



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
& ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χημική σύσταση και *in vitro* κυτταροτοξικότητα ελαίου και υδατικού εκχυλίσματος από το περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*)



Απόστολος Ι. Τζώρτζης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, 2022

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
& ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χημική σύσταση και in vitro κυτταροτοξικότητα ελαίου και υδατικού εκχυλίσματος από το περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*)

«Chemical composition and in vitro cytotoxicity of oil and aqueous extract from the hull of shelled pistachio (*Pistacia vera*)»

Απόστολος Ι. Τζώρτζης

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α (επιβλέπων)

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γεωργία Μοσχοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Χημική σύσταση και in vitro κυτταροτοξικότητα ελαίου και υδατικού εκχυλίσματος από το περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*)

Π.Μ.Σ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων

Περίληψη

Το περικάρπιο του φιστικιού είναι ένα απόβλητο, το οποίο μελετάται για τις βιοδραστικές του ενώσεις και την αξιοποίηση αυτών σε διάφορους κλάδους, όπως σε βιομηχανίες τροφίμων, βιομηχανίες καλλυντικών και φαρμακοβιομηχανίες, έχοντας ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες. Σκοπός της εν λόγω μεταπτυχιακής εργασίας είναι η αξιολόγηση της χημικής σύστασης και η in vitro κυτταροτοξικότητα του ελαίου και του υδατικού εκχυλίσματος από το περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) της καλλιεργητικής ποικιλίας της Αιγίνης.

Αρχικά, προσδιορίστηκαν η υγρασία 78,83 (% w/w νωπού περικαρπίου), οι πρωτεΐνες 15,93 (% w/w ξηρού περικαρπίου), και η τέφρα 11,11 (% w/w ξηρού περικαρπίου) του περικαρπίου. Ακολούθησε η παραλαβή του ελαίου με συσκευή Soxhlet και με εκχυλιστή εξάνιο και προσδιορίστηκε η απόδοση σε έλαιο, η οποία κυμάνθηκε από 6,28 έως 7,66 (% w/w ξηρού περικαρπίου). Ακολούθως, έγινε ο προσδιορισμός των δεικτών k ($k_{232}=1,26$ / $k_{268}=1,63$ / $k_{270}=1,35$ / $k_{274}=1,27$) , Δk (0,0997), R (< 11,36), των ελεύθερων λιπαρών οξέων (40,49% w/w) και του αριθμού των υπεροξειδίων (AY=0,32) για την ποιοτική αξιολόγηση του παραληφθέντος ελαίου. Το έλαιο του περικαρπίου χαρακτηρίστηκε ως ένα έλαιο χαμηλής ποιότητας με υψηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών.

Ύστερα, πραγματοποιήθηκε η παραλαβή αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων των απολιπασμένων περικαρπίων τόσο με την τεχνική της κλασσικής ανάδευσης όσο και με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και προσδιορίστηκε η απόδοση της εκχύλισης. Καταλληλότερη βρέθηκε η χρήση νερού HPLC ως μέσο εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπερήχους. Μέσω της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC-MS-QTOF) των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου προσδιορίστηκαν τα ακόλουθα φαινολικά συστατικά: το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρικετρίνη, η μυρικετίνη, η καμφερόλη, η φλωρογλυκινόλη, η ναριγενίνη, το ελαγικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, η πινοσεμπρίνη, η ισορχαμνετίνη, η λουτεολίνη, το ομογεντισικό οξύ και το βανιλικό

οξύ. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος υποβοηθούμενο με υπερήχους πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου DPPH, ενώ τα ολικά φαινολικά του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προέκυψε ότι η τιμή της παρεμποδιστικής δράσης I (%) του εκχυλίσματος ανέρχεται στα 82,97%, καθώς η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων ήταν αρκετά υψηλή (17,42 mg καφεϊκού οξέος/mL), γεγονός που σηματοδοτεί ότι το αιθανολικό εκχύλισμα υποβοηθούμενο με υπερήχους παρουσιάζει μια ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τέλος, έγινε μια προσπάθεια αξιολόγησης της κυτταροτοξικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος σε επιλεγμένες καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό ήταν του ανθρώπινου νευροβλαστώματος *SK-N-SH* (ATCC® HTB-11™), του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας *HeLa* (ATCC® CCL-2™) και του ανθρώπινου παχέος εντέρου *CaCo-2*. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση στη βιωσιμότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων σύμφωνα με τη δοκιμή MTT, έπειτα από 24 και 48 h επώασης και διαπιστώθηκε μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά *SK-N-SH* έναντι των κυτταρικών σειρών *HeLa* και *CaCo-2*.

Επιστημονική περιοχή: Περικάρπιο φιστικιού

Λέξεις-Κλειδιά: Περικάρπιο, *P.vera*, Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, Έλαιο απόδοση εκχύλισης, Υγρή χρωματογραφία, Φασματοσκοπία μαζών, Αντιοξειδωτική δράση, Κυτταροτοξικότητα

Chemical composition and in vitro cytotoxicity of oil and aqueous extract from the hull of shelled pistachio (*Pistacia vera*)

MSc Food Science & Technology & Human Nutrition
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Engineering, Processing & Preservation of Agricultural Foods

Abstract

Pistachio hull is a waste product, which is being studied for its bioactive compounds and their utilization in various sectors, such as food, cosmetics and pharmaceutical industries, having various beneficial properties. The aim of this master's thesis is to evaluate the chemical composition and in vitro cytotoxicity of the oil and aqueous extract from the hulls of pistachio (*Pistacia vera*) of the Aegina cultivar.

Initially, the moisture 78,83 (% w/w wet hull), protein 15,93 (% w/w dry hull), and ash 11.11 (% w/w dry hull) of the hull were determined. Then, the oil was extracted by Soxhlet apparatus and hexane extractor, the oil yield was determined and ranged from 6,28 to 7,66 (% w/w dry hull). Subsequently, k ($k_{232}=1.26$ / $k_{268}=1.63$ / $k_{270}=1.35$ / $k_{274}=1.27$), Δk (0.0997), R (< 11.36), free fatty acids (40.49% w/w) and peroxide number ($AY=0.32$) were determined for quality evaluation of the obtained oil. The hull oil was characterized as a low-quality oil with high concentration of antioxidants.

Subsequently, the extraction of ethanolic and aqueous extracts of the defatted hulls by both classical stirring and ultrasound-assisted extraction techniques was carried out and the extraction efficiency was determined. HPLC water was found to be more suitable as an ultrasound-assisted extraction medium. By chromatographic study (HPLC-MS-QTOF) of ethanolic and aqueous extracts of hull were determined the following phenolic components: protocatechuic acid, gallic acid, myricetin, myricetin, camphor, floroglucinol, narygenin, oleic acid, p-coumaric acid, 4-hydroxybenzoic acid, pinosebrin, isorhamnetin, luteolin, homogenetic acid and vanillic acid. Determination of the antioxidant capacity of the ultrasound-assisted ethanolic extract was carried out using the DPPH method, while the total phenolics of the extract were determined by the Folin-Ciocalteu method. According to the results, it was found that the value of inhibitory activity I (%) of the extract was 82.97%, as the concentration of total phenolic compounds was quite high (17.42 mg caffeic acid/mL), which signals that the ultrasound-assisted ethanolic extract exhibits a strong antioxidant ability.

Finally, an attempt was made to evaluate the cytotoxic activity of the aqueous extract in selected cultures of human cell lines. The cell lines used for this purpose were human neuroblastoma SK-N-SH (ATCC® HTB-11™), human cervical adenocarcinoma HeLa (ATCC® CCL-2™) and human colon CaCo-2. In this context, the effect on viability of different concentrations according to the MTT assay was studied after 24 and 48 h of incubation and a greater cytotoxic effect was found in the SK-N-SH cell line compared to the HeLa and CaCo-2 cell lines.

Scientific area: Pistachio hull

Keywords: Hull, *P.vera*, Physicochemical characteristics, Oil extraction performance, Liquid chromatography- Mass spectroscopy, Antioxidant activity, Cytotoxicity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στα εργαστήρια της Γενικής Χημείας, της Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων και της Κυτταρικής Τεχνολογίας, του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον εισηγητή της παρούσας διπλωματικής εργασίας κ. Χρήστο Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή. Τον ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για τη συνεχή καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς με το άρτιο επιστημονικό υπόβαθρο του συντέλεσε στην εκπόνηση και συγγραφή της διπλωματικής εργασίας μου. Χρωστάω, επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Μαρία Γεωργιάδου (Μέλος ΔΕΠ) για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε προκειμένου να μου δώσει σημαντικές συμβουλές και εξηγήσεις πάνω στο θέμα.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους υποψηφίους διδάκτορες του Γ.Π.Α, την Καπαράκου Ελευθερία, τον Ξαγοράκη Μαρίνο και τον Τσεκούρα Βασίλη, για την άψογη συνεργασία σε όλα τα στάδια του πειράματος καθώς και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Όποτε χρειάστηκα κάτι ήταν πάντα εκεί και τους ευχαριστώ γι' αυτό.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Νικόλαο Στοφόρο και κα. Γεωργία Μοσχοπούλου, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την αρτιότερη εκτέλεση και παρουσίαση της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια συνέπασχαν μαζί μου και μου προσέφεραν ό,τι μπορούσαν για να επιτύχω τον στόχο μου καθώς και όλους τους φίλους μου που με στήριζαν στην προσπάθεια αυτή.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1. Η ΦΙΣΤΙΚΙΑ	13
1.1 ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΦΙΣΤΙΚΙΑΣ	13
1.1.1 Βοτανική περιγραφή.....	13
1.1.2 Ιστορικά στοιχεία.....	14
1.1.3 Χρήσεις των ειδών <i>Pistacia</i>	15
1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ.....	16
1.2.1 Η καλλιέργεια της φιστικιάς ανά τον κόσμο	16
1.2.2 Η καλλιέργεια της φιστικιάς στην Ελλάδα	17
1.2.3 Οικονομική σημασία και χρήσεις	20
2. Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΟΥ <i>P.VERA</i>	22
2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ	22
2.2 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ (<i>P.VERA</i>)	24
2.2.1 Το περικάρπιο ως αποβάντο των φιστικιών	24
2.2.2 Η χρήση του περικάρπιου	25
2.2.3 Λιπαρά οξέα περικαρπίου φιστικιών.....	27
3. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	29
3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	30
3.2 IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	31
3.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ	32
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	33
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	34
4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ.....	34
4.2.1 Πειραματική διαδικασία	34
4.2.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	35
4.2.3 Συμπέρασμα.....	35
4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	36
4.3.1 Πειραματική διαδικασία	36
4.3.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση	39
4.3.3 Συμπέρασμα.....	39
4.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΕΦΡΑ	39
4.4.1 Πειραματική Διαδικασία.....	39
4.4.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση	41
4.4.3 Συμπέρασμα.....	41
4.5 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ-ΆΛΕΞΗ	41
4.6 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΛΑΙΟΥ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΜΕ SOXHLET	42
4.6.1 Πειραματική Διαδικασία.....	42
4.6.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση	44
4.6.3 Συμπεράσματα	44
5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΛΑΙΟΥ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ	45

5.1	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΔΙΑΘΛΑΣΗ	45
5.1.1	Πειραματική Διαδικασία	45
5.1.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση	45
5.1.3	Συμπέρασμα.....	46
5.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ	46
5.2.1	Πειραματική Διαδικασία	46
5.2.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση	47
5.2.3	Συμπέρασμα.....	48
5.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ.....	48
5.3.1	Πειραματική Διαδικασία	49
5.3.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση	50
5.3.3	Συμπέρασμα.....	50
5.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ K, ΔK ΚΑΙ R ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ UV-VIS	50
5.4.1	Πειραματική Διαδικασία.....	51
5.4.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση	52
5.4.3	Συμπέρασμα.....	53
6	ΜΕΛΕΤΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ (P.VERA)	54
6.1	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	54
6.1.1	Κωδικοποίηση δειγμάτων	54
6.1.2	Πειραματική διαδικασία.....	55
6.1.2.1	Αιθανολικά εκχυλίσματα.....	55
6.1.2.2	Υδατικά εκχυλίσματα.....	55
6.1.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση	56
6.1.4	Συμπέρασμα.....	58
6.2	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (LC-MS-QTOF)	58
6.2.1	Πειραματική διαδικασία	58
6.2.2	Αποτελέσματα- Συζήτηση	59
6.2.2.1	ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	59
6.2.2.1.1	Εκχυλίσματα με την τεχνική της ανάδευσης	59
6.2.2.1.2	Εκχυλίσματα υποβοηθούμενα με υπερήχους	62
6.2.2.2	ΥΔΑΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ	65
6.2.2.2.1	Εκχυλίσματα με την τεχνική της ανάδευσης	65
6.2.2.2.2	Εκχυλίσματα υποβοηθούμενα με υπερήχους	67
6.2.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	70
6.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΗΣΗΣ ΑΠΟ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ	70
6.3.1	Δοκιμή DPPH.....	70
6.3.2	Πειραματική διαδικασία	71
6.3.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	72
6.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	73
6.4.1	Μέθοδο Folin-Ciocalteu	73
6.4.2	Πειραματική διαδικασία	73
6.4.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	74
6.4.4	Συμπεράσματα	76
7.	ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟΥ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ (P.VERA)	77
7.1.	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	77
7.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΠΛΑΚΑ ΝΕUBAUER.....	78
7.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	79
7.3.1	Δοκιμή MTT	79
7.3.2	Πειραματική Διαδικασία	80
7.3.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση	80
7.3.4	Συμπέρασμα.....	84

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Οι καρποί της φιστικιάς <i>P.vera</i> (πηγή agroselida.blogspot.com).....	13
Εικόνα 2: Η παραγωγή της φιστικιάς παγκοσμίως (πηγή atlasbig.com).....	17
Εικόνα 3: Το δέντρο της φιστικιάς (Ferguson and Haviland, 2016).....	21
Εικόνα 4: Άγρια φιστικιά που αναπτύσσεται σε απότομες πλαγιές στους πρόποδες της οροσειράς Chatkalsky, Ουζμπεκιστάν (Khanazarov et al., 2009).....	23
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση 3 κύριων κάθετων διαστάσεων του φιστικιού. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον πυρήνα μέσα στο περικόχλιο (Kashaninejad and Tabil, 2011).....	23
Εικόνα 6: Διάθεση αποβλήτων επεξεργασίας φιστικιών στο έδαφος (Ντούλα, Κομνίτσας και Σαρρής, 2013).	25
Εικόνα 7: Ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο SiO_2	35
Εικόνα 8: Συσκευή υγρής καύσης (εφοδιασμένη με διάταξη απαγωγής αερίων) Velp Scientifica (Du6).....	37
Εικόνα 9: Συσκευή απόσταξης Kjeldahl™ 8100 Distillation Unit, 220V/50Hz, με ρυθμιζόμενο πρόγραμμα.....	38
Εικόνα 10: Απεικόνιση της μεταβολής του χρώματος του $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ κατά την τιτλοδότηση με HCl	38
Εικόνα 11: Φούρνος αποτέφρωσης Vulcan 3-550 NEY	40
Εικόνα 12: Εργαστηριακός μύλος άλεσης (Tekmar A-10).	42
Εικόνα 13: Συσκευή Soxhlet.....	42
Εικόνα 14: Περιστροφικός εξαμιστήρας κενού	43
Εικόνα 15: Διαθλασίμετρο Abbe Refractometer, WAY-1S.....	45
Εικόνα 16: Συσκευή τιτλοδότησης, εξουδετέρωση διαλύματος έως ότου αλλάξει το χρώμα του δείκτη.....	47
Εικόνα 17: Αποχρωματισμός του δείκτη αμύλου.....	49
Εικόνα 18: Φασματοφωτόμετρο UV-Vis.....	51
Εικόνα 19: Μαγνητικός αναδευτήρας (αριστερά) και λουτρό υπερήχων (δεξιά).....	55
Εικόνα 20: Συσκευή φυγοκέντρισης.....	56
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ανάδευσης.	61
Εικόνα 22: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος	61
Εικόνα 23: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος.....	61
Εικόνα 24: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης.....	61
Εικόνα 25: Φάσμα μαζών μυρικετίνης.....	62
Εικόνα 26: Φάσμα μαζών καμφερόλης.....	62
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με υπέρηχους.....	63
Εικόνα 28: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος.....	64

Εικόνα 29: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος.....	64
Εικόνα 30: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης.....	64
Εικόνα 31: Φάσμα μαζών καμφερόλης.....	65
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ανάδευσης.	66
Εικόνα 33: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος.....	66
Εικόνα 34: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος.....	67
Εικόνα 35: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης.....	67
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με υπέρηχους.....	68
Εικόνα 37: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος.....	69
Εικόνα 38: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος.....	69
Εικόνα 39: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης.....	69
Εικόνα 40: Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH (Molyneux ,2003).....	71
Εικόνα 41: Αποχρωματισμός αιθανολικού εκχυλίσματος με τη δοκιμή DPPH.....	72
Εικόνα 42: Πρότυπη καμπύλη Trolox για την δοκιμή DPPH σε αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού (P.vera).....	72
Εικόνα 43: Αιθανολικό εκχύλισμα με το αντιδραστήριο (F-C), δημιουργώντας στα διαλύματα ένα βαθύ μπλε χρώμα. Στην δεξιά πλευρά των διαλυμάτων είναι ο μάρτυρας (ακετόνη) που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις.	74
Εικόνα 44: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο (F-C) σε αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού (P.vera).	75
Εικόνα 45: Σχηματική απεικόνιση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer (Green and Sambrook, 2019).....	78
Εικόνα 46: Το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) μετατρέπεται σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Kumar, Nagarajan and Pradeep 2018).....	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του δένδρου Pistacia vera (Γεωργιάδου, 2015).	14
Πίνακας 2: Προφίλ λιπαρών οξέων από περικάρπιο φιστικιών (επί ξηρού βάρους) (Arjeh et al., 2020)	27
Πίνακας 3: Ταξινόμηση διαπιστευμένων δοκιμών βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας κυττάρων (Narayan, 2021).....	31
Πίνακας 4: Πειραματικά δεδομένα και η τιμή της οξύτητας ελαίου περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (P.vera).....	48
Πίνακας 5: Τιμές μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (AY) σε έλαιο περικαρπίου φιστικιού (P.vera).....	50
Πίνακας 6: Τιμές ειδικής απόσβεσης σε διαφορετικά μήκη κύματος σε έλαιο περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (P.vera).....	52
Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων βάσει τύπου διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης..	54
Πίνακας 8: Κωδικοποίηση δειγμάτων για ανάλυση με LC-MS QTOF.....	58
Πίνακας 9: Σύσταση (% v/v) της κινητής φάσης της χρωματογραφικής αναλυτή	59
Πίνακας 10: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος, με την τεχνική της απλής εκχύλισης, λυοφιλιωμένου περικαρπίου.	60
Πίνακας 11: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους, λυοφιλιωμένου περικαρπίου.....	62

Πίνακας 12: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος, με την τεχνική της απλής ανάδευσης, λυοφιλιωμένου περικαρπίου.....	65
Πίνακας 13: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, λυοφιλιωμένου περικαρπίου.	67
Πίνακας 14: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού δείγματος με τη δοκιμή DPPH και η συγκέντρωση του σε ισοδύναμα Trolox (mM).	73
Πίνακας 15: Υπολογισμός συγκέντρωσης του αιθανολικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο (F-C).....	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Απόδοση εκχυλίσεων απολιπασμένου περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (<i>P.vera</i>) με δυο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης και δυο διαφορετικούς διαλύτες.	56
Διάγραμμα 2: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων SK-N-SH σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5,5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 7 διαφορετικών μετρήσεων ± τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).	81
Διάγραμμα 3: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων HeLa σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 5 διαφορετικών μετρήσεων ± τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).	82
Διάγραμμα 4: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων CaCo-2 σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 5 διαφορετικών μετρήσεων ± τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).	83

Εισαγωγή

1. Η φιστικιά

1.1 Τα χαρακτηριστικά της φιστικιάς

Στο κεφάλαιο αυτό της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα αναλυθούν τα βασικά χαρακτηριστικά του φυτού της φιστικιάς, καθώς επίσης θα παρουσιαστεί και η ιστορική της σημασία της μαζί με τις χρήσεις της.

1.1.1 Βοτανική περιγραφή

Οι φιστικιές είναι φυτά μικρού έως μεσαίου μεγέθους και μπορούν να αναπτυχθούν έως και 12 m, αλλά είναι εν γένει μικρότερα κατά την περίοδο καλλιέργειας. Τα φύλλα είναι σύνθετα κυρίως με τρία φύλλα, αλλά και ορισμένες φορές με πέντε. Τα σχήματά τους ποικίλλουν από ωοειδή σε επιμήκη με σκούρο πράσινο χρώμα στο πάνω και πιο ανοιχτόχρωμο στο κάτω μέρος τους. Η ποικιλομορφία των φιστικιών εξαρτάται από τη θέση τους, η οποία μπορεί να είναι σε δάση-στέπες, στέπες ή ημι-έρημους. Η άνθιση λαμβάνει χώρα στα τέλη Μαΐου και μετά την πάροδο περίπου τριών εβδομάδων μεγαλώνουν και διαφοροποιούνται γρηγορότερα (Kashaninejad and Tabil, 2011).



Εικόνα 1: Οι καρποί της φιστικιάς *P.vera* (πηγή agroselida.blogspot.com).

Το γένος *Pistacia* ανήκει στα *Anacardiaceae*, μια οικογένεια που περιλαμβάνει περίπου 70 γένη και πάνω από 600 είδη. Τα είδη του γένους *Pistacia* είναι αειθαλείς ή φυλλοβόλοι θάμνοι και δέντρα, που φέρουν ρητίνη και έχουν ύψος 8-10 m. Τα είδη *P.*

lentiscus, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. vera* και *P. khinjuk* ανευρίσκονται από τη λεκάνη της Μεσογείου έως την Κεντρική Ασία. Ωστόσο, το *P.vera* είναι το μοναδικό είδος του γένους που καλλιεργείται για εμπορικούς λόγους.

Η συστηματική ταξινόμηση του Δένδρου *Pistacia vera* είναι:

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του δένδρου *Pistacia vera* (Γεωργιάδου, 2015).

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Υφομοταξία	Ροδίδες (Rosidae)
Τάξη	Σαπινδώδη (Sapindales)
Οικογένεια	Ανακαρδιοειδή (Anacardiaceae)
Γένος	Πιστακία (<i>Pistacia</i>)
Είδος	Πιστακία η γνήσια (<i>Pistacia vera</i>)

Η φιστικιά *P. vera* είναι δένδρο φυλλοβόλο βραδείας ανάπτυξης. Έχει εκτεταμένο ριζικό σύστημα και φτάνει σε μεγάλα βάθη. Ο καρπός είναι δρύπη, με επίμηκες ωοειδές σχήμα και αποτελείται από το περικάρπιο (φλοιός), το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος) και το σπέρμα (ψίχα). Κατά την ωρίμανση, το περικάρπιο μαλακώνει και αποκολλάται από το κέλυφος. Επίσης, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας του *Pistacia vera* είναι το σχίσσιμο του κελύφους κατά μήκος της ραφής, πράγμα που αποτελεί ιδιομορφία σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pistacia* (Γεωργιάδου, 2015).

1.1.2 Ιστορικά στοιχεία

Η λέξη φιστίκι προέρχεται από τη λέξη *pista-pistak* αρχαίας περσικής γλώσσας. Το κοινό όνομα του φιστικιού σε διαφορετικές γλώσσες είναι: *Peste* (Περσικά), *Pistache* (Γαλλικά), *Pistazie* (Γερμανία), *Pistacchio* (Ιταλικά), *Pistacho* (Ισπανικά), *Pista* (Indian), *Pistasch* (Σουηδικά), *Fustuq* (Αραβικά) και *Pisutachio* (Ιαπωνικά).

Η προέλευση του φιστικιού εντοπίζεται στην Μικρά Ασία (σημερινή Τουρκία), το Ιράν, η Συρία, ο Λίβανος, ο Καύκασος στη νότια Ρωσία και το Αφγανιστάν. Το πιθανότερο είναι να αναπτύχθηκε σε περιοχές που βρίσκονται στα βάθη της ερήμου,

αφού η καλλιέργεια του απαιτεί μακρά, ζεστά καλοκαίρια για την ωρίμανση, καθώς είναι ανθεκτικό στην ξηρασία, ακόμα και σε εδάφη με υψηλή αλατότητα, και έχει υψηλές «απαιτήσεις» το χειμώνα (Kashaninejad and Tabil, 2011).

Η πρώτη αναφορά στη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία θεωρείται ότι έγινε από το Θεόφραστο, 3^{ος}-4^{ος} αιώνας π.Χ., ο οποίος περιγράφει: «όπως λένε στην Ινδική και τη Βακτρία φύεται ένα δένδρο όμοιο με την τέρμινθον ως προς τα φύλλα, τους κλάδους και τα άλλα, διαφορετικό όμως προς τον καρπό. Οι καρποί είναι κάρνα που μοιάζουν με αμύγδαλα, αλλά είναι μικρότεροι και το κέλυφός τους δεν είναι τραχύ, στη γεύση δε, είναι πολύ νοστιμότεροι από τα αμύγδαλα και γι' αυτό προτιμώνται». Ο Αθηναίος από την Αλεξάνδρεια, τον 2^ο αι. μ.Χ. γράφει: «τα φιστίκια τα οποία προσφέρονται στο τραπέζι των σοφών, σύμφωνα με τα τότε γνωστά, παράγονται στη Συρία και την Αραβία. Ο καρπός είναι λευκόφαιος, μακρός, πράσινος στο εσωτερικό και, ενώ είναι λιγότερο χυμώδης από τον σπόρο της κουκουναριάς, είναι περισσότερο εύγευστος από αυτόν» (Γεωργιάδου, 2015).

1.1.3 Χρήσεις των ειδών *Pistacia*

Διαφορετικά μέρη των ειδών *Pistacia*, όπως η ρητίνη, ο καρπός και τα φύλλα παραδοσιακά καλλιεργούνται για ένα ευρύ φάσμα χρήσεων. Για παράδειγμα, η ρητίνη του *P. lentiscus* χρησιμοποιείται για πλήθος γαστρικών παθήσεων στις χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής τα τελευταία 3000 χρόνια. Χρησιμοποιήθηκε στην αρχαία Αίγυπτο ως θυμίαμα. Έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό και αρωματικό της αναπνοής.

Οι περισσότερες από τις παραδοσιακές αναφορές χρήσεων για τη ρητίνη του *P. atlantica* προέρχονται από το Ιράν, όπου έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πεπτικών, ηπατικών και νεφρικών παθήσεων. Οι καρποί του *P. vera* χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο. Αρχαία σχετικά με την κατανάλωση φιστικιού ως βρώσιμου χρονολογούνται από το 7000 π.Χ.. Το φιστίκι καλλιεργείται στη Μέση Ανατολή, στις Ηνωμένες Πολιτείες και στις μεσογειακές χώρες. Το Ιράν είναι ένας από τους μεγαλύτερους παραγωγούς και εξαγωγείς φιστικιών.

