων Trolox/L.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς Trolox.

### 3.13.7 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

#### 3.13.7.1 Χρωματογραφία – Αρχή της μεθόδου

Ο όρος «χρωματογραφία» περιλαμβάνει ένα πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Τα επιμέρους συστατικά, αφού διαχωριστούν, προσδιορίζονται ποιοτικά και ποσοτικά από συζευγμένη τεχνική ανίχνευσης (συνήθως φασματοσκοπική).

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase) και μία στατική (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη, ή μίγμα διαλυτών ενώ η στατική από πορώδες στερεό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Το προς ανάλυση δείγμα έρχεται σε επαφή με τις δύο φάσεις και λόγω της διαφορετικής φυσικοχημικής συγγένειας που εμφανίζουν τα συστατικά του με την κάθε φάση, επέρχεται ο διαχωρισμός. Πιο αναλυτικά: Κάθε μόριο μιας ουσίας κατά την κίνησή του διαμέσω της στήλης μετακινείται πολλές φορές μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Αν αλληλεπιδρά ισχυρά με την κινητή φάση θα παρασυρθεί ταχύτερα, ενώ αν αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση θα κινηθεί βραδύτερα. Η βαθμός αλληλεπίδρασης των μορίων με την κάθε φάση ορίζεται από διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, το φορτίο, την πτητικότητα, την διαλυτότητα κ.α. Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, τα διάφορα συστατικά του μίγματος εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους. Ο χρόνος έκλυσης (ή χρόνος κατακράτησης, ή χρόνος ανάσχεσης)  $t_R$  αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες (Κοντογιάννης Χ., 2015).

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε:

- Χρωματογραφία στήλης (η στατική φάση βρίσκεται σε μορφή στήλης)
- Επίπεδη χρωματογραφία - TLC (η στατική φάση βρίσκεται σε μορφή επίπεδης στοιβάδας)
- Αέρια χρωματογραφία - GC (ως κινητή φάση χρησιμοποιείται αδρανές αέριο)
- Υγρή χρωματογραφία - LC (η κινητή φάση είναι υγρό) κ.α. ((Ντουρτόγλου Β., 2014)

### 3.13.7.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance Liquid Chromatography – HPLC)

Αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει πολύ σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Διακρίνεται σε:

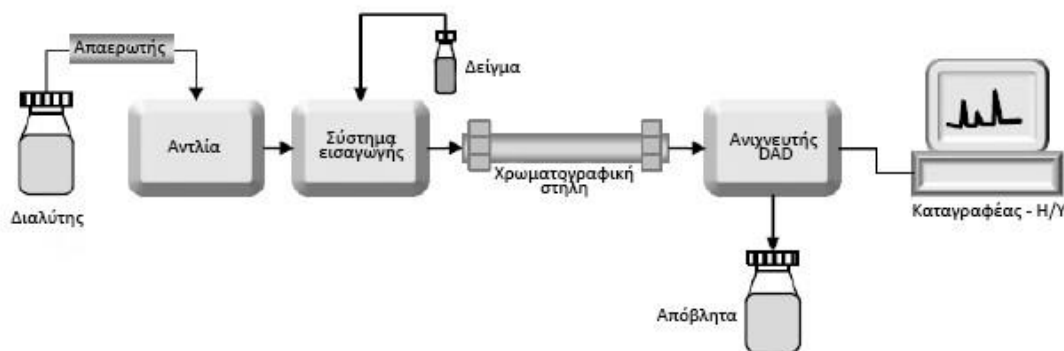
- HPLC με στήλη κανονικής φάσης, όπου η στατική φάση είναι πολική και η κινητή μειωμένης πολικότητας. Οι άπολες ενώσεις εκλούνται πρώτες και με σταδιακή αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης εκλούνται τα πιο πολικά μόρια.
- HPLC με στήλη αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση είναι άπολη και η κινητή πολική. Οι πολικές ενώσεις εκλούνται πρώτες και με σταδιακή μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης εκλούνται τα λιγότερο πολικά μόρια.

### 3.13.7.3 Οργανολογία HPLC

Η εργαστηριακή διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποτελεί μια τυπική διάταξη HPLC και περιλαμβάνει κατά σειρά τα παρακάτω μέρη:

- Περιέκτες διαλυτών: Φιάλες στις οποίες είναι αποθηκευμένοι οι διαλύτες, μίγμα των οποίων θα αποτελέσει την κινητή φάση.
- Απαερωτής κενού: Εξασφαλίζει την πλήρη απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη στήλη.
- Αντλία: Εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης στο σύστημα, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη στήλη και εισάγει το δείγμα στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη: Επιτυγχάνει το διαχωρισμό του μίγματος στα συστατικά του και είναι θερμοστατούμενη. Ακριβώς πριν, έχει τοποθετηθεί σε σειρά μια «προ-στήλη» η οποία λειτουργεί ως προστασία, αφού έχει τη δυνατότητα κατακράτησης τυχόντων στερεών υπολειμμάτων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν σημαντική βλάβη στη λειτουργία της χρωματογραφικής στήλης.
- Ανιχνευτής: Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD). Το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρίεται η απορρόφηση του φωτός σε διάφορα (προκαθορισμένα) μήκη κύματος. Άλλος ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector). Ακολουθούν αρκετοί ακόμη όπως οι αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detectors), οι φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detectors, MS Detectors), οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detectors) κ.α.
- Καταγραφικό: Καταγράφει συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης το μετρούμενο σήμα και το προωθεί στον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
- Συλλέκτης αποβλήτων: Φιάλη όπου καταλήγει η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος.





Εικόνα 21: Τυπική εργαστηριακή διάταξη HPLC

### 3.13.7.4 Προσδιορισμός βιοδραστικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος που εφαρμόστηκε κατά κύριο λόγο ήταν μια HPLC με στήλη αντίστροφης φάσης και τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται παρακάτω [διάταξη HPLC (1)]. Προφανώς, τα πολικότερα συστατικά εξήλθαν ταχύτερα από τη χρωματογραφική στήλη και σε μεταγενέστερους χρόνους εξήλθαν τα πιο άπολα συστατικά, κατά σειρά ελαττούμενης πολικότητας.

Η ποσότητα του δείγματος που εισήχθη στη στήλη ορίστηκε στα 20  $\mu\text{L}$  για τα λιγότερο πλούσια σε φαινολικά συστατικά δείγματα και για τα πιο πλούσια στα 10  $\mu\text{L}$ .

Η αναλύσεις διήρκεσαν 70 λεπτά και περιελάμβαναν τη ροή μίγματος τριών διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης αναλογίας. Η ροή του μίγματος διαλυτών ρυθμίστηκε στο 1  $\text{mL}/\text{min}$ . Η χρονική εξέλιξη της σύστασης των διαλυτών έκλουσης ακολούθησε το πρόγραμμα που παρουσιάζεται παρακάτω στον Πίνακα 2.1:

Πίνακας 7: Σύσταση του μίγματος διαλυτών (κινητή φάση) κατά τη χρονική εξέλιξη της ανάλυσης

Χρόνος t (min)	A % (H <sub>2</sub> O 0.2% TFA)	B % (MeOH 0.2% TFA)	C % (MeCN 0.2% TFA)
0	90	6	4
5	85	9	6
30	71	17,4	11,6
60	0	85	15
70	0	85	15

Ως σταθερή φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης με διαστάσεις 4,6mm x 150 mm, διάμετρο σωματιδίων 5  $\mu\text{m}$  και μέγεθος πορώδους 95 $\text{\AA}$  (Agilent Technologies, Germany).

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν συστοιχίας φωτοδιόδων - DAD (Hewlett Packard, Germany) και για τις παρούσες αναλύσεις ορίστηκε η λήψη δεδομένων σε 4 μήκη κύματος (280, 320, 360 και 520 nm). Η επιλογή των συγκεκριμένων μηκών κύματος σχετίζεται με το γεγονός ότι οι ουσίες που μελετώνται παρουσιάζουν σε αυτά μέγιστες απορροφήσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα 320 nm ενδείκνυνται για τη μελέτη των φαινολικών οξέων, τα 360 nm για τη μελέτη των φλαβονολών και τα 520 για τη μελέτη των ανθοκυανινών, στις οποίες είναι πλούσιος ο καρπός της αρώνιας. Τα 280 nm είναι ένα μήκος κύματος στο οποίο όλα τα

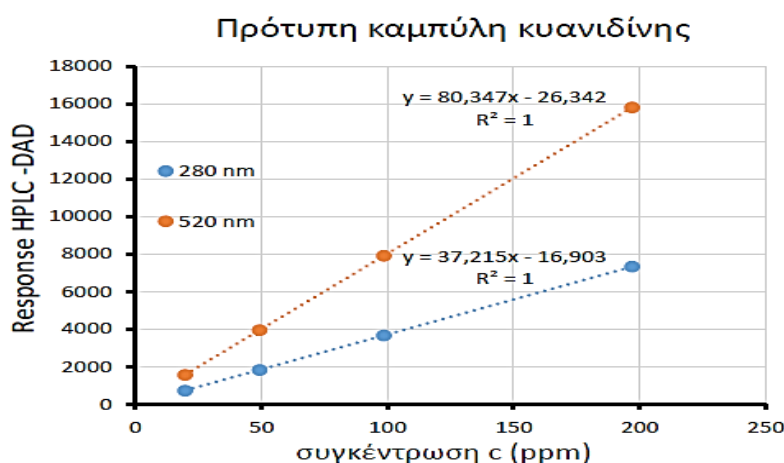
παραπάνω συστατικά παρουσιάζουν μετρήσιμες απορροφήσεις, οπότε αποτελούν μια καλή επιλογή για την αξιολόγηση του δείγματος σε αρχικό επίπεδο.

### 3.13.7.5 Ποσοτικοποίηση επιμέρους φαινολικών συστατικών με HPLC (φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, ανθοκυανινών)

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις τριών ομάδων φαινολικών ενώσεων (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες) στα διάφορα εκχυλίσματα της πούλπας και των φύλλων της αρώνιας. Για τη μετατροπή των απορροφήσεων που μετρήθηκαν με την HPLC σε συγκεντρώσεις, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς που παρουσιάζονται παρακάτω.

#### Ποσοτικοποίηση ανθοκυανινών

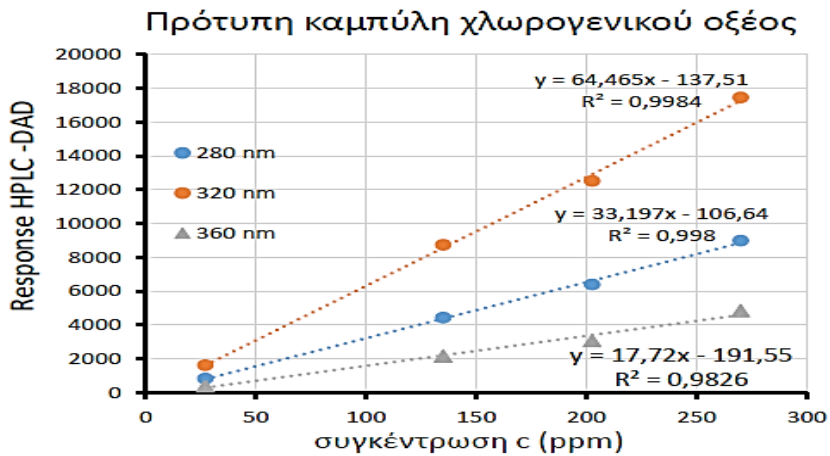
Για την ποσοτικοποίηση των ανθοκυανινών των δειγμάτων απαιτήθηκε η χάραξη πρότυπης καμπύλης κυανιδίνης. Για την ποσοτικοποίηση των ανθοκυανινών χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς η οποία χαράχθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων κυανιδίνης. Με βάση την καμπύλη, το εμβαδόν των κορυφών του χρωματογραφήματος εκφράζεται ως ισοδύναμο κυανιδίνης σε mg/mL :



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη κυανιδίνης. Οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν τη μέγιστη απορρόφηση στα 520 nm.

#### Ποσοτικοποίηση φαινολικών οξέων

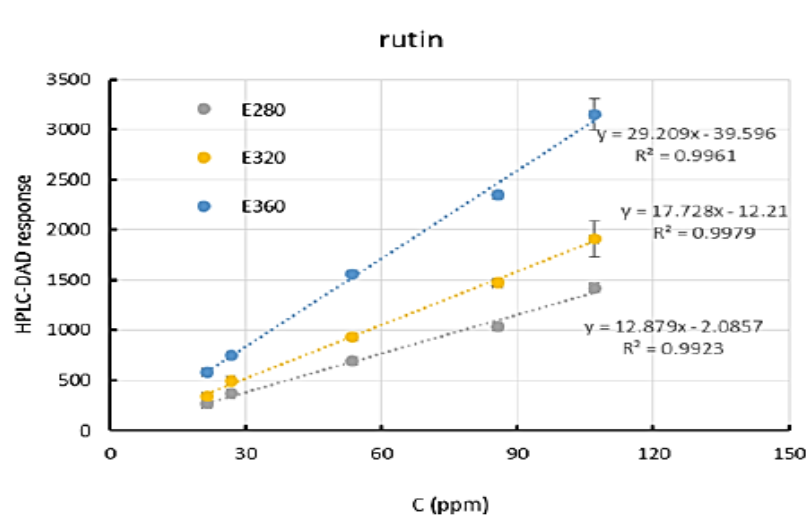
Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων κατασκευάστηκε κατά αντίστοιχο τρόπο η καμπύλη αναφοράς με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων χλωρογενικού οξέος. Με βάση την καμπύλη, το εμβαδόν των κορυφών του χρωματογραφήματος εκφράζεται ως ισοδύναμο χλωρογενικού οξέος σε mg/mL :



Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη χλωρογενικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 320 nm.

#### Ποσοτικοποίηση φλαβονολών

Για την ποσοτικοποίηση των φλαβονολών ελήφθη από το εργαστήριο η καμπύλη αναφοράς της ρουτίνης, που είχε χαραχθεί σε προγενέστερο χρόνο. Με βάση την καμπύλη, το εμβαδόν των κορυφών του χρωματογραφήματος εκφράζεται ως ισοδύναμα ρουτίνης σε mg/mL :



Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη ρουτίνης. Οι φλαβονόλες εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 360 nm.

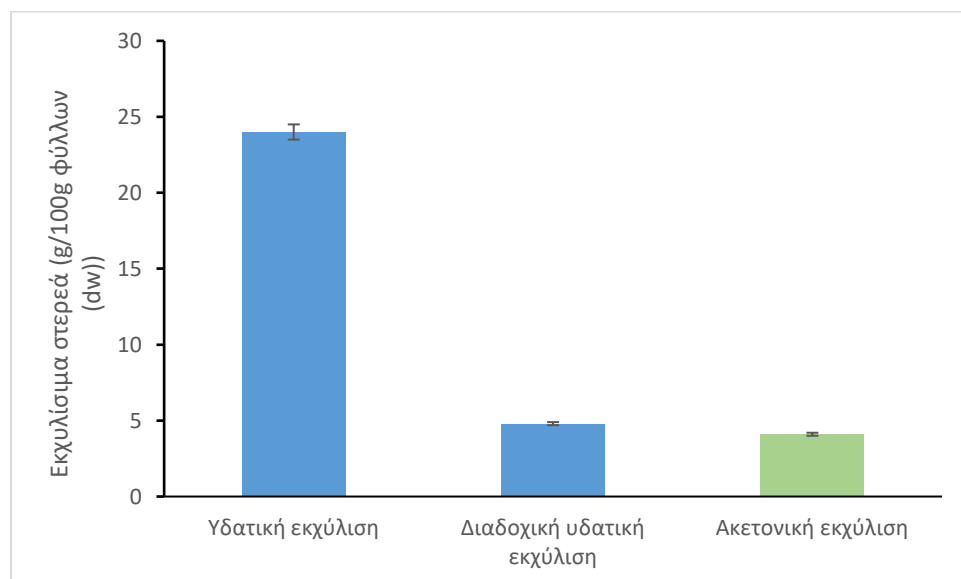
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Εκχύλιση φύλλων Αρώνιας και μερικός χαρακτηρισμός τους

#### 4.1.1 Παραλαβή ολικών στερεών

Προζυγισμένη ποσότητα αποψυγμένων φύλλων αρώνιας ξηράθηκε στους 100 °C και προσδιορίστηκε η υγρασία τους. Ακόμη βρέθηκε η υπολειπόμενη υγρασία στην ξηρή σκόνη φύλλων που δημιουργήθηκε με ξήρανση στους 40°C για την εκχύλιση τους. Προέκυψε ότι τα φύλλα περιείχαν υγρασία  $50,3 \pm 1,6$  % κατά βάρος και η υπολειπόμενη υγρασία της σκόνης των φύλλων ήταν ίση με  $6,07 \pm 0,01$  % κατά βάρος.

Η ξηρή σκόνη φύλλων υπέστη δύο διαδοχικές εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό (αναλογία 1:30 w/v) με την μέθοδο της εκχύλισης υπό ανάδευση για 24 ώρες και μία εκχύλιση με ακετόνη (αναλογία 1:15 w/v) σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο και την αντιριζική ικανότητα. Από την πρώτη εκχύλιση της ξηρής σκόνης των φύλλων με το νερό εκχυλίστηκαν  $0,240 \pm 0,005$  g στερεών/g φύλλων σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των φύλλων σε στερεά ήταν  $24,0 \pm 0,5$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Από την διαδοχική της εκχύλιση προέκυψαν  $0,048 \pm 0,001$  g στερεών/g φύλλων, δηλαδή απόδοση σε στερεά  $4,8 \pm 0,1$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Ενώ για την εκχύλιση της ξηρής σκόνης με ακετόνη σε σταθερή κλίνη εκχυλίστηκαν  $0,041 \pm 0,001$  g στερεών/g φύλλων, δηλαδή απόδοση  $4,1 \pm 0,1$  % w/w (επί ξηρής βάσης).



Διάγραμμα 6: Παραλαβή εκχυλίσμων στερεών από φύλλα της αρώνιας. dw = dry weight.

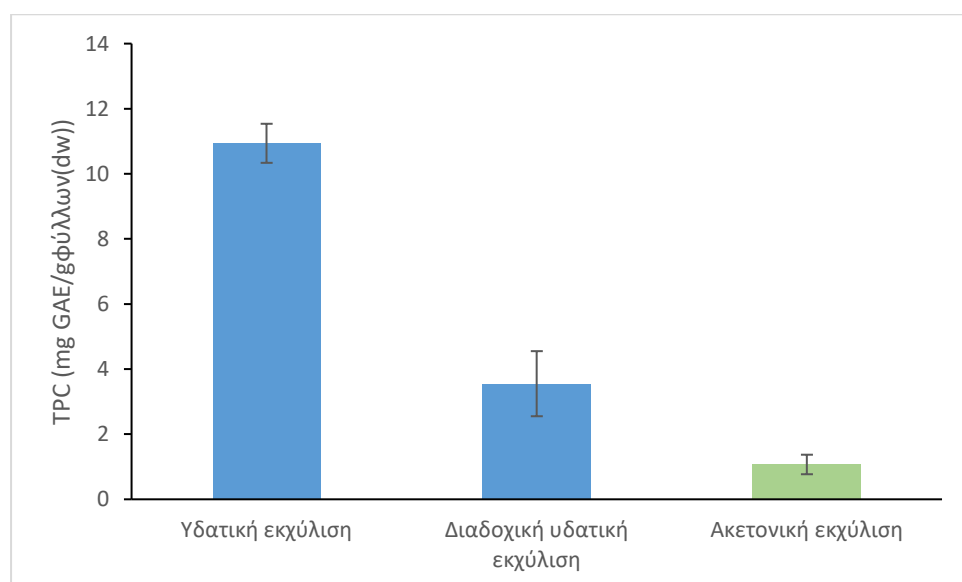
Η συνολική απόδοση της υδατικής εκχύλισης προέκυψε 28,8 %, η οποία ανέρχεται κοντά στο 1/3 του υλικού και αποτελεί σημαντικό ποσοστό. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η ακετονική εκχύλιση είχε πολύ χαμηλότερη απόδοση από την συνολική απόδοση της υδατικής εκχύλισης (4,1% w/w έναντι 28,8% w/w), που σημαίνει πως η εκχύλιση με ακετόνη δεν εκχύλισε πολλά συστατικά των φύλλων της αρώνιας. Αυτό εξηγείται καθώς η ακετόνη παραλαμβάνει τα μη πολικά συστατικά των φύλλων της αρώνιας, τα οποία είναι πολύ λιγότερα από τα

πολικά. Τα πολικά συστατικά των φύλλων της αρώνιας είναι τα σάκχαρα και οι φαινολικές ενώσεις ενώ τα μη πολικά συστατικά αποτελούν οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή κ.α. Σύμφωνα με τους Zielińska et al. (2020) τα κύρια σάκχαρα των φύλλων της αρώνιας είναι η σορβιτόλη, η γλυκόζη και η σακχαρόζη. Ακόμη κατά τους Jurendi & Žčetar (2021) τα κύρια φαινολικά συστατικά είναι τα φαινολικά οξέα και οι φλαβονόλες.

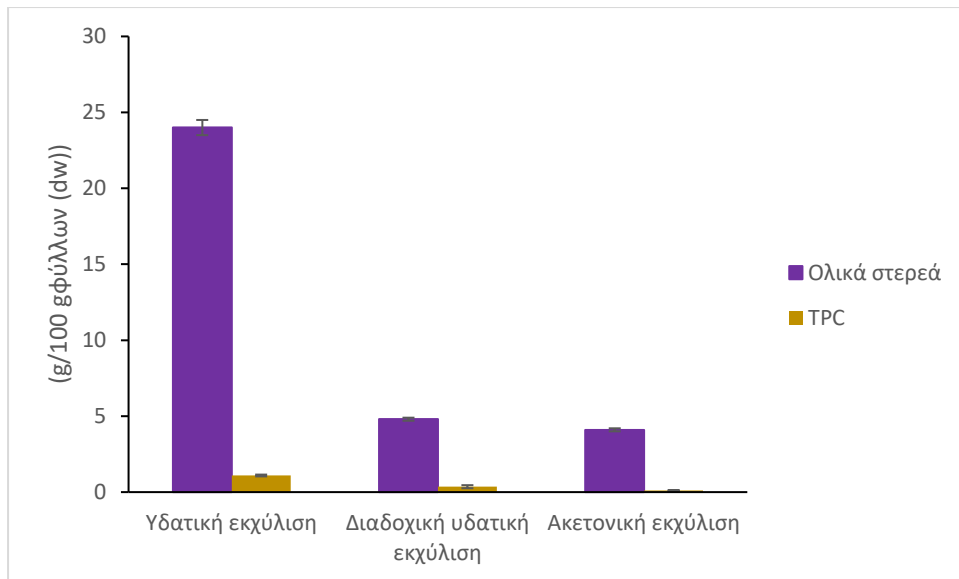
#### 4.1.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του κάθε εκχυλίσματος των φύλλων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents).

Από την υδατική εκχύλιση παρελήφθησαν  $11 \pm 1 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση, ενώ από την διαδοχική υδατική εκχύλιση παρελήφθησαν  $3,6 \pm 0,4 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση. Από την ακετονική εκχύλιση των φύλλων προέκυψαν  $1,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση.



Διάγραμμα 7: Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου από τα φύλλα της αρώνιας. TPC σε GAE (Gallic Acid Equivalents). dw = dry weight.



Διάγραμμα 8: Προσδιορισμός εκχυλίσιμων στερεών και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) από φύλλα της αρώνιας. TPC σε GAE (Gallic Acid Equivalents). dw = dry weight.

Παρατηρείται ότι οι εκχυλίσεις με υψηλότερη απόδοση σε ολικά στερεά επέφεραν και υψηλότερη απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο, όπως και αναμενόταν. Η υδατική εκχύλιση μαζί με την διαδοχική υδατική απέδωσαν  $14,6 \pm 1,4 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}(dw)}$  ή  $9,2 \pm 0,9 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}(fw)}$  και  $50,4 \pm 2,1 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{ολ.στερεών εκχυλίσματος}}$ . Οι Cvetkoníć et al. (2018) με εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό παρέλαβαν ολικό φαινολικό περιεχόμενο ίσο με  $131,53 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{ολ.στερεών εκχυλίσματος}}$ . Με την υπό ανάδευση εκχύλιση για 24 ώρες με νερό και την διαδοχική της, παραλήφθηκε οπότε το 38% του ολικού φαινολικού περιεχομένου.

Η ακετονική εκχύλιση επέφερε πολύ χαμηλότερη απόδοση ( $1,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}(dw)}$ ). Ήταν αναμενόμενο η ακετονική εκχύλιση να αποδώσει χαμηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, καθώς η ακετόνη λαμβάνει τις μη πολικές ενώσεις και δεν λαμβάνει τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες, που ευθύνονται κυρίως για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων της αρώνιας.

