



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**  
**SCHOOL OF FOOD SCIENCES**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από παραπροϊόντα κρόκου με χρήση πειραματικού σχεδιασμού και υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας»



**Λυκούδη Ελένη**  
**Χατζηκωνσταντίνου Μαρία**

Επιβλέπουσα: Στρατή Ειρήνη

Αθήνα, 2023

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή  
Αθήνα, 2023

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1 Όνομα Επιβλέπουσας

Στρατή Ειρήνη  
Επίκουρη Καθηγήτρια  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας  
Τροφίμων, ΠΑΔΑ

2 Όνομα μέλους επιτροπής

Τσιάκα Θάλεια  
Μεταδιδακτορική ερευνήτρια  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας  
Τροφίμων, ΠΑΔΑ

3 Όνομα μέλους επιτροπής

Μπάρτζης Βασίλειος  
Επίκουρος Καθηγητής  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας  
Τροφίμων, ΠΑΔΑ

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας όπως κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαστε οι αποκλειστικοί συγγραφείς όπως παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όπως οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή όπως περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνουμε, όπως, ότι αναλαμβάνουμε όπως συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Λυκούδη Ελένη



Χατζηκωνσταντίνου Μαρία



## Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας, στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Στρατή Ειρήνη, τόσο για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, και τις γνώσεις που μας παρείχε κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Επιπλέον, ευχαριστούμε θερμά την υποψήφια διδάκτορα κα. Τσιάκα Θάλεια για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά και καθοδήγησή της κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αργότερα. Τέλος, δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες και τους φίλους μας για την στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδαστικών μας χρόνων.

Ελίνα-Μαρία

Οκτώβριος 2023

## Περίληψη

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής αφορά την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, της αντιριζικής και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων παραπροϊόντων κρόκου Κοζάνης με στόχο την αξιοποίηση των φαινολικών ενώσεων στην βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικοί παράγοντες. Αναφέρθηκαν σημαντικές πληροφορίες για το φυτό *Crocus sativus L.* που αφορούν την καλλιέργεια και την συγκομιδή του καθώς και την χρησιμότητα του στην διατροφή αλλά και στην λαϊκή ιατρική, η οποία ώθησε τους επιστήμονες στην έρευνα των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν εν συντομία οι μέθοδοι εκχύλισεων φαινολικών ενώσεων αιτιολογώντας την επιλογή της πράσινης τεχνικής της εκχύλισης με σύστημα υπερήχων (Ultrasound assisted extraction, UAE) στο συγκεκριμένο πείραμα. Αναφορικά με το πειραματικό κομμάτι πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διαδικασίας και για τους ακόλουθους παράγοντες: (α) περιεκτικότητα σε αιθανόλη (%) σε μείγμα διαλύτη νερού/αιθανόλης, β) χρόνος εκχύλισης (λεπτά), γ) ισχύς υπερήχων (%) και δ) αναλογία διαλύτη/υλικού (ml/g), με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Η μεταβλητή απόκρισης ήταν η περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC), όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό, έδωσαν αποτελέσματα TPC 90,2-799,2 mg GAE/100g ξηρού δείγματος. Επιπλέον εφαρμόστηκε η δοκιμασία της αναγωγικής - αντιοξειδωτικής ισχύος σιδήρου (FRAP) για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων, όπου και δόθηκε εύρος τιμών 14,6-119,5 mg Fe<sup>+2</sup>/g ξηρού δείγματος στις βέλτιστες συνθήκες, καθώς και η δοκιμασία ενεργότητας απορρόφησης σε 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) για την εκτίμηση της αντιριζικής δράσης η οποία προσδιορίστηκε σε εύρος τιμών 3,5-18,0 mg TE/g ξηρού δείγματος στις βέλτιστες συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των παραπροϊόντων.

**Λέξεις Κλειδιά:** παραπροϊόντα *Crocus sativus*, εκχύλιση με υπερήχους, φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιριζική ικανότητα, LC-MS/MS

## Abstract

The subject of this project focuses on the evaluation of the total phenolic content, the anti-radical and antioxidant activity of extracts of saffron by-products in order to utilize the phenolic compounds in the food industry as enhancing agents. Initially, important information about the plant *Crocus sativus L.* regarding its cultivation and harvesting as well as its use in nutrition and in folk medicine, which has prompted scientists to research its medicinal properties, were mentioned. Then, the methods of phenolic compound extraction were briefly developed justifying the choice of the green technique of ultrasound assisted extraction (UAE) to be used in this experiment. Regarding the experimental part, process optimization was carried out for the following factors: (a) ethanol content (%) in water/ethanol solvent mixture, (b) extraction time (min), (c) ultrasonic power (%) and (d) solvent/solvent ratio (ml/g), with the help of Box- Behnken experimental design. The response variable was the total phenolic content (TPC) as determined by the Folin-Ciocalteu method. The optimized conditions, according to the experimental design presented TPC results of 90,2-799,2 mg GAE/100g dry sample. In addition, the iron reduction antioxidant power test (FRAP) was performed in order to evaluate the antioxidant capacity which was estimated at 14.6-119.5 mg Fe<sup>2+</sup>/g dry sample at the optimum conditions, as well as the absorbance activity assay in 2'-Azino-bis -(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) for the estimation of antioxidant activity which was estimated at 3.5-18.0 mg TE/g dry sample at the optimum conditions. Finally, liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique was performed so as to identify characteristic phenolic compounds in the by-product extracts.

**Keywords:** *Crocus sativus* by-products, Ultrasound Assisted Extraction, phenolic content, antioxidant capacity, anti-radical capacity, LC-MS/MS

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη .....	5
Abstract.....	6
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ .....</b>	<b>10</b>
Εισαγωγή .....	11
1.1. Το φυτό <i>Crocus sativus</i> L. ....	12
1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	12
1.1.2. Ιστορική Αναδρομή.....	12
1.1.3. Μορφολογία.....	13
1.1.4. Καλλιέργεια .....	14
1.1.5. Συγκομιδή, Επεξεργασία και Αποθήκευση .....	15
1.1.6. Χημική Σύσταση Κρόκου .....	16
1.1.7. Φαρμακευτικές Ιδιότητες .....	19
1.1.8. Οικονομικά Στοιχεία.....	20
1.1.9. Νοθεία.....	20
1.1.10. Παραπροϊόντα Κρόκου Κοζάνης.....	21
1.1.11. Χρήσεις παραπροϊόντων του <i>Crocus sativus</i> .....	22
1.2. Φαινολικές Ενώσεις .....	24
1.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά .....	24
1.2.2. Φαινολικές ενώσεις του φυτού <i>Crocus Sativus</i> .....	25
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ .....</b>	<b>28</b>
2.1. Μέθοδοι Εκχύλισης.....	29
2.2. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.....	29
2.2.1. Εκχύλιση Soxhlet .....	29
2.2.2. Διαβροχή ή εκχύλιση με διαλύτη (Maceration).....	30
2.3. Εκχυλίσεις υψηλών ενεργειών .....	31
2.3.1. Εκχύλιση με υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction .....	31
2.3.2. Εκχύλιση με μικροκύματα – Microwave Assisted Extraction.....	34
<b>Σκοπός Εργασίας.....</b>	<b>36</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>37</b>
3.1. Διάγραμμα Πειραματικής Πορείας .....	38
3.2. Αντιδραστήρια και Όργανα .....	38
3.2.1. Αντιδραστήρια και Πρότυπα Διαλύματα .....	38
3.2.2. Εξοπλισμός .....	39
3.3. Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης – Μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken .....	39
3.4. Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τα παραπροϊόντα <i>Crocus sativus</i> μετην χρήση υπερήχων (Ultrasound - assisted Extraction, UAE).....	43

<b>3.5.</b>	Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις.....	<b>44</b>
<b>3.5.1.</b>	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδοFolin – Ciocalteu (Total Phenolic Content, TPC).....	<b>44</b>
<b>3.5.2.</b>	Προσδιορισμός ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερήςελεύθερης ρίζας ABTS●+ [2,2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6- Sulfonic acid)].....	<b>46</b>
<b>3.5.3.</b>	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας/ αναγωγικής ισχύος έναντι του τρισθενούς σιδήρου – Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing/ Antioxidant Power) .....	<b>47</b>
<b>3.6.</b>	Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με μέθοδο υγρήχρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS).....	<b>48</b>
<b>3.7.</b>	Στατιστική Ανάλυση.....	<b>51</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>		<b>53</b>
<b>4.1.</b>	Βελτιστοποίηση Εκχύλισης με Υπερήχους – Πειραματικός Σχεδιασμός.....	<b>54</b>
<b>4.2.</b>	Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις που αφορούν το Ολικό ΦαινολικόΠεριεχόμενο (TPC, δοκιμή Folin-Ciocalteu), την αντιριζική δράση (δοκιμή) ABTS●+) και την αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμή FRAP) ..	<b>61</b>
<b>4.3.</b>	Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων με LC-MS/MS επιλεγμένωνεκχυλισμάτων παραπροϊόντων Crocus sativus L.....	<b>66</b>
<b>4.4.</b>	Συμπεράσματα .....	<b>69</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>		<b>72</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

<b>Εικόνα 1:</b> (Srivastava et al., 2010) Ποσοτική ανάλυση του σαφράν	<b>13</b>
<b>Εικόνα 2:</b> (Mzabri et al., 2019b)Χημική δομή βασικών συστατικών του φυτού Crocus sativus	<b>18</b>
<b>Εικόνα 3:</b> (Lahmass et al., 2018b) Αναπαράσταση των μερών του φυτού Crocus sativus L.	<b>22</b>
<b>Εικόνα 4:</b> (Soto et al., 2015) Κατηγοριοποίηση Φαινολικών Ενώσεων	<b>25</b>
<b>Εικόνα 5:</b> (Khongthaw et al., 2023b) Σχηματικό διάγραμμα της συσκευής εκχύλισης Soxhlet	<b>29</b>
<b>Εικόνα 6:</b> Αισθητήρας Υπερήχων	<b>32</b>
<b>Εικόνα 7:</b> (Panzella et al., 2020) Σχηματική αναπαράσταση του εξοπλισμού από την τεχνική UAE σε λουτρό υπερήχων	<b>33</b>
<b>Εικόνα 8:</b> (Huang et al., 2011)Σχηματική αναπαράσταση εξοπλισμού τεχνικής MAE	<b>35</b>
<b>Εικόνα 9:</b> (Ferreira et al., 2007) Γραφική αναπαράσταση μορφών σχεδίου Box-Behnken	<b>41</b>
<b>Εικόνα 10:</b> Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e–	<b>44</b>
<b>Εικόνα 11:</b> (Munteanu & Aretrei, 2021b)Διακύμανση χρώματος στη δοκιμασία ABTS (α). Σχέδιο αντίδρασης που εμπλέκεται το [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] για δοκιμασία δραστηκότητας δέσμευσης κατιόντων ριζών οξέος (ABTS)	<b>46</b>
<b>Εικόνα 12:</b> Αντίδραση δοκιμής FRAP	<b>47</b>



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

<b>Πίνακας 1:</b> Ποσοτική ανάλυση του σαφράν	19
<b>Πίνακας 2:</b> (Srivastava et al., 2010) Χημική σύσταση του Σαφράν	19
<b>Πίνακας 3:</b> (Mykhailenko κ.ά., 2019) Φαινολικές ενώσεις του φυτού <i>Crocus sativus</i>	26
<b>Πίνακας 4:</b> Πειραματικές τιμές συνθηκών εκχύλισης σύμφωνα με σχεδιασμό Box-Behnken.	42
<b>Πίνακας 5:</b> Ογκος (μL) δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της μεθόδου F-C	45
<b>Πίνακας 6:</b> Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης φαινολικών ουσιών με την χρήση συστήματος LC-MS/MS	50
<b>Πίνακας 7:</b> (Kritsi κ.ά., 2023) Συνθήκες για ESA και IDA πειράματα	51
<b>Πίνακας 8:</b> Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων <i>Crocus sativus</i>	54
<b>Πίνακας 9:</b> Σύνοψη Μοντέλου (Model Summary) πειραματικού σχεδιασμού με βάση το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων	55
<b>Πίνακας 10:</b> Πιθανοί συνδυασμοί βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης φαινολικών όπως προέκυψαν από τον Πειραματικό σχεδιασμό	60
<b>Πίνακας 11:</b> Πίνακας αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μετρήσεων	62
<b>Πίνακας 12:</b> Σχετικές εντάσεις ( $10^6$ ) της θραυσματοποίησης των ενώσεων στα φάσματα των εκχυλισμάτων	67

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

<b>Γράφημα 1:</b> Ραβδόγραμμα Pareto για εκχύλιση φαινολικών ουσιών	55
<b>Γράφημα 2:</b> Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των 4 παραγόντων στην ποσότητα των εκχυλιζόμενων φαινολικών ουσιών	56
<b>Γράφημα 3:</b> Γραφική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των παραγόντων στην ποσότητα των εκχυλιζόμενων φαινολικών ουσιών	57
<b>Γράφημα 4:</b> Contour plot - αναλογία περιεκτικότητας αιθανόλης και χρόνου εκχύλισης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	58
<b>Γράφημα 5:</b> Contour plot - ισχύς υπερήχων και χρόνου εκχύλισης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	59
<b>Γράφημα 6:</b> Contour plot - αναλογία διαλύτη/ υλικού και περιεκτικότητας αιθανόλης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	59
<b>Γράφημα 7:</b> Συνολική παρουσία φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα τα οποία εκχυλίστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες	67
<b>Γράφημα 8:</b> Συνολική παρουσία φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα τα οποία εκχυλίστηκαν στις συνθήκες που έδωσαν το μικρότερο TPC	68

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ**

## Εισαγωγή

Ο κρόκος (*Crocus sativus* L.) συνιστά ένα από τα πιο ακριβά μπαχαρικά και είναι μια πολυετής καλλιέργεια. Κατά τη διάρκεια της παραγωγής πραγματοποιούνται πολυάριθμες αναλυτικές τεχνικές για τη διασφάλιση της ποιότητας και την ελαχιστοποίηση της νοθείας του κρόκου. Γενικά, απαιτούνται περίπου 80 κιλά από άνθη *C. Sativus* για να παραχθεί 1 κιλό αποξηραμένου κρόκου (Abu-Izneid et al., 2022a), ενώ η αγορά του σαφράν αναμένεται να αυξηθεί κατά 12,09% την προβλεπόμενη περίοδο 2020-2027. Τα κύρια συστατικά του κρόκου είναι η κροκίνη, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα, αντίστοιχα (Kothari et al., 2021a).

Τα φαρμακευτικά οφέλη που παρουσιάζει το σαφράν συνδέονται με βιοενεργά φυτο-συστατικά που βρίσκονται σε διάφορα μέρη του *C. Sativus* σε διάφορες συγκεντρώσεις και ιδιαίτερα στα στίγματα του. Οι βιοδραστικές ενώσεις όπως τα καροτενοειδή, τα τερπένια και τα флаβονοειδή είναι οι κύριες ενώσεις που αναφέρονται στις ποικιλίες σαφράν. Πέρα από τις γνωστές χρήσεις του κρόκου, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ανθικά υποπροϊόντα του, κυρίως τα τέπαλα, είναι πλούσια σε πολύτιμα βιοδραστικά μόρια, όπως флаβονόλες, флаβονοειδή γλυκοσίδες και ανθοκυανίνες, τα οποία έχουν αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Συνεπώς, η αξιοποίηση των παραπροϊόντων μέσω της ανάπτυξης καινοτόμων λειτουργικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών θα συντελέσει στην ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και στη δυναμική αύξηση της ζήτησης κρόκου στην αγορά. Βιοδραστικές ενώσεις από παραπροϊόντα του κρόκου εξάγονται χρησιμοποιώντας ποικίλες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, όπως αυτή της διαβροχής και της εκχύλισης Soxhlet. Ωστόσο, η ανάγκη μείωσης της χρήσης τοξικών διαλυτών με χρήση τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον έχει παρακινήσει την ανάπτυξη νέων μεθόδων εκχύλισης που μπορούν να μεταφερθούν σε βιομηχανική κλίμακα. Υπό το πρίσμα αυτό, οι νέες τεχνικές με χρήση υπερήχων παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνολογίες καθώς, χρειάζεται μικρότερος χρόνος εκχύλισης και ταυτόχρονα ταχεία αύξηση θερμοκρασίας με υψηλότερη απόδοση. Τέλος, εμφανίζουν χαμηλότερη κατανάλωση και κόστος ενέργειας (Abu-Izneid et al., 2022a; Cerdá-Bernad et al., 2022).

## 1.1. Το φυτό *Crocus sativus* L.

### 1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο *Crocus sativus* L., είναι ένα ποώδες, πολυετές φυτό της οικογένειας *Iridaceae* που ανήκει στην κατηγορία των αγγειόσπερμων (Kothari κ.ά., 2021). Το γένος του *Crocus* διαθέτει περίπου 80 διαφορετικά είδη φυτών (Dai κ.ά., 2021). Τα αποξηραμένα στίγματα του δίνουν το κοινώς γνωστό μπαχαρικό σαφράν (saffron), γνωστό στην Ελλάδα ως ελληνικό σαφράν ή κρόκος Κοζάνης ΠΟΠ, ονομασία που του αποδίδεται εξαιτίας της πόλης στην οποία παράγεται, μεταποιείται και παρασκευάζεται. Είναι ένα φυτό τριπλοειδές ( $n = 24$ ,  $x = 8$  χρωμοσώματα) (Kothari κ.ά., 2021), και στείρο, συνεπώς η ανθρώπινη παρέμβαση καθίσταται αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό του (El Midaoui κ.ά., 2022). Για το υψηλό τελικό κόστος ευθύνεται η περιορισμένη καλλιέργεια του, εφόσον απαιτεί την ανθρώπινη παρέμβαση για τον πολλαπλασιασμό του μόνο συγκεκριμένους μήνες τον χρόνο, οι πρακτικές συγκομιδής οι οποίες απαιτούν επαρκές ανθρώπινο δυναμικό, κατάλληλα εκπαιδευμένο για την χειρωνακτική συλλογή και διαλογή του φυτού, και τελικά τη μικρή απόδοση τελικού προϊόντος συγκριτικά με την αρχική μάζα του φυτού (Dai κ.ά., 2021; El Midaoui κ.ά., 2022). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως για την παραγωγή 1kg ξηρού σαφράν απαιτούνται 150.000-250.000 λουλούδια περίπου δηλαδή 80kg φυτού (Gracia κ.ά., 2009; Husaini κ.ά., χ.χ.).

Ως πρώτη χώρα παραγωγής αναφέρεται το Ιράν με ετήσια παραγωγή 430 τόνων το 2019 (Saffron, 2020), ποσότητα περίπου ίση με το 90% της παγκόσμιας παραγωγής (Kothari κ.ά., 2021), ενώ ακολουθούν χώρες όπως η Ινδία, το Μαρόκο, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Γαλλία, η Ελβετία και το Πακιστάν (Abu-Izneid κ.ά., 2022). Χρησιμοποιείται για σκοπούς μαγειρικής ως καρύκευμα, ως χρωστική ουσία, αλλά και στην παραδοσιακή ιατρική ανά τους αιώνες και συνεπώς λαμβάνει ιδιαίτερη προσοχή από φαρμακευτικές βιομηχανίες, βιομηχανίες καλλυντικών, αρωματοποιίας και κλωστοϋφαντουργίας για την παραγωγή προϊόντων με ενισχυμένη δράση (Gohari κ.ά., 2013).

### 1.1.2. Ιστορική Αναδρομή

Η ονομασία πιθανολογείται ότι προέρχεται από την αραβική λέξη “za’faran” που σημαίνει κίτρινο, ή από την περσική λέξη “sahafaran” που σημαίνει κίτρινα λουλούδια (Dai κ.ά., 2021; Ramadan κ.ά., 2012). Αρχαίες ακόμα αναφορές εντοπίζονται σε κείμενα Ελλήνων συγγραφέων

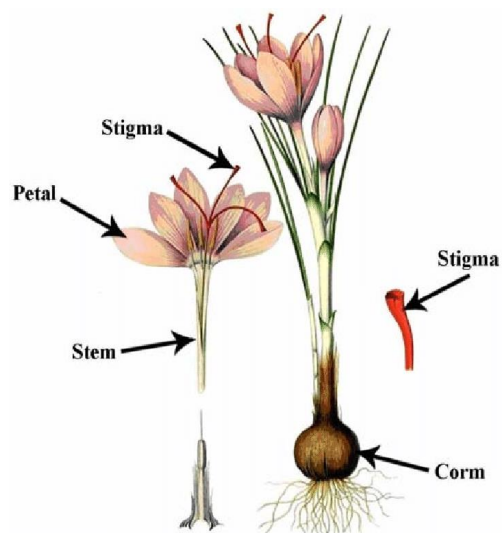
όπως ο Όμηρος, ο Σολωμός, ο Πίνδαρος, ο Ησίοδος, ο Αισχύλος και ο Ιπποκράτης, και Ρωμαίων όπως ο Πλίνος, ο Λάργος και ο Κέλσος, οι οποίοι τεκμηριώνουν την χρήση του ως βαφή και την αξιοποίησή του για την παρασκευή αρωμάτων και τροφίμων (Abdusamat κ.ά., 2021; Mzabri κ.ά., 2019). Οι πρώτες ενδείξεις για την καλλιέργεια του κρόκου παρουσιάζονται βέβαια πολύ αργότερα και μάλιστα το 1550 π.Χ. στον Μινωϊκό Πολιτισμό, όπως εμφανίζεται στον Πάπυρο Έμπερς, με περιγραφή των τοιχογραφιών του παλατιού τις Κνωσού, στις οποίες απεικονίζονταν νεαρά κορίτσια να μαζεύουν άνθη κρόκου σε καλάθια (Ebers, 1873).

Ο τόπος προέλευσης του *Crocus sativus* L. δεν έχει επιβεβαιωθεί, με δύο εκδοχές να επικρατούν. Η πρώτη βασίζεται στον Vavilon το 1951 (Mzabri κ.ά., 2019), που υποστηρίζει ότι η πρώτη καλλιέργεια έγινε στην Μέση Ανατολή και μεταφέρθηκε στην Ευρώπη τον 13<sup>ο</sup> αιώνα, ενώ η δεύτερη ότι προήλθε από την Κεντρική Ασία ή τα νησιά της νοτιοδυτικής Ελλάδας και εξαπλώθηκε στην Ινδία, την Κίνα και τις χώρες της Μέσης Ανατολής (Tammara, 1990), ώστε τελικά οι Άραβες να μεταδώσουν την παραγωγή του σαφράν σε ολόκληρη τη Μεσόγειο τον 9<sup>ο</sup> αιώνα (Palomares, 2015).

### 1.1.3. Μορφολογία

Το φυτό του *Crocus Sativus* L. απαρτίζεται από τις ρίζες, τον βολβό, τα φύλλα, τον στήμονα, και τα άνθη που απαρτίζονται από τα πέταλα και τα στίγματα, με το συνολικό του μήκος να φτάνει τα 10-25 cm. Αρχικά, ο βολβός έχει σχήμα υπο-ωοειδές, πεπλατυσμένο στην βάση, με διάμετρο 4,5-5,5 cm που καλύπτεται από πολλούς δικτυωτούς ινώδες χιτώνες. Κάθε μητρικός βολβός έχει έναν ή δύο κύριους οφθαλμούς, ο καθένας

εκ των οποίων παράγει από έναν έως τρεις μεγάλους θυγατρικούς βολβούς, και πολλούς μικρούς βολβούς από πλάγιους οφθαλμούς, που ο αριθμός τους εξαρτάται από το μέγεθος του μητρικού βολβού. Τα φύλλα, σκούρου πράσινου χρώματος, είναι όρθια και πολύ στενά, με το μήκος τους να κυμαίνεται στα 20-60cm, με νεύρωση στο εξωτερικό μέρος και μια λευκή ζώνη στο εσωτερικό τους. Ακολούθως, τα άνθη, αποτελούνται από 6 μωβ-ιώδη πέταλα το καθένα, είναι αρωματικά και συνδέονται με έναν στενό και μακρύ



Εικόνα 1: (Srivastava et al., 2010) Ποσοτική ανάλυση του σαφράν

σωλήνα με την βάση. Τέλος, εσωτερικά του άνθους, υπάρχουν τρεις στήμονες κίτρινου-καφέ ή κίτρινου-πορτοκαλί χρώματος με έντονη χαρακτηριστική μυρωδιά, και τα τρία νήματα κόκκινου χρώματος μήκους 25-40 mm, τα οποία ονομάζονται στίγματα, και είναι εκείνα που μετά την αποξήρανση τους θα δώσουν το πολύτιμο εμπορικό προϊόν του σαφράν (Abdusamat κ.ά., 2021; Gohari κ.ά., 2013; Kothari κ.ά., 2021; Mzabri κ.ά., 2019).

#### **1.1.4. Καλλιέργεια**

Η ανάπτυξη του φυτού εξαρτάται από πολυάριθμους παράγοντες, όπως το μέγεθος και η προέλευση των βλαστών, ο χρόνος φύτευσης, η πυκνότητα και το βάθος φύτευσης, η καταπολέμηση των ζιζανίων, η μέθοδος άρδευσης, το υψόμετρο, η θερμοκρασία, η ποιότητα του αέρα και του χώματος και η λίπανση.

Ο *Crocus sativus L.*, ευδοκimeί σε περιοχές που ποικίλλουν σε υψόμετρο, εύρος θερμοκρασίας και υγρασίας, με τα εδάφη να είναι καλά στραγγιζόμενα και χωρίς άργιλο (Sampathu κ.ά., 1984), και κλίματα που χαρακτηρίζονται από κρύους χειμώνες και ζεστά καλοκαίρια (Gohari κ.ά., 2013).

Ειδικότερα ευνοείται σε θερμά, ξηρά και υποτροπικά κλίματα, σε θερμοκρασίες μικρότερες των 20 °C, με μικρές απαιτήσεις σε νερό με αποτέλεσμα πολλές φορές οι καλλιέργειες να μην είναι καν αρδευόμενες, με το χώμα αργιλώδες με τιμές pH μεταξύ του 6,3 έως 7,3 και υψηλή οργανική περιεκτικότητα, σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 3.785 ha (Cardone κ.ά., 2019; Caser κ.ά., 2020; El Midaoui κ.ά., 2022; FAO, 2012; Kothari κ.ά., 2021; Renau-Morata κ.ά., 2012).

