

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΡΟΥΤΩΝ-ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ

<u>ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ</u> ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου υδραλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.), διερεύνηση της αντιμικροβιακής τους δράσης και της χρήσης τους στη μετασυλλεκτική διαχείριση ελάχιστα μεταποιημένων φύλλων μαρουλιού (*L. sativa* L.)

Ευαγγελία Χ. Ζαφείρη

<u>Επιβλέπων καθηγητής:</u> Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΡΟΥΤΩΝ-ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου υδραλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.), διερεύνηση της αντιμικροβιακής τους δράσης και της χρήσης τους στη μετασυλλεκτική διαχείριση ελάχιστα μεταποιημένων φύλλων μαρουλιού (*L. sativa* L.)

Chromatographic and spectroscopic study of pistachio hull extracts (*Pistacia vera* L.), investigation of their antimicrobial activity and their use in the post-harvest management of minimally processed lettuce leaves (*L. sativa* L.)

Ευαγγελία Χ. Ζαφείρη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων) Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ Μίλτος Χριστόπουλος, Ερευνητής Δ΄ στο ΙΤΑΠ ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου υδραλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.), διερεύνηση της αντιμικροβιακής τους δράσης και της χρήσης τους στη μετασυλλεκτική διαχείριση ελάχιστα μεταποιημένων φύλλων μαρουλιού (*L. sativa* L.)

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων ΓΠΑ Εργαστήριο Γενικής Χημείας ΓΠΑ Εργαστήριο Μετασυλλεκτικής Φυσιολογίας Φρούτων-Λαχανικών ΙΤΑΠ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελέτηθηκε ο χημειότυπος των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων νωπού και θερμικά επεξεργασμένου περικαρπίου των κελυφωτών φιστικιών (Pistacia vera L.) της καλλιεργητικής ποικιλίας Αιγίνης, με χρήση φασματοσκοπικών (UV-VIS, FT-IR, Raman) και χρωματογραφικών τεχνικών (HPLC-MS-QTOF). Ακολούθως, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση (δοκιμές ABTS & DPPH) καθώς και η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram τροφιμογενών μικροβίων. Τέλος, διερευνήθηκε η χρήση των εκχυλισμάτων στη μετασυλλεκτική διαχείριση ελάχιστα μεταποιημένων λαχανικών, με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης και τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με την δοκιμή DPPH, τα υδατικά εκχυλίσματα έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, συγκριτικά με τα αιθανολικά, με το P.Hull Freeze Dried-HPLC Water να επιδεικνύει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ το λιγότερο δραστικό είναι το P.Hull Raw-EtOH, με τις τιμές για την παρεμπόδιση των ελεύθερων ριζών (Ι%) να κυμαίνονται από 53,832% έως 76,078%. Αντιθέτως, στη δοκιμή ΑΒΤS, τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές παρεμπόδισης ελευθέρων ριζών (Ι%) (P.Hull Raw-EtOH- το πιο δραστικό), σε σύγκριση με τα υδατικά (P.Hull Freeze Dried-HPLC Water-το λιγότερο δραστικό), με τις τιμές για την παρεμπόδιση των ελεύθερων ριζών (1%) να κυμαίνονται από 92,932% έως 99,122%. Μέσω της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC-MS-QTOF) των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά τους συστατικά: γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), 4-αιθυλο- (3, 4,5τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη, κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης, κερκετίνη, οξύ, μονογαλοϋλογλυκοζίτης, πρωτοκατεχικό κερκετίνη 3-Ο-γλυκουρονίδη. Н φασματοσκοπική μελέτη (UV-VIS, FT-IR, Raman) παρείχε πληροφορίες τόσο για τις λειτουργικές ομάδες όσο και για τον σκελετό των μορίων, με τις βασικές κορυφές να αποδίδονται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές των φαινολικών συστατικών, σύμφωνα με με την βιβλιογραφία.

Αναφορικά με την αντιμικροβιολογική δράση των εκχυλισμάτων, τα θετικά κατά Gram βακτήρια (*B. subtilis* & *St. aureus*) επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία, με την ανάπτυξη τους να αναστέλλεται, λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων επί της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, συγκριτικά με την *Escherichia coli*.

Μετασυλλεκτικά, όλες τις ημέρες συντήρησης, οι μεταχειρίσεις των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων οδήγησαν σε αυξημένες τιμές του συντελεστή L* στην άνω και στη κάτω επιφάνεια του φύλλου μαρουλιού. Και στους δύο τύπους εκχυλισμάτων, παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση του συντελεστή a* στο κάτω φύλλο, από την 3^η ημέρα εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10^η ημέρα), σε αντίθεση, με το άνω φύλλο, όπου ο συντελεστής a* σταδιακά μειώνεται. Στο άνω φύλλο μαρουλιού, ο συντελεστής b*εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση κατά την 3η ημέρα και κατόπιν μείωση εως και την 10η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1%. Τέλος, η αλληλεπίδραση του χρόνου συντήρησης με τον τύπο και τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος επιδρά στατιστικά σημαντικά στην συγκέντρωση του φύλλων και τη συγκέντρωση του διοξειδίου του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη συντήρηση.

Επιστημονική περιοχή: Αναλυτική Χημεία, Μικροβιολογία Τροφίμων, Μετασυλλεκτική Διαχείριση

<u>Λέξεις κλειδιά</u>: Περικάρπιο - *P.vera* - Αξιοποίηση - Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών- Φασματοσκοπία IR - Raman- Φαινολικά Συστατικά - Αντιοξειδωτική Δράση — Αντιμικροβιακή Δράση- Χρήση στη Μετασυλλεκτική Φυσιολογία Φυτικών Ιστών. Chromatographic and spectroscopic study of pistachio hull extracts (*Pistacia vera* L.), investigation of their antimicrobial activity and their use in the post-harvest management of minimally processed lettuce leaves (*L. sativa* L.)

MSc Food, Nutrition and Health Department of Food Science & Human Nutrition Laboratory of General Chemistry AUA Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology AUA Laboratory of Postharvest Physiology of Fresh Fruits and Vegetables ITAP

ABSTRACT

In the present dissertation the chemotype of the aqueous and ethanolic extracts of fresh and heat-treated hulls of the pistachio (Pistacia vera L.) of the Aegina cultivar were studied, using spectrometric (UV-VIS, FT-IR, Raman) and chromatographic techniques (HPLC-MS-QTOF). Then, their antioxidant activity, as well as their antimicrobial activity against Grampositive and Gram-negative food-borne microbes was examined. Finally, the use of extracts in the post-harvest management of minimally processed vegetables was investigated, with the aim of extending the shelf life and improving the quality of the final product.

According to the DPPH assay, aqueous extracts have a stronger antioxidant effect than ethanols, with P.Hull Freeze Dried-HPLC Water having the strongest antioxidant activity, while P.Hull Raw-EtOH is the least active, with the values for free radical scavenging (I%) ranging from 53,832% to 76,078%. In the ABTS assay , ethanolic extracts showed higher free radical scavenging values (I %) (P.Hull Raw-EtOH, as the most active), compared to aqueous (P.Hull Freeze Dried-HPLC Water, as the least active), with values ranging from 92.932% to 99.122%. Chromatographic study (HPLC-MS-QTOF) of the hydroalcoholic extracts of the pistachio hulls determined the following phenolic constituents: gallic acid, syringic acid (3, 5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid), 4-ethyl-(3-trihydroxybenzoic acid), quercetin 3-O-glactoside, quercetin, monogalloylglycoside, primary catechin, quercetin 3-O-glucuronide. The spectroscopic study (UV-VIS, FT-IR, Raman) provided informations on both the functional groups and the skeleton of the molecules, with the peaks attributed to specific vibrations and chemical structures of the phenolic components, according to the literature.

Regarding the antimicrobial activity of the extracts, the Gram-positive bacteria (*B. subtilis* & *St. aureus*) showed greater sensitivity, with their growth being inhibited due to the effect of the extracts on their cell wall composition, compared to *Escherichia coli*.

Post-harvest, during the storage, the treatments of the hydroalcoholic extracts led to increased values of the L * coefficient on the upper and lower surface of the lettuce leaf. In both types of extracts, there is a gradual increase of the coefficient a * in the lower leaf,

from the 3rd day until the end of the experimental process (10th day), in contrast to the upper leaf, where the coefficient a * gradually decreases. On the top lettuce leaf, the b * coefficient showed a gradual increase on day 3 and then a decrease until day 10, with the exception of treatment E 1%. Finally, the interaction of shelf life with the type and concentration of the extract has a statistically significant effect on the concentration of the leaves and the concentration of the concentration of the leaves and the concentration of carbon dioxide during storage.

Scientific area: Analytical Chemistry, Food Microbiology, Post-Harvest Management

<u>Key words</u>: Hull - *P.vera* - PGH extract- Valorization- By-Products -LC-MS-QTOF - FTIR spectroscopy – Raman- Uv-Vis-Phenolic compounds- Antioxidant Activity –ABTS-DPPH - Gram-positive bacteria- Gram-negative bacteria- Chroma -Tissue Textrure - Use in Post-harvest Plant Tissue Physiology.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, καθώς και στο Εργαστήριο Μετασυλλεκτικής Φυσιολογίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2020.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον εισηγητή της παρούσας διπλωματικής, τον κ. Παππά Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση του, την υπομονή του και το γνήσιο ενδιαφέρον που έδειξε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μου, καθώς με το άρτιο επιστημονικό υπόβαθρο του, την ακρίβεια και τη σαφήνεια του λόγου του, με βοήθησε να υπερνικήσω τις δυσκολίες που αντιμετώπισα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Λυδία Βαλάση, υποψήφια διδάκτορα του Γ.Π.Α., για την πολύτιμη συμβολή της και τις γνώσεις της, οι οποίες αποτέλεσαν σημαντική βοήθεια για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πανάγου Ευστάθιο για την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές και την καθοδήγηση του για την ορθή εκπόνηση της μελέτης μου. Μια ιδιαίτερη μνεία στον Δρ Παντελή Νατσκούλη, Δόκιμου Ερευνητή στο αντικείμενο της Οινολογίας στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Χωρίς τη καθοριστική του συμβολή και καθοδήγηση του, θα αδυνατούσα να ολοκληρώσω το μικροβιολογικό σκέλος της εργασίας μου.

Επιπλέον, παρά τη σύντομη συνεργασία μας,οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στο τρίτο μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Δρ. Μίλτο Χριστόπουλο, Ερευνητή Δ΄ στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, ο οποίος με μύησε στη μετασυλλεκτική φυσιολογία και συντήρηση των φρεσκοκομμένων λαχανικών και με ενθάρρυνε και βοήθησε ουσιαστικά, στην πραγμάτωση της μελέτης μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου για την ενθάρρυνση και αμέριστη υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει διασταυρωθεί από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής, με τη συναίνεση και την έγκριση της συγγραφέως, που διαθέτει το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| ΠΕΡΙΛΗΨΗ3 | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABSTRACT 5 | |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | |
| Κατάλογος Εικόνων1 | <u>5</u> |
| Κατάλογος Πινάκων2 | <u>5</u> |
| Κατάλογος Συντμήσεων2 | <u>8</u> |
| Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : ΤΟ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ | |
| ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ | 2 |
| 1.1 Μορφολογία και στάδια ανάπτυξης κελυφωτού καρπού Pistacia vera L.(P. vera)3 | 13 |
| <u>1.2 Συγκομιδή, αποφλοίωση και αποθήκευση κελυφωτού καρπού P. vera L</u> | 35 |
| 1.3 Παραπροϊόντα καλλιέργειας κελυφωτού κάρπου (P. vera L.) | 37 |
| 1.3.1 Χημική σύσταση του περικαρπίου κελυφωτού καρπού (Pistachio Green Hull-PGH)3 | <u>38</u> |
| 1.3.1.1 Φαινολικά συστατικά | <u>88</u> |
| <u>1.3.1.2 Πηκτίνη3</u> | <u>9</u> |
| <u>1.3.1.3 Αιθέριο έλαιο4</u> | 0 |
| <u>1.3.1.4 Λιπαρά οξέα</u> 4 | 1 |
| <u>1.3.2 Διαχείριση και αξιοποίηση των περικαρπίων κελυφωτού καρπού (Pistachio Green</u> | |
| <u>Hull-PGH)4</u> | <u>1</u> |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ4 | <u>6</u> |
| 2.1 Παραλαβή φαινολικών συστατικών περικαρπίων κελυφωτών φιστικιών (PGH)4 | <u>6</u> |
| 2.2 Ταξινόμηση βάσει της χημικής δομής4 | 8 |
| <u>2.2.1 Φαινολικά οξέα</u> 5 | 0 |

| <u>2.2.2 Φλαβονοειδή50</u> |
|------------------------------------------------------------------------------|
| <u>2.3 Χημικές ιδιότητες51</u> |
| <u>2.4 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών52</u> |
| <u>2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση52</u> |
| 2.4.2 Αντιμικροβιακή δράση53 |
| 2.4.3 Δράση στη μετασυλλεκτική φυσιολογία φυτικών ιστών |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ |
| <u>3.1 Αρχή της μεθόδου DPPH57</u> |
| <u>3.2 Αρχή της μεθόδου ABTS58</u> |
| <u>3.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων DPPH & ABTS</u> |
| <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΦΡΕΣΚΟΚΟΜΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΛΑΦΡΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΛΛΩΔΗ</u> |
| ΛΑΧΑΝΙΚΑ61 |
| 4.1 Η Περίπτωση των φρεσκοκομμένων φυλλωδών λαχανικώ ν |
| ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ & ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 65 |
| <u>Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u> |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 65 |
| <u>5.1 Δειγματοληψία - Προκατεργασία δείγματος – Προσδιορισμός υγρασίας-</u> |
| <u>Αποθήκευση65</u> |
| <u>5.1.1 Δειγματοληψία και προκατεργασία δείγματος65</u> |
| 5.1.2 Προσδιορισμός υγρασίας65 |
| 5.1.3 Αποθήκευση και κοκκομέτρηση66 |
| 5.1.4 Αποτελέσματα και συζήτηση67 |
| 5.2 Παραλαβή φαινολικών συστατικών PGH67 |
| <u>5.2.1 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων67</u> |

| 5.2.1.1 Κωδικοποίηση δειγμάτων67 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>5.2.1.2 Πειραματική διαδικασία68</u> |
| <u>5.2.1.3 Συζήτηση</u> |
| 5.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης72 |
| 5.3.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS |
| <u>5.3.1.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας και πρότυπων διαλυμάτων ABTS.+73</u> |
| 5.3.1.2 Πειραματική διαδικασία |
| <u>5.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC50 των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων για τη</u> δοκιμή ABTS |
| <u>5.3.2.1 Πειραματική διαδικασία IC50 για τη δοκιμή ABTS</u> 74 |
| <u>5.3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας υδραλκοολικών</u> <u>εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS74</u> |
| <u>5.3.3.1 Δοκιμή ABTS74</u> |
| <u>5.3.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας ABTS κατά 50% (IC50)76</u> |
| 5.3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή |
| 5.3.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας και πρότυπων διαλυμάτων DPPH78 |
| 5.3.4.2 Πειραματική διαδικασία |
| 5.3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC50 των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων για τη δοκιμή DPPH |
| <u>5.3.5.1 Πειραματική διαδικασία IC50 για τη δοκιμή DPPH</u> 79 |
| 5.3.6 Αποτελέσματα και συζήτηση εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας υδραλκοολικών |
| <u>εκχυλισμάτων με τη δοκιμή DPPH79</u> |
| <u>5.3.6.1 Δοκιμή DPPH</u> |

| <u>5.3.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας DPPH κατά 50% (IC50)81</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>5.3.7 Σύγκριση δοκιμών ABTS & DPPH82</u> |
| 5.4 Χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με |
| φασματομετρία μαζών (QTOF)84 |
| <u>5.4.1 Οργανολογία</u> |
| 5.4.2 Πειραματική διαδικασία84 |
| <u>5.4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ποιότικής ανάλυσης εκχυλισμάτων με HPLC-MS-</u> |
| QTOF |
| 5.4.3.1 Pistachio Hull EtOH Freeze Dry88 |
| 5.4.3.2 Pistachio Hull EtOH Freeze Dry, με οξίνιση-ΗCOOH 1%90 |
| 5.4.3.3 Pistachio Hull EtOH Raw93 |
| 5.4.3.4 Pistachio Hull EtOH Raw, με οξίνιση-ΗCOOH 1%96 |
| 5.4.3.5 Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry98 |
| 5.4.3.6 Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry, με οξίνιση-ΗCOOH 1%100 |
| 5.4.3.7 Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry103 |
| 5.4.3.8 Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%106 |
| 5.4.3.9 Pistachio Hull HPLC Water Raw109 |
| 5.4.3.10 Pistachio Hull HPLC Water Raw, με οξίνιση-ΗCOOH 1%11 |
| 5.4.3.11 Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry113 |
| 5.4.3.12 Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry με οξίνιση-HCOOH 1%117 |
| <u>5.4.4 Συζήτηση120</u> |
| <u>5.5 Μελέτη υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με με φασματοφωτομετρία υπεριώδους –</u> |
| ορατού (UV-Vis)121 |
| 5.5.1 Όργανα και αντιδραστήρια121 |

| <u>5.5.2 Πειραματική διαδικασία122</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------|
| 5.5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με UV-Vis122 |
| 5.6 Φασματοσκοπική μελέτη των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία FT-IR |
| <u>και την τεχνική ATR123</u> |
| 5.6.1 Όργανα και αντιδραστήρια123 |
| 5.6.2 Πειραματική διαδικασία123 |
| 5.6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με FT-IR 124 |
| <u>5.7 Φασματοσκοπική μελέτη των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία</u> |
| RAMAN |
| 5.7.1 Οργανολογία127 |
| 5.7.2 Πειραματική διαδικασία127 |
| 5.7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με Raman128 |
| 5.8 Αντιμικροβιολογική δράση129 |
| <u>5.8.1 Αναλώσιμα υλικά129</u> |
| 5.8.2 Μικροβιακά στελέχη130 |
| 5.8.3 Πειραματική διαδικασία131 |
| 5.8.3.1 Ανανέωση μικροοργανισμών131 |
| 5.8.3.2 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων132 |
| 5.8.3.3 Μέθοδος μικροαραίωσης (Micro-Dilution)132 |
| 5.8.4 Αποτελέσματα και συζήτηση135 |
| 5.8.4.1 Bacillus subtilis136 |
| 5.8.4.2 Escherichia coli140 |
| 5.8.4.3 Staphylococcus aureus144 |
| 5.8.4.4 Pseudomonas fluorescens148 |

| <u>5.8.5</u> Συζήτηση | 149 |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.9 Μετασυλλεκτική χρήση | 150 |
| 5.9.1 Εκχύλιση με Υπερήχους | 150 |
| 5.9.2 Πειραματική διαδικασία | 151 |
| 5.9.2.1 Κοπή, μεταχείριση και συσκευασία φυτικού υλικού L.sativa var. Ca | pitata151 |
| 5.9.2.2 Κωδικοποίηση δειγμάτων | 152 |
| 5.9.2.3 Διενέργεια δειγματοληψίας | 156 |
| 5.9.2.3.1 Μέτρηση ατμόσφαιρας εντός της κλειστής συσκευασίας | 156 |
| 5.9.2.3.2 Μέτρηση υφής και συνεκτικότητας | 157 |
| <u>5.9.2.3.3</u> Μέτρηση χρώματος | 157 |
| <u>5.9.2.3.4 Μέτρηση αναπνοής</u> | 158 |
| <u>5.9.2.3.5</u> Αποθήκευση | |
| 5.9.2.3.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων | 159 |
| 5.9.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 159 |
| 5.9.3.1 Συνεκτικότητα φύλλου | 160 |
| 5.9.3.2 Χρωματικές παράμετροι | 162 |
| <u>5.9.3.2.1 Συντεταγμένη χρώματος L* άνω φύλλου</u> | 162 |
| 5.9.3.2.2 Συντεταγμένη χρώματος L* κάτω φύλλου | 163 |
| 5.9.3.2.3 Συντεταγμένη χρώματος a* άνω φύλλου | 164 |
| <u>5.9.3.2.4</u> Συντεταγμένη χρώματος a* κάτω φύλλου | 165 |
| <u>5.9.3.2.5</u> Συντεταγμένη χρώματος b*άνω φύλλου | 166 |
| 5.9.3.2.6 Συντεταγμένη χρώματος b* κάτω φύλλου | 167 |
| <u>5.9.3.2.7 Συζήτηση</u> | 168 |

| <u>5.9.3.3 Ατμόσφαιρα εντος κλειστής συσκευασίας170</u> |
|-------------------------------------------------------------|
| <u>5.9.3.3.1 Συγκέντρωση Ο₂ ατμόσφαιρας170</u> |
| <u>5.9.3.3.2</u> Συγκέντρωση CO ₂ ατμόσφαιρας171 |
| <u>5.9.3.4</u> Αναπνοή φυτικού ιστού172 |
| <u>5.9.3.4.1</u> Συγκέντρωση Ο ₂ αναπνοής172 |
| <u>5.9.3.4.2</u> Συγκέντρωση CO ₂ αναπνοής173 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 175 |
| Συμπεράσματα175 |
| <u>Προοπτικές178</u> |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 179 |
| ПАРАРТНМА |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| Εικόνα 1: Εκτίμηση παραγωγής κελυφωτών φιστικιών σε τόνους για το καλλιεργητικό έτος |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2020/2021 |
| Εικόνα 2 : Διαμήκης Τομή Κελυφωτού Φιστικιού34 |
| Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων κάθετων διαστάσεων στο κελυφωτό |
| <u>φιστίκι</u> |
| Εικόνα 4: Αποφλοιωτής κελυφωτού φιστικιού με τύμπανα |
| Εικόνα 5: Αφαίρεση αποβλήτων αποφλοίωσης κελυφωτού καρπού με ροή βαρύτητας 36 |
| Εικόνα 6: Α. Φλωρογλυκινόλη, Β. Ανακαρδικά Οξέα C. Γαλλικό Οξύ και D. Κερκετίνη-3-Ο- |
| <u>ρουτινοσίδη39</u> |
| Εικόνα 7: Γαλακτουρουνικό οξύ40 |
| Εικόνα 8: Α. α-πινένιο, Β. α-τερπινολένιο και C. Λιμονένιο40 |
| Εικόνα 9: Α. Ελαϊκό οξύ, Β. Λινολεϊκό οξύ και C. Παλμιτικό οξύ |
| Εικόνα 10: Τάφρος συλλογής περικαρπίων κελυφωτών φιστικιών |
| Εικόνα 11: Ρηχές δεξαμενές συλλογής42 |
| Εικόνα 12: Διαδοχικές δεξαμενές συλλογής43 |
| Εικόνα 13: Κύρια φαινολικά συστατικά, που έχουν ταυτοποιηθεί στο περικάρπιο |
| <u>κελυφωτού φιστικιού (PGH)46</u> |
| Εικόνα 14: Αναγωγή του (DPPH) σε (DPPH:H)58 |
| Εικόνα 15: Η οξείδωση του ΑΒΤS στη δραστική της ρίζα59 |
| Εικόνα 16: Φούρνος προξήρανσης περικαρπίων65 |
| Εικόνα 17: Αποθήκευση του φυτικού ιστού αεροστεγώς σε πλαστικό σακουλάκι66 |
| Εικόνα 18: Κοκκομέτρηση αποξηραμένων περικαρπίων σε μέγεθος κόκκων 800-500 μm66 |
| Εικόνα 19: Ζύγιζη ποσότητας νωπού περικαρπίου (P.Hull Raw EtOH)68 |
| Εικόνα 20: Εκχύλιση του φυτικού υλικού στους υπέρηχους στους 25° Cγια 30 min68 |

| Εικόνα 21: Διήθηση του δείγματος P.Hull Freeze Dry EtOH | <u>68</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Εικόνα 22: Συμπύκνωση εκχυλίσματος P.Hull Freeze Dry EtOH σε Rotary Evaporator | <u>69</u> |
| Εικόνα 23: Συμπύκνωση εκχυλίσματος P.Hull Freeze Dry EtOH και ζύγιση βάρους για | 60 |
| ϵ π α α α α β | <u>69</u> |
| Εικόνα 24: Υδατικά εκχυλίσματα P.Hull Vacuum Dry, μετά από 30 min στο λουτρό υπερήχ | <u>ων</u> 70 |
| Εικόνα 25: Υδατικά εκχυλίσματα P.Hull Vacuum Dry, μετά τη λυοφιλίωση | 70 |
| Εικόνα 26: Πρότυπη καμπύλη Trolox για τη δοκιμή ABTS | <u>75</u> |
| Εικόνα 27: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων περικαρπίου, με την δοκιμή ABTS | <u>76</u> |
| Εικόνα 28: Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας ABTS κατά 50% (IC50) | 77 |
| Εικόνα 29: Πρότυπη καμπύλη Trolox για την δοκιμή DPPH | <u>80</u> |
| Εικόνα 30 : Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων περικαρπίου,με την δοκιμή DPPH | <u>81</u> |
| Εικόνα 31: Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας DPPH κατά 50% (IC50) | <u>82</u> |
| Εικόνα 32: Σύγκριση δοκιμών ABTS & DPPH | 83 |
| Εικόνα 33: Χρωματογράφος 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS | <u>84</u> |
| Εικόνα 34: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>89</u> |
| Εικόνα 35: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | <u>89</u> |
| Εικόνα 36: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>89</u> |
| Εικόνα 37: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | <u>90</u> |
| Εικόνα 38: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>91</u> |
| Εικόνα 39: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= | |
| 150.0 V) | <u> 71</u> |
| Εικόνα 40: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>92</u> |
| Εικόνα 41: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | <u>92</u> |

| Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF92 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Εικόνα 43: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| 150.0 V) |
| Εικόνα 44: Χρωματογράφημα S1/E1 με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 45: Φάσμα μαζών S1/E1 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)93 |
| Εικόνα 46: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF93 |
| Εικόνα 47: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)93 |
| Εικόνα 48: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 49: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| 150.0 V) |
| Εικόνα 50: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF95 |
| Εικόνα 51: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 170.0 V) |
| |
| Εικόνα 52: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 53: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)96 |
| Εικόνα 54: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF97 |
| Εικόνα 55: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) |
| |
| Εικόνα 56: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF98 |
| Εικόνα 57: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)98 |
| Εικόνα 58: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 59: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| <u>190.0 V)</u> 99 |
| Εικόνα 60: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF |

| Εικόνα 61: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Εικόνα 62: Χρωματογράφημα κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF100 |
| Εικόνα 63: Φάσμα μαζών κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)100 |
| Εικόνα 64: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF102 |
| Εικόνα 65: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V) |
| Εικόνα 66: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF102 |
| Εικόνα 67: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) |
| Εικόνα 68: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 69: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)103 |
| Εικόνα 70: Χρωματογράφημα κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 71: Φάσμα μαζών κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)103 |
| Εικόνα 72: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF105 |
| Εικόνα 73: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)105 |
| Εικόνα 74: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF105 |
| Εικόνα 75: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) |
| Εικόνα 76: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 77: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)106 |
| Εικόνα 78: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF107 |
| Εικόνα 79: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| <u>150.0 V)</u> |
| Εικόνα 80: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF |

| Εικόνα 81: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 |) V) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| | .108 |
| Εικόνα 82: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | 108 |
| Εικόνα 83: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmento | <u>r=</u> |
| <u>150.0 V)</u> | 108 |
| Εικόνα 84: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>109</u> |
| Εικόνα 85: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | 109 |
| Εικόνα 86: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>110</u> |
| Εικόνα 87: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmento 150.0 V) | <u>or=</u> 110 |
| Εικόνα 88: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | 110 |
| Εικόνα 89: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 | <u>) V)</u> 111 |
| Εικόνα 90: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF | 111 |
| Εικόνα 91: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | 111 |
| Εικόνα 92: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF | 112 |
| Εικόνα 93: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentc 150.0 V) | o <u>r=</u> 112 |
| Εικόνα 94: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | <u>113</u> |
| Εικόνα 95: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 | <u>) V)</u> .113 |
| Εικόνα 96: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF | 113 |
| Εικόνα 97: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) | 113 |
| Εικόνα 98: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF | 115 |
| Εικόνα 99: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 | <u>) V)</u> 115 |

| Εικόνα 100: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF115 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Εικόνα 101: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| 150.0 V) |
| Εικόνα 102: Χρωματογράφημα κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| |
| Εικονα 103: Φασμα μαζών κερκετινής-3-Ο-γλυκουρονιδής με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| (Fragmentor= 150.0 V) |
| Εικόνα 104: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 105: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)117 |
| Εικόνα 106: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF118 |
| Εικόνα 107: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V) |
| |
| Εικόνα 108: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF119 |
| Εικόνα 109: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= |
| 150.0 V) |
| Εικόνα 110: Χρωματογράφημα κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| Εικόνα 111: Φάσμα μαζών κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF |
| (Fragmentor= 150.0 V) |
| Εικόνα 112: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF120 |
| Εικόνα 113: Φάσμα μαζών Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)120 |
| Εικόνα 114: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)122 |
| Εικόνα 115: Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου |
| περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού |
| Εικόνα 116: Σύστημα FT-IR & υποδοχή με κρύσταλλο ZnSe |

| <u>Εικόνα 117: Φάσμα FT-IR υδατικού (μπλέ) και αιθανολικού εκχυλίσματος (κόκκινου)</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>λυοφιλιωμένου περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού</u> 125 |
| Εικόνα 118: Φασματοφωτόμετρο Vis-Raman & γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος - |
| υποδοχέας δείγματος127 |
| Εικόνα 119: Φάσμα RAMAN αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου περικαρπίου |
| κελυφωτού φιστικιού129 |
| Εικόνα 120: Streaking για έλεγχο ζωτικότητας <i>Ε.coli</i> B16 |
| Εικόνα 121: 1η Ανανέωση μικροοργανισμών υπό μελέτη132 |
| Εικόνα 122: Πλήρωση βοθρίων με υπόστρωμα TSB και χρήση πολυπιπέτας133 |
| Εικόνα 123: Σχεδιασμός μικροπλακιδίου ανά μικροοργανισμό |
| Εικόνα 124: Υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα134 |
| Εικόνα 125: Φωτόμετρο SynergyHT–Multimode Microplate reader της εταιρίας Biotek |
| Εικόνα 126: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>B. subtilis,</i> |
| βάσει της οπτικής απορρόφησης,σε εκχυλίσματα περικαρπίου,συγκέντρωσης 5 mg/ml |
| Ευτόμα 127: Καυπύ) η αυάπτυξης και απαρίθυηση υψορθιακού φορτίου του R subtilis |
| βάσει της οπτικής αποροόφησης, σε εκγυλίσματα περικαρπίου, συγκέντοωσης 2, 5 mg/ml |
| |
| Εικόνα 128: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>Β. subtilis,</i> |
| <u>βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1, 25 mg/ml</u> |
| |
| Εικόνα 129: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>B. subtilis</i> , |
| βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,625 mg/ml |
| |
| Εικόνα 130: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>B. subtilis,</i> |
| <u>βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0, 3125 mg/ml</u> |
| |

Εικόνα 132: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του B. subtilis, βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)140 Εικόνα 133: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 5 mg/ml141 Εικόνα 134: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 2, 5 mg/ml.....141 Εικόνα 135: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1, 25 mg/ml Εικόνα 136: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,625 mg/ml Εικόνα 137: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0, 3125 mg/ml.....143 Εικόνα 138: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0, 15625 mg/ml....143 Εικόνα 139: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του Ε. Coli, βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)144 Εικόνα 140: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του S. aureus, βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 5 mg/ml..... 145 Εικόνα 141: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του S. aureus, βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 2, 5 mg/ml Εικόνα 142: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του S. aureus, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1, 25 mg/ml

| Εικόνα 145: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>S. aureus,</i> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| βάσει οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0, 15625 mg/ml |
| |
| Εικόνα 146: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του <i>S. aureus,</i> |
| βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)148 |
| Εικόνα 147: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του P. fluorescens, |
| βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)148 |
| Εικόνα 148: Ανάμειξη φύλλων μαρουλιού, πάχους 2 cm και συσκευασία του μάρτυρα σε |
| πλαστικούς περιέκτες |
| Εικόνα 149: Εμβάπτιση φύλλων σε διάλυμα εργασίας, γνωστής συγκέντρωσης και πλαστικό |
| πλέγμα για στράγγιση152 |
| Εικόνα 150: Τυχαία τοποθέτηση περιεκτών τελικής συσκευασίας εντος θαλάμου ψύξης |
| |
| Εικόνα 151: Καλιμπράρισμα ειδικού αναλυτή αερίων (PBI Dansensor Checkmate III) και |
| μέτρηση ατμόσφαιρας εντός της κλειστής συσκευασίας156 |
| Εικόνα 152: Αναλυτής υφής TA.HD plus Texture Analyser και μέτρηση υφής σε φύλλο |
| μαρουλιού, πάχους 2cm157 |
| Εικόνα 153: Χρωματόμετρο Minolta CR-300 και μέτρηση χρώματος άνω φύλλου μαρουλιού |
| |
| Εικόνα 154: Μέτρηση αναπνοής φυτικών ιστών159 |
| Εικόνα 155: Μεταβολή της συνεκτικότητας των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 ημερών |
| της πειραματικής διαδικασίας161 |

| Εικόνα 156: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος L* Άνω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας163 |
| |
| Εικόνα 157: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος L* Κάτω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
| 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας |
| |
| Εικόνα 158: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος a* Άνω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
| <u>10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας165</u> |
| Εικόμα 150· Μεταβολή της συντεταγμένης νούματος 3* Κάτω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
| |
| <u>10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας166</u> |
| |
| Εικόνα 160: Μεταβόλη της συντεταγμένης χρωματός b* Άνω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
| 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας |
| Εικόνα 161· Μεταβολή της συντετανμένης νοώματος h* Κάτω φύλλου κατά τη διάρκεια των |
| |
| 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας |
| Εικόνα 162: Μεταβολή της συγκέντρωσης Ο ₂ , εντός της κλειστής συσκευασίας, κατά τη |
| $\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2} \sum_{i$ |
| |
| Εικόνα 163: Μεταβολή της συγκέντρωσης CO ₂ , εντός της κλειστής συσκευασίας,κατά τη |
| διάρκεια των 10 ημερών της πειοαματικής διαδικασίας |
| |
| Εικόνα 164: Μεταβολή της συγκέντρωσης Ο ₂ των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 ημερών |
| της πειραματικής διαδικασίας |
| |
| Εικόνα 165: Μεταβολή της συγκέντρωσης CO $_2$ των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 |
| ημερών της πειραματικής διαδικασίας174 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| Πίνακας 1: Χημικές δομές φαινολικών συστατικών48 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Πίνακας 2: Κωδικοποίηση δειγμάτων βάσει τύπου διαλύτη και μεταχείρισης67 |
| Πίνακας 3: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS75 |
| Πίνακας 4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του υπολογισμού IC50 των δειγμάτων κατά τη |
| <u>δοκιμή ABTS</u> |
| Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH80 |
| Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του υπολογισμού IC50 των δειγμάτων κατά τη |
| <u>δοκιμή DPPH82</u> |
| Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων για ανάλυση στο LC-MS QTOF85 |
| Πίνακας 8: Βάση δεδομένων φαινολικών συστατικών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα |
| κελυφωτού φιστικιού86 |
| Πίνακας 9: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου |
| <u>περικαρπίου (Pistachio Hull EtOH Freeze Dry)88</u> |
| Πίνακας 10: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος με οξίνιση με |
| μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH Freeze Dry, με οξίνιση-ΗCOOH 1%)90 |
| Πίνακας 11: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος νωπού |
| <u>περικαρπίου (Pistachio Hull EtOH Raw)94</u> |
| Πίνακας 12: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος νωπού |
| <u>περικαρπίου με οξινισμένο μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH Raw, με οξίνιση-HCOOH</u> |
| <u>1%)</u> 96 |
| Πίνακας 13: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου |
| με ξήρανση σε φούρνο κενού (Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry) |
| Πίνακας 14: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου |
| με ξήρανση σε φούρνο κενού, οξινισμένο με μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH |
| <u>Vacuum Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%)</u> 101 |

| Πίνακας 15: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry)104 |
| Πίνακας 16: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού οξινισμένου λυοφιλιωμένου |
| <u>εκχυλίσματος περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%)</u> |
| |
| Πίνακας 17: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος νωπού |
| <u>περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Raw)109</u> |
| Πίνακας 18: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του οξινισμένου υδατικού εκχυλίσματος |
| νωπού περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Raw, με οξίνιση-HCOOH 1%)111 |
| Πίνακας 19: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου με |
| <u>ξήρανση σε φούρνο υπό κενό (Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry)</u> |
| Πίνακας 20: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του οξινισμένου υδατικού εκχυλίσματος |
| <u>περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό (Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry,με</u> |
| <u>οξίνιση-ΗCOOH 1%)</u> |
| Πίνακας 21: Απορροφήσεις των κυριότερων κορυφών και οι αντίστοιχες αποδόσεις των |
| φασμάτων FT-IR του εκχυλίσματος περικαρπίου125 |
| Πίνακας 22: Απορροφήσεις των κυριότερων κορυφών και οι αντίστοιχες αποδόσεις των |
| φασμάτων Raman του εκχυλίσματος περικαρπίου128 |
| Πίνακας 23: Τα μικροβιακά στελέχη υπό μελέτη130 |
| Πίνακας 24: Θερμοκρασία και χρόνος επώασης για την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού |
| |
| Πίνακας 25: Κωδικοποίηση εκχυλισμάτων περικαρπίου <i>Ρ.vera</i> L |
| Πίνακας 26a: Κωδικοποίηση δειγμάτων μάρτυρα υδατικού εκχυλίσματος |
| Πίνακας 26b: Κωδικοποίηση δειγμάτων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml |
| |
| Πίνακας 26c: Κωδικοποίηση δειγμάτων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 5 mg/ml |
| 153 |

| Πίνακας 26d: Κωδικοποίηση δειγμάτων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| |
| Πίνακας 27a: Κωδικοποίηση δειγμάτων μάρτυρα αιθανολικού εκχυλίσματος154 |
| Πίνακας 27b: Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml |
| |
| Πίνακας 27c: Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 5 mg/ml |
| |
| Πίνακας 27d: Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων c 10 mg/ml156 |
| Πίνακας 28: Επίδραση της χρονικής διάρκειας συντήρησης (Pday,Pd) με τον τύπο |
| <u>εκχυλίσματος και τη συγκέντρωση του,ανα επέμβαση (Pextract_concentration, Pe_c) και</u> |
| <u>της αλληλεπίδρασης τους (Pd x e_c),αναφορικά με τις παραμέτρους ποιότητας160</u> |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

PGH: Pistachio Green Hull (Περικάρπιο Κελυφωτού)

Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry: Υδατικό λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος περικαρπίου

Pistachio Hull HPLC Water Raw: Υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου σε φυσικές συνθήκες

Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry: Υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό

Pistachio Hull EtOH Freeze Dry: Αιθανολικό λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος περικαρπίου

Pistachio Hull EtOH Raw: Αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου σε φυσικές συνθήκες

Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry: Αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό

ABTS: 2'azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)

K₂S₂O₈: Υπερθειικό κάλιο

Silica gel: Αφυγραντικό μέσο

ATR: Attenuated Total Reflectance (Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση)

DPPH: 1,1-diphenyl,2-picrylhydrazyl (1,1-διφαινυλο 1,2-πικρυλυδραζίλιο)

IR: Infra Red Spectroscopy (Φασματοσκοπία Υπερύθρου)

FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy (Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier)

ZnSe: Σεληνιούχος ψευδάργυρος

AcOEt: Οξικός αιθυλεστέρας

UV-Vis: Ultraviolet–Visible spectroscopy (Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-Ορατού)

LC-MS: Υγρή χρωματογραφία -Φασματομετρία Μαζών

λ_{max}: Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης

ΜεΟΗ: Μεθανόλη

[M-H] : Αρνητικό ιόν

a*: Διακύμανση χρώματος μεταξύ κόκκινου-πράσινου

b*: Διακύμανση χρώματος μεταξύ κίτρινου-μπλέ

L*: Φωτεινότητα

Retention time-Rt: Χρόνος έκλουσης

m/z: Θραύσμα μάζας

TSA: Tryptone Soy Agar

TSB DS: Tryptone Soy Broth Double Strength

Nutrient broth: Θρεπτικός ζωμός

ΟD: Οπτική απορρόφηση

Mother solution: Μητρικό διάλυμα

Control: Μάρτυρας

ΕΜΒΤ: Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Broth Micro Dilution Method: Μέθοδος μικροαραίωσης σε ζωμό

Q1: Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη)

Q2: Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)

S₁= Συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ)

Ε1= 4-Αίθυλο- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ)

ΕtOH: Αιθανόλη

HPLC Water: Υπερκάθαρο νερό

ΗCOOΗ: Μυρμηγκικό οξύ

UAE: Εκχύλιση σε υπερήχους

ΙС 50% παρεμποδιστική δράση

GAE: Ισοδύναμο γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent)

TE: Ισοδύναμο Trolox

ΑΑ: Ασκορβικό οξύ

ΑΝΟVΑ: Ανάλυση διασποράς

Rotary Evaporator: Περιστροφικός συμπυκνωτής

PhR H20: Υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου σε φυσικές συνθήκες

PhV H20: Υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου, με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό

PhF H20: Υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου, με λυοφιλίωση

ΜΙC: Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης

ΝΙC: Μη ανασταλτική συγκέντρωση

B. cereus: Bacillus subtilis

S. aureus: Staphylococcus aureus

E. coli: Escherichia coli

P. fluorescens: Pseudomonas fluorescens

Pday (Pd): Επίδραση της χρονικής διάρκειας συντήρησης

Pextract_concentration (Pe_c): Επίδραση τύπου εκχυλίσματος και της συγκέντρωσης του, ανά επέμβαση

Pd x e_c: Αλληλεπίδραση της χρονικής διάρκειας συντήρησης και τύπου εκχυλίσματος και της συγκέντρωσης του, ανά επέμβαση

ΡΡΟ: πολυφαινόλοξειδάση

POD: περοξειδάση

PAL: αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης

Hydrogen atom transfer, HAT: Προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου

Single electron transfer, SET: Προσθήκη ενός ηλεκτρονίου

Reactive Oxygen Species, ROS: Οξυγονούχες δραστικές ουσίες

Reactive Nitrogen Species, RNS: Ελεύθερες ρίζες αζώτου

Reactive Sulfur Species, RSS: Ελεύθερες ρίζες θείου

ΤΒΗQ: τριτ-βουτυλυδροκινόνη

BHT: 2, 6-δι-τριτ-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1⁰:</u> ΤΟ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΥΣΤΙΚΙΩΝ

Σύμφωνα με την αναφορά "Tree Nuts: World Markets and Trade Report" του U.S Department of Agriculture's Foreign Agricultural Service, η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών, αυξήθηκε κατά 40%, φτάνοντας τους 985.000 τόνους (Εικ. 1). Οι ΗΠΑ συνεχίζουν να ηγούνται παγκοσμίως και προβλέπεται να φτάσουν τους 476.000 τόνους για το έτος 2020/2021. Ακολουθούν η Τουρκία, με τριπλασιασμό της εγχώριας παραγωγής της, στους 250.000 τόνους και το Ιράν, με μια εκτίμηση στους 190.000 τόνους. Η Συρία και η Ευρωπαϊκή Ένωση εκτιμάται ότι θα φθάσουν τους 50.000 και 18.000 τόνους παραγωγής φιστικιών, αντίστοιχα.