Ακόμη οι Cvetkoníć et al. (2018) πραγματοποίησαν εκχυλίσεις σε πολτοποιημένα φρέσκα φύλλα αρώνιας με διαλύτη μίγματα αιθανόλης-νερού για 30, 60 και 90 λεπτά υπό ανάδευση και προέκυψε ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των φύλλων της αρώνιας κυμαίνονταν από 11,0 έως  $28,18 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}(fw)}$ . Η τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος των φύλλων που προσδιορίστηκε στην παρούσα έρευνα πλησιάζει το εύρος τιμών των εκχυλίσεων με μίγμα αιθανόλης-νερού. Η χαμηλότερη τιμή που προέκυψε μπορεί να οφείλεται στο ότι το μίγμα αιθανόλης-νερού είναι καταλληλότερος διαλύτης για τα φαινολικά συστατικά των φύλλων σε σχέση με το νερό μόνο του. Ακόμη ένας σημαντικός παράγοντας είναι η ξήρανση που είχαν υποστεί τα φύλλα πριν την εκχύλιση (ξήρανση υπό αέρα στους  $40^{\circ}\text{C}$ ), ενώ τα πειράματα των Cvetkoníć et al. (2018) σε φρέσκα φύλλα πολτοποιημένα. Η ξήρανση των φύλλων, παρότι έγινε σε ήπια θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

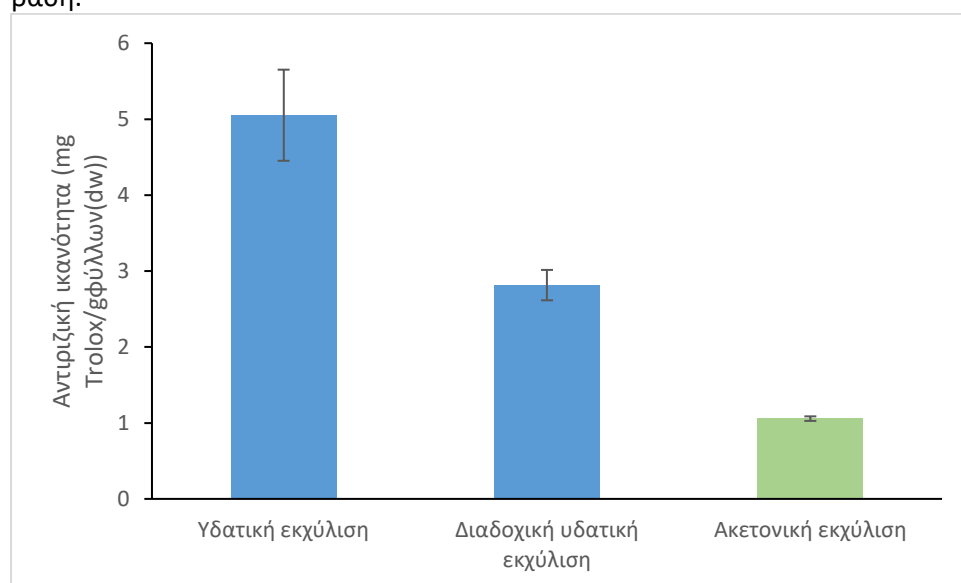
Πίνακας 8: Σύγκριση ανάκτησης στερεών και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στις εκχυλίσεις των φύλλων της αρώνιας

Εκχυλίσμα συστατικά		Υδατική εκχύλιση φύλλων	Διαδοχική υδατική εκχύλιση φύλλων	Ακετονική εκχύλιση
Εκχυλίσμα στερεά βστερεών/ gφύλλων		0,240±0,005	0,048±0,001	4,1±0,1
TPC mgGAE/ gφύλλων		11±1	3,6±0,4	1,1±0,5
% TPC/στερεά w/w		4,56±0,06	7,4±0,1	2,61±0,03

#### 4.1.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

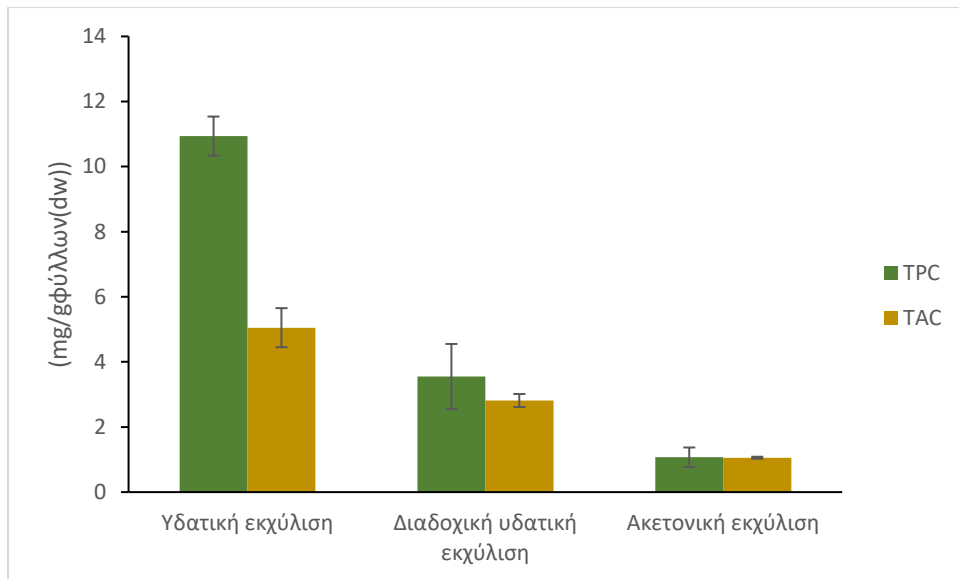
Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) όλων των εκχυλισμάτων των φύλλων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Η υδατική εκχύλιση παρουσίασε αντιριζική ικανότητα ίση με  $5,1 \pm 0,6 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση, ενώ από την διαδοχική υδατική εκχύλιση παρελήφθησαν  $2,8 \pm 0,2 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση. Η υδατική εκχύλιση μαζί με την διαδοχική υδατική απέδωσαν  $7,9 \pm 0,8 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση ή  $27,4 \pm 1,3 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{ολ.στερεών εκχυλίσματος}}$ . Οι Cvetković et al. (2018) με εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό βρήκαν την αντιριζική ικανότητα ίση με  $30,45 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{ολ.στερεών εκχυλίσματος}}$ . Με την υπό ανάδευση εκχύλιση για 24 ώρες με νερό και την διαδοχική της, παραλήφθηκε οπότε το 90% του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Παραλήφθηκε οπότε το υψηλό ποσοστό των ουσιών με αντιριζική ικανότητα των φύλλων της αρώνιας.

Από την ακετονική εκχύλιση των φύλλων προέκυψαν  $1,06 \pm 0,03 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση.



Διάγραμμα 9: Προσδιορισμός συστατικών με αντιριζική ικανότητα (TAC) από τις εκχυλίσεις των φύλλων της αρώνιας. Οι συγκεντρώσεις είναι εκφρασμένες σε TE (Trolox Equivalents). dw = dry weight.

Αντιπαραθέτοντας τις αποδόσεις σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τις αποδόσεις σε συστατικά με αντιριζική ικανότητα φαίνεται ότι οι εκχυλίσεις τους εξελίσσονται κατά παρόμοιο τρόπο. Κάτι τέτοιο είναι λογικό και αναμενόμενο, καθώς οι πολυφαινόλες είναι ουσίες που χαρακτηρίζονται από την αντιριζική τους δράση.



Διάγραμμα 10: Ανάκτηση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και ουσιών με αντιριζική ικανότητα (TAC) από τις εκχυλίσεις των φύλλων αρώνιας. TPC σε GAE (Gallic Acid Equivalents) και TAC σε TE (Trolox Equivalents). dw = dry weight.

Στην πρώτη υδατική εκχύλιση η απόδοση ουσιών με αντιριζική ικανότητα (TAC) πρόεκυψε λίγο χαμηλότερη από το 50% της απόδοσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC). Ήταν αναμενόμενο αυτές οι δύο αποδόσεις να προκύψουν πιο κοντά, ωστόσο αυτό δεν συνέβη. Κάποιες από τις φαινολικές ενώσεις των φύλλων της αρώνιας, οπότε δεν απέδωσαν αντιριζική ικανότητα.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και ουσιών με αντιριζική δράση (TAC) που ανακτήθηκαν με τις εκχυλίσεις των φύλλων της αρώνιας.

Εκχυλίσμα συστατικά	Υδατική εκχύλιση φύλλων	Διαδοχική υδατική εκχύλιση φύλλων	Ακετονική εκχύλιση
TAC mg <sub>TE</sub> /g <sub>φύλλων</sub>	5,1±0,6	2,8±0,2	1,06±0,03
TPC mg <sub>GAE</sub> /g <sub>φύλλων</sub>	11±1	3,6±0,4	1,1±0,5
% TAC/TPC w/w	46±6	79±8	99±4

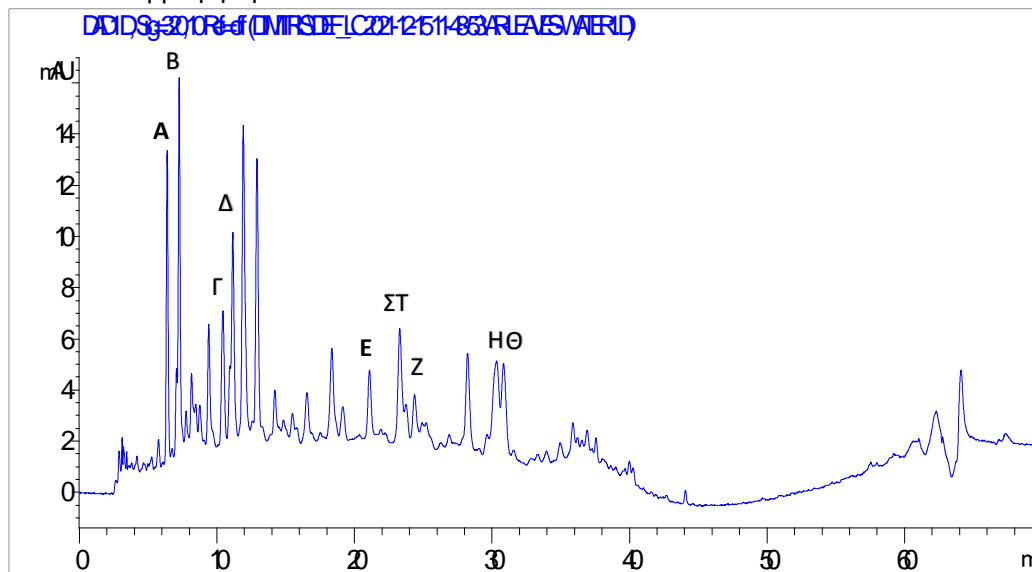
#### 4.1.4 Μελέτη επιμέρους φαινολικών ενώσεων και άλλων συστατικών

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στα φύλλα της αρώνιας ανήκουν στα φαινολικά οξέα, τις φλαβονόλες ή της φλαβαν-3-όλες. Οι φαινολικές ενώσεις παρελήφθησαν κυρίως μέσω της υδατικής εκχύλισης, καθώς το νερό ως ο διαλύτης παραλαμβάνει τις πολικές ενώσεις των φύλλων της αρώνιας. Η ακετονική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για την Προσδιορισμός των μη πολικών ενώσεων, όπως είναι οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή των φύλλων της αρώνιας.

Για τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση (όπου ήταν εφικτό) και την ποσοτικοποίησή τους, τα υδατικά και ακετονικά εκχυλίσματα των φύλλων αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Από κάθε ανάλυση παρελήφθησαν 3 χρωματογραφήματα, στα παρακάτω μήκη κύματος:

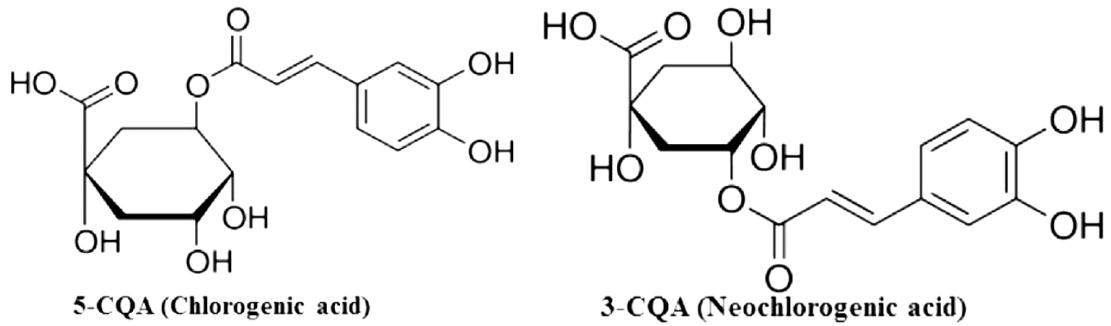


- 280 nm, μήκος κύματος στο οποίο δίνουν ικανοποιητικές απορροφήσεις οι περισσότερες από τις φαινολικές ενώσεις, οπότε μπορούμε να λάβουμε μια συνολική, πρώτη εικόνα του υλικού
- 320 nm, μήκος κύματος κατάλληλο για μελέτη των φαινολικών οξέων, καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.
- 360 nm, μήκος κύματος κατάλληλο για μελέτη των φλαβονών και των φλαβονολών, καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.
- 664 nm, μήκος κύματος για μελέτη των χλωροφυλλών, όπου εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.
- 446 nm, για μελέτη των καροτενοειδών, καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.
- 210 nm, για μελέτη των τριτερπενικών οξέων, καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.



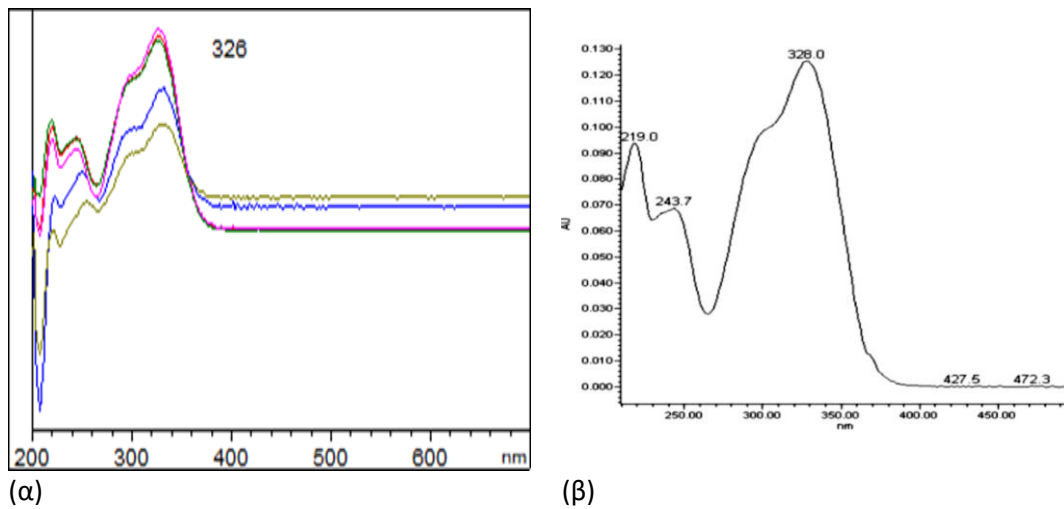
Διάγραμμα 11: Χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος στα 320 nm, εντοπισμός φαινολικών οξέων

Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, εντοπίστηκαν 5 κορυφές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και ορισμένα δευτερεύοντα σε ίχνη (3 κορυφές) στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων. Σε προηγούμενες μελέτες, οι Staszowska-Karkut & Materska(2020), οι Do Thi και Hwang (2014), οι Elena Y. Platonova et al.(2021) έδειξαν ότι τα κύρια φαινολικά οξέα των φύλλων της αρώνιας είναι δύο ισομερή: το χλωρογενικό οξύ και το νεοχλωρογενικό οξύ. Πιθανότατα κάποια φαινολικά οξέα από τα οποία εντοπίστηκαν να ταυτίζονται με τα προαναφερθέντα. Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα εδώ κρίνονται ανεπαρκή για την ακριβή ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων. Θα πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων των φύλλων της αρώνιας στο σύνολο τους και δεν θα γίνει επιμέρους ταυτοποίηση ή ποσοτικοποίηση.

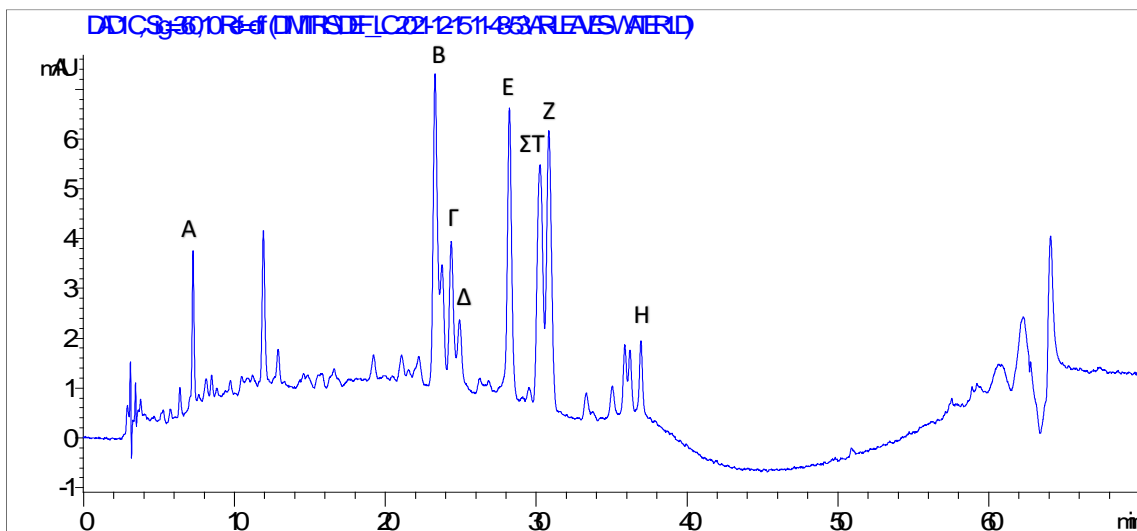


Εικόνα 22: Τα δύο κύρια φαινολικά οξέα της αρώνιας είναι ισομερή και ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των κινικών οξέων.

Συγκρίνοντας φάσμα υπεριώδους-ορατού από τα οξέα που εντοπίστηκαν πειραματικά παρατηρούμε ότι έχουν κοινά σημεία με το φάσμα του χλωρογενικού οξέος που βρέθηκε βιβλιογραφικά (Siahroush et al., 2011).

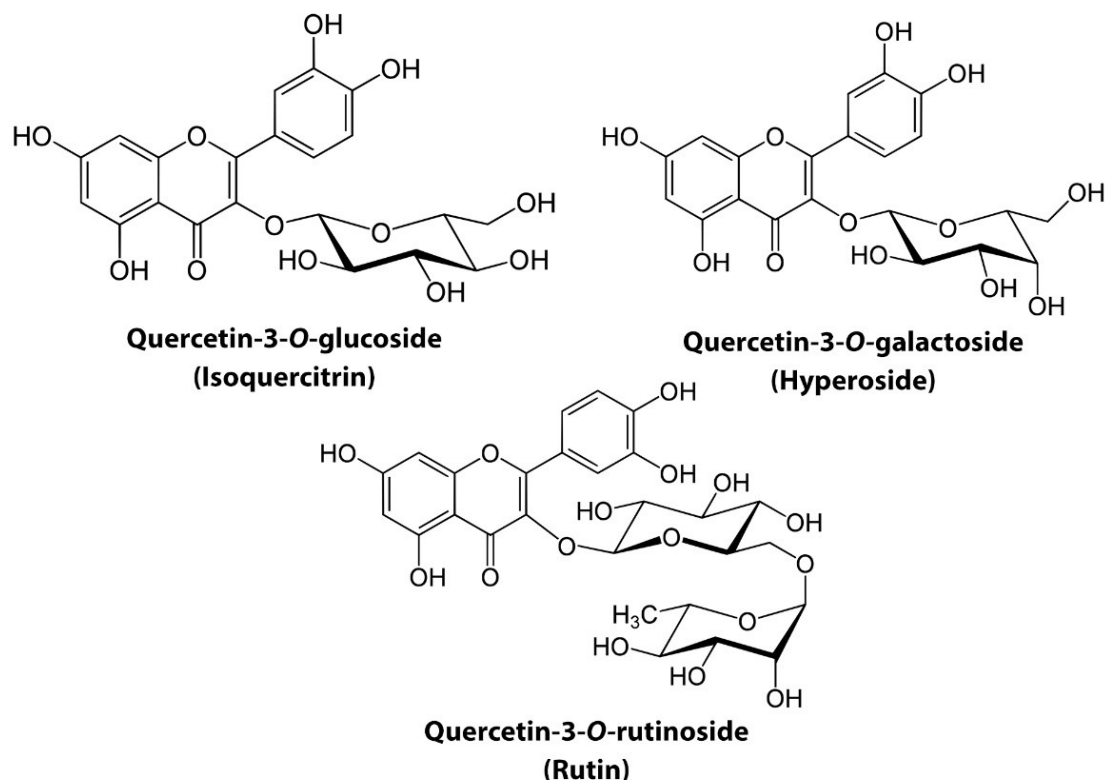


Διάγραμμα 12: (α) Φάσμα φαινολικού οξέος στα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων (πειραματικό)  $t_R=7,254 \text{ min}$   
 (β) φάσμα χλωρογενικού οξέος από τη βιβλιογραφία. Πηγή: Siahroush et al. (2011)



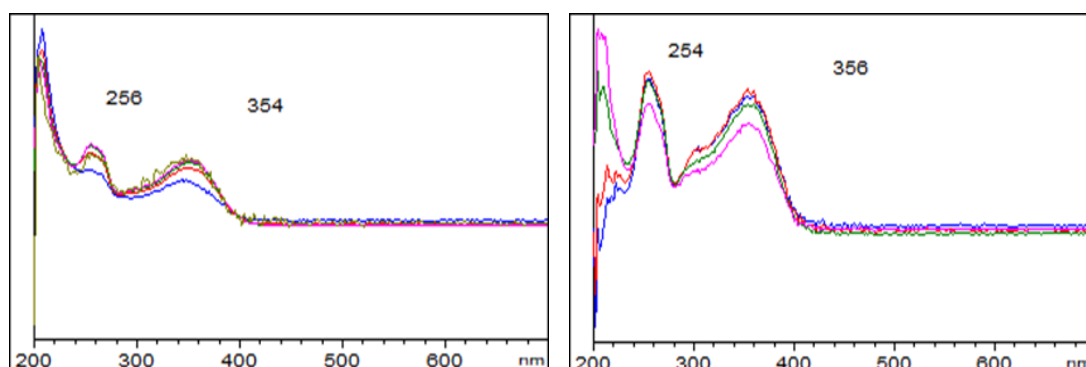
Διάγραμμα 13: Χρωματογράφημα στα 360 nm της υδατικής εκχύλισης, εντοπισμός φλαβονολών

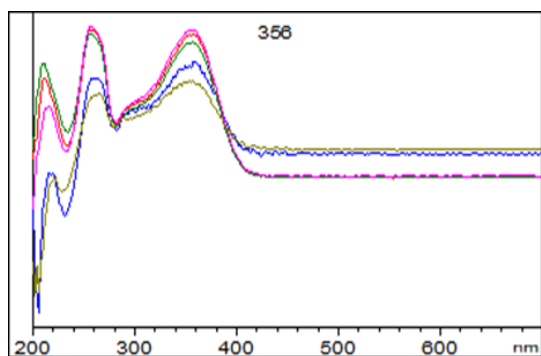
Σε προηγούμενες μελέτες, οι Elena Y. Platonova et al.(2021), οι Do Thi & Hwang(2014) και αρκετές ακόμα ερευνητικές ομάδες, συμφωνούν ότι η κύρια φλαβονόλη της αρώνιας είναι η κερκετίνη η οποία βρίσκεται σε αρκετές γλυκοζυλιωμένες μορφές όπως ο 3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης (Υπεροζίτης), ο 3-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης (Ισοκερκετίνη) και ο 3-O-ρουτινοζίτης της κερκετίνης (Ρουτίνη). Πολύ πιθανό λοιπόν κάποιες από τις φλαβονόλες φλαβονόλες που εντοπίστηκαν εργαστηριακά να ταυτίζονται με τις προαναφερθείσες. Επιπροσθέτως, προηγούμενες έρευνες έχουν εντοπίσει επιπλέον φλαβονόλες στον καρπό της αρώνιας όπως την κερκετίνη σε ελεύθερη μορφή (Jakobek et al., 2007), τον 3-O-βισκοζίτη της κερκετίνης (Skoczynska et al., 2010) και τον 3-O-ροβινοβιοζίτη της κερκετίνης (Ochmian et al., 2009) γεγονός που δυσχεραίνει την προσπάθεια ταυτοποίησης από τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 23: Οι 3 κύριες φλαβονόλες των φύλλων της αρώνιας αποτελούν γλυκοζίτες της κερκετίνης

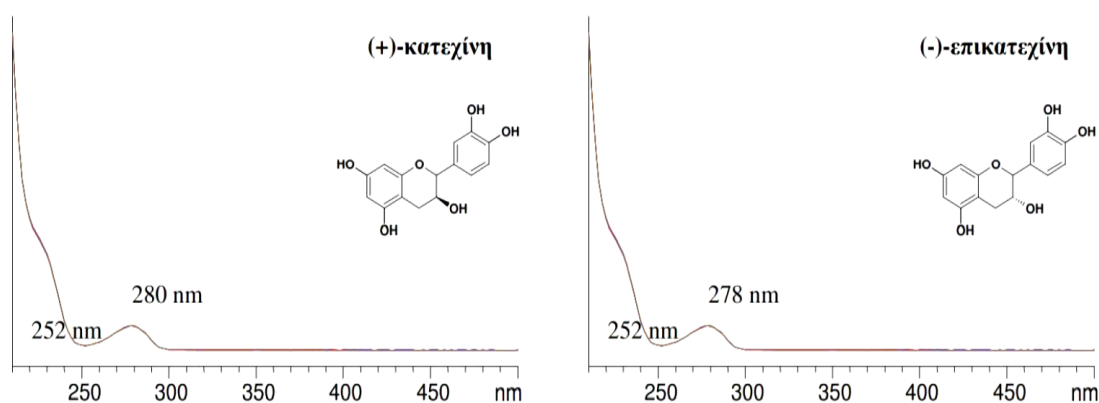
Όσον αφορά τις φλαβονόλες εντοπίστηκαν 4 κορυφές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και ορισμένες δευτερεύουσες σε ίχνη (4 κορυφές). Παρακάτω δίνονται κάποια φάσματα υπεριώδους-ορατού των φλαβοβόλων που εντοπίστηκαν πειραματικά.