Το έδαφος προετοιμάζεται λίγο πριν από την φύτευση με όργωμα, σβάρνισμα και αφαίρεση ζιζανίων. Ακολουθεί η ρηχή φύτευση των βολβών την εποχή της άνοιξης ή ακόμα και μέχρι τα μέσα του καλοκαιριού, ενώ η εμφάνιση των ανθέων ανιχνεύεται στα μέσα έως και τέλη Οκτωβρίου που η θερμοκρασία την μέρα αγγίζει τους 25<sup>0</sup>C ενώ την νύχτα τους 15<sup>0</sup>C (FAO, 2012). Σε πολλές περιοχές οι βολβοί παραμένουν φυτεμένοι στην γη καθ' όλη τη διάρκεια του έτους είτε επί σειρά ετών. Σε αυτές τις περιπτώσεις η τακτική επιθεώρηση των καλλιεργειών για την επαναφύτευση των σκουληκιών που τυχόν βρίσκονται εκτός εδάφους, για την πρόληψη κατά των ασθενειών που προσβάλλουν τους βολβούς, και τέλος για την απομάκρυνση ζιζανίων είτε με το χέρι είτε με τη χρήση ζιζανιοκτόνων (Ordoudi & Tsimidou, 2004).

Σύμφωνα με τους Renau-Morata et al. (2012), η αναπαραγωγή είναι βλαστική, δηλαδή το ίδιο το φυτό παράγει βολβούς αντικατάστασης στην βάση των βλαστών, με την συμβολή των φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φύλλων, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί και ανενεργοί στις εβδομάδες του χειμώνα και έπειτα της καλοκαιρινής ξηρασίας που ακολουθούν. Στις πρώτες βροχές του φθινοπώρου από τον κάθε βολβό προκύπτουν 4-12 άνθη. (Abdusamat κ.ά., 2021; El Midaoui κ.ά., 2022; Husaini κ.ά., χ.χ.)

### **1.1.5. Συγκομιδή, Επεξεργασία και Αποθήκευση**

Πρώτο στάδιο παραγωγής του σαφράν αποτελεί η συγκομιδή, η οποία πραγματοποιείται στα μέσα του Οκτωβρίου έως και τα μέσα Νοεμβρίου, με το χρονικό αυτό διάστημα να διαφοροποιείται από περιοχή σε περιοχή (Kothari κ.ά., 2021). Γίνεται παραδοσιακά από ομάδες γυναικών που κόβουν με το χέρι την βάση του άνθους τα οποία και συγκεντρώνουν σε καλάθια ή τσάντες. Η διαδικασία αυτή ξεκινάει από πολύ νωρίς το πρωί, εξαιτίας της πολύ μικρής διάρκειας ζωής του άνθους (20-24h) (Cid-Pérez κ.ά., 2021). Επιπλέον πολλές φορές, η συνήθης πρακτική αφορά την συλλογή των ακόμα έγκλειστων ανθών, με στόχο την διατήρηση της ποιότητας και του χρώματος των στιγμάτων από την πιθανή υποβάθμιση σε περίπτωση επαφής με τον αέρα, την βροχή και το ηλιακό φως (Abdusamat κ.ά., 2021; Ordoudi & Tsimidou, 2004; Shahi κ.ά., 2016; Tammara, 1990).

Έπειτα γίνεται η μεταφορά τους στο χώρο επεξεργασίας. Κατά την μεταφορά αυτή είναι πιθανή η επιμόλυνση με μικροοργανισμούς από το χώμα, από λύματα, από έντομα και τρωκτικά, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν με χημική επεξεργασία με οξείδιο του αιθυλενίου ή με επεξεργασία με θερμό ατμό (Cid-Pérez κ.ά., 2021; Ordoudi & Tsimidou, 2004).

Την ίδια μέρα με την συγκομιδή θα πρέπει να γίνει και η διαλογή των στιγμάτων από τα άνθη και η απόρριψη των στημόνων και των σέπαλων, μια διαδικασία που επίσης επιτυγχάνεται είτε χειρωνακτικά είτε και με την αξιοποίηση μηχανημάτων με εξαρισμό για τον καλύτερο διαχωρισμό (Cardone κ.ά., 2020; Ordoudi & Tsimidou, 2004).

Ακολουθεί το πιο σημαντικό στάδιο της διαχείρισης του προϊόντος που είναι η ξήρανση, η οποία επηρεάζει την τελική ποιότητα και σταθερότητα του. Δύο σημαντικές λεπτομέρειες που αφορούν την ξήρανση, είναι ότι επειδή οι κροκίνες είναι υδατοδιαλυτές δεν επιτρέπεται το πλύσιμο των στιγμάτων, και δεύτερον είναι φωτοευαίσθητες, όπως και όλα τα καροτενοειδή,

οπότε η έκθεση στο φως κατά την διάρκεια της διαδικασίας θα πρέπει να είναι περιορισμένη (Cid-Pérez κ.ά., 2021; Ordoudi & Tsimidou, 2004). Οι συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας κυμαίνονται στους 35-45°C και χαμηλότερες του 50%, αντίστοιχα, αν και οι συνθήκες αυτές καθώς και ο χρόνος επεξεργασίας ποικίλλουν ανάλογα με την χώρα. Οι μέθοδοι ξήρανσης είναι πολλές, και διακρίνονται στις συμβατικές, και πιο συγκεκριμένα στην ξήρανση στον ήλιο ή στην ξήρανση στη σκιά υπό συνθήκες αερισμού σε θερμοκρασία δωματίου, μέτριας θερμοκρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, και στις μη συμβατικές που αφορούν την ακτινοβολία υπεριώθρων, την ακτινοβολία μικροκυμάτων, τους ηλεκτρικούς φούρνους, τη λυοφιλίωση, τον θερμό αέρα και τους φούρνους κενού, που επιτυγχάνουν μεγαλύτερη απόδοση, ώστε η τελική υγρασία να φτάσει το 10-12%, σύμφωνα με το ISO 3632 (Abdusamat κ.ά., 2021; Kothari κ.ά., 2021; Ordoudi & Tsimidou, 2004).

Τέλος, το προϊόν προς πώληση διατίθεται σε μορφή νημάτων ή σκόνης, συσκευασμένο σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες. Θα πρέπει να φυλάσσεται σε συνθήκες σκότους, χαμηλής θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας, για την αποφυγή φαινομένων οξείδωσης και υποβάθμισης της ποιότητας (Abdusamat κ.ά., 2021; Cardone κ.ά., 2020; Cid-Pérez κ.ά., 2021).

### **1.1.6. Χημική Σύσταση Κρόκου**

Αναφορικά με την χημική σύσταση του κρόκου συνίσταται από βιταμίνες, αμινοξέα, πρωτεΐνες, άμυλο, ανόργανα άλατα και κόμμι, τα οποία συνιστούν πρωτογενείς μεταβολίτες και είναι κοινοί σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Ríos et al., 1996). Περιέχεται επίσης μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι προϊόντα του μεταβολισμού σημαντικοί για την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του οργανισμού όπως καροτενοειδή, μονοτερπένια και φλαβονοειδή, κυρίως ανθοκυανίνες. Τα πτητικά συστατικά των δευτερογενών μεταβολιτών, τα οποία έχουν έντονο άρωμα, αποτελούνται από περισσότερα από 34 συστατικά, τα οποία είναι κυρίως τερπένια, τερπενικές αλκοόλες και οι εστέρες τους. Αντίστοιχα, τα μη αρωματικά ενεργά συστατικά, είναι καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένης της ζεαξανθίνης, του λυκοπενίου και διάφορων α- και β- καροτενίων. Η κροκίνη, η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη είναι οι κύριες βιοενεργές ουσίες του κρόκου που ευθύνονται αντίστοιχα για το χρώμα, το άρωμα και την πικρή γεύση του μπαχαρικού αυτού (Kothari et al., 2021a).



Παρακάτω αναλύονται οι τρεις βασικές ουσίες του *Crocus sativus*:

#### A. Κροκετίνη

Είναι ένα ασυνήθιστο λιποφιλές καροτενοειδές που αποτελείται από πολυακόρεστες συζευγμένες ολεφίνες οξέων. Ο μοριακός τύπος της κροκετίνης είναι  $C_{20}H_{24}O_4$ . Έχει σημείο τήξης  $285\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Έχει καταγραφεί πως προάγει την υγεία, βελτιώνοντας την καρδιαγγειακή λειτουργία και έχει αντικαρκινική και αντικαταθλιπτική δράση.

#### B. Κροκίνη

Η κροκίνη, γνωστή και ως 8,8-διαποκαροτένιο-8,8-διοϊκό οξύ, είναι το κύριο χρωστικό του κρόκου και αποτελεί περίπου το 80% των συνολικών χημικών συστατικών. Είναι ένας υδατοδιαλυτός διεστέρας της κροκετίνης. Η κροκίνη είναι υπεύθυνη για τη χρυσαφί-κίτρινη-κόκκινη απόχρωση του κρόκου. Ο μοριακός τύπος της κροκίνης είναι  $C_{44}H_{64}O_{24}$ . Ανάμεσα στα καροτενοειδή, οι υδατοδιαλυτές κροκίνες αποτελούν από 6 έως 16% της ξηρής μάζας του κρόκου, ανάλογα με την επιλογή της ποικιλίας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την τεχνική επεξεργασίας του. Η κροκίνη 1 ή α-κροκίνη, που είναι το δι-(β-D-γεντιοβιοζυλικό) εστέρα της *trans*-κροκετίνης, είναι η πλέον ισχύουσα μορφή κροκίνης στον κρόκο με υψηλή διαλυτότητα. Η κροκίνη, συνήθως σκούρο-κόκκινη σε χρώμα, διαλύεται γρήγορα στο νερό, προσδίδοντας του μια κοκκινοραντίζουσα απόχρωση, γεγονός που την καθιστά χρήσιμη ως φυσικό χρωστικό τροφίμων. Η κροκίνη είναι επίσης γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση, καθώς παγιδεύει τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας τα κύτταρα και τα ιστούς από την οξειδωση. Η κροκίνη παραμένει σταθερή υπό ακραίες συνθήκες, αντίθετα με τη σαφρανάλη, η οποία είναι ασταθής. Το λmax για την κροκίνη είναι 440 nm.

#### C. Πικροκροκίνη

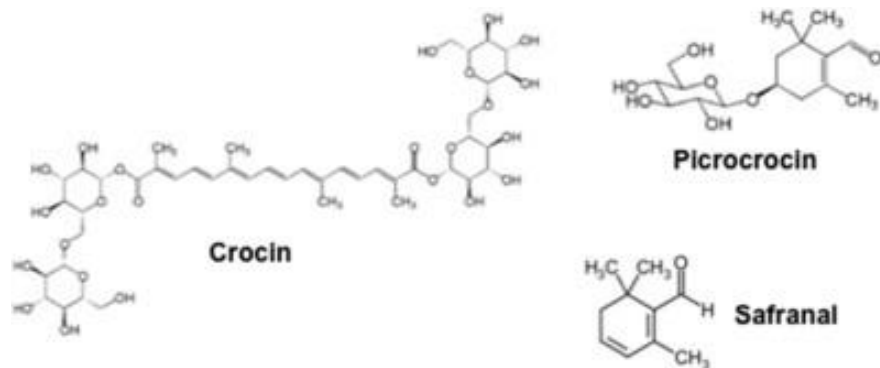
Η ειδική γεύση του κρόκου προέρχεται κυρίως από την πικροκροκίνη [4-(β-D-γλυκοπυρανοσουλζύ)-2,6,6-τριμεθυλ-1-κυκλοεξεν-1-καρβοξαλδεϋδη], η οποία βρίσκεται σε κάπως μικρότερη ποσότητα από την κροκίνη αναφορικά με το βάρος. Αποτελεί περίπου το 1 έως 13% της ξηρής μάζας του κρόκου. Ο μοριακός τύπος της πικροκροκίνης είναι  $C_{16}H_{26}O_7$ . Με τη φυσική απογλυκοσυλίωση, η πικροκροκίνη παράγει σαφρανάλη, ένα άλλο σημαντικό χημικό συστατικό που είναι κυρίως υπεύθυνο για τη μυρωδιά του κρόκου. Η πικροκροκίνη είναι

πρόδρομος της σαφρανάλης και ένα γλυκοσίδιο μονοτερπένου. Είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του κρόκου. Το  $\lambda_{max}$  για την πικροκροκίνη είναι 254 nm.

#### D. Σαφρανάλη

Η σαφρανάλη (2,6,6-τριμεθυλ-1,3-κυκλοεξαδιένιο-1-καρβοξαλδεϋδη) είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του κρόκου. Είναι υπεύθυνη για το άρωμα του κρόκου. Ο μοριακός τύπος της σαφρανάλης είναι  $C_{10}H_{14}O$ . Είναι μια μονοτερπένια αλδεϋδη και αγλυκόνη της πικροκροκίνης. Είναι πολύ ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα φρέσκα στίγματα του κρόκου δεν περιέχουν σαφρανάλη. Σχηματίζεται από τη δράση της  $\beta$ -γλυκοσιδάσης στην πικροκροκίνη κατά την αφυδάτωση και την αποθήκευση μετά τη συγκομιδή. Η σαφρανάλη μπορεί να αποτελείείως και το 70% του συνολικού αρωματικού κλάσματος σε ορισμένα δείγματα κρόκου και περίπου 0,001 έως 0,006% της ξηρής μάζας του. Το  $\lambda_{max}$  για τη σαφρανάλη βρίσκεται στα 330 nm. Η φασματοφωτομετρία και η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της τιμής και του περιεχομένου της σαφρανάλης, αντίστοιχα. Παλαιότερα, το περιεχόμενο της σαφρανάλης θεωρούνταν ως ένδειξη για την ποιότητα του κρόκου. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία δεν είναι πλέον αποδεκτή (Mzabri et al., 2019a).

Η ποιότητα (ελέγχεται από πρότυπα ISO 3632) του σαφράν εξαρτάται από τη συγκέντρωση αυτών των τριών κύριων μεταβολιτών (κροκίνη, πικροκροκίνη, σαφρανάλη) και η περιεκτικότητά τους εξαρτάται από το περιβάλλον, την καλλιεργητική πρακτική που χρησιμοποιείται καθώς και από τη ξήρανση, εκχύλιση και ανάλυση των στιγμάτων κρόκου (Kothari et al., 2021).



Εικόνα 2: (Mzabri et al., 2019b) Χημική δομή βασικών συστατικών του φυτού *Crocus sativus*

Πίνακας 2: Ποσοτική ανάλυση του σαφράν

Συστατικό	Mass percentage
Carbohydrates	12.0-15.0
H <sub>2</sub> O	19.0-14.0
Polypeptides	11.0-14.0
Cellulose	4.0-7.0
Lipids	3.0-8.0
Minerals	1.0-1.5
Miscellaneous	40.0
Non-nitrogenous	

Πίνακας 1: (Srivastava et al., 2010) Χημική σύσταση του Σαφράν

Component	Mass percentage
Water soluble components	53.0
Gums	10.0
Pentosans	8.0
Pectins	6.0
Starch	6.0
α- Crocin	2.0
Carotenoids	1.0
Lipids	12.0
Non volatile oils	6.0
Volatile oils	1.0
Protein	12.0
Inorganic matter ("ash")	6.0
HCl soluble ash	0.5
Water	10.0
Fiber (crude)	5.0

### 1.1.7. Φαρμακευτικές Ιδιότητες

Το σαφράν, από την αρχαιότητα, είναι φημισμένο για τις διατροφικές, ιατρικές και φαρμακολογικές του ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στην ιδιαίτερη χημική δομή διαφόρων ενώσεων και ομάδων ενώσεων, όπως είναι η κροκίνη, η πικροκροκίνη, η σαφρανάλη, οι κροκετίνες, οι ανθοκυανίνες, τα καροτενοειδή, η βιταμίνη C και τα τερπένια (Abu-Izneid κ.ά., 2022; Butnariu κ.ά., 2022; El Midaoui κ.ά., 2022; Lahmass κ.ά., 2018a).

Η χρήση του σαφράν έχει μεγάλη ιστορία στην παραδοσιακή ιατρική, όπου χρησιμοποιούνταν ως αναλγητικό, αντικαταθλιπτικό, αναπνευστικό αποσυμφορητικό, αντισπασμωδικό, αφροδισιακό, αποχρεμπτικό, εφιδρωτικό (Lahmass κ.ά., 2018a) καθώς και για την αντιμετώπιση της αυπνίας, των διαταραχών της εμμήνου ρήσεως και ορισμένων πεπτικών παθήσεων (Kabiri κ.ά., 2023), με τις πρώτες ιστορικές αναφορές για ιατρική χρήση να

τοποθετούνται στον 12<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. (Ferrence & Bendersky, 2004). Έτσι πληθώρα σύγχρονων ερευνών, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* επικεντρώνονται στην εύρεση, ανάλυση και απόδοση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων ενώσεων, αλλά και διαλυμάτων του *Crocus sativus L.* Για παράδειγμα θετικά αποτελέσματα έχουν βρεθεί έναντι του άγχους και της κατάθλιψης (Amin κ.ά., 2015; Ghajar κ.ά., 2017), της Schizophrenia (Pitsikas, 2016), του Alzheimer και της νόσου Parkinson (Dong κ.ά., 2020; Saeedi & Rashidy-Pour, 2021), της σαρκοπενίας (Dhillon & Hasni, 2017), διαφόρων καρδιαγγειακών νοσημάτων όπως η υπέρταση, οι αρρυθμίες, η ισχαιμία του μυοκαρδίου και η αθηροσκλήρωση (Abu-Izneid κ.ά., 2022; Butnariu κ.ά., 2022; Kabiri κ.ά., 2023; Oliva κ.ά., 2022), του διαβήτη και της δυσλιπιδαιμίας (Ghaffari & Roshanravan, 2019; Hatzigiariou & Lambrou, χ.χ.; He κ.ά., 2007; Hemmati κ.ά., 2015; Yaribeygi κ.ά., 2019), ενώ τέλος έχει δώσει θετικά αποτελέσματα ηπατοπροστατευτικής (Al-Hrouf κ.ά., 2018; Amin κ.ά., 2011; Milajerdi κ.ά., 2016) και αντικαρκινικής δράσης (D'Alessandro κ.ά., 2013; Escribano κ.ά., 1996; He κ.ά., 2014; Milajerdi κ.ά., 2016; Sajjadi & Bathaie, 2017).

### **1.1.8. Οικονομικά Στοιχεία**

Το σαφράν ή αλλιώς ‘ κόκκινος χρυσός’ είναι ένα από τα πιο ακριβά μπαχαρικά παγκοσμίως με την τιμή του να φτάνει έως και τα 8€ ανά γραμμάριο (*Saffron In All Over Europe / The Price Of Saffron In Europe—Ana Qayen, 2022*), ενώ η αξία της παγκόσμιας αγοράς του για το 2022 άγγιξε τα 435 εκατομμύρια ευρώ, με πρόβλεψη να αυξηθεί στα 729,6 εκατομμύρια ευρώ μέχρι το 2032 (*Saffron Market, 2022*). Το τελικό κόστος των αποξηραμένων στιγμάτων του *Crocus sativus L.*, εξαρτάται, εκτός από τους παράγοντες καλλιέργειας, συγκομιδής και περαιτέρω επεξεργασίας, και από την τελική ποιότητα του προϊόντος. Η τελευταία ορίζεται από την περιεκτικότητα των 3 βασικών ενώσεων που χαρακτηρίζουν τον κρόκο, οι οποίες είναι η κροκίνη, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη, οι οποίες καθορίζουν το έντονο κόκκινο χρώμα, την πικρή γεύση και το άρωμα αντίστοιχα, και ελέγχονται σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας ISO 3632-1 και -2 2011, και παίζει καθοριστικό ρόλο στην τιμή πώλησης του σαφράν (Cardone κ.ά., 2019; Caser κ.ά., 2020).

### **1.1.9. Νοθεία**

Δεδομένης της υψηλής αγοραστικής αξίας, το σαφράν γίνεται συχνά προϊόν νοθείας. Σύμφωνα με τους (Heidarbeigi κ.ά., 2015), οι πιο συνηθισμένες πρακτικές νοθείας είναι η

ανάμιξη του σαφράν με προϊόντα παρόμοιου χρώματος ή χημικής δομής, όπως η ατρακτυλίδα (*Carthamus tinctorius*. L, ή safflower), οι ίνες κόκκινου μεταξιού, το παντζάρι, ο κατιφές με κόκκινο στίγμα και το ρόδι, όπως επίσης η εμφάνιση των ινών του σαφράν σε μέλι, φυτικά έλαια και γλυκερίνη με σκοπό την αύξηση της μάζας. Οι Ordoudi & Tsimidou (2004) αναφέρουν τη νοθεία του σαφράν με προσθήκη φυτικής ύλης από *Calendula officinalis* L., στίγματα από άλλους κρόκους (*C. vernus* L., *C. Esperiosus* L.), μικρότερων σε μέγεθος και στα οποία απουσιάζουν οι χρωστικές ουσίες, πέταλα από *Papaver rhoeas* L., *Punicam granatum* L., *Arnica montana* L., και *Scolymus hispanicus* L., στήμονες από γαρύφαλλα, αλεσμένο κόκκινο πιπέρι, σκόνη σανδαλόξυλου και σωματίδια longwood, καθώς και κουρκουμά.

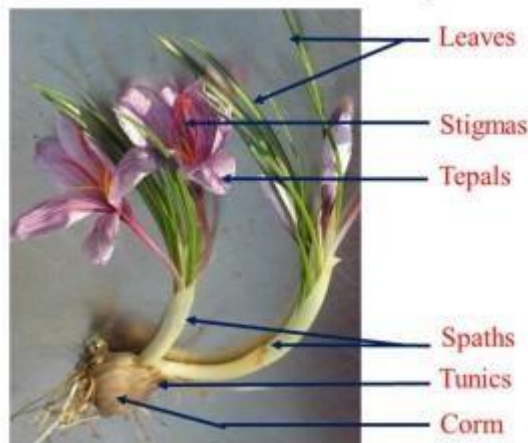
Ο έγκαιρος εντοπισμός της νοθείας πραγματοποιείται με τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών, της μικροκροκίνης και της σαφρανάλης, κύριων μεταβολιτών που διαχωρίζουν το σαφράν από άλλα είδη (José Bagur κ.ά., 2017). Τεχνικές όπως η φασματομετρία MS-MS, η φασματοφωτομετρία Raman, η υγρή χρωματογραφία HPLC, η αέρια χρωματογραφία GC-MS, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, οι τεχνικές PCR και η ηλεκτρονική μύτη, συμβάλλουν στην ανίχνευση της νοθείας (Rahaman κ.ά., 2021; Varliklioz Er κ.ά., 2017).

### **1.1.10. Παραπροϊόντα Κρόκου Κοζάνης**

Τα γεωργικά απόβλητα είναι το πιο άφθονο «πράσινο», ανανεώσιμο και βιώσιμο υπόλειμμα πόρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αξιοποίησή τους είναι ωφέλιμη τόσο σε περιβαλλοντικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο. Η αξία αυτής της βιομάζας ως ανανεώσιμης πηγής για βιοχημικά έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Έτσι, τα παραπροϊόντα του κρόκου Κοζάνης μπορούν να θεωρηθούν σημαντική πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επίλυση των περιορισμών των πόρων και των σύγχρονων προκλήσεων της ανθρώπινης υγείας. Επιστημονικά στοιχεία δείχνουν ότι αυτά τα παραπροϊόντα συνιστούν μια εξαιρετική εναλλακτική λύση παρέχοντας αρκετές βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να απομονωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν.

Πιο συγκεκριμένα, τα παραπροϊόντα του φυτού *Crocus sativus* είναι τα εξής (Lahmass et al., 2018):

1. Ξηρά φύλλα
2. Πράσινα φύλλα
3. Βολβοί
4. Χιτώνες
5. Σπάθες



Εικόνα 3: (Lahmass et al., 2018b) Αναπαράσταση των μερών του φυτού *Crocus sativus* L.

Αναφορικά με τα στίγματα, είναι το πλέον αξιοποιήσιμο μέρος του φυτού, καθώς από εκεί παράγεται και το μπαχαρικό σαφράν.

Ωστόσο, για τη συγκομιδή 1 κιλού αποξηραμένου σαφράν γύρω στα 350 κιλά πέταλα (που ισοδυναμούν με 150.000–200.000 φυτά) , 1500 κιλά φύλλα, εκατοντάδες κιλά από βολβούς και άλλα παραπροϊόντα, όπως σπάθια και χιτώνες, παραμένουν συνήθως αναξιοποίητα και ύστερα απορρίπτονται. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως, η συνολική παραγόμενη βιομάζα παγκοσμίως υπολογίζεται σε 146.300 τόνους/έτος (Mykhailenko et al., 2021).

### 1.1.11. Χρήσεις παραπροϊόντων του *Crocus sativus*

Χάρη στους δευτερεύοντες μεταβολίτες, τα γεωργικά απόβλητα αποτελούν πλέον ένα πραγματικό προϊόν που ανοίγει νέες προοπτικές για βιώσιμες μεταβάσεις στη γεωργία, την υγειονομική περίθαλψη και τα συστήματα τροφίμων(Lachguer et al., 2023).

Είναι γνωστό, πως τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, κυρίως πολυφαινόλες, βιταμίνες και ένζυμα, που ορισμένες ιδιότητες τους επιτρέπουν τη χρήση τους στη φαρμακευτική, τη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων. Αυτά τα φυτά καλλιεργούνται ευρέως, αλλά η αξιοποίησή τους απαιτεί προσαρμοσμένες λύσεις για τη διαχείριση της βιομάζας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η υψηλή ποσότητα των παραπροϊόντων (περίπου 90%) καθιστά απαραίτητη την διεξαγωγή ερευνών στις βιομηχανίες υγείας και τροφίμων, ώστε να

αποκαλυφθούν νέες χρήσεις αυτών για μια πιο βιώσιμη διαχείριση της καλλιέργειας. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη πληθώρας βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαινολικά, φαβονοειδή, γλυκοζίτες, ανθοκυανίνες και καμπφερόλη. Περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στις αντικαταθλιπτικές, αντιοξειδωτικές, αντιληπτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του *Crocus sativus*. Χάρη στη χαμηλή τους τοξικότητα αυτά τα απόβλητα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα στο χώμα, στην κτηνοτροφία ως συμπλήρωμα διατροφής, στην ανάπτυξη φυτικών φαρμάκων ως πρόσθετες πρώτες ύλες (Rahaiee et al., 2015).