Στην παραδοσιακή ιρανική ιατρική, διάφορα μέρη των *P. vera*, *P. atlantica*, *P. khinjuk*, *P. terebinthus* και *P. lentiscus* έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα ως χρήσιμες θεραπείες για διάφορες ασθένειες, όπως για παράδειγμα, ο πυρήνας των καρπών του *P. vera* ως τονωτικό της καρδιάς, του στομάχου, του ήπατος και του εγκεφάλου, οι καρποί του *P. atlantica*, *P. Khinjuk* και *P. terebinthus* για την

αφροδισιακή τους δράση και τη θεραπεία διαταραχών του ήπατος, των νεφρών, της καρδιάς και του αναπνευστικού συστήματος και η ρητίνη των *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. khinjuk* και *P. terebinthus* για την επούλωση των πληγών και τη θεραπεία εγκεφαλικών και γαστρεντερικών διαταραχών (Bozorgi et al., 2013).

1.2 Καλλιέργεια και οικονομική σημασία

Αφού, λοιπόν, προηγήθηκε η ανάλυση των γενικών χαρακτηριστικών της φιστικιάς, στο κεφάλαιο αυτό θα ακολουθήσει η παράθεση εκείνων των στοιχείων που τεκμηριώνουν την σημασία της καλλιέργειας του φιστικιού και τα οικονομικά οφέλη αυτής, όπως επίσης και η αξία που έχει η ορθή αξιολόγηση του περικόρπιου της.

1.2.1 Η καλλιέργεια της φιστικιάς ανά τον κόσμο

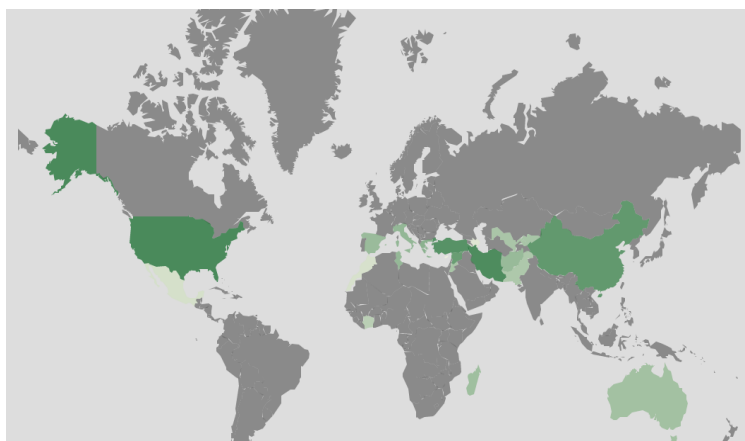
Πράγματι, η παγκόσμια εμπορική παραγωγή φιστικιών αυξήθηκε περισσότερο από δέκα φορές, από 47.584 τόνους το 1970 σε 517.823 τόνους το 2007. Φιστίκια παράγονται στο εμπόριο σε 18 χώρες σε έκταση 608.729 εκταρίων. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), οι κορυφαίοι έξι παραγωγοί φιστικιών το 2007 ήταν το Ιράν με 230.000 τόνους (ποσοστό 44,4% της παγκόσμιας παραγωγής), ακολουθούμενο από το Ηνωμένες Πολιτείες (108.598 τόνους, ποσοστό 20,97%), Τουρκία (73.416 τόνους, ποσοστό 14,18%), Συρία (52.066 τόνους, ποσοστό 10,05%), Κίνα (38.000 τόνους, ποσοστό 7,34%) και η Ελλάδα (9.000 τόνους, ποσοστό 1,7%) (Kashaninejad and Tabil, 2011). Η συνολική παγκόσμια παραγωγή φιστικιού το 2016 εκτιμήθηκε σε 1.057.566 τόνους, εκ των οποίων περίπου το 68% παρήχθη στις ΗΠΑ και το Ιράν, ακολουθούμενες από την Τουρκία (16%), την Κίνα (7,5%) και τη Συρία (5%) (FAOSTAT, 2016).

Οι καλλιέργειες πρόσφατα αυξήθηκαν δραματικά στις μεγάλες παραγωγικές χώρες του Ιράν, των Ηνωμένων Πολιτειών και της Τουρκίας. Για παράδειγμα, οι εκτάσεις παραγωγής φιστικιών στις Ηνωμένες Πολιτείες αυξήθηκαν από 688 το 1977 σε 46.136 εκτάρια το 2007. Στο Ιράν αυξήθηκαν από 47.000 σε 440.000 εκτάρια κατά την ίδια περίοδο. Παρόλο που η παραγωγή φιστικιών έχει ξεκινήσει και σε χώρες όπως η Αυστραλία, το Μεξικό, η Αργεντινή και η Νότια Αφρική, ο αριθμός παραγωγής τους εκεί δεν έχει φτάσει σε ανταγωνιστικά επίπεδα.

Η μέση απόδοση ανά δέντρο κυμαίνεται από 2 έως 22,5 kg/έτος. Κατά μέσο όρο 3 kg φιστίκια αποδίδουν 1 kg ψίχα φιστικιού. Η παγκόσμια εξαγωγή φιστικιών αυξήθηκε από 13.531 τόνους (αξίας 1,36 \$ εκατομμύρια) το 1970 σε 313.372 τόνους

(αξίας 1,36 \$ δισεκατομμυρίων) το 2007. Το Ιράν και η Τουρκία υπήρξαν οι μεγαλύτεροι εξαγωγείς το 1970 με 74 και 25% των παγκόσμιων εξαγωγών, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την FAO, το Ιράν ήταν ο μεγαλύτερος εξαγωγέας φιστικιών το 2006 με 163.431 τόνους ή το 55% των παγκόσμιων εξαγωγών και ακολουθείται από τις Ηνωμένες Πολιτείες με 48571 tons ή 17% της παγκόσμιας εξαγωγής. Οι περισσότερες εξαγωγές ιρανικού φιστικιού προορίζονται για το Χονγκ Κονγκ, τη Γερμανία, τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, τη Ρωσία, την Ισπανία, την Ιταλία και την Ινδία (Kashaninejad and Tabil, 2011).

Η παγκόσμια παραγωγή φιστικιών συνεχίζεται με ανοδική τάση. Η αύξηση της ζήτησης για φιστίκια έχει αυξήσει την ανάγκη παραγωγής περισσότερων φιστικιών μέσω κλωνικής φύτευσης. Στην τρέχουσα και παραδοσιακή κηπουρική πρακτική, η αναπαραγωγή και η επιλογή του φιστικιού είναι δαπανηρή και χρονοβόρα. Η πολιτιστική βελτίωση και η εμπορική διάδοση ήταν μάλλον δύσκολη λόγω της υψηλής ετεροζυγωτικότητας. Ωστόσο, η βιοτεχνολογία των φυτών προσφέρει ταχεία κλωνοποίηση του μικροβλαστικού στελέχους, τη σωματική εμβρυογένεση, δηλαδή την ανάπτυξη σωματικών εμβρυοειδών από καλλιεργημένα σωματικά κύτταρα/ιστούς. Αυτή η μέθοδος, όμως, δεν έχει χρησιμοποιηθεί για εμπορική χρήση, γιατί μόνο τα νεαρά εκφυτεύματα ανταποκρίνονται και τα αναγεννημένα φυτά δεν έχουν δοκιμαστεί επαρκώς (Iain and Gupta, 2005).



Εικόνα 2: Η παραγωγή της φιστικιάς παγκοσμίως (πηγή atlasbig.com).

1.2.2 Η καλλιέργεια της φιστικιάς στην Ελλάδα

Το γένος *Pistacia* (*Anacardiaceae* Family) περιλαμβάνει περισσότερα από 11 είδη. Αυτά τα είδη χαρακτηρίζονται από ορισμένα κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως συνθετικά φύλλα, δομή του αρσενικού καρπού και υφή των φύλλων. Τα

περισσότερα από αυτά τα είδη χρησιμοποιούνται ως ρίζα για το *P. vera*, η οποία είναι η μόνη εμπορική ποικιλία λόγω των μεγάλων και βρώσιμων ξηρών καρπών με υψηλή θρεπτική αξία. Τέσσερα είδη *Pistacia* είναι εγγενή στην Ελλάδα σύμφωνα με τον Zohary (1952), δηλαδή, *P. atlantica*, *P. lentiscus*, *P. palaestina* και *P. terebinthus*, ενώ μόνο η *P. vera* εισήχθη από τις Ανατολικές Μεσογειακές χώρες από τους Ρωμαίους και στη συνέχεια από τους Βυζαντινούς.

Το φιστίκι (*P. vera*) είναι ένα δίοικο και φυλλοβόλο είδος, που προέρχεται από τη Δυτική και Κεντρική Ασία. Η πρώτη εμπορική φυτεία στην Ελλάδα ιδρύθηκε γύρω στο 1860 σε μια περιοχή κοντά στην Αθήνα. Στη συνέχεια ιδρύθηκαν φυτείες στην περιοχή της Αττικής και στην Αίγινα στα τέλη του 19ου αιώνα. Το *P. terebinthus* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα στην αρχή της καλλιέργειας, το οποίο αντικαταστάθηκε αργότερα από την ποικιλία Tsikoudia. Το φιστίκι καλλιεργείται σε μια ευρεία περιοχή με διαφορετικές κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες. Σήμερα, καλλιεργούνται 4500 ha σε μια ευρεία περιοχή από τη Χαλκιδική στην Κρήτη και από τη Ζάκυνθο στα νησιά του Αιγαίου (Χίος, Μυτιλήνη, Σάμος, Ρόδος κ.λπ.). Ο αριθμός των καλλιεργημένων δέντρων στην Ελλάδα είναι κοντά σε ένα εκατομμύριο.

Μια νέα θηλυκή ποικιλία, *Pontikis*, εισήχθη πρόσφατα σε ελληνικές φυτείες, αλλά καλλιεργείται σε λιγότερο από το 1% της συνολικής έκτασης φιστικιών. Σύμφωνα με τον Ρούσκα (1995) η ποικιλία της Αίγινας βρίσκεται σε τρεις παραλλαγές, με την ονομασία νυχάτο (ή κινεζάκι), φουντουκάτο και κιλαράτο. Το δέντρο μπορεί να προσαρμόζεται εύκολα σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές απαιτήσεις. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι στο νησί της Σαντορίνης, όπου τα δέντρα αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλό ύψος, για να προστατεύονται από δυνατούς ανέμους. Τα φύλλα στην Αίγινα έχουν μήκος 17–22 cm και πλάτος 14–17 cm. Τα μπουμπούκια λουλουδιών είναι μεγάλα (9×6×4 mm) με στενό ωοειδές σχήμα με αποτέλεσμα κωνικές ταξιανθίες. Η ταξιανθία παράγει 8–18 πλευρικά κλαδιά και η αφθονία τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως ενδιάμεση.

Κατά τη διάρκεια της συγκομιδής το ποσοστό των σπασμένων καρπών είναι συχνά κοντά 90%. Το άνοιγμα ράμματος των σπασμένων καρπών ποικίλλει από στενό έως μέτριο. Το βάρος των 100 ξηρών καρπών είναι 100 g. Ο πυρήνας έχει εξαιρετική γεύση, είναι αρκετά ζουμερός και έχει πράσινο χρώμα. Το χρώμα δε του πυρήνα είναι κοκκινωπό. Οι χημικές αναλύσεις έδειξαν ότι 100 g φρέσκοι πυρήνες της Αίγινας περιέχουν 53,5% λίπος, 24% πρωτεΐνες, 14,5% υδατάνθρακες και 6,1% νερό. Το ελαϊκό οξύ είναι το κύριο λιπαρό οξύ (58%).

Σε μη αρδευόμενες περιοχές η ποικιλία μπορεί να διατηρηθεί σε καλές αποδόσεις παραγωγής, όπως έχουν καταγραφεί στις καλλιέργειες της Αίγινας. Τρεις διαφορετικές επιλογές χρησιμοποιούνται ως επικονιαστές για την Αίγινα: επιλογή Α, επιλογή Β και επιλογή Γ. Η επιλογή Α περιλαμβάνει δέντρα με όρθια ανάπτυξη. Τα φύλλα του έχουν πέντε ή επτά φυλλάρια. Τα πλευρικά φύλλα δεν έχουν μίσχο, αυτά είναι παρόντα μόνο στο τελικό φυλλάριο. Το σχήμα των φύλλων είναι ελλειπτικό ή ωοειδές (50-100 έως 45-60 mm) και το χρώμα τους είναι σκούρο πράσινο. Ο σχηματισμός των μπουμπουκιών των λουλουδιών γίνεται πολύ νωρίς σε νέα δέντρα. Η αφθονία των ανθέων στα παλιά δέντρα είναι ένα πολύ καλό χαρακτηριστικό για αυτήν την ποικιλία.

Οι ταξιανθίες της επιλογής Α έχουν κωνικό σχήμα και η άνθιση λαμβάνει χώρα 7–15 ημέρες πριν από την επιλογή Α. Χαρακτηριστικά όπως φύλλα, βλαστικά μπουμπούκια και κορμός έχουν χρώμα παρόμοιο με εκείνο της Tsikoudias. Η επιλογή Β περιλαμβάνει πολύ έντονα δέντρα, χαρακτηρίζεται από πολύ πρόωμη άνθιση (παρατεταμένη νεανική ηλικία έως επτά χρόνια). Τα φύλλα του έχουν επτά έως εννέα φυλλάρια σπάνια πέντε, και είναι ελλειπτικά (70-90 επί 30-40 mm) με κυματιστό μοτίβο. Τα μπουμπούκια λουλουδιών της επιλογής Β είναι διαφορετικά σε σχέση με τις επιλογές. Στην πραγματικότητα, αυτό είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό: οι κορυφές των καλυμμάτων τους (φύλλα bracts) ξεδιπλώνονται δίνοντας την εντύπωση των ακανθωτών μπουμπουκιών κατά την περίοδο «κινητοποίησης» του χυμού. Επιπλέον, το μέγεθος αυτών των μπουμπουκιών είναι μικρότερο και πιο έντονο από εκείνο που βρίσκεται στα άνθη μπουμπουκιών άλλων ποικιλιών. Ο χρόνος άνθισης πραγματοποιείται επτά ημέρες αργότερα από ό, τι στην ποικιλία Α. Η ποικιλία Γ χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσο σθένος παρόμοιο με αυτό της Αίγινας.

Η διακλάδωση είναι πυκνή και τα φύλλα της είναι παρόμοια με αυτά της Αίγινας. Τα φύλλα του έχουν τρία έως πέντε φυλλάρια (70-110 επί 40-70 mm) και είναι όλα στρογγυλά ωοειδή εκτός από το τερματικό φυλλάριο του οποίου το σχήμα είναι στρογγυλό, όπως στο τελικό φυλλάριο του *P. vera*. Το χρώμα των φύλλων είναι ανοιχτό πράσινο. Συχνά τα φυλλάρια καλύπτουν το ένα το άλλο, ιδιαίτερα όταν το φύλλο αποτελείται από πέντε φυλλάρια. Τα μπουμπούκια λουλουδιών είναι γενικά ωοειδή και μεγαλύτερα από αυτά που βρίσκονται σε άλλες ποικιλίες. Τα δέντρα αυτής της ποικιλίας έχουν ενδιάμεση ανάπτυξη, πολύ παχιά βλαστάρια, πολύ μεγάλα μπουμπούκια λουλουδιών, αργά ανθισμένα και φύλλα παρόμοια με αυτά του *P. vera*. (Zakynthinos and Rouskas, 2001).

Μεταξύ των χωρών της ΕΕ, η Ελλάδα έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή ακολουθούμενη από την Ιταλία. Στην Ελλάδα, φιστίκια παράγονται κυρίως στις περιοχές της Αττικής (Αίγινα και Μέγαρα), τη Στερεά Ελλάδα (Φθιώτιδα, Βοιωτία και Εύβοια), τη Θεσσαλία (Αλμυρός) και τη Βόρεια Ελλάδα (Χαλκιδική).

Το νησί της Αίγινας χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα πεδνοκλιματικά χαρακτηριστικά που προωθούν την παραγωγή φιστικιών υψηλής ποιότητας προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) με προνομιακή τιμολόγηση στην αγορά της ΕΕ, λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, της εξαιρετικής γεύσης και της ελκυστικότητας. Επί του παρόντος, 120.000 φιστίκια καλλιεργούνται στην Αίγινα σε συνολική έκταση 3.500 στρεμμάτων, αντιπροσωπεύοντας το 11% της συνολικής παραγωγής φιστικιών στη χώρα. Η παραγωγή φιστικιών έχει μεγάλη σημασία για την οικονομία της Αίγινας, καθώς όπως εκτιμάται περίπου 1.500 οικογένειες συνδέονται παραδοσιακά με αυτό (Bartzas and Komnitsas, 2017).

1.2.3 Οικονομική σημασία και χρήσεις

Το φιστίκι καλλιεργείται για παραγωγή ξηρών καρπών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κυρίως στο φαγητό φρέσκοι, αποξηραμένοι και ψητοί με ή χωρίς αλάτι και αρωματικά. Το φιστίκι είναι μοναδικό στο εμπόριο ξηρών καρπών λόγω του φυσικού ανοίγματος του κελύφους πριν τη συγκομιδή. Αυτό το πλεονέκτημα επιτρέπει την ευρεία διάθεση των καρπών με φιστίκια με το κέλυφος για φρέσκια κατανάλωση, επειδή οι πυρήνες τους μπορούν εύκολα να διαχωριστούν χωρίς μηχανική ρωγμή. Επιτρέπει, επίσης, στον επεξεργαστή να ψήνει και να αλατίζει τον πυρήνα χωρίς την αφαίρεση κελύφους. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, μετά το ψήσιμο και το αλάτισμα στα ακατέργαστα φιστίκια, το κέλυφος χρωματίζεται με κόκκινη βαφή για την κάλυψη των λεκέδων και των κηλίδων του κελύφους και πωλούνται ως «κόκκινα» φιστίκια. Τα φιστίκια χρησιμοποιούνται επίσης σε αρτοσκευάσματα, κέικ, παγωτά, γλυκά, καραμέλες, λουκάνικα και επιδόρπια (Kashaninejad and Tabil, 2011).

Η χρήση των φιστικιών στις χώρες παραγωγής ποικίλλει περισσότερο από ό, τι στις χώρες εισαγωγής. Στο Ιράν, τα κελύφη χρησιμοποιούνται για λίπασμα, για τροφή για μηρυκαστικά και μικρές ποσότητες μετατρέπονται σε μαρμελάδα. Μια μικρή ποσότητα λαδιού φιστικιού παράγεται για φαγητό και χρήση σε καλλυντικά, ενώ μια περιορισμένη ποσότητα φιστικιού χρησιμοποιείται επίσης για παραγωγή φυστικοβούτυρου. Αυτό το βούτυρο, μία ημι-στερεή πάστα, φτιάχνεται από

αλεσμένους και ψημένους πυρήνες φιστικιών με προσθήκη μερικών αρωμάτων και γλυκαντικών. Το φιστικοβούτυρο είναι ένα θρεπτικό προϊόν πλούσιο σε λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και βιταμίνες, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα τρόφιμα όπως μπισκότα, παγωτά και κέικ. Το κέλυφος χρησιμοποιείται επίσης και για βαφή στην Ινδία.

Η ρητίνη των ειδών της *Pistacia* χρησιμοποιείται ως προστατευτικό βερνίκι σε γυάλινες κατασκευές, πορσελάνες, ξύλα και μέταλλα. Επίσης, στην οδοντιατρική χρησιμοποιείται ως συστατικό για την παραγωγή στοματικών διαλυμάτων και οδοντοπαστών (Μαρίνου, 2010).



Εικόνα 3: Το δέντρο της φιστικιάς (Ferguson and Haviland, 2016).

2. Ο καρπός του *P.vera*

2.1 Η δομή του καρπού

Το *Pistacia vera* είναι ένα σχετικά μικρό (3–6 m ύψος), φυλλοβόλο, ξηροφυτικό δέντρο. Ο αριθμός χρωμοσωμάτων του έχει αναφερθεί ότι είναι $2n = 30$ ή $2n = 32$. Στη φύση, τα δέντρα αναπαράγονται από τους σπόρους και από τις ρίζες. Τα ριζικά τους συστήματα είναι γενικά πολύ εκτεταμένα, φτάνοντας πολύ πιο μακριά από τον κορμό σε σχέση με τον θόλο. Οι ρίζες των ώριμων φυτών μπορούν να αναπτυχθούν σε βάθος έως και 8-12 m και να απλωθούν πλάτος 20-30 m. Ως εκ τούτου, τα τεράστια ριζικά τους συστήματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των εδαφών από τη διάβρωση του νερού και του ανέμου.

Οι θόλοι των ώριμων δέντρων μπορούν να έχουν διάμετρο 4 έως 5 m, με πολύ παλιά δένδρα να φτάνουν τα 10 m. Υπό συνθήκες με επαρκή υγρασία του εδάφους, τα φύλλα είναι σύνθετα, μήκους 10–12 cm και πλάτους 7–9 cm, και συνήθως έχουν 5-7 φύλλα. Υπό συνθήκες με πολύ χαμηλή υγρασία του εδάφους, το μέγεθος των φύλλων και ο αριθμός των φύλλων μειώνεται σημαντικά. Σε περιοχές με βροχόπτωση μικρότερη από 200 mm ανά έτος, τα φύλλα έχουν γενικά μήκος 4–5 cm και πλάτος 2–3 cm και μπορούν να έχουν μόνο τρία φύλλα. Τα φύλλα είναι σκούρα πράσινα και γυαλιστερά και διατηρούν το χρώμα τους το ξηρό καλοκαίρι. Ως αποτέλεσμα, τα φιστικά τείνουν να ξεχωρίζουν οπτικά σε σχέση με το τοπίο γύρω τους με γενικά αδρανή κίτρινη-καφέ βλάστηση.

Ο φλοιός του *P. vera* είναι γενικά τραχύς σε υφή και γκρι έως καφέ σε χρώμα, με το χρώμα του φλοιού των παλαιών δέντρων κυρίως γκρι. Τα φυτά εμφανίζουν συνήθως μια θαμνώδη ανάπτυξη με πολλούς κορμούς, αν και μερικές φορές παράγουν μόνο έναν. Η διάμετρος του κορμού των πολύ παλαιών δέντρων μπορεί να φτάσει τα 150 cm, όπως στο Badkhizsky Zapovednik (δασικό απόθεμα) στο Badkhiz, Τουρκμενιστάν όπου οι φιστικιές αυτού του μεγέθους είναι κοινά. Είναι ενδιαφέρον ότι ο Chernova (2004) βρήκε ότι οι συνθήκες ανάπτυξης των δέντρων συσχετίστηκαν με ορισμένες κλιματολογικές περιοχές και υψόμετρα. Δέντρα με επτά έως εννέα κορμούς βρέθηκαν γενικά σε υψόμετρα μεταξύ 500 και 700 m πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας σε ξηρούς λόφους και πλαγιές (Khanazarov et al., 2009).

Τα φυτά φιστικιών είναι δίοικα και απαιτούνται οι επικονιαστές για τα θηλυκά φυτά. Όπως και με τα περισσότερα φυτά επικονίασης, τα φυλλώδη άνθη παράγουν αφθονία γύρης. Είναι σημαντικό ο χρόνος απελευθέρωσης της γύρης να συμπίπτει με

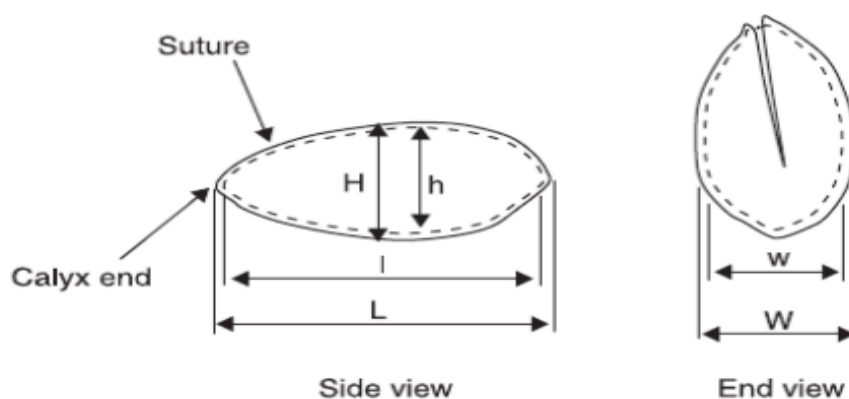
την ικανότητα δέσμευσης του ύπερου. Στην Καλιφόρνια χρησιμοποιούνται διάφοροι επικονιαστές για το «Kerman», συμπεριλαμβανομένων «Peters», το οποίο είναι ένα αρσενικό που επιλέχθηκε από τον A.B. Peters και επικαλύπτεται με το "Kerman".

Σε πεδία παραγωγής στην Καλιφόρνια αρσενικά δέντρα φυτεύονται συνήθως κάθε πέμπτο δέντρο σε κάθε πέμπτη σειρά που παρέχει άφθονη γύρη (Ford, 2011).

Το γένος *Pistacia* (*Anacardiaceae*) αποτελείται από περισσότερα από 12 είδη ή παραλλαγές αυτών, μεταξύ των οποίων τα *P. mexicana* H.B.K., *P. texana* Swingle, *P. lentiscus* L., *P. atlantica* Desfontaine, *P. chinensis* Bunge, *P. terebinthus* L. (με το υποείδος *P. palaestina* Bois), *P. khinjuk* Stocks (sin. *P. integerrima* Stewart), *P. formosana* Mats, (sin. *P. philippinensis*), *P. mutica* Fisher και Meyer, *P. cabulica* Stocks, *P. vera* L., και *P. oleosa* Lour Willd (Bai et al., 2019).



Εικόνα 4: Άγρια φιστικιά που αναπτύσσεται σε απότομες πλαγιές στους πρόποδες της οροσειράς Chatkalsky, Ουζμπεκιστάν (Khanazarov et al., 2009).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση 3 κύριων κάθετων διαστάσεων του φιστικιού. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον πυρήνα μέσα στο περικόχλιο (Kashaninejad and Tabil, 2011).

2.2 Αξιοποίηση του περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*)

2.2.1 Το περικάρπιο ως απόβλητο των φιστικιών

Οι καρποί του φιστικιού καλύπτονται με οργανικά εξωτερικά περικάρπια (κύτη) και ενδοκάρπια (κελύφη), που αφαιρούνται κατά τη διάρκεια των διαδικασιών αποφλοιώσης και ξεφλουδίσματος, αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές ροές απορριμμάτων φιστικιών αντιπροσωπεύουν περισσότερα άνω του 75% της συγκομιδής και στην Ελλάδα περίπου 7.000 τόνοι απορρίπτονται ετησίως. Σε επίπεδο χώρας, τα απόβλητα υπόκεινται κυρίως σε ανοικτή καύση και απόρριψη χωρίς καμία επεξεργασία. Και οι δύο επιλογές μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα και, συνεπώς, η ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών διαχείρισης αποβλήτων αποτελεί μείζον μέλημα στον τομέα των φιστικιών.