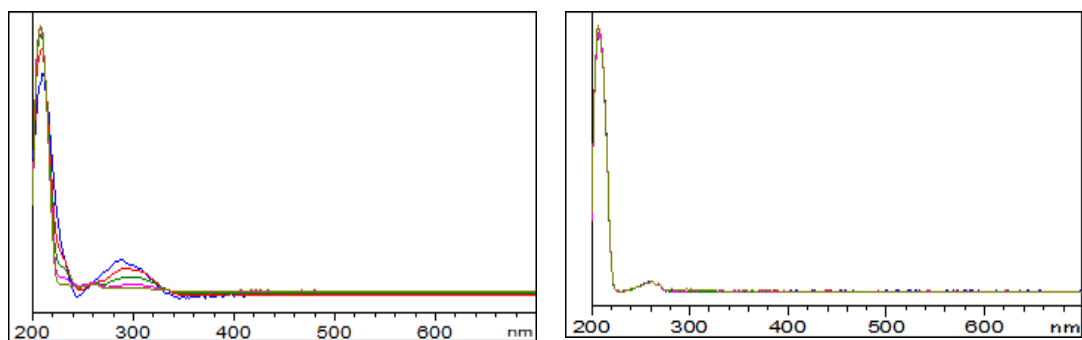


Διάγραμμα 14: Φάσματα υπεριώδους-ορατού φλαβονολών που ανιχνεύθηκαν εργαστηριακά στα φύλλα της της αρώνιας,  $t_R=23,761, 24,369, 28,226$  min αντίστοιχα

Οι φλαβαν-3-όλες βρίσκονται στα φύλλα της αρώνιας σε ελεύθερη μορφή (κατεχίνες και επικατεχίνες), όμως κυρίως εντοπίζονται ως υπομονάδες πολυμερών (συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες). Πράγματι, στα χρωματογραφήματα εντοπίστηκαν μικρές κορυφές που θα μπορούσαν να αποδοθούν στην κατεχίνη ή την επικατεχίνη, στις περισσότερες περιπτώσεις όμως μη αξιοποιήσιμες καθώς επικαλύπτονταν από άλλα συστατικά.

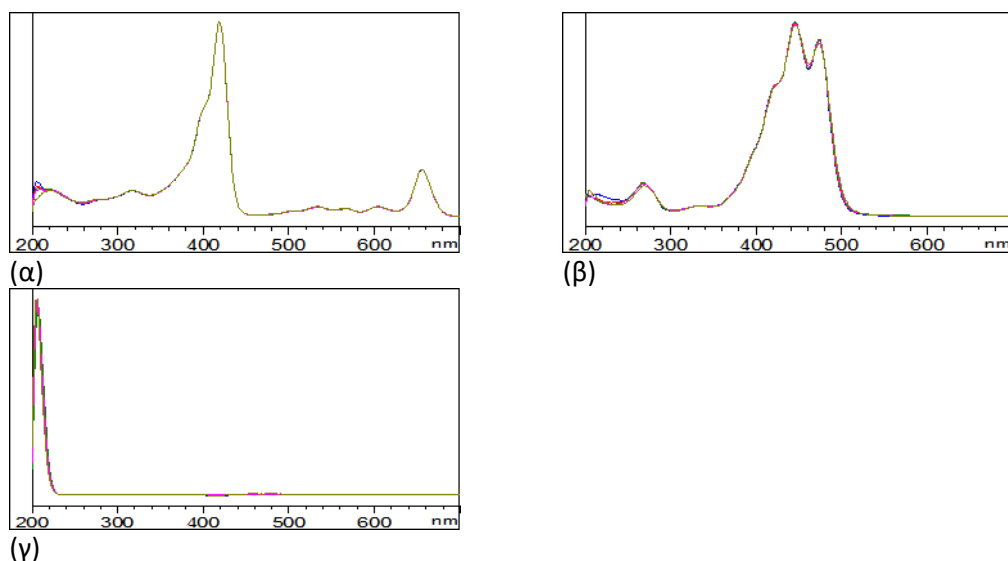


Διάγραμμα 15: Φάσματα υπεριώδους-ορατού των κύριων φλαβαν-3ολών της αρώνιας. Εντοπίζονται σπάνια σε ελεύθερη μορφή, συνήθως αποτελούν μονάδες πολυμερών (προανθοκυανιδίνες). Πηγή: Τσιμογιάννης, 2008.



Διάγραμμα 16: Πειραματικά φάσματα υπεριώδους-ορατού πιθανών φλαβαν-3ολών των φύλλων της αρώνιας

Ακόμη στα ακετονικά εκχυλίσματα εντοπίστηκαν κορυφές που αντιστοιχούσαν σε χλωροφύλλες, καροτενοειδή και κάποιες που πιθανώς αντιστοιχούσαν σε τριτερπενικά οξέα.



Διάγραμμα 17: (α) Φάσμα υπεριώδους-ορατού χλωροφυλλών (β) Φάσμα υπεριώδους-ορατού καροτενοειδών (γ) Φάσμα υπεριώδους-ορατού από πιθανά τριτερπενικά οξέα στα ακετονικά εκχυλίσματα των φύλλων της αρώνιας

#### 4.1.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Αρχικά παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων στο σύνολο τους στις υδατικές εκχυλίσεις των φύλλων. Τα φαινολικά οξέα που εντοπίστηκαν στα δείγματα, ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών με ανάλυση HPLC και την καμπύλη αναφοράς του χλωρογενικού οξέος στα 320 nm ( $E_{320} = 64,465c - 137,51$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα χλωρογενικού οξέος (Chlorogenic Acid Equivalents – ChAE). Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των φαινολικών οξέων στο σύνολο τους σε mg/g<sub>υλικού</sub> σε ξηρή βάση και σε mg/g<sub>ολ.στερεών εκχυλίσματος</sub> για τα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης για τα φαινολικά οξέα στα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων της αρώνιας

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> /g <sub>φύλλων(dw)</sub>	mg <sub>ChAE</sub> /g <sub>ολ.στερεών εκχυλίσματος</sub>
Υδατική εκχύλιση φύλλων (air dried, πλήρης ανάμειξη 24h)	1,2±0,1	5,0±0,3
Διαδοχική υδατική εκχύλιση φύλλων (air dried, πλήρης ανάμειξη 24h)	0,40±0,07	7,3±0,5

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των φλαβονολών στο σύνολο τους στα υδατικά εκχυλίσματα κλασμάτων των φύλλων, αξιοποιήθηκε το σύνολο του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών και η καμπύλη αναφοράς της ρουτίνης στα 360 nm ( $E_{360} = 29,209c - 39,596$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα ρουτίνης (Quercetin Rutinoside (Rutin) Equivalents – QRE). Παρακάτω δίνονται τα

αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των φλαβονολών στο σύνολο τους σε mg/g<sub>υλικού</sub> σε ξηρή βάση και σε mg/g<sub>ολ.στερεών εκχυλίσματος</sub> για τα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης για τις φλαβονόλες στα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων της αρώνιας

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> /g <sub>φύλλων(dw)</sub>	mg <sub>QRE</sub> /g <sub>ολ.στερεών εκχυλίσματος</sub>
Υδατική εκχύλιση φύλλων (air dried, πλήρης ανάμειξη 24h)	1,4±0,4	5,9±0,2
Διαδοχική υδατική εκχύλιση φύλλων (air dried, πλήρης ανάμειξη 24h)	0,7±0,1	14,3±0,7

Τα ολικά φαινολικά οξέα και οι ολικές φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης προέκυψαν αρκετά χαμηλότερες από το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC). Αυτό εξηγείται καθώς η μέθοδος Follin είναι μη ειδική και μπορεί να επηρεαστεί από άλλες μη ταυτοποιημένες φαινόλες καθώς και από μη φαινολικά αναγωγικά μόρια. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται από την επιλεκτική οξείδωση παρόμοιων εύκολα οξειδούμενων ουσιών. Άλλες εύκολα οξειδούμενες ουσίες εκτός από τις φαινόλες περιλαμβάνουν αρωματικές αμίνες, διοξείδιο του θείου, ασκορβικό οξύ και οι ενδολίες. Τα σάκχαρα διασπώνται σε αλκάλια για να δώσουν ενδολίες, οι οποίες οξειδώνονται εύκολα. Το αντιδραστήριο FC οξειδώνει επίσης τις πρωτεΐνες. Τα σάκχαρα δημιουργούν ένα πολύπλοκο ζήτημα επειδή διαφορετικά σάκχαρα προκαλούν διαφορετικές παρεμβολές όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος FC για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου. (R. Rover & C. Brown, 2013)

Τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν κάποιες αξιοποιήσιμες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών, σε αντίθεση με τα ακετονικά, ωστόσο υπήρχαν δυσκολίες στην διαχείριση των υδατικών εκχυλισμάτων. Κατά την εκχύλιση της ξηρής σκόνης των φύλλων της αρώνιας με το απιονισμένο νερό αναπτύχθηκε υψηλό ιξώδες και ήταν δύσκολο να επιτευχθεί πλήρη ανάδευση. Ακόμη ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος από την διαβρεγμένη σκόνη κατέστη δυνατός μόνο με φυγοκέντρηση και όχι με απλή διήθηση. Η έντονη αύξηση του ιξώδους κατά την υδατική εκχύλιση πιθανώς μαρτυρά την παρουσία κάποιου πολυσακχαρίτη με έντονη ικανότητα προσρόφησης του νερού. Αν και αυτό δυσχεραίνει την περαιτέρω εκχύλιση, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί σε επόμενη έρευνα.

#### 4.2 Χαρακτηρισμός παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας με εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA, ξηραμένο υπό αέρα)

Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας πραγματοποιήθηκε εξαντλητική εκχύλιση με μεθανόλη οξινισμένη με ισχυρό οξύ και στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Το οξύ που χρησιμοποιήθηκε είναι το τριφθοροξικό οξύ (TFA).

##### 4.2.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Προζυγισμένη ποσότητα αποψυγμένης πούλπας (παραπροϊόν) και του καρπού της αρώνιας ξηράθηκε στους 100 °C και προσδιορίστηκε η υγρασία τους. Ακόμη βρέθηκε η υπολειπόμενη υγρασία στην ξηρή σκόνη της πούλπας που δημιουργήθηκε με ξήρανση στους 40°C για την

εκχύλιση της. Προέκυψε ότι ο καρπός της αρώνιας περιείχε υγρασία  $78,1 \pm 1,7$  % κατά βάρος, η πούλπα περιείχε  $61 \pm 1$  % και η υπολειπόμενη υγρασία της σκόνης της πούλπας ήταν ίση  $6,4 \pm 0,7$  % κατά βάρος.

Για τον χαρακτηρισμό του παραπροϊόντος η ξηρή σκόνη του εκχυλίστηκε με MeOH 0,5% v/v TFA (ισχυρό οξύ) στην διάταξη της σταθερής κλίνης (τελική αναλογία σκόνης-διαλύτη 1:15 w/v). Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο και την αντιριζική ικανότητα. Από την εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με MeOH 0,5% v/v TFA εκχυλίστηκαν  $0,47 \pm 0,04$  g στερεών/g πούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης της ξηρής σκόνης των φύλλων σε στερεά ήταν  $47 \pm 4$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων σε στερεά προέκυψαν σχεδόν στο 50%, γεγονός που σημαίνει πως οι μισές από όλες τις ουσίες που συνθέτουν την πούλπα της αρώνιας αποτελούν εκχυλίσμα συστατικά. Τα κύρια συστατικά της αρώνιας που εκχυλίζονται είναι τα σάκχαρα με το σάκχαρο με την μεγαλύτερη συγκέντρωση να είναι η σορβιτόλη και ακολουθεί η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Σημαντική συμμετοχή στην απόδοση των ολικών στερεών έχουν ακόμη οι φυτικές ίνες και τα φαινολικά συστατικά της αρώνιας.

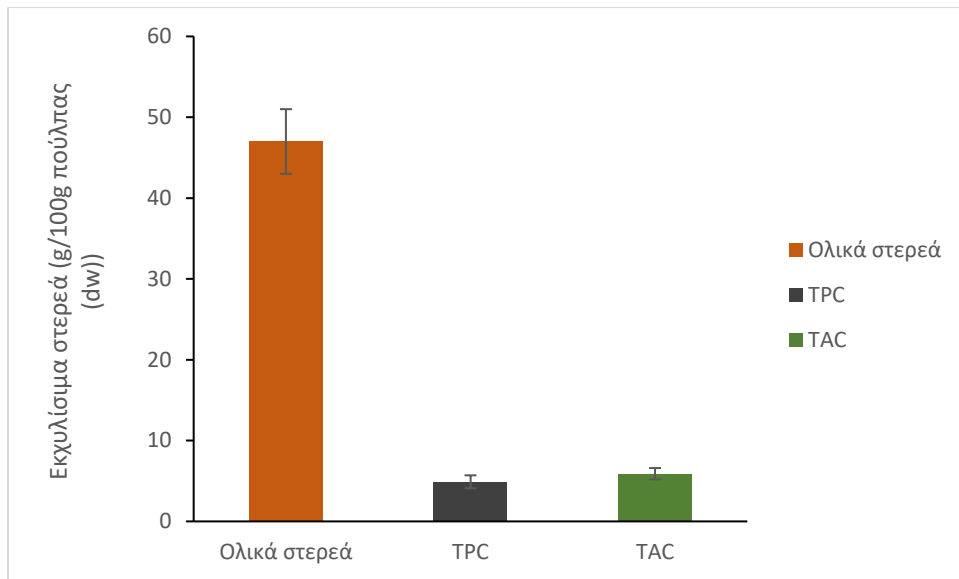
#### 4.2.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που σχηματίστηκε. Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $49 \pm 8$  mg<sub>GAE</sub>/g πούλπας σε ξηρή βάση και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $10,3 \pm 1,7$  (%TPC/στερεά w/w). Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του καρπού της αρώνιας με την μέθοδο Folin – Ciocalteu από τους Karci et al. (2013) είναι ίσο με  $63$  mg<sub>GAE</sub>/g καρπού σε ξηρή βάση. Με την μεθανολική εκχύλιση σταθερής κλίνης παραλήφθηκε από την πούλπα το 78% του ολικού φαινολικού περιεχομένου του καρπού της αρώνιας.

Σύμφωνα με τους Oszmianski & Wojdylo (2005) το 66% των ολικών φαινολικών ενώσεων της πούλπας της αρώνιας ανήκει στις πολυμερείς προανθοκυανίνες. Οι ανθοκυανίνες είναι η δεύτερη ομάδα φαινολικών ενώσεων και αντιπροσωπεύουν περίπου το 25% των ολικών φαινολικών ενώσεων, ακολουθούν τα φαινολικά οξέα με το 7,5% και οι φλαβονόλες με 1,3%.

#### 4.2.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $59 \pm 7$  mg<sub>TE</sub>/g πούλπας σε ξηρή βάση και απόδοση αντιριζικής ικανότητας σε σχέση με ολικό φαινολικό περιεχόμενο ίση με  $122 \pm 15$  (%TAC/TPC w/w). Σύμφωνα με τους Karci et al. (2013) η αντιριζική ικανότητα του καρπού της αρώνιας είναι ίση με  $52$  mg<sub>TE</sub>/g καρπού. Με την μεθανολική εκχύλιση σταθερής κλίνης παραλήφθηκε από την πούλπα το 113% του ολικού φαινολικού περιεχομένου του καρπού της αρώνιας.

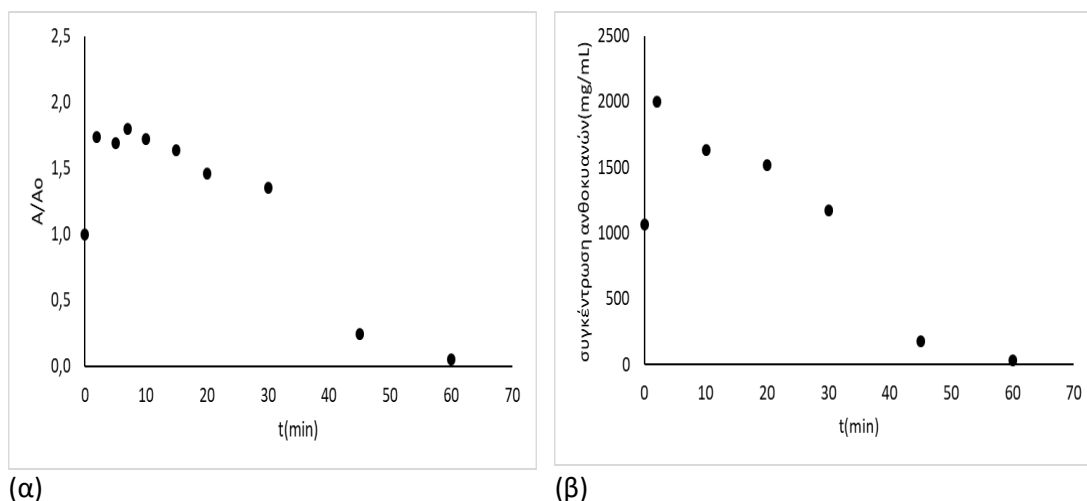


Διάγραμμα 18: Σύγκριση ολικών στερεών με ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στο παραπροϊόν με εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA.

#### 4.2.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα (α) (Διάγραμμα 19) παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Το διάγραμμα (β) (Διάγραμμα 19) παρουσιάζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο χρωματογράφημα των 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης.





Διάγραμμα 19: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών (α) με φωτομέτρηση στα 520, (β) με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το μεθανολικό εκχύλισμα (0,5% TFA, ξηραμένη υπό αέρα)

Παρατηρήθηκε ότι οι δύο καμπύλες που σχηματίστηκαν με τις δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης παρουσίασαν παρόμοια κινητική. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς και στις δύο μεθόδους λήφθηκαν απορροφήσεις στα 520 nm, που δίνουν μέγιστη απορρόφηση οι ανθοκυανίνες. Επιλέχθηκε να εξετασθεί η κινητική των ανθοκυανινών, διότι μετά τις προκυανιδίνες, που δεν ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, αποτελούν τα κύρια φαινολικά συστατικά της αρώνιας.

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών παρατηρείται ότι ξεκίνησε περίπου από το 50% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0, και σε πολύ κοντινό χρόνο στα 2 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Μέχρι τα 15 λεπτά τα κλάσματα της εκχύλισης απέδιδαν αποδόσεις κοντά στην μέγιστη, ενώ από τα 20 λεπτά και μετά οι αποδόσεις έπεφταν σχεδόν γραμμικά μέχρι και τα 60 λεπτά, όπου δεν παραλαμβάνονταν άλλες ανθοκυανίνες. Είναι πολύ σημαντικό πως στα 60 λεπτά παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, οπότε δεν χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.2.5 Μελέτη επιμέρους φαινολικών ενώσεων

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στην πούλπα της αρώνιας ανήκουν στις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα, τις φλαβονόλες ή της φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες σε μονομερείς αλλά κυρίως πολυμερείς δομές).

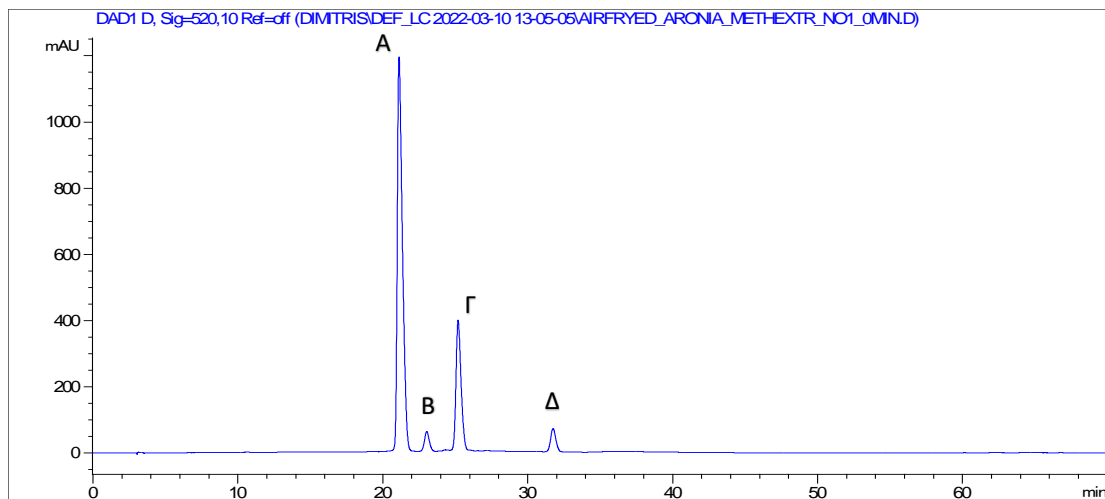
Για τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση (όπου ήταν εφικτό) και την ποσοτικοποίησή τους, τα εκχυλίσματα της πούλπας της αρώνιας αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Από κάθε ανάλυση παρελήφθησαν 4 χρωματογραφήματα, στα παρακάτω μήκη κύματος:

- 280 nm, μήκος κύματος στο οποίο δίνουν ικανοποιητικές απορροφήσεις οι περισσότερες από τις φαινολικές ενώσεις, οπότε μπορούμε να λάβουμε μια συνολική, πρώτη εικόνα του υλικού
- 320 nm, μήκος κύματος κατάλληλο για μελέτη των φαινολικών οξέων καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.

- 360 nm, μήκος κύματος κατάλληλο για μελέτη των φλαβονολών καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.
- 520 nm, μήκος κύματος κατάλληλο για μελέτη των ανθοκυανών καθώς εκεί παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.

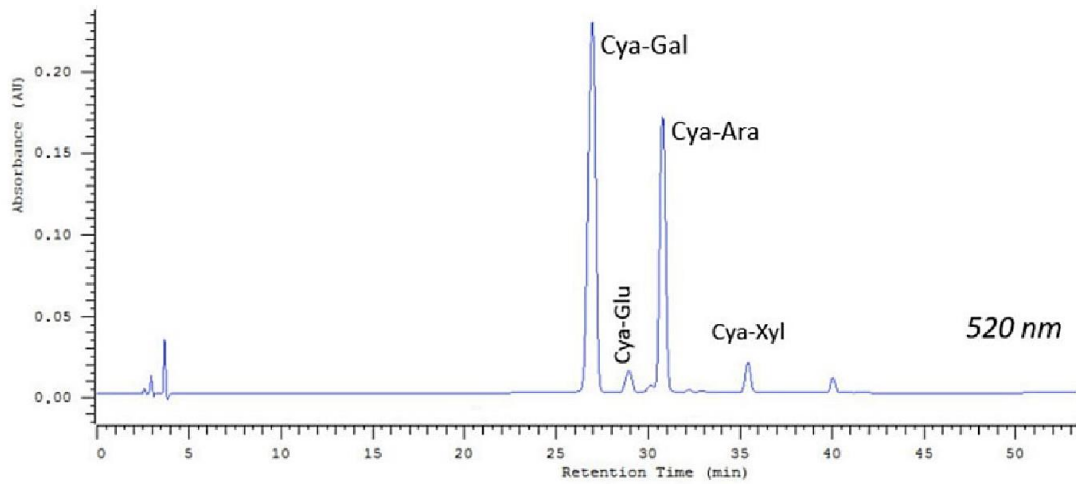
Στην πούλπα της αρώνιας ταυτοποιήθηκαν βιβλιογραφικά και ποσοτικοποιήθηκαν 2 κύρια φαινορικά οξέα και 4 γλυκοζυλιωμένες ανθοκυάνες (ανθοκυανίνες). Οι φλαβονόλες που εντοπίστηκαν ήταν αδύνατο να ταυτοποιηθούν από τις βιβλιογραφικές αναφορές, οπότε ποσοτικοποιήθηκαν στο σύνολό τους και όχι ως μεμονωμένες ενώσεις. Τέλος, οι ταννίνες παρουσίασαν αρκετές μικρές κορυφές, στις περισσότερες περιπτώσεις μη αξιοποιήσιμες καθώς επικαλύπτονταν από άλλα συστατικά.

Στα δείγματα που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 4 κύριες ανθοκυανίνες σε υψηλές συγκεντρώσεις (με χρόνους έκλουσης από τη στήλη  $tR \approx 19,0, 21,0, 23,0$  και  $29,0$  min) και ορισμένες δευτερεύουσες σε ίχνη. Παρακάτω, παρατίθεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος της πούλπας της αρώνιας στα 520 nm (μήκος κύματος στο οποίο οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση), όπου έχουν επισημανθεί οι αντίστοιχες κορυφές.