Είναι γνωστό πως οι πολυφαινόλες και των καρροτενοειδή συμβάλλουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, το οξειδωτικό στρες και προάγουν την αντιοξειδωτική δράση του φυτού. Ωστόσο, οι φαινολικές και οι καρροτενοειδείς ενώσεις εντοπίζονται διαφορετικά στο μέρος των φυτών και σε κάθε μέρος του φυτού περιέχονται διαφορετικές ποσότητες. Σύμφωνα με τη μελέτη των Lahmass et al. (2018), τα ξηρά φύλλα περιείχαν σημαντικά υψηλότερη ποσότητα ενώσεων πολυφαινόλης από τα άλλα εκχυλίσματα, η ποσότητα των ενώσεων φαινολών του φυτού είναι με τη σειρά: ξηρό φύλλο>σπάθες>πράσινο φύλλο>στίγμα>χιτώνας>κορμός. Για τη συνολική περιεκτικότητα σε καρροτενοειδή, αποδείχθηκε ότι τα στίγματα περιείχαν σημαντικά υψηλότερη ποσότητα καρροτενοειδών από τα άλλα εκχυλίσματα, η συνολική περιεκτικότητα σε καρροτενοειδή στο φυτό είναι στη σειρά: στίγματα>πράσινο φύλλο > ξηρό φύλλο > σπάθες > χιτώνας > κορμός.

Αναφορικά με τους ανθήρες, αυτοί είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες, σάκχαρα και λιγότερο σε λιπίδια και περιέχουν χρήσιμα μικροστοιχεία και αντιοξειδωτικές ενώσεις. Επισημαίνεται ακόμη πως διαθέτουν διαιτητική ιδιότητα που προκύπτει από την ανάλυση των μικρομακροστοιχείων της γύρης και της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα που υπάρχουν τόσο στην προηγούμενη όσο και στο εσωτερικό κυτταρικό στρώμα του τοιχώματος του ανθήρα. (Chichiriccò et al., 2019). Ταπέταλα έχει βρεθεί πως είναι πλούσια σε κροκίνη και καμπφερόλη, αντιπροσωπεύοντας έτσι μια σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων για την ανάπτυξη πιθανών λειτουργικών τροφίμων και καλλυντικών σκευασμάτων (Menghini et al., 2018)

Μια ακόμη ενδιαφέρουσα προσέγγιση αφορά την αντιυπεργλυκαιμική δράση των πετάλων και των φύλλων του *Crocus sativus*. Οι επιπλοκές του διαβήτη πιθανώς συνδέονται με οξειδωτικό στρες που είναι αποτέλεσμα αυξημένων επίπεδων γλυκόζης στο αίμα. Έτσι λοιπόν η χορήγηση

αυτών των βιοδραστικών μορίων με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της γλυκόζης (Ouahhoud et al., n.d.)

Υπό το πρίσμα της «Κυκλικής Οικονομίας» (zero waste) τα ευρήματα υποστηρίζουν μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για καινοτόμο βελτίωση του κλάσματος υποπροϊόντων του *Crocus sativus* υψηλής ποιότητας με τελικό στόχο τη βελτιστοποίηση και ανάπτυξη της παραγωγικής του αλυσίδας (Chichiriccò et al., 2019). Επομένως, επενδύοντας σε αυτό υποπροϊόν μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για περαιτέρω αύξηση της οικονομικής αξίας του φυτού.

## 1.2. Φαινολικές Ενώσεις

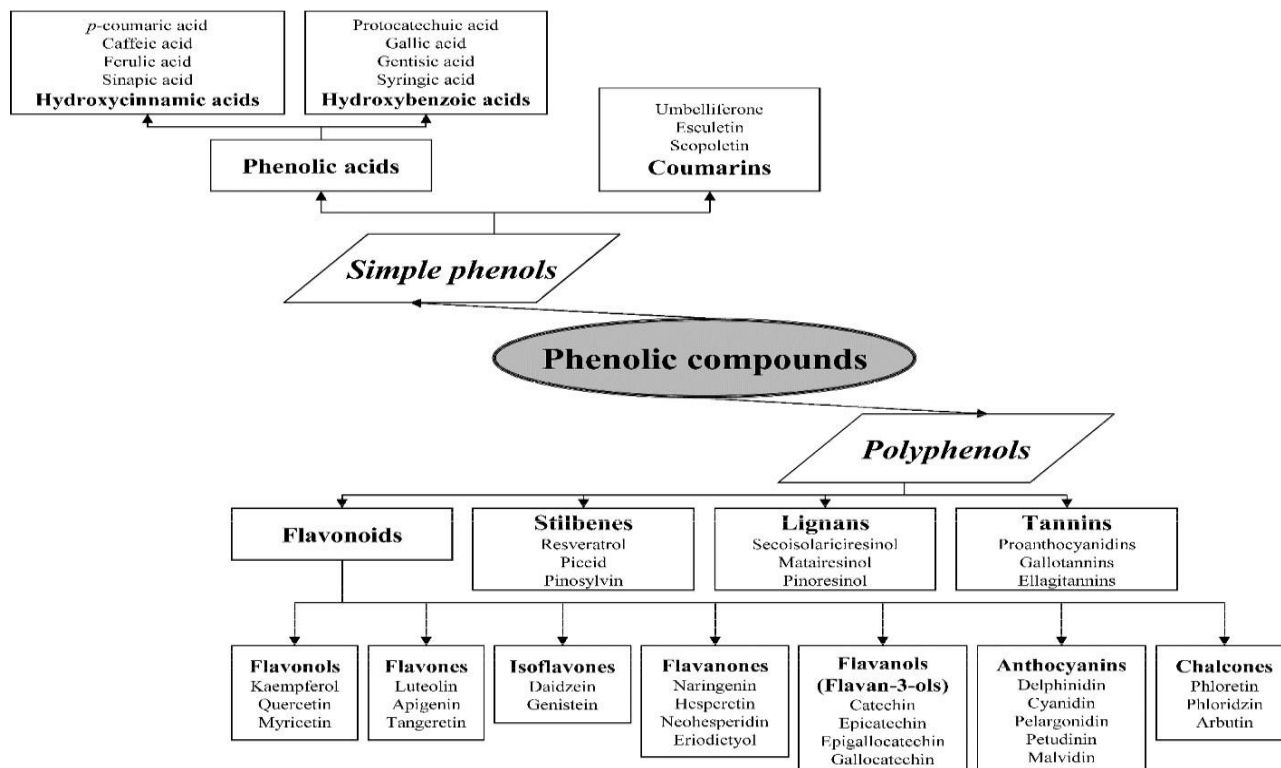
### 1.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι φαινολικές ενώσεις είναι ενώσεις με τουλάχιστον μία ομάδα υδροξυλίου, συνδεδεμένες με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης που συνδράμουν στην επιβίωση και προστασία των φυτών από άλλους οργανισμούς (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). Υπάρχουν σε αφθονία στην φύση με περισσότερες από 8000 γνωστές χημικές δομές που εντοπίζονται σε φρούτα, όσπρια, λαχανικά, σοκολάτα, καφέ, τσάι, βότανα και κρασί, με αποτέλεσμα να συνδράμουν με τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην ανθρώπινη διατροφή (Balasundram κ.ά., 2006).

Είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, χάρη στα υδροξύλια που περιέχουν, τα οποία μπορούν και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Da Porto & Natolino, 2018), δρουν αμυντικά σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, ενισχύουν την ανάπτυξη του φυτού, προσελκύουν επικονιαστές, συμβάλλουν στην διασπορά των καρπών και τέλος λειτουργούν ως φίλτρα στην UV ακτινοβολία (Alara κ.ά., 2021; Stelluti κ.ά., 2021), ενώ συνεισφέρουν σημαντικά στο χρώμα, στο άρωμα, στην στυπτικότητα και στην γεύση των τροφίμων (Ho, 1992; Soto κ.ά., 2015).

Οι φαινολικές ενώσεις σχηματίζονται με δύο κυρίως μεταβολικές οδούς, την οδό του οξικού οξέος και την οδό του σικιμικού οξέος (Soto κ.ά., 2015). Ο πιο κοινός τρόπος κατηγοριοποίησης των ενώσεων αυτών τις διακρίνει σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την χημική τους δομή, στις απλές φαινολικές ενώσεις και στις πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν τύπο ανθρακικού σκελετού C<sub>15</sub> (Alara κ.ά., 2021; Hamad H. Al Mamari, 2021; Ho, 1992; Oliva κ.ά., 2022).





Εικόνα 4: (Soto et al., 2015) Κατηγοριοποίηση Φαινολικών Ενώσεων

Η ανάγκη για την απομόνωση και ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στα απόβλητα και στα παραπροϊόντα των φυτών έχει προκύψει από τις ευκαιρίες που προσφέρουν στην βιομηχανία. Παραδειγματικά μειώνεται το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των βιομηχανιών μειώνοντας τα κόστη διαχείρισης των αποβλήτων και συνεισφέροντας στην κυκλική βιοοικονομία, όπως επίσης και ενισχύεται η επιστημονική έρευνα αλλά και το κέρδος, με την αξιοποίηση των φαινολικών σε προϊόντα τροφίμων όπως τυριά, προϊόντα δημητριακών και επιδορπίων αλλά και ποτών, σε φαρμακευτικά προϊόντα καθώς και σε προϊόντα καλλυντικών (Hamad H. Al Mamari, 2021; Rahaman κ.ά., 2021; Soto κ.ά., 2015; Stelluti κ.ά., 2021).

### 1.2.2. Φαινολικές ενώσεις του φυτού *Crocus Sativus*

Περισσότερες από συνολικά 150 πτητικές και μη πτητικές αρωματικές ενώσεις έχουν προκύψει από την χημική ανάλυση του *Crocus sativus*, με περίπου 50 από αυτές να εμφανίζουν φυτοχημικές ιδιότητες και έτσι έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στον εντοπισμό και στην ταυτοποίηση τους (Siddiqui κ.ά., 2018). Η αιτία αυτής της μεγάλης επιστημονικής έρευνας είναι ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που εμφανίζουν οι αρωματικές αυτές ενώσεις με δράσεις όπως η δέσμευση ελεύθερων ριζών, η αναστολή υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων και η παράλληλη αντιφλεγμονώδης δράση συνδράμουν στην υψηλή διατροφική αξία των τροφών αλλά και στην πρόληψη και αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών (Frankel, 1997; Lahmass κ.ά., 2017)

Πίνακας 3: (Mykhailenko κ.ά., 2019) Φαινολικές ενώσεις του φυτού *Crocus sativus*

Κατηγορία ενώσεων	Πλήθος εντοπισμένων ενώσεων	Παραδείγματα
<b>Ξανθόνη</b>	1	Μαγκνιφερίνη
<b>Ανθοκυάνες</b>	15	Δελφινίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη, δελφινίνη 3,7-δι-ο-β-γλυκοπυρανοζίτης, πετουνιδίνη 3,5-δι-ο-β-γλυκοπυρανοζίτης, τουλιπανίνη
<b>Ανθρακινόνες</b>	4	Εμοδίνη, 2-υδροξυεμοδίνη
<b>Ακετοφαινόνες</b>	2	2,3,4-τριυδροξυ-6-μεθυλοξυακετοφαινονη-3-ο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης
<b>Βιταμίνες</b>	6	B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>1</sub> , C, A, E
<b>Φυτοστερόλες</b>	5	β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, φαγαστερόλη
<b>Τριτερπενικές σαπωνίνες</b>	2	Αζαφρίνη 1, αζαφρίνη 2
<b>Φουράνια</b>	10	2-φορμυλο-5-μεθοξυφουράνιο, 2,4-διυδροξυ-2,5-διμεθυλο-3(2H)-φουραν-3-όνη
<b>Νουκλεοσίδια και αλκαλοειδή</b>	7	Ουρακίλη, αδενοσίνη, θυμίνη, νικοτιναμίδιο
<b>Καροτενοειδή</b>	20	Α-καροτένιο, β-καροτένιο, κροκετίνη, ζεαξανθίνη, λυκοπένιο
<b>Φλαβονοειδή και γλυκοζίτες</b>	61	Καμφερόλη, καμφερόλη, 3,7-ο-δι-γλυκοπυρανοζίτης, διυδρο-καμφερόλη 7-ο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης, κερκετίνη, κερκετίνη-3,7-δι-ο-β-D-σοφοροσίτης, ισοχαρμεντίνη, μυρικετίνη, ραμνετίνη, ναρινενγκίνη, λουτεολίνη
<b>Παράγωγα μονοατομικών, διατομικών, τριατομικών φαινολών και φαινολικών καρβοξυλικών οξέων</b>	18	Χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κινναμικό οξύ, γαλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ
<b>Μονοτερπενοειδή</b>	24	Πικροκροκίνη, σαφρανάλη, ισομερές της σαφρανάλης, κροκουσατίνη (B, C, D, I, J, K, L)
<b>Κυκλοεξάνια και παράγωγα</b>	30	β-ισοφορόνη, κροκουσατίνη (A, E, G, H), δαμασκινόνη, α-ιονόνη

Στο φυτό *Crocus sativus L.* έχουν βρεθεί σημαντικές ποσότητες κροκίνης, κροκετίνης, καροτένιου, λυκοπένιου, ανθοκυανών, α-καροτενίου, β-καροτενίου και ζεαξανθίνης που συγκεντρώνονται στα στίγματα (Nørbæk & Kondo, 1998), ενώ στα πέταλα εμφανίζονται δευτερογενείς μεταβολίτες όπως η ρουτίνη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η εσπεριδίνη και τα βιοφλαβονοειδή (Siddiqui κ.ά., 2018). Οι περιεκτικότητες των φαινολικών και των καροτενοειδών στο φυτό, παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις ως προς την παρουσία τους ή την ποσότητα τους στα μέρη του φυτού όπως στα στίγματα, στα πέταλα και τα τέπαλα και ακολούθως στους στήμονες, στα φύλλα και στον βολβό, τιμές που διαφοροποιούνται ανάλογα με την προέλευση του φυτού (Ghanbari κ.ά., 2019), τις καλλιεργητικές συνθήκες (Caser κ.ά., 2019) και τις συνθήκες αποθήκευσης (Moratalla-López κ.ά., 2019).

Μέχρι πρότινος οι μεμονωμένες ενώσεις της κροκίνης, των κροκετινών και της σαφρανάλης θεωρούνταν οι κύριες υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του φυτού. Ωστόσο ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση πως η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να αποδοθεί στην συνεργιστική δράση των φαινολικών ενώσεων, των φλαβονοειδών, των ταννινών και άλλων βιοενεργών ουσιών όπως το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη E το ασκορβικό οξύ και άλλα οργανικά οξέα (Driouiche κ.ά., 2023; Karimi κ.ά., 2010; Lahmass κ.ά., 2017).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ**

## 2.1. Μέθοδοι Εκχύλισης

Η εκχύλιση συνιστά μια μέθοδο προκατεργασίας για την παραλαβή μιας ή περισσότερων ενώσεων από ένα μίγμα καθώς και την απομάκρυνση προσμίξεων. Στηρίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις συμβατικές (conventional extraction methods) και τις μη συμβατικές (non-conventional extraction methods) μεθόδους εκχύλισης. (Ligor et al., 2018)

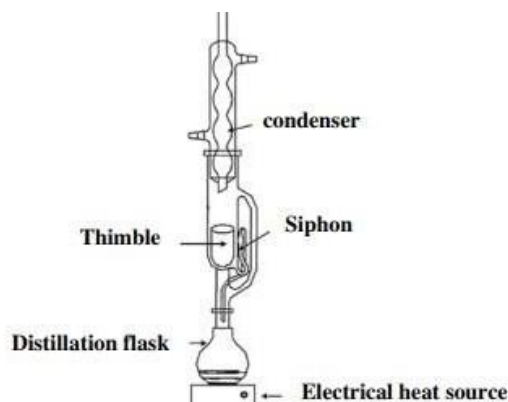
Η εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών και πιο συγκεκριμένα των φαινολικών ενώσεων από διάφορα μέρη του φυτού *Crocus sativus* είναι πολύ σημαντική λαμβάνοντας υπόψιν τις εφαρμογές τους στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Πλέον, έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές για την εξαγωγή βιοδραστικών συστατικών του κρόκου με την υψηλότερη ποιότητα, ενώ επιτυγχάνεται η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης. Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές, επιβεβαιώνεται ότι με τη χρήση της μεθόδου της κατάλληλης εκχύλισης, τα στοχευόμενα βιοενεργά συστατικά μπορούν να εξαχθούν πιο αποτελεσματικά ως προς το χρόνο εκχύλισης και τον όγκο του διαλύτη. (Rahaman et al., 2021; Saifullah et al., 2020)

## 2.2. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

Αυτή η κατηγορία μεθόδων εκχύλισης βασίζεται συνήθως στην ισχύ διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται και στην εφαρμογή θερμότητας ή/και ανάμειξης. Παρακάτω παρατίθενται οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι στην περίπτωση του *Crocus sativus*.

### 2.2.1. Εκχύλιση Soxhlet

Η τεχνική της εκχύλισης Soxhlet σχεδιάστηκε αρχικά από τον Γερμανό χημικό Fraiz Ritter Von Soxhlet για την εξαγωγή λιπιδίων/λίπους το 1879.



Εικόνα 15: (Khongthaw et al., 2023b) Σχηματικό διάγραμμα της συσκευής εκχύλισης Soxhlet

Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων που είναι θερμικά σταθερές και έχουν μέση έως χαμηλή πτητικότητα. Αναλυτικότερα, σε αποξηραμένο δείγμα σαφράν που τοποθετείται στη φύσιγγα του εκχυλιστή προστίθεται κατάλληλο διαλυτικό μέσο για τη διεξαγωγή της εκχύλισης. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται ξανά και ξανά για αρκετούς κύκλους έως ότου ολοκληρωθεί η εκχύλιση (Ligoret al., 2018). Ωστόσο, η εκχύλιση Soxhlet έχει ορισμένα μειονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες νέες μεθόδους εκχύλισης, καθώς το εκχύλισμα δεν καταλήγει να είναι καθαρό, καταναλώνει περισσότερη ενέργεια και διαλύτη, έχει χαμηλή ασφάλεια και απόδοση και απαιτεί περισσότερο χρόνο εκχύλισης. Βέβαια, σε συνδυασμό με άλλες προηγμένες τεχνικές εκχύλισης μπορεί να τροποποιηθεί ως προς την αποτελεσματικότητά της (Rahaman et al., 2021).

### **2.2.2. Διαβροχή ή εκχύλιση με διαλύτη (Maceration)**

Η διαβροχή είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται συνήθως για την απομόνωση μη πτητικών φυτικών ενώσεων για χρήση στη φαρμακοβιομηχανία (Khongthaw et al., 2023). Η εκχύλιση με διαλύτη ξεκινά από τη διαβροχή με ανάμειξη της κατάλληλης ποσότητας δείγματος σαφράν και διαλύτη, ακολουθεί ανάδευση για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια και ταχύτητα και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5 ημέρες (Ligor et al., 2018). Αυτή η διαδικασία μαλακώνει και καταστρέφει τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα, προκαλώντας την απελευθέρωση των φυτοθεραπευτικών συστατικών (Khongthaw et al., 2023). Ύστερα το προκύπτον εκχύλισμα διηθείται και αναλύεται μέσω φασματοφωτόμετρου UV-Vis ώστε να ληφθεί η τιμή απορρόφησής του. Η χρωστική ισχύς του εκχυλίσματος σαφράν καθορίζεται από τον χρόνο εκχύλισης, τον τύπο φίλτρου και το διαλύτη εκχύλισης. Συνεπώς, η ένταση χρωματισμού μειώνεται ενώ αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης (έως 24 ώρες), χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί μεγάλου μεγέθους πόρων και φιλτράροντας το εκχύλισμα πριν από την τελευταία αραίωση (Rahaman et al., 2021). Για τη λήψη των βιοδραστικών ενώσεων του κρόκου, χρησιμοποιούνται συχνά διαλύτες όπως η αιθανόλη ή/και μείγμα διαλυτών νερού σε διαφορετικές αναλογίες ως το καλύτερο μέσο (Rahaman et al., 2021). Ωστόσο, η διαβροχή έχει ορισμένους περιορισμούς όπως τη μεγάλη διάρκεια, τα εκτεταμένα στάδια συμπύκνωσης και τους μεγάλους όγκους επικίνδυνων διαλυτών (Khongthaw et al., 2023).

## 2.3. Εκχύλισεις υψηλών ενεργειών

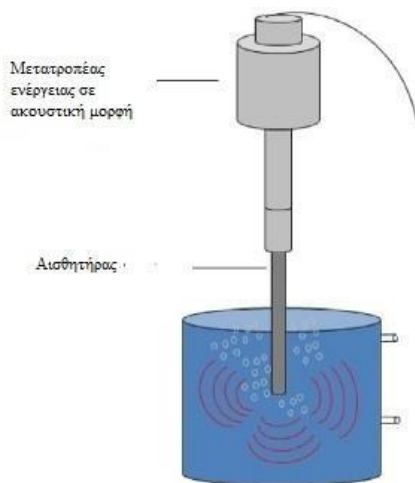
Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης παρατηρείται μια αυξανόμενη ζήτηση για τη χρήση νέων μεθόδων εκχύλισης. Ο σύντομος χρόνος εκχύλισης, η αποτελεσματικότητα, η απλότητα και το χαμηλό κόστος είναι σημαντικές παράμετροι που συνήθως λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή κατάλληλης τεχνικής εκχύλισης. Με βάση τους μηχανισμούς τους διακρίνονται σε: 1) εκχύλιση με την χρήση υπερήχων (ultrasound assisted extraction, UAE) και 2) εκχύλιση με την χρήση μικροκυμάτων (microwave assisted extraction, MAE) (Izadiyan & Hemmateenejad, 2016; Pollini et al., 2021; Rifna et al., 2023).

### 2.3.1. Εκχύλιση με υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction

Ο υπέρηχος είναι κυρίως ένα μηχανικό ή υπερηχητικό κύμα εντός του εύρους συχνοτήτων 20 kHz–100 MHz και η συχνότητα υπερήχων κυμαίνεται από 20 GHz-10 MHz. Οι δύο συχνότητες είναι ο διαγνωστικός και ο υπέρηχος ισχύος. Οι διαγνωστικοί υπέρηχοι ονομάζονται επίσης υπέρηχοι υψηλής συχνότητας (2 MHz έως 10 MHz όπου  $I < 1 \text{ cm}^{-2}$ ), ενώ οι υπέρηχοι ισχύος είναι χαμηλής συχνότητας (20 MHz έως 100 MHz όπου  $I > 1 \text{ W/cm}^2$ ) (Rahaman et al., 2021).

Η ένταση του υπερήχου μειώνει τις διαμοριακές δυνάμεις, προκαλώντας τη διάσπαση της μοριακής δομής. Αυτό είναι γνωστό ως σπηλαίωση και περιλαμβάνει την παραγωγή, την ανάπτυξη και την κατάρρευση φυσαλίδων, που αναφέρεται ως συμπίεση (θερμοκρασία 5000 K και πίεση 5000 atm) (Khongthaw et al., 2023). Όσο μικρότερη είναι η ισχύς των υπερήχων τόσο μεγαλύτερη η ενέργεια που παράγεται. Η ένταση και η ενέργεια των υπερήχων, μαζί με την τάση ατμών, την επιφανειακή τάση, τη θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύτη επηρεάζουν το μέγεθος της σπηλαίωσης. Αναλυτικότερα, η ηχητική σπηλαίωση δημιουργεί υψηλές διατμητικές τάσεις στο μέσο και η κατάρρευση των φυσαλίδων στο κρίσιμο σημείο προκαλεί στροβιλισμό, ο οποίος οδηγεί σε υψηλές ταχύτητες σύγκρουσης στο στερεό υλικό. Αυτό οδηγεί στη μηχανική διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος που απελευθερώνει το περιεχόμενό του, καθώς και την τοπική θέρμανση του υγρού αυξάνοντας τη διάχυση του εκχυλίσματος (Abu-Izneid et al., 2022). Αυτό πραγματοποιείται συνεχώς επιφέροντας αλλαγές στη δομή του μέσου διάδοσης (το δείγμα) (Moreira et al., 2019). Το μέσο διάδοσης των κυμάτων μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο (Mehta et al., 2022).

Σήμερα, η UAE είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων, λόγω του ότι χρησιμοποιεί απλό εργαστηριακό εξοπλισμό, εξάγει ένα ευρύ φάσμα φυσικών ενώσεων χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε διαλυτικό μέσο, παρουσιάζει υψηλή αναπαραγωγιμότητα, ενεργειακή αποτελεσματικότητα και υψηλό επίπεδο αυτοματισμού. Επίσης, ο χρόνος που απαιτείται είναι σύντομος, η απελευθέρωση τοξικών ρύπων είναι χαμηλή, λόγω της περιορισμένης κατανάλωσης οργανικού διαλύτη, ενώ το κόστος υποδομών της δεν είναι σημαντικά διαφορετικό από αυτό των συμβατικών τεχνικών. Αποτελεί, λοιπόν, μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση για την εκχύλιση φαινολικών και άλλων ουσιών. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η υψηλή ένταση ισχύος προκαλεί βλάβη ή ρήξη του βιολογικού κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις όγκου φυσαλίδων, οι οποίες μειώνουν τη δραστηριότητα της σπηλαίωσης, γνωστό ως το «φαινόμενο κορεσμού», που



Εικόνα 23: Αισθητήρας Υπερήχων

προκαλείται από μεγάλο αριθμό φυσαλίδων σπηλαίωσης γύρω από το άκρο του ανιχνευτή, δημιουργώντας παραμόρφωση φυσαλίδων, μη σφαιρική κατάρρευση και μειωμένη απόδοση, η οποία μπορεί να προκληθεί από την υπερηχητική αποδόμηση του εξαγόμενου φυτοθεραπευτικού συστατικού (Khongthaw et al., 2023; Rahaman et al., 2021). Η διάβρωση που προκαλείται από υπερήχους επιφέρει στην απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων. Η ηχοδιάτρηση, δηλαδή ο

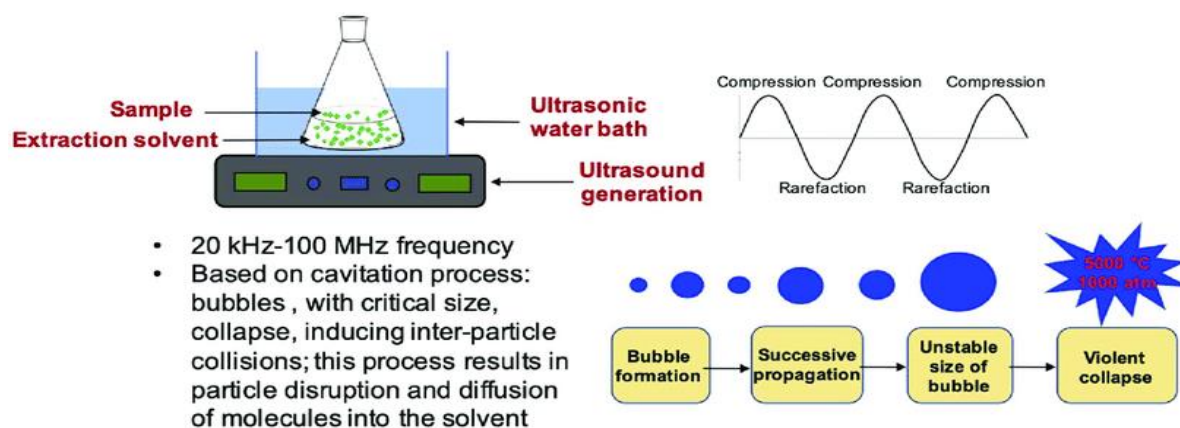
σχηματισμός πόρων λόγω της σπηλαίωσης επίσης βοηθά στην απελευθέρωση βιοδραστικών αρχών από τις κυτταρικές μήτρες. Η ικανότητα απορρόφησης νερού του δείγματος από το οποίο πρέπει να γίνει η εξαγωγή ενισχύεται με την εφαρμογή υπερήχων. Έτσι, το νερό δρα ως διαλύτης για τη διασπορά του δραστικού συστατικού με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης. Η εφαρμογή υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη απόδοση εκχύλισης με ελάχιστη απώλεια βιοδραστικότητας (Mehta et al., 2022).

