

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ



## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

### ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Μελέτη

*<< Αντιοξειδωτικές δράσεις από διάφορα φυσικά  
εκχυλίσματα >>*



Επιμέλεια:

Χριστόφορος Γρηγοράτος

Ιάκωβος Ψαροπουλος

Αθήνα, 2022

**<< Αντιοξειδωτικές δράσεις από διάφορα φυσικά  
εκχυλίσματα>>**

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την  
κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	
2	ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑΣ	
3	ΣΤΡΑΤΗ ΕΙΡΗΝΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

## Περιεχόμενα

1.1 Ελεύθερη Ρίζα .....	4
1.1.1Κυριότερα ΔΕΟ.....	5
1.1.2 Τρόπος σχηματισμού ελεύθερων ριζών .....	5
1.1.3 Δημιουργία Ελεύθερων Ριζών στον Οργανισμό μας.....	5
Φυσιολογικές διαδικασίες .....	6
Εξωτερικοί παράγοντες .....	6
1.1.4 Επίδραση ΔΕΟ στην υγεία .....	7
Μονοξειδίο του Αζώτου.....	7
Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.....	8
Δραστικές μορφές οξυγόνου .....	8
Ανιόν σουπεροξειδίου .....	9
Οξειδωτικό στρες .....	9
Υπεροξειδωση των λιπιδίων.....	10
Διαδικασία υπεροξειδωσης .....	11
Βλάβες σε DNA.....	11
Αποτελέσματα οξειδωτικής τροποποίησης DNA.....	12
Βλάβες στις πρωτεΐνες.....	13
1.2 Αντιοξειδωτικά.....	15
Ενζυμα με αντιοξειδωτική δράση.....	16
1.2.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες με μικρό μοριακό βάρος .....	18
1.2.2 Πολυφαινόλες.....	20
Κατηγορίες και Πηγές πολυφαινολών.....	21
Φλαβονοειδή .....	21
2.1 Καφές .....	23
2.1.1 Αντιοξειδωτικά στον Καφέ. Χημική Σύσταση του Καφέ .....	24
2.1.2 Αντιοξειδωτικά στον Καφέ .....	26
2.2 Δίκταμος.....	31
2.2.1 Χρήσεις του δίκταμου .....	32
2.2.2 Αντιοξειδωτική Δράση Δικτάμου .....	33
2.2.3 Αντιοξειδωτική Δράση Αιθέριου Έλαιου Δικτάμου .....	34

Συνοψίζοντας, ο δίκταμος αποτελεί ευεργετική ουσία για το βήχα, τον πονόλαιμο, τον πονοκέφαλο, το κοινό κρυολόγημα, για δερματικές παθήσεις, για παθήσεις εντέρου και στομάχου. ....	36
Η καλή αντιοξειδωτική του ικανότητα συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες το οποίο είναι υπεύθυνο για ασθένειες όπως διαβήτης, καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις. ....	36
2.3 Ρόδι ( <i>Punica granatum</i> ) .....	36
2.3.1 Ποικιλίες ροδιού .....	37
2.3.2 Αντιοξειδωτική δράση .....	43
2.4 Χαρούπι .....	45
2.4.1 Χαρακτηριστικά και επεξεργασία χαρουπιού .....	48
2.4.2 Αντιοξειδωτική δράση .....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: .....	53
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ .....	53
3.1 In vitro μοντέλα .....	53
3.1.1 Δραστηριότητα σάρωσης DPPH .....	53
3.1.2 Δοκιμασία σάρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	54
3.1.3 Δραστηριότητα δέσμευσης μονοξειδίου του αζώτου .....	55
3.1.4 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υπεροξυνιτρώδους .....	55
3.1.5 Μέθοδος ισοδύναμης αντιοξειδωτικής ικανότητας Trolox (TEAC)/Δοκιμασία αποχρωματισμού κατιόντων ριζών ABTS .....	56
3.1.6 Μέθοδος αντιοξειδωτικής παραμέτρου ολικής παγίδευσης ριζών (TRAP). ....	56
3.1.7 Δοκιμασία αναγωγικής-αντιοξειδωτικής ισχύος σιδήρου (FRAP). ....	57
3.1.8 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υπεροξειδίου (SOD) .....	57
3.1.9 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υδροξυλίου .....	57
3.1.10 Μέθοδος ικανότητας αποτροπής ριζών υδροξυλίου (HORAC). ....	58
3.1.11 Μέθοδος ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC). ....	58
3.1.12 Μέθοδος μείωσης ισχύος (RP) .....	58
3.1.13 Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου .....	59
3.1.14 Μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου (FTC) .....	59
3.1.15 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA). ....	59
3.1.16 Μέθοδος DMPD (N,N-διμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμινο διυδροχλωρική) .....	60
3.1.17 Μέθοδος β-καροτίνης λινολεϊκού οξέος/ προσδιορισμός συζευγμένου διενίου .....	60
3.1.18 Μέθοδος οξειδάσης ξανθίνης .....	61
3.1.19 Μέθοδος αντιοξειδωτικής ικανότητας μείωσης ιόντων χαλκού (CUPRAC). ....	61
3.1.20 Δραστηριότητα χηλικοποίησης μετάλλων .....	62

