



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας» «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΥΡΗΝΑ ΚΑΡΠΟΥ ΑΒΟΚΑΝΤΟ ΜΕ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ**



**ΛΑΣΠΑ ΠΕΤΡΟΥΛΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2022**

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΥΡΗΝΑ ΚΑΡΠΟΥ ΑΒΟΚΑΝΤΟ ΜΕ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR PRODUCTION OF  
EXTRACTS FROM AVOCADO FRUIT NUCLE WITH  
ANTIOXIDANT ACTION WITH THE USE OF MICROWAVES

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κομιώτης:** Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημητρίου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Κουρέτα Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου διατριβή στο εργαστήριο του, όπως και τον κ. Μόσιαλο για την βοήθεια που μου προσέφερε όταν χρειάστηκε να χρησιμοποιήσω το εργαστήριο του. Επίσης, ευχαριστώ όλη την ομάδα των εργαστηρίων για τη βοήθεια τους και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες πρώτα στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη βοήθεια τους και κυρίως ευχαριστώ βαθύτατα τους Ιωάννα και Κυριάκο Ζιάκου για την απίστευτη φιλοξενία τους όλες τις φορές που χρειάστηκε μα βρίσκομαι στην Λάρισα για τις υποχρεώσεις των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Ακόμα, ευχαριστώ τους φίλους και εργοδότες μου για την ουσιαστική τους στήριξη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον για τη μελέτη των αντιοξειδωτικών μορίων. Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών αποτελούν οι φυτικές πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων. Η σημαντικότερη είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες, έχουν δηλαδή την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική ικανότητα φυτικών εκχυλισμάτων από τον καρπό του αβοκάντο και προσδιορίστηκε το περιεχόμενο τους σε ολικά φλαβονοειδή, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με μικροκύματα. Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών έγινε με βάση το μοντέλο επιφάνειας-απόκριση Box-Behnken. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS και τα ολικά φλαβονοειδή με μία μέθοδο βασισμένη στη χρήση  $AlCl_3$ .

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών είναι θερμοκρασία  $76,66^\circ C$ , χρόνος εκχύλισης 69,64 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 4097,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 10,07ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το TFC θα είναι 22,45  $\mu g/ml$ . Συμπερασματικά, με την αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης, αλλά και του χρόνου εκχύλισης κατά πολύ, αυξάνεται και το περιεχόμενο των φλαβονοειδών, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ίσως γιατί είναι γνωστό ότι σε υψηλές θερμοκρασίες οι παραγόμενες πολυφαινόλες χάνουν τη δράση τους.

Επιπλέον, οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες για υψηλή αντιοξειδωτική δράση είναι θερμοκρασία  $40,830 C$ , χρόνος εκχύλισης 10,89 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 2278,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 39,93ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,3  $\mu l/ml$ . Ο μικρός χρόνος εκχύλισης (10,89 λεπτά) παίζει ιδιαίτερη σημασία σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές που τυπικά απαιτούν αρκετά λεπτά έως μισή ώρα. Εκτός από τα οικονομικά οφέλη, ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της πιθανής υποβάθμισης και οξείδωση των αντιοξειδωτικών, όπως και επιβεβαιώνεται.

Τέλος, οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για τον συνδυασμό του υψηλού περιεχόμενου φλαβονοειδών και υψηλής αντιοξειδωτική δράση είναι θερμοκρασία  $76,700 C$ , χρόνος εκχύλισης 83,39 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 5973,18 W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 14,24 ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,7  $\mu l/ml$  και το TFC 21,56  $\mu g/ml$ .

## ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in the study of antioxidant molecules. Antioxidants are molecules that have the ability to interact and neutralize free radicals. One of the most important classes of antioxidants are plant polyphenols, which have a variety of biological properties. The most important is the ability to neutralize free radicals protecting the body from the effects of oxidative stress, that is, they have the ability to act as antioxidants and chemoprotective agents.

In the present study, the antioxidant capacity of plant extracts from the avocado seed was studied and their content in total flavonoids was determined, in order to determine the optimal microwave extraction conditions. The optimal conditions were determined based on the Box-Behnken surface-response model. The antioxidant activity was determined by the ABTS method and total flavonoids by a method based on the use of  $AlCl_3$ .

The results showed that the optimal predicted extraction conditions for high flavonoid content are temperature 76.66 °C, extraction time 69.64 min, microwave power 4097.1W, and water solvent volume ratio per gr avocado kernel 10.07ml/gr. Under these conditions the TFC will be 22.45 µg/ml. In conclusion, with the increase of the extraction temperature, the content of flavonoids increases, which is in contrast with the high antioxidant activity, perhaps because it is known that at high temperatures the produced polyphenols lose their activity.

In addition, the optimal predicted conditions for high antioxidant activity are temperature 40.83 °C, extraction time 10.89 min, microwave power 2278.1W, and water solvent volume ratio per gr avocado kernel 39.93ml/gr. Under these conditions the  $IC_{50}$  will be 0.3 µl/ml. The short extraction time (10.89 minutes) is particularly important in contrast to traditional methods which typically require from several minutes up to half an hour. In addition to the economic benefits, the reduced extraction time can help prevent possible degradation and oxidation of antioxidants.

Finally, the optimal extraction conditions for the combination of high flavonoid content and high antioxidant activity are temperature 76.70 °C, extraction time 83.39 min, microwave power 5973.18 W, and water solvent volume ratio per gr avocado kernel 14, 24 ml/g. Under these conditions the  $IC_{50}$  will be 0.7 µl/ml and the TFC 21.56 µg/ml.

## Πίνακας περιεχομένων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ .....	9
1.1.2.Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.....	11
1.1.3. Οξειδωτικό stress.....	12
1.1.3.2.Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών .....	15
1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	16
1.2.1.Γενικά .....	16
1.2.2. Χημική δομή.....	16
1.2.3. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινόλων .....	17
1.2.4. Φλαβονοειδή .....	19
1.3. ΑΒΟΚΑΝΤΟ.....	22
1.3.1. Γενικά .....	22
1.3.2. Ποικιλίες Αβοκάντο .....	24
1.3.2.1 Εμπορικές ποικιλίες.....	25
1.3.3. Καλλιέργεια αβοκάντο στην Ελλάδα .....	27
1.3.4. Κατανάλωση Αβοκάντο και υγεία .....	27
1.3.5. Πολυφαινόλες του Αβοκάντο.....	29
1.4. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	31
2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	35
3.2. ABTS.....	35
Πειραματική διαδικασία .....	36
3.3. Μέτρηση φλαβονοειδών.....	37
Πειραματική διαδικασία .....	38
3.4. Στατιστικό μοντέλο για ανάλυση αποτελεσμάτων .....	40
3.4.1. Μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) για την εύρεση των άριστων συνθηκών εκχύλισης με βάση την αντιοξειδωτική δράση και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή. ....	40
3.4.2. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) .....	42
3.4.3. Στατιστική ανάλυση διακύμανσης και εκτίμηση των εξισώσεων των προβλεπόμενων μοντέλων. ....	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85

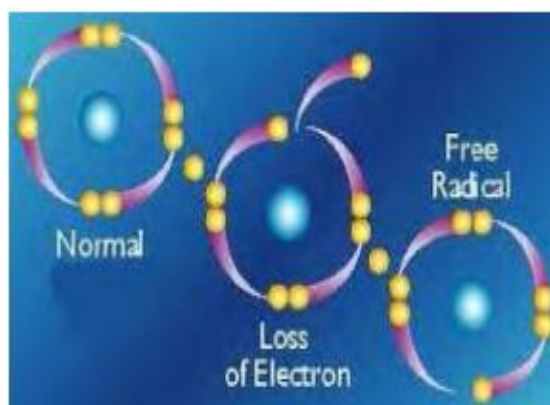




# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Την εξωτερική στιβάδα των ατόμων και των μορίων αποτελούν ηλεκτρόνια, τα οποία συνήθως βρίσκονται σε ζεύγη και κινούνται σε μια καθορισμένη περιοχή, το ατομικό ή αλλιώς μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, τα οποία στην εξωτερική τους στιβάδα φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 2015). Αυτό γίνεται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική στιβάδα ηλεκτρονίων (Mylonas, C. And Kouretas, D., 1999). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια και για αυτό το λόγο αντιδρούν με άλλα μόρια έτσι ώστε να καταφέρουν να σχηματίσουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων, κάνοντας τη δομή τους σταθερότερη. Σε αυτή τους την προσπάθεια αυξάνεται η δραστικότητα του μορίου ή του ατόμου.



Εικόνα 1.1: Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο που υπάρχει στην εξωτερική της στιβάδα.

Η αστάθεια και η μεγάλη χημική δραστικότητα των ελεύθερων ριζών οφείλονται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους (Valavanidis, 2006). Έτσι, εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους. Για αυτό το λόγο όταν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση η οποία δεν είναι ελεύθερη ρίζα θα οδηγήσει στην παραγωγή μια νέας ρίζας. Αυτή η χαρακτηριστική ιδιότητα τις καθιστά ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 2015). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη ελεύθερη ρίζα, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τους θα σχηματίσουν ένα ζεύγος και η παραγόμενη ένωση δε θα αποτελεί πια ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al, 1993; Wilson, 1978). Στη μεγάλη χημική δραστικότητα αποδίδεται εκτός από το γεγονός πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες,

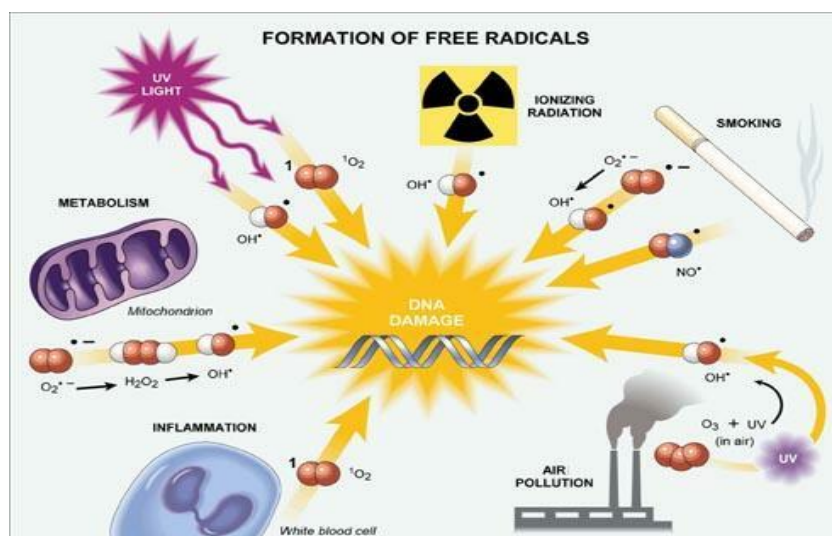
υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων, αλλά και στο γεγονός πως αυτές οι αλυσιδωτές αντιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του εκάστοτε βιολογικού υποστρώματος. Εάν το βιολογικό υπόστρωμα είναι το DNA, τότε οι μεταλλάξεις που μπορεί να προκληθούν μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο.

Το άτομο του υδρογόνου αποτελεί την πιο απλή ελεύθερη ρίζα και έχει στον πυρήνα του μόνο ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο θα πρέπει να μείνει ασύζευκτο. Ακόμη, το διατομικό μόριο του οξυγόνου είναι και αυτό μία ελεύθερη ρίζα, αφού αποτελείται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Στις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCls) που προέρχονται από το χλώριο. Ο όρος ROS (Reactive oxygen species) αποτελεί έναν ενιαίο όρο για είδη που προέρχονται από το οξυγόνο και είναι πιο αντιδραστικά από αυτό. Ο όρος αυτός περιλαμβάνει τις ρίζες σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), υπεροξειδίου ( $RO_2^{\cdot}$ ), αλκοξειδίου ( $RO^{\cdot}$ ), υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\cdot}$ ) αλλά και κάποιες μη ρίζες οι οποίες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), το όζον ( $O_3$ ) και το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ). Συνεπώς, όλες οι ρίζες του οξυγόνου ανήκουν στις ROS, αλλά δεν αποτελούν όλες οι ROS ρίζες του οξυγόνου. Οι RNS, RSS, RCls μπορούν να προκύψουν από αντίδραση με τις ROS ή να βοηθήσουν στην αυξημένη παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS). Σε αυτές περιλαμβάνονται ρίζες, οι οποίες έχουν ως κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξείδιο ( $NO^{\cdot}$ ) και το διοξείδιο του αζώτου ( $NO_2^{\cdot}$ ), αλλά και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (πχ  $HNO_2$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1998, Halliwell, 2001).

### 1.1.2.Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ως παραπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων ή κατά τη λιπιδική οξείδωση. Εκτός των μιτοχονδρίων που αποτελούν την κύρια πηγή ελευθέρων ριζών, μια άλλη πηγή ελευθέρων ριζών αλλά και  $H_2O_2$  είναι τα υπεροξειδιοσώματα. Πρόκειται για μικρά μεμβρανικά οργανίδια στα οποία περιέχονται οξειδωτικά ένζυμα, τα οποία συμβάλλουν στη διάσπαση πλήθους επικίνδυνων ουσιών για το κύτταρο με στόχο την οριστική απομάκρυνσή τους (Berg *et al.*, 2017). Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν και σε κύτταρα του ήπατος αλλά και σε άλλα κύτταρα, κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα έχουν καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών. Συμπερασματικά, η παρουσία των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων. Άλλοτε παράγονται για να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες και άλλοτε ως παραπροϊόντα μεταβολικών διεργασιών. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν οι ακτινοβολίες(ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία), οι φλεγμονές, το κάπνισμα και οι ρύποι της ατμόσφαιρας.



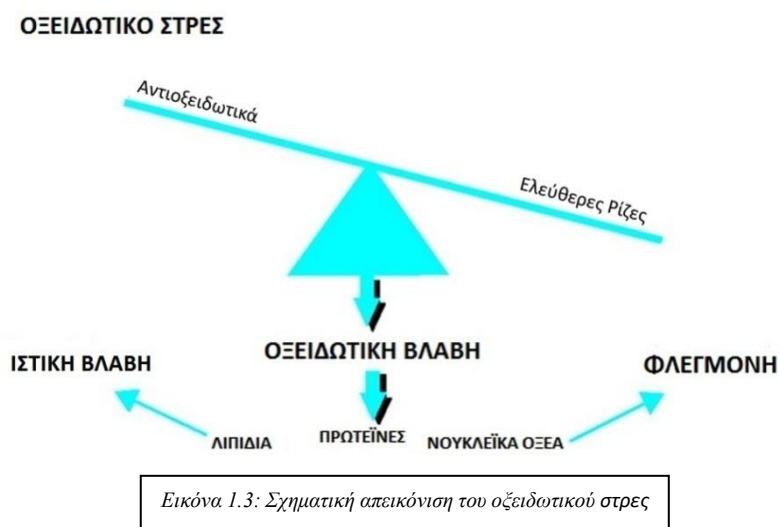
Εικόνα 1.2: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Ωστόσο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν σε:

- Ρύθμιση της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, με τη συμμετοχή τους στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και την ενεργοποίηση της διαδικασίας της απόπτωσης.
- Ενεργοποίηση ενζύμων και προστατευτικών κυτταρικών μηχανισμών.
- Πρωτεύουσα προστασία στην άμυνα των κυττάρων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών
- Η ρίζα NO αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών.

### 1.1.3. Οξειδωτικό stress

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού υπέρ των πρώτων και μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες. (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004).

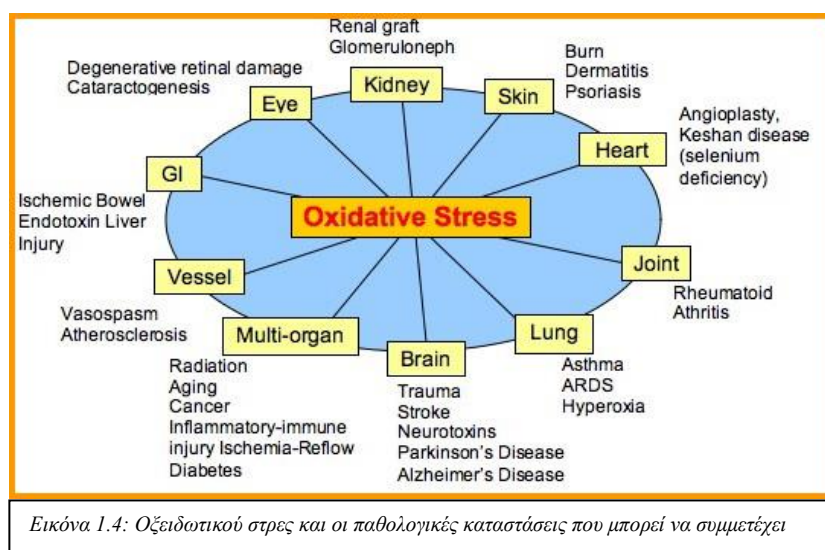


Η πρόκληση του οφείλεται κυρίως σε μειωμένη δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις ή τοξικούς παράγοντες (ατμοσφαιρική ρύπανση και ρύπανση υδάτων, ξеноβιοτικές ουσίες) που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, είτε σε μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών παραγόντων από τη διατροφή. Οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να προκληθεί και από

την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών, που μπορεί να οφείλεται είτε στην έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, είτε στην ύπαρξη παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή των ROS (έντονη άσκηση, ψυχολογικό στρες, κάπνισμα, αλκοόλ).

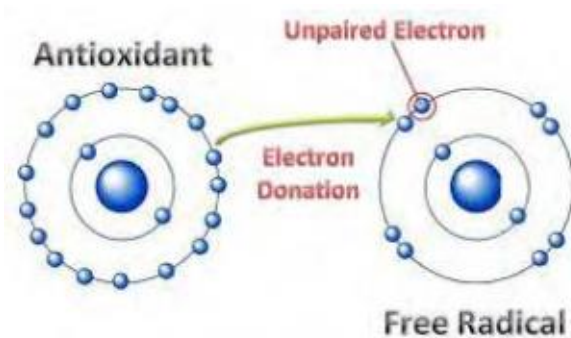
Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί μέσα από διάφορες μελέτες (Ashok and Ali, 1999; Betteridge, 2000; Devasagayam et al., 2004; Valko et al., 2007; Lobo et al., 2010; Alkadi, 2018) με:

- αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως ο καρκίνος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα
- καρδιαγγειακές παθήσεις που οφείλονται σε φραγμένες αρτηρίες
- γενετικές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Huntington ή η νόσος του Πάρκινσον
- ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η νόσος του Alzheimer και άλλες μορφές άνοιας
- καταρράκτη και μείωση της όρασης λόγω ηλικίας
- αλλαγές στην εμφάνιση που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η απώλεια της ελαστικότητας του δέρματος, οι ρυτίδες, η τριχόπτωση και οι αλλαγές στην υφή των μαλλιών
- τον διαβήτη



### 1.1.3.1. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ο κάθε παράγοντας ο οποίος σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχετικά με εκείνες ενός υποστρώματος που βρίσκεται προς οξείδωση, επιβραδύνει, αναστέλλει ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού θεωρείται πως είναι αντιοξειδωτικός (Halliwell, 2001). Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες στηρίζουν την δράση τους είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών (Scalbert et al, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά δρουν είτε προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει εμποδίζοντας έτσι τη βλαπτική δράση τους, είτε ενεργοποιώντας τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού μας (Halliwell, 2001).



Εικόνα 1.5.: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

Ορισμένα από αυτά τα αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, η ουβινοκινόλη και το ουρικό οξύ, παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού στο σώμα (Shi et al., 1999).

Αν και οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται από πολλά συστήματα ενζύμων εντός του ανθρώπινου σώματος, τα βασικά αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη E (α- τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και το Β-καροτένιο, τα οποία όμως μικροθρεπτικά συστατικά δεν μπορεί να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, πρέπει να τα προσλαμβάνει με την διατροφή του (Jaeschke and Ramachandran, 2018).

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται βάσει προέλευσης σε εξωγενή ή ενδογενή, βάσει διαλυτότητας σε υδρόφιλα ή λιπόφιλα και βάσει χημικής φύσης σε ενζυμικά ή μη ενζυμικά (Srdić-Rajić and Ristić, 2016).

### 1.1.3.2. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Υπάρχουν τέσσερα επίπεδα άμυνας, με βάση τα οποία δρουν τα αντιοξειδωτικά. Η πρώτη γραμμή άμυνας είναι τα προληπτικά αντιοξειδωτικά καταστέλλοντας τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Παρόλο που το *πώς* και το *πού* σχηματίζονται οι ρίζες *in vivo* δεν έχουν διευκρινισθεί ακόμη, μία από τις σημαντικές πηγές είναι οι διεγερόμενες από μέταλλα αποσυνθέσεις υδροϋπεροξειδίων και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Κάποια αντιοξειδωτικά μετατρέπουν τα υδροϋπεροξειδία και το υπεροξείδιο του υδρογόνου εξαρχής σε αλκοόλες και νερό, χωρίς να δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες, προκειμένου να οδηγήσουν στην καταστολή τέτοιων αντιδράσεων. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η s-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση του υδροπεροξειδίου των φωσφολιπιδίων της γλουταθειόνης (PHGPX) και η καταλάση είναι γνωστό ότι αποσυνθέτουν υδροϋπεροξειδία λιπιδίων σε αντίστοιχες αλκοόλες. Το PHGPX είναι μοναδικό στο ότι μπορεί να μειώσει τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων που είναι ενσωματωμένα σε βιομεμβράνες. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση μετατρέπουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό.

Στην δεύτερη γραμμή άμυνας ανήκουν τα αντιοξειδωτικά που προκαλούν την άμεση εξουδετέρωση των δραστικών ριζών. Διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά που απομακρύνουν τις ROS είναι (μερικά είναι υδρόφιλα και άλλα είναι λιπόφιλα): Η βιταμίνη C, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη και οι θειόλες είναι υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ενώ η βιταμίνη E και η ουβικινόλη είναι λιποφιλικά αντιοξειδωτικά.

Στην τρίτη γραμμή άμυνας ανήκει η επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ROS. Η αναγνώριση, η αποικοδόμηση και απομάκρυνση οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών και η αποτροπή της συσσώρευσης οξειδωμένων πρωτεϊνών επιτυγχάνεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τις πρωτεϊνάσες, τις πρωτεάσες και τις πεπτιδάσες που υπάρχουν στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των θηλαστικών. Σημαντικό ρόλο στην συνολική άμυνα του οργανισμού έναντι των οξειδωτικών βλαβών έχουν και τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA.

Τέλος, μια άλλη εξίσου σημαντική λειτουργία του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού ονομάζεται 'προσαρμογή', όπου το σήμα για την παραγωγή και τις

αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών προκαλεί σχηματισμό και μεταφορά του κατάλληλου αντιοξειδωτικού στο σωστό σημείο (Niki, 1993).

## **1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

### **1.2.1.Γενικά**

Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ, 2010). Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς και επιδρούν ευεργετικά στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Οι πολυφαινόλες προέρχονται από φρούτα, λαχανικά, βότανα, ψυχανθή, δημητριακά, τσάι, κόκκινο κρασί, ελιές και άλλα αποτελώντας την άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπερϊώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006). Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών συνδέεται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές βιοδραστικές ενώσεις που περιέχουν οι τροφές αυτές σύμφωνα με αρκετές επιδημιολογικές (Kris-Etherton P.M. et al, 2002). Οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και οι χημειοπροστατευτικές τους δράσεις στην υγεία του ανθρώπου τις κατατάσσει στις συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος χημικές ουσίες (Dew et al. , 2005).

### **1.2.2. Χημική δομή**

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών. Σαν όρος η πολυφαινόλη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1894. Πρόκειται για ένα σύνθετο ουσιαστικό αποτελούμενο από την λέξη (πολύ) και



την λέξη (φαινόλη) περιγράφοντας έτσι την χημική δομή ενός βενζοϊκού δακτυλίου(αρωματικός υδρογονάνθρακας) και μιας υδροξυλικής ομάδας (-OH), τα οποία βρίσκονται σε δεσμό μεταξύ τους. Δηλαδή, αποτελούν μόρια, που έχουν μια υδροξυλική ομάδα σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα ενός αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (φαινικό οξύ) είναι  $C_6H_5OH$ , που αποτελεί την απλούστερη φαινόλη.

Στη φύση βρίσκονται κυρίως ως γλυκοζίτες και όχι ελεύθερες, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Εξ ορισμού μια φαινόλη είναι υδροξυβενζόλη. Κατά IUPAC αποδίδεται η ονομασία *benzenol*. Ο πλέον χημικά αναγνωρισμένος ορισμός του όρου πολυφαινόλη δίδεται από τους White-Bate-SmithSwain-Haslam και αναφέρεται ως όρος (WBSSH) που περιγράφει τις πολυφαινόλες ως:

- Γενικά μέτρια υδατοδιαλυτές ενώσεις
- Μοριακό βάρος 500 – 4000 Da
- >12 υδροξυλικές ομάδες (υψηλή οξύτητα)
- Με 5 – 7 αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000 Da

Οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται με βάση τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν, καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους και διακρίνονται σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή, με τα τελευταία να χωρίζονται σε φαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνια.

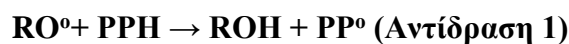
### 1.2.3. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών είναι από τις πιο σημαντικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές αναφέρονται στη δράση τους ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές ελεύθερων ριζών και χηλικών μετάλλων (Blokhina et al, 2003, Ferguson, 2001). Η αντιοξειδωτική δράση μιας πολυφαινόλης εξαρτάται από:

- Την ικανότητα της να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση μιας ουσίας, όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση από την ουσία αυτή.

- Την σταθερότητα της πολυφαινολικής ρίζας μετά την αναστολή της οξειδωσης.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν τα παραπάνω κριτήρια. (Rice Evans et al., 1996). Η διαθεσιμότητα των φαινολικών υδρογόνων τους είναι αυτή που δίνει στις πολυφαινόλες την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Δρουν κυρίως ως δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνων στις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών.



**ROH: ελεύθερη ρίζα, PPH : πολυφαινολική ρίζα, PP<sup>•</sup> : φαινολική ρίζα**

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας έτσι σταθερές φαινολικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών οι οποίες έρχονται σε επαφή μαζί τους αφού τους δίνουν το ηλεκτρόνιο τους. Η παραχθείσα ρίζα, λοιπόν, είναι μια φαινολική ρίζα με υψηλή σταθερότητα, καθώς οδηγεί στην μετατόπιση του ηλεκτρονίου με αποτέλεσμα αυτό να χάνει την δραστηριότητά του. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αποφυγή των αλυσιδωτών αντιδράσεων και η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Μάλιστα, η παραχθείσα ρίζα είναι σε θέση και να αδρανοποιήσει την αρχική ρίζα που οδήγησε στην παραγωγή της, σχηματίζοντας ένα μη δραστικό μόριο (Ferguson et al., 2001).



Ένας άλλος αντιοξειδωτικός μηχανισμός των πολυφαινολών και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου, τα οποία μέσω των αντιδράσεων Harber –Weiss (Αντίδραση 3) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) είναι ικανά να προκαλέσουν την παραγωγή ιδιαίτερα

δραστικών ελεύθερων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Μάλιστα, τα φλαβονοειδή, δεν μπορούν μόνο να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες αλλά και να αποτρέψουν το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton καθώς δεσμεύουν χηλικά δισθενή κατιόντα.



Επίσης οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή είναι σε θέση να προκαλέσουν το σχηματισμό ROS. Η παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως Fe και Cu (Li & Trush 1994), και η ικανότητα τους να ανάγουν το  $\text{Fe}^{3+}$  ή το  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$  ή  $\text{Cu}^{1+}$  αντίστοιχα είναι αυτές που φαίνεται να σχηματίζουν τις ROS (Yoshino et al., 1999). Έπειτα, οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό  $\text{OH}^\bullet$ . Η προ-οξειδωτική αυτή δράση των πολυφαινολών μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino et al., 1999). Ωστόσο, οι αμφιβολίες αυτές απορρίπτονται, αφού από μελέτες προκύπτει πως η απόπτωση αυτή προκαλείται σε καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζονται τα φυσιολογικά (Yamamoto et al., 2003).