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την διαδικασία της UAE είναι αρκετά απλά, αφού απαρτίζονται μόνο από ένα μέσο εκχύλισης, μια γεννήτρια ενέργειας και ένα μετατροπέα της ενέργειας σε ακουστική μορφή. Σε εργαστηριακό επίπεδο συνήθως χρησιμοποιείται το λουτρό



υπερήχων, ενώ σε μεγαλύτερης κλίμακας εκχυλίσσεις, ο αισθητήρας υπερήχων (Mehta et al., 2022). Όσον αφορά το λουτρό υπερήχων, το δείγμα (στερεό ή υγρό) διασκορπίζεται στον διαλύτη απευθείας, μέσα στην ατσάλινη δεξαμενή ενώ είναι συνδεδεμένη με την πηγή των υπερηχητικών κυμάτων. Ωστόσο, το λουτρό υπερήχων εμφανίζει κάποιους περιορισμούς όπως είναι η ανομοιογένεια στη διάδοση της ενέργειας και η μείωση της ισχύος με την πάροδο του χρόνου. Στον αντίποδα, στον αισθητήρα υπερήχων η πηγή των κυμάτων είναι βυθισμένη απευθείας μέσα στην φιάλη που περιέχει τον διαλύτη και το δείγμα. Έτσι η απευθείας παροχή ενέργειας στον διαλύτη επιτυγχάνει μικρές απώλειες και πιο αποδοτική σπηλαιώση καθώς η ενέργεια εφαρμόζεται σε ορισμένη περιοχή δείγματος. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις απαιτείται προεπεξεργασία της πρώτης ύλης, πχ αφυδάτωση (Raza et al., 2017).

Η εκχύλιση με υπερήχους ορίζεται από έναν αριθμό παραμέτρων που θα πρέπει να μελετηθούν προσεκτικά, καθώς επηρεάζουν τη διαδικασία. Οι σημαντικότεροι είναι: 1) Η ισχύς



Εικόνα 24: (Panzella et al., 2020) Σχηματική αναπαράσταση του εξοπλισμού από την τεχνική UAE σε λουτρό υπερήχων

των υπερήχων, η οποία κυμαίνεται από 0 έως 100% και εξαρτάται από την ισχύ του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, σε εκχυλίσσεις φυτικών ιστών, η ισχύς κυμαίνεται από 20-700W.

Είναι γνωστό ότι η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση της ισχύος και παράλληλα με μείωση της υγρασίας των τροφίμων, έτσι ώστε να αυξηθεί η επαφή στερεού-διαλύτη, και με τη βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας για να επιτευχθεί μια συντομότερη εκχύλιση

2) Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί. Για την εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιούνται συνήθως διαλύτες όπως νερό, αιθανόλη, ακετόνη, αλκοόλες κ.α. Οι αλκοόλες και η ακετόνη, σε συνδυασμό με το νερό χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση φαινολικών

ουσιών από φυτικούς ιστούς. Αξίζει να σημειωθεί πως η αιθανόλη, λόγω της υψηλής της συγγένειας με τις φαινόλες, συνιστά την καλύτερη επιλογή για την εκχύλιση τους. Παράλληλα, είναι αρκετά οικονομική, παράγεται από ανανεώσιμη πηγή (σακχαροκάλαμο) και έχει χαρακτηριστεί ως ασφαλής (GRAS - generally recognized as safe) διαλύτης. Για την εκχύλιση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών από φυτικούς ιστούς ο συνηθέστερος διαλύτης που επιλέγεται είναι η αιθανόλη σε ποσοστό 50-80% 3) Η αναλογία διαλύτη προς δείγμα. Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με αύξηση της αναλογίας διαλύτη/δείγματος και αφού φτάσει στο μέγιστο, μειώνεται. Η μικρή αναλογία διαλύτη/δείγματος επηρεάζει το ιξώδες του διαλύματος και δυσκολεύει την εκχύλιση. Από την άλλη πλευρά, η μεγάλη αναλογία αυξάνει τη διαχυτικότητα και τη διάλυση του δείγματος στον διαλύτη διευκολύνοντας τη διαδικασία εκχύλισης. 4) Η θερμοκρασία. Με αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η διαλυτότητα και το ιξώδες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης. Ενώ, η περαιτέρω αύξηση δυσχεραίνει το φαινόμενο της σπηλαίωσης και κατ' επέκταση την απόδοση της εκχύλισης. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της θερμοκρασίας καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης 5) Ο χρόνος εκχύλισης. Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με αύξηση του χρόνου ενώ από ένα σημείο και έπειτα, μειώνεται. Με την αρχική αύξηση του χρόνου ενισχύεται η διάγνωση, η ενυδάτωση, ο κατακερματισμός και ο σχηματισμός πόρων στη μήτρα του φυτικού ιστού και βοηθάει την εκχύλιση. Ωστόσο, η έκθεση σε υπερήχους για πολύ μεγάλη διάρκεια προκαλεί δομικές βλάβες στη διαλυμένη ουσία και μειώνει την απόδοση εκχύλισης (Kant & Kumar, 2022).

### **2.3.2. Εκχύλιση με μικροκύματα – Microwave Assisted Extraction**

Η εκχύλιση με μικροκύματα (MAE) πραγματοποιείται μέσω της διασποράς ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε ένα εύρος συχνοτήτων από 300 MHz έως 300 GHz. Ωστόσο, οι συχνότητες που χρησιμοποιούνται συνήθως για τρόφιμα, ιατρικά και φαρμακευτικά προϊόντα είναι εντός της περιοχής από 0,915 έως 2,45 GHz (Rahaman et al., 2021). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται κυρίως στην ενέργεια από τα μικροκύματα, τα οποία προκαλούν την κίνηση των υγρών μορίων, που αργότερα θερμαίνουν τα δείγματα γρήγορα αυξάνοντας το χαρακτηριστικό τριχοειδές πορώδες που επιτρέπει τη διάχυση του διαλύτη στα φυτικά κύτταρα και, στη συνέχεια, αναγκάζει την απελευθέρωση των ουσιών από το φυτικό κύτταρο στο διαλύτη (Aourach et al., 2021).

Η οργανολογία της MAE ταξινομείται σε δύο τύπους: κλειστό δοχείο και ανοιχτό δοχείο. Τα κλειστά συστήματα MAE χρησιμοποιούνται για εκχύλιση σε ελεγχόμενη πίεση και θερμοκρασία, ενώ οι εστιασμένοι φούρνοι μικροκυμάτων χρησιμοποιούνται για εκχύλιση σε ατμοσφαιρική πίεση. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

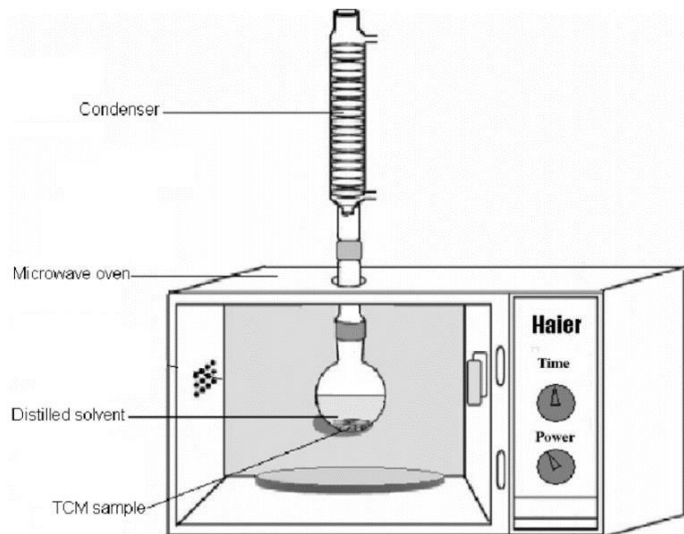
(α) Διείσδυση (μέσα στο στερεό ή μήτρα φυτών) και μεταφορά (εκτός στερεού μήτρα),

(β) Διαλυτοποίηση και διάσπαση,

(γ) Διαχωρισμός των εκχυλισμένων βιοδραστικών ενώσεων και

(δ) Μετανάστευση των εκχυλισμένων διαλυτών ουσιών στο σώμα του διαλύτη.

Στο πλαίσιο αυτό, παράγεται επίσης θερμότητα μέσω ιοντικής αγωγιμότητας, αυξάνοντας τον ρυθμό διάχυσης και αυτή με τη σειρά της την εκχύλιση ουσιών. Ο ρυθμός εκχύλισης εξαρτάται επίσης από τη διαλυτότητα των στοχευμένων βιοενεργών συστατικών στο διαλύτη καθώς και από τις διηλεκτρικές ιδιότητες του δείγματος και του διαλύτη (Khongthaw et al., 2023; Rahaman et al., 2021).



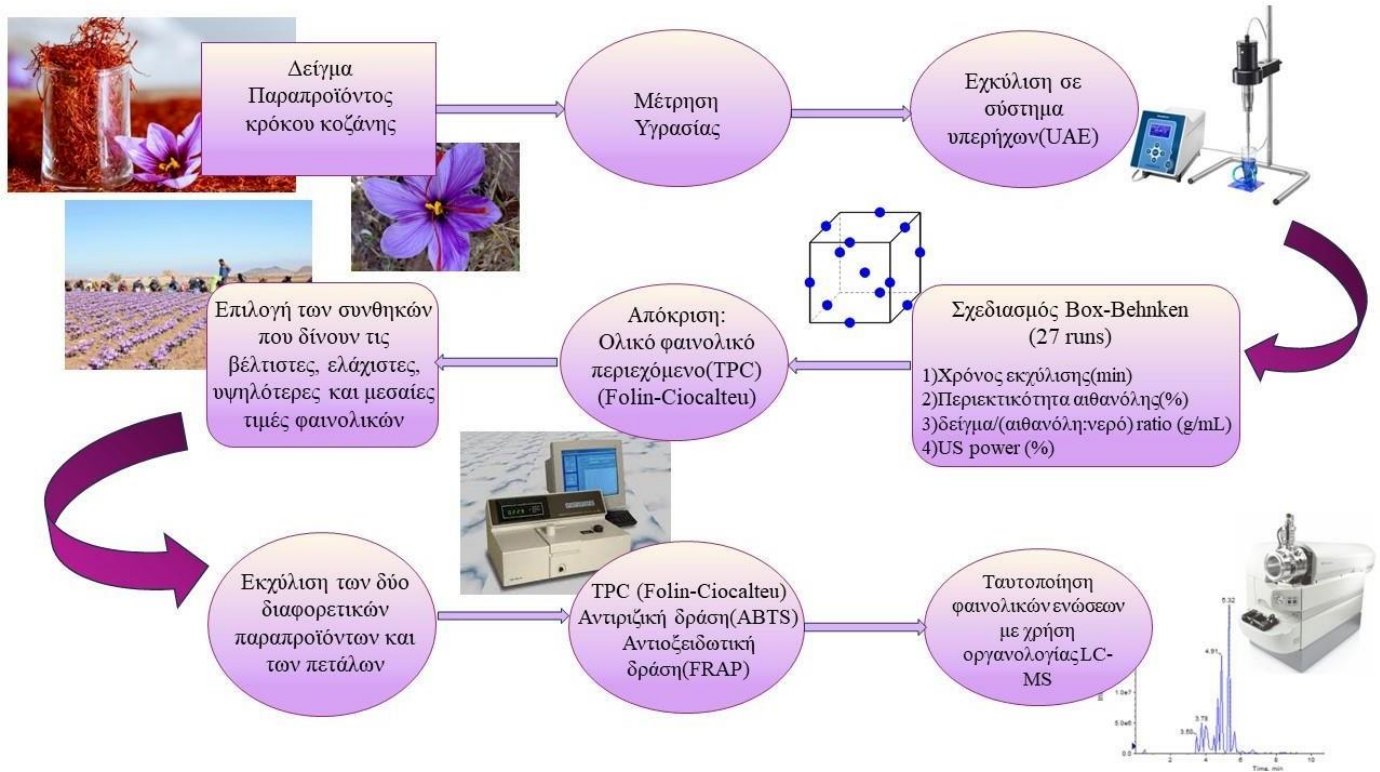
Εικόνα 25: (Huang et al., 2011) Σχηματική αναπαράσταση εξοπλισμού τεχνικής MAE

## Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη του φαινολικού περιεχομένου σε στερεό δείγμα παραπροϊόντος του φυτού *Crocus sativus* από ελληνική βιομηχανία και η παραλαβή των φαινολικών ενώσεων με χρήση τεχνικών εκχύλισης υψηλής ενέργειας και πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment, DOE). Ο κρόκος θεωρείται ένα σημαντικό προϊόν διατροφής που χρησιμοποιείται στην ιατρική, τις αρωματικές και χρωστικές ουσίες λόγω των βιοδραστικών του ενώσεων που περιέχει και τονώνουν την υγεία. Καλλιεργείται κυρίως στο Ιράν και ύστερα ακολουθούν η Ινδία, το Μαρόκο, η Ισπανία και φυσικά η Ελλάδα. Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια από τις κύριες κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην υψηλή διατροφική του ποιότητα που οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αντιοξειδωτική τους δράση. Τα παραπροϊόντα του κρόκου που επιλέχθηκαν απαρτίζονται κυρίως από τα φύλλα και τα πέταλα του φυτού. Η παραλαβή των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση με υπερήχους (ultrasound assisted extraction, UAE), η οποία βελτιστοποιήθηκε με Πειραματικό Σχεδιασμό σύμφωνα με το μοντέλο Box – Behnken. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν και οι τιμές στις οποίες κυμάνθηκαν ήταν η συγκέντρωση της αιθανόλης (20-100%, v/v), η αναλογία διαλύτη/δείγματος (20-60 mL/g), η ισχύς των υπερήχων (20-80%) και ο χρόνος (10-40 min). Επιπλέον, σε επιλεγμένα εκχυλίσματα του παραπροϊόντος κρόκου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν, με τη σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Συνοπτικά, οι βασικοί στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: (α) η βελτιστοποίηση της εκχύλισης με υπερήχους με χρήση πειραματικού σχεδιασμού, προς παραλαβή της μέγιστης ποσότητας φαινολικών ουσιών από κάθε υπόστρωμα, (β) η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων της εκχύλισης στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και (γ) η σύγκριση δύο διαφορετικών παραπροϊόντων, με σκοπό την αξιολογήσή τους και την εφαρμογή τους ως συντηρητικούς παράγοντες σε διάφορα τρόφιμα, όπως τα κρεατοσκευάσματα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### 3.1. Διάγραμμα Πειραματικής Πορείας



### 3.2. Αντιδραστήρια και Όργανα

#### 3.2.1. Αντιδραστήρια και Πρότυπα Διαλύματα

- Απεσταγμένο νερό
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (CH<sub>4</sub>O) (Carlo Erba Reagents, France).
- Αντιδραστήριο F-C phenol reagent (Merck KGaA, Germany)
- Ανθρακικό νάτριο (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- Γαλλικό οξύ (GA, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) (Alfa Aesar)
- Υπερθειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, sodium peroxydisulfate 98%, crystalline) (Alfa Aesar)
- ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt 98%, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub> (Alfa Aesar)
- Πρότυπη ουσία Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%, C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>), MW=250,29 g/mol, (Sigma-Aldrich, Germany)
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) (Merck KGaA, Germany)
- Οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH) (Merck KGaA, Germany)

- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) (Chem-Lab NV, Belgium)
- Τριχλωριούχος ένυδρος σίδηρος (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O) (Merck KGaA, Germany)
- Δισθενής ένυδρος θειικός σίδηρος (FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O) (Merck KGaA, Germany)
- Αντιδραστήριο TPTZ (Merck KGaA, Germany)
- Νερό (Fischer-Scientific, UK)
- Ακετονιτρίλιο (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) (Merck KGaA, Germany)
- Φορμικό οξύ (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (LGC Standards, Germany).

### **3.2.2. Εξοπλισμός**

- Ηλεκτρονικός ζυγός (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland).
- Συσκευή υπερήχων Sonoplus HD 4400 (Bandelin Sonoplus, Berlin, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (LaboMed, Los Angeles, USA)
- Πλαστικές κυψελίδες (Kartell, Noviglio, Italy) χωρητικότητας 4,00mL και πάχους εσωτερικής διαμέτρου 1,00cm
- Υδατόλουτρο (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland).
- Υβριδικός φασματογράφος μάζας 3200 QTrap® τριπλού τετραπόλου – παγίδας ιόντων (Sciex, Framingham, USA), πηγής ιοντισμού ESI, σύστημα HPLC1200 Agilent με G1379B απαερωτή, μια G1312A διπλή αντλία, έναν G1329 αυτόματο δειγματολήπτη και μια G1316A στήλη διαχωρισμού (Agilent, Santa Clara, USA).

### **3.3.Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης – Μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken**

Η φύση των βιομορίων και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, όσο και παράγοντες που αφορούν το είδος της εκχύλισης, τον τύπο του διαλύτη, την αναλογία δείγματος – διαλύτη, τον χρόνο εκχύλισης, τον αριθμό των εκχυλίσεων, την θερμοκρασία και το pH αναφέρονται ως μεταβλητές, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της μιας εκχύλισης (Chirinos κ.ά., 2007; He κ.ά., 2007), τόσο η κάθε μία ξεχωριστά όσο και ως σύνολο. Γι' αυτό και η βελτιστοποίηση συνθηκών πολύπλοκων εκχυλίσεων για την παραλαβή των φυτοχημικών συστατικών, όπως είναι η εκχύλιση υπερήχων, είναι απαραίτητη και διευκολύνεται με τον

πειραματικό σχεδιασμό (Design of Experiments, DOE) με την χρήση μαθηματικών και στατιστικών μοντέλων (Wahid & Nadir, 2013).

Η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) είναι ένα μαθηματικό μοντέλο που χρησιμεύει στην στατιστική ανάπτυξη νέων διεργασιών, στη βελτιστοποίηση της απόδοσής τους και στη βελτίωση του σχεδιασμού και της διαμόρφωσης νέων προϊόντων, ελαχιστοποιώντας τον αριθμό πειραματικών επαναλήψεων και αξιολογώντας πολλούς παράγοντες σε ένα μόνο πείραμα. Χρησιμοποιείται ευρέως στην αναλυτική χημεία σε βελτιστοποιήσεις συστημάτων που χρησιμοποιούν τεχνικές υψηλής ενέργειας (Tsiaka κ.ά., 2015), τεχνικές όπως η LC-MS (Hashemi Gahrui κ.ά., 2020) και η GC-MS (Esmaelian κ.ά., 2021) όπως επίσης και σε συστήματα εκχυλίσεων ανθοκυανών (Herrera-Ramirez κ.ά., 2020) και πολυφαινολικών και φαινολικών ενώσεων (Pandey κ.ά., 2018).

Ο σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD) είναι σχεδιασμός επιφάνειας απόκρισης πολύ σημαντικός, καθώς δίνει πληροφορίες για την επίδραση των μεταβλητών του πειράματος όπως και το πειραματικό σφάλμα, με τον ελάχιστο αριθμό πειραματικών επαναλήψεων. Είναι ένας σχεδιασμός τριών κωδικοποιημένων επιπέδων (three-level factorial design), συμμετρικός και περιστροφικός, με 2 μορφές: η (a) η οποία αφορά έναν κύβο, ο οποίος συνίσταται από ένα κεντρικό σημείο και από τα μεσαία σημεία των άκρων και η (b) όπου απεικονίζεται ένα σχήμα ενός κεντρικού σημείου και 3 αλληλοσυνδεόμενων 22 παραγοντικών σχεδίων  $2^2$  (Ferreira κ.ά., 2007). Ο αριθμός πειραμάτων που απαιτούνται για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου σχεδίου ορίζεται από τον τύπο  $N = 2k(k-1) + C_0$ , όπου N: ο αριθμός των πειραματικών εκτελέσεων, k: ο αριθμός των παραγόντων,  $C_0$  ο αριθμός των κεντρικών σημείων). Ο σχεδιασμός Box-Behnken μπορεί να εφαρμοστεί για αριθμό παραγόντων 3 έως 21, ενώ απαιτεί 3 επίπεδα (-1, 0, 1) ανά παράγοντα.

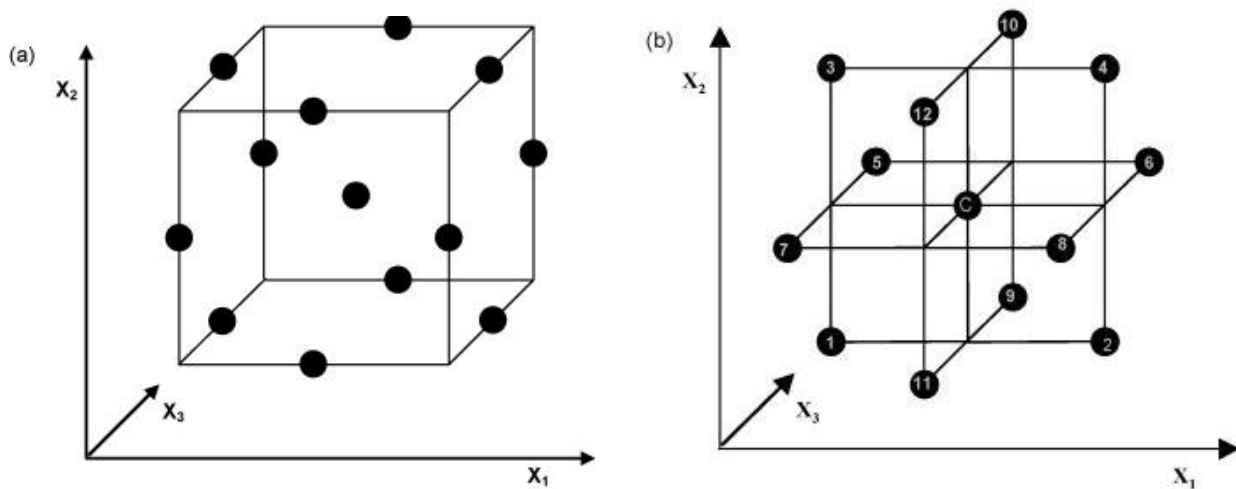
Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα του σχεδιασμού είναι ότι δεν εμφανίζει σημεία στις κορυφές, δηλαδή δεν αποτυπώνει τους παράγοντες στις ακραίες τους συνθήκες, είτε στις χαμηλότερες είτε στις υψηλότερες οι οποίες δεν αποδίδουν συνήθως ικανοποιητικά αποτελέσματα (Beg & Raza, 2021). Το πολυωνυμικό μοντέλο στο οποίο βασίζεται ο σχεδιασμός BBD είναι το:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum \beta_{ij} x_j x_i$$



όπου  $Y$ : η απόδοση του πειράματος (εξαρτώμενη μεταβλητή),  $\beta_0$ : σταθερός όρος της εξίσωσης,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  και  $\beta_{ij}$ : εκτιμώμενοι συντελεστές από το μοντέλο Box-Behnken,  $x_i^2$ ,  $x_i$  και  $x_j$ : τα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών που αντιπροσωπεύουν τις τετραγωνικές, γραμμικές επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις αυτών των μεταβλητών στην απόκριση.

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken και βασίστηκε σε δείγμα παραπροϊόντος *Crocus sativus*. Πιο συγκεκριμένα με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Minitab (version 21.1.0), έγινε συνδυασμός των διαφόρων συνθηκών εκχύλισης σύμφωνα με τα παρακάτω στάδια: Στο πρώτο στάδιο καθορίστηκαν οι 4 παράμετροι εκχύλισης (factors) ως  $x_1$ : ηπεριεκτικότητα αιθανόλης (%),  $x_2$ : ο χρόνος εκχύλισης (min),  $x_3$ : η αναλογία διαλύτη/ υλικού (mL/g) και  $x_4$ : η ισχύς υπερήχων (%), ενώ ακολούθησε η επιλογή 3 επιπέδων τιμών [values: (- 1,0,1)] για κάθε παράγοντα. Ως αποτέλεσμα προέκυψε εφαρμογή των παραπάνω σε ένα συμμετρικό πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken το οποίο αποτελούνταν από 27 πειραματικές εκχυλίσεις (runs), όπως φαίνεται στον πίνακα 4.



