



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ
ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΑΡΚΑΣ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ FTIR ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑΣ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΑΣΤΕΡ

ΕΡΑΤΩ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΜΑΙΟΣ 2022



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΑΣΤΕΡ

ΕΡΑΤΩ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Καθηγητής Θεοχάρης Ρ. Χάρης
2. Αναπλ. Καθηγήτρια Καπνίση-Χριστοδούλου Π. Κωνσταντίνα
3. Αναπλ. Καθηγήτρια Πινακουλάκη Ευτυχία (Ερευνητική Σύμβουλος)

ΜΑΙΟΣ 2022

Περίληψη

Τρόφιμα φυτικής προέλευσης και αντιοξειδωτικά συστατικά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, όπως είναι για παράδειγμα οι φυτοχημικές ουσίες της κατηγορίας των πολυφαινολών, συγκεντρώνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της προληπτικής τους δράσης κατά της οξειδωτικής βλάβης των κυτταρικών συστατικών. Η σάρκα χαρουπιού αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα με σημαντική περιεκτικότητα σε πολυφαινολικά συστατικά. Η σύσταση, η πολυφαινολική περιεκτικότητα και η αντιοξειδωτική της συμπεριφορά επηρεάζονται από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες. Αρκετές αναλυτικές μέθοδοι έχουν προταθεί και εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών παραμέτρων δειγμάτων χαρουπιού. Ωστόσο, προϋποθέτουν χρονοβόρες εργαστηριακές διαδικασίες, κατανάλωση τοξικών αντιδραστηρίων και ειδικό εξοπλισμό. Ως εναλλακτική προσέγγιση προτείνεται η αξιοποίηση της φασματοσκοπίας FTIR, η οποία παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη σύσταση του δείγματος σε μικρό χρόνο ανάλυσης και έχει μηδαμινό αντίκτυπο στο περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η αξιοποίηση της φασματοσκοπίας FTIR για την πρόβλεψη της συνολικής πολυφαινολικής περιεκτικότητας (Total Polyphenolic Content, TPC) και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) εκχυλισμάτων σάρκας χαρουπιού. Για τον σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν η TPC και η TAC 51 δειγμάτων, αξιοποιώντας συμβατικές μεθόδους ανάλυσης και βάσει αυτών κατασκευάστηκαν μοντέλα παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR) κατόπιν συσχέτισης των τιμών αναφοράς και των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) των εκχυλισμάτων. Η TPC ($42,9\text{--}202,2\text{ mg}$ ισοδύναμων γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος) και η συγκέντρωση γαλλικού οξέος ($1,3\text{--}4,1\text{ mg}$ γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος) προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, αντίστοιχα. Η TAC προσδιορίστηκε με τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας 2,2,-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH) και εκφράστηκε μέσω των τιμών EC_{50} ($10,0\text{--}100,3\text{ }\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος), ενώ προσδιορίστηκε επίσης μέσω της δοκιμής FRAP ($76,9\text{--}379,3\text{ mg}$ ισοδύναμων Trolox/g εκχυλίσματος).

Τα μοντέλα PLSR αξιολογήθηκαν με την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (*Cross-Validation*). Στα πλαίσια εξωτερικής επικύρωσης αξιοποιήθηκαν φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR επιπλέον δειγμάτων τα οποία είχαν αντιμετωπιστεί ως άγνωστα. Η προγνωστική ικανότητα του μοντέλου που αξιοποίησε σαν τιμές αναφοράς αυτές της μεθόδου Folin-Ciocalteu ($r^2_{\text{CAL}} > 0,97$, $r^2_{\text{PRED}} > 0,86$) χαρακτηρίστηκε ως πολύ καλή, με

χαμηλές τιμές για τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP, ενώ για τα μοντέλα που προχώρησαν σε πρόβλεψη της TAC μέσω των δοκιμών DPPH ($r^2_{\text{CAL}} > 0,88$, $r^2_{\text{PRED}} > 0,76$) και FRAP ($r^2_{\text{CAL}} > 0,74$, $r^2_{\text{PRED}} > 0,83$) κρίθηκε ικανοποιητική. Το μοντέλο που επιχείρησε τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος ($r^2_{\text{CAL}} > 0,36$, $r^2_{\text{PRED}} > 0,02$) δεν έδειξε επιτυχία πρόβλεψης.

Στα πλαίσια βελτιστοποίησης των μοντέλων PLSR εξετάστηκαν επιμέρους περιοχές του φάσματος. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ανέδειξαν τις περιοχές 3585–2810 και 1711–912 cm^{-1} σημαντικές για την πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων. Επιπλέον, εξετάστηκε η επιρροή που έχει στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων η μέθοδος προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR, συγκρίνοντας αποτελέσματα που λήφθηκαν από την αξιοποίηση κανονικοποιημένων ή παραγωγοποιημένων φασμάτων που προέκυψαν από τον υπολογισμό της πρώτης και της δεύτερης παραγώγου.

Συνοπτικά, η φασματοσκοπία FTIR σε συνδυασμό με τη χημειομετρική ανάλυση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για μελλοντικές έρευνες σε δείγματα σάρκας χαρουπιού. Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της TPC, όσο και για την εκτίμηση της TAC, όπως αυτή μπορεί να προσδιοριστεί μέσω των δοκιμών DPPH και FRAP, πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σάρκας χαρουπιού.

Abstract

Natural foods and food-related antioxidants, such as phenolic phytochemicals, are of great interest due to their preventive properties against oxidative damage. Carob pulp contains high quality and amount of phenolic compounds. The composition of carob pulp, its phenolics and antioxidant power are influenced by numerous factors causing great variation among samples. Several wet chemistry techniques have been reported for measuring these antioxidant parameters of the fruit. However, conventional analytical methods entail long and complicated laboratory procedures, the use of toxic chemicals and specific instrumentation. One appealing alternative is the use of Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy since it provides information about the sample composition quickly and it is multi-parametric and environmentally friendly choice.

The aim of this study was to use FTIR spectroscopy for the prediction of the total polyphenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) of carob pulp extracts. Therefore, the TPC and TAC of 51 samples were investigated using conventional reference methods and FTIR-based ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) partial least squares regression (PLSR) models were developed to predict these parameters. Phenolic contents, including total phenol and gallic acid monomer, were first quantified using Folin-Ciocalteu assay ($42.9\text{--}202.2\text{ mg gallic acid equivalents/g dry weight of extract}$) and reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (RP-HPLC-DAD) ($1.3\text{--}4.1\text{ mg gallic acid/g dry weight of extract}$), respectively. Antioxidant capacities were characterised using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay and the results were expressed as EC_{50} values ($10.0\text{--}100.3\text{ }\mu\text{g/mL}$ of extract) and FRAP assay ($76.9\text{--}379.3\text{ mg Trolox equivalents/g dry weight of extract}$).

PLSR models were constructed and cross-validated using FTIR spectra of phenolic-rich extracts and corresponding reference values determined using Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP and HPLC assays. Spectra from additional extracts were used as an external validation set for the models. PLSR models showed very good prediction capability for Folin-Ciocalteu ($r^2_{\text{CAL}} > 0.97$, $r^2_{\text{PRED}} > 0.86$), accompanied with low errors of prediction, RMSEC and RMSEP, good prediction capability for DPPH ($r^2_{\text{CAL}} > 0.88$, $r^2_{\text{PRED}} > 0.76$) and FRAP ($r^2_{\text{CAL}} > 0.74$, $r^2_{\text{PRED}} > 0.83$), but lacked accuracy in the prediction of the concentration of the gallic acid monomer ($r^2_{\text{CAL}} > 0.36$, $r^2_{\text{PRED}} > 0.02$).

In an attempt to increase the performance of the PLSR calibration models, subregions of the whole mid-infrared (MIR) spectra were examined. The developed PLSR models revealed

that the spectral regions of 3585–2810 and 1711–912 cm^{-1} are important for antioxidant activity prediction of the analysed phenolic-rich extracts. The effects of FTIR spectra preprocessing methods (normalization, first and second derivative) transformations on the performance of PLSR models were also evaluated.

Overall, FTIR spectroscopy along with chemometrics exhibited great potential for future carob pulp studies. The proposed method may be used for rapid screening of TPC and to get estimates for DPPH and FRAP antioxidant capacities of phenolic-rich extracts.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την ερευνητική μου σύμβουλο, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση τόσο σε ακαδημαϊκό, όσο και προσωπικό επίπεδο. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να καταπιαστώ με το συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο, τη συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές της.

Έπειτα, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Χάρη Ρ. Θεοχάρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Κωνσταντίνα Π. Καπνίση-Χριστοδούλου, που αποδέχτηκαν το αίτημα να αξιολογήσουν την παρούσα διατριβή, παρέχοντας πολύτιμες συμβουλές και κάνοντας σημαντικές υποδείξεις για την τελική επιμέλεια του κειμένου.

Ευχαριστώ επίσης, τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοαναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, που αποτελούσαν πάντα ευχάριστες νότες της καθημερινότητας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στις διδακτορικές φοιτήτριες Μαρίνα Γρηγορίου και Χάρια Χατζηπάκκου που ήταν πάντα πρόθυμες να προσφέρουν τις γνώσεις και την εμπειρία τους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς, σε όλους τους ανθρώπους που συνθέτουν τη δική μου πραγματικότητα και κάνουν το κάθε ταξίδι μου μοναδικό και όμορφο...μόνο με την παρουσία τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	iii
Ευχαριστίες	v
Περιεχόμενα	vi
Κατάλογος Εικόνων και Σχημάτων	viii
Κατάλογος Πινάκων	x
Κατάλογος Συντμήσεων	xii
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή – Στόχος και Πρωτοτυπία	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.2. Στόχος και Πρωτοτυπία	2
Κεφάλαιο 2 Θεωρητικό Υπόβαθρο	4
2.1. Η χαρουπιά και ο καρπός της	4
2.2. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του χαρουπιού	6
2.3. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των τροφίμων	9
2.3.1. Συμβατικές μέθοδοι	9
2.3.2. Εναλλακτική προσέγγιση – Φασματοσκοπία και Χημειομετρία	14
2.4. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)	15
2.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR)	19
2.6. Χημειομετρία	20
2.7. Χρησιμότητα μεθόδων πολυμεταβλητής παλινδρόμησης	23
2.8. Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLSR)	26
2.8.1. Βάσεις δεδομένων	27
2.8.2. Το μοντέλο PLSR	28
2.8.3. Ερμηνεία του μοντέλου	29
2.8.4. Γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου	30
2.8.5. Αξιολόγηση του μοντέλου	31
2.9. Ανάπτυξη ανθεκτικών (<i>robust</i>) μοντέλων PLSR	34
2.9.1. Δειγματοληψία	35
2.9.2. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας – Μέθοδος εκχύλισης και μέθοδος αναφοράς	37
2.9.3. Φασματοσκοπία FTIR – Προκατεργασία δείγματος και επιλογή φασματικής περιοχής	39
2.9.4. Προεπεξεργασία φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR	42
2.9.5. Στατιστική αξιολόγηση μοντέλου – Επιλογή αριθμού LVs	43
Κεφάλαιο 3 Πειραματικό Μέρος	45
3.1. Αντιδραστήρια	45
3.2. Δείγματα χαρουπιού	45
3.3. Εκχύλιση πολυφαινολικών ενώσεων	45
3.4. Προσδιορισμός της TPC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο	

Folin-Ciocalteu	46
3.5. Προσδιορισμός της TAC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH	47
3.6. Προσδιορισμός της TAC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο FRAP	48
3.7. Προσδιορισμός γαλλικού οξέος σε εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού με την τεχνική RP-HPLC	50
3.8. Φασματοσκοπία FTIR	53
3.9. Στατιστική και χημειομετρική ανάλυση	53
Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα και Συζήτηση	56
4.1. Μέθοδοι αναφοράς	56
4.2. FTIR χαρακτηρισμός σκόνης χαρουπιού και πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με στόχο την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR	60
4.3. Σύγκριση προγνωστικών μοντέλων PLSR για προσδιορισμό διαφορετικών αντιοξειδωτικών παραμέτρων	70
4.4. Σύγκριση φασματικής περιοχής και μεθόδου προεπεξεργασίας φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR για την ανάπτυξη ανθεκτικών (<i>robust</i>) προγνωστικών μοντέλων PLSR	79
4.4.1. Φασματική περιοχή	80
4.4.2. Μέθοδοι προεπεξεργασίας φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR	84
Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία	90
5.1. Συμπεράσματα	90
5.2. Μελλοντική Εργασία	93
Βιβλιογραφία	95

Κατάλογος Εικόνων και Σχημάτων

Εικόνα 2.1.	Απεικόνιση χαρουπιάς σε τοιχογραφία της αρχαίας Αιγύπτου.	4
Εικόνα 2.2.	Απεικόνιση του άγουρου και ώριμου χαρουπιού (σάρκα και σπόροι).	5
Σχήμα 2.1.	Κατηγοριοποίηση μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση τον μηχανισμό δράσης των αντιοξειδωτικών.	10
Σχήμα 2.2.	Οξείδωση πολυφαινολικών ενώσεων και αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.	11
Σχήμα 2.3.	Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας DPPH με την αντιοξειδωτική ένωση.	12
Σχήμα 2.4.	Μηχανισμός αντίδρασης του συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ με την αντιοξειδωτική ένωση.	13
Σχήμα 2.5.	(α) Μοντέλο αρμονικού ταλαντωτή, (β) Μη αρμονικό μοντέλο.	17
Σχήμα 2.6.	Σχηματική αναπαράσταση συμβολόμετρου Michelson.	18
Σχήμα 2.7.	Αρχή λειτουργίας φασματοσκοπίας ATR-FTIR.	20
Σχήμα 2.8.	Βάσεις δεδομένων X και Y.	27
Σχήμα 2.9.	Γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου PLSR.	31
Σχήμα 2.10.	Διαδικασία προσαρμογής και αξιολόγησης ενός μοντέλου PLSR.	32
Σχήμα 2.11.	Στάδια ανάπτυξης ανθεκτικών (<i>robust</i>) μοντέλων PLSR με αξιοποίηση φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR.	35
Σχήμα 2.12.	Σύγκριση των μοντέλων PLSR για A τις συγκεντρώσεις κατεχίνης ($\mu\text{g/g}$) και B της TAC ($\text{QEAC}/100\text{ g}$) για δείγματα μελιού.	38
Σχήμα 2.13.	Φάσματα FTIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.	40
Σχήμα 3.1.	Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της μεθόδου Folin-Ciocalteu με πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος.	46
Σχήμα 3.2.	Ενδεικτική σιγμοειδής καμπύλη για τον υπολογισμό της τιμής EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος).	48
Σχήμα 3.3.	Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της μεθόδου FRAP με πρότυπα διαλύματα Trolox.	49
Σχήμα 3.4.	Χρωματογράφημα A των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και B του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (απουσία σακχάρων). Η ταυτοποίηση της κορυφής του γαλλικού οξέος στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος έγινε με βάση τον χρόνο κατακράτησης ($R_t=3,6$ λεπτά).	51
Σχήμα 3.5.	Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με RP-HPLC.	52
Σχήμα 4.1.	Κανονικοποιημένα φάσματα FTIR δειγμάτων σκόνης χαρουπιού ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), B μεγέθυνση της περιοχής $4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ και C μεγέθυνση της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυφαινολικών μορίων ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).	62
Σχήμα 4.2.	Κανονικοποιημένα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία (κόκκινη γραμμή) και απουσία σακχάρων (πορτοκαλί γραμμή).	65
Σχήμα 4.3.	Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος) και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με	69

	εφαρμογή του μοντέλου PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR (4000–400 cm^{-1}) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).	
Σχήμα 4.4.	Αντιστοιχία αριθμού LVs και RMPRESS για το μοντέλο που προβαίνει σε πρόβλεψη της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg GA/g εκχυλίσματος) για τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων).	71
Σχήμα 4.5.	Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς A της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος), B της TAC εκφραζόμενης σε τιμές EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος), C της TAC (mg TE/g εκχυλίσματος), D της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg/g εκχυλίσματος) και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).	75
Σχήμα 4.6.	Συνεισφορά προγνωστικών μεταβλητών X (cm^{-1}) στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς A της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος), B της TAC εκφραζόμενης σε τιμές EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος) και C της TAC (mg TE/g εκχυλίσματος).	78
Σχήμα 4.7.	Διάγραμμα VIP με έμφαση στις προγνωστικές μεταβλητές X (cm^{-1}) που συνεισφέρουν περισσότερο στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς της TPC των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων.	81
Σχήμα 4.8.	Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) A και B σε ολόκληρη την περιοχή του MIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), C και D της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) και E και F των υποπεριοχών $\sim 3585\text{--}2810$ και $1711\text{--}912\text{ cm}^{-1}$. Τα A , C και E κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος, ενώ τα B , D και F με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού.	83
Σχήμα 4.9.	Παραγωγοποιημένα φάσματα FTIR που προέκυψαν με τον υπολογισμό της πρώτης (κόκκινη γραμμή) και της δεύτερης (κίτρινη γραμμή) παραγώγου μη επεξεργασμένου φάσματος πολυφαινολικού εκχυλίσματος σκόνης χαρουπιού, στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).	85
Σχήμα 4.10.	Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν από την εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας A και B τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR, C και D τα κανονικοποιημένα φάσματα (<i>Offset correction</i>), E και F τα παραγωγοποιημένα φάσματα πρώτης παραγώγου και G και H δεύτερης παραγώγου στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$). Τα A , C και E κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος, ενώ τα B , D και F με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού.	87

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1.	Επισκόπηση των εφαρμογών των χημειομετρικών μεθόδων στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των τροφίμων.	22
Πίνακας 2.2.	Ερευνητικές μελέτες που στόχευσαν στον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας και/ή άλλων παραμέτρων των τροφίμων, στηριζόμενες στη φασματοσκοπία FTIR και τη χημειομετρική ανάλυση.	24
Πίνακας 2.3.	Σύγκριση των μοντέλων PLSR για τα διαφορετικά είδη χυμού.	37
Πίνακας 2.4.	Σύγκριση αποτελεσμάτων της TPC και της TAC δειγμάτων σοκολάτας.	38
Πίνακας 2.5.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των έξι διαφορετικών μοντέλων PLSR για δείγματα μελιού.	38
Πίνακας 2.6.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των μοντέλων PLSR για δείγματα βατόμουρων.	39
Πίνακας 2.7.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών παραμέτρων σε δείγματα σοκολάτας.	44
Πίνακας 3.1.	Μέτρα αξιολόγησης της χρωματογραφικής μεθόδου.	52
Πίνακας 4.1.	Σύγκριση των τιμών αναφοράς που προέκυψαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, FRAP και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων) για τον συνολικό αριθμό δειγμάτων που αξιοποιήθηκαν κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR.	57
Πίνακας 4.2.	Τιμές αναφοράς (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) τριών επαναληπτικών μετρήσεων ($N=3$) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) που αξιοποιήθηκαν κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR.	57
Πίνακας 4.3.	Συσχέτιση Pearson (r) των τιμών αναφοράς της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος), της TAC εκφραζόμενης με την τιμή EC_{50} (μg/mL εκχυλίσματος) ή μέσω της μεθόδου FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος) και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (μg GA/g εκχυλίσματος).	59
Πίνακας 4.4.	Συχνότητες δόνησης λειτουργικών ομάδων που απαντούν στα δείγματα σκόνης χαρουπιού.	63
Πίνακας 4.5.	Χαρακτηριστικές κορυφές που εντοπίζονται στα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία και απουσία σακχάρων.	66
Πίνακας 4.6.	Μοντέλο PLSR που κατασκευάστηκε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) για την πρόβλεψη της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος).	69
Πίνακας 4.7.	Αριθμός LVs που επιλέχθηκε μέσω της διαδικασίας <i>leave-one-out</i> CV για το κάθε μοντέλο PLSR, μαζί με το εκατοστιαίο ποσοστό (%) διακύμανσης που εξηγείται μέσω αυτού για τις βάσεις δεδομένων X και Y.	71
Πίνακας 4.8.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (<i>robustness</i>) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC, της TAC και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα	73

	πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων) σκόνης χαρουπιού, με αξιοποίηση διαφορετικών συμβατικών μεθόδων.	
Πίνακας 4.9.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (<i>robustness</i>) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας δεδομένα από τρεις διαφορετικές φασματικές περιοχές των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).	82
Πίνακας 4.10.	Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (<i>robustness</i>) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας επεξεργασμένα ή μη φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR, στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος (1800–800 cm ⁻¹).	86

Κατάλογος Συντμήσεων

FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
TPC	Total Polyphenolic Content	Συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα
TAC	Total Antioxidant Capacity	Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα
PLSR	Partial Least Squares Regression	Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Potential	Αναγωγική ικανότητα τρισθενούς σιδήρου
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικά είδη οξυγόνου
NIR	Near-Infrared	Εγγύς υπέρυθρο
MIR	Mid-Infrared	Μέσο υπέρυθρο
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Οργανισμός τροφίμων και γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	Αντιοξειδωτική ικανότητα ισοδύναμου Trolox
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity	Ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου
LC	Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία
CE	Capillary Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
HAT	Hydrogen Atom Transfer	Μεταφορά ατόμου υδρογόνου
ET	Electron Transfer	Μεταφορά ηλεκτρονίου
GAE	Gallic Acid Equivalent	Ισοδύναμο γαλλικού οξέος
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazine	2,4,6-τρι(2-πυριδυλο)-1,3,5-τριαζίνης
IR	Infrared	Υπέρυθρο
ATR	Attenuated Total Reflectance	Εξασθετισμένη ολική ανάκλαση
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier
IRE	Internal Reflection Element	Στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης
LVs	Latent Variables	Λανθάνουσες μεταβλητές
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση κύριας συνιστώσας
HCA	Hierarchical Cluster Analysis	Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες
PCR	Principal Component Regression	Παλινδρόμηση κύριας συνιστώσας
DA	Discriminant Analysis	Διαχωριστική ανάλυση
PLS-DA	Partial Least Squares – Discriminant Analysis	Διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
MLR	Multiple Linear Regression	Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

DFA	Discriminant Function Analysis	Λειτουργική διαχωριστική ανάλυση
ANC	Anthocyanins	Ανθοκυανίνες
PAC	Proanthocyanidins	Προανθοκυανιδίνες
TFC	Total Flavonoid Content	Συνολική περιεκτικότητα φλαβονοειδών
SiPLS	Synergy interval Partial Least Squares	Διάστημα συνέργειας μερικών ελαχίστων τετραγώνων
SVM	Support Vector Machine	Μηχανή διανυσματικής υποστήριξης
ECVA	Extended Canonical Variates Analysis	Εκτεταμένη ανάλυση κανονικής διακύμανσης
UV-Vis	Ultraviolet-Visible	Υπεριώδες-ορατό
ICA	Iron Chelating Activity	Ικανότητα χηλικής δέσμευσης σιδήρου
SS	Soluble Solids	Διαλυτά στερεά
TA	Titrateable Acidity	Ογκομετρούμενη οξύτητα
WBC	Water Binding Capacity	Ικανότητα δέσμευσης νερού
OBC	Oil Binding Capacity	Ικανότητα δέσμευσης λιπόφιλων ενώσεων
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid	2,2'-αζινοδις(3-αιθυλοβενζοθειαζολιν)-6-σουλφονικού οξέος
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης
NIPALS	Non-linear Iterative Partial Least Squares	
PCs	Principal Components	Κύριες συνιστώσες
EV	External Validation	Εξωτερική επικύρωση
CV	Cross-Validation	Διασταυρούμενη επικύρωση
MSEC	Mean Square Error of Calibration	Μέσο τετραγωνικό σφάλμα βαθμονόμησης
MSECV	Mean Square Error of Cross-Validation	Μέσο τετραγωνικό σφάλμα διασταυρούμενης επικύρωσης
PRESS	Predicted Residual Error Sum of Squares	Προβλεπόμενο άθροισμα τετραγώνων των σφαλμάτων
MSEP	Mean Square Error of Prediction	Μέσο τετραγωνικό σφάλμα πρόγνωσης
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration	Τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος βαθμονόμησης
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross-Validation	Τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος της διασταυρούμενης επικύρωσης
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction	Τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος πρόβλεψης
TACC	Total Anthocyanin Content	Συνολική περιεκτικότητα ανθοκυανινών
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantitation	Όριο ποσοτικοποίησης
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση

RMPRESS	Root Mean Predicted Residual Error Sum of Squares	Τετραγωνική ρίζα του μέσου προβλεπόμενου αθροίσματος των τετραγώνων των σφαλμάτων
GA	Gallic Acid	Γαλλικό οξύ
TE	Trolox Equivalent	Ισοδύναμο Trolox
VIP	Variable Importance in Projection	Συνεισφορά μεταβλητών στην προβολή
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity	Αναγωγική ικανότητα δισθενούς χαλκού

Κεφάλαιο 1 | Εισαγωγή – Στόχος και Πρωτοτυπία

1.1. Εισαγωγή

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει συσχετίσει την οξείδωση των βιολογικών συστατικών με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης και διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως είναι το Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Η επιστημονική κοινότητα αποδίδει τις δυσμενείς επιπτώσεις στη συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στα κύτταρα, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των φυσιολογικών.¹⁻³ Τα ROS σχηματίζονται μέσω αερόβιων μεταβολικών διεργασιών στο κύτταρο και δρουν ως δευτερεύοντες σηματοδότες, ρυθμίζοντας παράλληλα τη διαδικασία απόπτωσης. Εν τούτοις, όταν βρεθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η δράση τους κρίνεται απειλητική για τη λειτουργικότητα των ιστών και των οργάνων, καθώς προωθούν την οξείδωση κυτταρικών συστατικών, επιφέροντας τροποποιήσεις που εμπλέκονται ενδεχομένως σε διάφορες παθολογίες.⁴

Η στροφή του καταναλωτικού κοινού σε επιλογές διατροφής φυτικής προέλευσης δεν αποτελεί απλώς μια επίκαιρη τάση. Βασικό κριτήριο επιλογής φαίνεται να είναι τα οφέλη που προσδίδουν οι φυτικές τροφές στην ανθρώπινη υγεία.⁴ Συγκεκριμένα, επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την αυξημένη κατανάλωση φυτικών προϊόντων με το μειωμένο ρίσκο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, ενώ μέρος της ευεργετικής τους δράσης αποδίδεται στην περιεκτικότητά τους σε ουσίες με αντιοξειδωτικό χαρακτήρα.^{1,5} Η φυσιολογική δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών αποσκοπεί στην αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων στις οποίες εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες, αλλά και στη διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων.⁵

Επομένως, οι τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά έχουν προσελκύσει δικαίως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, η οποία προσεγγίζει το θέμα από πολλές και διαφορετικές σκοπιές. Ο καρπός της χαρουπιάς αποτελεί μια από τις τροφές που συγκέντρωσαν το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικά συστατικά κυρίως της κατηγορίας των πολυφαινολικών ενώσεων. Ενδεικτικά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα πλούσια πολυφαινολικά εκχυλίσματα της σάρκας χαρουπιού είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία εξαιτίας της υψηλής αντιοξειδωτικής τους δράσης.⁶

Στοχεύοντας στην εκμετάλλευση των θετικών επιδράσεων που φέρει η κατανάλωση τέτοιων προϊόντων στην ανθρώπινη υγεία, οι επιστήμονες προχωρούν στον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των τροφίμων. Ο διαφορετικός τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών στις διάφορες μήτρες επιτάσσει ωστόσο την ανάπτυξη και την εφαρμογή

διαφορετικών μεθόδων. Οι συμβατικές αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κόρον κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, στις οποίες γίνεται χρήση κλασσικών αντιδραστηρίων (Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP κ.ά.), ενώ στη δεύτερη ανήκουν όσες προχωρούν σε διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως είναι για παράδειγμα η υγρή χρωματογραφία και η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς.⁷

Για την απόκτηση αντιπροσωπευτικής εικόνας της δράσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων σε *in vivo* συστήματα, απαιτείται η αξιοποίηση δύο ή και περισσότερων συμβατικών μεθόδων. Κάτι τέτοιο ωστόσο, προϋποθέτει αυξημένο χρόνο ανάλυσης, κατανάλωση μεγάλου όγκου αντιδραστηρίων, υψηλό κόστος και έχει αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό, οι επιστήμονες κλήθηκαν να προσεγγίσουν το ζήτημα μέσω εναλλακτικών οδών. Τα τελευταία χρόνια γίνεται εκμετάλλευση των πλεονεκτημάτων που παρέχουν οι φασματοσκοπικές τεχνικές εγγύς (Near-Infrared, NIR) και μέσου υπέρυθρου (Mid-Infrared, MIR) και σκεδασμού Raman, σε συνδυασμό με τις δυνατότητες που παρέχει η χημειομετρική ανάλυση επιτυγχάνοντας ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς σε τρόφιμα, παρακάμπτοντας κατ' αυτόν τον τρόπο κλασσικές και χρονοβόρες εργαστηριακές διαδικασίες. Συγκεκριμένα, ερευνητικές μελέτες κατάφεραν να αναπτύξουν προγνωστικά μοντέλα παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR) για τον προσδιορισμό διάφορων αντιοξειδωτικών παραμέτρων σε τρόφιμα, ποτά ή εκχυλίσματα (π.χ. κακάο, κρασί, χυμοί φρούτων, εκχυλίσματα πρόπολης κ.ά.) αξιοποιώντας φασματοσκοπικά δεδομένα.¹

1.2. Στόχος και Πρωτοτυπία

Παράλληλα με την προσπάθεια αναβίωσης της καλλιέργειας της χαρουπιάς στην Κύπρο, πραγματοποιούνται εκτεταμένες ερευνητικές μελέτες με στόχο την εκμετάλλευση της αυξανόμενης παραγωγής χαρουπιού προς όφελος της κυπριακής οικονομίας, μέσω της ανάπτυξης νέων προϊόντων που θα προωθούνται τελικά στη διεθνή αγορά. Το χαρούπι φημίζεται για την υψηλή περιεκτικότητά του σε θρεπτικά και ευεργετικά για την υγεία συστατικά, μεταξύ των οποίων είναι και οι πολυφαινολικές ενώσεις, γνωστές για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση. Επομένως, η ανάπτυξη νέων και γρήγορων μεθόδων για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων χαρουπιού θεωρείται απαραίτητη στα πλαίσια μιας τέτοιας προσπάθειας. Μέχρι στιγμής, ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών παραμέτρων δειγμάτων χαρουπιού

συντελείται μέσω της αξιοποίησης συμβατικών αναλυτικών μεθόδων, σύμφωνα με τις εκτεταμένες αναφορές της βιβλιογραφίας.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η παράκαμψη των μειονεκτημάτων που συνοδεύουν την εφαρμογή τέτοιων μεθόδων μέσω της ανάπτυξης μιας εναλλακτικής προσέγγισης. Συγκεκριμένα, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό της συνολικής πολυφαινολικής περιεκτικότητας (Total Polyphenolic Content, TPC) και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) εκχυλισμάτων σάρκας χαρουπιού, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα FTIR (Fourier-Transform Infrared). Εξετάστηκε επίσης, η δυνατότητα απευθείας προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών παραμέτρων λαμβάνοντας υπόψιν τα φασματοσκοπικά δεδομένα της πρώτης ύλης της σάρκας, στοχεύοντας στην παράκαμψη του σταδίου της εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων. Το εγχείρημα προσεγγίστηκε μέσω της ανάπτυξης γραμμικής σχέσης μεταξύ των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των δειγμάτων με τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από την εφαρμογή των συμβατικών μεθόδων Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, FRAP και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος. Στα πλαίσια βελτιστοποίησης των μοντέλων PLSR εξετάστηκε η περιοχή του MIR που παρέχει τις πιο πλούσιες δομικές πληροφορίες για τα δείγματα και συσχετίζεται σημαντικά με τον αντιοξειδωτικό τους χαρακτήρα, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση που έχει η μέθοδος προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR στην τελική προγνωστική ικανότητα των μοντέλων.

Κεφάλαιο 2 | Θεωρητικό Υπόβαθρο

2.1. Η χαρουπιά και ο καρπός της

Η χαρουπιά είναι ένα ιθαγενές δέντρο της Μεσογείου, αειθαλές, καρποφόρο και μακρόβιο, το οποίο απαντά αυτοφύες στη Μεσόγειο από την αρχαιότητα (Εικόνα 2.1) και καλλιεργείται πέραν αυτής λόγω της βαρυσήμαντης αξίας του καρπού της.⁸ Η καλλιέργειά της δεν απαιτεί ιδιαίτερη φροντίδα, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί και να ευδοκιμήσει σε θερμές και ξηρές περιοχές, έχοντας περιορισμένες εδαφικές απαιτήσεις.⁹



Εικόνα 2.1. Απεικόνιση χαρουπιάς σε τοιχογραφία της αρχαίας Αιγύπτου.¹⁰

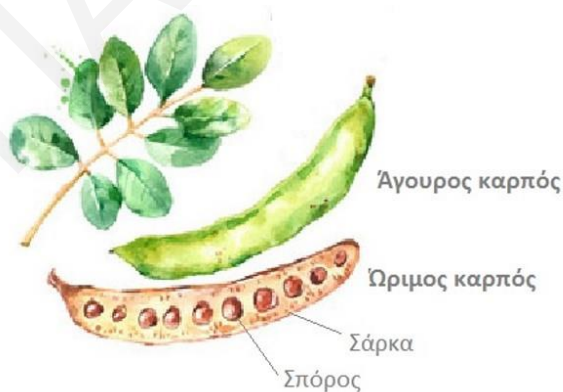
Το χαρούπι, ο καρπός δηλαδή της χαρουπιάς, αποτέλεσε την κύρια εξαγωγική δραστηριότητα των Κυπρίων γεωργών για αρκετές δεκαετίες, χαρίζοντάς του δικαιωματικά το όνομα «μαύρος χρυσός» της Κύπρου.¹¹ Οι ηγετικές χώρες στην παραγωγή χαρουπιού κατά τη χρονική περίοδο 1994–2019, σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), ήταν κατά σειρά η Πορτογαλία, η Ιταλία, το Μαρόκο, η Ελλάδα, η Τουρκία και η Κύπρος.¹² Η παγκόσμια παραγωγή χαρουπιού εκτιμάται στις 160.000 τόνους ετησίως και φαίνεται να επηρεάζεται από παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία, οι κλιματολογικές/γεωλογικές συνθήκες και οι γεωργικές πρακτικές.^{8,13}

Η επιστημονική ονομασία της χαρουπιάς, *Ceratonia siliqua* L., προέρχεται από την ελληνική λέξη *κέρας* ή αλλιώς κέρατο και τη λατινική *siliqua*, οι οποίες υποδηλώνουν αντίστοιχα το σχήμα και τη σκληρότητα του καρπού.^{11,14} Το χαρούπι επιδέχεται μορφολογικές αλλαγές και τροποποιήσεις στη σύστασή του κατά τη διαδικασία της

ωρίμανσης. Ειδικότερα, το άγουρο χαρούπι έχει πράσινο χρώμα και αυξάνεται σε μέγεθος, από τον Φεβρουάριο μέχρι τις αρχές Ιουνίου, μέχρις ότου αποκτήσει το μέγιστο μήκος του. Κατά τη διάρκεια του Ιούλη, αλλάζει σε σκούρο καφέ και ωριμάζει εντελώς περί τα τέλη Αυγούστου, έπειτα από απώλεια του μεγαλύτερου ποσοστού της υγρασίας του και επακόλουθη συρρίκνωση.¹⁵ Ο ώριμος καρπός είναι πεπλατυσμένος, ευθύς ή καμπυλωτός ή ελαφρώς στριμμένος, με μήκος που φτάνει τα 25 cm και πλάτος που κυμαίνεται μεταξύ 1,3 και 4 cm. Το άγουρο χαρούπι έχει στυφή γεύση σε αντίθεση με το ώριμο που είναι αρκετά γλυκό.^{8,16}

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρπών, αλλά και η σύστασή τους, επηρεάζονται επίσης από την ποικιλία του δέντρου και τις κλιματολογικές συνθήκες ανάπτυξης.¹⁴ Στην Κύπρο υπάρχουν τρεις ποικιλίες χαρουπιάς, η άγρια, η ήμερη και η αποστολική. Στις ήμερες εντάσσονται οι ποικιλίες «Τηλλυρία», «Κουμποτά» και «Κουντούρκα». Η ποικιλία «Τηλλυρία» συγκαταλέγεται στις πιο διαδεδομένες καλλιεργούμενες ποικιλίες και εξαιτίας αυτής, η Κύπρος έμεινε γνωστή για το ποιοτικό της εμπόρευμα.¹⁵

Το χαρούπι αποτελείται από δύο κύρια μέρη, τη σάρκα που απαρτίζει το 90% του καρπού και τους σπόρους που αντιστοιχούν στο υπόλοιπο 10% (Εικόνα 2.2).⁹ Η σάρκα συντίθεται εξωτερικά από το περικάρπιο και εσωτερικά από μια μαλακότερη περιοχή, το μεσοκάρπιο. Αντίστοιχα, οι σπόροι αποτελούνται από τον φλοιό, το ενδοσπέρμιο και το φύτρο και θεωρούνται το ακριβότερο μέρος του καρπού.^{17,18}



Εικόνα 2.2. Απεικόνιση του άγουρου και ώριμου χαρουπιού (σάρκα και σπόροι).¹⁹

Η αξιοποίηση των σπόρων γίνεται κυρίως από τη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή του φυσικού πρόσθετου E410 ή αλλιώς όπως είναι γνωστό, του κόμμεος χαρουπιού. Το κόμμι χαρουπιού είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος εξάγεται από το ενδοσπέρμιο και χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως πηκτικός παράγοντας, γαλακτωματοποιητής και σταθεροποιητής. Οι εφαρμογές του επεκτείνονται επίσης στις βιομηχανίες καλλυντικών,

φαρμάκων, χρωμάτων κ.λπ.⁹ Επιπλέον, από το φύτρο των σπόρων παράγεται και το αλεύρι φύτρων, το οποίο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και χρησιμοποιείται σαν συστατικό σε συμπληρώματα διατροφής ή σε τροφές απαλλαγμένες από γλουτένη (*gluten-free*) για άτομα που πάσχουν από κοιλιοκάκη.²⁰

Η σάρκα του χαρουπιού, αν και αποτελεί το μεγαλύτερο και το πιο θρεπτικό μέρος του, αντιμετωπίζεται ως το πιο υποτιμημένο με μεγάλες ποσότητες να απορρίπτονται και να παραμένουν ανεκμετάλλευτες κάθε χρόνο.^{21,22} Μέχρι πρότινος, η αξιοποίησή της περιοριζόταν στην παραγωγή ζωοτροφών ή στην εκμετάλλευση των σακχάρων για παραγωγή προϊόντων, όπως είναι το χαρουπόμελο και η σκόνη χαρουπιού.²³ Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πολυάριθμες μελέτες παρέθεσαν ενδιαφέροντα ευρήματα για την επίδραση που έχουν στην ανθρώπινη υγεία οι βιοδραστικές ουσίες που εμπεριέχονται σε αυτήν. Οι φυτικές ίνες, οι κυκλιτόλες και οι πολυφαινόλες είναι οι ομάδες ενώσεων που προσέλκυσαν το μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον και χάρισαν τη δυναμική αξιοποίησης των συστατικών της σε φυτικά συμπληρώματα διατροφής κ.ά.^{13,24}

Εν συντομία λοιπόν, το χαρούπι αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, με κυρίαρχη την παρουσία των σακχάρων (45–52%) και των ακατέργαστων ινών (≥ 40 %). Εξίσου σημαντική θεωρείται και η παρουσία των πολυφαινολικών μορίων (1,4–2,0 %), με την έκρηξη ενδιαφέροντος που παρουσιάστηκε την τελευταία δεκαετία να υπόσχεται πολλές και ποικίλες εφαρμογές στους διάφορους τομείς της επιστήμης.¹⁴

2.2. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του χαρουπιού

Η ευρύτερη έννοια του αντιοξειδωτικού εστιάζεται στην ικανότητα μιας ουσίας να καθυστερεί και/ή να παρεμποδίζει την οξείδωση ενός ευοξειδωτου υποστρώματος, όταν είναι παρούσα σε αρκετά χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με αυτό. Η φυσιολογική δράση των αντιοξειδωτικών αποσκοπεί στην αποφυγή της κυτταρικής βλάβης, η οποία προκύπτει ως συνέπεια των αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών που επιφέρει η περίσσεια των ROS.⁵

Η αξιοποίηση φθηνών πρώτων υλών με σημαντικά αναφερόμενες ποσότητες αντιοξειδωτικών, όπως είναι το χαρούπι, μπορεί να επιφέρει από κοινού κέρδος στην οικονομία και την ανθρώπινη υγεία. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως, παρά την ύπαρξη καρτενοειδών ενώσεων και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών στα εκχυλίσματα χαρουπιού, οι πλείστες μελέτες αναφέρονται στην άμεσα συσχετιζόμενη πολυφαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων και την αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν.^{25,26}

Οι πολυφαινολικές ενώσεις απαντούν σε ποικιλία τροφών φυτικής προέλευσης. Πρόκειται για δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται υπό τον όρο «πολυφαινολικές ενώσεις» εξαιτίας της κοινής χημικής δομής που μοιράζονται. Όλες οι ενώσεις διαθέτουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες και ποικίλουν εξαιτίας των διαφορετικών παραλλαγών που δέχεται ο βασικός σκελετός. Ουσιαστικά, ο βαθμός οξείδωσης, υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης, γλυκοσυλίωσης ή η σύζευξή τους με άλλα μόρια, όπως είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα σάκχαρα, τις κατατάσσουν στις διάφορες υποκατηγορίες.²⁷

Η αντιοξειδωτική τους δράση αποδίδεται κυρίως στις υποκαταστάσεις που δέχεται ο φαινολικός δακτύλιος. Μια εκ των αποδοτικότερων υποκαταστάσεων θεωρείται η τοποθέτηση δεύτερης υδροξυλομάδας σε *όρθο* θέση ως προς τη φαινολική. Τα συγκεκριμένα παράγωγα είναι αρκετά σταθερά κατόπιν απώλειας ενός ατόμου υδρογόνου, λόγω του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ της φαινολικής ρίζας και του γειτονικού υδροξυλίου. Καθαυτό τον τρόπο, ο ρυθμός διάδοσης των αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών μειώνεται αισθητά και/ή τερματίζεται, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη εικόνα των δυσμενών επιπτώσεων που επιφέρουν.²⁸

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πάνω από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις, ξεκινώντας από απλά φαινολικά μόρια και φτάνοντας μέχρι σύνθετα συστήματα υψηλού πολυμερισμού και/ή πολυφαινολικά παράγωγα.^{29,30} Όλες οι ενώσεις, από τις πιο απλές μέχρι και τις πιο σύνθετες προσφέρουν τα ίδια οφέλη. Συγκεκριμένα, επιδρούν στον ανθρώπινο οργανισμό ως αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριδιακά και αντικά. Ειδικότερα, εστιάζοντας στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, δρουν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή αλληλεπιδρώντας με άλλα συστατικά, όπως πρωτεΐνες, ιόντα και μεταλλοκατιόντα, επηρεάζοντας το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συστήματος. Αποτελέσματα *in vitro* μελετών έχουν αποδείξει την αυξημένη αντιοξειδωτική τους δράση συγκριτικά με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως είναι τα καροτενοειδή και ορισμένες βιταμίνες.³¹

Οι κυριότερες ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται στα χαρούπια είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες.⁶ Στην πλειοψηφία τους οι φαινολικές ενώσεις είναι χημικά δεσμευμένες στις φυτικές ίνες του καρπού, ενώ εντοπίζονται και ως ελεύθερα μόρια ή συζευγμένα σε διαλύτη μορφή.¹³

Η επικρατέστερη ομάδα ενώσεων που συναντάται είναι τα **φαινολικά οξέα**, τα οποία διακρίνονται με βάση τη δομή τους σε υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά, με προεξάρχοντα είδη το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του, τα οποία συγκαταλέγονται στην

πρώτη κατηγορία.¹⁴ Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις με χαρακτηριστικά παραδείγματα να είναι, το κινναμικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ κ.ά.^{6,13}

Από την ομάδα των **φλαβονοειδών** ενώσεων οι κυρίαρχες κατηγορίες που εντοπίζονται είναι οι φλαβονόλες και οι φλαβαν-3-όλες, ενώ ακολουθούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες και οι ισοφλαβανόνες.⁶ Ειδικότερα, από την ομάδα των φλαβονολών, η κερκετίνη και η μυρικετίνη, αλλά και τα γλυκοσιδικά τους παράγωγα, είναι οι ουσίες που συνδράμουν περισσότερο στη συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα του καρπού.¹³

Τέλος, οι **ταννίνες** αποτελούν την πιο χαρακτηριστική ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάται στα χαρούπια, καθώς προσδίδουν σε αυτά τη χαρακτηριστική στυφή γεύση. Οι ταννίνες κατηγοριοποιούνται σε υδρολύμενες και συμπυκνωμένες, οι οποίες είναι γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες. Οι υδρολύμενες ταννίνες προκύπτουν κατόπιν εστεροποίησης του γαλλικού ή του ελλαγικού οξέος με κάποιο μόριο γλυκόζης ή κάποιας πολυφαινόλης, όπως είναι η κερκετίνη και επακόλουθο πολυμερισμό. Αντίστοιχα, οι συμπυκνωμένες ταννίνες, οι οποίες κατέχουν και το μεγαλύτερο ποσοστό, συντίθενται έπειτα από εστεροποίηση του γαλλικού οξέος με κάποιο μόριο της ομάδας των φλαβαν-3-ολών και πολυμερισμό του μονομερούς.³²

Η TPC των καρπών παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις και σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές κυμαίνεται από 45–5376 mg GAE/100 g χαρουπιού.¹³ Οι διακυμάνσεις αυτές αποδίδονται στις διαφορετικές κλιματολογικές/γεωλογικές συνθήκες ανάπτυξης, στη διαφορετική ποικιλία και φύλο του δέντρου, καθώς και στα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των καρπών.^{8,23,33,34} Επιπλέον, οι γεωργικές πρακτικές, ο τρόπος και η χρονική διάρκεια αποθήκευσης αλλά και η επεξεργασία (π.χ. καβούρδισμα) των χαρουπιών, προσφέρουν αυξημένη ποικιλομορφία στα αποτελέσματα τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά. Τέλος, από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες φαίνεται να είναι και η μέθοδος εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων, καθώς τα πλείστα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζονται ασύμφωνα και/ή μη συγκρίσιμα. Ωστόσο, στην πλειοψηφία τους οι μελέτες συγκλίνουν ως προς την κυρίαρχη θέση που κατέχει το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του.³⁵

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στο χαρούπι, αποτελεί ήδη αρωγό στους τομείς της ανθρώπινης υγείας και της βιομηχανίας τροφίμων. Ειδικότερα, έχουν αναφερθεί θετικές επιδράσεις από την κατανάλωση σκόνης χαρουπιού στην πρόληψη σοβαρών ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου, η

υπερχοληστερολαιμία και ο διαβήτης τύπου II.^{4,14,36} Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε και η βελτιωμένη εικόνα ορισμένων διαταραχών διάθεσης και άγχους κατόπιν επίδρασης του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των σπόρων χαρουπιού.²⁸ Τέλος, στον τομέα των τροφίμων, πέραν της δυνατότητας αντικατάστασης των συνθετικών πρόσθετων αντιοξειδωτικών με φυσικά, παρουσιάστηκε από την ερευνητική ομάδα των Goulas *et al.* και μια εναλλακτική προσέγγιση αξιοποίησης των πολυφαινολών του χαρουπιού. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές συνέθεσαν ένα νέο αντιμικροβιακό και αντιοξειδωτικό υλικό επικάλυψης για τις συσκευασίες των τροφίμων, εκμεταλλευόμενοι τα πλούσια πολυφαινολικά κατάλοιπα χαρουπιού, αυξάνοντας καθαυτό τον τρόπο τη διάρκεια ζωής των τροφίμων.²⁴

2.3. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των τροφίμων

Τα τελευταία είκοσι χρόνια, πολλές ερευνητικές μελέτες επικεντρώθηκαν στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων συστατικών των τροφίμων.¹ Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα εξαρτάται τόσο από τον τρόπο δράσης τους, όσο και από τα συνεργειακά ή ανταγωνιστικά φαινόμενα που επικρατούν στις διαφορετικές μήτρες. Επομένως, ο προσδιορισμός καθίσταται μια δύσκολη διαδικασία.³⁷ Παρά τις δυσκολίες, έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας που αυτές προσδίδουν στα τρόφιμα.¹

Οι συμβατικές αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρύτερα και έχουν ήδη εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων χαρουπιού, κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες.³ Στην πρώτη ομάδα υπάγονται οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιούν κλασσικά αντιδραστήρια, όπως είναι το FRAP, το TEAC, το DPPH, το ORAC κ.ά.,³⁵ ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) και η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE), για ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων αντιοξειδωτικών συστατικών.^{38,39} Ωστόσο, οι επιστήμονες επιδιώκουν να οδεύσουν σε ταχύτερες και πιο οικονομικές κατευθύνσεις ανάλυσης, που είναι ικανές να ανταπεξέλθουν στους γοργούς ρυθμούς της γραμμής παραγωγής και της διασφάλισης της ποιότητας των τροφίμων.