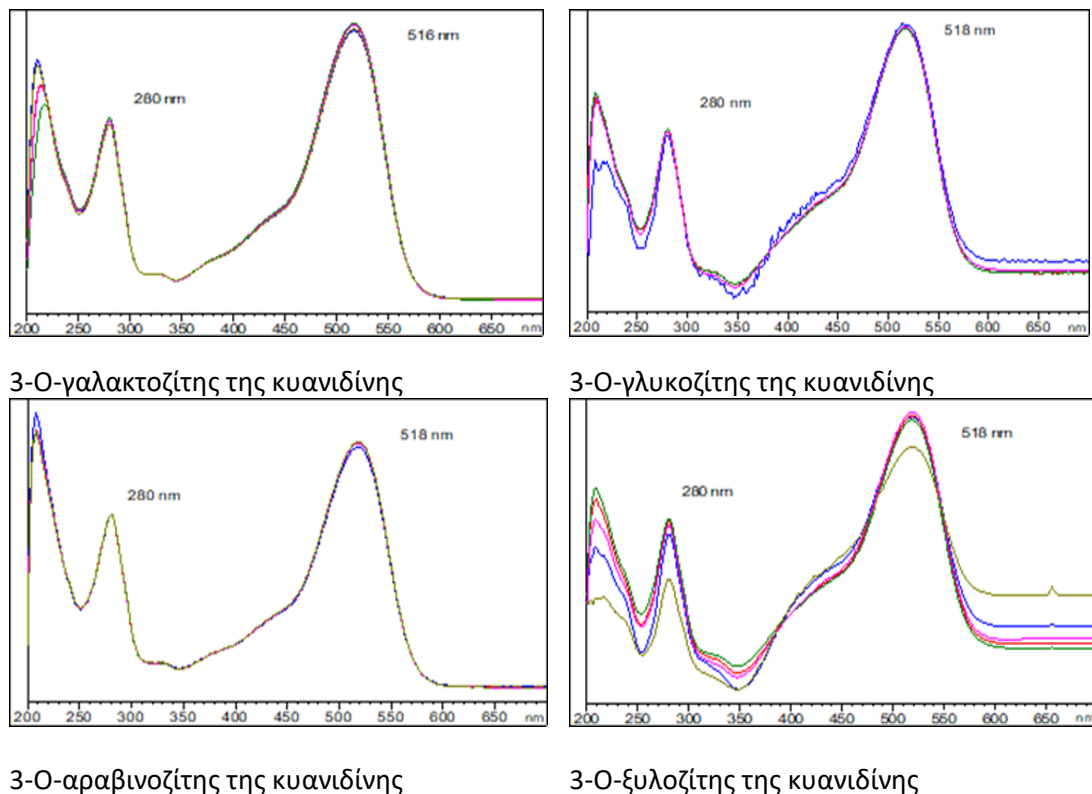
Διάγραμμα 21: Κύριες ανθοκυανίνες της αρώνιας. Το χρωματογράφημα αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα της πούλπας της αρώνιας και ελήφθη σε μήκος κύματος 520 nm.

Σε προηγούμενες μελέτες, οι Jakobek et al. (2007a), Rop et al (2010), Szopa et al. (2016), Slimstead et al. (2005) και ορισμένες ακόμα ερευνητικές ομάδες, απέδειξαν ότι οι κύριες ανθοκυανίνες που εντοπίζονται στον καρπό της αρώνιας είναι 4 στο πλήθος και βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (Ο-γλυκοζίτες – ανθοκυανίνες). Πιο συγκεκριμένα, η κύρια ανθοκυανίνη της αρώνιας είναι ο 3-Ο-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης, ακολουθούμενος από τον 3-Ο-αραβινοζίτη της κυανιδίνης και σε μικρότερες περιεκτικότητες οι 3-Ο-γλυκοζίτης και 3-Ο-ξυλοζίτης της κυανιδίνης.

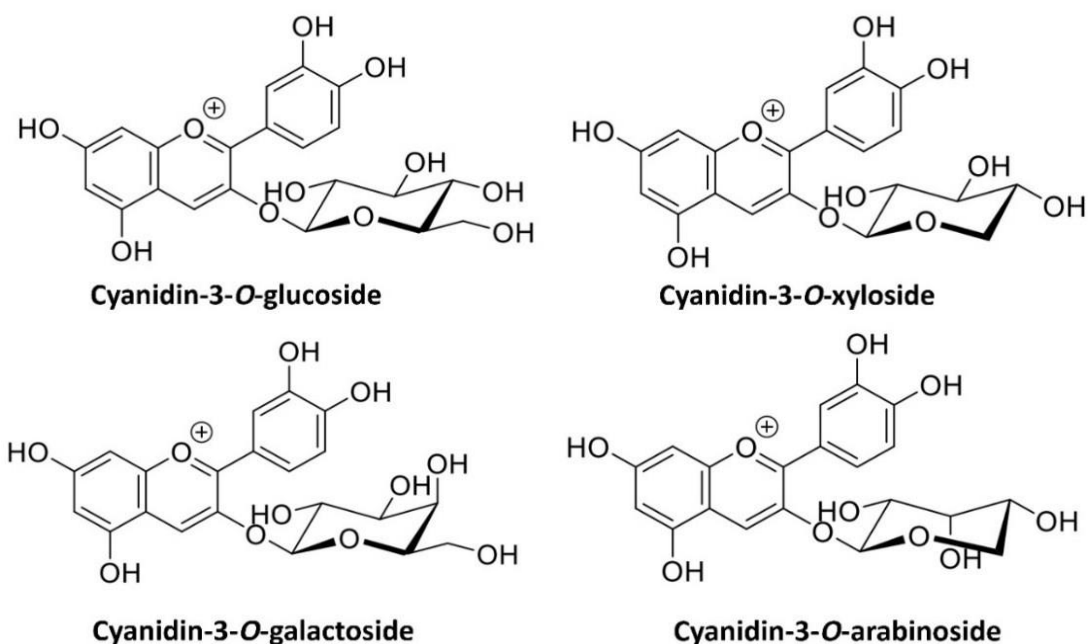


Διάγραμμα 22: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος αρώνιας που βρέθηκε βιβλιογραφικά. Πηγή: Zielinska et al. (2020).

Βάσει της σειράς έκλουσης των ανωτέρω εκτιμάται ότι η κορυφή Α αντιστοιχεί στον 3-Ο-γαλακτοζίτη, η κορυφή Β στον 3-Ο-γλυκοζίτη, η κορυφή Γ στον 3-Ο-αραβινοζίτη και η κορυφή Δ στον 3-Ο-ξυλοζίτη της κυανιδίνης. Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των ανθοκυανινών που εντοπίστηκαν.

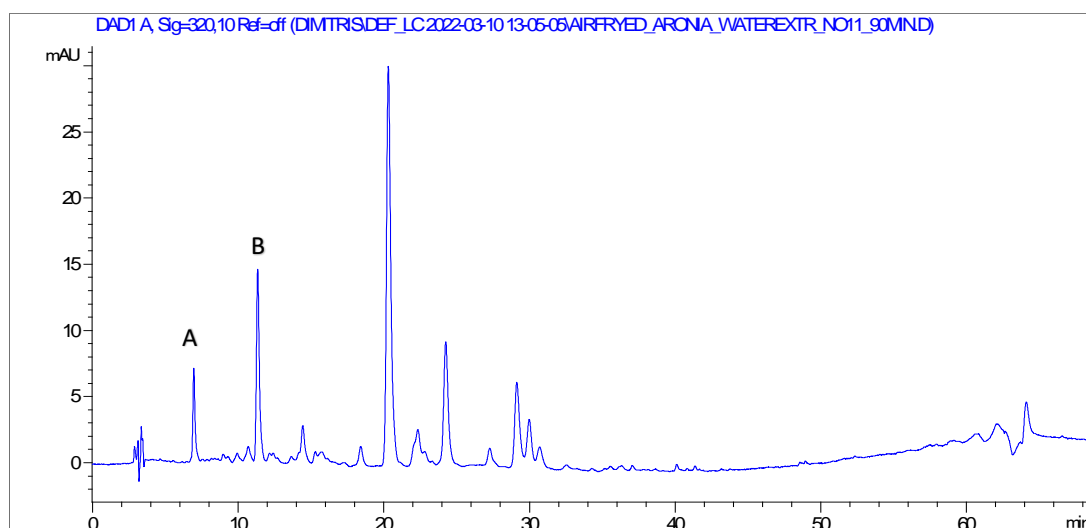


Διάγραμμα 23: Τα φάσματα των κύριων ανθοκυανινών που βρέθηκαν στην πούλπα της αρώνιας. Όλες αποτελούν γλυκοζίτες της κυανιδίνης.



Εικόνα 24: Δομή των κύριων ανθοκυανινών της αρώνιας

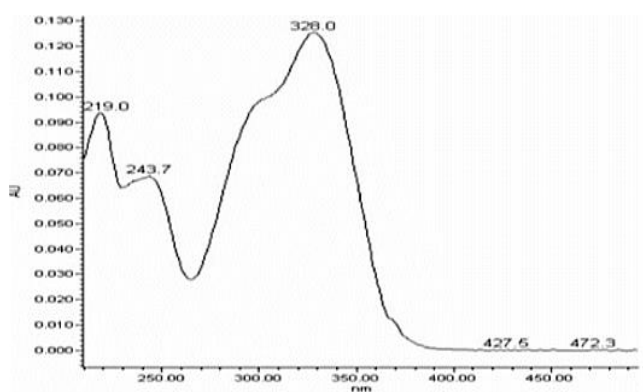
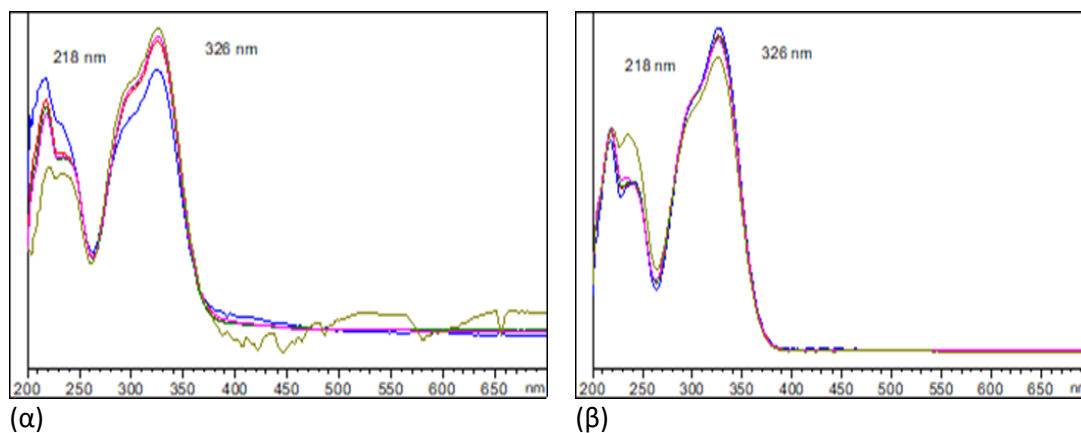
Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, εντοπίστηκαν 2 κύρια σε υψηλές συγκεντρώσεις (με χρόνους έκλουσης από τη στήλη  $t_R \approx 6,7$  και  $11,0$  min) και ορισμένα δευτερεύοντα σε ίχνη. Παρακάτω, παρατίθεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος πούλπας στα 320 nm, όπου έχουν επισημανθεί οι αντίστοιχες κορυφές.



Διάγραμμα 24: Κύρια φαινολικά οξέα της αρώνιας. Το χρωματογράφημα ελήφθη στα 320 nm και αφορά το εκχύλισμα της πούλπας αρώνιας.

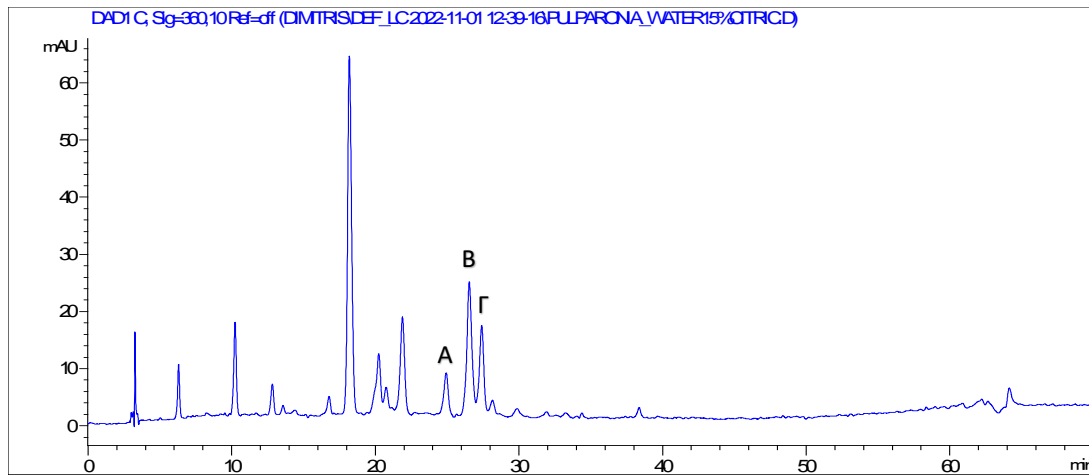
Σε προηγούμενες μελέτες, οι Ochmian et al. (2012), Rop et al (2010), Mayer-Miebach et al (2012), Wilkes et al (2014), Dudonné et al (2015) και ορισμένες ακόμα ερευνητικές ομάδες, απέδειξαν ότι τα κύρια φαινολικά οξέα της αρώνιας είναι δύο ισομερή: το χλωρογενικό οξύ και το νεοχλωρογενικό οξύ. Η δομή των δύο οξέων έχει δοθεί παραπάνω. Συγκρίνοντας τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των οξέων που εντοπίστηκαν πειραματικά παρατηρούμε ότι ταυτίζονται και επιπλέον, είναι όμοια με το φάσμα του χλωρογενικού οξέος που βρέθηκε βιβλιογραφικά (Siahroush et al., 2011). Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται για τις παραπάνω ισομερείς ενώσεις. Δεδομένου επίσης ότι το νεοχλωρογενικό οξύ εκλύεται

ταχύτερα από το χλωρογενικό από στήλη αντίστροφης φάσης (Szopa et al., 2017), συμπεραίνουμε τελικά ότι η κορυφή Α αντιστοιχεί στο νεοχλωρογενικό οξύ και η κορυφή Β στο χλωρογενικό οξύ.



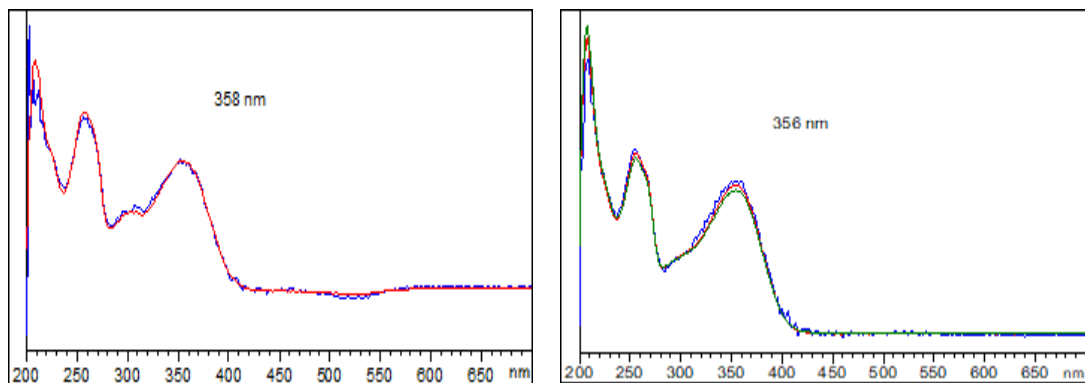
Διάγραμμα 25: Από αριστερά προς τα δεξιά: φάσμα νεοχλωρογενικού οξέος (πειραματικό), φάσμα χλωρογενικού οξέος (πειραματικό), φάσμα χλωρογενικού οξέος από τη βιβλιογραφία. Πηγή: Siahroush et al. (2011)

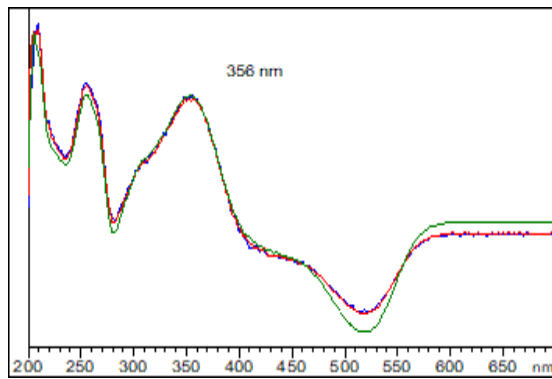
Οι φλαβονόλες που εντοπίστηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις ήταν κυρίως 3 (με χρόνους έκλουσης από τη στήλη  $t_R \approx 26,5, 28,2$  και  $29,0$  min). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις όμως, παρουσιάστηκαν επιπλέον ενώσεις. Παρακάτω, παρατίθεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα από το μεθανολικό εκχύλισμα της πούλπας της αρώνιας στα 360 nm (μήκος κύματος στο οποίο οι φλαβονόλες εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση), όπου έχουν επισημανθεί οι αντίστοιχες κορυφές.



Διάγραμμα 26: Κύριες φλαβονόλες της αρώνιας. Το χρωματογράφημα αφορά το εκχύλισμα της πούλπας της αρώνιας και ελήφθη σε μήκος κύματος 360 nm.

Σε προηγούμενες μελέτες, οι Denev et al. (2012), και αρκετές ακόμα ερευνητικές ομάδες, συμφωνούν ότι οι κύριες φλαβονόλες της αρώνιας βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και είναι ο 3-Ο-γαλακτοζίτης της κερκετίνης (Υπεροζίτης), ο 3-Ο-γλυκοζίτης της κερκετίνης (Ισοκερκετίνη) και ο 3-Ο-ρουτινοζίτης της κερκετίνης (Ρουτίνη). Πολύ πιθανό λοιπόν οι φλαβονόλες που εντοπίστηκαν εργαστηριακά να ταυτίζονται με τις προαναφερθείσες. Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα εδώ κρίνονται ανεπαρκή για την ακριβή ταυτοποίηση των φλαβονολών και θεωρούνται απαραίτητες περαιτέρω εργαστηριακές αναλύσεις για το σκοπό αυτό. Επιπροσθέτως, προηγούμενες έρευνες έχουν εντοπίσει επιπλέον φλαβονόλες στον καρπό της αρώνιας όπως την κερκετίνη σε ελεύθερη μορφή (Jakobek et al., 2007), τον 3-Ο-βισκοζίτη της κερκετίνης (Skoczynska et al., 2010) και τον 3-Ο-ροβινοβιοζίτη της κερκετίνης (Ochmian et al., 2009) γεγονός που δυσχεραίνει την προσπάθεια ταυτοποίησης από τη βιβλιογραφία. Η δομή των κύριων φλαβονολών της αρώνιας έχει δοθεί παραπάνω, καθώς ήταν και οι κύριες φλαβονόλες των φύλλων της αρώνιας.





Διάγραμμα 27: Φάσματα υπεριώδους-ορατού των κύριων φλαβονολών που ανιχνεύθηκαν εργαστηριακά στον καρπό της αρώνιας

Οι φλαβαν-3-όλες βρίσκονται στον καρπό της αρώνιας σε ελεύθερη μορφή (κατεχίνες και επικατεχίνες), όμως κυρίως εντοπίζονται ως υπομονάδες πολυμερών (συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες. Πράγματι, στα χρωματογραφήματα της πούλπας της αρώνιας εντοπίστηκαν μικρές κορυφές που θα μπορούσαν να αποδοθούν στην κατεχίνη ή την επικατεχίνη και μικρές κορυφές που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε προανθοκυανιδίνες.

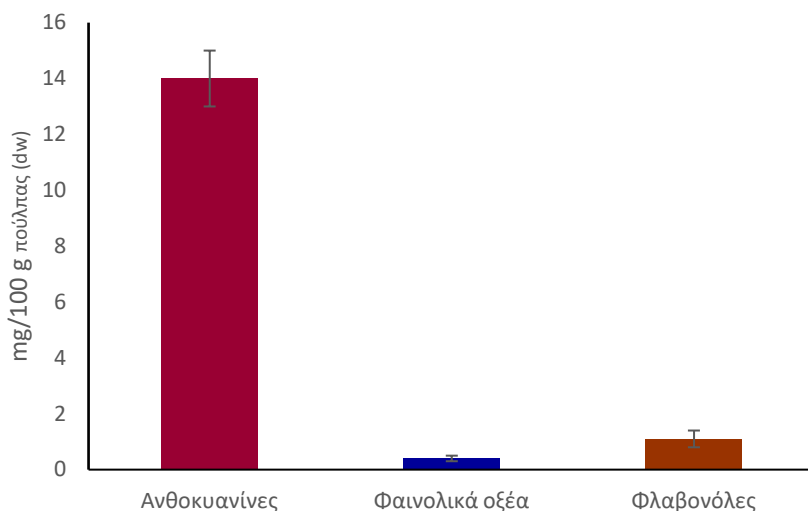
#### 4.2.6 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Οι ανθοκυανίνες που εντοπίστηκαν ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών και της καμπύλης αναφοράς της κυανιδίνης στα 520 nm ( $E_{520} = 80,347c - 26,342$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιούνται τα ισοδύναμα κυανιδίνης (Cyanidin Equivalents – CyE). Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή ανθοκυανών (TAnth) ίση με  $14 \pm 1 \text{ mg}_{\text{CyE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  και  $30,47 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{CyE}}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .

Εν συνεχεία, παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων στο μεθανολικό εκχύλισμα. Τα φαινολικά οξέα που εντοπίστηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών με ανάλυση HPLC και την καμπύλη αναφοράς του χλωρογενικού οξέος στα 320 nm ( $E_{320} = 64,465c - 137,51$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα χλωρογενικού οξέος (Chlorogenic Acid Equivalents – ChAE). Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή χλωρογενικών οξέων (ChAE) ίση με  $0,4 \pm 0,1 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση και  $0,7 \pm 0,4 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .

Συνεχίζοντας με τις φλαβονόλες, υπενθυμίζεται ότι στην παρούσα μελέτη δεν ολοκληρώθηκε η επιμέρους ταυτοποίησή τους, οπότε η ποσοτικοποίηση που ακολουθεί αφορά το σύνολο των φλαβονολών. Αναφέρεται ωστόσο ότι στα χρωματογραφήματα εντοπίστηκαν 3 κύριες φλαβονόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις και μερικές ακόμα σε χαμηλότερες. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων στο μεθανολικό εκχύλισμα, αξιοποιήθηκε το σύνολο του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών και η καμπύλη αναφοράς της ρουτίνης στα 360 nm ( $E_{360} = 29,209c - 39,596$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα ρουτίνης (Quercetin Rutinoside (Rutin) Equivalents – QRE). Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος της πούλπας με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της

καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή φλαβονολών (QRE) ίση με  $1,1 \pm 0,3 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ξηρή βάση και  $2,2 \pm 0,5 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .



Διάγραμμα 28: Ολικές ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα και φλαβονόλες σε  $\text{mg}/100 \text{ g}$  πούλπας (dw) που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο HPLC στο στην πούλπα (ξηραμένη υπό αέρα) με εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA.

Πίνακας 12: Ολικές ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα και φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο HPLC στο στην πούλπα (ξηραμένη υπό αέρα), ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική ικανότητα σε  $\text{mg}/100 \text{ g}$  πούλπας (dw) και σε  $\text{mg}/\text{g}$  στερεών εκχυλίσματος με εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA.

Φαινολικές ουσίες	mg /g πούλπας(dw)	mg /g στερεών εκχυλίσματος
Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	49±8	-
Αντιριζική ικανότητα	59±7	-
Ανθοκυανίνες	14±1	30,47±0,05
Φαινολικά οξέα	0,4±0,1	0,7±0,4
Φλαβονόλες	1,1±0,3	2,2±0,5

Σύμφωνα με τους Jurendic & Scetar (2021) για την πούλπα της αρώνια οι ανθοκυανίνες στο σύνολό τους είναι ίσες με  $1837 \text{ mg}_{\text{CyE}}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}}$  (dw). Με την εξαντλητική εκχύλιση με μεθανόλη 0,5 % v/v TFA στην πούλπα της αρώνιας ξηραμένης υπό αέρα προέκυψαν  $1425 \pm 131 \text{ mg}_{\text{CyE}}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}}$  (dw), τιμή η οποία αντιστοιχεί στο 76% της βιβλιογραφικής τιμής. Η εκχύλιση σε σταθερή κλίση παρέλαβε σχεδόν ποσοτικά τις ανθοκυανίνες της πούλπας της αρώνιας. Οι αποκλίσεις μπορεί να οφείλονται στην διαφορετική προέλευση, καταπόνηση και αποθήκευση του υλικού. Για τα φαινολικά οξέα στο σύνολο τους, οι Jurendic & Scetar (2021) βρήκαν ότι είναι ίσα  $373 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}}$  (dw). Από την μεθανολική εκχύλιση με TFA προέκυψαν μόλις  $38 \pm 13 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}}$ , τιμή η οποία βρίσκεται στο 10% της αντίστοιχης βιβλιογραφικής. Έγινε παραλαβή μόνο του 10,2% των φαινολικών οξέων, το οποίο σημαίνει ότι η οξινισμένη μεθανόλη (μέσο οξίνισης TFA) ως διαλύτης δεν είχε υψηλή



εκλεκτικότητα όσον αφορά τα φαινολικά οξέα. Τέλος, οι φλαβονόλες της πούλπας της αρώνιας στο σύνολο τους σύμφωνα με τους Jurendic & Scetar (2021) είναι ίσες  $88 \text{ mg}_{QRE}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}} (dw)$ . Με την εξαντλητική εκχύλιση με μεθανόλη 0,5 % v/v TFA στην πούλπα της αρώνιας ξηραμένης υπό αέρα προέκυψαν  $106 \pm 33 \text{ mg}_{QRE}/100 \text{ g}_{\text{πούλπας}} (dw)$ . Η τιμή των ολικών φλαβονολών που υπολογίστηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, λαμβάνοντας υπόψη το σφάλμα, συμφωνεί με την βιβλιογραφική πηγή, άρα με την συγκεκριμένη εκχύλιση λήφθηκαν ικανοποιητικά οι φλαβονόλες της πούλπας της αρώνιας.