Εικόνα 26: (Ferreira et al., 2007) Γραφική αναπαράσταση μορφών σχεδίου Box-Behnken

Πίνακας 4: Πειραματικές τιμές συνθηκών εκχύλισης σύμφωνα με σχεδιασμό Box-Behnken.  
(Σε παρένθεση αναφέρονται τα κωδικοποιημένα επίπεδα τιμών κάθε παράγοντα)

A/A	Περιεκτικότητα αιθανόλης (%)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Αναλογία διαλύτη/υλικού (mL/g)	Ισχύς υπερήχων (%)
1	60 (0)	25 (0)	60 (1)	20 (-1)
2	20 (-1)	25 (0)	60 (1)	50 (0)
3	100 (1)	25 (0)	40 (0)	20 (-1)
4	100 (1)	25 (0)	20 (-1)	50 (0)
5	100 (1)	10 (-1)	40 (0)	20 (-1)
6	60 (0)	40 (1)	40 (0)	50 (1)
7	100 (1)	25 (0)	60 (1)	80 (1)
8	60 (0)	10 (-1)	40 (0)	50 (0)
9	20 (-1)	25 (0)	40 (0)	80 (1)
10	100 (1)	40 (1)	20 (-1)	50 (0)
11	60 (0)	25 (0)	20 (-1)	80 (1)
12	60 (0)	40 (1)	40 (0)	80 (1)
13	60 (0)	10 (-1)	40 (0)	50 (0)
14	100 (1)	25 (0)	40 (0)	50 (0)
15	60 (0)	10 (-1)	20 (-1)	50 (0)
16	60 (0)	10 (-1)	60 (1)	50 (0)
17	60 (0)	25 (0)	40 (0)	80 (1)
18	20 (-1)	40 (1)	40 (0)	50 (0)
19	20 (-1)	25 (0)	20 (-1)	20 (-1)
20	60 (0)	25 (0)	40 (0)	50 (0)
21	60 (0)	25 (0)	40 (0)	20 (-1)
22	20 (-1)	25 (0)	60 (1)	50 (0)
23	100 (1)	10 (-1)	40 (0)	80 (1)
24	60 (0)	40 (1)	60 (1)	50 (0)
25	60 (0)	40 (1)	40 (0)	20 (-1)
26	60 (0)	25 (0)	40 (0)	50 (0)
27	20 (-1)	25 (0)	20 (-1)	50 (0)

Στο δεύτερο στάδιο διεξήχθησαν οι ανωτέρω πειραματικές εκχυλίσεις και μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το οποίο και εκφράστηκε σε mg GAE/100 g δείγματος. Το σχεδιασμένο αυτό πρόγραμμα στην συνέχεια αξιολογήθηκε ως προς την αξιοπιστία του, με βάση τις τιμές των  $R^2$  (συντελεστής παλινδρόμησης) και  $R^2_{adj}$  (διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης). Στην συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το πειραματικό μοντέλο, πρότεινε 3 βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης οι οποίες έχουν στόχο την παραλαβή της μέγιστης δυνατής περιεκτικότητας φαινολικών ουσιών.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν, έδωσε εξίσωση πρόβλεψης για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, πίνακες ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων (analysis of variance, ANOVA), ραβδογράμματα Pareto, διαγράμματα επιδράσεων των παραμέτρων (Main Effects Plot και Interaction Plot) και διαγράμματα δύο διαστάσεων (Contour Plot).

### **3.4. Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τα παραπροϊόντα *Crocus sativus* με την χρήση υπερήχων (Ultrasound - assisted Extraction, UAE)**

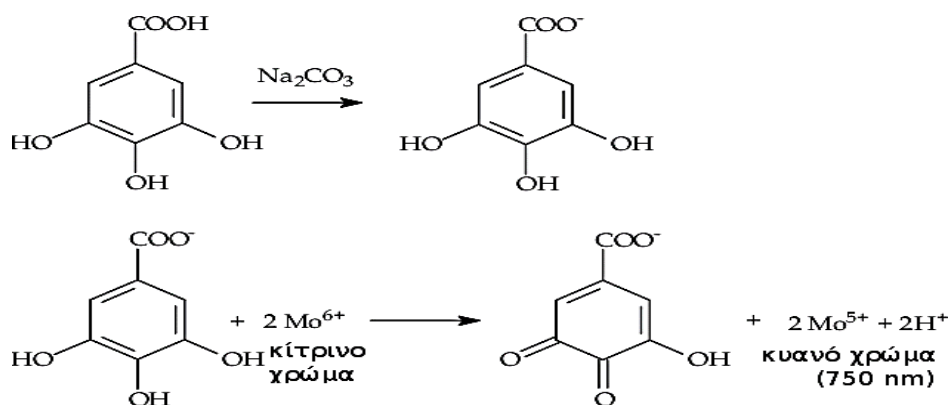
Με σκοπό την εκπόνηση της εργαστηριακής έρευνας ο Αγροτικός Συνεταιρισμός Αρωματικών-Φαρμακευτικών Φυτών και Ωπωροκηπευτικών Βοΐου Κοζάνης (<https://kozaniroses.gr/>), παρέδωσε τα δείγματα κρόκου Κοζάνης του είδους *Crocus sativus*. Πιο συγκεκριμένα δύο διαφορετικά δείγματα παραπροϊόντων καθώς και δείγματος νωπών πετάλων, συγκομίσθηκαν σε ημερομηνίες 9/11, 12/11 και 21/10 του έτους 2022, αντίστοιχα, και αποστάχθηκαν την ίδια μέρα της συλλογής τους. Μετά την παραλαβή τα δείγματα αποθηκεύτηκαν και διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία κατάψυξης στους  $-18^{\circ}\text{C}$  και σε συνθήκες σκότους σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες. Οι υγρασίες για τα νωπά πέταλα και το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν βρέθηκαν 88,46% και 21,28% αντίστοιχα, ενώ το 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν λήφθηκε υπό ξηρή μορφή. Οι παραπάνω 27 εκχυλίσεις που υποδείχθηκαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας παραπροϊόν υγρασίας 86,85% και ημέρας συγκομιδής 7/11/2022. Για το σκοπό αυτό ζυγίστηκε ποσότητα  $0,500 \pm 0,05$  g από το κάθε δείγμα και αναμείχθηκε με τις κατάλληλες ποσότητες απιονισμένου νερού και αιθανόλης. Οι εκχυλίσεις έγιναν σε σύστημα υπερήχων από την εταιρία Bandelin Sonoplus (Berlin, Germany). Πρώτα έγινε προετοιμασία του αισθητήρα υπερήχων με απεσταγμένο νερό ποσότητας 100mL για 15min σε ισχύ 50% (power). Σε όλη τη διάρκεια της εκχύλισης γινόταν καταγραφή της θερμοκρασίας με χρήση θερμοστοιχείων. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των θερμοευαίσθητων συστατικών των δειγμάτων, έγινε χρήση παγόλουτρου. Το εύρος

θερμοκρασιών στο τέλος των εκχυλίσεων κυμάνθηκε από 7 έως 38 °C. Έπειτα από κάθε εκχύλιση, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στα 3500 rpm για 15 λεπτά. Κατόπιν, έγινε λήψη του υπερκείμενου δείγματος και ακολούθησε προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu. Από τις μετρήσεις αυτές, βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης και οι συνθήκες εκχύλισης που έδωσαν την ελάχιστη, τη μέση και τη μέγιστη ποσότητα ολικών φαινολικών συστατικών για τα δείγματα των δύο παραπροϊόντων και των νωπών πετάλων.

### 3.5. Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις

#### 3.5.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin–Ciocalteu (Total Phenolic Content, TPC)

Η δοκιμή Folin–Ciocalteu αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδο με στόχο τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά (TPC). Αρχικά, αυτή η μέθοδος αναπτύχθηκε για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της τυροσίνης (1972), ενός φαινολικού μη απαραίτητου αμινοξέος (Attard, 2013).



Εικόνα 34: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός  $e^-$

Η μέθοδος Folin–Ciocalteu συνιστά μια αναγνωρισμένη, ευαίσθητη και απλή μέθοδο, χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερος εξοπλισμός και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών σε εκχυλίσματα φυτών, τρόφιμα και ποτά (Vázquez et al., 2015).

### Αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu's Phenol reagent (200  $\mu\text{L}$ )
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (500  $\mu\text{L}$ )
- Απεσταγμένο νερό
- Πρότυπη φαινολική ουσία Γαλλικό οξύ (gallic acid)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητα

Η πορεία του πειράματος έχει ως εξής: τοποθέτηση μέσω σύριγγας και σιφωνίου κατάλληλη ποσότητα προτύπου ή δείγματος, απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και αντιδραστήριο F-C σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL.

Πίνακας 5: Όγκος ( $\mu\text{L}$ ) δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της μεθόδου F-C

	Παραπροϊόν 9/11/22 ( $\mu\text{L}$ )	Παραπροϊόν 12/11/22 ( $\mu\text{L}$ )	Φυτό ( $\mu\text{L}$ )
<b>MAX</b>	80	80	80
<b>MIN</b>	80	150	120
<b>ΜΕΣΑΙΑ</b>	80	150	120
<b>OPTIMUM</b>	50	40	80

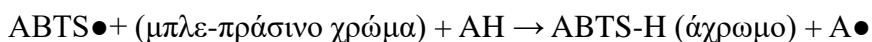
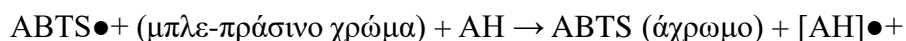
Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και τοποθέτηση σε σκότος για 8 min. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται. Έπειτα, οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 min σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας  $40^\circ\text{C}$ .

Αφότου αναπτυχθεί το επιθυμητό μπλε χρώμα και το περιεχόμενο των κυψελίδων αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε γίνεται μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο με απορρόφηση στα 750 nm ( $A_{750\text{nm}}$ ) για κάθε δείγμα ή πρότυπο. Παράλληλα, μετρήθηκε «τυφλό» δείγμα για τη διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης, το οποίο παρασκευάζεται με αρχική ανάμειξη 2500  $\mu\text{L}$  απεσταγμένου νερού και 200 mL αντιδραστηρίου F-C. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με απεσταγμένο νερό. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε γραφικά πρότυπη καμπύλη με εξίσωση  $y=0,0005x + 0,0783$  και συντελεστή  $R^2 = 0,9989$ , από την οποία υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του κάθε δείγματος εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ως mg GAE/ 100g ξηρού δείγματος.

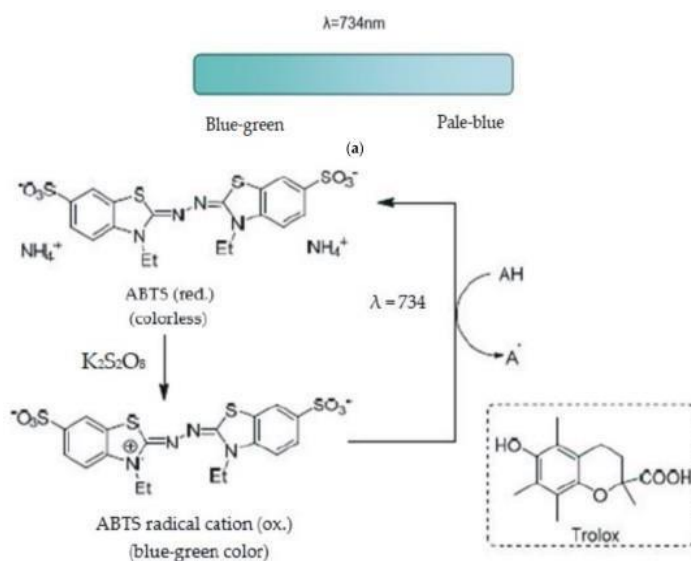
### 3.5.2. Προσδιορισμός ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS•+ [2,2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic acid)]

Η δοκιμή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Miller και την ομάδα του (1993) ως μια απλή και εύκολη μέθοδος για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τη σταθερή ρίζα [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] (ABTS•+), του οποίου η ένταση μειώνεται με την παρουσία αντιοξειδωτικών. Παρατηρείται ένας αποχρωματισμός του μπλε-πράσινου χρώματος, που παρουσιάζεται ως ξαφνική πτώση της απορρόφησης στα 734 nm και ο βαθμός αυτού εξαρτάται από τη διάρκεια της αντίδρασης, την εγγενή αντιοξειδωτική δράση καθώς και τη συγκέντρωση του δείγματος (Munteanu & Apetrei, 2021).



#### Αντιδραστήρια:

- Ρίζα ABTS•+ (7,00 mM)
- Υπερθειικό νάτριο Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM)
- Απεσταγμένο νερό
- Πρότυπη ουσία Trolox
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (0,006 M)



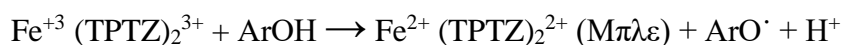
Εικόνα 35: (Munteanu & Apetrei, 2021b) Διακόμανση χρώματος στη δοκιμασία ABTS (α). Σχέδιο αντίδρασης που εμπλέκεται το [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] για δοκιμασία δραστηριότητας δέσμευσης κατιόντων ριζών οξέος (ABTS)

Αρχικά, τοποθετήθηκαν μέσω σύριγγας και σιφωνίου, κατάλληλος όγκος δείγματος με 5400  $\mu\text{L}$  αραιωμένου διαλύματος  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  σε πλαστικές κυψελίδες χωρητικότητας 4,0 mL, και αναδεύτηκαν στο σκοτάδι για 1 min. Η απορρόφηση  $A_{734\text{nm}}$  μετρήθηκε μετά από 5 min και σε  $t=T_{\text{plateau}}$  όπου και παρατηρείται το ελάχιστο της απορρόφησης. Τέλος, υπολογίστηκε μέσω «τυφλών» δειγμάτων το αρνητικό σφάλμα που προκλήθηκε στις τιμές της απορρόφησης από τον όγκο των διαλυτών των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας.

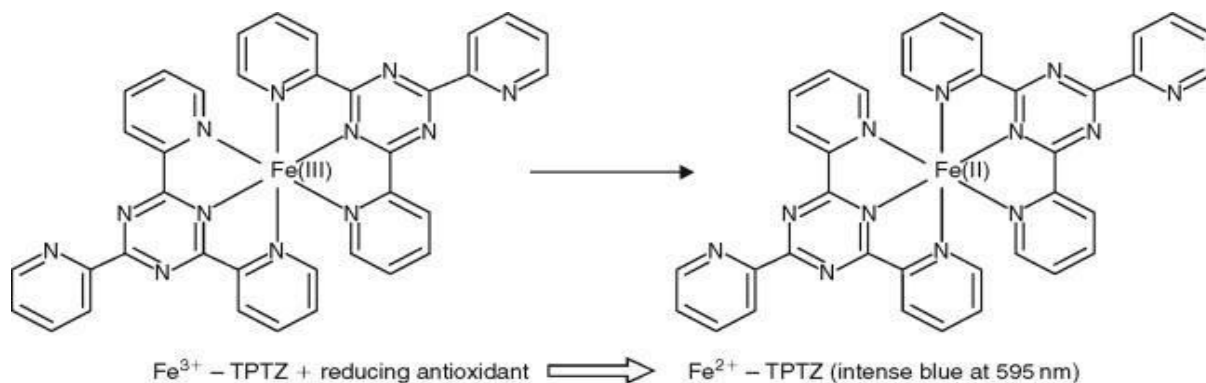
Τα αποτελέσματα για την εκτίμηση της αντιριζικής δραστηριότητας των δειγμάτων ως προς τη ρίζα  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  εκφράζονται ως η συγκέντρωση αυτών σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) ως mg TE/g ξηρού δείγματος και προσδιορίζεται με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης συσχέτισης με εξίσωση  $y=0,2876x - 0,002$  και συντελεστή  $R^2=0,9995$ .

### 3.5.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας/ αναγωγικής ισχύος έναντι του τρισθενούς σιδήρου – Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing/ Antioxidant Power)

Η διαδικασία FRAP είναι μια απλή, εύκολη, οικονομική και αυτοματοποιημένη φωτομετρική μέθοδος που δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, και δίδει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα αναφορικά με την αντιοξειδωτική ισχύ δείγματος τροφίμου. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα ως εξής:



όπου:  $\text{ArOH}$ =φαινολικό αντιοξειδωτικό,  $\text{TPTZ}$ =2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη



Εικόνα 36: Αντίδραση δοκιμής FRAP

### **Αντιδραστήρια:**

- Ρυθμιστικό διάλυμα (ΡΔ) CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa (300mM, pH=3,6)
- Διάλυμα HCl (40mM)
- Διάλυμα 2,4,6-τρις(2-πυριδυλο)-s-τριαζίνης (TPTZ) (10mM)
- Πρότυπα διαλύματα Fe<sup>+2</sup> (50-1800μM)
- Διάλυμα FRAP (200,00mL ΡΔ, 20,00mL FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O 20mM, 20,00 mL TPTZ)

Η πειραματική πορεία έχει ως εξής: σε πλαστικές κυψελίδες χωρητικότητας 4mL με την χρήση μικροσύριγγας τοποθετούνται 50μL δείγματος ή προτύπου H<sub>2</sub>O (τυφλού), 1950 μL απεσταγμένου H<sub>2</sub>O, 900 μL διαλύματος FRAP και τελικά 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος. Στην συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση του μίγματος και παραμονή του σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37οC υπό συνθήκες σκότους για 90 min. Μετά το πέρας της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του έγχρωμου συμπλόκου σε μήκος κύματος ίσο με 595nm με χρήση φασματοφωτομέτρου. Τέλος, με στόχο την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας.

Τα τελικά αποτελέσματα προκύπτουν από την σύγκριση των τιμών απορρόφησης στα 595nm σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία έχει εξίσωση  $y=0,0003x + 0,0081$  και συντελεστή  $R^2=0,9969$  και εκφράζονται σε mg Fe<sup>+2</sup>/ g ξηρού δείγματος.

### **3.6. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS)**

Η υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας είναι μια πολύ χρήσιμη τεχνική που χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία για την ταυτοποίηση πληθώρας ενώσεων, καθώς και φαινολικών ουσιών. Αποτελεί τον συνδυασμό της υγρής χρωματογραφίας (HPLC), η οποία προσφέρει τον διαχωρισμό ουσιών από πολύπλοκα φυσικά ή τεχνητά μίγματα με την φασματομετρία μάζας (MS), η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό των συστατικών με μοριακή ειδικότητα και ευαισθησία ανίχνευσης, ιονίζοντας το διαχωριζόμενο διάλυμα, αποδίδοντας μια τιμή μοριακού βάρους για κάθε συστατικό της κορυφής (McMaster, 2005). Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής LC-MS/MS βασίζεται στην θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος σε διακριτά



θυγατρικά ιόντα τα οποία δύναται να ταυτοποιηθούν αλλά και να ποσοτικοποιηθούν. Η ανάπτυξη του επαναστατικού αυτού συστήματος εντοπίζεται στην αρχή της δεκαετίας του 1980 ενώ σήμερα βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε πολλούς τομείς της επιστήμης και της έρευνας, όπως είναι η ανάλυση και μελέτη δειγμάτων τροφίμων και περιβαλλοντικών ρύπων, η πρωτεωμική ανάλυση και η φαρμακευτική, αγροχημική και καλλυντική βιοτεχνολογία (Barceló & Petrovic, 2007; Ciclet κ.ά., 2018).

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων προτιμάται η χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και αντίστροφης φάσης συνδυαστικά με φασματομετρία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό αρνητικής λειτουργίας (LC-ESI(-)-MS/MS) (Naim κ.ά., 2022). Η τεχνολογία ESI η οποία είναι και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για τα βιολογικά μόρια, χαρακτηρίζεται ως ήπια μορφή ιοντισμού, καθώς απαιτεί μικρό ποσό ενέργειας και δημιουργεί μικρά θραύσματα σε πολικά μόρια, σε αντίθεση παραδείγματος χάρη με την πηγή κρούσης ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται κατά κόρον στην τεχνική της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Η λειτουργία της πηγής ιόντων μπορεί να είναι είτε θετική (positive ion mode) είτε αρνητική (negative ion mode). Σε αντιστοιχία, η πρώτη λειτουργία εξυπηρετεί στην προσθήκη  $[M+H]^+$  πρωτονίου στο μόριο του αναλύτη ή αλλιώς με προϋπόθεση την παρουσία αλάτων στον μηχανισμό προσθήκης μεταλλοκατιόντων ή ιόντων αμμωνίας (π.χ.  $M+NH_4^+$ ,  $M+Na^+$ ,  $M+K^+$ ), ενώ η δεύτερη λειτουργία στην απώλεια πρωτονίου  $[M-H]^-$  ή στην προσθήκη κατιόντων στο μόριο (π.χ.  $M+οξικό^-$ ,  $M+μεθανικό^-$ ).

Στη συγκεκριμένη έρευνα έγινε χρήση οργανολογίας LC-MS/MS, που απαρτίζεται από υβριδικό φασματογράφο μάζας 3200 QTrap® τριπλού τετραπόλου – παγίδας ιόντων (SCIEX Company), πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού ESI (-), καθώς και από σύστημα 1200 HPLC το οποίο συμπεριλαμβάνει δυαδική αντλία τύπου G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη τύπου G1329 ,απαερωτή τύπου G1379B, και τέλος στήλη διαχωρισμού τύπου G1316A (AGILENT, Santa Clara, USA). Έγινε χρήση στήλης αντίστροφης φάσης Agilent Eclipse Plus C-18, χαρακτηριστικής εσωτερικής διαμέτρου 50mm x 2,1mm και μεγέθους σωματιδίων 3,5μm. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν για την κινητή φάση ήταν αρχικά νερό - 0,2% (v/v) φορμικό οξύ (φορμικό οξύ, FA) ως διαλύτης A και ακετονιτρίλιο – 0,1% (v/v) φορμικό οξύ ως διαλύτης B. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 25 °C και ο όγκος ένεσης πρότυπων ενώσεων και δειγμάτων ήταν 5 μL. Τα εκχυλίσματα εκλούστηκαν και διαχωρίστηκαν με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης:

Πίνακας 6: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης φαινολικών ουσιών με την χρήση συστήματος LC-MS/MS

Χρόνος (min)	Ακετονιτρίλιο – 0,1% (v/v) φορμικό οξύ (διαλύτης B)	Ρυθμός ροής κινητής φάσης (μL/min)
0,00	10%	300
0,50	10%	300
4,00	20-30%	300
4,10	30-50%	350
4,50	50-65%	350
5,10	65-100%	350
7,00	65-100%	350
8,00	100%	300
9,00	100%	300
9,10	100-10%	300
15,00	10%	300

Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση των ξηρών υπολειμμάτων των δειγμάτων σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης – φορμικού οξέος 0,1% v/v, και πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα LC-MS/MS φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων πολυεστέρα (PET) (διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,45 μm). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βαθμού καθαρότητας LC-MS (Kritsi κ.ά., 2023).

Αναφορικά με την πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), έγινε χρήση αρνητικού ιοντισμού για όλες τις υπό προσδιορισμό ουσίες και σάρωση θυγατρικού ιόντος (product ion scan) σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple monitoring reaction, MRM). Πραγματοποιήθηκε EMS σάρωση των ιόντων (enhanced mass spectrum) και IDA (information dependent acquisition) - triggered MS/MS πειράματα, με εύρος ανάλυσης 5ppm για κάθε m/z, με σκοπό την θραυσματοποίηση των βιοδραστικών και ειδικότερα των φαινολικών ενώσεων, που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα καθώς και την ταυτοποίησή τους.

Πίνακας 7: (Kritsi κ.ά., 2023) Συνθήκες για ESA και IDA πειράματα

MS/MS Συνθήκες	
Παράμετροι	Τιμές Παραμέτρων
<i>Enhanced mass spectrum (EMS) survey scan mass range</i>	100 to 700 amu at a time of 0.1513 s
<i>Scan rate (amu/s)</i>	4000
<i>Curtain gas (psi)</i>	30
<i>CAD gas (psi)</i>	Medium (EMS)/High (IDA)
<i>Αέριο Εκνέφωσης Gas 1 (psi)</i>	45
<i>Gas 2 (psi)</i>	45
<i>Ion spray needle voltage (V)</i>	-4500
<i>Declustering potential (V)</i>	-30
<i>Entrance potential (V)</i>	-7.5
<i>Collision energy (V)</i>	-10 (EMS)/-30 (IDA)
<i>C2B</i>	-300 (EMS)/-450 (IDA)
<i>IPA threshold for EPI experiments</i>	10000 counts
<i>Peak selected for the EPI scan</i>	Two most intense peaks
<i>Q1 resolution</i>	Low
<i>Collision energy spray EPI</i>	10
<i>EPI scans mass range</i>	50-700amu
<i>Linear ion trap (LIT) dynamic fill time (ms)</i>	250
<i>EPI scan rate (amu/s)</i>	1000

Τέλος, το λογισμικό Analyst 1.6. (SCIEX, USA) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων από τα φάσματα που προέκυψαν λαμβάνοντας υπόψιν τα πρότυπα, τους χρόνους έκλυσης, τα μέγιστα μήκη κύματος, τη φασματομετρία μάζας με ανεκτικότητα 5ppm ανά κορυφή και τα βιβλιογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν.

### 3.7. Στατιστική Ανάλυση

Στην συγκεκριμένη μελέτη, η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό λογισμικό Minitab (version 21.1.0). Οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε πρόγραμμα ANOVA (Analysis of Variance), σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και τιμές  $p$ -value  $\leq 0,05$ .

Η τιμή  $p$ -value, αποτελεί δείκτη στατιστικής σημαντικότητας και καθορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης. Δηλαδή σε ορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, αν δοθεί τιμή  $p$  ενός παράγοντα μικρότερη του 5% (0,05) τότε ο παράγοντας αυτός θεωρείται στατιστικά σημαντικός και επηρεάζει το αποτέλεσμα του πειράματος.

Ο συντελεστής παλινδρόμησης ( $R^2$ , Determination coefficient), ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ  $0 \leq R^2 \leq 1$  ή αλλιώς  $0 \leq R^2 \leq 100\%$ , εκφράζει το ποσοστό διασποράς που εμφανίζει το μοντέλο. Η αξιοπιστία του μοντέλου αυξάνει, καθώς πλησιάζει ο παράγοντας την μονάδα (100%).