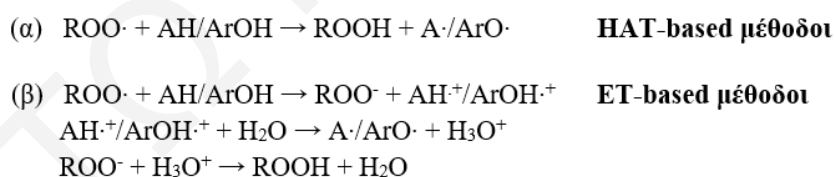
2.3.1. Συμβατικές μέθοδοι

Ο όρος «αντιοξειδωτική ικανότητα» αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να προστατεύουν τα βιολογικά υποστρώματα από τις καταστροφικές συνέπειες που επιφέρουν

τα ROS. Αρκετές μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί και αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της TAC ουσιών σε διάφορες μήτρες. Ωστόσο, δεν έχει καθιερωθεί ακόμη μια πρότυπη μέθοδος η οποία να χρησιμοποιείται κατά κόρον, καθώς ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα διάφορα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα δεν είναι απόλυτα καθορισμένος. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες της ανάλυσης, το υπόστρωμα αλλά και η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού πρέπει να προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό το πραγματικό περιβάλλον του τροφίμου, κάτι το οποίο δύσκολα επιτυγχάνεται.⁴⁰

Οι μέθοδοι προσδιορισμού διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το οξειδωτικό σώμα, τον μηχανισμό αντίδρασης «αντιοξειδωτικού–οξειδωτικού», την ένδειξη του τελικού σημείου της αντίδρασης, τις επικρατούσες συνθήκες και τον τρόπο έκφρασης των τελικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η βασική κατηγοριοποίηση γίνεται σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης των αντιοξειδωτικών. Με βάση αυτόν, έχουν χωριστεί σε μεθόδους μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), οι οποίες προσδιορίζουν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες με μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου και σε μεθόδους μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer, ET), κατά τις οποίες ο μηχανισμός προχωρά αντίστοιχα μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου (Σχήμα 2.1).⁴¹

Οι μηχανισμοί HAT και ET πραγματοποιούνται σχεδόν πάντα και σε όλα τα δείγματα ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα η διάκρισή τους να μην είναι στις πλείστες των περιπτώσεων ξεκάθαρη. Συγκεκριμένα, οι μελέτες των Huang *et al.* και των MacDonald-Wicks *et al.* κατατάσσουν τις δοκιμές (*assays*) Folin-Ciocalteu, TEAC και DPPH στις ET-based μεθόδους, ενώ οι Prior *et al.* αναφέρουν την ταυτόχρονη πραγματοποίηση και των δύο μηχανισμών.^{7,41–43}



Σχήμα 2.1. Κατηγοριοποίηση μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση τον μηχανισμό δράσης των αντιοξειδωτικών.⁴⁰

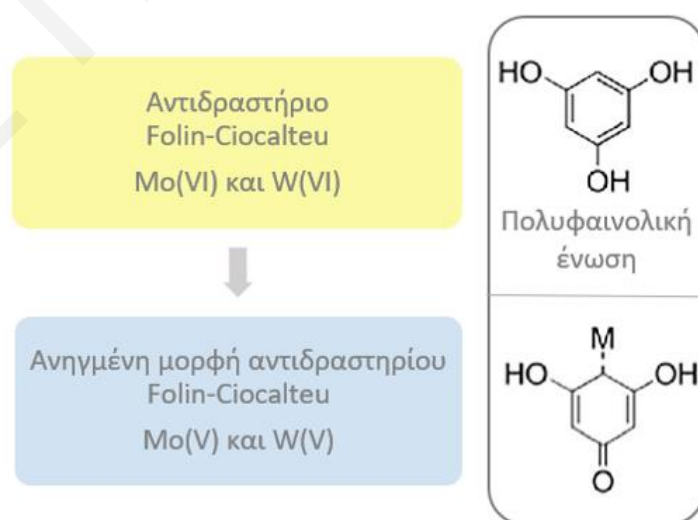
Ορισμένες από τις μεθόδους προσδιορισμού της TPC και/ή της TAC αναφέρονται και ως φασματοφωτομετρικές. Ο λόγος έγκειται στη μεταβολή του χρώματος που παρατηρείται κατά την αναγωγή της κύριας ένωσης του αντιδραστηρίου από το αντιοξειδωτικό. Η αύξηση ή η μείωση της απορρόφησης της σχηματιζόμενης ένωσης (χρωμοφόρο) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στο δείγμα.⁴⁰ Στο

εξής, θα σχολιαστούν συνοπτικά ορισμένες συμβατικές μέθοδοι προσδιορισμού της TPC και της TAC, αναφέροντας βασικά πλεονεκτήματα και αδυναμίες τους.

Προσδιορισμός Συνολικής Πολυφαινολικής Περιεκτικότητας (TPC) Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η φωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu βασίστηκε στην πρόιμη εργασία των Singleton και Rossi, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε αναγωγή του αντιδραστηρίου. Το εν λόγω αντιδραστήριο αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα πολυμερών ιόντων που αποτελείται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα.⁴⁴ Η μέθοδος εφαρμόστηκε αρχικά για τον προσδιορισμό φαινολικών αμινοξέων, όπως είναι η τυροσίνη σε πρωτεΐνες και στη συνέχεια αξιοποιήθηκε για την ανάλυση φαινολικών ενώσεων στο κρασί, από όπου βρήκε πλήθος εφαρμογών.⁴⁵

Σε μοριακό επίπεδο, ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το αντιοξειδωτικό στο μολυβδαινικό και βολφραμικό κέντρο του συμπλόκου και συνεπακόλουθη αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) και του W(VI) σε W(V), αντίστοιχα (Σχήμα 2.2). Το προκύπτον χρωμοφόρο σύμπλοκο, με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, παρουσιάζει ευρεία κορυφή απορρόφησης στην περιοχή του ορατού, με μέγιστο στα 765 nm (750–770 nm). Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των πολυφαινολών και εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent, GAE). Η μέθοδος εφαρμόζεται σε αλκαλικά περιβάλλοντα (pH~10), καθώς στο συγκεκριμένο pH οι πολυφαινόλες απαντούν στην ελεύθερη μορφή τους, δρώντας ευκολότερα ως αναγωγικά μέσα.⁴⁰



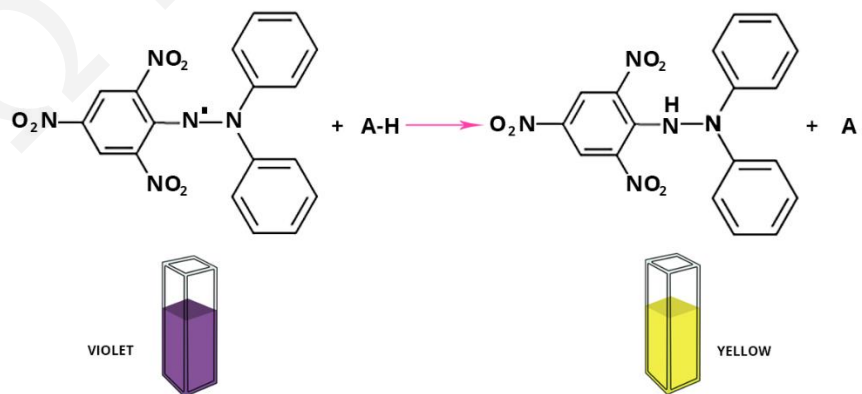
Σχήμα 2.2. Οξείδωση πολυφαινολικών ενώσεων και αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.

Αδιαμφισβήτητα, η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι απλή και αρκετά χρήσιμη για τον προσδιορισμό της συνολικής πολυφαινολικής σύστασης. Έρευνες αναφέρουν επίσης και τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της TPC που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και της TAC που προσδιορίζεται με τη χρήση άλλων αντιδραστηρίων, όπως είναι το DPPH, το FRAP, το ORAC κ.ά. Ωστόσο, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δεν εξειδικεύεται μόνο στον προσδιορισμό πολυφαινολικών ενώσεων. Η ύπαρξη άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στο δείγμα, όπως είναι για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ, επηρεάζει τα αποτελέσματα δίνοντας υπερεκτιμημένη εικόνα της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες.⁴²

Προσδιορισμός Συνολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC) Μέθοδος απόσβεσης ελεύθερης ρίζας DPPH

Η TAC ενός δείγματος μπορεί να προσδιοριστεί με βάση την ικανότητα απόσβεσης ελευθέρων ριζών που παρουσιάζει. Επομένως, αντιδραστήρια οργανικών ριζών, όπως είναι για παράδειγμα η ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH) μπορούν να αξιοποιηθούν για τον σκοπό αυτό.⁴⁶

Η ρίζα DPPH είναι μια αρκετά σταθερή οργανική ρίζα αζώτου. Η σταθερότητά της οφείλεται στον απεντοπισμό του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στους αρωματικούς δακτυλίους του μορίου (Σχήμα 2.3). Το εκτεταμένο αρωματικό σύστημα την καθιστά ικανή να απορροφά ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού και πιο συγκεκριμένα στα 515 nm, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό έντονο μωβ χρώμα. Κατά την αντίδρασή της με αντιοξειδωτικά/αναγωγικά μέσα σχηματίζεται η αντίστοιχη υδραζίνη, ανοικτού κίτρινου χρώματος. Συνεπώς, η μείωση της απορρόφησης της κορυφής στα 515 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού.⁴⁰



Σχήμα 2.3. Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας DPPH με την αντιοξειδωτική ένωση.⁴⁷

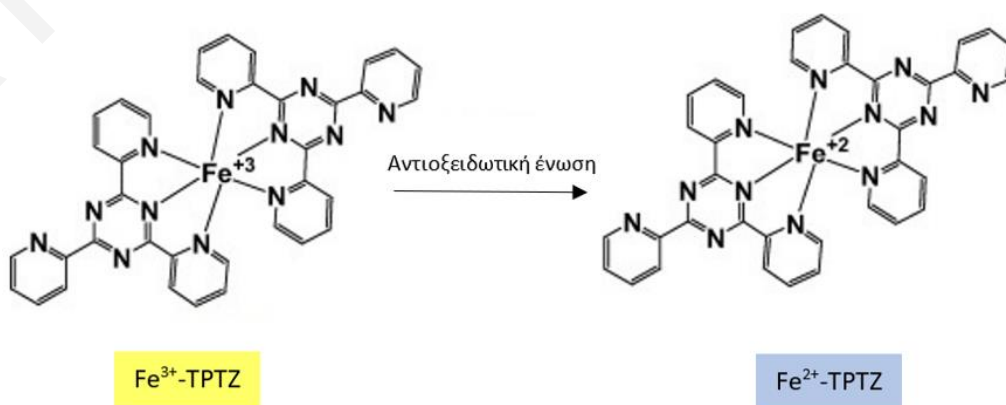
Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφοροι τρόποι έκφρασης της TAC. Πιο συχνά, η TAC εκφράζεται με χρήση της τιμής EC₅₀, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του

αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH κατά το ήμισυ. Επομένως, όσο μικρότερη είναι η τιμή EC_{50} , τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Παρά την απλότητα και την ταχύτητα που χαρακτηρίζουν τη μέθοδο, υπάρχουν ορισμένες «γκρίζες ζώνες» οι οποίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Παραδείγματος χάριν, η διαλυτότητα της ρίζας DPPH μόνο σε οργανικούς διαλύτες, καθιστά την ερμηνεία της δράσης των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών αρκετά αμφίβολη. Επιπλέον, η αντίδραση της ρίζας DPPH με ορισμένα αντιοξειδωτικά, όπως είναι η ευγενόλη ή άλλες δομικά παρόμοιες φαινόλες, είναι αντιστρεπτή με αποτέλεσμα να προσδιορίζεται αρκετά μειωμένη η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τέλος, η μικρή ομοιότητα της ρίζας DPPH με τις υπεροξειδικές ρίζες δεν χαρίζει μια αντιπροσωπευτική εικόνα για τη δράση των αντιοξειδωτικών σε *in vivo* συστήματα.⁴²

Προσδιορισμός Συνολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC) Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential, FRAP) προτάθηκε από τους Benzie και Strain με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων, προσδιορίζοντας την αναγωγική ικανότητα που έχουν έναντι ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αντιμετωπίζει τις αντιοξειδωτικές ουσίες ως αναγωγικά μέσα σε μια φωτομετρική αντίδραση οξειδοαναγωγής. Παρουσία λοιπόν όξινων συνθηκών ($pH \sim 3.6$) και αναγωγικού (δότης e^-), πραγματοποιείται αναγωγή του $Fe(III)$ στο σύμπλοκο της 2,4,6-Τρι(2-πυριδυλο)-1,3,5-τριαζίνης (Fe^{3+} -TPTZ) στη δισθενή μορφή του. Η αντίδραση ελέγχεται φασματοφωτομετρικά, καθώς κατά την αναγωγή του $Fe(III)$ παρατηρείται μεταβολή του χρώματος από κίτρινο σε μπλε και αύξηση της έντασης της κορυφής στα 593 nm, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναγωγικού (Σχήμα 2.4).⁷



Σχήμα 2.4. Μηχανισμός αντίδρασης του συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ με την αντιοξειδωτική ένωση.⁷

Η μέθοδος FRAP είναι απλή, γρήγορη και φθηνή, αφού δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό πέραν του φασματοφωτομέτρου UV-Vis. Παρόλα αυτά, ορισμένες αδυναμίες της είναι ικανές να αλλοιώσουν τη ρεαλιστική εικόνα των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα, καθώς οποιαδήποτε αναγωγική ουσία με οξειδοαναγωγικό δυναμικό μικρότερο του ζεύγους Fe(III)/Fe(II) είναι ικανή να συμβάλει θετικά στα αποτελέσματα της δοκιμής χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει αντιοξειδωτική συμπεριφορά. Αντίστοιχα, μια αντιοξειδωτική ένωση που δεν είναι ικανή να δράσει ως αναγωγικό του Fe(III) δεν μπορεί να συνεισφέρει στα τελικά αποτελέσματα. Επιπλέον, μέσω της μεθόδου δεν ανιχνεύονται ουσίες οι οποίες δρουν σαν αποσβέστες ελευθέρων ριζών μέσω μηχανισμών HAT, όπως είναι για παράδειγμα ορισμένες θειόλες και πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να υποτιμάται η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων *in vivo*.⁴²

2.3.2. Εναλλακτική προσέγγιση – Φασματοσκοπία και Χημειομετρία

Οι συμβατικές μέθοδοι προσδιορισμού των διαφορετικών αντιοξειδωτικών παραμέτρων εξαιτίας των επιμέρους μειονεκτημάτων τους, δίνουν σε αρκετές περιπτώσεις διαφορετικά αποτελέσματα για το ίδιο τρόφιμο. Επομένως, συνίσταται η αξιοποίηση δύο και/ή περισσότερων μεθόδων κάθε φορά με στόχο τον ακριβή προσδιορισμό τους. Με γνώμονα τα όσα έχουν αναφερθεί και συνυπολογίζοντας τις χρονοβόρες, οικονομικά ασύμφωρες και μη φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες που απαιτούνται, κρίνεται δύσκολη η εφαρμογή των παραπάνω για μεγάλο όγκο δειγμάτων, τα οποία επιβάλλεται να αναλυθούν σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα.⁴⁸

Συνεπώς, απαραίτητη θεωρείται η εύρεση μιας εναλλακτικής πολυδιάστατης προσέγγισης για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τροφίμων. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας FTIR, όπως είναι η ταχύτατη απόκριση, η αποφυγή επεξεργασίας του δείγματος, η ικανοποιητική ευαισθησία και επαναληψιμότητα των μετρήσεων, σε συνδυασμό με τις δυνατότητες που παρέχει η χημειομετρική ανάλυση, μπορούν να αποβούν εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για την κάλυψη των προαναφερόμενων αναγκών.¹ Ο συνδυασμός των δύο, χρησιμοποιείται ήδη για ανίχνευση τοξικών ουσιών και παθογόνων σε τρόφιμα, για εντοπισμό περιστατικών νοθείας, αλλά και για ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου σε τρόφιμα, ποτά ή εκχυλίσματα.

Συγκεκριμένα, το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων ή εκχυλισμάτων προβλέπονται μέσω της αξιοποίησης μοντέλων παλινδρόμησης, μέσω των οποίων συσχετίζονται τα κύρια φασματικά χαρακτηριστικά FTIR των δειγμάτων και οι

τιμές αναφοράς που λήφθηκαν από τις συμβατικές μεθόδους προσδιορισμού. Επομένως, μέσω της λήψης ενός φάσματος FTIR και της εφαρμογής του μοντέλου παλινδρόμησης μπορούν, όπως φαίνεται βιβλιογραφικά, να αντικατασταθούν ικανοποιητικώς οι χρονοβόρες και οικονομικά ασύμφορες διαδικασίες που κατατάσσονται υπό τον όρο «*Wet Chemistry*».⁴⁹

2.4. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η ανάπτυξη εφαρμογών της φασματοσκοπίας υπερύθρου (Infrared, IR) στον τομέα των τροφίμων και η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου για την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων απαιτεί πρωτίστως την κατανόηση των βασικών αρχών της φασματοσκοπίας. Η φασματοσκοπία ορίζεται ως η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ή κάποιας άλλης μορφής ενέργειας με την ύλη. Ειδικότερα, όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπέσει σε ένα μόριο, προκύπτει ένα φάσμα λόγω απορρόφησης της ενέργειας από το μόριο ή λόγω μετάβασης του μορίου στην αρχική του θεμελιώδη κατάσταση. Η μεταβολή της ενέργειας των ατόμων του μορίου οφείλεται σε μεταβάσεις μεταξύ δύο διαφορετικών ενεργειακών επιπέδων, οι οποίες είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη συχνότητα της ακτινοβολίας που έχει απορροφηθεί, όπως αυτό παρουσιάζεται από τη σχέση $\Delta E = E_\delta - E_\theta = h\nu$ και εφόσον $\nu = c/\lambda$, τότε $\lambda = hc/\Delta E$, όπου E_δ η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης, E_θ η ενέργεια της θεμελιώδους κατάστασης, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας, c η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.⁵⁰

Η φασματοσκοπία IR είναι μια από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές της Αναλυτικής Χημείας και εξαιτίας των πλεονεκτημάτων της κατάφερε να ενσωματωθεί εύκολα στις ρεαλιστικές συνθήκες ελέγχου της παραγωγής των τροφίμων. Η προέλευσή της χρονολογείται 100 χρόνια πριν και πιο συγκεκριμένα τη δεκαετία του 1850 με πρωτεργάτες τους Kirchhoff και Bunsen.⁵¹ Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που βοήθησαν στην εγκαθίδρυση της τεχνικής είναι η πλούσια ποιοτική πληροφορία που λαμβάνεται μέσω ενός φάσματος FTIR, η σχετικά ταχεία και εύκολη χρήση, ο σχετικά φθηνός εξοπλισμός και η ικανοποιητική ευαισθησία.⁵²

Η IR περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, από την οποία η τεχνική έλαβε και το όνομά της, περιλαμβάνει ακτινοβολίες των οποίων οι κυματαριθμοί κυμαίνονται από 12800 έως 10 cm^{-1} . Από την πλευρά τόσο των εφαρμογών, όσο και της οργανολογίας, το φάσμα IR χωρίζεται σε εγγύς, μέσο και άπω υπέρυθρο. Ουσιαστικά, οι περιοχές της IR ακτινοβολίας χωρίζονται με βάση τον διαφορετικό χαρακτήρα των μεταβάσεων που

εμπλέκονται σε κάθε περίπτωση.⁵¹ Οι περιοχές του NIR και MIR θεωρούνται οι πιο χρήσιμες για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των τροφίμων.⁵⁰

Η περιοχή της MIR ακτινοβολίας ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) παρέχει χρήσιμες δονητικές πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες των μορίων. Ένα φασματογράφημα εξετάζεται συνήθως με βάση τις δύο κύριες περιοχές που εντοπίζονται σε αυτό. Η πρώτη περιοχή ονομάζεται περιοχή *λειτουργικών ομάδων* και σε αυτήν εντοπίζονται χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες του δείγματος. Η δεύτερη περιοχή είναι γνωστή ως περιοχή *δακτυλικού αποτυπώματος* και απαρτίζεται από ποικίλες κορυφές, οι οποίες συνθέτουν στο σύνολο ένα μοτίβο το οποίο καθορίζει μια συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων που περιέχεται στο δείγμα. Υποδιαιρώντας τις παραπάνω περιοχές λαμβάνονται οι εξής πληροφορίες, ανά περιοχή:⁵³

(α) $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ Δονήσεις τάσης X–H

(β) $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ Τριπλός δεσμός

(γ) $2000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ Διπλός δεσμός

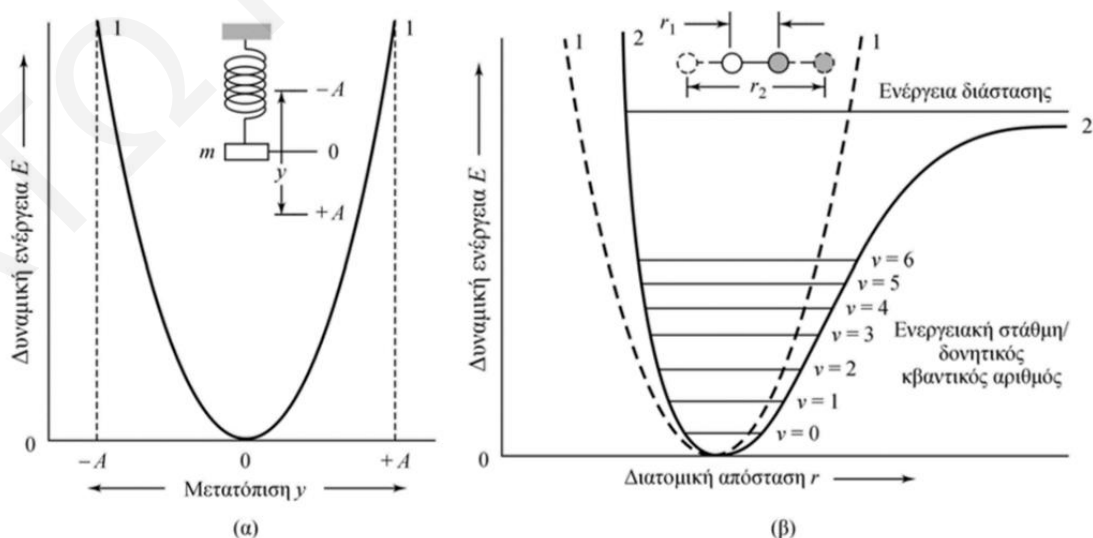
(δ) $1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ Δακτυλικό αποτύπωμα

Τα φάσματα IR μπορούν να ερμηνευθούν θεωρώντας ότι προέρχονται από μεταβάσεις μεταξύ κβαντισμένων δονητικών ενεργειακών καταστάσεων. Ένα μόριο για να απορροφήσει IR ακτινοβολία πρέπει να υποστεί μεταβολή της διπολικής του ροπής ως αποτέλεσμα της δονητικής του κίνησης. Η μεταβολή της διπολικής ροπής προκύπτει έπειτα από συστολή και διαστολή του δεσμού που υπάρχει μεταξύ δύο ατόμων του μορίου. Όταν λοιπόν ένα μόριο με διπολική ροπή δονείται, πραγματοποιείται αλλαγή στη διπολική του ροπή με συνεπακόλουθη τη δημιουργία πεδίου. Το πεδίο αυτό αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο της ακτινοβολίας και όταν οι συχνότητες των δύο συμπίσουν, πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας. Η μεταφορά αυτή προκαλεί αλλαγή στο πλάτος της μοριακής δόνησης, οπότε απορροφάται ακτινοβολία. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως στην περίπτωση που δονούνται ομοπυρηνικά διατομικά μόρια, όπως το O_2 , το N_2 και το Cl_2 , δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή και κατά συνέπεια τέτοιου είδους μόρια δεν απορροφούν στην IR περιοχή.

Οι απομονωμένες δονήσεις ενός μορίου μπορούν να προσεγγιστούν με τη χρήση ενός απλού μηχανικού μοντέλου, αυτό του «αρμονικού ταλαντωτή». Σύμφωνα με το μοντέλο, ένα διατομικό μόριο αναπαρίσταται με δύο σφαίρες οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με ένα ελατήριο. Η ενέργεια του συστήματος ορίζεται από το νόμο του Hook, σύμφωνα με την

εξίσωση $E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$ και όπου h η σταθερά του Planck, k η σταθερά του ελατηρίου και μ η ανηγμένη μάζα, $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$. Ωστόσο, όπως διέπεται από τους νόμους της κβαντομηχανικής, τα μοριακά συστήματα διαθέτουν μόνο διακριτά ενεργειακά επίπεδα με αποτέλεσμα η εξίσωση της ενέργειάς τους να υπόκειται τροποποίηση λαμβάνοντας τη μορφή $E_v = (v + \frac{1}{2}) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, όπου v ο κβαντικός αριθμός δόνησης που παίρνει μόνο θετικές τιμές και μηδέν. Με βάση τον κανόνα επιλογής των επιτρεπόμενων μεταπτώσεων πραγματοποιούνται μεταπτώσεις μόνο στην περίπτωση που τα κβαντικά δονητικά επίπεδα απέχουν μεταξύ τους $\Delta v = \pm 1$. Επομένως, η ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που μπορεί να απορροφηθεί από ένα μόριο ισούται με $\Delta E = E_{v_2} - E_{v_1}$.⁵⁴

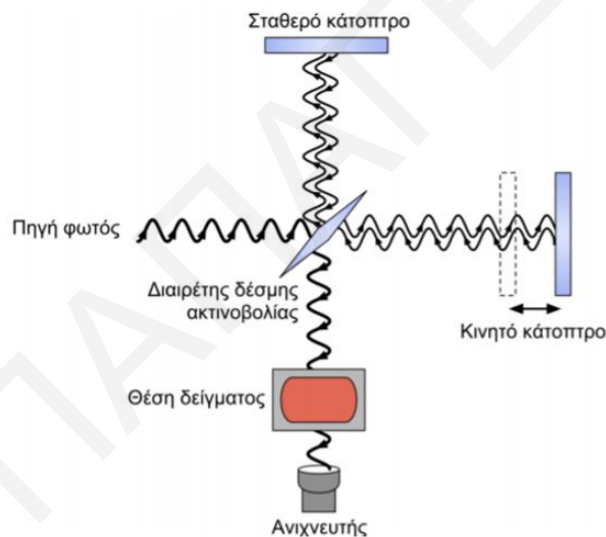
Η δυναμική ενέργεια του συστήματος δίνεται από την εξίσωση $V = \frac{1}{2} kx^2$. Η μεταβολή της συναρτήσει της μετατόπισης, x , των ατόμων από τη θέση ισορροπίας σε ένα διατομικό μόριο αναπαρίσταται σαν ένα πηγάδι δυναμικού για το αρμονικό μοντέλο, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.5 (α). Ωστόσο, η απωστική δύναμη Coulomb που αναπτύσσεται μεταξύ των δύο ατόμων όταν αυτά φτάσουν αρκετά κοντά ή η ελάττωση της ενέργειας όταν αυτά απομακρυνθούν αρκετά, επιτάσσουν την ανάπτυξη ενός νέου μοντέλου καθώς στα σημεία αυτά εντοπίζονται σημαντικές αποκλίσεις από την αρμονικότητα. Στο σχήμα 2.5 (β) λοιπόν εμφανίζεται το τροποποιημένο πηγάδι δυναμικού για το μη αρμονικό μοντέλο στο οποίο ισχύει $E = h\nu \left(v + \frac{1}{2}\right) + x_m h\nu \left(v + \frac{1}{2}\right)^2$, όπου x_m η σταθερά αναρμονικότητας και $\Delta v = \pm 2$ ή ± 3 .⁵⁴



Σχήμα 2.5. (α) Μοντέλο αρμονικού ταλαντωτή, (β) Μη αρμονικό μοντέλο.⁵⁴

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μορίων με την IR ακτινοβολία πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου με μετασχηματισμό Fourier. Στη φασματοσκοπία FTIR, το συμβολόμετρο Michelson, γνωστό ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, αποτελεί την καρδιά της τεχνικής. Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που απαρτίζεται από δύο κάτοπτρα κάθετα μεταξύ τους εκ των οποίων το ένα είναι κινητό και ένα διαιρέτη δέσμης που παρεμβάλλεται μεταξύ τους σε γωνία 45°. Το συμβολόμετρο Michelson χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις ανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές διαφορετικού μήκους.

Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή δίνοντας ένα συμβολογράφημα. Η μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος με μετασχηματισμό Fourier δίνει εν τέλει το φάσμα FTIR.⁵² Στο Σχήμα 2.6 παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση ενός συμβολομέτρου Michelson.



Σχήμα 2.6. Σχηματική αναπαράσταση συμβολομέτρου Michelson.⁵⁵

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η φασματοσκοπία FTIR σε σχέση με τη συνήθη φασματοσκοπία IR, είναι η βελτιωμένη και σταθερή διακριτική ικανότητα για δεδομένο χρόνο σάρωσης ή η μείωση του χρόνου σάρωσης για την ίδια διακριτική ικανότητα λόγω της ταυτόχρονης συλλογής πληροφοριών από ένα μεγάλο εύρος τιμών μήκους κύματος. Καταληκτικά, σε ένα φάσμα FTIR οι κορυφές απορρόφησης που εμπίπτουν στην περιοχή του MIR παρέχουν εκτεταμένες πληροφορίες για τη μοριακή δομή των ουσιών που εμπεριέχονται στο δείγμα ωστόσο, δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί απόλυτα η χημική δομή του δείγματος. Βασική λοιπόν προτεραιότητα του αναλυτή είναι να ερμηνεύσει τις κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα FTIR με βάση τις προτεινόμενες από τη βιβλιογραφία λειτουργικές

ομάδες και έπειτα να κρίνει κατά πόσο πιθανοί παρεμποδιστές από τη μήτρα του δείγματος επηρεάζουν τη θέση των κορυφών.¹

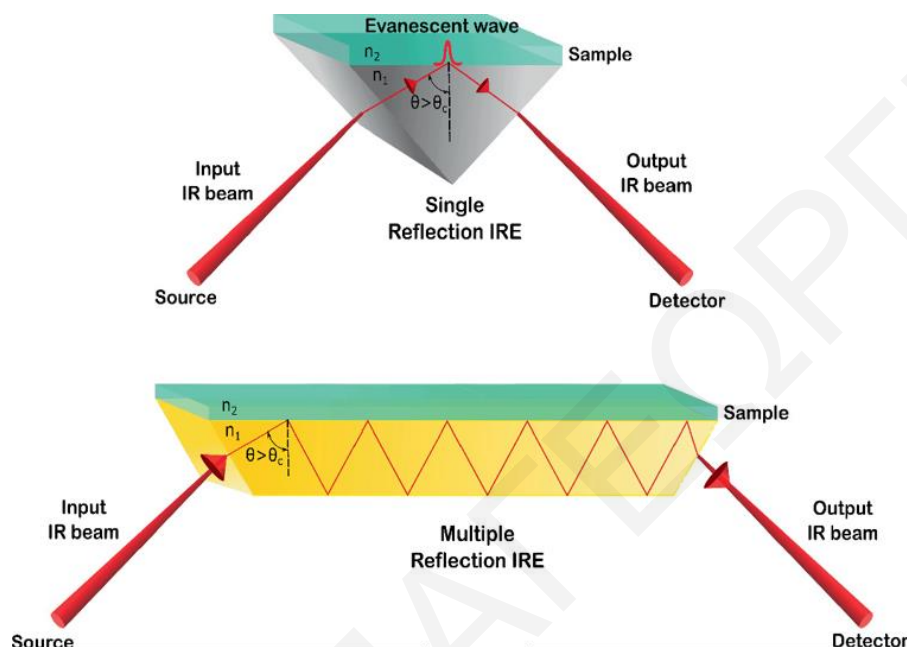
2.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου εξασθενισμένης ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR)

Οι τεχνικές ανάκλασης στη φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιούνται για την ανάλυση δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις συμβατικές φασματοσκοπικές μεθόδους διαπερατότητας. Πριν το 1993, οι εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων για την περιοχή του MIR, απαιτούσαν την κονιοποίηση του δείγματος και την ενσωμάτωσή του σε μήτρα KBr. Μια διαδικασία η οποία δεν ήταν ωστόσο συμβατή με τις περισσότερες μήτρες των τροφίμων εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους. Με την ένταξη της τεχνικής εξασθενισμένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR) παρακάμφθηκαν πολλές δυσκολίες, ενώ τα πλεονεκτήματά της ήταν τόσα ώστε να αποτελεί μέχρι σήμερα ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στον τομέα αυτό.¹ Η ATR είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης και χρησιμοποιείται ευρέως για αναλύσεις στερεών μικρής διαλυτότητας, ινών, κονιοποιημένων υλικών κ.ά. Η υψηλή ποιότητα των φασμάτων, η ανάλυση στερεών και υγρών δειγμάτων, ο μειωμένος χρόνος ανάλυσης και η ελάχιστη επεξεργασία του δείγματος είναι μερικά από τα κυριότερα της προτερήματα.^{56,57}

Η τεχνική ATR διαφέρει από την κλασσική ανάλυση FTIR ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος και ως προς τον τρόπο αλληλεπίδρασής του με την IR ακτινοβολία. Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο ολικής εσωτερικής ανάκλασης, το οποίο παρατηρείται όταν μια δέσμη ακτινοβολίας διέρχεται από ένα πυκνότερο υλικό (υψηλότερος δείκτης διάθλασης, n_1) σε ένα μικρότερης πυκνότητας (χαμηλότερος δείκτης διάθλασης, n_2). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται με αύξηση της γωνιάς πρόσπτωσης (θ) και μετά από μια κρίσιμη τιμή (κρίσιμη γωνιά, θ_c) η ανάκλαση γίνεται ολική. Έχει αποδειχθεί πειραματικά πως κατά την ανάκλαση της ακτινοβολίας, μέρος της διεισδύει σε μικρό βάθος στο υλικό με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα) και εξασθενεί στις περιοχές του IR ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου απορροφάται ενέργεια. Η ακτινοβολία που διεισδύει ονομάζεται «αποσβένων κύμα» (*evanescent wave*), ενώ το φαινόμενο που πραγματοποιείται μεταξύ των δύο υλικών ονομάζεται «εξασθενισμένη ολική ανάκλαση».

Το δείγμα που αποτελεί το μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, τοποθετείται στο στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (Internal Reflection Element, IRE) που είναι ένας διαφανής κρύσταλλος με υψηλό δείκτη διάθλασης. Με κατάλληλη ρύθμιση της γωνιάς πρόσπτωσης, η ακτινοβολία υπόκειται σε πολλαπλές εσωτερικές ανακλάσεις προτού περάσει από τον

κρύσταλλο στον ανιχνευτή. Σε κάθε σημείο ανάκλασης πραγματοποιείται απορρόφηση και εξασθένιση της IR ακτινοβολίας (Σχήμα 2.7).^{56,57} Επομένως, στην περιοχή του IR ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου το δείγμα απορροφά ακτινοβολία, παρατηρείται εξασθένιση με αποτέλεσμα να μπορούν να μελετηθούν οι επιμέρους λειτουργικές ομάδες που απαντούν στο άγνωστο δείγμα.⁵¹



Σχήμα 2.7. Αρχή λειτουργίας φασματοσκοπίας ATR-FTIR.⁵⁸

2.6. Χημειομετρία

Ο ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος της Χημειομετρίας έκανε την εμφάνισή του περί τα τέλη της δεκαετίας του 1960 από μερικές ερευνητικές ομάδες κυρίως του τομέα της Αναλυτικής Χημείας και της Φυσικοχημείας.^{59,60} Η επιτακτική ανάγκη ένταξης και αξιοποίησης της χημειομετρίας στα επιστημονικά δρώμενα και πιο συγκεκριμένα στο πεδίο ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων, επήλθε με τη διαπίστωση πως οι παραδοσιακές στατιστικές μέθοδοι ήταν ανίκανες πλέον να περιγράψουν επακριβώς τα περίπλοκα χημικά συστήματα. Η ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών και των ενόργανων συστημάτων ανάλυσης συνέβαλε σημαντικά στην εγκαθίδρυσή της.⁶¹

Ο ορισμός της Χημειομετρίας που προτάθηκε από τους Massart *et al.*, είναι ο πλέον δηλωτικός αναμεταξύ των πολλών και αναφέρεται στον κλάδο εκείνο της χημείας ο οποίος χρησιμοποιεί μαθηματικά, στατιστική και τυπική λογική για τον σχεδιασμό των βέλτιστων πειραματικών διαδικασιών, με αποτέλεσμα τη λήψη της μέγιστης δυνατής χημικής πληροφορίας, έχοντας ως τελικό στόχο τη λεπτομερή κατανόηση των χημικών συστημάτων.⁶² Ορόσημα στην ιστορία της χημειομετρίας ήταν η πρώτη αναφορά του όρου,

το 1971, από τον Σουηδό επιστήμονα Svante Wold σε επίσημη ερευνητική του πρόταση και η διάδοση του όρου στις ΗΠΑ από τον συνεργάτη του Bruce Kowalski. Έπειτα, ακολούθησε η ίδρυση της Διεθνούς Εταιρείας Χημειομετρίας (*International Chemometrics Society*), το 1974, καθιερώνοντάς την ως ένα ξεχωριστό επιστημονικό κλάδο.⁶³

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αύξηση της πολυπλοκότητας της χημικής οργανολογίας και των αναλυτικών διαδικασιών, καθιστούν δύσκολη την επεξεργασία και την κατανόηση των πειραματικών αποτελεσμάτων με συνέπεια η απεικόνισή τους με κλασσικά εργαλεία στατιστικής να μην είναι πλέον αρκετή. Για τον λόγο αυτό, η Χημειομετρία υιοθέτησε μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων (*Multivariate Data Analysis*), κατά τρόπο που να επιτρέπεται η συσχέτιση των πολλαπλών μεταβλητών σε ένα νέο ενιαίο πλαίσιο, από όπου θα εξαχθεί η μέγιστη δυνατή χημική πληροφορία. Μέσω της χαρτογράφησης των δεδομένων μπορούν να εντοπιστούν επαναλαμβανόμενα μοτίβα μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων ή ακόμα να προβλεφθούν ιδιότητες άγνωστων δειγμάτων μελλοντικά.