Για το σκοπό αυτό, η παραγωγή λιπασματοποίησης και βιολογικού φορτίου από απόβλητα φιστικιών έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή την τελευταία δεκαετία ως αναδύμενη στρατηγική για τη βελτίωση της ποιότητας του εδάφους και της παραγωγικότητας, την απομόνωση του άνθρακα στο έδαφος και τον μετριασμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Στην πραγματικότητα, η επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση κατάλοιπων γεωργικών προϊόντων, όχι μόνο μειώνουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της συγκομιδής, αλλά προσφέρουν και ένα επιπλέον εισόδημα στους αγρότες δεδομένου ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις. Με αυξανόμενη περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση και ζήτηση για αειφόρο καλλιέργεια μαζί με κατάλληλα απόβλητα, οι υπεύθυνοι λήψης αποφάσεων και άλλοι ενδιαφερόμενοι συνειδητοποιούν όλο και περισσότερο την ανάγκη για ανάπτυξη εφικτών προσεγγίσεων για τη βελτίωση του οικολογικού προφίλ των συγκομιδών στο μέλλον (Bartzas, Zaharaki and Komnitsas, 2021).

Σύμφωνα με τους Demiral et al., (2008), το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο καταλαμβάνουν το 18% του φιστικιού, με αποτέλεσμα περίπου 13.000 τόνοι κελύφους/έτος να λαμβάνονται ως υπόλειμμα μόνο από την Τουρκία. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε έρευνες για τη χρήση των απορριφθέντων περικαρπίων και ενδοκαρπίων, με συχνότερη τη χρήση ως βιοκαύσιμο και φαρμακευτικό παρασκεύασμα, προκειμένου να μειωθούν οι περιβαλλοντικοί ρύποι από την καλλιέργεια και να αυξηθούν τα οικονομικά οφέλη των παραγωγών (Αλυφαντή κ.ά., 2014).

Το Ιράν θεωρείται ο μεγαλύτερος παραγωγός φιστικιών παγκοσμίως με ετήσια παραγωγή περίπου 500.000 τόνων φρέσκων υποπροϊόντων φιστικιών (*Pistachio-By-*

Products, PBP). Τα υποπροϊόντα φιστικιών αποτελούνται από 64,5% μαλακό εξωτερικό κέλυφος, 25% κλαδιά, 10% φύλλα και 0,5% πυρήνα και κελύφη. Το PBP έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη (158,2 g/kg) και αιθέριο έλαιο (69,5 g/kg) και ως εκ τούτου αποτελεί μια πολύτιμη τροφή για μηρυκαστικά. Τα υποπροϊόντα αυτά πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί σε δίαιτες για αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (15% DM, PBP) και για αναπτυσσόμενους μόσχους (18% DM, PBP) και πρόβατα (30% DM, PBP) (Hosseini-Ghaffari et al., 2013).



Εικόνα 6: Διάθεση αποβλήτων επεξεργασίας φιστικιών στο έδαφος (Ντούλα, Κορνίτσας και Σαρρή, 2013).

Συγκεκριμένα, σε ανάλυση της Piness, 2010, αποκάλυψε μια σύνθεση λιπών και υδατανθράκων κυτταρίνης πολυσακχαρίτη. Η κυτταρίνη παρέχει δύναμη και δομή στο κέλυφος, ενώ τα λίπη το βοηθούν να διαλύει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τις βιταμίνες για την ανάπτυξη των φυτών.

2.2.2 Η χρήση του περικαρπίου

Η χρήση του πράσινου περικαρπίου των φιστικιών (Pistachio Green Hull-PGH) ως πηγή φυτοχημικών ουσιών είναι καθοριστικής σημασίας διότι μεγάλες ποσότητες μένουν ανεκμετάλλευτες (Sonmezdag, Kelebek and Selli, 2017), καθώς θεωρείται απόβλητο και αντιπροσωπεύει το 35%-45% της βιομηχανίας φιστικιών (Barreca et al., 2016 & Hamed et al., 2020), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε περιβαλλοντική ρύπανση (Wissam, 2019). Ωστόσο, το PGH αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πηγή με υψηλές περιεκτικότητες σε πρωτογενή (π.χ. πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα) και δευτερογενή (π.χ. φαινολικές ενώσεις) μεταβολίτες, πολυσακχαρίτες (π.χ. η πηκτίνη), διαιτητικές ίνες και βιταμίνες (Barreca et al., 2016 & Arjeh et al., 2020). Παρόλα αυτά, μεγάλες ποσότητες περικαρπίου αναμειγνύονται με το χόμα και

χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή, η οποία προκαλεί διατροφικά προβλήματα στα ζώα λόγω της υψηλής ποσότητας φαινολικών ενώσεων και τανινών. Εφαρμογή βρίσκει και στη φυτική ιατρική (herbalmedicine), αλλά και στην παραγωγή φαρμάκων και τροφίμων (Sonmezdag, Kelebek and Selli, 2017).

Η πηκτίνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που υπάρχει κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα και στο μεσαίο έλασμα των φυτών. Η περιεκτικότητα σε πηκτίνη που ανιχνεύεται στο περικάρπιο είναι αρκετά υψηλή (18-19%) συγκριτικά με άλλα φυτικά υπολείμματα, οπότε η εξαγωγή της από το PGH αποτελεί αντικείμενο αυξανόμενου ενδιαφέροντος για τις εφαρμογές του στη βιομηχανία τροφίμων και στα βιοϊατρικά πεδία. Σε βιομηχανίες τροφίμων η πηκτίνη χρησιμοποιείται ευρέως ως λειτουργικό συστατικό, εξαιτίας των πολύτιμων ιδιοτήτων της (π.χ. πηκτωματοποιητής, γαλακτωματοποιητής και σταθεροποιητής). Με βάση τους κανονισμούς του FAO και της ΕΕ, η εξαγόμενη πηκτίνη πρέπει να αποτελείται από τουλάχιστον 65% γαλακτουρονικό οξύ για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί εμπορικά. Σύμφωνα με μελέτη, η περιεκτικότητα σε γαλακτουρονικό οξύ της πηκτίνης PGH που εκχυλίστηκε υπό βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ήταν περίπου 65% (Arjeh et al., 2020).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το περικάρπιο του φιστικιού περιέχει βιοδραστικές ενώσεις, το οποίο έχει κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των ερευνητών αλλά και των βιομηχανιών τροφίμων, στοχεύοντας στην βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Συγκεκριμένα, το γεγονός ότι περιέχει υψηλά επίπεδα φυσικών αντιοξειδωτικών το καθιστά καλό υποκατάστατο των συνθετικών αντιοξειδωτικών. (Sonmezdag, Kelebek and Selli, 2017). Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες (Total Phenolic Content-TPC) του PGH είναι υψηλότερη σε σχέση με άλλα βρώσιμα λαχανικά και φρούτα που θεωρούνται πλούσιες πηγές φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο PGH μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες (τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι τανίνες). Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί στο PGH και βρίσκονται σε αφθονία είναι: το γαλλικό οξύ, η κουερσετίνη-3-O-ρουτινοσίδη, η φλωρογλυκινόλη, η κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη, η κερκετίνη-O-εξοσίδη, τα γαλλουλσικιμικά οξέα, η φθορογλουκινόλη, η θεογαλίνη, το γαλλουόλο-O-εξοσίδη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η λουτεολίνη και η πυρογαλλόλη. Το γαλλικό οξύ είναι μία από τις κύριες φαινολικές ενώσεις της φλούδας του φιστικιού που απαντάται ευρέως στα κόκκινα φρούτα και μπορεί να βρεθεί είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως μέρος υδρολυόμενων τανινών. Η κερκετίνη είναι ένα άλλο πολυφαινολικό φλαβονοειδές του PGH, με τη κερκετίνη-3-O-

ρουτινοσίδη να έχει την υψηλότερη συγκέντρωση. Η φλωρογλυκινόλη έχει διαπιστωθεί ότι είναι η κυρίαρχη φαινολική ένωση στο περικάρπιο και περιέχει το 1,3,5-τριυδροξυ βενζόλιο, ως τη βασική ομάδα της. Τέλος, τα ανακαρδικά οξέα είναι φαινολικά λιπίδια που αποτελούνται από φαινολικούς δακτυλίους και πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες, και θεωρούνται ταξινομικοί χημικοί δείκτες των φυτών της οικογένειας Anacardiaceae. Μελέτες έδειξαν ότι ανιχνεύτηκαν συνολικά 11 ανακαρδικά οξέα με διαφορετικά μήκη πλευρικών αλυσίδων (C13, C15 και C17) και βαθμό κορεσμού (πλήρως κορεσμένα ή μονο-, δι- ή τρι-ακόρεστα) στο PGH και επισήμαναν ότι ήταν τα κύρια συστατικά των φαινολικών του PGH (Arjeh et al., 2020).

Ερευνητές έχουν προτείνει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών του περικαρπίου, λόγω των βιοδραστικών ουσιών που περιέχει. Έτσι, η αξιοποίηση του περικαρπίου θα προσδώσει προστιθέμενη αξία στο φιστίκι (Sonmezdag, Kelebek, and Selli, 2017).

2.2.3 Λιπαρά οξέα περικαρπίου φιστικιών

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων συνήθως μελετάται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Τα κύρια ακόρεστα λιπαρά οξέα του εκχυλίσματος PGH είναι το ελαϊκό (18:1) και το λινολεϊκό οξύ (18:2), ενώ το παλμιτικό οξύ (16:0) αποτελεί το κυρίαρχο κορεσμένο λιπαρό οξύ των μη πολικών εκχυλισμάτων PGH (Πίνακας 2). Η διαφορά μεταξύ των προφίλ λιπαρών οξέων θα μπορούσε να σχετίζεται με την ποικιλία του φιστικιού, το στάδιο ωρίμανσης, τις καλλιεργητικές πρακτικές, τη γεωγραφική προέλευση, τις κλιματικές συνθήκες, καθώς και τη διαδικασία αποφλοιώσης. Η σύσταση των λιπαρών οξέων του PGH έχει ελαφρές διαφορές συγκριτικά με άλλες πηγές, όπως η φλούδα του αμυγδάλου και ο πυρήνας του φιστικιού (Arjeh et al., 2020).

Πίνακας 2: Προφίλ λιπαρών οξέων από περικάρπιο φιστικιών (επί ξηρού βάρους) (Arjeh et al., 2020)

Λιπαρά οξέα	Ποσότητα % w/w
Ελαϊκό οξύ (C18:1ω9 cis)	42-48
Λινολεϊκό οξύ (C18:2ω6 cis)	20-26,96
Παλμιτικό οξύ (C16:0)	12-15
α-Λινολενικό οξύ (C18:3ω3 cis)	4,9-9

Ελαϊδικό οξύ (C18:1ω9 trans)	4
Λινελαϊδικό οξύ (C18:2ω6 trans)	4
Στεατικό οξύ (C18:0)	2,2-4
Μυριστικό οξύ (C14:0)	1,47
Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1ω9)	0,94
Γαδελαιϊκό οξύ (C20:1ω9)	0,60-0,64
Βεχενικό οξύ (C22:0)	0,60-0,61
Αραχιδικό οξύ (C22:0)	0,15-0,20
Μαργανικό οξύ (C17:0)	0,18
Μαργαρελαϊκό οξύ (C17:1ω9)	0,09
Λαουρικό οξύ (C12:0)	0,03

3. Βιοτεχνολογία βιοδραστικών ενώσεων

Ο καρκίνος και οι νευρολογικές ασθένειες θεωρούνται από τα σημαντικότερα προβλήματα παγκοσμίως, με σταθερά αυξητικές τάσεις εμφάνισής τους στον πληθυσμό. Σύμφωνα με τα Παγκόσμια Στατιστικά Υγείας, υπολογίζεται ότι περίπου 400 νέα περιστατικά προκύπτουν ανά 100.000 ανθρώπους ετησίως. Μέχρι στιγμής, δεν έχει ακόμη ανακαλυφθεί καμία αποτελεσματική θεραπεία για τη βέβαιη και ολιστική αντιμετώπιση τέτοιων παθήσεων. Αρκετές έρευνες και μελέτες έχουν γίνει σε διάφορα φαρμακευτικά φυτά για τον προσδιορισμό και τον τρόπο δράσης των δραστικών συστατικών τους, καθώς προσφέρουν μεγάλες προοπτικές ανάπτυξης εναλλακτικών στρατηγικών θεραπείας (Gezici, 2019). Γι' αυτό, στόχος είναι η ανακάλυψη νέων φαρμάκων, τα οποία θα περιέχουν ισχυρές φυσικές βιοδραστικές ουσίες, προσφέροντας εξαιρετικά οφέλη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών θεραπείας κατά του καρκίνου (Seifaddiniour et al., 2018).

Οι βιοδραστικές ουσίες των φυτικών ιστών είναι χημικές ουσίες που παράγονται μέσω δευτερογενών μεταβολικών μονοπατιών. Οι ενώσεις αυτές απαρτίζονται από διάφορες χημικές ομάδες, όπως: τα οργανικά οξέα, τα αρωματικά συστατικά, τα τερπενοειδή, τα στεροειδή, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή, τα καρβονύλια, κ.ά. Χάρη στην αντικαρκινική και ανασο-διεγερτική ιδιότητα των ουσιών αυτών, τα φυτά διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο σε εφαρμογές στην ιατρική, ως καλλυντικά, πρόσθετα τροφίμων και ειδικά χημικά. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί την ανοδική ζήτηση των βιοδραστικών ενώσεων από εκχυλίσματα φυτών στην παγκόσμια αγορά και ειδικότερα στο τομέα της φαρμακολογίας.

Οι εναλλακτικές αντικαρκινικές θεραπείες αποκτούν μεγαλύτερη σημασία τα τελευταία χρόνια, αποφεύγοντας τις παρενέργειες των συμβατικών μεθόδων. Δυστυχώς, οι απαιτούμενη σταθερότητα για ευρείας κλίμακας κλινικές εφαρμογές δεν υποστηρίζεται από τα φυτικά φαρμακευτικά εκχυλίσματα, γεγονός που δεν τα καθιστά ιδιαίτερα αξιόπιστα. Ωστόσο, η βιοτεχνολογία προσφέρει διάφορες μεθόδους παραγωγής σημαντικών ποσοτήτων φυτικής βιομάζας σε σύντομο χρονικό διάστημα, όπως ο *in vitro* πολλαπλασιασμός. Μια πολύ σημαντική ιστοκαλλιέργητική η τεχνική παραγωγής βιομάζας, είναι η ανάπτυξη αποδιαφοροποιημένων ταχέως αναπτυσσόμενων κάλων. Αναλυτικότερα, φυτικά τμήματα (έκφυτα, ιστοί, κύτταρα) προερχόμενα από το φυτό δότη εμβολιάζονται σε μέσο με θρεπτικά στοιχεία και ρυθμιστές ανάπτυξης υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό

προκύπτει μια αναπτυσσόμενη φυτική μάζα απαλλαγμένη από ιούς και βακτήρια, που παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ποσότητας και του χρόνου παραγωγής εκχυλισμάτων με επιθυμητά συστατικά. Η τεχνική *in vitro* είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που μας παρέχει μεγαλύτερη σιγουριά για το επιθυμητό αποτέλεσμα με ελάχιστες πιθανότητες απόκλισης από αυτό, σε αντίθεση με *in vivo* διαδικασίες και την αδυναμία πλήρως ελέγχου ενός φυτικού οργανισμού (Μπαρμπεράκη, 2011).

3.1 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

Τα τελευταία χρόνια, για την αξιολόγηση του μηχανισμού δράσης μιας φυτοφαρμακευτικής ουσίας χρησιμοποιούνται απομονωμένα κυτταρικά συστήματα. Η δοκιμή σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών *in vitro* προσφέρει μια εξαιρετική μέθοδο μελέτης βιοδραστικών μορίων, αντικαθιστώντας την μελέτες σε πειραματόζωα όπου είναι δυνατόν. Τα κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro* προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς, με μοναδικές λειτουργίες, μερικές από τις οποίες διατηρούνται κατά την καλλιέργεια.

Υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες κυττάρων που μπορούν να καλλιεργηθούν, είναι τα λεγόμενα πρωτογενή κύτταρα και οι μόνιμες κυτταρικές σειρές. Τα πρωτογενή κύτταρα απομονώνονται απευθείας από νεογούς ιστούς θηλαστικών, συγκριτικά με τις μόνιμες κυτταρικές σειρές, οι οποίες εξελίσσονται από πρωτεύοντα κύτταρα μετά από γενετικό μετασχηματισμό. Οι περισσότερες κυτταρικές σειρές προκύπτουν από συμπαγείς ιστούς, τα κύτταρα αναπτύσσονται όντας προσκολλημένα σε κατάλληλη επιφάνεια, ωστόσο, μερικές κυτταρικές σειρές έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται ενώ επιπλέουν στο μέσο καλλιέργειας (καλλιέργεια εναιωρήματος). Εξαιτίας, του απεριόριστου δυναμικού υποκαλλιιεργειών των μόνιμων κυτταρικών σειρών, είναι αυτές που προτιμώνται συχνά για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας αντί των πρωτογενών κυττάρων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επιλογή του κατάλληλου τύπου κυτταρικής σειράς. Για παράδειγμα, τα ανθρώπινα κύτταρα αντιδρούν με πολύ διαφορετικό τρόπο σε σύγκριση με κύτταρα από άλλα θηλαστικά. Επειδή, τα βιολικά ή τα μόρια τα οποία ελέγχονται προορίζονται για κλινική χρήση, στις δοκιμές «βιοσυμβατότητας» χρησιμοποιούνται κατά βάση κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης. Η χρήση των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών *in vitro* δίνει πολύτιμες πληροφορίες για την τοξικότητα των συστατικών μια ουσίας (Narayan, 2021).

3.2 In vitro Κυτταροτοξικότητα

Σημαντικά κριτήρια για τη δοκιμή κυτταροτοξικότητας είναι η προέλευση των κυττάρων και η κατάσταση μετασχηματισμού, η οποία εξαρτάται από την εφαρμογή. Στις Ευρωπαϊκές χώρες προτιμώνται οι μόνιμες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διαπιστευμένους προμηθευτές (π.χ. American Type Culture Collection/ATCC, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures/DSMZ). Υπάρχει μια πληθώρα εμπορικών διαθεσίμων και διαπιστευμένων αναλύσεων κυτταροτοξικότητας, οι οποίες περιλαμβάνουν μετρήσεις διαφορών βιολογικών παραμέτρων (Πίνακας 3) (Narayan, 2021).

Πίνακας 3: Ταξινόμηση διαπιστευμένων δοκιμών βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας κυττάρων (Narayan, 2021)

<i>Κυτταρική λειτουργία</i>	<i>Σύστημα δοκιμής</i>
Ακεραιότητα μεμβράνης	Neutral red release
	LDH-release
	Cr-release
Ενεργειακός μεταβολισμός	Ανίχνευση ισοδυνάμων αναγωγής με προσδιορισμούς άλατος τετραζολίου (δηλαδή MTT , MTS , WST-1 , XTT)
	Περιεχόμενο ATP
Πολλαπλασιασμός	Cell number
	Cell cycle analyses
	Ki67-expression (ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση δείκτη πυρηνικού πολλαπλασιασμού)
Απόπτωση	Πυρηνική

	συμπύκνωση/κατακερματισμός
	TUNEL staining
	DNA ladder formation

3.3 Βιολογικές ιδιότητες περικαρπίου φιστικιού

Πρόσφατα, τα διαιτητικά φαρμακευτικά φυτά είναι πολυσύχναστο αντικείμενο μελέτης, καθώς παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον διότι ενισχύουν τη μείωση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (POS) συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού ρίζας υδροξυλίου (OH), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και ιόντων υπεροξειδίου (O₂), που απαντώνται φυσικά στο ανθρώπινο σώμα. Η πρόληψη των παρενεργειών του ROS σε ζωντανούς οργανισμούς αποτελεί μια από τις πιο αποτελεσματικές στρατηγικές διαχείρισης για ασθένειες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Gezici, 2019).

Ανάμεσα στα φυτά αυτά, το φιστικί Αιγίνης (*P.vera*) όπως ήδη έχει προαναφερθεί αποτελεί πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών με φαρμακολογικές ιδιότητες *in vitro*. Διάφορα μέρη του φυτού *P.vera* έχουν μελετηθεί, συμπεριλαμβανομένων του φλοιού, των φύλλων, της ρητίνης και των σπόρων, τα οποία παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες (Fathalizadeh et al.,2015). Σε σύγκριση με άλλα μέρη του φυτού φιστικιού, έχει αποδειχθεί ότι το περικάρπιο περιλαμβάνει υψηλότερα επίπεδα φαινολικών και αντιοξειδωτική δράση. Οι κύριες φαινολικές ουσίες που περιέχει το περικάρπιο των φιστικιών είναι το γαλλικό οξύ, η επικατεχίνη, η κερσετίνη, η ναριγγενίνη, η λουτεολίνη, η καμπερόλη, η κυανιδινο-3-O-γαλακτοσίδη και η κυανιδιν-3-O-γλυκοσίδη (Seifaddiniour et al.,2018). Η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά οδηγεί σε μείωση των χρόνιων ασθενειών, θεμελιώδη ρόλο σε αυτό διαδραματίζουν τα φαινολικά και τα αντιοξειδωτικά που συναντώνται στο PGH, καθώς δρουν ως αντικαρκινικές ουσίες (Barrecaet et al., 2016). Για παράδειγμα, η κερσετίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες από πειράματα *in vivo* και *in vitro*. Επίσης, η καμπερόλη έχει δείξει ευεργετικά αποτελέσματα στη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών, ιδιαίτερα του καρκίνου, ενώ η επικατεχίνη προορίζεται ως ένα νέο αντικαρκινικό φάρμακο (Seifaddiniour et al.,2018).

Σκοπός της Μελέτης

Η βιβλιογραφία που αφορά τη μελέτη τόσο της χημικής σύστασης όσο και των βιολογικών ιδιοτήτων του περικάρπιου των κελυφωτών φιστικιών (*P. Vera*) είναι αρκετά φτωχή.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

1. Ο προσδιορισμός της υγρασίας, των πρωτεϊνών και της τέφρας σε νωπό περικάρπιο.
2. Η παραλαβή του ελαίου με την τεχνική Soxhlet.
3. Η μέτρηση του δείκτη διάθλασης του παραληφθέντος ελαίου.
4. Ο προσδιορισμός των δεικτών k , Δk , R , των ελεύθερων λιπαρών οξέων και του αριθμού των υπεροξειδίων στο παραληφθέν έλαιο.
5. Η παραλαβή αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων των απολιπασμένων περικαρπίων τόσο με κλασσική ανάδευση όσο και με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους.
6. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν χρωματογραφικά με χρωματογραφία LC-MS-QTOF και ταυτοποιήθηκαν φαινολικά συστατικά. Επίσης, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων και προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά συστατικά.
7. Τέλος μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων όταν προστίθενται σε κυτταρικές σειρές.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Δειγματοληψία-Προετοιμασία Δείγματος

Για την εκπόνηση του πειράματος που πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων και Εργαστήριο Κυτταρικής Τεχνολογίας), συλλέχθηκαν δείγματα περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών της ποικιλίας *P.vera* από τη περιοχή Υπάτη Φθιώτιδας, τα οποία αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C) μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν για τις αναλύσεις.

Μελέτη φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*)

4.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε υγρασία

4.2.1 Πειραματική διαδικασία

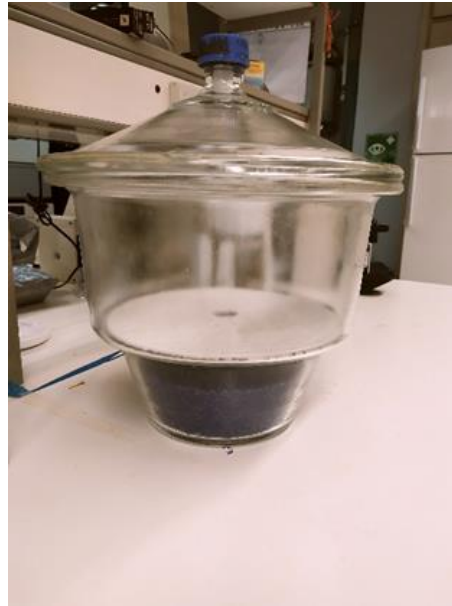
Στο περικάρπιο του φιστικιού, προσδιοριστική η περιεκτικότητα σε υγρασία σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο 925.40 του ΑΟΑΚ. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, από το αρχικό δείγμα λαμβάνεται μια ποσότητα περίπου 1,8 g νωπού περικαρπίου φιστικιού ζυγισμένο σε αναλυτικό ζυγό (Mark 2200) και τοποθετείται σε κεραμικές κάψες ξήρανσης, οι οποίες έχουν προθερμαθεί σε ηλεκτρικό φούρνο (Gallenkamp, Plus Oven) στους 100°C για 3 h και τοποθετηθεί να κρυσώσουν σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο ενεργοποιημένης μορφής του πυρίτιο (SiO_2) (Εικόνα 7).

Οι στερεές ουσίες ξηραίνονται με παραμονή αέρα ή με θέρμανση σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία εξαρτάται από το σημείο τήξης και τις ιδιότητες της κάθε ουσίας. Τόσο το απόβαρο (M_1) της κάθε κάψας, όσο και το μικτό βάρος (M_2) προσδιορίζονται σε ζυγό ακριβείας (Sartorius, B 120 S, Germany). Στη συνέχεια, οι κάψες τοποθετούνται σε κλίβανο στους 105°C και σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται μετρήσεις (M_3) μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος τους, δηλαδή οι δύο διαδοχικές μετρήσεις να μην διαφέρουν περισσότερο από 0,001 g. (Yanniotis and Zarboutis, 1996). Σε αυτό το σημείο θεωρείται ότι έχει αφαιρεθεί η περιεχόμενη υγρασία του δείγματος. Πριν από τη ζύγιση, οι κάψες αφήνονται στο ξηραντήριο να ισορροπήσουν με την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πέντε επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν στο δείγμα, για μεγαλύτερη ακρίβεια. Η αρχική περιεχόμενη

υγρασία του περικάρπιου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*) εκφρασμένη σε g νερού/g περικαρπίου, υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Y = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100 \text{ εξ. (1)}$$

Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν πέντε φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient of Variation, CV).