#### 1.2.4. Φλαβονοειδή

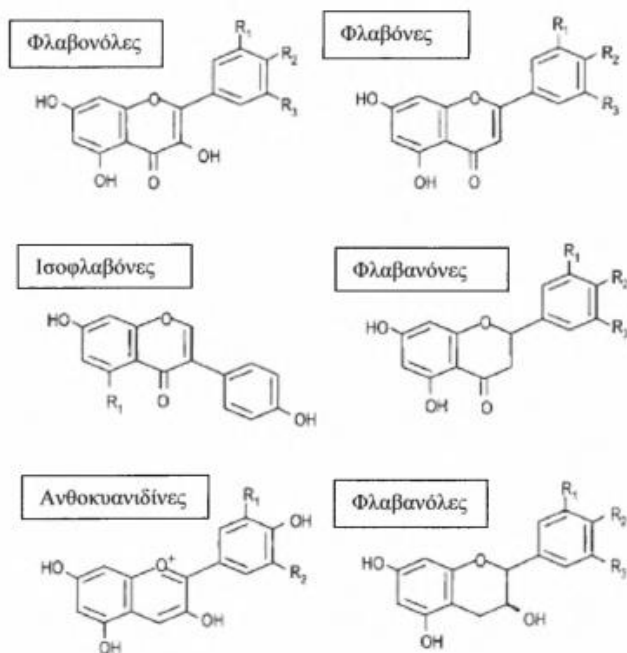
Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 13 υποκατηγορίες στις οποίες ανήκουν πάνω από 5000 ενώσεις. Ευθύνονται για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Επίσης, η αντιοξειδωτική τους δράση προστατεύει από ασθένειες όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από τους δύο αρωματικούς (βενζοϊκούς) δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο που περιέχει οξυγόνο (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός τους αποτελείται από πολυάριθμους υποκαταστάτες.

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανίδες), φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), ισοφλαβόνες (συναντιούνται κυρίως στα ψυχανθή),

φλαβανόνες και ανθοκυανιδίνες (Manach et al., 2004). Τα φλαβονοειδή στα φυτά βρίσκονται στα φύλλα, στους σπόρους, στο φλοιό και στα άνθη και τα προστατεύουν από την υπερϊώδη ακτινοβολία, από παθογόνους παράγοντες και από φυτοφάγα ζώα.

- *Φλαβονόλες*: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα χαρακτηριστικά των τροφίμων. Βρίσκονται σχεδόν σε όλες τις τροφές που καταναλώνει ο άνθρωπος, κυρίως όμως σε κρεμμύδια, πράσα, κόκκινο κρασί, μύρτιλα, τσάι, ελιές. Ως επί το πλείστον συναντώνται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως O – γλυκοσίδια και συσσωρεύονται στην επιδερμίδα και τα φύλλα του φυτού, αφού το φως είναι αυτό που τα βιοσυνθέτει (Manach et al, 2004).
- *Φλαβανόλες*: Είναι η πολυπλοκότερη κατηγορία των φλαβονοειδών. Μπορεί να είναι μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) ή πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, ή αλλιώς συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, αφού κατεργασθούν με ισχυρά οξέα (Crozier A, et al 2006). Συναντώνται σε πολλά φρούτα, το κόκκινο κρασί, αλλά κυρίως στο πράσινο τσάι και τη σοκολάτα.
- *Φλαβόνες*: Συναντώνται κυρίως ως γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης σε φρούτα και λαχανικά. Οι περισσότερες υπάρχουν ως 7 – O – γλυκοσίδια. Βρίσκονται επίσης στο σέλινο, στο μαϊντανό, στα δημητριακά και στα εσπεριδοειδή (πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi, Nacz 1995).
- *Φλαβανόνες*: Κυριότερες είναι η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Οι υδροξυλομάδες τους μπορούν να συνδεθούν με σάκχαρα και μεθυλομάδες, λόγω της χημικής δομής τους. (Manach et al, 2004). Βρίσκονται στην τομάτα, τα αρωματικά φυτά (μέντα) και τα εσπεριδοειδή.
- *Ισοφλαβόνες*: Έχουν την ιδιότητα φυτοοιστρογόνου και την ικανότητα να μπορούν να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων, λόγω των υδροξυλομάδων τους στις θέσεις 7' και 4'. Συναντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στη σόγια (Manach , et al, 2004).
- *Ανθοκυανιδίνες*: Είναι υπεύθυνες για το χρώμα των φυτών και φρούτων (ροζ, κόκκινο, μπλε, μωβ), αφού βρίσκονται στον επιδερμικό τους ιστό. Στο εσωτερικό του φυτού είναι αρκετά ανθεκτικές στο φως, στο pH και σε καταστάσεις οξείδωσης, με κύρια ανθοκυανιδίνη την κυανιδίνη. Βρίσκονται

επίσης στο κρασί, σε κάποια είδη δημητριακών ,στα λαχανικά στα κυρίως στα φρούτα.



Εικόνα 1.6. Χημική δομή φλαβονοειδών

Λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην ανθρώπινη υγεία αποτελούν κυρίαρχο αντικείμενο μελέτης. Λόγω της ιδιότητάς τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης έχουν επιδείξει μοναδική καρδιοπροστατευτική δράση (Mazur et al, 1999). Για παράδειγμα, η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών συνδέθηκε με χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου στους άντρες μεγαλύτερης ηλικίας (Hertog et al, 1993) και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 38% σε γυναίκες σε ηλικίες μετά την εμμηνόπαυση.

## 1.3. ΑΒΟΚΑΝΤΟ

### 1.3.1. Γενικά

Το αβοκάντο (*Persea Americana* L., οικογένεια Lauraceae) είναι ιθαγενές αειθαλές δέντρο των τροπικών περιοχών του Μεξικό και άλλων χωρών της Κεντρικής Αμερικής, γνωστό και με την ονομασία βουτυρόδεντρο και συγκαταλέγεται στα τροπικά και υποτροπικά καρποφόρα δένδρα. Η καλλιέργεια του σήμερα εντοπίζεται σε όλες σχεδόν τις τροπικές και υποτροπικές χώρες του κόσμου με σπουδαιότερες τις Η.Π.Α., Μεξικό, Χιλή, Κούβα, Ισραήλ, Νότιος Αφρική, Αυστραλία (Βασιλακάκης, 2016).



Εικόνα 1.7: Το δέντρο του αβοκάντο

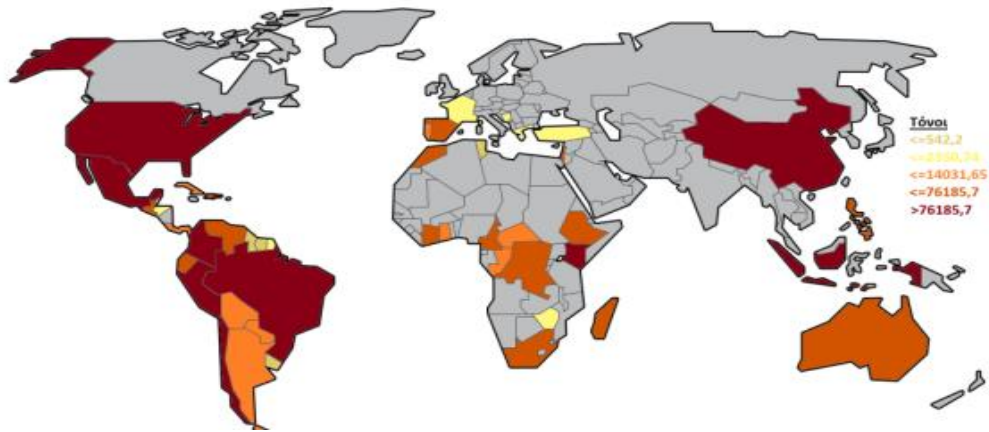
Ο Francisco Cervantes de Salazar («*Mexico en 1554*») ανέφερε πρώτος γραπτά την ύπαρξή του στην περιοχή του Μεξικού (Olmec), όπως επίσης και ο Benavente («*Historia de los Indios de la Nueva España*», μέσα 16ου αιώνα), οι οποίοι μίλησαν κυρίως για το φρούτο και τόνισαν τα ιδιαίτερα μορφολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, σχήμα, γεύση) επισημαίνοντας τη δυναμική της εμπορικής αξιοποίησής του (Schaffer et al., 2012).

Η παραγωγή του αναπτύχθηκε αρχικά στην Καλιφόρνια και την Φλόριντα, με τους καλλιεργητές της Καλιφόρνιας να οργανώνονται και να ιδρύουν πρώτοι το 1915 την «Ένωση αβοκάντο της Καλιφόρνιας». Τότε το αβοκάντο *P.Americana* μετονομάστηκε

σε «αβοκάντο», αφού μέχρι τότε αναφερόταν ως «ahuacate» (στην Καλιφόρνια) και «alligator pear» (στην Φλόριντα). Έπειτα το 1954 ορίστηκαν κανόνες των προτύπων ποιότητας, του εμπορίου, της χρηματοδότησης για μελλοντική έρευνα και της διαφήμισης του συγκεκριμένου προϊόντος από την βιομηχανία αβοκάντο της Φλόριντας, από την οποία ιδρύθηκε η «Διοικητική Επιτροπή αβοκάντο της Φλόριντα» (Schaffer et al., 2012).

Στην Ευρώπη το αβοκάντο εμφανίστηκε μετά το Β΄ Παγκόσμιο πόλεμο, οπότε και άρχισε να καλλιεργείται στις Νότιες Ευρωπαϊκές χώρες όπως Ισπανία, Πορτογαλία και πολύ αργότερα στην Ελλάδα. Σήμερα καλλιεργείται σχεδόν σε όλες τις τροπικές και υποτροπικές χώρες του κόσμου. Η παραγωγή αβοκάντο στην Ευρωπαϊκή Ένωση αυξάνεται διαρκώς, φθάνοντας το 2016 τους 94.165 τόνους (έναντι τους 72,895 τόνους του 2013). Από τις Μεσογειακές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης συνεισφέρουν στην καλλιέργεια του αβοκάντο κυρίως η Ισπανία η Πορτογαλία η Ελλάδα (το 2016, ≈3.199 τόνους, σε 3.830 στρ.), η Τουρκία και σε πολύ μικρότερο ποσοστό η Ιταλία (Σικελία, για εγχώρια κατανάλωση), ενώ η καλλιέργεια δεν ευνοείται εξαιτίας των διαφορετικών κλιματικών και εδαφικών συνθηκών σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες.

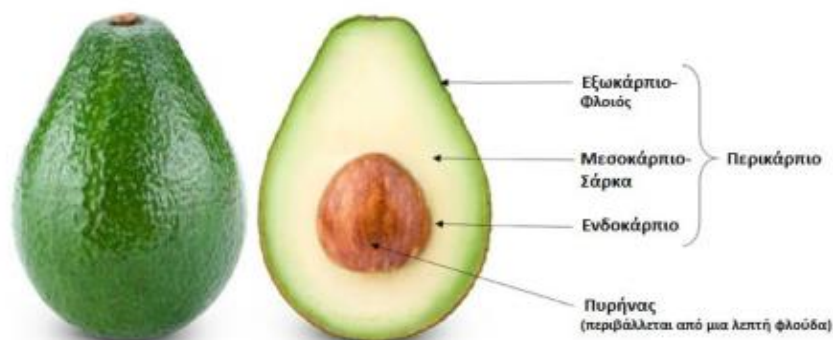
Λόγω λοιπόν της αυξανόμενης παραγωγής και κατανάλωσης του, σε συνδυασμό με την υψηλή διατροφική του αξία, το αβοκάντο αποτελεί προϊόν που αυξάνει ραγδαία την καλλιεργητική και εξαγωγική του αξία. Το μη εδώδιμο τμήμα του φρούτου, δηλαδή ο πυρήνας απορρίπτεται χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Ωστόσο πρόκειται για σημαντικό γεωργικό απόβλητο, κυρίως λόγω του μεγάλου του όγκου εντός του φρούτου, γεγονός που χρήζει διαχείρισης, ειδικά στις κύριες χώρες παραγωγής. Επομένως η σάρκα και ο πυρήνας αποτελούν σημαντικό αντικείμενο μελέτης προς αξιοποίηση τους (Avhad & Marchetti, 2015).



Εικόνα 1.8: Χώρες που καλλιέργειας αβοκάντο

### 1.3.2. Ποικιλίες Αβοκάντο

Το αβοκάντο (*Persea Americana* Mill.) ανήκει στη συνομοταξία (phylum) των αγγειόσπερμων, στην τάξη *Laurales*, στην οικογένεια *Lauraceae*, η οποία αποτελείται από 50 γένη και από 2500 έως 3000 είδη κυρίως δέντρων και ορισμένων θάμνων. Ανήκει στο γένος *Persea* ( $2n=24$  χρωμοσώματα), όπως και άλλα περίπου 50 είδη, εκ των οποίων είναι το μοναδικό με εμπορική αξία και που καλλιεργείται για τον καρπό του (Bergh & Ellstrand, 1986; Ranade & Thiagarajan, 2015).



Εικόνα 1.9: Μορφολογικά χαρακτηριστικά αβοκάντο



Λόγω των διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών, οι οποίες καθορίζονται κυρίως από το υψόμετρο και τη θερμοκρασία, στις οποίες και προσαρμόζεται, το αβοκάντο διακρίνεται σε τρεις βοτανικούς τύπους, με διαφορετικές μορφολογικές όσο και φυσιολογικές ιδιότητες, που έχουν να κάνουν τόσο με το δέντρο όσο και με τα διαφορετικά τμήματα του καρπού (Bergh & Ellstrand, 1986; Dabas, Shegog, Ziegler, & Lambert, 2013; Prasanna, Prabha, & Tharanathan, 2007). Οι ονομασίες τους που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα είναι:

- Μεξικού (*P. americana* var. *drymifolia*),
- Γουατεμάλας (*P. nubigena* var. *Nubigena*, *P. nubigena* var. *guatemalensis*)
- Δυτικών Ινδιών (*P. americana* var. *americana*).

Οι κύριες διαφορές στους σχετίζονται με τον χρόνο ωρίμανσης, το μέγεθος του καρπού, την υφή του φλοιού, την περιεκτικότητα σε έλαιο, την αντοχή στο κρύο κλπ.

### 1.3.2.1 Εμπορικές ποικιλίες

- *Ποικιλία Fuerte*: Το Fuerte έχει χαρακτηριστεί ως το αρχέτυπο και είναι μία υβριδική ποικιλία των τύπων Μεξικού και Γουατεμάλας. Ο πυρήνας του είναι μεγάλος και λεπτός, ενώ ο φλοιός του λείος. Έχει πράσινο-μαύρο χρώμα και μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπαρή ύλη (18-26%). Η ανθοφορία του γίνεται από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο είτε Ιούλιο με Οκτώβριο και η συγκομιδή γίνεται από Μάρτιο έως Αύγουστο είτε Μάη με Νοέμβριο. Η ποικιλία αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλα δέντρα, ενώ τα φύλλα της έχουν οσμή γλυκάνισου. Θεωρείται ποικιλία άριστης ποιότητας, με βουτυρώδη γεύση λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρή ύλη, ενώ η επίγευση καρυδιού είναι το χαρακτηριστικό του.



Εικόνα 1.10: Ποικιλία Fuerte

- *Ποικιλία Hass*: Προέρχεται από την Καλιφόρνια. Είναι ευαίσθητη στις υψηλές θερμοκρασίες. Ο καρπός είναι μέτριου μεγέθους, ωσειδής και το σχήμα του εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας. Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη ποικιλία στον κόσμο. Η ανθοφορία του γίνεται από τον μήνα Ιούλιο έως Σεπτέμβριο είτε Αύγουστο με Οκτώβριο και η συγκομιδή γίνεται από Ιούνιο έως Οκτώβριο είτε Αύγουστο με Δεκέμβριο.



Εικόνα 1.11: Ποικιλία Hass

Έχει εξαιρετική ποιότητα με πλούσια γεύση, με περιεκτικότητα σε λίπος μεταξύ 18 και 20%, ωστόσο σε περιπτώσεις καθυστέρησης της συγκομιδής μπορεί να παρουσιάσει ταγγή και «αλευρώδη» (mealy) γεύση. Η καλλιεργούμενη ποικιλία διαθέτει υψηλή απόδοση και η ωρίμανση του καρπού είναι πιο αργή σε σχέση με αυτή της ποικιλίας «Fuerte».

- *Ποικιλία Zutano*: Η πρώτη καλλιέργεια αυτής της ποικιλίας έγινε στο Μεξικό. Έχει σχήμα αχλαδιού, λεπτό και γυαλιστερό πράσινο δέρμα. Το δέντρο φτάνει σε ύψη από 9 έως 12 μέτρα.. Η συγκομιδή του ξεκινά από τα μέσα του φθινοπώρου έως στα τέλη του χειμώνα. Ο καρπός της ποικιλίας Zutano είναι ωσειδής ή και σφαιρικός, μικρού μεγέθους. Εάν η ωρίμανση του καρπού γίνει πάνω στο δέντρο έχει μικρή διάρκεια ζωής. Ο φλοιός



Εικόνα 1.12: Ποικιλία Zutano

είναι λεπτός, γυαλιστερός, με χρώμα ανοιχτό πράσινο. Ο πυρήνας είναι μεσαίος έως μεγάλος και κωνικός. Χαρακτηρίζεται από «φτωχή» (poor) ευχυμία και συχνά η επίγευση του μετά την κατανάλωση είναι δυσάρεστη. Αναπτύσσεται κυρίως σε ψυχρότερες περιοχές λόγω της αντοχής της στον παγετό (κάτω από  $-3,3^{\circ}\text{C}$ ).

### **1.3.3. Καλλιέργεια αβοκάντο στην Ελλάδα**

Η καλλιέργεια του αβοκάντο στην Ελλάδα καταλαμβάνει έκταση 5.000 στρεμμάτων περίπου και η συνολική παραγωγή ανέρχεται στους 5.000 τόνους. Καλλιεργείται κυρίως στο νομό Χανίων (99% της συνολικής ελληνικής παραγωγής), ενώ παράλληλα έχει γίνει προσπάθεια εγκατάστασης του και σε άλλες περιοχές της χώρας, όπως στην Πελοπόννησο, στην Μεσσηνία και στη Ρόδο (FAOSTAT, 2018). Κάθε χρόνο εξάγονται περί τους 1000-1200 τόνους, ενώ εισάγονται 2.500 τόνοι περίπου. Στην Κύπρο καταλαμβάνει έκταση περί τα 1000 στρέμματα και η παραγωγή ανέρχεται στους 800 τόνους/έτος. Η απόδοση κατά μέσο όρο φτάνει τα 1.000 κιλά (Βασιλακάκης, 2016). Ωστόσο, η εδραίωση της καλλιέργειας αβοκάντο στην Περιφέρεια της Κρήτης άργησε, κυρίως λόγω της επιφύλαξης των παραγωγών. Αυτή προερχόταν τόσο από το γεγονός ότι αποτελούσε μια σχετικά νέα καλλιέργεια, καθώς δεν υπήρχε οργανωμένη εμπορία, αλλά και από την αμφισβήτηση της αποδοχής της από τους καταναλωτές τόσο από τους εγχώριους όσο και από τους παγκόσμιους καταναλωτές.

### **1.3.4. Κατανάλωση Αβοκάντο και υγεία**

Το αβοκάντο καταναλώνεται κυρίως νωπό είτε προσθέτοντας καρυκεύματα είτε όχι, αφού διαθέτει ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η πιο διαδεδομένη μορφή του είναι ως βασικό συστατικό στη δημοφιλή σάλτσα «γουακαμόλε», που έγινε γνωστή από την περιοχή του Μεξικού και γενικότερα της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Schaffer et al., 2012). Επίσης, λόγω των ιδιαίτερων θεραπευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει ο πυρήνας του και οι οποίες αναδεικνύονται συνεχώς μέσα από φαρμακολογικές μελέτες, συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον. Τελευταία υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του πυρήνα του αβοκάντο, λόγω της δημοσίευσης αρκετών επιστημονικών άρθρων, που αναδεικνύουν τη δυναμική αυτών των παραπροϊόντων στην ανάκτηση βιοενεργών συστατικών (Ordoudi, Bakirtzi, & Tsimidou, 2018).

Πιο συγκεκριμένα, σε ιστορικές αναφορές αναφέρεται η χρήση του ως αφέψημα για την καταπολέμηση γαστρεντερικών λοιμώξεων και της δυσεντερίας (Αφρική), η ανακούφιση από τον πονόδοντο ή ως διουρητικό, αλλά και ως πρώτη ύλη για σούπες

και πουτίγκες με σκοπό τη διαχείριση της υπέρτασης (Dabas, Shegog, Ziegler, & Lambert, 2013; Dabas et al., 2012; Schaffer et al., 2012). Από την άλλη, δημοφιλείς χρήσεις είναι οι εξωτερικές (επάλειψη) της πάστας ή του ελαίου του αλλά και για την καταπολέμηση δερματικών παθήσεων (μυκητιάσεων και παρασιτικών λοιμώξεων) και τη θεραπεία της αρθρίτιδας. Ενδεικτικά έχει δημιουργηθεί παρασκεύασμα (αλοιφή) που περιέχει 5 έως 15% ασαπωνοποίητα λιπίδια από εκχύλιση του πυρήνα του αβοκάντο για την θεραπεία των δερματικών παθήσεων (Moy, 1998).

Ως προς τη διατροφική του αξία, το αβοκάντο είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (9,6% κατά βάρος), μέταλλα (Mg, K), βιταμίνες (A, B2, B9, K, C, E, συνένζυμο Q10), (πολυ)φαινόλες (προανθοκυανιδίνες, κατεχίνες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή), καροτενοειδή (ξανθοφύλλες όπως λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, β-κρυπτοξανθίνη) και φυτοστερόλες (καμπεστερόλη, σιγμαστερόλη) (Jimenezetal., 2020). Σε πρόσφατες επιστημονικές έρευνες μάλιστα βρέθηκε πως τόσο η σάρκα, όσο και τα υποπροϊόντα του αβοκάντο, μπορούν να προσφέρουν πολλά οφέλη στην υγεία, καθώς παρέχουν προστασία έναντι μικροβίων, φλεγμονών, καρκίνου, διαβήτη και υπέρτασης (Jimenez et al., 2020). Τα εκχυλίσματα του πυρήνα έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα δράσης τους έναντι των ζυμών, όπως *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* και *Malassezia pachydermatis* (υπεύθυνες για τις περισσότερες μυκητιασικές λοιμώξεις στα νοσοκομεία), αποδεικνύοντας με τα αποτελέσματά τους πως εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση (Leite et al., 2009). Καταναλώνοντας αβοκάντο σε συστηματική βάση φαίνεται πως βοηθάει σημαντικά στη μείωση του βάρους και την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, καθώς επίσης και στην επαναφορά της ισορροπίας των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου έπειτα από κατανάλωση υψηλών ποσοτήτων πρωτεϊνών από τη διατροφή, και μπορούν να οδηγήσουν σε ελκώδη κολίτιδα ή ακόμα και καρκίνο του εντέρου (Kontratieva, 2021). Επιπλέον, οι αντικαρκινικές ιδιότητες των μεθανολικών εκχυλισμάτων του πυρήνα του αβοκάντο έχουν μελετηθεί ως προς τις ιδιότητες τους έναντι στον καρκίνο του στήθους (Lee, Yu, Lee, & Lee, 2008).

Ωστόσο υπάρχει ανησυχία ως προς την τοξικότητα του πυρήνα κατά τη χρήση του. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ποντίκια για τον έλεγχο της ασφαλούς χρήσης του εκχυλίσματος του πυρήνα είτε ενδοφλέβια, είτε δια του στόματος ως αφέψημα ή δισκίο, έδειξαν χαμηλή τοξικότητα (LD50 μεγαλύτερο από 10.000 mg/kg1), αφήνοντας όμως ανοιχτό το ενδεχόμενο για περαιτέρω έρευνα (Aigbiremolen, Ativie, Aisuodionoe, & Odigie, 2018; Amaechina, Uchendu, Oboh, Agokei, & Eboke, 2017;

Imafidon & Amaechina, 2010; Ozolua, Anaka, Okro, & Idogun, 2009; Pahua-Ramos et al., 2012). Για αυτό το λόγο, έχουν δημοσιευθεί αρκετές πατέντες οι οποίες αξιοποιούν κυρίως τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, γεγονός που αναδεικνύει περισσότερο τη σημασία της αξιοποίησης του πυρήνα.

Άρα λοιπόν και η σάρκα του αβοκάντο, αλλά και ο πυρήνας του χρησιμοποιούνται και μεν εδώ και πολλά χρόνια, αλλά συνεχώς γίνεται ακόμη πιο αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων του.

### **1.3.5. Πολυφαινόλες του Αβοκάντο**

Έρευνες αναφέρουν πως στην πιο εμπορική ποικιλία αβοκάντο (Hass) το περιεχόμενο του πολικού κλάσματος της σάρκας σε ολικές φαινόλες κυμαίνεται από περίπου 0,7 έως 1,0 mg GAE/g επί ξηρού βάρους, ανάλογα με το διαλύτη εκχύλισης. Για παράδειγμα φαίνεται ότι η χρήση της ακετόνης ευνοεί την παραλαβή αυτού του τύπου συστατικών, όπως και η χρήση μεθανόλης (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Αυτή η τάση παρατηρείται και στην περίπτωση της σάρκας καρπών της ποικιλίας Fuerte στην οποία μάλιστα αποδίδονται σχεδόν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (1,16 έως 1,75 mg GAE/g επί ξηρού). Τα κύρια φαινολικά συστατικά που έχουν ταυτοποιηθεί στη σάρκα καρπών των ποικιλιών Fuerte και Hass φαίνεται να ανήκουν στις τάξεις των φαινολικών οξέων όπως τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (0,32 και 0,35 mg/g επί ξηρού, αντίστοιχα) και τα υδροξυκιναμωμικά οξέα (1,11 και 3,16 mg/g επί ξηρού, αντίστοιχα), φλαβονοειδών όπως οι φλαβαν-3-όλες (σύνολο κατεχίνης και επικατεχίνης, 0,004 και 0,033 mg/g επί ξηρού, αντίστοιχα) αλλά και πιο σύνθετων μορφών όπως οι προανθοκυανιδίνες (προκυανιδίνη -ως άθροισμα διμερών, ολιγομερών και πολυμερών- 0,73 και 0,62 mg/g, 20 αντίστοιχα). Μέσα από την βιβλιογραφία προκύπτει ότι δεν έχουν ανιχνευθεί φλαβονόλες στη σάρκα, σε αντίθεση με τον πυρήνα του αβοκάντο, όπου η συγκέντρωσή τους εντοπίζεται σε 0,02 mg/g επί ξηρού (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Wang et al., 2010).

Οι περισσότερες μελέτες δίνουν έμφαση στην ποσοτική και ποιοτική σύσταση του πολικού κλάσματος του πυρήνα, κυρίως όσον αφορά στις ολικές φαινόλες. Στον πυρήνα

του αβοκάντο (Hass) συναντώνται ολικές φαινόλες που κυμαίνονται από περίπου 16,99 έως 60,82 mg GAE/g επί ξηρού ανάλογα με το διαλύτη εκχύλισης. Και στον πυρήνα η ακετόνη ευνοεί την παραλαβή αυτών των συστατικών, όπως και η μεθανόλη (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και στην ποικιλία Fuerte η οποία μάλιστα αναφέρεται πως παρουσιάζει και στον πυρήνα σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (20,29 έως 69,12 mg GAE/g επί ξηρού). Διάφοροι ερευνητές βρήκαν ότι τα κύρια φαινολικά συστατικά ανήκουν στις τάξεις των προανθοκυανινών (προκυανιδίνη, ως άθροισμα διμερών, ολιγομερών και πολυμερών, 45,92 και 8,77 mg/g, για τις ποικιλίες Hass και Fuerte αντίστοιχα), των φαινολικών οξέων (υδροξυκιναμωμικά οξέα, 2,83 και 0,72 mg/g, για τις ποικιλίες Hass και Fuerte αντίστοιχα), των φλαβαν-3-ολών (σύνολο κατεχίνης και επικατεχίνης, 2,38 και 0,97 mg/g, για τις ποικιλίες Hass και Fuerte αντίστοιχα) και των φλαβονολών (καιμφερόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη, 0,01 και 0,02 mg /g, για τις ποικιλίες Hass και Fuerte αντίστοιχα), αφού εξέτασαν τα ακετονικά εκχυλίσματα των πυρήνων από ώριμους καρπούς των ποικιλιών Hass και Fuerte ή άλλων λιγότερων εμπορικών ποικιλιών, από τη Φλόριντα, (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Wang et al., 2010).