Οι τεχνικές δονητικής φασματοσκοπίας όπως είναι η φασματοσκοπία FTIR, NIR και η φασματοσκοπία σκεδασμού Raman, αλλά και οι τεχνικές απεικόνισης παράγουν δεδομένα υψηλής πολυπλοκότητας με το κάθε δείγμα να ορίζεται από εκατοντάδες μέχρι χιλιάδες διαφορετικές μεταβλητές.⁶⁴ Τα χημειομετρικά εργαλεία επιτυγχάνουν τη συσχέτιση δειγμάτων και μεταβλητών μέσω μετατροπής του συνόλου των πολυάριθμων μεταβλητών σε ένα ενιαίο χώρο μικρότερων διαστάσεων, ο οποίος ορίζεται από νέες λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables, LVs), όπως θα εξηγηθεί λεπτομερώς σε επόμενη ενότητα.⁶⁵

Τα τελευταία τριάντα χρόνια, επιστήμονες και τεχνολόγοι τροφίμων ανά το παγκόσμιο, έρχονται αντιμέτωποι με έναν τεράστιο όγκο πληροφοριών που προέρχεται από την ενσωμάτωση διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών και διαδικασιών στους τομείς της ανάλυσης και της παραγωγής τροφίμων. Πρόσφατα επίσης, έγινε αντιληπτό ότι η μέχρι πρότινος προσέγγιση που ακολουθείτο αγνοούσε την οποιαδήποτε συσχέτιση της μήτρας του τροφίμου και των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του. Η εξεύρεση μιας ολιστικής προσέγγισης στην οποία κυρίαρχο ρόλο θα έχουν οι πολυμεταβλητές μέθοδοι ανάλυσης, υπόσχεται μια ρεαλιστικότερη εικόνα των πραγμάτων στην οποία θα περιγράφονται όσο το δυνατόν καλύτερα οι σχέσεις μεταξύ των δύο.⁶⁶

Τη χρονική περίοδο, 2000 μέχρι 2015, υπολογίζεται ότι έχουν δημοσιευτεί περισσότερες από 3000 ερευνητικές μελέτες που αφορούν εφαρμογές της χημειομετρίας στον τομέα των τροφίμων, είτε για ποιοτικούς, είτε για ποσοτικούς προσδιορισμούς.⁶⁶ Στον πίνακα 2.1

συνοψίζονται οι εφαρμογές που βρίσκουν οι διάφορες χημειομετρικές μέθοδοι στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των τροφίμων.

Πίνακας 2.1. Επισκόπηση των εφαρμογών των χημειομετρικών μεθόδων στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των τροφίμων.⁶⁶

	Στόχος	Χημειομετρική μέθοδος	Εφαρμογή στον τομέα των τροφίμων
Ποιοτική ανάλυση	1. Εύρεση μοτίβων στα πειραματικά δεδομένα	PCA	1. Παρακολούθηση ζύμωσης
	2. Εύρεση δακτυλικού αποτυπώματος	DA	2. Έλεγχος νοθείας
	3. Ομαδοποίηση δεδομένων	PLS-DA	3. Γεωγραφική/βοτανική προέλευση
Ποσοτική ανάλυση			4. Ταυτοποίηση ποικιλίας
			5. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
			6. Επιμόλυνση τροφίμου
	1. Ακρίβεια (<i>Accuracy</i>)	PLS	Ποσοτικός προσδιορισμός:
	2. Ανθεκτικότητα (<i>Robustness</i>)	MLR	TAC, αιθανόλης, pH,
	3. Ανάπτυξη μοντέλου βαθμονόμησης	Τεχνητά νευρωνικά δίκτυα	σακχάρων, οργανικών οξέων, φλαβονολών, φαινολών, ανθοκυανινών, γλυκερόλης

Η κατηγοριοποίηση των χημειομετρικών μεθόδων, όπως αυτή αναφέρεται βιβλιογραφικά, γίνεται με βάση τον εκάστοτε στόχο και παρουσιάζεται ως εξής:⁶⁶

- Μέθοδοι απεικόνισης και ομαδοποίησης δεδομένων (*Unsupervised Methods*)
- Μέθοδοι πολυμεταβλητής βαθμονόμησης ή παλινδρόμησης (*Supervised Methods*)

Οι μέθοδοι απεικόνισης και ομαδοποίησης δεδομένων (*Unsupervised Methods*) μελετούν τη δομή των πειραματικών αποτελεσμάτων, αναζητώντας ομοιότητες και επαναλαμβανόμενα μοτίβα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Παράλληλα, εντοπίζουν ακραίες τιμές (*outliers*) που αποκλίνουν της κανονικής κατανομής των δεδομένων. Η χρησιμότητα των μεθόδων αυτών έγκειται στη διερεύνηση των πειραματικών δεδομένων όταν ακόμα ο πειραματικός στόχος δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος ή όταν επικρατεί άγνοια από τη μεριά του ερευνητή για το περιεχόμενο των πειραματικών δεδομένων που έχουν συλλεγεί. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα μεθόδων που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι η μέθοδος Ανάλυσης Κύριας Συνιστώσας (Principal Component Analysis, PCA) και η μέθοδος Ιεραρχικής Ανάλυσης Κατά Συνστάδες (Hierarchical Cluster Analysis, HCA), που στόχο έχουν την διαγραμματική απεικόνιση των πειραματικών δεδομένων και την ομαδοποίησή τους σε δέντρα κατάταξης, αντίστοιχα.

Οι μέθοδοι πολυμεταβλητής βαθμονόμησης ή παλινδρόμησης (*Supervised Methods*) αξιοποιούν ένα γνωστό σετ δεδομένων (σετ βαθμονόμησης) με τις αντίστοιχες αποκρίσεις τιμών για συγκεκριμένες ιδιότητες και μέσω αυτού επιδιώκεται η πρόγνωση (*prediction*)

των αντίστοιχων τιμών για άγνωστα δείγματα έπειτα από ένταξη των νέων πειραματικών δεδομένων που αντιστοιχούν σε αυτά. Η προσαρμογή του μοντέλου βαθμονόμησης γίνεται κατόπιν ποσοτικοποίησης των σχέσεων μεταξύ των περιγραφικών μεταβλητών που ορίζουν τα σετ δεδομένων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεθόδων της κατηγορίας αυτής είναι η μέθοδος Παλινδρόμησης Κύριας Συνιστώσας (Principal Component Regression, PCR) και η μέθοδος PLSR.⁶⁷

2.7. Χρησιμότητα μεθόδων πολυμεταβλητής παλινδρόμησης

Πολλές ερευνητικές μελέτες στοχεύουν στον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ή περισσότερων συστατικών του δείγματος, επιδιώκοντας τη συσχέτιση της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από το δείγμα και της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού. Η συσχέτιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω του νόμου Beer–Lambert $\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = e^{-\epsilon_{\lambda}cl}$, όπου $I(\lambda)$ είναι η ένταση της ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος, λ , που διέρχεται μέσω του δείγματος για απόσταση ισοδύναμη του μήκους διαδρομής, l , $I_0(\lambda)$ η ένταση της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο δείγμα, ϵ_{λ} ο συντελεστής απορροφητικότητας και c η συγκέντρωση του αναλύτη.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται κατόπιν κατασκευής μιας καμπύλης βαθμονόμησης για το κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό, μετρώντας την απορρόφηση της ακτινοβολίας για δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Έπειτα, προσδιορίζεται η σχέση του μετρούμενου σήματος και της συγκέντρωσης του αναλύτη και μέσω αυτής προβλέπεται η συγκέντρωση του σε άγνωστα δείγματα, χρησιμοποιώντας τη μαθηματική σχέση $\log \left[\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right] = \alpha_{\lambda} = \epsilon_{\lambda}cl$, όπου α_{λ} η απορροφητικότητα του δείγματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, λ .

Το πρόβλημα ωστόσο περιπλέκεται στις περιπτώσεις όπου το δείγμα περιέχει περισσότερα του ενός συστατικά τα οποία απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος. Υπό αυτές τις συνθήκες, το σύστημα περιγράφεται ως το γραμμικό άθροισμα των συνεισφορών των επιμέρους συστατικών του. Για παράδειγμα, η απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, λ , ενός μίγματος συστατικών για ορισμένο μήκος διαδρομής, l , ορίζεται ως $\alpha(\lambda) = \epsilon_1(\lambda)c_1l + \epsilon_2(\lambda)c_2l + \dots + \epsilon_p(\lambda)c_pl = \sum_{k=1}^p \epsilon_k(\lambda)c_kl$ και όπου p ο αριθμός των προσδιοριζόμενων συστατικών.

Το πρόβλημα διευρύνεται ακόμη περισσότερο όταν υπάρχει ανάγκη μελέτης ενός συνόλου δειγμάτων από την σκοπιά μιας ολόκληρης φασματικής περιοχής. Σε μια τέτοια περίπτωση η αύξηση των μεταβλητών είναι ραγδαία και το πρόβλημα περιγράφεται από τη σχέση

$\alpha_j(\lambda_i) = \sum_{k=1}^p \varepsilon_k(\lambda_i) c_{kj} l$, όπου k το k^o προσδιοριζόμενο συστατικό, i ο συνολικός αριθμός των υπό μελέτη μηκών κύματος, λ , και j ο συνολικός αριθμός των υπό μελέτη δειγμάτων.

Η κλασσική μέθοδος παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός συστατικού. Ωστόσο, αντιμετωπίζει σημαντικές δυσκολίες όταν στο πρόβλημα εμπλακούν πολλά συστατικά, τα οποία περιγράφονται από διαφορετικά μήκη κύματος. Συγκεκριμένα, τα προβλήματα με τα οποία έρχεται αντιμέτωπη είναι η πολυσυγγραμμικότητα των πειραματικών δεδομένων, τα συγκεχυμένα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τα παρακείμενα μήκη κύματος και τα πολλαπλά σφάλματα μέτρησης. Την επίλυση των παραπάνω δίνουν οι μέθοδοι πολυμεταβλητής παλινδρόμησης, αφού όπως φαίνεται βιβλιογραφικά βρίσκουν πλήθος εφαρμογών σε διάφορους τομείς της τεχνολογίας και της επιστήμης.⁶⁸

Ο προσδιορισμός της TAC ενός τροφίμου και/ή ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένης ομάδας ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση με αξιοποίηση της φασματοσκοπίας FTIR, εμπίπτουν σαφώς στα προβλήματα που αναζητούν μια τέτοια λύση. Αφενός, λόγω των συνεργειακών και ανταγωνιστικών φαινομένων που αναπτύσσονται μεταξύ των επιμέρους συστατικών στις διάφορες μήτρες των τροφίμων και αφετέρου, λόγω των πολλαπλών μεταβλητών που λαμβάνονται από ένα φάσμα FTIR. Η μέθοδος PLSR παρουσιάζεται βιβλιογραφικά ως η πιο διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της TPC και της TAC ποικιλίας τροφίμων ή εκχυλισμάτων, όπως φαίνεται από τις μελέτες που παρατίθενται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Ερευνητικές μελέτες που στόχευσαν στον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας και/ή άλλων παραμέτρων των τροφίμων, στηριζόμενες στη φασματοσκοπία FTIR και τη χημειομετρική ανάλυση.

A/A	Τρόφιμο	Εφαρμογή	Στατιστική προσέγγιση	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφική αναφορά
1	Φρούτα (Βατόμουρα και σταφύλι)	TAC	PLSR	ORAC	Lam <i>et al.</i> (2005) ³⁷
2	Κόκκινο κρασί	Ποσοτικοποίηση ταννινών	PLSR	Καθίζηση πρωτεϊνών, φλωρογλυκινόλυση	Fernández <i>et al.</i> (2007) ⁶⁹
3	Κόκκινο κρασί	TAC	PLSR	FRAP	Versari <i>et al.</i> (2010) ⁷⁰
4	Κρεμμύδι	TPC και TAC	PCA, DFA, PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC, FRAP	Lu <i>et al.</i> (2011) ⁷¹
5	Σκόρδο	TPC και TAC	PCA, DFA, PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC, FRAP	Lu <i>et al.</i> (2011) ⁷²
6	Ρύζι	TPC, TFC, TAC, ANC, PAC	PCA, DFA, PLSR	Folin-Ciocalteu, TEAC κ.ά.	Jantasee <i>et al.</i> (2013) ⁷³

7	Μοσχάτα επιδόρπια κρασιά	TPC, TFC, TAC	PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP κ.ά.	Silva <i>et al.</i> (2014) ⁷⁴
8	Κινέζικο κρασί ρυζιού	TPC και TAC	PCA, SiPLS, SVM	Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC, FRAP	Wu <i>et al.</i> (2015) ⁷⁵
9	Χουρμάς	TPC και TAC	PCA, PLS- DA, ECVA	Folin-Ciocalteu, TEAC	Hemmateenejad <i>et al.</i> (2015) ⁷⁶
10	Κρασί	TPC και TAC	PLSR	UV-Vis, FRAP	Preserova <i>et al.</i> (2015) ⁷⁷
11	Καφές	TAC, ποσοτικοποίηση ισομερών χλωρογενικού οξέος	PLSR	HPLC, ORAC, TEAC, DPPH	Liang <i>et al.</i> (2016) ⁷⁸
12	Σοκολάτα	TPC, TAC, PAC	PLSR	HPLC, Folin- Ciocalteu, DPPH, ORAC	Hu <i>et al.</i> (2016) ⁷⁹
13	Κακάο και σοκολάτα	TPC και TAC	PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC	Batista <i>et al.</i> (2016) ⁴⁸
14	Χυμός σταφυλιού	TPC, ANC	PLSR	Folin-Ciocalteu	Caramês <i>et al.</i> (2016) ⁸⁰
15	Βατόμουρα (Blueberries)	TPC και TAC	PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, ORAC	Zheng <i>et al.</i> (2017) ⁸¹
16	Αφεψήματα βοτάνων	TAC	PLSR	DPPH, TEAC	Venetsanou <i>et al.</i> (2017) ⁸²
17	Μέλι	TAC, ICA, ποσοτικοποίηση πολυφαινολών	PLSR	HPLC, UV-Vis	Tahir <i>et al.</i> (2017) ⁸³
18	Θυμάρι	TAC	PLS-DA, PCR, PLSR	DPPH	Izadiyan <i>et al.</i> (2017) ⁸⁴
19	Χυμοί φρούτων	SS. TA, ANC	PLSR	Διαθλασιμετρία, ποτενσιομετρία, HPLC	Clark <i>et al.</i> (2018) ⁸⁵
20	Ρεβίθι	TPC, TAC, ICA, WBC, OBC	PLS-DA, PLSR	Folin-Ciocalteu, TEAC κ.ά.	Kadiroğlu <i>et al.</i> (2018) ⁸⁶
21	Πρόπολη	TPC και TAC	PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC, FRAP	Da Silva <i>et al.</i> (2018) ⁸⁷
22	Κόκκινο λάχανο	TPC, TAC, ANC	PLSR	Folin-Ciocalteu, DPPH, ORAC, TEAC	Caramês <i>et al.</i> (2019) ⁴⁹
23	Φασόλια	Ποσοτικοποίηση πολυφαινολών, TPC, TAC	PLSR	Folin-Ciocalteu, HPLC, DPPH, ABTS, FRAP	Carbas <i>et al.</i> (2020) ⁸⁸
24	Έλαιο φυστικού	Προσδιορισμός περιεκτικότητας τοκοφερολών, TAC	OPLS-DA	HPLC, DPPH, ABTS	Valasi <i>et al.</i> (2020) ⁸⁹
26	Μαύρη σοκολάτα	Ποσοτικοποίηση αμινών, TPC, TAC	PLSR	UPLC, Folin- Ciocalteu, DPPH, Rancimat	Deus <i>et al.</i> (2021) ⁹⁰

Κατά την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων πολυμεταβλητής παλινδρόμησης επιδιώκεται η αξιοποίηση ελεγχόμενων και/ή εύκολα μετρούμενων μεταβλητών με στόχο την πρόβλεψη της συμπεριφοράς άλλων μεταβλητών, οι οποίες προσδιορίζονται με μεγαλύτερη δυσκολία, μέσω χρονοβόρων ή οικονομικά ασύμφορων πειραματικών διαδικασιών. Εύκολα

μετρούμενες μεταβλητές λαμβάνονται για παράδειγμα κατά τη λήψη φασμάτων FTIR και αξιοποιούνται με τρόπο που να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών του δείγματος. Για την επίτευξη του στόχου, απαιτείται η βέλτιστη συσχέτιση δύο βάσεων δεδομένων X και Y , εκ των οποίων η X περιέχει τις ανεξάρτητες ή προγνωστικές μεταβλητές X (*Independent variables ή predictors*) και η Y τις εξαρτημένες μεταβλητές ή αποκρίσεις Y (*Dependent variables ή responses*).⁹¹

2.8. Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLSR)

Οι απαρχές της προσέγγισης PLS χρονολογούνται από το 1975, όταν ο επιστήμονας Herman Wold επιχείρησε να μοντελοποιήσει πολύπλοκα δεδομένα υπό τη μορφή αλυσίδων πινάκων, τα οποία είναι γνωστά σαν μοντέλα διαδρομών (*path models*). Η προσέγγιση αυτή αφού κατάφερε επιτυχώς να εκτιμήσει τις παραμέτρους των μοντέλων, πήρε το όνομα NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares, NIPALS), από όπου και επικράτησε το σημερινό ακρωνύμιο, PLS. Το 1980, οι Svante Wold και Harald Martens δημιούργησαν ένα πιο ολοκληρωμένο μοντέλο, ικανό να αντιμετωπίσει πιο σύνθετα σύνολα δεδομένων. Στην προσπάθειά τους να δώσουν μια πιο περιγραφική εικόνα για αυτό, οι επιστήμονες αναφέρονται στο μοντέλο με το ακρωνύμιο PLS «Projection to Latent Structures», δηλαδή προβολή σε λανθάνουσες δομές.⁹²

Η μέθοδος PLSR θεωρείται η πιο απλή μορφή πολυμεταβλητής παλινδρόμησης και αντλεί τη χρησιμότητά της από την ικανότητα να αναλύει δεδομένα με πολλές, συγγραμμικές (*collinear*) μεταβλητές και έντονα σήματα θορύβου, τόσο στη X βάση δεδομένων (*data matrix*), όσο και στη Y . Μέσω της μοντελοποίησης των δύο βάσεων δεδομένων παρέχονται σημαντικές πληροφορίες στα ερωτήματα που θέτει το πρόβλημα παλινδρόμησης, καθώς μεγιστοποιείται η σχέση μεταξύ των δεδομένων που ανήκουν στις δύο βάσεις δεδομένων.⁹³

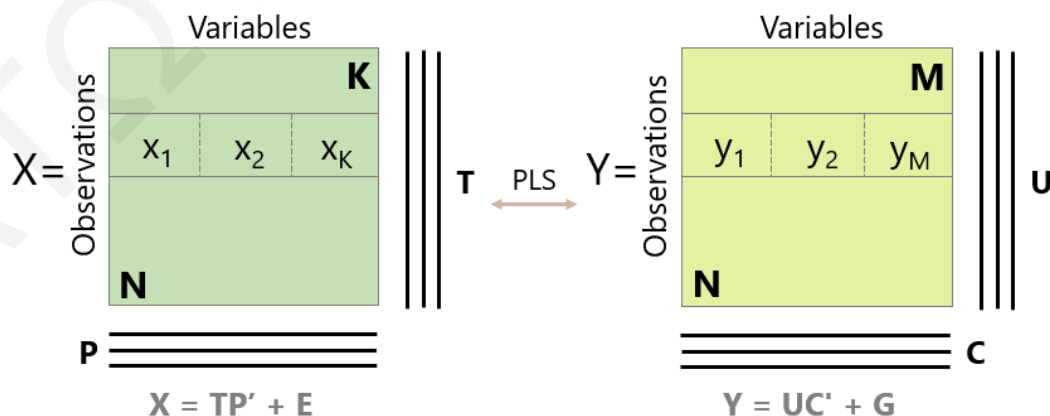
Βασικός στόχος εφαρμογής της μεθόδου PLSR είναι η πρόβλεψη των αποκρίσεων Y (*responses*) που εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων Y , μέσω των προγνωστικών μεταβλητών X (*predictors*) που εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων X . Αυτό επιτυγχάνεται έμμεσα με εξαγωγή των LVs T (X -scores) και U (Y -scores) από τις βάσεις δεδομένων X και Y , αντίστοιχα. Η ανάλυση βασίζεται στη μέθοδο των προβολών και στην εξαγωγή των κυρίων συνιστωσών (Principal Components, PCs) και έχει ως απώτερο στόχο τη βέλτιστη συσχέτιση των X -scores και των Y -scores (t_1 με το u_1 , t_2 με το u_2 κ.ο.κ), σύμφωνα με τη σχέση $u_1 = r_1 t_1$, όπου η τιμή r_1 χρειάζεται να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερη της μονάδας. Επομένως, γνωρίζοντας την τιμή t_1 (X -scores) γίνεται πρόβλεψη της τιμής u_1 (Y -scores), μέσω της οποίας θα γίνει η τελική πρόβλεψη της απόκρισης (*response*) Y .⁹¹

Η αναγκαιότητα εξαγωγής των LVs από τις δύο βάσεις δεδομένων, έγκειται στην ανάγκη ελαχιστοποίησης των φαινομένων πολυσυγγραμμικότητας που δημιουργούνται στα προγνωστικά μοντέλα. Όταν ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών είναι υψηλός, όπως δηλαδή παρατηρείται σε ένα φάσμα FTIR, τότε οι μεταβλητές καλούνται συγγραμμικές (*collinear*) και περιγράφουν μερικώς ή ολοκληρωτικά την ίδια ιδιότητα του συστήματος, παρέχοντας παρόμοιες πληροφορίες. Τότε, τα προγνωστικά μοντέλα καθίστανται μη ικανά να εκτιμήσουν σε ρεαλιστική κλίμακα ποικίλες ιδιότητες άγνωστων δειγμάτων μελλοντικά, καθώς η προγνωστική τους ικανότητα εξαρτάται ισχυρά από τα πειραματικά δεδομένα που αξιοποιήθηκαν κατά την κατασκευή τους.

Συνεπώς, επιβάλλεται ο συγκερασμός των συγγραμμικών μεταβλητών, με τρόπο ώστε το σύστημα να περιγράφεται από μικρότερο αριθμό μεταβλητών, οι οποίες είναι γνωστές ως συνιστώσες (*components*) ή παράγοντες (*factors*) ή LVs. Καθαυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο πρωταρχικός στόχος της μοντελοποίησης των πειραματικών δεδομένων, ο οποίος δεν είναι άλλος από την εύρεση της χρησιμότερης και πιο πλούσιας πληροφορίας, η οποία είναι απαλλαγμένη από σήματα θορύβου ή άλλων παρεμποδιστών.⁶⁴

2.8.1. Βάσεις δεδομένων

Το μοντέλο PLSR κατασκευάζεται βάσει ενός σετ βαθμονόμησης, το οποίο απαρτίζεται από N παρατηρήσεις (*observations*), K προγνωστικές μεταβλητές X (*predictors*) που συμβολίζονται με x_k ($k = 1, \dots, K$) και M αποκρίσεις Y (*responses*) που συμβολίζονται με y_m ($m = 1, \dots, M$). Καθαυτό τον τρόπο, δημιουργούνται οι δύο βάσεις δεδομένων X και Y με διαστάσεις $(N \times K)$ και $(N \times M)$, αντίστοιχα, όπως αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 2.8.



Σχήμα 2.8. Βάσεις δεδομένων X και Y .

Οι παρατηρήσεις μπορούν να είναι διαφορετικά δείγματα, χημικές ενώσεις, διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την εκτέλεση χρονικά εξαρτώμενων πειραμάτων κ.ά., ενώ μέσω των

μεταβλητών X και Y , ο ερευνητής μπορεί να προσδιορίσει συγκεκριμένες ιδιότητες των παρατηρήσεων. Ως μεταβλητές μπορούν να αξιοποιηθούν φασματικά δεδομένα (π.χ. εντάσεις χαρακτηριστικών κορυφών των φασμάτων FTIR), ποσοτικά δεδομένα που προκύπτουν από χρωματογραφικές μεθόδους ή αποτελέσματα άλλων πειραματικών μετρήσεων.

Έπειτα, οι προβλέψεις νέων παρατηρήσεων γίνονται με αξιοποίηση των προγνωστικών μεταβλητών X (*predictors*). Μέσω της διαδικασίας εξάγονται οι πληροφορίες για τις LVs T (X -scores), τα κατάλοιπα X (X -residuals), την τυπική απόκλιση των καταλοίπων (*residual SD* 's) και εν τέλει τις αποκρίσεις Y (*responses*) για συγκεκριμένο διάστημα εμπιστοσύνης.⁹⁴

2.8.2. Το μοντέλο PLSR

Η διαδικασία για την εφαρμογή ενός μοντέλου PLSR στηρίζεται στην αποσύνθεση των δύο βάσεων δεδομένων X και Y . Συγκεκριμένα, το γραμμικό μοντέλο PLSR ενσωματώνει κάποιες νέες LVs, οι οποίες καλούνται X -scores και συμβολίζονται με t_a ($a = 1, 2, \dots, A$) (Εξίσωση 2.1) και Y -scores που συμβολίζονται με u_a ($a = 1, 2, \dots, A$) (Εξίσωση 2.2). Οι μεταβλητές X -scores, t_a , είναι ολιγάριθμες και ορθογώνιες μεταξύ τους. Υπολογίζονται ως το γραμμικό άθροισμα των πραγματικών μεταβλητών, x_k , με τους αντίστοιχους συντελεστές βαρύτητας (*weights*), w_{ka}^* ($a = 1, 2, \dots, A$). Βιβλιογραφικά, οι συντελεστές βαρύτητας συμβολίζονται επίσης και ως, r_{ka} .

$$t_{ia} = \sum_a w_{ka}^* x_{ik} \quad (2.1)$$

$$u_{im} = \sum_a c_{ma} y_{im} \quad (2.2)$$

Οι μεταβλητές X -scores, t_a , μοντελοποιούν τη βάση δεδομένων X και αποτελούν συνάμα τις προγνωστικές μεταβλητές (*predictors*) για την πρόβλεψη της βάσης δεδομένων Y , όπως αυτό φαίνεται από τις εξισώσεις (2.3) και (2.4), αντίστοιχα.

$$x_{ik} = \sum_a t_{ia} p_{ak} + e_{ik} \quad (2.3)$$

$$y_{im} = \sum_a c_{ma} t_{ia} + f_{im} \quad (2.4)$$

Πολλαπλασιάζοντας τις μεταβλητές X -scores, t_a , με τις αντίστοιχες τιμές *loadings*, p_{ak} , ελαχιστοποιούνται οι τιμές των καταλοίπων X , e_{ik} , στην εξίσωση (2.3). Αντίστοιχα, όταν για τη βάση δεδομένων Y ισχύει $M > 1$, τα Y -scores, u_a , πολλαπλασιάζονται με τις αντίστοιχες τιμές βαρύτητας (*weights*), c_{am} , ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα κατάλοιπα, f_{im} , στην εξίσωση (2.5).

$$y_{im} = \sum_a u_{ia} c_{am} + g_{im} \quad (2.5)$$

Εστιάζοντας στην εξίσωση (2.4), μέσω της οποίας επιτυγχάνεται και η συσχέτιση των δύο βάσεων δεδομένων X και Y , τα αναφερόμενα κατάλοιπα Y , f_{im} , εκφράζουν τις αποκλίσεις μεταξύ των παρατηρούμενων (*reference values*) και των μοντελοποιημένων (*predicted values*) αποκρίσεων Y .

Κατόπιν συνδυασμού των εξισώσεων (2.1) και (2.4), εξάγεται η σχέση (2.6), η οποία αναπαριστά σε μεγάλο βαθμό ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, όπου b_{mk} οι συντελεστές PLSR.

$$y_{im} = \sum_a c_{ma} \sum_k w_{ka}^* x_{ik} + f_{im} = \sum_k b_{mk} x_{ik} + f_{im} \quad (2.6)$$

$$b_{mk} = \sum_a c_{ma} w_{ka}^* \quad (2.7)$$

Από τις σχέσεις (2.1) και (2.2) προκύπτει ότι το σημαντικό για την PLSR είναι να βρεθούν οι κατάλληλες τιμές βαρύτητας (*weights*), w_{ka}^* και c_{ma} , ώστε κάθε ζευγάρι γραμμικών συνδυασμών στις βάσεις δεδομένων X και Y , αντίστοιχα, να παρουσιάζει τη μέγιστη συνδιασπορά. Η βέλτιστη περίπτωση θεωρείται αυτή κατά την οποία ο συντελεστής PLSR, b_{mk} , προσεγγίζει τη μονάδα.⁹³

2.8.3. Ερμηνεία του μοντέλου

Συνοπτικά λοιπόν, με βάση τα όσα έχουν αναφερθεί, μέσω του μοντέλου PLSR εξάγονται νέες, ανεξάρτητες LVs X -scores, t_a , οι οποίες εκφράζονται σαν γραμμικοί συνδυασμοί των πραγματικών μεταβλητών, x_k , και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των αποκρίσεων Y . Το πλήθος των LVs που εξάγεται είναι το βέλτιστο, ώστε το μοντέλο να έχει καλή προγνωστική ικανότητα. Επιδιώκοντας μια λεπτομερέστερη ερμηνεία του μοντέλου, μπορούν να σημειωθούν τα εξής:⁹³

X -scores και Y -scores

Τα X -scores, t_a , και Y -scores, u_a , περιέχουν πληροφορίες οι οποίες περιγράφουν ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, με βασικό κριτήριο το πρόβλημα που θέτει το πρόβλημα παλινδρόμησης.

Τιμές βαρύτητας (*weights*)

Μέσω των τιμών βαρύτητας (*weights*), w_a^* και c_a , παρέχονται πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίον συνδυάζονται οι μεταβλητές, ώστε να προκύψει η ποσοτική σχέση μεταξύ των μεταβλητών X και Y . Πιο συγκεκριμένα, βοηθούν στην αναγνώριση των πιο χρήσιμων μεταβλητών x_k , αυτών δηλαδή που περιέχουν την πιο πλούσια χημική πληροφορία (υψηλές

τιμές w_a^*), ενώ βοηθούν επίσης στην αναγνώριση των μεταβλητών x_k που παρέχουν παρόμοιες πληροφορίες για το σύστημα (παρόμοιες τιμές w_a^*). Ωστόσο, επιβάλλεται προσοχή κατά την ερμηνεία των τιμών βαρύτητας, w_a^* , εξαιτίας των θετικών και ανταγωνιστικών συσχετίσεων που επικρατούν μεταξύ των δύο βάσεων δεδομένων.

Κατάλοιπα (*residuals*)

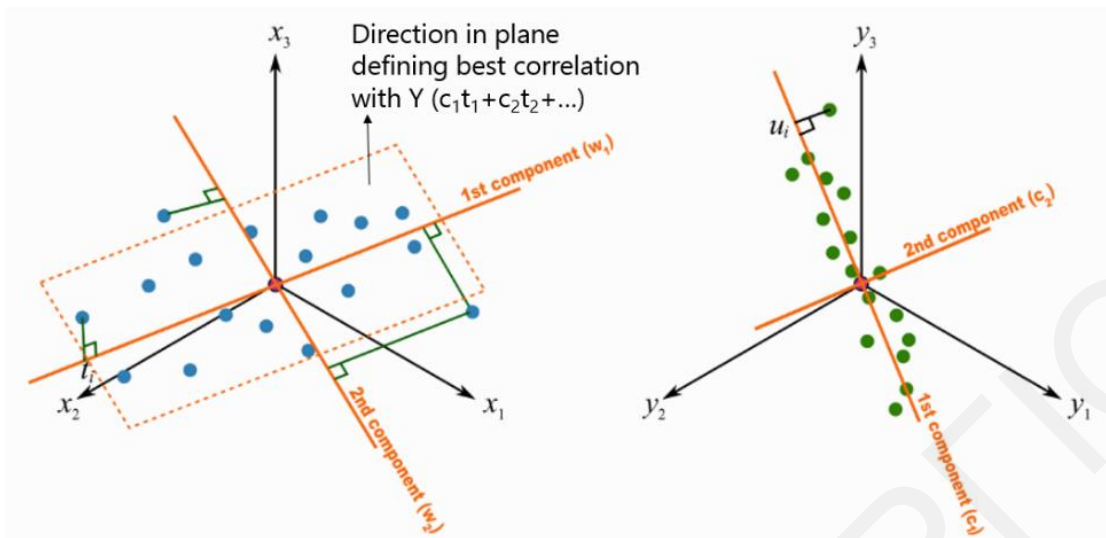
Τα κατάλοιπα (*residuals*) αναφέρονται στο κομμάτι των πειραματικών δεδομένων που δεν μπορεί να ερμηνευθεί από το μοντέλο, με συνέπεια να αποτελούν σημαντική ένδειξη της προγνωστικής του ικανότητας. Συγκεκριμένα, υψηλές τιμές καταλοίπων Y (*Y-residuals*) δίνουν την εικόνα ενός μη ικανού προγνωστικού μοντέλου. Σε μια τέτοια περίπτωση, το διάγραμμα της κανονικής πιθανότητας για κάθε απόκριση Y ξεχωριστά, μπορεί να υποδείξει ακραίες τιμές (*outliers*) που προκύπτουν από τη σχέση μεταξύ των T και Y .

Επιπλέον, στο μοντέλο PLSR αναφέρονται και τα κατάλοιπα X (*X-residuals*), στα οποία συμπεριλαμβάνεται το κομμάτι των πειραματικών δεδομένων που δεν αξιοποιείται για τη μοντελοποίηση της βάσης δεδομένων Y . Μέσω των τιμών αυτών μπορούν να εντοπιστούν ακραίες τιμές (*outliers*) προγνωστικών μεταβλητών X , με συνέπεια να αποκλειστούν κατά την προσαρμογή του μοντέλου.⁹³

2.8.4. Γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου

Η περιγραφικότητα που έδωσαν οι Svante Wold και Harald Martens με το ακρωνύμιο PLS «*Projection to Latent Structures*», φανερώνει πως το μοντέλο είναι βασισμένο γεωμετρικά στη μέθοδο των προβολών. Συγκεκριμένα, πρόκειται για την προβολή της βάσης δεδομένων X , αποτελούμενης από N σημεία σε ένα K -διάστατο χώρο, πάνω σε ένα A -διάστατο υπερεπίπεδο, με τρόπο ώστε οι συντεταγμένες των προβολών των σημείων (t_a , $a = 1, 2, \dots, A$) να αποτελούν ικανά προγνωστικά στοιχεία για την εκτίμηση των αποκρίσεων Y . Το A -διάστατο υπερεπίπεδο περιστρέφεται και ορίζεται από μια κατεύθυνση, ανά συνιστώσα (*component*) ή ταυτόσημα ανά LV. Ο συντελεστής της κάθε κατεύθυνσης ονομάζεται *loading*, συμβολίζεται με p_{ak} και συνοψίζει την πληροφορία που περιέχεται στη βάση δεδομένων X .

Η κατεύθυνση της κάθε συνιστώσας τοποθετείται με σκοπό τη μέγιστη επεξήγηση της πληροφορίας που βρίσκεται στις δύο βάσεις δεδομένων X και Y ξεχωριστά, αλλά και τη βέλτιστη συσχέτιση των πληροφοριών μεταξύ των δύο βάσεων δεδομένων. Στον πολυδιάστατο χώρο X επιβάλλεται οι συνιστώσες να είναι ορθογώνιες μεταξύ τους, σε αντίθεση με τον χώρο Y (Σχήμα 2.9).⁹⁵

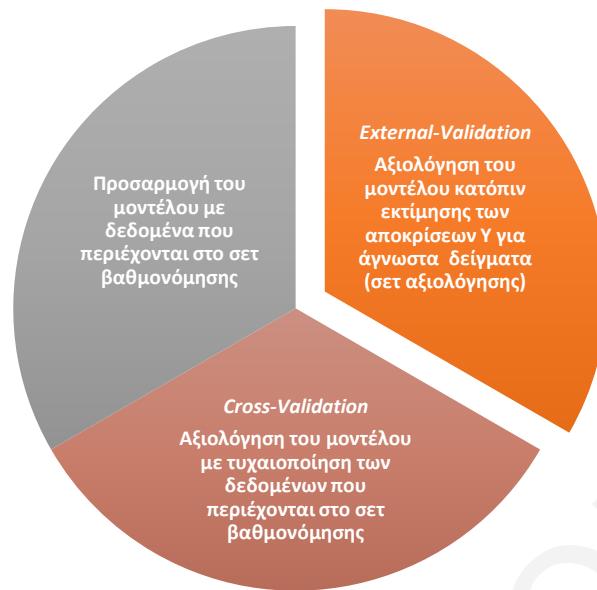


Σχήμα 2.9. Γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου PLSR.⁹⁶

2.8.5. Αξιολόγηση του μοντέλου

Κατόπιν προσαρμογής του μοντέλου PLSR επιβάλλεται προτού αυτό χρησιμοποιηθεί, να αξιολογηθεί ως προς την ικανότητα να προβλέπει την προσδιοριζόμενη ιδιότητα για άγνωστα δείγματα, τα οποία δεν έχουν αξιοποιηθεί κατά την προσαρμογή του. Η διαδικασία ελέγχου της προγνωστικής του ικανότητας είναι γνωστή ως επικύρωση (*validation*). Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη διαδικασία επικύρωσης συγκρίνονται με τις τιμές αναφοράς και εφόσον αυτά συμφωνούν και έχουν παρόμοια τιμή σφάλματος, τότε το μοντέλο κρίνεται κατάλληλο για την ακριβή πρόγνωση της προσδιοριζόμενης ιδιότητας στο μέλλον (Σχήμα 2.10).

Η ιδανικότερη διαδικασία επικύρωσης του μοντέλου είναι αυτή κατά την οποία αξιοποιείται το ήδη προσαρμοσμένο μοντέλο (σετ βαθμονόμησης) για την εκτίμηση των ιδιοτήτων άγνωστων δειγμάτων (σετ αξιολόγησης). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται εξωτερική επικύρωση (External Validation, EV). Ωστόσο, η εύρεση ενός τέτοιου, ανεξάρτητου και αντιπροσωπευτικού συνόλου δειγμάτων δεν είναι συχνά εφικτή, με συνέπεια η κυρίαρχη διαδικασία επικύρωσης να είναι η αυτή της διασταυρούμενης επικύρωσης (Cross-Validation, CV), μέσω της οποίας γίνεται επανεκτίμηση του μοντέλου κατόπιν τυχαιοποίησης των δεδομένων που περιέχονται στο σετ βαθμονόμησης. Πιο συγκεκριμένα, το λογισμικό πρόγραμμα προχωρά στον τυχαίο διαχωρισμό των δεδομένων, κατατάσσοντάς τα στα δύο σετ δεδομένων. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως η τεχνική CV χρησιμοποιείται επίσης για την εκτίμηση του βέλτιστου αριθμού LVs που θα αξιοποιηθούν εν τέλει από το μοντέλο.



Σχήμα 2.10. Διαδικασία προσαρμογής και αξιολόγησης ενός μοντέλου PLSR.

Οι επικρατέστερες διαδικασίες μέσω των οποίων εφαρμόζεται η τεχνική CV είναι η *K-fold CV* και η *leave-one-out CV*. Η πρώτη επιτυγχάνεται όταν τα πειραματικά δεδομένα χωριστούν τυχαία σε K ισομεγεθή υποσύνολα. Κάθε φορά εκτιμάται η προγνωστική ικανότητα του μοντέλου όταν το σετ βαθμονόμησης απαρτίζεται από $K-1$ υποσύνολα και το σετ αξιολόγησης από το εναπομείναν υποσύνολο. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν όλα τα K υποσύνολα αξιοποιηθούν ως σετ αξιολόγησης.

Στην περίπτωση όμως, όπου το πλήθος των παρατηρήσεων είναι αρκετά μικρό, τότε ο διαχωρισμός των δεδομένων στα δύο σετ είναι ανέφικτος, με αποτέλεσμα το κάθε σετ αξιολόγησης να αποτελείται από μια και μόνο παρατήρηση. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως *leave-one-out CV* ολοκληρώνεται όταν κάθε παρατήρηση αξιοποιηθεί σαν κριτήριο (σετ) αξιολόγησης.

Η προγνωστική ικανότητα των μοντέλων στοιχειοθετείται έπειτα από τον υπολογισμό των καταλοίπων (*residuals*). Με τον όρο κατάλοιπο γίνεται αναφορά στη διαφορά μεταξύ της πραγματικής και της εκτιμώμενης από το μοντέλο τιμής, για κάθε απόκριση Y . Οι τιμές αυτές μπορούν να υπολογιστούν μέσω διάφορων στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, όπως αυτά παρουσιάζονται παρακάτω.⁹²

Μέσο τετραγωνικό σφάλμα βαθμονόμησης (MSEC)

Αναφέρεται στο μέσο τετραγωνικό σφάλμα της βαθμονόμησης (Mean Square Error of Calibration, MSEC) ή αλλιώς στο φαινομενικό μέσο σφάλμα της πρόγνωσης ($MSEP_{app}$). Το

μέτρο αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλή μεροληψία, καθώς χειρίζεται το σετ βαθμονόμησης σαν σετ αξιολόγησης. Επομένως, η αξιοποίησή του σαν το μοναδικό μέτρο αξιολόγησης της προγνωστική ικανότητας του μοντέλου δεν είναι αποτελεσματική, καθώς δεν παρέχει αντιπροσωπευτική εικόνα για την ποιότητα των προβλέψεων σε άγνωστα δείγματα. Ο υπολογισμός του MSEC γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.8) και όπου n_L οι παρατηρήσεις που περιέχονται στο σετ βαθμονόμησης, \hat{y}_l οι εκτιμήσεις (προβλέψεις) των μεταβλητών των αποκρίσεων Y που προκύπτουν από το μοντέλο και y_i οι πραγματικές μεταβλητές των αποκρίσεων Y .

$$\text{MSEC} = \frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} (\hat{y}_l - y_i)^2 \quad (2.8)$$

Μέσο τετραγωνικό σφάλμα διασταυρούμενης επικύρωσης (MSECV)

Αντίστοιχα μπορεί να προσδιοριστεί το μέσο τετραγωνικό σφάλμα της πρόγνωσης που προκύπτει μέσω της τεχνικής CV (Mean Square Error of Cross-Validation, MSECV). Ο υπολογισμός του MSECV γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.9) και όπου n_L οι παρατηρήσεις που περιέχονται στο σετ βαθμονόμησης, \hat{y}_l οι εκτιμήσεις (προβλέψεις) των μεταβλητών των αποκρίσεων Y που προκύπτουν από το μοντέλο και y_i οι πραγματικές μεταβλητές των αποκρίσεων Y .

$$\text{MSECV} = \frac{1}{n_L - 1} \sum_{i=1}^{n_L} (\hat{y}_l - y_i)^2 \quad (2.9)$$

Η ελαχιστοποίηση του MSECV θεωρείται ένας αξιόπιστος τρόπος για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου και συνεπώς του βέλτιστου αριθμού LVs που θα χρησιμοποιηθούν από αυτό. Τον σκοπό αυτό μπορούν να εκπληρώσουν επίσης και άλλα ισοδύναμα στατιστικά μεγέθη, όπως είναι για παράδειγμα το PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares, PRESS).

$$\text{PRESS} = n_L \times \text{MSECV} \quad (2.10)$$

Μέσο τετραγωνικό σφάλμα πρόγνωσης (MSEP)

Κατά τη διαδικασία EV εκτιμούνται οι αποκρίσεις Y για άγνωστα δείγματα (σετ αξιολόγησης), τα οποία δεν έχουν αξιοποιηθεί κατά την προσαρμογή του μοντέλου αλλά θεωρητικά ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό με αυτά που περιέχονται στο σετ βαθμονόμησης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μέτρο αξιολόγησης μέσου τετραγωνικού σφάλματος πρόγνωσης (Mean Square Error of Prediction, MSEP) θεωρείται το πιο αμερόληπτο συγκριτικά με τα προηγούμενα και υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.11) και όπου n_T οι παρατηρήσεις που περιέχονται στο σετ αξιολόγησης, $\hat{y}_{T,i}^L$ οι εκτιμήσεις (προβλέψεις) των μεταβλητών των αποκρίσεων Y του σετ αξιολόγησης που προκύπτουν από το μοντέλο

που προσαρμόστηκε βάσει των δεδομένων του σετ βαθμονόμησης και $y_{T,i}$ οι πραγματικές μεταβλητές των αποκρίσεων Y του σετ αξιολόγησης.

$$MSEP = \frac{1}{n_T} \sum_{i=1}^{n_T} (\hat{y}_{T,i}^L - y_{T,i})^2 \quad (2.11)$$

Να τονιστεί ότι τις περισσότερες φορές στη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται η τετραγωνική ρίζα των MSEC, MSEC_V και MSEP, όπως αυτή φαίνεται ενδεικτικά για την τιμή RMSEC_V (Root Mean Square Error of Cross-Validation, RMSEC_V) στην εξίσωση (2.12).

$$RMSEC_V = \sqrt{MSEC_V} = \sqrt{\frac{PRESS}{n_L}} \quad (2.12)$$

Συντελεστής προσδιορισμού

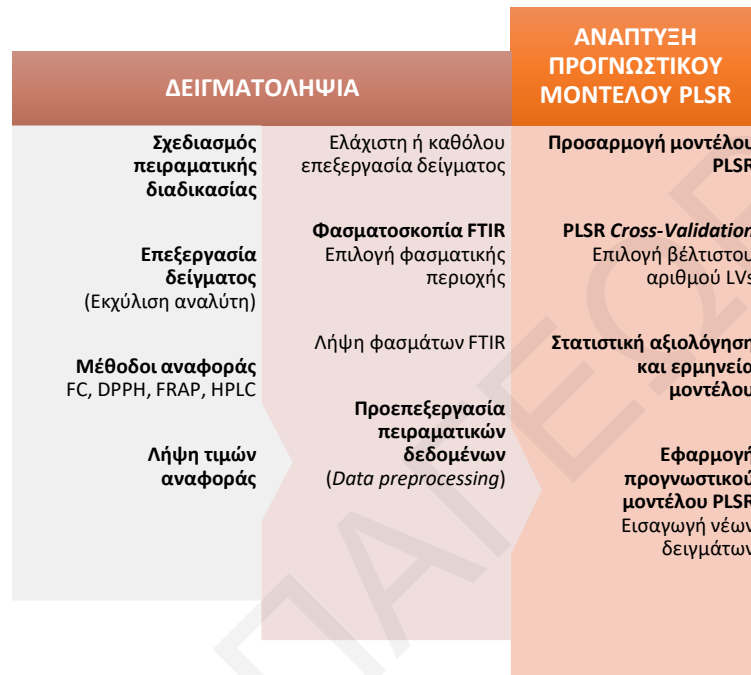
Η στατιστική αξιολόγηση ενός μοντέλου μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του συντελεστή προσδιορισμού, r^2 , μέσω του οποίου εξετάζεται η συσχέτιση των πραγματικών μεταβλητών των αποκρίσεων Y που προκύπτουν από τις μεθόδους αναφοράς και των προβλεπόμενων μεταβλητών των αποκρίσεων Y που προκύπτουν από την εφαρμογή του μοντέλου. Ο συντελεστής προσδιορισμού, r^2 , υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.13) και όπου n ο αριθμός των παρατηρήσεων, \hat{y}_i οι εκτιμώμενες από το μοντέλο μεταβλητές των αποκρίσεων Y , y_i οι πραγματικές μεταβλητές των αποκρίσεων Y όπως αυτές προκύπτουν από τις μεθόδους αναφοράς και \bar{y} ο μέσος όρος των πραγματικών μεταβλητών των αποκρίσεων Y όλων των δειγμάτων. Αναλόγως του σετ δεδομένων που χρησιμοποιείται κάθε φορά μπορούν να προκύψουν αντίστοιχα, οι συντελεστές προσδιορισμού βαθμονόμησης, r_{CAL}^2 , διασταυρούμενης επικύρωσης, r_{CV}^2 , και εξωτερικής επικύρωσης, r_{PRED}^2 .