Οι ανθοκυανίνες, τα ολικά φαινολικά οξέα και οι ολικές φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης προέκυψαν αρκετά χαμηλότερες από το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC). Αυτό εξηγείται αρχικά διότι δεν ποσοτικοποιήθηκαν οι προκυανιδίνες, που αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της αρώνιας σε φαινολικά συστατικά. Ακόμη η μέθοδος Folin είναι μη ειδική και μπορεί να επηρεαστεί από άλλα μη φαινολικά αναγωγικά μόρια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

#### 4.3 Σύγκριση λυοφυλιωμένης με ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA)

Δοκιμάστηκε διαφορετική μέθοδος ξήρανσης στην πούλπα της αρώνιας, για να βρεθεί αν υποβαθμίζονται οι φαινολικές ενώσεις της αρώνιας με την ξήρανση στους 40°C. Πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφυλίωση) και η λυοφυλιωμένη πούλπα εκχυλίστηκε με μεθανόλη 0,5 % v/v TFA στην διάταξη της σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου).

##### 4.3.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Προζυγισμένη ποσότητα αποψυγμένης πούλπας (παραπροϊόν) ξηράθηκε υπό κατάψυξη (λυοφυλίωση) στους -52 °C και πραγματοποιήθηκε άλεση για την δημιουργία της ξηρής σκόνης. Βρέθηκε ότι η υπολειπόμενη υγρασία στην ξηρή σκόνη της πούλπας που δημιουργήθηκε ήταν ίση  $4,3 \pm 0,3 \%$  με κατά βάρος.

Η ξηρή σκόνη της λυοφυλιωμένης πούλπας που χρησιμοποιήθηκε εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της πούλπας στην προηγούμενη ενότητα. Από την μεθανολική εκχύλιση της ξηρής σκόνης της λυοφυλιωμένης πούλπας και εκχυλίστηκαν  $0,45 \pm 0,08 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των φύλλων σε στερεά ήταν  $45 \pm 8 \%$  w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι η απόδοση σε ολικά στερεά της μεθανολικής εκχύλισης της λυοφυλιωμένης πούλπας μειώθηκε κατά 4% σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας ( $0,47 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ). Αυτή η διαφορά είναι πολύ μικρή και θεωρείται ασήμαντη.

##### 4.3.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $51 \pm 7 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 81% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $11,6 \pm 1,6 (\% \text{TPC}/\text{στερεά w/w})$ .

Πίνακας 12: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα μεθανολικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	TPC g <sub>GAE</sub> /100 g <sub>πούλπας(dw)</sub>	TPC mg <sub>GAE</sub> / g <sub>πούλπας(dw)</sub>	%TPC/ολικά στερεά w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,9±0,8	49±8	10,3±1,7
METH_PULP_TFA_FD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης, ημιδιαλείποντος έργου)	5,1±0,7	51±7	11,4±1,6

Παρατηρείται ότι η λυοφυλίωση στην πούλπα της αρώνιας επέφερε χαμηλή αύξηση (4%) στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Η συγκεκριμένη αύξηση δεν είναι τόσο σημαντική ώστε να επιλεγθεί η ξήρανση με λυοφυλίωση καθώς η μέθοδος αυτή είναι πολύ ακριβή και ενεργοβόρα. Ήταν αναμενόμενο η ξήρανση υπό κατάψυξη να επιφέρει αύξηση στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, διότι η σκόνη που προέκυψε από την λυοφιλιωμένη πούλπα αρώνιας ήταν πιο μαλακή και με πιο έντονο ερυθρό χρώμα από αυτήν με την ξήρανση υπό αέρα. Αυτό σημαίνει ότι υπήρξε χαμηλότερη καταπόνηση του υλικού με την λυοφυλίωση, ωστόσο η μεθανολική εκχύλιση με TFA δεν αύξησε την απόδοση σε επιθυμητό επίπεδο.

#### 4.3.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για την λυοφιλιωμένη πούλπα της αρώνιας από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $61 \pm 10 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{πούλπας}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 117% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

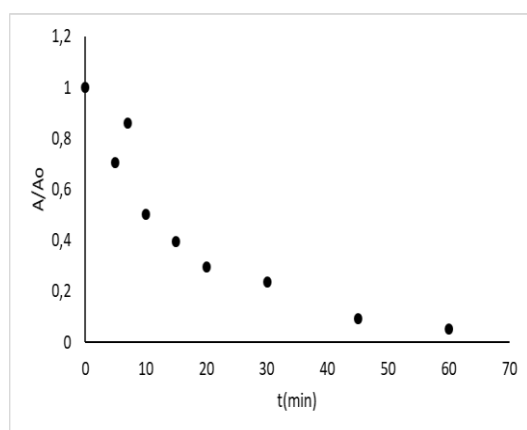
Πίνακας 13: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα μεθανολικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	TAC g <sub>TE</sub> /100 g <sub>πούλπας(dw)</sub>	TAC mg <sub>TE</sub> / g <sub>πούλπας(dw)</sub>	% TAC/TPC w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,9±0,7	59±7	122±15
METH_PULP_TFA_FD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης, ημιδιαλείποντος έργου)	6±1	61± 10	119±19

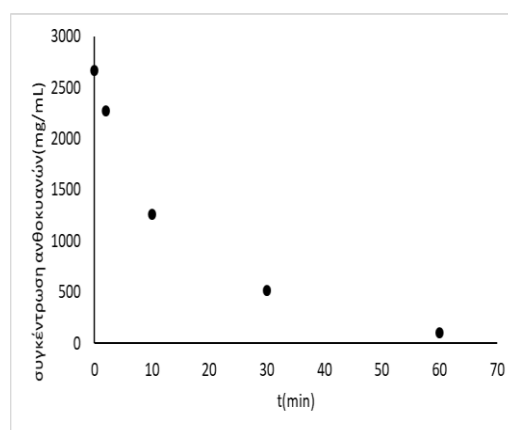
Παρατηρείται ότι η λυοφυλίωση στην πούλπα της αρώνιας δεν επέφερε σημαντική αύξηση (2%) και στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας. Ήταν αναμενόμενο, διότι οι αποδόσεις σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τις αποδόσεις σε συστατικά με αντιριζική ικανότητα εξελίσσονται κατά παρόμοιο τρόπο. Αυτό συμβαίνει, καθώς οι φαινολικές ενώσεις είναι ουσίες που χαρακτηρίζονται από την αντιριζική τους δράση.

#### 4.3.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της λυοφιλιωμένης πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχων δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα (α) (Διάγραμμα 29) παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στην λυοφιλιωμένη πούλπα αρώνιας στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Το διάγραμμα (β) (Διάγραμμα 29) παρουσιάζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο χρωματογράφημα των 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης.



(α)



(β)

Διάγραμμα 29: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών (α) με φωτομέτρηση στα 520, (β) με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το μεθανολικό εκχύλισμα (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης)

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών στην μεθανολική εκχύλιση της λυοφιλιωμένης πούλπας παρατηρείται ότι ξεκίνησε από την μέγιστη τιμή στον χρόνο 0 και μειώνεται εκθετικά με τον χρόνο μέχρι τα 60 λεπτά που η απορρόφηση των ανθοκυανινών έχει φτάσει σχεδόν στο 0. Είναι πολύ σημαντικό πως στα 60 λεπτά παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, οπότε δεν χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους. Η εκχύλιση της λυοφιλιωμένης πούλπας αρώνιας, με οξιμισμένη μεθανόλη παρουσιάζει διαφορετική καμπύλη κινητικής σε σχέση το ξηραμένο υπό αέρα υλικό, που σημαίνει ότι εκχυλίζονται διαφορετικά. Παρατηρείται ότι στην αρχή της εκχύλισης οι ανθοκυανίνες παραλαμβάνονται πιο γρήγορα. Ωστόσο στο τέλος της εκχύλισης (60 min) οι απορροφήσεις τους είναι σχεδόν ίδιες. Η λυοφιλιωμένη πούλπα αρώνιας ήταν πιο μαλακή και με πιο έντονο ερυθρό χρώμα από αυτήν με την ξήρανση υπό αέρα, που σημαίνει ότι υπήρξε χαμηλότερη καταπόνηση και διαφορετική δομή του υλικού με την λυοφιλίωση, για αυτό το λόγο η εκχύλιση της λυοφιλιωμένης πούλπας εξελίσσεται στην αρχή πιο γρήγορα από του υλικού με ξήρανση υπό αέρα.

#### 4.3.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο μεθανολικό εκχύλισμα της λυοφιλιωμένης πούλπας. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 14: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	14±1	30,47±0,05
METH_PULP_TFA_FD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης, ημιδιαλείποντος έργου)	13,6±0,9	30±2

Πίνακας 15: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> / g πούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> / g στερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,4±0,1	0,7±0,4
METH_PULP_TFA_FD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης, ημιδιαλείποντος έργου)	0,62±0,01	1,4±0,3

Πίνακας 16: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> / g πούλπας(dw)	mg <sub>QRE</sub> / g στερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,1±0,3	2,2±0,5
METH_PULP_TFA_FD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, λυοφιλιωμένης, ημιδιαλείποντος έργου)	1,2±0,1	3,01±0,09

Παρατηρήθηκε ότι η λυοφιλίωση της πούλπας της αρώνιας απέδωσε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος σε σχέση με την

ξήρανση υπό αέρα στους 40°C μόνο στην περίπτωση των φαινολικών οξέων (αύξηση 55%) και των φλαβονολών (αύξηση 9%), ενώ για τις ανθοκυανίνες δεν προέκυψε κάποια αύξηση. Οι αυξήσεις στις συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων και των φλαβονολών δεν ήταν τόσο σημαντικές για να επιλεχθεί η λυοφιλίωση έναντι της ξήρανσης υπό αέρα. Πιθανή εξήγηση για την συγκέντρωση των ανθοκυανινών, που δεν αυξήθηκε, είναι πως η οξεισμένη μεθανόλη με TFA παραλαμβάνει όλες τις ανθοκυανίνες και με τις δύο διαφορετικές μεθόδους ξήρανσης. Άρα οι ανθοκυανίνες δεν υποβαθμίζονται με την ξήρανση υπό αέρα.

#### 4.4 Σύγκριση στην εκχύλιση με οξεισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA) της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με την απλή ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας

Πραγματοποιήθηκε προκατεργασία της πούλπας και Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ), ώστε να επιτευχθεί διάρρηξη στα κύτταρα της πούλπας της αρώνιας και να εκχυλιστούν τα συστατικά της πιο γρήγορα ή σε μεγαλύτερο ποσοστό.

##### 4.4.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ). Στην συνέχεια ξηράθηκε υπό αέρα στους 40°C και έγινε άλεση για την δημιουργία της ξηρής σκόνης. Βρέθηκε ότι η υπολειπόμενη υγρασία στην ξηρή σκόνη της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) που δημιουργήθηκε ήταν ίση  $7 \pm 1$  % με κατά βάρος.

Η ξηρή σκόνη της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) που χρησιμοποιήθηκε, εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της πούλπας σε προηγούμενη ενότητα. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο, αντιριζική ικανότητα, αλλά και τις συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων. Από την μεθανολική εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) εκχυλίστηκαν  $0,47 \pm 0,03$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιώς σε στερεά ήταν  $47 \pm 3$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την μεθανολική εκχύλιση της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) είναι ίσα με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας ( $0,47 \pm 0,04$  gστερεών/gπούλπας).

##### 4.4.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $68 \pm 3$  mg<sub>GAE</sub>/gπούλπας σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 107% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $14,8 \pm 0,8$  (%TPC/στερεά w/w).

Πίνακας 17: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με της πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	TPC g <sub>GAE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TPC mg <sub>GAE</sub> / gπούλπας(dw)	%TPC/ολικά στερεά w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,9±0,8	49±8	10,3±1,7
PEF_METH_PULP_TFA_AD_SB PEF Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	6,8±0,3	68±3	14,8±0,8

Παρατηρείται ότι η προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ ή PEF) στην πούλπα της αρώνιας επέφερε αύξηση 39% στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και 44% στην απόδοση TPC/ολικά στερεά w/w. Η αύξηση αυτή είναι σημαντική και ήταν επιθυμητή, καθώς με την εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη των ιστών και αναμένεται αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχόμενων συστατικών.

#### 4.4.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για την πούλπα της αρώνιας με προκατεργασία ΠΗΠ με εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $61 \pm 10 \text{ mg}_{TE} / \text{g}_{πούλπας}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 117% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

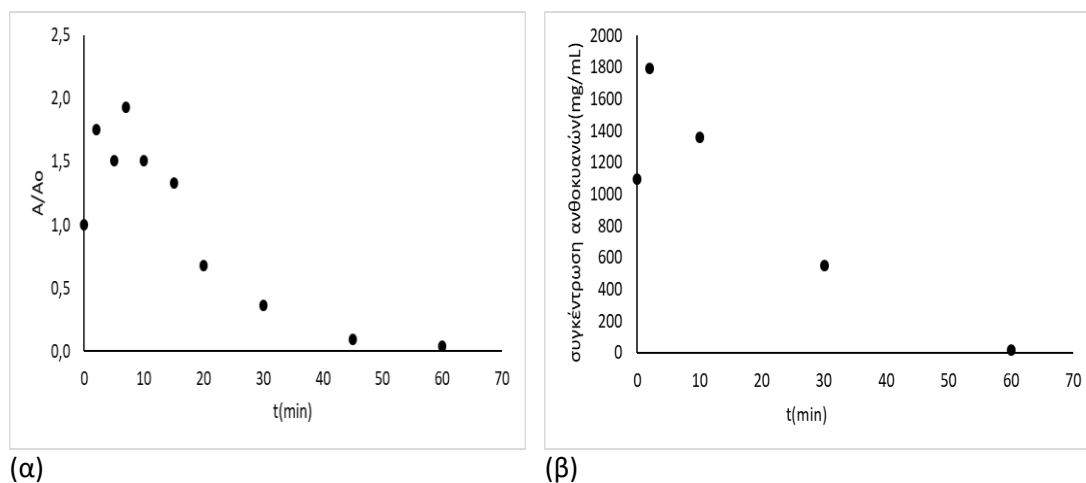
Πίνακας 18: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	TAC g <sub>TE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TAC mg <sub>TE</sub> / gπούλπας(dw)	% TAC/TPC w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,9±0,7	59±7	122±15
PEF_METH_PULP_TFA_AD_SB PEF Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	6±1	65±6	95±9

Παρατηρείται ότι η προκατεργασία ΠΗΠ στην πούλπα της αρώνιας δεν επέφερε σημαντική αύξηση στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας. Ήταν αναμενόμενο οι αποδόσεις σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τις αποδόσεις σε συστατικά με αντιριζική ικανότητα να εξελίσσονται κατά παρόμοιο τρόπο, επειδή οι φαινολικές ενώσεις είναι ουσίες που χαρακτηρίζονται από την αντιριζική τους δράση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε η αντίστοιχη αύξηση της απόδοσης της αντιριζικής ικανότητας, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι κάποιες από τις ουσίες με αντιοξειδωτική ικανότητα δεν παρουσιάζουν αντιριζική δράση. μπορεί οφείλεται στην αλλαγή της σύστασης των επιμέρους φαινολικών.

#### 4.4.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA της πούλπας της αρώνιας με προκατεργασία ΠΗΠ

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα (α) (Διάγραμμα 30) παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Το διάγραμμα (β) (Διάγραμμα 30) παρουσιάζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο χρωματογράφημα των 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης.



Διάγραμμα 30: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών (α) με φωτομέτρηση στα 520, (β) με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το μεθανολικό εκχύλισμα (0,5% TFA, ΠΗΠ, ξηραμένο υπό αέρα)

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών ξεκίνησε περίπου από το 50% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0, και σε πολύ κοντινό χρόνο στα 2 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Έπειτα η εκχύλιση φαίνεται να μειώνεται εκθετικά μέχρι και τα 60 λεπτά, όπου δεν παραλαμβάνονταν άλλες ανθοκυανίνες. Είναι πολύ σημαντικό πως στα 60 λεπτά παραλήφθηκαν όλες οι ανθοκυανίνες, οπότε δεν χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

Παρατηρείται ακόμη ότι η εκχύλιση της λυοφιλιωμένης πούλπας αρώνιας και της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ, με οξιμισμένη μεθανόλη παρουσιάζει παρόμοια καμπύλη κινητικής σε αντίθεση με το ξηραμένο υπό αέρα υλικό, που σημαίνει ότι εκχυλίζονται διαφορετικά. Η διαφορετική κινητική της εκχύλισης μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στην δομή της πούλπας με την προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Στην εκχύλιση της λυοφιλιωμένης πούλπας, όμως ξεκίνησε κατευθείαν από την μέγιστη απόδοση να μειώνεται εκθετικά, ενώ στην πούλπα με προκατεργασία ΠΗΠ και ξήρανση υπό αέρα δεν έφτασε από το χρόνο 0 στην μέγιστη απόδοση.

#### 4.4.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο μεθανολικό εκχύλισμα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF). Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 19: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με της πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /gπούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /gστερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	14±1	30,47±0,05
PEF_METH_PULP_TFA_AD_SB PEF Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	11,5±0,9	25,10±0,01

Πίνακας 20: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με της πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,4±0,1	0,7±0,4
PEF_METH_PULP_TFA_AD_SB PEF Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,65±0,01	1,10±0,04



Πίνακας 21: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ σε σχέση με της πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mgQRE / gπούλπας(dw)	mgQRE/ gστερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,1±0,3	2,2±0,5
PEF_METH_PULP_TFA_AD_SB PEF Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,4±0,5	3±1

Παρατηρήθηκε ότι η προκατεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία απέδωσε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος σε σχέση με την ξήρανση υπό αέρα στους 40°C μόνο στην περίπτωση των φαινολικών οξέων (αύξηση 62%) και των φλαβονολών (27%), ενώ για τις ανθοκυανίνες δεν προέκυψε κάποια αύξηση.

#### 4.5 Σύγκριση εκχύλισης ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας με οξιμισμένη μεθανόλη (0,75% w/v κιτρικό οξύ) και οξιμισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA)

Για την αξιοποίηση του μεθανολικού εκχυλίσματος έγινε αντικατάσταση του μέσου οξίνισης από το ισχυρό οξύ TFA σε ήπιο οξύ που μπορεί να αξιοποιηθεί στην βιομηχανία τροφίμων. Το TFA είναι πολύ τοξικό συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για ενσωμάτωση σε εκχυλίσματα που θα ενσωματωθούν σε τρόφιμα. Για αυτό τον λόγο επιλέχθηκε οξιμισμένη μεθανόλη με κιτρικό οξύ.

##### 4.5.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της πούλπας (ξηρανση υπό αέρα στους 40°C) εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της πούλπας σε προηγούμενη ενότητα, αλλά με διαφορετικό μέσο οξίνισης της μεθανόλης. Το τριφθοροξικό οξύ (TFA) είναι πολύ τοξικό συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για ενσωμάτωση σε εκχυλίσματα που θα ενσωματωθούν σε τρόφιμα. Για αυτό το λόγο αντικαταστάθηκε με κιτρικό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων.

Από την εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με MeOH 0,75% w/v κιτρικό οξύ εκχυλίστηκαν  $0,409 \pm 0,006$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιώς σε στερεά ήταν  $40,9 \pm 0,6$  % w/w (επί ξηρής βάσης).

Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την εκχύλιση με MeOH 0,75% w/v κιτρικό οξύ είναι μικρότερη (μείωση 13%) σε σχέση με την εκχύλιση με MeOH 0,5% v/v TFA ( $0,47 \pm 0,04$  gστερεών/gπούλπας).

#### 4.5.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ παρελήφθησαν  $44 \pm 1 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 70% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $10,4 \pm 0,2$  (%TPC/στερεά w/w).

Πίνακας 22: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα εκχυλίσματα της πούλπας με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ και μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	TPC $\text{g}_{\text{GAE}}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	TPC $\text{mg}_{\text{GAE}}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	%TPC/ολικά στερεά w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,9±0,8	49±8	10,3±1,7
METH_PULP_CA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,4±0,1	44±1	10,6±0,2

Παρατηρείται ότι η αλλαγή του μέσου οξίνισης από TFA (ισχυρό οξύ) σε κιτρικό οξύ στην εκχύλιση της πούλπας της αρώνιας δεν επέφερε σημαντική μείωση στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε g GAE/100 g (μείωση 10%) και επέφερε μικρή αύξηση στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w (αύξηση 3%). Η αύξηση στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w είναι σημαντική καθώς στην τελική παραλαβή των στερεών των εκχυλισμάτων θα έχει μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά.

#### 4.5.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v παρελήφθησαν  $42 \pm 8 \text{ mg}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 81% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

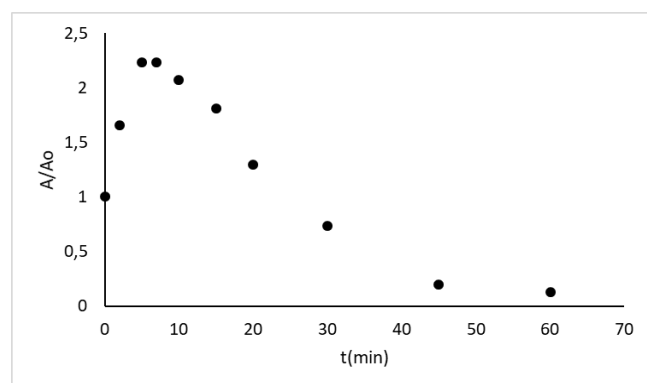
Πίνακας 23: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα εκχυλίσματα της πούλπας με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ και μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	TAC gTE/100 gπούλπας(dw)	TAC mgTE/ gπούλπας(dw)	% TAC/TPC w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,9±0,7	59±7	122±15
METH_PULP_CA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,2±0,8	42±8	94±8

Παρατηρείται ότι η εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ στην πούλπα της αρώνιας επέφερε μείωση 28,8% στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας. Ωστόσο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώθηκε μόνο κατά 10%, αυτό μπορεί οφείλεται στην αλλαγή της σύστασης των επιμέρους φαινολικών.

#### 4.5.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm. Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο. Το διάγραμμα 31 παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου.



Διάγραμμα 31: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση στα 520 nm για το μεθανολικό εκχύλισμα (0,75% w/v κιτρικό οξύ, ξηραμένη υπο αέρα)

Παρατηρείται ότι παρουσιάζει παρόμοια κινητική καμπύλη με την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα με προκατεργασία ΠΗΠ. Η εκχύλιση των ανθοκυανινών ξεκίνησε περίπου από το 50% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0, και σε πολύ κοντινό χρόνο στα 5 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Έπειτα μειώνεται σχεδόν εκθετικά μέχρι και τα 60 λεπτά, όπου σταματάει η εκχύλιση. Στα 60 λεπτά παραλαμβάνονται

σχεδόν όλες οι ανθοκυανίνες, οπότε δεν χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.5.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο μεθανολικό εκχύλισμα με 0,75% w/v κιτρικό οξύ. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

*Πίνακας 24: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα εκχυλίσματα της πούλπας με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ και μεθανόλη 0,5% v/v TFA*

<b>Δείγματα</b>	<b>mg<sub>CyE</sub>/g<sub>πούλπας(dw)</sub></b>	<b>mg<sub>CyE</sub> /g<sub>στερεών εκχυλίσματος</sub></b>
<b>METH_PULP_TFA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	14±1	30,47±0,05
<b>METH_PULP_CA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	12,1±0,1	29,6±0,7

*Πίνακας 25: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα εκχυλίσματα της πούλπας με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ και μεθανόλη 0,5% v/v TFA*

<b>Δείγματα</b>	<b>mg<sub>ChAE</sub>/ g<sub>πούλπας(dw)</sub></b>	<b>mg<sub>ChAE</sub>/ g<sub>στερεών εκχυλίσματος</sub></b>
<b>METH_PULP_TFA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,4±0,1	0,7±0,4
<b>METH_PULP_CA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,68±0,02	1,65±0,03

Πίνακας 26: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα εκχυλίσματα της πούλπας με μεθανόλη 0,75% w/v κιτρικό οξύ και μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>QRE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
<b>METH_PULP_TFA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,1±0,3	2,2±0,5
<b>METH_PULP_CA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,2±0,3	3,0±0,7

Παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση του ισχυρού οξέος (TFA), που χρησιμοποιήθηκε για αναλυτικούς σκοπούς, με κιτρικό οξύ απέδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος σε σχέση μόνο στην περίπτωση των φαινολικών οξέων και των φλαβονολών, ενώ για τις ανθοκυανίνες δεν προέκυψε κάποια αύξηση. Τα mg<sub>QRE</sub> / gπούλπας(dw) των φαινολικών οξέων ειδικά αυξήθηκαν κατά 70%, ενώ mg<sub>QRE</sub>/ gστερεών εκχυλίσματος αυξήθηκαν κατά 135%. Τα ποσοστά αύξησης των φαινολικών οξέων είναι πολύ σημαντικά και μπορεί να σημαίνει ότι η χρήση του TFA δρα παρεμποδιστικά για την παραλαβή των φαινολικών οξέων. Η συγκέντρωση των φλαβοβολών αυξήθηκε μόνο κατά

#### 4.6 Σύγκριση εκχύλισης υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση στην σταθερής κλίνης (διαλύτης οξινισμένη μεθανόλη (0,5% v/v TFA), ξηραμένη υπό αέραπούλπα)

Επιλέχθηκε αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης σε εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες. Η εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών του.

##### 4.6.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της πούλπας (ξηράνη υπό αέρα στους 40°C) εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες αλλά διαφορετική μέθοδο εκχύλισης σε σχέση με την εκχύλιση με μεθανόλη 0,5% v/v TFA στην διάταξη της σταθερής κλίνης (διάρκεια 1 ώρα). Οπότε εκχυλίστηκε με MeOH 0,5% v/v TFA (ισχυρό οξύ) υπό ανάδευση για 24 ώρες σε ανακινούμενο υδατόλουτρο (τελική αναλογία σκόνης-διαλύτη 1:15 w/v). Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο και την αντιριζική ικανότητα, για εξετασθεί η επίδραση της διαφορετικής μεθόδου εκχύλισης. Η εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών του. Από την εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με MeOH 0,5% v/v TFA εκχυλίστηκαν  $0,59 \pm 0,01$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιώς σε στερεά ήταν  $59 \pm 1$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη για 1 ώρα με MeOH 0,5% v/v TFA ( $0,47 \pm 0,04$  gστερεών/gπούλπας).