Αυτό που παρατηρείται λοιπόν είναι ότι η περιεκτικότητα του πυρήνα σε ολικές φαινόλες είναι περίπου 20 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της σάρκας. Λόγω αυτής της χημικής του σύστασης, λοιπόν, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις ολικές φαινόλες άρα ακολούθως στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων τόσο του πυρήνα όσο και του ελαίου αυτού. Μάλιστα, αναφέρεται πως τα πολικά εκχυλίσματα του πυρήνα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτά της σάρκας, ενώ η αντιοξειδωτική του δράση έχει διαπιστωθεί και σε συστήματα τροφίμων (Rodríguez Carpena et al., 2011; Soong & Barlow, 2004; Villa-Rodríguez et al., 2011; Wang et al., 2010).

Έτσι, τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του πυρήνα του αβοκάντο, καθώς έχουν δημοσιευθεί αρκετά επιστημονικά άρθρα, στα οποία αναδεικνύεται η δυναμική που εμφανίζουν αυτά τα παραπροϊόντα στην ανάκτηση βιοενεργών συστατικών (Ordoudi, Bakirtzi, & Tsimidou, 2018). Πιο συγκεκριμένα η αξιοποίηση του πυρήνα του αβοκάντο αναδεικνύει μια νέα τάση, για την οποία ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα (in vivo και κλινικές μελέτες). Για παράδειγμα, το 2011, ερευνητές ασχολήθηκαν και με την απομόνωση και σταθεροποίηση της χρωστικής του πυρήνα, ως μια πιθανή φυσική χρωστική, ο σχηματισμός της οποίας οφείλεται στην

οξειδωση των φαινολών με την καταλυτική δράση του ενζύμου πολυφαινολοξειδάση (PPO) (Dabas et al., 2011). Στον τομέα της υγείας μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι, οι φαινολικές ενώσεις του πυρήνα, καθώς και η πιθανή συνεργιστική τους δράση με άλλα φυτοχημικά συστατικά, συσχετίζονται με την αναστολή βασικών ενζύμων που συνδέονται με τη νόσο Alzheimer (Oboh et al., 2016).

#### **1.4. Εκχύλιση με μικροκύματα**

Η αξιοποίηση και χρήση των μικροκυμάτων ως μέθοδο εκχύλισης συστατικών κυρίως από φυτικές ύλες έχει αναδειχθεί πολύ σε ερευνητικό επίπεδο τελευταία. (Mandal et al., 2009), ακριβώς επειδή οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης απαιτούν πολύ χρόνο και μεγάλες ποσότητες εκχυλιστικών αντιδραστηρίων. Αυτό είναι που προσπαθεί να αλλάξει η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα.

Η μέθοδος εκχύλισης Soxhlet ήταν η κυρίαρχη τεχνική εκχύλισης τα τελευταία 126 χρόνια. Ωστόσο, λόγω των βασικών μειονεκτημάτων της, δηλαδή ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης και η μεγάλη απαίτηση σε διαλύτες και ενέργεια, οδήγησαν στην αναζήτηση άλλων τεχνικών. Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα έχει ήδη ερευνηθεί και πολλές αναφορές δείχνουν πως υπάρχει εφαρμογή της στον αγροτικό και περιβαλλοντολογικό τομέα (Mandal et al., 2007).

Τα μικροκύματα αναφέρονται σε μη ιονισμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με συχνότητα μεταξύ 300 MHz έως 300 GHz τα οποία τοποθετούνται μεταξύ των ακτινών X και της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (Letellier et al., 1999). Οι περισσότερες μέθοδοι θέρμανσης (με αγωγή ή συναγωγή) προκαλούν την απώλεια ενός μεγάλου ποσού θερμότητας στο περιβάλλον. Η χρήση των μικροκυμάτων επιτρέπει τη θέρμανση εκλεκτικά στην ύλη που προορίζεται για θέρμανση και μεταβαίνει κατευθείαν στην ύλη καθώς ο περιέκτης δεν απορροφά θερμότητα. Αυτό σημαίνει πως δε χάνεται θερμότητα στο περιβάλλον, αφού πρόκειται για κλειστό σύστημα.

Αυτό που προκαλεί την μετατροπή της ενέργειας των μικροκυμάτων σε θερμότητα είναι η ιονική αγωγή και η διπολική περιστροφή. Η ιονική αγωγή παράγει θερμότητα λόγω της αντίστασης του διαλύματος, της κίνησης των ιόντων του και αυτή εξαρτάται

από τη συγκέντρωση, το μέγεθος και το φορτίο των ιόντων καθώς και από τυχόν αλληλεπιδράσεις τους με το διαλύτη (Letellier et al., 1999). Η διπολική περιστροφή σχετίζεται με τις κινήσεις των δίπολων μορίων του διαλύματος, επειδή προσπαθούν να ευθυγραμμιστούν με τη φορά του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Αυτές, λοιπόν, οι περιστροφές και οι συγκρούσεις είναι υπεύθυνες για τη γρήγορη αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος (Letellier et al., 1999; Watkins, 1983). Ωστόσο, την στιγμή που διακόπτεται η έκθεση του δείγματος στα μικροκύματα, δεν σημαίνει πως διακόπτεται και η παραγωγή θερμότητας και κατ' επέκταση η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος, καθώς απαιτείται πάντα κάποιος χρόνος μέχρι να επέλθει η ηρεμία των μορίων του δείγματος και αυτά να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση (Zeotorzynski, 1995).

Οι βασικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με μικροκύματα είναι η φύση του δείγματος, οι συνθήκες κατεργασίας και ο διαλύτης.

Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την προετοιμασία μιας εκχύλισης με μικροκύματα είναι η επιλογή του σωστού διαλύτη. Η ικανότητά του να απορροφά τα μικροκύματα και η φύση του υποστρώματος καθώς και η συμβατότητα του με την ακόλουθη αναλυτική τεχνική μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης είναι τα βασικά κριτήρια επιλογής του διαλύτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση με μικροκύματα έχουν υψηλή πολικότητα και είναι συνήθως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο και το νερό ή μίγματά τους σε διάφορες αναλογίες (Letellier et al., 1999; Carro, 2000; Shu et al., 2003; Numata et al., 2004; Onuska et al., 1993; Chee et al., 1996; Lopez-Avila et al., 1994). Για το εάν είναι το μίγμα ή ο καθαρός διαλύτης αποτελεσματικότερος δεν μπορεί να δοθεί μία απάντηση, αφού η επιλογή εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, εκ των οποίων πιο σημαντική είναι η φύση του υποστρώματος, ενώ σε πιο πρόσφατες μελέτες, οι ερευνητές λαμβάνουν υπόψη και την ασφαλέστερη χρήση και τον φιλικότερο προς το περιβάλλον διαλύτη. Σε αυτό όμως που φαίνεται να συμφωνεί η ερευνητική κοινότητα είναι ότι τα μίγματα είναι αποτελεσματικότερα, όταν το ένα από τα δυο συστατικά τους έχει υψηλή πολικότητα, ενώ οι καθαροί διαλύτες δίνουν καλύτερα αποτελέσματα όταν εφαρμόζονται σε υποστρώματα που από μόνα τους απορροφούν πολύ ισχυρά τα μικροκύματα. Εκτός από το διαλύτη και τη θερμοκρασία σημαντικό ρόλο παίζει η υγρασία του υποστρώματος. Βέβαια, υπάρχουν διαφορετικές απόψεις για το αν η παρουσία υγρασίας στο δείγμα βελτιώνει την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα



της εκχύλισης και σε τι βαθμό. Ορισμένοι μελετητές πιστεύουν ότι η γρήγορη θέρμανση του νερού βοηθά το διαλύτη να εισχωρήσει καλύτερα και σε μεγαλύτερο βάθος στο δείγμα, ώστε να αποσπάσει μεγαλύτερη ποσότητα από το επιθυμητό συστατικό. Από την άλλη, η παρουσία υγρασίας έχει άλλοτε αμελητέα και άλλοτε αρνητική επίδραση στην ποσότητα του εκχυλίσματος (Kaufmann et al., 2002; Letellier et al., 1999). Τέλος, η ένταση όσο και ο χρόνος της μικροκυματικής ακτινοβολίας του δείγματος φαίνονται να έχουν επίσης κάποιο ρόλο, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν παγιωμένες απόψεις.

Η χρήση των μικροκυμάτων έχει πολλές εφαρμογές στον τομέα της επεξεργασίας των τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες, όπως για παράδειγμα στη θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων την ξήρανση, την παστερίωση, την αποστείρωση, τη βαφή, το ψήσιμο κ.α. (Gupta & Wong, 2007). Ο υψηλός ρυθμός θέρμανσης, η σημαντική μείωση στο χρόνο κατεργασίας, η μεγαλύτερη ομοιομορφία στη θέρμανση, η ασφαλής διαχείριση του τρόφιμου, η ευκολία στη λειτουργία είναι κάποιοι από τους λόγους για τους οποίους η θέρμανση με μικροκύματα έχει κερδίσει έδαφος στην επεξεργασία τροφίμων. Επίσης, τα μικροκύματα εφαρμόζονται σε διάφορες διεργασίες στην τεχνολογία τροφίμων όπως ξήρανση με αέρα, ξήρανση υπό κενό, ξήρανση με κατάψυξη, παστερίωση και αποστείρωση.

Η εκχύλιση με μικροκύματα εφαρμόζεται κυρίως για την εξαγωγή πολύτιμων συστατικών από φυτικές ύλες και τρόφιμα. Τελευταία, λαμβάνουν χώρα όλο και περισσότερες μελέτες που αφορούν την εκχύλιση φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο των μικροκυμάτων. Πρόκειται δηλαδή για μια τεχνική που κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος.

## **2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση των άριστων συνθηκών παρασκευής εκχυλίσματος από πυρήνα καρπού αβοκάντο με μικροκύματα ώστε να παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ABTS, ενώ για τα ολικά φλαβονοειδή μία μέθοδος που βασίζεται στη χρήση χλωριούχου αργιλίου.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Εκχύλιση με μικροκύματα

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν απομονώθηκαν από σπέρμα (πυρήνα) αβοκάντο (*Persea americana*) με χρήση μικροκυμάτων. Παρήχθησαν εκχυλίσματα υπό 29 διαφορετικές συνθήκες. Για την κάθε συνθήκη παρήχθησαν 3 εκχυλίσματα, επομένως ο συνολικός αριθμός των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν ήταν 87.

Πίνακας 3.1: Συνθήκες εκχύλισης των δειγμάτων αβοκάντο.

Αριθμός Δείγματος	Block	A:TEMPERATURE	B:EXTRACTION TIME	C:MICROWAVE	D:RATIO					ppm
		oC	MIN	INTENSITY	mL/g	kg	mg	L νερού	mL	στα 50μL
1	Block 1	40,00	50,00	6000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
2	Block 1	80,00	50,00	4000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
3	Block 1	60,00	50,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
4	Block 1	60,00	50,00	2000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
5	Block 1	60,00	50,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
6	Block 1	40,00	50,00	4000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
7	Block 1	60,00	50,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
8	Block 1	60,00	50,00	6000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
9	Block 1	60,00	90,00	4000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
10	Block 1	40,00	90,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
11	Block 1	80,00	50,00	6000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
12	Block 1	60,00	10,00	4000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000
13	Block 1	40,00	50,00	2000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
14	Block 1	60,00	50,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
15	Block 1	80,00	10,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
16	Block 1	60,00	10,00	2000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
17	Block 1	60,00	90,00	4000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000
18	Block 1	60,00	90,00	2000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
19	Block 1	80,00	90,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
20	Block 1	40,00	10,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
21	Block 1	60,00	90,00	6000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
22	Block 1	80,00	50,00	4000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000
23	Block 1	80,00	50,00	2000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
24	Block 1	60,00	10,00	4000,00	40,00	2,00	2000000,00	80	0,05	1250
25	Block 1	60,00	10,00	6000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
26	Block 1	60,00	50,00	4000,00	25,00	2,00	2000000,00	50	0,05	2000
27	Block 1	60,00	50,00	2000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000
28	Block 1	40,00	50,00	4000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000
29	Block 1	60,00	50,00	6000,00	10,00	2,00	2000000,00	20	0,05	5000

#### 3.2. ABTS

Οι Miller και Rice-Evans ανέπτυξαν την μέθοδο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS (Rice-Evans et al., 1996), η οποία βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης

αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Η ρίζα αυτή παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonicacid) (ABTS), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (κατιόν). Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Με την προσθήκη μιας ουσίας με αντιοξειδωτική δράση στο διάλυμα, η ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm.

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και έπειτα γίνεται η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

- Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) παρασκευάζεται διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος αρχικά ζυγίζονται 10,97 mg ABTS και έπειτα διαλύονται σε H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) παρασκευάζεται διάλυμα 600 μM. Πραγματοποιείται αραιώση του stock διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8,8 με H<sub>2</sub>O, ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μM.
- Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύεται 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Καθώς όλα τα παραπάνω διαλύματα είναι φωτοευαίσθητα, προετοιμάζονται την ημέρα

του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και μάλιστα κατά την διάρκεια του πειράματος διατηρούνται σε πάγο. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000μl στα οποία προστίθενται με την σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP) σε Eppendorf tubestων 1,5ml. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3.2: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων**

	Τυφλό	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450μl	400μl	450μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl
<b>ABTS</b>	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50μl	50μl	50μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
<b>HRP</b>	-	50μl	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl
<b>Τελικός Όγκος</b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν. Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετριέται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Control).

### 3.3. Μέτρηση φλαβονοειδών

#### Συνολικό Περιεχόμενο σε Φλαβονοειδή

Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή των δειγμάτων προσδιορίστηκε με την χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου. Η κερσετίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο και η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή εκφράστηκε σε μg ισοδύναμης κερσετίνης / ml εκχυλίσματος. Στη μέθοδο αυτή, το χλωριούχο αργίλιο σχηματίζει σύμπλοκο με ομάδες υδροξυλίου των φλαβονοειδών που υπάρχουν στο δείγμα. Το σύμπλοκο αυτό έχει τη μέγιστη απορρόφηση στα 420 nm. Ο λόγος για τη χρήση χλωριούχου αργιλίου στη χρωματομετρική μέθοδο είναι ότι το AlCl<sub>3</sub> (ασθενώς

όξινο), σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με τις ομάδες κετόνης C-4 και είτε την ομάδα υδροξυλίου C-3 ή C-5 φλαβονών και φλαβονολών. Το οξικό κάλιο είναι ένα βασικό άλας που προέρχεται από το ασθενές οξικό οξύ και το ισχυρό υδροξείδιο του καλίου, ή καυστική ποτάσα (KOH), έτσι προστίθεται για να χρησιμοποιήσει την αδύναμη βασικότητα του για να εξουδετερώσει την ασθενή οξύτητα στο σύστημα.

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και έπειτα γίνεται η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις

- **Διάλυμα 10%  $AlCl_3$**  : 10 gr  $AlCl_3$  προστέθηκαν σε 100 ml απιονισμένου νερού και εκτελείται η διάλυση του.
- **Διάλυμα 1M Οξικού καλίου:** 9,8gr Οξικού καλίου (Potassium acetate) μπήκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, με απιονισμένο νερό ώστε να γίνει η διάλυση του
- **Διάλυμα κερσετίνης:** 1 mg κερσετίνης διαλύθηκε εντός 1 ml αιθανόλης. Έτσι η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1mg / ml ή 1000μg / ml. Στη συνέχεια εκτελέστηκε σειριακή αραιώση για να παρασκευαστεί διαφορετικό διάλυμα συγκέντρωσης. Πχ 10, 50, 100 και 200 μg/ml.

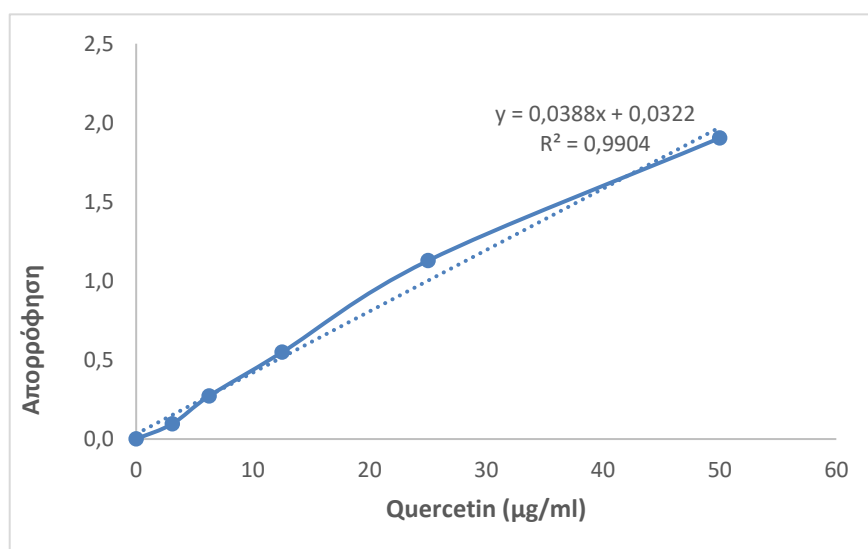
Καθώς όλα τα παραπάνω διαλύματα είναι φωτοευαίσθητα, προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και μάλιστα κατά την διάρκεια του πειράματος διατηρούνται σε πάγο. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000ml στα οποία προστίθενται με την σειρά η μεθανόλη, το διάλυμα του χλωριούχου αργιλίου ( $AlCl_3$ ), το διάλυμα του οξικού καλίου και απιονισμένο νερό σε Eppendorf tubes των 1,5ml. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα και μετρείται η απορρόφηση στα 420 nm.

**Πίνακας 3.3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων**

	Τυφλό	Κερσετίνη	C <sup>-</sup>	Κερσετίνη	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
AlCl <sub>3</sub>	20μl	20μl	-	-	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl
KOH	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl
Methanol	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl
H <sub>2</sub> O	660μl	460μl	20μl	480μl	-	-	-	-	-	-
Εκχύλισμα	-	200μl	660μl	200μl	660μl	660μl	660μl	660μl	660μl	660μl
Τελικός Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

### Πρότυπη καμπύλη κερσετίνης

Για τον προσδιορισμό των συνολικών φλαβονοειδών, χρησιμοποιήθηκε quercetin για να γίνει η τυπική καμπύλη βαθμονόμησης. Μετά την ανάμιξη, το διάλυμα επώαστηκε για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση των μιγμάτων της αντίδρασης μετρήθηκε έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 420 nm με φασματοφωτόμετρο. Η συγκέντρωση της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή στα δείγματα δοκιμής υπολογίστηκε από το γράφημα βαθμονόμησης ( $Y=0,038x + 0,032$ ,  $R^2= 0,0990$ ) και εκφράστηκε σε mg ισοδύναμο κερσετίνης (QE/ml φυτικού υλικού). Όλοι οι προσδιορισμοί εξετάστηκαν εις τριπλούν.



**Διάγραμμα 3.1: Πρότυπη καμπύλη κερσετίνης**

### 3.4. Στατιστικό μοντέλο για ανάλυση αποτελεσμάτων

#### 3.4.1. Μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) για την εύρεση των άριστων συνθηκών εκχύλισης με βάση την αντιοξειδωτική δράση και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή.

Με τον όρο βελτίωση (improvement) στον πειραματικό σχεδιασμό εννοούμε τη μετατόπιση των επιπέδων των παραγόντων προς περιοχές στις οποίες βελτιώνεται η απόκριση. Εργαλεία που συμβάλλουν προς τη βελτίωση είναι, για παράδειγμα, ο στατιστικός έλεγχος διεργασιών (SPC) αλλά και, πιο αποτελεσματικά, οι παραγοντικοί σχεδιασμοί (Myers και Montgomery, 2002). Ωστόσο, ορισμένες φορές αντικείμενο του πειραματισμού αποτελεί η εύρεση, όχι απλώς βελτιωμένων, αλλά των βέλτιστων δυνατών τιμών απόκρισης. Έτσι, η βελτιστοποίηση (optimization) αφορά στον καθορισμό εκείνων των επιπέδων των παραγόντων που οδηγούν στις βέλτιστες δυνατές τιμές απόκρισης.

Η μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) αποτελεί μία από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές βελτιστοποίησης. Η βελτιστοποίηση (optimization) αφορά στον καθορισμό εκείνων των επιπέδων των παραγόντων που οδηγούν στις βέλτιστες δυνατές τιμές απόκρισης.

Στη μεθοδολογία επιφανειών-απόκρισης στόχος είναι η δημιουργία επιφανειών απόκρισης και η περιγραφή των επιφανειών αυτών με αντίστοιχα μοντέλα. Τα μοντέλα που μπορεί να περιγράψουν μία επιφάνεια απόκρισης είναι πρωτοβάθμια, με ή χωρίς αλληλεπιδράσεις, δευτεροβάθμια ή τριτοβάθμια. Με τη βοήθεια αυτών καθίσταται εφικτή η πρόβλεψη μιας τιμής απόκρισης από ένα συνδυασμό τιμών παραγόντων και η εντόπιση της βέλτιστης περιοχής για την απόκριση.

Αναμφισβήτητα, κατά τη βελτιστοποίηση, η εύρεση της βέλτιστης περιοχής (optimal region) έχει μεγαλύτερη σπουδαιότητα από τον εντοπισμό ενός βέλτιστου σημείου. Η γνώση της μορφολογίας της βέλτιστης περιοχής, είναι πιο χρήσιμη, επειδή:

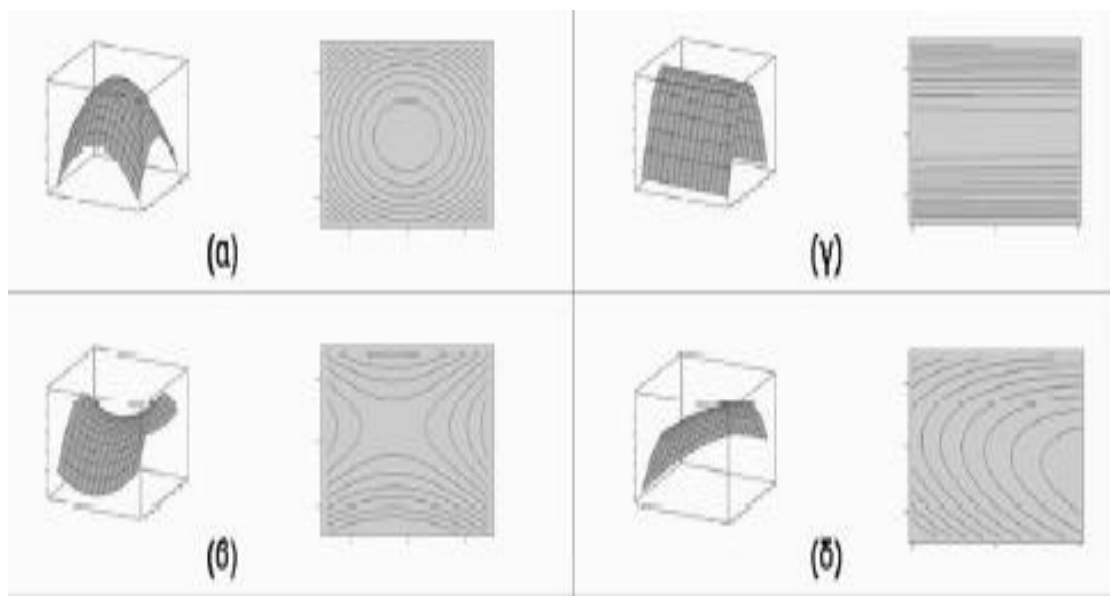
- Είναι χρήσιμο να υπάρχει ευχέρεια επιλογής ανάμεσα σε διάφορες τιμές παραγόντων που δίνουν τιμές απόκρισης εντός της βέλτιστης περιοχής.



- Υπάρχουν συχνά περιορισμοί για τις τιμές των παραγόντων, που καθιστούν στην πράξη δυσχερή την επίτευξη ενός συγκεκριμένου βέλτιστου.

Η μορφή της επιφάνειας απόκρισης, στην οποία θα αναζητηθεί η βέλτιστη περιοχή, ποικίλλει και μπορεί να πάρει διάφορες μορφές και έχει ως κέντρο της ένα στάσιμο σημείο (stationary point) που μπορεί να αντιστοιχεί (Myers, και Montgomery, 2002):

- σε ένα σημείο μέγιστης απόκρισης (σχήμα 3.1)
- σε ένα σημείο ελάχιστης απόκρισης
- σε ένα σημείο γύρω από το οποίο η επιφάνεια μοιάζει με αυχένα ή σέλα (saddle point), οπότε το σύστημα ονομάζεται ελάχιστο-μέγιστο (minimax system) (σχήμα 3.1)
- σε μια ευθεία βέλτιστων τιμών (μέγιστων ή ελάχιστων) που καλείται στάσιμη κορυφογραμμή (stationary ridge) (σχήμα 3.1)
- σε μια ευθεία που οδηγεί σε ένα σημείο μέγιστης ή ελάχιστης απόκρισης εκτός του πειραματικού χώρου, οπότε το σύστημα έχει τη μορφή ανοδικής ή καθοδικής κορυφογραμμής (rising or falling ridge) (σχήμα 3.1).



**Σχήμα 3.1:** Τέσσερις χαρακτηριστικές περιπτώσεις επιφάνειας απόκρισης. α) μέγιστο β) αυχέννας γ) στάσιμη κορυφογραμμή δ) ανοδική κορυφογραμμή.

Σε όλες αυτές τις παραπάνω περιπτώσεις ισχύει το δευτεροβάθμιο μοντέλο και η διαφορά των μορφών της επιφάνειας απόκρισης έγκειται μόνο στους διαφορετικούς συνδυασμούς πρόσημων των συντελεστών του δευτεροβάθμιου μοντέλου. Εάν αντίθετα, επικρατεί το πρωτοβάθμιο μοντέλο σε όλη την επιφάνεια, η απόκριση αυξάνεται ή μειώνεται σταθερά, και το σύστημα παρουσιάζει την εικόνα μιας πλαγιάς (hill side) (σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3.2:**Επιφάνεια απόκρισης με τη μορφή πλαγιάς στην οποία επικρατεί το πρωτοβάθμιο μοντέλο.

### 3.4.2. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (BBD)

Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) επιλέχθηκε για τη δυνατότητα να παρέχει ένα δίκτυο πειραματικών σημείων, που θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με βάση την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Αυτή η στατιστική διαδικασία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βελτιστοποίηση διαδικασιών, λόγω της αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητάς της, στην οικοδόμηση εξισώσεων πρόβλεψης (Box&Behnken, 1960; Wang et al., 2014).

Για το πείραμα BBD, επιλέχθηκαν 4 ανεξάρτητες μεταβλητές οι οποίες ήταν: η θερμοκρασία εκχύλισης ( $X_1 = 40-60-80^{\circ}\text{C}$ ), ο χρόνος εκχύλισης ( $X_2 = 10-50-90 \text{ min}$ ), η ισχύς των μικροκυμάτων ( $X_3 = 2000, 4000, 6000 \text{ W}$ ) και η αναλογία του όγκου του διαλύτη νερού ανά γπυρήνα καρπού αβοκάντο (10, 25, 40 ml/g).

Αυτές οι μεταβλητές βασίστηκαν στην ακόλουθη εξίσωση:

$$x_i = X_i - X_0 / \Delta X_i, X_i = 1, 2, 3, 4$$

όπου  $x_i$  και  $X_i$  είναι οι χωρίς διάσταση και οι πραγματικές τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, αντιστοίχως.  $X_0$  είναι η πραγματική τιμή των ανεξάρτητων μεταβλητών στο κεντρικό σημείο και  $\Delta X_i$  είναι η αλλαγή φάσης του  $X_i$  που αντιστοιχεί στη χωρίς διάσταση τιμή της διακύμανσης της εξίσωσης. Η ποσότητα των φλαβονοειδών και η αντιοξειδωτική ικανότητα (βασισμένη στις τιμές  $IC_{50}$  της μεθόδου ABTS) επιλέχθηκαν ως αποκρίσεις λόγω της εξάρτησής τους από τη μέθοδο εκχύλισης.

Οι μεταβλητές απόκρισης προσαρμόστηκαν σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο εξίσωσης 4<sup>ης</sup> τάξης που προέκυψε από τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Οι μεταβλητές απόκρισης ( $Y$ ) ήταν το TFC (ολικά φλαβονοειδή) και οι τιμές  $IC_{50}$  της μεθόδου ABTS.  $X_i$  και  $X_j$  ήταν οι ανεξάρτητες μεταβλητές που επηρεάζουν τις αποκρίσεις και  $\beta_0$ ,  $\beta_{ii}$  και  $\beta_{ij}$  ήταν οι 'regression coefficients' του μοντέλου (intercept, linear, quadratic και interaction).