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.13)$$

2.9. Ανάπτυξη ανθεκτικών (*robust*) μοντέλων PLSR

Η ανάπτυξη μοντέλων βασισμένων σε πειραματικά δεδομένα αποσκοπεί στη μέγιστη δυνατή σκιαγράφηση της πραγματικότητας. Η αξιοποίησή τους έχει σαν στόχο είτε την ερμηνεία, είτε την πρόβλεψή της. Ωστόσο, όλα τα πειραματικά μοντέλα κρίνονται λίγο ή πολύ εσφαλμένα, καθώς σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τυχαία ή συστηματικά σφάλματα. Ο σωστός πειραματικός σχεδιασμός και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μπορούν να δράσουν καταλυτικά στη μείωση του πειραματικού σφάλματος και κατ' επέκταση στη ανάπτυξη πιο ανθεκτικών (*robust*) μοντέλων.

Στο εξής, θα σχολιαστούν αναλυτικά τα επιμέρους στάδια που απαιτούνται για την ανάπτυξη ανθεκτικών (*robust*) μοντέλων PLSR, όπως αυτά παρουσιάζονται στο σχήμα 2.11. Επίσης, θα τονιστεί η σημαντικότητα του κάθε σταδίου, αναφέροντας χαρακτηριστικά παραδείγματα μοντέλων PLSR που εφαρμόστηκαν σε ποικιλία τροφίμων, ποτών και εκχυλισμάτων βιβλιογραφικά με σκοπό την πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και/ή του αντιοξειδωτικού τους περιεχομένου.^{66,97}



Σχήμα 2.11. Στάδια ανάπτυξης ανθεκτικών (*robust*) μοντέλων PLSR με αξιοποίηση φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR.

2.9.1. Δειγματοληψία

Το στάδιο της δειγματοληψίας κρίνεται αναντίρρητα ως το σημαντικότερο για την ανάπτυξη ενός ικανού προγνωστικού μοντέλου PLSR. Η ένταξη ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων με ποικιλόμορφα χαρακτηριστικά και ιδιότητες στο μοντέλο παλινδρόμησης διευρύνει σημαντικά τον αριθμό των άγνωστων δειγμάτων για τα οποία δύναται να γίνει πρόβλεψη των ιδιοτήτων τους μελλοντικά. Συνεπώς, το κλειδί της επιτυχίας είναι η κατάλληλη επιλογή μιας σειράς δειγμάτων, τα οποία θα καλύπτουν όλη την πιθανή φυσική ή χημική πληροφορία που θα περιέχεται στα άγνωστα δείγματα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως τα προγνωστικά μοντέλα είναι ικανά να λειτουργήσουν με ακρίβεια, μόνο εάν τα δείγματα που περιέχονται αντίστοιχα στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ αξιολόγησης, ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό. Εκτός αυτού, προτείνεται η εφαρμογή των ίδιων πειραματικών ή μη διαδικασιών, ώστε τα αποτελέσματα που θα λαμβάνονται να είναι όσο το δυνατόν ρεαλιστικότερα. Η συνεχής τροφοδότηση των προγνωστικών μοντέλων με

νέα δείγματα είναι καθοριστικής σημασίας για την αξιόπιστη εφαρμογή τους στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων.⁶⁶

Η συλλογή δειγμάτων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και διαφορετικής ποικιλίας (γονότυπου), μεταξύ διαφορετικών χρονικών περιόδων είναι ικανή να αυξήσει σημαντικά το εύρος των τιμών αναφοράς για την εκάστοτε προσδιοριζόμενη ιδιότητα του τροφίμου. Στη βιβλιογραφία παρατηρήθηκαν περιπτώσεις κατά τις οποίες η συλλογή μεγάλου όγκου δειγμάτων δεν κατέστη δυνατή, με αποτέλεσμα οι ερευνητές να στοχεύσουν στην αυξημένη ποικιλομορφία των δειγμάτων. Ειδικότερα, η ομάδα των Zheng *et al.* για τον προσδιορισμό της TPC και της TAC σε δείγματα βατόμουρων (*blueberries*), αξιοποίησε δεκαέξι μόνο δείγματα, τα οποία προέρχονταν ωστόσο από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Αργεντινής, της Χιλής, του Καναδά και των ΗΠΑ και είχαν συλλεγεί μεταξύ της χρονικής περιόδου 2014 και 2015.⁸¹

Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές στην προσπάθειά τους να διευρύνουν ακόμη περισσότερο την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων συμπεριλαμβάνουν δείγματα που είχαν αποθηκευτεί υπό διαφορετικές συνθήκες ή για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ή ακόμη υπέστηκαν κάποιου είδους επεξεργασία. Παραδείγματος χάριν, η ομάδα των Caramês *et al.* χρησιμοποίησε συνολικά 65 δείγματα εμπορικά διαθέσιμων χυμών σταφυλιού για τον προσδιορισμό της TPC και του TACC (Total Anthocyanin Content, TACC), εκ των οποίων τα 62 ήταν δείγματα διαφορετικής εταιρείας παραγωγής και τα τρία ήταν λυοφιλοποιημένα δείγματα των χυμών που βρέθηκαν να έχουν τις υψηλότερες τιμές TPC.⁸⁰ Αντίστοιχα, η ομάδα των Clark *et al.* για τον προσδιορισμό του TACC σε χυμούς φρούτων από κόκκινα ακτινίδια, φραγκοστάφυλλα (*blackcurrant*) και βατόμουρα (*raspberries* και *blueberries*) αξιοποίησε δείγματα φρέσκων χυμών, αλλά και κατεψυγμένων που είχαν αποθηκευτεί στους -20 °C για χρονικό διάστημα έως και έξι χρόνων.⁸⁵

Η ευθέως ανάλογη σχέση του εύρους των τιμών αναφοράς και της προγνωστικής ικανότητας των μοντέλων PLSR επιβεβαιώθηκε μεταξύ άλλων και από την έρευνα των Clark *et al.* Παρατηρώντας συγκεκριμένα το εύρος των τιμών αναφοράς για το κάθε είδος χυμού και τους αντίστοιχους r^2_{CAL} (Πίνακας 2.3), φαίνεται ξεκάθαρα πως ο χαμηλότερος r^2_{CAL} αντιστοιχεί στον χυμό του κόκκινου ακτινιδίου, του οποίου το μοντέλο PLSR κατασκευάστηκε βάσει του μικρότερου εύρους τιμών αναφοράς για τη TACC.⁸⁵

Πίνακας 2.3. Σύγκριση των μοντέλων PLSR για τα διαφορετικά είδη χυμού.⁸⁵

	Χυμός φραγκοστάφυλλου	Χυμός βατόμουρου (Blueberry)	Χυμός βατόμουρου (Raspberry)	Χυμός κόκκινου ακτινιδίου
Εύρος τιμών αναφοράς TACC (ppm)	110–4697	19–3031	207–2990	0,4–404
r^2_{CAL}	0,936	0,848	0,898	0,747

2.9.2. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας – Μέθοδος εκχύλισης και μέθοδος αναφοράς

Η εφαρμογή της χημειομετρικής ανάλυσης υπογραμμίζει την ανάγκη για βελτιστοποίηση των μεταβλητών συνεπώς και του καθορισμού συγκεκριμένων πρωτοκόλλων για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Βάσει του εκάστοτε στόχου επιβάλλεται να προηγηθεί ο κατάλληλος πειραματικός σχεδιασμός, ο οποίος θα συμπεριλαμβάνει την αποδοτικότερη και πιο εύχρηστη μέθοδο εκχύλισης των αναλυτών και την καταλληλότερη μέθοδο αναφοράς ή ένα συνδυασμό αυτών.

Οι ερευνητικές ομάδες που πραγματεύονται το ίδιο αντικείμενο παραθέτουν στις πλείστες περιπτώσεις αποτελέσματα τα οποία είναι ασύμφωνα και/ή μη συγκρίσιμα. Δύο εκ των βασικών αιτιών είναι η διαφορετική μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόζεται και ο διαφορετικός τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ερευνητικές μελέτες των Hu *et al.* και των Batista *et al.* που στόχευσαν στον προσδιορισμό της TPC και της TAC σε δείγματα σοκολάτας.^{48,79}

Συγκεκριμένα, πριν την ανάλυση των δειγμάτων με τις συμβατικές μεθόδους αναφοράς, τα δείγματα υπέστηκαν προκατεργασία για μείωση του λιπιδικού τους περιεχομένου και έπειτα εκχύλιση των πολυφαινολικών τους ενώσεων. Η απομάκρυνση των λιπιδίων έγινε και στις δύο περιπτώσεις με πολλαπλή κρύα εκχύλιση με διαλύτη n-εξάνιο, ενώ η εκχύλιση των πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της κρύας εκχύλισης και διαφορετική σύσταση διαλυτών σε κάθε περίπτωση. Στον πίνακα 2.4 παρουσιάζονται τα διαφορετικά συστήματα διαλυτών εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν από τις δύο ομάδες και τα αντίστοιχα αποτελέσματα της TPC και της TAC που λήφθηκαν. Σαφώς, για τη διαφορά στις τιμές αναφοράς δεν ευθύνεται αποκλειστικά η μέθοδος εκχύλισης των πολυφαινολών ωστόσο, δεν μπορεί να αγνοηθεί η επίδραση που έχει στα τελικά αποτελέσματα.

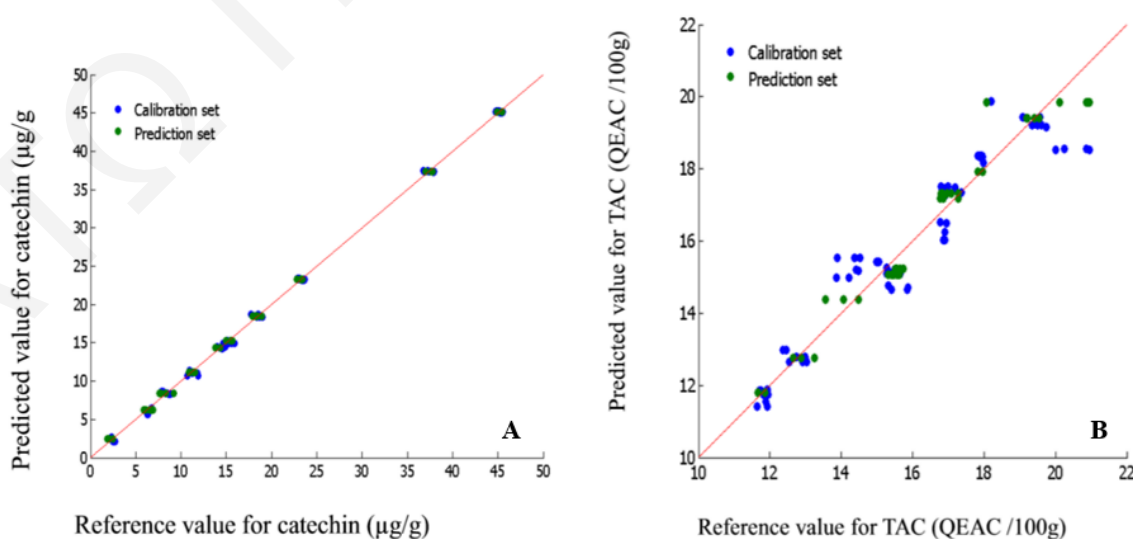
Πίνακας 2.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων της TPC και της TAC δειγμάτων σοκολάτας.

Σύστημα διαλυτών εκχύλισης πολυφαινολικών ενώσεων	TPC	DPPH	Βιβλιογραφία
Μεθανόλη/νερό (70:30)	2,60–48,49 (mg GAE/g DFW)	10,20–134,32 ($\mu\text{mol TE/g DFW}$)	Hu <i>et al.</i> ⁷⁹
Ακετόνη/νερό/οξικό οξύ (70:29,5:0,5)	47,17–57,16 (mg GAE/g)	1,66–2,33 (mM TE/g)	Batista <i>et al.</i> ⁴⁸

Επιπλέον, με βάση τις αναφορές της βιβλιογραφίας φαίνεται πως καθοριστικό ρόλο για την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων έχει και η επιλογή της μεθόδου αναφοράς. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται παρατηρώντας και συγκρίνοντας τα μοντέλα PLSR που κατασκευάστηκαν από την ερευνητική ομάδα των Tahir *et al.* βάσει διαφορετικών μεθόδων αναφοράς για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων παραμέτρων ή συστατικών σε δείγματα μελιού.⁸³ Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που υπολογίστηκαν για τα έξι μοντέλα, όπως αυτές φαίνονται στον πίνακα 2.5, παρατηρείται ότι παρά τις ικανοποιητικές τιμές $r^2_{\text{CAL}} > 0,95$ και $r^2_{\text{PRED}} > 0,92$ και τις σχετικά χαμηλές τιμές RMSECV, οι τιμές RMSEP για τα μοντέλα της TAC και της ICA (%) είναι σαφώς υψηλότερες (Σχήμα 2.12).

Πίνακας 2.5. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των έξι διαφορετικών μοντέλων PLSR για δείγματα μελιού.⁸³

Προσδιοριζόμενη/ο ιδιότητα/συστατικό	r^2_{CAL}	RMSECV	r^2_{PRED}	RMSEP
Κατεχίνη ($\mu\text{g/g}$)	0,9988	0,46	0,9988	0,40
Χλωρογενικό οξύ ($\mu\text{g/g}$)	0,9944	0,44	0,9940	0,43
Συριγγικό οξύ ($\mu\text{g/g}$)	0,9992	0,33	0,9924	1,08
Βανιλικό οξύ ($\mu\text{g/g}$)	0,9688	0,40	0,9461	0,45
ICA (%)	0,9934	0,86	0,9791	1,63
TAC (QEAC mg/100 g)	0,9681	0,47	0,9549	0,53

Σχήμα 2.12. Σύγκριση των μοντέλων PLSR για **A** τις συγκεντρώσεις κατεχίνης ($\mu\text{g/g}$) και **B** της TAC (QEAC/100 g) για δείγματα μελιού.⁸³

Οι ερευνητές θεώρησαν αναμενόμενη την παρατήρηση, καθώς μέσω των φασμάτων FTIR εντοπίζονται μόνο οι χαρακτηριστικές δονήσεις των λειτουργικών ομάδων που απαντούν στο δείγμα και όχι οι πιθανές αλληλεπιδράσεις ή τα συνεργειακά φαινόμενα μεταξύ των αντιοξειδωτικών και μη, συστατικών του δείγματος. Η παραπάνω δήλωση επιβεβαιώνεται και από τους υψηλότερους συντελεστές προσδιορισμού r^2_{PRED} που παρατηρούνται για τα μοντέλα PLSR των μονομερών πολυφαινολικών ενώσεων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η σύγκριση των μοντέλων PLSR που αναπτύχθηκαν από την ομάδα των Zheng *et al.* για τον προσδιορισμό της TPC και της TAC σε δείγματα βατόμουρων.⁸¹ Παρατηρώντας τις τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης που παρατίθενται στον πίνακα 2.6, καλύτερο μοντέλο κρίθηκε αυτό για την πρόγνωση της TPC. Οι ερευνητές δικαιολόγησαν το αποτέλεσμα αναφερόμενοι στη διαφορετική φύση των μεθόδων αναφοράς.

Πίνακας 2.6. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των μοντέλων PLSR για δείγματα βατόμουρων.⁸¹

	r^2_{CAL}	RMSEC	r^2_{PRED}	RMSEP
ORAC	0,9195	2,8125	0,6359	6,1854
DPPH	0,9576	0,4355	0,6580	0,7069
FC	0,9307	0,1933	0,8092	0,1434

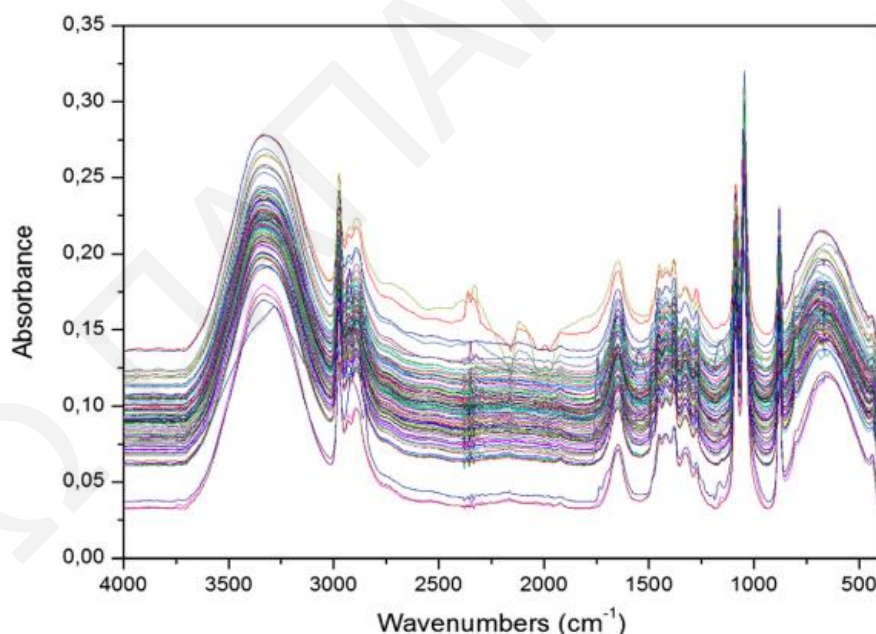
Συγκεκριμένα, εστιάστηκαν στη χρονική διάρκεια των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται αλλά και στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Ο μικρός χρόνος αντίδρασης του αντιοξειδωτικού με το αντιδραστήριο, παραδείγματος χάριν στην περίπτωση του αντιδραστήριου DPPH (30 λεπτά), συνεπάγεται αυξημένο αριθμό τυχαίων σφαλμάτων και μειωμένη ακρίβεια των μετρήσεων. Επιπρόσθετα, οι βασικές συνθήκες που επικρατούν κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης Folin-Ciocalteu, συμβάλλουν στην αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων έναντι του αντιδραστήριου και στη μείωση των τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων.⁸¹

2.9.3. Φασματοσκοπία FTIR – Προκατεργασία δείγματος και επιλογή φασματικής περιοχής

Η επιλογή της καταλληλότερης φασματικής περιοχής κρίνεται καθοριστικής σημασίας, καθώς σε αυτήν πρέπει να συμπεριλαμβάνεται η πιο πλούσια φασματική-χημική πληροφορία, που είναι απαλλαγμένη από παρεμποδιστικά σήματα θορύβου ή και άλλων συστατικών. Επίσης, πρέπει να παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις στις απορροφήσεις των χαρακτηριστικών κορυφών μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, οι οποίες θα σκιαγραφούν το μεγάλο εύρος των τιμών αναφοράς και κατά συνέπεια την ποικιλομορφία των δειγμάτων.

Η εξελικτική πορεία των ερευνών κατά τις οποίες επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της TAC σε προϊόντα τροφίμων είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα. Συγκεκριμένα, στην πρώτη ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Lam *et al.* αναφέρθηκε ο προσδιορισμός της TAC εκχυλισμάτων φρούτων και όχι της ακατέργαστης πρώτης ύλης, όπως συνηθίζεται στις πιο πρόσφατες μελέτες, ενώ για τη δημιουργία των μοντέλων PLSR είχε αξιοποιηθεί μόνο η περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυφαινολικών μορίων ($\sim 1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).³⁷ Παρά το γεγονός ότι η συγκεκριμένη προσέγγιση βρισκόταν έως τότε στα αρχικά στάδια, τα μοντέλα PLSR που είχαν αναπτυχθεί κατάφεραν επιτυχώς να προβλέψουν την TAC άγνωστων δειγμάτων.

Ωστόσο, η ανάπτυξη μοντέλων βασιζόμενων σε τιμές αναφοράς και φασματικά χαρακτηριστικά εκχυλισμάτων εφαρμόζεται και σε πιο πρόσφατες μελέτες, όταν η σύσταση του δείγματος είναι αρκετά περίπλοκη ή μερικώς απροσδιόριστη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Silva *et al.*, οι οποίοι επιχείρησαν τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης, αξιοποιώντας τις περιοχές των $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ και των $1800\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ (Σχήμα 2.13).⁸⁷



Σχήμα 2.13. Φάσματα FTIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) των αιθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.⁸⁷

Οι περιοχές που δεν συμπεριελήφθησαν δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων ή ακόμα εμφανίζουν κορυφές, οι οποίες αποδίδονται σε δονήσεις παρεμποδιστών, όπως είναι για παράδειγμα η έντονη κορυφή στους 3400 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης των --OH των αλκοολών.

Επίσης, η ελάχιστη προκατεργασία των δειγμάτων μπορεί να δώσει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στο εύρος της φασματικής περιοχής που αξιοποιείται για την κατασκευή των μοντέλων. Παρατηρώντας τις μελέτες που έγιναν από τους Batista *et al.* και τους Hu *et al.* σε δείγματα σοκολάτας, φαίνεται πως οι πρώτοι οι οποίοι κατεργάστηκαν τα δείγματα με υγρό άζωτο και ακόλουθη αφυδάτωση με τη χρήση λυοφιλιωτή, κατάφεραν να αξιοποιήσουν ολόκληρο το εύρος συχνοτήτων της περιοχής του MIR, καθώς ελαχιστοποιήθηκε σημαντικά η συνεισφορά του νερού στους $\sim 3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, όπου εντοπίζεται η δόνηση τάσης των --OH .⁴⁸ Αντίθετα, η ομάδα των Hu *et al.*, η οποία επέλεξε την απευθείας τοποθέτηση θρυμματισμένων δειγμάτων σοκολάτας στο IRE κατάφερε να αξιοποιήσει μόνο την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος, ώστε να λάβει ικανά προγνωστικά μοντέλα.⁷⁹

Στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος $\sim 1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, εμφανίζονται σημαντικές κορυφές οι οποίες αποδίδονται στην ύπαρξη του φαινολικού δακτυλίου των πολυφαινολικών ενώσεων. Εκμεταλλευόμενοι την ηχηρή παρουσία της (+)-κατεχίνης, στα δείγματα σοκολάτας, οι Hu *et al.* αξιοποίησαν το φάσμα FTIR της (+)-κατεχίνης ως πρότυπο ώστε να εντοπιστούν οι συνεισφορές που αποδίδονται ξεκάθαρα στις πολυφαινολικές ενώσεις.⁷⁹

Η πλειοψηφία των κορυφών στη συγκεκριμένη περιοχή αποδόθηκε στην ύπαρξη λειτουργικών ομάδων που απαντούν σε ενώσεις της κατηγορίας των φλαβαν-3-ολών. Ωστόσο, οι κορυφές στο φάσμα του δείγματος σοκολάτας ήταν μειωμένης έντασης σε σχέση με το πρότυπο, γεγονός που δικαιολογήθηκε από τη χαμηλή συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, αλλά και την ύπαρξη άλλων συστατικών σε μια πολυπλοκότερη μήτρα, όπως είναι αυτή του τροφίμου.

Συγκεκριμένα, αναφέρθηκε η σημαντική συνεισφορά των λιπιδίων και των πολυσακχαριτών στα φασματικά δεδομένα, μειώνοντας την αναλογία του σήματος ως προς τον θόρυβο, επιφέροντας έτσι την υποβάθμιση της προγνωστικής ικανότητας των μοντέλων, αφού αγνοούνται αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.⁷⁹ Συμπληρωματικά, η ομάδα των Batista *et al.* συνέκρινε τα αποτελέσματα των τιμών TPC και TAC των καρπών κακάο και των παραγόμενων δειγμάτων σοκολάτας και παρατήρησε αυξημένες τιμές της TPC και της TAC για τα τελευταία. Το γεγονός αυτό δικαιολογήθηκε με βάση τη συνεισφορά των υψηλού πολυμερισμού αντιοξειδωτικών ενώσεων (μελανοϊδίνες), που παράγονται κατά την αντίδραση Maillard στο στάδιο καβουρδίσματος του καρπού.⁴⁸

2.9.4. Προεπεξεργασία φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR

Στις περισσότερες εφαρμογές, προηγείται της στατιστικής ανάλυσης η προεπεξεργασία των φασματικών δεδομένων με αξιοποίηση μαθηματικών εργαλείων. Βασικοί στόχοι είναι η απαλλαγή των πειραματικών δεδομένων από ανεπιθύμητα σήματα (π.χ. θορύβου), απομονώνοντας τη χρήσιμη πληροφορία και η μετατροπή των φασματικών χαρακτηριστικών (*σημάτων*) σε μια κοινή μορφή, ώστε τα αποτελέσματα που θα ληφθούν από τα διαφορετικά δείγματα να είναι όσο το δυνατόν συγκρίσιμα.⁹⁸

Η επιλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου ή ενός συνδυασμού μεθόδων επηρεάζει σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα και εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, την τεχνική ενόργανης ανάλυσης που εφαρμόζεται και τον κύριο στόχο του πειράματος. Μια μεγάλη ποικιλία τέτοιων μεθόδων αναφέρεται και βρίσκει εφαρμογές βιβλιογραφικά και σε αυτήν συγκαταλέγονται η επικέντρωση (*mean-centering*) των δεδομένων, η κανονικοποίηση (*normalization*), η παραγωγοποίηση (*derivatization*) κ.ά.⁶⁶

Οι ερευνητές σε ορισμένες περιπτώσεις προχωρούν μέσω της προεπεξεργασίας των δεδομένων, ενώ σε άλλες αξιοποιούν τα δεδομένα στην πρότυπη μορφή τους. Η επιλογή προκύπτει μετά από σύγκριση των προγνωστικών μοντέλων που αναπτύσσονται με βάση τα επεξεργασμένα ή μη πειραματικά δεδομένα αφού όπως φαίνεται οι απόψεις των ερευνητών δε συγκλίνουν.

Παραδείγματος χάριν, η ερευνητική ομάδα των Preserova *et al.* εξέτασε την προγνωστική ικανότητα μοντέλων PLSR που κατασκευάστηκαν βάσει μη επεξεργασμένων φασμάτων FTIR και φασμάτων που προέκυψαν από την πρώτη και τη δεύτερη παράγωγο.⁷⁷ Κατόπιν σύγκρισης των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, προέκυψε ότι τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν αξιοποιώντας τα μη επεξεργασμένα φάσματα ήταν ικανότερα να προβλέψουν τις τιμές αναφοράς για τη TPC και τη TAC άγνωστων δειγμάτων κόκκινου και ροζέ κρασιού. Συγκεκριμένα, ανέφεραν πως κατά την παραγωγοποίηση των φασμάτων χάνονται σημαντικές πληροφορίες, οι οποίες είναι ικανές να μειώσουν την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων.

Σε αντίθετη περίπτωση, η ερευνητική ομάδα των Batista *et al.* ανέφερε πως μέσω της επικέντρωσης και της δεύτερης παραγωγοποίησης των φασμάτων επιτεύχθηκε σημαντική μείωση στη διακύμανση του υποβάθρου, με συνεπακόλουθη τη βελτίωση των φασματικών χαρακτηριστικών και τη δημιουργία ικανότερων προγνωστικών μοντέλων.⁴⁸

2.9.5. Στατιστική αξιολόγηση μοντέλου – Επιλογή αριθμού LVs

Σε προηγούμενη ενότητα έχει αναφερθεί η κρισιμότητα του σταδίου επικύρωσης (*validation*) ενός μοντέλου PLSR. Εάν παρακαμφθεί η συγκεκριμένη διαδικασία, τότε το μοντέλο που κατασκευάζεται θεωρείται αναξιόπιστο και δεν μπορεί να προβεί σε οποιαδήποτε πρόβλεψη. Από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλούνται οι ερευνητές να επιλύσουν μέσω της διαδικασίας επικύρωσης, είναι η επιλογή του βέλτιστου αριθμού LVs που θα αξιοποιηθούν εν τέλει κατά την εφαρμογή του μοντέλου.

Σε περιπτώσεις όπου επιλέγεται είτε ένας μικρός, είτε ένας μεγάλος αριθμός LVs υπάρχει ο κίνδυνος, το μοντέλο που θα προκύψει να έχει μικρή έως και μηδαμινή προγνωστική αξία. Η ποιότητα των προβλέψεων ελέγχεται μέσω διάφορων στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, με το πιο πολυχρησιμοποιημένο να είναι το RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP). Η κύρια τεχνική που εφαρμόζεται για την εκτίμηση της τιμής RMSEP είναι η CV. Η ελαχιστοποίηση του RMSEP θεωρείται ένας αξιόπιστος τρόπος για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού LVs. Ωστόσο, οι ερευνητές καλούνται να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί όταν προκύψει ένας πολύ μικρός ή ένας πολύ μεγάλος αριθμός LVs, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις το μοντέλο μπορεί να εμφανίσει υποπροσαρμογή (*underfitting*) ή υπερπροσαρμογή (*overfitting*) των δεδομένων, αντίστοιχα.⁹²

Η υπερπροσαρμογή (*overfitting*) των δεδομένων προκύπτει όταν επιλεγεί ένας μεγάλος αριθμός LVs. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει πλεόνασμα ανεξάρτητων μεταβλητών κατά τη μοντελοποίηση, με αποτέλεσμα το μοντέλο να είναι ισχυρά εξαρτώμενο από τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη βαθμονόμηση. Επομένως, η πρόβλεψη άγνωστων δειγμάτων δε θα είναι επιτυχής, καθώς ελάχιστες διαφορές μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών στα δείγματα του σετ βαθμονόμησης και στα άγνωστα δείγματα θα είναι καθοριστικής σημασίας.⁹⁹

Αντίθετα, όταν αξιοποιηθεί ένας αρκετά μικρός αριθμός LVs, το μοντέλο θα αντιμετωπίζει το πρόβλημα της υποπροσαρμογής (*underfitting*). Στην περίπτωση αυτή, το μοντέλο δε θα είναι αρκετά ανθεκτικό (*robust*) ώστε να μπορεί να διαχειρίζεται την υψηλή διακύμανση των πειραματικών δεδομένων, με αποτέλεσμα να μην προβαίνει στις σωστές προβλέψεις. Τα φαινόμενα προσαρμογής των δεδομένων είναι ισχυρά εξαρτώμενα από τον αριθμό των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται κατά την ανάπτυξη ενός μοντέλου. Φαίνεται πως όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ενταγμένων δειγμάτων, τόσο καλύτερη είναι και η προγνωστική ικανότητα του μοντέλου.⁹⁹

Ενδεικτικό παράδειγμα υπερπροσαρμογής (*overfitting*) των δεδομένων από τη βιβλιογραφία, αποτελεί η έρευνα του Hu και των συνεργατών του, οι οποίοι μέσω της τεχνικής CV κατέληξαν στην επιλογή 11–14 LVs για τα μοντέλα PLSR που ανέπτυξαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό μονομερών προκυανιδινών, της TAC και της TPC σε δείγματα σοκολάτας (Πίνακας 2.7).⁷⁹

Πίνακας 2.7. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης των μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών παραμέτρων σε δείγματα σοκολάτας.⁷⁹

Ιδιότητα/ Συστατικό	Δοκιμή/ Τεχνική	LVs	r^2_{CAL}	RMSEC	r^2_{CV}	RMSECV	r^2_{PRED}	RMSEP
TAC	DPPH	13	0,95	8,46	0,92	10,87	0,89	13,07
	ORAC	15	0,95	30,97	0,89	45,52	0,90	37,92
TPC	Folin-Ciocalteu	11	0,96	3,21	0,93	4,21	0,88	5,08
[(+)-κατεχίνη]	HPLC-DAD	11	0,96	0,07	0,94	0,09	0,86	0,10
[(-)-επικατεχίνη]		12	0,91	0,48	0,87	0,58	0,72	0,57

Παρατηρώντας τις τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης οι ερευνητές κατέληξαν στο εξής συμπέρασμα. Παρά το γεγονός ότι $r^2_{\text{CV}} < r^2_{\text{CAL}}$ και $\text{RMSECV} > \text{RMSEC}$, η μικρή απόκλιση στο r^2_{PRED} σε σχέση με το r^2_{CAL} (μικρότερο από 0,1) και το αυξημένο κατά ~15% RMSEP, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις υπερπροσαρμογής (*overfitting*) των δεδομένων λόγω αξιοποίησης μεγάλου αριθμού LVs.⁷⁹

Κεφάλαιο 3 | Πειραματικό Μέρος

3.1. Αντιδραστήρια

Αιθανόλη, ακετονιτρίλιο (υψηλής καθαρότητας, βαθμού HPLC), ανθρακικό νάτριο (>99,0%), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, γαλλικό οξύ (>97,5%), 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), μεθανόλη (υψηλής καθαρότητας, βαθμού HPLC), νερό (υψηλής καθαρότητας, βαθμού HPLC), οξικό νάτριο, παγόμορφο οξικό οξύ, 2,4,6-τρι(2-πυριδυλο)-1,3,5-τριαζίνη (TPTZ), 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2-καρβοξυλικό οξύ (97%, Trolox), υδροχλωρικό οξύ (37%), χλωριούχος σίδηρος (III). Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και των διαλυτών έγινε από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

3.2. Δείγματα χαρουπιού

Για διεύρυνση των τιμών αναφοράς της TPC και της TAC εξετάστηκαν συνολικά 51 δείγματα ώριμων χαρουπιών, τα οποία είχαν συλλεγεί κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης των καρπών, μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου, κατά τα έτη συγκομιδής 2018, 2019 και 2020. Τα δείγματα προέρχονταν τόσο από ελεγχόμενες, όσο και από μη ελεγχόμενες καλλιέργειες, κυρίως των επαρχιών Πάφου, Λεμεσού και Λάρνακας, ενώ ένας μικρός αριθμός δειγμάτων προερχόταν από τις επαρχίες Λευκωσίας και Αμμοχώστου. Επιπλέον, στον συνολικό αριθμό των δειγμάτων συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα από το Μαρόκο και ένα δείγμα από την Ελλάδα (Κρήτη). Η πλειοψηφία των δειγμάτων αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ανάλυσή τους για χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνούσε τους εννέα μήνες. Αντίστοιχα, όσα δείγματα είχαν συλλεγεί κατά την περίοδο συγκομιδής του έτους 2018 αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4 °C για το χρονικό διάστημα των δύο ετών. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των καρπών με απεσταγμένο νερό και ξήρανσή τους σε ατμοσφαιρικό αέρα. Κατόπιν, οι καρποί τεμαχίστηκαν με σκοπό τον διαχωρισμό τους στα δύο απαρτιζόμενα συστατικά μέρη και απομάκρυνση των σπόρων. Το εναπομείναν μέρος της σάρκας αλέστηκε με τη βοήθεια της συσκευής Thermomix™ TM5 και η προκύπτουσα λεπτόκοκκη μάζα αξιοποιήθηκε σύμφωνα με τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω. Στο εξής, θα γίνεται χρήση του όρου «σκόνη» χαρουπιού, εξαιτίας της επεξεργασίας που υπέστησε το μέρος της σάρκας.

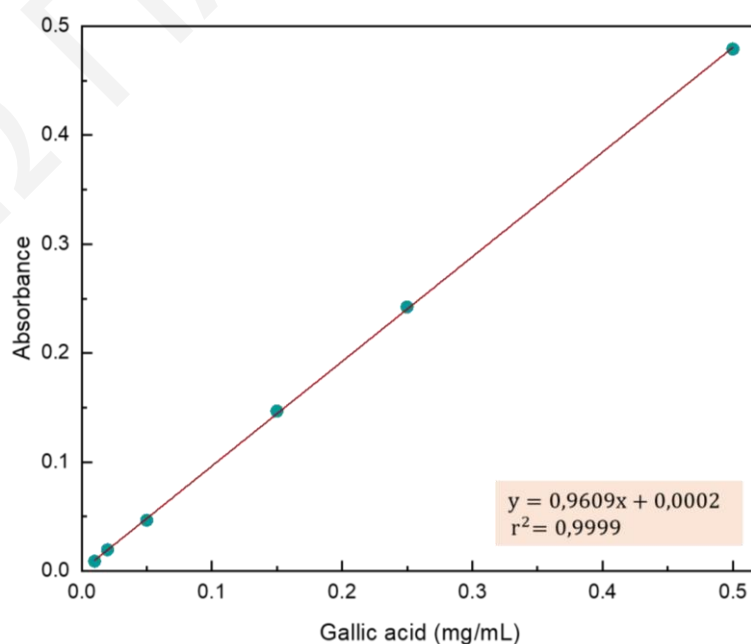
3.3. Εκχύλιση πολυφαινολικών ενώσεων

Τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα λήφθηκαν σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιγράφεται από τους Grigoriou *et al.*, με ελάχιστη τροποποίηση της διαδικασίας στην

περίπτωση των εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων).¹⁰⁰ Στοχεύοντας στην απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων, 5 g λεπτόκοκκης σκόνης χαρουπιού εκχυλίστηκαν με 50 mL απεσταγμένο νερό για 12 ώρες, στους 4 °C. Για την προετοιμασία των εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων) το στάδιο αυτό είχε παραληφθεί. Το στερεό υπόλειμμα λήφθηκε κατόπιν διήθησης και στη συνέχεια εκχυλίστηκε με 50 mL διαλύτη 1:1 EtOH:H₂O και θέρμανση για 10 λεπτά σε συσκευή reflux. Το δείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό, επιδιώκοντας τη λήψη του διηθήματος. Το διήθημα φυγοκεντρήθηκε (Eppendorf 5804R Centrifuge/F-34-6-38 Rotor) για 10 λεπτά με στροφές 10.000 rpm στους 4 °C και έπειτα συμπυκνώθηκε σε ρότορα εξάτμισης (R-215 Rotary Evaporator) για απομάκρυνση του οργανικού μέρους. Κατόπιν, ξηράθηκε σε λυοφιλιωτή (LyoDry Compact Benchtop Freeze Dryer), ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι την ανάλυσή του. Ο συνολικός χρόνος φύλαξης των στερεών εκχυλισμάτων δεν ξεπερνούσε τις πέντε ημέρες.

3.4. Προσδιορισμός της TPC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η TPC των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπως αυτή περιγράφεται από τους Uysal *et al.*, εφαρμόζοντας ορισμένες τροποποιήσεις.¹⁰¹ Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ και τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,01, 0,02, 0,05, 0,15, 0,25 και 0,50 mg/mL (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της μεθόδου Folin-Ciocalteu με πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος.

Έπειτα, προστέθηκαν σε φυαλίδιο 100 μL πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος ή διαλύματος εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2 mg/mL ή απεσταγμένου νερού για την παρασκευή του τυφλού δείγματος, 4,5 mL απεσταγμένου νερού και 100 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια, ακολούθησε έντονη ανάδευση και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300 μL διαλύματος 2% (w/v) Na_2CO_3 και το προκύπτον διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 2 ώρες, μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 2 ωρών, μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis (Shimadzu, UV-1700) και υπόβαθρο το σήμα του τυφλού δείγματος. Η TPC εκφράστηκε ως mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος (mg GAE/g εκχυλίσματος) και ως mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g σκόνης χαρουπιού (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού). Η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε κατ' επανάληψη τρεις φορές για το κάθε δείγμα και λήφθηκαν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις.

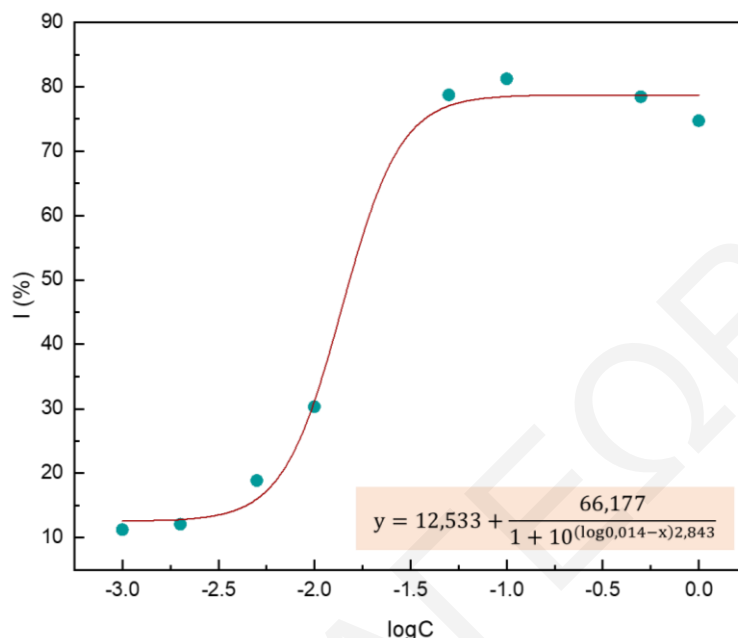
3.5. Προσδιορισμός της TAC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η TAC των εκχυλισμάτων μετρήθηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας 2,2,-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), όπως περιγράφεται πειραματικά από τους Sarikurku *et al.*, εφαρμόζοντας ορισμένες τροποποιήσεις.¹⁰² Σε κάθε φυαλίδιο προστέθηκαν 1 mL μεθανολικού διαλύματος του εκχυλίσματος γνωστής συγκέντρωσης ή 1 mL νερού για την παρασκευή του τυφλού δείγματος και 1 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μεθανολικού διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 0,2 mM . Συνολικά παρασκευάστηκαν οκτώ τέτοια διαλύματα με συγκεντρώσεις 0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 και 1,0 mg/mL . Έπειτα, ακολούθησε έντονη ανάδευση του κάθε διαλύματος και τα διαλύματα αφέθηκαν σε ηρεμία, στο σκοτάδι, για 30 λεπτά μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 517 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis (Shimadzu, UV-1700). Η εκατοστιαία τιμή απόσβεσης ($I\%$) της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 3.1 και όπου A_{control} η απορρόφηση του τυφλού δείγματος και A_{sample} η απορρόφηση του εκχυλίσματος.

$$I\% = 100 \times \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \quad (\text{Εξίσωση 3.1})$$

Η TAC των εκχυλισμάτων εκφράστηκε μέσω της τιμής EC_{50} , η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH κατά το ήμισυ. Επομένως, όσο μικρότερη βρέθηκε να είναι η τιμή EC_{50} για το κάθε δείγμα, τόσο ισχυρότερη ήταν η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Οι τιμές EC_{50}

υπολογίστηκαν κατόπιν κατασκευής των σιγμοειδών καμπυλών δόσης–απόκρισης (Σχήμα 3.2), με τις τιμές του λογαρίθμου των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων να συνθέτουν τον άξονα Χ και τις αντίστοιχες εκατοστιαίες τιμές απόσβεσης ($I\%$) της ελεύθερης ρίζας DPPH, τον άξονα Υ.