3.2 In vivo μοντέλα.....	62
3.2.1. Το σίδηρο μειώνει την ικανότητα του πλάσματος .....	62
3.2.2 Μειωμένη εκτίμηση γλουταθειόνης (GSH) .....	62
3.2.3 Εκτίμηση υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GSHPx).....	63
3.2.4 Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GSt) .....	63
3.2.5 Μέθοδος υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).....	64
3.2.6 Καταλάση (CAT).....	64
3.2.7 Δοκιμασία δραστικότητας γ-γλουταμυλο τρανπεπτιδάσης (GGT).....	64
3.2.8 Δοκιμασία αναγωγάσης γλουταθειόνης (GR).....	64
3.2.9 Δοκιμασία υπεροξειδωσης λιπιδίων (LPO).....	65
3.2.10 Δοκιμασία LDL.....	65
4.0 Συμπέρασματα .....	66
Βιβλιογραφία.....	68

### **Ευχαριστίες**

Σε αυτό το σημείο θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Αλίκη Τσάκνη, η οποία μας καθοδήγησε καθόλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας δίνοντας μας συμβουλές σε οποιαδήποτε απορία μας

Επίσης θα θέλαμε να ευαριστήσουμε την κα Δήμητρα Χούχουλα όπου σαν υπεύθυνη της πτυχιακής μας εργασίας μας έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθούμε με την ενδιαφέρουσα αυτή μελέτη

### **1.1 Ελεύθερη Ρίζα**

Τα μόρια αποτελούνται από ένα ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες οι όποιοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια τα όποια περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από το πυρήνα, στα λεγόμενα τροχιακά. Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα τροχιακά ζευγαρώνουν μεταξύ τους και περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Η περιστροφή αυτή ονομάζεται **spin**. Λόγω των ηλεκτρονίων που βρίσκονται σε ζευγάρια, το μόριο καθίσταται σταθερό και άρα με μικρή ενεργειακή κατάσταση, επομένως λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στο εξωτερικό τροχιακό του μορίου δεν είναι συνδεδεμένο με κάποιο άλλο, το μόριο γίνεται ασταθές, δραστικότερο. Το ηλεκτρόνιο αυτό ασκεί τεράστια έλξη στα γειτονικά ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα τη πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ των ατόμων ή των μορίων κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα άτομο. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι το σκούριασμα των μετάλλων, το όποιο οφείλεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα άζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία ονομάζεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Η παραπάνω μεταβίβαση ηλεκτρονίων από ένα μόριο σε ένα άλλο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας δεύτερης, τρίτης κοκ ελεύθερης ρίζας, καταλήγοντας σε μια αλυσιδωτή αντίδραση.

Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά ειδή με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Τα μοριακά ήδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο είτε είναι ελεύθερη ρίζα είτε όχι, ονομάζονται **δραστικά ειδή οξυγόνου (ΔΕΟ)**

### 1.1.1 Κυριότερα ΔΕΟ:

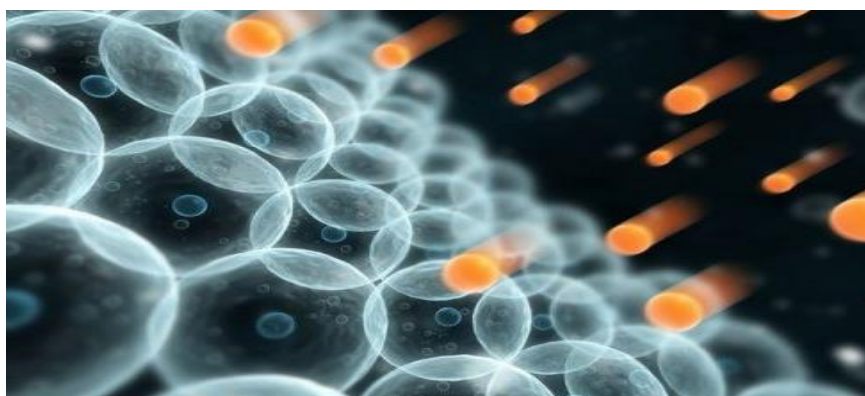
- Ρίζα σουπεροξειδίου
- Ρίζα υδροξυλίου
- Ρίζα υπεροξειδίου
- Οξυγόνο απλής κατάστασης
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου
- Υποχλωριώδες οξύ

Στα παραπάνω συμπεριλαμβάνονται και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου

### 1.1.2 Τρόπος σχηματισμού ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν με έναν από τους παρακάτω τρεις τρόπους :

- Ομοιοπολικές διασπάσεις
- Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με μεταφορά ηλεκτρονίου
- Από την αντίδραση ριζών με άλλες οργανικές ενώσεις



Εικόνα 1.1. Δημιουργία ελευθέρων ριζών

### 1.1.3 Δημιουργία Ελεύθερων Ριζών στον Οργανισμό μας

## Φυσιολογικές διαδικασίες

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι φυσιολογικές διαδικασίες εκ των οποίων παράγονται οι ελεύθερες ρίζες παραθέτονται παρακάτω:

- Η παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου ως παραπροϊόν κατά την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων.
- Μέσω της φυσιολογικής δράσης ορισμένων οξειδωτικών ενζύμων όπως για παράδειγμα των λιποξυγονάσεων, των κυκλοοξυγονάσεων, των υπεροξειδάσεων και των αφυδρογονάσεων κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενδημικών αντιδράσεων
- Η παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα
- Μέσω χημικών αντιδράσεων αναγωγής μεταλλικών ιόντων
- Κατά των κύκλο αναγωγής κινονών
- Ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος
- Κατά τη βιοσύνθεση της προσταγλαδίνης

## Εξωτερικοί παράγοντες

Ένας αριθμός ελευθέρων ριζών που μπορούν να παραχθούν στον οργανισμό μας οφείλονται και σε εξωτερικούς παράγοντες :

- Μόλυνση του αέρα
- Καπνός από τσιγάρο
- Αλκοόλ
- Τοξίνες
- Υψηλό επίπεδο σακχάρου στο αίμα
- Μεγάλη κατανάλωση από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
- Ακτίνες X
- Υπεριώδης ακτινοβολία
- Υπερβολική λήψη σιδήρου, μαγνησίου, χαλκού ή ψευδάργυρου

- Υψηλής ένταση άσκηση ή άσκηση για μεγάλα χρονικά διαστήματα (μαραθώνιος) που προκαλεί φθορά στους ιστούς

Το μυστικό βρίσκεται στην ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών. Όταν οι ελεύθερες ρίζες είναι περισσότερες από τα αντιοξειδωτικά δημιουργείται το λεγόμενο «οξειδωτικό στρες».