Στη συνέχεια το μαθηματικό πρόγραμμα Design-Expert (Version 12) χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν οι τελικοί 29 συνδυασμοί των συνθηκών εκχύλισης που εξετάστηκαν η κάθε μία σε τριπλά δείγματα (Πίνακας 3.1). Τα πειράματα τυχαιοποιήθηκαν για να μεγιστοποιηθούν οι επιπτώσεις ανεξήγητης διακύμανσης των μεταβλητών στις παρατηρούμενες αποκρίσεις. Κάθε μεταβλητή κατηγοριοποιήθηκε σε 3 επίπεδα: -1 (χαμηλό), 0 (ενδιάμεσο) και +1 (υψηλό). Το εύρος αυτών των παραμέτρων εκχύλισης προσδιορίστηκε με προκαταρκτικά πειράματα, όπου ο στόχος ήταν η εξάρτηση της απόδοσης εκχύλισης σε σχέση με κάθε μία από τις παραμέτρους. Για το λόγο αυτό, στη δημιουργία του τελικού δικτύου σημείων για τις 29 συνθήκες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό Design-Expert version 7. Τα πειράματα τυχαιοποιήθηκαν για να μεγιστοποιηθούν οι επιπτώσεις ανεξήγητης διακύμανσης των μεταβλητών στις παρατηρούμενες αποκρίσεις.

**Πίνακας 3.4:** Πειραματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών.

Independent Variables	Code Units	Coded Variable Level		
		-1	0	1
Extraction temperature (°C)	X1	40	60	80
Extraction time (min)	X2	10	50	90
Microwave power (W)	X3	2000	4000	6000
Ratio of PP to water (%)	X4	10	25	40

### **3.4.3. Στατιστική ανάλυση διακύμανσης και εκτίμηση των εξισώσεων των προβλεπόμενων μοντέλων.**

Η στατιστική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης των πειραματικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό Design-Expert (version12) και ακολουθώντας μια μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης. Οι εξισώσεις επιφανειακής απόκρισης προέκυψαν από την ανάλυση ANOVA, συσχετίζοντας τις μετρούμενες επιδόσεις και τις βιοδραστικές παραμέτρους με τις ανεξάρτητες μεταβλητές εκχύλισης. Το ίδιο λογισμικό χρησιμοποιήθηκε επίσης για την πρόβλεψη των βέλτιστων τιμών του TFC και IC<sub>50</sub> της μεθόδου ABTS.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα διαγράμματα 4.1 έως 4.29 παρουσιάζεται η εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το κάθε εκχύλισμα που προέκυψε από διαφορετικές συνθήκες ισχύος μικροκυμάτων, θερμοκρασίας εκχύλισης, χρόνου εκχύλισης και αναλογίας όγκου διαλύτη (νερού) ανά γραμμάριο πυρήνα του αβοκάντο. Στα εκχυλίσματα όλων των συνθηκών υπήρξε δοσοεξαρτώμενη εξουδετέρωση της ρίζας ABTS. Από τα διαγράμματα υπολογίστηκαν για το εκχύλισμα κάθε συνθήκης οι τιμές IC<sub>50</sub> που φαίνονται στον Πίνακα 4.1. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτικού εκχυλίσματος. Οι τιμές IC<sub>50</sub> κυμαινότανε από 2,27 (συνθήκη 12) έως 9,10 μl/ml (συνθήκη 17).

Επίσης, στο κάθε εκχύλισμα προσδιορίστηκε το ποσό των ολικών φλαβονοειδών το οποίο παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1. Οι τιμές των φλαβονοειδών κυμαινότανε από πολύ μικρές που δεν ήταν ανιχνεύσιμες με τη συγκεκριμένη μέθοδο (συνθήκες 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 13, 15, 16, 20, 24, 25, 26) έως 21,3 μg/ml (συνθήκη 22).

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης το οποίο ήταν και ο βασικός σκοπός της μελέτης, ώστε να υπάρχει είτε υψηλή αντιοξειδωτική δράση, είτε υψηλό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή είτε και τα δύο έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με το στατιστικό μοντέλο επιφάνειας-απόκρισης Box-Behnken με το οποίο άλλωστε προσδιορίστηκαν και οι συνθήκες των 29 πειραμάτων εκχύλισης.

Στο διάγραμμα 4.30 παρουσιάζονται οι επιφάνειες απόκρισης (3D) με contour-plots (2D) στα οποία παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στο ολικό ποσό των φλαβονοειδών (TFC).

Στο διάγραμμα 4.31 παρουσιάζονται οι επιφάνειες απόκρισης (3D) με contour-plots (2D) στα οποία παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στις τιμές IC<sub>50</sub> της μεθόδου ABTS.

Στον Πίνακα 4.2 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση ANOVA προκειμένου να προσδιοριστεί η στατιστική σημαντικότητα του μοντέλου για την αριστοποίηση του μοντέλου για την αντιοξειδωτική δράση με βάση τη μέθοδο ABTS. Το μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p = 0,0006$ ).

Στον Πίνακα 4.3 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση ANOVA προκειμένου να προσδιοριστεί η στατιστική σημαντικότητα του μοντέλου για την αριστοποίηση του μοντέλου για τις τιμές ολικών φλαβονοειδών. Το μοντέλο ήταν σημαντικό στατιστικά ( $p < 0,0001$ ).

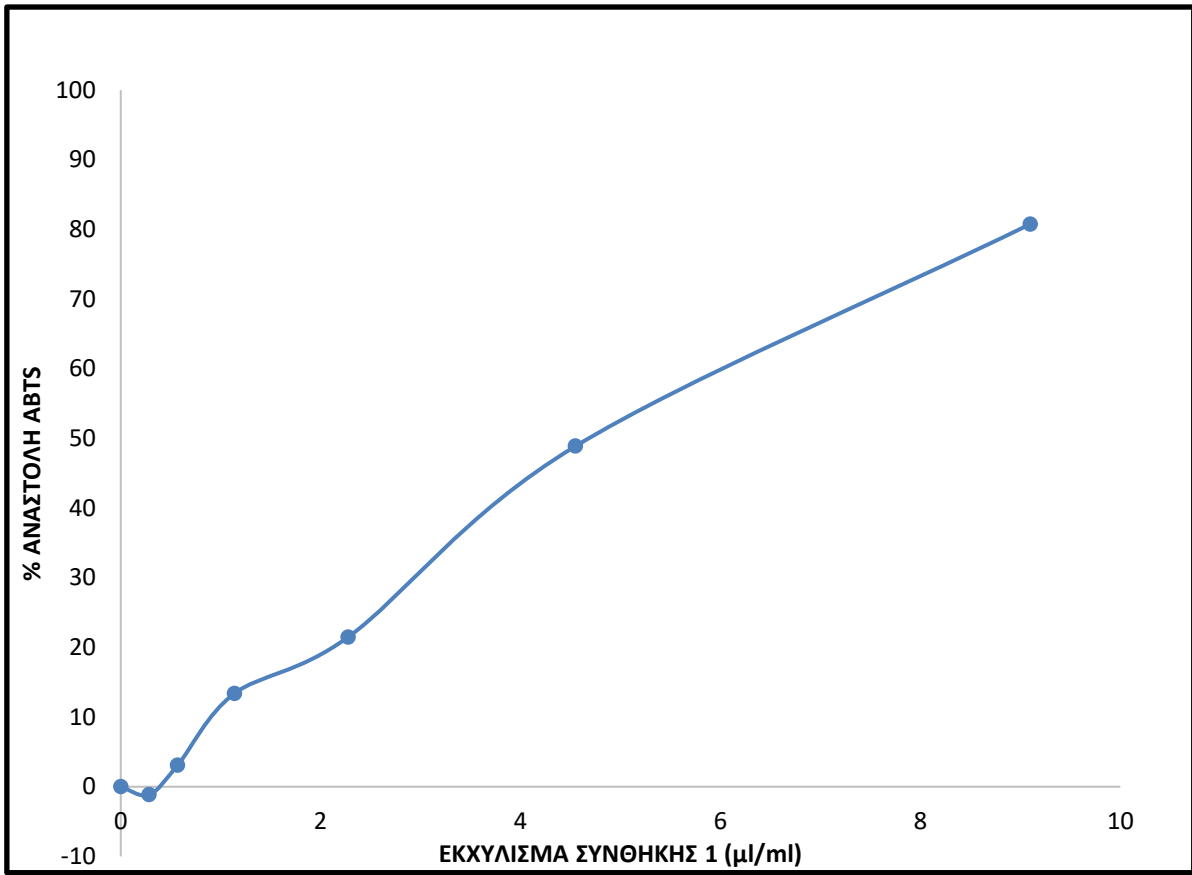
Επίσης, έγινε η κατασκευή των διαγραμμάτων κανονικής κατανομής (Δ.Κ.Κ. Normal probability plot) προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι υπολογιζόμενες τιμές από το μοντέλο προέρχονται από έναν πληθυσμό με κανονική κατανομή, ώστε να επαληθευτεί η σημαντικότητα των παραχθέντων μοντέλων. Στο διάγραμμα 4.32 φαίνεται το Διάγραμμα Κανονικής Κατανομής του μοντέλου για την επίτευξη εκχυλισμάτων με υψηλή αντιοξειδωτική δράση με βάση τη μέθοδο ABTS. Δεν υπήρχε ουσιαστική απόκλιση των σημείων από την ευθεία του διαγράμματος, που σημαίνει ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις μετρηθέντων τιμών από τις προβλεπόμενες του μοντέλου. Στο διάγραμμα 4.33 φαίνεται το Διάγραμμα Κανονικής Κατανομής του μοντέλου για την επίτευξη εκχυλισμάτων με υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών. Σε αυτή την περίπτωση δεν υπήρχε μεγάλη απόκλιση των σημείων από την ευθεία του διαγράμματος που σημαίνει ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις μετρηθέντων τιμών από τις προβλεπόμενες του μοντέλου. Και για τις δύο περιπτώσεις το μοντέλο ήταν επιτυχημένο.

Στον Πίνακα 4.4 φαίνονται οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι συνθήκες αυτές είναι θερμοκρασία  $40,83^{\circ}\text{C}$ , χρόνος εκχύλισης 10,89 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 2278,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 39,93ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,3  $\mu\text{l/ml}$ .

Στον Πίνακα 4.4 φαίνονται οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών. Οι συνθήκες αυτές είναι θερμοκρασία  $76,66^{\circ}\text{C}$ , χρόνος εκχύλισης 69,64 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 4097,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 10,07ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το TFC θα είναι 22,45  $\mu\text{g/ml}$ .

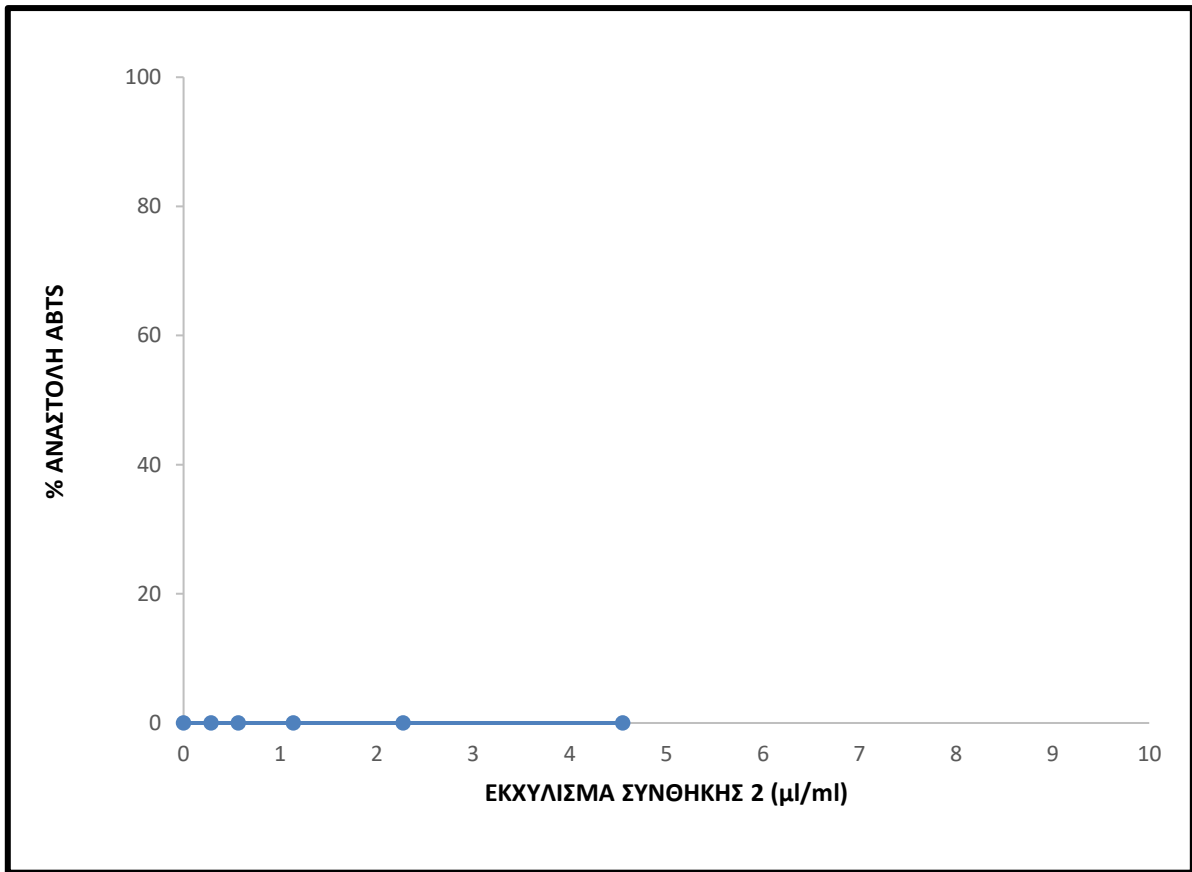
Στον Πίνακα 4.4 φαίνονται οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών και υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι συνθήκες αυτές είναι θερμοκρασία  $76,70^{\circ}\text{C}$ , χρόνος εκχύλισης 83,39 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 5973,18

W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 14,24 ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,7 μl/ml και το TFC 21,56 μg/ml.

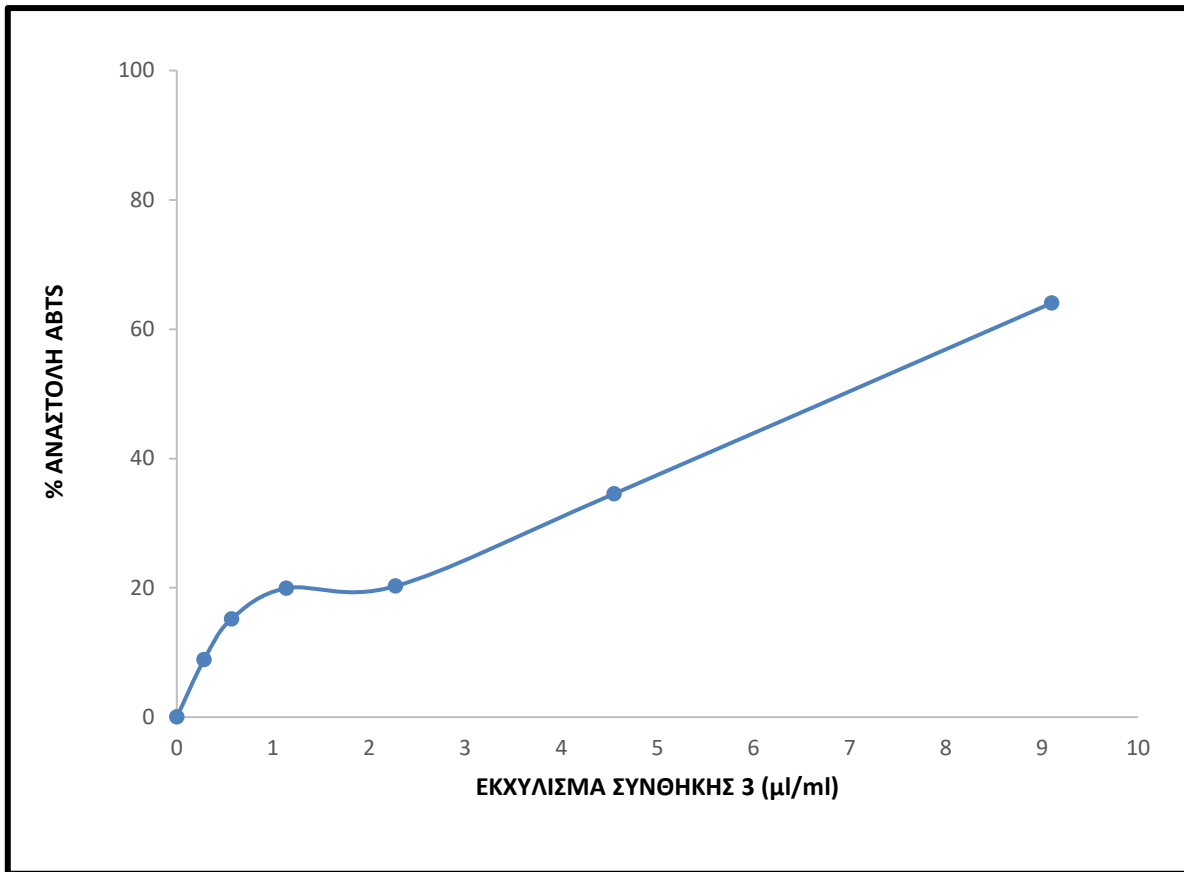


**Διάγραμμα 4.1:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από το εκχύλισμα της συνθήκης 1.

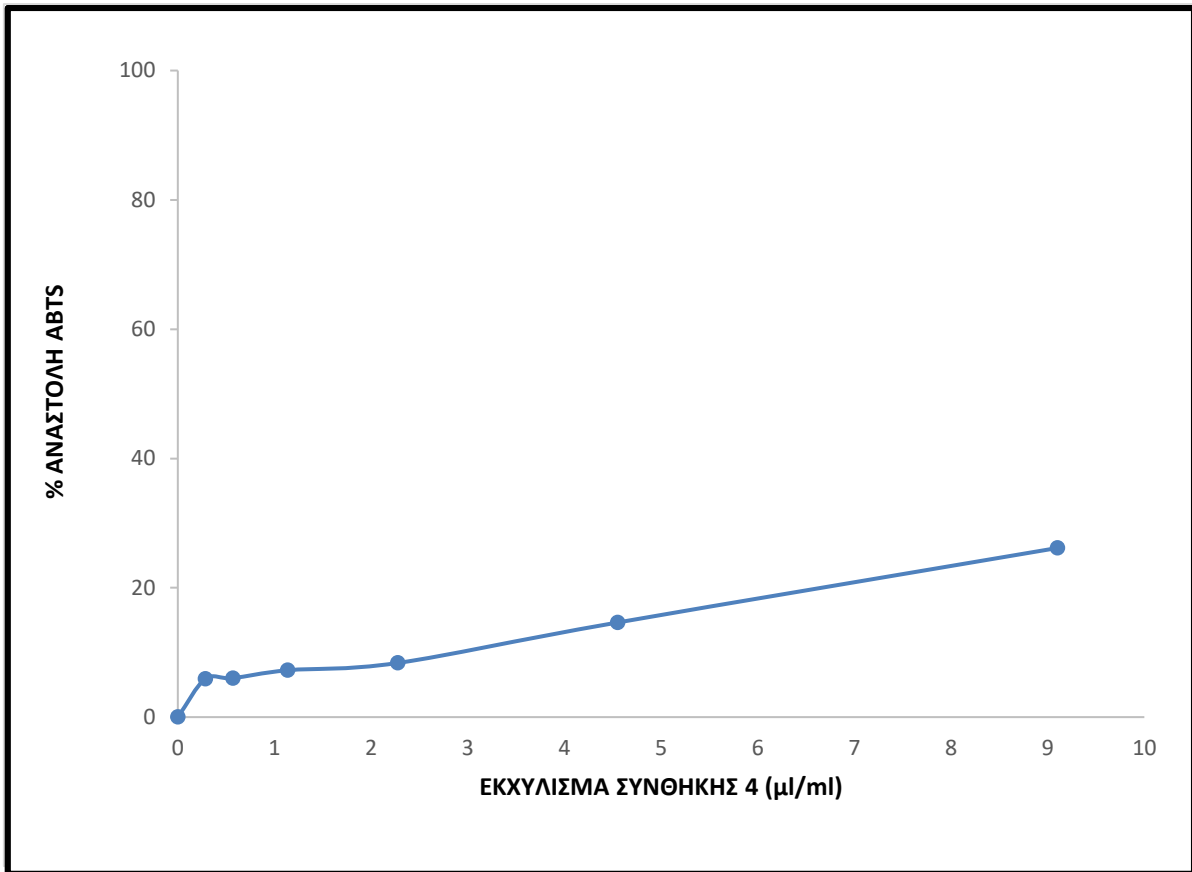




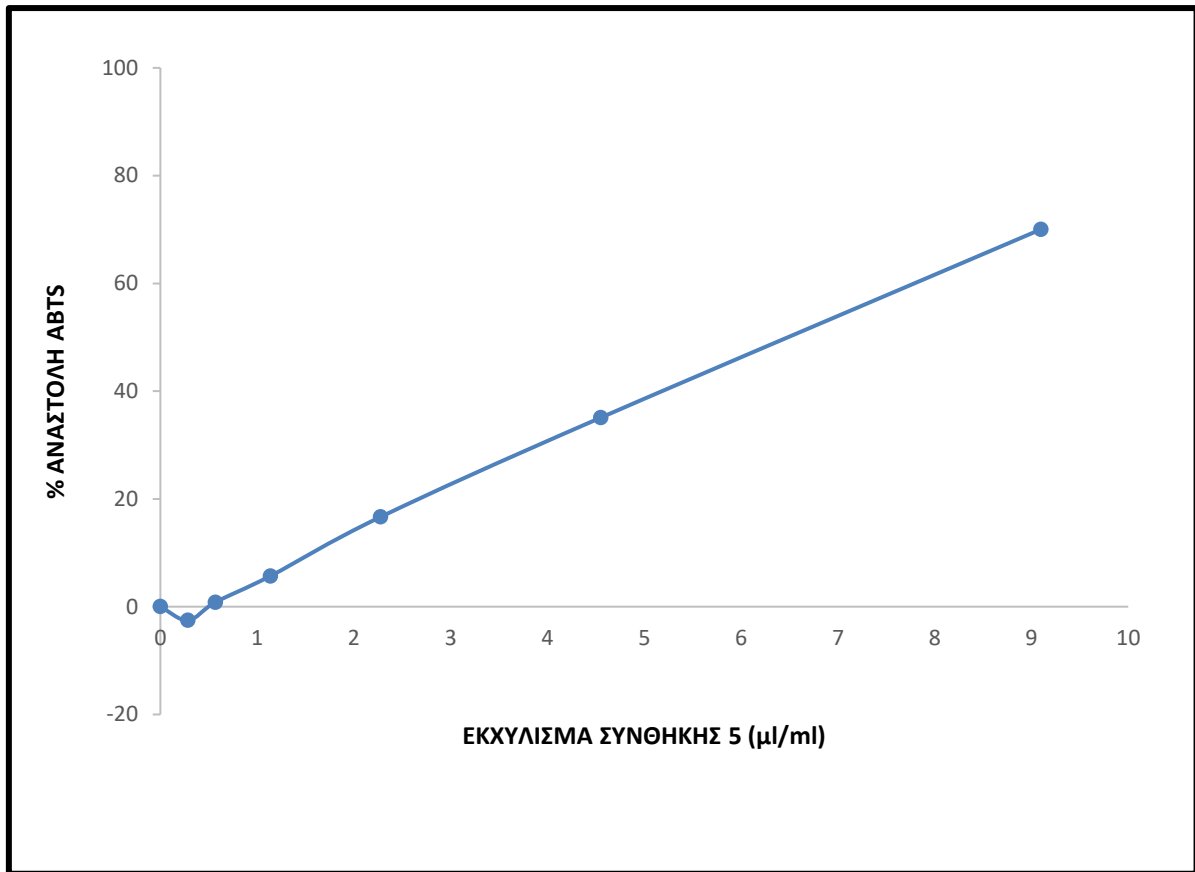
**Διάγραμμα 4.2:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 2.



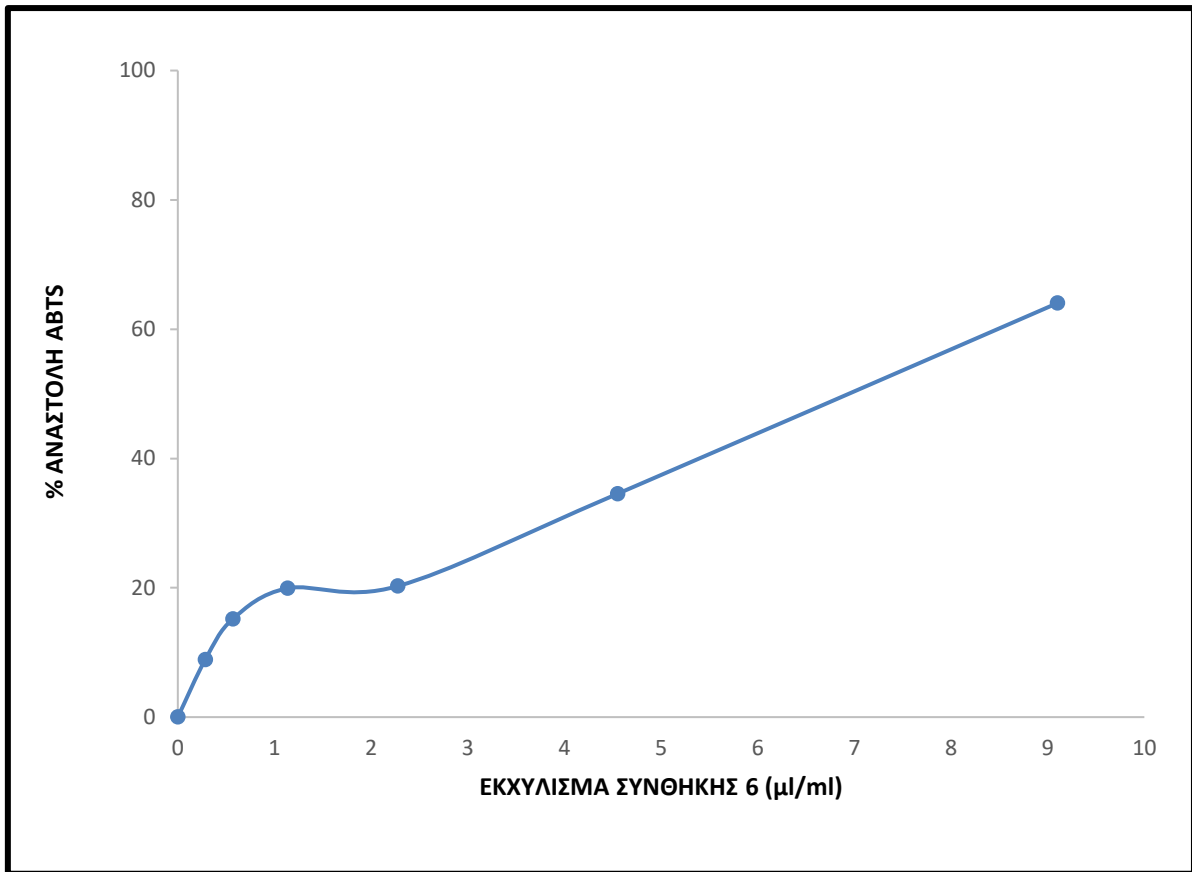
**Διάγραμμα 4.3:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από το εκχύλισμα της συνθήκης 3.