Σχήμα 3.2. Ενδεικτική σιγμοειδής καμπύλη για τον υπολογισμό της τιμής EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος).

Η εξίσωση 3.2 περιγράφει τις σιγμοειδείς καμπύλες δόσης–απόκρισης και μέσω αυτής υπολογίστηκαν οι τιμές EC_{50} , όπου, A_1 , η κάτω ασύμπτωτη ευθεία της καμπύλης, A_2 , η πάνω ασύμπτωτη ευθεία της καμπύλης, p , η κλίση της καμπύλης και, x_0 , η συγκέντρωση στο κέντρο της καμπύλης (σημείο καμπής) που αντιστοιχεί στην τιμή EC_{50} . Η κατασκευή των σιγμοειδών καμπυλών και ο υπολογισμός των τιμών EC_{50} έγινε με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος OriginPro 2020.

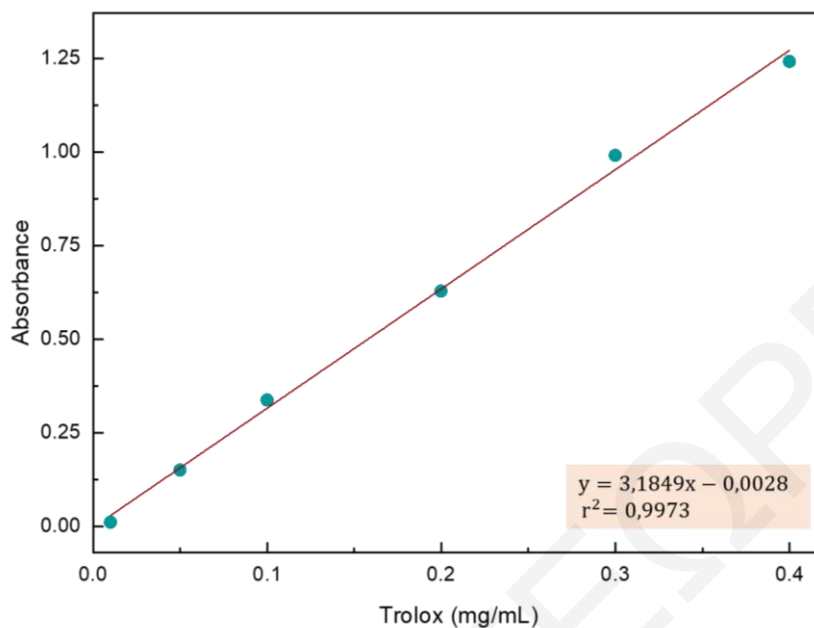
$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (\text{Εξίσωση 3.2})$$

Οι τιμές EC_{50} εκφράστηκαν ως μg αντιοξειδωτικού ανά mL εκχυλίσματος ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος). Η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε κατ' επανάληψη τρεις φορές για το κάθε δείγμα και λήφθηκαν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις.

3.6. Προσδιορισμός της TAC των εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού με τη μέθοδο FRAP

Η TAC των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο FRAP, όπως αυτή περιγράφεται από τους Vitali Čepo *et al.*, εφαρμόζοντας ορισμένες τροποποιήσεις.¹⁰³ Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε το

αντιδραστήριο Trolox και τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 και 0,4 mg/mL (Σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3. Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της μεθόδου FRAP με πρότυπα διαλύματα Trolox.

Έπειτα, παρασκευάστηκαν 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος με διάλυση 0,31 g οξικού νατρίου και προσθήκη 1,6 mL παγόμορφου οξικού οξέος. Το ρυθμιστικό διάλυμα κρατήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι τη χρήση του. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 40 mM με κατάλληλη αραίωση του πυκνού διαλύματος HCl συγκέντρωσης 37% (w/v) και το διάλυμα 2,4,6-τρι(2-πυριδυλο)-1,3,5-τριαζίνης (TPTZ) με διάλυση 0,03 g στερεού TPTZ σε 10 mL διαλύματος HCl 40 mM. Το διάλυμα TPTZ κρατήθηκε στο σκοτάδι μέχρι την αξιοποίησή του. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν 10 mL διαλύματος χλωριούχου σιδήρου (III) (FeCl₃) με διάλυση 0,03 g στερεού FeCl₃. Τα διαλύματα TPTZ και FeCl₃ παρασκευάστηκαν κατά την ημέρα εκτέλεσης του πειράματος ώστε να χρησιμοποιηθούν φρέσκα. Για την παρασκευή του διαλύματος FRAP πραγματοποιήθηκε ανάμιξη ενός όγκου διαλύματος TPTZ με ένα όγκο διαλύματος FeCl₃ και δέκα όγκους ρυθμιστικού διαλύματος. Το προκύπτον διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο, στους 37 °C για 5 λεπτά, απουσία ακτινοβολίας. Τέλος για τις μετρήσεις απορρόφησης αναμείχθηκαν 30 μL πρότυπου διαλύματος Trolox ή εκχυλίσματος χαρουπιού συγκέντρωσης 1 mg/mL ή απεσταγμένου νερού για την παρασκευή του τυφλού δείγματος, 90 μL απεσταγμένου νερού και 900 μL διαλύματος FRAP. Έπειτα, ακολούθησε έντονη ανάδευση του διαλύματος και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία, στο σκοτάδι, για 30 λεπτά, μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, μετρήθηκε η

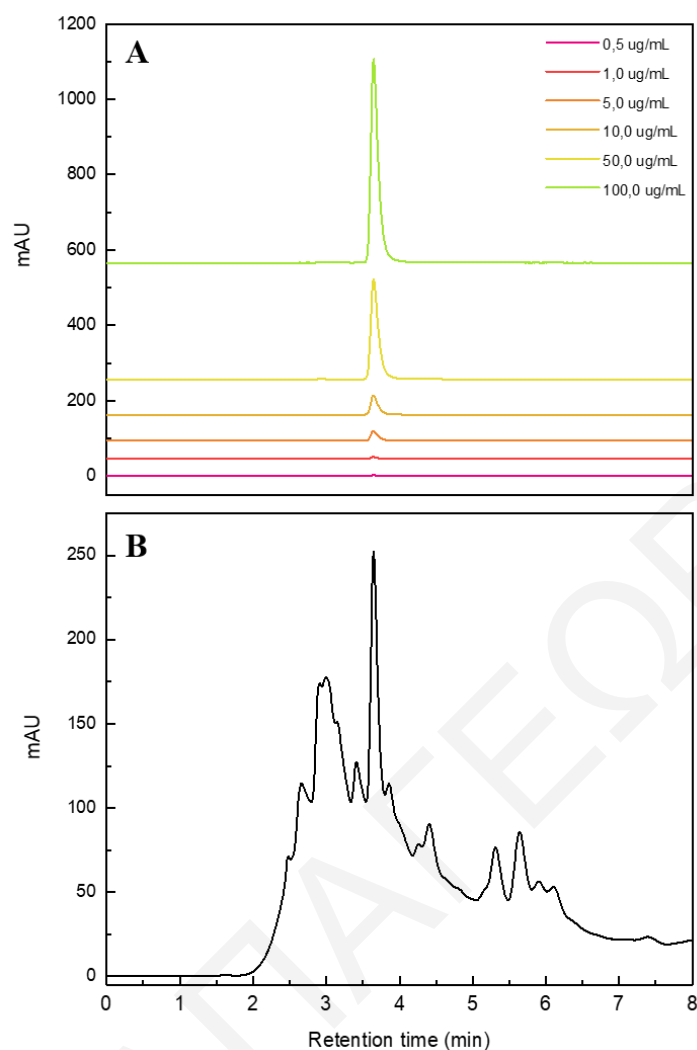
απορρόφηση του δείγματος στα 596 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis (Shimadzu, UV-1700) και υπόβαθρο το σήμα του τυφλού δείγματος. Η TAC των εκχυλισμάτων εκφράστηκε ως mg ισοδύναμων Trolox ανά g εκχυλίσματος (mg TE/g εκχυλίσματος). Η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε κατ' επανάληψη τρεις φορές για το κάθε δείγμα και λήφθηκαν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις.

3.7. Προσδιορισμός γαλλικού οξέος σε εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού με την τεχνική RP-HPLC

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του γαλλικού οξέος παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος εύρους συγκεντρώσεων 0,5–100,0 µg/mL. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν κατόπιν διαδοχικών αραιώσεων πυκνού διαλύματος γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 400,0 µg/mL. Αναλυτικά, τα πρότυπα διαλύματα είχαν όγκο 1 mL και συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 50,0 και 100,0 µg/mL. Για την κάθε συγκέντρωση λήφθηκε το αντίστοιχο χρωματογράφημα εις τριπλούν.

Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση του γαλλικού οξέος στα εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού εφαρμόστηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, όπως περιγράφεται από τους Grigoriou *et al.*, με ελάχιστες τροποποιήσεις.¹⁰⁰ Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας Thermo Scientific-Dionex Ultimate 3000, εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη Agilent TC-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm), θερμοστατούμενη στους 25 °C και προστήλη TC-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). Εφαρμόστηκε ισοκρατική έκλουση με μίγμα διαλυτών κινητής φάσης 70:25:5 H₂O(1% v/v AcOH):MeOH:ACN και ροή 0,7 mL/min. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 10 µL και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 280 nm.

Για τον σκοπό της ανάλυσης παρασκευάστηκε διάλυμα του κάθε εκχυλίσματος με συγκέντρωση 0,01 g/mL. Τόσο τα πρότυπα διαλύματα, όσο και τα διαλύματα των εκχυλισμάτων, πριν από την έγχυσή τους στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας, φιλτραρίστηκαν με χρήση φίλτρου σύριγγας με πορωτικό υλικό διαμέτρου 0,2 µm. Για το κάθε διάλυμα λήφθηκαν διαδοχικά τρία χρωματογραφήματα. Ο εντοπισμός του γαλλικού οξέος στα εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού έγινε κατόπιν σύγκρισης του χρόνου κατακράτησης του γαλλικού οξέος ($R_t=3,6$ λεπτά) και ταυτοποίησης των φασμάτων απορρόφησης UV-Vis των αντίστοιχων κορυφών στα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4. Χρωματογράφημα **A** των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και **B** του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (απουσία σακχάρων). Η ταυτοποίηση της κορυφής του γαλλικού οξέος στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος έγινε με βάση τον χρόνο κατακράτησης ($R_t=3,6$ λεπτά).

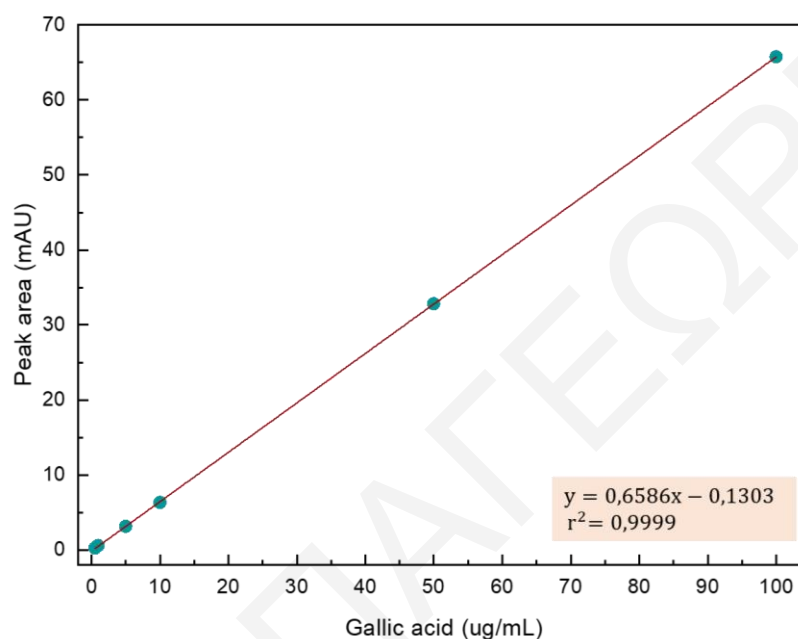
Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης και του εμβαδού της κορυφής των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος, το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ). Τα αποτελέσματα της στατιστικής αξιολόγησης της μεθόδου συνοψίζονται στον πίνακα 3.1.

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) της καμπύλης βαθμονόμησης, που κατασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,5 μέχρι 100,0 µg/mL (Σχήμα 3.5). Μέσω του υπολογισμού του συντελεστή προσδιορισμού εξετάστηκε η συσχέτιση της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και του αντίστοιχου υπολογιζόμενου εμβαδού της κάθε κορυφής. Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού

βρέθηκε σχεδόν ίση με τη μονάδα, υποδηλώνοντας την εξαιρετικά καλή γραμμικότητα της μεθόδου.

Πίνακας 3.1. Μέτρα αξιολόγησης της χρωματογραφικής μεθόδου.

	Εξίσωση Καμπύλης Βαθμονόμησης	r^2	RSD _(time) (%)	RSD _(area) (%)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Γαλλικό οξύ	$y = 0,6586x - 0,1303$	0,9999	0,07	0,27	0,41	1,26



Σχήμα 3.5. Καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με RP-HPLC.

Η επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης υπολογίστηκε με βάση τις τιμές των πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και πιο συγκεκριμένα για τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εντός της ίδιας ημέρας. Η επαναληψιμότητα εκφράστηκε με τη χρήση της τιμής της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation, RSD), η οποία βρέθηκε ίση με 0,07% και χαρακτηρίστηκε ως αρκετά καλή, καθώς ήταν πολύ μικρότερη της μονάδας. Επιπλέον, υπολογίστηκε η τιμή RSD (%) με βάση το εμβαδόν των κορυφών πρότυπου διαλύματος, επίσης για τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις που έγιναν εντός της ίδιας ημέρας και βρέθηκε ίση με 0,27%. Τέλος, το LOD και το LOQ υπολογίστηκαν με βάση το τυπικό σφάλμα της αναλυτικής μεθόδου και βρέθηκαν ίσα με 0,41 και 1,26 μg/mL, αντίστοιχα.

3.8. Φασματοσκοπία FTIR

Τα φάσματα FTIR των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού και των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων καταγράφηκαν σε φασματόμετρο FTIR Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany), εφοδιασμένο με IRE κρύσταλλο ZnSe ATR μονής ανάκλασης (Pike Technologies, Madison WI, USA) και ανιχνευτή DTGS (Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Για τη λήψη των φασμάτων, μικρή ποσότητα του κάθε στερεού δείγματος τοποθετείτο στο IRE και με τη βοήθεια ειδικού εξαρτήματος πίεσης (*pressure clamp*) εξασκείτο πίεση σε αυτό με στόχο τη βέλτιστη επαφή του με τον κρύσταλλο. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε εύρος συχνοτήτων μεταξύ 4000 και 400 cm^{-1} , με διακριτική ικανότητα 4 cm^{-1} . Το κάθε φάσμα υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος 64 επαναλαμβανόμενων σαρώσεων (*scans*). Της λήψης των φασμάτων προηγήθηκε η σάρωση του υποβάθρου. Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν τουλάχιστον τρία διαφορετικά φάσματα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε επιμέρους δείγματα του αρχικού. Έπειτα, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των ληφθέντων φασμάτων και το προκύπτον φάσμα κρίθηκε αντιπροσωπευτικό του αρχικού δείγματος. Τέλος, στοχεύοντας στη μελέτη της επίδρασης των μεθόδων προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων PLSR εφαρμόστηκαν ξεχωριστά τρεις διαφορετικές μέθοδοι προεπεξεργασίας. Συγκεκριμένα, έγινε κανονικοποίηση των φασμάτων με τη μέθοδο *Offset correction* και υπολογίστηκαν η πρώτη παράγωγος με χρήση πέντε *smoothing points* και η δεύτερη παράγωγος με χρήση εννέα *smoothing points*. Για την καταγραφή και την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα OPUS 7.0.

Τα κονιοποιημένα δείγματα σκόνης χαρουπιού πριν την ανάλυσή τους, τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε λυοφιλωτή (LyoDry Compact Benchtop Freeze Dryer), για απομάκρυνση της υγρασίας και αποφυγή εμφάνισης παρεμποδιστικών σημάτων στα φάσματα. Έπειτα, τα δείγματα κοσκινίστηκαν σε κόσκινο των 250 μm με στόχο την ομοιομορφία του μεγέθους των σωματιδίων τους και τη βέλτιστη επαφή τους με το IRE, επιτυγχάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη λήψη ποιοτικότερης φασματικής πληροφορίας. Το υλικό που συγκρατήθηκε στο κόσκινο απομακρύνθηκε, ενώ το υλικό που διήλθε συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε ξηρό περιβάλλον μέχρι την ανάλυσή του. Ο συνολικός χρόνος φύλαξης των δειγμάτων δεν ξεπερνούσε τη μια ημέρα.

3.9. Στατιστική και χημειομετρική ανάλυση

Τα αποτελέσματα για την κάθε μέθοδο αναφοράς εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών επαναληπτικών μετρήσεων ($N=3$) με τη βοήθεια του υπολογιστικού

προγράμματος MS Excel, εκτός των περιπτώσεων που αξιοποιήθηκαν μόνο δύο επαναληπτικές μετρήσεις ($N=2$), καθώς μια εξ αυτών βρέθηκε να αποκλίνει σημαντικά. Για τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθόδους, υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης (r) Pearson, με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος OriginPro 2020. Τα φασματικά δεδομένα που προέκυψαν από την καταγραφή των φασμάτων FTIR των δειγμάτων μετατράπηκαν σε αριθμητικά δεδομένα μέσω του προγράμματος OPUS 7.0 και έπειτα βάσει των αντιστοιχίσεων τους με τις τιμές αναφοράς του κάθε δείγματος κατασκευάστηκαν οι βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων εισήχθησαν στο λογισμικό πρόγραμμα OriginPro 2020 με στόχο την κατασκευή των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η γραμμική συσχέτιση των φασματικών δεδομένων και των τιμών αναφοράς.

Για τον έλεγχο των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού και των αντίστοιχων πολυφαινολικών εκχυλίσμάτων, παρουσία και απουσία σακχάρων, και του αντίκτυπου που έχουν στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων, κατασκευάστηκαν συνολικά δώδεκα μοντέλα PLSR, αξιοποιώντας την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800-800\text{ cm}^{-1}$) και τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τις φωτομετρικές μεθόδους Folin-Ciocalteu (mg GAE/g εκχυλίσματος), απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (EC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος) και FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος) και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg GA/g εκχυλίσματος). Για σκοπούς αξιολόγησης της συσχέτισης των τιμών αναφοράς που προέκυψαν από τις τέσσερις διαφορετικές μεθόδους και των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλίσμάτων (απουσία σακχάρων) στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800-800\text{ cm}^{-1}$), κατασκευάστηκαν συνολικά τέσσερα μοντέλα PLSR. Για έλεγχο της επιρροής που έχει η περιοχή του φάσματος στην τελική προγνωστική ικανότητα των μοντέλων κατασκευάστηκαν συνολικά έξι μοντέλα PLSR αξιοποιώντας σαν τιμή αναφοράς την τιμή της TPC εκφραζόμενη σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού και τις περιοχές ολόκληρου του MIR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800-800\text{ cm}^{-1}$) και τις υποπεριοχές $\sim 3585-2810$ και $\sim 1711-912\text{ cm}^{-1}$, ξεχωριστά. Τέλος για έλεγχο της μεθόδου προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων FTIR και του αντίκτυπου που έχει στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων, κατασκευάστηκαν συνολικά οκτώ μοντέλα PLSR αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από επεξεργασμένα και μη φάσματα FTIR στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800-800\text{ cm}^{-1}$) και τις τιμές αναφοράς της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού. Στις μεθόδους προεπεξεργασίας που εξετάστηκαν συγκαταλέγεται η κανονικοποίηση των φασμάτων με εφαρμογή της μεθόδου *Offset*

correction και η παραγωγοποίηση τους με εφαρμογή της πρώτης και της δεύτερης παραγώγου.

Για την προσαρμογή και την αξιολόγηση των μοντέλων έγινε τυχαιοποίηση του συνολικού αριθμού δειγμάτων και διαχωρισμός τους στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ EV, σε αναλογία 70:30. Κάθε μοντέλο PLSR αξιολογήθηκε με τη χρήση των στατιστικών παραμέτρων r^2_{CAL} , RMSEC, r^2_{PRED} και RMSEP. Στα πλαίσια εσωτερικής αξιολόγησης της προγνωστικής ικανότητας των μοντέλων εφαρμόστηκε η διαδικασία CV και πιο συγκεκριμένα η τεχνική *leave-one-out* CV, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο βέλτιστος αριθμός LVs που ήταν ικανός να περιγράψει τη μέγιστη διακύμανση για τις βάσεις δεδομένων X και Y και αντιστοιχούσε στην ελάχιστη τιμή RMPRESS (Root Mean Predicted Residual Error Sum of Squares, RMPRESS). Για αποφυγή υπερπροσαρμογής (*overfitting*) των δεδομένων, τα μοντέλα που χαρακτηρίστηκαν ως καλύτερα αξιοποίησαν εννέα ή λιγότερες LVs, ενώ για την επιλογή των βέλτιστων μοντέλων οι συντελεστές προσδιορισμού, r^2_{CAL} και r^2_{PRED} , βρέθηκαν ίσοι ή μεγαλύτεροι από την τιμή 0,8 και συνοδεύονταν από χαμηλές τιμές για τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP.

Κεφάλαιο 4 | Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1. Μέθοδοι αναφοράς

Με στόχο την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για πρόβλεψη της TPC, της TAC και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος σε άγνωστα δείγματα σκόνης χαρουπιού, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των προαναφερόμενων παραμέτρων με εφαρμογή συμβατικών αναλυτικών μεθόδων, ώστε να επιτευχθεί εν τέλει η επιθυμητή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών αναφοράς και των προβλεπόμενων τιμών που υπολογίζονται μέσω ενός μοντέλου PLSR αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των δειγμάτων. Ο προσδιορισμός της TPC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ για την TAC εφαρμόστηκαν οι δοκιμές DPPH και FRAP. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος επιτεύχθηκε με χρωματογραφικό διαχωρισμό (RP-HPLC) των εκχυλισμάτων και ποσοτικοποίηση του μονομερούς, το οποίο σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές αποτελεί το κυρίαρχο πολυφαινολικό συστατικό στη σάρκα.^{100,104}

Οι τιμές αναφοράς εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών επαναληπτικών μετρήσεων ($N=3$). Μέσω των τιμών αυτών φανερώθηκε η σημαντική περιεκτικότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικά συστατικά, με κυρίαρχη την παρουσία και την δράση των πολυφαινολικών στοιχείων. Το μεγάλο εύρος των τιμών αναφοράς επιβεβαιώνει τη διαφοροποιημένη σύσταση της πρώτης ύλης, η οποία πιθανόν να αποτελεί επακόλουθο γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως θα σχολιαστεί σε επόμενη ενότητα.

Οι τιμές για την TPC των δειγμάτων κυμαίνονταν μεταξύ 42,9 και 202,2 mg GAE/g εκχυλίσματος, με μέσο όρο $112,5 \pm 35,9$ mg GAE/g εκχυλίσματος. Η TAC εκφράστηκε με τη χρήση της τιμής EC_{50} , η οποία αναφέρεται στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που επιτυγχάνει την απόσβεση της ελεύθερης ρίζας DPPH κατά το ήμισυ. Για τα δείγματα που εξετάστηκαν, οι τιμές EC_{50} κυμαίνονταν μεταξύ 10,0 και 100,3 $\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος, με μέσο όρο $28,2 \pm 22,8$ $\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος. Επιπλέον, η TAC μελετήθηκε και με τη μέθοδο FRAP, με τα αποτελέσματα της μεθόδου να κυμαίνονται μεταξύ 76,9 και 379,3 mg TE/g εκχυλίσματος, με μέσο όρο $243,3 \pm 90,4$ mg TE/g εκχυλίσματος. Τέλος, η συγκέντρωση γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα κυμάνθηκε μεταξύ 271,5 και 9091,5 $\mu\text{g GA/g}$ εκχυλίσματος, με μέσο όρο $2503,6 \pm 1520,5$ $\mu\text{g GA/g}$ εκχυλίσματος (Πίνακας 4.1). Οι τιμές αναφοράς, όπως προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι σε ορισμένες περιπτώσεις σύμφωνες με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας, ενώ σε άλλες η σύγκρισή τους γίνεται δύσκολη εξαιτίας της διαφορετικής προέλευσης των δειγμάτων και του διαφορετικού τρόπου έκφρασης των αποτελεσμάτων.^{100,105}

Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται σε αντιπαράβολή οι τιμές αναφοράς, ως ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών επαναληπτικών μετρήσεων ($N=3$), που προέκυψαν από τις διαφορετικές συμβατικές αναλυτικές μεθόδους για το κάθε δείγμα. Ωστόσο, δεν είναι εύκολο να γίνει σύγκριση ή να εντοπιστεί ένα σταθερό μοτίβο το οποίο να αναδεικνύει τη μεταξύ τους σχέση, αφού οι συνθήκες αντίδρασης, ο μηχανισμός αντίδρασης αντιδραστηρίου–αντιοξειδωτικής ένωσης και η εκλεκτικότητα της κάθε μεθόδου διαφέρουν σημαντικά.

Πίνακας 4.1. Σύγκριση των τιμών αναφοράς που προέκυψαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, FRAP και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων) για τον συνολικό αριθμό δειγμάτων που αξιοποιήθηκαν κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR.

Παράμετρος	N ^a	Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση	Εύρος τιμών
Folin-Ciocalteu (TPC) (mg GAE/g εκχυλίσματος)	51	112,5 \pm 35,9	42,9–202,2
DPPH (EC₅₀) (μg/mL εκχυλίσματος)	51	28,2 \pm 22,8	10,0–100,3
FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος)	32	243,3 \pm 90,4	76,9–379,3
Γαλλικό οξύ (μg GA/g εκχυλίσματος)	49	2503,6 \pm 1520,5	271,5–9091,5

^a Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 4.2. Τιμές αναφοράς (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) τριών επαναληπτικών μετρήσεων ($N=3$) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) που αξιοποιήθηκαν κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR.

A/A	Folin-Ciocalteu (TPC) (mg GAE/g εκχυλίσματος)	DPPH (EC ₅₀) (μg/mL εκχυλίσματος)	FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος)	Γαλλικό οξύ (μg GA/g εκχυλίσματος)
1	160,3 \pm 4,8 ^a	13,5 \pm 0,6	NQ	2925,7 \pm 3,7
2	156,2 \pm 9,7	10,4 \pm 0,9	NQ	2032,6 \pm 11,9
3	133,7 \pm 1,6 ^a	14,1 \pm 1,7	379,3 \pm 6,4	3499,4 \pm 7,9
4	112,0 \pm 11,9 ^a	19,7 \pm 4,6	295,6 \pm 7,1	1420,3 \pm 10,0
5	126,1 \pm 0,8	13,9 \pm 3,9	353,9 \pm 2,9	2589,8 \pm 9,4
6	92,4 \pm 3,9	20,0 \pm 0,1 ^a	262,2 \pm 7,8	2133,8 \pm 8,5
7	94,4 \pm 4,3	24,8 \pm 5,3	266,6 \pm 8,1 ^a	1811,7 \pm 14,2
8	82,6 \pm 5,0	42,9 \pm 8,9 ^a	203,6 \pm 5,3 ^a	1280,3 \pm 12,1
9	135,9 \pm 6,9	14,9 \pm 1,2	356,0 \pm 11,1	2685,2 \pm 9,5
10	50,0 \pm 2,0	62,4 \pm 4,4	160,5 \pm 8,8 ^a	1707,1 \pm 10,4
11	44,4 \pm 2,8	85,2 \pm 3,4	108,8 \pm 10,3 ^a	2007,1 \pm 13,8
12	80,5 \pm 5,4	40,8 \pm 6,9	202,6 \pm 16,3 ^a	1312,1 \pm 7,0
13	84,3 \pm 0,8	54,2 \pm 1,6	163,3 \pm 7,9 ^a	1290,5 \pm 8,9
14	61,9 \pm 3,5	100,3 \pm 9,2 ^a	164,2 \pm 0,9 ^a	1785,0 \pm 4,4
15	81,1 \pm 2,9	59,3 \pm 8,3	170,5 \pm 13,1 ^a	2067,6 \pm 3,4
16	90,2 \pm 2,8	47,3 \pm 3,6	205,6 \pm 5,7 ^a	1428,4 \pm 6,3
17	42,9 \pm 0,5 ^a	77,2 \pm 20,0 ^a	76,9 \pm 14,1 ^a	3396,4 \pm 9,6
18	63,1 \pm 11,3 ^a	70,2 \pm 9,6	122,6 \pm 17,2 ^a	1722,6 \pm 7,2
19	66,1 \pm 14,9	66,1 \pm 8,4	115,5 \pm 6,6 ^a	1456,6 \pm 8,8
20	77,9 \pm 11,9 ^a	50,5 \pm 8,8	153,8 \pm 9,0 ^a	1401,8 \pm 3,3

21	105,3 ± 13,1 ^a	45,6 ± 6,6	206,4 ± 4,6 ^a	1527,9 ± 2,8
22	151,4 ± 7,7	13,0 ± 2,0	128,8 ± 4,8 ^a	9091,5 ± 0,7
23	48,8 ± 1,9	48,8 ± 7,1	232,8 ± 13,4 ^a	1727,1 ± 6,7
24	72,5 ± 3,3	44,0 ± 8,4	226,2 ± 30,9 ^a	1672,2 ± 3,2
25	87,6 ± 1,5	23,9 ± 4,7	NQ	2804,7 ± 7,3
26	126,0 ± 4,3	17,5 ± 6,5	308,7 ± 0,2 ^a	2264,0 ± 3,3
27	99,7 ± 2,3	27,7 ± 3,1	233,4 ± 1,2 ^a	2660,1 ± 4,3
28	202,2 ± 1,7 ^a	11,7 ± 1,6	NQ	1914,2 ± 1,5
29	124,8 ± 6,7	15,4 ± 0,9	315,5 ± 4,3	2620,2 ± 3,3
30	156,1 ± 3,8 ^a	14,5 ± 1,3	NQ	2642,0 ± 6,3
31	99,8 ± 0,0 ^a	16,9 ± 0,9	348,4 ± 8,7 ^a	2334,2 ± 16,5
32	128,7 ± 1,0 ^a	15,1 ± 3,3	NQ	8529,0 ± 33,7
33	121,3 ± 5,0 ^a	12,4 ± 2,8	NQ	1839,9 ± 7,5
34	144,3 ± 4,3 ^a	11,4 ± 1,6	NQ	2248,1 ± 6,7
35	140,4 ± 6,0 ^a	13,4 ± 0,5	NQ	4648,1 ± 13,8
36	124,0 ± 12,4	11,0 ± 1,7	NQ	2195,0 ± 23,0
37	127,6 ± 7,3 ^a	11,2 ± 1,8	NQ	2715,4 ± 22,8
38	135,1 ± 2,1 ^a	11,6 ± 0,5	NQ	2209,6 ± 4,2
39	106,6 ± 11,6 ^a	16,6 ± 2,2	348,7 ± 2,9 ^a	271,5 ± 2,3
40	99,1 ± 9,1 ^a	19,9 ± 1,2	332,8 ± 16,1	1524,4 ± 9,6
41	154,0 ± 4,5	11,7 ± 2,4	NQ	1695,7 ± 14,4
42	158,8 ± 3,5 ^a	10,0 ± 2,8	NQ	4056,0 ± 14,7
43	159,2 ± 4,5	11,9 ± 1,7	NQ	2260,1 ± 14,4
44	133,6 ± 2,7	11,6 ± 1,2	NQ	3085,8 ± 12,5
45	154,1 ± 3,5	12,2 ± 0,8	NQ	3031,9 ± 7,5
46	113,0 ± 5,0	14,6 ± 3,5	341,2 ± 4,2 ^a	2143,6 ± 27,9
47	143,9 ± 2,0	11,6 ± 0,5	NQ	3840,7 ± 6,0
48	137,8 ± 5,9	14,7 ± 1,3	362,2 ± 15,5	3775,1 ± 12,5
49	91,1 ± 4,6	17,3 ± 0,3 ^a	285,0 ± 4,6 ^a	2068,0 ± 11,8
50	131,9 ± 3,5	13,9 ± 2,0	353,3 ± 19,0	2300,9 ± 9,6
51	124,9 ± 3,0	17,6 ± 4,6	NQ	2033,8 ± 11,0

^a Αριθμός επαναληπτικών μετρήσεων (N=2)

Με βάση τον μηχανισμό αντίδρασης αντιδραστηρίου–αντιοξειδωτικής ένωσης, οι μέθοδοι διαχωρίζονται σε αυτές στις οποίες η απόσβεση των ελευθέρων ριζών γίνεται μέσω μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) και σε αυτές στις οποίες η απόσβεση συντελείται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου (ET). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι Folin-Ciocalteu και FRAP, ενώ η μέθοδος απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH πιστεύεται ότι προχωρά μέσω ενός παράλληλου μηχανισμού HAT και ET. Εκτός των διαφορετικών μηχανισμών αντίδρασης, η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων έγκειται στη διαφορετική δομή και δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων αναλόγως των συνθηκών αντίδρασης. Η δομή και συνεπώς η αντιοξειδωτική ικανότητα των ουσιών επηρεάζονται σημαντικά από την θερμοκρασία και το pH, ενώ εξίσου σημαντικός θεωρείται και ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, καθώς σε αυτόν εκδηλώνεται ή όχι, η αντιοξειδωτική δράση υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών ενώσεων.¹⁰⁶

Στοχεύοντας στη διευκρίνιση της σχέσης μεταξύ των τιμών αναφοράς που προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθόδους υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης Pearson (r), οι οποίοι φαίνονται στον πίνακα 4.3 και φανερώσουν τη γραμμική ή μη σχέση μεταξύ τους. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) που υπολογίστηκε για τις τιμές της TPC και τις τιμές EC_{50} , βρέθηκε ίσος με $-0,83$ υπογραμμίζοντας την ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο. Η αρνητική τιμή ανταποκρίνεται στην αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της TPC και της τιμής EC_{50} , υποδηλώνοντας ότι όσο αυξάνεται η TPC ενός εκχυλίσματος, τόσο μειώνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την απόσβεση της ελεύθερης ρίζας DPPH κατά το ήμισυ. Κατ' αυτόν τον τρόπο φανερώνεται η κυρίαρχη συνεισφορά των πολυφαινολικών στοιχείων στην TAC των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων.

Πίνακας 4.3. Συσχέτιση Pearson (r) των τιμών αναφοράς της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος), της TAC εκφραζόμενης με την τιμή EC_{50} (μg/mL εκχυλίσματος) ή μέσω της μεθόδου FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος) και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (μg GA/g εκχυλίσματος).

	TPC	EC_{50}	FRAP	GA
TPC	1	-0,83	-0,40	0,35
EC_{50}		1	0,18	-0,29
FRAP			1	-0,20
GA				1

Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης που αναγράφονται με έντονη γραφή (**bold**) είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$).

Αντίθετα, εντοπίστηκε ασθενής συσχέτιση μεταξύ των τιμών της TPC και των τιμών που αναφέρονται στη TAC των εκχυλισμάτων, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP. Η έλλειψη ισχυρής συσχέτισης πιθανόν να οφείλεται στη μικρή εκλεκτικότητα της μεθόδου FRAP, αφού ουσίες με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό μπορούν δυνητικά να προκαλέσουν αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου και να συνεισφέρουν στα τελικά αποτελέσματα της δοκιμής.⁷⁴ Επιπλέον, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης, δηλαδή το χαμηλό pH, είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική δράση ορισμένων συστατικών, καθώς δυσχεραίνεται ο ιονισμός τους ο οποίος οδηγεί εν τέλει στη μεταφορά ηλεκτρονίου και στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου στο σύμπλοκο Fe^{3+} -TPTZ.¹⁰⁶

Επίσης, ασθενής συσχέτιση βρέθηκε και μεταξύ των τιμών της TPC και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεισφορά και άλλων πολυφαινολικών συστατικών στην TPC των εκχυλισμάτων. Παρά την κυριαρχία του γαλλικού οξέος έναντι των υπόλοιπων μονομερών πολυφαινολικών ενώσεων στη σάρκα, δεν πρέπει να παραβλέπεται η συνεισφορά και των υπόλοιπων μονομερών πολυφαινολών ή των χημικά δεσμευμένων και συζευγμένων μορφών τους στη TPC των εκχυλισμάτων.

Η ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της TPC και των τιμών EC_{50} , που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, και η ασθενής

συσχέτιση μεταξύ των τιμών της TPC και της συγκέντρωσης μονομερών πολυφαινολικών ενώσεων, σχολιάστηκε επίσης για τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού από την ερευνητική ομάδα των Grigoriou *et al.*, στη μελέτη των οποίων αναφέρθηκαν αρκετά παρόμοια αποτελέσματα.¹⁰⁰ Η σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών που στοχεύουν στον προσδιορισμό και τη συσχέτιση των αντιοξειδωτικών παραμέτρων είναι αρκετά δύσκολη εξαιτίας της διαφορετικής σύστασης των τροφίμων και της διαφορετικής διαδικασίας εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων.

Ο διαφορετικός τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων, αλλά και ο διαφορετικός μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του αντιοξειδωτικού περιεχομένου, δηλαδή της TPC ή της συγκέντρωσης συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού συστατικού και της TAC μεταξύ των διαφορετικών συμβατικών μεθόδων, υπογραμμίζει την ανάγκη εφαρμογής πέραν της μιας μεθόδου για την απόκτηση μιας αντιπροσωπευτικής εικόνας της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων. Ωστόσο, κάτι τέτοιο είναι χρονοβόρο, κοστίζει και απαιτεί την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αντιδραστηρίων με αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον. Στο σημείο αυτό παρεμβαίνει η φασματοσκοπία FTIR προτάσσοντας τα προτερήματά της και παρέχοντας τη λύση για μια γρήγορη, φθηνή και συνάμα αξιόπιστη πρόβλεψη του αντιοξειδωτικού περιεχομένου (TPC και συγκέντρωσης μονομερών πολυφαινολικών ενώσεων) και της TAC, με εφαρμογή προγνωστικών μοντέλων PLSR.

4.2. FTIR χαρακτηρισμός σκόνης χαρουπιού και πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με στόχο την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR

Στοχεύοντας στον απευθείας προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας άγνωστων δειγμάτων σκόνης χαρουπιού, επιχειρήθηκε η συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC και της TAC, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τις δοκιμές DPPH και FRAP, και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος, με τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) της λυοφιλιωμένης πρώτης ύλης της σάρκας, μέσω ανάπτυξης μοντέλων PLSR. Απώτερος στόχος ήταν η αποφυγή των χρονοβόρων εργαστηριακών διαδικασιών εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων και των συμβατικών αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών παραμέτρων μετέπειτα.

Για την κατασκευή και την αξιολόγηση των μοντέλων έγινε τυχαιοποίηση του συνολικού αριθμού δειγμάτων και διαχωρισμός τους, στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ EV. Κάθε μοντέλο PLSR αξιολογήθηκε με τη χρήση των στατιστικών παραμέτρων r^2_{CAL} , RMSEC, r^2_{PRED} και RMSEP, ενώ η διαδικασία CV πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής

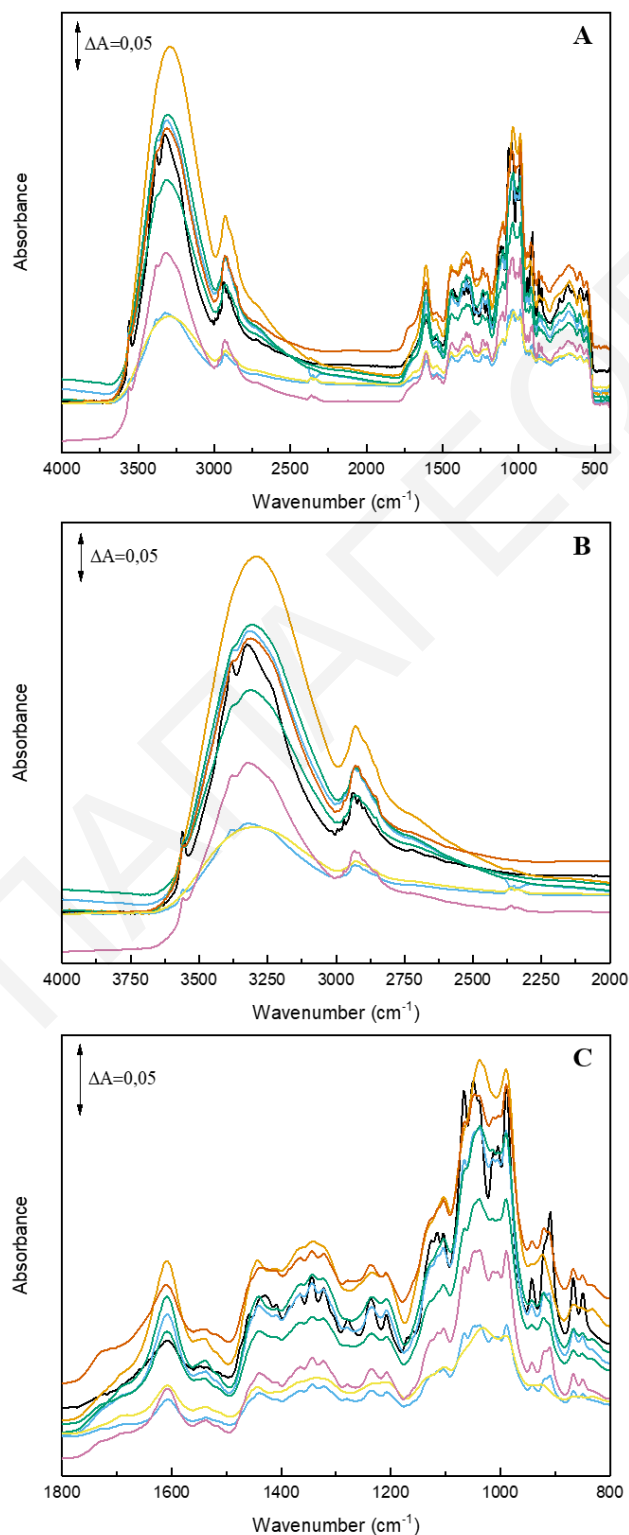
leave-one-out CV, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο βέλτιστος αριθμός LVs που ήταν ικανός να περιγράψει τη μέγιστη διακύμανση στις βάσεις δεδομένων X και Y και αντιστοιχούσε στην ελάχιστη τιμή RMPRESS. Κατόπιν προσαρμογής και αξιολόγησης των μοντέλων PLSR, κρίθηκε πως τα μοντέλα που βασίστηκαν στα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού δεν ήταν ικανά να προχωρήσουν σε πρόβλεψη των προσδιοριζόμενων παραμέτρων, καθώς μέσω της διαδικασίας CV δεν υπολογίστηκε αριθμός LVs που να μπορεί να περιγράψει τη διακύμανση στις βάσεις δεδομένων X και Y και συνεπώς να συσχετίσει γραμμικά τα δεδομένα που εμπεριέχονταν σε αυτές.