#### 1.1.4 Επίδραση ΔΕΟ στην υγεία

Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας ως προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Επίσης έχει γίνει αποδεκτό πως συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων. Οι ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες όλο ένα και αυξάνονται με τις κυριότερες εξ αυτών να είναι : **καρδιαγγειακές παθήσεις – καρκίνος – νευροεκφυλιστικές ασθένειες – καταρράκτης – διαβήτης - καθώς και αυτοάνοσες ασθένειες**

#### Μονοξειδίο του Αζώτου

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) καθώς και άλλα οξειδία του, ήταν γνωστά από τη συμμετοχή τους στη μόλυνση της ατμόσφαιρας. Κατά τη δεκαετία του 1980 αποδείχθηκε ότι το NO είναι ένας παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται σε ρύθμιση ορισμένων διαδικασιών όπως είναι : **η πίεση του αίματος, η θρόμβωση, η μετάδοση νευρικών σημάτων.**

Το γεγονός ότι το NO δεν είναι δραστικό μόριο, είναι μη πολικό και μη φορτισμένο του δίνει τη δυνατότητα να διαχέεται μεταξύ διαφόρων κυττάρων και να αντιδρά επιλεκτικά με συγκεκριμένα μόρια.

Το NO καθίσταται ελεύθερη ρίζα καθώς έχει 15 ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Οι ηλεκτρονικές υποστιβάδες μπορούν να διαθέτουν έως 2 ηλεκτρόνια κάτι που σημαίνει πως μια από αυτές έχει ένα ασύζευκτο.

Η δραστικότητά του θα μπορούσε να συγκριθεί με εκείνη του μοριακού οξυγόνου, το οποίο όμως έχει δυο άζευκτα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές του στιβάδες (Beckman, Korpenol 1996).

Και τα δύο προαναφερθέντα μόρια, δηλαδή το NO και το O<sub>2</sub>, μπορούν να μετατραπούν σε ισχυρότερα οξειδωτικά μέσα, μέσω αντιδράσεων με άλλες χημικές ενώσεις. Ο συνδυασμός των παραπάνω ιδιοτήτων του NO, δηλαδή της ικανότητάς του να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες χωρίς να αντιδρά άμεσα με τα περισσότερα μόρια που συναντά στα κύτταρα, φαίνεται ότι έπαιξε καθοριστικό ρόλο, ώστε να επιλεγεί, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, για τη μετάδοση σημάτων μεταξύ διαφορετικών ειδών κυττάρων, χωρίς την ενδιάμεση βοήθεια κλασικού τύπου υποδοχέων (Martinez-Ruiz, Cadenas et al., 2011).

Η δημιουργία του NO στον οργανισμό μας, πέρα από τις προαναφερόμενες διεργασίες, έχει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική άμυνα του οργανισμού κατά των ξένων μικροοργανισμών ή των καρκινικών κυττάρων.

Η τοξικότητα του NO οφείλεται κυρίως σε προϊόντα που δημιουργούνται μετά την αντίδρασή του με άλλες ενώσεις, όπως για παράδειγμα το ανιόν του σουπεροξειδίου το οποίο οδηγεί



στον σχηματισμό της ισχυρής προοξειδωτικής ένωσης “περοξυνιτρικό” (ONOO<sup>-</sup>) (Pryor and Squadrito, 1995).

### Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Αρχικές παρατηρήσεις σχετικά με την τοξικότητα του οξυγόνου είχαν βασιστεί στο γεγονός κατά το οποίο το οξυγόνο μπορούσε να αναστείλει απευθείας τη δράση ορισμένων ενζύμων, όπως είχε αποδειχθεί σε ορισμένα ένζυμα αναερόβιων οργανισμών. Τα ένζυμα όμως των αερόβιων οργανισμών είτε δεν είναι καθόλου ευαίσθητα στο οξυγόνο, είτε αναστέλλονται με πολύ χαμηλή ταχύτητα σε σχέση με την τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει η έκθεσή τους σε αυτό. Το 1954 οι Gershman και Gilbert πρότειναν πως οι βλαπτικές επιπτώσεις του οξυγόνου, οφείλονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών με βάση το οξυγόνο ( Η θεωρία αυτή βασίστηκε στα κοινά χαρακτηριστικά που εμφάνιζε η τοξικότητα του οξυγόνου με την ιονίζουσα ακτινοβολία). Έχουν γίνει γνωστά αρκετά βασικά ένζυμα τα οποία απενεργοποιούνται, όχι όμως απευθείας από το οξυγόνο, άλλα από την έκθεσή τους στο **ανιόν του σουπεροξειδίου** το οποίο αποτελεί προϊόν αναγωγής του οξυγόνου με ένα ηλεκτρόνιο. Παράδειγμα του παραπάνω αποτελεί το ένζυμο **ακοτινάση των μιτοχονδρίων** το οποίο συμμετέχει στον κύκλο Krebs και αναστέλλεται από το ανιόν του οξυγόνου λόγω της οξειδωσης της προσθετικής του ομάδας.