<u>Εικόνα 1</u>: Εκτίμηση παραγωγής κελυφωτών φιστικιών σε τόνους για το καλλιεργητικό έτος 2020/2021 (Πηγή: Tree Nuts: World Markets and Trade Report, U.S Department of Agriculture's Foreign Agricultural Service)

Η χώρα μας (1%) βρίσκεται στην 6^η θέση παγκοσμίως και στην 1^η στην Ευρώπη, με καλλιεργούμενη έκταση 4.500 εκταρίων και ετήσια παραγωγή 12.300 τόνων (FAO Stat, 2019). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μείωση του αριθμού των δένδρων φιστικιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, ωστόσο η συνολική παραγωγή και η πρόσοδος για τον παραγωγό παρουσιάζει αύξηση, παρά τη μείωση του αριθμού των δένδρων (Αθανάτου, 2009). Σύμφωνα με τα στοιχεία της κλαδικής μελέτης (ICAP Group), στα έτη 1998-2005, τα κελυφωτά φιστίκια κάλυψαν μόλις το 12% της εγχώριας παραγωγής ξηρών καρπών, ενώ στις εξαγωγές αποτελούν το δεύτερο σε θέση, ξηρό καρπό, μετά την αμυγδαλόψιχα (Γεωργιάδου, 2015).

Η αναγνώριση του ελληνικού φιστικιού ως προϊόν Προστατευομένης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π) από την Ε.Ε, ανάλογα με την περιοχή προέλευσης (Φιστίκι Αιγίνης, Κελυφωτό Φιστίκι Μαρκοπούλου Μεσογείων, Κελυφωτό Φιστίκι Φθιώτιδας/ΕΚ 1263/96) συμβάλλει στην ανταγωνιστικότητα του εξαγώγιμου ελληνικού προϊόντος (Αθανάτου, 2009).

Εδώ, να σημειωθεί ότι η μεγάλη παραγωγή σε κελυφωτό φιστίκι είναι ανάλογη και της τελικής απόθεσης των αντίστοιχων παραπροϊόντων της συγκεκριμένης καλλιέργειας, βάσει της εκτίμησης ότι το 35-45% του συνολικού βάρους του καρπού αντιστοιχεί μόνο στο περικάρπιο του (Barreca et al., 2016). Η φιστικιά είναι καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις, ως προς το έδαφος και το κλίμα (Χιτζανίδου κ.α, 2004). Μετά τη συγκομιδή, ακολουθεί η βιομηχανική επεξεργασία του καρπού, όπου αποβάλλονται τα περικάρπια (Pistachio hull), ως το κυριότερο παραπροϊόν της βιομηχανίας κελυφωτών φιστικιών (Barreca et al., 2016). Το υψηλό του οργανικό φορτίο και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών, καθώς και η υψηλή συγκέντρωση στερεών, το καθιστά ένα τοξικό και ρυπογόνο υλικό, εκτός αν διαχειριστεί αποτελεσματικά (Agrostrategies, 2014). Δευτερευόντως, εκτός από τα περικάρπια και φύλλα παραμένουν ξυλοποίημενοι κλαδίσκοι, αλλά σε πολύ πιο μικρά ποσοστά (Akbari-Alavijeh et al., 2017). Υπάρχουν λίγες πληροφορίες στη βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση του συγκεκριμένου τύπου παραπροϊόντος, τις βιολογικές ιδιότητες του και τις χημικές ενώσεις που προάγουν την υγεία, παρά το γεγονός ότι αποτελεί μια αποδεδειγμένη πολλά υποσχόμενη πηγή πρωτογενών (κυρίως πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων) και δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως φαινολικών παραγώγων), βιταμινών, μεταλλικών αλάτων και αιθερίων ελαίων (Goli et al., 2005).

1.1 Μορφολογία και στάδια ανάπτυξης κελυφωτού καρπού Pistacia vera L. (P.vera)

Βοτανικά, ο καρπός είναι δρύπη, με επίμηκες ωοειδές σχήμα, μήκος από 1-2 εκατοστά, ενω σχηματίζεται σε σύνθετους βότρεις (Ποντίκης, 1996). Αποτελείται από το περικάρπιο (μεσοκάρπιο και εξωκάρπιο) και το ξυλοποιήμενο ενδοκάρπιο (κέλυφος), το οποίο και περικλείει το σπέρμα (ψίχα). Το εξωκάρπιο και το μεσοκάρπιο αποτελούν τον εξωτερικό μαλακό φλοιό του καρπού. Το ενδοκάρπιο της φιστικιάς σκίζεται όταν ωριμάσει ο καρπός. Το οπέρμα περιβάλλεται από έναν λεπτό και εδώδιμο φλοιό (ενδοσπέρμιο) με βυσσινί ή κόκκινο χρώμα στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του και περικλείει το έμβρυο και τις δύο κοτυληδόνες που έχουν διαφορετικά χρώματα που ποικίλλουν από υποκίτρινο μέχρι πράσινο. Στους γεμάτους καρπούς, το ξυλώδες ενδοκάρπιο σχίζεται με την εκάστοτε ποικιλία και αποτελεί χαρακτηριστικό ποιότητας (Kashaninejad et al., 2011).



Εικόνα 2: Διαμήκης Τομή κελυφωτού φιστικιού (Kashaninejad et al., 2011). Περικάρπιο (Μεσοκάρπιο + Εξωκάρπιο)/Φλοιός, Δ Ενδοκάρπιο/Κέλυφος, ΦΕνδοσπέρμιο και

Σπέρμα/Πυρήνας.

Ένα άλλο κριτήριο ποιότητας είναι η απουσία χρώσης στο κέλυφος. Αυτό δεν ενδιαφέρει τους παραγωγούς, μόνο για αισθητικούς λόγους, μιας και αποτελεί δείκτη ανάπτυξης παθογόνων οργανισμών και προβλημάτων από τα έντομα, πριν από την συγκομιδή (Ferguson et al., 2005). Ο καρπός, μετά την καρπόδεση, κατά τον Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο αυξάνει σε μέγεθος, ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται, κατά το διάστημα αυτό. Μέχρι και το τέλος Ιουνίου, το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων (Ferguson et al., 2005). Από το τέλος Ιουνίου, το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και το σπέρμα αρχίζει να αναπτύσσεται και φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα με τέλη Αυγούστου. Η διάσπαση του κελύφους δεν είναι ορατή, λόγω του γεγονότος ότι το σαρκώδες μεσοκάρπιο περιβάλλει το κέλυφος στα αναπτυσσόμενα φιστίκια (Ποντίκης, 1996). Ωστόσο, στοιχεία της ωρίμανσης μπορεί να δει κανείς στην αλλαγή του χρώματος του φλοιού, ο οποίος είναι πράσινος όταν ο καρπός δεν είναι ώριμος και στη συνέχεια εξελίσσεται σε κόκκινο, κατά τη πλήρη ωρίμανση, στο τμήμα, που εκτίθεται στον ήλιο. Αυτό οφείλεται στη μείωση ή στην απώλεια της χρωστικής χλωροφύλλης στο φλοιό, η οποία επιτρέπει στις κόκκινες χρωστικές να γίνουν ορατές. Όταν ο καρπός είναι πλήρως

παρουσιάζει αυτή την ιδιομορφία.

34

ώριμος, το περικάρπιο γίνεται μαλακό και αποκολλάται εύκολα από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (Ferguson et al., 2005). Το *P.vera* είναι το μόνο είδος του γένους *Pistacia*, που



<u>Εικόνα 3:</u> Σχηματική απεικόνιση των τριών διαστάσεων στο κελυφωτό φιστίκι. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν το πυρήνα/ψίχα εντός του ενδοκαρπίου (Ozden-Tokatli et al., 2010).

Το μέγεθος, οι διαστάσεις αλλά και το σχήμα όλων των τμημάτων του καρπού παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό και στην επιλογή του κατάλληλου εξοπλισμού επεξεργασίας και αποθήκευσης (Ozden-Tokatli et al., 2010). Στην Ελλάδα, καλλιεργείται εκτεταμένα η θηλυκή ποικιλία Αιγίνης, ενώ ως επικονιαστές χρησιμοποιούνται οι τρεις αρσενικές ποικιλίες Α,Β και Γ. Άλλες σπουδαίες εγχώριες καλλιεργήσιμες ποικιλίες είναι η Νυχάτη, η Φουντουκάτη και η Pontikis, ενω από ξένες ποικιλίες, η Kerman, η Sfax, η Red Aleppo και η Bronte,μεταξύ άλλων (Ποντίκης, 1996).

1.2 Συγκομιδή, αποφλοίωση και αποθήκευση κελυφωτού καρπού P. vera L.

Η ωρίμανση των φιστικιών αρχίζει από τα μέσα Αυγούστου. Οι καρποί δεν ωριμάζουν όλοι μαζί και γι' αυτό η συγκομιδή δεν διενεργείται μονομιάς, αλλά με καθυστέρηση, σε δύο ή σπανιότερα σε τρία «χέρια». Η περίοδος της συγκομιδής κυμαίνεται από το τέλος Αυγούστου μέχρι τέλους Σεπτεμβρίου, ανάλογα με την ποικιλία και την περιοχή (Ποντίκης, 1996). Ο καρπός συγκομίζεται με ράβδισμα ή τίναγμα των δένδρων και με μηχανικούς δονητές. Η εκκίνηση της συγκομιδής πραγματοποιείται, όταν το περικάρπιο του φρεσκοκομμένου και ώριμου καρπού ξεφλουδίζεται αρκετά εύκολα (Ποντίκης, 1996).

Η κατάλληλη και σύντομη χρονικά επεξεργασία μετά τη συγκομιδή είναι πολύ σημαντική για την ποιότητα του φιστικιού και την εμπορευσιμότητα του (Kashaninejad et al., 2011).

Πράγματι, όταν η αποφλοίωση λαμβάνει χώρα το συντομότερο δυνατό, συμβάλλει στο να μειωθεί η πιθανότητα ανάπτυξης μυκήτων, αλλά και να αποφευχθεί η χρώση του κελύφους. Γενικά, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τύποι αποφλοιωτικών μηχανών, ανάλογα με την έκταση και την ποσότητα της παραγωγής, τον οικονομικό προϋπολογισμό του εκάστοτε παραγωγού, αλλά και τη διαθεσιμότητα νερού κατά την επεξεργασία

(Kashaninejad et al., 2011). Στη περίπτωση του αποφλοιωτή με τύμπανα, αφαιρείται το περικάρπιο από τον καρπό, αμέσως μετά τη συγκομιδή. Τα κελυφωτά φιστίκια πλένονται και ξεφλουδίζονται μέσα στο κύλινδρο ξεφλουδίσματος και στη συνέχεια ο διαχωρισμός του τελικού προϊόντος από τα ελλιποβαρή και κούφια φιστίκια λαμβάνει χώρα στο δοχείο νερού μέσω συνεχούς ανάδευσης (www.ercad.gr).



Εικόνα 4: Αποφλοιωτής κελυφωτού φιστικιού με τύμπανα (www.ercad.gr)



Εικόνα 5: Αφαίρεση αποβλήτων αποφλοίωσης κελυφωτών φιστικιών με ροή βαρύτητας (Προσωπικό Αρχείο)

Τα απόβλητα από τη διαδικασία αποφλοίωσης μπορούν να αφαιρεθούν με μια προαιρετική συσκευή άντλησης ή με ροή βαρύτητας (Εικ. 5). Η συνολική απόδοση της συσκευής είναι εξαιρετικά υψηλή τόσο για διαδικασίες αποφλοίωσης όσο και για διαχωρισμό (www.ercad.gr). Στη συνέχεια,ο αποφλοιωμένος καρπός απομακρύνεται άμεσα από το χώρο της αποφλοίωσης, με απώτερο στόχο, να "στεγνώσει" είτε φυσικά στον ήλιο,είτε σε ειδικά ρυθμιζόμενα ξηραντήρια.
Η πρώτη αυτή ξήρανση συμβάλλει στη μείωση της υψηλής ενεργότητας σε νερό του καρπού και στην ορθότερη αποθήκευση του, η οποία πληροί τα ποιοτικά κριτήρια ασφάλειας και προηγείται της εμπορικής του διάθεσης (Χιτζανίδου κ.α, 2004). Πιο συγκεκριμένα, μετά την αποφλοίωση, ο καρπός αποξηραίνεται σε ειδικά ξηραντήρια σε θερμοκρασία 65 °C επί 8 h. Όταν πρόκειται για μικρή ποσότητα, τα φιστίκια απλώνονται σε στρώση πάχους 2-3 φιστικιών στον ήλιο επί 3-4 ημέρες (Χιτζανίδου κ.α, 2004). Στους αποξηραμένους σε ξηραντήρια καρπούς, το ποσοστό υγρασίας μετά την αφαίρεση των λιπαρών συστατικών είναι 5-6%, ενώ στους αποξηραμένους στον ήλιο κυμαίνεται,από 8-10%. Η σχέση βάρους αποφλοιωμένων και αποξηραμένων καρπών προς νωπούς προ της αποθηκεύονται σε αποθήκες καθαρές, με καλή θερμική μόνωση, με χαμηλή υγρασία, για να εμποδίζεται η ανάπτυξη μυκήτων και με δυνατότητα αερισμού. Στα παράθυρα των αποθηκών πρέπει να υπάρχει λεπτή σήτα για να αποφεύγεται η είσοδος εντόμων (Χιτζανίδου κ.α, 2004).

1.3 Παραπροϊόντα καλλιέργειας του καρπού P. vera L.

Μετά τη συγκομιδή και κατά τη διάρκεια της προαναφερθείσας βιομηχανικής επεξεργασίας, αποβάλλονται τα περικάρπια, το πιο σημαντικό παραπροϊόν της καλλιέργειας φιστικιών (>60 %) (Mohammadi et al., 2009). Το περικάρπιο περιέχει μεγάλη ποσότητα νερού (>70%) και κατά συνέπεια είναι επιρρεπής στη μικροβιακή επιμόλυνση και ζύμωση και πρέπει να υποβληθεί σε διαδικασία ξήρανσης (Arjeh et al., 2020).

Οι μονάδες αποφλοίωσης έχουν τη τάση να απορρίπτουν τα παραγόμενα παραπροϊόντα εντός του ίδιου του φιστικεώνα ή σε εκτάσεις, που γειτνιάζουν με αυτόν για λόγους ευκολίας. Η μη περαιτέρω επεξεργασία των περικαρπίων εγείρει περιβαλλοντικούς προβληματισμούς, σχετικούς με την υποβάθμιση του εδάφους και του υδροφόρου ορίζοντα (Behgar et al., 2011). Σε ένα πρωταρχικό επίπεδο διαχείρισης, γίνεται ανάμειξη με τύρφη, με το τελικό προϊόν να διατίθεται ως βελτιωτικό προϊόν κομποστοποίησης, είτε χρησιμοποιείται άτυπα, ως ζωοτροφή σε τοπικό επίπεδο (Çelik et al., 2015). Ωστόσο, τα περικάρπια αποτελούν μια οικονομικά αποδοτική πηγή, πλούσια σε φαινολικές ενώσεις με τεκμηριωμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Rajaei et al., 2010,Grace et al., 2016). Ως εκ τούτου, η χρήση τους ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να οδηγήσει σε μια ολοκληρωμένη και κυκλική διαχείριση της φιστικοκαλλιέργειας, δίνοντας λύση σε ένα μείζον περιβαλλοντικό ζήτημα και παράλληλα, συμβάλλοντας στην αξιοποίηση ενός παραποποροϊόντος, το οποίο παράγεται σε μεγάλη ποσότητα (Arjeh et al., 2020).

Επομένως, η απομόνωση και ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τα απόβλητα αποφλοίωσης κελυφωτών φυστικιών παρέχει τριπλό όφελος,τόσο στο περιβάλλον,όσο και στο εισόδημα των παραγωγών και στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

1.3.1 Χημική σύσταση του περικαρπίου κελυφωτού (Pistachio Green Hull-PGH)

Τα περικάρπια των κελυφωτών φυστικιών (Pistachio Green Hull - PGH), καταλαμβάνοντας ένα μεγάλο μέρος του φιστικιού (περίπου το ένα τρίτο του βάρους της ξηράς ουσίας), θεωρούνται μια πλούσια πηγή φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών, λιπαρών οξέων και πολυσακχαριτών όπως η πηκτίνη (Chaharbaghi et al., 2017, Rajaei et al., 2010).

1.3.1.1 Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις του PGH ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με την βοτανική ποικιλία, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, το στάδιο ωρίμανσης, τις καλλιεργητικές τεχνικές, τον τρόπο αποφλοίωσης και τη χημική σύσταση του διαλύτη εκχύλισης (Grace et al., 2016). Οι κυρίαρχες είναι το γαλλικό οξύ, η κερκετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη, η φλωρογλυκινόλη, η κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη, η θεογαλλίνη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η λουτεολίνη και η πυραγαλλόλη (Barreca et al., 2016). Οι Seifzadeh et al. (2018) αναφέρουν ότι το γαλλικό οξύ είναι μία από τις κυριότερες φαινολικές ενώσεις του PGH και εντοπίζεται τόσο ελεύθερη όσο και ως μέρος υδρολυόμενων τανινών. Η κερκετίνη είναι ένα άλλο πολυφαινολικό φλαβονοειδές του PGH, το οποίο ευθύνεται για την στυπτικότητα και την πικρότητα στους χυμούς φρούτων και το κρασί (Ferrer-Gallego et al., 2015). Οι Barreca et al. (2016) αναφέρουν ότι μεταξύ των φαινολικών ενώσεων του PGH, η κερκετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη έχει τη υψηλότερη συμμετοχή. Ωστόσο, οι Lalegani et al. (2018) διαπίστωσαν ότι η φλωρογλυκινόλη ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση στον ίδιο φυτικό ιστό, με τη φλωρογλυκινόλη να αποτελεί μια φυσική ένωση που περιέχει το 1,3,5-τριυδροξυ βενζόλιο, ως τη βασική ομάδα της. Οι Tomaino et al. (2010) στην εργασία τους, επιβεβαιώνουν ότι το περικάρπιο περιέχει υψηλότερα επίπεδα φλαβονοειδών, φλαβονολών, ανθοκυανινών και πρωτοανθοκυανιδινών από ότι το σπέρμα. Τα ανακαρδικά οξέα είναι φαινολικά λιπίδια που αποτελούνται από φαινολικούς δακτυλίους και πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες και θεωρούνται ταξονομικοί χημικοί δείκτες της οικογένειας Anacardiaceae. Ονομάζονται από το μήκος της πλευρικής αλυσίδας και τον αριθμό των διπλών δεσμών στην αλειφατική αλυσίδα (Schulze-Kaysers et al., 2015). Οι Erşan et al. (2016) εντόπισαν συνολικά 11 ανακαρδικά οξέα με διαφορετικά μήκη πλευρικών αλειφατικών αλυσίδων (C13, C15 και C17) και βαθμό κορεσμού (πλήρως κορεσμένος ή μονο-, δι- ή τρι-ακόρεστα) στο PGH και ανέφεραν ότι ήταν τα κύρια συστατικά των φαινολικών PGH.



<u>Εικόνα 6</u>: **Α.** Φλωρογλυκινόλη, **Β.** Ανακαρδικά οξέα **Γ.** Γαλλικό οξύ και **Δ.** Κερκετίνη-3-Ορουτινοσίδη (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

1.3.1.2 Πηκτίνη

Οι Chaharbaghi et al. (2017) και Kazemi et al. (2019) χαρακτήρισαν τις ιδιότητες της PGH πηκτίνης, η οποία απομονώθηκε σε όξινες συνθήκες, και αναφέρουν ότι ο βαθμός εστεροποίησης της PGH πηκτίνης κυμαίνεται από 26,0 έως 58,3%. Επομένως, η πηκτίνη του περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού ταξινομείται ως χαμηλή μεθοξυλική πηκτίνη (LM), η οποία δεν απαιτεί επιπλέον σάκχαρα για ζελατινοποίηση. Με βάση τους κανονισμούς του FAO και της EE, η εκχυλισμένη πηκτίνη πρέπει να αποτελείται από τουλάχιστον 65% γαλακτουρονικό οξύ (Εικ. 7). Σε μελέτη των Chaharbaghi et al. (2017), η περιεκτικότητασε γαλακτουρονικό οξύ της πηκτίνης, που εκχυλίστηκε υπό βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης,ήταν περίπου 65%. Σε άλλη μελέτη, το γαλακτουρονικό οξύ (66,0%), η αραβινόζη (26,2%), η γαλακτόζη (3,7%), η ραμνόζη(2,7%) και η ξυλόζη (1,0%) ποσότικοποιήθηκαν με τη μέθοδο HPLC στην πηκτίνη, που εκχυλίστηκε με μικροκύματα (Kazemi et al., 2019). Επομένως, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι τα περικάρπια κελυφωτού φιστικιού δύναται να είναι μια καλή πηγή για την εκχύλιση πηκτίνης με ικανοποιητική καθαρότητα.



Εικόνα 7: Γαλακτουρουνικό οξύ (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

1.3.1.3 Αιθέριο έλαιο

Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο της PGH, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κυμαίνεται από 0,14 έως 0,53% (v/w) (επί ξηρού βάρους) (Chahed et al., 2007). Αποτελείται, κυρίως, από:

- (i) μονοτερπινικούς υδρογονάνθρακες (79,8-93,6%),
- (ii) οξυγονωμένα μονοτερπένια (3,9-10,2%),
- (iii) σεσκιτερπένια (0,03-0,08%),
- (iv) φαινόλες (0,01-0,03%) και
- (v) αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (0,6-1,9%) (Chahed et al., 2007, Smeriglio et al., 2017)



Εικόνα 8: Α. α-πινένιο, Β. α-τερπινολένιο και Γ. Λιμονένιο

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

Τα κύρια συστατικά είναι το α-πινένιο, το α-τερπινολένιο και το λιμονένιο (~ 80%), τα οποία ακολουθούνται από μικρότερες ποσότητες άλλων πτητικών ενώσεων (Εικ. 8) (Chahed et al., 2007). Το α-πινένιο είναι ένας μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας, απαντά πολύ συχνά στα αιθέρια έλαια . Στο αιθέριο έλαιο του PGH απαντά σε συγκεντρώσεις έως και 54% (Küsmenoglu et al., 1995). Τυχόν αλλαγές στη σύνθεση των αιθέριων ελαίων είναι γνωστό

ότι συνδέονται στενά με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και το κλίμα. Ως εκ τούτου, η σύγκριση της σύνθεσης αιθέριου ελαίου περικαρπίου από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές μπορεί να έχει ενδιαφέρον για τον ορισμό νέων χημειοτύπων (Chahed et al., 2007).

1.3.1.4 Λιπαρά οξέα

Τα ελαϊκό (18:1) και λινολεϊκό οξύ (18:2) αποτελούν τα κύρια ακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ το παλμιτικό οξύ (16:0), το κυρίαρχο κορεσμένο λιπαρό οξύ των μη πολικών εκχυλισμάτων PGH (Εικ. 9). Τα λιπαρά οξέα του PGH που εκχυλίστηκαν με διχλωρομεθάνιο και αναλύθηκαν με GC-MS, είχαν συγκέντρωση 1,5 % (w/w) (επί ξηρού βάρους, από τα οποία η αναλογία ακόρεστων λιπαρών προς ολικά λιπαρά οξέα ήταν περίπου 87%, με το πολυακόρεστο λινολεϊκό οξύ, να αποτελεί το 50% των συνολικών λιπαρών οξέων (Grace et al., 2016).



<u>Εικόνα 9:</u> Α. Ελαϊκό οξύ, **Β.** Λινολεϊκό οξύ και **Γ.** Παλμιτικό οξύ (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

1.3.2 Διαχείριση και αξιοποίηση των περικαρπίων κελυφωτού καρπού (Pistachio Green Hull-PGH)

Έχει ήδη αναφερθεί η συνήθης πρακτική των φιστικοπαραγωγών να εναποθέτουν αυτούσια τα παραγόμενα παραπροϊόντα εντός του ίδιου του φιστικεώνα, πλησίον του αποφλοιωτή για λόγους ευκολίας και κατόπιν σε γειτονικές γεωργικές εκτάσεις, αψηφώντας την περιβαλλοντική επιβάρυνση (Behgar et al., 2011).



Εικόνα 10: Τάφρος συλλογής περικαρπίων κατά την αποφλοίωση κελυφωτών φιστικιών.

Η χρήση των περικαρπίων ως εδαφοβελτιωτικό προϊόν κομποστοποίησης, είτε ως ζωοτροφή είναι ευρέως διαδεδομένη στις χώρες παραγωγής τους (Çelik et al., 2015). Όσον αφορά το κομποστοποιημένο προϊόν και τη διαχείρισή του, η ικανότητα του *Aspergillus flavus* να μολύνει μια μεγάλη ποικιλία φυσικών υποστρωμάτων (Cotty et al., 1994) εγείρει προβληματισμούς, σχετικά με το πόσο ασφαλές είναι στη χρήση του ως φυσικό λίπασμα. Ο συγκεκριμένος τύπος ζωοτροφής πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, γιατί φέρεται να ευθύνεται για τη πρόκληση πεπτικών προβλημάτων στα ζώα, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων και τανινών, που περιέχει (Mokhtarpour et al., 2014). Στην Ελλάδα, για τη μείωση της ποσότητας των παραπροϊόντων, δύο απλά και χαμηλού κόστους συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων αναπτύχθηκαν και υλοποιήθηκαν σε δύο πιλοτικά χωράφια στην Αίγινα (www.agrostrat.gr). Το πρώτο σύστημα είναι οι ρηχές δεξαμενές συλλογής, εύκολες στη κατασκευή τους (Εικ. 11) (www.agrostrat.gr).



<u>Εικόνα 11:</u> Ρηχές δεξαμενές συλλογής (www.agrostrat.gr).

Πριν τη διάθεση, τα απόβλητα διαχωρίζονται με χρήση απλής τεχνολογίας διαχωρισμού σε στερεά και υγρά, με τα υγρά να οδηγούνται στις δεξαμενές, οι οποίες έχουν καλυφθεί με προστατευτικά υλικά, ώστε να προστατευτεί το έδαφος και τα υδατικά συστήματα από διαρροές (www.agrostrat.gr). Στην περίπτωση των Διαδοχικών Δεξαμενών Συλλογής,

δεύτερο σύστημα επεξεργασίας, τα απόβλητα συλλέγονται στις δεξαμενές, χωρίς να έχει γίνει αρχικός διαχωρισμός των στερεών από τα υγρά απόβλητα και αφήνονται προς εξάτμιση του υγρού μέρους, ενώ το στερεό που απομένει, κομποστοποιείται (Εικ. 12) (Layman's Report, Agrostart).



Εικόνα 12: Διαδοχικές δεξαμενές συλλογής (www.agrostrat.gr)

Πέρα από την περιβαλλοντική διαχείριση,οι μεγάλες ποσότητες περικαρπίων κελυφωτού φιστικιού (PGH) μπορούν να αξιοποιηθούν και σε άλλους παραγωγικούς τομείς. Το περικάρπιο, ως η εξώτατη στοιβάδα φλοιού των κελυφωτών φυστικιών, φέρεται να περιέχει μια αξιόλογη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών πολυφαινολικών ενώσεων, όπως αναμένεται λόγω του ρόλου του, ως προστατευτικού εξωτερικού περιβλήματος γύρω από τον καρπό (Grace et al.,2016). Οι περισσότερες επιστημονικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην απομόνωση φαινολικών αντιοξειδωτικών συστατικών από τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα, δεδομένου ότι αποτελούν μια πλούσια πηγή για την εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες και οι πολυσακχαρίτες (Goli et al., 2005). Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις, λόγω του αντιοξειδωτικού δυναμικού τους, συμβάλλουν στη προστασία της υγείας καθώς και στη συντήρηση τροφίμων, λόγω της ικανότητας τους να παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν τους οξειδωτικούς μηχανισμούς που προκαλούν βλάβες στους ιστούς (Balasundram et al.,2006). Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες να βρεθούν φυσικά αντιοξειδωτικά από φυτικές πηγές, κυρίως λόγω ζητημάτων ασφάλειας, καθώς και της τοξικότητας των συνθετικών αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι μερικά συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), η tertβουτυλουδροκινόνη (TBHQ) και ο γαλλικός προπυλεστέρας έχουν καρκινική δράση ή βλάπτουν το DNA παρουσία μεταλλικών ιόντων σιδήρου και χαλκού (Grace et al., 2016). Οι φαινολικές ενώσεις από τα απόβλητα, που προέρχονται από αγροτοβιομηχανική παραγωγή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και λειτουργικά

συστατικά και πρόσθετα τροφίμων και να αντικαταστήσουν τα συνθετικά τους ισοδύναμα. Αυτές οι ενώσεις προστατεύουν το σώμα, έχοντας ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, έναντι της οξείδωσης και των κυτταρικών βλαβών, που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Balasundram et al. ,2006). Μελέτες αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα περικαρπίων φιστικιού (Pistachio Green Hull Extract) έχει σημαντικές ποσότητες πολυφαινολικών ενώσεων με διάφορες βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (Rajaei et al., 2010, Grace et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα του περικαρπίου είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά, με αποτέλεσμα να επιβραδύνουν σημαντικά την υποβάθμιση του σογιέλαιου στους 60 °C, με απόδοση συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη από την συνθετική αντιοξειδωτική BHA. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι τα εκχυλίσματα PGH εμφανίζουν προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (> 500 mg / kg) (Goli et al., 2005). Παράλληλα, φέρονται να αναστέλλουν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram τροφιμογενών βακτηρίων (Bacillus cereus), ενώ τα ίδια εκχυλίσματα έδειξαν αντιμεταλλαξογόνο δράση, έναντι του μεταλλαξιογόνου του 2-νιτροφουρενίου (Rajaei et al., 2010). Άλλες χρήσεις του περικαρπίου του φιστικιού, οι οποίες έχουν μελετηθεί από σχετικές εργασίες είναι: ως

πρώτη ύλη για τη παραγωγή βιοκαυσίμων, υλικό για την απομάκρυνση τοξικών ρύπων (π.χ κυανιούχων) από λύματα (Ersan et al., 2016), ως νέο και εναλλακτικό φυσικό αναστολέα της τυροσινάσης για τη μείωση της ενζυματικής της δράσης, σχετικά με την ενζυμική αμαύρωση ευαλλοίωτων τροφίμων υπό συντήρηση (Fattahifar et al., 2018). Παράλληλα, έχει γίνει προσπάθεια απομόνωσης πηκτινών, με ικανοποιητική απόδοση και χρήση τους, στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των ιδιοτήτων της πηκτωματοποίησης, γαλακτωματοποίησης και σταθεροποίησης των περιεχόμενων υλικών (Kazemi et al., 2019). Τα τελευταία χρόνια, λόγω ορισμένων περιορισμών σχετικά με την άμεση χρήση βιοδραστικών ενώσεων σε προϊόντα διατροφής, μελετήθηκε η ενθυλάκωση τους. Οι κύριοι λόγοι περιορισμοί των βιοδραστικών ενώσεων για άμεση χρήση στη σύνθεση τροφίμων είναι οι εξής:

- χαμηλή διαλυτότητα,
- χαμηλή σταθερότητα,
- χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα,
- αντίδραση με συστατικά τροφίμων και
- δυσμενής γεύση (Rafiee et al., 2018).

Από αυτή την άποψη, οι Rafiee et al. (2018) και Roostaee et al. (2017) ανέπτυξαν μέθοδο της χρήσης φαινολικών ενώσεων σε νανολιποσωμικές συνθέσεις για καθυστέρηση της αλλοίωσης της μαγιονέζας και του σογιέλαιου, αντίστοιχα. Στα αποτελέσματα τους, ανέφεραν ότι τα νανολιποσώματα βελτίωσαν την αντιοξειδωτική απόδοση των φαινολικών ενώσεων PGH κατά τη διάρκεια της μακροπρόθεσμης αποθήκευσης. Η αποτελεσματικότητα των ενθυλακωμένων φαινολικών ενώσεων στην καθυστέρηση της οξειδωτικής διαδικασίας ήταν συγκρίσιμη με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά (BHT και TBHQ).

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2⁰:</u> ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Οι φαινολικές ενώσεις είναι ευρύτερα διαδεδομένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, με ποικιλία δομών, από απλά μόρια, όπως φαινολικά οξέα,έως πολυφαινόλες όπως φλαβονοειδή και τανίνες, που περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες πολυμερών μορίων. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του PGH είναι υψηλότερο από εκείνο πολλών βρώσιμων λαχανικών και φρούτων, που θεωρούνται πλούσιες πηγές φαινολικών ενώσεων (Goli et al., 2005, Seifzadeh et al., 2018).





Σύμφωνα με τους Behgar et al., 2011, συγκριτικά με τη ψίχα και το κέλυφος του ίδιου καρπού, το φαινολικό περιεχόμενο του περικαρπίου εντοπίζεται και εδώ σε υψηλότερη συγκέντρωση. Στην πραγματικότητα, η φαινολική περιεκτικότητα του υδατικού εκχυλίσματος του PGH αναφέρεται σε περίπου 197 mg GAE / g ξηρού βάρους (Garavand et al., 2017). Το προφίλ των φαινολικών ενώσεων τους εχει ήδη αναγνωριστεί από διάφορους συγγραφείς (Barreca et al., 2016, Seifzadeh et al., 2018) και μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κύριες ομάδες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 13.

2.1 Παραλαβή φαινολικών συστατικών περικαρπίων κελυφωτών φιστικιών (PGH)

Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης του δείγματος καθώς και η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη επιδρά σημαντικά στην αποτελεσματική παραλαβή των λειτουργικών ενώσεων.

Πράγματι, η μεταβλητότητα των λειτουργικών ενώσεων και συνεπώς, η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από την ποικιλία, το κλίμα, την κατάσταση του εδάφους, τη γεωγραφική θέση και τις μεθόδους επεξεργασίας (Beres et al., 2017).

Όσον αφορά τη παραλαβή φαινολικών συστατικών από το περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών, οι Ghandahari et al. (2018) μελέτησαν την επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος και του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης και κατέληξαν στη θετική συσχέτιση της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων, λόγω της αύξησης της επιφάνειας επαφής μεταξύ διαλύτη και δείγματος. Αντιθέτως, οι Mokhtarpour et al. (2014) και Tabaraki et al. (2016) ανέφεραν ότι η απόδοση εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων δεν επηρεάστηκε από το μέγεθος των σωματιδίων. Οι πολικές φαινολικές ενώσεις είναι ευδιάλυτες σε πολικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν συχνά νερό (Mohammadi et al., 2009, Seifzadeh et al., 2018, Tabaraki et al., 2016), ακετόνη (Abolhasani et al., 2018, Behgar et al., 2011), μεθανόλη (Erşan et al., 2016, Tabaraki et al., 2016), αιθανόλη (Barreca et al., 2016, Tabaraki et al., 2016), οξικό αιθυλεστέρα (Abolhasani et al., 2018, Goli et al., 2005), ως διαλύτη εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του περικαρπίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Alhariri et al., 2007, Goli et al., 2005, Rajaei et al., 2010), το νερό είναι ο καλύτερος διαλύτης στην εκχύλιση φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, έχουν επίσης αναφερθεί και αντιφατικά αποτελέσματα (Taghizadeh et al., 2018). Τα αποτελέσματα των Erşan et al. (2016) έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις του περικαρπίου κελυφωτού εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα πολικότητας, από πολικές / μετρίως πολικές ενώσεις (π.χ γλυκοζίτες φλαβονοειδών και γαλοταννίνες), έως μη πολικές όπως τα τα ανακαρδικά οξέα, που διαθέτουν μεγάλη αλειφατική αλυσίδα. Σε μια άλλη τους μελέτη, οι Ersan et al. (2017) ανέφεραν ότι τα ανακαρδικά οξέα εκχυλίζονται σχεδόν εκλεκτικά με χρήση οργανικων διαλυτών, όπως το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας και η ακετόνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια, οι Taghizadeh et al. (2018) συνέκριναν την αποτελεσματικότητα πολικών και μη πολικών διαλυτών στην απόδοση εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων από το PGH και παρατήρησαν ότι οι μη πολικοί ή-μετρίως πολικοί διαλύτες έχουν υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης. Γενικά, τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει προσπάθειες για την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης και για την πρόληψη της απώλειας βιο-δραστικών ενώσεων. Η ενζυματική εξαγωγή είναι μία από τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν για αυτό τον στόχο. Οι Yazdi et al. (2018) βελτιστοποίησαν τις συνθήκες εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από το PGH με μια ενζυματική μέθοδο. Η θετική επίδραση των ενζύμων στην απόδοση εκχύλισης έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος του περικαρπίου, τη

διάσπαση των δεσμών μεταξύ των πολυφαινολών και των πολυμερών των φυτικών κυττάρων και κατ' επέκταση, τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης φαινολικών ενώσεων (Yazdi et al., 2018). Οι Goli et al. (2005) και Erşan et al. (2017) δεν παρατήρησαν σημαντικές αλλαγές στην απόδοση εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων PGH κατά τη σύγκριση της εκχύλισης, υποβοηθούμενης από υπερήχους, με μια συμβατική αναδευόμενη εκχύλιση. Σε άλλη μελέτη, οι Tabaraki et al., 2016 συνέκριναν τρεις τεχνικές εκχύλισης (συμβατική, μικροκύματα και υπέρηχοι) και διαπίστωσαν ότι η εκχύλιση με μικροκύματα είχε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από το PGH. Τέλος, οι Abolhasani et al. (2018) και Behgar et al. (2011) περιέγραψαν την επίδραση της γ-ακτινοβολίας στη φυτοχημική εκχύλιση του PGH και δήλωσαν ότι τα υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας αύξησαν σημαντικά το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων.