Η αποτυχία των προγνωστικών μοντέλων πιθανόν να οφείλεται στο μικρό ποσοστό που κατέχουν οι πολυφαινολικές ενώσεις (1,4–2,0%) στη συνολική σύσταση της σάρκας, με συνέπεια η χαμηλή τους συγκέντρωση να μην μπορεί να αποτυπωθεί ξεκάθαρα στα φάσματα FTIR μέσω χαρακτηριστικών κορυφών που αποδίδονται αποκλειστικά σε δονήσεις των λειτουργικών τους ομάδων. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη συσχέτισης μεταξύ των φασματικών χαρακτηριστικών και των τιμών αναφοράς των αντιοξειδωτικών παραμέτρων επιτυγχάνεται δύσκολα. Εικάζεται πως ομάδες ενώσεων που βρίσκονται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στη σάρκα του καρπού, όπως είναι παραδείγματος χάριν οι υδατάνθρακες (45–52%), μπορούν να καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό το φασματικό αποτύπωμα, επικαλύπτοντας κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις των λειτουργικών ομάδων των πολυφαινολικών μορίων.¹⁴

Για την κατανόηση της μη ικανοποιητικής προγνωστικής ικανότητας των μοντέλων PLSR, επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός των φασμάτων FTIR των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού. Στα φάσματα FTIR οι κορυφές απορρόφησης που εμπίπτουν στην περιοχή του MIR παρέχουν εκτεταμένες πληροφορίες για τη μοριακή δομή των ουσιών που εμπεριέχονται στα δείγματα. Ωστόσο, η απόλυτη ταυτοποίηση των συστατικών ουσιών είναι αρκετά δύσκολη έως και ακατόρθωτη, κυρίως όταν πρόκειται για μήτρες αρκετά πολύπλοκες όπως είναι αυτές των τροφίμων. Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα FTIR ορισμένων δειγμάτων σκόνης χαρουπιού που αξιοποιήθηκαν κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση των μοντέλων, εστιάζοντας στην περιοχή των 4000–2000 cm⁻¹ και στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυφαινολικών μορίων (1800–800 cm⁻¹).

Η πολυπλοκότητα των φασμάτων σκόνης χαρουπιού καταδεικνύει σαφέστατα τη σύνθετη χημική δομή της σάρκας. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα φάσματα των διαφορετικών δειγμάτων παρουσιάζονται αρκετά ετερογενή, με τις διαφοροποιήσεις να ανταποκρίνονται στη μεγάλη διακύμανση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών τους. Δεδομένου ότι η σύσταση του κάθε δείγματος αποτυπώνεται μοναδικά σε ένα φάσμα FTIR,

δημιουργώντας την εικόνα των συνεργειακών και των ανταγωνιστικών φαινομένων που συνυπάρχουν, μπορούν να εντοπιστούν επίσης μετατοπίσεις κορυφών λόγω αυξημένης αλληλεπίδρασης γειτονικών λειτουργικών ομάδων ή εξασθένησης των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.



Σχήμα 4.1. **A** Κανονικοποιημένα φάσματα FTIR δειγμάτων σκόνης χαρουπιού (4000–400 cm⁻¹), **B** μεγέθυνση της περιοχής 4000–2000 cm⁻¹ και **C** μεγέθυνση της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυφαινολικών μορίων (1800–800 cm⁻¹).

Οι κορυφές που αποδίδονται σε λειτουργικές ομάδες των υδατανθρακικών μορίων φαίνεται να κυριαρχούν στα φάσματα FTIR, επιφέροντας σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων εξαιτίας αφενός, της μεγάλης διακύμανσης που παρατηρείται στη συνολική περιεκτικότητά τους (45–52%) και αφετέρου, της διαφοροποιημένης σύστασης των επιμέρους μονοσακχαριτών/δισακχαριτών κ.λπ.^{14,107} Τέτοιες λειτουργικές ομάδες είναι οι υδροξυλομάδες, τα αιθερικά οξυγόνα των γλυκοσιδικών δεσμών και οι sp^3 C–H δεσμοί.

Αν και το ποσοστό των πολυφαινολικών ενώσεων στη σάρκα χαρουπιού είναι χαμηλό, πολυφαινολικά μόρια όπως είναι για παράδειγμα οι συμπυκνωμένες ταννίνες μπορούν να συνεισφέρουν στα φάσματα FTIR.¹⁰⁷ Τα πολυμερή αυτά μόρια αποτελούνται κυρίως από αρωματικά συστήματα, υδροξυλομάδες, αιθερικά οξυγόνα και sp^3 C. Σημαντική είναι επίσης και η συνεισφορά των υπόλοιπων συστατικών, όπως είναι ορισμένα αμινοξέα ή πεπτίδια, λιπαρά οξέα, κάποιες κυκλιτόλες και βιταμίνες. Χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις λειτουργικών ομάδων που απαντούν στα μόρια αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4. Συχνότητες δόνησης λειτουργικών ομάδων που απαντούν στα δείγματα σκόνης χαρουπιού.

Συχνότητα δόνησης (cm^{-1})	Λειτουργική ομάδα	Βιβλιογραφική αναφορά
~3300	Δόνηση τάσης O–H και N–H	Christou <i>et al.</i> ¹⁰⁸
~2930	Δόνηση τάσης sp^3 C–H	Venetsanou <i>et al.</i> ⁸²
~1730	Δόνηση τάσης C=O	
~1620	Δόνηση τάσης C=C–C αρωματικού δακτυλίου, C=N και C=C	Grigoriou <i>et al.</i> ¹⁰⁰
~1430	Δόνηση κάμψης $-CH_2-$	Christou <i>et al.</i> ¹⁰⁸
~1340	Δόνηση κάμψης $-CH_3$	Silva <i>et al.</i> ⁷⁴
~1235	Δόνηση τάσης C–OH	
~1107	Δόνηση τάσης C–OH	
~1040	Δόνηση τάσης C–OH και C–C	Jantasee <i>et al.</i> ⁷³
~990		
~915	Περιοχή ανωμερικού κέντρου	Kačuráková <i>et al.</i> ¹⁰⁹

Η ποικιλομορφία των φασματικών δεδομένων πιθανόν να συνδέεται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία του δέντρου, η περίοδος συγκομιδής των καρπών, οι γεωλογικές και οι κλιματολογικές συνθήκες ανάπτυξης, αλλά και ο τρόπος και η διάρκεια φύλαξης των δειγμάτων. Παράγοντες οι οποίοι καταπώς φαίνεται επηρεάζουν σημαντικά τη σύσταση των δειγμάτων, αναλογιζόμενοι ότι τα δείγματα είχαν συλλεγεί από διαφορετικές καλλιέργειες και διαφορετικές επαρχίες, μεταξύ διαφορετικών χρονικών περιόδων, ενώ είχαν αποθηκευτεί για διαφορετικό χρονικό διάστημα μέχρι την ανάλυσή τους.

Ο αντίκτυπος των γενετικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων στη σύσταση των καρπών επιβεβαιώνεται από διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές. Ερευνητικές ομάδες

εξέτασαν την επιρροή που έχει ο βαθμός ωρίμανσης των καρπών και η ποικιλία του δέντρου στην περιεκτικότητα των επιμέρους συστατικών. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα των Ben Othmen *et al.* εξέτασε τρία διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, συσχετίζοντάς τα με την περιεκτικότητα των κυρίαρχων σακχάρων, γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης, την TPC, το TFC και το περιεχόμενο των συμπυκνωμένων ταννινών, μελετώντας υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα.

Τα αποτελέσματα της έρευνας κατέδειξαν αύξηση στην περιεκτικότητα του δισακχαρίτη σακχαρόζης με την ωρίμανση του καρπού, ενώ ανέφεραν ανομοιόμορφη τάση για τους μονοσακχαρίτες, γλυκόζης και φρουκτόζης αναλόγως του χρησιμοποιούμενου διαλύτη εκχύλισης.¹¹⁰ Παρόμοια αποτελέσματα δημοσίευσε και η ερευνητική ομάδα των Vekari *et al.* σχολιάζοντας την πιθανή ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενζύμων που εμπλέκονται στον αναβολισμό ή τον καταβολισμό των υδατανθράκων.¹¹¹

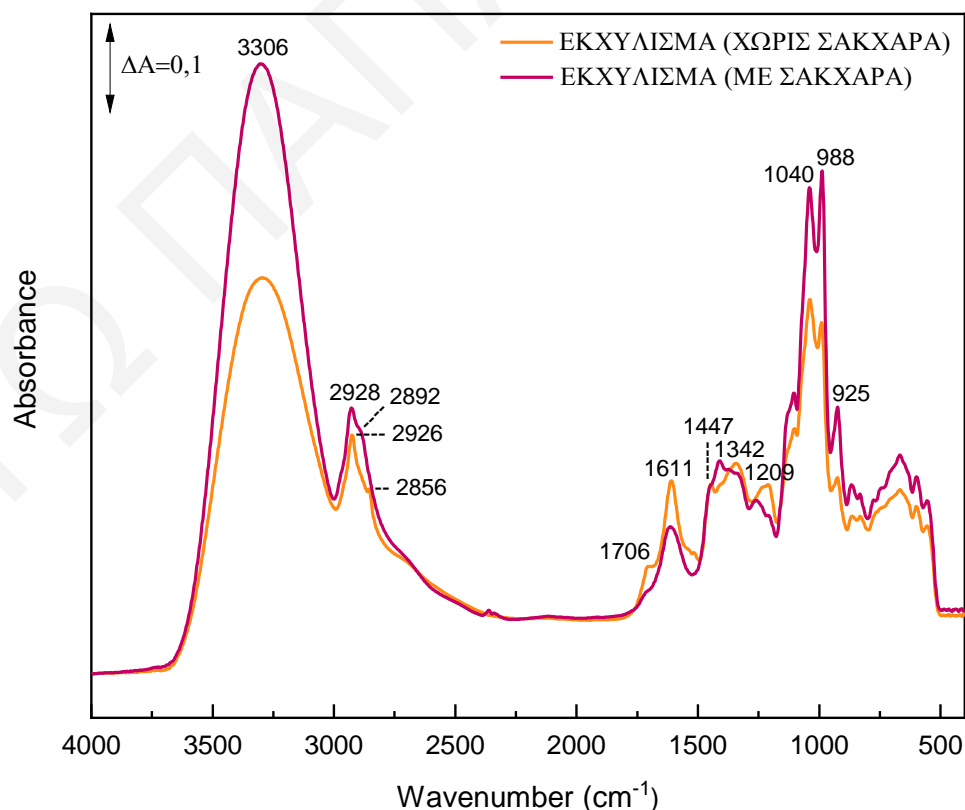
Οι ερευνητικές ομάδες ανέφεραν επίσης μειωμένες τιμές της TPC συγκρίνοντας τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης του καρπού, στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της καλοκαιρινής περιόδου, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε πολυμερισμό και συμπύκνωση των ταννινών.^{110,111} Καθοδική πορεία ανέφεραν επίσης οι Ben Othmen *et al.* για τις τιμές του TFC, ενώ παρατήρησαν μείωση και στο περιεχόμενο των συμπυκνωμένων ταννινών με τη μετάβαση του άγουρου καρπού σε σχεδόν ώριμο, κατά τις αρχές Ιουλίου.¹¹⁰

Επιπλέον, διερευνήθηκε από ορισμένες ομάδες και η επίδραση του γονότυπου (ποικιλίας) του δέντρου στην TPC. Οι Rodriguez-Solana *et al.* προχώρησαν σε σύγκριση των επικρατέστερων πορτογαλικών ποικιλιών AIDA, Mulata και Galhosa, ενώ οι Vekari *et al.* σχολίασαν τις αυξημένες τιμές υγρασίας και TPC για καρπούς προερχόμενους από άγριες χαρουπιές και αντίστοιχα μειωμένες τιμές περιεκτικότητας σε σάκχαρα, πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα.^{111,112} Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Papaefstathiou *et al.*, στην οποία γίνεται αναφορά στη σύσταση της σάρκας χαρουπιού των κυπριακών ποικιλιών Τηλλυρία, Κουμποτά και Κουντούρκα. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της έρευνας, η διακύμανση των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των διαφορετικών κυπριακών ποικιλιών δεν είναι μεγάλη, καθώς αναφέρονται ελάχιστες διαφορές στα ποσοστά υγρασίας, διαιτητικών ινών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων.¹¹

Συνδυαστικά λοιπόν με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, φαίνεται πως οι γενετικοί και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι ικανοί να διαφοροποιήσουν τη σύσταση των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού, η οποία αντικατοπτρίζεται έντονα μέσω της ετερογένειας των φασμάτων FTIR. Επομένως, η γραμμική συσχέτιση των φασματικών χαρακτηριστικών με

τις τιμές αναφοράς για την TPC και την TAC αποτυγχάνει κατά την προσαρμογή των προγνωστικών μοντέλων PLSR, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιτευχθεί ο απευθείας προσδιορισμός των τιμών αναφοράς μέσω της λήψης των φασμάτων FTIR της πρώτης ύλης και μόνο. Η διαδικασία εκχύλισης των πολυφαινολικών μορίων κρίνεται λοιπόν απαραίτητη και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Στο στάδιο αυτό, θα γίνει χαρακτηρισμός και σύγκριση των φασμάτων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία και απουσία σακχάρων.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η παρουσία σακχάρων στα δείγματα συνεισφέρει στα τελικά αποτελέσματα των μετρήσεων αναφοράς, επομένως κρίθηκε απαραίτητο να εξεταστούν εξίσου τα φασματικά δεδομένα των εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων), ώστε να διερευνηθεί κατά πόσο η συνεισφορά των σακχάρων επηρεάζει αναλογικά και τα δύο μονοπάτια, καθορίζοντας τη γραμμική σχέση μεταξύ τους και εν τέλει την αποτελεσματικότητα των προγνωστικών μοντέλων.¹¹³ Στο σχήμα 4.2 παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, του ίδιου δείγματος για την περιοχή των $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, όπως αυτά προέκυψαν με την πραγματοποίηση ή μη, του σταδίου της κρύας υδατικής εκχύλισης για απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων και στον πίνακα 4.5 φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που εντοπίζονται σε αυτά.



Σχήμα 4.2. Κανονικοποιημένα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία (κόκκινη γραμμή) και απουσία σακχάρων (πορτοκαλί γραμμή).

Πίνακας 4.5. Χαρακτηριστικές κορυφές που εντοπίζονται στα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία και απουσία σακχάρων.

Συχνότητα δόνησης (cm ⁻¹)		Λειτουργική ομάδα	Πιθανή προέλευση	Βιβλιογραφική αναφορά
Εκχύλισμα (παρουσία σακχάρων)	Εκχύλισμα (απουσία σακχάρων)			
3306	3300	Δόνηση τάσης O–H και N–H	Υδατάνθρακες, πολυφαινόλες, αμινοξέα (πρωτεΐνες)	Grigoriou <i>et al.</i> ¹⁰⁰
2928	2926	Δόνηση τάσης C–H	Υδατάνθρακες	
2892	2856			
	1706	Δόνηση τάσης C=O	Πολυφαινόλες, αμινοξέα (πρωτεΐνες)	Silva <i>et al.</i> ⁷⁴
1611	1611	Δόνηση τάσης C–C φαινολικού δακτυλίου, C=N και C=C	Πολυφαινόλες, αμινοξέα (πρωτεΐνες)	Lu <i>et al.</i> ⁷¹ Hu <i>et al.</i> ⁷⁹
1412	1447	Αντισυμμετρική εντός επιπέδου δόνηση κάμψης –CH ₃	Πολυφαινόλες	Silva <i>et al.</i> ⁷⁴
	1342	Παραμόρφωση ομάδων –CH ₂ – Δόνηση κάμψης C–H	Πολυφαινόλες	Lu <i>et al.</i> ⁷¹
		Παλλόμενη δόνηση –CH ₂ –		
		Εντός επιπέδου δόνηση τάσης C–O φαινολικού δακτυλίου		
	1209	Δόνηση τάσης C–O φαινολικού δακτυλίου	Πολυφαινόλες	Grigoriou <i>et al.</i> ¹⁰⁰
1104	1102	Δόνηση τάσης C–O	Υδατάνθρακες, πολυφαινόλες	Silva <i>et al.</i> ⁷⁴
1040	1039	Δόνηση τάσης και δόνηση κάμψης C–O	Υδατάνθρακες, πολυφαινόλες	Jantasee <i>et al.</i> ⁷³
988	990			
925	926	Παραμόρφωση C–O–H		

Η φασματική περιοχή μεταξύ των 4000 και 2000 cm⁻¹ αποτελείται από ευρείες κορυφές που οφείλονται σε δονήσεις των λειτουργικών ομάδων O–H, N–H και αλειφατικών C–H. Η κορυφή στους ~3300 cm⁻¹ αποδίδεται κυρίως σε δόνηση τάσης O–H υδροξυλομάδων των υδατανθρακικών και των πολυφαινολικών μορίων, ενώ πιθανόν να συνεισφέρει και η δόνηση τάσης N–H αμινομάδων που βρίσκονται σε αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια και πρωτεΐνες. Η συχνότητα και το εύρος της δόνησης υποδηλώνουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των

υδροξυλομάδων μέσω δεσμών υδρογόνου. Οι κορυφές στους ~ 2930 και $\sim 2890 \text{ cm}^{-1}$ προέρχονται από την δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C-H } sp^3$ ανθράκων.¹⁰⁰

Παρόλο που μέσω της ερμηνείας της συγκεκριμένης περιοχής δεν παρέχονται εκτεταμένες πληροφορίες για τη μοριακή δομή των ουσιών που περιέχονται στα δείγματα, είναι φανερό πως οι κορυφές στα φάσματα των εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων) είναι υψηλότερης έντασης συγκριτικά με τις αντίστοιχες κορυφές που εντοπίζονται στα φάσματα των εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων). Τα υδατανθρακικά μόρια φαίνεται να συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό, επηρεάζοντας σημαντικά τις σχετικές εντάσεις κορυφών που αποδίδονται σε λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται τόσο στα υδατανθρακικά, όσο και στα πολυφαινολικά μόρια.

Η περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$) είναι χαρακτηριστική για κάθε οργανικό μόριο και μέσω αυτής παρέχονται οι πιο πλούσιες δομικές πληροφορίες. Η απόδοση ωστόσο των κορυφών σε συγκεκριμένες δονήσεις γίνεται αρκετά δύσκολη όταν πρόκειται για ένα μείγμα ενώσεων, όπως είναι αυτό του πολυφαινολικού εκχυλίσματος. Οι εκτεταμένες αναφορές της βιβλιογραφίας δίνουν παρ' όλα αυτά σημαντικές κατευθυντήριες γραμμές για την ερμηνεία της.

Η κορυφή στους 1706 cm^{-1} που εμφανίζεται στο φάσμα FTIR του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (απουσία σακχάρων) αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης C=O καρβονυλομάδων.⁷⁴ Καρβονυλομάδες εντοπίζονται σε πολυφαινολικά μόρια της κατηγορίας των φαινολικών οξέων (π.χ. γαλλικό οξύ) και της κατηγορίας των συμπυκνωμένων ταννινών, οι οποίες κατέχουν σημαντική θέση στο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο της σάρκας του καρπού. Επίσης, δεν αποκλείεται και η συνεισφορά καρβονυλομάδων που απαντούν σε μόρια αμινοξέων, ολιγοπεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Η χαρακτηριστική κορυφή που εμφανίζεται στους 1611 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης C-C του φαινολικού δακτυλίου, ο οποίος συναντάται σε αρκετά πολυφαινολικά συστατικά της σάρκας.^{71,79} Επίσης, η κορυφή ενδέχεται να συνθέτει το αποτέλεσμα της αλληλεπικάλυψης κορυφών συμπεριλαμβανομένων αυτών που προέρχονται από δεσμούς C=C-C αρωματικών δακτυλίων, C=N και C=C , χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα συνεισφοράς αμιδικών ή καρβοξυλικών ομάδων.^{72,100}

Στην περιοχή των $1450\text{--}1300 \text{ cm}^{-1}$ παρατηρούνται κορυφές που οφείλονται κυρίως σε δονήσεις κάμψης των δεσμών O-C-H , C-C-H και C-O-H .⁷⁹ Συγκεκριμένα, στο φάσμα FTIR του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (απουσία σακχάρων) εμφανίζεται η κορυφή στους 1447 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στην αντισυμμετρική εντός επιπέδου δόνηση κάμψης των

μεθυλίων $-\text{CH}_3$, ενώ υπάρχει πιθανή συνεισφορά κορυφών που αποδίδονται στην παραμόρφωση των ομάδων $-\text{CH}_2-$.⁷⁴ Η κορυφή στους 1342 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση κάμψης του δεσμού $\text{C}-\text{H}$, στην παλλόμενη δόνηση των $-\text{CH}_2-$ και στην εντός επιπέδου δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}-\text{O}$ του φαινολικού δακτυλίου.^{71,74}

Η κορυφή στους 1209 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική για τη δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}-\text{O}$ του φαινολικού δακτυλίου, ενώ υπάρχει μερική συνεισφορά και των δεσμών $\text{C}-\text{O}$ των υδατανθρακικών μορίων.^{57,100} Στην περιοχή των $1050-900\text{ cm}^{-1}$ παρατηρούνται κορυφές χαρακτηριστικές για τις δονήσεις των ομάδων $-\text{CH}_2\text{OH}$ των μορίων των υδατανθράκων και για τον λόγο αυτό εμφανίζονται εντονότερες στο φάσμα του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (παρουσία σακχάρων), ενώ δεν αποκλείεται και η σύνδεσή τους με δονήσεις τάσης των δεσμών $\text{C}-\text{C}$ και $\text{C}-\text{O}$ από ομάδες αλκυλο εστέρα, αιθέρα και μεθόξυ.¹⁰⁰ Οι δονήσεις που συνυπάρχουν στην συγκεκριμένη περιοχή φαίνεται να αφορούν κυρίως τις δονήσεις τάσης και κάμψης του δεσμού $\text{C}-\text{O}$ και την παραμόρφωση των ομάδων $\text{C}-\text{O}-\text{H}$.⁷³ Η κορυφή στους 1040 cm^{-1} δεν αποκλείεται να ενισχύεται από τη δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}-\text{O}$ των πολυφαινολικών μορίων.⁷⁴

Κατόπιν σύγκρισης των φασμάτων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, παρουσία και απουσία σακχάρων, διαπιστώθηκε πως η συνεισφορά των υδατανθρακικών μορίων στα φασματικά χαρακτηριστικά είναι έντονη, επικαλύπτοντας σε μεγάλο βαθμό χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις λειτουργικών ομάδων των μορίων των πολυφαινολών. Κατά τον πρώιμο σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για προσδιορισμό της TPC και της TAC άγνωστων δειγμάτων χαρουπιού, με βάση τα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων), ώστε να εξακριβωθεί η ενδεχόμενη παρεμβολή τους στα προγνωστικά αποτελέσματα.

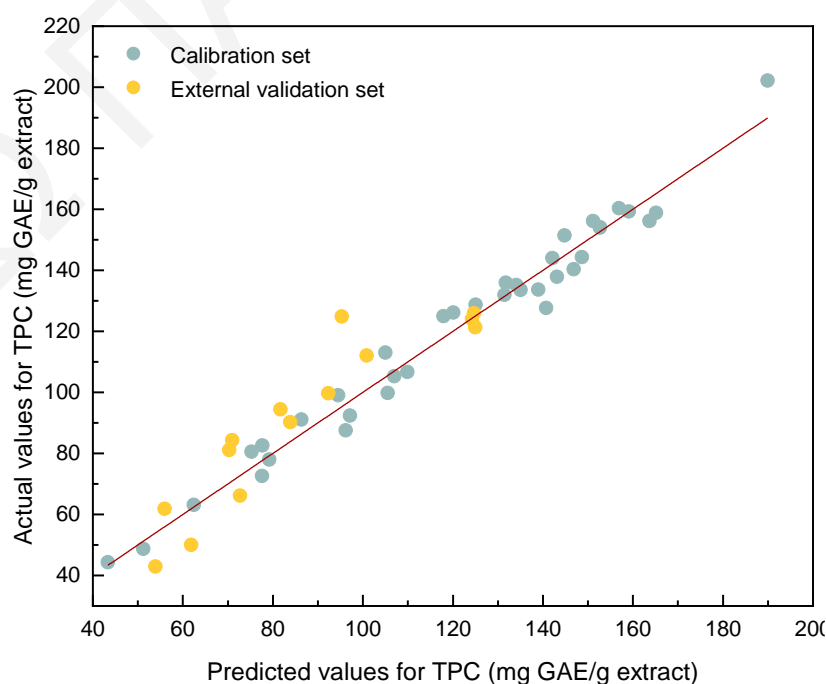
Τα μοντέλα αυτά δεν ήταν ικανά να προχωρήσουν σε πρόβλεψη. Συγκεκριμένα, μέσω της διαδικασίας CV δεν υπολογίστηκε αριθμός LVs που να μπορεί να περιγράψει τη διακύμανση στις βάσεις δεδομένων X και Y και συνεπώς να συσχετίσει γραμμικά τα δεδομένα που εμπεριέχονταν σε αυτές. Η συνεισφορά των υδατανθράκων φαίνεται να εμποδίζει την ανάπτυξη γραμμικής σχέσης μεταξύ των φασματικών χαρακτηριστικών και των τιμών αναφοράς της TPC ή της TAC, καθώς τα συστατικά που ευθύνονται για την αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων, οι πολυφαινολικές δηλαδή ενώσεις, δεν κυριαρχούν στα φάσματα FTIR. Η επικάλυψη των χαρακτηριστικών τους κορυφών έγκειται πιθανόν στην αρκετά χαμηλή συγκέντρωσή τους συγκριτικά με αυτήν των υδατανθρακικών μορίων στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (παρουσία σακχάρων).

Αντίθετα, τα μοντέλα PLSR που κατασκευάστηκαν με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) έδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μοντέλο που επιχείρησε την πρόβλεψη της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος) επιτυγχάνοντας υψηλή γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με την αξιοποίηση των φασματικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων (4000–400 cm^{-1}). Στον πίνακα 4.6 συνοψίζονται οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, όπως υπολογίστηκαν για το συγκεκριμένο μοντέλο, ενώ στο σχήμα 4.3 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς που προσδιορίστηκαν από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με την αξιοποίηση του μοντέλου.

Πίνακας 4.6. Μοντέλο PLSR που κατασκευάστηκε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR (4000–400 cm^{-1}) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) για την πρόβλεψη της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος).

Παράμετρος	N ^a	Προεπεξεργασία δεδομένων	cm^{-1}	LVs	Βαθμονόμηση (N ^a =37)		Εξωτερική Επικύρωση (N ^a =14)	
					r^2_{CAL}	RMSEC	r^2_{PRED}	RMSEP
TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος)	51	Μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων)	4000–400	7	0,9762	5,55	0,8503	11,44

^a Αριθμός δειγμάτων



Σχήμα 4.3. Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος) και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με εφαρμογή του μοντέλου PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR (4000–400 cm^{-1}) των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).

Καταληκτικά, η πραγματοποίηση του σταδίου εκχύλισης των πολυφαινολικών μορίων είναι απαραίτητη, ενώ καθοριστικό φαίνεται να είναι το στάδιο απομάκρυνσης των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων. Όπως φάνηκε, η υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων στα λυοφιλωμένα δείγματα σκόνης χαρουπιού ή στα πολυφαινολικά τους εκχυλίσματα (παρουσία σακχάρων) αποτυπώνεται εξίσου έντονα στα φάσματα FTIR, επικαλύπτοντας τις κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις των λειτουργικών ομάδων των πολυφαινολικών μορίων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η συσχέτιση των φασματικών χαρακτηριστικών των πολυφαινολικών μορίων με τις τιμές αναφοράς των αντιοξειδωτικών παραμέτρων που συσχετίζονται άμεσα με την παρουσία και τη δράση των πολυφαινολών, αποτυγχάνει. Στο εξής λοιπόν, για σκοπούς σύγκρισης των υπόλοιπων παραμέτρων που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων, θα γίνεται αξιοποίηση μόνο των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).

4.3. Σύγκριση προγνωστικών μοντέλων PLSR για προσδιορισμό διαφορετικών αντιοξειδωτικών παραμέτρων

Σε αυτή την ενότητα, θα γίνει σχολιασμός και σύγκριση των μοντέλων PLSR που κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, FRAP και συγκέντρωσης γαλλικού οξέος για τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων). Για την κατασκευή των μοντέλων αξιοποιήθηκαν τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR των εκχυλισμάτων στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$), η οποία θεωρείται βιβλιογραφικά η πιο χρήσιμη αφού σε αυτήν περιέχονται οι πλουσιότερες δομικές πληροφορίες που αφορούν τα πολυφαινολικά μόρια.

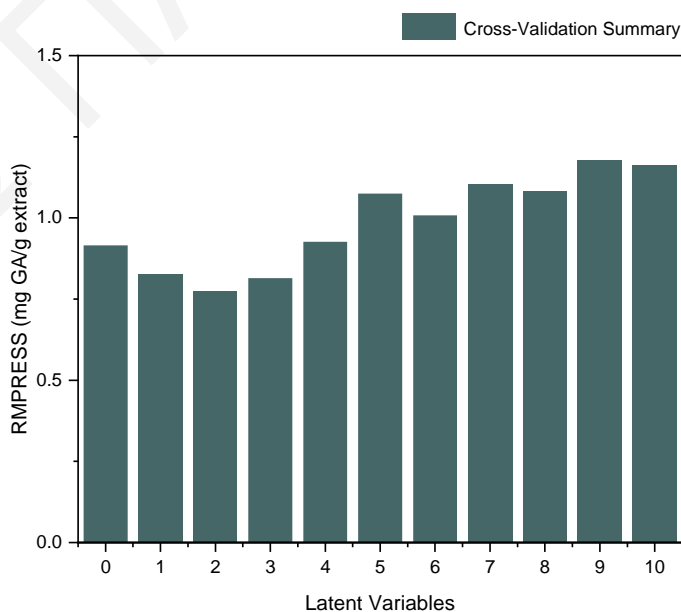
Για την προσαρμογή και την αξιολόγηση των μοντέλων έγινε τυχαιοποίηση του συνολικού αριθμού δειγμάτων και διαχωρισμός τους στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ EV. Κάθε μοντέλο PLSR αξιολογήθηκε με τη χρήση των στατιστικών παραμέτρων r^2_{CAL} , RMSEC, r^2_{PRED} και RMSEP, ενώ η διαδικασία CV πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής *leave-one-out* CV, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο βέλτιστος αριθμός LVs που ήταν ικανός να περιγράψει τη μέγιστη διακύμανση για τις βάσεις δεδομένων X και Y και αντιστοιχούσε στην ελάχιστη τιμή RMPRESS. Ο υπολογισμός του βέλτιστου αριθμού LVs για το κάθε μοντέλο υπολογίστηκε αυτόματα μέσω του υπολογιστικού προγράμματος.

Το εκατοστιαίο ποσοστό της διακύμανσης που περιγράφηκε για τις βάσεις δεδομένων X και Y μέσω των μοντέλων, υπερέβη το 74% για τα μοντέλα που προχώρησαν σε πρόβλεψη των

τιμών της TPC και της TAC, όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω των δοκιμών DPPH και FRAP, ποσοστό αρκετά ικανοποιητικό σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές.⁷⁴ Αντίθετα, οι LVs που υπολογίστηκαν για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος μπορούσαν να περιγράψουν μόνο το ~38% της διακύμανσης των δεδομένων που περιέχονταν στη βάση δεδομένων Y (Πίνακας 4.7). Το χαμηλό ποσοστό διακύμανσης που εξηγείται μέσω του μοντέλου αποτελεί επακόλουθο του μικρού αριθμού LVs, ο οποίος υποδηλώνει υποπροσαρμογή (*underfitting*) των δεδομένων. Ωστόσο, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.4, η επιλογή μεγαλύτερου αριθμού LVs θα οδηγούσε επίσης με μεγάλη πιθανότητα, σε ανεπιτυχή πρόβλεψη όπως φανερώνουν οι αυξημένες τιμές του RMPRESS που υπολογίστηκαν κατά το στάδιο του CV.

Πίνακας 4.7. Αριθμός LVs που επιλέχθηκε μέσω της διαδικασίας *leave-one-out* CV για το κάθε μοντέλο PLSR, μαζί με το εκατοστιαίο ποσοστό (%) διακύμανσης που εξηγείται μέσω αυτού για τις βάσεις δεδομένων X και Y.

Παράμετρος	LVs	Εκατοστιαίο ποσοστό (%) διακύμανσης που εξηγείται μέσω του μοντέλου PLSR	
		Βάση δεδομένων X	Βάση δεδομένων Y
TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος)	5	99,3	97,8
DPPH (EC ₅₀) (μg/mL εκχυλίσματος)	6	99,7	88,3
FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος)	3	99,0	74,0
Γαλλικό οξύ (mg GA/g εκχυλίσματος)	2	97,6	37,9



Σχήμα 4.4. Αντιστοιχία αριθμού LVs και RMPRESS για το μοντέλο που προβαίνει σε πρόβλεψη της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg GA/g εκχυλίσματος) για τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων).

Για την αξιολόγηση των μοντέλων βαθμονόμησης PLSR υπολογίστηκαν ο συντελεστής προσδιορισμού, r^2_{CAL} , και το μέσο τετραγωνικό σφάλμα βαθμονόμησης, RMSEC. Μέσω του συντελεστή προσδιορισμού αναδείχθηκε η γραμμική ή μη, σχέση μεταξύ των τιμών αναφοράς που προσδιορίστηκαν μέσω των συμβατικών μεθόδων και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με εφαρμογή του μοντέλου PLSR, κατόπιν αξιοποίησης των φασματικών δεδομένων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων. Οι τιμές του r^2_{CAL} που βρέθηκαν να προσεγγίζουν την μονάδα ήταν ενδεικτικές της καλής προγνωστικής ικανότητας των μοντέλων. Βιβλιογραφικά, οι αποδεκτές τιμές του r^2_{CAL} είναι όσες υπερβαίνουν την τιμή 0,8.⁷⁴ Η τιμή του RMSEC υποδηλώνει την απόκλιση των προβλεπόμενων τιμών από τις αντίστοιχες που προσδιορίζονται με τις μεθόδους αναφοράς και όπως είναι αναμενόμενο, όσο μειωμένη είναι η τιμή του RMSEC, τόσο βελτιωμένη είναι η προγνωστική ικανότητα των μοντέλων.

Για επικύρωση των προγνωστικών μοντέλων πέραν της διαδικασίας CV, που εφαρμόστηκε αυτόματα από το υπολογιστικό πρόγραμμα για τον υπολογισμό των LVs, πραγματοποιήθηκε και διαχωρισμός των δειγμάτων με σκοπό την ένταξή τους στο σετ EV. Κατ' αυτόν τον τρόπο, όσα δείγματα ανήκαν στο σετ EV αντιμετωπίστηκαν ως άγνωστα, με στόχο τον έλεγχο της εφαρμοσιμότητας των μοντέλων σε άγνωστα δείγματα μελλοντικά. Για το σετ EV υπολογίστηκαν αντίστοιχα οι τιμές του συντελεστή προσδιορισμού, r^2_{PRED} , και του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της πρόβλεψης, RMSEP. Ιδανικά οι τιμές του r^2_{PRED} κατά αντιστοιχία με το σετ βαθμονόμησης έπρεπε να ξεπερνούν την τιμή 0,8 και οι τιμές του RMSEP να είναι όσο το δυνατόν μικρότερες. Όπως ήταν αναμενόμενο βρέθηκαν ελάχιστα μειωμένες τιμές για τον r^2_{PRED} σε σχέση με τον r^2_{CAL} και αυξημένες τιμές για το RMSEP σε σχέση με το RMSEC.

Συνοπτικά λοιπόν, η αυξημένη ανθεκτικότητα (*robustness*) των μοντέλων εκδηλώθηκε μέσω των υψηλών τιμών των συντελεστών προσδιορισμού, r^2_{CAL} και r^2_{PRED} , και των χαμηλών τιμών για τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP. Ο αριθμός των LVs που υπολογίστηκαν μέσω της τεχνικής CV για όλα τα προγνωστικά μοντέλα βρέθηκε μικρότερος από 6, γεγονός που αποκλείει την υπερπροσαρμογή (*overfitting*) των δεδομένων. Στον πίνακα 4.8 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για τα μοντέλα PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC, της TAC και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα.

Το μοντέλο PLSR που στόχευσε στην πρόβλεψη της TPC έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με $r^2_{\text{CAL}} > 0,97$, $r^2_{\text{PRED}} > 0,86$ και μικρά σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP, με τιμές 5,30 και 10,69 mg GAE/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Η μειωμένη τιμή του r^2_{PRED} σε σχέση

με τον r^2_{CAL} και η αυξημένη τιμή του RMSEP σε σχέση με το RMSEC θεωρήθηκε αναμενόμενη. Το μοντέλο PLSR μέσω του οποίου επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της TAC, όπως αυτή προέκυψε με την πραγματοποίηση της δοκιμής DPPH, έδωσε επίσης αρκετά ικανοποιητική τιμή για τον r^2_{CAL} , ίση με 0,8827. Ωστόσο, η μειωμένη τιμή του r^2_{PRED} που βρέθηκε ίση με 0,7680 σε συνδυασμό με τις τιμές σφαλμάτων πρόγνωσης, RMSEC και RMSEP, ίσες με 6,26 και 11,84 $\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος (EC_{50}), είναι ενδεικτικά της περιορισμένης αναπαραγωγιμότητας του μοντέλου. Η ένταξη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων κατά το στάδιο βαθμονόμησης είναι δυνατόν να δώσει βελτιωμένα αποτελέσματα με πιθανή εφαρμοσιμότητα του μοντέλου μελλοντικά.

Πίνακας 4.8. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (*robustness*) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC, της TAC και της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (απουσία σακχάρων) σκόνης χαρουπιού, με αξιοποίηση διαφορετικών συμβατικών μεθόδων.

Παράμετρος	N^a	Προεπεξεργασία δεδομένων	cm^{-1}	LVs	Βαθμονόμηση ($N^a=37$)		Εξωτερική Επικύρωση ($N^a=14$)	
					r^2_{CAL}	RMSEC	r^2_{PRED}	RMSEP
TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος)	51	Μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR εκχυλίσμάτων (απουσία σακχάρων)	1800–800	5	0,9783	5,30	0,8695	10,69
DPPH (EC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος)	50 ^b			6	0,8827	6,26	0,7680	11,84
FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος)	32 ^c			3	0,7401	51,29	0,8340	30,65
Γαλλικό οξύ (mg GA/g εκχυλίσματος)	49 ^d			2	0,3618	0,72	0,0211	0,38

^a Αριθμός δειγμάτων

^b Αριθμός δειγμάτων στο σετ βαθμονόμησης ($N=37$) και στο σετ εξωτερικής επικύρωσης ($N=13$)

^c Αριθμός δειγμάτων στο σετ βαθμονόμησης ($N=22$) και στο σετ εξωτερικής επικύρωσης ($N=10$)

^d Αριθμός δειγμάτων στο σετ βαθμονόμησης ($N=35$) και στο σετ εξωτερικής επικύρωσης ($N=14$)

Μειωμένες τιμές λήφθηκαν επίσης για το μοντέλο που επιχείρησε την πρόβλεψη της TAC των πολυφαινολικών εκχυλίσμάτων, όπως αυτή είχε προσδιοριστεί με τη μέθοδο FRAP. Συγκεκριμένα, ο συντελεστής r^2_{CAL} βρέθηκε ίσος με 0,7401, ο r^2_{PRED} ίσος με 0,8340 και τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP, ίσα με 51,29 και 30,65 mg TE/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Οι βελτιωμένες τιμές του r^2 και του RMSE για το σετ EV σε σχέση με αυτό της βαθμονόμησης, είναι κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα μοντέλα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον χαμηλό αριθμό δειγμάτων που αξιοποιήθηκαν συνολικά κατά την προσαρμογή και την αξιολόγηση του μοντέλου, σε σχέση με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε

στα μοντέλα που προχώρησαν σε πρόβλεψη της TPC ή της TAC μέσω της δοκιμής DPPH. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.5 (D), τα δείγματα στο σετ EV παρουσιάζουν μικρότερες αποκλίσεις σε σχέση με τα αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης. Ωστόσο, οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης παρουσιάζονται αρκετά υποσχόμενες, με την ένταξη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων στο σετ βαθμονόμησης να σκιαγραφεί την πιθανή εφαρμοσιμότητα του μοντέλου.

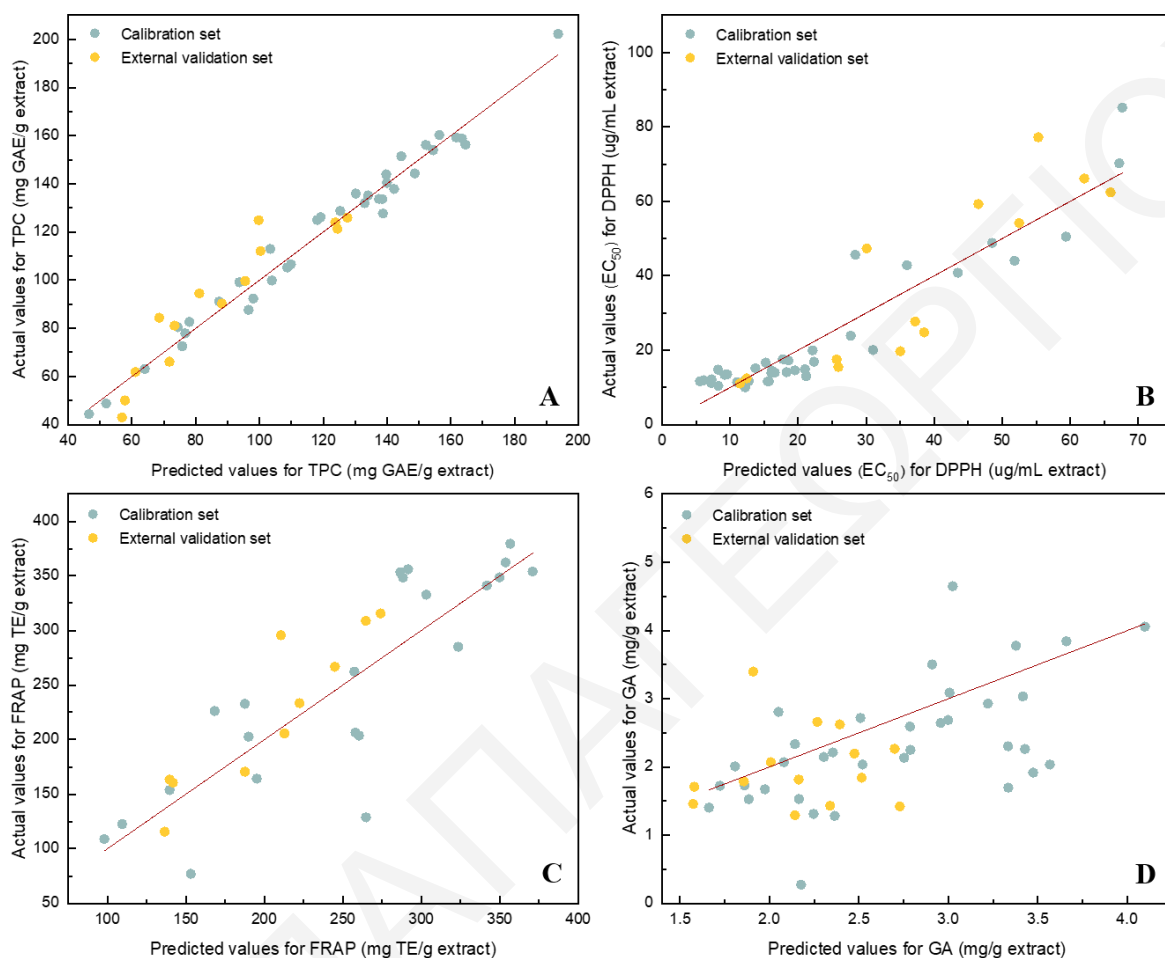
Τέλος, αρκετά υποβαθμισμένες βρέθηκαν οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για το μοντέλο που συσχετίζει τη συγκέντρωση μονομερούς γαλλικού οξέος των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR. Συγκεκριμένα, ο r^2_{CAL} βρέθηκε ίσος με 0,3618, ο r^2_{PRED} ίσος με 0,0211 και τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP, ίσα με 0,72 και 0,38 mg GA/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα.

Συνδυαστικά, οι τιμές που υπολογίστηκαν περιγράφουν ένα ανεπιτυχές προγνωστικό μοντέλο. Παρά το γεγονός ότι το γαλλικό οξύ αναφέρεται βιβλιογραφικά ως η κυρίαρχη πολυφαινολική ένωση που εντοπίζεται στη σκόνη χαρουπιού και κατά συνέπεια στα πολυφαινολικά της εκχυλίσματα, η συγκέντρωσή της είναι αρκετά χαμηλή με αποτέλεσμα να μην εμφανίζει έντονες χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα FTIR ή σε αρκετές περιπτώσεις οι κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις του μορίου να επικαλύπτονται από αυτές των κυρίαρχων συστατικών (π.χ. υδατάνθρακες). Στα φάσματα FTIR εντοπίζονται κυρίως κορυφές οι οποίες αποδίδονται σε λειτουργικές ομάδες μορίων που η συγκέντρωσή τους ξεπερνά το 0,1%.⁸⁵

Επιπλέον, μέσω του χρωματογραφικού διαχωρισμού (RP-HPLC) των εκχυλισμάτων επιτυγχάνεται μόνο η ποσοτικοποίηση του μονομερούς γαλλικού οξέος. Δεν πρέπει ωστόσο να αγνοείται η συνεισφορά τόσο της ελεύθερης όσο και της χημικά δεσμευμένης ή συζευγμένης μορφής του στο συνολικό φασματικό αποτύπωμα. Γεγονός που δυνητικά επηρεάζει τη συσχέτιση των τιμών αναφοράς με τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στα φάσματα FTIR. Στο σχήμα 4.5 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν μέσω των μοντέλων PLSR με αξιοποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τις συμβατικές μεθόδους.

Οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για το μοντέλο PLSR που προβαίνει σε πρόβλεψη της TPC αποδεικνύουν την ικανότητα της φασματοσκοπίας FTIR να αξιοποιηθεί συνδυαστικά με την χημειομετρική μέθοδο PLSR σαν μια εναλλακτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων

σκόνης χαρουπιού. Εν αντιθέσει με τις συμβατικές αναλυτικές μεθόδους που επιχειρούν τον ίδιο προσδιορισμό, η φασματοσκοπία FTIR υπερτερεί στον χρόνο και στο κόστος ανάλυσης, έχοντας ελάχιστο έως μηδαμινό αντίκτυπο στο περιβάλλον.



Σχήμα 4.5. Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς **A** της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος), **B** της TAC εκφραζόμενη σε τιμές EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος), **C** της TAC (mg TE/g εκχυλίσματος), **D** της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg/g εκχυλίσματος) και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).

Συγκρίνοντας τα προγνωστικά μοντέλα PLSR που βασίστηκαν στις διαφορετικές μεθόδους αναφοράς, φάνηκε πως την καλύτερη γραμμική συσχέτιση με τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων έδωσαν οι τιμές που αναφέρθηκαν στη TPC των εκχυλισμάτων. Στην προηγούμενη ενότητα, έγινε εκτεταμένη αναφορά στην σημαντική συνεισφορά στο φασματικό αποτύπωμα, των δονήσεων των λειτουργικών ομάδων που απαντούν στα πολυφαινολικά μόρια, με χαρακτηριστικές τις κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις των αρωματικών δακτυλίων (1611 και 1209 cm^{-1}), των καρβοξυλομάδων (1706 cm^{-1}) και των υδροξυλομάδων (3300 , 1102 και 1039 cm^{-1}).

Είναι γνωστό πως η φασματοσκοπία FTIR αντλεί τη χρησιμότητά της από τις εκτεταμένες πληροφορίες που λαμβάνονται μέσω ενός φάσματος για τη μοριακή δομή του δείγματος, ενώ συνεισφέρει ελάχιστα στην κατανόηση των μηχανισμών αντίδρασης που συντελούνται μεταξύ των συστατικών από συνεργειακά ή ανταγωνιστικά φαινόμενα.⁷⁸ Επομένως, η συσχέτιση των φασματικών χαρακτηριστικών που αποδίδονται κατά κύριον λόγο στις δονήσεις των πολυφαινολικών μορίων επιτυγχάνεται ευκολότερα με την τιμή που αναφέρεται στοχευμένα στη TPC των δειγμάτων. Επιπλέον, οι βασικές συνθήκες που επικρατούν κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης Folin-Ciocalteu συμβάλλουν στην αυξημένη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων έναντι του αντιδραστηρίου.⁸¹

Αντίθετα, οι τιμές που λήφθηκαν για τη TAC, μέσω των δοκιμών DPPH και FRAP, αναφέρονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των συστατικών του δείγματος η οποία λαμβάνει χώρα μέσω ξεχωριστών ή παράλληλων μηχανισμών ET και HAT, και δεν παρουσιάζεται ευκρινώς μέσω των φασμάτων FTIR.⁷⁸ Στη TAC των δειγμάτων, πέραν των πολυφαινολικών ενώσεων, μπορούν να συνεισφέρουν και άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά τα οποία δυνητικά υπάρχουν στα εκχυλίσματα σε μικρότερες συγκεντρώσεις και δεν μπορούν να αποτυπωθούν στα φάσματα FTIR. Τέτοια συστατικά μπορεί να είναι κάποιες βιταμίνες (π.χ. βιταμίνη A, C και E) ή ορισμένα ιχνοστοιχεία (π.χ. Cu, Zn, Se, Mn).^{79,107}

Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται σημαντικά από τη χημική δομή ή τον βαθμό υποκατάστασης (αριθμός και θέση υδροξυλομάδων) των αρωματικών δακτυλίων των πολυφαινολικών μορίων. Ορισμένες πολυφαινολικές ενώσεις είναι δυνατόν να συνεισφέρουν στα φασματικά χαρακτηριστικά FTIR και στη TPC των εκχυλισμάτων, χωρίς ωστόσο να συνδράμουν στην τιμή της TAC. Παραδείγματος χάριν, η ρίζα DPPH παρουσιάζει μειωμένη δραστικότητα με ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών, των οποίων ο δακτύλιος B δεν είναι υποκατεστημένος με υδροξυλομάδες (π.χ. καμφερόλη), όπως επίσης και με μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα αρωματικών οξέων (π.χ. φερουλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ).⁷⁴

Αναφορικά με τις τιμές της TAC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την μέθοδο FRAP, φαίνεται πως ο μικρός βαθμός συσχέτισής τους με τα φασματικά δεδομένα FTIR έγκειται στη μειωμένη εκλεκτικότητα της μεθόδου. Συγκεκριμένα, στις τιμές αναφοράς που προσδιορίζονται με τη μέθοδο είναι δυνατόν να συνεισφέρουν και άλλα συστατικά με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό που καταφέρνουν να προκαλέσουν αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου στο σύμπλοκο Fe^{3+} -TPTZ, παρά τη μειωμένη αντιοξειδωτική τους δράση.⁷⁴

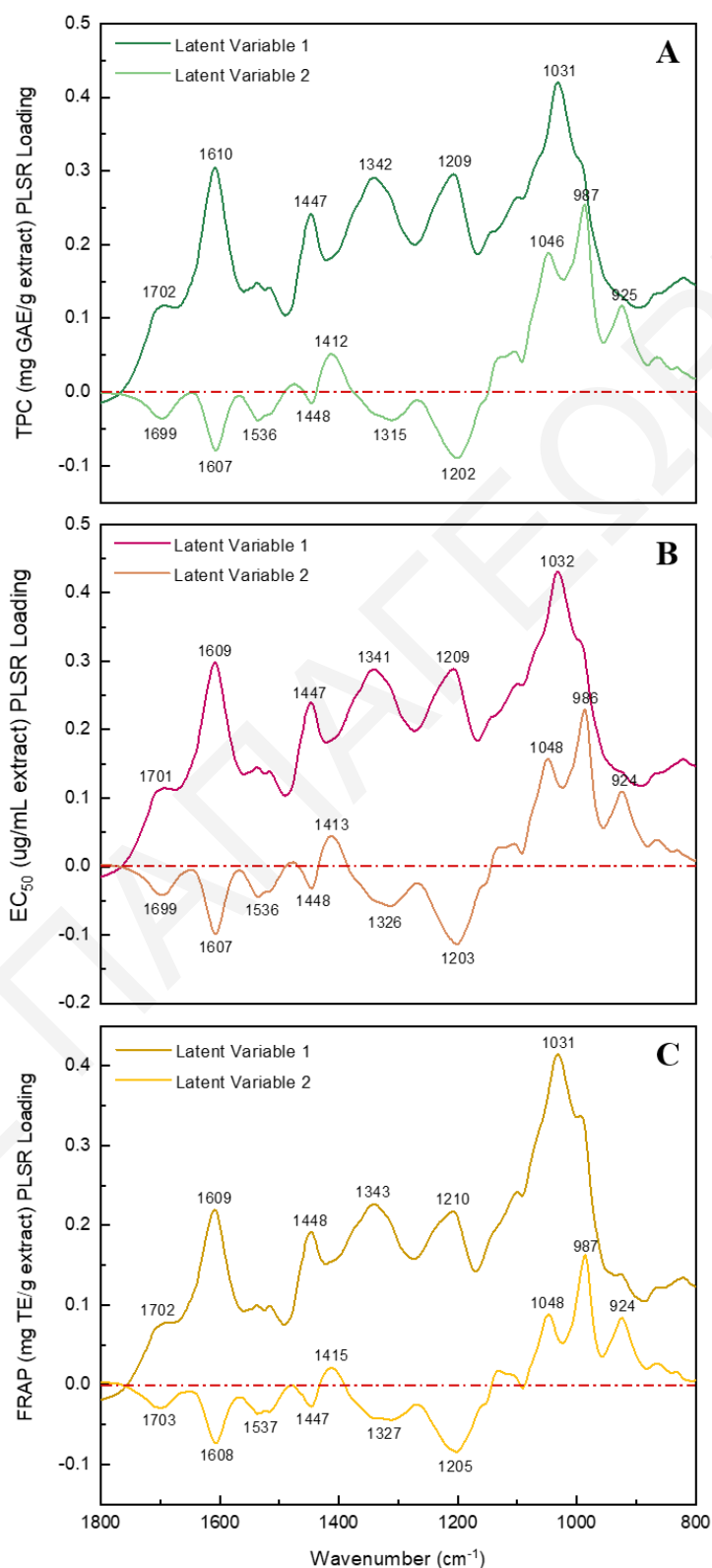
Η βελτιωμένη προγνωστική ικανότητα των μοντέλων που προχωρούν σε πρόβλεψη της TPC, έναντι των παραμέτρων που υπολογίζονται από τις υπόλοιπες μεθόδους αναφοράς, επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά, βρίσκοντας εφαρμογή σε διάφορα τρόφιμα ή εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, αρκετά καλά μοντέλα PLSR κατασκευάστηκαν και εφαρμόστηκαν για πρόβλεψη της TPC σε μοσχάτα επιδόρπια κρασιά, σε βατόμουρα και σε δείγματα σοκολάτας.^{74,79,81} Ωστόσο, ορισμένες ερευνητικές μελέτες αναδεικνύουν ως καλύτερα, τα μοντέλα που προχωρούν σε πρόβλεψη μονομερών αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως είναι για παράδειγμα τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν από τις ομάδες των Tahir *et al.* και των Liang *et al.* για προσδιορισμό της συγκέντρωσης μονομερών πολυφαινολικών ενώσεων σε δείγματα μελιού και κόκκων καφέ, αντίστοιχα. Οι ερευνητές ενισχύουν τα αποτελέσματά τους σχολιάζοντας τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται για τις πολυφαινολικές ενώσεις μέσω των φασμάτων FTIR, και κατ' επέκταση στην καλή συσχέτισή τους με τις συγκεντρώσεις των ουσιών στα δείγματα.^{78,83}

Με στόχο την εξακρίβωση των λειτουργικών ομάδων που συνεισφέρουν περισσότερο στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, διερευνήθηκαν τα διαγράμματα που συσχετίζουν τις τιμές *loading* της κάθε προγνωστικής μεταβλητής X ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$), για τα προγνωστικά μοντέλα που προχώρησαν σε πρόβλεψη της TPC και της TAC (DPPH, FRAP). Τα διαγράμματα *loading* αποτελούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο μέσω του οποίου απεικονίζεται η συσχέτιση των φασματικών χαρακτηριστικών με τις τιμές αναφοράς. Συγκεκριμένα, όσες κορυφές (cm^{-1}) αντιστοιχούν σε τιμές *loading* μεγαλύτερες του μηδενός συσχετίζονται θετικά με την προσδιοριζόμενη παράμετρο, ενώ όσες αντιστοιχούν σε τιμές μικρότερες από μηδέν δεν συνεισφέρουν στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης μεταξύ τους.

Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζονται αρκετά πανομοιότυπα, τα διαγράμματα *loading* για τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και FRAP. Οι πρώτες δύο LVs περιγράφουν αθροιστικά πάνω από το 97% της συνολικής φασματικής διακύμανσης και εξετάζονται ενδεικτικά για το κάθε μοντέλο.

Οι συχνότητες δόνησης που συσχετίζονται θετικά με τις τιμές αναφοράς εντοπίζονται στους ~ 1702 , 1610 , 1447 , 1342 , 1209 και 1031 cm^{-1} και αναφέρονται κυρίως σε δονήσεις υδροξυλομάδων και αρωματικών δακτυλίων. Συγκεκριμένα, η κορυφή στους $\sim 1702\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}=\text{O}$. Η κορυφή στους $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης $\text{C}-\text{C}$ του φαινολικού δακτυλίου ή στη δόνηση τάσης των δεσμών $\text{C}=\text{N}$ και $\text{C}=\text{C}$. Η κορυφή στους $\sim 1447\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην αντισυμμετρική εντός επιπέδου δόνηση κάμψης των μεθυλίων ή στην παραμόρφωση των ομάδων $-\text{CH}_2-$, ενώ αυτή στους 1342 cm^{-1} είναι αποτέλεσμα της δόνησης κάμψης $\text{C}-\text{H}$, της παλλόμενης δόνησης $-\text{CH}_2-$ και της

εντός επιπέδου δόνησης τάσης C–O του φαινολικού δακτυλίου. Η κορυφή στους $\sim 1209\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται επίσης σε δόνηση τάσης C–O του φαινολικού δακτυλίου και η κορυφή στους $\sim 1031\text{ cm}^{-1}$ είναι αποτέλεσμα δόνησης τάσης και κάμψης του δεσμού C–O.



Σχήμα 4.6. Συνεισφορά προγνωστικών μεταβλητών X (cm^{-1}) στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς **A** της TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος, **B** της TAC εκφραζόμενη σε τιμές EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος) και **C** της TAC (mg TE/g εκχυλίσματος).

Μέσω των διαγραμμάτων *loading* παρατηρείται συσχετισμός των λειτουργικών ομάδων που εντοπίζονται στα δείγματα με τις αναφερόμενες τιμές TPC και TAC. Η παρουσία υδροξυλομάδων και φαινολικών δακτυλίων φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, επιβεβαιώνοντας την κυριαρχία των πολυφαινολικών ενώσεων έναντι των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών συστατικών που πιθανόν να περιέχονται στα εκχυλίσματα της σκόνης. Το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο συσχετίστηκε βιβλιογραφικά με αυξημένες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας και στην περίπτωση ακατέργαστων τροφίμων.¹¹⁴

Η παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων φαίνεται να επηρεάζει πανομοιότυπα τις προσδιοριζόμενες παραμέτρους που προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθόδους αναφοράς, με μειωμένες τιμές *loading* μόνο στην περίπτωση των τιμών της TAC που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο FRAP. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη μη γραμμική συσχέτιση που εντοπίστηκε στην ενότητα (4.1) μεταξύ των τιμών αναφοράς της TPC και των τιμών EC₅₀, που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο απόσβεσης της ρίζας DPPH και των τιμών της TAC που προέκυψαν από τη μέθοδο FRAP. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις συγκλίνουν στην μειωμένη εκλεκτικότητα της μεθόδου και/ή στην μειωμένη αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων παρουσία όξινων συνθηκών. Σε χαμηλές τιμές pH, ο ιονισμός των πολυφαινολικών ενώσεων δυσχεραίνεται και παρατηρείται αύξηση στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον μηχανισμό πραγματοποίησης της αντίδρασης αντιοξειδωτικού–αντιδραστηρίου.¹⁰⁶

4.4. Σύγκριση φασματικής περιοχής και μεθόδου προεπεξεργασίας φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR για την ανάπτυξη ανθεκτικών (*robust*) προγνωστικών μοντέλων PLSR

Μεταξύ των παραμέτρων που εξετάζονται βιβλιογραφικά με στόχο την ανάπτυξη ικανότερων προγνωστικών μοντέλων PLSR για προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των τροφίμων είναι η επιλογή της φασματικής περιοχής και της μεθόδου προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR, ώστε τα προγνωστικά μοντέλα να επωφελούνται της μέγιστης δυνατής χημικής πληροφορίας που περιέχεται σε αυτά. Συγκεκριμένα, η διακύμανση των τιμών αναφοράς που εντοπίζεται μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, χρειάζεται να αποτυπώνεται στα φάσματα όσο το δυνατόν πιο ξεκάθαρα, ώστε να αναπτύσσεται εν τέλει ισχυρότερη γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους.

Για τον λόγο αυτό, οι ερευνητικές ομάδες προχωρούν ως επί το πλείστον με αξιοποίηση της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος ($\sim 1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$), στην οποία περιέχονται οι πιο

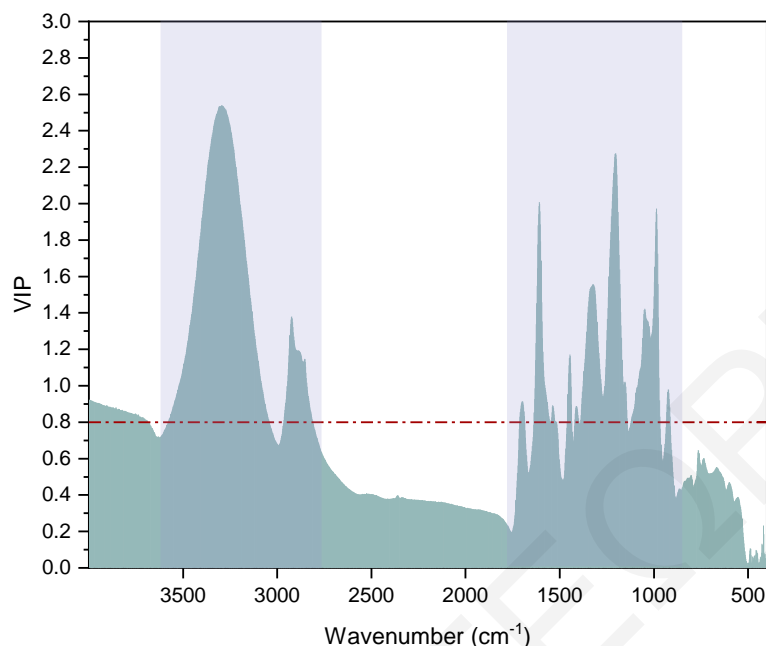
πλούσιες δομικές πληροφορίες για τα διάφορα οργανικά μόρια.^{37,70,73,74,79,80,115,116} Ωστόσο, δεν είναι λίγοι αυτοί που αξιοποιούν είτε ολόκληρη την περιοχή του MIR (4000–400 cm^{-1})^{49,75,82,83,117}, είτε υποπεριοχές που φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο στην ανάπτυξη ισχυρής γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς.^{77,84,87} Με στόχο την εξακρίβωση της καταλληλότερης φασματικής περιοχής για την περίπτωση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού, εξετάστηκαν σε αντιπαραβολή τα προγνωστικά μοντέλα PLSR που αναπτύχθηκαν για πρόβλεψη της TPC των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ή της σκόνης χαρουπιού και βασίστηκαν είτε σε ολόκληρη την περιοχή του MIR, είτε μόνο στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος, είτε ακόμα σε συγκεκριμένες υποπεριοχές του φάσματος.

Επιπλέον, στη συγκεκριμένη ενότητα θα διερευνηθεί ο αντίκτυπος της προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων. Η αναγκαιότητα διερεύνησης της συγκεκριμένης παραμέτρου πηγάζει από τις αμφιλεγόμενες βιβλιογραφικές αναφορές. Συγκεκριμένα, ορισμένοι ερευνητές αναφέρονται στην αξιοποίηση της μέγιστης δυνατής χημικής πληροφορίας που εξάγεται μέσω των μη επεξεργασμένων φασμάτων FTIR, ενώ άλλοι αξιοποιούν παραγωγοποιημένα φάσματα επικαλούμενοι τον ίδιο σκοπό. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μοντέλων που προέκυψαν με χρήση μη επεξεργασμένων φασμάτων FTIR, κανονικοποιημένων φασμάτων (*Offset correction*) και φασμάτων που προέκυψαν μετά την πρώτη και δεύτερη παράγωγο. Για σκοπούς σύγκρισης επιλέχθηκε το μοντέλο που προβαίνει σε πρόβλεψη της TPC, καθώς κρίθηκε ως το βέλτιστο μετά την στατιστική αξιολόγηση που προηγήθηκε στην ενότητα 4.3.

4.4.1. Φασματική περιοχή

Στο εξής, θα γίνει σχολιασμός και σύγκριση των μοντέλων PLSR που κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων που λήφθηκαν (α) σε ολόκληρη την περιοχή του MIR (4000–400 cm^{-1}), (β) μόνο στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυφαινολικών μορίων (1800–800 cm^{-1}) και (γ) στις υποπεριοχές ~3585–2810 και ~1711–912 cm^{-1} . Οι συγκεκριμένες υποπεριοχές βρέθηκαν να συνεισφέρουν περισσότερο στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς, σύμφωνα με το διάγραμμα VIP (Variable Importance in Projection, VIP). Το διάγραμμα VIP (Σχήμα 4.7) εξηγεί κάθε προγνωστική μεταβλητή X (cm^{-1}) με βάση τη μέση διακύμανση των τιμών αναφοράς. Συγκεκριμένα, κάθε τιμή VIP αποτελεί το μέτρο της

σημαντικότητας της προγνωστικής μεταβλητής X και εφόσον αυτή ξεπερνά την τιμή 0,8 θεωρείται ότι συνεισφέρει και συσχετίζεται «σημαντικά» με τις τιμές αναφοράς.



Σχήμα 4.7. Διάγραμμα VIP με έμφαση στις προγνωστικές μεταβλητές X (cm^{-1}) που συνεισφέρουν περισσότερο στην ανάπτυξη γραμμικής σχέσης με τις τιμές αναφοράς της TPC των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων.

Για την κατασκευή των μοντέλων αξιοποιήθηκαν τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR των εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) και για την προσαρμογή και την αξιολόγησή τους έγινε τυχαιοποίηση του συνολικού αριθμού δειγμάτων και διαχωρισμός τους στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ EV. Κάθε μοντέλο PLSR αξιολογήθηκε με τη χρήση των στατιστικών παραμέτρων r^2_{CAL} , RMSEC, r^2_{PRED} και RMSEP, ενώ η διαδικασία CV πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής *leave-one-out* CV, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο βέλτιστος αριθμός LVs που ήταν ικανός να περιγράψει τη μέγιστη διακύμανση για τις βάσεις δεδομένων X και Y και αντιστοιχούσε στην ελάχιστη τιμή RMPRESS. Ο υπολογισμός του βέλτιστου αριθμού LVs για το κάθε μοντέλο υπολογίστηκε αυτόματα μέσω του υπολογιστικού προγράμματος.

Στον πίνακα 4.9 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για τα μοντέλα PLSR μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (mg GAE/g εκχυλίσματος). Για σκοπούς αξιοποίησης των μοντέλων για απευθείας πρόβλεψη της πολυφαινολικής σύστασης της πρώτης ύλης της σάρκας, κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα μοντέλα για πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού.

Πίνακας 4.9. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (*robustness*) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας δεδομένα από τρεις διαφορετικές φασματικές περιοχές των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).

Παράμετρος	N ^a	Προεπεξεργασία δεδομένων	cm ⁻¹	LVs	Βαθμονόμηση (N ^a =37)		Εξωτερική Επικύρωση (N ^a =14)	
					r ² _{CAL}	RMSEC	r ² _{PRED}	RMSEP
TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος)	51	Μη	4000–400	7	0,9762	5,55	0,8503	11,44
		επεξεργασμένα	1800–800	5	0,9783	5,30	0,8695	10,69
		φάσματα FTIR	3585–2810	9	0,9850	4,41	0,8789	10,30
		εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων)	1711–912					
TPC (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού)			4000–400	7	0,9725	1,24	0,7831	3,09
			1800–800	5	0,9713	1,27	0,8210	2,81
			3585–2810	8	0,9728	1,24	0,7700	3,19
			1711–912					

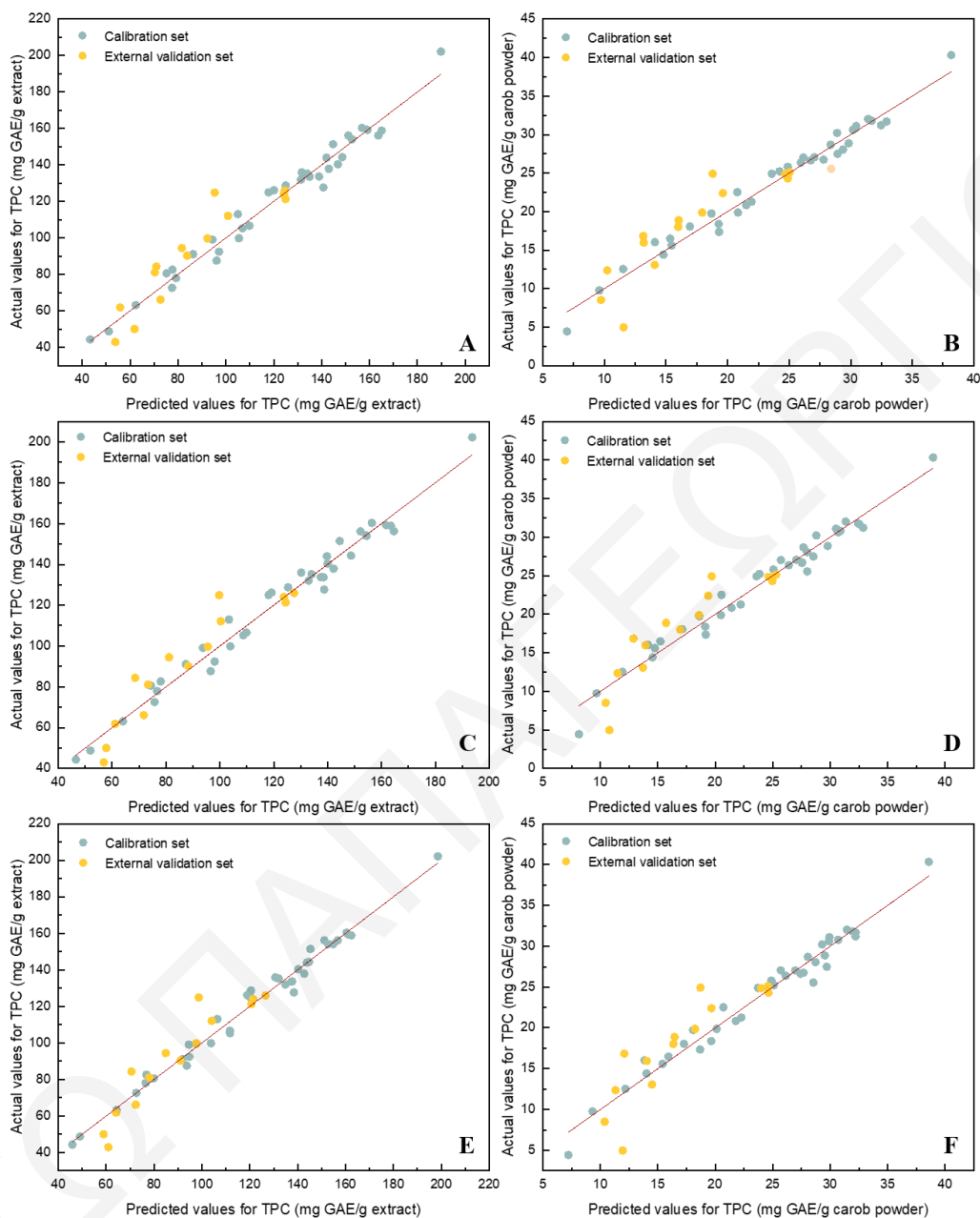
^a Αριθμός δειγμάτων

Ο αριθμός των LVs που υπολογίστηκαν μέσω της τεχνικής CV για όλα τα προγνωστικά μοντέλα βρέθηκε μικρότερος ή ίσος με 9, γεγονός που αποκλείει την υπερπροσαρμογή (*overfitting*) των δεδομένων. Παρατηρώντας τις τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, φαίνεται πως όλα τα μοντέλα έδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα με τιμές συντελεστών προσδιορισμού $r^2_{\text{CAL}} > 0,97$ και r^2_{PRED} σχεδόν ίσο ή μεγαλύτερο από 0,8 και μικρές τιμές για τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP. Στο σχήμα 4.8 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με εφαρμογή του κάθε μοντέλου PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δειγμάτων στις τρεις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

Συγκρίνοντας τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ωστόσο, γίνεται αντιληπτή η μικρή τάση βελτίωσης της προγνωστικής ικανότητας μεταβαίνοντας προς το μοντέλο στο οποίο αξιοποιήθηκαν μόνο οι υποπεριοχές του φάσματος που επιλέγηκαν μέσω του διαγράμματος VIP. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τα όσα κατέδειξαν τα διαγράμματα *loading* στην προηγούμενη ενότητα, συγκλίνοντας στη σημαντική συνεισφορά των δονήσεων των φαινολικών δακτυλίων και των υδροξυλομάδων των πολυφαινολικών μορίων, που εντοπίζονται στις συγκεκριμένες περιοχές, στο συνολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των δειγμάτων.

Η τάση βελτίωσης παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση που οι τιμές αναφοράς της TPC ήταν εκφρασμένες σε mg GAE/g εκχυλίσματος. Αντίθετα, όταν οι τιμές εκφράστηκαν ως mg GAE/g σκόνης χαρουπιού εντοπίστηκε μικρή υποβάθμιση της προγνωστικής ικανότητας και των τριών μοντέλων. Ο λόγος έγκειται στη συνεισφορά του επιπλέον

σφάλματος που προκύπτει από την πραγματοποίηση του σταδίου εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων στην τελική τιμή της TPC.



Σχήμα 4.8. Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν με εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) **A** και **B** σε ολόκληρη την περιοχή του MIR (4000–400 cm^{-1}), **C** και **D** της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος (1800–800 cm^{-1}) και **E** και **F** των υποπεριοχών ~3585–2810 και 1711–912 cm^{-1} . Τα **A**, **C** και **E** κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος, ενώ τα **B**, **D** και **F** με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού.

Ωστόσο, παρά τις ελάχιστα υποβαθμισμένες τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, τα μοντέλα κρίθηκαν ικανά να προχωρήσουν σε πρόβλεψη της TPC (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού) σε άγνωστα δείγματα μελλοντικά, με την ένταξη ενός μεγαλύτερου αριθμού

δειγμάτων να υπόσχεται τη διευρυμένη εφαρμοσιμότητά τους. Η αξιοποίηση των μοντέλων στα οποία οι τιμές αναφοράς της TPC είναι εκφρασμένες σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού παρέχει το σημαντικό πλεονέκτημα του απευθείας προσδιορισμού του αντιοξειδωτικού περιεχομένου της πρώτης ύλης.

Συμπερασματικά λοιπόν, οι μικρές διαφορές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης των μοντέλων που κατασκευάστηκαν βάσει των διαφορετικών περιοχών των φασμάτων δεν αναδεικνύουν κάποια συγκεκριμένη φασματική περιοχή ως χρησιμότερη. Οι λειτουργικές ομάδες των πολυφαινολικών μορίων εντοπίζονται σε ολόκληρο το εύρος του MIR, με επακόλουθο την εξαγωγή της χρήσιμης χημικής-φασματικής πληροφορίας και στις τρεις περιπτώσεις. Ωστόσο, το ελάχιστο βελτιωμένο προγνωστικό μοντέλο PLSR στο οποίο αξιοποιήθηκαν μόνο οι υποπεριοχές που εξήχθησαν από το διάγραμμα VIP έρχεται να συμφωνήσει με την έρευνα των Izadiyan *et al.* στην οποία είχαν αναδειχθεί οι περιοχές 3544–2964, 2901–2633 και 1762–846 cm^{-1} ως οι χρησιμότερες κατά τη συσχέτισή τους με τις τιμές αναφοράς της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων θυμαριού.⁸⁴

4.4.2. Μέθοδοι προεπεξεργασίας φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR

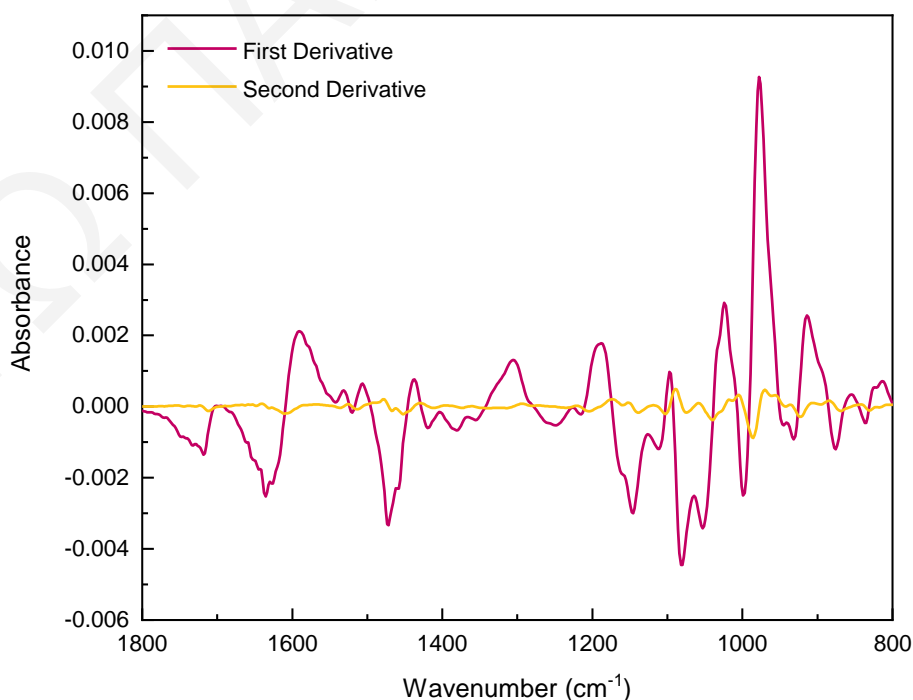
Σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων PLSR είναι η αξιοποίηση της μέγιστης δυνατής φασματικής-χημικής πληροφορίας που περιέχεται στα φάσματα FTIR. Δεδομένης της ύπαρξης σημάτων θορύβου και υποβάθρου στα μη επεξεργασμένα φάσματα, είναι δυνατόν να υποβαθμίζεται η ποιότητα της πληροφορίας που λαμβάνεται, επηρεάζοντας έτσι και την ικανότητα πρόβλεψης των μοντέλων. Για την ελαχιστοποίηση παρεμποδιστικών σημάτων προτείνεται βιβλιογραφικά η εφαρμογή μαθηματικών εργαλείων με στόχο την απομάκρυνση της μη επιθυμητής φυσικής πληροφορίας.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι αλγόριθμοι που εφαρμόζονται κατά το στάδιο προεπεξεργασίας των δεδομένων. Εκτός από την απομάκρυνση της μη χρήσιμης πληροφορίας, η εφαρμογή των μαθηματικών εργαλείων έχει σαν στόχο και τη βελτίωση της ποιότητας των χρήσιμων φασματικών δεδομένων. Τα μαθηματικά εργαλεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα, είτε συνδυαστικά με τα πιο κοινά να στοχεύουν στη διόρθωση της γραμμής του υποβάθρου (*baseline correction*), στην ομαλοποίηση του σχήματος των κορυφών (*smoothing*), στην κανονικοποίηση (*normalization*) ή στην παραγωγοποίηση (*derivatization*) των δεδομένων, στη μετακίνηση των μέσων όρων κ.λπ.

Προκειμένου να διερευνηθεί η βελτίωση της απόδοσης των προγνωστικών μοντέλων, εξετάστηκαν σε αντιπαραβολή τα μοντέλα PLSR που κατασκευάστηκαν με βάση μη

επεξεργασμένα φάσματα FTIR, κανονικοποιημένα φάσματα (*Offset correction*) και παραγωγοποιημένα φάσματα που προέκυψαν με υπολογισμό της πρώτης (*First derivative*) και της δεύτερης παραγώγου (*Second derivative*). Για τη σύγκριση των μεθόδων προεπεξεργασίας επιλέχθηκε το μοντέλο που προβαίνει σε πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης είτε σε mg GAE/g εκχυλίσματος, είτε σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων) στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).

Για την κανονικοποίηση των φασμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος *Offset correction* με στόχο τη μετατόπιση των δεδομένων σε μια καθορισμένη θέση του άξονα yy' και πιο συγκεκριμένα στην αρχή του άξονα, ώστε τα φασματικά δεδομένα των διαφορετικών δειγμάτων να είναι όσο το δυνατόν συγκρίσιμα. Αντίστοιχα, μέσω του υπολογισμού της πρώτης παραγώγου επιχειρήθηκε η ελαχιστοποίηση της ολίσθησης του υποβάθρου και η επισήμανση συγκεκριμένης φασματικής πληροφορίας. Με τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου ελαχιστοποιήθηκε επίσης η ολίσθηση του υποβάθρου, υπερτονίζοντας συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος, ενώ συνάμα μειώθηκε και η γραμμική τάση που εμφανίζουν τα φασματικά δεδομένα.¹¹⁸ Στο σχήμα 4.9, παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα FTIR στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) ενός εκ των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού, που προέκυψαν με τον υπολογισμό της πρώτης και της δεύτερης παραγώγου μη επεξεργασμένου φάσματος.



Σχήμα 4.9. Παραγωγοποιημένα φάσματα FTIR που προέκυψαν με τον υπολογισμό της πρώτης (κόκκινη γραμμή) και της δεύτερης (κίτρινη γραμμή) παραγώγου μη επεξεργασμένου φάσματος πολυφαινολικού εκχυλίσματος σκόνης χαρουπιού, στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).

Για την προσαρμογή και την αξιολόγηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR έγινε τυχαιοποίηση του συνολικού αριθμού δειγμάτων και διαχωρισμός τους στο σετ βαθμονόμησης και στο σετ EV. Κάθε μοντέλο PLSR αξιολογήθηκε με τη χρήση των στατιστικών παραμέτρων r^2_{CAL} , RMSEC, r^2_{PRED} και RMSEP, ενώ η διαδικασία CV πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής *leave-one-out* CV, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο βέλτιστος αριθμός LVs που ήταν ικανός να περιγράψει τη μέγιστη διακύμανση για τις βάσεις δεδομένων X και Y και αντιστοιχούσε στην ελάχιστη τιμή RMPRESS. Ο υπολογισμός του βέλτιστου αριθμού LVs για το κάθε μοντέλο υπολογίστηκε αυτόματα μέσω του υπολογιστικού προγράμματος. Στον πίνακα 4.10 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για τα μοντέλα PLSR μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC των πολυφαινολικών εκχυλίσματος εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.10. Στατιστικά μέτρα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας (*robustness*) των μοντέλων PLSR, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος και σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας επεξεργασμένα ή μη φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR, στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$).

Παράμετρος	N^a	Προεπεξεργασία δεδομένων	cm^{-1}	LVs	Βαθμονόμηση ($N^a=37$)		Εξωτερική Επικύρωση ($N^a=14$)	
					r^2_{CAL}	RMSEC	r^2_{PRED}	RMSEP
TPC (mg GAE/g εκχυλίσματος)	51	Καμία επεξεργασία	1800–800	5	0,9783	5,30	0,8695	10,69
		Κανονικοποίηση		6	0,9504	8,02	0,7890	13,59
		(Offset correction)						
		Παραγωγοποίηση		3	0,8545	13,73	0,7076	16,00
TPC (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού)	51	Καμία επεξεργασία	1800–800	7	0,97151	6,08	0,8773	10,36
		Κανονικοποίηση						
		(Offset correction)						
		Παραγωγοποίηση		10	0,9781	1,11	0,8611	2,58
TPC (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού)	51	Καμία επεξεργασία	1800–800	9	0,9741	1,21	0,6737	3,80
		Κανονικοποίηση						
		(Offset correction)						
		Παραγωγοποίηση		7	0,9729	1,23	0,8206	2,81
TPC (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού)	51	Καμία επεξεργασία	1800–800	10	0,9781	1,11	0,8611	2,58
		Κανονικοποίηση						
		(Offset correction)						
		Παραγωγοποίηση		7	0,9729	1,23	0,8206	2,81

^a Αριθμός δειγμάτων

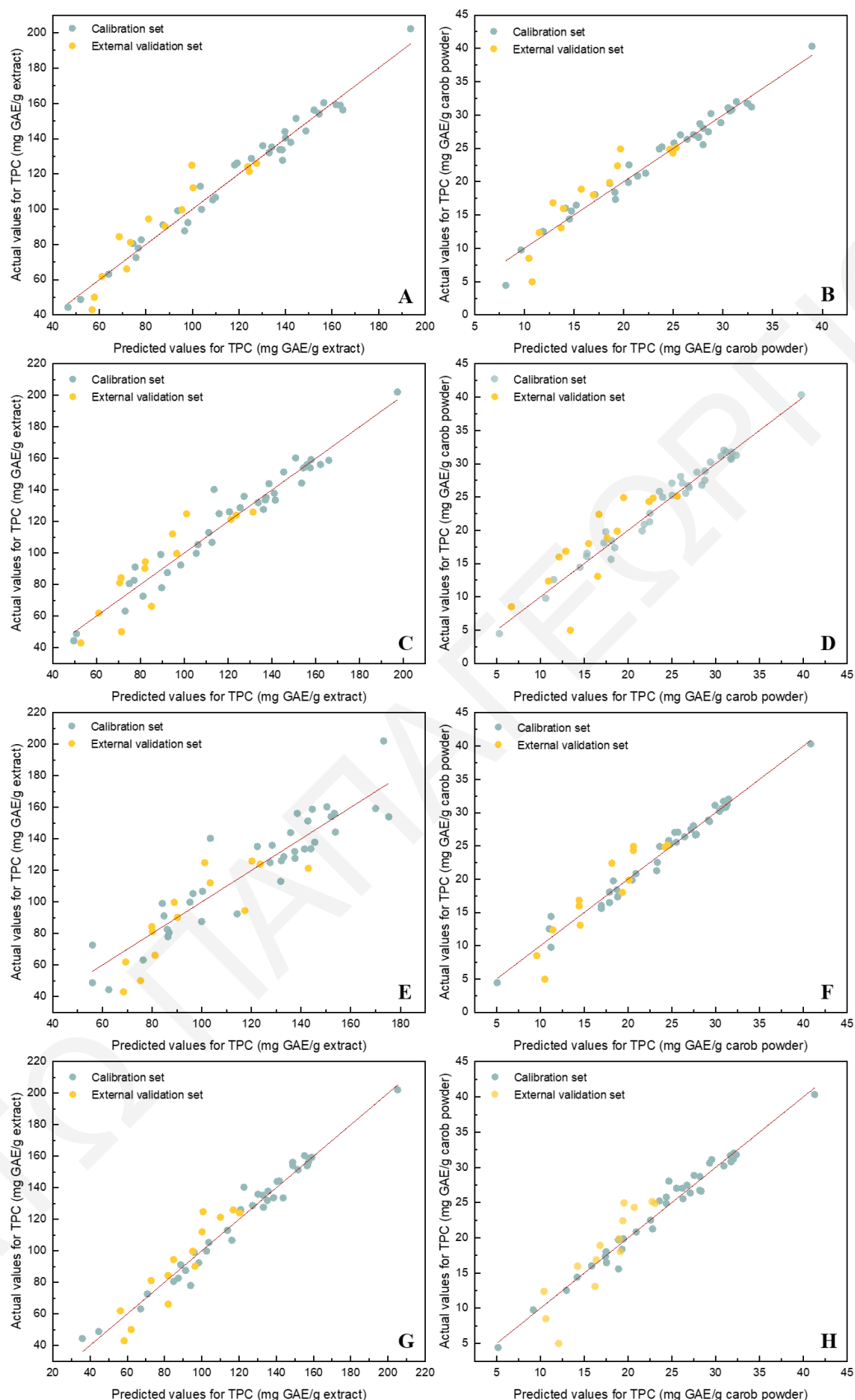
Ο αριθμός των LVs που υπολογίστηκαν μέσω της τεχνικής CV για τα περισσότερα προγνωστικά μοντέλα βρέθηκε μικρότερος ή ίσος με 9, γεγονός που αποκλείει την υπερπροσαρμογή (*overfitting*) των δεδομένων. Ωστόσο, αυξημένος αριθμός LVs, ίσος με 10, υπολογίστηκε για το μοντέλο που προχώρησε σε πρόβλεψη της TPC (mg GAE/g σκόνης

χαρουπιού) αξιοποιώντας τα κανονικοποιημένα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων.