Τέλος ο διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης ( $R^2_{adj}$ , Adjusted determination coefficient), καθορίζει την προσαρμοστικότητα του μοντέλου. Η τιμή του αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών. Το μοντέλο μπορεί να χαρακτηριστεί επαρκές με  $R^2_{adj} > 80\%$ , και διαφορά  $R^2 - R^2_{adj} < 20\%$  (0,02) (Παπαγεωργίου Έφη,2017).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### 4.1.Βελτιστοποίηση Εκχύλισης με Υπερήχους – Πειραματικός Σχεδιασμός

Μετά την εκχύλιση των δειγμάτων με υπερήχους, σύμφωνα με τις συνθήκες που υπέδειξε το πρόγραμμα του πειραματικού σχεδιασμού, ακολούθησε η μέθοδος Folin-Ciocalteu, με την βοήθεια της οποίας μετρήθηκαν οι μέσες τιμές περιεκτικότητας του ολικού φαινολικού περιεχομένου του κάθε δείγματος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων *Crocus sativus*

Αριθμός Εκχύλισης	Μέση περιεκτικότητα φαινολικού περιεχομένου (mg GAE/100 g ξηρού δείγματος)
1	1876 ± 246
2	3184 ± 235
3	1397 ± 172
4	2844 ± 60
5	1428 ± 92
6	2821 ± 136
7	2474 ± 249
8	3400 ± 112
9	2421 ± 91
10	3288 ± 84
11	3687 ± 158
12	3357 ± 1284
13	815 ± 587
14	2121 ± 29
15	2107 ± 231
16	2284 ± 156
17	2524 ± 321
18	3118 ± 332
19	3237 ± 155
20	2422 ± 123
21	3759 ± 263
22	1064 ± 266
23	3874 ± 720
24	2618 ± 635
25	2979 ± 49
26	2776 ± 212
27	3812 ± 80

Το εύρος των τιμών της μέσης περιεκτικότητας φαίνεται ότι είναι 815-3874 mg GAE/ 100g ξηρού δείγματος (δείγμα 13 και 23 αντίστοιχα) . Το δείγμα 13, το οποίο εκχύλισε την μικρότερη ποσότητα φαινολικών, πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες: 100% αιθανόλη, 10 λεπτά χρόνος

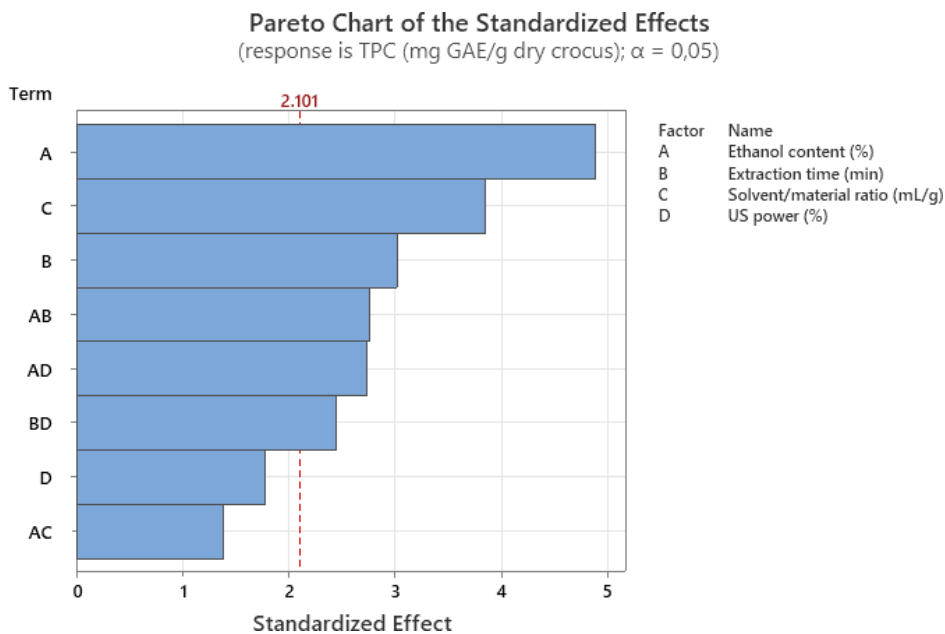
εκχύλισης, 40/1 αναλογία διαλύτη/ υλικού και 50% ισχύς υπερήχων, ενώ οι αντίστοιχες συνθήκες για το εκχύλισμα 23 με τα περισσότερα φαινολικά ήταν: 60% αιθανόλη, 10 λεπτά χρόνος εκχύλισης, 40/1 αναλογία διαλύτη/ υλικού και 80% ισχύς υπερήχων. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις έχουν τα δείγματα 1, 3, 5, 13 και 22, ενώ αντίστοιχα υψηλότερες τα δείγματα 8, 11, 21, 23 και 27.

Από τα παραπάνω δεδομένα, προέκυψαν με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Minitab, ο συντελεστής παλινδρόμησης  $R^2$  του συγκεκριμένου σχεδιασμού ο οποίος βρέθηκε ίσος με 83,00%, τιμή ικανοποιητική και σχετικά κοντά στο επιθυμητό 100%, και ο διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης  $R^2_{adj}$ , ίσος με 75,44%. Η διαφορά τους βρέθηκε μικρότερη από 20% (7,56%) και συνεπώς το μοντέλο κρίνεται επαρκές και αξιόπιστο. Ωστόσο  $R^2_{pred}$  βρέθηκε ίσος με 56,61%, μια μεσαία τιμή ως προς την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, όχι πολύ ικανοποιητική.

Πίνακας 9: Σύνοψη Μοντέλου (Model Summary) πειραματικού σχεδιασμού με βάση το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων

$R^2$	$R^2_{adj}$	$R^2_{pred}$
83,00%	75,44%	56,61%

Ακολουθούν τα δεδομένα που δόθηκαν αναφορικά με την σημαντικότητα των μεταβλητών στο συγκεκριμένο πείραμα, καθώς και η διαγραμματική τους αναπαράσταση στο ραβδόγραμμα Pareto.

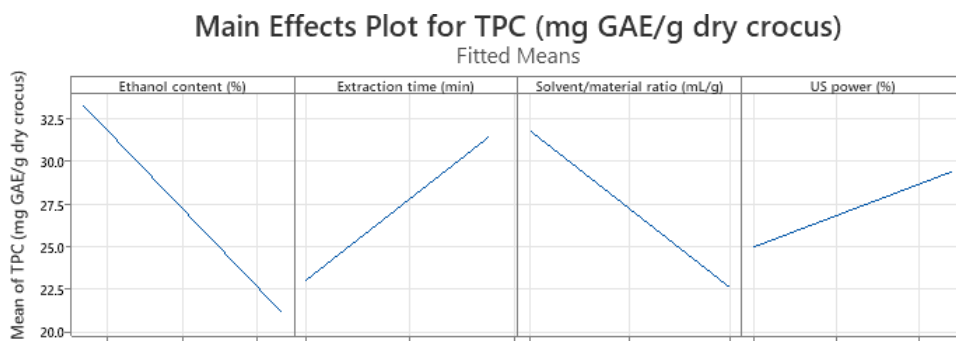


Γράφημα 1: Ραβδόγραμμα Pareto για εκχύλιση φαινολικών ουσιών

Παρουσιάζονται με σειρά σημαντικότητας οι μεταβλητές, που εμφανίζουν τιμή  $p \leq 0,05$  όπως ανέδειξε το πρόγραμμα ANOVA, και έχουν ως εξής: 1) περιεκτικότητα αιθανόλης ( $x_1$ ,  $p=0,000$ ), 2) αναλογία διαλύτη/ υλικού ( $x_3$ ,  $p=0,001$ ) 3) χρόνος εκχύλισης ( $x_2$ ,  $p=0,017$ ), 4) περιεκτικότητα αιθανόλης-χρόνος εκχύλισης ( $x_1*x_2$ ,  $p=0,013$ ), 5) περιεκτικότητα αιθανόλης-ισχύς υπερήχων ( $x_1*x_4$ ,  $p=0,014$ ) και 6) χρόνος εκχύλισης-ισχύς υπερήχων ( $x_2*x_4$ ,  $p=0,025$ ). Οι παράγοντες της ισχύος υπερήχων ( $x_4$ ,  $p=0,092$ ) και της αναλογίας διαλύτη (αιθανόλης) / υλικού ( $x_1*x_3$ ,  $p=0,182$ ), εμφανίζουν τιμή  $p$  μεγαλύτερες του 0,005 και επομένως δεν θεωρούνται σημαντικές, και αυτό σημαίνει ότι τυχόν μεταβολές στις τιμές τους δεν επιφέρουν κάποια σημαντική αλλαγή στον μετρήσιμο παράγοντα της συγκεκριμένης εκχύλισης, που στο εν λόγω πείραμα είναι το φαινολικό περιεχόμενο.

Συνδυάζοντας τις παραπάνω πληροφορίες, εξάγεται η εξίσωση πρόβλεψης, η οποία συμπεριλαμβάνει όλους τους παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις τους και έχει την μορφή:

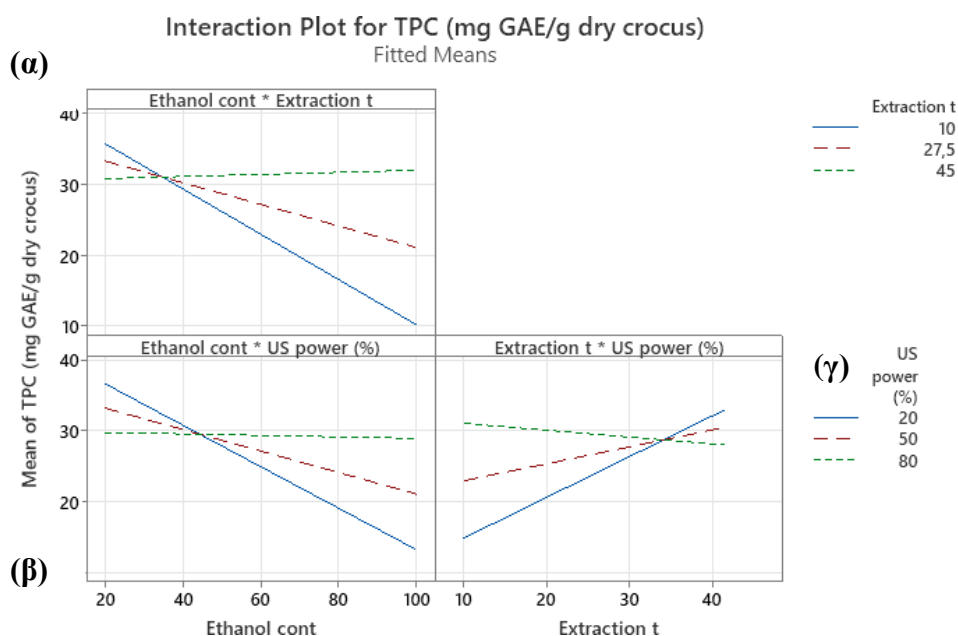
$$\begin{aligned} \text{TPC (mg GAE/g dry crocus)} = & 40,9 - 0,505 \text{ περιεκτικότητα αιθανόλης (\%)} \\ & + 0,231 \text{ χρόνος εκχύλισης (min)} \\ & - 0,014 \text{ αναλογία διαλύτη/υλικού (mL/g)} \\ & + 0,100 \text{ ένταση υπερήχων (\%)} \\ & + 0,00950 \text{ περιεκτικότητα αιθανόλης (\%)*χρόνος εκχύλισης (min)} \\ & - 0,00359 \text{ περιεκτικότητα αιθανόλης (\%)*αναλογία διαλύτη/υλικού (mL/g)} \\ & + 0,00471 \text{ περιεκτικότητα αιθανόλης (\%)*ένταση υπερήχων (\%)} \\ & - 0,01123 \text{ χρόνος εκχύλισης (min)*ένταση υπερήχων (\%)} \end{aligned}$$



Γράφημα 2: Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των 4 παραγόντων στην ποσότητα των εκχυλιζόμενων φαινολικών ουσιών



Το παραπάνω γράφημα καταδεικνύει την γραμμικότητα στην σχέση που εμφανίζουν οι 4 σημαντικοί παράγοντες της εκχύλισης, δηλαδή η περιεκτικότητα της αιθανόλης (% ,  $x_1$ ), ο χρόνος της εκχύλισης (min,  $x_2$ ), η αναλογία διαλύτη/ υλικού (mL/g,  $x_3$ ) και τέλος η ισχύς των υπερήχων (% ,  $x_4$ ) περιλαμβάνοντας τις ακραίες τιμές, δηλαδή την χαμηλότερη και την υψηλότερη, στις οποίες ελέγχθηκαν. Πιο συγκεκριμένα για την περιεκτικότητα της αιθανόλης, φαίνεται πως καθώς αυξάνεται, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώνεται, και το ίδιο ισχύει και για την αναλογία διαλύτη/ υλικού. Την αντίστροφη σχέση φαίνεται να εμφανίζει η ισχύς των υπερήχων, οι τιμές της οποίας καθώς αυξάνονται, αυξάνεται και η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος, όπως συμβαίνει και με τον χρόνο της εκχύλισης.



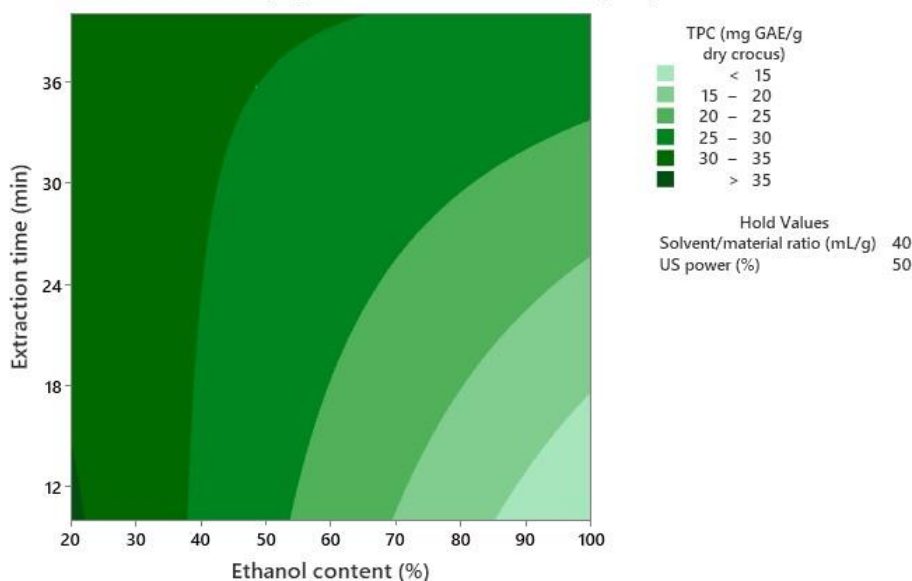
Γράφημα 3: Γραφική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των παραγόντων στην ποσότητα των εκχυλιζόμενων φαινολικών ουσιών

Στο παραπάνω γράφημα γίνεται συνδυαστική σύγκριση των παραμέτρων ανά δύο, αναφορικά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που εκχυλίζεται. Στο πάνω αριστερά γράφημα (α) παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζεται μεγαλύτερο σε χρόνο εκχύλισης 10min και περιεκτικότητα αιθανόλης 20%, πορεία που εμφανίζει απότομα μειούμενη κλίση με την αύξηση της περιεκτικότητας. Αντίστοιχη συμπεριφορά εμφανίζει ο χρόνος εκχύλισης 25min σε όλες τις περιεκτικότητες αιθανόλης, με μικρότερη όμως κλίση, ενώ τελικά το φαινολικό

περιεχόμενο παρουσιάζεται σχεδόν σταθερό σε χρόνο 45min σε όλες τις περιεκτικότητες. Στο κάτω αριστερά διάγραμμα (β) την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά φαίνεται να παρουσιάζουν οι υπέρηχοι σε ισχύ 20% και σε περιεκτικότητα αιθανόλης 20%, όπου η ευθεία παρουσιάζει απότομα μειούμενη κλίση. Η ευθεία της ισχύος υπέρηχων ρυθμισμένη σε 50% παρουσιάζει αντίστοιχη πορεία, ώστε τελικά η ισχύς 80% να αποδίδει σχεδόν ίδιες περιεκτικότητες φαινολικών σε κάθε εκτιμώμενη περιεκτικότητα αιθανόλης. Τέλος, το γράφημα κάτω δεξιά (γ), καταδεικνύει την αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ισχύος των υπέρηχων. Όπως φαίνεται σε ισχύ υπέρηχων 20%, με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, υπάρχει και αύξηση στην περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών, φτάνοντας στο μέγιστο στα 45min. Αντίστοιχη πορεία ακολουθεί η ευθεία που χαρακτηρίζει την ισχύ 50% των υπέρηχων, ενώ αντίστροφη πορεία διαγράφει η ισχύς υπέρηχων στο 80%, η οποία βαίνει μειούμενη, συναρτήσει της αύξησης του χρόνου εκχύλισης, χωρίς να υπάρχει μεγάλη μεταβολή όμως στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Τα διαγράμματα Contour plot που ακολουθούν στην συνέχεια, μπορούν και συνδυάζουν τις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, με την αναπαράσταση των αποτελεσμάτων σε περιοχές διαφορετικού χρώματος αναφορικά με την επιλεγμένη απόκριση. Οι διαφορετικές χρωματικές ζώνες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ολικού φαινολικού περιεχομένου και η διαβάθμιση έχει ως εξής: σκούρο πράσινο μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαινολικών, με σταδιακή διαβάθμιση μέχρι σκούρο μπλε, χρώμα που υποδεικνύει την μικρότερη περιεκτικότητα

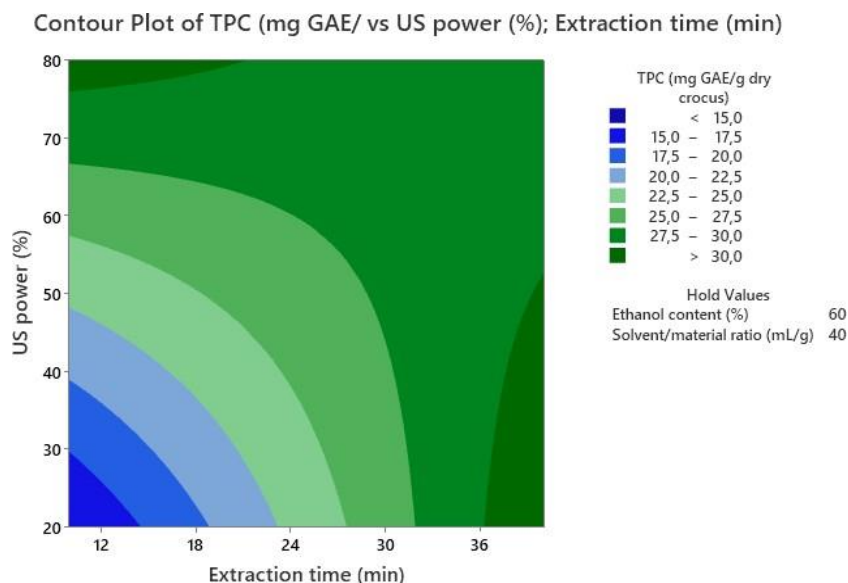
Contour Plot of TPC (mg GAE/ vs Extraction time (min); Ethanol content



Γράφημα 11: Contour plot - αναλογία περιεκτικότητας αιθανόλης και χρόνου εκχύλισης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

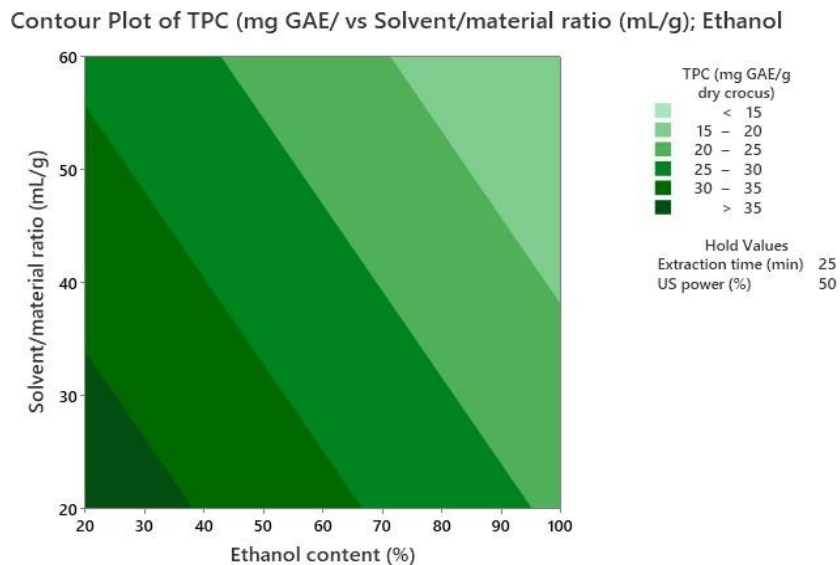
φαινολικών.

Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης με την περιεκτικότητα της αιθανόλης. Ως ιδανική περιοχή για την εκχύλιση των φαινολικών εμφανίζεται εκείνη με συνθήκες 10min και περιεκτικότητας αιθανόλης 20%.



Γράφημα 12: Contour plot - ισχύς υπερήχων και χρόνο εκχύλισης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Στο δεύτερο διάγραμμα μελετάται ο συνδυασμός της ισχύος υπερήχων με τον χρόνο εκχύλισης, και βρίσκεται ότι τα καλύτερα αποτελέσματα αποδίδονται σε δύο διαφορετικές περιοχές. Ο πρώτος συνδυασμός περιγράφει ισχύς υπερήχων 80% με 10-12min εκχύλιση, και ο δεύτερος ισχύς υπερήχων 50% με χρόνο εκχύλισης 40min.



Γράφημα 13: Contour plot - αναλογία διαλύτη/ υλικού και περιεκτικότητας αιθανόλης αναφορικά με την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Στο τελευταίο διάγραμμα Contour Plot, αναπαρίσταται η σχέση της αναλογίας διαλύτη/ υλικού με την περιεκτικότητα αιθανόλης και αποδεικνύεται ότι ο βέλτιστος συνδυασμός αφορά αναλογία 20% και περιεκτικότητα 20%.

Ως συνολικό συμπέρασμα προκύπτει ότι οι βέλτιστες συνθήκες, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό, για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου περιλαμβάνει αναλογία διαλύτη/ υλικού 20%, περιεκτικότητα αιθανόλης 20%, ενώ δύο ικανοποιητικές τιμές ισχύουν για την ισχύ υπερήχων, δηλαδή 50% και 80% για αντίστοιχους χρόνους 40min και 10min, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει γιατί η αλληλεπίδραση των παραγόντων της ισχύος των υπερήχων με τον χρόνο εκχύλισης είναι στατιστικά σημαντική, όπως βρέθηκε και στο διάγραμμα Pareto.

Με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Minitab, προτάθηκαν 3 διαφορετικοί συνδυασμοί συνθηκών για την βέλτιστη εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Πιθανοί συνδυασμοί βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης φαινολικών όπως προέκυψαν από τον Πειραματικό σχεδιασμό

	Περιεκτικότητα Αιθανόλης (%)	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Ισχύς υπερήχων (%)	Αναλογία διαλύτη/ υλικού (mL/mg)	TPC (mg GAE/100g ξηρού δείγματος)
1	20	40	20	20	4087
2	100	40	80	20	3997
3	20	10	80	20	3987

Όπως φαίνεται, και οι 3 προτεινόμενοι συνδυασμοί συμφωνούν στην αναλογία διαλύτη/ υλικού η οποία είναι 20%. Επίσης δύο από τους τρεις συνδυασμούς χρησιμοποιούν 20% περιεκτικότητα αιθανόλης, σε αντίθεση με το 100% που επιλέγεται στον δεύτερο συνδυασμό, και στις συνθήκες αυτές διαφέρει η επιλεγείσα ισχύς υπερήχων και είναι 20% και 80%, όπως και ο χρόνος εκχύλισης, ο οποίος είναι 40min και 10min. Από το πρώτο διάγραμμα Contour Plot, επιβεβαιώθηκε ότι η 20% περιεκτικότητα αιθανόλης επιφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα και μάλιστα σε χρόνο 10min, ενώ το δεύτερο διάγραμμα έδωσε για χρόνο 10min βέλτιστα

αποτελέσματα σε συνδυασμό με ισχύ υπερήχων 80%. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι οι αναμενόμενες τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου είναι σημαντικά κοντά με αποτέλεσμα να μην τίθεται θέμα διαφοροποίησης των συνθηκών αυτών αναλογικά με τον συγκεκριμένο παράγοντα. Επομένως ως συνθήκες για την βέλτιστη εκχύλιση φαινολικών επιλέχθηκε η 3<sup>η</sup>, όπου περιλαμβάνει συγκεκριμένα 20% περιεκτικότητα αιθανόλης, 10 min χρόνο εκχύλισης, 80% ισχύ υπερήχων και 20% αναλογία διαλύτη υλικού.