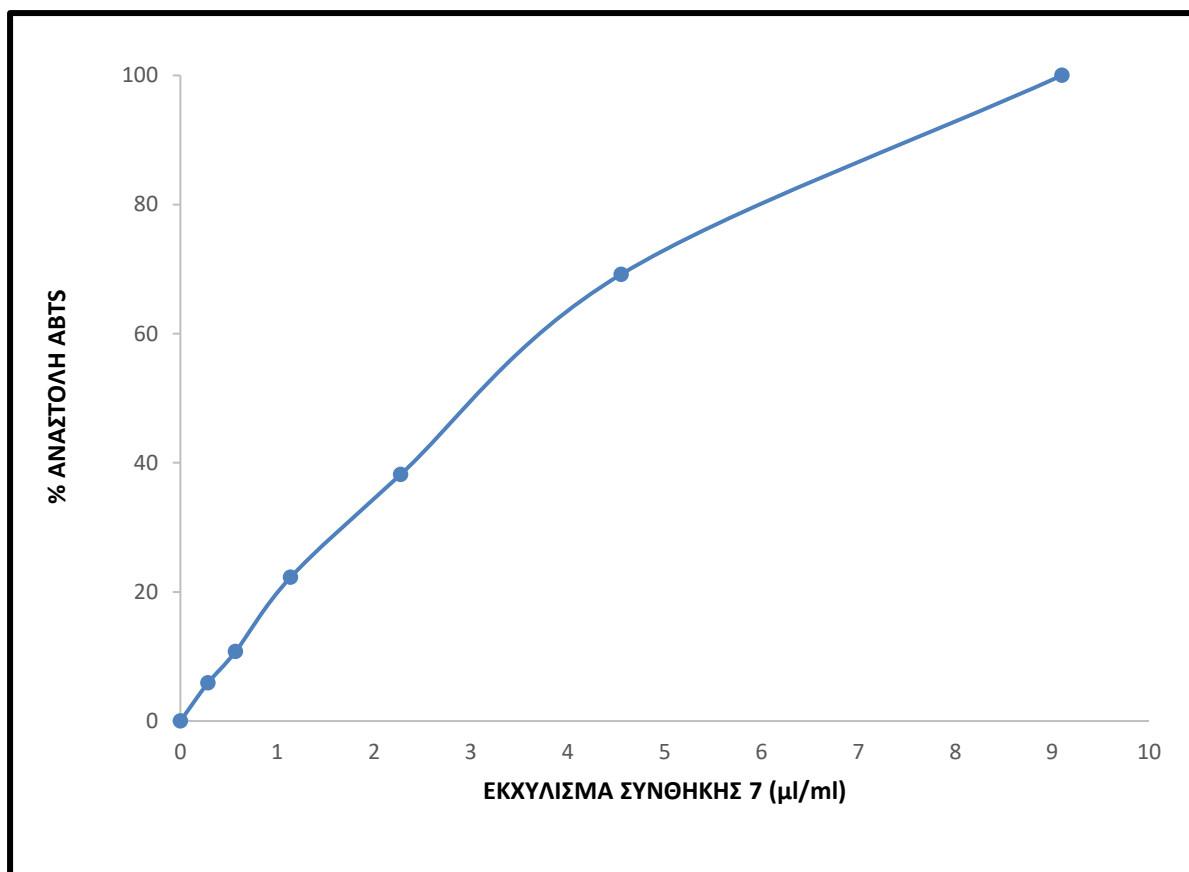
**Διάγραμμα 4.4:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 4.



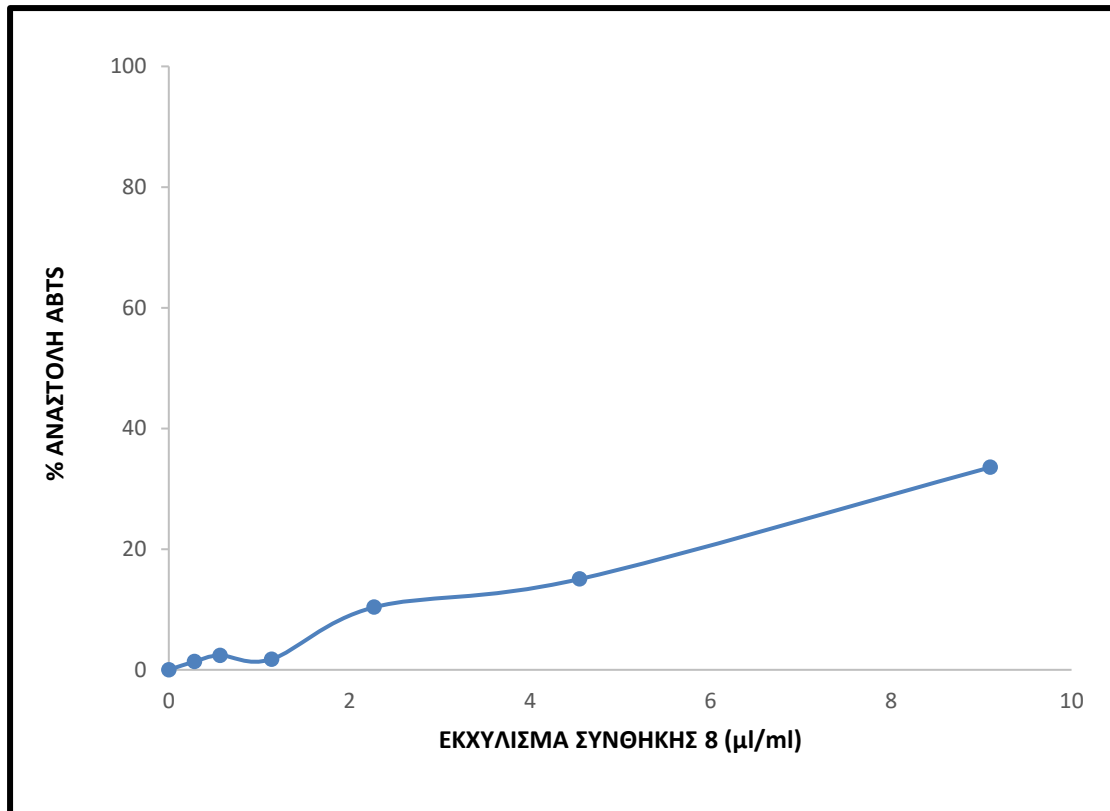
**Διάγραμμα 4.5:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 5.



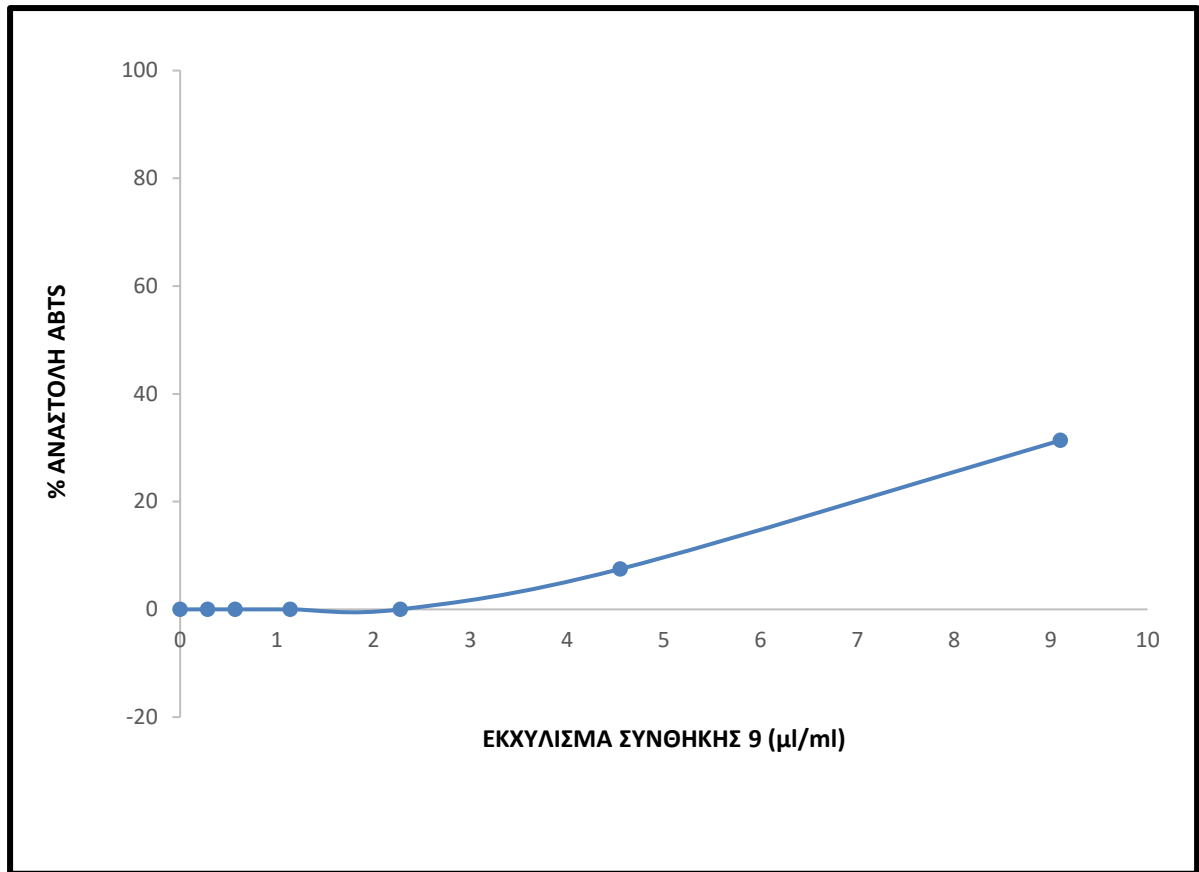
**Διάγραμμα 4.6:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από το εκχύλισμα της συνθήκης 6.



**Διάγραμμα 4.7:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 7.

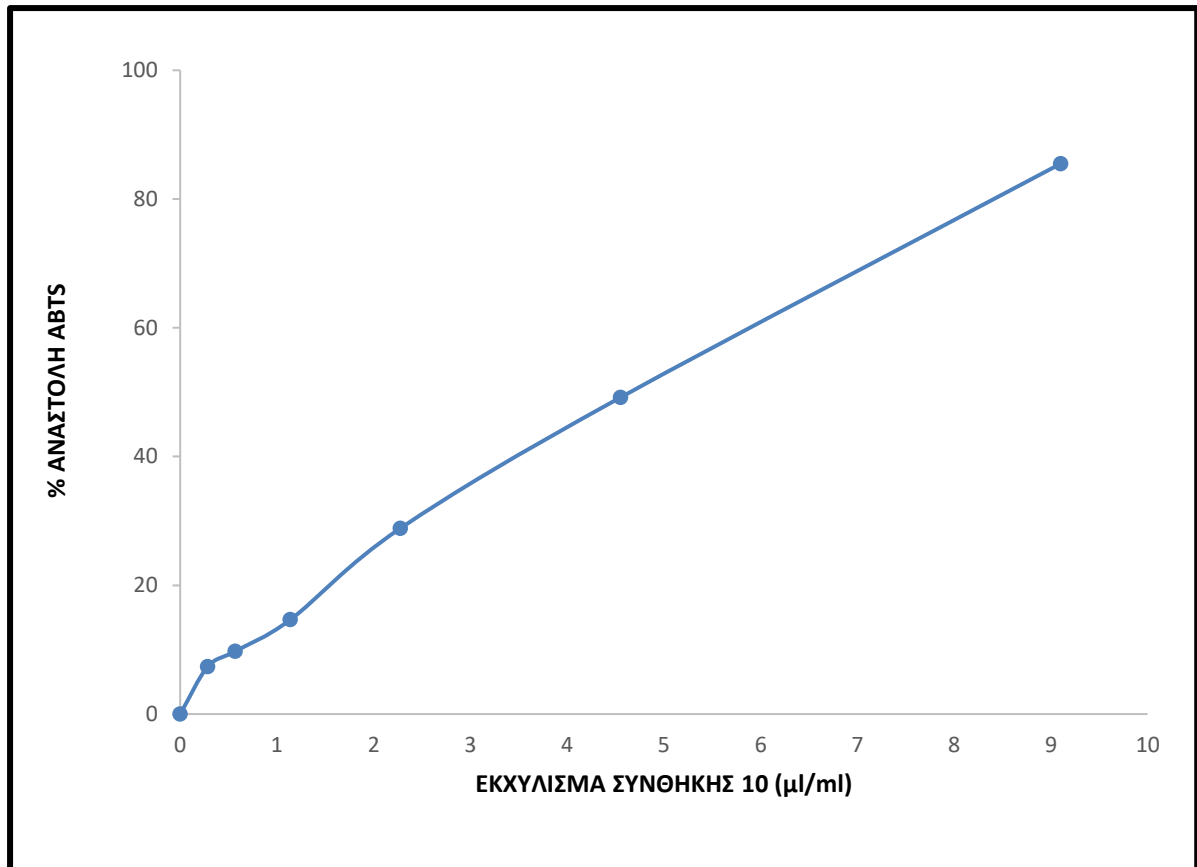


**Διάγραμμα 4.8:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 8.

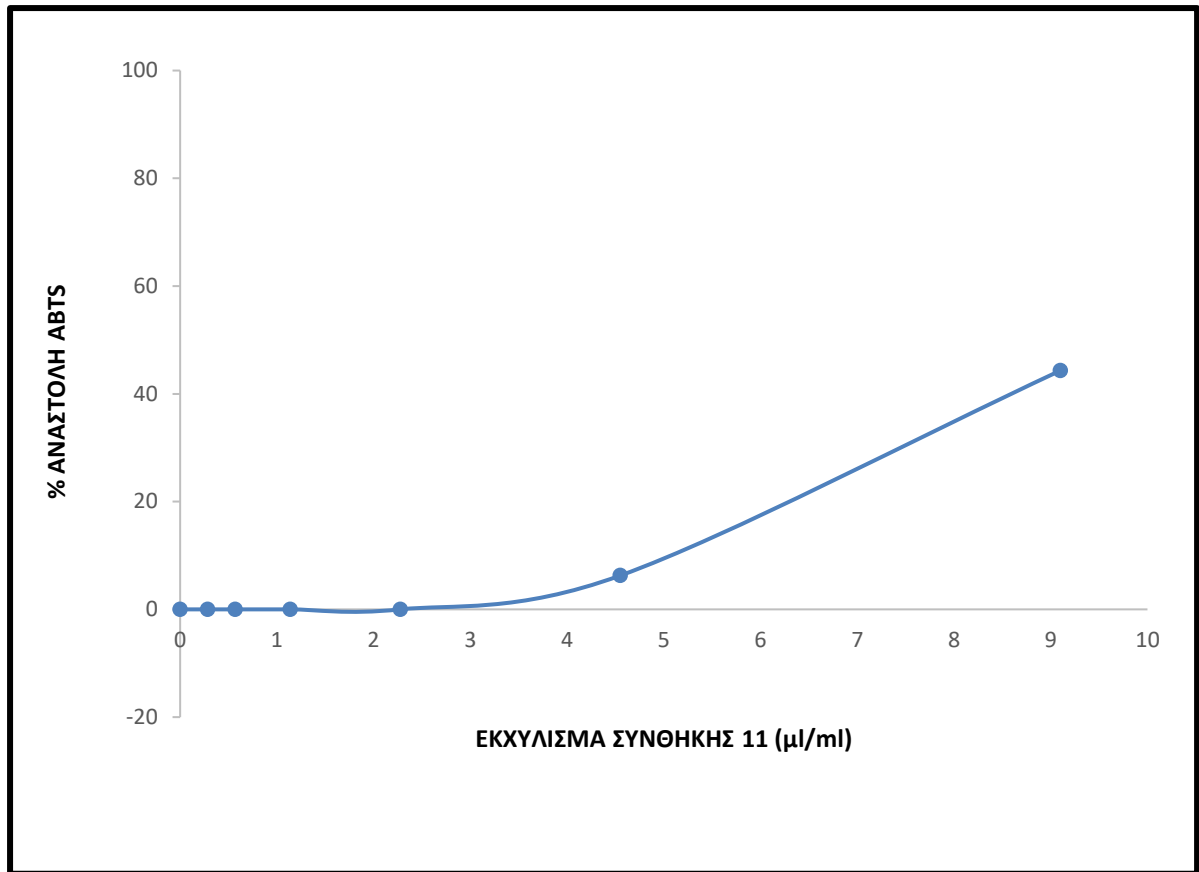


**Διάγραμμα 4.9:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤΣ από το εκχύλισμα της συνθήκης 9.

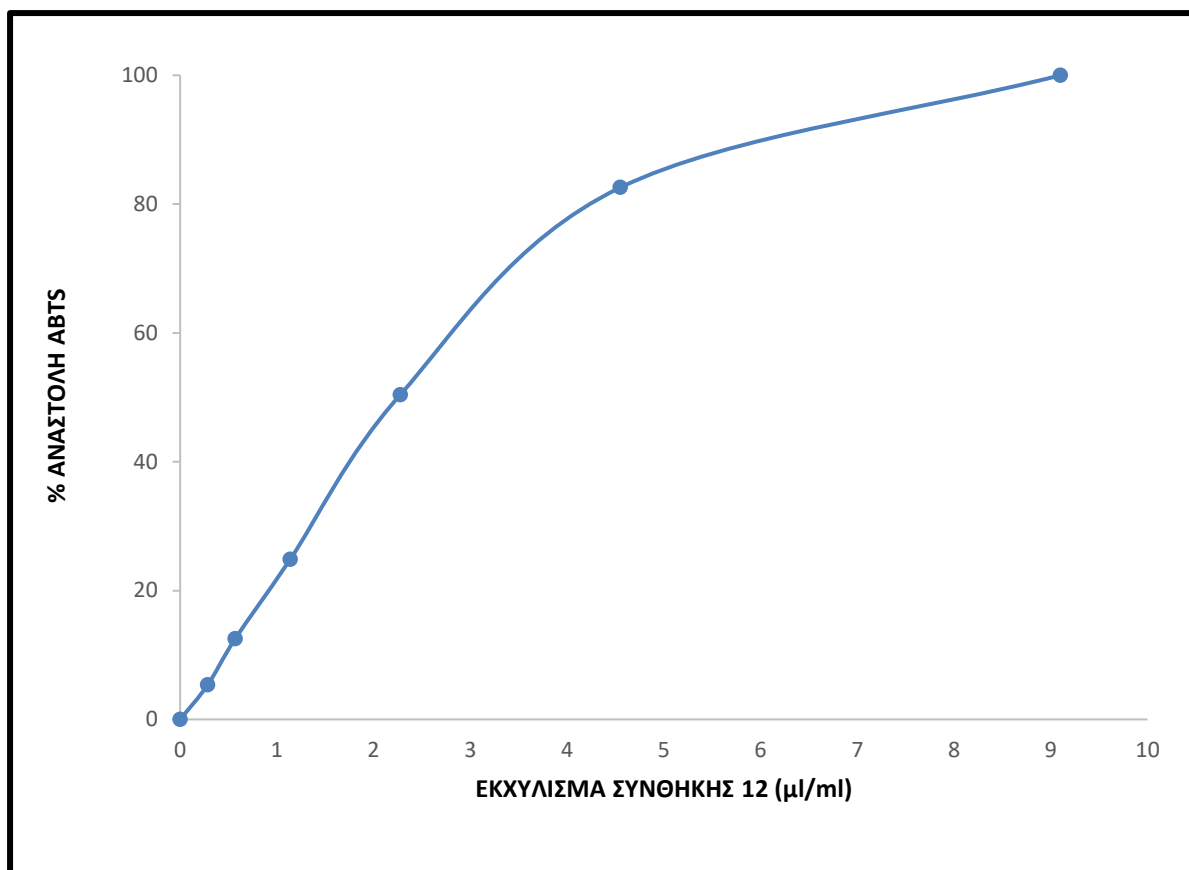




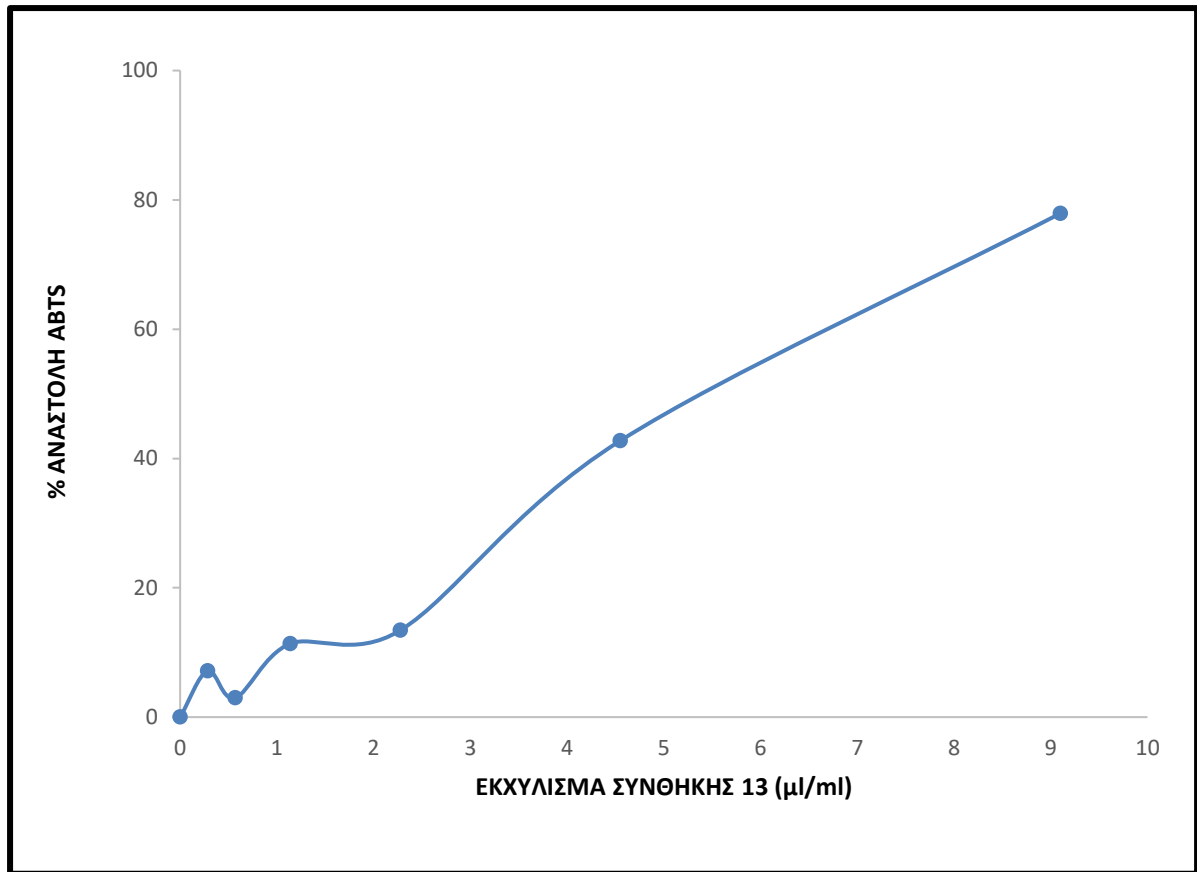
**Διάγραμμα 4.10:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 10



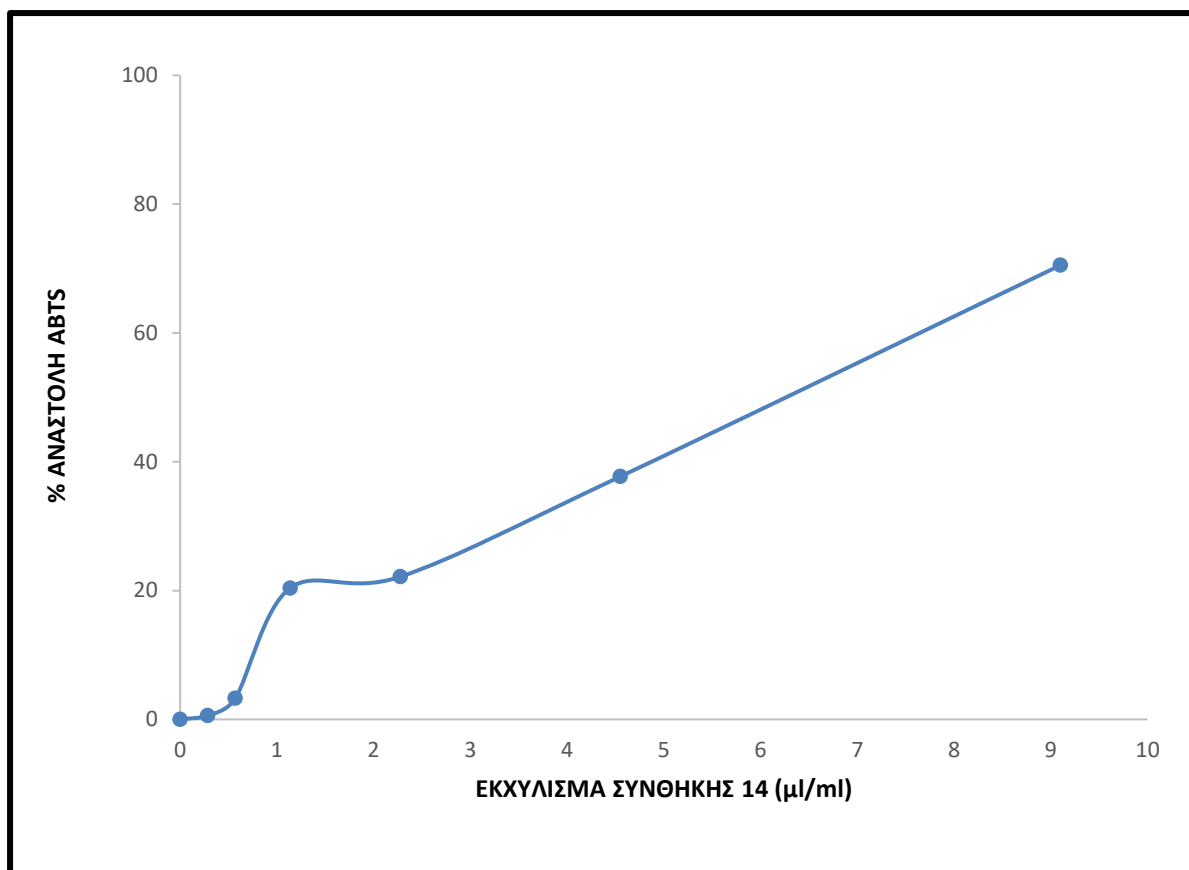
**Διάγραμμα 4.11:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 11.



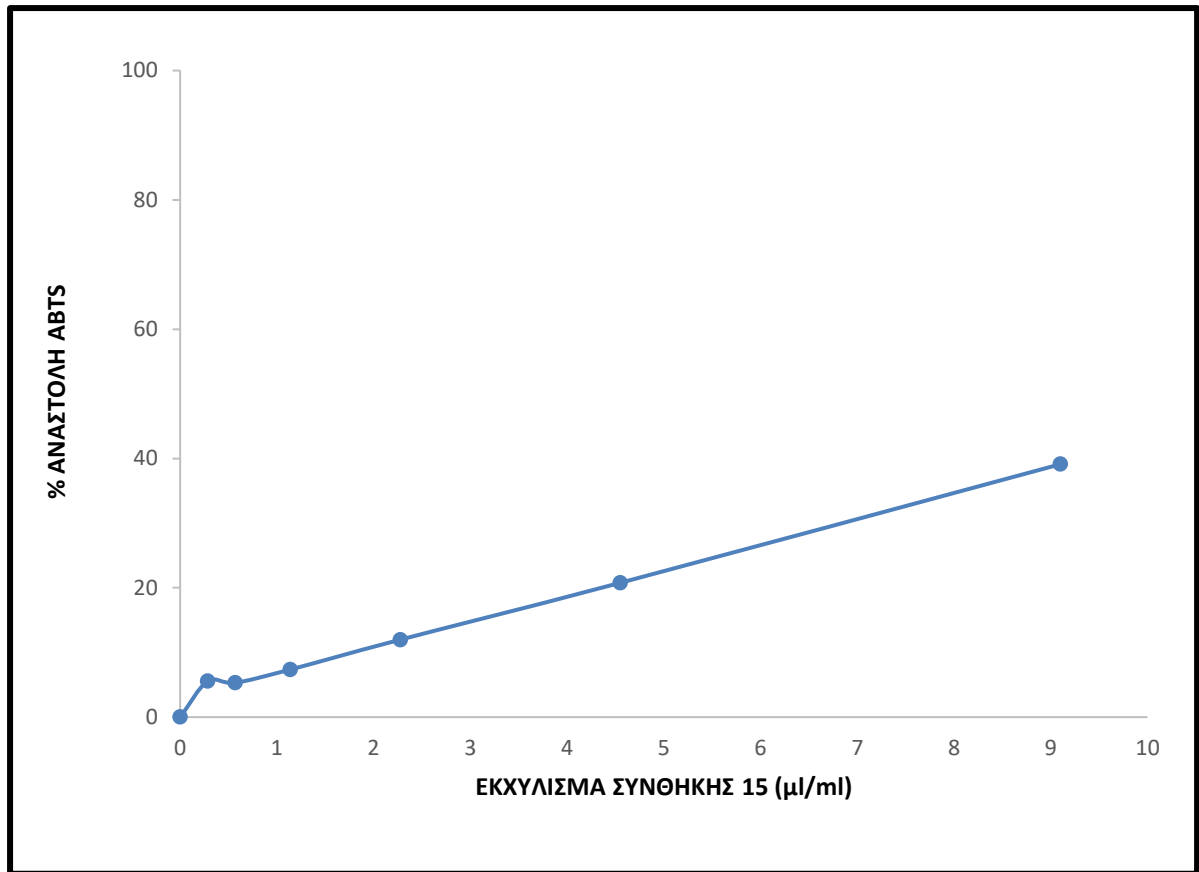
**Διάγραμμα 4.12:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 12.