### Δραστικές μορφές οξυγόνου

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας ο οποίος περιλαμβάνει ενώσεις που καλούνται **Δραστικές Μορφές Οξυγόνου**.

Από το σύνολο των ελεύθερων ριζών, εκείνες που μονοπωλούν το ενδιαφέρον είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species).

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δυο ή τριών ηλεκτρονίων καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheesman et al.1993;Gutteridge 1995).

Ένωση	Όνομα
	<b>Ελεύθερες ρίζες</b>
$O_2^{\cdot-}$	ανιόν σουπεροξειδίου
$HO_2^{\cdot}$	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
$RO^{\cdot}$	ρίζα αλκοξειδίου
$ROO^{\cdot}$	ρίζα υπεροξειδίου
$NO_2^{\cdot}$ και $NO^{\cdot}$	διοξειδίο και μονοξειδίο του αζώτου
	<b>Μη-ελεύθερες ρίζες</b>
$H_2O_2$	υπεροξειδίο του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υδροπεροξειδία
$^1O_2$	μονήρες οξυγόνο
$O_3$	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ
$ONOO^-$	περοξυνιτρικό

Πίνακας 1.1. Πίνακας ελευθέρων ριζών

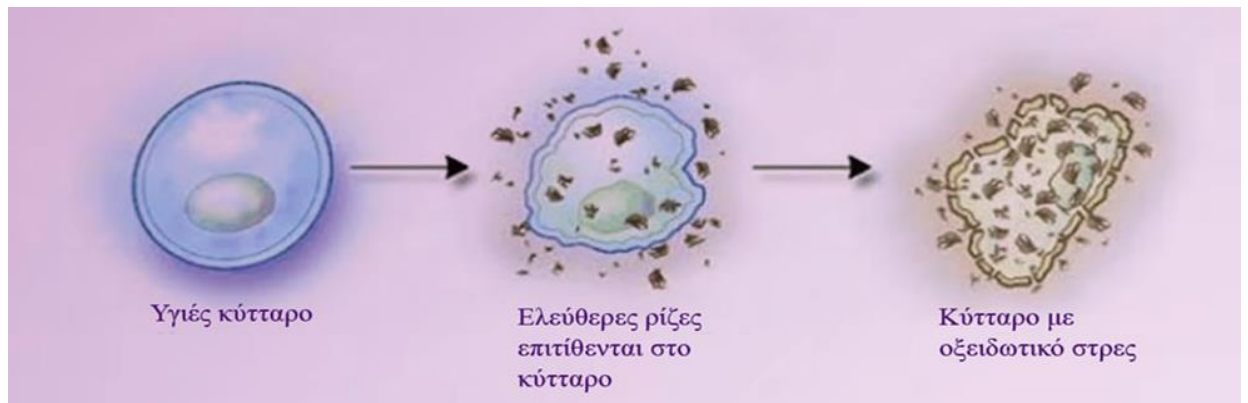
### Ανιόν σουπεροξειδίου

Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικής δράσης του παραπάνω ανιόντος δεν είναι απόλυτα γνωστός καθώς διαφέρει από περίπτωση σε περίπτωση. Ωστόσο παρόλο που δεν θεωρείται ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας, η αυξημένη δημιουργία του στα κύτταρα προκάλεσε οξειδωση και τροποποίηση βιολογικών ιδιοτήτων των στοιχείων τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και τη δομή των κυττάρων.

### Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες περιγράφει μια κατάσταση ανισορροπίας ανάμεσα στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου. Μπορεί να εμφανιστεί στον οργανισμό σε περιπτώσεις όπου οι τοξικές ουσίες που προϋπάρχουν μεταβολίζονται και παράγουν ROS, οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες δεν επαρκούν, όπου υπάρχει υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παράγωγης ROS.