#### **4.2. Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις που αφορούν το Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (TPC, δοκιμή Folin-Ciocalteu), την αντιριζική δράση (δοκιμή) ABTS•+) και την αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμή FRAP)**

Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό, ακολούθησε η εκχύλιση των δύο παραπροϊόντων (9/11 και 12/11) καθώς και των νωπών πετάλων στις βέλτιστες συνθήκες, καθώς και στις συνθήκες που αντιστοιχούσαν σε ελάχιστη, μέγιστη και μεσαία τιμή φαινολικών ουσιών από τον πρώτο κύκλο 27 εκχυλίσεων. Αυτές οι εκχυλίσεις αφορούν τις συνθήκες που επικράτησαν στα πειράματα 13, 23 και 20 του Πίνακα 8 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στα παρακάτω αποτελέσματα, υπάρχει μεγάλη διαβάθμιση στις τιμές των φαινολικών που μετρήθηκαν τόσο μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων όσο και μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης που είχαν επιλεγθεί. Μια πρώτη παρατήρηση αφορά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο το οποίο εντοπίζεται μεγαλύτερο στο 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν (799,2 mg GAE/ 100g ξηρού προϊόντος), ακολούθως στα τέπαλα (398,5 mg GAE/ 100g ξηρού προϊόντος ) και τέλος στο 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν (90,2 mg GAE/ 100g ξηρού προϊόντος). Τα αποτελέσματα των δώδεκα νέων εκχυλίσεων είναι τα εξής:

Πίνακας 11: Πίνακας αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μετρήσεων

Δείγμα	TPC (mg GAE/100g ξηρού δείγματος)	ABTS•+ (mg TE/g ξηρού δείγματος)	FRAP (mg Fe <sup>+2</sup> / g ξηρού δείγματος)
1 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Χαμηλό TPC	591,1 ± 28,5	47,3 ± 1,8	44,0 ± 6,8
1 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Υψηλό TPC	562,3 ± 24,4	42,1 ± 0,9	42,3 ± 1,6
1 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Μεσαίο TPC	706,1 ± 17,2	52,9 ± 2,0	56,0 ± 0,7
<b>1<sup>ο</sup> Παραπροϊόν Βέλτιστο TPC</b>	<b>90,2 ± 0,5</b>	<b>18,0 ± 0,2</b>	<b>14,6 ± 0,3</b>
2 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Χαμηλό TPC	158,6 ± 12,0	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,3
2 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Υψηλό TPC	446,8 ± 25,8	8,5 ± 0,1	25,3 ± 0,7
2 <sup>ο</sup> Παραπροϊόν Μεσαίο TPC	129,3 ± 19,4	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,9
<b>2<sup>ο</sup> Παραπροϊόν Βέλτιστο TPC</b>	<b>799,2 ± 27,3</b>	<b>8,2 ± 0,2</b>	<b>22,5 ± 0,4</b>
Τέπαλα Χαμηλό TPC	419,1 ± 20,0	2,6 ± 0,4	43,5 ± 2,0
Τέπαλα Υψηλό TPC	474,4 ± 34,5	6,5 ± 0,7	185,0 ± 13,5
Τέπαλα Μεσαίο TPC	192,7 ± 18,9	2,4 ± 0,3	47,3 ± 9,5
<b>Τέπαλα Βέλτιστο TPC</b>	<b>398,5 ± 11,7</b>	<b>3,4 ± 0,4</b>	<b>119,5 ± 4,0</b>

Συγκριτικά, οι (Caser κ.ά., 2020), μελέτησαν φρέσκα δειγμάτων τεπάλων που συλλέχθηκαν από 3 διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας. Πραγματοποίησαν εκχυλίσεις με μικροκύματα και εκχυλίσεις με υπερήχους σε διαφορετικές περιεκτικότητες μεθανόλης σε χρόνο 15min. Οι τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων των τεπάλων (περιεκτικότητα μεθανόλης 0%, 20%, 50% και 80%) ήταν αντίστοιχα: 449,8, 374,8, 402,9 και 677,7 mg GAE/ 100g ξηρού δείγματος. Παρατηρείται εύκολα πως η βέλτιστη τιμή TPC που μετρήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα στο εκχύλισμα των τεπάλων είναι παραπλήσια με αυτή που μετρήθηκε σε περιεκτικότητα 20% MeOH στο πείραμα των (Caser κ.ά., 2020).

Σύμφωνα με τους (Hashemi Gahrui κ.ά., 2020) οι οποίοι μέτρησαν το φαινολικό περιεχόμενο πετάλων του φυτού *Crocus sativus* με σύστημα υπερήχων, στις βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού τους σχεδιασμού μέτρησαν 863,70 mg GAE/ 100 g ξηρού δείγματος για χρόνο 40,61min και ισχύ υπερήχων 135,3W (90%), τιμή μερικώς υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή του 2<sup>ου</sup> παραπροϊόντος που μελετήθηκε. Εξαιτίας της μερικής συσχέτισης των αποτελεσμάτων ίσως το 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν να προέρχεται από δείγμα πετάλων το οποίο έχει επηρεαστεί από την μέθοδο ξήρανσης η οποία και του εφαρμόστηκε δεδομένου ότι ήταν και το μοναδικό ξηρό παραπροϊόν που μελετήθηκε, ή ίσως πρόκειται για πρόσμιξη διαφορετικών παραπροϊόντων, όπως για παράδειγμα είναι πιθανή η ύπαρξη φύλλων του φυτού καθώς εμφανίζουν ακόμα μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο συγκριτικά με τα πέταλα (Jadouali κ.ά., 2018).

Σε άλλη έρευνα, κατά την οποία μελετήθηκαν εκχυλίσματα του βολβού του κρόκου, σε συνθήκες εκχύλισης: 80% περιεκτικότητα αιθανόλης, 45min χρόνος εκχύλισης και 37kHz συχνότητα υπερήχων βρέθηκε ολικό φαινολικό περιεχόμενο 100,396 mg GAE/100g ξηρού δείγματος (Esmaeelian κ.ά., 2021), τιμή παραπλήσια με την τιμή που αφορά το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν στις βέλτιστες συνθήκες. Και πάλι λόγω συσχέτισης των αποτελεσμάτων, το δείγμα του 1<sup>ου</sup> παραπροϊόντος ίσως αναφέρεται σε δείγμα βολβού ή σε δείγμα προσμίξεων διαφορετικών παραπροϊόντων.

Η δουλειά των (Stelluti κ.ά., 2021) επικεντρώθηκε στην μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων αποξηραμένων τεπάλων του σαφράν, τα οποία εκχυλίστηκαν με τον παραδοσιακό τρόπο εκχύλισης αλλά και με σύστημα υπερήχων με διαφορετικούς διαλύτες, που περιλάμβαναν νερό, και διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης, 0%, 20%, 50% και 80%, αλλά

όλα εκχυλίστηκαν σε ίδιο χρόνο 15min. Τα αποτελέσματα που δόθηκαν για το σύστημα UAE ήταν 1150,63, 1113,27, 1066,89 και 1153,49 mg GAE/ 100g ξηρού δείγματος αντίστοιχα για κάθε σύστημα διαλυτών. Η τιμή TPC εμφανίζεται χαμηλότερη συγκριτικά με την τιμή που αφορά τα πέταλα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής FRAP, ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το δείγμα των πετάλων, έπειτα του 2<sup>ου</sup> παραπροϊόντος και τέλος του 1<sup>ου</sup> παραπροϊόντος. Έτσι προκύπτει ότι δεν υπάρχει ακριβή συσχέτιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική δράση στα δείγματα που μελετήθηκαν, κάτι το οποίο ενδεχομένως οφείλεται στην διαφορετική προέλευση των δειγμάτων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της δοκιμής ABTS, καθώς μεγαλύτερη αντιριζική δράση εμφάνισε το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν το οποίο έχει μάλιστα το μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, ενώ χαμηλότερη αντιριζική δράση μετρήθηκε στο δείγμα των πετάλων, με το δείγμα του 2<sup>ου</sup> παραπροϊόντος να εμφανίζει ενδιάμεση τιμή αντιριζικής δράσης. Αντίστοιχα αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ ολικού φαινολικού περιεχομένου και αντιριζικής δράσης μελετήθηκε στην έρευνα των (Lahmass κ.ά., 2018a), όπου με την μέθοδο DPPH, δείγματα των ξηρών και πράσινων φύλλων με μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο TPC:  $23,32 \pm 0,06$  και  $17,86 \pm 0,077$   $\mu\text{g GAE/mg}$  εκχυλίσματος αντίστοιχα) εμφάνισαν μικρότερη αντιριζική ικανότητα μετρημένη σε συγκέντρωση IC<sub>50</sub> (560 και 488  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα) συγκριτικά με δείγμα βολβού που είχε μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο ( $12,90 \pm 0,041$   $\mu\text{g GAE/mg}$  εκχυλίσματος) αλλά μεγαλύτερη αντιριζική δράση (244  $\mu\text{g/ml}$ ). Επίσης σε άλλη έρευνα των (Lahmass κ.ά., 2018b), πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αντιριζικής ικανότητας των σπαθών και των στιγμάτων του *Crocus sativus L.* με την μέθοδο DPPH, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δύο διαφορετικά δείγματα εμφάνισαν παρόμοια αντιριζική δράση παρ' όλο που οι σπάθες περιείχαν μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Είναι φανερό, πως στην βιβλιογραφία δεν έχει αποδειχθεί ακριβής η σχέση μεταξύ της αντιριζικής ικανότητας με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Πρέπει να σημειωθεί πως η γεωγραφική προέλευση, η περίοδος συγκομιδής, οι κλιματικές συνθήκες μπορεί επίσης να επηρεάσουν το φαινολικό περιεχόμενο. Όλα αυτά μάλιστα αιτιολογούν ιδιαίτερα τις διακυμάνσεις των τιμών TPC που υπάρχουν κατά την μελέτη των πετάλων όπως περιεγράφηκε και παραπάνω. Στο πείραμα που εκπονήθηκε, ο παράγοντας που διαφέρει είναι η περίοδος συγκομιδής, όπου φάνηκε πως το παραπροϊόν που εκχυλίστηκε αργότερα, δηλαδή 12/11/22 εμφάνιζε μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Επίσης, η ετήσια διάρκεια και το υψόμετρο της ηλιοφάνειας επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε κροκίνη και τη συνολική απόδοση του κρόκου και συσχετίζονται θετικά με την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή,



την περιεκτικότητα σε ρουτίνη και την αντιοξειδωτική δράση ( $p < 0,05$ ). Οι παράγοντες του εδάφους έχουν επιδείξει μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα της περιεκτικότητας σε ολική φαινολική, φλαβονοειδή, φλαβονόλη, σαπωνίνη, κροκίνες και πρωτεΐνες στα φυτά. Επομένως, η βιοσύνθεση των ενώσεων εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες των τόπων ανάπτυξης των φυτών. Ορισμένες ενώσεις μπορούν να συσσωρευτούν μόνο σε ορισμένες τοποθεσίες, συγκεκριμένα όργανα και η συγκέντρωσή τους μπορεί επίσης να ποικίλλει. Τα υψηλά επίπεδα υγρασίας που παρατηρούνται συνδέονται γραμμικά με τις κλιματικές συνθήκες (Ebrahimzadeharvanaghi & Arkun, 2018). Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν την επιλογή βιοδεικτών για την ποιότητα των φυτικών πρώτων υλών (Mykhailenko et al., 2022).

Παράλληλα, η υγρασία εξαρτάται από τη μέθοδο, το χρόνο και τη θερμοκρασία που επικράτησε κατά το στάδιο της ξήρανσης πριν εκχυλιστούν τα παραπροϊόντα που μελετήθηκαν. Διαφορετικές μέθοδοι ξήρανσης έχουν κάποια επίδραση στην περιεκτικότητα σε κροκίνη, η οποία μπορεί να σχετίζεται με το χρόνο ξήρανσης, τη θερμοκρασία και τη δύναμή τους. Η υγρασία μπορεί να καταλύσει την αποικοδόμηση ή την υδρόλυση της κροκίνης σε κροκετίνη (Acar et al., 2011). Ο έλεγχος της υγρασίας είναι σημαντικός για την αποθήκευση του κρόκου και τη μακροχρόνια αποθήκευση επηρεάζει το χρώμα και τη γεύση του κρόκου. Η ποιότητα του κρόκου διατηρείται καλύτερα σε σκοτεινές συνθήκες παρά υπό φως ή ψύξη ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Επιπλέον, οι Morimoto και άλλοι συνέστησαν την αποθήκευση του σαφράν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για να διασφαλιστεί η διατήρηση της φαρμακολογικής του δράσης (Fujii et al., 2022).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα τεπάλα είναι τα μέρη λουλουδιών με την υψηλότερη υγρασία σε φρέσκο βάρος ( $90,1 \pm 0,2\text{ g}/100\text{ g}$ ), ενώ οι στήμονες ήταν τα μέρη λουλουδιών με τη χαμηλότερη ( $75,6 \pm 4,6\text{ g}/100\text{ g}$ ), ακολουθούμενα από τα στίγματα ( $80,0 \pm 0,3\text{ g}/100\text{ g}$ ). Τα πέταλα του φυτού που μελετήθηκαν είναι εντός ορίων σε περιεκτικότητα υγρασίας (88,46%). Η υπερβολική υγρασία μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση από μικροοργανισμούς και χημικές αντιδράσεις. Μετά τη συγκομιδή του κρόκου, η περιεκτικότητά τους σε νερό μπορούσε να ελεγχθεί με κατάψυξη ή ξήρανση, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής τους (Serrano-Díaz et al., 2013).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως οι βιβλιογραφικές τιμές TPC όμως παρουσιάζονται μεγαλύτερες με αύξηση της περιεκτικότητας του διαλύτη καθώς και του χρόνου εκχύλισης, γεγονός που δεν συμβαδίζει με το βελτιστοποιημένο πρόγραμμα εκχύλισης που περιεγράφηκε παραπάνω. Επίσης κατά την εκχύλιση του 1<sup>ου</sup> παραπροϊόντος, οι συνθήκες που προέβλεπαν ελάχιστο και μεσαίο φαινολικό περιεχόμενο παρέδωσαν πολύ μεγαλύτερες τιμές TPC συγκριτικά με την τιμή που βρέθηκε με τις βέλτιστες συνθήκες εκχυλίσεις. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις

μπορούν να αιτιολογηθούν από μεσαία τιμή προβλεψιμότητας του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού, η οποία είχε συντελεστή  $R^2_{\text{pred}}=56,61$ .

### 4.3. Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων με LC-MS/MS επιλεγμένων εκχυλισμάτων παραπροϊόντων *Crocus sativus* L.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται κάποιες από τις χαρακτηριστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί βιβλιογραφικά στο φυτό του *Crocus sativus* L., καθώς και τα μητρικά τους ιόντα όπως και τα θραύσματα τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχή φάσματος 700-100Da.

Πίνακας 11. Μητρικά ιόντα και θραύσματα χαρακτηριστικών ενώσεων του είδους *Crocus sativus* L.

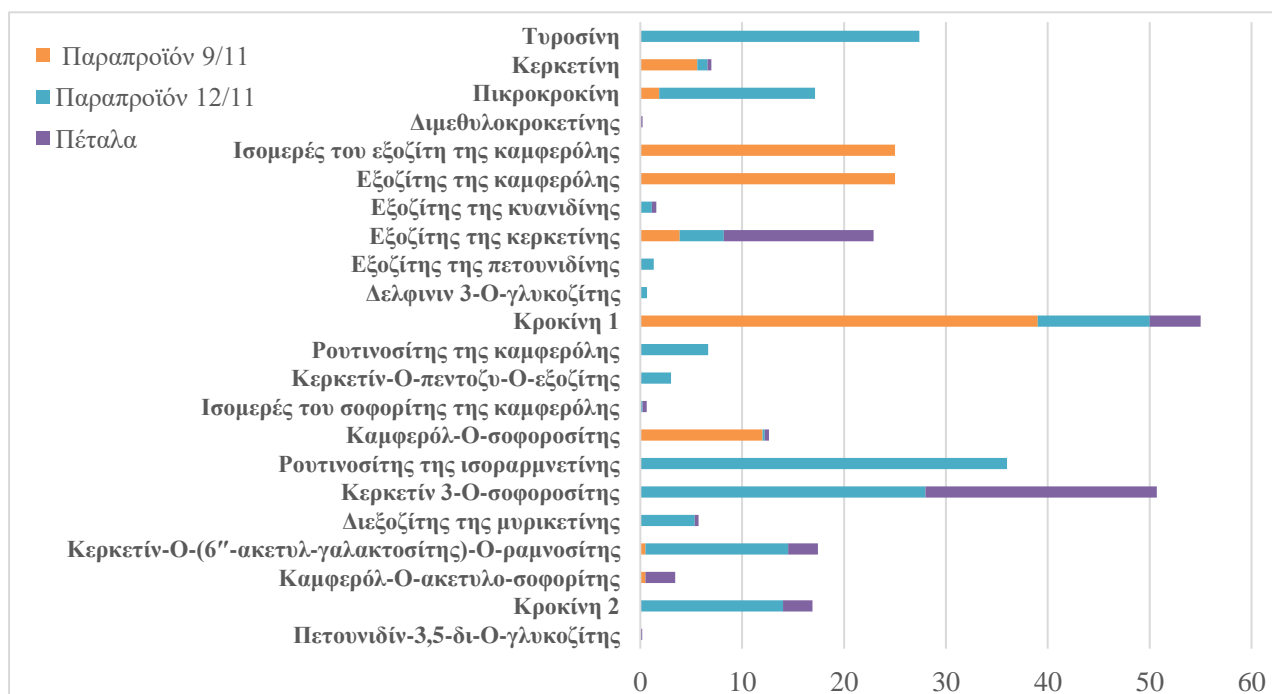
Μητρικό ιόν: Θραύσματα	Όνομα ένωσης	Χημική Ομάδα	Αναφορά
<b>651,267:</b> 489,327	Ισομερές της κροκίνης 2	Κροκίνη	(Hegazi κ.ά., 2022)
<b>625,149:</b> 505, 445, 301	Κερκετίν-3-Ο-σοφοροσίτης	Φλαβονοειδές	(Tuberoso κ.ά., 2016)
<b>609,146:</b> 429, 285	Καμφερόλ-ο-σοφοροσίτης	Φλαβονοειδές	(Hegazi κ.ά., 2022)
<b>593:</b> 285	Καμφερόλ-ρουτινοσίδη	Φλαβονοειδές	(Naim κ.ά., 2022)
<b>489:</b> 327, 285	Κροκίνη 1	Κροκίνη	(Hegazi κ.ά., 2022)
<b>463:</b> 301, 271, 179, 151	Εξοζίτης της κερκετίνης	Φλαβονοειδές	(Naim κ.ά., 2022)
<b>448,5:</b> 287, 259, 231, 213	Εξοζίτης της κυανιδίνης	Ανθοκυανίνη	(Oliva κ.ά., 2022)
<b>329:</b> 285, 283, 303, 167	Πικροκροκίνη	Αποκαροτενοειδές	(Verma & Middha, 2010)
<b>169,01:</b> 125,02	Γαλλικό οξύ	Φαινολικό οξύ	(Wang κ.ά., 2023)

Στον παρακάτω πίνακα πραγματοποιείται αντιστοίχιση των χαρακτηριστικών ενώσεων που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα των δειγμάτων στις βέλτιστες συνθήκες καθώς και στις συνθήκες που δίνουν το μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, με τις εντάσεις θραυσματοποίησης ( $10^6$ ) που δόθηκαν από το πρόγραμμα Analyst (version 1.6).

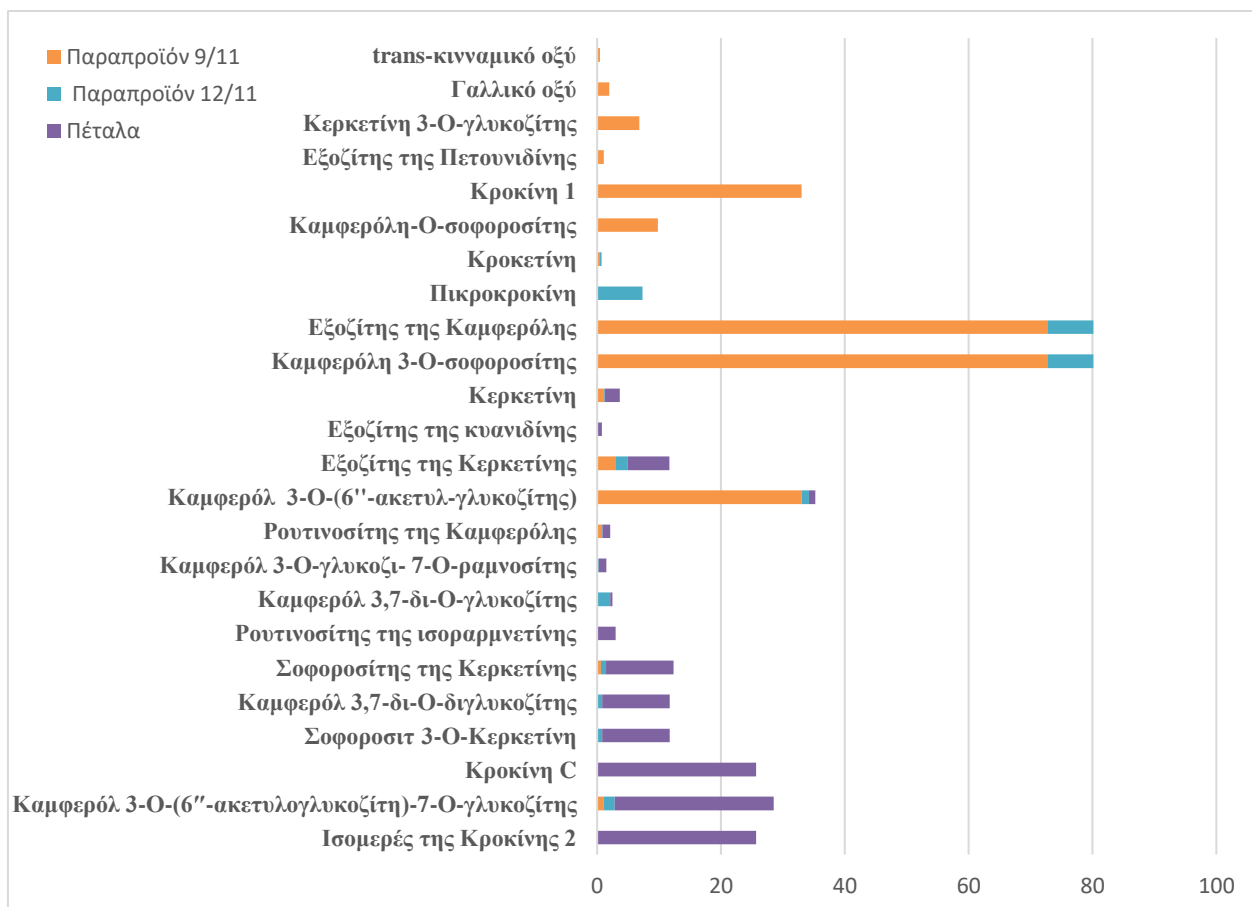
Πίνακας 12: Σχετικές εντάσεις ( $10^6$ ) της θραυσματοποίησης των ενώσεων στα φάσματα των εκχυλισμάτων

Όνομα ένωσης	Ένταση 9/11 OPT	Ένταση 12/11 OPT	Ένταση πέταλα OPT	Ένταση 9/11 MIN	Ένταση 12/11 MIN	Ένταση πέταλα MIN
Ισομερές της κροκίνης 2	-	0,14	2,91	-	-	25,7
Κερκετίν-3-Ο-σοφοροσίτης	25	28	22,7	-	0,805	10,9
Καμφερόλ-ο-σοφοροσίτης	12	0,21	0,4	9,8	-	-
Καμφερόλ-ρουτινοσίδη	-	6,67	-	0,659	0,230	1,24
Κροκίνη 1	39	11	5	33	-	-
Εξοζίτης της κερκετίνης	3,87	4,33	14,7	2,95	1,96	6,78
Εξοζίτης της κυανιδίνης	-	1,13	0,44	-	0,16	0,607
Πικροκροκίνη	1,85	15,3	-	-	7,32	-
Γαλλικό οξύ	7,94	-	0,7	1,950	-	-

Τα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζουν συνδυαστικά τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα του LC-MS/MS στα εκχυλίσματα που εκχυλίστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες, καθώς και στις συνθήκες που δίνουν τα λιγότερα φαινολικά, αναλογικά με τις εντάσεις θραυσματοποίησης ( $10^6$ ).



Γράφημα 14: Συνολική παρουσία φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα τα οποία εκχυλίστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες



Γράφημα 22: Συνολική παρουσία φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα τα οποία εκχυλίστηκαν στις συνθήκες που έδωσαν το μικρότερο TPC

Με την βοήθεια του προγράμματος Analyst (version 1.6) πραγματοποιήθηκε ποιοτική ταυτοποίηση συνολικά 18 μητρικών ιόντων τόσο στα εκχυλίσματα που εκχυλίστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες όσο και στα δείγματα που εκχυλίστηκαν για την απόδοση του ελάχιστου TPC. Στις ενώσεις αυτές ανήκουν φλαβονοειδή, κροκίνες, ανθοκυανίνες και φαινολικά οξέα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη των ενώσεων αυτών σε μορφή παραγώγων των φλαβονοειδών όπως οι (δι)γλυκοζίτες, (δι)εξοζίτες, σοφοροσίτες και ρουτινοσίτες της καμφερόλης, (δι)γλυκοζίτες, οι (δι)εξοζίτες, σοφοροσίτες της κερκετίνης, ρουτινοσίτες της ισοραμνετίνης, ο γλυκοζίτης της δελφινιδίνης και των ανθοκυανινών όπως ο διεξοζίτης και σοφορίτης της μυρικετίνης, ο εξοζίτης και διγλυκοζίτης της πετουनिδίνης. Τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν ήταν το γαλλικό οξύ, και το trans-κινναμικό οξύ στο 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν που εκχυλίστηκε στις minimum συνθήκες, καθώς και το αμινοξύ της τυροσίνης που ταυτοποιήθηκε

στο 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν βέλτιστων συνθηκών. Είναι αισθητή η διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών συνδυασμών συνθηκών, αρχικά αναφορικά με τις τιμές των εντάσεων θραυσματοποίησης, οι οποίες και μετρήθηκαν αρκετά μεγαλύτερες στα δείγματα που εκχυλίστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες. Επίσης οι ενώσεις που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα των minimum συνθηκών αφορούν κυρίως το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν και τα πέταλα, ενώ στις βέλτιστες κυρίως το 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν και τα πέταλα. Ωστόσο στις βέλτιστες συνθήκες στην πλειοψηφία των ενώσεων έχει μετρηθεί ένταση τουλάχιστον στα δύο από τα τρία παραπροϊόντα ενισχύοντας την πιθανότητα της έγκυρης ποιοτικής ταυτοποίησης, σε αντίθεση με τις εντάσεις των εκχυλίσεων στις minimum συνθήκες όπου οι ενώσεις εμφανίζουν ένταση κυρίως σε μόνο ένα από τα τρία παραπροϊόντα, οδηγώντας σε αμφίβολα αποτελέσματα.

Επίσης, φαίνεται πως το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν είναι φτωχότερο σε φαινολικές ενώσεις συγκριτικά με το 2<sup>ο</sup> παραπροϊόν και τα πέταλα, κάτι το οποίο δικαιολογεί και το χαμηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, και την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

#### **4.4. Συμπεράσματα**

Η πτυχιακή αυτή εργασία είχε ως στόχο την μελέτη των παραπροϊόντων του φυτού *Crocus sativus L.* Η χρήση του συγκεκριμένου φυτού έχει μακρά ιστορία και έχει συνεισφέρει σημαντικά στον ανθρώπινο πολιτισμό, παρ' όλο που κατά την παραγωγή και προμήθεια του υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες που αφορούν την καλλιέργεια και την συγκομιδή, την χαμηλή απόδοση και την αποθήκευση. Στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας και της βιωσιμότητας, η σύγχρονη έρευνα έχει εστιάσει στην εκμετάλλευση των παραπροϊόντων τέτοιων βιοχημικά πολύτιμων υποστρωμάτων, που συνήθως προέρχονται από τα παραπροϊόντα.