#### 4.6.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Από την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $98 \pm 1 \text{ mg}_{GAE} / \text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 156% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $16,6 \pm 0,2$  (%TPC/στερεά w/w).

*Πίνακας 27: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA*

Δείγματα	TPC $\text{g}_{GAE}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	TPC $\text{mg}_{GAE}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	%TPC/ολικά στερεά w/w
<b>METH_PULP_TFA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,9±0,8	49±8	10,3±1,7
<b>METH_PULP_TFA_AD_B</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	9,8±0,1	98±1	16,6±0,2

Παρατηρείται ότι η αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης σε υπό ανάδευση για 24 ώρες επέφερε υψηλή αύξηση στην απόδοση σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη για 1 ώρα του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε  $\text{g GAE}/100 \text{ g}$  (αύξηση 100%) και στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w (αύξηση 61%). Η αύξηση στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w είναι σημαντική καθώς στην τελική παραλαβή των στερεών των εκχυλισμάτων θα έχει μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά.

#### 4.6.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του μεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Από την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $90 \pm 1 \text{ mg}_{TE} / \text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 173% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

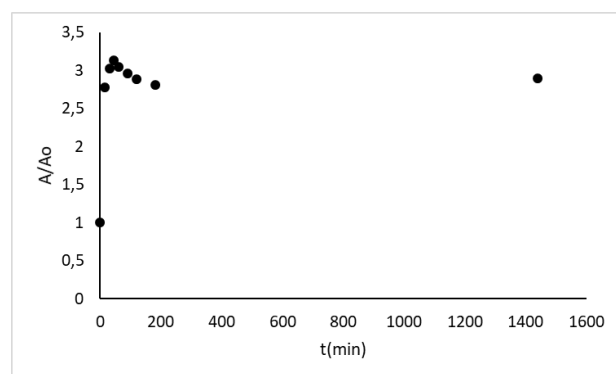
Πίνακας 28: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	TAC g <sub>TE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TAC mg <sub>TE</sub> / gπούλπας(dw)	% TAC/TPC w/w
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,9±0,7	59±7	122±15
METH_PULP_TFA_AD_B Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	9±1	91±10	92±10

Παρατηρείται ότι η εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA στην πούλπα της αρώνιας επέφερε αύξηση 53% στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας, τιμή πολύ σημαντική. Οι αποδόσεις σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τις αποδόσεις σε συστατικά με αντιριζική ικανότητα εξελίσσονται κατά παρόμοιο τρόπο. Αυτό εξηγείται, καθώς οι φαινολικές ενώσεις είναι ουσίες που χαρακτηρίζονται από την αντιριζική τους δράση. Διαπιστώνεται οπότε ότι η απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο στην εκχύλιση διαλείποντος έργου για 24 ώρες με οξιμισμένη μεθανόλη οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις και όχι σε άλλα μη φαινολικά αναγωγικά μόρια. Ωστόσο, σε σχέση με την εκχύλιση σταθερής κλίνης μειώθηκε το ποσοστό ουσιών με αντιριζική δράση ανά ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TAC/TPC %) κατά 25% (από 122% σε 92% TAC/TPC w/w). Έγινε παραλαβή άρα περισσότερων φαινολικών ενώσεων με χαμηλότερη αντιριζική δράση.

#### 4.6.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm. Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο. Το διάγραμμα 32 παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης διαλείποντος έργου.



Διάγραμμα 32: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση στα 520 nm για την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών ξεκίνησε από πολύ μικρή απόδοση, αυξανόταν μέχρι τα 60 λεπτά και έπειτα η τιμή της παραμένει σταθερή. Αυτό σημαίνει ότι από τα 60 λεπτά και μετά έχει παραληφθεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθοκυανινών.

#### 4.6.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 29: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίση στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλιμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	14±1	30,47±0,05
METH_PULP_TFA_AD_B Μεθανολικό εκχύλιμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	14,3±0,7	24±2

Πίνακας 30: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίση στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
METH_PULP_TFA_AD_SB Μεθανολικό εκχύλιμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,4±0,1	0,7±0,4
METH_PULP_TFA_AD_B Μεθανολικό εκχύλιμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	0,65±0,01	1,10±0,04



Πίνακας 31: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA

Δείγματα	mgQRE / gπούλπας(dw)	mgQRE/ gστερεών εκχυλίσματος
<b>METH_PULP_TFA_AD_SB</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας(0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,1±0,3	2,2±0,5
<b>METH_PULP_TFA_AD_B</b> Μεθανολικό εκχύλισμα πούλπας (0,5% TFA, ξηραμένης υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	1,1±0,1	1,8±0,2

Παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με μεθανόλη 0,5% v/v TFA απέδωσε μεγαλύτερη συγκέντρωση μόνο στην περίπτωση των φαινολικών οξέων (αύξηση 63%), ωστόσο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) απέδωσε σχεδόν την διπλάσια απόδοση από την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη για μία ώρα. Οι προκυανιδίνες αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό της αρώνιας σε φαινολικά συστατικά και δεν έγινε ποσοτικοποίηση τους με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Είναι πιθανόν για την αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιριζικής ικανότητας με την μέθοδο της υπό ανάδευσης εκχύλισης για 24 ώρες να ευθύνονται αυτές οι ενώσεις. Ωστόσο, σε σχέση με την εκχύλιση σταθερής κλίνης μειώθηκε το ποσοστό ουσιών με αντιριζική δράση ανά ολικό φαινολικό περιεχόμενο (% w/w TAC/TPC), οπότε παραλήφθησαν περισσότερες φαινολικές ενώσεις με χαμηλότερη αντιριζική δράση.

#### 4.7 Χαρακτηρισμός παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας με εκχύλιση με οξιμισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ, ξηραμένη υπό αέρα)

Το νερό είναι ο φιλικότερος προς το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία διαλύτης και επιπλέον είναι κατάλληλος για την παραλαβή αρκετών φαινολικών συστατικών. Συνεπώς επιλέχθηκε να αντικατασταθεί η οξιμισμένη μεθανόλη ως διαλύτης με το οξιμισμένο νερό.

##### 4.7.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

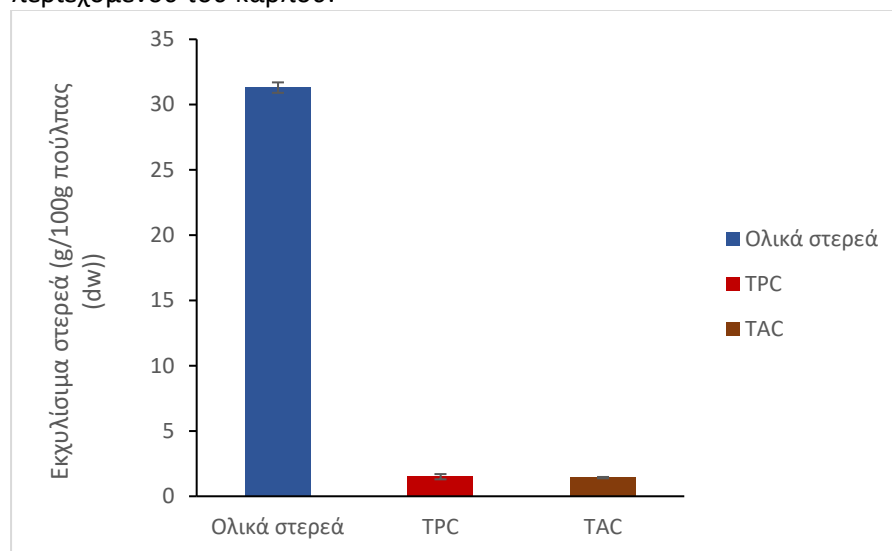
Για τον χαρακτηρισμό του παραπροϊόντος η ξηρή σκόνη της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας του εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ στην διάταξη της σταθερής κλίνης εις διπλούν για την εξαγωγή σφάλματος (τελική αναλογία σκόνης-διαλύτη 1:25 w/v). Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο και την αντιριζική ικανότητα. Από την υδατική εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ και εκχυλίστηκαν  $0,313 \pm 0,004$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιών σε στερεά ήταν  $31,3 \pm 0,4$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε πως η απόδοση της υδατικής εκχύλισης σε στερεά προέκυψε μικρότερη από την μεθανολική εκχύλιση, γεγονός που σημαίνει πως εκχυλίζονται λιγότερα συστατικά σε σχέση με την μεθανόλη.

#### 4.7.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents). Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ παρελήφθησαν  $15 \pm 2 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 24% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση αντιριζικής ικανότητας σε σχέση με ολικό φαινολικό περιεχόμενο ίση με  $4,7 \pm 0,8$  (%TPC/στερεά w/w).

#### 4.7.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ παρελήφθησαν  $14,3 \pm 0,5 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 28% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

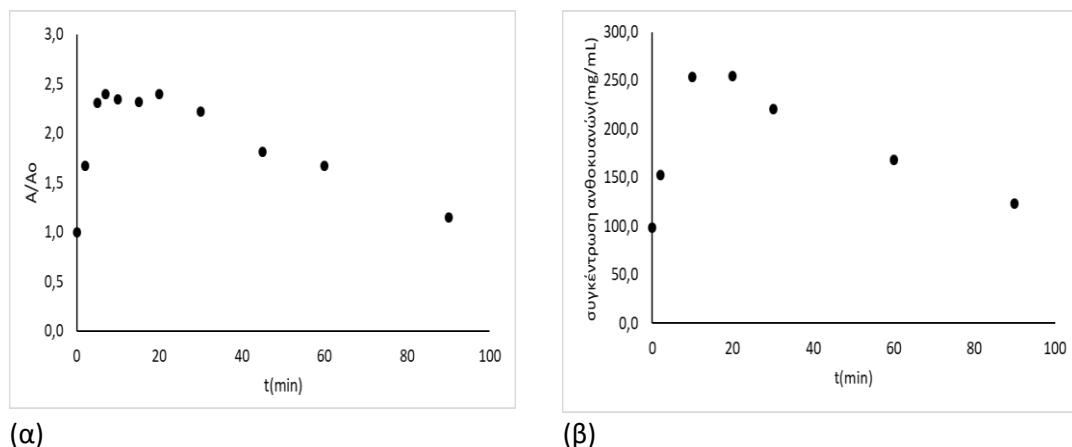


Διάγραμμα 33: Σύγκριση ολικών στερεών με ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και αντιριζική ικανότητα (TAC) στο παραπροϊόν με εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ

#### 4.7.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα (α) (Διάγραμμα 4) παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του υδατικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Το διάγραμμα (β) (Διάγραμμα 34) παρουσιάζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που

ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο χρωματογράφημα των 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης.



Διάγραμμα 34: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών (α) με φωτομέτρηση στα 520, (β) με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το υδατικό εκχύλισμα (0,75% κιτρικό οξύ, ξηραμένη υπό αέρα)

Παρατηρήθηκε ότι οι δύο καμπύλες που σχηματίστηκαν με τις δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης παρουσίασαν παρόμοια κινητική. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς και στις δύο μεθόδους λήφθηκαν απορροφήσεις στα 520 nm, που δίνουν μέγιστη απορρόφηση οι ανθοκυανίνες. Η εκχύλιση των ανθοκυανινών παρατηρείται ότι ξεκίνησε περίπου από το 50% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0, και σε πολύ κοντινό χρόνο στα 5 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Μέχρι τα 30 λεπτά τα κλάσματα της εκχύλισης απέδιδαν αποδόσεις κοντά στην μέγιστη, ενώ από τα 30 λεπτά και μετά οι αποδόσεις έπεφταν σχεδόν γραμμικά μέχρι και τα 90 λεπτά, όπου σταμάτησε η εκχύλιση. Στα 90 λεπτά δεν παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, εφόσον οι απορροφήσεις δεν έφτασαν κοντά στο 0, οπότε χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.7.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

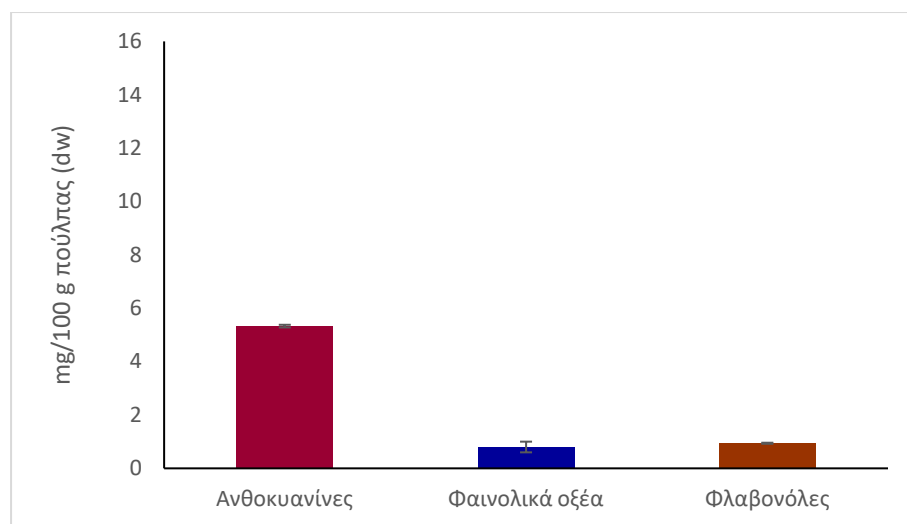
Στα υδατικά εκχυλίσματα εντοπίστηκαν οι ίδιες φαινολικές ουσίες με τα μεθανολικά εκχυλίσματα, αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Οι ανθοκυανίνες που εντοπίστηκαν ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών και της καμπύλης αναφοράς της κυανιδίνης στα 520 nm ( $E_{520} = 80,347c - 26,342$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιούνται τα ισοδύναμα κυανιδίνης (Cyanidin Equivalents – CyE). Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή ανθοκυανινών (TAnth) ίση με  $5,33 \pm 0,05 \text{ mg}_{CyE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση και  $17,0 \pm 0,3 \text{ mg}_{CyE}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .

Τα φαινολικά οξέα που εντοπίστηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών με ανάλυση HPLC και την καμπύλη αναφοράς του χλωρογενικού οξέος στα 320 nm ( $E_{320} = 64,465c - 137,51$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα χλωρογενικού οξέος (Chlorogenic Acid Equivalents – ChAE). Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της

καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή χλωρογενικών οξέων (ChAE) ίση με  $0,8 \pm 0,2 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση και  $2,5 \pm 0,5 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των φλαβονολών στο μεθανολικό εκχύλισμα, αξιοποιήθηκε το σύνολο του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών και η καμπύλη αναφοράς της ρουτίνης στα 360 nm ( $E_{360} = 29,209c - 39,596$ , όπου  $c$  η συγκέντρωση σε mg/L). Ως μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα ρουτίνης (Quercetin Rutinoside (Rutin) Equivalents – QRE). Από την ανάλυση των εκχυλισμάτων φλοιών με HPLC και την ποσοτικοποίηση βάσει της καμπύλης αναφοράς, εξήχθη η ολική παραλαβή φλαβονολών (QRE) ίση με  $0,94 \pm 0,02 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση και  $3,01 \pm 0,09 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{ολ. στερεών εκχυλίσματος}}$ .



Διάγραμμα 35: : Ολικές ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα και φλαβονόλες σε mg/100 g πούλπας (dw) που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο HPLC στο στην πούλπα (ξηραμένη υπό αέρα) με εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ.

Πίνακας 32: Ολικές ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα και φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο HPLC στο στην πούλπα (ξηραμένη υπό αέρα), ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική ικανότητα σε mg/100 g πούλπας (dw) και σε mg/g στερεών εκχυλίσματος με εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ.

Φαινολικές ουσίες	mg /g πούλπας(dw)	mg /g στερεών εκχυλίσματος
<b>Ολικό φαινολικό περιεχόμενο</b>	15±2	-
<b>Αντιριζική ικανότητα</b>	14,3±0,5	-
<b>Ανθοκυανίνες</b>	5,33±0,05	17,0±0,3
<b>Φαινολικά οξέα</b>	0,8±0,2	2,5±0,5
<b>Φλαβονόλες</b>	0,94±0,02	3,01±0,09

Οι Kaloudi et al. (2022) πραγματοποίησαν εκχύλιση σε πούλπα (εργαστηριακή χυμοποίηση) ξηραμένη υπό αέρα στους 40°C με διαλύτη νερό οξινισμένο κατά 0,75 % με κιτρικό οξύ (σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου). Η τελική προκύπτουσα αναλογία ήταν 1:18 (επί της ξηρής μάζας) και η συνολική διάρκεια εκχύλισης 180 min. Προέκυψε ότι μέσω της εκχύλισης

με οξιτισμένο νερό, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε ξηρή βάση από το υπόλειμμα της χυμοποίησης ήταν  $13,2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο και  $3,67 \text{ mg}_{\text{CγE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ανθοκυανίνες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία για εκχύλιση πούλπας (από βιομηχανική χυμοποίηση) με τις ίδιες συνθήκες, αλλά τελική προκύπτουσα αναλογία ήταν 1:25 (επί της ξηρής μάζας) και η συνολική διάρκεια εκχύλισης 90 min, παραλήφθηκαν  $15 \pm 2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο, τιμή υψηλότερη κατά 12%. Η συγκέντρωση των ανθοκυανινών βρέθηκε ίση με  $5,33 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{CγE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ , υψηλότερη κατά 45%.

Συγκρίνοντας με την εκχύλιση σταθερής κλίνης με μεθανόλη 0,5% v/v TFA (Πίνακας 12), η απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώθηκε κατά 69%, και η απόδοση σε ουσίες με αντιριζική ικανότητα μειώθηκε κατά 76%. Οι αποδόσεις της υδατικής εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά και αντιριζική δράση προέκυψαν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με της μεθανολικής.

Παρατηρείται ότι λήφθηκε υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών οξέων (αύξηση 50%) και παραπλήσια συγκέντρωση φλαβονολών (αύξηση 14%) με την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v, ωστόσο παραλήφθηκε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανινών (μείωση 62%). Οι ανθοκυανίνες είναι από τις κύριες φαινολικές ενώσεις της αρώνιας, σε αντίθεση με τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και δεν παραλαμβάνονται ικανοποιητικά με εκχύλιση με οξιτισμένο νερό.

#### 4.8 Σύγκριση λυοφυλιωμένης με ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με απιονισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ)

Δοκιμάστηκε διαφορετική μέθοδος ξήρανσης στην πούλπα της αρώνιας, για να βρεθεί αν υποβαθμίζονται οι φαινολικές ενώσεις της αρώνιας με την ξήρανση στους 40°C. Οπότε πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφυλίωση) και η λυοφυλιωμένη πούλπα εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό 0,75% w/v στην διάταξη της σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου).

##### 4.8.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της λυοφυλιωμένης πούλπας εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του υδατικού εκχυλίσματος της πούλπας στην προηγούμενη ενότητα. Από την υδατική εκχύλιση της ξηρής σκόνης της λυοφυλιωμένης πούλπας εκχυλίστηκαν  $0,34 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιώς σε στερεά ήταν  $34 \pm 4 \% \text{ w/w}$  (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την υδατική εκχύλιση της λυοφυλιωμένης πούλπας είναι σχεδόν ίσα με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας ( $0,31 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ).

##### 4.8.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Από την υδατική εκχύλιση της λυοφυλιωμένης πούλπας παρελήφθησαν  $23 \pm 1 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή

βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 37% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $6,8 \pm 0,3$  (%TPC/στερεά w/w).

Πίνακας 33: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα υδατικά εκχυλίσματα της λυοφιλωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	TPC g <sub>GAE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TPC mg <sub>GAE</sub> / gπούλπας(dw)	%TPC/ολικά στερεά w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,5±0,2	15±2	4,7±0,8
WAT_PULP_0.75CA_FD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, λυοφιλωμένη, ημιδιαλείποντος έργου)	2,3±0,1	23±1	6,8±0,3

Παρατηρείται ότι η λυοφυλίωση στην πούλπα της αρώνιας επέφερε σημαντική αύξηση (53%) στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου για τις υδατικές εκχυλίσεις. Η ξήρανση υπό κατάψυξη αναμενόταν να επιφέρει αύξηση στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, διότι η σκόνη που προέκυψε από την λυοφιλωμένη πούλπα αρώνιας ήταν πιο μαλακή και με πιο έντονο ερυθρό χρώμα από αυτήν με την ξήρανση υπό αέρα. Αυτό σημαίνει ότι υπήρξε χαμηλότερη καταπόνηση και διαφορετική δομή του υλικού με την λυοφυλίωση.

#### 4.8.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για την λυοφιλωμένη πούλπα της αρώνιας από την υδατική εκχύλιση παρελήφθησαν  $18 \pm 4 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{πούλπας}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 35% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

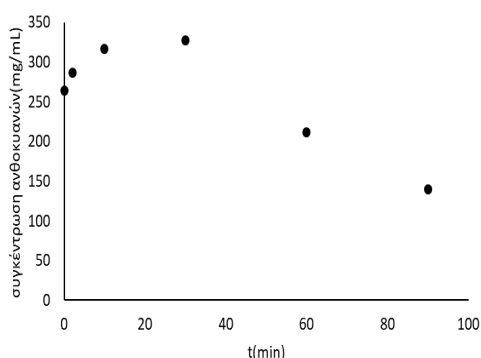
Πίνακας 34: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα υδατικά εκχυλίσματα της λυοφιλωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	TAC g <sub>TE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TAC mg <sub>TE</sub> / gπούλπας(dw)	% TAC/TPC w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,43±0,05	14,3±0,5	96±3
WAT_PULP_0.75CA_FD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, λυοφιλωμένη, ημιδιαλείποντος έργου)	1,8±0,4	18±4	77±16

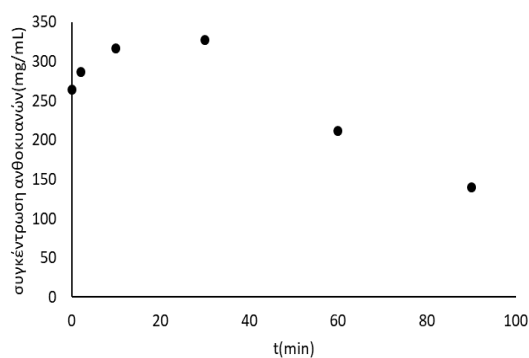
Παρατηρείται ότι η λυοφυλίωση στην πούλπα της αρώνιας επέφερε αύξηση 26% στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας, χαμηλότερη σε σχέση με την απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

#### 4.8.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ της λυοφιλιωμένης πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα (α) (Διάγραμμα 36) παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του υδατικού εκχυλίσματος της λυοφιλιωμένης πούλπας στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Το διάγραμμα (β) (Διάγραμμα 36) παρουσιάζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στο χρωματογράφημα των 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης.



(α)



(β)

Διάγραμμα 36: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με (α) με φωτομέτρηση στα 520, (β) με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το υδατικό εκχύλισμα (0,75% w/v κιτρικό οξύ, λυοφιλιωμένη)

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών παρατηρείται ότι ξεκίνησε περίπου από το 70% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0 και στα 20 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Από τα 20 λεπτά και μετά οι αποδόσεις έπεφταν σχεδόν γραμμικά μέχρι και τα 90 λεπτά, όπου σταμάτησε η εκχύλιση. Στα 90 λεπτά δεν παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, εφόσον οι απορροφήσεις δεν έφτασαν κοντά στο 0, οπότε χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.8.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο υδατικό εκχύλισμα της λυοφιλιωμένης πούλπας. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 35: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mgCyE/gπούλπας(dw)	mgCyE /gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,33±0,05	17,0±0,3
WAT_PULP_0.75CA_FD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, λυοφιλιωμένη, ημιδιαλείποντος έργου)	6,9±0,1	21±2

Πίνακας 36: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mgChAE/ gπούλπας(dw)	mgChAE/ gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,8±0,2	2,5±0,5
WAT_PULP_0.75CA_FD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, λυοφιλιωμένη, ημιδιαλείποντος έργου)	0,84±0,05	2,5±0,2

Πίνακας 37: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της λυοφιλιωμένης σε σχέση με την ξηραμένη υπό αέρα πούλπας

Δείγματα	mgQRE / gπούλπας(dw)	mgQRE/ gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,94±0,02	3,01±0,09
WAT_PULP_0.75CA_FD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, λυοφιλιωμένη, ημιδιαλείποντος έργου)	1,1±0,1	3,4±0,2

Παρατηρήθηκε ότι η λυοφιλίωση της πούλπας της αρώνιας στις υδατικές εκχυλίσεις απέδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος σε σχέση με την ξήρανση υπό αέρα στους 40°C και στις τρεις περιπτώσεις των φαινολικών ενώσεων που ποσοτικοποιήθηκαν στο σύνολο τους. Αυτό συνέβη διότι υπήρξε χαμηλότερη καταπόνηση και διαφορετική δομή του υλικού με την λυοφιλίωση σε σχέση με την ξήρανση



υπό αέρα. Για τις ανθοκυανίνες προέκυψε η μεγαλύτερη αύξηση (29%), το οποίο ήταν και αναμενόμενο καθώς η εκχύλιση με οξινισμένο νερό αποδείχθηκε ότι παραλαμβάνει μικρό ποσοστό των ανθοκυανινών.

#### 4.9 Σύγκριση πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ με απλή ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας στην εκχύλιση με οξινισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ)

Πραγματοποιήθηκε προκατεργασία της πούλπας και Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ), ώστε να επιτευχθεί διάρρηξη στα κύτταρα της πούλπας της αρώνιας και να εκχυλιστούν τα συστατικά της πιο γρήγορα ή σε μεγαλύτερο ποσοστό.