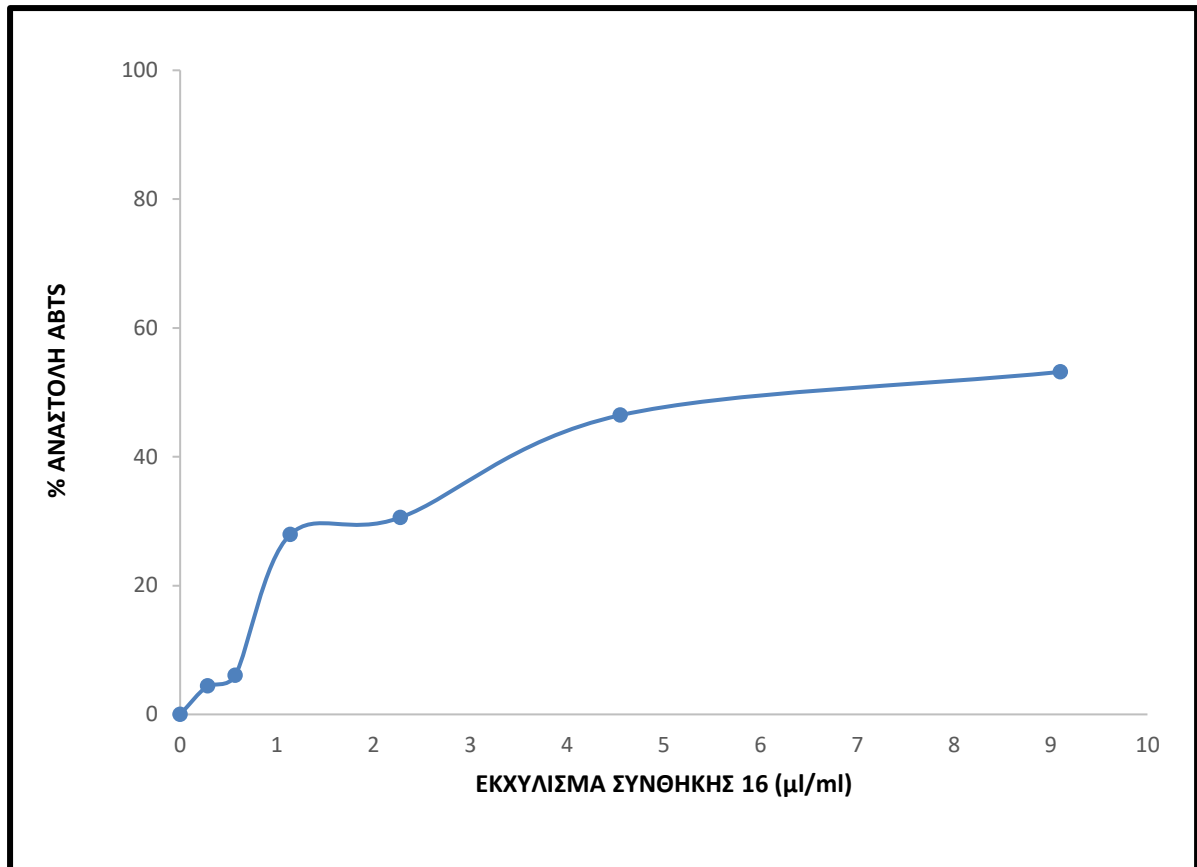
**Διάγραμμα 4.13:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 13.



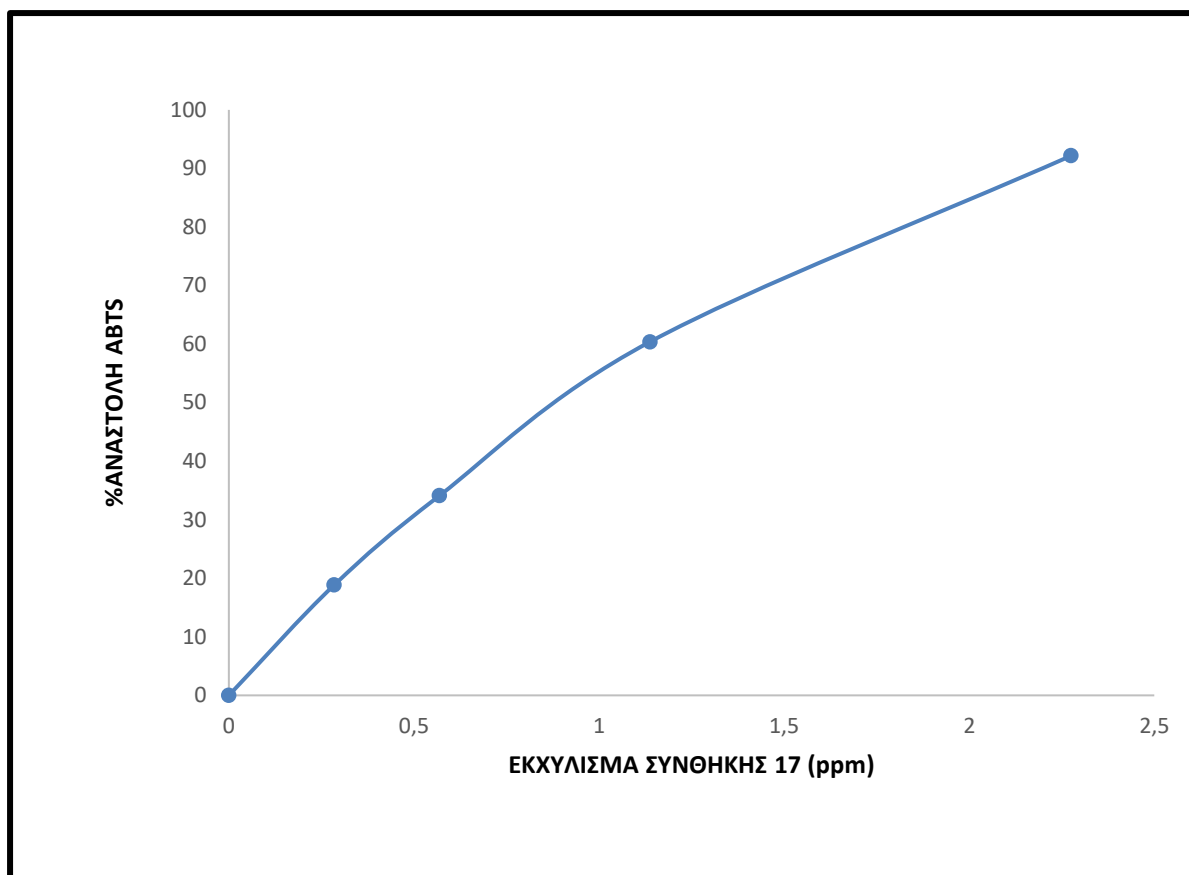
**Διάγραμμα 4.14.** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 14.



**Διάγραμμα 4.15:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 15.

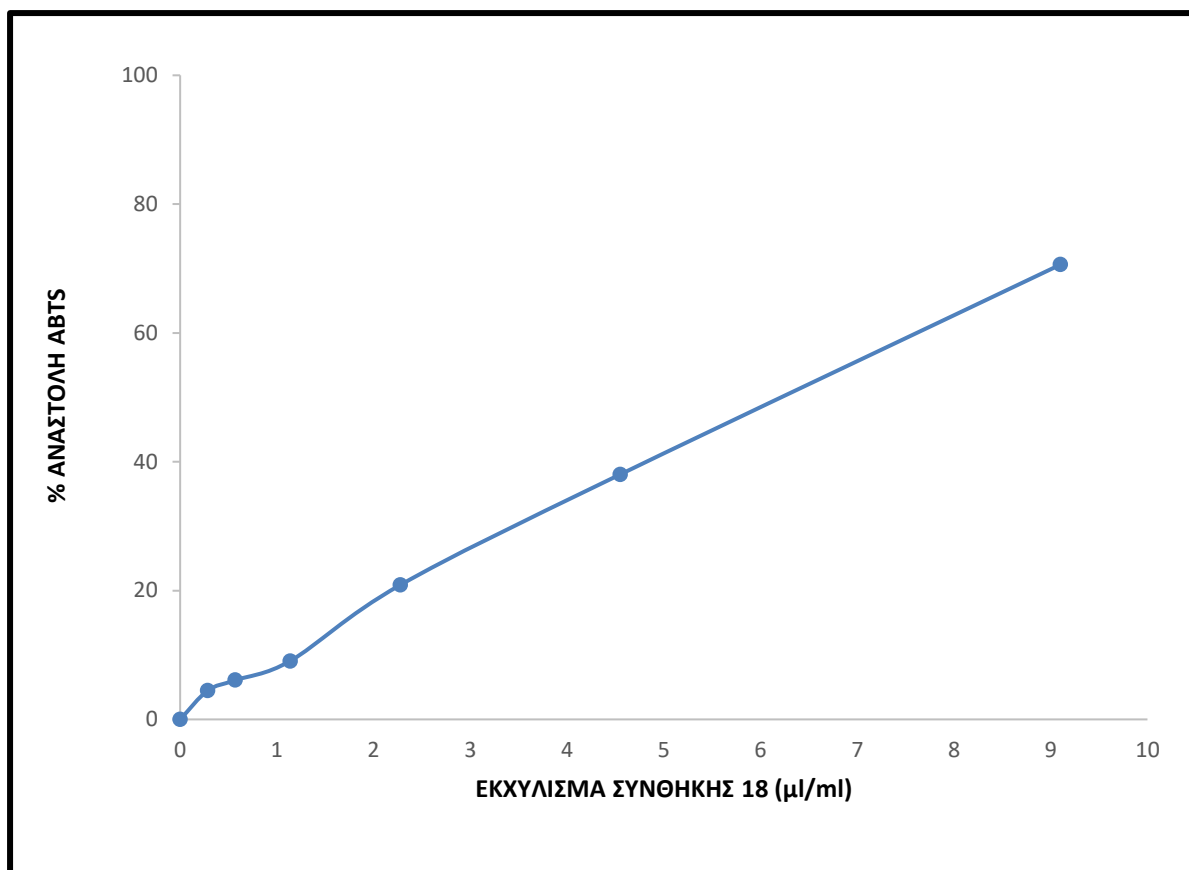


**Διάγραμμα 4.16:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 16.

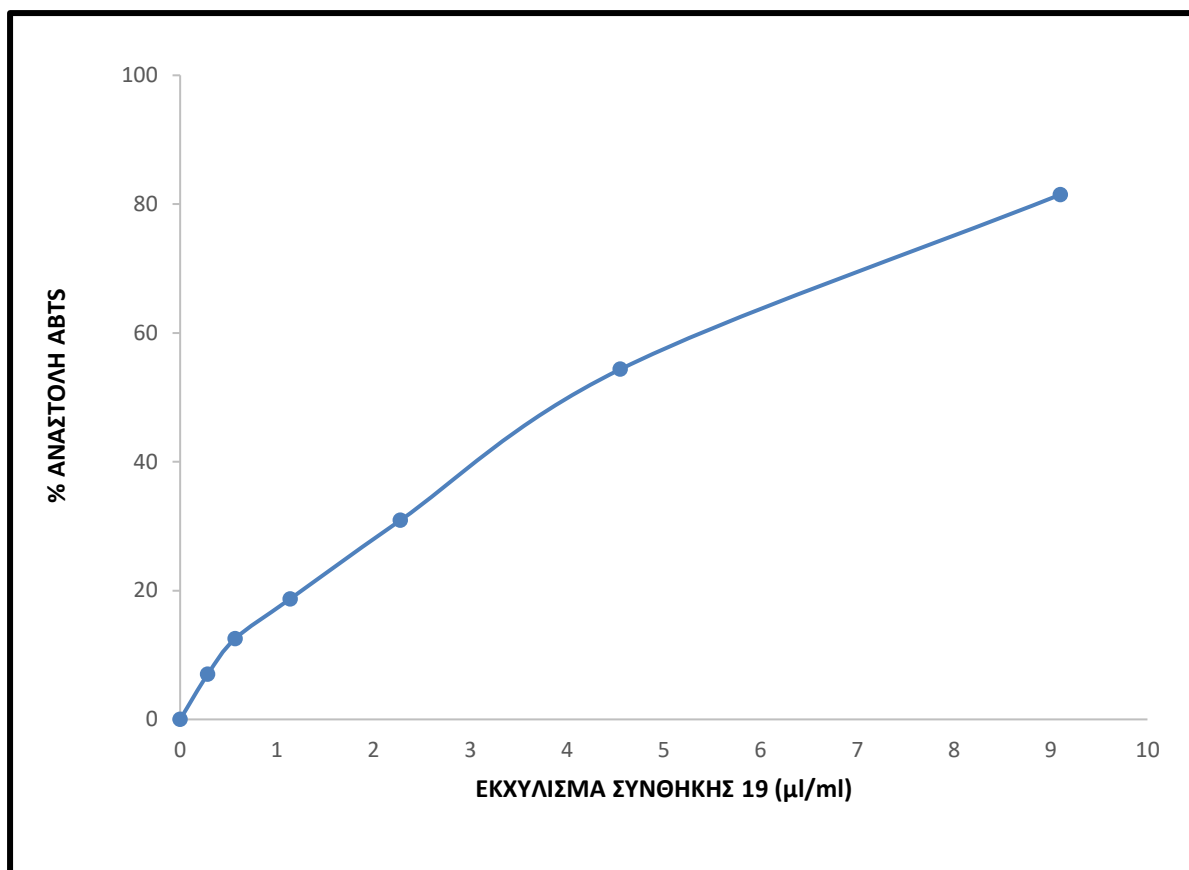


**Διάγραμμα 4.17:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 17.

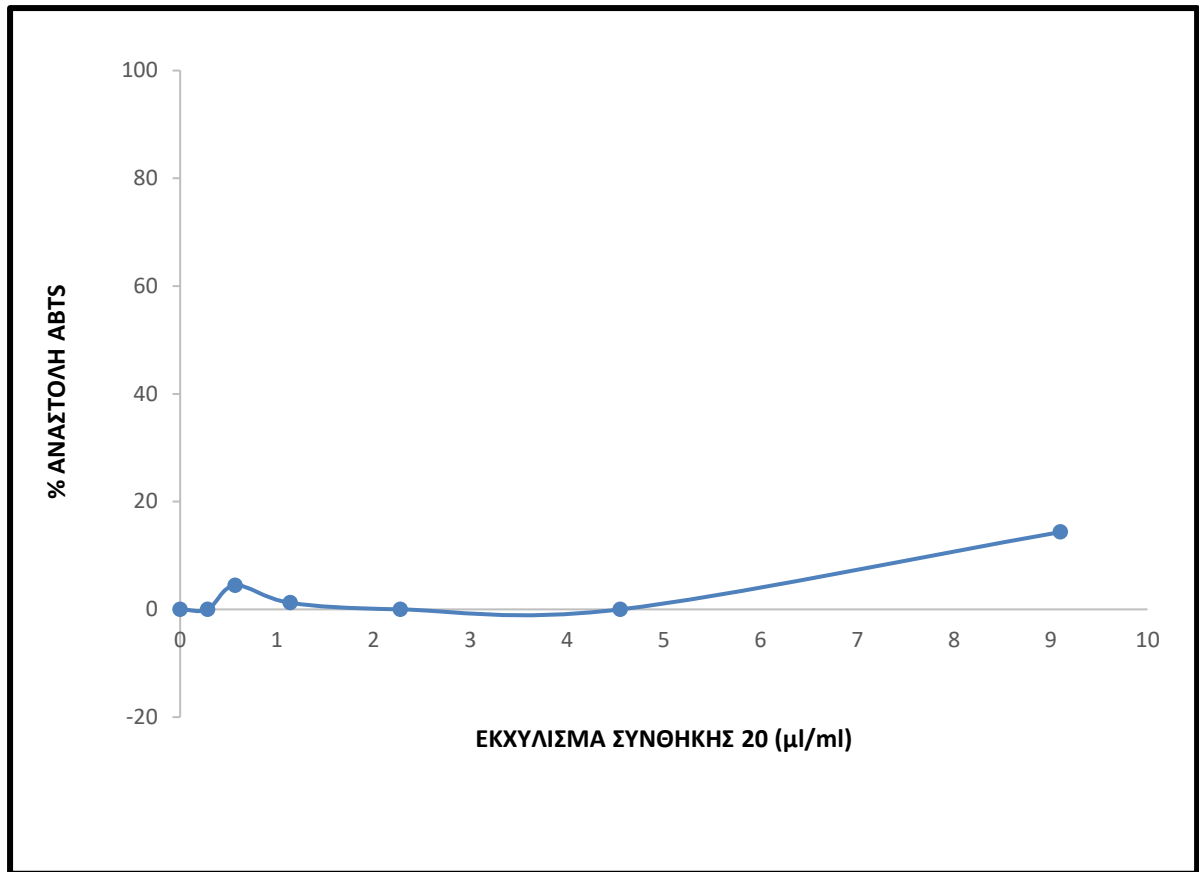




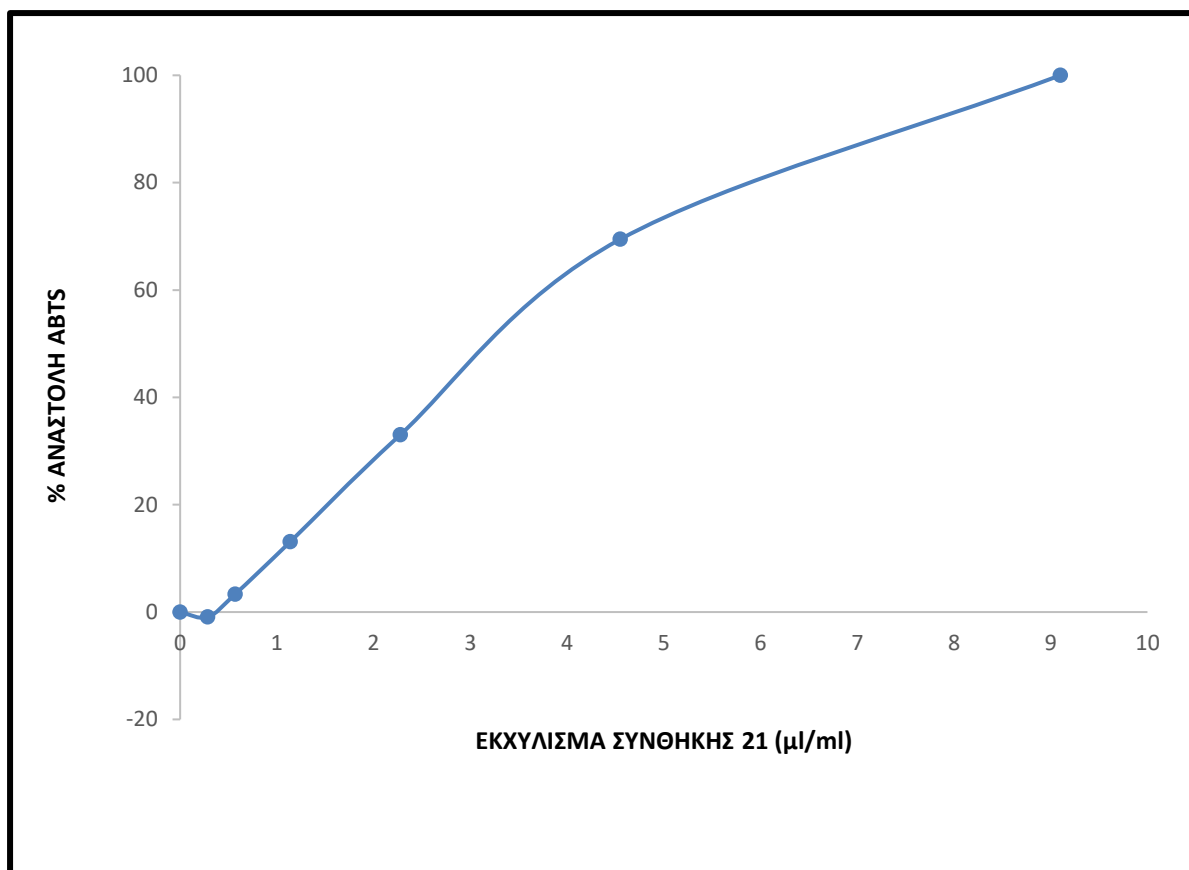
**Διάγραμμα 4.18:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από το εκχύλισμα της συνθήκης 18.



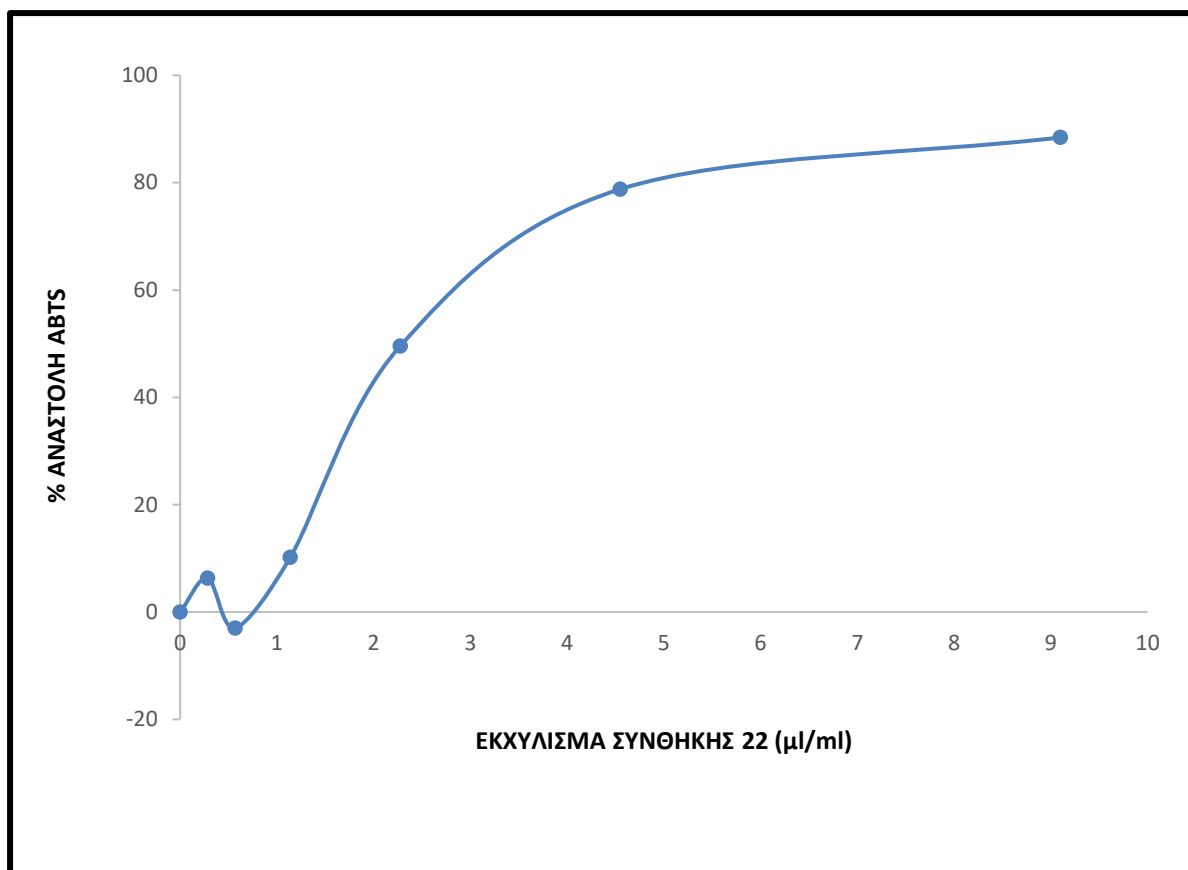
**Διάγραμμα 4.19:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 19.



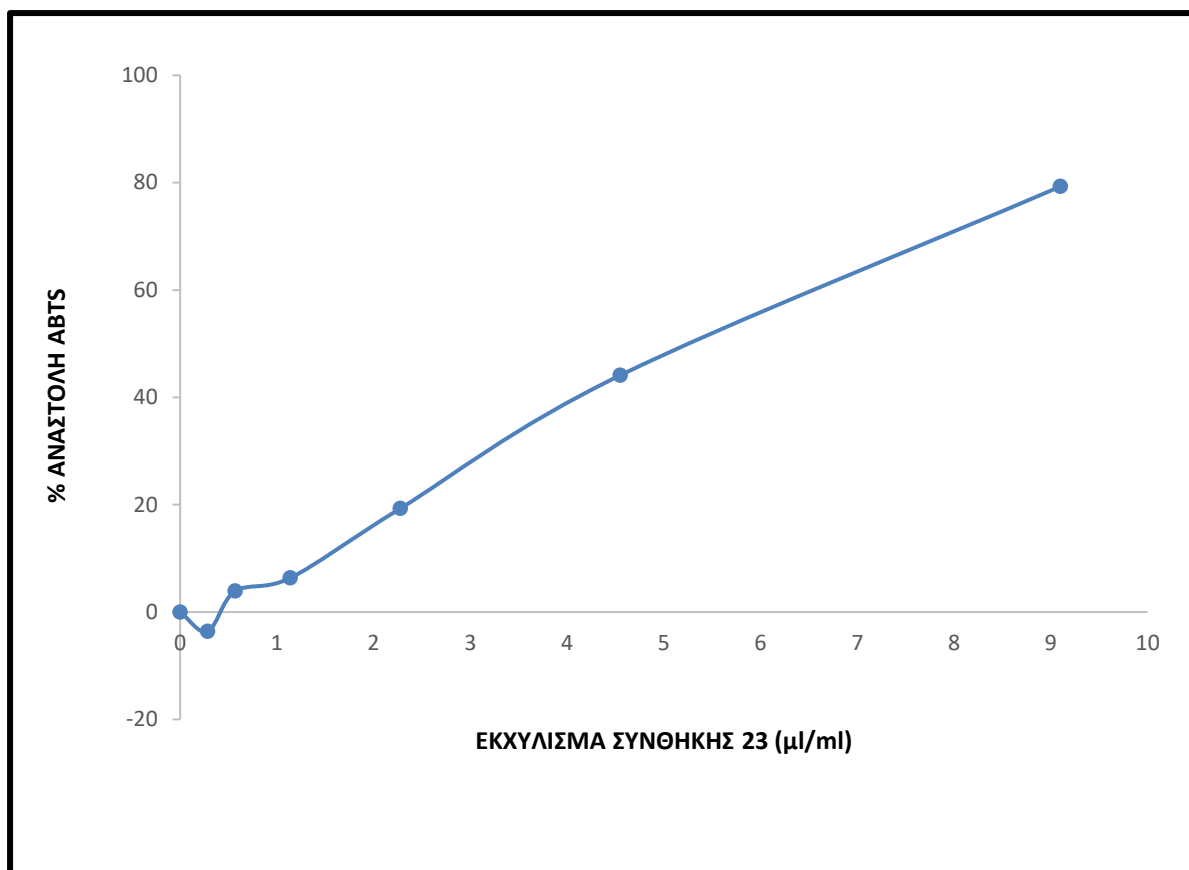
**Διάγραμμα 4.20:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 20.