Παρατηρώντας τις τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης, φαίνεται πως τα μοντέλα τα οποία κατασκευάστηκαν με βάση τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR και τα φάσματα που προέκυψαν με τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου και τις τιμές αναφοράς της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος ή σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα με τιμές συντελεστών προσδιορισμού $r^2_{CAL}>0,97$ και $r^2_{PRED}>0,8$ και μικρές τιμές για τα σφάλματα πρόβλεψης, RMSEC και RMSEP. Αντίθετα, τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν με βάση τα κανονικοποιημένα φάσματα ή τα φάσματα που προέκυψαν μετά τον υπολογισμό της πρώτης παραγώγου έδωσαν υποβαθμισμένες τιμές για τους συντελεστές προσδιορισμού και αυξημένες τιμές σφαλμάτων πρόβλεψης, κυρίως στην περίπτωση των δειγμάτων EV.

Εστιάζοντας στο μοντέλο που κατασκευάστηκε αξιοποιώντας τα φάσματα που προέκυψαν με τον υπολογισμό της πρώτης παραγώγου και τις τιμές αναφοράς της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, φαίνεται πως παρά τις αρκετά ικανοποιητικές τιμές των συντελεστών προσδιορισμού, $r^2_{CAL}>0,97$ και $r^2_{PRED}>0,86$ και τα μικρά σφάλματα πρόβλεψης RMSEC και RMSEP, ίσα με 1,11 και 2,58 mg GAE/g σκόνης χαρουπιού, αντίστοιχα, το μοντέλο υστερεί λόγω του αυξημένου αριθμού LVs, ενδεικτικού της αυξημένης πιθανότητας υπερπροσαρμογής (*overfitting*) των δεδομένων. Καταληκτικά λοιπόν, τα μοντέλα που πλεονεκτούν και είναι ικανά να εφαρμοστούν μελλοντικά για τον προσδιορισμό της TPC είτε των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, είτε της πρώτης ύλης της σάρκας είναι αυτά στα οποία αξιοποιήθηκαν τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ή τα φάσματα που προέκυψαν από τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου.

Στο σχήμα 4.10 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με εφαρμογή του κάθε μοντέλου PLSR. Η μέθοδος προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων φαίνεται λοιπόν να αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την ανάπτυξη ικανών προγνωστικών μοντέλων, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τις διαφορές στις τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης των διαφορετικών μοντέλων στην παρούσα ερευνητική μελέτη, αλλά και από αποτελέσματα που παρατίθενται στη βιβλιογραφία. Ο αντίκτυπος των μεθόδων προεπεξεργασίας στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων φαίνεται να εξαρτάται σημαντικά από τη χημική πληροφορία που περιέχεται στα φάσματα και κατ' επέκταση από τη σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ αυτής και των τιμών αναφοράς της προσδιοριζόμενης ιδιότητας.



Σχήμα 4.10. Γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς της TPC και των προβλεπόμενων τιμών που προκύπτουν από την εφαρμογή των μοντέλων PLSR, αξιοποιώντας **A** και **B** τα μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR, **C** και **D** τα κανονικοποιημένα φάσματα (*Offset correction*), **E** και **F** τα παραγωγισιολογικά φάσματα πρώτης παραγώγου και **G** και **H** δεύτερης παραγώγου στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$). Τα **A**, **C** και **E** κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g εκχυλίσματος, ενώ τα **B**, **D** και **F** με βάση τις τιμές της TPC εκφραζόμενης σε mg GAE/g σκόνης χαρουπιού.

Μεταξύ των διαφορετικών ερευνών δεν αναδεικνύεται μια συγκεκριμένη μέθοδος ή ένας συνδυασμός μεθόδων ως καλύτερος. Επομένως, γίνεται ξεκάθαρο πως η σύγκριση των μοντέλων που προκύπτουν με εφαρμογή της ίδιας μεθόδου προεπεξεργασίας γίνεται δύσκολη όταν πρόκειται για φασματοσκοπικά δεδομένα που αναφέρονται σε διαφορετικά τρόφιμα ή εκχυλίσματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μελέτης που προχώρησε σε σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων προεπεξεργασίας με γνώμονα τον αντίκτυπο που αυτές έχουν στην προγνωστική ικανότητα των μοντέλων είναι εκείνη των Preserona *et al.*, οι οποίοι εντόπισαν διαφορετική τάση βελτίωσης για τα δείγματα κόκκινων και ροζέ κρασιών σε σχέση με τα λευκά κρασιά. Συγκεκριμένα, αναφέρθηκαν καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση των κόκκινων και ροζέ κρασιών αξιοποιώντας μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR και καλύτερα αποτελέσματα για τα λευκά κρασιά με την αξιοποίηση φασμάτων που προέκυψαν με τον υπολογισμό της πρώτης παραγώγου.⁷⁷

Αντίστοιχα, η ερευνητική μελέτη των Liang *et al.* προχώρησε στη σύγκριση των προγνωστικών μοντέλων που κατασκευάστηκαν με αξιοποίηση επεξεργασμένων ή μη φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR δειγμάτων κόκκων καφέ. Συγκεκριμένα, συνέκριναν τα μοντέλα που προχώρησαν σε προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισομερών πολυφαινολικών ενώσεων αναφέροντας σημαντική βελτίωση των στατιστικών παραμέτρων στην περίπτωση αξιοποίησης των παραγωγοποιημένων φασμάτων, ενώ ανέφεραν την βελτιωμένη εικόνα που παρατηρήθηκε στα περισσότερα μοντέλα με αξιοποίηση των δεδομένων που προέκυψαν με υπολογισμό της πρώτης παραγώγου σε σχέση με τη δεύτερη.

Συμπερασματικά λοιπόν, η μέθοδος προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων μπορεί να επηρεάσει σε διαφορετικό βαθμό την προγνωστική ικανότητα των μοντέλων αναλόγως της μήτρας του τροφίμου/εκχυλίσματος, του φασματικού αποτυπώματος και της συσχέτισής του με τις τιμές αναφοράς. Η εύρεση της βέλτιστης μεθόδου προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων δεν αποτελεί ένα ζήτημα που αποζητά μια μονοδιάστατη λύση. Αντίθετα, τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονται κατόπιν εκτεταμένης σύγκρισης των μοντέλων που προκύπτουν από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων και/ή συνδυασμών τους με την κατανόηση τους να προϋποθέτει την εις βάθος μελέτη των συστημάτων τόσο από τη σκοπιά της στατιστικής ανάλυσης, όσο και από αυτήν που εξετάζει τη φυσικοχημική συμπεριφορά των δειγμάτων.

Κεφάλαιο 5 | Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία

5.1. Συμπεράσματα

Το χαρούπι, γνωστό ως ο «μαύρος χρυσός» της Κύπρου εδώ και αρκετές δεκαετίες, φημίζεται για τη σημαντική περιεκτικότητά του σε θρεπτικά συστατικά. Μέρος της ευεργετικής του δράσης αποδόθηκε στην παρουσία και τη δράση των πολυφαινολικών μορίων που εντοπίζονται κυρίως στο κομμάτι της σάρκας. Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων χαρουπιού παρακίνησε τους ερευνητές να εξετάσουν το θέμα από πολλές και διαφορετικές σκοπιές.

Αρκετές μελέτες στόχευσαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και/ή της αντιοξειδωτικής ικανότητας του καρπού, διάφορων προϊόντων χαρουπιού ή ακόμα και εκχυλισμάτων, εφαρμόζοντας συμβατικές αναλυτικές μεθόδους. Παρά το γεγονός ότι οι συμβατικές μέθοδοι αποτέλεσαν τη βάση για την εξέλιξη των ερευνών, δεν μπορούν να αγνοηθούν ορισμένοι σημαντικοί περιορισμοί. Συγκεκριμένα, τα διαφορετικής φύσης αντιδραστήρια, οι διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης και ο πολυδιάστατος τρόπος με τον οποίο δρουν τα ποικίλα αντιοξειδωτικά, επιβάλλουν την εφαρμογή δύο και/ή περισσότερων τέτοιων μεθόδων. Οι χρονοβόρες διαδικασίες επεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων, αλλά και η κατανάλωση μεγάλου όγκου αντιδραστηρίων με αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον, κρίθηκαν παράγοντες αρκετά σημαντικοί για την αναζήτηση μιας εναλλακτικής προσέγγισης.

Για τον σκοπό αυτό, τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες στράφηκαν με ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς τις φασματοσκοπικές τεχνικές, οι οποίες πέραν των πλεονεκτημάτων τους, παρουσίασαν και βελτιωμένη ευελιξία με την άνοδο της χημειομετρίας. Τα σημαντικά προτερήματα της φασματοσκοπίας FTIR, όπως είναι η ταχύτατη απόκριση, η αποφυγή επεξεργασίας του δείγματος, η ικανοποιητική ευαισθησία και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, σε συνδυασμό με τις δυνατότητες που παρέχει η χημειομετρική ανάλυση μπορούν να αξιοποιηθούν για την επίτευξη του στόχου. Σύμφωνα, με βιβλιογραφικές αναφορές, ο ποσοτικός προσδιορισμός διάφορων αντιοξειδωτικών παραμέτρων με αξιοποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR έχει επιτευχθεί σε αρκετά τρόφιμα ή εκχυλίσματα, μέσω ανάπτυξης μοντέλων πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Επικρατέστερη χημειομετρική μέθοδος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι η PLSR.

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής μελέτης, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων σκόνης χαρουπιού, αξιοποιώντας τα

φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών τους εκχυλισμάτων, παρακάμπτοντας έτσι τις χρονοβόρες εργαστηριακές διαδικασίες ανάλυσης που προϋποθέτουν οι συμβατικές μέθοδοι. Με την κατασκευή των μοντέλων επιχειρήθηκε κατά βάση η γραμμική συσχέτιση των τιμών αναφοράς που προέκυψαν από τις συμβατικές μεθόδους Folin-Ciocalteu, απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, FRAP και της συγκέντρωσης μονομερούς γαλλικού οξέος με τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων).

Κατόπιν στατιστικής αξιολόγησης και σύγκρισης των μοντέλων PLSR που κατασκευάστηκαν με αξιοποίηση των τιμών αναφοράς των διαφορετικών συμβατικών μεθόδων και των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των εκχυλισμάτων στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1800-800\text{ cm}^{-1}$), φάνηκε πως καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το μοντέλο που προχώρησε σε πρόβλεψη της TPC ($\text{mg GAE/g εκχυλίσματος}$), με υψηλά αναφερόμενη συσχέτιση των τιμών αναφοράς που προέκυψαν με εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu και των προβλεπόμενων τιμών που προέκυψαν με την αξιοποίηση του μοντέλου. Υψηλή συσχέτιση επιτεύχθηκε τόσο για τα δείγματα βαθμονόμησης ($r^2_{\text{CAL}} > 0,97$), όσο και για τα δείγματα EV ($r^2_{\text{PRED}} > 0,86$).

Υποβαθμισμένες βρέθηκαν οι τιμές των στατιστικών μέτρων αξιολόγησης για τα μοντέλα που προχώρησαν σε πρόβλεψη της TAC των δειγμάτων όπως αυτή εκφράστηκε, είτε μέσω της τιμής EC_{50} ($\mu\text{g/mL εκχυλίσματος}$) για απόσβεση της ελεύθερης ρίζας DPPH ($r^2_{\text{CAL}} > 0,88$ και $r^2_{\text{PRED}} > 0,76$), είτε μέσω της μεθόδου FRAP ($\text{mg TE/g εκχυλίσματος}$) ($r^2_{\text{CAL}} > 0,74$ και $r^2_{\text{PRED}} > 0,83$). Οι μειωμένες τιμές των συντελεστών προσδιορισμού πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων αντιδραστηρίου–αντιοξειδωτικής ένωσης που επικρατούν σε κάθε περίπτωση ή στην έλλειψη εκλεκτικότητας των μεθόδων. Ωστόσο, οι τιμές εμπίπτουν σχεδόν στα αποδεκτά όρια της βιβλιογραφίας ($r^2 > 0,8$) σκιαγραφώντας την ενδεχόμενη εφαρμοσιμότητα των μοντέλων με την ένταξη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων στο σετ βαθμονόμησης.

Το μοντέλο που επιχείρησε την πρόβλεψη της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα, κρίθηκε ανεπιτυχές με βάση τις χαμηλές τιμές των συντελεστών προσδιορισμού, r^2_{CAL} και r^2_{PRED} , οι οποίοι υπολογίστηκαν ίσοι με 0,3618 και 0,0211, αντίστοιχα. Η χαμηλή προγνωστική ικανότητα του μοντέλου έγκειται στην ασθενή συσχέτιση μεταξύ των τιμών αναφοράς της συγκέντρωσης μονομερούς γαλλικού οξέος που προσδιορίστηκε μέσω του χρωματογραφικού διαχωρισμού (RP-HPLC) και των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων. Στα φάσματα FTIR αποτυπώνονται οι δονήσεις των δεσμών που εντοπίζονται τόσο στο μονομερές, όσο

και στη συζευγμένη ή χημικά δεσμευμένη μορφή του γαλλικού οξέος, με αποτέλεσμα η συσχέτισή τους με τη συγκέντρωση της μονομερούς μορφής και μόνο να είναι αρκετά χαμηλή.

Μέσω της σύγκρισης των μοντέλων PLSR που αναπτύχθηκαν με βάση διαφορετικές περιοχές του MIR (4000–400 cm^{-1}), φάνηκε πως οι διαφορές μεταξύ των μοντέλων που αξιοποίησαν ολόκληρη την περιοχή του MIR, μόνο την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος (1800–800 cm^{-1}) των πολυφαινολικών μορίων ή τις υποπεριοχές 3585–2810 και 1711–912 cm^{-1} ήταν ελάχιστες, με μικρή τάση βελτίωσης στην περίπτωση του τελευταίου. Σε συνδυασμό με τα διαγράμματα *loading*, οι κορυφές (cm^{-1}) των φασμάτων FTIR των εκχυλισμάτων που συσχετίστηκαν άμεσα με τις τιμές αναφοράς της TPC και της TAC, ήταν αυτές που αποδόθηκαν σε δονήσεις υδροξυλομάδων και φαινολικών δακτυλίων, αποδεικνύοντας την κυριαρχία των πολυφαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Επιπλέον, οι αντιφάσεις της βιβλιογραφίας αποτέλεσαν κίνητρο για τη μελέτη της επίδρασης της μεθόδου προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR στα προγνωστικά αποτελέσματα των μοντέλων. Για τον σκοπό αυτό, έγινε σύγκριση των μοντέλων που κατασκευάστηκαν με βάση μη επεξεργασμένα φάσματα FTIR ή επεξεργασμένα φάσματα που προέκυψαν με κανονικοποίηση (*Offset correction*) ή παραγωγοποίηση. Καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν τα μοντέλα που αξιοποίησαν είτε μη επεξεργασμένα φάσματα, είτε φάσματα που προέκυψαν από τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου (*Second derivative*).

Στοχεύοντας στην αποφυγή της χρονοβόρας διαδικασίας εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων από τη σάρκα του καρπού επιχειρήθηκε επίσης, η ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR με αξιοποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR λυοφιλιωμένων δειγμάτων σκόνης χαρουπιού. Ωστόσο, τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν δεν ήταν ικανά να προχωρήσουν σε πρόβλεψη των αντιοξειδωτικών παραμέτρων. Εξετάζοντας τα φάσματα FTIR των διαφορετικών δειγμάτων σκόνης, διαπιστώθηκε πως η σημαντική συνεισφορά των υδατανθρακικών μορίων στο συνολικό φασματικό αποτύπωμα είχε σαν αποτέλεσμα την επικάλυψη κορυφών που αποδίδονται σε δονήσεις των δεσμών των πολυφαινολικών συστατικών. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη γραμμικής σχέσης μεταξύ των φασματικών χαρακτηριστικών και των τιμών αναφοράς δεν κατέστη δυνατή, υπογραμμίζοντας την ανάγκη πραγματοποίησης του σταδίου εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, τα υδατανθρακικά μόρια συνεισφέρουν στα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις συμβατικές μεθόδους. Επομένως, εξετάστηκε κατά πόσο η παρουσία τους στα πολυφαινολικά εκχυλίσματα μπορεί να επηρεάσει εξίσου τα

φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR, ευνοώντας ή παρεμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συσχέτισή τους με τις τιμές αναφοράς. Στα πλαίσια του πρώιμου σχεδιασμού της πειραματικής διαδικασίας, η αποτυχία των προγνωστικών μοντέλων στα οποία αξιοποιήθηκαν τα φάσματα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (παρουσία σακχάρων) κατέδειξε την έλλειψη συσχέτισης και την ανάγκη απομάκρυνσης των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων με την πραγματοποίηση του σταδίου της κρύας υδατικής εκχύλισης.

Καταληκτικά λοιπόν, επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό της TPC πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σκόνης χαρουπιού (mg GAE/g εκχυλίσματος) ή της πρώτης ύλης της σάρκας (mg GAE/g σκόνης χαρουπιού), αξιοποιώντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (απουσία σακχάρων). Επίσης, κατασκευάστηκαν μοντέλα PLSR ικανά για σκιαγράφιση της TAC των εκχυλισμάτων, όπως αυτή μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση της τιμής EC₅₀ (μg/mL εκχυλίσματος) για απόσβεση της ελεύθερης ρίζας DPPH ή μέσω της μεθόδου FRAP (mg TE/g εκχυλίσματος). Επομένως, μέσω της λήψης ενός φάσματος FTIR του πολυφαινολικού εκχυλίσματος κάποιου άγνωστου δείγματος και εφαρμογής των μοντέλων PLSR, μπορεί να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των παραμέτρων της TPC και της TAC, με ακρίβεια παρόμοια με αυτήν των μεθόδων αναφοράς, παρακάμπτοντας τις χρονοβόρες εργαστηριακές διαδικασίες ανάλυσης και ό,τι αυτές επακολουθούν.

5.2. Μελλοντική Εργασία

Για τη βελτιστοποίηση των προγνωστικών μοντέλων PLSR που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής μελέτης και είχαν σαν στόχο τον απευθείας προσδιορισμό της TPC και της TAC δειγμάτων σκόνης χαρουπιού αξιοποιώντας φασματοσκοπικά δεδομένα FTIR, οι μελλοντικές έρευνες μπορούν να επικεντρωθούν στα εξής σημεία:

1. Ένταξη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων με διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά κατά το στάδιο προσαρμογής των υφιστάμενων μοντέλων PLSR, με στόχο τη διευρυμένη προγνωστική ικανότητα και εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε άγνωστα δείγματα. Σημαντικά περιθώρια βελτίωσης επιδέχονται τα μοντέλα που αξιοποίησαν τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από τη μέθοδο απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και τη μέθοδο FRAP.
2. Ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για τον απευθείας προσδιορισμό αντιοξειδωτικών παραμέτρων με τη χρήση διαφορετικών συμβατικών μεθόδων (π.χ. ORAC, CUPRAC, απόσβεσης της κατιονικής ρίζας ABTS κ.ά.) ή αξιοποιώντας

φασματοσκοπικά δεδομένα που προκύπτουν από άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως είναι η τεχνική NIR ή η τεχνική σκεδασμού Raman.

3. Σύγκριση διαφορετικών μεθόδων προεπεξεργασίας των φασμάτων FTIR ή συνδυασμού μεθόδων με στόχο τη βελτιωμένη προγνωστική ικανότητα των μοντέλων.
4. Προσπάθεια παράκαμψης του χρονοβόρου σταδίου εκχύλισης των πολυφαινολικών ενώσεων, στοχεύοντας στον απευθείας προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών παραμέτρων με αξιοποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR της ακατέργαστης πρώτης ύλης της σάρκας. Εναλλακτικά, μπορούν να γίνουν προσπάθειες για συντόμευση του σταδίου προκατεργασίας του δείγματος, στοχεύοντας αποκλειστικά στην απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων και τη συμπύκνωση των πολυφαινολών.
5. Ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων PLSR για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών παραμέτρων προϊόντων χαρουπιού και/ή εκχυλισμάτων τους με αξιοποίηση των φασματοσκοπικών FTIR χαρακτηριστικών τους.

Βιβλιογραφία

- (1) Lu, X.; Rasco, B. A. Determination of Antioxidant Content and Antioxidant Activity in Foods Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52* (10), 853–875.
- (2) Harman, D. Free Radicals in Aging. *Mol. Cell. Biochem.* **1988**, *84* (2), 155–161.
- (3) Wu, D.; Chen, J.; Lu, B.; Xiong, L.; He, Y.; Zhang, Y. Application of near Infrared Spectroscopy for the Rapid Determination of Antioxidant Activity of Bamboo Leaf Extract. *Food Chem.* **2012**, *135* (4), 2147–2156.
- (4) Ayache, S. ben; Saafi, E. B.; Emhemmed, F.; Flamini, G.; Achour, L.; Muller, C. D. Biological Activities of Aqueous Extracts from Carob. *Molecules.* **2020**, *25* (3120), 1–16.
- (5) Pisoschi, A. M.; Pop, A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 55–74.
- (6) Loullis, A.; Pinakoulaki, E. Carob as Cocoa Substitute: A Review on Composition, Health Benefits and Food Applications. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244* (6), 959–977.
- (7) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 4290–4302.
- (8) Ydjedd, S.; Chaalal, M.; Richard, G.; Kati, D. E.; López-Nicolás, R.; Fauconnier, M. L.; Louaileche, H. Assessment of Antioxidant Potential of Phenolic Compounds Fractions of Algerian Ceratonia Siliqua L. Pods during Ripening Stages. *Int. Food Res. J.* **2017**, *24* (5), 2041–2049.
- (9) Boublenza, I.; el haitoum, A.; Ghezlaoui, S.; Mahdad, M.; Vasaï, F.; Chemat, F. Algerian Carob (Ceratonia Siliqua L.) Populations. Morphological and Chemical Variability of Their Fruits and Seeds. *Sci. Hortic.* **2019**, *256*, 108537.
- (10) <https://www.atthemummiesball.com/toast-beer-eternity/> (accessed September, 2021).
- (11) Papaefstathiou, E.; Agapiou, A.; Giannopoulos, S.; Kokkinofa, R. Nutritional Characterization of Carobs and Traditional Carob Products. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6* (8), 2151–2161.
- (12) FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (accessed September, 2021).
- (13) Goulas, V.; Stylos, E.; Chatziathanasiadou, M. v.; Mavromoustakos, T.; Tzakos, A. G. Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (11).
- (14) Nasar-Abbas, S. M.; e-Huma, Z.; Vu, T. H.; Khan, M. K.; Esbenshade, H.; Jayasena, V. Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (1), 63–72.
- (15) Davies, W. N. L. The Carob Tree and Its Importance in the Agricultural Economy of Cyprus. *Econ. Bot.* **1970**, *24*(4), 460–470.
- (16) Batal, E.; el Batal, H.; Hasib, A.; Dehbi, F.; Zaki, N.; Ouattmane, A.; Boulli, A. Assessment of Nutritional Composition of Carob Pulp (Ceratonia Siliqua L.) Collected from Various Locations in Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* **2016**, *7* (9), 3278–3285.

- (17) Makris, D. P.; Kefalas, P. Carob Pods (*Ceratonía Siliqua* L.) As a Source of Polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, 42 (2), 105–108.
- (18) Salinas, M. v.; Carbas, B.; Brites, C.; Puppo, M. C. Influence of Different Carob Fruit Flours (*Ceratonía Siliqua* L.) on Wheat Dough Performance and Bread Quality. *Food Bioproc. Tech.* **2015**, 8 (7), 1561–1570.
- (19) <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/watercolor-carob-painted-isolated-superfood-on-vector-36045939> (accessed September, 2021).
- (20) Custódio, L.; Escapa, A. L.; Fernandes, E.; Fajardo, A.; Aligué, R.; Alberício, F.; Neng, N.; Nogueira, J. M. F.; Romano, A. Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Carob Tree (*Ceratonía Siliqua* L.) Germ Flour Extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2011**, 66 (1), 78–84.
- (21) Roseiro, L. B.; Tavares, C. S.; Roseiro, J. C.; Rauter, A. P. Antioxidants from Aqueous Decoction of Carob Pods Biomass (*Ceratonía Siliqua* L.): Optimisation Using Response Surface Methodology and Phenolic Profile by Capillary Electrophoresis. *Ind. Crops Prod.* **2013**, 44, 119–126.
- (22) Almanasrah, M.; Roseiro, L. B.; Bogel-Lukasik, R.; Carvalheiro, F.; Brazinha, C.; Crespo, J.; Kallioinen, M.; Mänttari, M.; Duarte, L. C. Selective Recovery of Phenolic Compounds and Carbohydrates from Carob Kibbles Using Water-Based Extraction. *Ind. Crops Prod.* **2015**, 70, 443–450.
- (23) El Bouzdoudi, B.; El Ansari, Z.; Mangalagiu, I.; Mantu, D.; Badoc, A.; Lamarti, A. Determination Of Polyphenols Content In Carob Pulp From Wild And Domesticated Moroccan Trees. *Am. J. Plant Sci.* **2016**, 07 (14), 1937-1951.
- (24) Goulas, V.; Georgiou, E. Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential: Extraction Optimization and Application in Food Models. *Foods.* **2020**, 9 (1).
- (25) Brassesco, M. E.; Brandão, T. R. S.; Silva, C. L. M.; Pintado, M. Carob bean (*Ceratonía siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, 114, 310-322.
- (26) Karim, A. A.; Azlan, A. Fruit Pod Extracts as a Source of Nutraceuticals and Pharmaceuticals. *Molecules.* **2012**, 11931–11946.
- (27) Pinho, E.; Grootveld, M.; Soares, G.; Henriques, M. Cyclodextrins as Encapsulation Agents for Plant Bioactive Compounds. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 121–135.
- (28) Lakkab, I.; el Hajaji, H.; Lachkar, N.; Lefter, R.; Ciobica, A.; el Bali, B.; Lachkar, M. *Ceratonía Siliqua* L. Seed Peels: Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Effect on Mood Disorders. *J. Funct. Foods.* **2019**, 54, 457–465.
- (29) Hajieva, P. The Effect of Polyphenols on Protein Degradation Pathways: Implications for Neuroprotection. *Molecules.* **2017**, 22(1), 159.
- (30) Niedzwiecki, A.; Roomi, M. W.; Kalinovsky, T.; Rath, M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients.* **2016**, 8(9), 552.
- (31) Podsedek, A. Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity of Brassica Vegetables: A Review. *LWT – Food Sci. Technol.* **2007**, 40 (1), 1–11.
- (32) Avallone, R.; Plessi, M.; Baraldi, M.; Monzani, A. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonía Siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *J. Food Compos. Anal.* **1997**, 10.

- (33) Custódio, L.; Fernandes, E.; Romano, A. Quantification of Polyphenols in Carob Tree (*Ceratonia Siliqua* L.) Fruits and Leaves in Portuguese Cultivars. *Acta Hortic.* **2009**, 841, 503–506.
- (34) Benchikh, Y.; Louaileche, H.; George, B.; Merlin, A. Changes in Bioactive Phytochemical Content and in Vitro Antioxidant Activity of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) as Influenced by Fruit Ripening. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 60, 298–303.
- (35) Stavrou, I. J.; Christou, A.; Kapnissi-Christodoulou, C. P. Polyphenols in Carobs: A Review on Their Composition, Antioxidant Capacity and Cytotoxic Effects, and Health Impact. *Food Chem.* **2018**, 355–374.
- (36) Ruiz-Roso, B.; Quintela, J. C.; de la Fuente, E.; Haya, J.; Pérez-Olleros, L. Insoluble Carob Fiber Rich in Polyphenols Lowers Total and Ldl Cholesterol in Hypercholesterolemic Subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, 65 (1), 50–56.
- (37) Lam, H. S.; Proctor, A.; Howard, L.; Cho, M. J. Rapid Fruit Extracts Antioxidant Capacity Determination by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Food Sci.* **2006**, 70 (9), 545–549.
- (38) Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H. R.; Mellenthin, A.; Haber, B.; Galensa, R. Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia Siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (12), 3784–3791.
- (39) Christou, A.; Stavrou, I. J.; Kapnissi-Christodoulou, C. P. Combined Use of β -Cyclodextrin and Ionic Liquid as Electrolyte Additives in EKC for Separation and Determination of Carob's Phenolics—A Study of the Synergistic Effect. *Electrophoresis.* **2021**, 42 (19), 1945–1955.
- (40) Gupta, D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2015**, 6 (2), 546.
- (41) Huang, D.; Boxin, O. U.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 1841–1856.
- (42) Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods.* **2009**, 2 (1), 41–60.
- (43) MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M. L. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in Vitro: A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 2046–2056.
- (44) Blainski, A.; Lopes, G. C.; de Mello, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules.* **2013**, 18 (6), 6852–6865.
- (45) Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, 73, 627–650.
- (46) Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, 48(4), 412–422.
- (47) <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> (accessed September, 2021)
- (48) Batista, N. N.; de Andrade, D. P.; Ramos, C. L.; Dias, D. R.; Schwan, R. F. Antioxidant Capacity of Cocoa Beans and Chocolate Assessed by FTIR. *Food Res. Int.* **2016**, 90, 313–319.

- (49) Caramês, E. T. S.; Alamar, P. D.; Pallone, J. A. L. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity in Freeze-Dried Red Cabbage by FT-NIR and MIR Spectroscopy and Chemometric Tools. *Food Anal. Methods*. **2019**, *13*, 78-85.
- (50) Ghosh, P. K.; Jayas, D. S. Use of Spectroscopic Data for Automation in Food Processing Industry. *Sens. Instrum. for Food Qual. Saf.* **2009**, *3* (1), 3–11.
- (51) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, (μτφ. Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης). Κωσταράκης: Αθήνα, 2010.
- (52) Smith, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press, 2011.
- (53) Karoui, R.; Downey, G.; Blecker, C. Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships-A Review. *Chem. Rev.* **2010**, *110*(10), 6144-6168.
- (54) Hollas, J. *Basic Atomic and Molecular Spectroscopy*; Wiley-Interscience: New York, 2022.
- (55) <https://eclass.uniwa.gr/modules/document/file.php/BISC108/%CE%A0%CE%B5%CE%B9%CF%81%CE%B1%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%20%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%BF%CF%82%20FT-IR.pdf> (accessed August, 2021).
- (56) Winder, C. L.; Goodacre, R. Comparison of Diffuse-Reflectance Absorbance and Attenuated Total Reflectance FT-IR for the Discrimination of Bacteria. *Analyst*. **2004**, *129* (11), 1118–1122.
- (57) Yaman, N.; Velioglu, S. D. Use of Attenuated Total Reflectance—Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy in Combination with Multivariate Methods for the Rapid Determination of the Adulteration of Grape, Carob and Mulberry Pekmez. *Foods*. **2019**, *8* (7), 231.
- (58) https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-981-33-6084-6_1 (accessed August, 2021).
- (59) Geladi, P.; Esbensen, K. The start and early history of chemometrics: selected interviews, Part 1. *J. Chemometr.* **1990**, *4*, 337–354.
- (60) Geladi, P.; Esbensen, K. The start and early history of chemometrics: selected interviews, Part 2. *J. Chemometr.* **1990**, *4*, 389–412.
- (61) Geladi, P. Chemometrics In Spectroscopy. Part 1. Classical Chemometrics. *Spectrochim. Acta B*. **2003**, *58*, 767-782.
- (62) Massart, D. L.; Vandeginste, B. J. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.
- (63) Kowalski, B. R. Chemometrics: views and propositions, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1975**, *15*, 201–203.
- (64) Rajalahti, T.; Kvalheim, O. M. Multivariate Data Analysis in Pharmaceuticals: A Tutorial Review. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 280–290.
- (65) Kumar, N.; Bansal, A.; Sarma, G. S.; Rawal, R. K. Chemometrics Tools Used in Analytical Chemistry: An Overview. *Talanta*. **2014**, *123*, 186–199.
- (66) Roberts, J. J.; Cozzolino, D. An Overview on the Application of Chemometrics in Food Science and Technology—An Approach to Quantitative Data Analysis. *Food Analy. Methods*. **2016**, *9*, 3258–3267.

- (67) Tarapoulouzi, M. Chemometric characterisation of Cypriot traditional cheese Halloumi. Ph.D. Dissertation, University of Cyprus, Nicosia, 2020.
- (68) Hopke, P. K. The Evolution of Chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *500*, 365–377.
- (69) Fernandez, K.; Agosin, E. Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *J Agric Food Chem* **2007**, *55* (24), 7294–7300.
- (70) Versari, A.; Paola, G.; Scazzina, F.; Del, D. Prediction of Total Antioxidant Capacity of Red Wine by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Control.* **2010**, *21* (5), 786–789.
- (71) Lu, X.; Wang, J.; Al-Qadiri, H. M.; Ross, C. F.; Powers, J. R.; Tang, J.; Rasco, B. A. Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Onion (*Allium Cepa*) and Shallot (*Allium Oschaninii*) Using Infrared Spectroscopy. *Food Chem.* **2011**, *129* (2), 637–644.
- (72) Lu, X.; Ross, C. F.; Powers, J. R.; Aston, D. E.; Rasco, B. A. Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Garlic (*Allium Sativum*) and Elephant Garlic (*Allium Ampeloprasum*) by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (10), 5215–5221.
- (73) Jantasee, A.; Thumanu, K. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Antioxidant Capacity Determination in Colored Glutinous Rice. *Food Anal. Methods.* **2014**, *7*, 389–399.
- (74) Silva, S. D.; Feliciano, R. P.; Boas, L. v; Bronze, M. R. Application of FTIR-ATR to Moscatel Dessert Wines for Prediction of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity. *Food Chem.* **2014**, *150*, 489–493.
- (75) Wu, Z.; Xu, E.; Long, J.; Pan, X.; Xu, X.; Jin, Z.; Jiao, A. Comparison between ATR-IR, Raman, Concatenated ATR-IR and Raman Spectroscopy for the Determination of Total Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Chinese Rice Wine. *Food Chem.* **2016**, *194*, 671–679.
- (76) Hemmateenejad, B.; Karimi, S.; Javidnia, K. Classification and Assessment of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Different Varieties of Date Palm (*Phoenix Dactylifera*) Fruits from Iran. *J. Iran. Chem. Soc.* **2015**, *12*, 1935–1943.
- (77) Preserova, J.; Ranc, V.; Milde, D.; Kubistova, V.; Stavek, J. Study of Phenolic Profile and Antioxidant Activity in Selected Moravian Wines during Winemaking Process by FT-IR Spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 6405–6414.
- (78) Liang, N.; Lu, X.; Hu, Y.; Kitts, D. Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy to Determine Chlorogenic Acid Isomer Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Beans Antioxidant Capacity of Coffee Beans. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 681–689.
- (79) Hu, Y.; Pan, Z. J.; Liao, W.; Li, J.; Gruget, P.; Kitts, D. D. Determination of Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Chocolate by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed-Infrared Spectroscopy. *Food Chem.* **2016**, *202*, 254–261.
- (80) Caramês, E. T. S.; Alamar, P. D.; Poppi, R. J.; Pallone, J. A. L. Rapid Assessment of Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Grape Juice Using Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Anal. Methods.* **2017**, *10* (5), 1609–1615.
- (81) Zheng, X.; Hu, Y.; Anggreani, E.; Lu, X. Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberries Using Fourier Transformed Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Raman Spectroscopy. *J. Food Meas. Charact.* **2017**, *11*, 1909–1918.

- (82) Venetsanou, A.; Anastasaki, E.; Gardeli, C.; Tarantilis, P. A.; Pappas, C. S. Estimation of Antioxidant Activity of Different Mixed Herbal Infusions Using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Emir. J. Food Agric.* **2017**, 29 (2), 149–155.
- (83) Elrasheid, H.; Xiaobo, Z.; Zhihua, L.; Jiyong, S.; Zhai, X.; Wang, S.; Adam, A. Rapid Prediction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sudanese Honey Using Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Food Chem.* **2017**, 226, 202–211.
- (84) Izadiyan, P.; Hemmateenejad, B.; Taghavi, S. M. Discrimination of Shirazi Thyme from Thymus Species and Antioxidant Activity Prediction Using Chemometrics and FT-IR Spectroscopy. *J. Iran. Chem. Soc.* **2017**, 15, 259–268.
- (85) Clark, C. J.; Cooney, J. M.; Hopkins, W. A.; Currie, A. Global Mid-Infrared Prediction Models Facilitate Simultaneous Analysis of Juice Composition from Berries of Actinidia, Ribes, Rubus and Vaccinium Species. *Food Anal. Methods.* **2018**, 11 (11), 3147–3160.
- (86) Kadiroğlu, P.; Aydemir, L. Y.; Akcakaya, F. G. Prediction of functional properties of registered chickpea samples using FT-IR spectroscopy and chemometrics. *LWT – Food Sci. Technol.* **2018**, 93, 463–469.
- (87) Silva, C.; Prasniewski, A.; Calegari, M. A.; Lima, V. A. de. Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR-FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Anal. Methods.* **2018**, 11 (7), 2013–2021.
- (88) Carbas, B.; Machado, N.; Oppolzer, D.; Queiroz, M.; Brites, C.; Rosa, E. A. S.; Barros, A. I. R. N. A. Prediction of Phytochemical Composition, In Vitro Antioxidant Activity and Individual Phenolic Compounds of Common Beans Using MIR and NIR Spectroscopy. *Food Bioproc. Technol.* **2020**, 13 (6), 962–977.
- (89) Valasi, L.; Arvanitaki, D.; Mitropoulou, A.; Georgiadou, M.; Pappas, C. S. Study of the Quality Parameters and the Antioxidant Capacity for the Ftir-Chemometric Differentiation of Pistacia Vera Oils. *Molecules.* **2020**, 25 (7), 1614.
- (90) Deus, V. L.; Resende, L. M.; Bispo, E. S.; Franca, A. S.; Gloria, M. B. A. FTIR and PLS-Regression in the Evaluation of Bioactive Amines, Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Dark Chocolates. *Food Chem.* **2021**, 357, 1–9.
- (91) Abdi, H. Partial Least Squares Regression and Projection on Latent Structure Regression (PLS Regression). *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2010**, 2 (1), 97–106.
- (92) Μαυρούτσος, Ν. Ανάλυση δεδομένων με μοντέλα παλινδρόμησης PLS. Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2014.
- (93) Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L.; Sweden°, S. PLS-Regression: A Basic Tool of Chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2001**, 58, 109–130.
- (94) Παπαγιάννη, Έ. Ι. Χημειομετρική Διάκριση Του Κυπριακού Παραδοσιακού Κρασιού Κουμανδαρία. Διδακτορική διατριβή (Ph.D.), Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λευκωσία, 2012.
- (95) Godoy, J. L.; Vega, J. R.; Marchetti, J. L. Relationships between PCA and PLS-Regression. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2014**, 130, 182–191.
- (96) [6.7.2. A conceptual explanation of PLS — Process Improvement using Data \(learnche.org\)](https://learnche.org/6.7.2-A-conceptual-explanation-of-PLS-Process-Improvement-using-Data/) (accessed October 2021).
- (97) Allegrini, F.; Olivieri, A. IUPAC-Consistent Approach To The Limit Of Detection In Partial Least-Squares Calibration. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 7858–7866.

- (98) Engel, J.; Gerretzen, J.; Szymańska, E.; Jansen, J. J.; Downey, G.; Blanchet, L.; Buydens, L. M. C. Breaking with Trends in Pre-Processing? *Trends Analyt Chem.* **2013**, *50*, 96–106.
- (99) Hawkins, D. M. The Problem of Overfitting. *J. Chem. Inf. Comput.* **2004**, *44* (1), 1–12.
- (100) Grigoriou, A. M.; Pinakoulaki, E. Linking the Dynamic Changes in the in Vitro Antioxidant Activity of Carob Kibbles upon Roasting to the Chemical and Structural Changes Revealed by FTIR Spectroscopy. *Antioxidants.* **2021**, *10* (12).
- (101) Uysal, S.; Zengin, G.; Aktumsek, A.; Karatas, S. Chemical and Biological Approaches on Nine Fruit Tree Leaves Collected from the Mediterranean Region of Turkey. *J. Funct.* **2016**, *22*, 518–532.
- (102) Sarikurkcü, C.; Arisoy, K.; Tepe, B.; Cakir, A.; Abali, G.; Mete, E. Studies on the Antioxidant Activity of Essential Oil and Different Solvent Extracts of Vitex Agnus Castus L. Fruits from Turkey. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47* (10), 2479–2483.
- (103) Vitali Čepo, D.; Mornar, A.; Nigović, B.; Kremer, D.; Radanović, D.; Vedrına Dragojević, I. Optimization of Roasting Conditions as an Useful Approach for Increasing Antioxidant Activity of Carob Powder. *LWT – Food Sci. Technol.* **2014**, *58* (2), 578–586.
- (104) Christou, A.; Stavrou, I. J.; Kapnissi-Christodoulou, C. P. Continuous and Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction of Carob's Antioxidants: Processing Parameters Optimization and Identification of Polyphenolic Composition. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, 76.
- (105) Darwish, W. S.; Khadr, A. E. S.; Kamel, M. A. E. N.; Abd Eldaim, M. A.; el Sayed, I. E. T.; Abdel-Bary, H. M.; Ullah, S.; Ghareeb, D. A. Phytochemical Characterization and Evaluation of Biological Activities of Egyptian Carob Pods (*Ceratonía Siliqua* L.) Aqueous Extract: In Vitro Study. *Plants.* **2021**, *10* (12), 1146.
- (106) Munteanu, I. G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7).
- (107) Rodríguez-Solana, R.; Romano, A.; Moreno-Rojas, J. M. Carob Pulp: A Nutritional and Functional by-Product Worldwide Spread in the Formulation of Different Food Products and Beverages. a Review. *Processes.* **2021**, *9* (7).
- (108) Christou, C.; Agapiou, A.; Kokkinofa, R. Use of FTIR Spectroscopy and Chemometrics for the Classification of Carobs Origin. *J. Adv. Res.* **2018**, *10*, 1–8.
- (109) Kačuráková, M.; Wilson, R. H. Developments in Mid-Infrared FT-IR Spectroscopy of Selected Carbohydrates. *Carbohydr.* **2001**, *44*, 291–303.
- (110) Ben Othmen, K.; Garcia-Beltrán, J. M.; Elfalleh, W.; Haddad, M.; Esteban, M. Á. Phytochemical Compounds and Biological Properties of Carob Pods (*Ceratonía Siliqua* L.) Extracts at Different Ripening Stages. *Waste Biomass Valorization.* **2021**, *12* (9), 4975–4990.
- (111) Vekiari, A. S.; Ouzounidou, G.; Gork, G.; Ozturk, M.; Asfi, M. Compositional Changes of Major Chemical Compounds in Greek Carob Pods during Development. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2012**, *26* (3), 343–351.
- (112) Rodríguez-Solana, R.; Salgado, J. M.; Pérez-Santín, E.; Romano, A. Effect of Carob Variety and Roasting on the Antioxidant Capacity, and the Phenolic and Furanic Contents of Carob Liquors. *J. Sci. Food ad Agric.* **2019**, *99* (6), 2697–2707.
- (113) Bastola, K. P.; Guragain, Y. N.; Bhadriraju, V.; Vadlani, P. V. Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *Am. J. Anal. Chem.* **2017**, *08* (06), 416–431.

- (114) Santas, J.; Carbó, R.; Gordon, M. H.; Almajano, M. P. Comparison of the Antioxidant Activity of Two Spanish Onion Varieties. *Food Chem.* **2008**, *107* (3), 1210–1216.
- (115) Clark, C. J.; Cooney, J. M.; Hopkins, W. A.; Currie, A. Global Mid-Infrared Prediction Models Facilitate Simultaneous Analysis of Juice Composition from Berries of Actinidia, Ribes, Rubus and Vaccinium Species. *Food Anal. Methods.* **2018**, *11* (11), 3147–3160.
- (116) Liang, N.; Lu, X.; Hu, Y.; Kitts, D. D. Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy to Determine the Chlorogenic Acid Isomer Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Beans. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 681–689.
- (117) Kadiroğlu, P.; Aydemir, L. Y.; Akcakaya, F. G. Prediction of Functional Properties of Registered Chickpea Samples Using FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. *LWT – Food Sci. Technol.* **2018**, *93*, 463–469.
- (118) Vestergaard, R. J.; Vasava, H. B.; Aspinall, D.; Chen, S.; Gillespie, A.; Adamchuk, V.; Biswas, A. Evaluation of Optimized Preprocessing and Modeling Algorithms for Prediction of Soil Properties Using Vis-NIR Spectroscopy. *Sensors.* **2021**, *21* (20).