Έτσι, και στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο τριών δειγμάτων παραπροϊόντων του φυτού, τα οποία εκχυλίστηκαν σε σύστημα πράσινης τεχνολογίας, και πιο συγκεκριμένα με υπερήχους (UAE), ύστερα από την βελτιστοποίηση του προγράμματος εκχυλίσεων με τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken. Ως σημαντικότεροι παράγοντες της εκχύλισης βρέθηκαν η περιεκτικότητα της αιθανόλης (%), η αναλογία διαλύτη/ υλικού (mL/g), ο χρόνος εκχύλισης (min) καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του χρόνου εκχύλισης με την περιεκτικότητα αιθανόλης, της αιθανολικής περιεκτικότητας με την ισχύ των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης με την ισχύ των υπερήχων. Βρέθηκαν επίσης οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ως εξής: περιεκτικότητα 20% σε αιθανόλη σε μίγμα διαλύτη νερού/αιθανόλης, 10 λεπτά χρόνος εκχύλισης, 80% ισχύς υπερήχων και αναλογία 40 mL/g διαλύτη/υλικού, και δόθηκε η

προβλεψιμότητα του μοντέλου με συντελεστή  $R^2_{\text{pred}}$  56,61%, τιμή όχι ιδιαίτερα ικανοποιητική.

Ακολούθησε η εκχύλιση των τριών παραπροϊόντων στις συνθήκες αυτές, καθώς και σε συνθήκες που παρουσίασαν την ελάχιστη, τη μέγιστη και μια μεσαία τιμή φαινολικού περιεχομένου όπως βρέθηκε από τον πειραματικό σχεδιασμό. Τα αποτελέσματα, ύστερα από βιβλιογραφική σύγκριση έδειξαν πως το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζεται στο δείγμα του 2<sup>ου</sup> παραπροϊόντος, με τιμές άμεσα συγκρίσιμες με τις βιβλιογραφικές, ενώ οι χαμηλότερες τιμές του 1<sup>ου</sup> παραπροϊόντος συσχετίστηκαν με τιμές που έχει γίνει αναφορά τους ως προέλευσης από τον βολβό του φυτού, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές των πετάλων συσχετίστηκαν με διαφορετικά δείγματα πετάλων. Με εξαίρεση του δείγματος των πετάλων, τα πρώτα δύο παραπροϊόντα ενδέχεται να αποτελούν πρόσμιξη διαφορετικών παραπροϊόντων. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές εκτίμησης της αντιριζικής (ABTS•+) και αντιοξειδωτικής δράσης (FRAP). Αξίζει να σημειωθεί πως, τα πέταλα εμφάνισαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα άλλα δύο εκχυλίσματα, αντιθετικά με την πολύ μεγαλύτερη αντιριζική δράση των δύο παραπροϊόντων. Υπό το πρίσμα αυτό, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πέταλα παρουσίασαν 8 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν, ενώ το 1<sup>ο</sup> παραπροϊόν εμφάνισε 5 φορές μεγαλύτερη αντιριζική δράση συγκριτικά με τα πέταλα.

Τέλος πραγματοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS), όπου αναλύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα δείγματα των τριών παραπροϊόντων που εκχυλίστηκαν τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης καθώς και τα ίδια δείγματα που εκχυλίστηκαν στις συνθήκες που απέδιδαν το μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο. Στα αποτελέσματα παρουσιάστηκε η ύπαρξη φλαβονοειδών, όπως οι ενώσεις και τα παράγωγα της καμφερόλης, της κερκετίνης, της μυρικετίνης και της ισοραμνετίνης, κροκινών όπως η κροκίνη 1 και η κροκίνη 2, ανθοκυανίνες όπως οι ενώσεις και τα παράγωγα της πετουνιδίνης, της δελφινίνης και της κυανιδίνης και τέλος φαινολικών οξέων όπως το γαλλικό οξύ και το trans-κινναμμικό οξύ. Τα δείγματα των βέλτιστων συνθηκών έδωσαν υψηλότερες εντάσεις θραυσματοποίησης, ενώ οι εντάσεις των περισσότερων ενώσεων μετρήθηκαν σε τουλάχιστον τα δύο από τα τρία παραπροϊόντα, ενώ οι εντάσεις των δειγμάτων στις minimum συνθήκες βρέθηκαν στην πλειοψηφία των ενώσεων σε μόνο ένα από τα τρία παραπροϊόντα.

Συνολικά, μπορεί να ειπωθεί πως η εκχύλιση με υπερήχους διευκολύνει την εκχύλιση σημαντικών βιοδραστικών μορίων όπως οι φαινολικές ενώσεις και πως η εκχύλιση με περιεκτικότητα αιθανόλης 20% δίνει παρόμοια αποτελέσματα με βιβλιογραφικές εκχυλίσεις που

πραγματοποιήθηκαν με περιεκτικότητα μεθανόλης 60% και 80%, όπως επίσης και ο μικρότερος χρόνος των 10 min, δίνει αποτελέσματα που συμβαδίζουν με τις βιβλιογραφικές αναφορές στα 15 min, συμπέρασμα που εξάγεται από τις δοκιμές Folin-Ciocalteu, ABTS(•+) και FRAP.

Συνεπώς εξάγεται το συνολικό συμπέρασμα πως τα παραπροϊόντα του κρόκου μπορούν να αποτελέσουν μια σημαντική προσθήκη στην βιομηχανία τροφίμων αναλογικά με το υψηλό φαιολικό τους περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική και αντιριζική τους δράση. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν τις ιδιότητες αυτές των παραπροϊόντων του φυτού καθώς η βιβλιογραφία παραμένει ελλιπής.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παπαγεωργίου Έφη, Π. Έ. (2017). *Βιοστατιστική και Εφαρμογές*.

Abdusamat, B., Samir, M. A. A., & Farid, M. A. (2021). *Bioecology And Introduction of Saffron (Crocus Sativus L.)*. 2(2770).

Abu-Izneid, T., Rauf, A., Khalil, A. A., Olatunde, A., Khalid, A., Alhumaydhi, F. A., Aljohani, A. S. M., Sahab Uddin, Md., Heydari, M., Khayrullin, M., Shariati, M. A., Aremu, A. O., Alafnan, A., & Rengasamy, K. R. R. (2022). Nutritional and health beneficial properties of saffron ( *Crocus sativus* L): A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2683–2706.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1857682>

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214.

<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Al-Hrout, A., Chaiboonchoe, A., Khraiweh, B., Murali, C., Baig, B., El-Awady, R., Tarazi, H., Alzahmi, A., Nelson, D. R., Greish, Y. E., Ramadan, W., Salehi-Ashtiani, K., & Amin, A. (2018). Safranal induces DNA double-strand breakage and ER-stress-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, 8(1), 16951.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34855-0>

Amin, A., Hamza, A. A., Bajbouj, K., Ashraf, S. S., & Daoud, S. (2011). Saffron: A potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 54(3), 857–867. <https://doi.org/10.1002/hep.24433>



- Amin, B., Nakhsaz, A., & Hosseinzadeh, H. (2015). Evaluation of the antidepressant-like effects of acute and sub-acute administration of crocin and crocetin in mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(5), 458–468.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barceló, D., & Petrovic, M. (2007). Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.11.006>
- Beg, S., & Raza, K. (2021). Full Factorial and Fractional Factorial Design Applications in Pharmaceutical Product Development. Στο S. Beg (Επιμ.), *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development: Volume I : Basics and Fundamental Principles* (σσ. 43–53). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-33-4717-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-33-4717-5_4)
- Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Singh, L., Aborehab, N. M., Bouyahya, A., Venditti, A., Sen, S., Acharya, K., Bashiry, M., Ezzat, S. M., Setzer, W. N., Martorell, M., Mileski, K. S., Bagiu, I.-C., Docea, A. O., Calina, D., & Cho, W. C. (2022). The Pharmacological Activities of *Crocus sativus* L.: A Review Based on the Mechanisms and Therapeutic Opportunities of its Phytoconstituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2022/8214821>
- Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2019). Evaluation of corm origin and climatic conditions on saffron (*Crocus sativus* L.) yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 5858–5869. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9860>

- Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae*, 272, 109560. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109560>
- Caser, M., Demasi, S., Stelluti, S., Donno, D., & Scariot, V. (2020). Crocus sativus L. Cultivation in Alpine Environments: Stigmas and Tepals as Source of Bioactive Compounds. *Agronomy*, 10(10), 1473. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101473>
- Caser, M., Victorino, Í. M. M., Demasi, S., Berruti, A., Donno, D., Lumini, E., Bianciotto, V., & Scariot, V. (2019). Saffron Cultivation in Marginal Alpine Environments: How AMF Inoculation Modulates Yield and Bioactive Compounds. *Agronomy*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010012>
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217–225. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005>
- Ciclet, O., Barron, D., Bajic, S., Veuthey, J.-L., Guillaume, D., & Grand-Guillaume Perrenoud, A. (2018). Natural compounds analysis using liquid and supercritical fluid chromatography hyphenated to mass spectrometry: Evaluation of a new design of atmospheric pressure ionization source. *Journal of Chromatography B*, 1083, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.037>
- Cid-Pérez, T. S., Nevárez-Moorillón, G. V., Ochoa-Velasco, C. E., Navarro-Cruz, A. R., Hernández-Carranza, P., & Avila-Sosa, R. (2021). The Relation between Drying Conditions and the Development of Volatile Compounds in Saffron (*Crocus sativus*). *Molecules*, 26(22), 6954. <https://doi.org/10.3390/molecules26226954>

- Da Porto, C., & Natolino, A. (2018). Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chemistry*, 258, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.059>
- Dai, R.-C., Nabil, W. N. N., & Xu, H.-X. (2021). The History of Saffron in China: From Its Origin to Applications. *Chinese Medicine and Culture*, 4(4), 228. [https://doi.org/10.4103/CMAC.CMAC\\_38\\_21](https://doi.org/10.4103/CMAC.CMAC_38_21)
- D'Alessandro, A. M., Mancini, A., Lizzi, A. R., De Simone, A., Marroccella, C. E., Gravina, G. L., Tatone, C., & Festuccia, C. (2013). Crocus Sativus Stigma Extract and Its Major Constituent Crocin Possess Significant Antiproliferative Properties Against Human Prostate Cancer. *Nutrition and Cancer*, 65(6), 930–942. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.767368>
- Dhillon, R. J. S., & Hasni, S. (2017). Pathogenesis and Management of Sarcopenia. *Clinics in Geriatric Medicine*, 33(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2016.08.002>
- Dong, N., Dong, Z., Chen, Y., & Gu, X. (2020). Crocetin Alleviates Inflammation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Models through Improving Mitochondrial Functions. *Parkinson's Disease*, 2020, e9864370. <https://doi.org/10.1155/2020/9864370>
- Drioiche, A., Ailli, A., Handaq, N., Remok, F., Elouardi, M., Elouadni, H., Al Kamaly, O., Saleh, A., Bouhrim, M., Elazzouzi, H., El Makhoukhi, F., & Zair, T. (2023). Identification of Compounds of Crocus sativus by GC-MS and HPLC/UV-ESI-MS and Evaluation of Their Antioxidant, Antimicrobial, Anticoagulant, and Antidiabetic Properties. *Pharmaceuticals*, 16(4), 545. <https://doi.org/10.3390/ph16040545>
- Ebers, G. (1873). Papyrus Ebers. *Zeitschrift für Ägyptische Sprache und Altertumskunde*, 11(1–12), 41–46. <https://doi.org/10.1524/zaes.1873.11.112.41>

- El Midaoui, A., Ghzaïel, I., Vervandier-Fasseur, D., Ksila, M., Zarrouk, A., Nury, T., Khallouki, F., El Hessni, A., Ibrahimi, S. O., Latruffe, N., Couture, R., Kharoubi, O., Brahmi, F., Hammami, S., Masmoudi-Kouki, O., Hammami, M., Ghraïri, T., Vejux, A., & Lizard, G. (2022). Saffron (*Crocus sativus* L.): A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases. *Nutrients*, *14*(3), 597. <https://doi.org/10.3390/nu14030597>
- Escribano, J., Alonso, G.-L., Coca-Prados, M., & Fernández, J.-A. (1996). Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, *100*(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)04067-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)04067-6)
- Esmaelian, M., Jahani, M., Feizy, J., & Einafshar, S. (2021). Effects of Ultrasound-Assisted and Direct Solvent Extraction Methods on the Antioxidant and Antibacterial Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corm Extract. *Food Analytical Methods*, *14*(1), 74–87. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01855-8>
- FAO. (2012). *Saffron Heritage Site of Kashmir in India. GIAHS Saffron Site Report (part- 1)*.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, *597*(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Ferrence, S. C., & Bendersky, G. (2004). Therapy with saffron and the goddess at Thera. *Perspectives in Biology and Medicine*, *47*(2), 199–226. <https://doi.org/10.1353/pbm.2004.0026>

- Frankel, E. N. (1997). Nutritional Benefits of Flavonoids. Στο H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, & T. Yoshikawa (Επιμ.), *Food Factors for Cancer Prevention* (σσ. 613–616). Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-67017-9\\_121](https://doi.org/10.1007/978-4-431-67017-9_121)
- Ghaffari, S., & Roshanravan, N. (2019). Saffron; An updated review on biological properties with special focus on cardiovascular effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *109*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.031>
- Ghajar, A., Neishabouri, S. M., Velayati, N., Jahangard, L., Matinnia, N., Haghghi, M., Ghaleiha, A., Afarideh, M., Salimi, S., Meysamie, A., & Akhondzadeh, S. (2017). Crocus sativus L. versus Citalopram in the Treatment of Major Depressive Disorder with Anxious Distress: A Double-Blind, Controlled Clinical Trial. *Pharmacopsychiatry*, *50*(04), 152–160. <https://doi.org/10.1055/s-0042-116159>
- Ghanbari, J., Khajoei-Nejad, G., & van Ruth, S. M. (2019). Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) corm provenance on its agro-morphological traits and bioactive compounds. *Scientia Horticulturae*, *256*, 108605. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108605>
- Gohari, A. R., Saeidnia, S., & Mahmoodabadi, M. K. (2013). An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacognosy Reviews*, *7*(13), 61–66. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112850>
- Gracia, L., Perez-Vidal, C., & Gracia-López, C. (2009). Automated cutting system to obtain the stigmas of the saffron flower. *Biosystems Engineering*, *104*(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.06.003>
- Hamad H. Al Mamari. (2021, Ιούλιος 19). *Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis* / IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/77604>

- Hashemi Gahruei, H., Parastouei, K., Mokhtarian, M., Rostami, H., Niakousari, M., & Mohsenpour, Z. (2020). Application of innovative processing methods for the extraction of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus*) petals. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *19*, 100264.  
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100264>
- Hatziagapiou, K., & Lambrou, G. I. (χ.χ.). The Protective Role of *Crocus Sativus* L. (Saffron) Against Ischemia- Reperfusion Injury, Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Nature Opposing Cardiovascular Diseases. *Current Cardiology Reviews*, *14*(4), 272–289.
- He, K., Si, P., Wang, H., Tahir, U., Chen, K., Xiao, J., Duan, X., Huang, R., & Xiang, G. (2014). Crocetin induces apoptosis of BGC-823 human gastric cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *9*(2), 521–526. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1851>
- He, S.-Y., Qian, Z.-Y., Wen, N., Tang, F.-T., Xu, G.-L., & Zhou, C.-H. (2007). Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails. *European Journal of Pharmacology*, *554*(2–3), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.09.071>
- Hegazi, N. M., Khattab, A. R., Frolov, A., Wessjohann, L. A., & Farag, M. A. (2022). Authentication of saffron spice accessions from its common substitutes via a multiplex approach of UV/VIS fingerprints and UPLC/MS using molecular networking and chemometrics. *Food Chemistry*, *367*, 130739.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130739>
- Heidarbeigi, K., Mohtasebi, S. S., Foroughirad, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Rafiee, S., & Rezaei, K. (2015). Detection of Adulteration in Saffron Samples Using Electronic Nose. *International Journal of Food Properties*, *18*(7), 1391–1401.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2014.915850>

- Hemmati, M., Zohoori, E., Mehrpour, O., Karamian, M., Asghari, S., Zarban, A., & Nasouti, R. (2015). Anti-atherogenic potential of jujube, saffron and barberry: Anti-diabetic and antioxidant actions. *EXCLI Journal*, *14*, 908–915. <https://doi.org/10.17179/excli2015-232>
- Herrera-Ramirez, J., Meneses-Marentes, N., & Tarazona Díaz, M. P. (2020). Optimizing the extraction of anthocyanins from purple passion fruit peel using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *14*(1), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00280-8>
- Ho, C.-T. (1992). Phenolic Compounds in Food. Στο *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II* (τ. 507, σσ. 2–7). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
- Husaini, A. M., Wani, S. A., Sofi, P., Rather, A. G., Parray, G. A., Shikari, A. B., & Mir, J. I. (χ.χ.). *Bioinformatics for Saffron (Crocus sativus L.) Improvement*.
- Jadouali, S. M., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., Elmoslih, A., Laknifli, A., & Mamouni, R. (2018). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, *9*(1), 113–118. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.1.14>
- José Bagur, M., Alonso Salinas, G., Jiménez-Monreal, A., Chaouqi, S., Llorens, S., Martínez-Tomé, M., & Alonso, G. (2017). Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food. *Molecules*, *23*(1), 30. <https://doi.org/10.3390/molecules23010030>
- Kabiri, G., Hssaini, L., Naim, N., Houmanat, K., Ennahli, S., Fauconnier, M., & Hanine, H. (2023). Aromatic potential, quality and antioxidant activity of saffron grown in Morocco. *Flavour and Fragrance Journal*, *38*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1002/ffj.3722>

- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. E. (2010). Evaluation of Crocus sativus L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules*, *15*(9), 6244–6256. <https://doi.org/10.3390/molecules15096244>
- Kothari, D., Thakur, R., & Kumar, R. (2021). Saffron (Crocus sativus L.): Gold of the spices—a comprehensive review. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *62*(5), 661–677. <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00349-8>
- Kritsi, E., Tsiaka, T., Sotiroudis, G., Mouka, E., Aouant, K., Ladika, G., Zoumpoulakis, P., Cavouras, D., & Sinanoglou, V. J. (2023). Potential Health Benefits of Banana Phenolic Content during Ripening by Implementing Analytical and In Silico Techniques. *Life*, *13*(2), 332. <https://doi.org/10.3390/life13020332>
- Lahmass, I., Lamkani, T., Delporte, C., Sikdar, S., Van Antwerpen, P., Saalaoui, E., & Megalizzi, V. (2017). The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds. *Journal of Functional Foods*, *35*, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.057>
- Lahmass, I., Ouahhoud, S., Elmansuri, M., Sabouni, A., Elyoubi, M., Benabbas, R., Choukri, M., & Saalaoui, E. (2018a). Determination of Antioxidant Properties of Six By-Products of Crocus sativus L. (Saffron) Plant Products. *Waste and Biomass Valorization*, *9*(8), 1349–1357. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9851-y>
- Lahmass, I., Ouahhoud, S., Elyoubi, M., Benabbas, B., Sabouni, A., Asehrou, A., & Saalaoui, E. (2018b). Evaluation of antioxidant activities of saffron stigma and spathe as by-product of Crocus sativus L. *MOJ Biology and Medicine*, *3*(4), 154–158. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2018.03.00091>
- McMaster, M. C. (2005). *LC/MS: A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons.



- Milajerdi, A., Djafarian, K., & Hosseini, B. (2016). The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 3, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2015.12.332>
- Moratalla-López, N., Lorenzo, C., Chaouqi, S., Sánchez, A. M., & Alonso, G. L. (2019). Kinetics of polyphenol content of dry flowers and floral bio-residues of saffron at different temperatures and relative humidity conditions. *Food Chemistry*, 290, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.129>
- Mykhailenko, O., Kovalyov, V., Goryacha, O., Ivanauskas, L., & Georgiyants, V. (2019). Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry*, 162, 56–89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.004>
- Mzabri, Addi, & Berrichi. (2019). Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*). *Cosmetics*, 6(4), 63. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040063>
- Naim, N., Bouymajane, A., Oulad El Majdoub, Y., Ezrari, S., Lahlali, R., Tahiri, A., Ennahli, S., Laganà Vinci, R., Cacciola, F., Mondello, L., & Madani, I. (2022). Flavonoid Composition and Antibacterial Properties of *Crocus sativus* L. Petal Extracts. *Molecules*, 28(1), 186. <https://doi.org/10.3390/molecules28010186>
- Nørbæk, R., & Kondo, T. (1998). Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae). *Phytochemistry*, 47(5), 861–864. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00625-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00625-0)
- Oliva, E., Fanti, F., Palmieri, S., Viteritti, E., Eugelio, F., Pepe, A., Compagnone, D., & Sergi, M. (2022). Predictive Multi Experiment Approach for the Determination of Conjugated Phenolic Compounds in Vegetal Matrices by Means of LC-MS/MS. *Molecules*, 27(10), 3089. <https://doi.org/10.3390/molecules27103089>

- Ordoudi, S. A., & Tsimidou, M. Z. (2004). Saffron Quality: Effect of Agricultural Practices, Processing and Storage. Στο R. Dris & S. M. Jain (Επιμ.), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops Volume 1* (σσ. 209–260). Kluwer Academic Publishers. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2533-5\\_8](https://doi.org/10.1007/1-4020-2533-5_8)
- Palomares, C. (2015). *Le safran, précieuse épice ou précieux médicament?*
- Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products*, 119, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.019>
- Pitsikas, N. (2016). Constituents of Saffron (*Crocus sativus* L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia. *Molecules*, 21(3), 303. <https://doi.org/10.3390/molecules21030303>
- Rahaman, A., Kumari, A., Farooq, M. A., Zeng, X.-A., Hassan, S., Khalifa, I., Aadil, R. M., Jahangir Chughtai, M. F., Khaliq, A., Ahmad, N., & Wajid, M. A. (2021). Novel Extraction Techniques: An Effective Way to Retrieve the Bioactive Compounds from Saffron ( *Crocus Sativus* ). *Food Reviews International*, 1–29. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1967377>
- Ramadan, A., Soliman, G., Mahmoud, S. S., Nofal, S. M., & Abdel-Rahman, R. F. (2012). Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *Journal of Saudi Chemical Society*, 16(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.10.012>

- Renau-Morata, B., Nebauer, S. G., Sánchez, M., & Molina, R. V. (2012). Effect of corm size, water stress and cultivation conditions on photosynthesis and biomass partitioning during the vegetative growth of saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products*, 39, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.009>
- Saeedi, M., & Rashidy-Pour, A. (2021). Association between chronic stress and Alzheimer's disease: Therapeutic effects of Saffron. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110995. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110995>
- Saffron In All Over Europe | The Price Of Saffron In Europe—Ana Qayen*. (2022, Μάιος 26). <https://anasaffron.com/saffron-in-europe/>
- Saffron: Leading producers worldwide 2019*. (2020, Ιανουάριος). Statista. <https://www.statista.com/statistics/1135621/leading-saffron-producers-worldwide/>
- Saffron Market*. (2022, Οκτώβριος). <https://www.futuremarketinsights.com/reports/saffron-market>
- Sajjadi, M., & Bathaie, Z. (2017). Comparative Study on The Preventive Effect of Saffron Carotenoids, Crocin and Crocetin, in NMU-Induced Breast Cancer in Rats. *Cell Journal*, 19(1), 94–101. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3901>
- Sampathu, S. R., Shivashankar, S., & Lewis, Y. S. (1984). Saffron (*Crocus sativus* Linn.): Cultivation, processing, chemistry and standardization. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Saffron+%28Crocus+sativus+Linn.%29+%3A+Cultivation%2C+processing%2C+chemistry+and+standardization&author=Sampathu%2C+S.R.&publication\\_year=1984](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Saffron+%28Crocus+sativus+Linn.%29+%3A+Cultivation%2C+processing%2C+chemistry+and+standardization&author=Sampathu%2C+S.R.&publication_year=1984)

- Shahi, T., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2016). Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron. *Trends in Food Science & Technology*, *58*, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.010>
- Siddiqui, M. J., Saleh, M. S. M., Basharuiddin, S. N. B. B., Zamri, S. H. B., Mohd Najib, M. H. bin, Che Ibrahim, M. Z. bin, binti Mohd Noor, N. A., Binti Mazha, H. N., Mohd Hassan, N., & Khatib, A. (2018). Saffron (*Crocus sativus* L.): As an Antidepressant. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *10*(4), 173–180. [https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS\\_83\\_18](https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_83_18)
- Soto, M. L., Falqué, E., & Domínguez, H. (2015). Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, *2*(3), 259–276. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259>
- Stelluti, S., Caser, M., Demasi, S., & Scariot, V. (2021). Sustainable Processing of Floral Bio-Residues of Saffron (*Crocus sativus* L.) for Valuable Biorefinery Products. *Plants*, *10*(3), 523. <https://doi.org/10.3390/plants10030523>
- Tamaro, F. (1990). *Crocus sativus* L.—cv. Piano di Navelli (L'Aquila saffron): Environment, cultivation, morphometric characteristics, active principles, uses. *Proceedings of the international conference on saffron*, 47–57.
- Tsiaka, T., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V. J., Makris, C., Heropoulos, G. A., & Calokerinos, A. C. (2015). Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analytica Chimica Acta*, *877*, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.051>

- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Chapter 16—Classification of Phenolic Compounds in Plants. Στο R. R. Watson (Επιμ.), *Polyphenols in Plants (Second Edition)* (σσ. 263–284). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8>
- Tuberoso, C. I. G., Rosa, A., Montoro, P., Fenu, M. A., & Pizza, C. (2016). Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products. *Food Chemistry*, *199*, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.115>
- Varliklioz Er, S., Eksi-Kocak, H., Yetim, H., & Boyaci, I. H. (2017). Novel Spectroscopic Method for Determination and Quantification of Saffron Adulteration. *Food Analytical Methods*, *10*(5), 1547–1555. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0710-4>
- Verma, R. S., & Middha, D. (2010). Analysis of Saffron (*Crocus sativus* L. Stigma) Components by LC–MS–MS. *Chromatographia*, *71*(1), 117–123. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1398-z>
- Wahid, Z., & Nadir, N. (2013). *Improvement of One Factor at a Time Through Design of Experiments*.
- Wang, R., Chen, N., Li, J., Qian, D., Huang, X., & Yang, B. (2023). Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics to clarify the mechanism of color change of saffron floral bio-residues. *Journal of Food Science*, *88*(2), 732–743. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16443>
- Yaribeygi, H., Zare, V., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2019). Antidiabetic potential of saffron and its active constituents. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(6), 8610–8617. <https://doi.org/10.1002/jcp.27843>