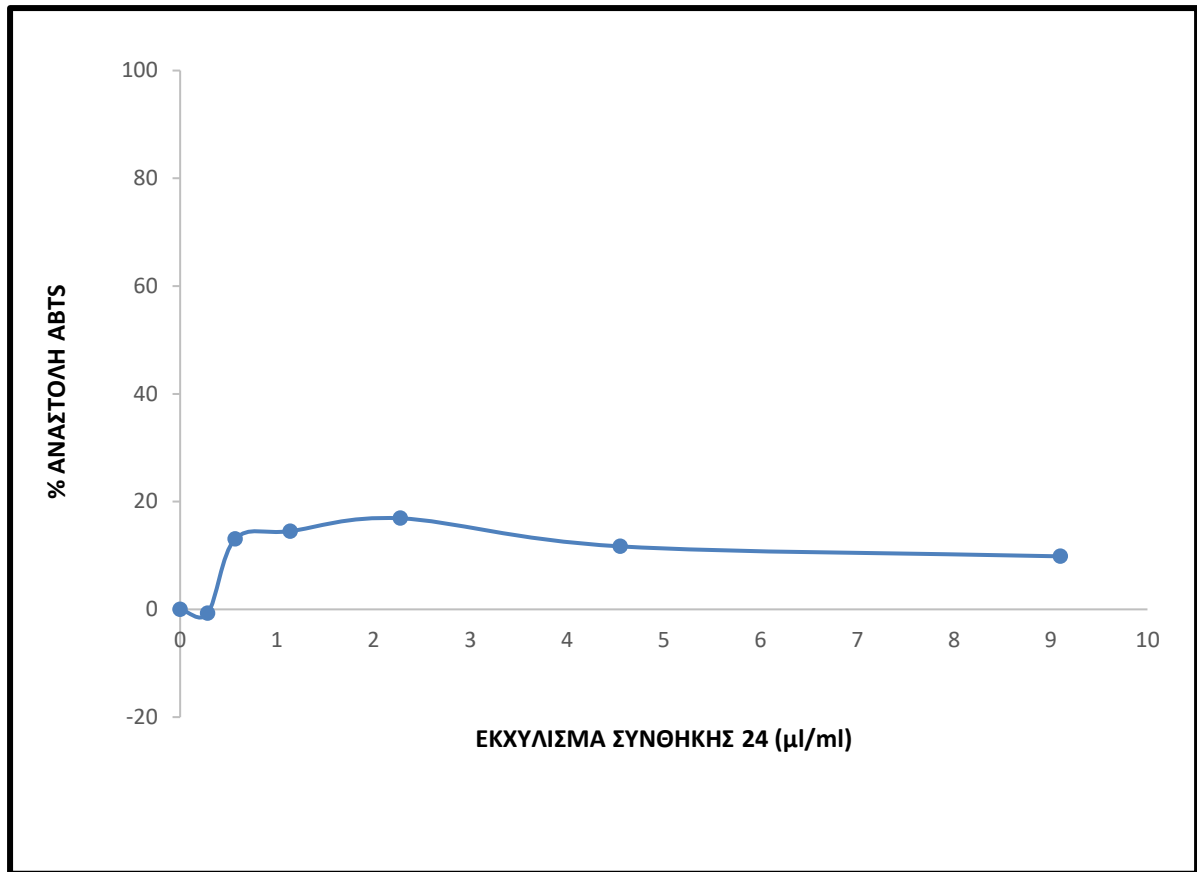
**Διάγραμμα 4.21:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 21.



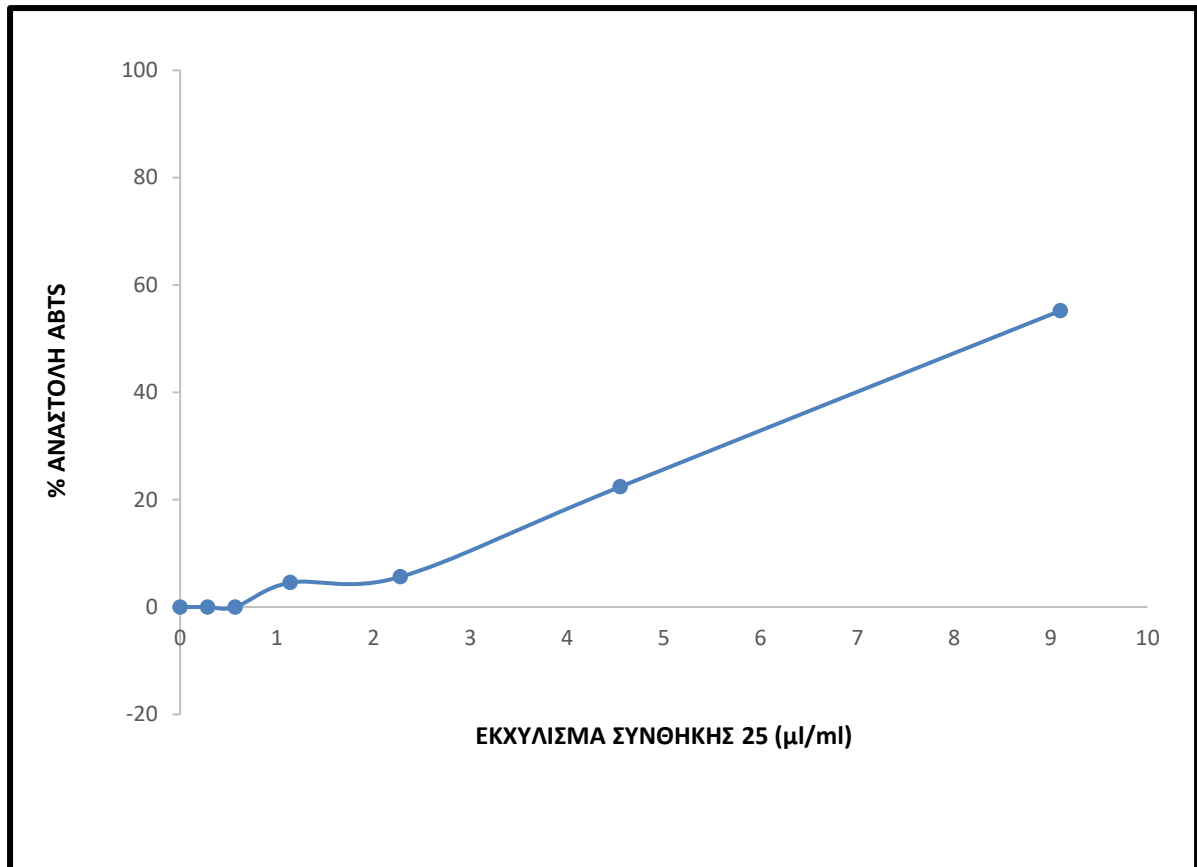
**Διάγραμμα 4.22:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 22.



**Διάγραμμα 4.23:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 23.

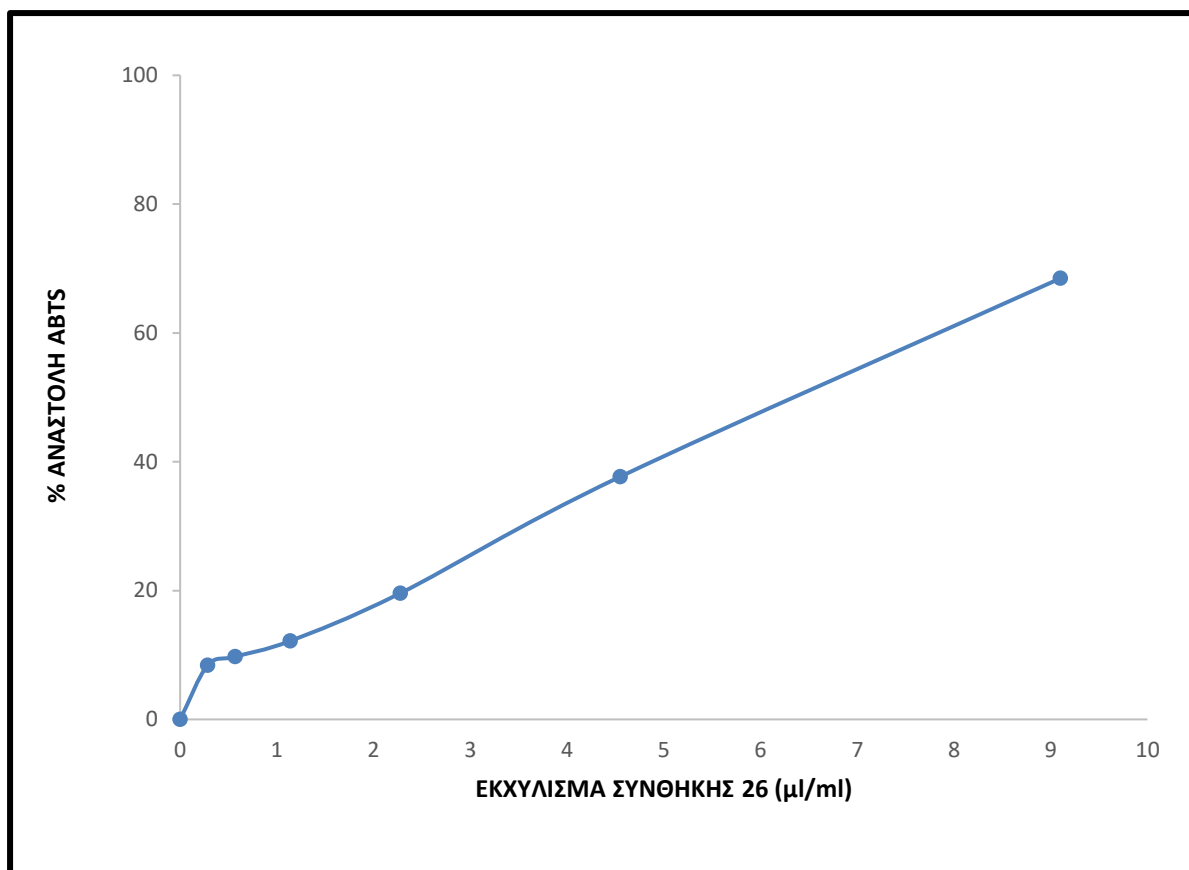


**Διάγραμμα 4.24:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 24.

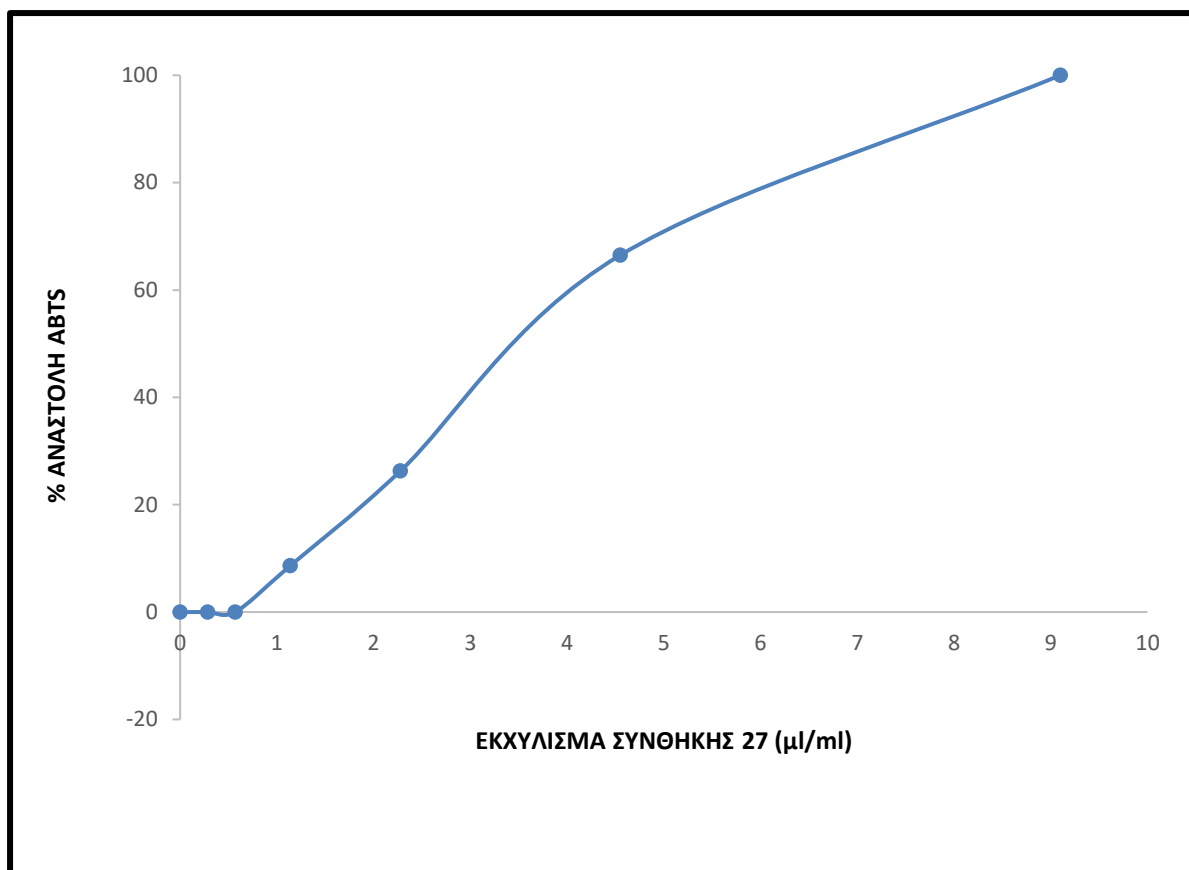


**Διάγραμμα 4.25:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 25.

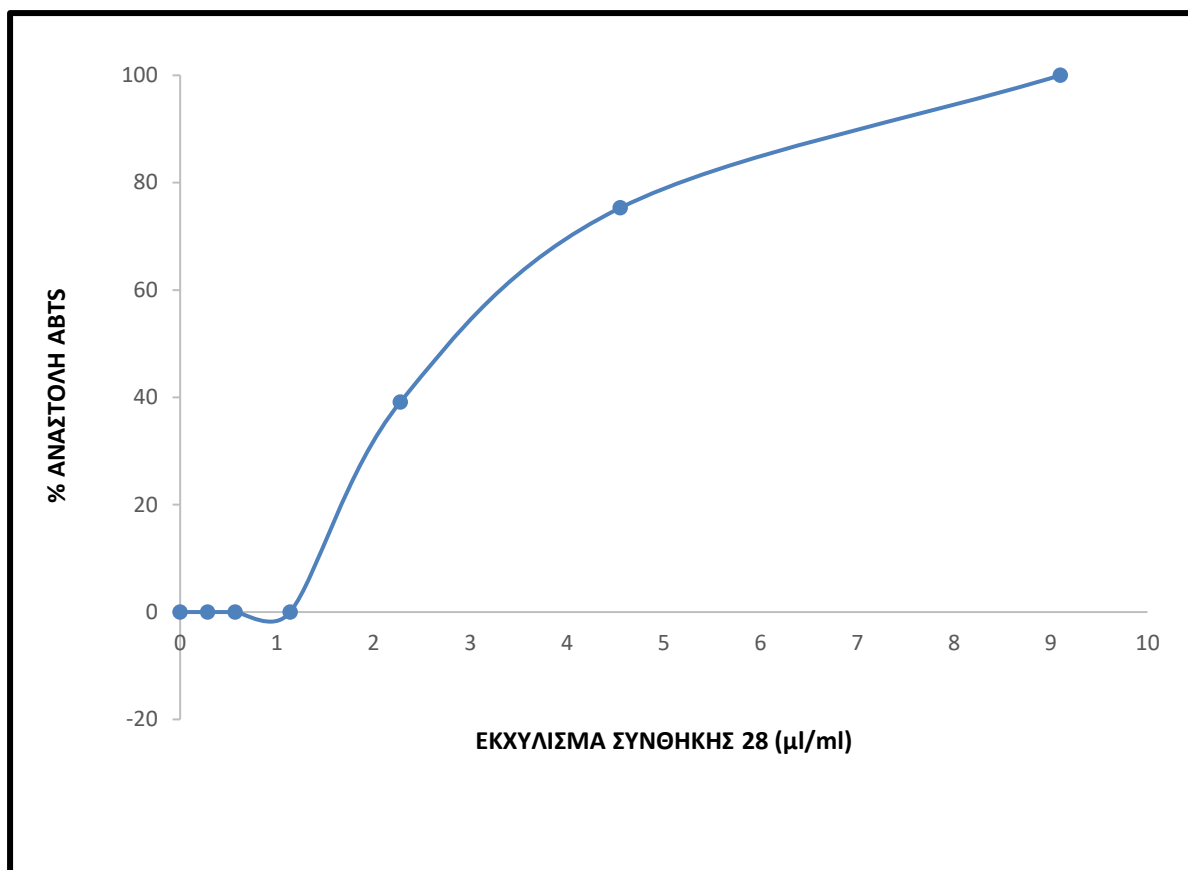




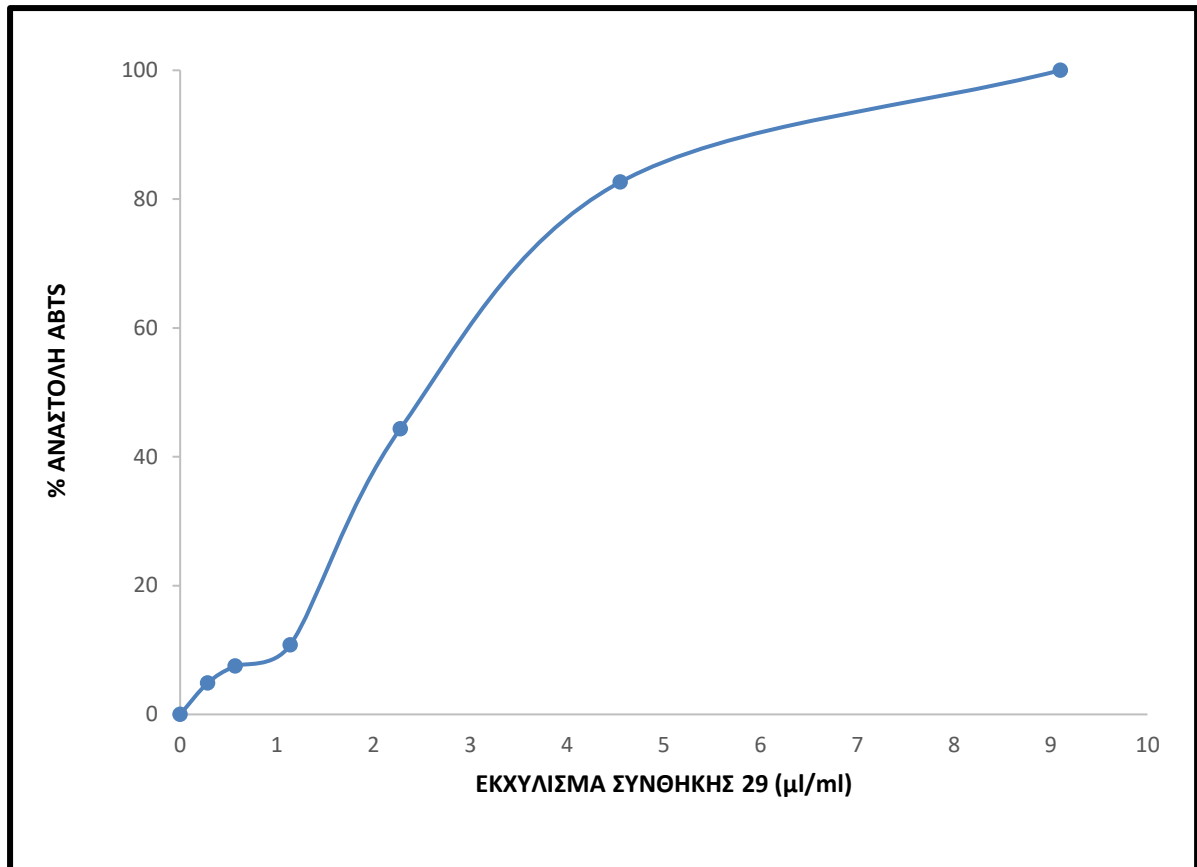
**Διάγραμμα 4.26:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 26.



**Διάγραμμα 4.27:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 27.



**Διάγραμμα 4.28:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 28.

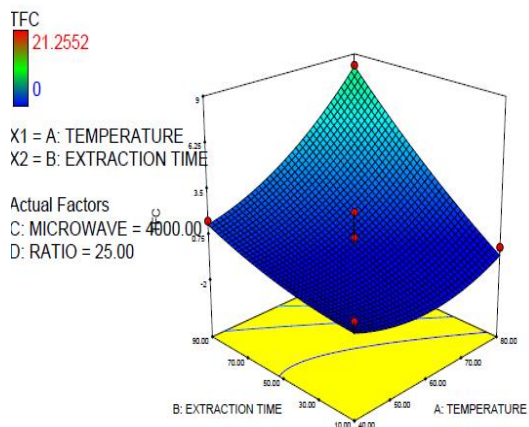


**Διάγραμμα 4.29:** Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα της συνθήκης 29.

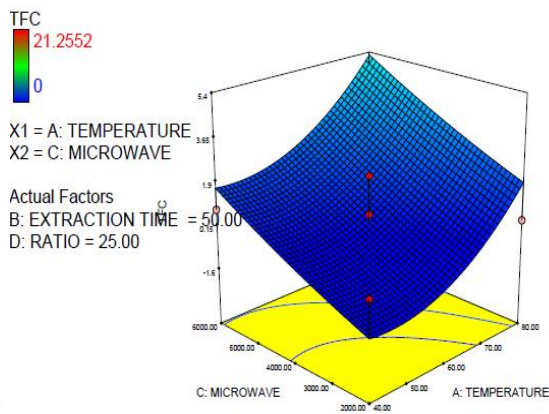
**Πίνακας 4.1: Συγκέντρωση φλαβονοειδών και IC50 του ABTS**

<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>C φλαβονοειδών (μg/ml)</b>	<b>ABTS IC50</b>
1	0,8 ± 0,02	4,60 ± 0,18
2	0,0 ± 0,0	-
3	0,0 ± 0,0	7,00 ± 0,28
4	0,0 ± 0,0	-
5	0,6 ± 0,02	6,40 ± 0,26
6	0,0 ± 0,0	-
7	0,0 ± 0,0	3,02 ± 0,12
8	0,0 ± 0,0	-
9	0,0 ± 0,0	-
10	1,6 ± 0,05	4,57 ± 0,18
11	1,4 ± 0,04	-
12	1,9 ± 0,06	2,27 ± 0,09
13	0,0 ± 0,0	5,40 ± 0,22
14	2,20 ± 0,06	6,30 ± 0,25
15	0,0 ± 0,0	-
16	0,0 ± 0,0	6,00 ± 0,24
17	16,4 ± 0,49	9,10 ± 0,36
18	1,5 ± 0,04	6,37 ± 0,25
19	8,3 ± 0,25	4,00 ± 0,16
20	0,0 ± 0,0	-
21	6,4 ± 0,19	3,20 ± 0,13
22	21,3 ± 0,64	2,30 ± 0,09
23	0,4 ± 0,01	5,20 ± 0,21
24	0,0 ± 0,0	-
25	0,0 ± 0,0	8,5 ± 0,34
26	0,0 ± 0,0	6,30 ± 0,25
27	5,4 ± 0,16	3,60 ± 0,14
28	8,0 ± 0,24	2,80 ± 0,11
29	18,1 ± 0,54	2,50 ± 0,10

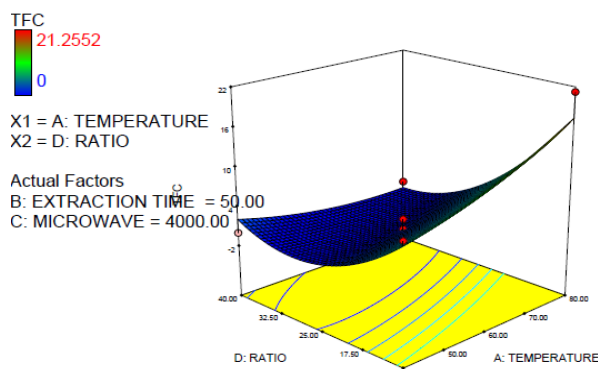
Design-Expert® Software



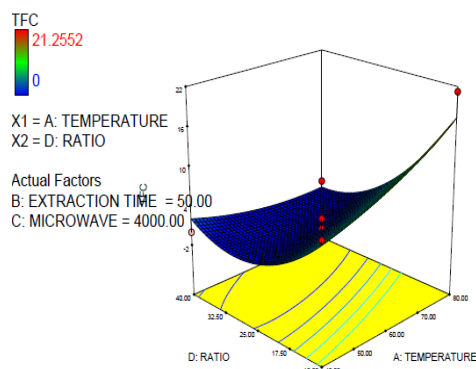
Design-Expert® Software



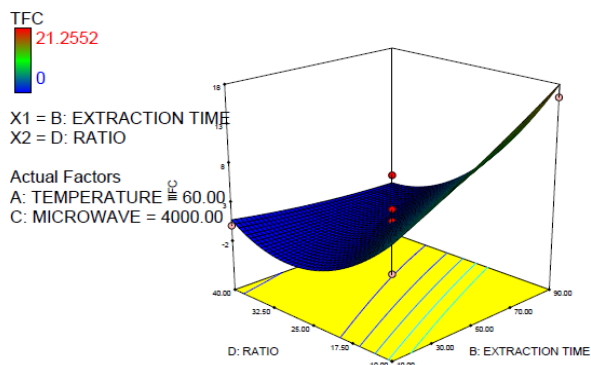
Design-Expert® Software



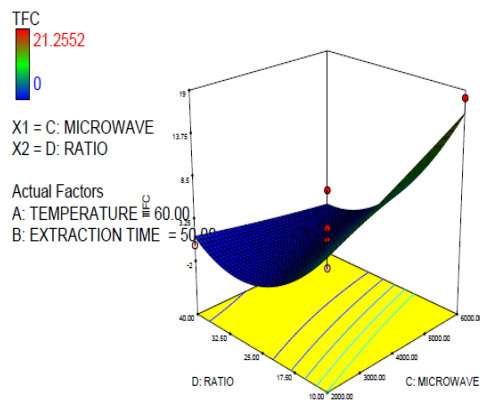
Design-Expert® Software



Design-Expert® Software

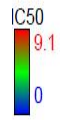


Design-Expert® Software



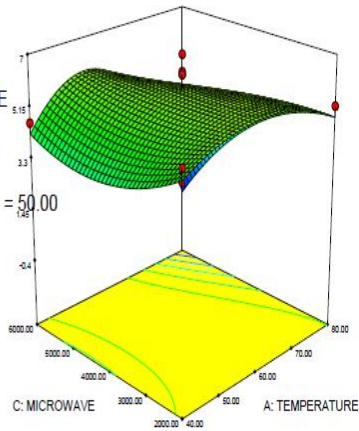
**Διάγραμμα 4.30:** Επιφάνειες απόκρισης (3D) με contour plots (2D) στα οποία παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στο ολικό ποσό των φλαβονοειδών (TFC). (Α) Θερμοκρασία εκχύλισης και χρόνος εκχύλισης. (Β) Θερμοκρασία εκχύλισης και ισχύς μικροκυμάτων. (Γ) Θερμοκρασία εκχύλισης και λόγος όγκου διαλύτη νερού ανά γραμμάριο αβοκάντο. (Δ) Χρόνος εκχύλισης και ισχύς μικροκυμάτων. (Ε) Χρόνος εκχύλισης και λόγος όγκου διαλύτη νερού ανά γραμμάριο αβοκάντο. (ΣΤ) Ισχύς μικροκυμάτων και λόγος όγκου διαλύτη νερού ανά γραμμάριο αβοκάντο.

Design-Expert® Software

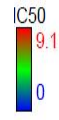


X1 = A: TEMPERATURE  
X2 = C: MICROWAVE

Actual Factors  
B: EXTRACTION TIME = 50.00  
D: RATIO = 25.00

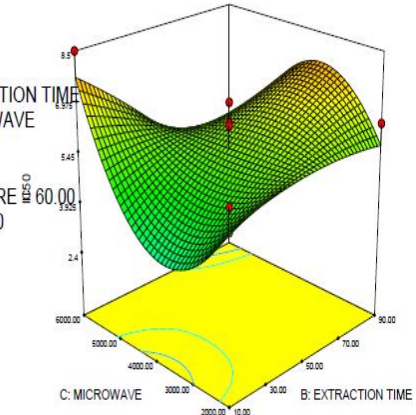


Design-Expert® Software



X1 = B: EXTRACTION TIME  
X2 = C: MICROWAVE

Actual Factors  
A: TEMPERATURE = 60.00  
D: RATIO = 25.00

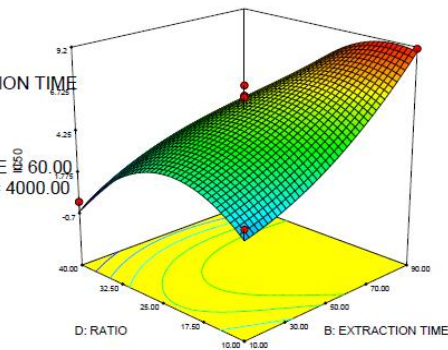


Design-Expert® Software



X1 = B: EXTRACTION TIME  
X2 = D: RATIO

Actual Factors  
A: TEMPERATURE = 60.00  
C: MICROWAVE = 4000.00



**Διάγραμμα 4.31:** Επιφάνειες απόκρισης (3D) με contour plots (2D) στα οποία παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στις τιμές IC<sub>50</sub> της μεθόδου ABTS. (Α) Θερμοκρασία εκχύλισης και ισχύς μικροκυμάτων. (Β) Χρόνος εκχύλισης και ισχύς μικροκυμάτων. (Γ) Χρόνος εκχύλισης και λόγος όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο.

Πίνακας 4.2: . ANOVA για την αριστοποίηση του μοντέλου για την αντιοξειδωτική δράση με βάση τη μέθοδο ABTS.