Εικόνα 7: Ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο SiO₂

4.2.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η περιεκτικότητα σε υγρασία βρέθηκε $78,83 \pm 0,54$ (% w/w νωπού περικαρπίου) ($n=5$, $CV=0,68$). Σύμφωνα με τον Arjeh et al. (2020) τα αποτελέσματα της υψηλής ενεργότητας του περικαρπίου σε νερό επικυρώνονται, δεδομένου ότι σαν φυτικός ιστός, το περικάρπιο περιέχει μεγάλη ποσότητα νερού (>70%). Επίσης, οι Ozbek et al. (2018) και οι Özbek et al. (2019) βρήκαν την περιεκτικότητα του περικαρπίου σε υγρασία 70,81% και 71,05% υγρού βάρους, αντίστοιχα, ενώ οι Grace et al. (2016) βρήκαν 78% υγρασία αρκετά κοντά με την πειραματική μας τιμή.

4.2.3 Συμπέρασμα

Η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι υψηλή και συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

4.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες

4.3.1 Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του περικαρπίου των φιστικιών σε πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο AOAC 950.48 (μέθοδος Kjeldahl). Η μέθοδο Kjeldahl βασίζεται στην ολική μετατροπή των αζωτούχων συστατικών ενός δείγματος σε αμμωνιακά άλατα. Όμως, πέρα από το άζωτο των πρωτεϊνών προσδιορίζεται και το άζωτο άλλων ενώσεων όπως νουκλεϊκών οξέων, αλκαλοειδών, χρωστικών κλπ.

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

Βήμα 1- Προετοιμασία δείγματος: Το δείγμα αποψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C), αλέθεται σε εργαστηριακό μύλο (Tekmar A-10) και τοποθετείται σε φούρνο στους 60°C για 6 h για απομάκρυνση της υγρασίας. Στη συνέχεια, σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας (Kern ABS) ζυγίζονται περίπου 500 mg περικαρπίου φιστικιών σε τρεις διαφορετικές επαναλήψεις.

Βήμα 2- Λευκός προσδιορισμός (blank): Σχετίζεται με το προσδιορισμό του αζώτου που τυχόν υπάρχει στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια κατά τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και το οποίο προστίθεται στο άζωτο των άγνωστων δειγμάτων και αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Ο λευκός προσδιορισμός πραγματοποιείται στην αρχή και εν συνεχεία ακολουθείται η πλήρης διαδικασία χωρίς να υπάρχει δείγμα. Το αποτέλεσμα του λευκού (χωρίς δείγμα) προσδιορισμού αφαιρείται από το αποτέλεσμα του προσδιορισμού με δείγμα.

Βήμα 3- Καύση δείγματος: Το ξηρό δείγμα (500 mg) τοποθετείται αρχικά στον πυθμένα ενός γυάλινου σωλήνα καύσης και προστίθεται μια ταμπλέτα Kjeldahl (Merck) και αντιαφριστική σιλικόνη, καθώς επίσης και 25 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄) 95-97%. Στη συνέχεια, οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετούνται στη συσκευή καύσης (Εικόνα 8) και παραμένουν εκεί, έως ότου το δείγμα διαυγάσει και αποκτήσει ασθενώς κυανοπράσινο χρώμα (περίπου 1 h στους 430°C). Κατά την καύση, το οργανικό άζωτο του δείγματος οξειδώνεται παρουσία του H₂SO₄ και του καταλύτη και μετατρέπεται ποσοτικά σε θειικό αμμώνιο (NH₄)₂SO₄. Η ταμπλέτα Kjeldahl (καταλύτης) περιέχει 96,5% Na₂SO₄, 1,5% CuSO₄ και 2% Se. Η παρουσία του ενσωματωμένου άλατος στην ταμπλέτα Kjeldahl είναι απαραίτητη για την αύξηση του

σημείου βρασμού του H_2SO_4 , ενώ οι ενσωματωμένοι καταλύτες (Se.Hg,Cu) επιταχύνουν τη διαδικασία της καύσης.



Εικόνα 8: Συσκευή υγρής καύσης (εφοδιασμένη με διάταξη απαγωγής αερίων) Velp Scientifica (Du6).

Βήμα 4-Απόσταξη: Μετά το τέλος της καύσης του δείγματος, κάθε γυάλινος σωλήνας, αφού κρυώσει, τοποθετείται στη συσκευή απόσταξης Kjeldahl (Kjeldahl™ 8100 Distillation Unit, 220 V/50 Hz) και ρυθμίζεται στο προκαθορισμένο πρόγραμμα απόσταξης (Εικόνα 9). Μέσα στη αποστακτική συσκευή προστίθεται αυτόματα 30 mL H_2O και 100 mL NaOH 40%, ενώ στην έξοδο της αποστακτικής συσκευής τοποθετείται κωνική φιάλη με 50 mL βορικού οξέος (H_3BO_3) 4%, με δείκτες πράσινο της βρωμοκρεζόλης και κόκκινο του μεθυλίου. Κατά την απόσταξη, το θειικό αμμώνιο (που παρήχθη κατά την καύση) σε αλκαλικό περιβάλλον διασπάται και παράγεται αμμωνία, η οποία ψύχεται και διαβιβάζεται στο διάλυμα H_3BO_3 , όπου δεσμεύεται με την μορφή βορικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$. Η απόσταξη θεωρείται ικανοποιητική εφόσον συλλεχθούν τουλάχιστόν 150-200 mL αποστάγματος στην κωνική φιάλη.

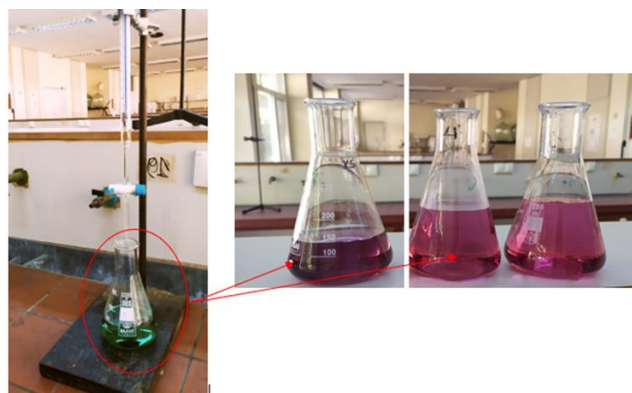


Εικόνα 9: Συσκευή απόσταξης Kjeldahl TM 8100 Distillation Unit, 220V/50Hz, με ρυθμιζόμενο πρόγραμμα.

Βήμα 5-Τιτλοδότηση: Ακολουθεί ογκομέτρηση με υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,1 M χρησιμοποιώντας ως δείκτη μίγμα ερυθρού του μεθυλίου και πράσινου της βρωμοκρεζόλης, έως ότου το διάλυμα του αποστάγματος αποκτήσει μια ελαφρώς ροζ απόχρωση (Εικόνα 10). Από την ογκομέτρηση με HCl υπολογίζεται το περιεχόμενο του αζώτου σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\%N = \frac{(\text{mL HCl Δείγματος} - \text{mL HCl Πρότυπο}) \times \text{Καθαρότητα HCl} \times 14,007 \times 100}{\text{Βάρος του Δείγματος (mg)}} \quad \text{εξ. (2)}$$

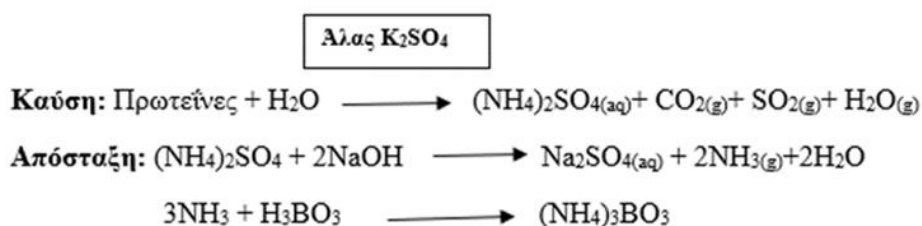
$$\text{Protein (\%)} = \text{ολικό N(\%)} \times 6,25 \quad \text{εξ. (3)}$$



Εικόνα 10: Απεικόνιση της μεταβολής του χρώματος του $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ κατά την τιτλοδότηση με HCl..

Η εκατοστιαία ποσότητα του ολικού αζώτου, όπως προκύπτει από την εξίσωση (2), πολλαπλασιάζεται με τον εμπειρικό συντελεστή 6,25, ο οποίος δεν είναι σταθερός για κάθε ομάδα τροφίμου ή φυτικού υλικού και έτσι υπολογίζεται η τελική περιεκτικότητα σε άζωτο, κάθε δείγματος (Εξίσωση 3) (Kordi and Naserian, 2020 & Hamed, et. al.,2020). Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και ο CV.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα στάδια προσδιορισμού της περιεκτικότητας πρωτεϊνών κατά Kjeldahl αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω:



4.3.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε στα 15,93±0,21 (% w/w ξηρού περικαρπίου). Οι τιμές αυτές συμφωνούν, με μικρές διαφορές, με αποτελέσματα άλλων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν στην ποικιλία «Αιγίνης» (Moghaddam et al.,2009& Ozbek et al.,2018 & Özbek et al. 2019). Από διαφορετικές μελέτες διαπιστώνεται ότι το περικάρπιο του φιστικιού είναι πλούσια πηγή σε πρωτεΐνες (15,82% w/w ξηρού βάρους) (Ghasemi et al., 2012).

4.3.3 Συμπέρασμα

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι αντίστοιχη με τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία.

4.4 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε τέφρα

4.4.1 Πειραματική Διαδικασία

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών σε τέφρα πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την επίσημη μέθοδο AOAC 923.03. Η τέφρα αποτελεί το ανόργανο υπόλειμμα που απομένει μετά την τέλεια καύση των οργανικών συστατικών των προϊόντων, και ένα από τα συστατικά που καθορίζει την ποιότητα και την ταυτότητα τους (Γεωργιάδου, 2015).

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, από το αρχικό δείγμα λαμβάνεται μια ποσότητα 0,5g αλεσμένου και αποξηραμένου περικαρπίου φιστικιού ζυγισμένο σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας (Kern ABS) και τοποθετείται σε πορσελάνινα χωνευτήρια καύσης. Τα χωνευτήρια έχουν προηγουμένως προθερμανθεί σε ηλεκτρικό φούρνο (Gallenkamp, Plus Over) στους 100°C για 15 min και έχει καταγραφεί το απόβάρό τους, αφού προηγουμένως ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (SiO₂). Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον αποτεφρωτήρα (Vulcan 3-550 NEY) για πρόκαυση στους 250°C για 2 h, μέχρι να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ύλης και να αποφευχθεί ο αφρισμός κατά την αποτέφρωση (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Φούρνος αποτέφρωσης Vulcan 3-550 NEY

Έπειτα, ακολουθεί η τέλεια καύση με αποτέφρωση όλου του άνθρακα στους 550°C για 6 h. Στο τέλος, το στερεό άκαυστο υπόλειμμα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας (Sartorius, B 120 S) και επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το βάρος παραμείνει σταθερό. Ο χειρισμός των χωνευτηρίων γίνεται με μεταλλικές λαβίδες και η μέτρηση του βάρους γίνεται αφού κρυώσουν τα δείγματα σε ξηραντήριο. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για τον υπολογισμό της τέφρας. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος περικαρπίου φιστικιού σε τέφρα υπολογίστηκε από το παρακάτω τύπο:

$$\left| \text{Τέφρα \%} = \frac{(\beta - \alpha)}{B} \times 100 \right. \text{ εξ. (4)}$$

Όπου,

α: το απόβαρο του χωνευτηρίου σε g

β: το μικτό βάρος χωνευτηρίου μετά την αποτέφρωση σε g

B: το βάρος του δείγματος σε g

4.4.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η περιεκτικότητα σε τέφρα του περικαρπίου βρέθηκε $11,11 \pm 0,23$ (% w/w ξηρού περικαρπίου). Η παραπάνω τιμή είναι αντίστοιχη με αποτελέσματα άλλων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν στην ποικιλία *P.vera* και κυμάνθηκαν από 11,4 έως 13,1% (w/w ξηρού βάρους) (Moghaddam et al., 2009 & Ozbek et al., 2018 & Özbek et al. 2019).

4.4.3 Συμπέρασμα

Η περιεκτικότητα σε τέφρα προσεγγίζει τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας.

4.5 Λυοφιλίωση-Άλεση

Μετά το πέρας του προσδιορισμού του περικαρπίου σε τέφρα, αρκετή ποσότητα νωπών περικαρπίων ξηράθηκε με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης (lyophilization) για δυο μέρες. Η τεχνική της λυοφιλίωσης πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, με σκοπό να διατηρεί καλύτερα τη δομή του προϊόντος χωρίς να υπάρξει ποιοτική ή/και ποσοτική μεταβολή.

Κατά τη διαδικασία της άλεσης, τα περικάρπια των φιστικιών κονιοροποιήθηκαν με τη βοήθεια εργαστηριακού μύλου άλεσης (Εικόνα 12) έως τη μετατροπή αυτών σε σκόνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Ακολούθησε κοκκομέτρηση και συλλέχθηκε το κλάσμα με μέγεθος κόκκων σκόνης μικρότερο από 500 μm . Το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό για την μετέπειτα ανάλυση. Το μικρό μέγεθος των κόκκων οδηγεί στη βελτίωση της εκχύλισης. Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην απόδοση της εκχύλισης των λιπαρών συστατικών (Arjeh et al., 2020). Σύμφωνα, με μελέτες των Ghandahari Yazdi et al. (2018) απέδειξαν ότι το μέγεθος των σωματιδίων-κόκκων και ο χρόνος εκχύλισης παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόδοση εκχύλισης τόσο του ελαίου όσο και των φαινολικών ενώσεων, καθώς η αύξηση του χρόνου έως τις 4 ώρες και η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων από 1,00 σε 0,40 mm είχαν σημαντική επίδραση στην απόδοση εκχύλισης του περικαρπίου των φιστικιών. Η σκόνη των περικαρπίων των φιστικιών αποθηκεύτηκε σε πλαστικούς περιέκτες στους 25 °C.



Εικόνα 12: Εργαστηριακός μύλος άλεσης (Tekmar A-10).

4.6 Παραλαβή ελαίου περικαρπίου κελεφωτών φιστικιών με Soxhlet

4.6.1 Πειραματική Διαδικασία

Η παραλαβή ελαίου του περικαρπίου πραγματοποιήθηκε με ημισυνεχή εκχύλιση με χρήση οργανικού διαλύτη σε συσκευή Soxhlet (Εικόνα 13), σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 948.22, ως ακολούθως: 15 g λυοφιλωμένου δείγματος τοποθετούνται στο φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα). Εν συνεχεία, η καρτούσα με το δείγμα τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet ενώ στη σφαιρική φιάλη της συσκευής προστίθενται 600 mL εξάνιο (εκχυλιστής). Το δείγμα εκχυλίζεται για 8 h.



Εικόνα 13: Συσκευή Soxhlet

Ύστερα, ο διαλύτης (εκχυλιστής), δηλαδή το εξάνιο, απομακρύνεται με χρήση περιστρεφόμενου εξαμιστήρα κενού (Rotary Evaporator) (Εικόνα 14) συνδεδεμένου με υδατόλουτρο στους 35-40°C και προσδιορίζεται η μάζα των λιπαρών ουσιών με

ζύγιση. Το στερεό δείγμα που απομένει στην καρτούσα (απολιπασμένο) αφήνεται στο περιβάλλον για να εξατμιστεί ο διαλύτης και, στη συνέχεια, αποθηκεύεται στην κατάψυξη (-20°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

Η απόδοση σε έλαιο υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Otemuyiwa and Adewusi, (2013): α) με απ' ευθείας ζύγιση του ελαίου μετά την εξάτμιση σε αναλυτικό ζυγό (εξ. 5) και β) με ζύγιση του απολιπασμένου δείγματος (η καρτούσα μετά το τέλος της εκχύλισης) σε ζυγό ακριβείας (εξ. 6) και λήφθηκε η μέση τιμή των δυο μετρήσεων. Πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις για το δείγμα.



Εικόνα 14: Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού

$$(α) \text{ Έλαιο}\% = \frac{B_1 - B_0}{B_2} \times 100 \text{ εξ. (5)}$$

Όπου,

B_0 : Απόβαρο φιάλης σε g

B_1 : Το βάρος της φιάλης μετά την εκχύλιση με το δείγμα σε g

B_2 : Το βάρος του αρχικού δείγματος σε g

$$(β) \text{ Έλαιο}\% = \frac{G_0 - G_1}{G_2} \times 100 \text{ εξ. (6)}$$

Όπου,

G_0 : Μικτό βάρος της καρτούσας πριν την εκχύλιση σε g

G_1 : Μικτό βάρος της καρτούσας με το απολιπασμένο δείγμα μετά την εκχύλιση σε g

G₂: Το βάρος του αρχικού δείγματος σε g

Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν έξι φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και ο CV.

4.6.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η περιεκτικότητα σε έλαιο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις (5) και (6). Η μέση περιεκτικότητα σε έλαιο κυμάνθηκε από 6,28 έως 7,66 (% w/w λυοφιλωμένου περικαρπίου). Κατά τον άμεσο προσδιορισμό ο μέσος όρος βρέθηκε $7,66 \pm 0,72$ (n=6) και ο συντελεστή μεταβλητότητας (CV= 9,46), ενώ κατά τον έμμεσο η περιεκτικότητα βρέθηκε $6,28 \pm 1,27$ (CV=20,14). Όταν $CV < 10$, θεωρείται στατιστικά αποδεκτή η διάχυση των τιμών γύρω από τον μέσο όρο. Επομένως μόνον ο άμεσος προσδιορισμός παρείχε, στατιστικά, αποδεκτά αποτελέσματα. Σε άλλες μελέτες η περιεκτικότητα σε έλαιο του περικαρπίου βρέθηκε 5-7 % w/w (Ghasemi et al., 2012, Ahanchi et al., 2018). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

4.6.3 Συμπεράσματα

Η χημική σύσταση του περικαρπίου φιστικιού μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με την ποικιλία, τις καλλιεργητικές φροντίδες, την ωρίμανση του πυρήνα, τη διαδικασία αφαίρεσης της φλούδας και τις συνθήκες αποθήκευσης (Bakhshizadeh et al., 2014).

5 Ανάλυση ελαίου περικορπίου κελυφωτών φιστικιών

5.1 Μέτρηση του δείκτη διάθλαση

Ο δείκτης διάθλασης εκφράζεται σε απόλυτη τιμή ή σε εκατοστιαία αναλογία σακχαρόζης κατά μάζα (g/L ή Kg).

5.1.1 Πειραματική Διαδικασία

Το δείγμα ελαίου φέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) και τοποθετείται μια ποσότητά του στο κατώτερο πρίσμα του διαθλασίμετρου (Abbe Refractometer, WAY-1S) (Εικόνα 15) ώστε, όταν τα πρίσματα πιέζονται το ένα πάνω στο άλλο, το δείγμα να καλύπτει ομοιόμορφα την επιφάνεια του γυαλιού. Μετρείται ο δείκτης διάθλασης σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της χρησιμοποιούμενης συσκευής. Εκτελέστηκαν τουλάχιστον δυο προσδιορισμοί στο ίδιο δείγμα και ο δείκτης διάθλασης σημειώνεται με τέσσερα δεκαδικά ψηφία σύμφωνα με τον (ΕΚ) αρ. 1234/2007, (2010).



Εικόνα 15: Διαθλασίμετρο Abbe Refractometer, WAY-1S

5.1.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ο δείκτης διάθλασης που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία βρέθηκε ίσος με 1,5011. Η τιμή αυτή είναι ελαφρώς υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου και του φιστικελαίου (1,4677-1,4705), όπως και του πυρηνέλαιου (1,4680 - 1,4707). Οι τιμές αυτές ορίζονται στην τράπεζα του Ισοκράτη από το Γενικό Χημείο του Κράτους (1987)(ΦΕΚ Β' 788/31.12.1987). Ο δείκτης

διάθλασης σχετίζεται άμεσα με την ακορεστότητα στο λάδι και μεταξύ δυο διαφορετικών μέσων, μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης έχει εκείνο με την μεγαλύτερη ακορεστότητα. Επιπροσθέτως, όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα των λιπαρών οξέων και των τριγλυκεριδίων στο έλαιο τόσο μεγαλύτερος είναι και ο δείκτης διάθλασης (Ανδρικόπουλος, 2015).

5.1.3 Συμπέρασμα

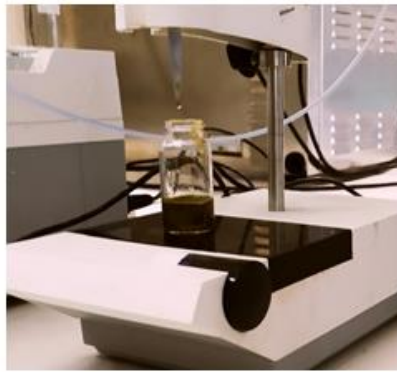
Η τιμή του δείκτη διάθλασης του ελαίου του περικαρπίου βρέθηκε μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου, του φιστικελαίου και του πυρηνελαίου.

5.2 Προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον (ΕΟΚ) αριθμό 2568/91 (2008), με μερικές τροποποιήσεις. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα εκφράζεται ως οξύτητα. Η οξύτητα εκφράζεται σε g ελαϊκού οξέος/100 g λιπαρής ύλης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ογκομέτρηση των περιεχόμενων ελεύθερων λιπαρών οξέων με πρότυπο υδατικό διάλυμα NaOH.

5.2.1 Πειραματική Διαδικασία

Ζυγίζεται 1 g δείγματος σε κωνική φιάλη των 250 mL με ακρίβεια 0,001. Στην κωνική φιάλη των 250 mL προστίθεται 5 mL του μείγματος διαλυτών διαιθυλαιθέρα/αιθανόλης 95 % με αναλογία 1:1 v/v και κατόπιν προσθήκης δύο ή τριών σταγόνων φαινολοφθαλεΐνης ακολουθεί προεξουδετέρωσή του με την προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH 0,05 M, με ταυτόχρονη ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε αυτόματη συσκευή τιτλοδότησης για μεγαλύτερη ακρίβεια (Εικόνα 16). Το διάλυμα θεωρείται εξουδετερωμένο όταν αποκτήσει ρόδινη χροιά για τουλάχιστον 10 s.



Εικόνα 16: Συσκευή τιτλοδότησης, εξουδετέρωση διαλύματος έως ότου αλλάξει το χρώμα του δείκτη

Η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ (% w/w) δίνεται από την Εξίσωση 7:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} \quad \text{εξ. (7)}$$

Όπου,

V: ο όγκος (mL), του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) που έχει χρησιμοποιηθεί,

c: η ακριβής συγκέντρωση (mol/L), του τιτλοδοτημένου διαλύματος NaOH που έχει χρησιμοποιηθεί,

M: η γραμμομοριακή μάζα του ελαϊκού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του αποτελέσματος (= 282 g/mol),

m: η μάζα (g) του δείγματος

5.2.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η ελεύθερη οξύτητα ή ελεύθερων λιπαρά οξέα είναι σημαντικός δείκτης ποιότητας ενός ελαίου, υποδηλώνοντας την αλλοίωση που μπορεί να υφίσταται. Η τιμή της ελεύθερης οξύτητας δείχνει τον τρόπο διαχείρισης πριν από την επεξεργασία και το χρονικό διάστημα από τη συγκομιδή έως τη σύνθλιψη. Επιπλέον, είναι ένα πρώιμο σημάδι της πιθανής διάρκειας ζωής του ελαίου. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα και η ελεύθερη οξύτητα όπως αυτή προσδιορίστηκε από την εξίσωση 7.

Πίνακας 4: Πειραματικά δεδομένα και η τιμή της οξύτητας ελαίου περικάρπιου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*).

V_{NaOH} (mL)	C_{NaOH} (mol/L)	M_r ελαϊκού οξέος (g/mol)	m δείγματος (g)	Οξύτητα (% w/w)
28,714	0,05	282	1	40,49

Ένας από τους σημαντικούς δείκτες ποιότητας φιστικέλαιου είναι η οξύτητά του. Η υψηλή οξύτητα υποδηλώνει υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και υδρόλυση τριγλυκεριδίων. Η υψηλή οξύτητα του λαδιού προκαλεί ταχεία οξείδωση, γεγονός που καθιστά το λάδι λιγότερο χρήσιμο στη βιομηχανία τροφίμων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η τιμή της οξύτητας είναι αρκετά υψηλή και ανέρχεται στα 40,49% w/w, γεγονός που το καθιστά χαμηλής ποιότητας έλαιο και μη εμπορεύσιμο. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν ελάχιστες αναφορές όσον αφορά την οξύτητα του ελαίου στο περικάρπιο των φιστικιών (*P.vera*), έχει αναφερθεί ότι η οξύτητα από το εξαγόμενο έλαιο περικάρπιου φιστικιών σε διαφορετικές ιρανικές ποικιλίες κυμαίνεται 1,6 έως 3,1 % w/w (Ahanchi et al.,2018).

5.2.3 Συμπέρασμα

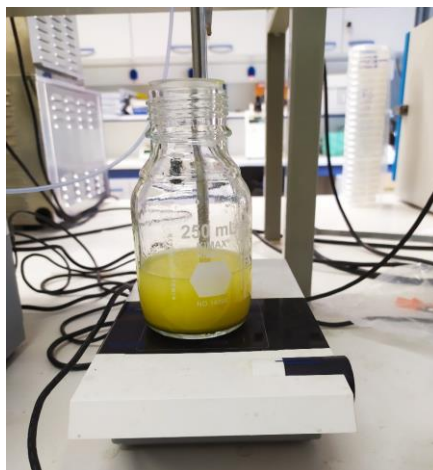
Η οξύτητα του ελαίου είναι αρκετά υψηλή, καθιστώντας το έλαιο Γ' κατηγορίας.

5.3 Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων

Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων στο περικάρπιο κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον (ΕΟΚ) αριθμό 2568/91 (2008), ελαφρώς τροποποιημένο. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα των συστατικών του δείγματος (εκφρασμένη σε χιλιοστοϊσοδύναμα (mEq) ενεργού οξυγόνου ανά kg) που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες ανάλυσης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι το ληφθέν δείγμα διαλύεται σε μείγμα οξικού οξέος και χλωροφορμίου και προστίθεται διάλυμα ιωδιούχου καλίου. Ακολουθεί ογκομέτρηση του απελευθερούμενου ιωδίου με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

5.3.1 Πειραματική Διαδικασία

Ζυγίζονται 1,5 g δείγματος του ελαίου σε εσφυρισμένη φιάλη των 250 mL με ακρίβεια 0,001 g. Έπειτα, προστίθενται 30 mL μείγματος χλωροφορμίου/οξικού οξέος με αναλογία 2:3 v/v και κατόπιν ανάδευσης προστίθεται 1 mL διαλύματος KI. Όλος ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός πρέπει να είναι απαλλαγμένος από αναγωγικές ή οξειδωτικές ουσίες. Στη συνέχεια, η φιάλη πωματίζεται, αναδεύεται και αφήνεται στο σκοτάδι για 5 min. Στην πορεία προστίθενται 75 mL απιονισμένου νερού και 4-5 σταγόνες δείκτη διαλύματος αμύλου. Το απελευθερούμενο ιώδιο ογκομετρείται με το διάλυμα του θειοθειικού νατρίου 0,01 M με ζωηρή ανάδευση. Το πέρας της τιτλοδότησης σηματοδοτείται από τον αποχρωματισμό του κυανού χρώματος του αμύλου (Εικόνα 17). Ταυτόχρονα, εκτελείται ένας λευκός προσδιορισμός (τυφλό δείγμα, δηλαδή 1 g απιονισμένου νερού). Εάν το αποτέλεσμα του τυφλού ξεπερνά τα 0,05 mL διαλύματος 0,01 M θειοθειικού νατρίου, αντικαθίστανται τα αντιδραστήρια.