##### 4.9.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της υδατικής εκχύλισης της πούλπας σε προηγούμενη ενότητα. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το φαινολικό περιεχόμενο, αντιριζική ικανότητα, αλλά και τις συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων. Από την υδατική εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) εκχυλίστηκαν  $0,35 \pm 0,01$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιών σε στερεά ήταν  $35 \pm 1$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την υδατική εκχύλιση της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF) είναι σχεδόν ίσα με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας ( $0,31 \pm 0,04$  gστερεών/gπούλπας).

##### 4.9.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την υδατική εκχύλιση της λυοφιλωμένης πούλπας παρελήφθησαν  $17 \pm 1$  mg<sub>GAE</sub>/gπούλπας σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 27% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $14,8 \pm 0,8$  (%TPC/στερεά w/w).

Πίνακας 38: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα υδατικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία PEF σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	TPC g <sub>GAE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TPC mg <sub>GAE</sub> / gπούλπας(dw)	%TPC/ολικά στερεά w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,5±0,2	15±2	4,7±0,8
PEF_WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,68±0,08	17±1	5,0±0,2

Παρατηρείται ότι η προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ ή PEF) στην πούλπα της αρώνιας για τις υδατικές εκχυλίσσεις επέφερε αύξηση 12% στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Η αύξηση αυτή ήταν επιθυμητή, καθώς με την εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη των ιστών και αναμένεται αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχόμενων συστατικών. Θα ήταν επιθυμητή ωστόσο, μια μεγαλύτερη αύξηση.

#### 4.9.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Για την πούλπα της αρώνιας με προκατεργασία ΠΗΠ με εκχύλιση με νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ παρελήφθησαν  $16 \pm 1 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 31% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

Πίνακας 39: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα υδατικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία PEF σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

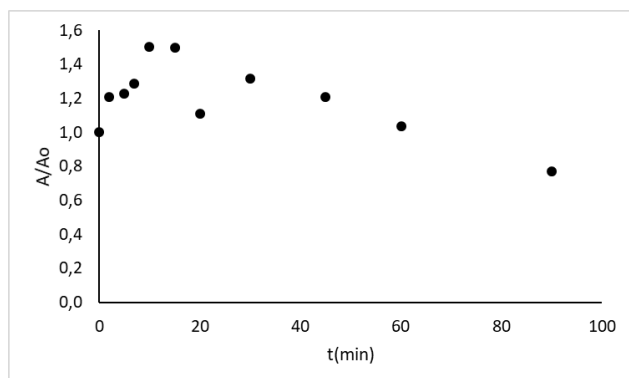
Δείγματα	TAC $\text{g}_{TE}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	TAC $\text{mg}_{TE}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	% TAC/TPC w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,43±0,05	14,3±0,5	96±3
PEF_WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,6±0,1	16±1	94±8

Παρατηρείται ότι η προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ ή PEF) στην πούλπα της αρώνιας για τις υδατικές εκχυλίσσεις επέφερε αύξηση 12% στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας. Η αύξηση αυτή ήταν επιθυμητή, καθώς με την εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη των ιστών και αναμένεται αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχόμενων συστατικών. Θα ήταν επιθυμητή ωστόσο, μια μεγαλύτερη αύξηση. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική ικανότητα αυξήθηκαν κατά το ίδιο ποσοστό, το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς οι φαινολικές ουσίες χαρακτηρίζονται από την αντιριζική τους δράση.

#### 4.9.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ της λυοφιλωμένης πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντιστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα 37 παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του υδατικού εκχυλίσματος της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ στα 520 nm

ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου.



Διάγραμμα 37: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση στα 520 nm για το υδατικό εκχύλισμα (0,75% w/v κιτρικό οξύ, PEF, ξηραμένη υπό αέρα)

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών παρατηρείται ότι ξεκίνησε περίπου από το 60% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0 και στα 20 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Από τα 20 λεπτά και μετά οι αποδόσεις έπεφταν σχεδόν γραμμικά μέχρι και τα 90 λεπτά, όπου σταμάτησε η εκχύλιση. Στα 90 λεπτά δεν παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, εφόσον οι απορροφήσεις δεν έφτασαν κοντά στο 0, οπότε χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.9.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο μεθανολικό εκχύλισμα της πούλπας με προκατεργασία ΠΗΠ (PEF). Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 40: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία PEF σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,33±0,05	17,0±0,3
PEF_WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	4,9±0,1	14,8±0,6

Πίνακας 41: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία PEF σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,8±0,2	2,5±0,5
PEF_WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,65±0,04	1,9±0,2

Πίνακας 42: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα υδατικά εκχυλίσματα της πούλπας με προκατεργασία PEF σε σχέση με της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας χωρίς προκατεργασία

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>QRE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,94±0,02	3,01±0,09
PEF_WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,74±0,01	2,209±0,003

Παρατηρήθηκε ότι η προκατεργασία της πούλπας της αρώνιας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία δεν απέδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος σε σχέση με την ξήρανση υπό αέρα στους 40°C. Ωστόσο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιριζική ικανότητα παρουσίασε αύξηση σε σχέση με την πούλπα χωρίς προκατεργασία ΠΗΠ, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην παραλαβή των προκυανιδινών που δεν ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

#### 4.10 Σύγκριση υδατικής εκχύλισης ξηραμένης υπό αέρα πούλπας αρώνιας με αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος από 0,75% w/v σε 1,5% w/v

Εξετάσθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος στο οξινισμένο νερό για να βρεθεί η επιρροή της οξίνισης του διαλύτη στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών της πούλπας της αρώνιας.

##### 4.10.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της πούλπας (ξηράνση υπό αέρα στους 40°C) εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες και μέθοδο που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της πούλπας σε προηγούμενη ενότητα, αλλά με διαφορετική συγκέντρωση του μέσου οξίνισης του απιονισμένου νερού. Η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος επιλέχθηκε για να διερευνηθεί πως επηρεάζεται η υδατική εκχύλιση με την μείωση του pH. Το εκχύλισμα μελετήθηκε ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική ικανότητα αλλά και τις συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων. Από την εκχύλιση της ξηρής σκόνης της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ εκχυλίστηκαν  $0,39 \pm 0,02$  gστερεών/gπούλπας σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιών σε στερεά ήταν  $39 \pm 2$  % w/w (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την υδατική εκχύλιση με 0,75% w/v κιτρικό οξύ ( $0,31 \pm 0,04$  gστερεών/gπούλπας), οπότε ότι παρέλαβε περισσότερα ολικά στερεά.

##### 4.10.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Για τον χαρακτηρισμό της πούλπας της αρώνιας από την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ παρελήφθησαν  $12 \pm 1$  mg<sub>GAE</sub>/gπούλπας σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 19% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $3,0 \pm 0,4$  (%TPC/στερεά w/w).

Πίνακας 43: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στα εκχυλίσματα της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v σε σχέση με 0,75% w/v

Δείγματα	TPC g <sub>GAE</sub> /100 gπούλπας(dw)	TPC mg <sub>GAE</sub> / gπούλπας(dw)	%TPC/ολικά στερεά w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,5±0,2	15±2	4,7±0,8
WAT_PULP_1.5CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (1,5% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,2±0,1	12±1	3,0±0,4

Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του μέσου οξίνισης από 0,75% w/v σε 1,5% w/v κιτρικού οξέος στην υδατική εκχύλιση της πούλπας της αρώνιας δεν επέφερε αύξηση στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Επομένως, η μείωση του pH δεν επέφερε αύξηση στην εκχυλισσιμότητα των φαινολικών συστατικών της πούλπας της αρώνιας.

#### 4.10.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Από την εκχύλιση με μεθανόλη 0,75% w/v παρελήφθησαν  $14 \pm 1 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 27% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

Πίνακας 44: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στα εκχυλίσματα της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v σε σχέση με 0,75% w/v

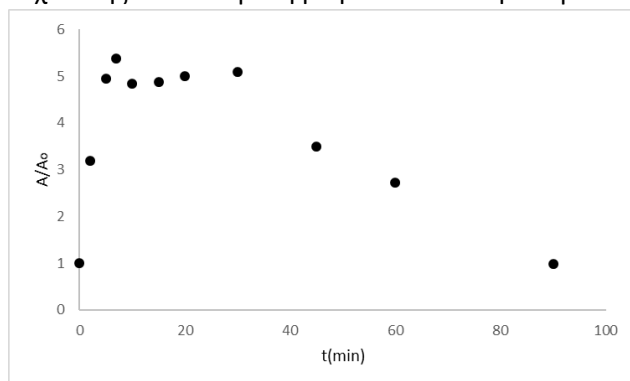
Δείγματα	TAC $\text{g}_{TE}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	TAC $\text{mg}_{TE}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	% TAC/TPC w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,43±0,05	14,3±0,5	96±3
WAT_PULP_1.5CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (1,5% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,4±0,1	14±1	123±12

Παρατηρείται ότι η εκχύλιση με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ στην πούλπα της αρώνιας παρουσίασε παρόμοια απόδοση με την υδατική εκχύλιση με 0,75% w/v κιτρικό οξύ, άρα δεν προτείνεται η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος στο 1,5% w/v.

#### 4.10.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για την εκχύλιση με απιονισμένο νερό 1,5% w/v κιτρικό οξύ της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας της αρώνιας

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm και με μελέτη των αντίστοιχών δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο αλλά και από την μελέτη με υγρή χρωματογραφία. Το διάγραμμα 38 παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του υδατικού εκχυλίσματος της πούλπας με 1,5% w/v κιτρικό οξύ στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα

εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου



Διάγραμμα 38: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση στα 520 nm για το υδατικό εκχύλισμα (1,5% w/v κιτρικό οξύ, air dried)

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών παρατηρείται ότι ξεκίνησε περίπου από το 20% της μέγιστης απόδοσης στον χρόνο 0 και στα 10 λεπτά έφτασε στην μέγιστη απόδοση. Από τα 10 λεπτά μέχρι τα 30 λεπτά η απόδοση παρέμεινε σταθερή και μετά οι έπεφταν σχεδόν γραμμικά μέχρι και τα 90 λεπτά, όπου σταμάτησε η εκχύλιση. Στα 90 λεπτά δεν παραλαμβάνονται όλες οι ανθοκυανίνες, εφόσον οι απορροφήσεις δεν έφτασαν στο 0, οπότε χρειάζεται περαιτέρω εκχύλιση για την παραλαβή τους.

#### 4.10.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο υδατικό εκχύλισμα με 1,5% w/v κιτρικό οξύ. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

Πίνακας 45: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στα στα εκχυλίσματα της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v σε σχέση με 0,75% w/v

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,33±0,05	17,0±0,3
WAT_PULP_1.5CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (1,5% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	6,2±0,2	15,8±0,5

Πίνακας 46: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στα εκχυλίσματα της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v σε σχέση με 0,75% w/v

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,8±0,2	2,5±0,5
WAT_PULP_1.5CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (1,5% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,6±0,1	1,5±0,2

Πίνακας 47: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στα εκχυλίσματα της πούλπας με απιονισμένο νερό 1,5% w/v σε σχέση με 0,75% w/v

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>QRE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,94±0,02	3,01±0,09
WAT_PULP_1.5CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (1,5% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,9±0,2	2,3±0,4

Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος απέδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε mg φαινολικών ενώσεων/ g στερεών εκχυλίσματος στην περίπτωση των ανθοκυανινών (αύξηση 16%).

#### 4.11 Σύγκριση εκχύλισης υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση στην σταθερής κλίνης (διαλύτης οξινισμένο νερό (0,75% w/v κιτρικό οξύ), ξηραμένη υπό αέρα πούλπα)

Επιλέχθηκε αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης σε εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες. Η εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών του.

##### 4.11.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών

Η ξηρή σκόνη της πούλπας (ξηρανση υπό αέρα στους 40°C) εκχυλίστηκε με τις ίδιες συνθήκες αλλά διαφορετική μέθοδο εκχύλισης σε σχέση με την υδατική εκχύλιση με 0,75% w/v κιτρικό οξύ στην διάταξη της σταθερής κλίνης (διάρκεια 1 ώρα). Οπότε εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό 0,75% w/v TFA κιτρικό οξύ υπό ανάδευση για 24 ώρες σε ανακινούμενο υδατόλουτρο (αναλογία 1:15 w/v). Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν αρχικά ως προς τα ολικά στερεά τους, το



φαινολικό περιεχόμενο και την αντιριζική ικανότητα, για εξετασθεί η επίδραση της διαφορετικής μεθόδου εκχύλισης. Η εκχύλιση για 24 ώρες είναι εξαντλητική και μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλιστικότητα των συστατικών του. Από την υδατική εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου της ξηρής σκόνης της πούλπας εκχυλίστηκαν  $0,40 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, δηλαδή η απόδοση της εκχύλισης των αλλιώς σε στερεά ήταν  $40 \pm 2 \% \text{ w/w}$  (επί ξηρής βάσης). Παρατηρούμε ότι τα ολικά στερεά που παραλήφθηκαν με την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την υδατική εκχύλιση σε σταθερή κλίνη για 1 ώρα ( $0,31 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{στερεών}}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ).

#### 4.11.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε GAE (Gallic Acid Equivalents) που έχει δοθεί παραπάνω. Από την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $16,0 \pm 0,1 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 25% του συνολικού περιεχομένου του καρπού, και απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου σε σχέση με ολικά στερεά ίση με  $3,99 \pm 0,03 (\% \text{TPC}/\text{στερεά w/w})$ .

*Πίνακας 48: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ*

Δείγματα	TPC $\text{g}_{\text{GAE}}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	TPC $\text{mg}_{\text{GAE}}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας(dw)}}$	%TPC/ολικά στερεά w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	$1,5 \pm 0,2$	$15 \pm 2$	$4,7 \pm 0,8$
WAT_PULP_0.75CA_AD_B Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	$1,60 \pm 0,01$	$16,0 \pm 0,1$	$3,99 \pm 0,03$

Παρατηρείται ότι η αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης σε υπό ανάδευση για 24 ώρες επέφερε μικρή αύξηση στην απόδοση, σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη για 1 ώρα (διπλάσια απόδοση), του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε g GAE/100 g αλλά μείωση στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w. Η μείωση στο ποσοστό % TPC/ολικά στερεά w/w είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη καθώς στην τελική παραλαβή των στερεών των εκχυλισμάτων θα έχει μικρότερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά.

#### 4.11.3 Προσδιορισμός αντιριζικής ικανότητας

Η αντιριζική ικανότητα (TAC = Total Antioxidant Capacity) του υδατικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH και ποσοτικοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Trolox σε TE (Trolox Equivalents). Από την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με

μεθανόλη 0,5% v/v TFA παρελήφθησαν  $12 \pm 1 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμή που αντιστοιχεί στο 23% του συνολικού περιεχομένου του καρπού.

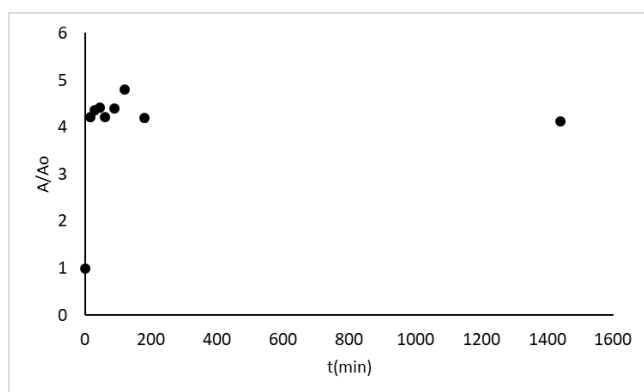
Πίνακας 49: Σύγκριση αντιριζικής ικανότητας (TAC) στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίση στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ

Δείγματα	TAC $\text{g}_{TE}/100$ $\text{g}_{\text{πούλπας}}(\text{dw})$	TAC $\text{mg}_{TE}/$ $\text{g}_{\text{πούλπας}}(\text{dw})$	% TAC/TPC w/w
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	1,43±0,05	14,3±0,5	96±3
WAT_PULP_0.75CA_AD_B Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	1,2±0,1	12±1	73±7

Παρατηρείται ότι η υδατική εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες στην πούλπα της αρώνιας επέφερε μικρή μείωση στην απόδοση της αντιριζικής ικανότητας.

#### 4.11.4 Χάραξη κινητικής καμπύλης για εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ

Μελετήθηκε η κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων δειγμάτων (σε διάφορους χρόνους) στα 520 nm. Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα της κινητικής καμπύλης από την μελέτη στο φωτόμετρο. Το διάγραμμα 39 παρουσιάζει την μεταβολή της ανηγμένης απορρόφησης του μεθανολικού εκχυλίσματος στα 520 nm ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης. Η εξέλιξη αυτή αντιστοιχεί σε διαφορετικά κλάσματα εκχύλισης που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης διαλείποντος έργου.



Διάγραμμα 39: Κινητική καμπύλη της εκχύλισης των ανθοκυανινών με φωτομέτρηση στα 520 nm για την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών ξεκίνησε από πολύ μικρή απόδοση, αυξανόταν μέχρι τα 120 λεπτά και έπειτα η τιμή της παραμένει σταθερή. Αυτό σημαίνει ότι από τα 120 λεπτά και μετά έχει παραληφθεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθοκυανινών.

#### 4.11.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για την εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα για τις ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα και τις φλαβονόλες που ποσοτικοποιήθηκαν σε σύγκριση με την μεθανολική εκχύλιση της ξηραμένης υπό αέρα πούλπας.

*Πίνακας 50: Σύγκριση ανθοκυανινών στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ*

Δείγματα	mg <sub>CyE</sub> /g πούλπας(dw)	mg <sub>CyE</sub> /g στερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	5,33±0,05	17,0±0,3
WAT_PULP_0.75CA_AD_B Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	2,7±0,6	7±1

*Πίνακας 51: Σύγκριση φαινολικών οξέων στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ*

Δείγματα	mg <sub>ChAE</sub> / g πούλπας(dw)	mg <sub>ChAE</sub> / g στερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,8±0,2	2,5±0,5
WAT_PULP_0.75CA_AD_B Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	0,73±0,0,04	1,833±0,005

Πίνακας 52: Σύγκριση φλαβονολών στο σύνολό τους στην εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ

Δείγματα	mg <sub>QRE</sub> / gπούλπας(dw)	mg <sub>QRE</sub> / gστερεών εκχυλίσματος
WAT_PULP_0.75CA_AD_SB Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, ημιδιαλείποντος έργου)	0,94±0,02	3,01±0,09
WAT_PULP_0.75CA_AD_B Υδατικό εκχύλισμα πούλπας (0,75% citric acid, ξηραμένο υπό αέρα, διαλείποντος έργου 24h)	0,46±0,04	1,14±0,05

Παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες στην ξηραμένη υπό αέρα πούλπα αρώνιας με απιονισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ απέδωσε μικρότερες συγκεντρώσεις στις επιμέρους φαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, ωστόσο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο προέκυψε μεγαλύτερο από την εκχύλιση στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Οι προκυανιδίνες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της αρώνιας σε φαινολικά συστατικά και δεν έγινε ποσοτικοποίηση τους με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, οπότε είναι πιθανόν με την μέθοδο της υπό ανάδευσης εκχύλισης για 24 ώρες να λήφθηκαν περισσότερες προκυανιδίνες.

## 5. Συμπεράσματα

Η αρώνια ως καρπός ακόμα δεν έχει αποκτήσει μεγάλη δημοτικότητα στο καταναλωτικό κοινό, καθώς η γεύση της είναι όξινη με έντονη στυπτικότητα και δεν είναι ευρέως αποδεκτή. Ωστόσο, η προσθήκη της στην διατροφή προσφέρει σημαντικά οφέλη για την υγεία, διότι εκτός των βιταμινών και των ιχνοστοιχείων που περιέχει, είναι πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών. Μεγάλο ενδιαφέρον για την βιομηχανία, παρουσιάζει η χρήση της στην παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, φυσικών χρωστικών και φυσικών συντηρητικών τροφίμων. Από την χυμοποίηση της αρώνιας παράγεται ως παραπροϊόν ένας πολτός (πούλπα), ο οποίος απορρίπτεται. Αποτελεί όμως, μια πηγή πολύ πλούσια σε πολυφαινόλες και ιδιαίτερα σε ανθοκυανίνες. Κατά την καλλιέργεια της αρώνιας παράγονται επίσης φύλλα και μίσχοι, τα οποία περιέχουν υπολογίσιμες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών.

Η παρούσα μελέτη αρχικά επεδίωξε την εξαγωγή επιπλέον πληροφοριών για τα φύλλα της αρώνιας και την ανάλυση των φαινολικών συστατικών τους. Πραγματοποιήθηκε υδατική εκχύλιση 24 ωρών υπό ανάδευση σε ξηρή σκόνη φύλλων αρώνιας και μία διαδοχική της, για την παραλαβή των πολικών ενώσεων. Για τα φύλλα της αρώνιας προέκυψε ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) ίσο με  $14,6 \pm 1,4 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  και αντιριζική ικανότητα (TAC) ίση με  $7,9 \pm 0,8 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση, συγκεντρώσεις που αναλογούν περίπου στο 23% και 15% του περιεχομένου του καρπού αντίστοιχα. Από τις αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης στα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων, βρέθηκαν ότι τα κύρια φαινολικά συστατικά τους είναι τα φαινολικά οξέα και οι φλαβονόλες. Η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων προσδιορίστηκε ίση με  $1,6 \pm 0,17 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$ , ενώ των φλαβονολών ίση με  $2,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση. Έλαβε μέρος ακόμη ακετονική εκχύλιση σταθερής κλίνης ημιδιαλείποντος έργου για την παραλαβή των μη πολικών ενώσεων (φλαβονοειδή) και παρελήφθησαν  $1,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  και  $1,06 \pm 0,03 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{φύλλων}}$  σε ξηρή βάση. Τα φύλλα της αρώνιας επέδειξαν σημαντική υστέρηση σε φαινολικά συστατικά έναντι του καρπού, καθώς οι ανθοκυανίνες, στις οποίες είναι πλούσιος ο καρπός, απουσίαζαν σχεδόν καθολικά.

Συνεχίζοντας με το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του παραπροϊόντος από την χυμοποίηση της αρώνιας (πούλπας). Ξηρή σκόνη πούλπας (ξηρανση υπό αέρα 40°C) εκχυλίστηκε με μεθανόλη οξιμισμένη με 0,5% v/v TFA στην διάταξη της σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου) για 60 λεπτά. Η προσθήκη μέσου οξίνισης επιλέχθηκε για την ενίσχυση της σταθερότητας των ανθοκυανινών. Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) ίσο με  $49 \pm 8 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  και αντιριζική ικανότητα (TAC) ίση με  $59 \pm 7 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση, τιμές που αντιστοιχούν στο 78% και 113% αντίστοιχα του περιεχομένου του καρπού. Με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών, των φαινολικών οξέων και των φλαβονολών της πούλπας ίσες με  $14 \pm 1 \text{ mg}_{CyE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ,  $0,4 \pm 0,1 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  και  $1,1 \pm 0,3 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  σε ξηρή βάση αντίστοιχα, τιμές που αποτελούν το 78%, 10% και 120% του περιεχομένου της πούλπας αντίστοιχα. Οπότε η οξιμισμένη μεθανόλη με TFA ως διαλύτη είχε υψηλή εκλεκτικότητα όσον αφορά τις ανθοκυανίνες και τις φλαβονόλες και χαμηλή εκλεκτικότητα για τα φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες διαπιστώθηκε ότι είναι από τις κυριότερες φαινολικές ενώσεις της πούλπας της αρώνιας (28% του ολικού φαινολικού περιεχομένου). Οι φαινολικές ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης απέδωσαν το 32% του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC). Το εύρημα αυτό κρίνεται αναμενόμενο, διότι δεν ποσοτικοποιήθηκαν με αυτή τη μέθοδο οι προκυανιδίνες της πούλπας

της αρώνιας, που αντιστοιχούν στο 66% των φαινολικών συστατικών της. Επιβεβαιώνεται ότι η πούλπα της αρώνιας αποτελεί πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών.