2.2 Ταξινόμηση βάσει της χημικής δομής

Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον αριθμό και τη διάταξη των ατόμων του άνθρακα που ενώνονται με τον δακτύλιο της φαινόλης και συνήθως απαντώνται υπό συζευγμένη μορφή με σάκχαρα και οργανικά οξέα (Crozier et al.,2006). Οι φαινολικές ενώσεις έχουν στο μόριο τους έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια και παράγονται κατά κύριο λόγο μέσω των μεταβολικών μονοπατιών του σικιμικού και του μηλονικού οξέος (Manach et al., 2004). Αποτελούν μία ευρεία ποικιλία ενώσεων συμπεριλαμβανομένων απλών, μικρού μοριακού βάρους μονοκυκλικών φαινολών και φαινολικών οξέων, μέχρι και μεγάλου μοριακού βάρους πολύπλοκων τανινών και πολυφαινολών (Crozier et al., 2006). Οι κυριότερες τάξεις των φαινολικών ενώσεων κατά Crozier et al., 2006 φαίνονται στον Πίνακα 1.

| <u>Σκελετός</u> | <u>Κατηγορία</u> | <u>Παραδείγματα</u> | <u>Χημική Δομή</u> |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | |
| C6 | Απλές Φαινόλες | Βανιλλίνη, | ОН |
| | | Υδροκινόνη, | |
| | | Θυμόλη, | |
| | | Καρβακρόλη | |
| | <u>Σκελετός</u> C6 | Σκελετός Κατηγορία C6 Απλές Φαινόλες | Σκελετός Κατηγορία Παραδείγματα C6 Απλές Φαινόλες Βανιλλίνη, Υδροκινόνη, Θυμόλη, Καρβακρόλη Καρβακρόλη |

Πίνακας 1: Χημικές δομές φαινολικών συστατικών (Crozier et al., 2006)

| 7 | C6-C1 | Φαινολικά Οξέα | Γαλλικό Οξύ, Π-υδροξυβενζοϊκό Οξύ | С |
|----|-----------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 9 | C6-C3 | Υδροξυκινναμικά Οξέα | π-κουμαρικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, Φερουλικό οξύ Σιναπικό οξύ | ОН |
| 14 | C6-C2-C6 | Στιλβένια | Ρεσβερατρόλη | |
| 18 | (C6-C3)2 | Λιγνάνες | Σησαμίνη | H ₃ C CH ₃ |
| n | (C6-C3- C6)n | Συμπυκωμένες Ταννίνες | Προκυανιδίνες Προδελφινιδίνες | CH ₃ OH OH OH OH OH OH |
| 15 | C6-C3-C6 | Φλαβανοειδή | | |
| | | Φλαβόνες | Απιγενίνη, Λουτεολίνη | |
| | | Φλαβονόλες | Κερκετίνη, Μυρκετίνη, Καμφερόλη | ОН |
| | | Φλαβανόνες | Ναριγκενίνη, Εσπερετίνη | |

| la | σοφλαβόνες | Γενιστεΐνη, Δαϊζδεΐνη | |
|----|-------------|------------------------------------------------|----|
| A | νθοκυανίνες | Κυανιδίνη, Δελφινιδίνη | OH |
| Φ | υλαβανόλες | Κατεχίνη, Προανθοκυανιδίνη Γαλλοκατεχίνη | |

2.2.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά. Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος. Στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων ανήκουν το πρωτοκατεχοϊκό και το γαλλικό οξύ, ενώ στην κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων ανήκει το π-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και τα σιναπικό οξύ (Καράταγλης, 1994). Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι τα πιο κοινά υδροξυβενζοϊκά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα πολυμερίζονται σε υδρολυόμενες τανίνες, φέρουν στο κέντρο τους μόριο σακχάρου μερικά ή ολικά εστεροποιημένο με φαινολικό οξύ. Τα μόρια των υδροξυβενζοικών οξέων (συνήθως γαλλικό ή ελλαγικό οξύ), στο μόριο της υδρολυόμενης τανίνης, συνδέονται με ποικίλους τρόπους (Καράταγλης, 1994). Σε όξινες συνθήκες ή με ενζυμική αποικοδόμηση, οι υδρολυόμενες τανίνεα στο σάκχαρο και φαινολικά οξέα. Αυτό συμβαίνει γιατί το χαμηλό pH εξασθενεί τον δεσμό ανάμεσα στο υδρογόνο και το οξυγόνο των συνδεδεμένων φαινολών (Nepka et al., 1999).

2.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα πολυφαινολών και περιέχουν πάνω από 4000 φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης. Αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτύλιους (Α και Β), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα, που ονομάζεται κεντρικός οξυγονωμένος ετεροδακτύλιος. Η δομή αυτή είναι το αποτέλεσμα της συνένωσης δύο προϊόντων που προέρχονται από δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια στα φυτά. Ο δακτύλιος Α προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος Β προέρχεται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος. Διαιρούνται σε έξι υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετεροδακτυλίου: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) (Καράταγλης, 1994). Οι φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη) συγκεντρώνονται στην επιδερμίδα και στα φύλλα των φυτών, επειδή η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από το φως. Οι φλαβόνες βρίσκονται κυρίως συνδεδεμένες με λουτεολίνη και απιγενίνη. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες δεν περιορίζονται μόνο στα άνθη, αλλά βρίσκονται επίσης στα φύλλα και στους βλαστούς όλων των χλωροφυλλούχων φυτών, έτσι ώστε να τα προστατεύουν από την UV-ακτινοβολία (Καράταγλης, 1994). Οι ισοφλαβόνες έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα, αν και δεν είναι στεροειδή και έχουν ψευδοορμονικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου της ικανότητας τους να συνδέονται στον οιστρογονικό υποδοχέα, γι'αυτό κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα. Φλαβανόλες υπάρχουν σε μονομερή μορφή (κατεχίνες) και σε πολυμερισμένη μορφή (προανθοκυανιδίνες). Κύριοι εκπρόσωποι των κατεχινών είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη. Οι προανθοκυανιδίνες είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή κατεχινών και προσδίδουν αντισηπτικές ιδιότητες στα φρούτα (Manach et al., 2004). Τα μόρια των συμπυκνωμένων τανινών είναι μεγαλύτερα από αυτά των υδατοδιαλυτών τανινών. Αντίθετα με τις υδατοδιαλυτές τανίνες, οι συμπυκνωμένες τανίνες σε όξινες συνθήκες ή παρουσία αποικοδομητικών ενζύμων, αποικοδομούνται σε πολύπλοκα μόρια τα οποία είναι αδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα (Nepka et al., 1999). Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές που είναι διαλυμένες στα χυμοτόπια επιδερμικών ιστών, ανθέων και φρούτων. Βοηθούν στην προσέλκυση των ζώων προς τα άνθη και τους καρπούς με τη δημιουργία ορατών και οσφρητικών σημάτων (Καράταγλης, 1994). Υπάρχουν σε διαφορετικές χημικές δομές, που χρωματίζονται ή είναι άχρωμες ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Είναι εξαιρετικά ασταθείς, όταν δεν βρίσκονται συνδεδεμένες με σάκχαρα. Μέσα στα φυτά είναι ανθεκτικές στο φως, στο pH και σε οξειδωτικές συνθήκες (Manach et al.,2004).

2.3 Χημικές ιδιότητες

Η παρουσία της φαινυλομάδας επηρεάζει σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών, καθότι αυξάνει τον υδρόφιλο χαρακτήρα του μορίου και εμφανίζει όξινο χαρακτήρα. Οι φαινόλες παρουσιάζουν το φαινόμενο του συντονισμού, που συνεπάγεται μεγάλη σταθερότητα του μορίου. Ο βενζολικός δακτύλιος είναι πολύ σταθερός και δύσκολα σπάζει στη διάρκεια χημικών ή βιολογικών αντιδράσεων (Manach et al., 2004). Ένα υδατικό διάλυμα μιας φαινολικής ένωσης παρουσιάζει ασθενή οξύτητα, που σημαίνει ότι μια φαινολική ουσία διίσταται σε υδατικό διάλυμα. Οι φαινόλες είναι έδρα

διαμοριακών συζεύξεων με δεσμούς υδρογόνου. Η παρουσία δεσμού υδρογόνου μειώνει την δραστικότητα των φαινολικών ομάδων, ως προς την διαλυτότητα της ουσίας σε αλκαλικό διάλυμα. Τα φαινολικά παράγωγα υφίστανται πολύ εύκολα οξειδωτικές μεταβολές, χημικής ή ενζυματικής φύσης . Τα ένζυμα που προκαλούν τις οξειδώσεις είναι η λακκάση και η τυροσινάση (Manach et al., 2004).

2.4 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών

2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φαινολικά συστατικά έχουν άμεση αντιοξειδωτική δράση, αλλά ενδέχεται να εμφανίσουν έμμεσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μέσω της επαγωγής ενδογενών προστατευτικών ενζύμων και ευεργετικών ρυθμιστικών επιδράσεων στις οδούς σηματοδότησης. Λόγω της δραστηριότητας «ριζών- καθαριστών», οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά κατά των ελεύθερων ριζών, με τη δραστηριότητα αυτή, να αποδίδεται στην ικανότητα δωρεάς υδρογόνου (Manach et al.,2004).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το PGH είναι μια πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (γαλλικό οξύ, κερκετίνη, φθορογλυκινόλη, θεογαλλίνη, κατεχίνη, πυρογαλόλη, πολυσακχαρίτες, α-πινένιο και α-τερπινολένιο). Πιο συγκεκριμένα, το γαλλικό οξύ, ως η πιο άφθονη φαινολική ένωση του PGH, έχει αναφερθεί ότι έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Giftson et al., 2010). Ερευνητές ανέφεραν ότι τα φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ, εμφανίζουν τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες με δύο τρόπους: (1) δωρεά ατόμου υδρογόνου και (2) ενεργώντας ως δότης ηλεκτρονίων (Prior et al., 2005).

Οι Wright et al. (2001) συνέκριναν τους δύο αυτούς μηχανισμούς και ανέφεραν ότι και οι δύο μηχανισμοί παίζουν ρόλο στις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες, με διαφορετικούς ρυθμούς. Η ανάλυση της αντιοξειδωτικής δράσης αρκετών φαινολικών ενώσεων, χρησιμοποιώντας τη λειτουργική θεωρία πυκνότητας έδειξε την επικράτηση του πρώτου μηχανισμού. Η κερκετίνη είναι μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική πολυφαινόλη στο εκχύλισμα PGH (Barreca et al., 2016) και αναφέρεται εκτενώς για τη βιολογική της δράση (Razavi et al., 2009). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η κερκετίνη είναι ένας ισχυρός καθαριστής των ROS, όπως το O_2^- και το RO', και των αντιδραστικών ειδών αζώτου (RNS), όπως το 'NO και το ONOO⁻ (Boots et al., 2008). Η αντιοξειδωτική ικανότητα της κερκετίνης έχει αποδοθεί στην παρουσία δύο αντιοξειδωτικών ομάδων στο μόριό της της ομάδας -OH στη θέση 3 και της κατεχόλης στον δακτύλιο B (Gupta, 2016). Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φρούτων και λαχανικών εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση των βιοδραστικών ενώσεων, ιδίως των φαινολικών (Ismail et al., 2012). Από

αυτήν την άποψη, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος PGH έχει βρεθεί ότι αυξάνεται κατά τρόπο ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Garavand et al., 2017, Rajaei et al., 2010, Seifzadeh et al., 2018). Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Lalegani et al. (2018), η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος PGH και των σχετικών πολυφαινολών (φθορογλυκινόλη και γαλλικό οξύ) συγκρίθηκαν με το συνθετικό αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος PGH και των σχετικών πολυφαινολών (φθορογλυκινόλη και γαλλικό οξύ) συγκρίθηκαν με το συνθετικό αντιοξειδωτικό (Trolox). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η PGH παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Παράλληλα, σε άλλη μελέτη, το δυναμικό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του PGH (ακατέργαστο και καθαρισμένο) εκχύλισμα συγκρίθηκε, in vitro, με αυτό του BHT και TBHQ, ως δύο από τα πιο κοινά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (Rajaei et al., 2010). Τέλος, στα μπιφτέκια βόειου κρέατος, που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με λυοφιλιωμένο υδατικό εκχύλισμα PGH, υπήρξε ισχυρή αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών, ενώ οι τιμές οξείδωσης λιπιδίων επηρεάστηκαν λιγότερο σε σύγκριση με τον μάρτυρα, μετά από 8 ημέρες αποθήκευσης (Sadeghinejad et al., 2019)

2.4.2 Αντιμικροβιακή δράση

Η πλειονότητα του καταναλωτικού κοινού ζητά τρόφιμα χωρίς ουσίες που τις εκλαμβάνει ως συνθετικές -«χημικές» -δυνητικά επικίνδυνες για την υγεία του. Στην εν λόγω κατηγορία εμπίπτουν όλα τα χρησιμοποιούμενα συντηρητικά και αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (Calo et al., 2015). Το τελευταίο διάστημα έχει ενταθεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον για τη χρήση «φυσικών» συντηρητικών που θα αντικαταστήσουν τα έως σήμερα χρησιμοποιούμενα που κρίνονται, είτε ως ύποπτα (όσον αφορά την επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) ή δεν είναι πλέον αποδεκτά από τον καταναλωτή. Βασικό κριτήριο για την επιλογή – χρήση τους είναι η αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή τους δράση σε σχέση με τη θανάτωση των παθογόνων και την παρεμπόδιση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Στο πλαίσιο αυτό, πολλά μόρια φυτικής προέλευσης διαθέτουν αποδεδειγμένη ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με αποτέλεσμα να είναι ενδεχομένως ικανά να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται πολλά φυσικά ή συνθετικά φαινολικά παράγωγα (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, ανθοκυάνες, τανίνες), οργανικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό) και αιθέρια έλαια φυτών. Η δράση όλων των αντιμικροβιακών συστημάτων κινείται στους παρακάτω τρεις άξονες:

i) Επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη με επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητάς της,

ii) Αδρανοποίηση ενζύμων

iii) Καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού (Sikkema et al., 1995).

Η αντιβακτηριακή και η αντιμυκητιακή δράση των φλαβονοειδών έχει μελετηθεί επανειλημμένα, όμως ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τον τρόπο δράσης τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τη σχέση δομής - δράσης και επίδρασης των φλαβονοειδών (π.χ. φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες και κατεχίνες) στη σύνθεση του DNA και RNA, αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Ορισμένες φλαβονόλες (π.χ. μυρικετίνη) έχουν πιο αποτελεσματική αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τις φλαβανόνες και φλαβανόλες, ενώ για την αντιμικροβιακή δράση είναι απαραίτητη η ύπαρξη τριών υδροξυλομάδων στις θέσεις 3',4' και 5'-τριυδροξυ στον Β δακτύλιο και μίας ελεύθερης 3υδροξυλομάδας (Wink et al., 2010). Συγκεκριμένα στο εκχύλισμα του περικαρπίου, το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη, δύο από τις κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτό, φέρονται να προκαλούν την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής και εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης (Simoes et al., 2009). Οι Rajaei et al. (2010) αξιολόγησαν στην εργασία τους την in vitro αντιμικροβιακή δράση ακατέργαστων (crude) και καθαρισμένων (purified) εκχυλισμάτων PGH έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των B. cereus, S. aureus, P. aeruginosa, E.coli, C. albicans, S. thayphi, και N. intermedia. Διαπίστωσαν ότι η ανάπτυξη των θετικών κατά Gram βακτηρίων αναστάλθηκε, λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων επί της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο μεταχειρίσεις των εκχυλισμάτων περικαρπίουενδέχεται να αναστείλουν την ανάπτυξη του B.cereus και του S. aureus. Σε άλλη εργασία, οι Al-Juhaimi et al. (2017) απέδειξαν τη σημαντική μείωση του συνολικού πληθυσμού αερόβιων μικροβίων σε μπιφτέκι κοτόπουλου, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου κατά τη μεταχείριση του δείγματος. Το ενθυλακωμένο εκχύλισμα PGH έδειξε ελεγχόμενη απελευθέρωση κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης και είχε ανασταλτική επίδραση σε εντεροβακτήρια και βακτήρια του γαλακτικού οξέος, σε σύγκριση με τον μάρτυρα δειγμάτων μαγιονέζας κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 4 μηνών στους 25 ° C. Επίσης, ο μικροβιακός πληθυσμός σε μεταχείριση μαγιονέζας με εκχύλισμα PGH ήταν παρόμοιος με τα δείγματα μαγιονέζας που περιείχαν 1000 mg/kg βενζοϊκού νατρίου (Rafiee et al., 2018).

2.4.3 Δράση στη μετασυλλεκτική φυσιολογία φυτικών ιστών

Η υγιεινή διατροφή και ο υγιεινός τρόπος ζωής αποτελούν παγκόσμια τάση. Αυτή η φιλοσοφία έχει αυξήσει την ανάγκη για καλύτερη συντήρηση των ευπαθών προϊόντων

όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, καθώς αποτελούν άφθονη πηγή βιοδραστικών ενώσεων, βιταμινών και μετάλλων. Η διατήρηση της ποιότητας κατά την αποθήκευση μετά τη συγκομιδή είναι ζωτικής σημασίας για την ανταγωνιστικότητα των λαχανικών, καθώς αυξάνει τη παραμονή στο ράφι και διατηρεί τη τιμή πώλησης σε υψηλά επίπεδα. Ωστόσο, παράγοντες όπως η αφυδάτωση και η μείωση της σπαργής των φυτικών κυττάρων, οι μεταβολές στην υφή και τη συνεκτικότητα και το χρώμα, καθώς και μετασυλλεκτικές προσβολές, μπορούν να προκαλέσουν μια ταχεία αποσύνθεση του προϊόντος, μειώνοντας σημαντικά τη ζωή μετά τη συγκομιδή (Diaz-Mula et al., 2009). Οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι παραγόντων που προκαλούν στρες (βιοτικό ή αβιοτικό). Στα φρούτα και τα λαχανικά, η έκθεση σε συνθήκες μετά τη συγκομιδή, όπως αποθήκευση, ελεγχόμενες ατμόσφαιρες, φυτορμόνες (αιθυλένιο), ακτινοβολία (υπεριώδης και ακτινοβολία γ), θερμικά σοκ, βρώσιμα επιχρίσματα, εδώδιμες μεμβράνες και ελάχιστη επεξεργασία προκαλούν τη σύνθεση φαινολικών ενώσεων. Φυτικά εκχυλίσματα, με φαινολικό δυναμικό και η εφαρμογή τους σε διάφορα φρούτα και λαχανικά κερδίζει δημοτικότητα έναντι της χρήσης χημικών συντηρητικών. Τα παραγόμενα αυτά συστατικά μπορεί να έχουν θετική επίδραση στην ποιότητα του προϊόντος, τόσο με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα, υφή, άρωμα) όσο και ως προς τη θρεπτική του αξία (αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιμικροβιακοί παράγοντες κ.ά.) ή να αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά του συστήματος του τροφίμου, χάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά τους, ή αλλάζοντας το χρώμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος (Lopez-Martinez et al., 2020). Σε μελέτη, που αφορά την επίδραση εκχυλίσματος περικαρπίου σε μανιτάρια Agaricus, αναφέρεται ότι το υδατικό εκχύλισμα συντελεί στη διατήρηση της σφριγηλότητας των μανιταριών (13,9% υψηλότερο από τα δείγματα του μάρτυρα) και του λευκού χρώματος του πίλου, με τις αισθητηριακές ιδιότητες των μανιταριών να διατηρούνται εντός αποδεκτών ορίων καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες μεταχειρίσεις των μανιταριών βρέθηκαν να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά, καθώς και αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το δείγμα του μάρτυρα, κατά το τέλος του χρόνου αποθήκευσης. Επομένως,μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η μεταχείριση με το εκχύλισμα περικαρπίου αυξάνει τις λειτουργικές ιδιότητες των μανιταριών και μπορεί να συντελέσει στην παραγωγή λειτουργικών μανιταριών. Τέλος, το εν λόγω εκχύλισμα, λόγω του ότι είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, με αξιόλογη αντιοξειδωτική ικανότητα, μπορεί να αποτελέσει ένα νέο φυσικό αναστολέα τυροσινάσης και να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση της ενζυματικής αμαύρωσης των τροφίμων (Fattahifar et al., 2018).

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ</u>

Το οξυγόνο είναι ένα απαραίτητο μόριο για τους ζωντανούς οργανισμούς, ωστόσο κατά τη διάρκεια των μεταβολικών διαδικασιών αερόβιου τύπου αναπόφευκτα παράγονται οξυγονούχες δραστικές ουσίες (Reactive Oxygen Species) και ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που είναι ιδιαίτερα ασταθή και υπόκεινται σε χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια. Προέρχονται από τρία στοιχεία, το οξυγόνο, άζωτο και θείο, δημιουργώντας έτσι (ROS), ελεύθερες ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και ελεύθερες ρίζες θείου (Reactive Sulfur Species, RSS).

Οι ROS περιλαμβάνουν ιόντα οξυγόνου και υπεροξείδια τόσο ανόργανα όσο και οργανικά, όπως το υπεροξειδικό ανιόν (O²⁻⁻), η υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO₂•), η ρίζα υδροξυλίου (•HO), το οξείδιο του αζώτου (NO) και άλλες όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και υποχλωριώδες ανιόν (-ClO) (Halliwell et al., 2007). Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη (Halliwell et al., 2007). Κατά το ίδιο έτος οι Khlebnikov et al., (2007) ορίζουν ως αντιοξειδωτικό κάθε ουσία που απομακρύνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες ή δρα έμμεσα έτσι ώστε να αυξηθεί η αντιοξειδωτική άμυνα ή αναστέλλει την παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Τα αντιοξειδωτικά δρουν με τους παρακάτω τρόπους:

 Δεσμευτές οξυγόνου σε συνέργεια με άλλα αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας το οξυγόνο ώστε να μην υπάρχει η απαιτούμενη ποσότητα για να οξειδώσει τα λιπαρά συστατικά.

Αναστολείς των αντιδράσεων οξείδωσης των ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας τον σχηματισμό ή διασπώντας τα προϊόντα της οξείδωσης.

 Ουσίες που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα μέταλλα ώστε να αποτρέψουν την έναρξη της οξείδωσης.

4) Ουσίες που διασπούν τα υπεροξείδια έτσι ώστε να μην διασπαστούν σε ρίζες.

5) Τερματιστές ελεύθερων ριζών. Πρόκειται για ουσίες που τερματίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση, προσφέροντας υδρογόνο ή ηλεκτρόνια.

6) Αναστολείς των προοξειδωτικών ενζύμων (Halliwell, 2007, Khlebnikov et al., 2007).

Ωστόσο, σε συνθήκες νόσου, η άμυνα κατά των ελεύθερων ριζών εξασθενεί ή καταστρέφεται. Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι απαραίτητη η εξωτερική τροφοδοσία αντιοξειδωτικών για να αντισταθμιστούν οι βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες (Ratnam et al., 2006). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να λειτουργήσουν ως προοξειδωτικά και να προκαλέσουν αντιδράσεις ελεύθερων

ριζών (Škrovánková et al., 2012). Η πρόσφατη βιβλιογραφία έχει επικυρώσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων περικαρπίων κελυφωτού φιστικιού (PGH) (Goli et al., 2005, Grace et al., 2016, Arjeh et al., 2020). Η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος επηρεάζεται από τη μέθοδο του προσδιορισμού της, το χημικό τύπο και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών συστατικών του δείγματος, τη μέθοδο και τις συνθήκες εκχύλισης του. Πράγματι, λόγω της πολυπλοκότητας των συστημάτων της αντιοξειδωτικής δράσης και της σύστασης του εκχυλίσματος, αλλά και τη συνεργιστική δράση μεταξύ των συστατικών του, επιβάλλεται η χρήση τουλάχιστον δύο μεθόδων συνεκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων (Prior et al., 2005). Η επιλογή τους γίνεται ανάλογα με το αναμενόμενο αντιοξειδωτικό δυναμικό αλλά και την προέλευση και φύση των δειγμάτων (Huang et al., 2005). Ανάλογα με τον μηχανισμό των χημικών αντιδράσεων, που λαμβάνουν χώρα, οι μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας χωρίζονται σε μεθόδους, οι οποίες βασίζονται σε αντιδράσεις:

- Μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays-HAT)
- Μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays-ET)

Ο μηχανισμός ΗΑΤ προσδιορίζει την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να αποσβένει ελεύθερες ρίζες μέσω δωρεάς υδρογόνου, ενώ ο μηχανισμός ΕΤ ανιχνεύει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο, με σκοπό τη μείωση των ριζών (Huang et al., 2005). Οι μέθοδοι μεταφοράς ηλεκτρονίου μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα, καθώς οξειδώνεται στην αντίδρασή το με το οξειδωτικό, ενώ οι μέθοδοι μεταφοράς υδρογόνου εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων, με τις συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών να υπολογίζονται από τις κινητικές καμπύλες (Huang et al., 2005).

3.1 Αρχή της μεθόδου DPPH

Η μέθοδος DPPH βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών και επομένως να προσδιορίζεται η ικανότητα περιορισμού των ελεύθερων ριζών με την αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) και τον τελικό αποχρωματισμό του διαλύματος εργασίας. Η ρίζα DPPH αδρανοποιείται είτε μέσω

προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer,SET), είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer,HAT) (Prior et al.,2005).

Με τις φαινολικές ενώσεις, αντιδρά με δύο διαφορετικούς τρόπους (Brand-Williams et al., 1995):

- Με απόσπαση ενός φαινολικού υδρογόνου από τη ρίζα του DPPH (αντίδραση HAT)
- Με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προς
 την ελεύθερη ρίζα (αντίδραση ΕΤ)

Ουσιαστικά, πρόκειται για μια σταθερή ρίζα, έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 515 nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα του DPPH ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται και στη παρακάτω Εικ. 14.



<u>Εικόνα 14:</u> Αναγωγή του (DPPH) σε (DPPH:H) (Brand-Williams et al., 1995).

Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτελέσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από μωβ σε κίτρινο, σε αναλογία με τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας. Αντίστοιχα, μειώνεται και η απορρόφηση, μεταβολή, που προσδιορίζεται φωτομετρικά (Brand-Williams et al., 1995). Μεγάλη μείωση στην απορρόφηση υποδεικνύει σημαντική αντιοξειδωτική δράση του συστατικού (Duduku et al., 2011).

3.2 Αρχή της μεθόδου ABTS

Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS⁴⁺. Το ABTS [2,2'-αζινο-δις(3αιθυλοβενζοθειαζόλινο-6-θειικό οξύ)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) μέσω της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση (HRP), έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση του (ABTS) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος ABTS'+ (Εικ. 15).



Εικόνα 15: Η οξείδωση του ABTS στη δραστική της ρίζα

Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα λmax= 734 nm.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας (Miller & Rice-Evans, 1993). Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS'+ ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 734 nm (Εικόνα 16) (Prior et al., 2005). Η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο των λιπόφιλων όσο και των υδρόφιλων συστατικών (Duduku et al., 2011).

3.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων DPPH & ABTS

Το DPPH είναι μία σταθερή διαθέσιμη στο εμπόριο οργανική αζωτούχα ρίζα και θεωρείται εύκολη και ακριβής για εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων. Χαρακτηρίζεται ως απλή και γρήγορη μέθοδος με μόνη απαίτηση UV φωτόμετρο στον εργαστηριακό εξοπλισμό, μειονέκτημα όμως αποτελεί, όταν στην απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος εμπλέκεται, καλύπτοντας την απορρόφηση του DPPH, άλλη ή άλλες χημικές ενώσεις όπως συμβαίνει με τα καροτενοειδή. Όπως έχει αναφερθεί, αρχικά η ρίζα DPPH' θεωρούνταν, ότι μπορεί να αδρανοποιηθεί μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) αλλά πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι αυτό συμβαίνει σε πρώτη φάση μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) και ακολουθεί προσθήκη ατόμων υδρογόνου (Noruma et al., 1997).

Ο παραπάνω μηχανισμός σε συνδυασμό με την πιθανή παρουσία οξέων ή βάσεων στο διάλυμα μπορεί να επηρεάσουν την ιοντική ισορροπία των φαινολών και να οδηγήσουν σε ανακριβή αποτελέσματα εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Prior et al, 2005). Ένα ακόμη μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η στερεοσκοπική διαμόρφωση της ρίζας, που δίνει καλύτερη πρόσβαση και πλεονέκτημα σε δείγματα αποτελούμενα από μικρότερα μόρια, με αποτέλεσμα να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα δράσης. Τέλος το pH δεν επηρεάζει την αντίδραση, αφού για διαλύτης χρησιμοποιείται μεθανόλη (Prior et al, 2005). Συγκριτικά με την μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS'+, η μέθοδος αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH θεωρείται πιο κατάλληλη για δείγματα που περιέχουν λιπόφιλα αντιοξειδωτικά και αυτά που έχουν υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο (MacDonald-Wicks et al. 2006). Όταν το ABTS ενεργοποιηθεί ενζυμικά, είναι μία πολύ σταθερή ρίζα, γεγονός μεγάλης σημασίας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Δεν υπάρχει στα βιολογικά συστήματα και δεν έχει ομοιότητες με ρίζες που υπάρχουν σε αυτά. Όταν η ρίζα ABTS ενεργοποιείται ενζυμικά, η αντίδραση γίνεται γρήγορα και μπορεί να δουλέψει σε μεγάλο εύρος pH, αλλά προτιμάται το όξινο περιβάλλον. Όπως έχουν δείξει μελέτες το pH μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ισορροπία της αντίδρασης, αλλά δεν αποτελεί κανένα πρόβλημα όταν κυμαίνεται από 3,0-6,5 (MacDonald-Wicks et al. 2006). Το ABTS είναι διαλυτό τόσο στο νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες και δεν επηρεάζεται από το ηλεκτικό φορτίο των ιόντων, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση υδρόφιλων αλλά λιπόφιλων συστατικών, με προτιμότερα τα πρώτα. Ακόμη, ένα συστατικό για να μπορέσει να αντιδράσει και να εξουδετερώσει το ABTS θα πρέπει να έχει χαμηλότερο δυναμικό, παρόλα αυτά φαινολικά συστατικά με χαμηλό δυναμικό, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ABTS

(Cano et al., 1998).

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4⁰:</u> ΦΡΕΣΚΟΚΟΜΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΛΑΦΡΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΛΛΩΔΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Στα φυλλώδη λαχανικά, η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης θα πρέπει να έχει ως στόχο τη μετασυλλεκτική διατήρηση της ποιότητας ενός ήδη πλήρως αναπτυγμένου οργάνου, όπως τη διατήρηση της ποιότητας του μαρουλιού μετά τη συγκομιδή, εν προκειμένω. Μετά τη συλλογή των φυλλωδών λαχανικών, όπως το μαρούλι, η φυσιολογική φθορά μπορεί να εκδηλωθεί με αλλαγές στο χρώμα, την υφή, το άρωμα, τη σύσταση και τη θρεπτική αξία (Πάσσαμ κ.α, 2015). Ισχύει ότι πριν τη συγκομιδή, η φωτοσύνθεση αποτελεί την πρωταρχική λειτουργία των φύλλων, η οποία προμηθεύει το φυτό με ενέργεια και θρεπτικά στοιχεία. Επίσης, τα φύλλα ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό τη θερμοκρασία του φυτού, καθώς είναι υπεύθυνα για τη διαπνοή. Παρόλα αυτά, μόλις αφαιρεθούν από το φυτό, χάνουν την ικανότητα τους να φωτοσυνθέτουν και παύει να αναπληρώνεται από τις ρίζες, το νερό που χάνεται με την εξάτμιση, συνεπώς διακόπτεται η διαπνοή.

Παράλληλα, τα φύλλα παρουσιάζουν υψηλή τιμή επιφάνειας για δεδομένο όγκο και μεγάλη πυκνότητα στοματίων, με συνέπεια να εμφανίζουν υψηλό ρυθμό απώλειας νερού και ταχεία μάρανση, ιδιαίτερα όταν η υγρασία του περιβάλλοντος είναι χαμηλή.

Επίσης, επειδή τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μεταφέρονται στις ρίζες ή στους καρπούς, τα συγκομισμένα φύλλα δεν διαθέτουν επαρκή αποθέματα υδατανθράκων ώστε να καλύψουν τις ανάγκες της αναπνοής για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επειδή αυτή η πηγή ενέργειας εξαντλείται γρήγορα, σε σύντομο χρονικό διάστημα γίνεται η αποσύνθεση των δομικών στοιχείων των κυττάρων και των ιστών (π.χ. κυτταρικά τοιχώματα), με αποτέλεσμα τη δημιουργία νεκρωτικών περιοχών και στιγμάτων (Πάσσαμ κ.α, 2015).

4.1 Η Περίπτωση των φρεσκοκκομένων φυλλωδών λαχανικών

Οι απαιτήσεις του σύγχρονου καταναλωτή για υψηλής ποιότητας προϊόντα, που χρειάζονται ελάχιστη προσπάθεια και χρόνο για το χειρισμό τους έχει οδηγήσει στην εισαγωγή των έτοιμων για χρήση (Ready-To-Use), εύχρηστων τροφίμων, που συντηρούνται με ήπιες, ελάχιστης επεξεργασίας, μεθόδους (minimally processed methods) (Zhan et al., 2012).

Τα ελάχιστα μεταποιημένα οπωροκηπευτικά είναι τα προϊόντα, που παράγονται και χειρίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε:

•να είναι έτοιμα για χρήση και κατανάλωση

•να είναι όπως τα νωπά

•να έχουν μακρά ζωή στο ράφι

•να είναι ασφαλή για την υγεία

•να διατηρούν ακέραιη τη θρεπτική και γευστική ποιότητα (Γερασόπουλος, 2005).

Τα ελάχιστα επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά αποτελούνται από νωπά, φρεσκοκομμένα προϊόντα, τα οποία έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία, όπως αποφλοίωση και τεμαχισμό για να καταστούν έτοιμα για χρήση. Τα φρεσκοκομμένα λαχανικά, συνήθως, συσκευάζονται σε σφραγισμένες σακούλες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή δισκάκια, από μεμβράνες πολυμερών.

Μεταξύ των φυλλωδών λαχανικών, το μαρούλι είναι δημοφιλές, γιατί αποτελεί καλή πηγή ασβεστίου, σιδήρου και βιταμίνης Α, σε σύγκριση με άλλα λαχανικά, ενώ έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Ωστόσο, είναι πολύ ευπαθές και επιρρεπές σε ενζυμική αμαύρωση, ειδικά αφού έχει κοπεί (Zhan et al., 2012), με τα τρία ένζυμα της πολυφαινόλοξειδάσης (PPO), υπεροξειδάσης (POD) και αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) να εμπλέκονται στενά κατά την επεξεργασία των φρέσκων προϊόντων. Επί του παρόντος, εφαρμόζονται διάφορες προσεγγίσεις για την αποτροπή της αμαύρωσης των φρεσκοκομμένων λαχανικών, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα αυτών των τριών ενζύμων για τη διατήρηση της εγγενούς ποιότητας του μαρουλιού. Η δράση τους ελέγχεται μέσω της χρήσης φυσικών και χημικών μεθόδων, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και οι δύο μέθοδοι. Οι φυσικές μέθοδοι μπορεί να περιλαμβάνουν μείωση της θερμοκρασίας και του οξυγόνου, χρήση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή εδώδιμων μεμβρανών ή βιοενεργών εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης, μεταχείριση με ακτινοβολία ή υψηλή πίεση. Οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν μείγματα, που στοχεύουν στην αναστολή των ενζύμων. Πολλές από τις χημικές ενώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στη διεθνή έρευνα μέχρι σήμερα, μπορεί να μην πληρούν τις προϋποθέσεις ασφάλειας και να είναι τοξικές για τον καταναλωτή και το περιβάλλον, ενώ παρατηρήθηκαν και ανεπιθύμητες αισθητικές επιδράσεις στα τρόφιμα (Garcia & Barrett, 2002). Πράγματι, οι καταναλωτές θεωρούν την εμφάνιση και την υφή των λαχανικών, σημαντικές ποιοτικές παραμέτρους για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των λαχανικών. Τυχόν μάρανση στα φύλλα, συνοδευόμενη με απώλεια βάρους, ευθύνεται για την αλλαγή των επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος.

Οι μηχανικές ζημιές (π.χ. συμπίεση και κοπή) θα μπορούσαν να διεγείρουν την απελευθέρωση αιθυλενίου από τα φυλλώδη λαχανικά. Το αιθυλένιο, σε συνδυασμό με την απώλεια νερού, ενδέχεται να ευθύνεται για την λιγνιτοποίηση των φυλλωδών φυτικών ιστών (Watada et al., 1996) και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συνεκτικότητας τους,

κατά την αποθήκευση. Όσον αφορά τη παράμετρο του χρώματος, το καφέτιασμα-μαύρισμα στα σημεία κοπής των φύλλων μαρουλιού είναι συχνά ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση φρέσκων προϊόντων. Ο βαθμός μαυρίσματος στα λαχανικά αξιολογείται, μετρώντας τη φωτεινότητα του προϊόντος (L *) και τις χρωματικές συντεταγμένες (a* και b*), με τη τιμή a* να δείχνει τη διαβάθμιση του χρώματος από πράσινο (-a*) έως κόκκινο (+a*) και τη τιμή b*, τη διαβάθμιση από κίτρινο (+b*) σε μπλε (-b*). Γενικά, ισχύει ότι χαμηλότερες τιμές L * και υψηλότερες τιμές a * και b * υποδηλώνουν ότι ένα προϊόν έχει υποβαθμιστεί χρωματικά (Abbott et al., 1997).