Εικόνα 17: Αποχρωματισμός του δείκτη αμύλου

Ο αριθμός υπεροξειδίων (AY) εκφράζεται σε χλιοστοϊσοδύναμα (mEq) ενεργού οξυγόνου ανά kg και δίνεται από τη σχέση :

$$AY = \frac{(V - V') \times T \times 1000}{m} \quad \text{εξ. (8)}$$

Όπου :

V:ο αριθμός των mL του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) που χρησιμοποιείται για την ογκομέτρηση του δείγματος,

V':ο αριθμός των mL του προτύπου διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που χρησιμοποιείται για την ογκομέτρηση του τυφλού,

T: η ακριβής μοριακότητα του διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που χρησιμοποιείται,

m: η μάζα του δείγματος σε g.

5.3.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Σε αντίθεση, με την υψηλή τιμή οξύτητας που ανιχνεύτηκε στο έλαιο περικαρπίου, ο αριθμός των υπεροξειδίων ήταν αρκετά χαμηλός. Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι τιμές που ελήφθησαν από το πείραμα για να υπολογιστεί ο αριθμός των υπεροξειδίων του ελαίου του περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών.

Πίνακας 5: Τιμές μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (AY) σε έλαιο περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*).

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ (mL)	$V'_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ (mL)	T	m (g)	AY
1,05	1,0	0,01	1,55	0,32

Ο αριθμός των υπεροξειδίων εκφράστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 8 και βρέθηκε ότι $AY=0,32$, που είναι μικρότερος από 20, τιμή αντίστοιχη του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου σύμφωνα με τον Κανονισμό της Ε.Ε. αριθ. 2568/91 της 11ης Ιουλίου 1991. Σύμφωνα, με τους Ahanchi et al., (2018) ο αριθμός υπεροξειδίων στο έλαιο του περικαρπίου σε ιρανικές ποικιλίες είναι κοντά στο μηδέν. Η χαμηλή τιμή υπεροξειδίου οφείλεται στο υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων που περιέχεται στην φλούδα του φιστικιού. Αυτό το συμπέρασμα μπορεί να συσχετιστεί με την υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιοξειδωτικά, ιδιαίτερα σε τοκοφερόλες. Η χαμηλή τιμή υπεροξειδίου και ο υψηλός δείκτης οξείδωσης του ελαίου, σηματοδοτεί ότι το έλαιο είχε υψηλότερη οξειδωτική σταθερότητα (Shakerardekani, Tavakolipour, and Bakhtar, 2019).

5.3.3 Συμπέρασμα

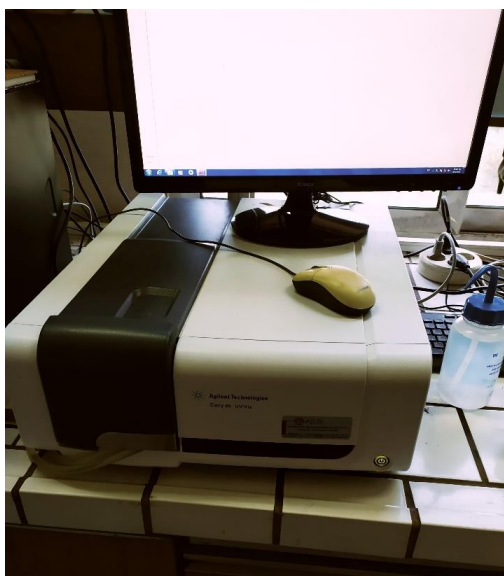
Η χαμηλή συγκέντρωση υπεροξειδίων στο έλαιο, σηματοδοτεί την παρουσία αντιοξειδωτικών σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρατείνοντας την διάρκεια ζωής του.

5.4 Προσδιορισμός δεικτών k, Δk και R με τη χρήση της φασματοσκοπίας UV-Vis

Ο προσδιορισμός των δεικτών k, ΔK και R του ελαίου περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ευρωπαϊκό πρότυπο ποιότητας του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθμό 2568/91 (2008) της Επιτροπής (παράρτημα ΙΧ του κανονισμού),ελαφρώς τροποποιημένο.

5.4.1 Πειραματική Διαδικασία

Ζυγίζονται 0,1 g ελαίου σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώνονται με κυκλοεξάνιο καθαρότητας 99,8 % μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προκύπτει ομογενοποιείται και έτσι παρασκευάζεται διάλυμα περιεκτικότητας 1 % w/v. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ήταν το φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) εφοδιασμένο με το λογισμικό CaryWinUV5.0 (Εικόνα 18). Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με χρήση μόνο του διαλύτη (blank). Το δείγμα αραιώθηκε περαιτέρω με κυκλοεξάνιο σε αναλογία 1:111 v/v , διότι ήταν αρκετά πυκνό. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 232, 238,270 και 274 nm.



Εικόνα 18: Φασματοφωτόμετρο UV-Vis

Στη συνέχεια, υπολογίζεται η ειδική απόσβεση k_n ή απλώς k , για κάθε μήκος κύματος, σύμφωνα με την Εξίσωση (9):

$$k_n = \frac{A_n}{C \cdot s} \quad \text{εξ. (9)}$$

Όπου,

A_n : η απορρόφηση στο εκάστοτε μήκος κύματος n

C : η συγκέντρωση εκφρασμένη σε g/L και

s : το πάχος της κυψελίδας (ισούται με 1 cm)

Ακολούθως, υπολογίζεται η μεταβολή της ειδικής απόσβεσης ΔK σύμφωνα με την Εξίσωση 10, και ο δείκτης R που υπολογίζεται με την Εξίσωση 11:

$$\Delta K = \left| k_{270} - \frac{k_{268} + k_{274}}{2} \right| \quad \text{εξ. (10)}$$

$$R = \frac{k_{232}}{k_{270}} \quad \text{εξ. (11)}$$

5.4.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση στο υπεριώδες μπορεί να παρέχει αρκετά σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα ενός ελαίου, την κατάσταση συντήρησής του καθώς και τις μεταβολές που προκλήθηκαν με τεχνολογικές διεργασίες.

Η απορρόφηση στα συγκεκριμένα μήκη κύματος οφείλεται στην παρουσία συζυγιακών διενίων και τριενίων συστημάτων που προκύπτουν από διαδικασίες οξείδωσης ή πρακτικές εξευγενισμού. Η εν λόγω απορρόφηση εκφράζονται ως ειδικές αποσβέσεις $E_{1\text{cm}} 1\%$ (η απόσβεση διαλύματος 1% του ελαίου στον καθορισμένο διαλύτη, σε πάχος κυψελίδας 1 cm), η οποία δηλώνεται με το σύμβολο k (ονομάζεται επίσης ως «συντελεστής απόσβεσης»). Ο δείκτης k_{232} συσχετίζεται με τις συνθήκες αποθήκευσης ενώ ο k_{270} εκφράζει κατά πόσο ένα έλαιο είναι φρέσκο, εκτός από κριτήριο ποιότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως κριτήριο αυθεντικότητας. Ο δείκτης R χρησιμοποιείται ως κριτήριο για τον διαχωρισμό μεταξύ υψηλής και χαμηλής ποιότητας ελαίων. Ο δείκτης Δk παρέχει πληροφορίες για την κατάσταση οξείδωσης του ελαίου. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή τόσο υψηλότερη είναι η ποιότητα του ελαίου. Η τιμή Δk του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,01.

Με τη χρήση του προγράμματος Excel υπολογίστηκε οι ειδικές αποσβέσεις k , η τιμή Δk και ο δείκτης R των δειγμάτων του ελαίου του περικαρπίου των κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*). Η ειδική απόσβεση υπολογίστηκε για κάθε μία απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση 9 και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Τιμές ειδικής απόσβεσης σε διαφορετικά μήκη κύματος σε έλαιο περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*).

k_{232}	k_{268}	k_{270}	k_{274}
1,26	1,63	1,35	1,27

Το ΔΚ υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 10 και βρέθηκε -0,0997, κατά απόλυτη τιμή 0,0997. Ενώ ο δείκτης R υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11 και βρέθηκε ίσος με 8,34.

Ο δείκτης k_{232} δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2,50 και ο k_{270} δεν πρέπει να υπερβαίνει η τιμή του το 0,22, για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Από τις τιμές τους μπορούμε να δούμε αν υπάρχουν πάρα πολλές οξειδωτικές ουσίες και αν έχει νοθευτεί το έλαιο. Επίσης όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ο δείκτης R είναι ένα άλλο κριτήριο διαχωρισμού των ελαίων. Για εξαιρετικό παρθένο λάδι πρέπει να είναι μικρότερος από 11,36. Το οποίο υπολογίζεται από $R\text{-value} < (2,50/0,22) \Rightarrow R\text{-value} < 11,36$. Στο έλαιο του περικαρπίου των κελυφωτών φιστικιών η τιμή k_{232} ήταν 1,26 κάτω από το 2,50 και η τιμή του k_{270} ήταν 1,35. Η τιμή του Δκ ήταν μεγαλύτερη από τα επιτρεπτά όρια, ενώ ο δείκτης R ήταν μικρότερος από 11,36. Επειδή, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες έρευνες για τον προσδιορισμό των δεικτών ποιότητας σε έλαιο περικαρπίου φιστικιών, οι τιμές των δεικτών ποιότητας συγκρίθηκαν με παρόμοιας χημικής σύστασης έλαια. Σε σύγκριση με τη μελέτη που διεξήχθη από τους Sakar et al. (2017) για το αμυγδαλέλαιο πέντε καλλιεργειών, η τιμή του k_{232} ήταν μεταξύ 1,04-1,90 και η τιμή του k_{270} ήταν μεταξύ 0,06-0,19. Αυτές οι τιμές βρίσκονται στο εύρος που θεωρείται ότι είναι έλαια υψηλής ποιότητας, αλλά φαίνεται να έχουν ελαφρώς αυξηθεί σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μελέτης που διεξήχθη στην παρούσα εργασία. Σε μια άλλη μελέτη, το έλαιο κολοκύθας είχε $k_{232} = 4,80$, $k_{270} = 3,52$ και τιμή $R = 0,74$ (Gohari et al., 2011). Άλλες μελέτες σχετικά με την επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην ποιότητα του λαδιού έχουν δείξει ότι οι τιμές των k_{232} και k_{270} συνεχίζουν να αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου (Al-Bachira and Othmana, 2019, Kiritsakis et al., 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ποιότητα του ελαιόλαδου θα μειωθεί εάν βρίσκεται σε υψηλές θερμοκρασίες (ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου) (Bubola et al., 2014).

5.4.3 Συμπέρασμα

Οι δείκτες ποιότητας φανερώνουν την ποιοτική κατάσταση του ελαίου. Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι το έλαιο δεν είναι μέσα στα αποδεκτά όρια των τιμών που έχει ορίσει ο κώδικας τροφίμων και ποτών για το ελαιόλαδο. Επομένως μπορεί να θεωρηθεί το έλαιο ως χαμηλής ποιότητας.

6 Μελέτη χημικής σύστασης αιθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος του περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*)

Μετά το πέρας της παραλαβής του ελαίου με τη συσκευή Soxhlet, επίσης, συλλέχτηκε αρκετή ποσότητα απολιπασμένου δείγματος (σκόνη), η οποία αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C) για περαιτέρω μελέτη. Μέρος του απολιπασμένου δείγματος εκχυλίστηκε με αιθανόλη και ένα δεύτερο μέρος του με νερό HPLC. Τόσο το αιθανολικό όσο και το υδατικό εκχύλισμα μελετήθηκαν χρωματογραφικά με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (-Q-TOF LC/MS), καθώς επίσης εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση και προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά του αιθανολικού εκχυλίσματος.

6.1 Παραλαβή αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση των περικαρπίων κελυφωτού φιστικιού *P.vera* L., πραγματοποιήθηκε με δυο τεχνικές και με την χρήση δύο διαλυτών σε απολιπασμένο δείγμα. Με την κλασσική μέθοδο, δηλαδή με απλή ανάδευση και με την μέθοδο της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 35 KHz (Ultrasound Assisted Extraction-UAE).

6.1.1 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων βάσει τύπου διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

Κωδικός δείγματος	Μέθοδος	Διαλύτης
Δ1-P.hull degreased	Ανάδευση	EtOH
Δ2- P.hull degreased	UAE	EtOH
Δ3- P.hull degreased	Ανάδευση	HPLC water
Δ4- P.hull degreased	UAE	HPLC water

6.1.2 Πειραματική διαδικασία

6.1.2.1 Αιθανολικά εκχυλίσματα

Χρησιμοποιήθηκαν δυο κωνικές φιάλες. Σε κάθε κωνική φιάλη προστέθηκαν 5 g απολιπασμένου περικαρπίου και 50 mL αιθανόλης (EtOH). Η μια κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα και η δεύτερη σε λουτρό υπερήχων στις ίδιες συνθήκες (25°C, 30 min) (Εικόνα 19). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα ξηράθηκε και ζυγίστηκε και τα διηθήματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία μικρότερη των 35 °C. Το στερεό επαναδιαλυτοποιήθηκε με MeOH LC-MS, υψηλής καθαρότητας >99.9% σε συγκέντρωση 15000 ppm.



Εικόνα 19: Μαγνητικός αναδευτήρας (αριστερά) και λουτρό υπερήχων (δεξιά).

6.1.2.2 Υδατικά εκχυλίσματα

Η διαδικασία για τα υδατικά εκχυλίσματα είναι η ίδια, που ακολουθήθηκε και κατά τη παραλαβή των αιθανολικών εκχυλισμάτων. Οι διαφορές έχουν να κάνουν με τον διαλύτη, που στην προκειμένη περίπτωση, είναι το νερό HPLC και τη τεχνική συμπύκνωσης των εκχυλισμάτων. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στα 5000 rpm για 10 min (Εικόνα 20), το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε με πιπέτα Pasteur και λυοφιλιώθηκε για 24 h.



Εικόνα 20: Συσκευή φυγοκέντρισης

Η απόδοση της εκχύλισης στα αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα εκφράζεται σε απόδοση % (w/w) και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{Απόδοση} = \frac{B_1 - B_0}{B_2} \times 100$$

Όπου,

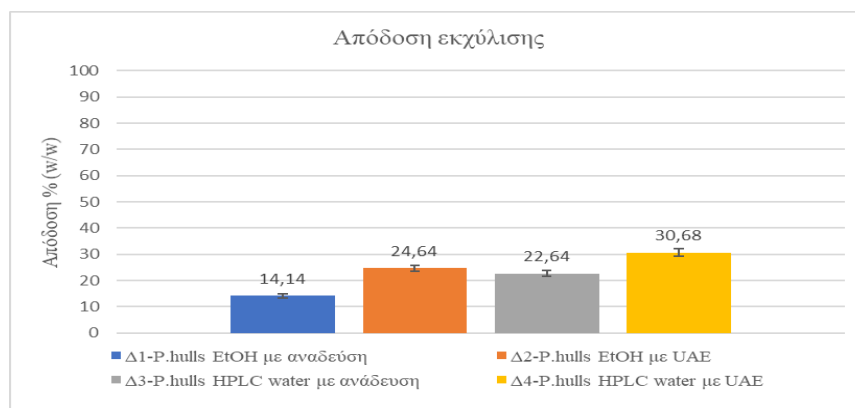
B_0 : το απόβαρο της κωνικής φιάλης σε g

B_1 : το μικό βάρος μετά την εξάτμιση σε g

B_2 : η μάζα του απολιπασμένου δείγματος σε g

6.1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζεται η απόδοση της εκχύλισης (% w/w), με δυο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης (απλή ανάδευση και UAE) και δυο διαφορετικούς διαλύτες (αιθανόλη και νερό HPLC).



Διάγραμμα 1: Απόδοση εκχυλίσεων απολιπασμένου περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*) με δυο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης και δυο διαφορετικούς διαλύτες.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στην απόδοση της εκχύλισης ανάλογα με τον διαλύτη και την τεχνική εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων Δ₁ με Δ₃ και των Δ₂ με Δ₄, όσον αφορά την ίδια τεχνική εκχύλισης και διαφορετικό διαλύτη. Ακόμα, διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των εκχυλισμάτων Δ₁ με Δ₂ και των Δ₃ με Δ₄, όσον αφορά τον ίδιο διαλύτη και διαφορετική τεχνική εκχύλισης. Επίσης, εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων Δ₁ με Δ₄. Η μεγαλύτερη απόδοση καταγράφηκε στο εκχύλισμα Δ₄ (30,68%), ενώ η μικρότερη στο εκχύλισμα Δ₁ (14,14%). Η απόδοση στο εκχύλισμα Δ₁ ήταν κατά 37,5% μικρότερη σε σύγκριση με το εκχύλισμα Δ₃, κατά 42,6% μικρότερη σε σύγκριση με το εκχύλισμα Δ₂ και κατά 53,9% μικρότερη σε σύγκριση με το εκχύλισμα Δ₄. Σύμφωνα με τους Taghizadeh et al. (2018), η απόδοση της εκχύλισης μεταξύ διαφορετικών διαλυτών, συμπεριλαμβανομένου του νερού και της αιθανόλης, που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση του περικαρπίου των φιστικιών κυμαίνεται από 16,22 έως 43,14%.

Όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα η καλύτερη τεχνική εκχύλισης είναι η εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (UAE). Σε προηγούμενες μελέτες, η χρήση της τεχνικής εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπερήχους σε χαμηλές συχνότητες (35 kHz), έδειξε ότι αυξάνει το φαινολικό περιεχόμενο (Erşan et al., 2017, Garavand, Madadlou and Moini, 2017).

Ο τύπος του διαλύτη καθώς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στη διαδικασία εκχύλισης και διαφορετικά αποτελέσματα ενδέχεται να επιτευχθούν μετά την εφαρμογή διαφορετικών διαλυτών. Σχετικά με την αξιολόγηση των διαλυτών, υπερτερεί το νερό. Για την εκχύλιση των πολικών φαινολικών ενώσεων του περικάρπιου φιστικιού (*P.vera*), οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι νερό, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι το νερό είναι ο καλύτερος διαλύτης στην εκχύλιση των πολικών φαινολικών ενώσεων καθώς αποτελεί μια εναλλακτική λύση φιλική προς το περιβάλλον (Erşana et al., 2018 & Arjeh et al., 2020). Ωστόσο, έχουν επίσης αναφερθεί αντιφατικά αποτελέσματα καθώς έχει παρατηρηθεί υψηλότερη απόδοση εκχύλισης χρησιμοποιώντας λιγότερο πολικούς διαλύτες, για λιγότερο πολικές φαινολικές ενώσεις (Rezaie et al., 2015).

Συνοψίζοντας, για την αύξηση της απόδοσης των πολικών φαινολικών ενώσεων του περικάρπιου φιστικιού (*P.vera*), οι σημαντικοί παράμετροι για την εκχύλιση είναι η κατάλληλη επιλογή της μεθόδου, καθώς και η επιλογή του

κατάλληλου διαλύτη. Ο συνδυασμός των δύο παραμέτρων, όπως διαπιστώθηκε στην εν λόγω μελέτη, βελτιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης και των πολικών φαινολικών συστατικών. Συγκεκριμένα, πιο αποδοτική ήταν η εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με την χρήση HPLC νερού ως διαλύτη. Το νερό είναι ένας καλός διαλύτης για τις πολικές φαινολικές ενώσεις, οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης αυτών των συστατικών σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες (η μεθανόλη, η αιθανόλη), ιδιαίτερα αν η εκχύλιση υποβοηθηθεί με υπερήχους (Corbin et al., 2015).

6.1.4 Συμπέρασμα

Η εφαρμογή νερού HPLC ως μέσο εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπερήχους, αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης.

6.2 Χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μαζών (LC-MS-QTOF)

6.2.1 Πειραματική διαδικασία

Τα τέσσερα κωδικοποιημένα δείγματα (Πίνακας 8) αραιώθηκαν κατάλληλα, μέχρι η τελική τους συγκέντρωση να είναι 2,5 mg/mL (2500 ppm) και ο τελικός όγκος τους 1 mL. Ο χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, ρυθμισμένος σε όγκο έκχυσης δείγματος 20 µL. Η στήλη ήταν ανεστραμμένης φάσης και συνδυάστηκαν δύο διαλύτες.

Πίνακας 8: Κωδικοποίηση δειγμάτων για ανάλυση με LC-MS QTOF

Κωδικός δείγματος	Μέθοδος	Διαλύτης
Δ1-P.hull degreased	Ανάδευση	MeOH
Δ2- P.hull degreased	UAE	MeOH
Δ3- P.hull degreased	Ανάδευση	HPLC water
Δ4- P.hull degreased	UAE	HPLC water

Ο διαλύτης A ήταν το νερό HPLC, ο διαλύτης B ήταν MeOH LC-MS και οι δυο διαλύτες ήταν οξιτισμένοι με μυρμηγκικό οξύ (0,1%). Ο χρωματογραφικός

διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία στήλης 21°C, η ροή της κινητής φάσης ήταν σταθερή στα 0,5 mL/min και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18 (μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρος 4,6 nm και μέγεθος σωματιδίων 2,7 μm). Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 95 min και η τεχνική έκλουσης των διαλυτών που εφαρμόστηκε ήταν βαθμιδωτή ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών (Πίνακας 9). Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιόντος, ώστε να σχηματιστεί αρνητικό ιόν $[M-H]^-$. Το εύρος για το ρυθμός σάρωσης ιόντων m/z ορίστηκε μεταξύ 70-500 nm. Τα μήκη κύματος που καταγράφηκαν ήταν τα ακόλουθα: 230, 270, 280, 320, 360, 530 nm, τα οποία προσδιορίστηκαν με βάση την βιβλιογραφία και τα φάσματα US-Vis. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε βάσει του χρόνου έκλουσης (Retention time-Rt), των φασμάτων απορρόφησης τους από τη βιβλιογραφία, καθώς και από το μοριακό ιόν (m/z). Όσον αφορά, το φάσμα μάζας κάθε συστατικού, λήφθηκε υπόψιν το θραύσμα μάζας m/z του μοριακού ιόντος του.

Πίνακας 9: Σύσταση (% v/v) της κινητής φάσης της χρωματογραφικής αναλυτή

Χρόνος (min)	Διαλύτης A	Διαλύτης B
0.00	90	10
9.00	75	25
15.00	70	30
22.00	60	40
35.00	50	50
48.00	35	65
70.00	20	80
95.00	90	10

6.2.2 Αποτελέσματα- Συζήτηση

6.2.2.1 Αιθανολικά Εκχυλίσματα

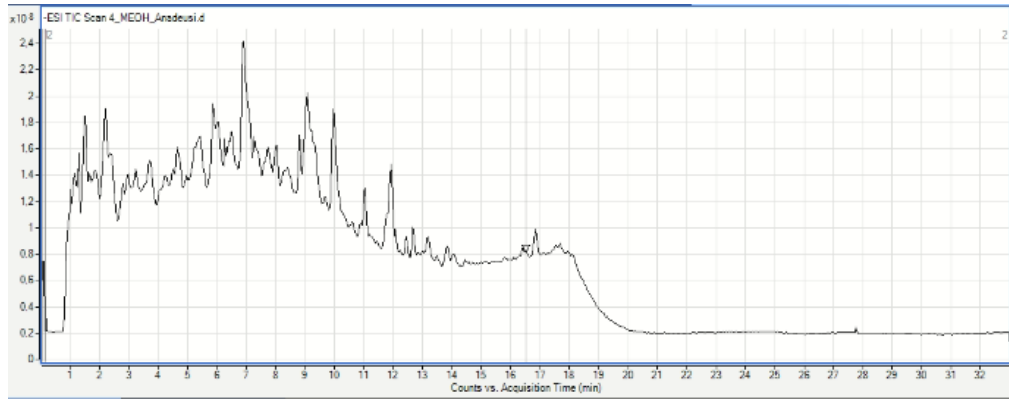
6.2.2.1.1 Εκχυλίσματα με την τεχνική της ανάδευσης

Ανιχνεύτηκαν κυρίως φαινολικές ενώσεις. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 10, στο οξιτισμένο μεθανολικό εκχύλισμα λυοφιλωμένου περικαρπίου προσδιορίζονται ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά συστατικά με αύξοντα χρόνο συγκράτησης. Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν ήταν: το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρικετρίνη, η μυρικετίνη και η καμφερόλη.

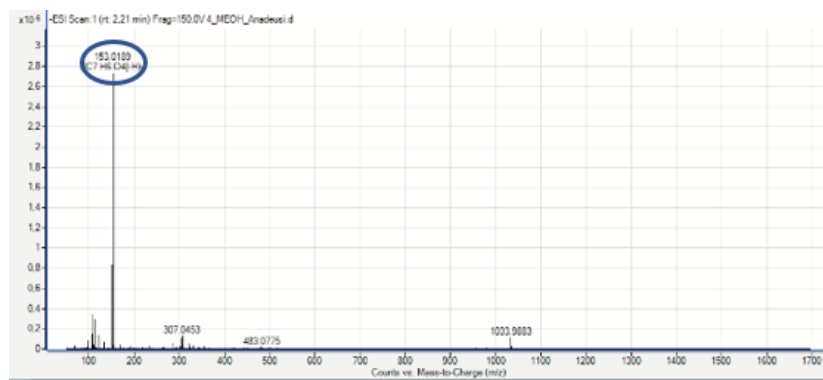
Πίνακας 10: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος, με την τεχνική της απλής εκχύλισης, λυοφιλωμένου περικαρπίου.