Στην επόμενη φάση των πειραμάτων διερευνήθηκε η απόδοση σε φαινολικά συστατικά της πούλπας με εκχύλιση με νερό οξινισμένο με κιτρικό οξύ. Το νερό επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος διαλύτης για μεταφορά της διεργασίας σε μεγάλη κλίμακα (φιλικό προς το περιβάλλον, διαθέσιμο και οικονομικό) και το κιτρικό οξύ ως ένα άχρωμο, άοσμο και ασφαλές μέσο οξίνισης με ευρεία χρήση. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σταθερής κλίνης της ξηρής σκόνης πούλπας (ξήρανση υπό αέρα 40°C) για 90 λεπτά με απιονισμένο νερό οξινισμένο με κιτρικό οξύ 0,75% w/v με τελική αναλογία πρώτης ύλης - εκχυλίσματος ίση με 1:25 w/v. Από αναλύσεις προέκυψε ότι οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων στο συνολικό εκχύλισμα σε ξηρή βάση ήταν ίσες με:  $15 \pm 2 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ολικό φαινολικό περιεχόμενο,  $14,3 \pm 0,5 \text{ mg}_{TE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ουσίες με αντιριζική ικανότητα,  $5,33 \pm 0,05 \text{ mg}_{CYE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  ανθοκυανίνες,  $0,8 \pm 0,2 \text{ mg}_{ChAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φαινολικά οξέα και  $0,94 \pm 0,02 \text{ mg}_{QRE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$  φλαβονόλες. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο της εκχύλισης με οξινισμένο νερό αντιστοιχεί στο 31% του φαινολικού περιεχομένου που παραλήφθηκε με την εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη, με σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών (μείωση 62%). Όσον αφορά την υδατική εκχύλιση, η απόδοση ανάκτησης πολυφαινολών και ιδιαίτερα ανθοκυανινών που σημειώθηκε κρίθηκε μη ικανοποιητική σε σχέση με την εκχύλιση με μεθανόλη.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ξήρανσης υπό αέρα στους 40°C με την ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση) στην πούλπα αρώνιας, για να βρεθεί αν η πρώτη επηρεάζει τις βιοδραστικές της ουσίες. Λυοφιλιωμένη πούλπα σε σκόνη εκχυλίστηκε και με τους δύο διαλύτες που έχουν επιλεγεί (οξινισμένη μεθανόλη, οξινισμένο νερό) στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για την μεθανολική εκχύλιση αυξήθηκε κατά 4% (από 49 σε  $51 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ), ενώ για την υδατική εκχύλιση αυξήθηκε κατά 53% (από 15 σε  $23 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ). Η ξήρανση υπό κατάψυξη απέδωσε αύξηση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, ιδιαίτερα στην περίπτωση της υδατικής εκχύλισης, διότι υπήρξε χαμηλότερη καταπόνηση και διαφορετική δομή του υλικού (πιο έντονο χρώμα σκόνης, μεγαλύτερο πορώδες). Η λυοφιλίωση ωστόσο αποτελεί μία υψηλού κόστους και ενεργοβόρα μέθοδο ξήρανσης σε σχέση με την ξήρανση υπό αέρα και οι αυξήσεις στα φαινολικά συστατικά δεν ήταν επαρκείς, ώστε να επιλεγεί. Στα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η ξήρανση υπό αέρα στους 40°C.

Στην συνέχεια επιλέχθηκε η προκατεργασία της πούλπας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ) σε ακραία συνθήκη (παλμοί=1000, ηλεκτρικό πεδίο  $E=3,4-4 \text{ kV/cm}$ ) με κύριο στόχο την αύξηση της απόδοσης της υδατικής αλλά και της μεθανολικής εκχύλισης στην διάταξη της σταθερής κλίνης. Προέκυψαν αυξήσεις στις αποδόσεις του ολικού φαινολικού περιεχομένου: για την μεθανολική εκχύλιση 39% (από 49 σε  $68 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ) και για την υδατική εκχύλιση 12% (15 σε  $17 \text{ mg}_{GAE}/\text{g}_{\text{πούλπας}}$ ). Ήταν αναμενόμενο να αυξηθούν τα φαινολικά συστατικά στα εκχυλίσματα, καθώς με την εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη των ιστών και αναμένεται αποτελεσματικότερη εκχύλιση των περιεχομένων συστατικών. Η προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία αποτέλεσε ικανοποιητική μέθοδο προκατεργασίας, με υψηλότερη παραλαβή φαινολικών ουσιών στην εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη.

Για την αξιοποίηση του μεθανολικού εκχυλίσματος στην βιομηχανία τροφίμων επιλέχθηκε να αντικατασταθεί το μέσο οξίνισης της μεθανόλης, από το τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε κιτρικό

οξύ. Το τριφθοροξικό οξύ (TFA) είναι τοξικό και χρησιμοποιήθηκε καθαρά και μόνο για αναλυτικούς σκοπούς. Η μεθανόλη είναι τοξική για τον οργανισμό, παρόλα αυτά αποτελεί επιτρεπόμενο διαλύτη για εκχυλίσεις υπό την προϋπόθεση την απομάκρυνσή της από τα εκχυλίσιμα, στο επιθυμητό ποσοστό. Η εκχύλιση με μεθανόλη οξινισμένη με 0,75% w/v κιτρικό οξύ επέφερε χαμηλή μείωση (10%) στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (από 49 σε 44  $mg_{GAE}/g_{πούλπας}$ ). Συνεπώς, η αντικατάσταση του TFA από το κιτρικό οξύ ήταν επιτυχής.

Ακόμη εξετάστηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος από το 0,75% στο 1,5% w/v στο οξινισμένο νερό για να βρεθεί η επιρροή του pH του διαλύτη στην εκχυλισσιμότητα των ανθοκυανινών της πούλπας της αρώνιας. Οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν σταθερότητα σε όξινο περιβάλλον. Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του μέσου οξίνισης στην υδατική εκχύλιση σταθερής κλίνης επέφερε μείωση 12% στην απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Επομένως, η μείωση του pH δεν απέδωσε αύξηση στην εκχυλισσιμότητα των φαινολικών συστατικών της πούλπας της αρώνιας.

Τέλος, επιλέχθηκε διαφορετική μέθοδος εκχύλισης και συγκρίθηκε με την εκχύλιση σταθερής κλίνης (ημιδιαλείποντος έργου) με διαλύτες οξινισμένη μεθανόλη 0,5% v/v TFA και οξινισμένο νερό 0,75% w/v κιτρικό οξύ. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υπό ανάδευση (διαλείποντος έργου) για 24 ώρες και για την μεθανολική εκχύλιση βρέθηκε ότι η απόδοση του ολικού φαινολικού περιεχομένου διπλασιάστηκε (49 σε 98  $mg_{GAE}/g_{πούλπας}$ ), ενώ για την υδατική αυξήθηκε μόνο κατά 7% (15 σε 16  $mg_{GAE}/g_{πούλπας}$ ). Διαπιστώθηκε ότι η μεθανολική εκχύλιση διαλείποντος έργου για 24 ώρες απέδωσε υψηλή αύξηση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου για 1 ώρα, ωστόσο το ίδιο δεν συνέβη για την υδατική εκχύλιση. Η αύξηση αυτή δεν επιδόθηκε σε αύξηση των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν αλλά πιθανόν των προκυανιδινών της πούλπας. Η εκχύλιση υπό ανάδευση για 24 ώρες με οξινισμένη μεθανόλη βρέθηκε ότι είναι εξαντλητική και πιθανώς πραγματοποιούνται αλλαγές στην δομή του υλικού και συνεπώς στην εκχυλισσιμότητα των συστατικών της πούλπας της αρώνιας. Ωστόσο, σε σχέση με τις εκχυλίσεις σταθερής κλίνης, και με τους δύο διαλύτες, μειώθηκε το ποσοστό ουσιών με αντιριζική δράση ανά ολικό φαινολικό περιεχόμενο (% w/w TAC/TPC). Παρελήφθησαν περισσότερες φαινολικές ενώσεις με χαμηλότερη αντιριζική δράση. Συνεπώς, η εκχύλιση σταθερής κλίνης για μία ώρα παρουσίασε υψηλότερη εκλεκτικότητα σε ουσίες με αντιριζική δράση.

Σε μελλοντικό χρόνο, για τον εμπλουτισμό των ευρημάτων θα ήταν σκόπιμα:

1. Η εύρεση αποδοτικότερου πράσινου διαλύτη εκχύλισης από το νερό για τα φύλλα αλλά και την πούλπα της αρώνιας, που όμως να ενδείκνυται για τη μεταφορά της διεργασίας σε μεγάλη κλίμακα. Προτείνεται η δοκιμή μίγματος αιθανόλης-νερού, που αποτελεί πράσινο διαλύτη.
2. Η δοκιμή άλλων μεθόδων προεπεξεργασίας της πούλπας σε συνδυασμό με προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ), πχ. η προεπεξεργασία με ένζυμα ή μικροκύματα, για την υψηλότερη αύξηση της απόδοσης των υδατικών εκχυλίσεων της πούλπας αρώνιας.
3. Ο προσδιορισμός των προκυανιδινών της πούλπας της αρώνιας. Η αρώνια είναι γνωστό ότι διαθέτει υψηλό φορτίο σε προκυανιδίνες. Στην παρούσα μελέτη ωστόσο δεν προσδιορίστηκαν, καθώς δεν επετεύχθη η εύρεση/ανάπτυξη κατάλληλου

πρωτοκόλλου για τις δεδομένες εργαστηριακές συνθήκες. Οι αναλύσεις HPLC που πραγματοποιήθηκαν δεν εμφάνιζαν σαφείς κορυφές.

4. Στην πούλπα με προκατεργασία με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ) να γίνουν εκχυλίσεις με οξινισμένη μεθανόλη και οξινισμένο νερό (μέσο οξίνισης κιτρικό οξύ) με την μέθοδο της σταθερής κλίνης. Τα εκχυλίσματα με μεθανόλη οξινισμένη με κιτρικό οξύ μπορούν να αξιοποιηθούν στην βιομηχανία τροφίμων και εμφανίζουν υψηλές αποδόσεις σε φαινολικές ενώσεις. Ακόμη η προκατεργασία ΠΗΠ απέδωσε αύξηση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο της πούλπας για εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη και οξινισμένο νερό.



## 6. Βιβλιογραφία

- Adje, F., Lozano, Y. F., Lozano, P. & Adima, A., 2010. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops Products*, pp. 439-444.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L. & Lorimer, J., 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry.
- Al-Kuraishy, H.M.; Al-Gareeb, A.I.; Negm, W.A.; Alexiou, A.; Batiha, G.E.-S., 2022. Ursolic acid and SARS-CoV-2 infection: A new horizon and perspective. *Inflammopharmacology*, 30, 1493–1501. [CrossRef]
- Ashurst P., 2016. The Stability and Shelf Life of Fruit Juices and Soft Drinks. *The Stability and Shelf Life of Food*, 347–374.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M. M. & Sharif, K., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp. 426-436.
- Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M. & Barroso, C. G., 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, Volume 75, pp. 1332-1337
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M. & Bertelli, D., 2006. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, Volume 69, pp. 164-169.
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1).
- Boonkird, S., Phisalaphong, C. & Phisalaphong, M., 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 15, pp. 1075-1079
- Brzówska M. Malgorzata, Joanna Rogalska, Malgorzata Galazyn-Sidorczuk, Maria Jurczuk, Alicja Roszczenko, Michal Tomczyk, 2015. "Protective effect of *Aronia melanocarpa* polyphenols against cadmium-induced disorders in bone metabolism: A study in a rat model of lifetime human exposure to this heavy metal", *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 229, Issus 5, pp. 132-146, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.031>.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Y.-J. & Khan, M., 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochem*, 18(4), pp. 813-815.
- Cvetanović, A., Zengin, G., Zeković, Z., Švarc-Gajić, J., Ražić, S., Damjanović, A., ... & Mitić, M. 2018. Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 458-466.

Cvetković, D., Stanojević, L., Zvezdanović, J., Savić, S., Ilić, D., & Karabegović, I., 2018. Aronia leaves at the end of harvest season—Promising source of phenolic compounds, macro-and microelements. *Scientia Horticulturae*, 239, 17-25.

Da Porto, C. & Decorti, D., 2009. [50] D Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavour compounds from spearmint (carvone-rich) plants: comparison with conventional hydrodistillation. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 16, pp. 795-799.

Daoutidou, M.; Plessas, S.; Alexopoulos, A.; Mantzourani, I. Assessment of antimicrobial activity of pomegranate, cranberry, and black chokeberry extracts against foodborne pathogens. *Foods* 2021, 10, 486. [CrossRef] [PubMed]

Daskalova, E., Delchev, S., Peeva, Y., Vladimirova-Kitova, L., Kratchanova, M., Kratchanov, C., Denev, P. 2015. Antiatherogenic and cardioprotective effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice in aging rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 717439.

Deighton, N., Brennan, R., Finn, C. & Davies, H. V., 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), pp. 1307-1313.

Denev N. Petko ,Christo G. Kratchanov,Milan Ciz,Antonin Lojek,Maria G. Kratchanova 2012. "Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: in vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review", *Comprehenshve REVIEWS in Food Science and Food Safety*, Vol. 11, Issue 5, pp. 471-489

Denev, P.; Číž, M.; Kratchanova, M.; Blazheva, D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem.* 2019, 284, 108–117. [CrossRef] [PubMed]

Dey, P. M. & Harborne, J. B., 1997. Phenolic Metabolism. In: S. D., ed. *Plant Chemistry*. London: Academic Press, pp. 387-417.

Do Thi, N., & Hwang, E. S. 2014. Bioactive compound contents and antioxidant activity in aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Preventive nutrition and food science*, 19(3), 204.

Ekici, L., Simsek, Z., Ozturk, I. et al. 2014. Effects of Temperature, Time, and pH on the Stability of Anthocyanin Extracts: Prediction of Total Anthocyanin Content Using Nonlinear Models. *Food Anal. Methods* 7, 1328–1336

Galanakis, C. M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and comme

Gao, N.; Wang, Y.; Jiao, X.; Chou, S.; Li, E.; Li, B. Preparative purification of polyphenols from *Aronia melanocarpa* (chokeberry) with cellular antioxidant and antiproliferative activity. *Molecules* 2018, 23, 139. [CrossRef] [PubMed]

Gil-Chávez, J. G. et al., 2013. Gil-Chávez, J.G., Villa, J., Ayala-Zavala, F., Heredia, B., Sepulveda, D., Yahia, E.M. & GoTechnologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), pp. 5-23.

Häkkinen, S. H. & Törrönen, A. R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33(6), pp. 517-524.

Harguindeguy, M., & Fissore, D. 2019. On the effects of freeze-drying processes on the nutritional properties of foodstuff: A review. *Drying Technology*, 1–23.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), pp. 572-584.

Jakobek L., Šeruga M., Medvidović-Kosanović M., Novak I. 2007. Antioxidant activity and polyphenols of *Aronia* in comparison to other berry species. *Agric. Consp. Sci.* 72:301–306.

Jakobek Lidija, Marijan Šeruga, Martina Medvidović-Kosanović, Ivana Novak 2007. "Antioxidant Activity and Polyphenols of *Aronia* in Comparison to other Berry Species", *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 72 No. 4, pp. 301-306, 2007.

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidovic-Kosanovic, M., Novak, I. 2007. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensm. -Rundsch.*, 103, 58–64.

Javanaud, C., Gladwell, N. R. & Gouldby, S. J., 1991. Experimental and theoretical values of the ultrasonic properties of dispersions: effect of particle state and size distribution. *Ultrasonics*, Volume 29, pp. 331-337.

Jerman, T., Trebse, P. & Vodopivec, B. M., 2010. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, Volume 123, pp. 175-182.

Jurendić, T.; Šćetar, M. ,2021. *Aronia melanocarpa* products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants*, 10, 1052. [CrossRef] [PubMed]

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I. & Heino, M., 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), pp. 4076- 4082.

Kaloudi, T., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2022). *Aronia Melanocarpa*: Identification and Exploitation of Its Phenolic Components. *Molecules*, 27(14), 4375.

Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A. & Prior, . R. L., 1999. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), pp. 4638-4644.

Kanner, J. et al., 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), pp. 64-69.

Kapci, B., Neradová, E., Cížková, H., Voldrich, M., Rajchl, A., Capanoglu, E. 2013. Investigating the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *J. Food Nutr. Res.*, 52, 219–229.

Kasprzak-Drozd, K.; Oniszczuk, T.; Soja, J.; Gancarz, M.; Wojtunik-Kulesza, K.; Markut-Miotla, E.; Oniszczuk, A. 2021. The efficacy of black chokeberry fruits against cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6541. [CrossRef] [PubMed]

- Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., and Luczkiewicz M., 2009. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J Med Food*.
- Kraemer-Schafhalter, A., Fuchs, H. & Pfannhauser, W., 1998. Solid-phase extraction (SPE) - a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), pp. 435-440.
- Kulling E.S., Rawel M.H., 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica*, 74(13): 1625-1634
- Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* 53 (4), 771–782.
- Letellier , M. & Budzinski, H., 1999. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), pp. 259-270.
- Li, H., Pordesimo , L. & Weiss, J., 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research*, Volume 37, pp. 731-738.
- Li, J.; Benatrehina, P.A.; Rague, A.L.; Pan, L.; Kinghorn, A.D.; Naman, C.B. 2018. Isolation and analysis of antioxidant phytochemicals from black chokeberry, maqui, and goji berry dietary supplements. In *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, WA, USA, Volume 1286, pp. 3–19.
- Li, J.; Deng, Y.; Yuan, C.; Pan, L.; Chai, H.; Keller, W.J.; Kinghorn, A.D. Antioxidant and quinone reductase-inducing constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 11551–11559. [CrossRef] [PubMed]
- Li, M. S., 2014. Optimazation of Ultrasonic Extraction Technology of anthocyanins from *Aronia melanocarpa*. *China Bre*, 33(9), pp. 129-133.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., 2009. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 90 (1), 60–66
- Mason, T. J. & Cordmas, E. D., 1996. Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations – A review. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers*, Volume 74, pp. 511-516.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E. & Finn, C. E., 2002. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50(3), pp. 519-525.
- Mustafa, A. & Turner, C., 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review.. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), pp. 8- 18.
- Nowak, D.; Grabczewska, Z.; Gośliński, M.; Obońska, K.; Dabrowska, A.; Kubica, J. Effect of chokeberry juice consumption on antioxidant capacity, lipids profile and endothelial function in healthy people: A pilot study. *Czech J. Food Sci.* 2016, 34, 39–46. [CrossRef]
- Ochmian I., Grajkowski J., Smolik M. (2012) Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, 40, 253–260.

Ochmian I., Oszmiański J., Skupień K. 2009. Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 83:64–69.

Oszmiański, J., & Wojdyło, A. 2005. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221(6), 809-813.

Oszmianski, J., Lachowicz, S. 2016. Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, 21, 1098.

Palma, M. & Barroso, C., 2002. Application of a new analytical method to determine the susceptibility of wine to browning. *European Food Research and Technology*, 214(5), pp. 441-443.

Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S. & Mason, T. J., 2009. [155] Paniwnyk, L., Cai, H., AlbuThe enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 16, pp. 287-292.

Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A. & Diamantidis, G., 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), pp. 777-783.

Peralbo-Molina, Á., Priego-Capote, F. & Dolores Luque De Castro, M., 2012. Comparison of extraction methods for exploitation of grape skin residues from ethanol distillation. *Talanta*, Volume 101, pp. 292-298.

Petković, M., Đurović, I., Miletić, N., & Radovanović, J. 2019. Effect of Convective Drying Method of Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on Drying Kinetics, Bioactive Components and Sensory Characteristics of Bread with Chokeberry Powder.

Platonova, E. Y., Shaposhnikov, M. V., Lee, H. Y., Lee, J. H., Min, K. J., & Moskalev, A. 2021. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts in terms of geroprotector criteria. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 570-584.

Prior, R. L. et al., 1998. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), pp. 2686-2693.

Prior, R. L. et al., 1998. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), pp. 2686-2693.

Proteggente, A. R. et al., 2002. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radical Research*, 36(2), pp. 217-233.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* 30 (1), 37–44.

Roda-Serrat, M. C., Andrade, T. A., Rindom, J., Lund, P. B., Norddahl, B., & Errico, M. 2020. Optimization of the Recovery of Anthocyanins from Chokeberry Juice Pomace by Homogenization in Acidified Water. *Waste and Biomass Valorization*.

Rop O., Mlcek J., Jurikova T., Valsikova M., Sochor J., Reznicek V., Kramarova D. 2010. Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (michx.) elliot) cultivars. *J. Med. Plants Res.* 22:2432–2437.

Rover, M. R., & Brown, R. C. 2013. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371.

Rugina, D.; Sconta, Z.; Leopold, L.; Pintea, A.; Bunea, A.; Socaciu, C. Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *J. Med. Food* 2012, 15, 700–706. [CrossRef] [PubMed]

Šamec, D. & Piljac-Žegarac, J., 2011. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures— Comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, Volume 131, pp. 15-21.

Šamec, D. & Piljac-Žegarac, J., 2011. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures— Comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, Volume 131, pp. 15-21.

Shahidi, F. & Wanasundara, J. P., 1992. Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1(32), pp. 67-103.

Siahpoush A., Ghasemi N., Ardakani M.S., Asghari G. 2011. Production of chlorogenic acid in *Varthemia persica* DC (var. *persica*) callus cultures. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 6(1):63-69. PMID: 22049279; PMCID: PMC3203274.

Siddiq, M., Dolan, K. D., Perkins-Veazie, P., & Collins, J. K. 2018. Effect of pectinolytic and cellulolytic enzymes on the physical, chemical, and antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice. *LWT*, 92, 127–132.

Sidor, A.; Drozd'zyńska, A.; Gramza-Michalowska, A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors—an overview. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, 89, 45–60. [CrossRef]

Sidor, A.; Gramza-Michalowska, A. Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L.—A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential. *Molecules* 2019, 24, 3710. [CrossRef] [PubMed]

Slimestad, R., Torskangerpoll, K., Nateland, H.S., Johannessen, T., Giske, N.H. 2005. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Compos. Anal.*, 18, 61–68.

Staszowska-Karkut, M., & Materska, M. 2020. Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* L.), raspberry (*Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients*, 12(2), 463.

Stojković, L.; Jovanović, I.; Živković, M.; Zec, M.; Djurić, T.; Zivotić, I.; Kuveljić, J.; Kolaković, A.; Kolić, I.; Djordjević, A.; et al. The effects of *Aronia melanocarpa* juice consumption on the mRNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells in subjects at cardiovascular risk. *Nutrients* 2020, 12, 1484. [CrossRef]

Stojković, L.; Zec, M.; Živković, M.; Bundalo, M.; Bošković, M.; Glibetić, M.; Stanković, A. Polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* juice consumption affects LINE-1 DNA methylation in

peripheral blood leukocytes in dyslipidemic women. *Front. Nutr.* 2021, 8, 689055. [CrossRef] [PubMed]

Sun, Z.-M.; Zhou, X.; Zhang, J.-L.; Li, T. Research progress of anthocyanin antioxidant function in *Aronia melanocarpa*. *Food Res. Dev.* 2017, 38, 220–224.

Szopa A., Kokotkiewicz A., Kubica P., Banaszczak P., Wojtanowska-Krośniak A., Krośniak M., Ekiert, H. 2017. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. xprunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1645–1657.

USDA National Nutrient database, 2017

Vagiri, M. & Jensen, M. 2017. Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food Chemistry*, 217, 409–417.

Vidović S, Ramić M, Ambrus R, Vladić J, Szabó-Révész P, Gavarić A. 2019. *Aronia* Berry Processing by Spray Drying: From Byproduct to High Quality Functional Powder. *Food Technol Biotechnol.* 57(4):513-524.

Wang, H., Cao, G. & Prior, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), pp. 701-705

Wang, J. et al., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), pp. 804-810.

Wang, S. Y. & Jiao, H., 2000. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), p. 5677–5684.

Wang, S. Y. & Stretch, A. W., 2001. Antioxidant Capacity in Cranberry Is Influenced by Cultivar and Storage Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), pp. 969-974.

Wu X., Gu L., Prior RL., McKay S. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 52(26):7846-56.

Yang, S.-Q.; Wang, D.; Gao, Y.-X. Advances in studies on the function and application of *Aronia melanocarpa*. *Food Res. Dev.* 2021, 42, 206–213.

Zhang, Z. S. et al., 2008. Ultrasound-assisted Extraction of Oil from Flaxseed. *Sep. Purif. Technol.*, 62(1), pp. 192-198.

Zheng, W. & Wang, S. W., 2003. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), p. 502–509.

Zheng, W. & Wang, S. W., 2003. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), p. 502–509.

Zheng, W. & Wang, S. W., 2003. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), p. 502–509.

Zielinska, A., Bryk, D., & Paradowska, K. 2020. Aronia melanocarpa leaves as a source of chlorogenic acids, anthocyanins, and sorbitol, and their anti-inflammatory activity. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 70(4).

Zlotorzynski, A., 1995. The Application of Microwave Radiation to Analytical and Environmental Chemistry. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 25(1), pp. 43-76.

Δημόπουλος Γ., Κατσιμίχας Α., Ταούκης Π., 2020. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ.

Μπάρδας Γ., (2012), Goji berry – Γενικά καλλιεργητικά στοιχεία - Αντιμετώπιση εδαφογενών φυτοπαθογόνων – Τακτικές φυτοπροστασίας για φυτωριούχους και παραγωγούς.

Νάνος Γ., (2014), Διδακτικές σημειώσεις για το μάθημα Ειδική Δενδροκομία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Σπανός Ι., (2011), Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά – Αρώνια, Πεμπτουσία, 18 Οκτωβρίου, διαθέσιμο στο: <http://www.pemptousia.gr/2012/10/aromatikafarmakeftika-fita-aronia/>, ημερομηνία ανάκτησης 17/2/2016

Σπανός Ι. (2012), “Η καλλιέργεια της αρώνιας: Ένα φυτό με... χίλιες χρήσεις», Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός “Δήμητρα”, Γενικής Διεύθυνση Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών, 2012.

Τσιμογιάννης Δ. (2008), Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: Αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων, Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.



## 7. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAE	Ascorbic Acid Equivalents
CA	Citric Acid
CE	Catechin Equivalents
CGE	Cyanidin-galactoside Equivalents
ChAE	Chlorogenic Acid Equivalents
CyE	Cyanidin Equivalents
DE	Dextrose equivalent
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DW	Dry weight
FW	Fresh weight
GA	Gum Arabic
GAE	Gallic Acid Equivalents
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IE	Isorhamnetin Equivalents
KE	Kaempferol Equivalents
MeCN	Ακετονιτρίλιο
MeOH	Methanol
MD	Maltodextrin
ME	Myricetin Equivalents
ND	Not detected
PCB2E	Procyanidin B2 Equivalents
PE	Pelargonidin Equivalents
QE	Quercetin Equivalents
QGalE	Quercetin-galactoside Equivalents
QRE	Quercetin Rutinoside Equivalents
TAC	Total Antiradical Capacity
TAnth	Total Anthocyanins
TE	Trolox Equivalents
TF	Total Flavonols
TFA	Trifluoroacetic acid

TPA Total Phenolic Acids

TPC Total Phenolic Content

TR Traces