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ & ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της μελέτης είναι η μελέτη του χημειότυπου των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων του περικαρπίου των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.) της καλλιεργητικής ποικιλίας Αιγίνης, με χρήση φασματομετρικών και χρωματογραφικών τεχνικών. Ακολούθως, θα εξεταστεί η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram τροφιμογενών μικροβίων.

Τέλος, θα διερευνηθεί η χρήση των εκχυλισμάτων στη μετασυλλεκτική διαχείριση ελάχιστα μεταποιημένων λαχανικών, με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης και τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της αξιοποίησης των συγκεκριμένων παραπροϊόντων, με κατεύθυνση την απομόνωση και ανάκτηση φαινολικών συστατικών και την ανάδειξη της αντιμικροβιακής τους χρήσης και της χρήσης έναντι της φυσιολογικής φθοράς φυτικών ιστών, μετά από τη συλλογή τους και κατά την αποθήκευση τους.

Όσον αφορά τα στοιχεία της πρωτοτυπίας της εργασίας, τα φαινολικό δυναμικό της ποικιλίας Αιγίνης, μιας παγκοσμίου φήμης παραγωγικής ποικιλίας, εδραιωμένης στην Ελλάδα, με καρπούς ποιότητας, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Συνδυαστικά με τη χρήση διαλυτών, φιλικών προς στο περιβάλλον, η συγκεκριμένη μελέτη προτείνει ένα μοντέλο ολοκληρωμένης και οικολογικής διαχείρισης των παραπροϊόντων στις καλλιεργητικές περιοχές του κελυφωτού φιστικιού.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5⁰:</u> ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ-ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

5.1.1 Δειγματοληψία και προκατεργασία δείγματος

Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου συγκομιδής του καλλιεργητικού έτους 2019-2020 και μετά την ολοκλήρωση της μηχανικής αποφλοίωσης, συλλέχθηκε με τυχαία δειγματοληψία δείγμα περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού ποικιλίας *P.vera* L. ποικιλίας Αιγίνης, από τη περιοχή Υπάτη Φθιώτιδας. Χωρίστηκε σε τρία μέρη, από τα οποία, το ένα προορίζεται για λυοφιλίωση, το δεύτερο, για ξήρανση σε φούρνο υπό κενό, ενώ το τρίτο μέρος διατηρήθηκε σε νωπή κατάσταση. Στη συνέχεια, και τα τρία μέρη αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, μέχρι να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Όσον αφορά τη προκατεργασία του δείγματος, πριν προσδιοριστεί η υγρασία, διενεργήθηκε προξήρανση του, σε συμβατικό φούρνο, στους 40 °C, για 4,5 ώρες (Εικ. 16).



Εικόνα 16: Φούρνος Προξήρανσης Περικαρπίων

5.1.2 Προσδιορισμός υγρασίας

Παράλληλα, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των περικαρπίων σε υγρασία σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο του AOAC. Από το αρχικό δείγμα, ελήφθησαν 10,6805 g περικαρπίου, ζυγισμένα σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετήθηκαν σε κεραμικές κάψες ξήρανσης. Είθισται οι κεραμικές κάψες ξήρανσης να προθερμαίνονται σε ηλεκτρικό φούρνο (Gallenkamp,Plus Oven) στους 100 °C για 5 min και τοποθετούνται για να κρυώσουν σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (silica gel). Τόσο το απόβαρο (m1) της κάθε κάψας, όσο και η μικτή τους μάζα (m2) προσδιορίζονται σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια, οι κάψες τοποθετούνται σε κλίβανο στους 102 °C και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται μετρήσεις (m3), μέχρι να σταθεροποιηθεί η μάζα τους τους (δυο διαδοχικές μετρήσεις να μην διαφέρουν περισσότερο από 0,001 g) (Yanniotis & Zarboutis, 1996). Σε αυτό το σημείο, θεωρείται ότι έχει αφαιρεθεί η περιεχόμενη υγρασία του δείγματος. Πριν από κάθε μέτρηση, οι κάψες είθισται να αφήνονται στο ξηραντήριο να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία του χώρου (Σχετική-Υγρασία
40%). Η περιεχόμενη υγρασία των περικαρπίων του δείγματος εκφράζεται σε: g νερού /100 g δείγματος και υπολογίζεται από τον τύπο: $Y = \frac{m2-m3}{m2-m1} * 100$.

5.1.3 Αποθήκευση και κοκκομέτρηση

Μετά τη θερμική επεξεργασία και αφυδάτωση του δείγματος, ακολούθησε η αποθήκευση του φυτικού ιστού αεροστεγώς σε πλαστικό σακουλάκι (Εικ. 17) σε βαθιά κατάψυξη (-20 °C), με αναγραφόμενη ετικέτα βάσει της μεθόδου ξήρανσης και της ημερομηνίας διενέργειας της ξήρανσης. Ο ίδιος τρόπος αποθήκευσης και σήμανσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε εκ νέου και για το τελικό αφυδατωμένο και κοκκομετρημένο προϊόν.



Εικόνα 17: Αποθήκευση του φυτικού ιστού αεροστεγώς σε πλαστικό σακουλάκι

Ακολούθησε η άλεση των δειγμάτων με τη χρήση μπλέντερ. Στη συνέχεια, κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης, διενεργήθηκε κοκκομέτρηση των δειγμάτων σε μέγεθος κόκκων σκόνης περικαρπίου 800-500 μm (Εικ. 18).



Εικόνα 18: Κοκκομέτρηση αποξηραμένων περικαρπίων σε μέγεθος κόκκων 800-500 μm

5.1.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Αναφορικά με την προκατεργασία του δείγματος, η προξήρανση κρίθηκε απαραίτητη λόγω της υψηλής ενεργότητας του περικαρπίου σε νερό, ενώ η τελική % υγρασία (g H20/g ξηρού υλικού) στις κεραμικές κάψες ξήρανσης, υπολογίστηκε στο 3,045%. Βιβλιογραφικά, τα αποτελέσματα ενεργότητας της υψηλής του περικαρπίου σε νερό επικυρώνονται,δεδομένου ότι σαν φυτικός ιστός, το περικάρπιο περιέχει μεγάλη ποσότητα νερού (>70%) (Arjeh et al., 2020). Επίσης, αξίζει να επισημανθεί ότι το συγκεκριμένο δείγμα προέρχεται από μηχανική αποφλοίωση, υποβοηθούμενη με νερό, διεργασία, η οποία μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της ενεργότητας του νερού του ιστού. Όσον αφορά την αποθήκευση του δείγματος, η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό του αφυδατωμένου προϊόντος (<5%), συμβάλλει στη σωστή και αποτελεσματική του αποθήκευση, αποτρέποντας την μικροβιακή αλλοίωση και χημική αποικοδόμηση του δείγματος. Τέλος, σχετικά με την κοκκομέτρηση του δείγματος, στη περίπτωση του νωπού περικαρπίου, η κοκκομέτρηση ήταν αδύνατη λόγω της περίσσειας υγρασίας του φυτικού ιστού.

5.2 Παραλαβή φαινολικών συστατικών PGH

5.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η εκχύλιση των περικαρπίων κελυφωτού φιστικιού *P.vera* L., πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 35 KHz (Ultrasound Assisted Extraction-UAE) και στηρίχθηκε στη μεθοδολογία των Garavaland et al. 2017, όσον αφορά την αναλογία περικαρπίου προς διαλύτη.

5.2.1.1 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Πίνακας 2: Κωδικοποίηση δειγμάτων βάσει τύπου διαλύτη και μεταχείρισης

| <u>No</u> | <u>Κωδικός Δείγματος</u> | Διαλύτης | <u>Μεταχείριση</u> |
|-----------|------------------------------|------------|--------------------|
| 1 | P.Hull Freeze Dry EtOH | EtOH | Λυοφιλίωση |
| 2 | P.Hull Freeze Dry HPLC Water | HPLC Water | Λυοφιλίωση |
| 3 | P.Hull Vacuum Dry EtOH | EtOH | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 4 | P.Hull Vacuum Dry HPLC Water | HPLC Water | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 5 | P.Hull Raw EtOH | EtOH | Νωπό |
| 6 | P.Hull Raw HPLC Water | HPLC Water | Νωπό |

5.2.1.2 Πειραματική διαδικασία

<u>Αιθανολικά εκχυλίσματα περικαρπίων</u>

Ζυγίστηκε ποσότητα 5 gr νωπού, λυοφιλιωμένου και αποξηραμένου σε φούρνο υπό κενό περικαρπίου (Εικ. 19). Σε κωνική φιάλη των 250 mL, προστέθηκε το δείγμα και ποσότητα διαλύτη 250 mL, σε αναλογία δείγματος προς διαλύτη, 1:50 και ακολούθησε η εκχύλιση του φυτικού υλικού στους υπέρηχους στους 25° C για 30 min (Εικ. 20).



Εικόνα 19: Ζύγιζη ποσότητας νωπού περικαρπίου (P.Hull Raw EtOH)



<u>Εικόνα 20</u>: Εκχύλιση του φυτικού υλικού στους υπέρηχους στους 25° C για 30 min

Ακολούθησε διήθηση του φυτικού υλικού (Εικ. 21)



Εικόνα 21: Διήθηση του δείγματος P.Hull Freeze Dry EtOH

Το συνολικό διήθημα συμπυκνώθηκε στο Rotary Evaporator (Εικ. 22), με θερμοκρασία στο υδατόλουτρο κάτω από 30° C. Τέλος, ζυγίστηκε η καθαρή του μάζα μετά την συμπύκνωση του επί ξηρού (Εικ. 23) του και επαναδιαλυτοποιήθηκε με MeOH LC-MS, υψηλής καθαρότητας > 99,9%, σε πυκνή συγκέντρωση 15000 ppm. Αναλυτικότερα, για το αιθανολικό δείγμα νωπού περικαρπίου, η καθαρή του μάζα προσδιορίστηκε στα 1,504 g δείγματος, η οποία επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 mL MeOH LC-MS, ενω 0,736 g λυοφιλιωμένου δείγματος και 0,907 g δείγματος αποξηραμένου σε φούρνο υπό κενό, επαναδιαλυτοποιήθηκαν, σε 49 και 60 mL MeOH LC-MS, αντίστοιχα. Για τη φύλαξη του, χρησιμοποίηθηκαν γυάλινοι περιέκτες με πώμα, οι οποίοι καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην έρθει σε επαφή με το φως το εκάστοτε εκχύλισμα και τέλος,αποθηκεύτηκε στους -20 °C, μέχρι την ανάλυση.



Εικόνα 22: Συμπύκνωση εκχυλίσματος P.Hull Freeze Dry EtOH σε Rotary Evaporator



<u>Εικόνα 23:</u> Συμπύκνωση εκχυλίσματος P.Hull Freeze Dry EtOH και ζύγιση βάρους για επαναδιαλυτοποίηση με MeOH LC-MS, υψηλής καθαρότητας > 99,9%.

Υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίων

Η διαδικασία είναι η ίδια,που ακολουθήθηκε και κατά τη παραλαβή των αιθανολικών εκχυλισμάτων, με την αναλογία δείγματος προς διαλύτη,να παραμένει η ίδια (1:50) (Εικ. 24). Οι διαφορές έχουν να κάνουν με τον διαλύτη, που στην προκείμενη περίπτωση, είναι το HPLC νερό και τη μέθοδο συμπύκνωσης των εκχυλισμάτων. Χρησιμοποιήθηκε το

σύστημα της λυοφιλίωσης για την εξάτμιση επί ξηρού των υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίων *P.vera* L. (Εικ. 25). Τα εκχυλίσματα ζυγίστηκαν (καθαρή μάζα) πριν και μετά την ξήρανση και κατόπιν, επαναδιαλυτοποιήθηκαν με MeOH LC-MS, υψηλής καθαρότητας > 99,9%, σε πυκνή συγκέντρωση 15000 ppm. Αναλυτικότερα, για το υδατικό δείγμα νωπού περικαρπίου, η καθαρή του μάζα προσδιορίστηκε στα 0,364 g δείγματος, η οποία επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 24 mL MeOH LC-MS, ενω 1,464 g λυοφιλιωμένου δείγματος και 1,786 g δείγματος αποξηραμένου σε φούρνο υπό κενό, επαναδιαλυτοποιήθηκαν, σε 99 και 119 mL MeOH LC-MS, αντίστοιχα. Για τη φύλαξη και αποθήκευση τους, χρησιμοποίηθηκε η ίδια διαδικασία με τη σωστή σήμανση.



Εικόνα 24: Υδατικά εκχυλίσματα P.Hull Vacuum Dry, μετά από 30 min στο λουτρό υπερήχων



Εικόνα 25: Υδατικά εκχυλίσματα P.Hull Vacuum Dry, μετά τη λυοφιλίωση

5.2.1.3 Συζήτηση

Στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας, επιλέχθηκαν ως διαλύτες εκχύλισης η αιθανόλη με βαθμό καθαρότητας 95% και το υπερκάθαρο νερό HPLC. Σχετικά με την αξιολόγηση των διαλυτών, στη περίπτωση του θερμικά επεξεργασμένου περικαρπίου, υπερτερεί το νερό, αξιολογώντας την τελική απόδοση, εκφρασμένη σε g δείγματος επί ξηρού. Αντίθετα, στην εκχύλιση του νωπού περικαρπίου, διακρίνεται οτι πιο αποδοτικός διαλύτης είναι η αιθανόλη, λαμβάνοντας υπόψιν τη τελική καθαρή μάζα του δείγματος.

Η αναφορά της αξιόλογης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών πολυφαινολικών ενώσεων στο περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών, όπως αναμένεται λόγω του ρόλου του, ως προστατευτικού εξωτερικού περιβλήματος γύρω από τον καρπό (Grace et al.,2016) στάθηκε αφορμή για την εκτενέστερη μελέτη και απομόνωση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων PGH (Pistachio Green Hull). Οι πολικές φαινολικές ενώσεις, ως πολικές, είναι εύκολα διαλυτές σε πολικούς διαλύτες, όπως νερό και οργανικούς διαλύτες (π.χ. αλκοόλες). Ως εκ τούτου, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν συχνά νερό (Seifzadeh et al., 2018), ακετόνη (Behgar et al., 2011), μεθανόλη (Erşan et al., 2016), αιθανόλη (Barreca et al., 2016) για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων από το περικάρπιο κελυφωτού φιστικιού. Η επιλογή του διαλύτη επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποσοτική ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών καθώς και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, συνεπώς αποτελεί σημαντική παράμετρο για την απόδοση της εκχύλισης. Για την εκλεκτική εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, η πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης θα πρέπει να συνάδει με τη πολικότητα των φαινολικών ενώσεων («όμοια διαλύουν όμοια»), με τη διάλυση να γίνεται εξαιτίας της ανάπτυξης διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ διαλυμένης ουσίας και διαλύτη. Η αποδοτικότητα ενός διαλύτη εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα του να διαλυτοποιεί το επιθυμητό φαινολικό συστατικό. Επίσης, ο διαλύτης μπορεί να επηρεάσει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου με χημικό ή βιοφυσικό μηχανισμό. Για παράδειγμα, η αιθανόλη αυξάνει την διαπερατότητα της μεμβράνης, αφού αλληλεπιδρά με την διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων που την αποτελούν.

Οι ιδιότητες του διαλύτη εκχύλισης, που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή του είναι:

- Πολικότητα
- Σημείο βρασμού
- Λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης
- Βαθμός αντίδρασης με τα εκχυλίσιμα στερεά
- Ιξώδες
- Σταθερότητα στην θερμότητα, στο οξυγόνο, στο φως
- Τοξικότητα

Διαλύτης με χαμηλό σημείο βρασμού οδηγεί σε ευκολότερο διαχωρισμό από τις εκχυλιζόμενες ουσίες οπότε είναι προτιοτιμητέος, καθώς επίσης μια χαμηλή τιμή δείκτη ιξώδους είναι ευνοϊκή για την εύκολη πρόσβαση στη φυτική μήτρα. Επιπλέον, ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά ή να αποδομεί τις ουσίες που εκχυλίζει ή να είναι εύφλεκτος ή

τοξικός.Τέλος, η απόρριψη του στο περιβάλλον δεν πρέπει να δημιουργεί περιβαλλοντικούς κινδύνους διότι αυτό συνεπάγεται αφενός ρύπανση του περιβάλλοντος και αφετέρου οικονομικές επιβαρύνσεις και πρόστιμα.

Η αιθανόλη και μεθανόλη είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για την εκχύλιση πολυφαινολών από αρωματικά φυτά. Εναλλακτικά, διαδοχικές εκχυλίσεις με διαφορετικούς διαλύτες ολοένα αυξανόμενης πολικότητας παρέχουν κλάσματα που αποτελούνται από διαφορετικές ομάδες φαινολικών ουσιών. Εκτιμώντας ότι η αιθανόλη έχει περίπου ίσες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά με την μεθανόλη, για χρήσεις στην κοσμετολογία και στην βιομηχανία τροφίμων προτιοτιμάται η αιθανόλη λόγω μικρότερης τοξικότητας σε σύγκριση με την μεθανόλη. Το νερό θεωρείται ένας καλός διαλύτης για τα φαινολικά οξέα και τους γλυκοζίτες και οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης αυτών των συστατικών σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και η βουτανόλη, ειδικότερα αν η εκχύλιση υποβοηθηθεί με υπερήχους (Corbin et al., 2015). Αναφορικά με το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος περικαρπίων κατά την εκχύλιση, οι Yazdi et al. (2018) μελέτησαν την επίδραση του μεγέθους στην απόδοση εκχύλισης φαινολικών ενώσεων της PGH και δήλωσαν ότι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων μπορεί να προκαλέσει ρήξεις στο κυτταρικό τοίχωμα και να αυξήσει την επιφάνεια του κοκκομετρημένου δείγματος,που οδηγεί σε υψηλότερη επιφάνεια επαφής μεταξύ του διαλύτη και του δείγματος. Αντιθέτως, οι Mokhtarpour et al. (2014) και Tabaraki and Ghadiri (2016) ανέφεραν ότι η απόδοση εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων δεν επηρεάστηκε από το μέγεθος των σωματιδίων. Τέλος, σχετικά με την ξήρανση των υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου πριν την τελική τους επαναδιαλυτοποίηση τους, η συμπύκνωση τους σε περιστροφικό εξατμιστή υπό κενό (rotary evaporator) κρίθηκε χρονοβόρα, γιατί όσο εξατμίζεται το νερό, τόσο μειώνεται η επιφάνεια του και επομένως, δυσχεραίνεται η εξαγωγή των παραγόμενων υδρατμών. Επιπρόσθετα, η περιστροφική εξάτμιση με αργό ρυθμό θεωρείται αναποτελεσματική λόγω της ενεργοποίησης ενζύμων, που προκαλούν αμαύρωση στη πρώτη ύλη, εν προκειμένω στα υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου.

5.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού *Pistacia vera* L., χρησιμοποιήθηκαν οι δύο *in vitro* χρωματομετρικές μέθοδοι DPPH & ABTS, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση σταθερών χημικών ριζών από τις εν δυνάμει αντιοξειδωτικές ουσίες των περικαρπίων.
5.3.1 Προσδιορισμός του φαινολικού περιεχομένου των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS

Η αρχή της δοκιμής ABTS βασίζεται στην οξείδωση του (ABTS²⁻) προς ριζικό κατιόν (ABTS⁺) με υπερθειϊκά ιόντα ($S_2O_8^{2-}$) (βαθύ κυανοπράσινο χρώμα), που απορροφά ισχυρά στα 734 nm και στον ακόλουθο αποχρωματισμό του ABTS⁺, όταν ανάγεται από τις αντιοξειδωτικές ουσίες.

5.3.1.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας και πρότυπων διαλυμάτων ABTS⁺

Παρασκευή διαλύματος εργασίας ABTS^{.+}

Αρχικά,ζυγίστηκαν 96 mg αντιδραστηρίου ABTS σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, διαλύθηκαν σε λίγο απιονισμένο νερό και το διάλυμα αραιώθηκε μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν 37,9 mg υπερθειικούκαλίου (K₂S₂O₈) σε ειδικό φιαλίδιο και προστέθηκε σε αυτό 1 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, προστέθηκαν 440 μL διαλύματος K₂S₂O₈ στο διάλυμα του ABTS. Το διάλυμα που δημιουργήθηκε αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι στους 25 °C για 18 ώρες, ώστε να προκύψει βαθύ κυανοπράσινο διάλυμα.

Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος ABTS⁺

Σε ποτήρι ζέσης προστέθηκαν 9,00 mL αιθανόλης (EtOH) και 115 μL διαλύματος φύλαξης του ABTS⁺. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm, η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε τιμή κοντά στο 0,700 nm (A=0,7±0,005).

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (0,1–0,8 mM) Trolox (ανάλογο της Βιταμίνης Ε με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας ABTS).

5.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό φιαλίδιο (vial) για να παρασκευαστεί το διάλυμα αναφοράς που περιείχε 100 μL EtOH και 2 mL αραιωμένου διαλύματος ABTS. Σε vials μεταφέρθηκαν 100 μL κάθε δείγματος συγκέντρωσης 15000 ppm (ή προτύπου) και προστέθηκαν 4 mL αραιωμένου διαλύματος ABTS στο κάθε δείγμα. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex. Μετά από περίοδο επώασης 6 min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25 °C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 734nm με χρήση φασματόμετρου JascoV-550 τόσο των προτύπων όσο και των δειγμάτων. Με χρήση των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η συνολική συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών προσδιορίστηκε με χρήση της καμπύλης αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox.

Ακολούθως προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (Ι%)

σύμφωνα με την <u>**Εξίσωση 1**</u>: Ι % = A₀-A/A₀*100

όπου: Ι % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας,

Α₀= η απορρόφηση του τυφλού,

Α = η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος

Οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

5.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ΙC₅₀ των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων για τη δοκιμή ABTS

Για τα δείγματα που παρουσίασαν παρεμποδιστική δράση πάνω από 50 %,υπολογίστηκε το IC₅₀. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το ποσοστό (%) εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

5.3.2.1 Πειραματική διαδικασία IC₅₀ για τη δοκιμή ABTS

Αρχικά, παρασκευάστηκαν για κάθε δείγμα έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις από 100μ δείγμα συγκέντρωσης 15000 ppm και 70, 100, 300, 500, 700 και 1000 μL EtOH αντίστοιχα. Ακολούθως σε 100 μL κάθε αραιωμένου διαλύματος προστέθηκαν 2 mL αραιωμένου διαλύματος ABTS⁺. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex. Μετά από περίοδο επώασης για 6 min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25 °C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 734 nm και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (Ι%) σύμφωνα με την Εξίσωση 1. Έπειτα, δημιουργήθηκαν για κάθε δείγμα οι αντίστοιχες καμπύλες,της μορφής y= ax+ β. Συνεπώς για να βρεθούνε οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% μείωση της ρίζας του ABTS για τα αντίστοιχα δείγματα,έγινε αντικατάσταση με y=50 στις αντίστοιχες καμπύλες.

5.3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS

5.3.3.1 Δοκιμή ABTS

Στην Εικόνα 26, φαίνεται η πρότυπη καμπύλη με βάση την οποία προσδιορίστηκε το Ι%.

Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή σε ισοδύναμα Trolox έγινε μέσω της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης η οποία είναι η: y= (-0,675) x TE + 0,695 με R²= 0,995. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράστηκαν σε mM Trolox. Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μέσων (SD). Στον Πίνακα 3, παραθέτονται τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης των ελεύθερων ριζών (I%) με τη δοκιμή ABTS.



Εικόνα 26: Πρότυπη καμπύλη Trolox για τη δοκιμή ABTS

| Δείγμα | <u>1%</u> | <u>Μέσος όρος ± τυπική</u> |
|---------------------------------------|-----------|------------------------------|
| | | αποκλίση (mivi Trolox) (n=3) |
| Pistachio Hull_Freeze Dry_EtOH | 98,340 | 144,215 ± 1,380 |
| Pistachio Hull_Freeze Dry_ HPLC WATER | 92,932 | 136,204 ± 1,054 |
| Pistachio Hull_RAW_EtOH | 99,122 | 145,375 ± 0,804 |
| Pistachio Hull_RAW_HPLC WATER | 95,998 | 140,745 ± 4,296 |
| Pistachio Hull_Vacuum Dry_EtOH | 97,704 | 143,273 ± 2,977 |
| Pistachio Hull_Vacuum Dry_HPLC WATER | 95,827 | 140,492 ± 1,303 |
| Γενικός Μέσος Όρος δειγμάτων | 96,654 | 141,717 ± 1,252 |

Πίνακας 3: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS.

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3, οι τιμές για την παρεμπόδιση των ελεύθερων ριζών (Ι%) κυμάνθηκαν από 92,932% έως 99,122%. Αναλύοντας τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το αιθανολικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου (Pistachio Hull_RAW_EtOH), το οποίο είχε και την υψηλότερη απόδοση σε g

δείγματος, ενώ με την μικρότερη, το υδατικό εκχύλισμα λυοφιλιωμένου περικαρπίου (Pistachio Hull_Freeze Dry_ HPLC WATER) (Εικ. 27). Διακρίνεται μια τάση των αιθανολικών εκχυλισμάτων να επιδεικνύουν υψηλότερες τιμές παρεμπόδισης ελευθέρων ριζών (Ι%), σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα, παρά το γεγονός οτι το νερό αξιολογήθηκε ως πιο αποδοτικός διαλύτης για το θερμικά επεξεργασμένο περικάρπιο. Στη περίπτωση του νωπού περικαρπίου, το αιθανολικό εκχύλισμα επέδειξε και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, επιβεβαιώνοντας την απόδοση του σε φαινολικά συστατικά.



Εικόνα 27: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων περικαρπίου, με την δοκιμή ABTS

5.3.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας ABTS κατά 50% (IC₅₀)

Για τα δείγματα, όπου η παρεμποδιστική ικανότητα (Ι%) προσδιορίστηκε μεγαλύτερη από 50%, υπολογίστηκε το IC₅₀. Στον Πίνακα 4, παραθέτονται οι συγκεντρώσεις εκείνων των δειγμάτων που παρουσίασαν 50% παρεμπόδιση σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Το IC₅₀ εκφράζει την συγκέντρωση του εχκυλίσματος,που απαιτείται για να υπάρξει 50% παρεμποδιστική δράση, έναντι των ελεύθερων ριζών. Το ποσοστό παρεμπόδισης υπολογίζεται από την εξίσωση της γραφικής παράστασης, συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων κάθε δείγματος. Ουσιαστικά, οσο πιο μικρό είναι το IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το εκάστοτε εκχύλισμα. Όπως φαίνεται και στην Εικ. 28, η μεταχείριση του εκχυλίσματος του περικαρπίου με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση έχει το Σιναρτία το μικρότερο IC₅₀ (0,0000304491 mM Trolox.). Το λιγότερο δραστικό είναι το P.Hull Freeze Dried-HPLC Water, του οποίου το IC₅₀ ισούται με

0,0000393007 mM Trolox. Ουσιαστικά, τα αποτελέσματα αυτά επικυρώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων, ενώ εξακολουθεί η τάση των αιθανολικών εκχυλισμάτων να επιδεικνύουν υψηλότερες τιμές παρεμποδιστικής δράσης (IC₅₀), σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα, παρά το γεγονός της καλύτερης απόδοσης του νερού, ως διαλύτης εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του περικαρπίου.

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του υπολογισμού IC₅₀ των δειγμάτων κατά τη δοκιμή ABTS.

| Δείγματα | P.H_FD_E | P.H_F.D_W | P.H_R_E | P.H_R_W | P.H_VD_E | P.H_VD_W |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | | |
| μL | A734 (nm) 1% |
| 170 | 0,001 99,829 | 0,003 99,488 | 0,001 99,867 | 0,002 99,659 | 0,008 98,637 | 0,002 99,735 |
| 200 | 0,002 99,659 | 0,008 98,637 | 0,009 98,811 | 0,007 98,807 | 0,01 98,269 | 0,004 99,471 |
| 400 | 0,162 72,402 | 0,092 84,327 | 0,139 81,638 | 0,128 78,194 | 0,08 86,371 | 0,125 83,487 |
| 600 | 0,165 71,890 | 0,198 66,269 | 0,228 69,881 | 0,187 68,143 | 0,221 62,350 | 0,308 59,313 |
| 800 | 0,281 52,129 | 0,329 43,952 | 0,376 50,330 | 0,29 50,596 | 0,301 48,722 | 0,326 56,935 |
| 1100 | 0,379 35,434 | 0,382 34,923 | 0,391 48,348 | 0,321 45,315 | 0,378 35,604 | 0,395 47,820 |
| Εξίσωση | Y=113097x + | Y=122695x + | Y=111990x + | Y=115010x + | Y=117267x + | Y=114069x + |
| | 48,435 | 45,178 | 49,659 | 47,813 | 46,995 | 48,777 |
| R ² | 0,9053 | 0,8036 | 0,8583 | 0,8998 | 0,8134 | 0,8871 |
| IC ₅₀ | 1,38377E-05 | 3,93007E-05 | 3,04491E-06 | 1,90157E-05 | 2,51847E-05 | 1,07216E-05 |



Εικόνα 28: Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Εξουδετέρωσης ρίζας ABTS κατά 50% (IC₅₀)

Στην έρευνα των Tomaino et al. (2010) αναφέρεται ότι 2,19 mmol Trolox/g υδρομεθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου, απαιτούνται για να υπάρξει 50% παρεμποδιστική δράση, έναντι των ελεύθερων ριζών, ενω στην εργασία των Lalegani et al. (2018), απαιτούνται, αντίστοιχα, 139 μΜ TE/g υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου. Σύμφωνα με τους Seifzadeh et al. (2018) και την αντιοξειδωτική δοκιμή ABTS, υπολόγισαν την IC₅₀, στα 6,12 mg ασκορβικού οξέος (AA)/mg.

5.3.4 Προσδιορισμός του φαινολικού περιεχομένου των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή DPPH

Η αρχή της δοκιμής DPPH βασίζεται στην αναγωγή της ρίζας του DPPH από αντιοξειδωτικές ουσίες με αποτέλεσμα την εξασθένιση του αρχικού πορφυρού χρώματος (απορρόφηση στα 515nm).

5.3.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας και πρότυπων διαλυμάτων DPPH

Παρασκευή διαλύματος εργασίας DPPH

Ζυγίστηκαν 3,2 mg DPPH, της εταιρίας Sigma, και διαλύθηκαν σε 100 mL οξικού αιθυλεστέρα (AcOEt). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με AcOEt έως τα 100 mL.Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι, ενώ παρασκευάστηκε την ίδια μέρα που έγινε η ανάλυση.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (0,05 –1,0 mM) Trolox σε AcOEt.

5.3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένα φιαλίδιο για να παρασκευαστεί το διάλυμα αναφοράς που περιείχε 100 μL AcOEt και 4 mL DPPH. Σε ειδικά vials προστέθηκαν 100 μL δείγματος συγκέντρωσης 15000 ppm και 4 mL DPPH. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex. Μετά από περίοδο επώασης 30 min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25 °C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm με φασματόμετρο JascoV-550. Με χρήση των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η συνολική συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών προσδιορίστηκε με χρήση της καμπύλης αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox. Ακολούθως προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I%) σύμφωνα με την Εξίσωση 1. Οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

5.3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC₅₀ των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων για τη δοκιμή DPPH

Για τα δείγματα που παρουσίασαν παρεμποδιστική δράση πάνω από 50 %, υπολογίστηκε το IC₅₀. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το ποσοστό (%) εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

5.3.5.1 Πειραματική διαδικασία IC₅₀ για τη δοκιμή DPPH

Αρχικά, παρασκευάστηκαν για κάθε δείγμα έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις από 100 μ δείγμα συγκέντρωσης 15000 ppm και 20, 35, 50, 70, 100 και 300 μL AcOEt αντίστοιχα. Ακολούθως σε 100 μL κάθε αραιωμένου διαλύματος προστέθηκαν 4 mL DPPH. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex. Μετά από περίοδο επώασης 30 min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25 °C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I%) σύμφωνα με την Εξίσωση 1. Έπειτα δημιουργήθηκαν για κάθε δείγμα οι αντίστοιχες καμπύλες οι οποίες είναι της μορφής y= ax+ β.Συνεπώς για να βρεθούνε οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% μείωση της ρίζας του DPPH για τα αντίστοιχα δείγματα, έγινε αντικατάσταση με y=50 στις αντίστοιχες καμπύλες.

5.3.6 Αποτελέσματα και συζήτηση εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή DPPH

5.3.6.1 Δοκιμή DPPH

Στην Εικ. 29, φαίνεται η πρότυπη καμπύλη με βάση την οποία προσδιορίστηκε το Ι(%). Στον Πίνακα 5, παραθέτονται τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης των ελεύθερων ριζών (Ι %). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή στο Trolox έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης η οποία είναι η: y= (-0,388)x TE + 0,797, με R²= 0,971. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράστηκαν σε mM Trolox. Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μέσων (SD). Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5, οι τιμές για την παρεμπόδιση των ελεύθερων ριζών (Ι%) κυμάνθηκαν από 53,832% έως 76,078%. Διακρίνεται από τα αποτελέσματα οτι, το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου, σε νωπή κατάσταση (Pistachio Hull_RAW_ HPLC WATER), ενώ με την μικρότερη, το αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου, θερμικά επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό (Pistachio Hull_Vacuum Dry_EtOH) (Εικ. 30). Στη δοκιμή αυτή, τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές παρεμπόδισης ελευθέρων ριζών (Ι%), σε σύγκριση με τα αιθανολικά εκχυλίσματα, επικυρώνοντας την υψηλότερη απόδοση του νερού κατά την εκχύλιση του θερμικά επεξεργασμένου περικαρπίου. Στη περίπτωση του νωπού περικαρπίου, το υδατικό εκχύλισμα, αν και είχε τη χαμηλότερη απόδοση σε g δείγματος, επέδειξε και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 29: Πρότυπη Καμπύλη Trolox για την δοκιμή DPPH.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH.

| Δείγμα | <u>l%</u> | <u>Μέσος όρος ± τυπική</u> <u>απόκλιση (mM Trolox) (n=3)</u> |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Pistachio Hull_Freeze Dry_EtOH | 53,045 | 134,214 ± 2,249 |
| Pistachio Hull_Freeze Dry_ HPLC WATER | 63,586 | 161,380 ± 3,986 |
| Pistachio Hull_RAW_EtOH | 69,438 | 176,463 ± 4,666 |
| Pistachio Hull_RAW_HPLC WATER | 76,078 | 193,575 ± 5,813 |
| Pistachio Hull_Vacuum Dry_EtOH | 53,832 | 136,242 ± 2,523 |
| Pistachio Hull_Vacuum Dry_HPLC WATER | 64,989 | 164,997 ± 3,841 |
| Γενικός Μέσος Όρος δειγμάτων | 63,495 | 161,145 ± 1,215 |

Βιβλιογραφικά, οι Barreca et al. (2016) υπολόγισαν το ποσοστό παρεμπόδισης (Ι%), κατά την αντιοξειδωτική δοκιμή DPPH, σε μεθανολικά εκχυλίσματα περικαρπίου στο 68%, ενω οι Behgar et al. (2011), σε ακετονικά εκχυλίσματα περικαρπίου, στο 54%.



Εικόνα 30: Αντιοξειδωτική Ικανότητα εκχυλισμάτων περικαρπίου, με την δοκιμή DPPH

5.3.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας DPPH κατά 50% (IC50)

Για τα δείγματα,όπου η παρεμποδιστική ικανότητα (Ι%) προσδιορίστηκε μεγαλύτερη από 50%, υπολογίστηκε το ΙC₅₀. Στον Πίνακα 6, παραθέτονται οι συγκεντρώσεις εκείνων των δειγμάτων που παρουσίασαν 50% παρεμπόδιση σχηματισμού ελευθέρων ριζών.

Όπως φαίνεται και στην Εικ. 31, η μεταχείριση του εκχυλίσματος του περικαρπίου με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το P.Hull Freeze Dried-HPLC Water, καθώς έχει το μικρότερο IC₅₀ (0,00072029 mM Trolox.), ενω το λιγότερο δραστικό είναι το P.Hull Raw-EtOH, του οποίου το IC₅₀ ισούται με 0,001254479 mM Trolox. Πράγματι, διακρίνεται οτι τα υδατικά εκχυλίσματα έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, συγκριτικά με τα αιθανολικά, δεδομένου οτι επιδεικνύουν υψηλότερες τιμές παρεμποδιστικής δράσης (IC₅₀). Στην έρευνα των Roosteae et al. (2017), οι τιμές IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δοκιμής DPPH σε υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου υπολογίστηκαν στα 10 μg GAE/mL, ενω οι Lalegani et al. (2018) αναφέρουν ότι 44 μΜ ΤΕ/g υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου,που απαιτούνται για να υπάρξει 50% παρεμποδιστική δράση, έναντι των ελεύθερων ριζών. Οι Garavand et al. (2017), στην εργασία τους, παρουσίασαν ότι οι τιμές IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δοκιμής DPPH σε υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου, σε υπερήχους (UAE), βρέθηκαν στα 22 μg GAE/mL, ενω οι Seifzadeh et al. (2018) ανέφεραν ότι το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου για τις τιμές IC₅₀ του DPPH ήταν 4,49 mg δείγματος/mL. Οι Ozbek et al. (2018) υπολόγισαν ότι οι τιμές IC_{50} της αντιοξειδωτικής δοκιμής DPPH σε αιθανολικά εκχυλίσματα περικαρπίου ήταν 2,73 μg δείγματος/mL.



Εικόνα 31: Προσδιορισμός συγκέντρωσης εξουδετέρωσης ρίζας DPPH κατά 50% (IC₅₀)

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του υπολογισμού IC₅₀ των δειγμάτων κατά τη δοκιμή DPPH.

| Δείγματα | P.H_FD_E | P.H_F.D_W | P.H_R_E | P.H_R_W | P.H_VD_E | P.H_VD_W |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | | |
| μL | A734 (nm) 1% |
| 120 | 0,368 37,308 | 0,384 49,273 | 0,391 33,390 | 0,301 48,722 | 0,366 37,649 | 0,393 48,084 |
| 135 | 0,374 36,286 | 0,414 45,310 | 0,417 28,960 | 0,363 38,160 | 0,387 34,071 | 0,411 45,706 |
| 150 | 0,388 33,901 | 0,425 43,857 | 0,429 26,916 | 0,429 26,916 | 0,397 32,367 | 0,438 42,140 |
| 170 | 0,397 32,368 | 0,567 25,099 | 0,431 26,575 | 0,447 23,850 | 0,401 31,686 | 0,572 24,438 |
| 200 | 0,406 30,835 | 0,611 19,286 | 0,451 23,168 | 0,461 21,465 | 0,405 31,005 | 0,623 17,701 |
| 400 | 0,49 16,525 | 0,624 17,569 | 0,494 15,843 | 0,501 14,650 | 0,516 12,095 | 0,641 15,323 |
| Εξίσωση | Y=42456x + | Y=74504x - | Y=32275x + | Y=65767x - | Y=49140x + | Y=77861x - |
| | 10,083 | 3,6645 | 9,5117 | 3,7569 | 5,3668 | 6,5019 |
| R ² | 0,9218 | 0,7982 | 0,9789 | 0,8293 | 0,8763 | 0,8182 |
| IC ₅₀ | 0,00094020 | 0,00072029 | 0,001254479 | 0,000817384 | 0,000908287 | 0,000725677 |

5.3.7 Σύγκριση δοκιμών ABTS & DPPH

Βάσει της Εικόνας 32 και της σύγκρισης των δυο διαφορετικών δοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης, συμπεραίνουμε ότι σε όλες τις μεταχειρίσεις των εκχυλισμάτων περικαρπίου, το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης (Ι%) είναι υψηλότερο στη δοκιμή ABTS, από ότι στη δοκιμή DPPH. Οι διαφορές, που παρουσιάζονται μεταξύ των δύο δοκιμών, μπορεί να οφείλονται στο γεγονός, πως η δοκιμή ABTS χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ανιχνευσιμότητα και ευαισθησία. Συγκριτικά με την μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS'+, η μέθοδος αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH θεωρείται πιο κατάλληλη για δείγματα που περιέχουν λιπόφιλα αντιοξειδωτικά και αυτά που έχουν υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο (MacDonald-Wicks et al. 2006). Όταν το ABTS ενεργοποιηθεί ενζυμικά, είναι μία πολύ σταθερή ρίζα, γεγονός μεγάλης σημασίας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα . Δεν υπάρχει στα βιολογικά συστήματα και δεν έχει ομοιότητες με ρίζες που υπάρχουν σε αυτά.



Εικόνα 32: Σύγκριση δοκιμών ABTS & DPPH

Όταν η ρίζα ABTS ενεργοποιείται ενζυμικά, η αντίδραση γίνεται γρήγορα και μπορεί να δουλέψει σε μεγάλο εύρος pH, αλλά πρότιμάται το όξινο περιβάλλον. Όπως έχουν δείξει μελέτες το pH μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ισορροπία της αντίδρασης, αλλά δεν αποτελεί κανένα πρόβλημα όταν κυμαίνεται από 3,0-6,5 (MacDonald-Wicks et al. 2006). Το ABTS είναι διαλυτό τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες και δεν επηρεάζεται από το σθένος των ιόντων,με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση υδρόφιλων αλλά λιπόφιλων συστατικών, με πρότιμότερα τα πρώτα. Ακόμη, ένα συστατικό για να μπορέσει να αντιδράσει και να εξουδετερώσει το ABTS θα πρέπει να έχει χαμηλότερο δυναμικό, παρόλα αυτά φαινολικά συστατικά με χαμηλό δυναμικό, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ABTS (Cano et al., 1998). Παρά το γεγονός ότι είναι διαθέσιμες πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, είναι σημαντικό οι μέθοδοι αυτές να είναι σταθερές και ταχείες. Ενώ κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, οι πιο αξιόπιστες και άμεσες μέθοδοι θεωρούνται οι δύο συγκεκριμένες, οι οποίες έχουν τροποποιηθεί και βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια (Duduku et al., 2011). Η μέθοδος αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS'+ θεωρείται μία σταθερή μέθοδος και καλή επιλογή για συνδυασμό με τη μέθοδο τη μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH' και δίνει ένα επιπλέον πλεονέκτημα σε περίπτωση αντιοξειδωτικών ουσιών,που είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες (Prior et al., 2005). Ως μέθοδοι *in vitro*, οι συγκεκριμένες δοκιμές είναι κατά βάση ποιότικές και ουσιαστικά, ανιχνεύουν αν το δεδομένο δείγμα έχει αντιοξειδωτική δράση. Με τον συμπληρωματικό προσδιορισμό του IC₅₀, ακολουθεί η ποσότικοποίηση της (Prior et al., 2005).

5.4 Χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μαζών (QTOF)

5.4.1 Οργανολογία

- Χρωματογράφος 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Εικ. 33)
- Χρωματογραφική στήλη Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18, μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρος 4,6nm,particle size 2,7μm
- Νερό για LC-MS
- Νερό οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ 0,1%
- MeOH LC-MS
- MeOH οξινισμένη με μυρμηγκικό οξύ 0,1%





5.4.2 Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα, ώστε η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων να είναι 2,5 mg/mL (2500 ppm) και ο τελικός τους όγκος, 1 mL. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOFLC/MS,ρυθμισμένο σε όγκο έκχυσης δείγματος

20 μL. Η μέθοδος, που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Pistachio Neg-O2, μια τεχνική ανεστραμμένης φάσης όπου συνδυάστηκαν δυο διαλύτες.

| No | <u>Κωδικός Δείγματος</u> | Διαλύτης | Μεταχείριση |
|----|------------------------------------------|------------|------------------|
| 1 | P.Hull Freeze Dry EtOH | EtOH | Λυοφιλίωση |
| 2 | P.Hull Freeze Dry EtOH 1% | EtOH | Λυοφιλίωση |
| | НСООН | | |
| 3 | P.Hull Freeze Dry HPLC Water | HPLC Water | Λυοφιλίωση |
| 4 | P.Hull Freeze Dry HPLC Water | HPLC Water | Λυοφιλίωση |
| | 1% HCOOH | | |
| 5 | P.Hull Vacuum Dry EtOH | EtOH | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 6 | P.Hull Vacuum Dry EtOH 1% HCOOH | EtOH | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 7 | P.Hull Vacuum Dry HPLC Water | HPLC Water | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 8 | P.Hull Vacuum Dry HPLC Water 1% HCOOH | HPLC Water | Ξήρανση Υπό Κενό |
| 9 | P.Hull Raw EtOH | EtOH | Νωπή κατάσταση |
| 10 | P.Hull Raw EtOH 1% HCOOH | EtOH | Νωπή κατάσταση |
| 11 | P.Hull Raw HPLC Water | HPLC Water | Νωπή κατάσταση |
| 12 | P.Hull Raw HPLC Water 1% HCOOH | HPLC Water | Νωπή κατάσταση |

Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων για ανάλυση στο LC-MS QTOF

Ο διαλύτης Α ήταν το νερό οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ (0,1%), ο διαλύτης Β ήταν η MeOH για LC-MS με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος (0,1%), ο διαλύτης Γ νερό για LC-MS και ο διαλύτης Δ MeOH για LC-MS. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,5 mL/min και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε, η Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18, με μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 nm και particle size 2,7 μm. Η θερμοκρασία στήλης ορίστηκε στους 21° C. Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιόντος, ώστε να σχηματιστεί αρνητικό ιόν [M-H]⁻. Το εύρος για το κλάσμα m/z ορίστηκε μεταξύ 70-500 nm, βάσει βιβλιογραφίας. Η τεχνική έκλουσης των διαλυτών που εφαρμόστηκε ήταν βαθμιδωτή ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών. Τα μήκη κύματος που καταγράφηκαν ήταν τα εξής: 230, 270, 280, 320, 360, 530 nm, τα οποία επιλέχθηκαν βάση των φασμάτων UV-Vis και της βιβλιογραφίας. Ο ποιότικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των περικαρπίων *P.vera* L. εκτιμήθηκε με βάση τον χρόνο έκλουσης (Retention time-Rt) και τα φάσματα απορρόφησης τους από τη βιβλιογραφία, καθώς και από το μοριακό ιόν (m/z). Σχετικά με το φάσμα μάζας κάθε συστατικού, λήφθηκε υπόψιν το θραύσμα μάζας m/z του μοριακού ιόντος του.

5.4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ποιότικής ανάλυσης εκχυλισμάτων με HPLC-MS-QTOF

Τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία– φασματομετρία μαζών. Για τη ταυτοποίηση των πιθανών φαινολικών συστατικών επί των εκχυλισμάτων περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού, έγινε χρήση βιβλιογραφικής βάσης δεδομένων φαινολικών συστατικών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα ψίχας κελυφωτού φιστικιού (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Βάση δεδομένων φαινολικών συστατικών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτού φιστικιού (Μητροπούλου, 2020)

| ΠΡΟΤΥΠΗ | <u>M.T</u> | [M](mass) | $[M+H]^+$ | [M-H] ⁻ |
|--------------------------|----------------------|-----------|-----------|--------------------|
| Γαλλικό οξύ | $C_7H_6O_5$ | 170,02152 | 171,0288 | 169,01425 |
| (+)-κατεχίνη | $C_{15}H_{14}O_6$ | 290,07904 | 291,08631 | 289,07176 |
| (-)-επικατεχίνη | $C_{15}H_{14}O_6$ | 290,07904 | 291,08631 | 289,07176 |
| Εριοδικτυόλη-7-Ο- | $C_{21}H_{22}O_{11}$ | 450,11621 | 451,12349 | 449,10894 |
| γλυκοζίτης | | | | |
| Εριοδικτυόλη | $C_{15}H_{12}O_6$ | 288,06339 | 289,07066 | 287,05611 |
| Ναρινγενίνη-7-Ο- | $C_{27}H_{32}O_{14}$ | 580,17921 | 581,18648 | 579,17193 |
| νεοεσπεριδίνη | | | | |
| Ναρινγκενίνη | $C_{15}H_{12}O_5$ | 272,06847 | 273,07575 | 271,06120 |
| Κερκετίνη-3-Ο- | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 610,15339 | 611,16067 | 609,14611 |
| ρουτινοσίδη | | | | |
| Κερκετίνη-3-Ο- | $C_{21}H_{20}O_{12}$ | 464,09548 | 465,10275 | 463,08820 |
| γαλακτοσίδη | | | | |
| Κερκετίνη-3-Ο-γλυκοζίτης | $C_{21}H_{19}O_{12}$ | 463,08765 | 464,09493 | 463,08820 |
| Κερκετίνη-3-Ο- | $C_{21}H_{18}O_{13}$ | 478,07474 | 479,08202 | 477,06747 |
| γλυκουρονίδη | | | | |
| Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ | 302,04265 | 303,04993 | 301,03538 |
| Απιγενίνη | $C_{15}H_{10}O_5$ | 270,05282 | 271,06010 | 269,04555 |
| Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίτης | $C_{21}H_{20}O_{10}$ | 432,1056 | 433,11288 | 431,0984 |
| Μυρικετίνη | $C_{15}H_{10}O_8$ | 318,03757 | 319,04484 | 317,03029 |

| Ρεσορκινόλη | $C_6H_6O_2$ | 110,03678 | 111,04961 | 109,02950 |
|--------------------------|----------------------|------------|------------|------------|
| Ρεσβερατρόλη | $C_{14}H_{12}O_3$ | 228,07864 | 229,08592 | 227,07137 |
| Κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτης | $C_{21}H_{21}O_{11}$ | 449,10839 | 450,11566 | 448,10111 |
| Πεντα-Ο-γαλοϋλοΙ-β-D- | $C_{41}H_{32}O_{26}$ | 940,11818 | 941,12546 | 939,11091 |
| γλυκοζίτης | | | | |
| Εξαγαλοϋλοεξόζη | $C_{48}H_{36}O_{30}$ | 1092,12914 | 1093,13641 | 1091,12186 |
| Μονογαλοϋλογλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ | 332,07435 | 333,08162 | 331,06707 |
| 17:1-ανακαρδικό οξύ | $C_{24}H_{38}O_3$ | 374,28210 | 375,28937 | 373,27482 |
| 13:0-ανακαρδικό οξύ | $C_{20}H_{32}O_3$ | 320,23514 | 321,24242 | 319,22787 |
| 13:1-ανακαρδικό οξύ | $C_{20}H_{30}O_{3}$ | 318,21949 | 319,22677 | 317,21222 |
| (στεβιόλη) | | | | |
| Φλωρογλουκινόλη | $C_6H_6O_3$ | 126,03169 | 127,03897 | 125,02442 |
| Βανιλικό οξύ | $C_8H_8O_4$ | 168,04226 | 169,04953 | 167,03498 |
| π-κουμμαρικό οξύ (trans- | $C_9H_8O_3$ | 164,04734 | 165,05462 | 163,04007 |
| 2-υδροξυκυναμικό οξύ) | | | | |
| Συναπικό οξύ (trans-3,5- | $C_{11}H_{12}O_5$ | 224,06847 | 225,07575 | 223,06120 |
| διμεθοξυ-4- | | | | |
| υδροξυκυναμικό οξύ) | | | | |
| Πρωτοκατεχικό οξύ | $C_7H_6O_4$ | 154,02661 | 155,03388 | 153,01933 |
| Χλωρογενικό οξύ | $C_{16}H_{18}O_{9}$ | 354,09508 | 355,10236 | 353,08781 |
| Ρουτίνη | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 610,15338 | 611,16066 | 609,14611 |
| Καφεϊκό οξύ | $C_9H_8O_4$ | 180,04226 | 181,04953 | 179,03498 |
| Φερουλικό οξύ (3-μεθοξυ- | $C_{10}H_{10}O_4$ | 194,05791 | 195,06518 | 193,05063 |
| 4-υδροξυκυναμικό οξύ) | | | | |
| Υδροξυτυροσόλη (3,4- | $C_8H_{10}O_3$ | 154,06299 | 155,07027 | 153,05572 |
| διυδροξυφαινυλαιθανόλη) | | | | |
| Σαλικιλικό οξύ (4- | $C_7H_6O_3$ | 138,03169 | 139,03897 | 137,02442 |
| υδροξυβενζοϊκό οξύ) | | | | |
| Βανιλίνη (3-μεθοξυ-4- | $C_8H_8O_3$ | 152,04734 | 153,05462 | 151,04007 |
| υδροξυβενζαλδεϋδη) | | | | |
| Πυρογαλόλη (1,2,3- | $C_6H_6O_3$ | 126,03169 | 127,03897 | 125,02442 |
| τριϋδροξυβενζόλιο) | | | | |
| Τυροσόλη (4- | $C_8H_{10}O_2$ | 138,06808 | 139,07535 | 137,06080 |

| υδροξυφαινυλαιθανόλη) | | | | |
|-----------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| Συριγγαλδεΰδη (3,5- | $C_9H_{10}O_4$ | 182,05791 | 183,06518 | 181,05063 |
| διμεθοξυ-4- | | | | |
| Υδροξυβενζαλδεϋδη) | | | | |
| Μεθυλο-(3,4- | $C_8H_8O_4$ | 168,04226 | 169,04953 | 167,03498 |
| διϋδροξυβενζοϊκό) | | | | |
| Μεθύλ-(3,4,5- | $C_8H_8O_5$ | 184,03717 | 185,04445 | 183,02990 |
| τριϋδροξυβενζοϊκό) | | | | |
| Συριγγικό οξύ (3,5- | $C_9H_{10}O_5$ | 198,05282 | 199,06010 | 197,04555 |
| διμεθόξυ-4- | | | | |
| υδροξυβενζοϊκό οξύ) | | | | |
| Αιθυλο-(3,4,5- | $C_9H_{10}O_5$ | 198,05282 | 199,06010 | 197,04555 |
| τριϋδροξυβενζοϊκό) | | | | |

Στους πίνακες και τα χρωματογραφήματα και φάσματα μαζών, που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

Αιθανολικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

5.4.3.1 Pistachio Hull EtOH Freeze Dry

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 9, στο αιθανολικό εκχύλισμα λυοφιλιωμένου περικαρπίου προσδιορίζονται ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται το γαλλικό οξύ και ακολουθεί η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

<u>Πίνακας</u> 9: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου περικαρπίου (Pistachio Hull EtOH Freeze Dry)

| # | Rt | [M-H]⁻ | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|---|--------|----------|------------------------|------------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| | (min) | (П) | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 11,973 | 169,0140 | 169,01425 | 150 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 2 | 11,982 | 169,0141 | 169,01425 | 170 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 3 | 11,990 | 169,0140 | 169,01425 | 190 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 4 | 11,999 | 169,0141 | 169,01425 | 210 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 5 | 37,217 | 463,0869 | 463,08820 | 150 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |





Εικόνα 35: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 34: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



γλυκοζίτης)

 1 Q₁= Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), 2 Q₂= Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-

| 6 | 37,225 | 463,0866 | 463,08820 | 170 | 3,455 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
|---|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 7 | 37,234 | 463,0868 | 463,08820 | 190 | 3,023 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 8 | 37,242 | 463,0865 | 463,08820 | 210 | 3,671 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |



Εικόνα 37: Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.1.3.2 Pistachio Hull EtOH Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 10, στο οξινισμένο αιθανολικό εκχύλισμα λυοφιλιωμένου περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ) ή το αιθυλ- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό) και τέλος, η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

<u>Πίνακας 10</u>: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου περικαρπίου με οξίνιση με μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt (min) | [M-H]⁻(Π) | [M-H]⁻(Θ) | Fragm | Mass | Ένωση | <u>M.T</u> |
|----|----------|-----------|-----------|-------|--------------|-----------------------|----------------------|
| | | | | entor | <u>Error</u> | | |
| 1 | 7,752 | 331,0661 | 331,06707 | 150 | 2,929 | Μονογαλοϋλογλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 7,761 | 331,0663 | 331,06707 | 170 | 2,325 | Μονογαλοϋλογλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 7,769 | 331,0667 | 331,06707 | 190 | 1,117 | Μονογαλοϋλογλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 7,778 | 331,0666 | 331,06707 | 210 | 1,419 | Μονογαλοϋλογλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 10,219 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 10,227 | 169,0142 | 169,01425 | 170 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 10,236 | 169,0142 | 169,01425 | 190 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 10,244 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 12,078 | 169,0143 | 169,01425 | 150 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 10 | 12,086 | 169,0142 | 169,01425 | 170 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 11 | 12,103 | 169,0143 | 169,01425 | 210 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 12 | 17,797 | 153,0192 | 153,01933 | 170 | 0,85 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |

| 13 | 17,814 | 153,0193 | 153,01933 | 210 | 0,2 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 14 | 30,799 | 197,0453 | 197,04555 | 150 | 1,27 | S ₁ /E ₁ | $C_9H_{10}O_5$ |
| 15 | 30,807 | 197,0455 | 197,04555 | 170 | 0,25 | S ₁ /E ₁ | $C_9H_{10}O_5$ |
| 16 | 30,816 | 197,0450 | 197,04555 | 190 | 2,79 | S ₁ /E ₁ | $C_9H_{10}O_5$ |
| 17 | 30,824 | 197,0453 | 197,04555 | 210 | 1,27 | S ₁ /E ₁ | $C_9H_{10}O_5$ |
| 18 | 37,321 | 463,0869 | 463,08820 | 150 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 19 | 37,329 | 463,0870 | 463,08820 | 170 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 20 | 37,338 | 463,0871 | 463,08820 | 190 | 2,375 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 21 | 37,346 | 463,0863 | 463,08820 | 210 | 4,1 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 ${}^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), ${}^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης). ${}^{3}S_{1}$ = Συριγγικό οξύ (3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), E₁= Αιθυλ- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό)



Εικόνα 38: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 39</u>: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 40: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 41: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 43:</u> Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 44: Χρωματογράφημα S_1/E_1 με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 45: Φάσμα μαζών S₁/E₁ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 46: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 47: Φάσμα μαζών Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.3 Pistachio Hull EtOH Raw

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 11, στο αιθανολικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου, προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ και τέλος, η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 11: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος νωπού περικαρπίου (Pistachio Hull EtOH Raw)

| # | Rt | [M-H] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|----|--------|------------------------|------------------------|------------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 7,247 | 331,0663 | 331,06707 | 150 | 2,325 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 7,255 | 331,0665 | 331,06707 | 170 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 7,264 | 331,0667 | 331,06707 | 190 | 1,117 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 7,272 | 331,0663 | 331,06707 | 210 | 2,325 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 9,781 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 9,790 | 169,0140 | 169,01425 | 170 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 9,798 | 169,0141 | 169,01425 | 190 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 9,806 | 169,0143 | 169,01425 | 210 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 11,952 | 169,0139 | 169,01425 | 170 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 10 | 11,961 | 169,0140 | 169,01425 | 190 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 11 | 11,969 | 169,0135 | 169,01425 | 210 | 4,44 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 12 | 35,971 | 463,0867 | 463,08820 | 150 | 3,239 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 13 | 35,979 | 463,0869 | 463,08820 | 170 | 2,81 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 14 | 35,988 | 463,0868 | 463,08820 | 190 | 3,02 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 15 | 35,996 | 463,0871 | 463,08820 | 210 | 2,375 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 16 | 36,376 | 463,0873 | 463,08820 | 150 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 17 | 36,385 | 463,0871 | 463,08820 | 170 | 2,375 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 18 | 36,393 | 463,0870 | 463,08820 | 190 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 19 | 36,402 | 463,0874 | 463,08820 | 210 | 1,727 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 20 | 36,883 | 463,0873 | 463,08820 | 150 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 21 | 36,892 | 463,0870 | 463,08820 | 170 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 22 | 36,900 | 463,0876 | 463,08820 | 190 | 1,94 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 23 | 36,908 | 463,0873 | 463,08820 | 210 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

| 24 | 37,289 | 463,0870 | 463,08820 | 150 | 2,591 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|-----------|----------------------|
| 25 | 37,297 | 463,0871 | 463,08820 | 170 | 2,375 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 26 | 37,306 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 27 | 37,314 | 463,0870 | 463,08820 | 210 | 2,591 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 48: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 49: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 50: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 51: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 170.0 V)



Εικόνα 52: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 53: Φάσμα μαζών Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.4 Pistachio Hull EtOH Raw, με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 12, στο οξινισμένο αιθανολικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται το γαλλικό οξύ και ακολουθεί, η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 12: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου σε φυσικές συνθήκες με οξίνιση με μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH Raw,με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt (min) | [M-H] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | <u>Mass</u> | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|---|----------|------------------------|------------------------|------------|--------------|--------------|------------|
| | | | | | <u>Error</u> | | |

| 1 | 9,776 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 2 | 9,784 | 169,0140 | 169,01425 | 170 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 3 | 9,793 | 169,0141 | 169,01425 | 190 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 4 | 9,801 | 169,0140 | 169,01425 | 210 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 5 | 11,939 | 169,0138 | 169,01425 | 150 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 11,947 | 169,0139 | 169,01425 | 170 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 11,956 | 169,0140 | 169,01425 | 190 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 11,964 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 36,844 | 463,0866 | 463,08820 | 150 | 3,455 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 10 | 36,853 | 463,0872 | 463,08820 | 170 | 2,16 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 11 | 36,861 | 463,0869 | 463,08820 | 190 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 12 | 36,869 | 463,0875 | 463,08820 | 210 | 1,51 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 13 | 37,283 | 463,0872 | 463,08820 | 150 | 2,16 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 14 | 37,292 | 463,0870 | 463,08820 | 170 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 15 | 37,300 | 463,0870 | 463,08820 | 190 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 16 | 37,309 | 463,0872 | 463,08820 | 210 | 2,16 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 54: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF







Εικόνα 56: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 57</u>: Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.5 Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 13, στο αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου, θερμικά επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό, προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη.

Πίνακας 13: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο κενού (Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry)

| # | Rt | [M-H] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | Ένωση | <u>M.T</u> |
|---|-------|------------------------|------------------------|------------|--------------|----------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 7,277 | 331,0662 | 331,06707 | 150 | 2,63 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 7,286 | 331,0665 | 331,06707 | 170 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 7,294 | 331,0665 | 331,06707 | 190 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 7,303 | 331,0662 | 331,06707 | 210 | 2,63 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 9,778 | 169,0140 | 169,01425 | 150 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 9,787 | 169,0140 | 169,01425 | 170 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |

| 7 | 9,795 | 169,0141 | 169,01425 | 190 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|-------------|-------------------|
| 8 | 9,804 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 11,975 | 169,0137 | 169,01425 | 150 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 10 | 11,983 | 169,0140 | 169,01425 | 170 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 11 | 11,992 | 169,0137 | 169,01425 | 190 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 12 | 12,000 | 169,0138 | 169,01425 | 210 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 13 | 48,539 | 301,0342 | 301,03538 | 150 | 3,92 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 14 | 48,547 | 301,0345 | 301,03538 | 170 | 2,92 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 15 | 48,556 | 301,0344 | 301,03538 | 190 | 3,26 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 16 | 48,564 | 301,0345 | 301,03538 | 210 | 2,92 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |



Εικόνα 58: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 59: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)



Εικόνα 60: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 61: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 62: Χρωματογράφημα κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 63: Φάσμα μαζών κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)

5.4.3.6 Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 14, στο οξινισμένο αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου, θερμικά επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό, προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό) και η κερκετίνη.

Πίνακας 14: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο κενού, οξινισμένο με μυρμηγικό οξύ 1% (Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry,με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt | [М-Н] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|----|--------|------------------------|------------------------|------------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 7,281 | 331,0662 | 331,06707 | 150 | 2,63 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 7,289 | 331,0665 | 331,06707 | 170 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 7,306 | 331,0665 | 331,06707 | 210 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 9,747 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 5 | 9,756 | 169,0139 | 169,01425 | 170 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 9,764 | 169,0139 | 169,01425 | 190 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 9,773 | 169,0141 | 169,01425 | 210 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 11,944 | 169,0138 | 169,01425 | 150 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 11,953 | 169,0138 | 169,01425 | 170 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 10 | 11,961 | 169,0138 | 169,01425 | 190 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 11 | 11,969 | 169,0135 | 169,01425 | 210 | 4,44 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 12 | 36,748 | 463,0871 | 463,08820 | 150 | 2,38 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 13 | 36,757 | 463,0869 | 463,08820 | 170 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 14 | 36,765 | 463,0872 | 463,08820 | 190 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 15 | 36,773 | 463,0864 | 463,08820 | 210 | 3,89 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 16 | 48,440 | 301,0345 | 301,03538 | 150 | 2,92 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 17 | 48,449 | 301,0344 | 301,03538 | 170 | 3,26 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 18 | 48,457 | 301,0352 | 301,03538 | 190 | 0,6 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |
| 19 | 48,466 | 301,0350 | 301,03538 | 210 | 1,26 | Κερκετίνη | $C_{15}H_{10}O_7$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 64: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 65: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)



Εικόνα 66: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 67: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 68: Χρωματογράφημα Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 69 Φάσμα μαζών Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)



Εικόνα 70: Χρωματογράφημα κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 71: Φάσμα μαζών κερκετίνης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)

Υδατικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

5.4.3.7 Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 15, στο υδατικό λυοφιλιωμένο εκχύλισμα περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται το γαλλικό οξύ και ακολουθούν, το πρωτοκατεχικό οξύ και η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό)

<u>Πίνακας 15</u>: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry)

| # | Rt | [M-H]⁻(Π) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|----|--------|-----------|------------------------|------------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 12,075 | 169,0138 | 169,01425 | 150 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 2 | 12,083 | 169,0139 | 169,01425 | 170 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 3 | 12,092 | 169,0140 | 169,01425 | 190 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 4 | 17,515 | 153,0191 | 153,01933 | 150 | 1,5 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 5 | 17,524 | 153,0191 | 153,01933 | 170 | 1,5 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 6 | 17,532 | 153,0191 | 153,01933 | 190 | 1,5 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 7 | 17,541 | 153,0188 | 153,01933 | 210 | 3,46 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 8 | 36,744 | 463,0876 | 463,08820 | 150 | 1,3 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 9 | 36,752 | 463,0876 | 463,08820 | 170 | 1,3 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 10 | 36,760 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 11 | 36,769 | 463,0874 | 463,08820 | 210 | 1,727 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 12 | 37,183 | 463,0871 | 463,08820 | 150 | 2,38 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 13 | 37,191 | 463,0873 | 463,08820 | 170 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 14 | 37,200 | 463,0869 | 463,08820 | 190 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 15 | 37,208 | 463,0871 | 463,08820 | 210 | 2,38 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 72: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 73: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 190.0 V)



Εικόνα 74: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 75: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 76: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 77: Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.8 Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 16, στο οξινισμένο υδατικό λυοφιλιωμένο εκχύλισμα περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 16: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού οξινισμένου λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry, με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt | [М-Н] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | <u>Mass</u> | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|---|--------|------------------------|------------------------|------------|--------------|----------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 9,207 | 331,0664 | 331,06707 | 150 | 2,02 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 9,216 | 331,0666 | 331,06707 | 170 | 1,42 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 9,224 | 331,0664 | 331,06707 | 190 | 2,02 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 9,233 | 331,0667 | 331,06707 | 210 | 1,117 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 11,945 | 169,0137 | 169,01425 | 150 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |

| 6 | 11,953 | 169,0137 | 169,01425 | 170 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 7 | 11,962 | 169,0137 | 169,01425 | 190 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 11,970 | 169,0141 | 169,01425 | 210 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 17,453 | 153,0191 | 153,01933 | 150 | 1,5 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 10 | 17,461 | 153,0192 | 153,01933 | 170 | 0,85 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 11 | 17,470 | 153,0192 | 153,01933 | 190 | 0,85 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 12 | 17,478 | 153,0193 | 153,01933 | 210 | 0,2 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 13 | 36,850 | 463,0873 | 463,08820 | 150 | 1,94 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 14 | 37,256 | 463,0872 | 463,08820 | 170 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 15 | 36,858 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 16 | 36,867 | 463,0873 | 463,08820 | 210 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 17 | 37,264 | 463,0874 | 463,08820 | 170 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 18 | 37,272 | 463,0873 | 463,08820 | 190 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 19 | 37,281 | 463,0874 | 463,08820 | 210 | 1,727 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 78: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 79: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 80: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 81: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 82: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 83: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)


Εικόνα 84: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 85:</u> Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.9 Pistachio Hull HPLC Water Raw

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 17, στο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 17: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος νωπού περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Raw)

| # | Rt | [M-H] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | <u>Mass</u> | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|---|--------|------------------------|------------------------|------------|--------------|----------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 9,243 | 331,0662 | 331,06707 | 150 | 2,63 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 2 | 9,251 | 331,0663 | 331,06707 | 170 | 2,325 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 9,260 | 331,0664 | 331,06707 | 190 | 2,02 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 9,268 | 331,0664 | 331,06707 | 210 | 2,02 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 11,946 | 169,0140 | 169,01425 | 150 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 11,955 | 169,0142 | 169,01425 | 170 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 11,963 | 169,0139 | 169,01425 | 190 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |

| 8 | 11,971 | 169,0138 | 169,01425 | 210 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 9 | 36,852 | 463,0867 | 463,08820 | 150 | 3,24 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 10 | 36,860 | 463,0876 | 463,08820 | 170 | 1,3 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 11 | 36,869 | 463,0869 | 463,08820 | 190 | 2,807 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 12 | 36,877 | 463,0872 | 463,08820 | 210 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 86: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 87: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 88: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 89: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V



Εικόνα 90: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 91: Φάσμα μαζών Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.10 Pistachio Hull HPLC Water Raw, με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 18, στο οξινισμένο υδατικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται ο Μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 18: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του οξινισμένου υδατικού εκχυλίσματος νωπού περικαρπίου (Pistachio Hull HPLC Water Raw,με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt | [M-H] ⁻ (П) | [M-H] ⁻ (Θ) | Fragmentor | Mass | Ένωση | <u>M.T</u> |
|---|-------|------------------------|------------------------|------------|--------------|-------|------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |

| 1 | 9,206 | 331,0665 | 331,06707 | 150 | 1,721 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 2 | 9,215 | 331,0666 | 331,06707 | 170 | 1,42 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 3 | 9,223 | 331,0661 | 331,06707 | 190 | 2,93 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 4 | 9,232 | 331,0666 | 331,06707 | 210 | 1,42 | Μονογαλοϋλο- γλυκοζίτης | $C_{13}H_{16}O_{10}$ |
| 5 | 11,944 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 11,952 | 169,0143 | 169,01425 | 170 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 11,961 | 169,0138 | 169,01425 | 190 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 11,969 | 169,0137 | 169,01425 | 210 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 36,883 | 463,0870 | 463,08820 | 150 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 10 | 36,891 | 463,0870 | 463,08820 | 170 | 2,591 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 11 | 36,900 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 12 | 36,908 | 463,0869 | 463,08820 | 210 | 2,807 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 92: Χρωματογράφημα μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 93</u>: Φάσμα μαζών μονογαλοϋλογλυκοζίτη με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 94: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 95: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 96: Χρωματογράφημα Q1/Q2 με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 97: Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.11 Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 19, στο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου, θερμικά επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό, προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται το γαλλικό οξύ και

ακολουθούν το πρωτοκατεχικό οξύ, η κερκετίνη-3-Ο-γλυκουρονίδη και η κερκετίνη 3-Ογαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

| # | Rt | [M-H] ⁻ (П) | [M-H]⁻(Θ) | Fragmentor | Mass | <u>Ένωση</u> | <u>M.T</u> |
|----|--------|------------------------|-----------|------------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 11,945 | 169,0137 | 169,01425 | 150 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 2 | 11,954 | 169,0136 | 169,01425 | 170 | 3,85 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 3 | 11,962 | 169,0138 | 169,01425 | 190 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 4 | 11,971 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 5 | 15,189 | 169,0141 | 169,01425 | 150 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 15,198 | 169,0139 | 169,01425 | 170 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 15,206 | 169,0141 | 169,01425 | 190 | 0,887 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 15,215 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 9 | 17,487 | 153,0189 | 153,01933 | 150 | 2,81 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 10 | 17,496 | 153,0190 | 153,01933 | 170 | 2,16 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 11 | 17,504 | 153,0192 | 153,01933 | 190 | 0,85 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 12 | 17,513 | 153,0191 | 153,01933 | 210 | 1,5 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 13 | 35,397 | 169,0140 | 169,01425 | 150 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 14 | 35,406 | 169,0142 | 169,01425 | 170 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 15 | 35,414 | 169,0139 | 169,01425 | 190 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 16 | 35,423 | 169,0139 | 169,01425 | 210 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 17 | 36,614 | 477,0664 | 477,06747 | 150 | 2,24 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 18 | 36,622 | 477,0665 | 477,06747 | 170 | 2,03 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 19 | 36,631 | 477,0666 | 477,06747 | 190 | 1,82 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 20 | 36,639 | 477,0664 | 477,06747 | 210 | 2,24 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 21 | 36,884 | 463,0872 | 463,08820 | 150 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 22 | 36,893 | 463,0875 | 463,08820 | 170 | 1,51 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 23 | 36,901 | 463,0873 | 463,08820 | 190 | 1,943 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 24 | 36,910 | 463,0873 | 463,08820 | 210 | 1,943 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

<u>Πίνακας 19</u>: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό (Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry)

| 25 | 37,324 | 463,0872 | 463,08820 | 150 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 26 | 37,332 | 463,0873 | 463,08820 | 170 | 1,943 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 27 | 37,341 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 28 | 37,349 | 463,0876 | 463,08820 | 210 | 1,3 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 98: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 99: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 100: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 101: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 102: Χρωματογράφημα κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 103</u>: Φάσμα μαζών κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 104: Χρωματογράφημα Q_1/Q_2 με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 105:</u> Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.3.12 Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry με οξίνιση-HCOOH 1%

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 20, στο οξινισμένο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου, θερμικά επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό, προσδιορίζονται ποιότικά τα ακόλουθα φαινολικά συσταστικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται το γαλλικό οξύ και ακολουθούν το πρωτοκατεχικό οξύ, η κερκετίνη-3-Ο-γλυκουρονίδη και η κερκετίνη 3-Ογαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό).

Πίνακας 20: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του οξινισμένου υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου με ξήρανση σε φούρνο υπό κενό (Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry,με οξίνιση-HCOOH 1%)

| # | Rt | [M-H]⁻(Π) | [M-H]⁻(Θ) | Fragmentor | <u>Mass</u> | Ένωση | <u>M.T</u> |
|----|--------|-----------|-----------|------------|--------------|----------------------|-------------|
| | (min) | | | | <u>Error</u> | | |
| 1 | 11,945 | 169,0136 | 169,01425 | 150 | 3,85 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 2 | 11,954 | 169,0137 | 169,01425 | 170 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 3 | 11,962 | 169,0137 | 169,01425 | 190 | 3,25 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 4 | 11,970 | 169,0136 | 169,01425 | 210 | 3,85 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 5 | 15,189 | 169,0139 | 169,01425 | 150 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 6 | 15,198 | 169,0140 | 169,01425 | 170 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 7 | 15,215 | 169,0142 | 169,01425 | 210 | 0,295 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 8 | 17,453 | 153,0189 | 153,01933 | 150 | 2,81 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 10 | 17,462 | 153,0190 | 153,01933 | 170 | 2,16 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 10 | 17,470 | 153,0192 | 153,01933 | 190 | 0,85 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 11 | 17,479 | 153,0190 | 153,01933 | 210 | 2,16 | Πρωτοκατεχικό Οξύ | $C_7H_6O_4$ |
| 12 | 35,397 | 169,0138 | 169,01425 | 150 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 13 | 35,406 | 169,0138 | 169,01425 | 170 | 2,66 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |

| 14 | 35,414 | 169,0139 | 169,01425 | 190 | 2,070 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
|----|--------|----------|-----------|-----|-------|--------------------------------|----------------------|
| 15 | 35,423 | 169,0140 | 169,01425 | 210 | 1,479 | Γαλλικό Οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| 16 | 36,614 | 477,0663 | 477,06747 | 150 | 2,45 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 17 | 36,622 | 477,0667 | 477,06747 | 170 | 1,61 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 18 | 36,631 | 477,0663 | 477,06747 | 190 | 2,45 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 19 | 36,639 | 477,0663 | 477,06747 | 210 | 2,45 | Κερκετίνη-3-Ο- γλυκουρονίδη | $C_{21}H_{18}O_{13}$ |
| 20 | 36,884 | 463,0875 | 463,08820 | 150 | 1,51 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 21 | 36,893 | 463,0871 | 463,08820 | 170 | 2,38 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 22 | 36,901 | 463,0874 | 463,08820 | 190 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 23 | 36,910 | 463,0874 | 463,08820 | 210 | 1,727 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 24 | 37,290 | 463,0871 | 463,08820 | 150 | 2,38 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 25 | 37,298 | 463,0870 | 463,08820 | 170 | 2,591 | Q_1/Q_2 | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 26 | 37,307 | 463,0872 | 463,08820 | 190 | 2,16 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |
| 27 | 37,315 | 463,0875 | 463,08820 | 210 | 1,51 | Q ₁ /Q ₂ | $C_{21}H_{20}O_{12}$ |

 $^{1}Q_{1}$ = Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη), $^{2}Q_{2}$ = Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)



Εικόνα 106: Χρωματογράφημα γαλλικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF







Εικόνα 108: Χρωματογράφημα πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 109: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 110: Χρωματογράφημα κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF



<u>Εικόνα 111</u>: Φάσμα μαζών κερκετίνης-3-Ο-γλυκουρονίδης με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)



Εικόνα 112: Χρωματογράφημα Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF



Εικόνα 113: Φάσμα μαζών Q₁/Q₂ με ανάλυση LC-MS-QTOF (Fragmentor= 150.0 V)

5.4.4 Συζήτηση

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC-MS-QTOF) των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου, τα ακόλουθα φαινολικά συστατικά προσδιορίστηκαν ποιοτικά : γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), αιθυλ- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη, κερκετίνη 3-Ογλυκοζίτης, κερκετίνη, μονογαλοϋλογλυκοζίτης, πρωτοκατεχικό οξύ, κερκετίνη 3-Ογλυκουρονίδη. Όσον αφορά την συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την απόδοση των υδατικών εκχυλισμάτων, στα δύο πιο αποδοτικά εκχυλίσματα (P. hull water vacuum dry & P. hull water freeze dry) εκλούονται το γαλλικό οξύ και ακολουθούν το πρωτοκατεχικό οξύ, κερκετίνη-3-Ο-γλυκουρονίδη και κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη η και ŋ 0 μονογαλοϋλογλυκοζίτης, το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη, αντίστοιχα. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, αν και το εκχύλισμα του νωπού περικαρπίου φέρεται να έχει την υψηλότερη απόδοση, ποιοτικά ξεχωρίζει το οξινισμένο εκχύλισμα του λυοφιλιωμένου περικαρπίου, στο οποίο εκλούονται ο μονογαλοϋλογλυκοζίτης και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ) ή το Αιθυλ- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό) και τέλος, η κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη ή ο 3-Ο-γλυκοζίτης κερκετίνης (ενώσεις με ίδιο θεωρητικό αρνητικό ιονισμό). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα της ποιότικής ανάλυσης

επί των δειγμάτων επικυρώνονται από την διεθνή βιβλιογραφία. Πράγματι, το προφίλ των

φαινολικών ενώσεων στο περικάρπιο κελυφωτού εχει ήδη αναγνωριστεί από διάφορους συγγραφείς (Barreca et al., 2016, Seifzadeh et al., 2018, Grace et al., 2016) και μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κύριες ομάδες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες). Αξίζει να αναφερθεί οτι οι φαινολικές ενώσεις του PGH ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με την βοτανική ποικιλία, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, το στάδιο ωρίμανσης, τις καλλιεργητικές τεχνικές και τον τρόπο αποφλοίωσης και τη χημική σύσταση του διαλύτη εκχύλισης (Grace et al.,2016). Οι κυρίαρχες είναι το γαλλικό οξύ, η κερκετίνη-3-Ορουτινοσίδη, η φλωρογλυκινόλη, η κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη, η θεογαλλίνη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η λουτεολίνη και η πυραγαλλόλη (Barreca et al., 2016). Οι Seifzadeh et al. (2018) αναφέρουν ότι το γαλλικό οξύ είναι μία από τις κυριότερες φαινολικές ενώσεις του PGH και εντοπίζεται τόσο ελεύθερη όσο και ως μέρος υδρολυόμενων τανινών. Η κερκετίνη είναι ένα άλλο πολυφαινολικό φλαβονοειδές του PGH, με τους Barreca et al. (2016) να αναφέρουν ότι μεταξύ των φαινολικών ενώσεων του PGH, η κερκετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη έχει τη υψηλότερη συμμετοχή. Ωστόσο, οι Lalegani et al. (2018) διαπίστωσαν ότι η φλωρογλυκινόλη ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση στον ίδιο φυτικό ιστό, με τη φλωρογλυκινόλη να αποτελεί μια φυσική ένωση που περιέχει το 1,3,5-τριυδροξυ βενζόλιο, ως τη βασική ομάδα της. Τέλος, οι Tomaino et al. (2010) στην εργασία τους, επιβεβαιώνουν ότι το περικάρπιο περιέχει υψηλότερα επίπεδα φλαβονοειδών,φλαβονολών,ανθοκυανινών και πρωτοανθοκυανιδινών από ότι το σπέρμα.

5.5 Ανάλυση υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με φασματομετρία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis και οι περιοχές απορρόφησης τους αποτελούν ένα πρώτο scan των δειγμάτων για την επιβεβαίωση της παραλαβής των φαινολικών συστατικών από τα εκχυλίσματα περικαρπίου

5.5.1 Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis) της εταιρείας Agilent Technologies,μοντέλο Cary 60 UV-Vis και λογισμικό CaryWinUV 5.0 (Εικ. 114)
- Κυψελίδα χαλαζία



Εικόνα 114: Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

5.5.2 Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα αραιώθηκαν με τον αντίστοιχο διαλύτη, ώστε να έχουν συγκέντρωση 0,1 mg/mL (100 ppm). Αρχικά, μηδενίστηκε το όργανο με τη βοήθεια διαλύματος blank, που περιέχει τον εκάστοτε διαλύτη εκχύλισης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και μετά από κάθε μηδενισμό, καταγράφηκαν τα φάσματα UV-Vis των αντίστοιχων διαλυμάτων. Το εύρος φάσματος ορίστηκε στο διάστημα 800-200 nm, βάσει σχετικής βιβλιογραφίας.

5.5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis των διαφόρων φαινολικών ομάδων έχουν χαρακτηριστική δομή, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με την υποκατηγορία της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα UV-Vis των φλαβονοειδών εμφανίζουν τις δύο ζώνες απορρόφησης Ι και ΙΙ.

Η Ζώνη Ι βρίσκεται στην περιοχή απορρόφησης 300-370 nm και αντιστοιχεί στη δομή των δακτυλίων Β και C ενώ η ζώνη ΙΙ κυμαίνεται μεταξύ των 250-300 nm και οφείλεται στον Αδακτύλιο των φλαβονοειδών. Στα 260-280 nm απορροφούν και τα φαινολικά οξέα που ανήκουν στις μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις, ενω οι ανθοκυάνες παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 530 nm. Έτσι, η κάθε ομάδα ουσιών παρουσιάζει απορρόφηση σε συγκεκριμένη ζώνη. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού (100 ppm) φαίνεται στην Εικ. 115.

Τα αποτελέσματα έδειξαν απορρόφηση (Abs) στη περιοχή 260-280 nm. Βάσει της εργασίας των Barreca et al. (2016), στα 260 nm εντοπίζονται τα φαινολικά οξέα και οι φλαβόνες, στα 292 nm, οι φλαβανόνες και στα 370 nm, οι φλαβονόλες.



Εικόνα 115: Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis αιθανολικού εκχυλίσματος λυοφιλιωμένου περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού

5.6 Ανάλυση υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία FT-IR και τεχνική ATR

5.6.1 Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο Υπερύθρου Thermo Nicolet 7600 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) και λογισμικό OMNIC 7.3
- Υποδοχέας ATR με κρύσταλλο ZnSe τραπεζοειδούς σχήματος (800 x 10 x 4 mm)



Εικόνα 116: Σύστημα FT-IR & Υποδοχή με κρύσταλλο ZnSe

5.6.2 Πειραματική διαδικασία

Τα φάσματα FT-IR με την τεχνική ATR ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 7600 με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειϊκής τριγλυκίνης (DTGS). Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) για την καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων. Αρχικά, ο κρύσταλλος του υποδοχέα ZnSe καθαρίστηκε με ακετόνη, προτού χρησιμοποιηθεί. Η καθαρότητα της πλάκας επαληθεύτηκε καταγράφοντας ένα φάσμα μόνον του κρυστάλλου, το οποίο έπρεπε να παρουσιάζει μηδενική απορρόφηση, επειδή δεν περιείχε δείγμα. Ακολούθως 300μL από κάθε δείγμα συγκέντρωσης 15000 ppm τοποθετήθηκαν στον κρύσταλλο του ATR και έπειτα ο υποδοχέας ATR, για 2 min σε φούρνο στους 35 °C, δημιουργώντας μία ομοιόμορφη μεμβράνη επί του κρυστάλλου. Πριν από κάθε επανάληψη, γινόταν καθαρισμός του κρυστάλλου ATR με απιονισμένο νερό (πολικός διαλύτης). Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα και ανά πέντε φάσματα κάθε φορά,λαμβανόταν το υπόβαθρο (background). Τα φάσματα καταγράφηκαν με διαχωριστική ικανότητα 4 cm⁻¹ και 100 σαρώσεις. Η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν 0,6329 mm/s. Όλα τα φάσματα FT-IR που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν, έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων και κανονικοποιήθηκε η κλίμακας του λογισμικού OMNIC 7.3. Τέλος, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών φασμάτων κάθε δείγματος με χρήση του λογισμικού του οργάνου.

5.6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με FT-IR

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, μας απασχολεί η περιοχή MIR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που βρίσκεται μεταξύ 4000 και 400 cm⁻¹.

Η Εικόνα 117 απεικονίζει δύο αντιπροσωπευτικά φάσματα FT-IR υδατικού και αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού, με τις κυριότερες κορυφές σημειωμένες. Η αυξημένη απόδοση σε φαινολικά συστατικά στη περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος, σε σύγκριση με την αιθανόλη, επικυρώνεται και από τα προαναφερθέντα φάσματα. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο κυματαριθμό, που αποδίδεται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές των φαινολικών συστατικών (Πίνακας 21).

Αναλύοντας τον Πίνακα 21, σε σχέση με τα φάσματα των δειγμάτων, παρατηρήθηκαν ομοιότητες μεταξύ τους στις αντίστοιχες φασματικές περιοχές. Σύμφωνα με τους Akbari-Alavijeh et al., (2017) και Kazemi et al. (2018), η κορυφή στον κυματαριθμό 2924cm⁻¹ αποδίδεται σε δονήσεις τάσης και κάμψης αρωματικών και μη αρωματικών C-H και συσχετίζεται με σάκχαρα (γλυκοζίτες, γαλακτοζίτες), ξυλανών (Hesam et al.,2020) και λιπαρών οξέων (Βαλάση,2016). Η ασθενής ζώνη απορρόφησης στα 1561 cm⁻¹, αφορά τη δόνηση κάμψης του N-H (αμίδιο II) και συνδυαστικά, με την απορρόφηση στις κορυφές στα 1645 και 1393 cm⁻¹, επιβεβαιώνει τη παρουσία πρωτεϊνών στο περικάρπιο κελυφωτού φιστικιού (Akbari-Alavijeh et al., 2017, Hamed et al., 2020). Σε ξυλάνες, ακόμη, αποδίδονται απορροφήσεις με κορυφές στα 1645 cm⁻¹, τάση της ομάδας C=O (Hesam et al., 2020).

124

Στην ίδια περιοχή, απορροφά και το νερό (δόνηση κάμψης), καθώς και πρωτεϊνες (αμίδιο I). Στους κυματαριθμούς 1452 cm⁻¹ και 1379 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις κάμψης των –CH₂ & -CH₃ (Βαλάση, 2016). Οι απορροφήσεις στα 1452 cm⁻¹, 1312 cm⁻¹ και 1244 cm⁻¹ συνδέονται με τις δονήσεις κάμψης και απορρόφησης των C-O-H, C-H & -CH₂, ενώ οι Akbari-Alavijeh et al., (2017) αποδίδουν την απορρόφηση στα 1244 cm⁻¹, σε ημικυτταρίνες και η Βαλάση (2016), στη δόνηση τάσης C-O των εστέρων. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι εργασίες των Kazemi et al. (2018) & Hamed et al. (2020), όπου οι κορυφές μεταξύ των κυματαριθμών 1300-1000 cm⁻¹ συνδέονται με πολυσακχαρίτες και οι έντος απορροφήσεις στα 1019 cm⁻¹ και 1066 cm⁻¹, στις λειτουργικές ομάδας C-O, C-CH, C-C & O-CH. Οι ζώνες απορρόφησης στη περιοχή 1190-950 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις C-O & C-H, που προέρχονται από δεσμούς αλειφατικού –CH₂ & C-OH, ενω η περιοχή από 950 έως 710 cm⁻¹ αποτελεί τμήμα του δακτυλικού αποτυπώματος των πολυσακχαριτών (Hamed et al., 2020).



Εικόνα 117: Φάσμα FT-IR υδατικού (μπλέ) και αιθανολικού εκχυλίσματος (κόκκινου) λυοφιλιωμένου περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού

Πίνακας 21: Απορροφήσεις των κυριότερων κορυφών και οι αντίστοιχες αποδόσεις των φασμάτων FT-IR του εκχυλίσματος περικαρπίου

| <u>Κυματαριθμοί</u> | <u>Λειτουργική</u> | <u>Αποδόσεις</u> | <u>Τρόπος Δόνησης</u> | <u>Ένταση</u> |
|--------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| <u>(cm⁻¹)</u> | <u>Ομάδα</u> | | | |
| 2924,2852 | C-Η αλκανίων | Λιπίδια ή Σάκχαρα | Τάσης, Κάμψης | Πολυ |
| | | (γλυκοζίτες,γαλακτοζ | | υψηλές |

| | | ίτες) | | |
|------|-----------------------------------------|--------------------|---------------------|---------|
| 1691 | C=0 | Αλδεϋδες,Κετόνες, | Τάσης | Υψηλή |
| | | Καρβοξυλικά Οξέα | | |
| 1645 | C=0,-CO0 ⁻ | Μη εστεροποιημένες | Ασύμμετρης Τάσης | Υψηλή |
| | | πηκτίνες,δεσμοί | | |
| | | εστέρα | | |
| | | τριγλυκεριδίων, | | |
| | | πρωτεϊνες,νερό | | |
| 1603 | C=C,-NH ₂ | Κινόλες,Αμινοξέα | Τάσης | Υψηλή |
| 1561 | N-H | Πρωτεϊνες | Κάμψης | Μέτρια- |
| | | | | Υψηλή |
| 1452 | C=C αρωμ. | Αμίνες,Αρωματικός | Τάσης,Κάμψης | Υψηλή |
| | δακτυλίου,-NH ₂ , | δακτύλιος | | |
| | C-N,-CH ₂ , -CH ₃ | | | |
| 1392 | C-H | Σάκχαρα,Αλδεΰδες, | Κάμψης | Μέτρια |
| | | Κετόνες | | |
| 1379 | C-Ο (οξύ ή | Μέθυλο-,Αίθυλ- | Συμμετρική δόνηση | Μέτρια- |
| | εστέρας), -CH₃, | εστέρες,Σάκχαρα | τάσης, παραμόρφωσης | Υψηλή |
| | -OCH ₃ | | | |
| 1312 | C-O (οξύ ή | Μέθυλο-,Αίθυλ- | Συμμετρική δόνηση | Μέτρια- |
| | εστέρας), -CH3,- | εστέρες,Σάκχαρα | τάσης,παραμόρφωσης | Υψηλή |
| | OCH ₃ | · / | . / | |
| 1244 | -OCH ₃ , -C-O | Δευτεροταγείς | Δόνηση | Υψηλη |
| | -CH ₂ =CH-O | αλκοολες,Σακχαρα | παραμορφωσης | |
| | | | οευτεροταγων | |
| | | | αλκοολων σε | |
| | | | δυνουασμο με | |
| | | | $-CH^{-}$ | |
| 121/ | -0646-0 | Δευτεροταγείς | Δόνηση | νιμηλή |
| 1214 | -CH_=CH_O | αλκοόλες Σάκναρα | παραμόρφωσης | ψηλη |
| | | αλκουλες,Ζακχαρα | λαμαμορφωσης | |
| | | | αλκοολών | |
| | | | ດມູນຄົມດອບດ່ | |
| | | | με | |

| | | | δονήσεις | –CH- |
|------|-------------------------|---------------------|-----------------|---------|
| | | | ,ασύμμετρη τάση | C-O-C |
| 1071 | С-О,С-О-С | Πολυσακχαρίτες | Κάμψεις | Υψηλή |
| 1066 | -NH ₂ ,-C-OH | Δευτεροταγείς | Δόνηση Κάμψης | Μέτρια- |
| | | αλειφατικές | | Υψηλή |
| | | αμίνες,αλκόολες,σάκ | | |
| | | χαρα | | |
| 952 | С-О,С-Н | Αλειφατικές C-H,O-H | Τάση,Κάμψη | Μέτρια |
| | | φαινολών | | |
| 822 | C-Η αλκανίων | Πολυσακχαρίτες | Τάση,Κάμψη | Μέτρια |
| 714 | C=C | Πολυσακχαρίτες | Τάση,Κάμψη | Μέτρια |

5.7 Ανάλυση υδραλκοολικών εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία RAMAN

5.7.1 Οργανολογία

- Φασματοφωτόμετρο Vis-Raman (768 nm)
- Γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος -υποδοχέας δείγματος



Εικόνα 118: Φασματοφωτόμετρο Vis-Raman & Γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος - υποδοχέας δείγματος

5.7.2 Πειραματική διαδικασία

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Vis-Raman (πηγή μήκους κύματος τα 768 nm) της εταιρείας DeltaNU, συνοδευόμενο από το λογισμικό NuSpec. Σε γυάλινο τριχοειδή σωληνίσκο τύπου τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος. Τα φάσματα καταγράφηκαν με το πρόγραμμα NuSpec (10 φάσματα σε χρόνο 10 s). Στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με το λογισμικό OMNIC 7.3. Όλα τα φάσματα που ελήφθησαν,

εξομαλύνθηκαν, έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων και κανονικοποιήθηκε η κλίμακα τους. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών «αυτόματης εξομάλυνσης», «αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής» και «κανονικοποίησης της κλίμακας» του λογισμικού OMNIC 7.3. Τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος τριών φασμάτων για κάθε δείγμα με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3.

5.7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση ανάλυσης εκχυλισμάτων περικαρπίου με Raman

Στην Εικόνα 119, διακρίνεται αντιπροσωπευτικό φάσμα Raman αιθανολικού εκχυλίσματος περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού. Στον Πίνακα 22, παρουσιάζονται οι κυριότερες κορυφές των φασματων Raman του εκχυλίσματος περικαρπίου, καθώς και οι αντίστοιχες αποδόσεις.

Πίνακας 22: Απορροφήσεις των κυριότερων κορυφών και οι αντίστοιχες αποδόσεις των φασμάτων Raman του εκχυλίσματος περικαρπίου

| <u>Κυματαριθμοί</u> | <u>Λειτουργική</u> | <u>Αποδόσεις</u> | <u>Τρόπος Δόνησης</u> | <u>Ένταση</u> |
|--------------------------|--------------------------|------------------|------------------------|---------------|
| <u>(cm⁻¹)</u> | <u>Ομάδα</u> | | | |
| 1451 | C=C –CH ₂ , - | Ακόρεστες | Τάσης,Κάμψης | Χαμηλή |
| | CH₃ | Ενώσεις | | |
| 1157 | -CH ₂ | Αλκάνια | Κλυδωνισμού,Στρέβλωσης | Χαμηλή |
| | | (πολυσακχαρίτες) | | |
| 1111 | C-C | Αλκάνια | Κλυδωνισμού,Στρέβλωσης | Χαμηλή |
| | | (πολυσακχαρίτες) | | |
| 1036 | C-H | Σάκχαρα | Παραμόρφωση εντός | Υψηλή |
| | | | επιπέδου | |

Αναλύοντας τον Πίνακα 22, οι κορυφές στα 1157 cm⁻¹ και στα 1111 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις των –CH₂ και C-C, αντίστοιχα, των πολυσακχαριτών, επιβεβαιώνοντας τις χαρακτηριστικές κορυφές του σκελετού των μορίων. Επιπρόσθετα, η απορρόφηση,υψηλής έντασης, στα 1036 cm⁻¹, σχετίζεται με τη παραμόρφωση C-H των πολυσακχαριτών (Hasem et al., 2020). Η κορυφή στα 1451 cm⁻¹, αν και κατέχει χαμηλή ένταση στο φάσμα Raman, βρέθηκε υψηλή στο φάσμα IR, γεγονός, που επιβεβαιώνει ότι η φασματοσκοπία IR, παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για την καλύτερη ανίχνευση και χαρακτηρισμό του δείγματος-στόχου. Πράγματι, συνδυάζοντας τις δύο τεχνικές, αποσαφηνίζονται τόσο οι χαρακτηριστικές ομάδες, όσο και η δομή των σκελετών των μορίων του περικαρπίου, το οποίο αποτελείται, κυρίως, από πολυσακχαρίτες (Hamed et al., 2020).





5.8 Αντιμικροβιολογική δράση

Τα έξι εκχυλίσματα, με παράγοντα διαφοροποίησης,τον τύπο διαλύτη (HPLC Water & βιομηχανική EtOH) και τον τύπο επεξεργασίας (λυοφιλίωση, ξήρανση σε φούρνο κενού & συντήρηση φρέσκου περικαρπίου στους -20 °C) μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι τροφιμογενών βακτηρίων (+) και (-) Gram βακτηρίων. Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζωμό (Broth Micro Dilution Method) και στη συνέχεια, ο υπολογισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC). Η μικροαραίωση σε ζωμό είναι μια από τις πιο βασικές μεθόδους δοκιμής της ευαισθησίας κατά των μικροοργανισμών, με κύρια πλεονεκτήματα την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, την οικονομία των αντιδραστηρίων αλλά και την οικονομία χώρου.

5.8.1 Αναλώσιμα υλικά

Ορεπτικά υποστρώματα

- Tryptone Soy Broth (15 g/500 mL απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Tryptone Soy Broth Double Strength (15 g/250 mL απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Σωληνάκια με 10 mL Tryptone Soy Broth
- Tryptone Soy Agar για streaking & spreading

Αραιωτικά υγρά

- Ringer Solution (2 ταμπλέτες/1 L απιονισμένο νερό)
- Σωληνάκια με 9 mL Ringer

5.8.2 Μικροβιακά στελέχη

Κατόπιν καλλιέργειας και οπτικού ελέγχου της ζωτικότητας τους, επιλέχθηκαν τα συνήθη στο φυτικό βασίλειο (+) κατά Gram στελέχη βακτηρίων: *Staphylococcus aureus* 134 & *Bacilus subtilis* B109 και τα (-) κατά Gram στελέχη βακτηρίων: *E.Coli* B16 & *Pseudomonas fluorescens* B29.

Πίνακας 23: Τα μικροβιακά στελέχη υπό μελέτη

| <u>(+) κατά Gram</u> | <u>(-) κατά Gram</u> |
|---------------------------|-----------------------------|
| Staphylococcus aureus 134 | <u>E.Coli B16</u> |
| Bacilus subtilis B109 | Pseudomonas fluorescens B29 |



Εικόνα 120: Streaking για έλεγχο ζωτικότητας *E.coli* B 16

Τα μικροβιακά στελέχη προέρχονται από τη συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών, που διατηρεί το EMBT. Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20 °C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

5.8.3 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία, που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί, που διενεργήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν, σε κάθε περίπτωση, υπό ασηπτικές συνθήκες ενώ για λόγους καθαρά επαναληψιμότητας πραγματοποιείται πάντα διπλή επανάληψη.

5.8.3.1 Ανανέωση μικροοργανισμών

Προετοιμασία εμβολίων

Η ανανέωση των μικροοργανισμών μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό τους σε κάποιο υπόστρωμα (στο συγκεκριμένο πείραμα, σε TSB) και διαρκεί 18 -24 ώρες, με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37 °C. Πριν τον ενοφθαλμισμό γίνονται πάντα δύο ανανεώσεις προς επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων από πλευράς ζωτικότητας. Πιο αναλυτικά, για τη προετοιμασία και τον καθαρισμό των εμβολίων

| | | / / . | | | <u>^</u> | |
|------------------------|---------------------|---------------|----------------|-------------|---------------|---------|
| ΠΙνακας 24: Θεά | ομοκοασια και | γρονος επωρ | ισης νια την ά | αναπτυεη κα | ίθε πικυσούλο | ινισμου |
| | promp are real mare | Λροιος οι τωσ | | | | |

| <u>Μικροοργανισμοί</u> | Θερμοκρασία Επώασης | Χρόνος Επώσης |
|-----------------------------|---------------------|---------------|
| | <u>(°C)</u> | |
| E.Coli B16 | 37 | 24 |
| Pseudomonas fluorescens B29 | 25 | 48 |
| Staphylococcus aureus 134 | 37 | 24 |
| Bacilus subtilis B109 | 30-35 | 24-48 |

Έγιναν δύο διαδοχικές ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):

Η πρώτη περιλάμβανε λήψη 100 μL κυττάρων από το stock και την προσθήκη τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στις κατάλληλες συνθήκες και τους κατάλληλους χρόνους ανάπτυξης για τον εκάστοτε μικροοργανισμό. Παράλληλα, έγινε χρήση της τεχνικής της γραμμικής επίστρωσης σε τριβλία με TSA, με 2 επαναλήψεις/μικροοργανισμό, με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών του βακτηρίου και επώαση, στις ίδιες συνθήκες με τα σωληνάκια της 1ης ανανέωσης. Μετά την 1η ανανέωση, ο αριθμός των κυττάρων του μικροργανισμών αναμένεται στα 10⁸ με 10⁹ CFU/mL. Η δεύτερη ανανέωση περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18-24 ώρες. Μετά την 2η ανανέωση, ο αριθμός των κυττάρων του μικοοργανισμού αναμένεται στα 10⁷ με 10⁶ CFU/mL. Για τον καθαρισμό του εμβολίου έγινε φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 min στους 4 °C και στην συνέχεια, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 mL ισοτονικού δ/τος ¼ strength Ringer's solution (2 φορές). Ο καθαρισμός του εμβολίου είχε ως σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών μεταβολιτών που υφίστανται στο μέσο. Βάσει βιβλιογραφίας (Rajaei et al., 2010), θα γίνει ενοφθαλμισμός με 10 μL από το stock του μ.ο με 10^4 CFU/mL σε υπόστρωμα TSB. Επομένως, μετά την 2η ανανέωση (10^7 με 10^6 CFU/mL), ακολουθούν δύο με τρεις διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να καταλήξουμε στον ζητούμενο αριθμό αποικιών/mL (10^4 CFU/mL). Η επιβεβαίωση της συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου γινόταν με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία TSA.



Εικόνα 121: 1^η Ανανέωση μικροοργανισμών υπό μελέτη

5.8.3.2 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Αρχικά, στο αποστειρωμένο falcon με το καθαρό πλεόν εμβόλιο, προστίθενται 10 mL Ringer solution και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια, διενεργούνται οι διαδοχικές αραιώσεις με τη μεταφορά 1 mL αναδευμένου περιεχομένου κυττάρων του μικοοργανισμού και Ringer σε νέα σωληνάκια των 9 mL Ringer. Τέλος, πραγματοποιείται δειγματοληψία των διαδοχικών αραιώσεων του τελικού εμβολίου (μηδενική αραίωση, αραίωση -1, αραίωση -2, αραίωση -3) σε νέα σωληνάκια των 9 mL Ringer για την εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού του εκάστοτε μικροοργανισμού, με την τεχνική της επίστρωσης (spread plating) σε τριβλία υποστρώματος TSA και την επώαση αυτών, στους 37 °C, για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, γίνεται η καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών.

5.8.3.3 Μέθοδος μικροαραίωσης (Micro-Dilution)

Έχοντας έτοιμο σε stock το εμβόλιο του εκάστοτε μ.ο με 10⁴ CFU/mL, σειρά έχουν η προετοιμασία των βοθρίων του εκάστοτε microplate, με την πλήρωση όλων τους με

υπόστρωμα TSB (Vτελ=150 μL) και ο ενοφθαλμισμός των βοθρίων των σειρών A-G, με 10 μL από το προαναφερθέν stock του μικροοργανισμού (Εικ. 122). Στα έξι βοθρία των αιθανολικών εκχυλισμάτων της σειράς G θα προστεθεί επιπρόσθετα x μL αιθανόλη,ώστε να αποσαφηνιστεί η βακτηριοστατική δράση συγκεκριμένου διαλύτη, σε μια προτεινόμενη αναλογία 2 (100 μL υπόστρωμα TSB): 1 (50 μL αιθανόλη). Ο σχεδιασμός των βοθρίων ανα μικροοργανισμό και εκχύλισμα αναφέρεται αναλυτικά στην Εικ. 123. Η τελευταία σειρά H αποτελεί το background noise, μιας και φέρει μόνο υπόστρωμα TSB. Το αρχικό διάλυμα (mother solution) του εκάστοτε εκχυλίσματος,συγκέντρωσης 10 mg/mL και τελικού όγκου 5 mL συνίσταται από 330 μL εκχυλίσματος,συγκέντρωσης 15 mg/mL και 170 μL TSB Double Strength (TSB DS) και αποθηκεύεται σε αποστειρωμένα falcon των 15 mL, στους 4 °C, για περαιτέρω χρήση. Οι συγκεντρώσεις αυτές προέκυψαν έπειτα από έναν συνδυασμό βιβλιογραφίας και προσαρμογής αυτής,σε ένα προκαταρκτικό πείραμα στα κύτταρα του *B. Subtilis*.

Πίνακας 25: Κωδικοποίηση εκχυλισμάτων περικαρπίου P.vera L.

| <u>Εκχύλισμα</u> | <u>Κωδικός</u> |
|--------------------------------------|----------------|
| Pistachio Hull Raw Water HPLC | P.h.rW |
| Pistachio Hull Vacuum Dry Water HPLC | P.h.v.dW |
| Pistachio Hull Freeze Dry Water HPLC | P.h.f.d-W |
| Pistachio Hull Raw EtOH | P.h.rE |
| Pistachio Hull Vacuum Dry EtOH | P.h.v.dE |
| Pistachio Hull Freeze Dry EtOH | P.h.f.d-E |



Εικόνα 122: Πλήρωση βοθρίων με υπόστρωμα TSB και χρήση πολυπιπέτας

Τα αποτελέσματα υποδήλωνουν ότι οι συγκεντρώσεις 10-5 mg/mL, σε όλα τα εκχυλίσματα εξίσου, είναι ήδη αρκετά υψηλές-πυκνές και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των αποικιών.

| Extract | | P.h.rW P.h.v-d-W | | P.h.f-d-W | | P.h.rE | | P.h.v-d-E | | P.h.f-d-E | | | |
|---------|---|-------------------------------|-------------|------------|-----|--------|---|-----------|---|-----------|----|----|------------|
| mg/ml | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 5 | A | 10^4CFU/ml + 5mg/ml εκχύλισμα | | | | | | | | | | | |
| 2,5 | В | 10^4CFU/r | nl + 2,5mg/ | ml εκχύλια | τμα | | | | | | | | |
| 1,25 | c | | | | | | | | | | | | |
| 0,625 | D | | | | | | | | | | | | |
| 0,3125 | E | | | | | | | | | | | | |
| 0,15625 | F | | | | | | | | | | | | 10^4CFU/ml |
| 0 | G | Control | | | | | | | | | | | 10^4CFU/ml |
| 0 | н | | | | | | | | | | | | blank |

Εικόνα 123: Σχεδιασμός microplate ανά μικροοργανισμό

Επομένως, συγκέντρωση εκκίνησης είναι τα 5 mg/mL για τις 6 διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις. Η πυκνότητα του υποστρώματος TSB DS αποσκοπεί σε μια αποτελεσματική/λειτουργική αναλογία εκχυλίσματος-υποστρώματος. Να σημειωθεί ότι και στα τρία υδατικά εκχυλίσματα, παρά τη διαύγεια τους, είχαν δημιουργηθεί ιζήματα. Βάσει οπτικής παρατήρησης και κατόπιν, ανάδευσης, κρίθηκε σκόπιμη η χρήση μικροφίλτρων στη περίπτωση και των τριών αιθανολικών εκχυλισμάτων, αλλά και του υδατικού εκχυλίσματος του νωπού περικαρπίου (Εικ. 124).



Εικόνα 124: Υδατικά και Αιθανολικά Εκχυλίσματα

Στόχος ήταν, να καταστούν τα εκχυλίσματα, πιο διαυγή και άνευ συσσωματωμάτων, ώστε να μπορέσει να γίνει σωστά η ανάλυση στο Microplate reader (Εικ. 125).



Εικόνα 125: Φωτόμετρο SynergyHT–Multimode Microplate reader της εταιρίας Biotek

Στη συνέχεια, με ρυθμιζόμενη πιπέτα (100-1000 μL), μεταφέρονται 150 μL από το αρχικό διάλυμα (mother solution) του εκάστοτε εκχυλίσματος, συγκέντρωσης 10 mg/mL στα αντίστοιχα δύο βοθρία της σειράς Α. Κάθε εκχύλισμα έχει δύο επαναλήψεις.

Με τη χρήση πολυπίπετας και δουλεύοντας κάθετα, διενεργούνται διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις,πληρώνοντας και τα 12 βοθρία κάθε σειράς,μέχρι και την σειρά F.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση στο Microplate reader (OD στα 610 nm) για 24 ώρες επώασης στην optimum θερμοκρασία για τον εκάστοτε μικροοργανισμό.

Έπειτα, ακολούθησε τεχνική επιφανειακής επίστρωσης σε τριβλία υποστρώματος TSA, με 1 επανάληψη ανά βοθρίο, από όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του εκάστοτε μικροοργανισμού, εξαιρουμένων των σειρών G (control) και H (blank) και την επώαση αυτών, στις κατάλληλες συνθήκες και τους κατάλληλους χρόνους για τον κάθε μικροοργανισμό.

5.8.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από τα φυτά,ως απόκριση μικροβιακής μόλυνσης,επομένως δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι είναι αποτελεσματικές αντιμικροβιακές ουσίες έναντι ευρέως φάσματος βακτηρίων.

Η αντιμικροβιακή δράση μιας ουσίας διακρίνεται σε αυτή που προκαλεί:

Α) Αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών (βακτηριοστατική, μυκοστατική, ή γενικώς μικροβιοστατική δράση),δηλαδή σταματάει την περαιτέρω αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών χωρίς να προκαλεί ουσιαστική μείωση στον πληθυσμό τους. Αυτό μπορεί να συμβεί π.χ. λόγω αναστολής της δράσης σημαντικών ενζύμων του μεταβολισμο.

B) Καταστροφή (θανάτωση) των μικροοργανισμών (βακτηριοκτόνος, μυκητοκτόνος, ή γενικώς μικροβιοκτόνος δράση), δηλαδή προκαλείται δραστική μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών, π.χ. λόγω διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης ή καταστροφής του

γενετικού υλικο. Κάποιες ουσίες προκαλούν μόνο αναστολή και κάποιες απευθείας καταστροφή των κυττάρων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η αντιμικροβιακή δράση ξεκινάει με αναστολή σε χαμηλές συγκεντρώσεις,με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση να ορίζεται ως Minimum Inhibitory Concentration (MIC) και εξελίσσεται σε θανάτωση σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου κελυφωτού, έναντι Gram (-) παθογόνων και Gram (+) παθογόνων,με τη μέθοδο της μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζωμό (Broth Micro Dilution Method) και της απαρίθμησης του μικροβιακού φορτίου του εκάστοτε μικροοργανισμού, βάσει της οπτικής απορρόφησης. Στη συνέχεια,πραγματοποιείται ο υπολογισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC). Η χρήση των αιθανολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου In vitro,στην αυτούσια μορφή τους, για την εξέταση της αντιμικροβιακής τους δράσης δεν λήφθηκε υπόψιν και δεν συμπεριλήφθηκε στα τελικά αποτελέσματα,δεδομένου ότι η αιθανόλη έδρασε βακτηριοστατικά έναντι τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά Gram Περαιτέρω επεξεργασία των συγκεκριμένων μεταχειρήσεων, βακτηρίων. όπως συμπύκνωση της αιθανόλης σε γνωστές συγκεντρώσεις, και η επαναδιαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων, θα μπορούσε να συμβάλλει στην απενεργοποίηση της δράσης της αιθανόλης από τα παραγόμενα αποτελέσματα και θα ληφθεί υπόψιν για μελλοντικές πειραματικές διαδικασίες.

5.8.4.1 Bacillus subtilis

Όπως παρατηρείται στα ακόλουθα διαγράμματα (Εικόνες 126-128), τα υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου γνωστών συγκεντρώσεων (5 mg/mL, 2,5 mg/mL & 1,25 mg/mL), σε όλες τις μεταχειρίσεις τους, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *Bacillus subtilis*. Στη συνέχεια, παρατηρείται ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis* στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 0,625 mg/mL (Εικ. 129), για τις μεταχειρίσεις υδατικού εκχυλίσματος νωπού περικαρπίου (PhR H₂0_1) και υδατικού εκχυλίσματος σε φούρνο υπό κενό (PhV H₂0_2). Στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, η συγκέντρωση 0,625 mg/mL εξακολουθεί να δρα παρεμποδιστικά. Στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων 0,3125 mg/mL και 0,15625 mg/mL (Εικ. 130-131), σε όλες τις μεταχειρίσεις, εκτός της PhF H₂0_2, διακρίνεται ανάπτυξη του βακτηρίου, ενω ο μάρτυρας επιβεβαιώνει την ανάπτυξη του βάκιλλου (Εικ. 132).



Εικόνα 126: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 5 mg/mL



Εικόνα 127: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 2,5 mg/mL

Η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τη μεταχείριση PhR H₂O, που προκάλεσε παρεμπόδιση του συγκεκριμένου στελέχους, υπολογίστηκε, στα 754,62 mg/L. Για τη μεταχείριση PhV H₂O, στα 700,57 mg/L και για την PhF H2O, στα 573,82 mg/L. Όσον αφορά την μη ανασταλτική συγκέντρωση (NIC), αυτή υπολογίστηκε αντίστοιχα, για το υδατικό εκχύλισμα του νωπού περικαρπίου στα 135,47 mg/L, του επεξεργασμένου σε φούρνο υπό κενό, στα 188,65 mg/L και τέλος, για το λυοφιλιωμένο υδατικό εκχύλισμα, στα 264,70 mg/L.



Εικόνα 128: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1,25 mg/mL



<u>Εικόνα 129</u>: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,625 mg/mL



Εικόνα 130: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,3125 mg/mL



Εικόνα 131: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,15625 mg/mL



Εικόνα 132: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis,* βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)

5.8.4.2 Escherichia coli

Όπως παρατηρείται στα ακόλουθα διαγράμματα (Εικ. 133-135), τα υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου γνωστών συγκεντρώσεων (5 mg/mL, 2,5 mg/mL & 1,25 mg/mL), σε όλες τις μεταχειρίσεις τους, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *Escherichia coli*. Στη συνέχεια, στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL και 0,15625 mg/mL (Εικ. 136-138), σε όλες τις μεταχειρίσεις, διακρίνεται ανάπτυξη του βακτηρίου, ενω ο μάρτυρας επιβεβαιώνει την ανάπτυξη της *Escherichia coli* (Εικ. 139). Η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τη μεταχείριση PhR H₂O, που προκάλεσε παρεμπόδιση της *Escherichia coli*, υπολογίστηκε,στα 1017,31 mg/L. Για τη μεταχείριση PhV H₂O, στα 1088,18 mg/L και για την PhF H₂O, στα 957,60 mg/L. Όσον αφορά την μη ανασταλτική συγκέντρωση (NIC), αυτή υπολογίστηκε αντίστοιχα, για το υδατικό εκχύλισμα, σε νωπή μορφή, στα 392,31 mg/L, σε ξήρανση υπό κενό, στα 264,62 mg/L και τέλος, για το λυοφιλιωμένο υδατικό εκχύλισμα, στα 428,94 mg/L.



<u>Εικόνα 133:</u> Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 5 mg/mL



Εικόνα 134: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 2,5 mg/mL



Εικόνα 135: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1,25 mg/mL



Εικόνα 136: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,625 mg/mL



Εικόνα 137: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,3125 mg/mL



Εικόνα 138: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,15625 mg/mL



Εικόνα 139: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *Ε. Coli,* βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)

5.8.4.3 Staphylococcus aureus

Όπως παρατηρείται στα ακόλουθα διαγράμματα (Εικ. 140-142), τα υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου γνωστών συγκεντρώσεων (5 mg/mL, 2,5 mg/mL & 1,25 mg/mL), σε όλες τις μεταχειρίσεις τους, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του Staphylococcus aureus. Στη συνέχεια, παρατηρείται ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου του Staphylococcus aureus, στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 0,625 mg/mL (Εικ. 143), για τις μεταχειρίσεις υδατικού εκχυλίσματος νωπού περικαρπίου (PhR H₂0_1 και PhR H₂0_2) και υδατικού εκχυλίσματος σε φούρνο υπό κενό (PhV H₂0_2). Στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις των εκχυλισμάτων 0,3125 mg/mL εξακολουθεί να δρα παρεμποδιστικά. Στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων 0,3125 mg/mL και 0,15625 mg/mL (Εικ. 144-145), διακρίνεται ανάπτυξη του βακτηρίου, ενω ο μάρτυρας επιβεβαιώνει την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου (Εικ. 146).

Τέλος, ερμηνεύοντας τις καμπύλες ανάπτυξης του συγκεκριμένου στελέχους του σταφυλόκοκκου, η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τις μεταχειρίσεις PhR H₂O και PhV H₂O, εντοπίζεται στο εξής εύρος συγκεντρώσεων 625 mg/L<MIC< 1250 mg/L. Ενώ για το PhF H₂O, στα 312 mg/L<MIC< 625 mg/L. Όσον αφορά την μη ανασταλτική συγκέντρωση (NIC), αυτή εντοπίζεται για όλες στις μεταχειρίσεις, στο εύρος 0<NIC<156 mg/L.


Εικόνα 140: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 5 mg/mL



Εικόνα 141: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 2,5 mg/mL



Εικόνα 142: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 1,25 mg/mL



Εικόνα 143: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,625 mg/mL



Εικόνα 144: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus*, βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,3125 mg/mL



<u>Εικόνα 145</u>: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus,* βάσει της οπτικής απορρόφησης, σε εκχυλίσματα περικαρπίου, συγκέντρωσης 0,15625 mg/mL



Εικόνα 146: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *S. aureus,* βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)

5.8.4.4 Pseudomonas fluorescens

Στη περίπτωση της *Pseudomonas fluorescens*, ο μάρτυρας (Εικ. 147) επιβεβαιώνει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν αναπτύχθηκε. Επομένως, δεν κατέστη δυνατή η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων. Ενδεχομένως, συνέβη κάποιο λάθος κατά την αναζωογόνηση του μικροοργανισμού ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού.



Εικόνα 147: Καμπύλη ανάπτυξης και απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου του *P. fluorescens,* βάσει της οπτικής απορρόφησης (μάρτυρας)

5.8.5 Συζήτηση

Με βάση τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου, τα θετικά κατά Gram βακτήρια (B. subtilis & St. aureus) επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία, με την ανάπτυξη τους να αναστέλλεται, λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων επί της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, συγκριτικά με την Escherichia coli. Πράγματι, ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τη σχέση δομής-δράσης και επίδρασης των φλαβονοειδών (π.χ. φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες και κατεχίνες) στη σύνθεση του DNA και RNA, αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Ορισμένες φλαβονόλες (π.χ. μυρικετίνη) έχουν πιο αποτελεσματική αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τις φλαβανόνες και φλαβανόλες, ενω για την αντιμικροβιακή δράση είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός 3',4',5'-τριυδρόξυ Β δακτυλίου και μίας ελεύθερης 3υδροξυλομάδας (Wink et al., 2010). Γενικά, τα αρνητικά βακτήρια κατά Gram είναι πιο ανθεκτικά στις πολυφαινόλες σε σύγκριση με τα θετικά κατά Gram, ενδεχομένως λόγω της διαφορετικής σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος (Negi et al., 2003). Βιβλιογραφικά, στο εκχύλισμα του περικαρπίου, το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη, δύο από τις κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτό, φέρονται να προκαλούν την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής και εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης (Simoes et al., 2009). Οι Rajaei et al.(2010) αξιολόγησαν στην εργασία τους την in vitro αντιμικροβιακή δράση υδατικών ακατέργαστων (crude) και καθαρισμένων (purified) εκχυλισμάτων PGH έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των B. cereus, S. aureus, P. aeruginosa, E.coli, C. albicans, S. thayphi, και N. intermedia. Διαπίστωσαν ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία, με την ανάπτυξη τους να αναστέλλεται, λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων επί της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος. Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο μεταχειρίσεις των εκχυλισμάτων περικαρπίου ενδέχεται να αναστείλουν την ανάπτυξη του B.cereus και του S. aureus, με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των υδατικών ακατέργαστων εκχυλισμάτων έναντι των Β. cereus και S. aureus να υπολογίζεται αντίστοιχα στα 1,0 και 2,0 mg / mL, καταστώντας τον B. Cereus, πιο ευαίσθητο μικροοργανισμό σε σύγκριση με τον S. aureus. Στα καθαρισμένα υδατικά εκχυλίσματα, και για τα δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 0,5 mg/mL. Αυτά τα αποτελέσματα είναι πολύ σημαντικά, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι B. cereus και S. aureus παράγουν εντεροτοξίνες,οι οποίες προκαλούν γαστρεντερίτιδα, μια πολυ σημαντική τροφική ασθένεια στις περισσότερες χώρες (Oliveira et al., 2008). Επιπρόσθετα, οι Sadeghinejad et al. (2019)

149

επιβεβαιώνουν την αντιμικροβιακή δράση του λυοφιλιωμένου υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου έναντι του *S. aureus.*

5.9 Μετασυλλεκτική Χρήση

Η διερεύνηση της επίδρασης των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων του περικαρπίου κελυφωτού φιστικιού επί της φυσιολογίας ελάχιστα μεταποιημένων φυτικών ιστών, είχε ως στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης και τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Δεδομένου ότι ο όγκος εργασίας και ο αριθμός των δειγμάτων έπρεπε να περιοριστεί, λόγω των ευαλλοίωτων φρεσκοκκομένων λαχανικών, επιλέχθηκε, εκ των τριών εκχυλισμάτων του περικαρπίου, αυτή του λυοφιλιωμένου φυτικού ιστού, με διαλύτη εκχύλισης, νερό και αιθανόλη (Pistachio Hull Freeze Dry HPLC Water & Pistachio Hull Freeze Dry EtOH).

5.9.1 Εκχύλιση με Υπερήχους

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η εκχύλιση των λυοφιλιωμένων περικαρπίων κελυφωτού φιστικιού *P.vera* L., πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 35 KHz (Ultrasound Assisted Extraction-UAE), στους 25° C για 30 min, με αναλογία δείγματος προς διαλύτη, 1:50. Κατόπιν, έγινε διπλή διήθηση στα εκχυλίσματα. Στη συνέχεια, τα υδατικά εκχυλίσματα λυοφιλιώθηκαν και τα αιθανολικά εκχυλίσματα, συμπυκνώθηκαν σε Rotary Evaporator, για να επαναδιαλυτοποιηθούν με H₂O, με σταθερή συγκέντρωση (15000 ppm) και τελικό όγκο 3 L, για λόγους ασφαλείας. Τα συγκεκριμένα πυκνά διαλύματα αποτελούν τα stock διαλύματα, τα οποία αποτέλεσαν τη βάση, για τη σύνθεση των διαλυμάτων εργασίας, τελικής συγκέντρωσης 10 mg/mL, 5 mg/mL και 1 mg/mL. Οι συγκεντρώσεις αυτές, προήλθαν από τον σχεδιασμό του πειράματος της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων περικαρπίου, ώστε να υπάρχει μια σύνδεση στη χρήση των εκχυλισμάτων. Λόγω των ιδιοτήτων της αιθανόλης, όσον αφορά την αλλοίωση στη φυσιολογία του φυτικού ιστού, προσδιορίζεται ο όγκος της στο αιθανολικό εκχύλισμα εργασίας, ώστε να περιοριστεί η δράση της. Πιο συγκεκριμένα, στο πιο πυκνό αιθανολικό εκχύλισμα εργασίας, με βαθμό συμπύκνωσης 15%, βάσει ογκομέτρησης, τελικής συγκέντρωσης 10 mg/mL και 1 L όγκου διαλύματος, η αιθανόλη καταλαμβάνει 99,99 mL στο 1 L διαλύματος. Τα επόμενα αιθανολικά εκχυλίσματα εργασίας ανάγονται στο πιο πυκνό διάλυμα, όσον αφορά τον όγκο της αιθανόλης. Στο διάλυμα εργασίας, συγκέντρωσης 5 mg/mL και 1 L όγκου διαλύματος, η αιθανόλη καταλαμβάνει 49,95 mL στο 1 L διαλύματος

150

και στο διάλυμα εργασίας, συγκέντρωσης 1 mg/mL και 1 L όγκου διαλύματος, η αιθανόλη καταλαμβάνει 9,99 mL.

5.9.2 Πειραματική Διαδικασία

5.9.2.1 Κοπή, μεταχείριση και συσκευασία φυτικού υλικού *L.sativa* var. capitata

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκε φυτικός ιστός φρεσκοκοκκομένου μαρουλιού, βάρους 2.400 g, για 9 επαναλήψεις, συν 1 επανάληψη για λόγους ασφάλειας. Αρχικά, αφαιρέθηκαν τα πολύ εξωτερικά φύλλα, αλλά και τα εσωτερικά πιο τρυφερά φύλλα από το μαρούλι. Τα υπόλοιπα φύλλα κόπηκαν ισόπαχα, σε πάχος 2 cm,για να είναι το δείγμα αντιπροσωπευτικό και αναμείχθηκαν, για να παραληφθούν τυχαία (Εικ. 148). Στη συνέχεια, έγινε σύντομη εμβάπτιση των φύλλων στο εκάστοτε διάλυμα εργασίας, με γνωστή συγκέντρωση εκχυλίσματος και ακολούθησε στράγγιση των φύλλων με τη βοήθεια ενος πλαστικού πλέγματος (Εικ. 149).



Εικόνα 148: Ανάμειξη φύλλων μαρουλιού, πάχους 2 cm και συσκευασία του μάρτυρα σε πλαστικούς περιέκτες

Το διάλυμα εργασίας για την εμβάπτιση των φύλλων,που παρέμεινε, επαναχρησιμοποιήθηκε για τις επαναλήψεις κάθε επέμβασης (3 επαναλήψεις/επέμβαση εκχυλίσματος). Κατόπιν, τα εμβαπτισμένα φύλλα τοποθετήθηκαν σε τελάρα με διηθητικό χαρτί, για να στεγνώσουν, υποβοηθούμενα από ρεύμα αέρα. Ως υλικά συσκευασίας, επιλέχθηκαν πλαστικοί περιέκτες και αρχικά, ζυγίστηκε το απόβαρο τους και μετά, το καθαρό βάρος αλλά και το μικτό βάρος του περιέκτη μαζί με το φυτικό υλικό, ανά διάλυμα εργασίας γνωστής συγκέντρωσης. Έπειτα, οι πλαστικοί περιέκτες καλύφθηκαν με πλαστική διαφάνεια και τοποθετήθηκαν τυχαία, κατά την αποθήκευση τους σε ψυκτικό θάλαμο (θερμοκρασία: 4 °C και Σχετική υγρασία: 90%), για 10 ημέρες στο σύνολο (Εικ. 150).



Εικόνα 149: Εμβάπτιση φύλλων σε διάλυμα εργασίας, γνωστής συγκέντρωσης και πλαστικό πλέγμα για στράγγιση



Εικόνα 150: Τυχαία τοποθέτηση περιεκτών τελικής συσκευασίας εντος θαλάμου ψύξης

5.9.2.2 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Πίνακας 26a: Κωδικοποίηση δειγμάτων μάρτυρα υδατικού εκχυλίσματος

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | W | (μάρτυρας) | 1 | 0 |
| 2 | W | (μάρτυρας) | 2 | 0 |

| 3 | W | (μάρτυρας) | 3 | 0 |
|----|---|------------|---|----|
| 4 | W | (μάρτυρας) | 1 | 3 |
| 5 | w | (μάρτυρας) | 2 | 3 |
| 6 | W | (μάρτυρας) | 3 | 3 |
| 7 | W | (μάρτυρας) | 4 | 7 |
| 8 | W | (μάρτυρας) | 5 | 7 |
| 9 | w | (μάρτυρας) | 6 | 7 |
| 10 | W | (μάρτυρας) | 7 | 10 |
| 11 | W | (μάρτυρας) | 8 | 10 |
| 12 | W | (μάρτυρας) | 9 | 10 |

Πίνακας 26b: Κωδικοποίηση δειγμάτων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 1 mg/mL

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| - | W1 | 1 | - | 3 |
| 1 | W1 | 1 | 2 | 3 |
| 2 | W1 | 1 | 3 | 3 |
| 3 | W1 | 1 | 4 | 7 |
| 4 | W1 | 1 | 1 | 7 |
| - | W1 | 1 | - | 7 |
| 5 | W1 | 1 | 7 | 10 |
| 6 | W1 | 1 | 8 | 10 |
| 7 | W1 | 1 | 9 | 10 |

*Τα κόκκινα γράμματα υποδηλώνουν την απουσία επανάληψης

| Πίνακας 26c: Κωδικοποίηση | δειγμάτων υδατικών | εκχυλισμάτων α | συγκέντρωσης 5 mg/mL |
|---------------------------|--------------------|----------------|----------------------|
|---------------------------|--------------------|----------------|----------------------|

| | | | E () | 5.4.1/ |
|-----------|-----------------|----------------------|------------------|--------|
| <u>N0</u> | <u>Διαλυτης</u> | <u>Cεκχυλίσματος</u> | <u>Επαναληψη</u> | DAY |
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | W5 | 5 | 1 | 3 |
| 2 | W5 | 5 | 2 | 3 |
| 3 | W5 | 5 | 3 | 3 |
| 4 | W5 | 5 | 4 | 7 |
| 5 | W5 | 5 | 5 | 7 |

| 6 | W5 | 5 | 6 | 7 |
|---|----|---|---|----|
| 7 | W5 | 5 | 7 | 10 |
| 8 | W5 | 5 | 8 | 10 |
| 9 | W5 | 5 | 9 | 10 |

Πίνακας 26d: Κωδικοποίηση δειγμάτων υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 10 mg/mL

| <u>No</u> | <u>Διαλύτης</u> | <u>C_{εκχυλίσματος}</u> (mg/mL) | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|-----------|-----------------|--------------------------------------------|------------------|-----|
| 1 | W10 | 10 | 1 | 3 |
| 2 | W10 | 10 | 2 | 3 |
| 3 | W10 | 10 | 3 | 3 |
| 4 | W10 | 10 | 4 | 7 |
| 5 | W10 | 10 | 5 | 7 |
| 6 | W10 | 10 | 6 | 7 |
| 7 | W10 | 10 | 7 | 10 |
| 8 | W10 | 10 | 8 | 10 |
| 9 | W10 | 10 | 9 | 10 |

Πίνακας 27a: Κωδικοποίηση δειγμάτων μάρτυρα αιθανολικού εκχυλίσματος

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | E | (μάρτυρας) | 1 | 0 |
| 2 | E | (μάρτυρας) | 2 | 0 |
| 3 | E | (μάρτυρας) | 3 | 0 |
| 4 | E | (μάρτυρας) | 1 | 3 |
| 5 | E | (μάρτυρας) | 2 | 3 |
| 6 | E | (μάρτυρας) | 3 | 3 |
| 7 | E | (μάρτυρας) | 4 | 7 |
| 8 | E | (μάρτυρας) | 5 | 7 |
| 9 | E | (μάρτυρας) | 6 | 7 |
| 10 | E | (μάρτυρας) | 7 | 10 |

| 11 | E | (μάρτυρας) | 8 | 10 |
|----|---|------------|---|----|
| 12 | E | (μάρτυρας) | 9 | 10 |

<u>Πίνακας 27b:</u> Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 1 mg/mL

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | E1 | 1 | 1 | 3 |
| 2 | E1 | 1 | 2 | 3 |
| 3 | E1 | 1 | 3 | 3 |
| 4 | E1 | 1 | 4 | 7 |
| 5 | E1 | 1 | 5 | 7 |
| 6 | E1 | 1 | 6 | 7 |
| 7 | E1 | 1 | 7 | 10 |
| 8 | E1 | 1 | 8 | 10 |
| 9 | E1 | 1 | 9 | 10 |

Πίνακας 27c: Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 5 mg/mL

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | E5 | 5 | 1 | 3 |
| 2 | E5 | 5 | 2 | 3 |
| 3 | E5 | 5 | 3 | 3 |
| 4 | E5 | 5 | 4 | 7 |
| 5 | E5 | 5 | 5 | 7 |
| 6 | E5 | 5 | 6 | 7 |
| 7 | E5 | 5 | 7 | 10 |
| 8 | E5 | 5 | 8 | 10 |
| 9 | E5 | 5 | 9 | 10 |

| No | <u>Διαλύτης</u> | <u>C</u> εκχυλίσματος | <u>Επανάληψη</u> | DAY |
|----|-----------------|-----------------------|------------------|-----|
| | | (mg/mL) | | |
| 1 | E10 | 10 | 1 | 3 |
| 2 | E10 | 10 | 2 | 3 |
| 3 | E10 | 10 | 3 | 3 |
| 4 | E10 | 10 | 4 | 7 |
| 5 | E10 | 10 | 5 | 7 |
| 6 | E10 | 10 | 6 | 7 |
| 7 | E10 | 10 | 7 | 10 |
| 8 | E10 | 10 | 8 | 10 |
| 9 | E10 | 10 | 9 | 10 |

<u>Πίνακας 27d:</u> Κωδικοποίηση δειγμάτων αιθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 10 mg/mL

5.9.2.3 Διενέργεια δειγματοληψίας

Το πείραμα διήρκησε συνολικά 10 ημέρες και διενεργήθηκε δειγματοληψία, κατά την έναρξη του πειράματος (Day 0), την 3^η ημέρα (Day 3) , την 7^η ημέρα (Day 7) και την 10^η ημέρα (Day 10) του πειράματος.

5.9.2.3.1 Μέτρηση ατμόσφαιρας εντός της κλειστής συσκευασίας

Εντός του ψυκτικού θαλάμου και πριν να ανοιχθούν οι συσκευασίες, γίνεται η ανάλυση της ατμόσφαιρας εντός της συσκευασίας (0₂% & CO₂%).



Εικόνα 151: Καλιμπράρισμα ειδικού αναλυτή αερίων (PBI Dansensor Checkmate III) και μέτρηση ατμόσφαιρας εντός της κλειστής συσκευασίας

Αφου γίνει καλιμπράρισμα στη βελόνα, γίνονται προσεκτικά οπές στη συσκευασία και συνεχίζεται η ανάλυση των αερίων. Ουσιαστικά, με τη βοήθεια της προσαρμοσμένης βελόνας στο σύστημα εισαγωγής αέρα του οργάνου, γινόταν λήψη μιας ποσότητας αέρα από το εσωτερικό της συσκευασίας και καταγραφόταν στην οθόνη του οργάνου, η εκατοστιαία αναλογία σε CO₂ και O₂, με ακρίβεια 0,1% CO₂ και O₂ (Εικ. 151).

5.9.2.3.2 Μέτρηση υφής και συνεκτικότητας

Για τη μέτρηση της υφής και συνεκτικότητας των φυτικών ιστών, επιλέγονται 5 με 6 φύλλα από κάθε επέμβαση, ώστε να γίνουν 5 επαναλήψεις ανά επέμβαση. Προσδιορίζεται με τη χρήση αναλυτή υφής TA.HD plus Texture Analyser (Εικ. 152), ο οποίος φέρει ένα μετακινούμενο άξονα με κυλινδρική βελόνα, διαμέτρου 2 mm. Τα φύλλα τοποθετούνταν σε ειδική εσοχή, κάτω από την βελόνα, η κίνηση της οποίας είχε προγραμματιστεί πριν από την έναρξη της μέτρησης (Εικ. 152). Πιο αναλυτικά, πριν την επαφή με το φύλλο, η βελόνα είχε ταχύτητα 5 mm/sec, κατά την επαφή με το φύλλο, ταχύτητα 1 mm/sec, ενώ διένυε απόσταση 10 mm, από τη στιγμή, που ερχόταν σε επαφή με το φύλλο. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε g της μέγιστης δύναμης, που κατέγραψε ο αναλυτής, εντός των 10 mm κίνησης της βελόνας εντός της επιφάνειας του φύλλου.



<u>Εικόνα 152</u>: Αναλυτής υφής TA.HD plus Texture Analyser και μέτρηση υφής σε φύλλο μαρουλιού, πάχους 2cm

5.9.2.3.3 Μέτρηση χρώματος

Το χρώμα των φύλλων μαρουλιού προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φορητού τριχρωματικού διαφορικού χρωματόμετρου Minolta CR-300, το οποίο μετράει τις CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) συντεταγμένες του χρώματος L*, a*, b* (Εικ. 153). Το όργανο

πριν τη χρήση του βαθμονομήθηκε, όπως απαιτείται, με άσπρη πλάκα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την τοποθέτηση της κεφαλής του οργάνου σε σημεία στο άνω και το κάτω μέρος του εκάστοτε φύλλου (Εικ. 163). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, η τιμή L* αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα, έχει κλίμακα από 0-100, όπου L*=0 είναι το μαύρο και L*=100 το άσπρο. Όσο πιο μεγάλο είναι το L* τόσο πιο φωτεινό είναι το χρώμα του ιστού. Οι παράμετροι a* και b* είναι συνισταμένες που τοποθετούν το χρώμα σε ένα νοητό οριζόντιο άξονα κάθετο στο L*.



Εικόνα 153: Χρωματόμετρο Minolta CR-300 και μέτρηση χρώματος άνω φύλλου μαρουλιού

Το άχρωμο ορίζεται από τις συντεταγμένες (0,0) για το a* και το b*, αντίστοιχα. Η τιμή a* υποδηλώνει τη διαβάθμιση του χρώματος από πράσινο (-a*) έως κόκκινο (+a*) και η τιμή b* τη διαβάθμιση από μπλε (-b*) έως κίτρινο (+b*).

5.9.2.3.4 Μέτρηση αναπνοής

Το φυτικό περιεχόμενο, που απομένει, τοποθετείται σε γυάλινες φιάλες, οι οποίες τοποθετούνται σε σκιερό μέρος για 70 εως 90 min. Η σκιά εμποδίζει το φύλλο, να έρθει σε επαφή με το φως και άρα να φωτοσυνθέσει και να αποβάλλει περίσσειο οξυγόνο.

Με το πέρας του χρονικού πλαισίου, γίνεται η μέτρηση της αναπνοής των φύλλων (0₂% & CO₂%), με τη χρήση ειδικού αναλυτή αερίων (Εικ. 154). Στο καπάκι των γυάλινων φιάλων, υπάρχει μια σιλικονένια οπή, την οποία και διαπερνά η βελόνα του αναλυτή, ώστε να προσδιοριστούν τα ποσοστά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, που αποβάλλει το φύλλο.



Εικόνα 154: Μέτρηση αναπνοής φυτικών ιστών

5.9.2.3.5 Αποθήκευση

Μετά το πέρας των μετρήσεων της εκάστοτε ημέρας δειγματοληψίας, τα εναπομείναντα φυτικά δείγματα ανα επέμβαση τοποθετούνται σε σακουλάκι Polybag, με τη κατάλληλη σήμανση, σε καταψύκτη για περαιτέρω ανάλυση.

5.9.2.3.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη χρήση του προγράμματος Statgraphics,της εταιρείας StatPoint Technologies. Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς ANOVA και ο έλεγχος της στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων, έγινε μέσω της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD test), σε επίπεδο σημαντικότητας $P \le 0,05$. Όσον αφορά τη παρουσίαση των αποτελεσμάτων, οι τιμές των πιθανοτήτων προσδιορίζουν τη σημαντικότητα του κάθε παράγοντα μεμονωμένα καθώς και των αλληλεπιδράσεων τους. Όταν η τιμή των πιθανοτήτων είναι μικρότερη από 0,05,τότε συμβολίζεται με (*) και ο αντίστοιχος παράγοντας ή η αλληλεπίδραση παρουσιάζουν μια σημαντική επίδραση στο εκάστοτε αποτέλεσμα σε διάστημα εμπιστοσύνης είναι 99% και τέλος, για τιμή, μικρότερη από 0,001 (***), το διάστημα εμπιστοσύνης είναι 99,9%.

5.9.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Η διπαραγοντική ανάλυση των πιθανοτήτων διασποράς των παραμέτρων ποιότητας φύλλων φρεσκοκομμένου μαρουλιού παρουσιάζεται στον Πίνακα 28 και αναφέρεται στους δύο παράγοντες, τη χρονική διάρκειας συντήρησης (Pday, Pd) και τον τύπο εκχυλίσματος

και τη συγκέντρωση του, ανα επέμβαση (Pextract_concentration, Pe_c), καθώς και στην αλληλεπίδρασης τους (Pd x e_c).

Πίνακας 28: Επίδραση της χρονικής διάρκειας συντήρησης (Pday, Pd) με τον τύπο εκχυλίσματος και τη συγκέντρωση του, ανα επέμβαση (Pextract_concentration, Pe_c) και της αλληλεπίδρασης τους (Pd x e_c), αναφορικά με τις παραμέτρους ποιότητας.

| Τιμές Πιθανοτήτων Διπαραγοντικής Ανάλυσης | | | |
|----------------------------------------------|--------------------------|------|------------|
| Παράμετροι Ποιότητας | Διπαραγοντική Ανάλυση | | |
| | Pd | Pe_c | Pd x ec |
| Συνεκτικότητα | *** | | _ |
| L* Άνω Φύλλου | | * | |
| L* Κάτω Φύλλου | * | * | |
| a* Άνω Φύλλου | * * * | *** | *** |
| a* Κάτω Φύλλου | * * * | *** | *** |
| b* Άνω Φύλλου | | * | |
| b* Κάτω Φύλλου | | | |
| O ₂ atm | | | |
| CO ₂ atm | *** | | * |
| O ₂ resp | *** | | |
| CO ₂ resp | *** | | ** |

5.9.3.1 Συνεκτικότητα φύλλου

Η συνεκτικότητα των φύλλων φρεσκοκομμένου μαρουλιού, εκτιμώμενη με βάση τη δύναμη διάτρησης, κατά την έναρξη της συντήρησης ήταν στα επίπεδα των 75 g. Ο χρόνος συντήρησης επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη μεταβολή της δύναμης διάτρησης (Pd < 0,001), η οποία εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 7η μέρα και κατόπιν μείωση την 10η μέρα. Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου δεν

επηρέασαν στατιστικά σημαντικά τις μεταβολές της δύναμης διάτρησης κατά τη συντήρηση (Pe_c > 0,05).



Εικόνα 155: Μεταβολή της συνεκτικότητας των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 7η μέρα όπου οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους. Κατά την ίδια μέρα συντήρησης τα αιθανολικά εκχυλίσματα οδήγησαν σε αυξημένες τιμές δύναμης διάτρησης σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους (Εικ. 155). Βιβλιογραφικά, η συνεχής αύξηση της δύναμης διάτρησης των φύλλων συναρτήσει του χρόνου μπορεί να οφείλεται στην σκλήρυνση του προϊόντος, λόγω της λιγνιτοποίησης των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων του μαρουλιού. Αναφορικά με τη συνεκτικότητα των φυτικών ιστών, η αρχική ευκαμψία τους οφείλεται κυρίως στην παρουσία παρεγχυματικών κυττάρων, τα οποία δεν είναι λιγνιτοποιημένα, ενω τα αρχικά τους κυτταρικά τοιχώματα αποτελούνται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Αυτό το μίγμα πηκτινών, ημικυτταρινών και ινωδών πολυσακχαριτών (κυτταρινών) στο κυτταρικό τοίχωμα, προσδίδει σε αυτό, δύο πολύ σημαντικές ιδιότητες, πλαστικότητα και παράλληλα, ακαμψία. Η πλαστικότητα επιτρέπει στο κυτταρικό τοίχωμα να επεκτείνεται όσο το κύτταρο αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού, αλλά στη συνέχεια και ακαμψία, η οποία παρέχει αντοχή και εξασφαλίζει το τελικό σχήμα των κυττάρων. Η μηχανική στήριξη του κυττάρου, ωστόσο,

είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης τόσο της ακαμψίας, όσο και της εσωτερικής υδροστατικής πίεσης (σπαργή) του κυττάρου. Επιπρόσθετα, η θέση και ο τρόπος διάταξης των παρεγχυματικών κυττάρων στο φυτικό ιστό είναι ένας άλλος παράγοντας, που επηρεάζει τη μηχανική αντοχή του φυτικού ιστού (Abbott et al., 2006), με τα φύλλα να παρουσιάζουν υψηλή τιμή επιφάνειας για δεδομένο όγκο και μεγάλη πυκνότητα στοματίων. Ως συνέπεια, παρατηρείται υψηλός ρυθμός απώλειας νερού και ταχεία μάρανση, ιδιαίτερα όταν η υγρασία του περιβάλλοντος είναι χαμηλή (Πάσσαμ et al., 2015). Επομένως, η τελική μείωση της δύναμης διάτρησης στα φύλλα μαρουλιού μπορεί να αιτιολογηθεί λόγω της αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, δεδομένου ότι η πρωτοπηκτίνη διαλυτοποιείται σε πηκτίνη και σημειώνονται απώλειας σε νερό και την επερχόμενη απουσία σπαργής, ενδέχεται να ενεργούν ένζυμα, όπως η πολυγαλακτουρονάση και η πηκτινομεθυλεστεράση, τα οποία συμβάλουν, με τη σειρά τους, στη περαιτέρω χαλάρωση των ιστών (Barrett et al., 1998, Abbott et al., 2006).

5.9.3.2 Χρωματικές παράμετροι

Ο παράγοντας χρώμα παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμπορική αξία των φυτικών οργάνων και μαζί με την υφή και τη συνεκτικότητα προσδιορίζουν τη φρεσκάδα των περισσότερων λαχανικών.Το χρώμα χρησιμοποιείται σαν κριτήριο ωριμότητας ή γήρανσης, καθώς και σαν δείκτης φυσιολογικών, μηχανικών ή παθολογικών βλαβών (Kader, 2002). Συγκεκριμένα, η συντεταγμένη χρώματος L* (Lightness) αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα του δείγματος στο εύρος τιμών [0 (μαύρο) -100 (λευκό)]. Όσο πιο μεγάλο είναι το L*, τόσο πιο φωτεινό είναι το φύλλο. Η τιμή a*υποδηλώνει τη διαβάθμιση του χρώματος από πράσινο (-a*) έως κόκκινο (+a*), ενω η τιμή b*, τη διαβάθμιση από μπλε (-b*) έως κίτρινο (+b*).

5.9.3.2.1 Συντεταγμένη χρώματος L* άνω φύλλου

Το χρώμα του άνω φύλλου (ΑΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού, όσον αφορά τον συντελεστή φωτεινότητας L*, κατά την έναρξη της συντήρησης, σημειώθηκε στο L*=46. Όσον αφορά τον χρόνο συντήρησης, ο παράγοντας αυτός φέρεται να μην επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος L* Άνω φύλλου κατά τη συντήρηση (Pd > 0,05). Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου επηρέασαν στατιστικά τον συντελεστή φωτεινότητας L* (0,01<Pe_c < 0,05).

162





Στα υδατικά εκχυλίσματα,ο συντελεστής L* εμφάνισε κάποιες αυξομειώσεις έως την 10η μέρα. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη τιμή του συντελεστή L* για τη μεταχείριση W 1%, σημειώνεται κατά την 3^η ημέρα (L*=49,505) και για τις μεταχειρίσεις W 5% & W 10%, κατά την 7^η ημέρα (L*=47,86 και L*=47,383). Όλες τις ημέρες συντήρησης, οι μεταχειρίσεις των υδατικών εκχυλισμάτων οδήγησαν σε αυξημένες τιμές συντελεστή L*, σε σχέση με το μάρτυρα, ο οποίος παρουσιάζει μια μείωση κατα την ημέρα 3η και κατόπιν σταδιακή αύξηση εως και την 10η και τελευταία ημέρα του πειράματος. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής L* στο άνω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 10η μέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1%, στην οποία παρατηρείται μείωση κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος. Πράγματι, στον χειρισμό των αιθανολικών εκχυλισμάτων Ε 1%, η υψηλότερη τιμή του συντελεστή L* σημειώνεται κατά την 3^η ημέρα (L*=46,59), ενώ κατά την 10^η ημέρα, η συγκεκριμένη μεταχείριση εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή του συντελεστή L εταχείριση εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή του συντελεστή μεταχείριση ευς και την 7^η ημέρα συντήρησης, οι μεταχειρίσεις των αιθανολικών εκχυλισμάτων Ε 1%, τη υψηλότερη τιμή του συντελεστή L σημειώνεται κατά την 3^η ημέρα (L*=46,59), ενώ κατά την 10^η ημέρα, η συγκεκριμένη μεταχείριση εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή του συντελεστή L* σημειώνεται κατά την 3^η σμέρα (L*=46,59).

5.9.3.2.2 Συντεταγμένη χρώματος L* κάτω φύλλου

Το χρώμα του κάτω φύλλου (ΚΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού,όσον αφορά τον συντελεστή φωτεινότητας L*, κατά την έναρξη της συντήρησης, σημειώθηκε στο L*=51,3. Τόσο ο χρόνος συντήρησης (0,01<Pd <0,05), όσο και οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά

εκχυλίσματα περικαρπίου (0,01<Pe_c < 0,05), επηρεάζουν στατιστικά τη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος L* Κάτω φύλλου κατά τη συντήρηση. Στα υδατικά εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως εως την 10η ημέρα, με εξαίρεση τις μεταχειρίσεις W 1 % και W 5 %,στις οποίες, κατά την 3η ημέρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα. Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των υδατικών εκχυλισμάτων παρατηρήθηκαν την 3η μέρα, όπου οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα (W 5% και W 10%) εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα, χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 10η μέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1% και Ε 10%. Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αιθανολικών εκχυλισμάτων παρατηρήθηκαν την 7η μέρα, όπου οι χειρισμοί με αιθανολικά εκχυλίσματα (Ε 5% και Ε 10%) εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα, χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους (Εικ. 157).



Εικόνα 157: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος L* Κάτω φύλλου κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας.

5.9.3.2.3 Συντεταγμένη χρώματος a* άνω φύλλου

Το χρώμα του άνω φύλλου (ΑΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού, όσον αφορά την συντεταγμένη χρώματος a*, κατά την έναρξη της συντήρησης, σημειώθηκε στο b* ΑΦ= - 17,62. Στατιστικά, ο χρόνος συντήρησης (Pd< 0,001), ο τύπος και η συγκέντρωση του

εκχύλισματος (Pe_c < 0,001), αλλά και η αλληλεπίδραση τους (Pd x e_c < 0,001) επιδρούν σημαντικά στη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος a* άνω φύλλου κατά τη συντήρηση των άνω φύλλων του μαρουλιού στις 10 ημέρες της πειραματικής διαδικασίας. Στα υδατικά εκχυλίσματα, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του συντελεστή a* στο άνω φύλλο, κατά την 3ⁿ ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση W 10%, όπου ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο, κατά την 3ⁿ ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση W 10%, όπου ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο αυξάνεται εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10ⁿ ημέρα). Για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις των υδατικών εκχυλισμάτων, εκτός του μάρτυρα (a*=-17,74), ακολουθεί μια μείωση κατά την 7ⁿ ημέρα και κατόπιν,αύξηση μέχρι και το τέλος του πειράματος (10ⁿ ημέρα). Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο σημειώνει μείωση μέχρι και την ημέρα 7, εκτος της μεταχείρισης Ε 1% και κατόπιν, αύξηση κατά την 10ⁿ και τελευταία ημέρα (Εικ. 158).



Εικόνα 158: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος a* Άνω φύλλου κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

5.9.3.2.4 Συντεταγμένη χρώματος a* κάτω φύλλου

Το χρώμα του κάτω φύλλου (ΚΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού,όσον αφορά την συντεταγμένη χρώματος a*, κατά την έναρξη της συντήρησης,σημειώθηκε στο a* KΦ= - 17,55. Στατιστικά, ο χρόνος συντήρησης (Pd< 0,001), ο τύπος και η συγκέντρωση του εκχύλισματος (Pe_c < 0,001), αλλά και η αλληλεπίδραση τους (Pd x e_c < 0,001) επιδρούν σημαντικά στη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος a* κάτω φύλλου κατά τη συντήρηση των φύλλων του μαρουλιού στις 10 ημέρες της πειραματικής διαδικασίας. Πιο αναλυτικά,και στους δύο τύπους εκχυλισμάτων, παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση του

συντελεστή a* στο κάτω φύλλο, από την 3ⁿ ημέρα εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10ⁿ ημέρα). Εξαίρεση αποτελεί ο μάρτυρας του αιθανολικού εκχυλίσματους (Ε 0%) κατά την 3ⁿ ημέρα, όπου σημειώνεται μια αριθμητική μείωση (a*= -17,76) και κατόπιν, αύξηση εως και την 10ⁿ ημέρα (a*= -16,17). Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3η μέρα όπου τόσο οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα, όσο και οι χειρισμοί των αιθανολικών εκχυλισμάτων εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους (Εικ. 159).





5.9.3.2.5 Συντεταγμένη χρώματος b*άνω φύλλου

Το χρώμα του άνω φύλλου (ΑΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού, όσον αφορά την συντεταγμένη χρώματος b*, κατά την έναρξη της συντήρησης, σημειώθηκε στο b* ΑΦ=23,15. Όσον αφορά τον χρόνο συντήρησης, ο παράγοντας αυτός φέρεται να μην επηρεάζει στατιστικά τη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος b* Άνω φύλλου κατά τη συντήρηση (Pd > 0,05). Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου επηρέασαν στατιστικά τον συντελεστή b* (0,01 < Pe_c < 0,05) κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ο οποίος εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση κατά την 3^η ημέρα και κατόπιν μείωση εως και την 10η ημέρα. Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3η μέρα όπου οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους. Αντίστοιχα, στα αιθανολικά εκχυλίσματα, κατά την ίδια ημέρα, όλοι οι χειρισμοί, εκτός της Ε 10%, παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα (Εικ. 160).



Εικόνα 160: Μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος b* Άνω φύλλου κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

5.9.3.2.6 Συντεταγμένη χρώματος b* κάτω φύλλου

Το χρώμα του κάτω φύλλου (ΚΦ) φρεσκοκομμένου μαρουλιού, όσον αφορά τον συντελεστή φωτεινότητας b*, κατά την έναρξη της συντήρησης, σημειώθηκε στο L*=24,98. Τόσο ο χρόνος συντήρησης (Pd > 0,05), όσο και οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου (Pe_c > 0,05), δεν επηρεάζουν στατιστικά τη μεταβολή της συντεταγμένης χρώματος b* του Κάτω φύλλου κατά τη συντήρηση. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, παρουσιάζεται μια αύξηση κατά την 3ⁿ ημέρα συντήρησης και κατόπιν, σταδιακή μείωση εως και την 10ⁿ ημέρα. Παρομοίως, στα υδατικά εκχυλίσματα, εντοπίζεται μια αύξηση κατά την 3ⁿ ημέρα συντήρησης και τέλος, αύξηση κατά την 3ⁿ ημέρα συντέταγμένης χρώματος b* Κάτω φύλλου κατά την 10ⁿ ημέρα και τέλος, αύξηση της συντεταγμένης χρώματος b* Κάτω φύλλου κατά την 10ⁿ ημέρα και τέλος, αύξηση της συντεταγμένης χρώματος b* Κάτω φύλλου κατά την 3ⁿ μέρα όπου οι χειρισμοί με τα αιθανολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν τον 3η μέρα όπου οι χειρισμοί με τα αιθανολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς υδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους. Αντιθέτως, κατά την ίδια μέρα συντήρησης, τα υδατικά εκχυλίσματα οδήγησαν σε αυξημένες τιμές της συντεταγμένης χρώματος b* κάτω φύλλου, συγκριτικά με το μάρτυρα (Εικ. 161).





5.9.3.2.7 Συζήτηση

Όλες τις ημέρες συντήρησης, οι μεταχειρίσεις των υδατικών εκχυλισμάτων οδήγησαν σε αυξημένες τιμές συντελεστή L* στο άνω φύλλο, σε σχέση με το μάρτυρα, ο οποίος παρουσιάζει μια μείωση κατα την ημέρα 3η και κατόπιν σταδιακή αύξηση εως και την 10η και τελευταία ημέρα του πειράματος. Στα υδατικά εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως εως την 10η ημέρα, με εξαίρεση τις μεταχειρίσεις W 1 % και W 5 %, στις οποίες, κατά την 3η ημέρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 10η μέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1% και Ε 10%. Στα υδατικά εκχυλίσματα, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του συντελεστή a* στο άνω φύλλο, κατά την 3η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση W10, όπου ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο αυξάνεται εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10η ημέρα). Για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις των υδατικών εκχυλισμάτων, εκτός του μάρτυρα (a*=-17,74), ακολουθεί μια μείωση κατά την 7η ημέρα και κατόπιν, αύξηση μέχρι και το τέλος του πειράματος (10η ημέρα). Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο σημειώνει μείωση μέχρι και την ημέρα 7, εκτος της μεταχείρισης Ε 1% και κατόπιν, αύξηση κατά την 10η και τελευταία ημέρα. Και στους δύο τύπους εκχυλισμάτων, παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση του συντελεστή a* στο κάτω φύλλο, από την 3η ημέρα, όπου σημειώνονται οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας

(10η ημέρα). Τέλος, οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου επηρέασαν στατιστικά τον συντελεστή b* στο άνω φύλλο μαρουλιού κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ο οποίος εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση κατά την 3η ημέρα και κατόπιν μείωση εως και την 10η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1%. Η υποβάθμιση της ποιότητας του μαρουλιού μετά τη συγκομιδή του εκδηλώνεται, αρχικά, με ταχύτατη απώλεια βάρους και στη συνέχεια, με αποχρωματισμό (κιτρίνισμα) των φύλλων του. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι κεφαλές μαρουλιού μπορούν να συντηρηθούν για 7 έως 14 ημέρες στους 0-2 °C, χωρίς να υποβαθμιστεί σημαντικά η ποιότητα τους (Salunkhe and Kadam, 1998). Φυσικές χρωστικές ουσίες, οι οποίες προσδίδουν χρώμα σε φρούτα και λαχανικά, όπως για παράδειγμα οι λιποδιαλυτές χλωροφύλλες (πράσινο χρώμα), αλλάζουν καθώς το φυτό ωριμάζει. Επιπλέον, οι ενζυματικές και μη ενζυματικές αντιδράσεις αμαύρωσης (browning) μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό υδατοδιαλυτών καφέ, γκρι και μαύρων χρωστικών. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις συγκεκριμένες αντιδράσεις περιλαμβάνουν την οξειδάση πολυφαινόλης (PPO), η οποία καταλύει την οξείδωση πολυφαινολικών ενώσεων και την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), που παρεμποδίζει τη σύνθεση προδρόμων σε φαινολικά υποστρώματα. Όσον αφορά τον βαθμό μαυρίσματος στα λαχανικά, αυτός εκτιμάται μετρώντας τη φωτεινότητα του προϊόντος (L *) και τις συντεταγμένες χρωματικότητας (a * και b *). Γενικά, οι χαμηλότερες τιμές L * και υψηλότερες τιμές * και b υποδηλώνουν ότι ένα προϊόν έχει μαυρίσει περισσότερο από το επιθυμητό, σε επίπεδο ποιότητας σε χρώμα. Έχουν διερευνηθεί διάφορες τεχνικές και μηχανισμοί για τον έλεγχο της έκτασης του μαυρίσματος στα λαχανικά. Γενικά, η ενζυματική αμαύρωση μπορεί να αποφευχθεί με θερμική απενεργοποίηση του ΡΡΟ, αλλά η θερμότητα μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητο μαλάκωμα των ιστών. Αντί της λεύκανσης, έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσθετα για την πρόληψη της ενζυματικής χρώσης. Ουσιαστικά, οι αναγωγικοί παράγοντες, τα αντιοξειδωτικά συστατικά και οι ενζυματικοί αναστολείς παρεμποδίζουν την αμαύρωση, μειώνοντας τις ο-κινόνες σε άχρωμες διφαινόλες (Mcevily, Iyengar, & Otwell, 1992). Στην εργασία των Kim et al. (2014), μελετούνται οι μεταβολές στις τιμές χρώματος των φρεσκοκομμένων φύλλων μαρουλιού, που έχουν υποστεί επεξεργασία ή όχι με αιθέριο έλαιο από πευκοβελόνες, κατά την αποθήκευση στους 4 °C. Η τιμή L * έτεινε να μειώνεται με την αύξηση της διάρκειας της περιόδου αποθήκευσης. Υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων μετά από 3 και 12 ημέρες αποθήκευσης. Η τιμή L * στο φρεσκοκομμένο μαρούλι που έχει υποστεί επεξεργασία με ΕΡ (διάλυμα αιθανόλης και αιθέριο έλαιο από πευκοβελόνες) ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη στο

φρεσκοκομμένο μαρούλι που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με άλλες λύσεις μετά από αποθήκευση 12 ημερών (διάλυμα αιθέριου ελαίου και απεσταγμένου νερού-WP,απεσταγμένο νερό-WW και αιθανόλη-EE). Οι τιμές a *, b * τείνουν να αυξάνονται με την αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης. Ο αυξανόμενος ρυθμός των τιμών a*, b * ήταν σημαντικά χαμηλότερος στο μαρούλι που είχε υποστεί επεξεργασία με EP από ό, τι στις άλλες μεταχειρίσεις και ήταν σημαντικά υψηλότερο στο μαρούλι που είχε υποστεί επεξεργασία με WW. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χρήση του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου είχε σημαντική επίδραση στη διατήρηση φρέσκου χρώματος του μαρούλι. Οι Chen et al. (2016) διαπίστωσαν ότι οι τιμές L *, a * και b* του φρεσκοκομμένου μαρουλιού,το οποίο μεταχειρίστηκε με EUG (ευγενόλη) και CEO (αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου),παρέμειναν σταθερές κατά την περίοδο αποθήκευσης των 12 ημερών. Ωστόσο, το μαρούλι που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με απεσταγμένο νερό και 5% EtOH έδειξε σημαντικές αλλαγές στις τιμές L *, a * και b* την 6η και 9η ημέρα αποθήκευσης.

Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με την απώλεια του αρχικού χρώματος των φύλλων και την επικράτηση του φαινόμενου της ενζυμικής αμαύρωσης, με αποτέλεσμα την απώλεια της οπτικής ποιότητας. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου καθώς και η ευγενόλη καθυστέρησαν την απώλεια χλωροφύλλης και τη διάχυση του καφέ χρώματος στην επιφάνεια του φύλλου του φρεσκοκομμένου μαρουλιού.

5.9.3.3 Ατμόσφαιρα εντος κλειστής συσκευασίας

5.9.3.3.1 Συγκέντρωση O2 ατμόσφαιρας

Τόσο ο χρόνος συντήρησης (Pd >0,05), όσο και οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου (Pe_c > 0,05), δεν επηρεάζουν στατιστικά την ατμόσφαιρα εντός της κλειστής συσκευασίας, αναφορικά με την συγκέντρωση της ατμόσφαιρας σε οξυγόνο. Γενικά, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης O_2 για τα υδατικά εκχυλίσματα κατα την ημέρα 7η και μια σταδιακή αύξηση κατά την ημέρα 10, με εξαίρεση την μεταχείριση W 10%. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, παρατηρείται μια μειωτική τάση κατά την 7η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 10%, όπου η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, εντός της κλειστής συσκευασίας, παρουσιάζει μια αυξητική τάση κατά την διάρκεια του συνολικού χρόνου συντήρησης. Κατά την 10η ημέρα, και οι υπόλοιπες δυο μεταχειρίσεις (Ε 1% και Ε 5%) αυξάνονται εξίσου (Εικ. 162).



Εικόνα 162: Μεταβολή της συγκέντρωσης Ο₂, εντός της κλειστής συσκευασίας, κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 10η μέρα όπου οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα εξακολουθούν να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση W 5%. Κατά την ίδια μέρα συντήρησης τα αιθανολικά εκχυλίσματα οδήγησαν σε αυξημένες τιμές συγκέντρωσης O₂ ατμόσφαιρας εντός της κλειστής συσκευασίας, συγκριτικά με το μάρτυρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση E 1% (Εικ. 162).

5.9.3.3.2 Συγκέντρωση CO2 ατμόσφαιρας

Ο χρόνος συντήρησης επηρέασε στατιστικά σημαντικά την συγκέντρωση της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο του άνθρακα, εντός της κλειστής συσκευασίας (Pd < 0,001), η οποία εμφάνισε μια απότομη μείωση, από την 3^{n} ημέρα, στην 7^{n} ημέρα και κατόπιν σταδιακή μείωση την 10^{n} ημέρα για τις μεταχειρίσεις W, W 10%, E, E 1%, E 5% & E 10%, είτε σταθεροποίηση της για τις μεταχειρίσεις W 1% & W 5%. Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου δεν επηρέασαν στατιστικά την συγκέντρωση της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο του άνθρακα κατά τη συντήρηση (Pe_c > 0,05), σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση του χρόνου συντήρησης με τον τύπο και τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος (0,01 < Pd x e_c < 0,05). Τέλος, οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3^{n} ημέρα, όπου όλοι οι χειρισμοί των υδατικών εκχυλισμάτων εμφάνισαν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τον μάρτυρα. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα,

όλες οι μεταχείρισεις, εκτός της Ε 10%, εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους (Εικ. 163).



Εικόνα 163: Μεταβολή της συγκέντρωσης CO₂, εντός της κλειστής συσκευασίας,κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ παρατηρείται: (α) μείωση του ρυθμού αποδόμησης των αναπνευστικών υποστρωμάτων, καθώς και μείωση του ρυθμού παραγωγής θερμότητας, και (β) επιβράδυνση της ωρίμανσης και γήρανσης των καρπών. Η επίδραση του CO₂ σχετίζεται με την ποσότητα των αναπνευστικών υποστρωμάτων που βρίσκονται στους φυτικούς ιστούς. Έτσι, όταν υπάρχει επάρκεια αναπνευστικών υποστρωμάτων, η αναπνοή παρεμποδίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις CO₂, ενώ σε περίπτωση ανεπάρκειας αναπνευστικών υποστρωμάτων η αύξηση του CO₂ δεν προκαλεί καμία επίδραση. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του O₂ και του CO₂ χρησιμοποιείται κατά την αποθήκευση καρπών (κυρίως σε μήλα και αχλάδια και δευτερευόντως σε ακτινίδια, αβοκάντο, λωτούς και ρόδια) σε ελεγχόμενες ατμόσφαιρες (controlled atmosphere storage - CA), αλλά δεν εφαρμόζεται αποθήκευσης των κηπευτικών (Πάσσαμ κ.α, 2015).

5.9.3.4 Αναπνοή φυτικού ιστού

5.9.3.4.1 Συγκέντρωση O_2 αναπνοής



Εικόνα 164: Μεταβολή της συγκέντρωσης Ο₂ των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

Ο χρόνος συντήρησης επηρέασε στατιστικά σημαντικά την αναπνοή του φυτικού ιστού (Pd < 0,001), η οποία εμφάνισε μια απότομη αύξηση κατά την 3η ημέρα, την οποία ακολούθησε μια απότομη μείωση κατά την 7η ημέρα και κατόπιν σταδιακή μείωση κατά την 10η ημέρα για τις μεταχείρισεις W 10% και Ε 1%, Ε 5% και Ε 10% και σταδιακή αύξηση, κατά την ίδια μέρα συντήρησης, για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου δεν επηρέασαν στατιστικά την αναπνοή του φύλλων και τη συγκέντρωση του οξυγόνου κατά τη συντήρηση (Pe_c > 0,05). Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3η ημέρα όπου οι χειρισμοί με τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν συντηρήθηκαν του οξυγόνου κατά τη συγκέντρωση του οι χειρισμό του οι χειρισμοί με τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν συντηρήθηκαν του οι χειρισμοί και τη συγκέντρωση του ολωγόνου κατά τη συγκέντρωση του οι χειρισμόν παρατηρήθηκαν την 3η ημέρα όπου οι χειρισμοί με τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν συγκεντρώσεων τους (Εικ. 164).

5.9.3.4.2 Συγκέντρωση CO₂ αναπνοής

Ο χρόνος συντήρησης επηρέασε στατιστικά σημαντικά την αναπνοή του φυτικού ιστού (Pd < 0,001), η οποία εμφάνισε μια απότομη αύξηση κατά την 3ⁿ ημέρα, την οποία ακολούθησε μια απότομη μείωση κατά την 7ⁿ ημέρα και κατόπιν σταδιακή μείωση κατά την 10ⁿ ημέρα για τα αιθανολικά εκχυλίσματα και μια μικρής κλίμακας αύξηση για τα υδατικά. Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου δεν επηρέασαν στατιστικά την αναπνοή του φύλλων και τη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη συντήρηση (Pe_c > 0,05), σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση του χρόνου συντήρησης με τον τύπο και τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος (0,001 < Pd x e_c <0,01). Οι μεγαλύτερες

διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3η ημέρα όπου οι χειρισμοί με υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους.



Εικόνα 165: Μεταβολή της συγκέντρωσης CO₂ των φύλλων κατά τη διάρκεια των 10 ημερών της πειραματικής διαδικασίας

Παρομοίως, κατά την ίδια μέρα συντήρησης, στα αιθανολικά εκχυλίσματα σημειώθηκαν αυξημένες τιμές συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα, σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους (Εικ. 165).

Οι κυριότεροι παράγοντες,που επιδρούν στο ρυθμό της αναπνοής των φυτικών ιστών μετασυλλεκτικά, είναι η θερμοκρασία, η σύνθεση της ατμόσφαιρας στην αποθήκη, η περιεκτικότητα του ιστού σε νερό, τυχόν τραυματισμοί καθώς και ο φυσιολογικός χαρακτήρας του προϊόντος. Κατά κανόνα, ο υψηλός ρυθμός αναπνοής συνεπάγεται ότι το προϊόν οδηγείται σε ταχεία γήρανση και μικρή αποθηκευτική ζωή, ενώ, αντίθετα, χαμηλοί ρυθμοί αναπνοής συνεπάγονται χρονικά εκτεταμένη συντήρηση (Πάσσαμ κ.α, 2015). Στη περίπτωση του φρεσκοκομμένου φυλλώδους μαρουλιού, η ένταση της αναπνοής θεωρείται υψηλή, με ρυθμό αναπνοής, 21-30 mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ στους 5 °C (Kader et al., 2002).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συμπεράσματα

- Τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου μελετήθηκαν φασματοσκοπικά (UV-Vis, FTIR, Raman), με τις βασικές κορυφές να αποδίδονται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές των φαινολικών συστατικών, σύμφωνα με με την βιβλιογραφία.
- ✓ Σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS, η μεταχείριση του εκχυλίσματος του περικαρπίου με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το P.Hull Raw-EtOH , καθώς έχει το μικρότερο IC₅₀ (0,00000304491 mM Trolox.). Το λιγότερο δραστικό είναι το P.Hull Freeze Dried-HPLC Water, του οποίου το IC₅₀ ισούται με 0,0000393007 mM Trolox.
- Σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH,η μεταχείριση του εκχυλίσματος του περικαρπίου με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το P.Hull Freeze Dried-HPLC Water, καθώς έχει το μικρότερο IC50 (0,00072029 mM Trolox.). Το λιγότερο δραστικό είναι το P.Hull Raw-EtOH, του οποίου το IC50 ισούται με 0,001254479 mM Trolox.
- Ο παράγοντας της θερμικής επεξεργασίας (λυοφιλίωση και ξήρανση σε φούρνο υπό κενό) ή μη (νωπή κατάσταση) του περικαρπίου και η επιλογή του διαλύτη συμβάλλουν στην έκλουση διαφορετικών φαινολικών συστατικών, κατά την ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση (HPLC-MS-QTOF) των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου
- Μέσω της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC-MS-QTOF) των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων περικαρπίου προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά τους συστατικά: γαλλικό οξύ, Συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ), Αιθυλ- (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη, Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης, Κερκετίνη, Μονογαλοϋλογλυκοζίτης, Πρωτοκατεχικό οξύ, Κερκετίνη 3-Ο-γλυκουρονίδη.
- Για την B. subtilis, η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τη μεταχείριση PhR H₂O υπολογίστηκε στα 754,62 mg/L. Για τη μεταχείριση PhV H₂O, στα 700,57 mg/L και για την PhF H₂O, στα 573,82 mg/L. Όσον αφορά την μη ανασταλτική συγκέντρωση (NIC), αυτή υπολογίστηκε αντίστοιχα, για το υδατικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου, στα 135,47 mg/L, σε ξήρανση υπό κενό, στα 188,65 mg/L και τέλος, για το λυοφιλιωμένο υδατικό εκχύλισμα, στα 264,70 mg/L.
- ✓ Για την Escherichia coli, η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τη μεταχείριση PhR H₂O υπολογίστηκε, στα 1017,31 mg/L. Για τη μεταχείριση PhV H₂O, στα 1088,18 mg/L και για την PhF H₂O, στα 957,60 mg/L. Ενώ η μη ανασταλτική

συγκέντρωση (NIC) υπολογίστηκε αντίστοιχα, για το υδατικό εκχύλισμα νωπού περικαρπίου, στα 392,31 mg/L, σε ξήρανση υπό κενό, στα 264,62 mg/L και τέλος, για το λυοφιλιωμένο υδατικό εκχύλισμα, στα 428,94 mg/L.

- ✓ <u>Για το St. aureus</u>, η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) για τις μεταχειρίσεις PhR H₂O και PhV H₂O, εντοπίζεται στο εξής εύρος συγκεντρώσεων 625 mg/L<MIC<
 1250 mg/L. Ενώ για το PhF H2O, στα 312 mg/L<MIC< 625 mg/L. Η μη ανασταλτική συγκέντρωση (NIC) εντοπίζεται για όλες στις μεταχειρίσεις, στο εύρος 0<NIC<156 mg/L.
- Τα θετικά κατά Gram βακτήρια (B. subtilis & St. aureus) επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία, με την ανάπτυξη τους να αναστέλλεται, λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων επί της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, συγκριτικά με την Escherichia coli.
- Όλες τις ημέρες συντήρησης, οι μεταχειρίσεις των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων οδήγησαν σε αυξημένες τιμές συντελεστή L* στο άνω φύλλο, σε σχέση με το μάρτυρα, ο οποίος παρουσιάζει μια μείωση κατα την ημέρα 3η και κατόπιν σταδιακή αύξηση εως και την 10η και τελευταία ημέρα του πειράματος. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής L* στο άνω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 10η μέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1%, στην οποία παρατηρείται μείωση κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος.
- ✓ Στα υδατικά εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως εως την 10η ημέρα, με εξαίρεση τις μεταχειρίσεις W 1 % και W 5 %, στις οποίες, κατά την 3^η ημέρα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής L* στο κάτω φύλλο εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση έως την 10η μέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1% και Ε 10%.
- Στα υδατικά εκχυλίσματα, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του συντελεστή a* στο άνω φύλλο, κατά την 3η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση W 10%, όπου ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο αυξάνεται εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10η ημέρα). Για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις των υδατικών εκχυλισμάτων,εκτός του μάρτυρα (a*=-17,74), ακολουθεί μια μείωση κατά την 7η ημέρα και κατόπιν, αύξηση μέχρι και το τέλος του πειράματος (10η ημέρα). Στα αιθανολικά εκχυλίσματα, ο συντελεστής a* στο άνω φύλλο σημειώνει μείωση μέχρι και την ημέρα 7, εκτός της μεταχείρισης Ε 1% και κατόπιν, αύξηση κατά την 10η και τελευταία ημέρα.

- ✓ Και στους δύο τύπους εκχυλισμάτων,παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση του συντελεστή a* στο κάτω φύλλο, από την 3η ημέρα, όπου σημειώνονται οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών εως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (10η ημέρα). Εξαίρεση αποτελεί ο μάρτυρας του αιθανολικού εκχυλίσματους (Ε 0%) κατά την 3η ημέρα, όπου σημειώνεται μια αριθμητική μείωση (a*= -17,76) και κατόπιν, αύξηση εως και την 10η ημέρα (a*= -16,17).
- ✓ Οι χειρισμοί εμβάπτισης σε υδροαλκοολικά εκχυλίσματα περικαρπίου επηρέασαν στατιστικά τον συντελεστή b* στο άνω φύλλο μαρουλιού κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ο οποίος εμφάνισε μια σταδιακή αύξηση κατά την 3ⁿ ημέρα και κατόπιν μείωση εως και την 10η ημέρα, με εξαίρεση τη μεταχείριση Ε 1%.
- Η αλληλεπίδραση του χρόνου συντήρησης με τον τύπο και τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος επιδρά στατιστικά σημαντικά στην συγκέντρωση της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο του άνθρακα, εντός της κλειστής συσκευασίας, η οποία εμφάνισε μια απότομη μείωση, από την 3η ημέρα, στην 7η ημέρα και κατόπιν σταδιακή μείωση την 10η ημέρα για τις μεταχειρίσεις W, W 10%, E, E 1%, E 5% & E 10%, είτε σταθεροποίηση της για τις μεταχειρίσεις W 1% & W 5%. Τέλος, οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών παρατηρήθηκαν την 3η ημέρα, όπου όλοι οι χειρισμοί των υδατικών εκχυλισμάτων εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους.
- Η αλληλεπίδραση του χρόνου συντήρησης με τον τύπο και τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος επιδρά στατιστικά στην αναπνοή του φύλλων και τη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη συντήρηση. Και σε αυτή περίπτωση, κατά την 3η ημέρα, παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων, οι οποίες εμφάνισαν υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα, σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις κατόπιν μειώνονται μέχρι και το τέλος του πειραματικού κύκλου.

Προοπτικές

- Μελέτη εκχυλισμάτων περικαρπίου, από όλες τις γεωγραφικές ζώνες καλλιέργειας
 της ποικιλίας Αιγίνης, στην ελληνική επικράτεια
- Επιλογή αποδοτικότερου τύπου εκχύλισης φαινολικών ενώσεων και χρήση
 μιγμάτων διαλυτών, φιλικών προς το περιβάλλον, με στόχο τη βελτιστοποίηση της
- Ποσοτική Ανάλυση φαινολικών συστατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου
- Αξιοποίηση περικαρπίου για την εκχύλιση πολυσακχαριτών και δημιουργία καινοτόμου προϊόντος, αγροδιατροφικού χαρακτήρα
- Εκτενέστερη μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων, με έμφαση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια
- Αποθήκευση περικαρπίου και απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός μυκοτοξινών
- Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης και αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος περικαρπίου σε μαγιονέζα, εμπλουτισμένη σε ω-3 λιπαρά, κατά την αποθήκευση της
- Μετασυλλεκτική χρήση εκχυλίσματος περικαρπίου σε αποφλοιωμένα κελυφωτά φιστίκια, κατά την αποθήκευση τους και αξιολόγηση των παραμέτρων ποιότητας τους
- Μελέτη της επίδρασης της τεχνολογίας των εδώδιμων επικαλύψεων με την ενσωμάτωση εκχυλισμάτων περικαρπίου σε αυτές, σε αποφλοιωμένη ψίχα φιστικιού
- Επίδραση εκχυλισμάτων περικαρπίου σε κυτταρικές σειρές

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott J. A. & Harker F. R. (2006), Texture. The Commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. *Agriculture Handbook*, Number 66.
- Abbott J.A., Lu R., Upchurch B.L., Stroshine R.L. (1997), Technologies for non destructive quality evaluation of fruits and vegetables, *Horticultural Reviews*, 20,1-120.
- Abolhasani, A., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2018), Effect of gamma irradiation on the extraction yield, antioxidant, and antityrosinase activities of pistachio green hull extract. *Radiation Physics and Chemistry*, 144, 373–378.
- Akbari-Alavijeh S., Soleimanian-Zad S., Sheikh-Zeinoddin M., Hashmi S. (2017), Pistachio hull water-soluble polysaccharides as a novel prebiotic agent. *Biological Macromolecules*, 107(Pt A), p. 808-816.
- Amini Sarteshnizi R., Sahari M. A., Ahmadi Gavlighi H., Regenstein J. M., & Nikoo M. (2019), Antioxidant activity of Sind sardine hydrolysates with pistachio green hull (PGH) extracts. *Food Bioscience*, 27, 37-45.
- Arjeh, E., Akhavan, H.R., Barzegar, M., Carbonell-Barrachina, A.A (2020). Bio-active compounds and functional properties of pistachio hull: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 55–64
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman S. (2006), Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Barreca D., Lagana G., Leuzzi U., Smeriglio A., Trombetta D., Belloco E. (2016), Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (Pistacia vera L. variety Bronte) hulls. *Food Chemistry*, p. 493-502.
- Barrett D.M., Garcia E. and Wayne J. E (1998), Textural Modification of Processing Tomatoes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(3), 173–258.
- Behgar M., Ghasemi S., Naserian A., Borzoie A., Fatollahi, H. (2011), Gamma Radiation Effects on Phenolics, Antioxidants Activity and in Vitro Digestion of Pistachio (Pistachia Vera) Hull. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 963–967.
- Boots A. W., Haenen G. R. M. M., & Bast A. (2008), Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325–337

- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C. (2015), Essential oils as antimicrobials in food systems-a review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Cano A., Hernandze-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M., Arnao M.B. (1998), An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material ,*Phytochemical Analysis*, 9, 196-202.
- Çelik İ., Demirer G.N. (2015), Biogas production from pistachio (*Pistacia vera* L.) processing waste. *Biocatalysis andAgricultural Biotechnology*, 4, 767–772.
- Chaharbaghi E., Khodaiyan F., & Hosseini S. S. (2017), Optimization of pectin extraction from pistachio green hull as a new source. *Carbohydrate Polymers*, 173, 107–113.
- Chahed T., Dhifi W., Hamrouni I., Msaada K., Bellila A., Kchouk M. E. (2007), Comparison of pistachio hull essential oils from different Tunisian localities. *Italian Journal of Biochemistry*, 56, 35–39.
- Chen X., Ren L., Li M., Qian J., Fan J., Du B. (2016), Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce, *Food Chemistry*, 214, 432-434.
- Cotty P.J., Bayman P., Egel D.S., Elias K.S. (1994), Agriculture, aflatoxins and Aspergillus. In: Powell K.A., Renwick A., Perberdy J.F., editors. *The Genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press; New York, NY, USA p. 1–27.
- Crozier A., Michael N. C., Hiroshi A. (2006), Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd.
- Díaz-Mula H. M., Zapata P. J., Guillén F., Martínez-Romero D., Castillo S., Serrano M. (2009), Changes in hydrophilicand lipophilic antioxidant activity and related bioactive com-pounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 354–363
- Duduku K., Rosalam S., Rajesh N. (2011), A review of the antioxidant potential of medicinal plantspecies, *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217–233.
- Erşan S., Güçlü Üstündağ O.z., Carle R., & Schweiggert R. M. (2016), Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (Pistacia vera L.) hulls (exo-and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 5334–5344.
- Fattahifar E., Barzegar M., Ahmadi Gavlighi H., & Sahari M. A. (2018), Evaluation of the inhibitory effect of pistachio (*Pistacia vera L.*) green hull aqueous extract on mushroom tyrosinase activity and its application as a button mushroom postharvest anti-browning agent. *Postharvest Biology and Technology*, 145(May), 157–165.
- Ferguson L., Polito V. & Kallsen C. (2005), The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In L. Ferguson (Ed.), *Pistachio production manual*, p. 31-39. University of California Inc., U.S.A.
- Garavand F., Madadlou A., & Moini S. (2017), Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high-performance liquid chromatography– diode array detector–electro-spray ionization–mass spectrometry as affected by ultrasound and microwave. *International Journal of Food Properties*, 20, 19–29.
- Garcia E., Barrett D.M. (2002), Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. *Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology and Market*, O. Lamikanra (Ed.), p. 267-303. CRC Press, Boca Raton, FL
- Ghandahari Yazdi A. P., Barzegar M., Sahari M. A., & Ahmadi Gavlighi, H. (2018), Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Sciences and Nutrition*, 1–11.
- Giftson J. S., Jayanthi S., & Nalini N. (2010), Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1, 2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*, 28, 251–259.
- Goli S. A. H., Barzegar M., & Sahari M. A. (2005), Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, 521-525.
- Grace M.H., Esposito D., Timmers M.A., Xiong J., Yousef G., Komarnytsky S., Lila, M.A. (2016), Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry*, 210, 85–95.
- Gupta R. C. (2016). Nutraceuticals: Efficacy, safety and toxicity. London, U.K: Academic Press.
- Halliwell B. & Gutteridge J. (2007), Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press.
- Huang M.-T., Osawa T., Ho C-T., Rosen R. T. (1994), Food Phytochemicals for Cancer Prevention I -Fruits and Vegetables, American Chemical Society, Chapter 24, 294– 302.

- Ismail T., Sestili P., & Akhtar S. (2012), Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 397–405
- Kashaninejad M., & Tabil L. G. (2011), Pistachio (Pistacia vera L.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, p. 218–247.
- Kazemi M., Khodaiyan F., Labbafi M., Hosseini S. S., & Hojjati M. (2019), Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties, *Food chemistry* 271, 663-672
- Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn
 M.T., (2007), Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 1749–1770.
- Kim Do-Hee, Kim Han-Bit, Chung Hun-Sik, Moon Kwang-Deog (2014), Browning control of fresh-cut lettuce by phytoncide treatment. *Food Chemistry*, 159, 188-192.
- Küsmenoglu S., Baser K. H. C., & Özek T. (1995), Constituents of the essential oil from the hulls of Pistacia vera L. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 441–442.
- Lalegani, S., Ahmadi Gavlighi, H., Azizi, M. H., & Sarteshnizi, R. A. (2018). Inhibitory activity of phenolic-rich pistachio green hull extract-enriched pasta on key type 2 diabetes relevant enzymes and glycemic index. *Food Research International*, 105, 94–101.
- Lopez-Martinez L., Marquez-Molina O., Gutierrez-Grijalva E. P., Basilio Heredia J. (2020), Plant Phenolics and Postharvesting Technologies. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, p. 347-366.
- MacDonald-Wicks L., Wood L., Garg M. (2006), Review Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro. *Journal of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004), Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Miller N.J., Rice Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993), A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407–412.

- Mohammadi Moghaddam, T., Razavi, S. M. A., Malekzadegan, F., & Shaker Ardekani, A. (2009), Chemical composition and rheological characterization of pistachio greenhull's marmalade. *Journal of Texture Studies*, 40, 390–405.
- Noruma T., Kikuch M., Kawakami Y. (1997), Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42, 361-370.
- Ozden-Tokatli Y., Akdemir H., Tilkat E. & Onay A. (2010), Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. *Biotechnology Advances*, 28, 130 – 141.
- Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Šolmajer T., & Jerala R. (2003), Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 530–536.
- Prior R., Xianli W., Schaich K. (2005), Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (6), 1841- 1856.
- Rafiee Z., Barzegar M., Sahari M. A., & Maherani B. (2018), Nanoliposomes containing pistachio een hull's phenolic compounds as natural bio-preservatives for mayonnaise. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 220, 115-122.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez A. M., Sahari M. A., Esfahani Z.H. (2010), Anti-Microbial, and Antimutagenicity Activities of Pistachio (Pistachia Vera) Green Hull Extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 107–112.
- Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K. & Kumar M.N. (2006), Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, p. 189-207.
- Razavi S. M., Zahri S., Zarrini, G., Nazemiyeh H., & Mohammadi S. (2009), Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 35, 376–378.
- Roostaee, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Rafiee, Z. (2017). The enhancement of pistachio green hull extract functionality via nan-oliposomal formulation: Studying in soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 3620–3629
- Sadeghinejad N., Sarteshnizi R. A., Gavlighi H. A. & Barzegar M. (2019), Pistachio green hull extract as a natural antioxidant in beef patties: Effect on lipid and protein oxidation, color deterioration, and microbial stability during chilled storage. *LWT Food Science and Technology*, 102, 393-402.

- Sarteshnizi, R. A., Sahari, M. A., Gavlighi, H. A., Regenstein, J. M., & Nikoo, M. (2019), Antioxidant activity of Sind sardine hydrolysates with pistachio green hull (PGH) extracts. *Food Bioscience*, 27, 37-45.
- Schmid M. (2001), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 48 (May), 87.
- Seifzadeh N., Sahari M. A., Barzegar M., & Ahmadi Gavlighi H. (2018), Concentration of pistachio hull extract antioxidants using membrane separation and reduction of membrane fouling during process. *Food Sciences and Nutrition*, 6, 1741–1750.
- Seifzadeh, N., Sahari, M. A., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H., Calani, L., Del Rio, D., & Galaverna, G. (2019), Evaluation of polyphenolic compounds in membrane concentrated pistachio hull extract. *Food Chemistry*, 277(30), 398-406.
- Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B. (1995), Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology reviews* 59, 201-222.
- Simoes M., Bennett R. N., & Rosa E. A. S. (2009), Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26, 746–757.
- Škrovánková S., Mišurcová L. and Machů L. (2012), Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67, 75-124.
- Tabaraki R. & Ghadiri F. (2016), Comparative study of extraction methods for pistachio hull antioxidants by multiple assays. *Journal of Applied Chemistry*, 10, 19– 29.
- Watada A.E., Ko N.P., Minott D.A. (1996), Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, 9:115-125.
- Wink M. (2010), Functions and biotechnology of plant secondary metabolites.
 Annual Plant Reviews, vol. 39. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Wright J. S., Johnson E. R., & DiLabio G. A. (2001), Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173– 1183.
- Zhan L., Hu J., Pang L., Fan H. (2012), Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14:70–76.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αθανάτου Στέλλα (2009), Παραγωγή και επεξεργασία στο φιστίκι Αιγίνης. Πτυχιακή
 Μελέτη, Σχολή Τεχνολογίας-Γεωπονίας, Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων.
 Α.Τ.Ε.Ι Καλαμάτας
- Γερασόπουλος Δ. (2005), Διδακτικές σημειώσεις του μεταπτυχιακού μαθήματος:
 Έπεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων'. Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. ΑΠΘ
- Γεωργιάδου Μ. (2015), Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών με στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Συντήρησης και Επεξεργασίας Γεωργικών Προϊόντων,Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου -Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Καράταγλης Σ. (1994). Φυσιολογία Φυτών. Εκδόσεις Art of Text.
- Πάσσαμ Χ., Τσαντίλη Ε., Χριστόπουλος Μ., Καυκαλέτου Μ., Αλεξόπουλος Α.,
 Καραπάνος Ι.(2015), Μετασυλλεκτική φυσιολογία και μετασυλλεκτικοί χειρισμοί καρπών δενδροκομικών ειδών. Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, ΤΕΙ Πελοποννήσου.
- Ποντίκης Κ. Α. (1996), Ειδική Δενδροκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Τόμος Δεύτερος.
- Χιτζανίδου Α., Μουρίκης Π.Α., Χολέβας Κ.Δ. (2004), Ασθένειες & Εντομολογικοί εχθροί της φυστικιάς στην Ελλάδα. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- Dry nut processing. <u>https://www.ercad.gr/en/dry-nut-processing</u>.
- FAO (2019). Stat Database Web Page. <u>www.fao.org</u>
- Sustainable strategies for the improvement of seriously degraded agricultural areas: The example of *Pistachia vera L.* (2014). *www.agrostrat.gr*
- Tree Nuts: World Markets and Trade Current Report (2021), U.S Department of Agriculture's Foreign Agricultural Service. <u>https://www.fas.usda.gov/data/tree-nuts-</u> world-markets-and-trade
- PubChem <u>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</u>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ποιοτική Ανάλυση Εκχυλισμάτων Περικαρπίου με HPLC-MS-QTOF

Αιθανολικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

Pistachio Hull EtOH Freeze Dry

Pistachio Hull EtOH Raw, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Pistachio Hull EtOH Raw

Pistachio Hull EtOH Raw, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry

Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Υδατικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

Pistachio Hull Water Freeze Dry

Pistachio Hull Water Raw, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Pistachio Hull Water Raw

Pistachio Hull Water Raw, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Pistachio Hull Water Vacuum Dry

Pistachio Hull Water Vacuum Dry, με οξίνιση (HCOOH 1%)

Pistachio Hull EtOH Freeze Dry

<u>Γαλλικό Οξύ</u>



• <u>Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη)/Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)</u>





Pistachio Hull EtOH Freeze Dry,με οξίνιση (HCOOH 1%)

Γαλλικό Οξύ







Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη)/Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)







Μονογαλοϋλογλυκοζίτης







Πρωτοκατεχικό Οξύ



 Συριγγικό οξύ (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ)/Αιθυλ- (3, 4, 5τριυδροξυβενζοϊκό)







Pistachio Hull EtOH Raw

Γαλλικό Οξύ



Υπεροσίδη (Κερκετίνη 3-Ο-γαλακτοσίδη)/Ισοκερκετίνη (Κερκετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης)







• Μονογαλοϋλογλυκοζίτης



Pistachio Hull EtOH Raw,με οξίνιση (HCOOH 1%)





Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry

Γαλλικό Οξύ





Κερκετίνη







<u>Μονογαλοϋλογλυκοζίτης</u>









<u>Pistachio Hull EtOH Vacuum Dry,με οξίνιση (HCOOH 1%)</u>

| ×10 ⁵ | -ESI Scan-2 (dt: 9.756 min) Frag=170.0V Pistacio_hull_14_ETOH-formic acid_Vacuum Dried.d |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2- | 1033.9882 |
| 1- | 169.0139 |
| 0.8- | 966.0008 |
| 0.6 | |
| 0.4 | 112.9858 |
| 0.4 | |
| 0.2- | 68.9961 248.9598 361.0158 514.8960 650.8731 1000.0151 |
| | 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900 950 1000 1050 1100 1150 1200 1250 1300 1350 1400 1450 1500 1550 1600 1650 1700 |

| ×10 ⁵ | -ESI S | Scan:3 (rt: 9.1 | 764 min) | Frag=19 | 0.0V Pia | stacio_hu | II_14_E | TOH-fo | mic aci | id_Vacu | ım Drie | b.be | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|-----------------|-------------|---------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-----------------|-----------------|----------------------------------------|----------------|------|-----------|------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|------|--------|-----|
| 1.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1033 | 3.9884 | | | | | | | | | | | |
| 1. | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | |
| 0.8- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | 966.0 | 007 | | | | | | | | | | | | |
| 0.01 | | 16 | 9.0139 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.4- | | 125.024 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.2 | | | | 252 000 | | | | | - | | | | | - | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | _ | - Hiller | - Andrewski | 232,900 | 244 | 378.913 | žene ju | . 514.8 | 82 | | 8808. | heres | . 805. | 8006 | m da | | | 1090,0236 | 1 | 213,725 | 9 | _ | | | | | | | _ |
| | 50 | 0 100 15 | 0 200 | 250 | 300 3 | 50 400 | 450 | 500 | 550 | 600 6 | 50 71 | 00 7 | 50 80 Counts | 0 850 vs Mar | 000 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII | 950 arge (r | 1000 | 1050 1100 | 1150 | 1200 12 | 50 130 | 00 135 | 0 140 | 0 145 | 0 150 | 0 1550 | 1600 | 1650 1 | 700 |

| 1.2- | | | | | | | | | | 1033,9877 | | | | | | |
|-------|------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|---------|-------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1. | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.8 | | | | | | | | | 966.00 | 11 | | | | | | |
| 0.6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.4 | 25.0240 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.2 | 169.0141 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.2 | | 248.9586 | | 514 | 6877 | | 805. | 9806 | | 1090 | 0.0095 | 1265,9557 | | | | |
| 50 10 | 00 150 200 | 250 300 | 350 400 | 450 500 | 550 600 | 650 700 | 750 80 | 0 850 | 900 950 | 1000 1050 ' | 1100 1150 1200 | 1250 1300 | 1350 1400 | 1450 1500 | 1550 1600 | 1650 1700 |

• <u>Κερκετίνη</u>







<u>Μονογαλοϋλογλυκοζίτης</u>







Υδατικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry







Πρωτοκατεχικό Οξύ









<u>Pistachio Hull HPLC Water Freeze Dry,με οξίνιση (HCOOH 1%)</u>













Μονογαλοϋλογλυκοζίτης







Πρωτοκατεχικό Οξύ







Pistachio Hull HPLC Water Raw

Μονογαλοϋλογλυκοζίτης











<u>Pistachio Hull HPLC Water Raw,με οξίνιση (HCOOH 1%)</u>

<u>Μονογαλοϋλογλυκοζίτης</u>















Pistachio Hull HPLC Water Vacuum Dry







Πρωτοκατεχικό Οξύ







• <u>Κερκετίνη 3-Ο-γλυκουρονίδη</u>









<u>Pistachio Hull HPLC Water,με οξίνιση (HCOOH 1%)</u>







Πρωτοκατεχικό Οξύ







• <u>Κερκετίνη 3-Ο-γλυκουρονίδη</u>