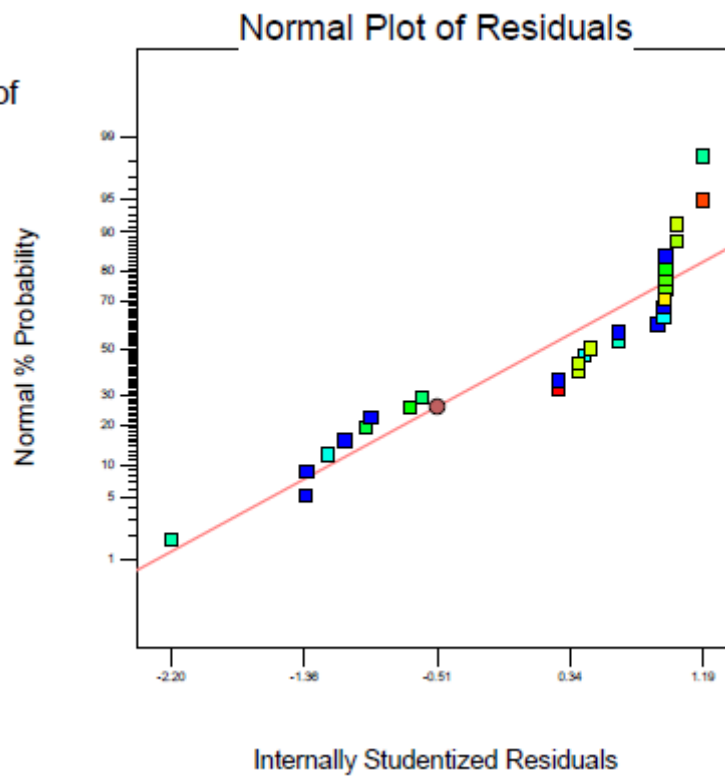
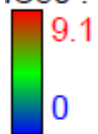
<b>ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model</b>						
<b>Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]</b>						
<b>Source</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>p-value Prob &gt; F</b>	
Model	205.22	15	13.68	6.86	0.0008	significant
A-TEMPERATURE	0.14	1	0.14	0.072	0.7931	
B-EXTRACTION TIME	29.65	1	29.65	14.85	0.0020	
C-MICROWAVE	0.39	1	0.39	0.20	0.6651	
D-RATIO	15.68	1	15.68	7.86	0.0149	
AC	4.84	1	4.84	2.43	0.1434	
BC	8.04	1	8.04	4.03	0.0660	
BD	11.66	1	11.66	5.84	0.0311	
A <sup>2</sup>	32.17	1	32.17	16.12	0.0015	
B <sup>2</sup>	0.73	1	0.73	0.36	0.5569	
C <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	0.088	0.7715	
D <sup>2</sup>	58.94	1	58.94	29.54	0.0001	
A <sup>2</sup> C	4.36	1	4.36	2.18	0.1632	
AC <sup>2</sup>	3.03	1	3.03	1.52	0.2396	
B <sup>2</sup> D	5.55	1	5.55	2.78	0.1193	
BC <sup>2</sup>	26.59	1	26.59	13.32	0.0029	
Residual	25.94	13	2.00			
Lack of Fit	15.92	9	1.77	0.71	0.6961	not significant
Pure Error	10.03	4	2.51			
Cor Total	231.17	28				



Πίνακας 4.3: ANOVA για την αριστοποίηση του μοντέλου για τις τιμές ολικών φλαβονοειδών TFC.

Response 1 TFC						
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	883.58	14	63.11	11.49	< 0.0001	significant
A-TEMPERATURE	36.43	1	36.43	6.63	0.0220	
B-EXTRACTION TIME	86.88	1	86.88	15.82	0.0014	
C-MICROWAVE	31.86	1	31.86	5.80	0.0304	
D-RATIO	419.75	1	419.75	76.41	< 0.0001	
AB	11.05	1	11.05	2.01	0.1779	
AC	0.014	1	0.014	2.615E-003	0.9599	
AD	43.96	1	43.96	8.00	0.0134	
BC	6.22	1	6.22	1.13	0.3054	
BD	52.54	1	52.54	9.57	0.0079	
CD	40.44	1	40.44	7.36	0.0168	
A <sup>2</sup>	8.33	1	8.33	1.52	0.2384	
B <sup>2</sup>	1.17	1	1.17	0.21	0.6521	
C <sup>2</sup>	0.17	1	0.17	0.031	0.8628	
D <sup>2</sup>	148.68	1	148.68	27.07	0.0001	
Residual	76.90	14	5.49			
Lack of Fit	73.41	10	7.34	8.40	0.0274	significant
Pure Error	3.49	4	0.87			
Cor Total	960.47	28				

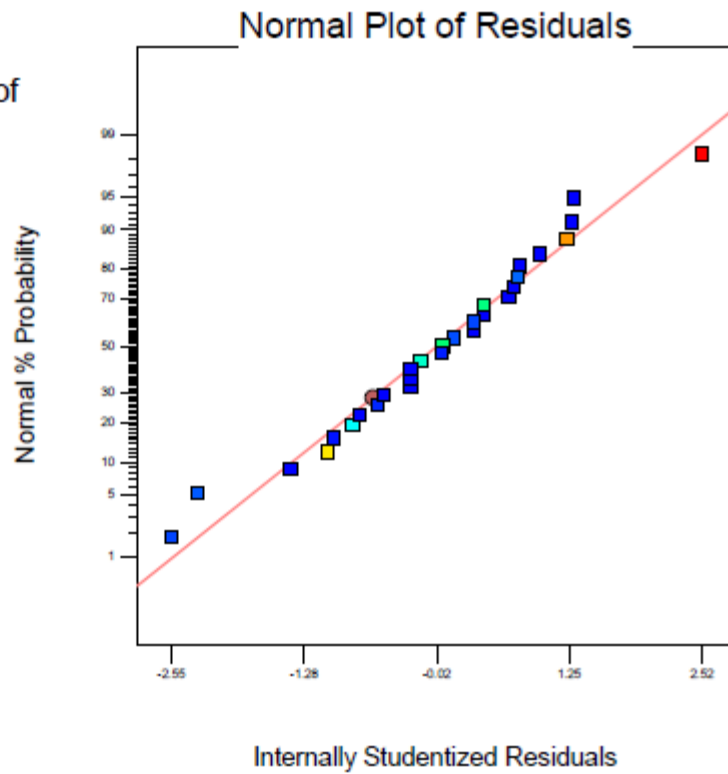
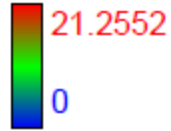
Color points by value of  
IC50 :



**Διάγραμμα 4.32.** Διάγραμμα Κανονικής Κατανομής του μοντέλου για την επίτευξη εκχυλισμάτων με υψηλή αντιοξειδωτική δράση με βάση τη μέθοδο ABTS.

Design-Expert® Software  
TFC

Color points by value of  
TFC:



**Διάγραμμα 4.33:** Διάγραμμα Κανονικής Κατανομής του μοντέλου για την επίτευξη εκχυλισμάτων με υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών TFC.

**Πίνακας 4.4:** Άριστες προβλεπόμενες συνθήκες για παρασκευή εκχυλίσματος από φλοιό ροδιού με υψηλή αντιοξειδωτική δράση ή με υψηλό ποσό φλαβονοειδών ή με υψηλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό ποσό φλαβονοειδών.

	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)</b>	<b>ΧΡΟΝΟΣ (min)</b>	<b>ΙΣΧΥΣ (W)</b>	<b>ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΟΓΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ/ ΜΑΖΑ ΠΥΡΗΝΑ ΑΒΟΚΑΝΤΟ (ml/gr)</b>	<b>IC50 (μl/ml)</b>	<b>TFC (μg/ml)</b>
<b>ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ</b>	<b>40,83</b>	<b>10,89</b>	<b>2278,1</b>	<b>39,93</b>	<b>0,3</b>	
<b>ΠΟΣΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ</b>	<b>76,66</b>	<b>69,64</b>	<b>4097,1</b>	<b>10,07</b>		<b>22,45</b>
<b>ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ</b>	<b>76,70</b>	<b>83,89</b>	<b>5973,1</b>	<b>14,24</b>	<b>0,7</b>	<b>21,56</b>

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρπός του αβοκάντο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τις ευεργετικές του ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία, όπως και για τη σύσταση του σε πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση (Jimenez et al., 2020). Για παράδειγμα, οι πολυφαινόλες του αβοκάντο φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη σοβαρών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι βακτηριακές λοιμώξεις, οι ιώσεις, ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.α. (Lee, Yu, Lee, & Lee, 2008).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών των συνθηκών εκχύλισης με μικροκύματα, ώστε τα εκχυλίσματα του πυρήνα του αβοκάντο να παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, το υψηλότερο ποσοστό σε ολικά φλαβονοειδή (τη σημαντικότερη υποκατηγορία των πολυφαινολών) και το συνδυασμό αυτών.

Η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης βασίστηκε στο μοντέλο επιφάνειας-απόκρισης Box-Behnken (BBD), η οποία είναι από τις πιο χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες για τη βελτιστοποίηση διαδικασιών (Box & Behnken, 1960). Για το μοντέλο αυτό αρχικά επιλέχθηκαν 29 τυχαιοποιημένες συνθήκες εκχύλισης (Πίνακας 3.1), αφού όμως είχαν προηγηθεί κάποιες μετρήσεις δοκιμασίας.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων έγινε με τη μέθοδο ABTS γιατί συγκαταλέγεται στις πιο δημοφιλείς και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων προϊόντων, λόγω της ευκολίας, της ταχύτητας και της ευαισθησίας της. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εξεταζόμενου δείγματος προσδιορίζεται μέσω της παραμέτρου IC50, η οποία είναι η συγκέντρωση του δείγματος που είναι ικανή να αναστείλει το 50% της ρίζας. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC50, τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος. Έτσι, για κάθε ένα από τα 29 εκχυλίσματα προσδιορίστηκε η τιμή IC50. Οι τιμές IC50 κυμαινότανε από 2,27 (συνθήκη 12) έως 9,10 μl/ml (συνθήκη 17).

Σε κάθε εκχύλισμα εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, προσδιορίστηκε και το ολικό ποσό των φλαβονοειδών. Οι τιμές των φλαβονοειδών σε κάποια εκχυλίσματα δεν ήταν

ανιχνεύσιμες με τη συγκεκριμένη μέθοδο (συνθήκες 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 13, 15, 16, 20, 24, 25, 26), ενώ η μεγαλύτερη τιμή ήταν 21,3  $\mu\text{g/ml}$  (συνθήκη 22).

Στα διαγράμματα 4.30 και 4.31 παρουσιάζονται οι επιφάνειες απόκρισης (3D) με contour-plots (2D) στα οποία παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στο ολικό ποσό των φλαβονοειδών (TFC), καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών εκχύλισης βασιζόμενες στις τιμές  $IC_{50}$  της μεθόδου ABTS. Οι γραφικές παραστάσεις 3D δημιουργήθηκαν σχεδιάζοντας την απόκριση σε δύο ανεξάρτητες μεταβλητές χρησιμοποιώντας τον άξονα z και διατηρώντας τις άλλες δύο μεταβλητές σταθερές. Αυτά τα γραφήματα είναι πολύ χρήσιμο για την οπτικοποίηση της σχέσης μεταξύ ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο μεταβλητών. Τα διαφορετικά σχήματα των γραφικών παραστάσεων υποδεικνύουν διαφορετικούς τύπους αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών και αν το αποτέλεσμα τους ευνοεί το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα. Έτσι, στα διαγράμματα 3D χρωματίζονται διαφορετικά περιοχές που τιμών των μεταβλητών όπου οι αλληλεπιδράσεις τους είναι θετικές ή όχι για το τελικό αποτέλεσμα. Το κόκκινο, πράσινο και μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε υψηλές, μέτριες και μικρές τιμές.

Η σημαντικότητα του μοντέλου για κάθε μεταβλητή, με βάση την ανάλυση ANOVA για το  $IC_{50}$  της μεθόδου ABTS και για το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων από πυρήνα αβοκάντο παρουσιάζονται στους πίνακες 4.2. και 4.3, όπου προσδιορίζεται η στατιστική σημαντικότητα της διαδικασίας εκχύλισης με βάση τις τιμές της κάθε επίδρασης καθώς και των αλληλεπιδράσεων αυτών. Από την ANOVA φαίνεται ότι η σημαντικότητα και των δύο παρουσιαζόμενων μοντέλων είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως θα είναι αποδεκτή και η πρόβλεψη για τις βέλτιστες συνθήκες. Επίσης, από την ανάλυση ANOVA είναι σημαντική η πληροφορία που δίνεται για το πόσο σημαντικές είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών. Συγκεκριμένα, στον πίνακα 4.3 φαίνεται ότι για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών είναι σημαντικές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ θερμοκρασίας-αναλογίας νερού/ μάζα πυρήνα αβοκάντο. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση του νερού ως διαλύτη επιτρέπει τη διασπορά του νερού μέσα στη μήτρα των φυτικών κυττάρων πιο αποτελεσματικά (από άλλους διαλύτες), με αποτέλεσμα τη βελτίωση της θέρμανσης και έτσι διευκολύνεται η μεταφορά ουσιών στον διαλύτη με υψηλότερους ρυθμούς μεταφοράς μάζας. Ο όγκος του διαλύτη πρέπει να είναι επαρκής ώστε να διασφαλίζεται ότι ολόκληρο το δείγμα είναι βυθισμένο στο διαλύτη σε όλη τη διαδικασία της

εκχύλισης με μικροκύματα (Feki et al, 2021). Επίσης, σημαντική ήταν η αλληλεπίδραση χρόνος εκχύλισης-αναλογίας νερού/μάζα πυρήνα αβοκάντο και ισχύς μικροκυμάτων-αναλογίας νερού/μάζα πυρήνα αβοκάντο. Η υψηλή ισχύς μικροκυμάτων μπορεί να αυξήσει τη θερμοκρασία εκχύλισης και να αυξήσει την απόδοση εξαγωγής (Feki et al., et al., 2021). Η αντίστοιχη ανάλυση ANOVA για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση (πίνακας 4.2) έδειξε ότι ήταν σημαντική η αλληλεπίδραση χρόνος εκχύλισης- αναλογίας νερού/μάζα πυρήνα αβοκάντο.

Στα διαγράμματα 4.32 και 4.33 παρουσιάζονται τα διαγράμματα κανονικής κατανομής (Δ.Κ.Κ.). Το Δ.Κ.Κ. διαχωρίζει τις πραγματικές επιδράσεις από εκείνες που δηλώνουν απλώς θόρυβο. Το διάγραμμα λοιπόν σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα δεδομένα να σχηματίζουν ευθεία γραμμή, ενώ οι σημαντικές αποκλίσεις των δεδομένων από την κανονική κατανομή να έχουν ικανοποιητική απόσταση από την γραμμή. Η ευθεία η οποία προκύπτει με βάση τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, διέρχεται από το διάμεσο των σημείων με κλίση καθορισμένη από την περιοχή των τεταρτημορίων. Όσο πιο κοντά στην ευθεία βρίσκονται τα σημεία τόσο πιο πιθανό είναι αυτά να ακολουθούν την κανονική κατανομή και άρα το αντίστοιχο μοντέλο να είναι αποδεκτό, ενώ σημαντική καμπυλότητα των δεδομένων οδηγεί σε σημαντική ασυμμετρία (skewness). Τα σημεία του διαγράμματος συμβολίζουν τα δεδομένα και είναι τοποθετημένα σε ανιούσα φορά, ανάλογα με την εκάστοτε τιμή (από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη). Ο οριζόντιος και ο κατακόρυφος άξονας είναι βαθμονομημένοι έτσι ώστε η συνάρτηση αθροιστικής κατανομής (cumulative distribution function) να σχηματίζει ευθεία γραμμή. Οι τιμές του οριζόντιου άξονα είναι οι κανονικοποιημένες τιμές των μοντέλων. Στο διάγραμμα 4.32 που αφορά την αντιοξειδωτική δράση, φαίνεται ότι οι περισσότερες τιμές σχηματίζουν ευθεία και άρα η πρόβλεψη του μοντέλου είναι αποδεκτή το οποίο συμφωνεί και με τη στατιστική σημαντικότητα του από την ANOVA ανάλυση. Το ίδιο ισχύει και για το διάγραμμα 4.33 που αφορά το υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών. Μάλιστα, σε αυτή την περίπτωση η κανονική κατανομή είναι μεγαλύτερη από αυτή για την αντιοξειδωτική δράση. Επομένως, εκτός από την ANOVA ανάλυση και αυτός ο δείκτης δηλώνει ότι η προβλεπόμενες βέλτιστες συνθήκες για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών είναι αποδεκτές.

Έτσι με βάση το χρησιμοποιούμενο μοντέλο, οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες για υψηλή αντιοξειδωτική δράση είναι θερμοκρασία 40,83° C, χρόνος εκχύλισης 10,89 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 2278,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr

πυρήνα αβοκάντο 39,93ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,3 μl/ml. Ο μικρός χρόνος εκχύλισης (10,89 λεπτά) παίζει ιδιαίτερη σημασία σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές που τυπικά απαιτούν αρκετά λεπτά έως μισή ώρα. Εκτός από τα οικονομικά οφέλη, ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της πιθανής υποβάθμισης και οξείδωση των αντιοξειδωτικών, όπως και επιβεβαιώνεται.

Οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για υψηλό περιεχόμενο φλαβονοειδών είναι θερμοκρασία 76,66° C, χρόνος εκχύλισης 69,64 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 4097,1W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 10,07ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το TFC θα είναι 22,45 μg/ml. Συμπερασματικά, με την αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης, αλλά και του χρόνου εκχύλισης κατά πολύ, αυξάνεται και το περιεχόμενο των φλαβονοειδών, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ίσως γιατί είναι γνωστό ότι σε υψηλές θερμοκρασίες οι παραγόμενες πολυφαινόλες χάνουν τη δράση τους (Sharma et al., 2015)..

Οι άριστες προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης για τον συνδυασμό του υψηλού περιεχόμενου φλαβονοειδών και υψηλής αντιοξειδωτική δράση είναι θερμοκρασία 76,70° C, χρόνος εκχύλισης 83,39 λεπτά, ισχύς μικροκυμάτων 5973,18 W, και αναλογία όγκου διαλύτη νερού ανά gr πυρήνα αβοκάντο 14,24 ml/gr. Με αυτές τις συνθήκες το IC50 θα είναι 0,7 μl/ml και το TFC 21,56 μg/ml.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aigbiremolen, A. A., Ativie, R. N., Aisuodionoe, M. E., & Odigie, O. M. (2018). Effect of aqueous extract of *Persea americana* seed on blood glucose in Alloxan-induced diabetic wistar rats. *Asian Journal of Medicine and Health*, 9(3), 1–10. <https://doi.org/10.9734/AJMAH/2017/37955>

Alkadi H., (2018). A Review On Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. doi: 10.2174/1871526518666180628124323.

Amaechina, F. C., Uchendu, A. P., Oboh, C. I., Agokei, N. I., & Eboka, C. J. (2017). Preliminary comparative effect of the aqueous extract of *Persea americana* seeds on the blood pressure of normotensive rabbits and rats. *Journal of Science and Practice of Pharmacy*, 4 (1): 177-181. Available at <http://www.jsppharm.org>. ISSN: 2449-0458 (print); 2449- 0466 (electronic)

Ashok B.T. and Ali R., (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol.*, 34(3):293-303

Avhad, M. R., & Marchetti, J. M. (2015). Temperature and pretreatment effects on the drying of Hass avocado seeds. *Biomass and Bioenergy*, 83, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.028>

Berg J. Tymoczko J, Gregory J, Stryer L. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (έκδοση 2017)

Bergh, B., & Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the Avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 135–146.

Betteridge D.J., (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2): 3-8.

Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan*, (91), 179-194

Box, G.E.P. and Behnken, D.W. (1960) Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 2, 455-475.

Carro, N., Garcia, I., Lompart, M., 2000, “Closed-vessel assisted microwave extraction of polychlorinated biphenyls in marine mussels”, *Analysis*, 28: 720-724.

Chee, K.K., Wong, M.K., Lee, H.K., 1996, “Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic-hydrocarbons in marine-sediments using a microwave extraction system with High-Performance Liquid-Chromatography Fluorescence60 Detection and Gas-Chromatography Mass-Spectrometry” *Journal of Chromatography*, 723: 259-271.

Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara J. (2006). Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. *Blackwell Publishing*

Dabas, Deepti (2012). A colored avocado seed extract with antioxidant, anti- carcinogenic and anti-inflammatory effects. Available at: [https://etda.libraries.psu.edu/files/final\\_submissions/1576](https://etda.libraries.psu.edu/files/final_submissions/1576)

Dabas, Deepti Elias, R. J., Lambert, J., & Ziegler, G. R. (2011). A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. *Journal of Food Science*, 76(9), 1335–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02415.x>

Dabas, Deepti, Shegog, R. M., Ziegler, G. R., & Lambert, J. D. (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6133–6140. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340007>.

Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bolor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S. and Lele R.D., (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52:794-804.

Dew T.P., Day A.J., Morgan M.R., (2005). Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (53), 6510-6515

Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk L. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress. *Progr Lipid Res*, (43), 200-227.

Feki F, Klisurova D, Masmoudi MA, Choura S, Denev P, Trendafilova A, Chamkha M, Sayadi S. Optimization of microwave assisted extraction of simmondsins and polyphenols from Jojoba (*Simmondsia chinensis*) seed cake using Box-Behnken statistical design. *Food Chem*. 2021 356:129670.

Ferguson Lynnette R. (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, (475),89-111.

Gilbert D.L. (2000). “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, (899)1.

Gupta, M., Wai Leong, Eugene, W., (2007), “Microwave Heating in Microwaves and Metals”, John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd, Singapore.

Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1998). Free Radicals in Biology and Medicine, (11), 416-493, 188-266.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition, Oxford University Press, New York.

Halliwell, B, Gutteridge, J.M.C.(1990). “Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview”,in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme* bgy 186.

Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, (342), 1007-1011.

Imafidon, K. E., & Amaechina, F. C. (2010). Effects of aqueous seed extract of *Persea americana* Mill. (Avocado) on blood pressure and lipid profile in hypertensive rats. *Advances in Biological Research*, 4(2), 116–121.

Jaeschke H. and Ramachandran A., (2018). Antioxidant Defense Mechanisms. *Comprehensive Toxicology*, 277–295. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.64200-9.

Jimenez, P., Garcia, P., Quitral, V., Vasquez, K., Parra-Ruiz, C., Reyes-Farias, M., et al. (2020). Pulp, Leaf, Peel and Seed of Avocado Fruit: A Review of Bioactive Compounds and Healthy Benefits. *Food Reviews International*, 1-37. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1717520>.

Kaufmann B., Christen, P., 2002, “Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction”, *Phytochemical Analysis*, 13: 105-113.

Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilper K. F., ... & Etherton T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.

Lee, S. G., Yu, M. H., Lee, S. P., & Lee, I. S. (2008). Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(3), 269–275. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.3.269>.

Leite, J. J. G., Brito, É. H. S., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Sidrim, J. J. C., Bertini, L. M., Rocha, M. F. G. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 110–113. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000200003>

Letellier M., Budzinski, H., 1999, “Microwave assisted extraction of organic compounds”, *Analysis*, 27: 259-271.

Li Y., Trush M.A. (1994). Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.*, (54), 1895-1898.

Lobo V., Patil A., Phatak A. and Chandra N., (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 4(8): 118–126.

Lopez-Avila, V., Young, R., 1994, “Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments”, *Anal. Chem.*, 66: 1097-1106.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, (79), 727- 747.

Mandal, V., Dewanjee, S., Mandal, S.C., 2009, “Microwave-assisted extraction of total bioactive saponin fraction from *Gymnemasylvestre* with reference to gymnemagenin: a potential biomarker”, *Phytochemical Analysis*, 20: 491–497.

Mazur A., Bayle D., Lab C., Rock E., Rayssiguier Y. (1999). Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, (145), 421–442.

Miller NJ, Rise-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A , (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science (London)*.

Moy, L. S. (1998). Cosmetic formulation and method for amelioration of skin keratoses and striae distensae. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US5928659A/en?q=avocado&q=seed&oq=avocado+seed>

Myers, R.H. and Montgomery, D.C. (2002) *Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York.

Mylonas C and Kouretas D. *Lipid Peroxidation and Tissue Damage. In Vivo*. Αθήνα, 1999.

Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C, Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M. (2001), *Flevonoids: a review of probable*

mechanisms of action and potential 100ynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, (74), 25 – 48

Niki E., (1993). Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. Free radicals: From basic science to medicine. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 365–373.

Numata, M., Yarita, T., Aoyagi, Y., Takatsu, A., 2004, “Evaluation of a Microwave-Assisted Extraction Technique for the Determination of Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Sediments”, *Analytical Sciences*, 20: 793-798.

Oboh, G., Odubajo, V. O., Bello, F., Ademosun, A. O., Oyeleye, S. I., Nwanna, E. E., & Ademiluyi, A. O. (2016). Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities in vitro. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(2), 131–140. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0049>.

Onuska, F.I., Terry K.A., 1993, “Extraction of Pesticides from Sediments using a Microwave Technique”, *Chromatographia*”, 36: 191-194.

Ordoudi, S. A., Bakirtzi, C., &Tsimidou, M. Z. (2018). The potential of tree fruit stone and seed wastes in Greece as sources of bioactive ingredients. *Recycling*, 3, 9, 15–20. <https://doi.org/10.3390/recycling3010009>

Ozolua, R. I., Anaka, O. N., Okpo, S. O., &Idogun, S. E. (2009). Acute and sub-acute toxicological assessment of the aqueous seed extract of *Persea American* Mill. (Lauraceae) in parts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 6 (4): 573 - 578. <https://doi.org/10.1080/00219266.2012.688849>

Pahua-Ramos, M. E., Ortiz-Moreno, A., Chamorro-Cevallos, G., Hernández-Navarro, M. D., Garduño-Siciliano, L., Necochea-Mondragón, H., & Hernández-Ortega, M. (2012).Hypolipidemic Effect of Avocado (*Persea americana* Mill.) seed in a Hypercholesterolemic Mouse Model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 10–16. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0280-6>

Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena-an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408390600976841>

Prior R, Xianli W, Schaich K, (2005) “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, 53 (6) : 1841-1856,

Ranade, S. S., & Thiagarajan, P. (2015). A review on *Persea Americana* Mill. (Avocado) - Its fruit and oil. *International Journal of PharmTech Research*, 8(6), 72–77.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, (20), 933-956.

Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estevez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625–5635. <https://doi.org/10.1021/jf1048832>.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.

Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., & Whiley, A. W. (2012). *The Avocado Botany, Production and Uses* (2nd ed).

Shahidi F., Naczk M. (1995). *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA.

Sharma K, Ko EY, Assefa AD, Ha S, Nile SH, Lee ET, Park SW. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *J Food Drug Anal*. 2015 23(2):243-252.

Shi H., Noguchi N. and Niki E., (1999). Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopherol hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.*, 27(3-4):334-46.

Shu, Y.Y., Lai, T.L., Lin, H., Yang, T.C., Chang, C., (2003), “Study of factors affecting on the extraction efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils using open-vessel focused microwave-assisted extraction”, *Chemosphere*, 52: 1667-1676.

Shu, Y.Y., Tey, Y.S., Wu, D., (2003), “Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles using open-vessel focused microwave-assisted extraction”, *Analytica Chimica Acta*, 495: 99-108.

Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruitseeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411–417.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>.

Srdić-Rajić A. and Ristić K., (2016). Antioxidants: Role on Health and Prevention. *Encyclopedia of Food and Health*, Pages 227-233.

Valavanidis A, “Free radicals in organic chemistry”, University of Athens, 2006.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1):44-84.

Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of “Hass” avocado. *Food Research International*, 44(5), 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>.

Wang, W., Bostic, T. R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122(4), 1193–1198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.114>.

Wang, Y.; Liu, Y.; Hu, Y. (2014) Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.*, 111, 324–332.

Watkins, K.W., (1983), “Heating in microwave ovens. An example of dipole moments in action”, *Journal of Chemical Education*, 60: 1043-1044.



Wilson RL, "Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries", New York Academic Press: 123-224, 1978.

Yoshino M., Haneda M., Naruse M., Murakami K. (1999). Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *MolGenetMetab.*, (68), 468-472.

Βασιλακάκης Μ., (2016), Γενική και Ειδική Δενδροκομία, Εκδόσεις Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη, σελίδα 1237.

Κοντρατιέβα Ι., (2021), Μεταπτυχιακή διατριβή «Ανασκόπηση της επίδρασης βιοδραστικών συστατικών υπερτροφών (superfoods) στο εντερικό μικροβίωμα.

Σπανού Χ. (2010). Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών