Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

Προπτυχιακή διπλωματική εργασία

Αντιοξειδωτικές Χημικές Ενώσεις στα Φυτά: Μελέτη των Μύρτιλων, Κόκκινων και Μαύρων Βατόμουρων

Graduate thesis

Antioxidant Chemical Compounds in Plants: A Study of Blueberries, Raspberries and Blackberries

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/ NAME OF STUDENT

Μαρία Νεφέλη Μορφοπούλου

Maria Nefeli Morfopoulou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/ NAME OF SUPERVISOR

Μαρία Τράπαλη

Maria Trapali

ΑΙΓΑΛΕΩ/AI GALEO 2024

Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences

Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

"Antioxidant Chemical Compounds in Plants: A Study of Blueberries, Red and Blackberries"

Maria Nefeli Morfopoulou
20678408
nefelimorf@gmail.com

FIRST SUPERVISOR
Maria Trapali

SECOND SUPERVISOR
Vasiliki Lagouri

THIRD SUPERVISOR
Christina Fountzoula

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης
Ημερομηνία εξέτασης: 7/10/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1ος Εξεταστής	Μαρία Τράπαλη	MARIA TRAPALI Digitally signed by MARIA TRAPALI Date: 2024.12.08 08:38:05 +02'00'
2ος Εξεταστής	Βασιλική Λαγούρη	VASILIKI LAGOURI Digitally signed by VASILIKI LAGOURI Date: 2024.12.05 13:33:36 +02'00'
3ος Εξεταστής	Χριστίνα Φουντζουλα	CHRISTINA FOUNTZOULA Digitally signed by CHRISTINA FOUNTZOULA Date: 2024.12.08 08:56:06 +02'00'

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μορφοπούλου Μαρία Νεφέλη του Άγγελου, με αριθμό μητρώου 20678408 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτητή

Μορφοπούλου Μαρία Νεφέλη

Υπογραφή φοιτήτριας

MARIA NEFELI MORFOPOULOU

Digitally signed by MARIA NEFELI MORFOPOULOU
Date: 2024.11.12 10:46:19 +02'00'

Περιεχόμενα

Αντιοξειδωτικές Χημικές Ενώσεις στα Φυτά: Μελέτη των Μύρτιλων, Κόκκινων και Μαύρων Βατόμουρων i

Επιτροπή εξέτασης iii

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας iv

Πίνακας εικόνων, πινάκων και διαγραμμάτων 1

Πρόλογος 2

Abstract 3

1.Γενικά για τα φυτά 4

2.Τα αντιοξειδωτικά 4

2.1 Το οξειδωτικό στρες 5

2.2 Αντιοξειδωτικά στα φυτά 5

3. Τα βατόμουρα 6

3.1 Μύρτιλο 6

3.2 Σμέουρα 7

3.3 Μαύρο Βατόμουρο 7

4.Ανθοκυανίνες 8

5. Προετοιμασία δειγμάτων 8

6. Εργαστηριακό μέρος 9

6.1 Μέθοδος Εκχύλισης 9

6.1.1 Επιλογή διαλύτη για εκχύλιση 10

6.2 Μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP) 10

6.3 Μέθοδος μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) 12

6.4 Μέθοδος για την δραστικότητα αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο δέσμευσης ελεύθερων ριζών DPPH 15

6.5 Δοκιμή αποχρωματισμού κατιόντος ριζών ABTS 17

7.Συμπεράσματα 19

8.Συζήτηση 20

Αναφορές 22

Πίνακας εικόνων, πινάκων και διαγραμμάτων

Εικόνα 1. Μύρτιλα (πηγή:vita4you) 6

Εικόνα 2. Σμέουρα (πηγή: froutopia.com) 7

Εικόνα 3. Βατόμουρο (πηγή:alekati.gr) 6

Πίνακας 1. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων και συγκεντρώσεις ύστερα από υπολογισμούς κάθε δείγματος 12

Πίνακας 2. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων και συγκεντρώσεις ύστερα από υπολογισμούς, κάθε δείγματος 15

Πίνακας 3. Απορροφήσεις και ποσοστά αναστολής κάθε δείγματος που βρέθηκε μετά από υπολογισμούς. 16

Πίνακας 4. Απορροφήσεις δειγμάτων ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις. 16

Πίνακας 5 Ποσοστά αναστολής κάθε απορρόφησης των παραπάνω διαδοχικών αραιώσεων. 16

Πίνακας 6. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων, διαφορά απορρόφησης δείγματος και control και συγκεντρώσεις κάθε δείγματος που βρέθηκαν ύστερα από υπολογισμούς 17

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη μεθόδου FRAP 12

Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη μεθόδου μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) ... 14

Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη διαλύματος Trolox. 1818

Πρόλογος

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να οριστεί οποιαδήποτε ουσία που υπάρχει σε χαμηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με ένα οξειδωμένο υπόστρωμα και καθυστερεί ή αναστέλλει αποτελεσματικά την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell, 1995, p. 1) (Tiveron, et al., 2012, p. 2). Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ενώσεις οι οποίες μπορούν να προέρχονται από μικροοργανισμούς, φυτά και ζωικούς ιστούς και έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν τις διαδικασίες οξείδωσης (Zehiroglu & Sarikaya, 2019, p. 2) (Godlewska, et al., 2023, p. 68).

Είναι αποδεδειγμένο από μελέτες πως τα φυτοχημικά δηλαδή τα αντιοξειδωτικά που παράγονται από φυτά, είναι χρήσιμα στην πρόληψη και θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών (Muhammad Bilal Ahmed, et al., 2022, p. 2) (Jang & Lee, 2023, p. 1), καθώς και στη θεραπεία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων του ήπατος με τη χρήση είτε φυσικών προϊόντων είτε παραγώγων τους (Aleksandar Rašković, et al., 2014, p. 2). Η σημασία τους είναι τόσο υψηλή που έχουν προταθεί για την πρόληψη και/ή τη θεραπεία του διαβήτη που ταλαιπωρεί εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο (Tianru Jin, et al., 2018, p. 1) (Stagos, 2019, p. 1).

Σε αυτή την ερευνητική εργασία, αρχικά θα αναφερθούν οι κυριότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα τα φαινολικά οξέα, τα καροτενοειδή και οι βιταμίνες μέσα από την μελέτη του μύρτιλου, του σμέουρου και του βατόμουρου. Σχετικά με τα φαινολικά οξέα είναι σημαντικό να επισημανθεί πως σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη σε διάφορα λαχανικά, κάθε ένα έχει το μοναδικό του φαινολικό προφίλ. (Li, et al., 2018, p. 2).

Στη συνέχεια, η εργασία θα επικεντρωθεί στη σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων μελετώντας την ύπαρξη των αντιοξειδωτικών ενώσεων στο μύρτιλο, το σμέουρο και το βατόμουρο. Οι διαφορετικές τους αντιοξειδωτικές δραστηριότητες μπορεί να οφείλονται στη μεταβλητότητα της χημικής τους σύνθεσης καθώς και τη συγκέντρωση σουλφιδίων (Florentine Marie-Chantal Ndoye Foe, et al., 2016, p. 9). Εκτός από τους παραπάνω δύο παράγοντες, τη δράση των αντιοξειδωτικών και των πολυφαινολών γενικότερα επηρεάζει εξίσου η διατροφή (John Neustadt, 2006, p. 3) και το περιβάλλον. Επομένως η μελέτη για τους παράγοντες αυτούς είναι πρακτικής σημασίας (Adamczyk-Szabela, et al., 2023, p. 7). Είναι ούτως ή αλλιώς γνωστό πως μια διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικά θεωρείται ουσιαστικό μέρος μιας ολοκληρωμένης θεραπείας σε συνδυασμό με τη ορθή χρήση φαρμάκων (Katsimbri, et al., 2021, p. 10).

Διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να ποσοτικοποιήσουν δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιοξειδωτική δράση (Montes, et al., 2019, p. 5). Είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η δραστικότητα της κάθε ουσίας καθώς ένα φυτό που μπορεί απλά να βρίσκεται στον κήπο μας ή αποτελεί μέρος της διατροφής μας, μπορεί να συμβάλλει στην υγεία μας. Στην συγκεκριμένη εργασία θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της φωτομέτρησης με στόχο την διερεύνηση των ενώσεων που διαθέτουν αντιοξειδωτική ιδιότητα.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η πρόκληση του ενδιαφέροντος για περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο της επιστήμης. Τα φυτά επικρατούν στο περιβάλλον γύρω μας. Υπάρχουν πάρα πολλά είδη τα οποία πιθανώς δεν έχουν μελετηθεί αρκετά και δεν έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια οι τρόποι που η αντιοξειδωτική δράση των χημικών ενώσεων που περιέχουν, μπορούν να συμβάλλουν στην υγεία και ευεξία του ανθρώπου.

Abstract

An antioxidant can be defined as any substance that is present in a low concentration compared to an oxidized substrate and effectively delays or inhibits the oxidation of the substrate (Halliwell, 1995, p. 1) (Tiveron, et al., 2012, p. 2). Antioxidants are compounds that can come from microorganisms, plants and animal tissues and have the ability to prevent oxidation processes (Zehiroglu & Sarikaya, 2019, p. 2) (Godlewska, et al., 2023, p. 68).

It is proven by studies that phytochemicals, otherwise known as antioxidants produced by plants, are useful in the prevention and treatment of inflammatory diseases (Muhammad Bilal Ahmed, et al., 2022, p. 2) (Jang & Lee, 2023, p. 1), as well as in the treatment of various pathological conditions of the liver using either natural products or their derivatives (Aleksandar Rašković, et al., 2014, p. 2). Their importance is so high that they have been proposed for the prevention of diabetes that afflicts millions of people around the world (Tianru Jin, et al., 2018, p. 1) (Stagos, 2019, p. 1).

In this research paper, the main categories of antioxidant compounds, such as for example phenolic acids, carotenoids and vitamins will be initially reported through the study of blueberry, raspberry and blackberry. Regarding phenolic acids, it is important to point out that according to research conducted on various vegetables, each one has its own unique phenolic profile. (Li, et al., 2018, p. 2).

The work will then focus on the composition and biological properties of these compounds by studying the existence of antioxidant compounds in blueberry, raspberry and blackberry. Their different antioxidant activities may be due to the variability of their chemical composition as well as sulfide (Florentine Marie-Chantal Ndoye Foe, et al., 2016, p. 9). In addition to the above two factors, the action of antioxidants and polyphenols in general is equally affected by diet (John Neustadt, 2006, p. 3) and the environment. Therefore, the study of these factors is of practical importance (Adamczyk-Szabela, et al., 2023, p. 7). It is known, nonetheless that a diet rich in anti-oxidants is considered an essential part of an integrated treatment in combination with the correct use of drugs (Katsimbri, et al., 2021, p. 10)

Different methods can quantify secondary metabolites with anti-oxidative activity (Montes, et al., 2019, p. 5). It is necessary to determine the activity of each substance as a plant that can simply be in our garden or is part of our diet, can contribute to our health. In this work, the method of photometry will be used with the aim of investigating the compounds that have antioxidant properties.

The aim of this work is to provoke interest for further research in this specific field of science. Plants dominate the environment around us. There are too many species, which have probably not been studied enough, and the ways in which the antioxidant action of the chemical compounds they contain, can contribute to human health and well-being, have not been precisely determined.

Key words: antioxidants, phytochemicals, blueberry, raspberry, blackberry, health, treatment, diet, research, plants.

1.Γενικά για τα φυτά

Ως φυτό ορίζεται ο ευκαρυωτικός μικροοργανισμός του βασιλείου Plantae που διαθέτει την ικανότητα να φωτοσυνθέτει. Τα φυτά μέσω της διαδικασίας αυτής μπορούν και παράγουν μόνα τους την τροφή τους. Χρησιμοποιώντας την ηλιακή ενέργεια και το διοξείδιο του άνθρακα παράγουν γλυκόζη και οξυγόνο το οποίο επιστρέφουν στην ατμόσφαιρα (Μανέτας, et al., 2015) (Ριζοπούλου, et al., 2015, p. 31).

Από τις αρχές των χρόνων ο άνθρωπος αξιοποιούσε τις ιδιότητες των φυτών ακόμα και αν δεν συνειδητοποιούσε πλήρως την λειτουργία τους. Ήταν φανερό το πόσο κρίσιμο ρόλο παίζουν στην ισορροπία του οικοσυστήματος μας. Χάρη στα φυτά πολλά ζώα και έντομα βρίσκουν καταφύγιο και τροφή. Τα δέντρα με τις ρίζες τους προσφέρουν στήριξη στο έδαφος αποφεύγοντας την διάβρωσή του, ενώ με το φύλλωμά τους προσφέρουν στο περιβάλλον οξυγόνο, απαραίτητο για τη ζωή, και απομακρύνουν το διοξείδιο του άνθρακα το οποίο αποτελεί βλαπτικό παράγοντα, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο ταυτόχρονα το κλίμα.

Εκτός από τα πλεονεκτήματα που τα φυτά προσφέρουν στο περιβάλλον, είναι σημαντικό να αναφέρουμε και αυτά που προσδίδουν στον άνθρωπο. Αρχικά, τα φυτά αποτελούν κύρια πηγή τροφής για τον άνθρωπο παρέχοντας βιταμίνες, μέταλλα ίνες και αντιοξειδωτικά. Μια ισορροπημένη και ολοκληρωμένη διατροφή οφείλει να περιέχει φρούτα, λαχανικά και ξηρούς καρπούς. Η κατανάλωση φυτικών τροφίμων που περιέχουν όλα τα προαναφερόμενα θρεπτικά στοιχεία αλλά και φυτοχημικά, με άλλα λόγια ουσίες με αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση, έχει ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση της πέψης και ταυτόχρονα την αποφυγή χρόνιων ασθενειών όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης και ο καρκίνος.

Σχετικά με τη σχέση φυτών και φαρμακευτικής επιστήμης, τα φυτά αποτελούν βάση των περισσότερων φαρμάκων, είτε διότι προέρχονται από αυτά είτε επειδή περιέχουν φυτικά συστατικά. Για παράδειγμα ένα ευρέως διαδεδομένο φάρμακο είναι η ασπιρίνη (Γκαναβιας, 2012, p. 13), η οποία παράγεται από το σαλικυλικό οξύ το οποίο με την σειρά του προέρχεται από το φλοιό της ιτιάς. Επίσης τα φυτά μέσα από εκχυλίσματα παρέχουν στον άνθρωπο βότανα τα οποία, είτε σε πόσιμη είτε σε βρώσιμη μορφή, μπορούν να λειτουργήσουν ως χαλαρωτικά και αποτοξινωτικά.

Τα φυτά χωρίζονται σε σπερματόφυτα, δηλαδή φυτά που παράγουν σπόρους, και σε βρυόφυτα, δηλαδή φυτά που δεν παράγουν σπόρους όπως βρύα και φτέρες. Τα περισσότερα φυτά που αξιοποιούνται από τον άνθρωπο είναι αυτά με καρπούς, καθώς διαθέτουν πολλαπλά συστατικά με ευεργετικές ιδιότητες προς τον ανθρώπινο οργανισμό, χωρίς να υποβαθμίζονται με αυτό τον τρόπο τα μη καρποφόρα φυτά. Τέτοια φυτά είναι για παράδειγμα οι ελιές, οι τριανταφυλλιές, οι βατομουριές.

2.Τα αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ουσίες που παράγονται είτε από τον οργανισμό είτε λαμβάνονται μέσω της τροφής. Οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, δηλαδή πολύ δραστικά μόρια τα οποία προκαλούν βλάβες στα κύτταρα όπως οξείδωση και καταστροφή λιπών, πρωτεϊνών και γενετικού υλικού.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που παράγει ο ανθρώπινος οργανισμός περιλαμβάνουν την κατάλαση, το ουρικό οξύ, τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα συστήματα επανόρθωσης του DNA (Καλαντζή &

Κατωπόδης, 2010, p. 8). Η καταλάση αποτελεί ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο αποτρέποντας τη συσσώρευση την επιβλαβούς ουσίας. Το ουρικό οξύ με την σειρά του αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και δρα στο πλάσμα του αίματος. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα διασπούν πρωτεΐνες και λιπίδια ενώ ταυτόχρονα απομακρύνουν κατεστραμμένα μόρια. Τέλος τα συστήματα επανόρθωσης του DNA επιδιορθώνουν τυχόν βλάβες που έχουν προκληθεί από οξείδωση και συγκεκριμένα το οξειδωτικό στρες.

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά είτε αποτρέπουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών είτε τις εξουδετερώνουν πριν ακόμα προλάβουν να προκαλέσουν την οποιαδήποτε βλάβη στον οργανισμό και συγκεκριμένα στα μακρομόρια. Πέρα από ένζυμα και συστήματα, ως αντιοξειδωτικό μπορεί να δράσει ακόμα και ένα πολύ σημαντικό οργανίδιο του κυττάρου, το μιτοχόνδριο. Τα οργανίδια αυτά εμποδίζουν τις βλάβες που μπορούν να προκληθούν κατά την κυτταρική αναπνοή, δηλαδή κατά την παραγωγή ATP, όπου η δημιουργία ελεύθερων ριζών είναι ιδιαίτερα εύκολη.

2.1 Το οξειδωτικό στρες

Οξειδωτικό στρες ονομάζεται η διαταραχή της ισορροπία των προοξειδωτικών (προάγουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών) και των αντιοξειδωτικών ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου. Κάτι τέτοιο μπορεί να προκληθεί από αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ή από έλλειψη/ ανεπάρκεια μηχανισμών με αντιοξειδωτική δράση. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα οι ελεύθερες ρίζες είτε του οξυγόνου είτε του αζώτου αποτελούν βλαβερά στοιχεία για την ορθή λειτουργία των κυττάρων. Οι βλάβες που μπορεί να προκληθούν οδηγούν στη δημιουργία διαφόρων νοσημάτων, ακόμα και πρόωρης γήρανσης.

Η ισορροπία ανάμεσα στα προοξειδωτικά και τα αντιοξειδωτικά είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του κυττάρου και γενικότερα του οργανισμού. Για να διατηρηθεί αυτή η ισορροπία είναι απαραίτητη η ύπαρξη οξειδοαναγωγικής ρύθμισης. Αυτό το είδος ρύθμισης προστατεύει τα κύτταρα από τις επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών διατηρώντας την ομοιόσταση και αποφεύγοντας την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες.

Έρευνες έχουν επισημάνει πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών ασθενειών. Συγκεκριμένα τα άτομα με υπέρταση και κατ' επέκταση καρδιαγγειακά νοσήματα, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ανιόντων υπεροξειδίου του υδρογόνου και ταυτόχρονα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών (Γιαννακοπούλου, p. 9).

2.2 Αντιοξειδωτικά στα φυτά

Τα αντιοξειδωτικά στα φυτά αποτελούν απαραίτητο στοιχείο στην προστασία του οργανισμού από τις ελεύθερες ρίζες. Αποτελούν επίσης και μια εύκολη και προσβάσιμη πηγή αντιοξειδωτικών, για να ενδυναμώσουμε τον οργανισμό ενάντια στις ρίζες αυτές. Πολλά φυτά, φρούτα και λαχανικά είναι γνωστά για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά αυτά περιλαμβάνουν μια ποικιλία βιταμινών και μετάλλων, βασικές εκ των οποίων είναι τα φλαβονοειδή, οι φαινολικές ενώσεις, οι βιταμίνες A, C και E.

Έρευνες έχουν δείξει πως η μακροχρόνια κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μπορεί να μειώσει σημαντικά αν όχι εξαφανίσει, τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων που σχετίζονται με το οξειδωτικό

στρες. Η κατανάλωση αυτών των τροφών ενισχύει το ανοσοποιητικό με αποτέλεσμα να αποτρέπει την εμφάνιση διαβήτη, καρκίνου και πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων (Ζέκιαι , 2024, p. 20).

3. Τα βατόμουρα

Τα βατόμουρα ανήκουν στα Bramble φρούτα, συγκεκριμένα στο γένος Rubus και στην οικογένεια Rosaceal (Κούκος, 2000, p. 4). Τα βατόμουρα όπως και άλλα φρούτα και λαχανικά αποτελούν πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών. Τα βατόμουρα περιέχουν πολλές διαφορετικές βιταμίνες και μέταλλα τα οποία δρουν κατά του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα περιέχουν ανθοκυανίνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να μειώνουν την οξειδωτική ζημιά. Οι ανθοκυανίνες ανήκουν στα φλαβονοειδή, φαινολικές ουσίες, και είναι γνωστές για το κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα που προσδίδουν σε καρπούς και άνθη. Εξαιτίας αυτής της ουσίας προσδίδεται στο μύρτιλο, το κόκκινο και μαύρο βατόμουρο (το οποίο στην πραγματικότητα, όπως παρατηρήθηκε αργότερα στην εκχύλιση του είναι σκούρο μωβ), το χρώμα που διαθέτουν (Κυτρίδης, 2008, pp. 1-2). Δείγματα μύρτιλου έδειξαν σε έρευνες πως το χρώμα τους διέφερε από μωβ-κόκκινο έως κόκκινο. Η περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνη φαίνεται να επηρεάζει επίσης σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα εκχύλισης χρωστικής κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. (Sapers, et al., 1984, p. 108)

Τα βατόμουρα περιέχουν επίσης βιταμίνη C, A, E και βιταμίνες του συμπλέγματος B. Η βιταμίνη C συμβάλλει στη σύνθεση του κολλαγόνου, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη βελτίωση της απορρόφησης του σιδήρου από τα τρόφιμα. Η βιταμίνη A είναι σημαντική για την υγεία των ματιών, την ανάπτυξη των κυττάρων και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η βιταμίνη E προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και βοηθά στη διατήρηση της υγείας του δέρματος και των ματιών. Σχετικά με τις βιταμίνες του συμπλέγματος B όπως η B6 η οποία είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών, και το φολικό οξύ (βιταμίνη B9), το οποίο είναι σημαντικό για την κυτταρική διαίρεση και την παραγωγή του DNA. Τέλος, τα βατόμουρα είναι καλή πηγή βιταμίνης K, η οποία είναι απαραίτητη για την πήξη του αίματος και την υγεία των οστών. Η επαρκής πρόσληψη βιταμίνης K συμβάλλει στην πρόληψη της οστεοπόρωσης και στη διατήρηση της υγείας του καρδιαγγειακού συστήματος (Γιαννακοπούλου, 2009, p. 7).

3.1 Μύρτιλο

Εικόνα 1. Μύρτιλα (πηγή:vita4you)

Τα μύρτιλα ή αλλιώς blueberries ανήκουν στην οικογένεια των Ερεικοειδών. Συγκεκριμένα η επιστημονική τους ονομασία είναι *Vaccinium myrtillus* (Βακκίνιον ο μύρτιλλος). Το είδος αυτής της καλλιέργειας εξημερώθηκε τον 20ό αιώνα. Τα μύρτιλα μπορούν να καλλιεργηθούν σε όξινα, ελάχιστα στραγγιζόμενα αμμώδη εδάφη, τα οποία κάποτε θεωρούνταν ακατάλληλα για γεωργική παραγωγή (Ratnaparkhe, 2007, pp. 217-218).

Η Βόρεια Αμερική είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός βατόμουρων. Η συνολική έκταση που αφιερώνεται στην εμπορική καλλιέργεια βατόμουρου στη Βόρεια Αμερική είναι περίπου 74 000 εκτάρια. Τα μύρτιλα είναι η πλουσιότερη πηγή αντιοξειδωτικών μεταξύ των φρέσκων φρούτων και λαχανικών. Συγκεκριμένα τα φρέσκα μύρτιλα αποτελούν καλή πηγή βιταμίνης A,C,E ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν Β-καροτίνη, σάκχαρα, κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορο, ανόργανα οξέα, μεταλλικά άλατα, πηκτίνη και φυτικές ίνες. Τα μύτριλα έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες ότι όταν εντάσσονται στην καθημερινή διατροφή, εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

3.2 Σμέουρα

Το σμέουρο γνωστό και ως Raspberry έχει επιστημονική ονομασία *Rubus ideaus* (βάτος η ιδιαία) και αποτελεί άγριο φυτό. Τα σμέουρα περιέχουν διάφορα θρεπτικά συστατικά όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, βιταμίνη C και A. διαθέτουν υψηλή διατροφική αξία μιας και είναι πλούσια σε ανθοκυανίνες και φαινόλες, οι οποίες όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα μούρα δίνουν τα υψηλότερα ποσοστά φυτικών ινών. Σύμφωνα με έρευνες, τα σμέουρα μπορούν να συμβάλουν στην μείωση των καρκινικών κυττάρων σε γυναίκες που έχουν προσβληθεί με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Zhaoxia Zhang, et al., 2011, p. 401).

Εικόνα 2. Σμέουρα (πηγή: froutopia.com)

3.3 Μαύρο Βατόμουρο

Τα βατόμουρα γνωστά και ως blackberry αποτελούν φρούτα χαμηλής ενέργειας ενώ αποτελείται κυρίως από φυσικούς υδατάνθρακες και διαιτητικές φυτικές ίνες. Διαθέτουν αμελητέες ποσότητες χοληστερόλης και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων αλλά και χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο. Συγκριτικά με τα σμέουρα περιέχουν υψηλότερες ποσότητες καροτένιου αλλά ισοδύναμες ποσότητες ρετινόλης, ενώ σε σχέση με το μύρτιλο περιέχει διπλάσιες ποσότητες βιταμίνης C.

Εικόνα 3. Βατόμουρο (πηγή:alekati.gr)

Τα βατόμουρα φαίνεται να χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για την καταπολέμηση ασθενειών. Στην αρχαία Ελλάδα, αποτελούσε φάρμακο κατά της αρθρίτιδας ενώ στην Κίνα κατά τις ασθένειες που σχετίζονται με τα νεφρά. Σήμερα, τα βατόμουρα αξιοποιούνται για της αντιοξειδωτικές ισχυρές ιδιότητές τους, κατατάσσοντάς τα ψηλά στις θέσεις των φυτικών αντικαρκινικών τροφών (Χαλαστάρα, 2019, p. 5).

4.Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν πολυφαινολικές χρωστικές οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και είναι υπεύθυνες για τα χρώματα από το κόκκινο-πορτοκαλί έως το μπλε-ιώδες. Τα χρώματα αυτά τα συναντάμε σε φρούτα, άνθη και φύλλα. Οι ανθοκυανίνες συνήθως εμφανίζονται με την γλυκοζυλιωμένη τους μορφή διότι οι αγλυκόνες τους, δηλαδή η μη γλυκοζυλιωμένη μορφή, είναι ασταθείς.

Οι ανθοκυανίνες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των επιδράσεων που μπορεί να έχουν στην ανθρώπινη υγεία, είτε με την μορφή της πρόληψης είτε με την μορφή θεραπείας. Μπορεί η βιοδιαθεσιμότητά τους να είναι λιγότερο από 1%, η κατανάλωσή τους όμως είναι άμεσα συνδεδεμένη με διάφορα οφέλη στην υγεία, όπως για παράδειγμα η αντιφλεγμονώδης δράση. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες έχουν την ικανότητα να απορροφώνται άμεσα από τον οργανισμό αλλά και να αλληλοεπιδρούν με τα αγγειακά κύτταρα του εγκεφάλου.

Παρόλο που δεν ανήκουν στην κατηγορία των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για τον ανθρώπινο οργανισμό, οι ανθοκυανίνες ίσως και να προάγουν την υγεία. Η τακτική τους κατανάλωση μέσα από φρούτα και λαχανικά μπορεί να προσφέρει προστασία έναντι σημαντικών χρόνιων και μη παθήσεων. Οι ανθοκυανίνες μπορεί να βρεθούν στα μούρα, το κρασί, τα σταφύλια καθώς και τα κόκκινα/μωβ λαχανικά. (Wallace & Giusti, 2015, p. 621)

5. Προετοιμασία δειγμάτων

Για να μπορέσει να ξεκινήσει το ερευνητικό κομμάτι της εργασίας ήταν απαραίτητη η ορθή προετοιμασία των τριών δειγμάτων. Αρχικά αγοράστηκαν από την ίδια υπεραγορά συσκευασίες βιολογικής καλλιέργειας

μύρτιλου, σμέουρου και βατόμουρου, προσπαθώντας με αυτόν τον τρόπο να αποφευχθούν όσο το δυνατόν περισσότερο παράγοντες, όπως ο διαφορετικός τρόπος επεξεργασίας των φρούτων, που θα επηρέαζαν τα μελλοντικά αποτελέσματα.

Γνωρίζοντας πως το πρώτο βήμα θα ήταν η εκχύλιση των δειγμάτων, ακολούθησε η αποξήρανση των φρούτων. Αποξήρανση ονομάζεται η τεχνική αφαίρεση του νερού από τους ιστούς, έτσι ώστε να διατηρούν το αρχικό σχήμα χρώμα και υφή παρόλη την πάροδο του χρόνου (Βόγλη & Νάσιου, 1999, p. 8). Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί είτε αφήνοντας τα για τουλάχιστον δυο εβδομάδες στον ήλιο είτε βάζοντάς τα στο φούρνο σε χαμηλή θερμοκρασία για μερικές ώρες. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ακολουθήθηκε ο δεύτερος τρόπος, τοποθετώντας 8 από το κάθε φρούτο και βάζοντας τα στο φούρνο στους 150°C για 6 ώρες. Η τελική μορφή των δειγμάτων ήταν σαν αυτή της σταφίδας.

Στη συνέχεια με την χρήση γουδιού, λιώσαμε κάθε δείγμα χωριστά μέχρι να δημιουργηθεί μια «πάστα» την οποία μεταφέραμε και τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένο ονοματισμένο δοχείο. η ιδανική μορφή τον δειγμάτων θα έπρεπε να είναι σκόνη και όχι πάστα για την μεγαλύτερη διευκόλυνση της εκχύλισης. Όμως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των δειγμάτων σε νερό, αυτό ήταν αδύνατο. Παρόλα αυτά η εκχύλιση έγινε κανονικά χωρίς να παρουσιάζεται εν τέλη καμία δυσκολία.

6. Εργαστηριακό μέρος

6.1 Μέθοδος Εκχύλισης

Για να επιτευχθεί η μελέτη των αντιοξειδωτικών παραγόντων στο μύρτιλο, το μαύρο και το κόκκινο βατόμουρο είναι απαραίτητη η εκχύλιση τους, δηλαδή η απόσπαση των φαινολών, αρωματικών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση (Κατικαρίδου, 2017, p. 35). Κατά την διαδικασία της εκχύλισης τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf 50 mg αποξηραμένου μύρτιλου, μαύρου και κόκκινου βατόμουρο ξεχωριστά. Η μέτρηση της ποσότητας έχει με την χρήση σπάτουλας σε αναλυτικό ζυγό για μεγαλύτερη ακρίβεια. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε στη θέση του διαλύτη μεθανόλη- νερό σε αναλογία 80:20. Σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 16 mL μεθανόλης και 4 mL υπερκαθαρού νερού από την HPLC. Προστέθηκαν στη συνέχεια 500 μL σε κάθε ένα από τα τρία Eppendorf από τα δείγματα με την βοήθεια πιπέτας 100-1000 μL. Κατόπιν τα δείγματα αναμείχθηκαν στο Vortex για 30sec με σκοπό την ομογενοποίηση τους. Ακολούθως χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων όπου τα Eppendorf αφέθηκαν για 10min. Στο λουτρό υπερήχων δημιουργούνται δονήσεις υψηλής συχνότητας οι οποίες προκαλούν μικροκρουστικά κύματα και τοπικές θερμοκρασίες και πιέσεις. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η περαιτέρω ανάδευση των δειγμάτων. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 5500 στροφές. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρηση και περιέχει τις επιθυμητές αντιοξειδωτικές ενώσεις συλλέγεται και τοποθετείται σε καινούργια Eppendorf, τα οποία έχουμε ονομάσει αντίστοιχα με τα δείγματα. Τα Eppendorf που περιέχουν πλέον το υπερκείμενο φυλάσσονται στην κατάψυξη.

Μετά την διαδικασία της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε στα δείγματα μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP).

ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Αναλυτικός ζυγός KERNABJ-NM/ABS-N
- Πιπέτες 20-200 μL, 100-1000 μL
- Eppendorf
- Δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες
- Ποτήρι ζέσεως 1000 μL
- Vortex
- Φυγόκεντρος
- Λουτρό υπερήχων
- Μεθανόλη (CH_3OH)
- Υπερκαθαρό νερό (H_2O)

6.1.1 Επιλογή διαλύτη για εκχύλιση

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες για μια τέτοια διαδικασία είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διαλύονται στο νερό. Εκτός από αυτούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί γλυκερίνη και τα υδατικά διαλύματα κυκλοδεξτρινών. Συνήθως για την εκχύλιση χρησιμοποιείται μεθανόλη ή αιθανόλη. Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθεί ότι οι συμβατοί διαλύτες μπορεί να εκχυλίσουν και άλλες ουσίες εκτός από τις επιθυμητές, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την απόδοση των αντιοξειδωτικών. Για μεγαλύτερη απόδοση μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα είτε σε μίγματα (Αγγάνη, 2023, p. 23).

6.2 Μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP)

Η Μέθοδος FRAP (Ferric-Reducin g Antioxidant Power) αξιολογεί την αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων μέσω της μείωσης του συμπλόκου σιδήρου (Fe^{3+}) σε σίδηρο (Fe^{2+}). Στη διαδικασία αυτή, το δείγμα αναλύεται αφού διαλυθεί σε απιονισμένο νερό και αναμιχθεί με το αντιδραστήριο FRAP, το οποίο περιέχει διάλυμα οξικού ρυθμιστικού διαλύματος, TPTZ και FeCl3. Μετά από επώαση στους 37°C για 30 λεπτά, η απορρόφηση μετράτε στα 593 nm. Όσο εντονότερο το χρώμα του δείγματος τόσο μεγαλύτερη θα εμφανίζεται η αντιοξειδωτική του ικανότητα (Zorzi, et al., 2020, p. 3).

Όργανα

- Επωαστικός κλίβανος WTCbinder
- Αναλυτικός ζυγός KERNABJ-NM/ABS-N
- Δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες
- Eppendorf
- Ποτήρια ζέσεως 1000 μL
- Πιπέτες 20:200, 100:1000 μL
- Ρύγχη για πιπέτες των 20:200 μL και 100:1000 μL
- Φωτόμετρο Ultrospectre 2100 pro

- Κυψελίδες
- Vortex

Αντιδραστήρια (για το ρυθμιστικό διάλυμα/ buffer οξικού οξέος 300 Mm με pH =3,6)

- Υπερκαθαρό H_2O για HPLC
- Καθαρό CH_3COOH
- Ένυδρο CH_3COONA $3H_2O$

Σε 98,4 mL υπερκαθαρού νερού προσθέτουμε 1,6 mL CH_3COONa και 0,31 g CH_3COONa και αποθηκεύουμε στο ψυγείο.

Αντιδραστήρια (για το διάλυμα TPTZ 100 Mm)

- TPTZ
- Καθαρό HCH

Σε 6,7 mL νερού προσθέτουμε 3,3mL καθαρό HCl και 0.312 g TPTZ και αποθηκεύουμε στο ψυγείο.

Αντιδραστήρια (για το διάλυμα $FeCl_3$ $6H_2O$ 200 mM)

- Καθαρό ένυδρο $FeCl_3$ $6H_2O$

Σε 10 mL υπερκαθαρού H_2O προσθέτουμε 0,54 g $FeCl_3$ $6H_2O$ και αποθηκεύουμε στο ψυγείο.

Αντιδραστήρια (για την πρότυπη καμπύλη ένυδρου $FeSO_47H_2O$ 3 mM)

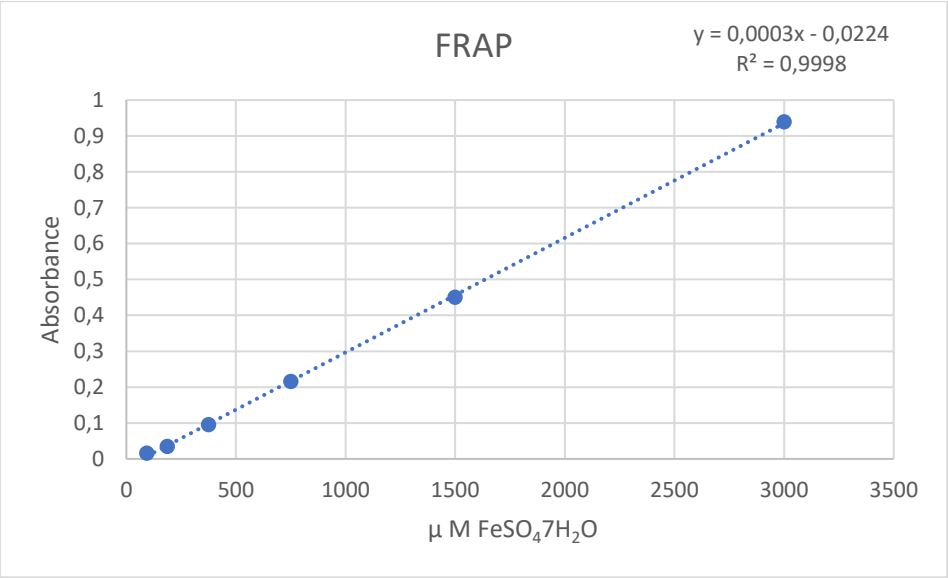
- Καθαρό ένυδρο $FeSO_47H_2O$

Σε 20,38 mL H_2O προσθέτουμε 0,01 g $FeSO_47H_2O$

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις 1:2 σε σωληνάρια Eppendorf από το αρχικό πυκνό διάλυμα $FeSO_47H_2O$ από 3000 μM έως 93,75 μM
2. Προστέθηκαν 40 μL $FeSO_47H_2O$ και 40 μL H_2O για το τυφλό σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα
3. Σε διαφορετικούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 1,2 mL αντιδραστηρίου FRAP (200 μL $FeCl_3$, 200 μL TPTZ, 3600 μL H_2O, 20 mL Buffer)
4. Ανάδευση σε vortex
5. Επώαση δοκιμαστικών σωληναρίων για 5 λεπτά στους 40^oC σε επωαστικό κλίβανο
6. Μεταφορά δειγμάτων από δοκιμαστικούς σωλήνες σε κυψελίδες
7. Φωτομέτρηση σε λ=593 nm



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη μεθόδου FRAP

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα δείγματα Μύρτιλου, μαύρου και κόκκινου βατόμουρου:

1. Έγινε εκ νέου η διαδικασία ίδια με αυτή της πρότυπης καμπύλης αλλά προστέθηκαν 40 μL υπερκείμενο διάλυμα από την εκχύλιση των δειγμάτων αντί για διάλυμα $FeSO_4$
2. Για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε όμως αραίωση των δειγμάτων 1:5 με νερό (800 μL H_2O και 200 μL δείγματος)
3. Με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος (όπου y βάζουμε την αντίστοιχη τιμή απορρόφησης). Για την εύρεση της συγκέντρωσης θα πρέπει να πολλαπλασιάσουμε στο τέλος με 5 καθώς έχει προηγηθεί η αραίωση 1:5, με στόχο την αντιστοίχιση στην αρχική τιμή.

Πίνακας 1. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων και συγκεντρώσεις ύστερα από υπολογισμούς κάθε δείγματος

Δείγμα	**A1**	**A2**	**Μέσος όρος**	**C(ppm)**
101 (raspberry)	0,294	0,318	0,306	5473,3
102 (blueberry)	0,451	0,452	0,451	7890
103 (blackberry)	0,183	0,256	0,219	4023,3

6.3 Μέθοδος μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC)

Η μέθοδος Μέτρησης Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC) βασίζεται κυρίως στη δοκιμασία Folin-Ciocalteu, η οποία είναι γνωστή για την απλότητα και την αναπαραγωγισιμότητά της. Η ανάλυση Folin-Ciocalteu περιλαμβάνει την αναγωγή του αντιδραστηρίου που περιέχει σύμπλοκα φωσφομολυβδικού και φωσφοτουγγικού οξέος από τις φαινολικές ενώσεις, παράγοντας ένα μπλε χρώμα στο διάλυμα με μέγιστη

απορρόφηση στα 765 nm. Το αποτέλεσμα συνήθως εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ή άλλων φαινολικών ενώσεων όπως η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ ή το φερουλικό οξύ. Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως ευαισθησία στο pH, τη θερμοκρασία και τον χρόνο αντίδρασης, καθώς και πιθανή αναγωγή του αντιδραστηρίου από μη φαινολικά αναγωγικά στοιχεία (Αγγάνη, 2023, p. 23).

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός KERNABJ-NM/ABS-N
- Δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες
- Eppendorf
- Ποτήρια ζέσεως 1000 μL
- Πιπέτες 20:200, 100:1000 μL
- Ρύγχη για πιπέτες των 20:200 μLκαι 100:1000 μL
- Φωτόμετρο Ultrospect 2100 pro
- Κυψελίδες
- Vortex

Αντιδραστήρια (για το διάλυμα folin-ciocalteu 1N)

- Πυκνό διάλυμα Folin-Ciocalteu 2N
- Υπερκαθαρό H_2O HPLC

Προσθέτουμε ίση ποσότητα πυκνού διαλύματος και υπερκαθαρού νερού

Αντιδραστήρια (για διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 35%

- Πέρλες ανθρακικού νατρίου
- Υπερκαθαρό νερό HPLC

Ζυγίζουμε σε ζυγό 8,7 g Na_2CO_3 και το διαλύουμε, με τη βοήθεια υπέρηχων, σε 25mL υπερκαθαρού H_2O HPLC.

Αντιδραστήρια (για την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος)

- Γαλλικό οξύ
- Καθαρή μεθανόλη HPLC

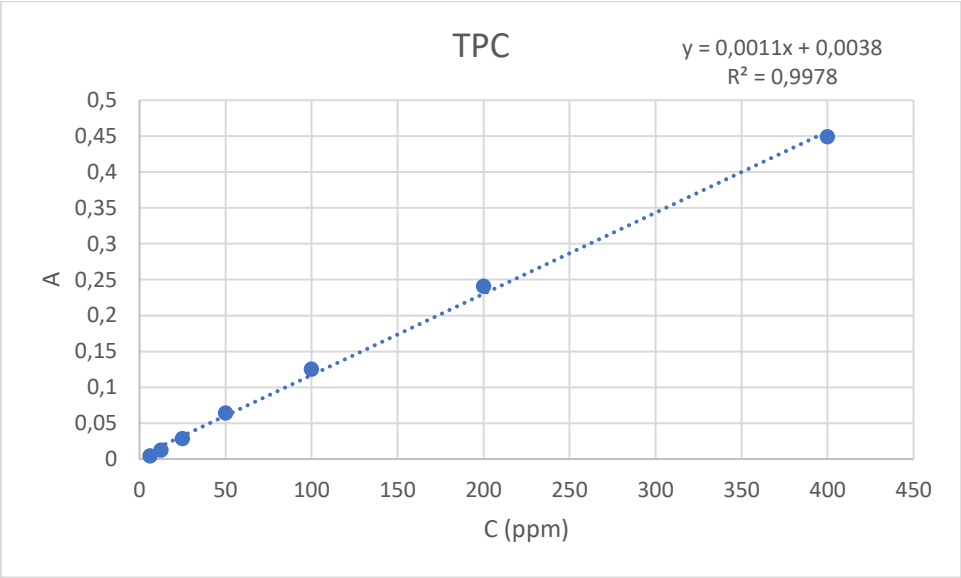
Σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζουμε 4 mg Γαλλικού οξέος και τα διαλύουμε σε 10mL καθαρής μεθανόλης.

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Για την πρότυπη καμπύλη ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Πραγματοποιήθηκαν 6 διαδοχικές αραιώσεις 1:2, σε Eppendorf, από αρχικό πυκνό διάλυμα Γαλλικού οξέος 400 ppm ή μ g/mLέως 0,0045 ppm ή μ g/mL

2. Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 100 μL από κάθε αραίωση του του Γαλλικού οξέος και στο τυφλό ίση ποσότητα H_2O
3. Προσθήκη στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 2500 μL H_2O
4. Προσθήκη στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 250 μLF-C
5. Ανάδευση σε vortex
6. Επωάζουμε τα γυάλινα σωληνάρια για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Προσθέτουμε στα σωληνάρια 500 μL Na_2CO_3
8. Προσθέτουμε στα σωληνάρια 1650 μL H_2O
9. Επωάζουμε για 60 λεπτά
10. Προσθήκη περίπου 1100 μL σε κάθε κυψελίδα
11. Φωτομέτρηση σε λ=725 nm



Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη μεθόδου μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC)

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών ενώσεων στα δείγματα μύρτιλου, μαύρου και κόκκινου βατόμουρου Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα δείγματα Μύρτιλου, μαύρου και κόκκινου βατόμουρου:

1. Έγινε εκ νέου η διαδικασία ίδια με αυτή της πρότυπης καμπύλης αλλά προστέθηκαν 50 μL υπερκείμενο διάλυμα από την εκχύλιση των δειγμάτων.
2. Σε 2 σωληνάρια για κάθε δείγμα προστέθηκαν 50 μL αντίστοιχα.
3. Προσθήκη 1250 μL H_2O HPLC και 125 μL Folin 1N.
4. Ανάδευση σε vortex για 3 λεπτά.
5. Προσθήκη 250 μL Na_2CO_3 35% και 825 μL H2O HPLC.
6. Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φωτομέτρηση σε λ=725 nm.

8. Για την δημιουργία τυφλού ακολουθείτε η ίδια διαδικασία αλλά αντί για 50 μL δείγματος, προσθέτουμε υπερκαθαρό νερό ίδιας ποσότητας.
9. Για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε όμως αραίωση των δειγμάτων 1:5 με νερό (800 μL H_2O και 200 μL δείγματος).
10. Με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος (όπου y βάζουμε την αντίστοιχη τιμή απορρόφησης). Για την εύρεση της συγκέντρωσης θα πρέπει να πολλαπλασιάσουμε στο τέλος με 5 καθώς έχει προηγηθεί η αραίωση 1:5, με στόχο την αντιστοίχιση στην αρχική τιμή.

Πίνακας 2. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων και συγκεντρώσεις ύστερα από υπολογισμούς, κάθε δείγματος

Δείγμα	**A1**	**A2**	**Μέσος όρος**	**C (ppm)**
101(raspberry)	0,174	0,178	0,176	782,5
102(blueberry)	0,294	0,313	0,303	1360
103(blackberry)	0,278	0,304	0,291	1305,5

6.4 Μέθοδος για την δραστικότητα αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο δέσμευσης ελεύθερων ριζών DPPH

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH, που είναι σταθερές και εμφανίζονται με έντονο μωβ χρώμα. Η DPPH είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα με μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm. Όταν αντιδρά με ένα αντιοξειδωτικό, δέχεται ένα άτομο υδρογόνου και μετατρέπεται σε DPPH-H, η οποία είναι αποχρωματισμένη. Η μείωση στην απορρόφηση του διαλύματος είναι ανάλογη της αντιοξειδωτικής δραστικότητας του δείγματος (Khalaf , et al., 2008, p. 53).

Όργανα-αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο DPPH.
- Μεθανόλη.
- Φωτόμετρο.
- Ζυγαριά ακριβείας.
- Πιππέτα 20-200 μL, 100-1000 μL.
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Ποτήρι ζέσεως.
- Δείγματα από βατόμουρο, σμέουρο και μύρτιλο.

Διαδικασία:

1. Προετοιμάζουμε το διάλυμα DPPH, ζυγίζοντας 5 mg και διαλύοντας σε 30 mL MeOH και το φωτομετρούμε σε 517 nm καθώς θέλουμε επιθυμητή απορρόφηση από 0,8 μέχρι 1,2.
2. Το τυφλό για την φωτομέτρηση είναι η μεθανόλη.

3. Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε 30 μL από κάθε δείγμα χωριστά, και 1020 μL DPPH.
4. Αναδεύουμε καλά με την βοήθεια της πιπέτας και τοποθετούμε τους σωλήνες σε ένα μέρος με πλήρες σκοτάδι για 1 ώρα.
5. Μετά την 1 ώρα παρατηρούμε ότι έχει αλλάξει το χρώμα των διαλυμάτων και φωτομετρούμε στα 517 nm.
6. Την απορρόφηση του κάθε δείγματος τοποθετούμε μετά στην εξίσωση: Percent (%) inhibition of DPPH activity = $\frac{A_C - A\delta}{A_C} \times 100$. Με αυτή την εξίσωση βρίσκουμε το ποσοστό αναστολής. Ένα υψηλό ποσοστό αναστολής δείχνει την υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα δηλαδή το δείγμα είναι πολύ αποτελεσματικό στη δέσμευση ελεύθερων ριζών DPPH, ενώ το χαμηλό ποσοστό δείχνει την μικρή δέσμευση ελεύθερων ριζών.

Μετά το πέρας της μίας ώρας παρατηρήσαμε πως το χρώμα των διαλυμάτων μας στους δοκιμαστικούς σωλήνες είχε αλλάξει και από σκούρο μωβ είχε μετατραπεί σε κίτρινο. Αυτό από μόνο του υποδεικνύει την υψηλή περιεκτικότητα των δειγμάτων μας, αλλά το επαλήθευσε και η φωτομέτρηση που ακολούθησε.

Πίνακας 3. Απορροφήσεις και ποσοστά αναστολής κάθε δείγματος που βρέθηκε μετά από υπολογισμούς.

ΔΕΙΓΜΑ	**ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ**	**ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ**
101 (raspberry)	0.073	91,22%
102 (blueberry)	0.068	91,8%
103 (blackberry)	0.073	91,22%

Επειδή όμως ψάχνουμε την μικρότερη συγκέντρωση όπου εμφανίζεται οξειδωτική δράση χρειαζόμαστε απορρόφηση κοντά σε αυτή του διαλύματος DPPH και ποσοστό αναστολής ίσο περίπου με 50%. Από ότι φαίνεται για να υπάρχει τόσο υψηλό ποσοστό αναστολής τα δείγματά μας είναι πυκνά. Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν διαδοχικές αραιώσεις συγκεντρώσεων 50 Mm, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM, 3,125 mM.
Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

Πίνακας 4. Απορροφήσεις δειγμάτων ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	**50 mM**	**25 mM**	**12,5 mM**	**6,25 mM**	**3,125 mM**
101	0,404	0,613	0,681	0,756	0,790
102	0,295	0,487	0,608	0,830	0,759
103	0,246	0,469	0,746	0,723	0,730

Πίνακας 5 Ποσοστά αναστολής κάθε απορρόφησης των παραπάνω διαδοχικών αραιώσεων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	**50 mM**	**25 mM**	**12,5 mM**	**6,25 mM**	**3,125 mM**
101	51%	26,3%	18,1%	9,1%	4,2%
102	64,5%	41,4%	26,9%	20%	8,7%

103	70%	43,6%	10,3%	13,1%	12,2%

6.5 Δοκιμή αποχρωματισμού κατιόντος ριζών ABTS

Η μέθοδος αποχρωματισμού κατιόντος ριζών ABTS βοηθά στην αναγνώριση της ύπαρξης αντιοξειδωτικής ικανότητας στο δείγμα μας. Με την μέθοδο αυτή μετριέται η ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών, δηλαδή μόρια που βλάπτουν τα ανθρώπινα κύτταρα και μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Όσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος τόσο μεγαλύτερη είναι και η προστασία από τα μόρια αυτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή πολλαπλών ασθενειών που οφείλονται στην οξείδωση των κυττάρων όπως ο καρκίνος. Στη συγκεκριμένη μέθοδο συγκρίνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων με αυτή του Trolox, ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό παρόμοιο με την βιταμίνη Ε. Με την βοήθεια του Trolox θα δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη, στην οποία θα βασίσουμε στην συνέχεια τα δείγματά μας.

Όργανα-αντιδραστήρια

- Διάλυμα Trolox(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ).
- ABTS (2,2’-azinobis(3-ethylbenzothia zoline-6-sulfonic acid) diammonium salt).
- Υπερθειικό κάλιο.
- Μεθανόλη (HPLC).

Για την προετοιμασία των διαλυμάτων (Biskup, et al., 2013, pp. 2-3).

1. **Διάλυμα Trolox**
   - Προετοιμάστε απόθεμα 2.5 mM σε αιθανόλη.
   - Ετοιμάστε τα πρότυπα εργασίας καθημερινά με αραίωση σε αιθανόλη.

2. **Διάλυμα ABTS**
   - Διαλύστε το ABTS και το υπερθειικό κάλιο σε απεσταγμένο νερό ποσότητας 25 mL με τελικές συγκεντρώσεις 96 mM και 14,58 mM αντίστοιχα.
   - Αναμειγνύουμε το διάλυμα και το αφήνουμε για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου να επωαστεί σε πλήρες σκοτάδι.

     Αραιώστε το παραγόμενο διάλυμα ριζών ABTS με απεσταγμένο νερό ώστε να επιτευχθεί απορρόφηση 1.00 στα 734 nm.

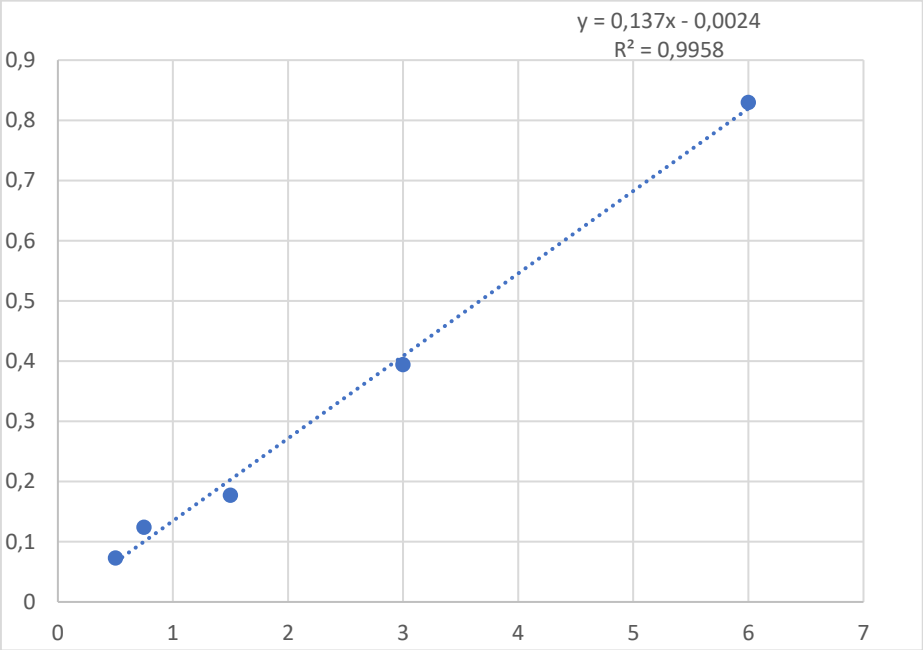
Διαδικασία Δοκιμής

1. Όταν περάσουν οι 16 ώρες αραιώνουμε το διάλυμα του ABTS, το οποίο έχει σκούρο μπλε χρώμα, με απεσταγμένο νερό. Αυτό πραγματοποιείται καθώς επιθυμούμε η απορρόφηση να είναι κοντά στο 1 στα 734 nm.
2. Τοποθετούμε ποσότητα περίπου 1 mL στην κυψελίδα από το διάλυμα ABTS και φωτομετρούμε στα 734 nm.

3. Για τα δείγματά μας προσθέτουμε 20 μL σε δοκιμαστικούς σωλήνες από κάθε δείγμα ξεχωριστά και 1 mL από το διάλυμα ABTS.
4. Τοποθετούμε τα 3 σωληνάρια (έχουμε τρία δείγματα, μύρτιλο, κόκκινο, μαύρο βατόμουρο) στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και περιμένουμε 5 λεπτά.
5. Μετά το πέρας των 5 λεπτών φωτομετρούμε τα δείγματα στο ίδιο μήκος κύματος
6. Για το τυφλό χρησιμοποιούμε αιθανόλη όπως Προσθέστε τα δείγματα των φαινολών (τελικές συγκεντρώσεις 0.0001-0.01 mg/mL) ή πρότυπα Trolox (τελικές συγκεντρώσεις 0-20 mM) στο αραιωμένο διάλυμα ριζών ABTS.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η ικανότητα των φαινολών να εξουδετερώνουν το 50% των ελεύθερων ριζών ABTS (IC50) και η ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (TEAC).

Σχόλια: φτιάχνουμε 2 ίδια σωληνάρια για το κάθε δείγμα επιθυμώντας να παρατηρήσουμε την ύπαρξη ή μη επαναληψιμότητας.



Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη διαλύματος Trolox.

Πίνακας 6. Απορροφήσεις, μέσος όρος απορροφήσεων, διαφορά απορρόφησης δείγματος και control και συγκεντρώσεις κάθε δείγματος που βρέθηκαν ύστερα από υπολογισμούς

ΔΕΙΓΜΑ	**A1**	**A2**	**Μέσος όρος**	**A_C-A**	**C(ppm)**
A_c	1,198	-			
101	0,479	0,450	0,464	0,622	4,5
102	0,524	0,553	0,538	0,660	4,8
103	0,426	0,398	0,412	0,674	4,9

Για να βρούμε τη συγκέντρωση αντικαθιστούμε στην εξίσωση της πρότυπης καμπύλης όπου y την αντίστοιχη απορρόφηση.

7.Συμπεράσματα

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην μείωση των ιόντων σιδήρου και βοηθά στην αναγνώριση παρουσίας ή μη αντιοξειδωτικών στο δείγμα μας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση του δείγματος, τόσο υψηλότερη μπορεί να θεωρηθεί η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Αφού έγιναν οι απαραίτητες πράξεις για την εύρεση των συγκεντρώσεων σε κάθε δείγμα παρατηρούμε ότι το blueberry με την χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση, ακολουθεί το raspberry και στο τέλος βρίσκεται το blackberry (πίνακας 1.). Στη μέθοδο FRAP όταν προστεθεί ένα αντιοξειδωτικό δείγμα, τα αντιοξειδωτικά συστατικά του μειώνουν τα ιόντα του σιδήρου ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$), δωρίζοντας του ηλεκτρόνια.

Στο πείραμά μας παρατηρήθηκε αλλαγής το χρώμα των δειγμάτων μας. Αρχικά το αντιδραστήριο της FRAP είχε κίτρινο χρώμα, με την προσθήκη των τριών δειγμάτων όμως το χρώμα μετατράπηκε άμεσα σε μπλε. Η αλλαγή αυτή αποτελούσε την πρώτη ένδειξη ότι το blueberry, το raspberry και το blackberry διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αυξημένη απορρόφηση ήταν η επόμενη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δύναμη των δειγμάτων, καθώς δείχνει την ποσότητα των παραχθέντων ιόντων Fe^{2+}. Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι οι αρχικές απορροφήσεις ήταν τόσο υψηλές που χρειάστηκε να γίνει αραίωση και στα τρία δείγματα έτσι ώστε εν τέλη οι απορροφήσεις να αντιστοιχούν στην πρότυπη καμπύλη. Η αραίωση στο τέλος πολλαπλασιάστηκε για την εύρεση της τελικής συγκέντρωσης.

Το αντιδραστήριο folin-ciocalteu όταν βρίσκεται μαζί με δείγμα που περιέχει φαινολικές ενώσεις, το αντιδραστήριο ανάγεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα οξέα να μειώνονται και να παράγεται ένα μπλε χρώμα. Όταν όμως προστεθεί το αλκαλικό διάλυμα, στην περίπτωσή μας το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) τότε ολοκληρώνεται η χημική αντίδραση και αποκτάτε το πλήρες και τελικό μπλε χρώμα (ενότητα 5.3).

Με την φωτομέτρηση στην πραγματικότητα μετράμε την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που έχουν παραχθεί. Στο πείραμά μας παρατηρούμε ότι και τα τρία δείγματα είχαν για άλλη μια φορά αναπτύξει ένα έντονο χρώμα το οποίο υποδεικνύει την μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα. Όμως από τα τρία δείγματα το blueberry παρουσίασε την μεγαλύτερη απορρόφηση (πίνακας 2.) άρα και την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τα άλλα δυο δείγματα από τα οποία το blackberry είχε ελάχιστα μικρότερη απορρόφηση από ότι το μύρτιλο.

Η DPPH είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα που εμφανίζει έντονο μωβ χρώμα και έχει μέγιστη απορρόφηση στα 517nm. Όταν αντιδρά όμως με ένα αντιοξειδωτικό το χρώμα μπορεί να μετατραπεί από μωβ σε κίτρινο ή άχρωμο. Όσο μεγαλύτερη η ποσότητα του αντιοξειδωτικού τόσο πιο έντονος θα είναι και ο αποχρωματισμός (ενότητα 5.4). Στην περίπτωσή μας παρατηρήσαμε ότι τα δείγματα είχαν λάβει ένα έντονο κίτρινο χρώμα. Μπορούμε εύκολα να συμπεράνουμε ότι η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων είναι ιδιαίτερα υψηλή. Τα υψηλά ποσοστά αναστολής ήταν μία ακόμα ένδειξη της δράσης τους αυτής, ενώ συμπληρωματικό ρόλο έπαιξαν και οι απορροφήσεις. Από τα αποτελέσματα (πίνακας 3.) παρατηρούμε πως το μύρτιλο είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής άρα και την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ το σμέουρο και το βατόμουρο εμφάνισαν ίσα ποσοστά.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις στην μέθοδο αποχρωματισμού κατιόντος ριζών ABTS (πίνακας 6.), τα δείγματα παρουσίασαν διαφορετικά επίπεδα αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αλλά με ελάχιστες διαφορές

μεταξύ τους, με το βατόμουρο να προηγείται του μύρτιλου για 0,1 ppm. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με βάση διάφορες συγκεντρώσεις του Trolox (διάγραμμα 3.) με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Αρχικά το ABTS διαθέτει ένα μπλε-πράσινο χρώμα. Με την προσθήκη των δειγμάτων όμως τα οποία διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα, το χρώμα του διαλύματος θα είναι πιο αχνό καθώς όλο και περισσότερες ελεύθερες ρίζες έχουν εξουδετερωθεί.

Στο συγκεκριμένο πείραμα και τα τρία δείγματα εμφάνισαν παρόμοια αλλαγή στο χρώμα, με αποτέλεσμα οι απορροφήσεις ήταν αυτές που βοήθησαν στην διεξαγωγή συμπεράσματος για την αντιοξειδωτική ικανότητα. Με την συγκεκριμένη μέθοδο λοιπόν σύμφωνα με τον πίνακα 6. παρατηρούμε ότι και τα τρία δείγματα εμφάνισαν πανομοιότυπες απορροφήσεις και συγκεντρώσεις, με το βατόμουρο να διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά, ακολουθεί το μύρτιλο και τελευταίο με ελάχιστη διαφορά είναι το σμέουρο.

8.Συζήτηση

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, εφαρμόστηκαν τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του φαινολικού περιεχομένου τριών δειγμάτων, εκείνο του μύρτιλου, του σμέουρου και του βατόμουρου. Με τις μεθόδους αυτές μπορεί να υπάρξει μια μερική εκτίμηση της διατροφικής τους αξίας και φυσικά της ικανότητάς τους να προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από το οξειδωτικό στρες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: η μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC), η μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP, η μέθοδος δέσμευσης ελεύθερων ριζών DPPH και η δοκιμή αποχρωματισμού κατιόντος ριζών. Τα δείγματα παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα της κάθε τεχνικής, με το βατόμουρο να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλες τις μεθόδους.

Στην μέθοδο TPC παρατηρήθηκε ότι το μύρτιλο (blueberry) 1360ppm περιέχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ακολούθησε το βατόμουρο (blackberry) 1305,5ppm και το σμέουρο (raspberry) 782,5ppm. Τα αποτελέσματα αυτά λοιπόν υποδηλώνουν ότι το μύρτιλο είναι πλουσιότερο σε φαινολικές ενώσεις, γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Η υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα των υπόλοιπων μεθόδων.

Στην μέθοδο FRAP επιβεβαιώθηκε η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα του μύρτιλου συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως το μύρτιλο είχε συγκέντρωση 7890 ppm, ενώ το σμέουρο 5473,3 ppm και το βατόμουρο 4023,3 ppm. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο τα αποτελέσματα δείχνουν την σημαντική ικανότητα του δείγματος να μειώνει τα ιόντα σιδήρου. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων της FRAP και της TPC καθορίζει την αξιοπιστία της μεθόδου για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αλλά και τονίζει την σημασία των φαινολικών ενώσεων ως παράγοντα που επηρεάζει άμεσα την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η μέθοδος DPPH που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών από αντιοξειδωτικά, έδειξε πως για ακόμα μια φορά το μύρτιλο έχοντας το υψηλότερο ποσοστό αναστολής έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή οξειδωτική

βλάβη στα κύτταρα όμως η ικανότητα του συγκεκριμένου δείγματος να τις εξουδετερώνει αποτελεί σημαντικό βήμα για την πρόληψη των σχετικών ασθενειών.

Σχετικά με την δοκιμή αποχρωματισμού κατιόντος ριζών ABTS αξίζει να αναφερθεί πως πρόκειται για μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο καθώς το διάλυμα του ABTS πρέπει να επωαστεί για 16 ώρες στο σκοτάδι. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχει ιδιαίτερη προσοχή να μην διαταραχθεί το περιβάλλον του για το διάστημα αυτό. Επιπλέον για το λόγο ότι το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο τα διάφορα στάδια μέχρι την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων πρέπει να γίνονται με ιδιαίτερη προσοχή και ταχύτητα. Η συγκεκριμένη μέθοδος. Στη συγκεκριμένη μέθοδο το βατόμουρο παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση αλλά με ελάχιστη διαφορά από το μύρτιλο, το οποίο κυριάρχησε σε όλες τις υπόλοιπες μεθόδους.

Η σχετική σταθερότητα των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις μεθόδους υποδεικνύει ότι το μύρτιλο (blueberry) είναι εξαιρετικά πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, το οποία βοηθούν στην πρόληψη των ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση του οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα στην παρούσα έρευνα ενισχύουν την υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναδεικνύει τα μούρα ως σημαντική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Κάτι τέτοιο μπορεί να αξιοποιηθεί από την βιομηχανία για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλισμάτων από τέτοιου είδους φρούτων , με σκοπό την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των διαφόρων προϊόντων.

Οφείλεται να αναφερθεί όμως ότι παρόλο που οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι αποδεκτές και αξιόπιστες, μπορεί εύκολα να επηρεαστεί η ακρίβειά τους από παράγοντες όπως οι συνθήκες μέτρησης, η καταλληλότητα των οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων των διαλυμάτων και των δειγμάτων. Ταυτόχρονα η δράση των αντιοξειδωτικών διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο αφομοίωσης και μεταβολισμού από τον κάθε οργανισμό.

Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης τονίζουν την σημασία της χρήσης πολλαπλών μεθόδων για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του μύρτιλου ως πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στην απομόνωση των αντιοξειδωτικών αυτών ενώσεων καθώς και στην βιοδιαθεσιμότητα τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αναφορές

Ζέκιαι , Α., 2024. *Επίδραση της διατροφής στο οξειδωτικό στρες,* s.l.: s.n.

Ριζοπούλου, Σ. και συν., 2015. ΚΕΦ 3 φωτοσύνθεση. Στο: *εργαστηριακές ασκήσεις φυσιολογίας φυτών.* s.l.:s.n., pp. 31-37.

Adamczyk-Szabela, D., Chrzescijanska, E., Zielenkiewicz, P. & Wolf, W. M., 2023. Antioxidant Activity and Photosynthesis Efficiency in Melissa officinalis Subjected to Heavy Metals Stress. *Molecules*, 14 March, 28(6), p. 12.

Aleksandar Rašković, και συν., 2014. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. July, Τόμος 14, p. 9.

Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A. & Sroka, Z., 2013. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig Med Dosw*, p. 6.

Florentine Marie-Chantal Ndoye Foe, και συν., 2016. Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7 April, Τόμος 16, p. 12.

Godlewska, K., Pacyga, P., Najda, A. & Michalak, I., 2023. Investigation of chemical constituents and antioxidant activity of biologically active plant-derived natural products. *molecules*, p. 77.

Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization. methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology,* pp. 1341-1544.

Jang, J.-H. & Lee, T.-J., 2023. Mechanisms of Phytochemicals in Anti-Inflammatory and Anti-Cancer. *International Journal of molecular sciences,* 24(9).

John Neustadt, N., 2006. WESTERN DIET AND INFLAMMATION. *Integrative Medicine*, 10(2), pp. 50-54.

Katsimbri, P. και συν., 2021. The Effect of Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacity of Diet on Psoriasis and Psoriatic Arthritis Phenotype: Nutrition as Therapeutic Tool?. *Antioxidants*, January, 10(2).

Khalaf , N. A. και συν., 2008. Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turkish Journal of Biology*, pp. 51-55.

Li, Z. και συν., 2018. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of 12 Cruciferous Vegetables. *Molecules*, May, 23(5), p. 16.

Montes, O., Vázquez-Hernández, A. & Fenton-Navarro, B., 2019. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects. *ΦΥΤΟΝ*, 88(1), pp. 1-10.

Muhammad Bilal Ahmed, και συν., 2022. Phytochemicals as chemo-preventive agents and signaling molecule modulators: current role in cancer therapeutics and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences,* p. 31.

Ratnaparkhe, M. B., 2007. Blueberry. Στο: *Fruits and Nuts.* s.l.:s.n., pp. 217-227.

Sapers, G. M. και συν., 1984. Color and Composition of Highbush Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, January, 9(1), pp. 105-111.

Stagos, D., 2019. Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants*, 24 December, 9(1), p. 7.

Tianru Jin, Zhuolun Song, Jianping Weng & I. George Fantus, 2018. Curcumin and other dietary polyphenols: Potential mechanisms of metabolic actions and therapy for diabetes and obesity. *American Journal of Physiology,* 314(3), pp. E201-E205.

Tiveron, A. P. και συν., 2012. Antioxidant activity of brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *International Journal of Molecular Sciences,* p. 15.

Wallace, T. C. & Giusti, M. M., 2015. Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, September, 6(5), pp. 620-622.

Zehiroglu, C. & Sarikaya, S. B. O., 2019. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food science and technology*, p. 4757–4774.

Zhaoxia Zhang, και συν., 2011. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. Στο: *Gynecologic Oncology.* s.l.:s.n., pp. 401-406.

Zorzi, M. και συν., 2020. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Small Berries. *Foods*, 21 April, 9(5).

Αγγάνη, Β., 2023. *Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από τον φλοιό του ροδιού με χρήση περιβαντολλογικά φιλικών διεργασιών,* s.l.: s.n.

Βόγλη, Έ. & Νάσιου, Χ., 1999. *Μέθοδοι αποξήρανσης άνθεων,* s.l.: s.n.

Γιαννακοπούλου, Ε., 2009. *Οξειδωτικό στρες- αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί,* s.l.: s.n.

Γκαναβιας, Λ., 2012. *Άσθμα από ασπιρίνη και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη,* s.l.: s.n.

Καλαντζή, Ε. & Κατωπόδης, Ι., 2010. *Αντιοξειδωτικά κίνδυνοι και οφέλη,* s.l.: s.n.

Κατικαρίδου, Ε., 2017. *Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς,* s.l.: s.n.

Κούκος, Α., 2000. *Καλλιέργεια βατόμουρου προοπτικές εξέλιξης,* s.l.: s.n.

Κυτρίδης, Φ. Β., 2008. *Πιθανοί ρόλοι των ανθοκυανινών στα φύλλα: Γιατί μερικά φύλλα συνθέτουν παροδικά ανθοκυανίνες και γιατί οι ανθοκυανίνες αυτές είναι πάντα κόκκινες,* s.l.: s.n.

Μανέτας, Γ., Γραμματικόπουλος, Γ., Πετροπούλου, Γ. & Ψαράς, Γ. Κ., 2015. ΚΕΦ2. Φωτοσύνθεση. Στο: *Εργαστηριακές ασκήσεις Φυσιολογίας Φυτών.* s.l.:s.n., pp. 29-54.

Χαλαστάρα, Α., 2019. *«Καρποί με το συνθετικό "berry" στην αγγλική δημώδη ονομασία τους:,* s.l.: s.n.