#	Rt (min)	Φαινολική ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ Θεωρητικό	[M-H] ⁻ Πειραματικό	Fragmentor	Mass Error (ppm)
1	1,47	Φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	125,0244	125,0241	150	2,59
2	1,5	Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0139	150	1,8
3	2,21	Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	153,0187	153,0189	150	2,78
4	3,33	4- Υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	137,0245	150	-0,31
5	3,87	Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	167,0350	167,0346	150	2,48
6	5,46	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163,0400	163,0402	150	-0,78
7	6,20	Ελαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9990	300,9983	150	2,4
8	6,30	Μυρικετρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0874	150	1,8
9	8,02	Μυρικετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,303	317,0297	150	1,9
10	11,20	Ναριγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	271,0609	150	1,14
11	11,91	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	285,0402	150	0,97
12	15,16	Πινοσεμπρίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255,0663	255,0657	150	2,28

Στην εικόνα 21, παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του αιθανολικού εκχυλίσματος με απλή ανάδευση και έπειτα, τα φάσματα μαζών των πέντε κύριων φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.



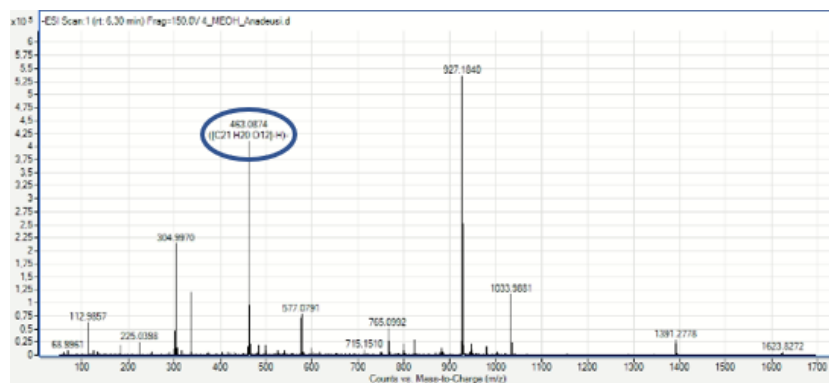
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ανάδευσης.



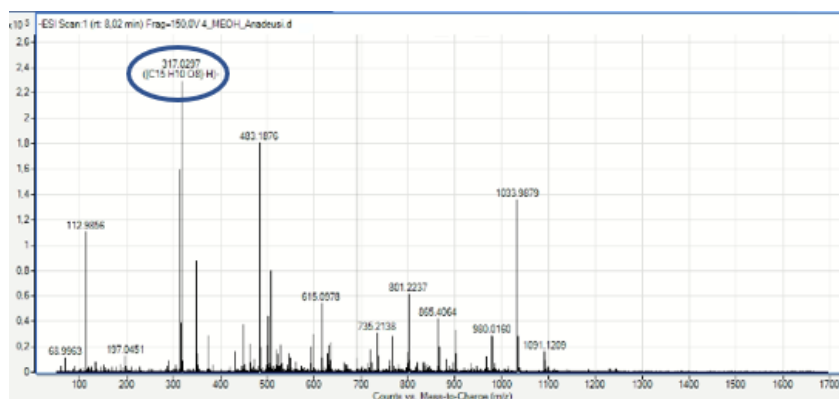
Εικόνα 22: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος



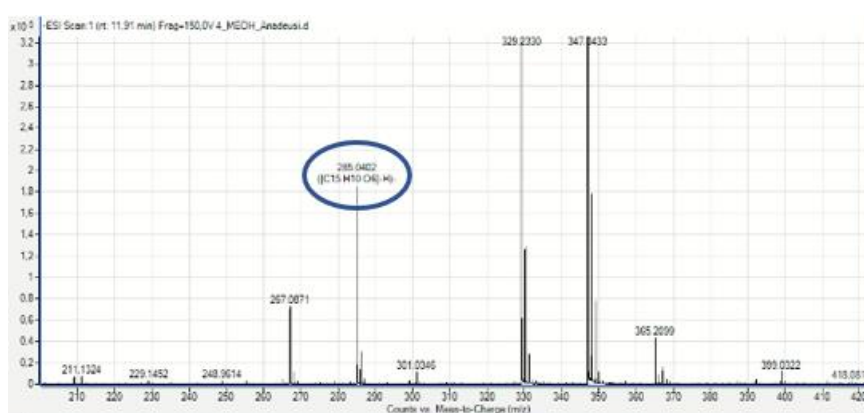
Εικόνα 23: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος



Εικόνα 24: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης



Εικόνα 25: Φάσμα μαζών μυρικετίνης



Εικόνα 26: Φάσμα μαζών καμφερόλης

6.2.2.1.2 Εκχύλισμα υποβοηθούμενα με υπερήχους

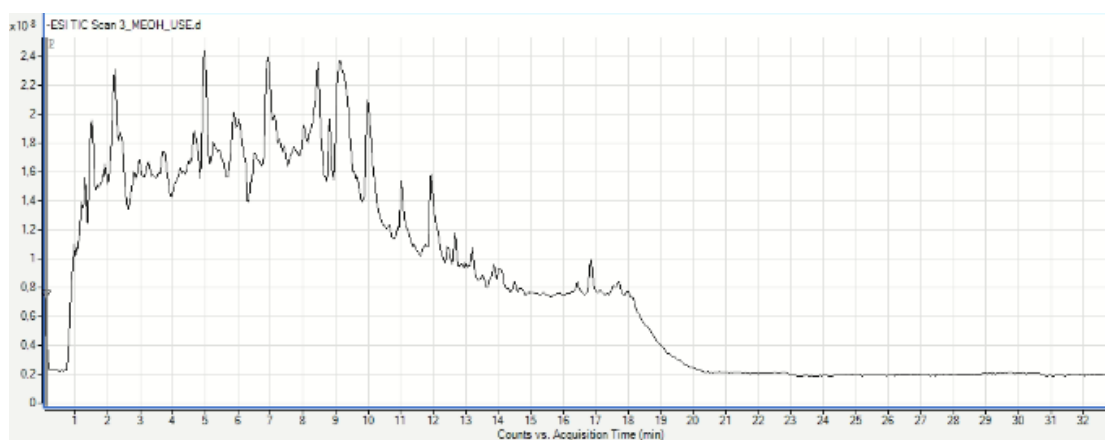
Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 11 αρχικά, εκλύεται η φλωρογλυκινόλη και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, το ομογεντισικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και τέλος, η πινοσεμπρίνη. Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα, οι κύριες φαινολικές ενώσεις ήταν: το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρικετρίνη και η καμφερόλη.

Πίνακας 11: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, λυοφιλωμένου περικαρπίου.

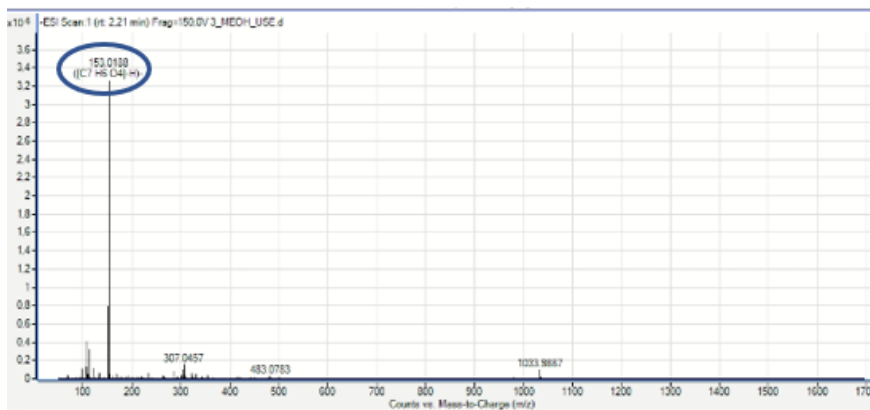
#	Rt (min)	Φαινολική ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ Θεωρητικό	[M-H] ⁻ Πειραματικό	Fragmentor	Mass Error (ppm)
1	1,46	Φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	125,0244	125,0243	150	0,99
2	1,5	Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0137	150	3,0
3	1,8	Ομογεντισικό	C ₈ H ₈ O ₄	167,0350	167,0347	150	1.8

		οξύ					
4	2,21	Πρωτοκατεχικό οξύ	$C_7H_6O_4$	153,0187	153,0188	150	-0,5
5	3,32	4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0243	150	0,7
6	5,48	π-κουμαρικό οξύ	$C_9H_8O_3$	163,0400	163,0400	150	0,1
7	6,23	Ελαγικό οξύ	$C_{14}H_6O_8$	300,9990	300,9988	150	0,7
8	6,30	Μυρικετρίνη	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0882	463,0875	150	1,6
9	8,02	Μυρικετίνη	$C_{15}H_{10}O_8$	317,303	317,0295	150	2,5
10	11,23	Ναριγενίνη	$C_{15}H_{12}O_5$	271,0612	271,0609	150	1,2
11	11,90	Καμφερόλη	$C_{15}H_{10}O_6$	285,0404	285,0404	150	0,1
12	12,14	Ισορχαμνετίνη	$C_{16}H_{12}O_7$	315,0510	315,0508	150	0,7
13	15,15	Πινοσεμπρίνη	$C_{15}H_{12}O_4$	255,0663	255,0666	150	-1,08

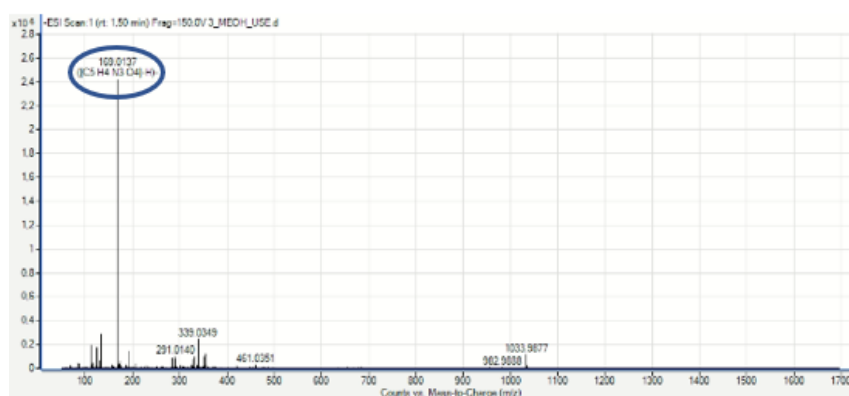
Στην εικόνα 27, φαίνεται το χρωματογράφημα του αιθανολικού εκχυλίσματος υποβοηθούμενο σε λουτρό υπερήχων και ακολούθως, τα φάσματα μαζών των τεσσάρων κύριων φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.



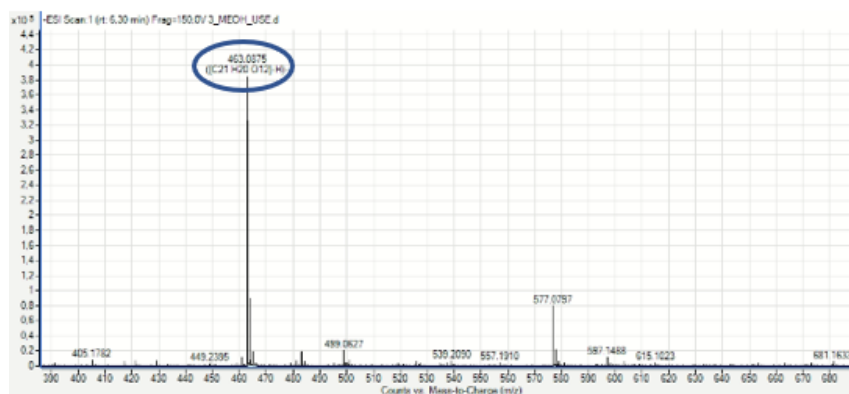
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με υπέρηχους.



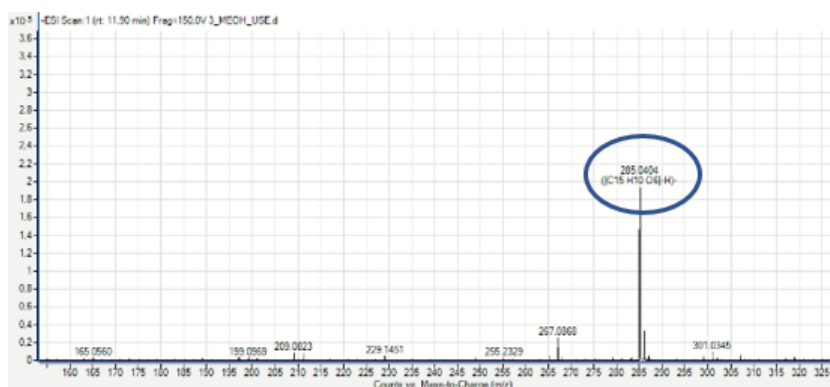
Εικόνα 28: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος



Εικόνα 29: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος



Εικόνα 30: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης



Εικόνα 31: Φάσμα μαζών καμφερόλης

6.2.2.2 Υδατικά Εκχυλίσματα Περικαρπίου

6.2.2.2.1 Εκχυλίσματα με την τεχνική της ανάδευσης

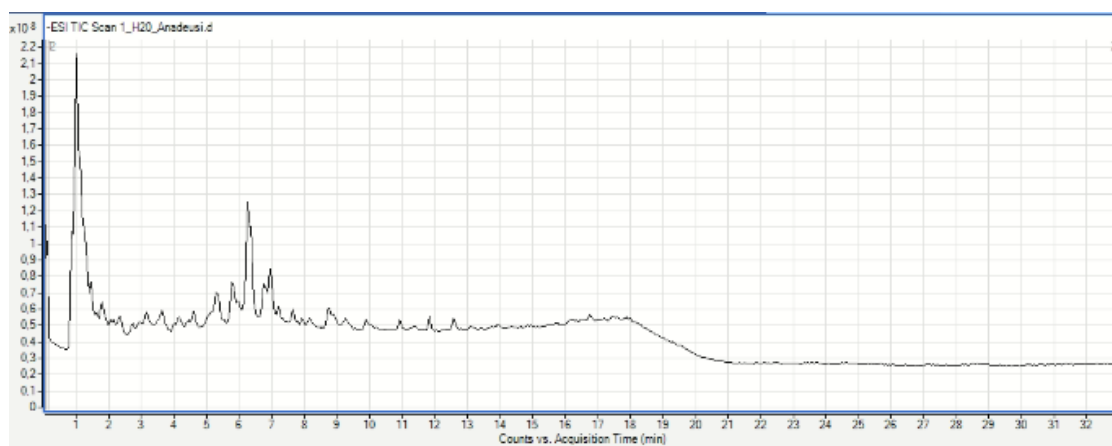
Όπως παρατηρείται στον πίνακα 12, στο υδατικό λυοφιλωμένο εκχύλισμα περικαρπίου προσδιορίζονται ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά συστατικά με αύξοντα χρόνο κατακράτησης. Αρχικά, εκλούεται η φλωρογλυκινόλη και ακολουθούν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και τέλος, η καμφερόλη. Οι φαινολικές ενώσεις με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα ήταν: το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και η μυρικετρίνη.

Πίνακας 12: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος, με την τεχνική της απλής ανάδευσης, λυοφιλωμένου περικαρπίου

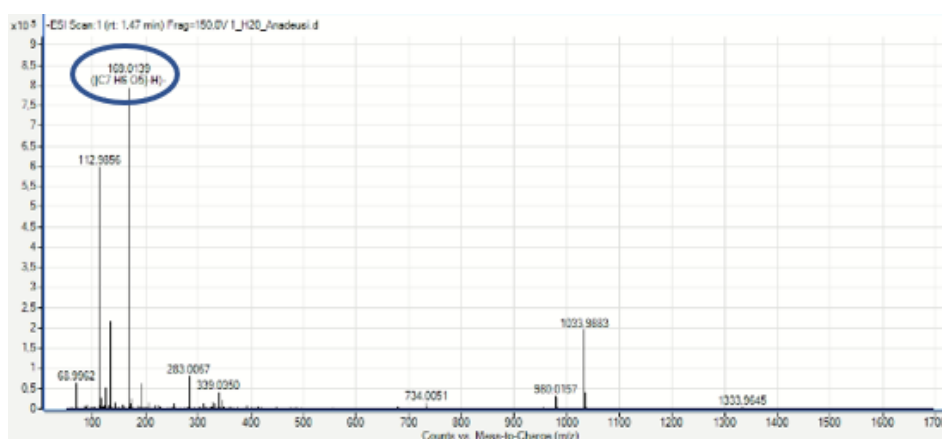
#	Rt (min)	Φαινολική ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ Θεωρητικός	[M-H] ⁻ Πειραματικός	Fragmentor	Mass Error (ppm)
1	1,48	Φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	125,0244	125,0244	150	0,1
2	1,5	Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0139	150	1,8
3	2,21	Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	153,0187	153,0193	150	-3,92
4	3,33	4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	137,0244	150	0,1
5	6,28	Μυρικετρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0870	150	2,6
6	8,02	Μυρικετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,303	317,0303	150	0,1

7	9,99	Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	285,0398	150	2,1
8	11,1	Ναριγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	271,0608	150	1,56
9	11,8	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	285,0402	150	0,8

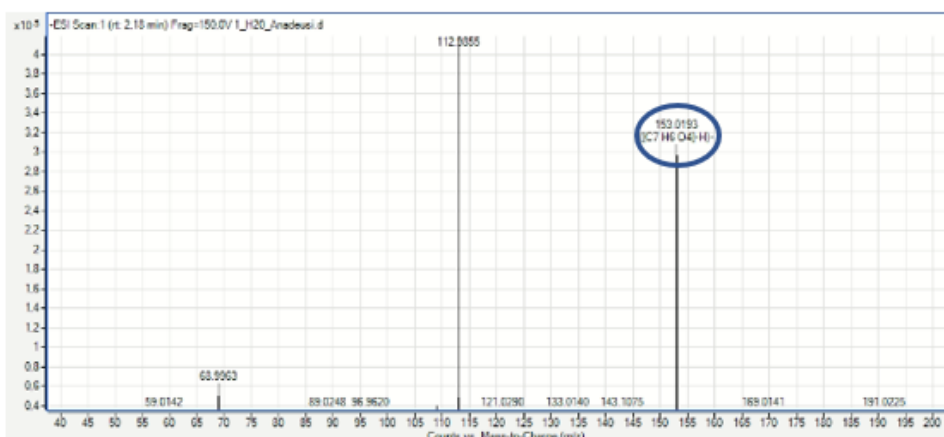
Στην εικόνα 32, παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος με απλή ανάδευση και έπειτα, τα φάσματα μαζών των τριών κύριων φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.



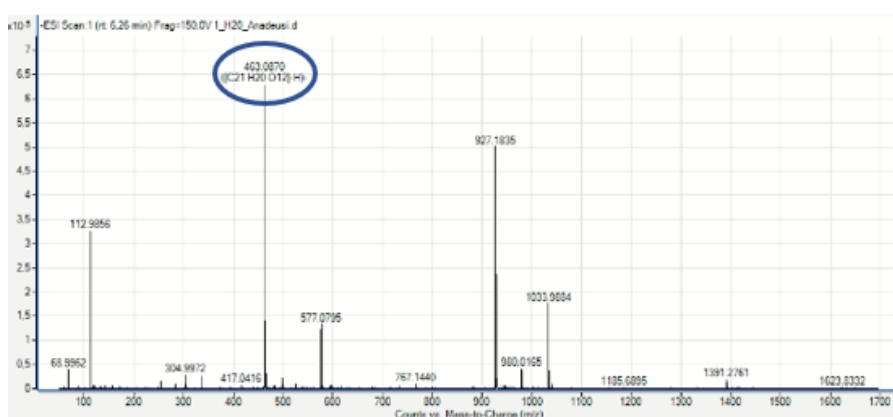
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ανάδευσης.



Εικόνα 33: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος



Εικόνα 34: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος



Εικόνα 35: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης

6.2.2.2.2 Εκχυλίσματα υποβοηθούμενα με υπερήχους

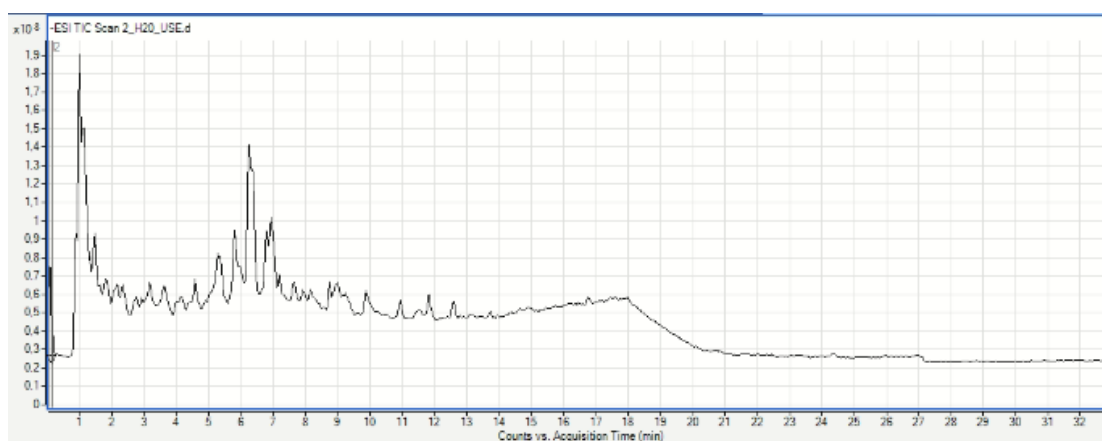
Όπως παρατηρείται στον πίνακα 13, στο υδατικό λυοφιλωμένο εκχύλισμα περικαρπίου προσδιορίζονται ποιοτικά τα ακόλουθα φαινολικά συστατικά με αύξοντα χρόνο συγκράτησης. Όπως και στην περίπτωση της εκχύλισης με απλή ανάδευση, έτσι και σε αυτό, τα κύρια φαινολικά συστατικά είναι το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και η μυρικετρίνη.

Πίνακας 13: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, λυοφιλωμένου περικαρπίου.

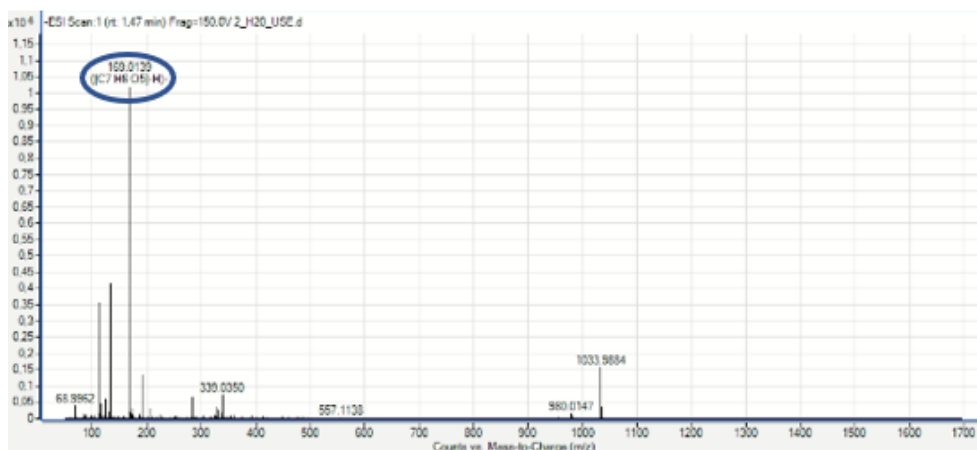
#	Rt (min)	Φαινολική ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ Θεωρητικός	[M-H] ⁻ Πειραματικός	Fragmentor	Mass Error (ppm)
1	1,48	Φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	125,0244	125,0242	150	1,79
2	1,48	Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0139	150	1,8

3	2,19	Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	153,0187	153,0193	150	-3,92
4	3,33	4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	137,0244	150	0,1
5	5,4	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163,0400	163,0399	150	0,6
6	6,26	Μυρικετρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0869	150	2,9
7	7,99	Μυρικετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,303	317,0302	150	0,4
8	9,94	Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	285,0407	150	-1,1
9	11,13	Ναριγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	271,0611	150	0,46
10	11,83	Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	285,0403	150	0,4

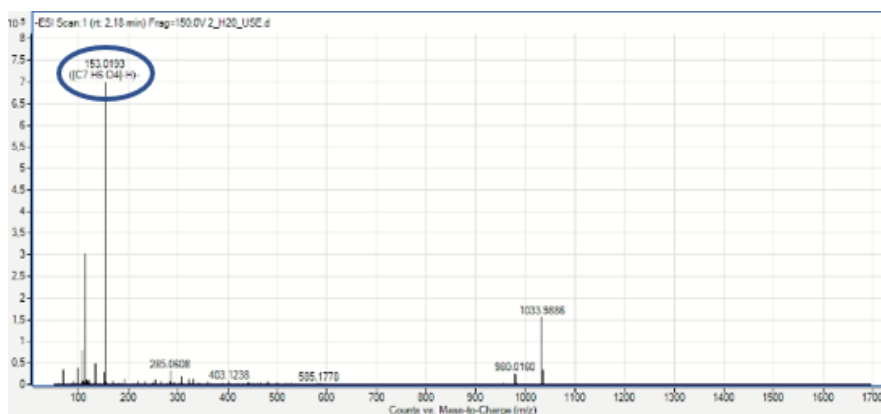
Στην εικόνα 36, φαίνεται το χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος υποβοηθούμενο σε λουτρό υπερήχων και ακολούθως, τα φάσματα μαζών των τριών κύριων φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.



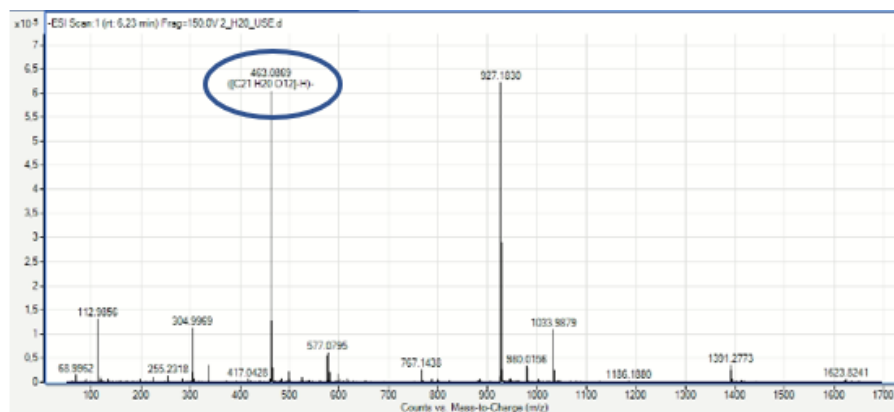
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος, η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με υπέρηχους.



Εικόνα 37: Φάσμα μαζών γαλλικού οξέος



Εικόνα 38: Φάσμα μαζών πρωτοκατεχικού οξέος



Εικόνα 39: Φάσμα μαζών μυρικετρίνης

Συνολικά 15 φαινολικές ενώσεις (το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρικετρίνη, η μυρικετίνη, η καμφερόλη, η φλωρογλυκινόλη, η ναριγενίνη, το ελαγικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, η πινοσεμπρίνη, η ισορχαμνετίνη,

η λουτεολίνη, το ομογεντισικό οξύ και το βανιλικό οξύ) ταυτοποιήθηκαν στα τέσσερα δείγματα λυοφιλιωμένου περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*). Σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές έρευνες, βρέθηκαν αντίστοιχα φαινολικά συστατικά, καθώς και άλλα (Barreca et al.,2016, Erşan et al.,2016& Erşan et al.,2018).

6.2.3 Συμπέρασμα

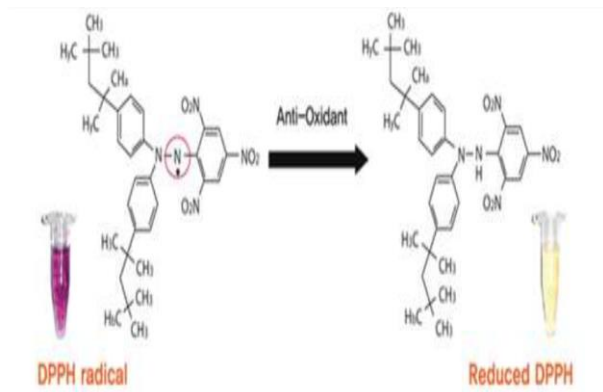
Η επιλογή του διαλύτη καθώς και η τεχνική της εκχύλισης διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Παρατηρήθηκε ότι στα αιθανολικά εκχυλίσματα, υποβοηθούμενα με υπέρηχους, ανιχνεύτηκαν περισσότερες πολικές φαινολικές ενώσεις και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

6.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική της υποβοήθησης από υπέρηχους

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά φυτικής προέλευσης. Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι τα αντιοξειδωτικά φυτικής προέλευσης σχετίζονται με την πρόληψη διαφόρων παθολογικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, διαφόρων καρδιαγγειακών και νευρολογικών ασθενειών . Προκύπτει έτσι, ένα φλέγον ζήτημα για τους επιστήμονες και τους ερευνητές που ασχολούνται με τους κλάδους της υγείας και της διατροφής, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Comert and Gokmen, 2018). Τα φιστίκια και ιδίως το περικάρπιο αυτών αποτελούν μια πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων με υψηλό δυναμικό αντιοξειδωτικών (Tomaino et. al., 2010).

6.3.1 Δοκιμή DPPH

Η ρίζα DPPH• (1,1 διφαινυλο-2 πικρυλυδραζύλιο) αποτελεί μια από τις πιο γνωστές και σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και δεν χρειάζεται να δημιουργηθεί πριν από την δοκιμασία, όπως η ρίζα ABTS• (Molyneux, 2003). Η σταθερή ρίζα DPPH• αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται). Με τη μείωση, ιώδες χρώμα του διαλύματος εξασθενεί και μετατρέπεται σε αχνό κίτρινο (Εικόνα 40). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιείται η απορρόφηση 517 nm (Blois, 1958).



Εικόνα 40: Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH (Molyneux ,2003).

Ο πρώτος που καθιέρωσε τη μέθοδο DPPH ήταν ο Blois (1958), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αντιοξειδωτικό την κυστεΐνη. Ύστερα, από συνεχή επιστημονικά πειράματα, η πιο πρόσφατη και καθιερωμένη μέθοδος είναι αυτή του Brand-Williams και της ομάδας του (1995).

6.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκε το μητρικό διάλυμα DPPH. Για το σκοπό αυτό, ζυγίστηκαν 3,2 mg DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με οξικό αιθυλεστέρα (AcOEt) μέχρι τη χαραγή. Το αντιδραστήριο DPPH παρασκευάστηκε την ίδια μέρα που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Παράλληλα, για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων από 0,05 έως 0,8 mM σε AcOEt . Στη συνέχεια, σε περιέκτη (vial) αναμιγνύονται 100 μL δείγματος (ή προτύπου διαλύματος Trolox) και 4 mL διαλύματος DPPH. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος σε Vortex για 30 s και διατήρησή του για 30 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Μετά τα 30 min, το περιεχόμενο του vial τοποθετήθηκε σε κυψελίδες και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 515 nm. Χρησιμοποιήθηκε καθαρός AcOEt για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Όλοι οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

Τέλος, υπολογίστηκε η παρεμποδιστική ικανότητα I(%) του δείγματος με χρήση της εξίσωσης 12:

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad \text{εξ. (12)}$$

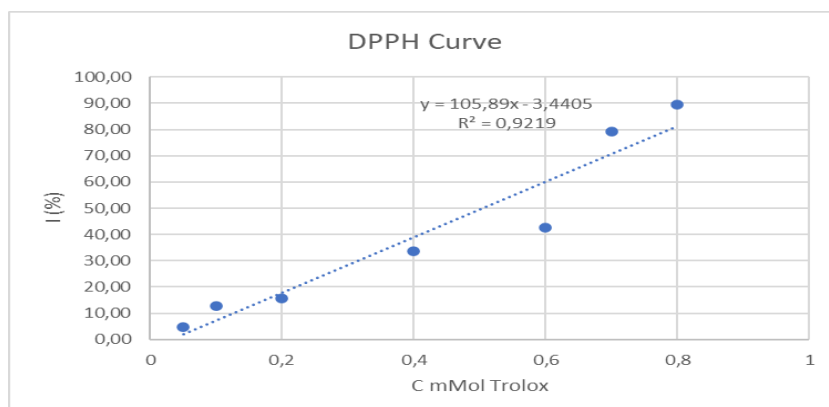
6.3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Όσο περισσότερες ελεύθερες ρίζες δεσμεύονται, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό του αντιδραστηρίου αντιδρά με το δείγμα, έτσι ώστε το χρώμα του διαλύματος να αλλάζει από μωβ σε κίτρινο (Εικόνα 41). Όσο πιο πολύ αποχρωματίζεται το διάλυμα, τόσο πιο ισχυρό είναι το αντιοξειδωτικό.



Εικόνα 41: Αποχρωματισμός αιθανολικού εκχυλίσματος με τη δοκιμή DPPH.

Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή σε Trolox έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης η οποία είναι η: $y = 105,89x + 3,4405$, με $R^2 = 0,9219$. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράστηκαν σε mM Trolox. Στην Εικόνα 42, φαίνεται η πρότυπη καμπύλη με βάση την οποία προσδιορίστηκε το I(%). Στον Πίνακα 14, παρατίθενται τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης των ελεύθερων ριζών (I%). Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.



Εικόνα 42: Πρότυπη καμπύλη Trolox για την δοκιμή DPPH σε αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*).

Πίνακας 14: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού δείγματος με τη δοκιμή DPPH και η συγκέντρωση του σε ισοδύναμα Trolox (mM).

Δείγμα	I (%)	M.O. ± S.D (mM Trolox) (n=3)
Extract EtOH P. hull degreased-UAE	82,97	0,172±0,053

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 14, η τιμή για την παρεμπόδιση των ελεύθερων ριζών (I%) ανέρχεται στα 82,97 %. Σύμφωνα με τους Taghizadeh et al. (2018), υπολόγισαν το ποσοστό παρεμπόδισης (I%), με τη δοκιμή DPPH, σε εκχυλίσματα περικαρπίου στο 51,42%, όταν ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε AcOEt, ενώ με διαλύτη το εξάνιο η τιμή αυξήθηκε στο 82,23%. Επίσης, οι Barreca et al. (2016), υπολόγισαν τη παρεμποδιστική δράση (I%), με τη δοκιμή DPPH, σε αιθανολικά εκχυλίσματα στο 56%, ενώ σε μεθανολικά εκχυλίσματα η τιμή ήταν υψηλότερη στο 65%. Ακόμη, σε μαθανολικά εκχυλίσματα κόκκινου-ώριμου περικαρπίου η τιμή της παρεμποδιστικής δράσης έφτασε 80,55% (Gezici, 2019).

6.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

6.4.1 Μέθοδο Folin-Ciocalteu

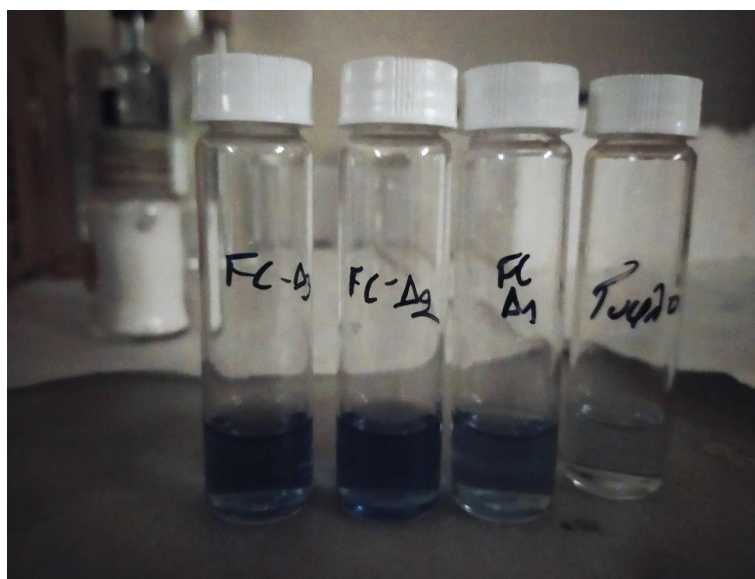
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) βασίζεται σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση των συνολικών φαινολικών. Την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδενικού ($H_3MoO_{12}O_{40}$) και του φωσφοροβολφραμικού ($H_3PW_{12}O_{40}$) οξέος, τα οποία είναι συστατικά του αντιδραστήριου (F-C) (Singleton et al. 1999). Για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων μετριέται η απορρόφηση στα 745-770 nm.

6.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά το έτοιμο αντιδραστήριο F-C, αραιώθηκε σε φιάλη 250 mL με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:100 (v/v) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή του διαλύματος Na_2CO_3 (7,5% w/v), ζυγίστηκαν 7,5 g Na_2CO_3 μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκαν με νερό μέχρι την χαραγή. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν οκτώ πρότυπα διαλύματα καφεϊκού οξέος με συγκεντρώσεις 0,5, 2, 4, 8, 12, 16, 24, και 32 mg/mL. Ακολούθως, σε περιέκτη (vial) προστέθηκαν 400 μ L δείγματος ή πρότυπου διαλύματος και 100 μ L νερού. Προστέθηκαν 2,5 mL διαλύματος F-C και μετά από 5 min εμβολιάστηκαν με 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 . Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος για 30 s σε Vortex και

επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), στο σκοτάδι για 1,5 h. Στην συνέχεια, κάθε 30 min, επαναλαμβάνονταν η ανάδευση τους στη συσκευή Vortex. Μετά τα πέρασ των 90 min ,το περιεχόμενο διάλυμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδες και φωτομετρήθηκε στα 765 nm με φορητό φωτόμετρο Portable Datalonging Spectrophotomer (Εικόνα 43). Χρησιμοποιήθηκε ακετόνη για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Για κάθε προσδιορισμό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εις τριπλούν.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 765 nm των προτύπων διαλυμάτων του καφεϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα της μεθόδου F-C, εκφράστηκαν ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL).



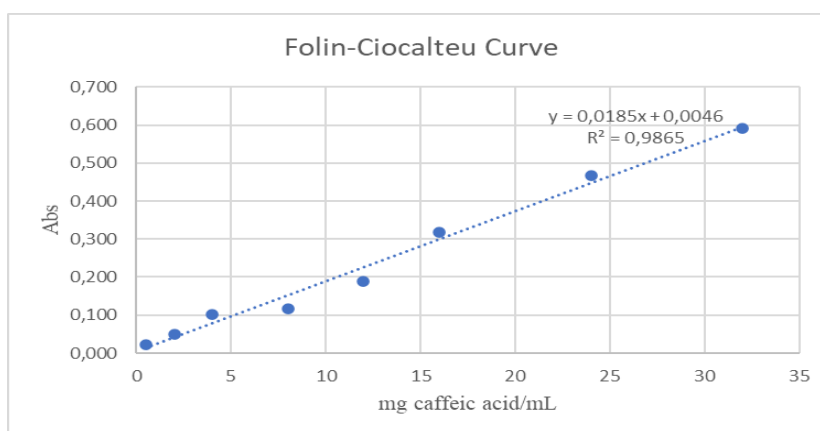
Εικόνα 43: Αιθανολικό εκχύλισμα με το αντιδραστήριο (F-C), δημιουργώντας στα διαλύματα ένα βαθύ μπλε χρώμα. Στην δεξιά πλευρά των διαλυμάτων είναι ο μάρτυρας (ακετόνη) που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις.

Για να προσδιοριστούν τα ολικά φαινολικά στο αιθανολικό εκχύλισμα διαλύθηκαν 5 g λυοφιλωμένου αιθανολικού εκχυλίσματος σε αιθανόλη μέχρι τελικού όγκου 50 mL.

6.4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Για την εκτίμηση των ολικών φαινολικών, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του καφεϊκού οξέος, η οποία είναι η $y=0,01854x+0,0046$ με $R^2=0,9865$. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών εκφράστηκαν σε mg καφεϊκού οξέος/mL. Στην Εικόνα 44, παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη με βάση την οποία προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στο αιθανολικό

εκχύλισμα. Συνεπώς για να βρεθεί η αντίστοιχη συγκέντρωση για το αντίστοιχο δείγμα, έγινε αντικατάσταση στην τιμή του y με την απορρόφηση του δείγματος στην αντίστοιχη καμπύλη.



Εικόνα 44: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο (F-C) σε αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*).

Πίνακας 15: Υπολογισμός συγκέντρωσης του αιθανολικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο (F-C)

Δείγμα	P. Hull_EtOH_UAE
μL	A ₇₆₅
400	0,318
Εξίσωση	$y=0,01854x+0,0046$
R²	$R^2=0,9865$
Κδείγματος (mg caffeic acid/mL)	17,42

Στον Πίνακα 15, παρατίθεται η συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος, η οποία είναι ίση 17,42 mg καφεϊκού οξέος/ mL (ή 174,2 καφεϊκού οξέος w/w λυοφιλωμένου περικαρπίου). Σύμφωνα, με τους Taghizadeh et al. (2018), η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών, σε αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου, με τη μέθοδο (F-C), ήταν στα 113,21 γαλλικού οξέος (GA) w/w (Taghizadeh et al., 2018). Σε πρόσφατη δημοσίευση, φάνηκε πως η καλύτερη επιλογή του διαλύτη κατά την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων στο περικάρπιο φιστικιού είναι η αιθανόλη, αυξάνοντας την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών στα 47 GA w/w σύμφωνα με τη μέθοδο F-C (Pakdaman et al., 2021).

6.4.4 Συμπεράσματα

Το δείγμα από ότι φαίνεται παρουσιάζει μια αρκετά υψηλή περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία οφείλεται στην παρουσία υψηλού ποσοστού φαινολικών ενώσεων.

7. Κυτταροτοξικότητα υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.vera*)

Έπειτα, μετά την ανίχνευση των φαινολικών κλασμάτων και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, συλλέχθηκε επαρκής ποσότητα από το υδατικό εκχύλισμα του περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*) και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια αξιολόγησης της αντικαρκινικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τρεις επιλεγμένες καλλιέργειες κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου νευροβλαστώματος *SK-N-SH* (ATCC® HTB-11™), του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας *HeLa* (ATCC® CCL-2™) και του ανθρώπινου παχέος εντέρου *CaCo-2* ώστε να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Στο πλαίσιο αυτό, εξετάστηκε η επίδραση στη βιωσιμότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων, έπειτα από 24 και 48 ώρες επώασης, με τη δοκιμή MTT.

7.1. Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων

Στα πλαίσια του πειράματος της παρούσας εργασίας καλλιεργήθηκαν τα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου νευροβλαστώματος *SK-N-SH* (ATCC® HTB-11™), του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας *HeLa* (ATCC® CCL-2™) και του ανθρώπινου παχέος εντέρου *CaCo-2*.

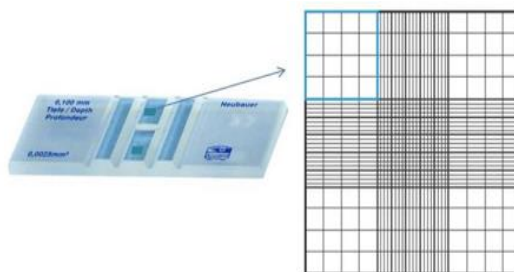
Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε φλάσκες 75 cm², οι οποίες περιέχουν θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορού εμβρύου μόσχου (FBS). Για κάθε μια από τις κυτταρικές σειρές χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό με την κατάλληλη σύσταση. Τα κύτταρα *HeLa* και *CaCo-2* καλλιεργούνται σε υπόστρωμα Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ενώ τα *SK-N-SH* σε Minimum Essential Medium (MEM) με άλατα Earle's. Οι συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37°C και σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂. Η αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται ανά 48-72 ώρες, η οποία εξαρτάται από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται είναι απαραίτητη όταν τα κύτταρα που καλλιεργούνται καλύψουν σε ποσοστό 80-100% την επιφάνεια της φλάσκας. Ο προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης πραγματοποιείται με παρατήρηση της φλάσκας σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Πιο συγκεκριμένα, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από την φλάσκα καλλιέργειας και ακολουθεί ξέπλυμα με 3-5 mL διαλύματος 1x PBS (αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα

φωσφορικών). Για να επιτευχθεί αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της πλάσκας προστίθεται 1 mL ενζυμικού διαλύματος θρυψίνης/EDTA και τα κύτταρα επωάζονται για 5 min στους 37°C. Εν συνεχεία, προστίθενται 9 mL θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένο με 10% FBS, ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης και το εναιώρημα συλλέγεται και τοποθετείται σε falcon των 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 4 λεπτά στους 25°C προκειμένου να γίνει η απομάκρυνση της θρυψίνης. Έπειτα, γίνεται η αφαίρεση του υπερκείμενου και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Ύστερα, μεταφέρεται μικρή ποσότητα κυττάρων περίπου 10 μ L σε πλάκα Neubauer και τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο με σκοπό να πραγματοποιηθεί η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Τα κύτταρα διατηρούνται σε εναιώρημα μέχρι το επόμενο στάδιο. Οι διαδικασίες του χειρισμού των κυττάρων πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα υλικά και σε απαγωγό κάθετου νηματικής ροής.

7.2 Μέτρηση αριθμού κυττάρων σε αιματοκυτταρομετρική πλάκα Neubauer

Η μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ανά μονάδα όγκου πραγματοποιηθεί με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου Neubauer προκειμένου να εκτιμηθεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων SK-N-SH, HeLa και CaCo-2. Το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο θαλάμους, στους οποίους υπάρχουν περιοχές μέτρησης των κυττάρων (Εικόνα 45). Σε κάθε θάλαμο περιέχει δυο όμοια τετράγωνα τα οποία υποδιαιρούνται σε εννέα πρωτεύοντα τετράγωνα με επιφάνεια 1 mm². Τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα που βρίσκονται στις γωνίες υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα ενώ το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 τετράγωνα. Όλες αυτές οι διαβαθμίσεις του τετραγωνικού πλέγματος διευκολύνουν την ακριβή μέτρηση των κυττάρων.



Εικόνα 45: Σχηματική απεικόνιση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer (Green and Sambrook, 2019).

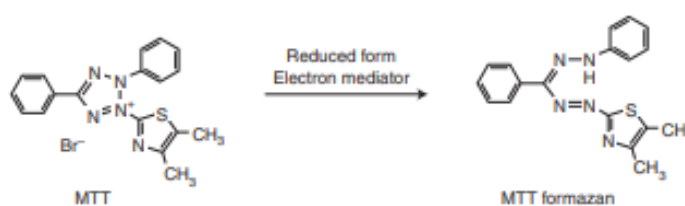
Πάνω στην αιματοκυτταρομετρική πλάκα τοποθετείται μια καλυπτρίδα στην κεντρική περιοχή και μικρή ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος (10 μ L) μεταφέρεται

στην κοίλη επιφάνεια της καλυπτρίδας. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο με εστίαση 10X και ακολουθεί η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στο κεντρικό τετράγωνο και σε δύο εσωτερικά μεγάλα τετράγωνα. Μόλις ολοκληρωθεί η μέτρηση και η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων σε τρία τετράγωνα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Green and Sambrook (2019), υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών, ο οποίος πολλαπλασιάζεται επί 10^4 προκειμένου να βρεθεί ο αριθμός των κυττάρων στο 1 mL. Εάν είχε πραγματοποιηθεί αραιώση του αρχικού κυτταρικού εναιωρήματος τότε ο αριθμός των κυττάρων/mL πολλαπλασιάζεται επί τον συντελεστή αραιώσης.

7.3 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων

7.3.1 Δοκιμή MTT

Η δοκιμή MTT αποτελεί μια χρωματογραφική, μέτρηση που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων, η οποία περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983. Βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου, δηλαδή του βρωμιδίου του 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολίου (MTT), σε ένα μη διαλυτό παράγωγο φορμαζάνης. Πιο συγκεκριμένα, το MTT είναι μια κίτρινη υδατοδιαλυτή χρωστική τετραζολίου που ανάγεται από ζωντανά κύτταρα με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου (NADPH-εξαρτώμενη οξειδοοδουκτάση), με αποτέλεσμα να παράγονται ιώδεις κρύσταλλοι φορμαζάνης που είναι αδιάλυτοι σε υδατικά διαλύματα (Εικόνα 46).



Εικόνα 46: Το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) μετατρέπεται σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Kumar, Nagarajan and Pradeep 2018).

Η ποσότητα της παραγόμενης MTT-φορμαζάνης διαλύεται με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών (π.χ. DMSO), οπότε μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα τους φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο πολλαπλών φρεατίων σε μήκος κύματος 500-600 nm. Όσο πιο σκοτεινό είναι το χρώμα του διαλύματος δηλαδή έντονος σχηματισμός κρυστάλλων τετραζολίου τόσο

περισσότερα ζωντανά μεταβολικά ενεργά κύτταρα υπάρχουν και τόσο μεγαλύτερη απορρόφηση καταγράφεται. Επομένως η διαδικασία MTT είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού (Langdon, 2003).

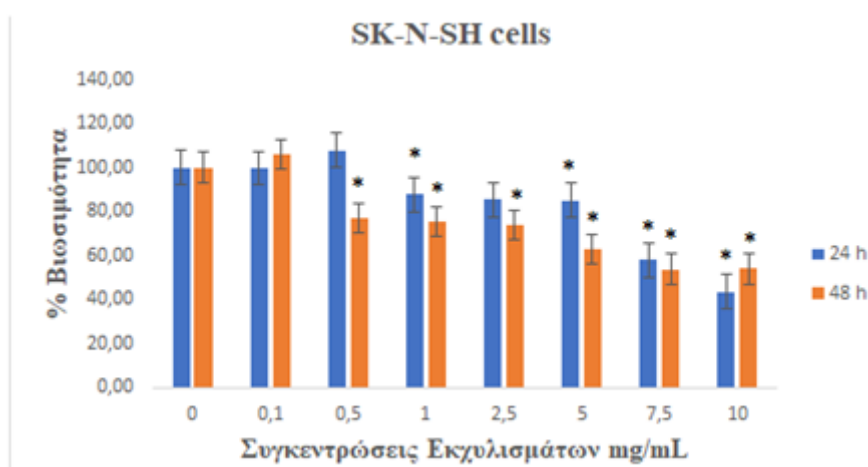
7.3.2 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, τοποθετείται σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA 96 βοθρίων για κυτταροκαλλιέργεια διάλυμα κυττάρων SK-N-SH/HeLa/CaCo-2 με θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Η τελική συγκέντρωση ήταν $8 \cdot 10^3$ κύτταρα ανά βοθρίο (24ωρη επώαση) και $6 \cdot 10^3$ κύτταρα ανά βοθρίο (48ωρη επώαση). Έπειτα, τα πλακίδια τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 37°C , με υγρασία και 5% CO_2 για 24 h. Μετά από 24 h αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα βοθρία και προστίθενται 180 μL θρεπτικού διαλύματος που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού. Για κάθε διαφορετική συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προστέθηκε στα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό (εμπλουτισμένο με 1% FBS) με DMSO. Ύστερα, προστίθεται το MTT, το οποίο έχει συγκέντρωση 5mg/mL σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), σε αναλογία 1:10 σε κάθε βοθρίο, μετά από 24 ή αντίστοιχα 48 h επώασης. Τα κύτταρα επωάζονται στον θάλαμο ανάπτυξης και μετά το πέρας των 3 h αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με το MTT. Τέλος, προστίθενται 200 μL DMSO και τα κύτταρα επωάζονται για ακόμη 5 min υπό ανάδευση. Η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο πλάκας PowerWave 340 σε μήκος κύματος 560 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι Μ.Ο. \pm τυπικές αποκλίσεις 5 επαναλήψεων.

7.3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού στη βιωσιμότητα των κυττάρων SK-N-SH, HeLa και CaCo-2 προσδιορίστηκε φωτομετρικά μέσω της πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η δοκιμή MTT παρουσιάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω καταγραφής της μιτοχονδριακής δραστηριότητας τους. Οι τρεις κυτταρικές σειρές επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις για 24 και 48 h. Τα αποτελέσματα των δοκιμών βιωσιμότητας των κυττάρων SK-N-SH, HeLa και CaCo-2 παρουσιάζονται στα γραφήματα 2, 3 και 4 αντίστοιχα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα.

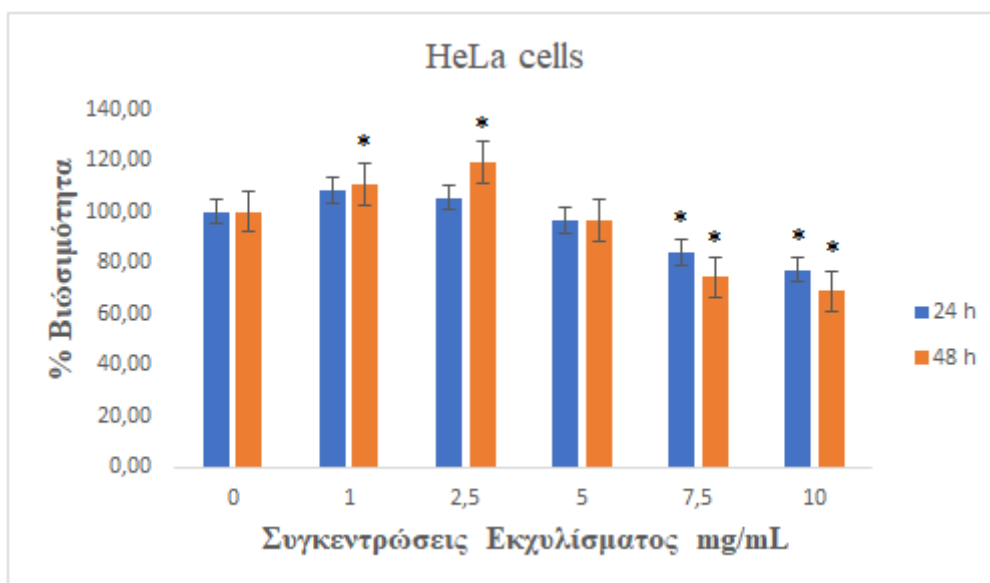
Τα κύτταρα SK-N-SH επώαστηκαν με υδατικό διαλύματα περικαρπίου φιστικιού συγκέντρωσης 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL για 24 και 48 h. Στο διάγραμμα 2, μετά το πέρας της 24 h επώασης παρατηρείται ότι το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,5 mg/mL. Στη συγκέντρωση των 0,5mg/mL παρατηρείται αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας. Για όλες τις συγκεντρώσεις του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου, εκτός από αυτές των 0,1, 0,5 και 2,5 mg/mL, η μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων εκτιμήθηκε ως στατιστικά σημαντική. Μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων (43,58%), και άρα μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, παρατηρήθηκε στα 10 mg/mL υδατικού εκχυλίσματος. Η μεταβολή του αριθμού των ζωντανών κυττάρων κατά την 48ωρη επώαση είναι πιο σημαντική, πέρα από αυτήν των 0,1 mg/mL. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των 24ωρών επώασης, παρατηρείται μικρή αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας τόσο στα 0,1 mg/mL συγκριτικά με το μάρτυρα, όσο και μεταξύ των συγκεντρώσεων 7,5 mg/mL με 10 mg/mL του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού.



Διάγραμμα 2: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων SK-N-SH σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 7 διαφορετικών μετρήσεων ± τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).

Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού, σε συγκεντρώσεις 0, 1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa ύστερα από επώαση 24 και 48 h. Μετά το πέρας της

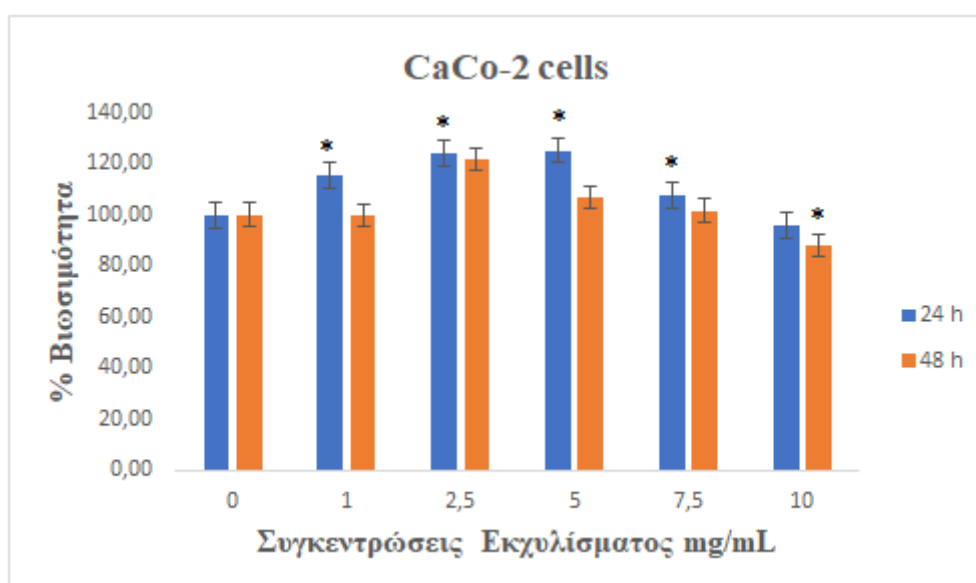
24 h επώασης παρατηρείται ότι το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Το υδατικό διάλυμα περικαρπίου δεν παρουσίασε πολύ σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την 24ωρη επώαση. Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με τον μάρτυρα παρατηρήθηκε μόνο στις συγκεντρώσεις των 7,5 και 10 mg/mL, όπου υπήρξε μια μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 15 έως 23%. Η μεταβολή αυτή αυξήθηκε σημαντικά κατά τη 48ωρη επώαση. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των 24ωρών επώασης, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας στα 2,5 mg/mL υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού συγκριτικά με το μάρτυρα. Το μέγιστο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, όπου η βιωσιμότητα μειώθηκε κατά 68,8 %, παρατηρήθηκε στα 10 mg/ mL υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού.



Διάγραμμα 3: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων HeLa σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 5 διαφορετικών μετρήσεων \pm τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).

Στο διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού, σε συγκεντρώσεις 0, 1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL στη βιωσιμότητα των κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση 24 και 48 h. Μετά το πέρας της 24 h επώασης παρατηρείται ότι το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων μέχρι

τη συγκέντρωση των 5 mg/mL και έπειτα, παρουσιάζεται μια μείωση της βιωσιμότητας. Το υδατικό διάλυμα περικαρπίου παρουσίασε πολύ σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την 24ωρη επώαση, . Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με τον μάρτυρα παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των 1, 2,5 και 5 mg/mL, όπου υπήρξε μια αύξηση της βιωσιμότητας της τάξης του 15 έως 25%, καθώς στην συγκέντρωση των 7,5 mg/mL. Η μεταβολή αυτή μειώθηκε σημαντικά κατά τη 48ωρη επώαση. Το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού δεν παρουσίασε πολύ σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την 48ωρη επώαση, μόνο στην συγκέντρωση των 10mg/mL Το μέγιστο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, όπου η βιωσιμότητα μειώθηκε κατά 88,15%, παρατηρήθηκε στα 10 mg/mL υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού.



Διάγραμμα 4: Απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων CaCo-2 σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τις ακόλουθες συγκεντρώσεις υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού: 0, 0,1, 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα (μέσος όρος 5 διαφορετικών μετρήσεων \pm τυπικό σφάλμα, t-test * $p \leq 0,05$ έναντι μάρτυρα).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα για την αντικαρκινική δράση του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου κελυφωτών φιστικιών (*P.Vera*) στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές SK-N-SH, HeLa και CaCo-2, παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η έκθεση των κυττάρων SK-N-SH σε αυξανόμενη συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος περικαρπίου, έδειξε ότι υπάγει τον κυτταρικό θάνατο με δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι Fathalizadeh et al. (2015), έδειξαν ότι η χρήση του εκχυλίσματος περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*), μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων

(IC₅₀ 0,3 mg/mL) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στα ανθρώπινα κύτταρα του ήπατος (HepG2), ενώ τα κύτταρα του ανθρώπινου μελανόματος (SKMEL-3) σε υψηλή δόση (0,5 mg/mL) έδειξαν σημαντική κυτταροτοξική δράση (63%) (Sarkhail et al., 2017).

Αντίστοιχα, αποτελέσματα παρατηρήθηκαν έπειτα από έκθεση των κυτταρικών σειρών HeLa σε αυξανόμενη συγκέντρωση, τα οποία δεν παρουσίασαν ξεκάθαρη εξάρτηση από την συγκέντρωση και το χρόνο επώασης. Σύμφωνα, με τον Gezici, (2019), έδειξε ότι τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου φιστικιού εμφάνισαν αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές δυνατότητες προς δοκιμασμένα ανθρώπινα κύτταρα (A-549, MCF-7, and HeLa) σε δόσο- και χρονό εξαρτώμενο τρόπο. Πιθανές αυξήσεις του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις και το χρόνο επώασης ήταν φυσιολογικές. Σύμφωνα, με τους Rai et al. (2018), η αύξηση της μεταβολικής βιωσιμότητας των κυττάρων μπορεί να οφείλεται είτε από την υπερδραστηριότητα των μιτοχονδρίων, είτε από αυξημένη μιτοχονδριακή μάζα, καθώς η μετατροπή του MTT σε φορμαζάνη πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια.

Επιπλέον, η σχέση δόσης-απόκρισης του υδατικού διαλύματος στις κυτταρικές σειρές HeLa και CaCo-2 δεν είναι γραμμική, καθώς αυξάνοντας την δόση του υδατικού εκχυλίσματος δεν υπάρχει κυτταρικός θάνατος της συγκεκριμένης σειράς, παρά μόνο στις 48 h επώασης με συγκέντρωση 10 mg/mL. Σύμφωνα με τους Calabrese and Baldwin (2001), διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση μιας ουσίας σε μικρές ή και σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί ένα φαινόμενο U, γνωστό ως όρμηση (hormesis).

Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος με το μέγιστο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, ήταν στα 10 mg/mL και για τις τρεις κυτταρικές σειρές. Επιπροσθέτως, η πιο ευαίσθητη κυτταρική σειρά ήταν SK-N-SH>HeLa>CaCo-2 στο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού. Οι κυτταρικές σειρές HeLa και CaCo-2 από ό,τι φάνηκε παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού, καθώς παρουσίασαν την μικρότερη κυτταροτοξική δράση.

7.3.4 Συμπέρασμα

Το υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου φιστικιού (*P.vera*) παρουσίασε την μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά SK-N-SH έναντι των άλλων δυο κυτταρικών σειρών.

Γενικά Συμπεράσματα-Προοπτικές

Συμπεράσματα

- Το περικόρπιο του φιστικιού αποτελεί μια πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών και ελαίου με αρκετά υψηλά επίπεδα υγρασίας, σύμφωνα με τους προσδιορισμούς που πραγματοποιήθηκαν.
- Η τιμή του δείκτη διάθλασης στο έλαιο διαπιστώθηκε αυξημένη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στη μεγάλη περιεκτικότητα των ακόρεστων λιπαρών

οξέων είτε στον μεγαλύτερο αριθμό της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων ή στο συνδυασμό των δύο.

- Σύμφωνα με την μέτρηση των δεικτών ποιότητας (k, ΔK και R) και την οξύτητα του ελαίου, παρουσιάζεται ένα έλαιο χαμηλής ποιότητας.
- Αντίθετα, η χαμηλή τιμή της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων στο έλαιο, σηματοδοτεί την ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών.
- Διαπιστώθηκε αύξηση της απόδοσης εκχύλισης με την χρήση νερού HPLC υποβοηθούμενη με υπερήχους.
- Μέσω της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC-MS-QTOF) των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα ακόλουθα φαινορικά τους συστατικά: το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρικετρίνη, η μυρικετίνη, η καμφερόλη, η φλωρογλυκινόλη, η ναριγενίνη, το ελαγικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, η πινοσεμπρίνη, η ισορχαμνετίνη, η λουτεολίνη, το ομογεντισικό οξύ και το βανιλικό οξύ.
- Παρατηρήθηκαν περισσότερες φαινολικές ενώσεις και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα αιθανολικά εκχυλίσματα κατά την χρωματογραφική μελέτη, συγκριτικά με τα υδατικά εκχυλίσματα.
- Σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH, το αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου υποβοηθούμενο με υπερήχους παρουσιάζει ισχυρή παρεμποδιστική και αντιοξειδωτική δράση.
- Σύμφωνα με την δοκιμή F-C, το αιθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου υποβοηθούμενο με υπερήχους, παρουσιάζει αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα με υψηλή περιεκτικότητα ολικών φαινολικών.
- Η μέγιστη κυτταροτοξική δράση εντοπίζεται στα 10 mg/mL στα SK-N-SH, HeLa και CaCo-2. Η ευαισθησία των κυτταρικών σειρών στο υδατικό εκχύλισμα περικαρπίου ακολουθεί την σειρά SK-N-SH> HeLa>CaCo-2.

Προοπτικές

Στο μέλλον, η τρέχουσα έρευνα μπορεί να επεκταθεί σε:

- Προσδιορισμός των πρωτεϊνών και τις συγκεντρώσεις κάθε μιας εξ αυτών με σκοπό την εφαρμογή αυτών στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.
- Μελέτη κυτταροτοξικότητας του περικαρπίου των κελυφωτών φιστικιών από διαφορετικές περιοχές και διαφορετικές ποικιλίες φιστικιών *Pistacia vera*.

- Δημιουργία βιβλιοθήκης-ορίων, τα οποία θα καταγράφουν την ποιότητα των ελαίων των φιστικιών όλων των τμημάτων του καρπού, με τον ίδιο τρόπο που υπάρχει ήδη για το ελαιόλαδο (π.χ. οξύτητα, δείκτης διάθλασης κλπ.).
- Μελέτη διαφορετικών τρόπων που μπορούν να αξιοποιούνται τα περικάρπια φιστικιών για να μειωθεί ο όγκος των υπολειμμάτων που δρουν σαν απόβλητα στο περιβάλλον όσο αυξάνεται η απόθεσή τους.
- Αξιοποίηση του ελαίου του περικαρπίου φιστικιού ως βιοντίζελ ή βιοκαύσιμο.
- Μελέτη σε περισσότερες σειρές καρκινικών κυττάρων.
- Μελέτη χρήσης του ελαίου κελυφωτών φιστικιών σαν συντηρητικά στον τομέα των τροφίμων.
- Αξιοποίηση των αντιοξειδωτικών του περικαρπίου στην βιομηχανία των τροφίμων και τις φαρμακευτικής, ως φυσικά συντηρητικά , ως καταστολής του οξειδωτικού στρες στον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ανδρικόπουλος, Ν.Κ., (2015). Τροφογονωσία, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα-Αποθετήριο Καλλίπος, Αθήνα, Κεφάλαιο 3, 61-87.

Αλυφαντή, Κ., Σδράλη, Δ., Θεοδοροπούλου, Ε., Μητούλα, Ρ., (2014). Η φιστικοκαλλιέργεια στη νήσο Αίγινα: Συμβολή στη βιώσιμη ανάπτυξη και προοπτικές, με βάση τις απόψεις των φυσιολογικών. Conference: 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγροτικής Οικονομίας. Ο ρόλος του αγροτικού τομέα στην παρούσα κρίση. Αθήνα.

Γεωργιάδου, Μ., (2015). Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κελυφωτών φιστικών με στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Επιστήμης τροφίμων & διατροφής του ανθρώπου. Διαθέσιμο στο: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/36490#page/1/mode/2up>

Θάνου, Ι.Κ., (2020). Φιστικέλαιο προερχόμενο από κελυφωτά φιστικά (*Pistacia vera*): προσδιορισμός της ελεύθερης οξύτητας, της αντιοξειδωτικής δράσης και φασματοσκοπική μελέτη του χημειοτύπου του, Μεταπτυχιακή μελέτη, Τμήμα Επιστήμης τροφίμων & διατροφής του ανθρώπου.

Μαρίνου, Α., (2010). Μελέτη της επίδρασης της χορήγησης εκχυλίσματος φιστικού Αιγίνης για την πρόληψη και θεραπεία της αθηρωμάτωσης σε ζωικό πρότυπο. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Διαθέσιμο στο: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/25361#page/185/mode/1up>

Μπαρμπεράκη, Μ., (2011). Εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων στο φυτό Ιξός (*Viscum album* L.) για την παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Ντούλα, Μ.Κ., Κομνίτσας, Κ., Σαρρής, Α., (2013). Αποτύπωση και αξιολόγηση περιβαλλοντικής κατάστασης νήσου Αίγινας. Αειφόρες στρατηγικές για τη βελτίωση εντατικά καλλιεργούμενων εδαφών: Το παράδειγμα της καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικού (*Pistachia vera* L.). Διαθέσιμο στο: <https://www.agrostrat.gr/sites/default/files/files/environmental%20Aegina.pdf> (πρόσβαση στις 20 Μαΐου 2021).

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Ahanchi, M., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Rezaei, K., Talebi, A.F., Ghaffari, A., Khoshnevisan, B. and Khounani, Z., (2018). Pistachio (*Pistachia vera*) wastes valorization: Enhancement of

biodiesel oxidation stability using hull extracts of different varieties, *Journal of Cleaner Production*, 852-859.

Al-Bachira, M., and Othmana, Y., (2019). Detection of Long Storage and Sunflower Adulteration of Olive Oils Using an Ultra-violet (UV) Spectroscopy Method, *International Journal of Food Studies*, 8, 34-42.

Arjeh, E., Akhavan, H.R., Barzegar, M. and Carbonell-Barrachina, A.A (2020). Bio-active compounds and functional properties of pistachio hull: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 55–64.

Bai, Q., Ma, Z., Zhang, Y., Su, S. and Leng, P., (2019). The sex expression and sex determining mechanism in *Pistacia* species, *Breeding Science*, 69(2), 205-214.

Bakhshizadeh, S., Taghizadeh A., Janmohammadi, H., and Alijani, S., (2014). Chemical composition and the nutritive value of pistachio epicarp (in situ degradation and in vitro gas production techniques). *Veterinary Research Forum*, 5, 43-47.

Barreca, D., Lagana, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D. and Bellico, E., (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls, *Food Chemistry*, 196, 493-502

Bartzas, G. and Komnitsas, K., (2017). Life cycle analysis of pistachio production in Greece, *Science of the Total Environment*, 595, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.251>

Bartzas, G., Zaharaki, D., Komnitsas, K., n.d., (2021). Life cycle analysis of pistachio production in Greece. Διαθέσιμο στο: http://uest.ntua.gr/cyprus2016/proceedings/pdf/Komnitsas_Lifecycle_analysis_pistachio_production_Greece.pdf (πρόσβαση στις 17 Μαΐου 2021).

Blois M.S., (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181:1199–1200

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., Shams-Ardekani, M.R. and Rahimi, R., (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. Khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 1-33 <https://doi.org/10.1155/2013/219815>.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C., (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28:25-30.

Brkić Bubola, K., Koprivnjak, O., Sladonja, B., and Belobrajčić, I., (2014). Influence of storage temperature on quality parameters, phenols and volatile compounds of Croatian virgin olive oils, *Grasas Y Aceites*, 65(3).

Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A., (2001). U-Shaped Dose-Responses in Biology, Toxicology, and Public Health. *Annual Review of Public Health*, 22(1), 15–33.

Chernova, G.M., (2004). Bio-ecological basis of pistachio (*Pistachio vera* L.) breeding in central Asia. Uzbek Research Scientific Institute of Forestry, Bishek (in Russian).

Comert E.D. and Gokmen V., (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105: 76-93.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E.A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.-P. Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., and Hano, C., (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176–185.

Demiral, I., Gulmezoglu Atilgan, N., Sensoz, S., (2008). Production of biofuel from soft shell of Pistachio (*Pistacia vera* L), *Chemical Engineering Communications*, 196(1-2), 104-115. <https://doi.org/10.1080/00986440802300984>.

Erşan, S., Üstündağ, Ö.G., Carle, R., and 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)-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64,5334-5344.

Erşan, S., Üstündağ, Ö.G., Carle, R., and Schweiggert, R.M., (2017). Determination of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull (exo- and mesocarp) phenolics by HPLC-DAD-ESI/MS n and UHPLC-DAD-ELSD after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 103-114.

Erşan, S., Üstündağ, O.G., Carle, R. and Schweiggert, R.M., (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls, *Food Chemistry*, 253, 46-54

FAOSTAT (2016). Food and agriculture organization. Available at: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Fathalizadeh, J., Bagheri, V., Khorramdelazad, H., Kazemi Arababadi, M., Jafarzadeh, A., Mirzaei, M.R., Shamsizadeh, A., and Hajizadeh, M.R., (2015). Induction of apoptosis by pistachio (*Pistacia vera* L.) hull extract and its molecular mechanisms of action in human hepatoma cell line HepG2, *Cellular & Molecular Biology*, 61 (7): 128-134.

Ferguson, L. and Haviland, D.R., (2016). Pistachio Production Manual. (e-book) τόμος 3545 του University of California, Agriculture and Natural Resources. UCANR Publications. Διαθέσιμο από: https://books.google.gr/books?id=tOSIDQAAQBAJ&lr=&hl=el&source=gb_s_navlinks_s

[πρόσβαση: 28 Μαρτίου 2021].

Ford, T., (2011). Pistachio (*Pistacia vera* L.) in the Intermountain West, *The Nutshell*, 65(3), 11-12.

- Garavand, F., Madadlou, A., and Moini, S., (2017). Determination of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Pistachio Hull Using HPLC-DAD-ESI-MS as Affected by Ultrasound and Microwave. *International Journal of Food Properties*, 20, 19-29.
- Gezici, S., (2019). Cancer preventive and neuroprotective potentials of red hulls, kernels and oleo-gum resins from Pistachio, *International Journal Agriculture, Environment Food Sciences*, 3(3), 137-143.
- Ghandahari Yazdi, A.P., Barzegar, M., Sahari, M.A., and Ahmadi Gavlighi, H., (2018). Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull, *Food Sciences and Nutrition*, 1-11
- Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., M. Behgar, M., and Ghovvati, S., (2012). Inclusion of pistachio hulls as a replacement for hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population, *Small Ruminant. Research*, 104, 94-98.
- Gohari Ardabili, A., Farhoosh, R., and Haddad Khodaparast, M.H., (2011). Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaka*) grown in Iran, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 1053-1063.
- Grace, M.H., Esposito, D., Timmers, M.A., Xiong, J., Yousef, G., Komarnytsky, S., and Lila, M.A., (2016). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry*, 210, 85–95.
- Green, M.R. and Sambrook, J., (2019). Estimation of Cell Number by Hemocytometry Counting, *Cold Spring Harbor Protocols*, (11).
- Hamed, M., Bougatef, H., Karoud, W., Krichen, F., Haddar, A., Bougatef, A., & Sila, A. (2020). Polysaccharides extracted from pistachio external hull: Characterization, antioxidant activity and potential application on meat as preservative, *Industrial Crops and Products*, 148, 112315.
- Hosseini-Ghaffari, M., Tahmasbi, A.M., Valizadeh, H., Naserian, A., (2013). Effects of pistachio by-products in replacement of alfalfa hay on populations of rumen bacteria involved in biohydrogenation and fermentative parameters in the rumen of sheep, *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 578-586.
- Jain, S.M. and Gupta, P.K. (eds.), (2005). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Springer. Printed in the Netherlands, 289-300
- Kashaninejad, M. and Tabil, L.G., 2011. Pistachio (*Pistacia vera* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Volume 4: Mangosteen to white sapote*. E. M. Yahia, ed., 218-246. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Ltd.
- Khanazarov, A.A., Chernova, G.M., Rakhmonov, A.M. and Nikolyyi, L.V., (2009). Genetic resources of *Pistacia vera* L. in Central Asia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(3), 429-433.

- Kiritsakis, A., Kanavouras, A., and Kiritsakis, K. (2002). Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 628–638.
- Kordi, M. and Naserian, A.A., (2020). Evaluation of nutritional value of some nut hulls as feedstuffs for ruminants by in vitro gas production technique, *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 74 No 1
- Kress-Rogers, E., Gillatt, P.N., and Rossell, J.B., (1990). Development and evaluation of a novel sensor for the in-situ assessment of frying oil quality, *Food Control*, 1(3),163-178.
- Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P.D., (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*
- Langdon, S.P., (2003). *Cancer Cell Culture Volume 88 || Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay.*, 165–170.
- Mosmann, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V. and 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
- Molyneux P., (2003). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2):211-219.
- Moghaddam, M.T., Razavi, S.M.A., Malekzadegan, F., and Ardekani A.S., (2009). Chemical composition and rheological characterization of pistachio green hull's marmalade. *Journal of Texture Studies*, 40, 390-405.
- Narayan, R. (eds.), (2021). *Biomedical Materials*, Springer. Printed in the USA,420-434
- Otemuyiwa, I.O. and Adewusi, S.R.A., (2013). Fatty acid, aarotenoid and tocopherol content of some fat foods from a Nigerian eatery
- Ozcelik B., Lee J.H. and Min D.B., (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Journal of Food Science*, 68(2): 487-490.
- Özbek, H.N., Yanık, D.K., Fadıloğlu, S, Keskin Çavdar, H. and Göğüş, F., (2018). Microwave-assisted extraction of non-polar compounds from pistachio hull and characterization of extracts, *Grasas Aceites*, 69 (3).
- Özbek, H.N., Yanık, D.K., Fadıloğlu, S. and Göğüş, F., (2019). Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from pistachio (*Pistacia vera* L.) hull, *Separation Science and Technology*, 1-11.
- Pakdaman, N, Dargahi, R., Nadi, M., Javanshah, A., Ahmad Shakerardekani, A., and Saberi, N., (2021). Optimizing the Extraction of Phenolic Compounds from Pistachio Hulls, *Journal of Nuts*, 12, 361-370.

- Piness, J., (2010). Physical and Chemical Structural Analysis of Pistachio Shells, *Journal of Undergraduate Materials Research*, 4.
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D.K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., B. S. Dwarakanath, B.S., and Bhatt, A.N., (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition, *Scientific Reports*, 8, 1531.
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., and Golmohamadzadeh, S., (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties, *Food Chemistry*, 173, 577–583.
- Sakar, E.H., El Yamani, M., and Rharrabti, Y. (2017). Variability of oil content and its physico-chemical traits from five almond (*Prunus dulcis*) cultivars grown in northern Morocco, *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(8), 2679-2686.
- Sarkhail, P., Salimi, M., Sarkheil, P. and Kandelous, H.M., (2017). Anti-Melanogenic Activity and Cytotoxicity of *Pistacia vera* Hull on Human Melanoma SKMEL-3 Cells, *Acta Medica Iranica*, 55.
- Seifaddinipour, M., Farghadani, R., Namvar, F., Mohamad, J., and Abdul Kadir, H., (2018). Cytotoxic Effects and Anti-Angiogenesis Potential of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls against MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Molecules*, 23(1), 110.
- Shakerardekani, A., Tavakolipour, H., and Bakhtar, N., (2019). An Investigation of the Effects of the Addition of Pistachio Hul and Testa on the Oxidative Stability of Pistachio Butter, *Pistachio and Health Journal*, 8-14.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Sonmezdag, A.S., Kelebek, H. and Selli, S., (2017). Characterization and comparative evaluation of volatile, phenolic and antioxidant properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull, *Journal of Essential Oil Research*, 29, 262-270.
- Taghizadeh, S.F., Rezaee, R., Davarynejad, G., Karimi, G., Nemati, S.H., and Asili, J., (2018). Phenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia vera* var. *Sarakhs* hull and kernel extracts: the influence of different solvents, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 2138-2144.
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C. and Saija, A., (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins, *Biochimie*, 92, 1115-1122.

Wissam, Z., (2019). Optimization of different parameters for the extraction of polyphenols and proanthocyanidins from *Pistacia vera* hull, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 11, 36-39.

Yanniotis, S., and Zarboutis, I., (1996). Water sorption isotherms of pistachio nuts, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 29,372-375.

Zakynthinos, G. and Rouskas, D., (2001). Wild and cultivated *Pistacia* species in Greece. In: Padulosi, S., Hadj-Hassan, A., Towards a comprehensive documentation and use of *Pistacia* genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Europe, Ibid, 88-92.

Zohary, M., (1952). *A monographical study of the genus Pistacia*, Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series),5, 187-228

Ιστοσελίδες

http://agroselida.blogspot.com/2015/08/blog-post_55.html

<https://www.atlasbig.com/en-au/countries-by-pistachio-production>