Όπως προαναφέραμε μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να οδηγήσει σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα να μπορεί να προσβάλει όλα τα βασικά συστατικά ενός κύτταρου, όπου μέσω της σειράς των αντιδράσεων να προκληθεί η ολοκληρωτική καταστροφή του υποστρώματος του κυττάρου.



Εικόνα 1.2. Επίδραση οξειδωτικού στρες στο κύτταρο

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	
Πολυοργανικές	Γήρανση, καρκίνος, διαβήτης
Αγγεία	Αρτηριοσκλήρυνση
Εγκέφαλος	Τραύμα, πάρκινσον, νευροτοξίνες, άνοια
Πνεύμονες	Άσθμα
Αρθρώσεις	Ρευματισμοί
Καρδιά	Θρόμβωση στεφανιαίας
Δέρμα	Εγκαύματα, δερματίτιδα
Νεφροί	Μεταμόσχευση γκλομερουλονεφρίτη
Οφθαλμοί	Καταρακτογέννεση, αμφιβληστροειδήτιδα, εκφυλισμός του αμφιβληστροειδούς
Γαστρεντερικό	Διαβήτης, παγκρεατίτιδα, ισχαιμία, καταστροφή του ήπατος

Πίνακας 1.2. Οξειδωτικό στρες

### Υπεροξείδωση των λιπιδίων

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με κυτταρικά συστατικά είναι αυτός με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. Το φαινόμενο **λιπιδιακή υπεροξείδωση** παρατηρείται όταν υπερκοραστούν οι αμυντικοί μηχανισμοί των κυττάρων με αποτέλεσμα τη συνεχή και μη ελεγχόμενη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

## Διαδικασία υπεροξειδωσης

Η αρχή της υπεροξειδωσης γίνεται όταν μια οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα, η οποία είναι αρκετά δραστική, αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από μια μεθυλομάδα. Όταν μια μεθυλική ομάδα βρίσκεται σε ένα διπλό δεσμό, η ισχύς του δεσμού υδρογόνου με τον άνθρακα εξασθενεί. Αυτό μας οδηγεί στο αποτέλεσμα, σχεδόν πάντοτε, οι οξειδωτικοί παράγοντες να αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου από μεθυλομάδες που βρίσκονται μεταξύ διπλών δεσμών. Η απομάκρυνση του ατόμου του υδρογόνου έχει ως συνέπεια τη δημιουργία νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η αστάθεια της ρίζας του λιπαρού οξέος προκαλεί το γρήγορο ανασυνδυασμό της με γειτονικά ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί μια διαφορετική ελεύθερη ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα είναι σχετικά πιο σταθερή και προλαβαίνει να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον, δημιουργώντας έτσι μια ρίζα υπεροξειδίου. Η ρίζα του υπεροξειδίου αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας έτσι μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος. Τα συσσωρευμένα υπεροξειδία των λιπαρών οξέων μέσω πολύπλοκων μηχανισμών και κυκλικών αντιδράσεων, σε περίπτωση που δεν τερματιστούν, μπορούν να προκαλέσουν καταστροφικά αποτελέσματα και τελικά την ολική οξειδωση των μεμβρανών και το θάνατο των κυττάρων

**Το πεντάνιο, το αιθάνιο και το αιθυλένιο σχηματίζονται, επίσης, κατά την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και έχουν ανιχνευθεί με ειδικές τεχνικές στον εκπνεόμενο αέρα ανθρώπων και ζώων, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.**

Ο κύριος φυσιολογικός παράγοντας ο οποίος μπορεί να αναστέλλει τη διαδικασία της λιπιδιακής υπεροξειδωσης είναι η **Βιταμίνη Ε**. Πρόκειται για μια ομάδα ενώσεων που αποκαλούνται **τοκοφερόλες** με κυριότερη εξ αυτών την **α-τοκοφερόλη**.

## Βλάβες σε DNA

Τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων και από τα πιο καλά προστατευμένα είναι το DNA και το RNA. Ωστόσο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα. Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν σε αυτά τα νουκλεϊνικά πολυμερή, έχουν σα συνέπεια την αναστολή τόσο της αντιγραφής και της μεταγραφής, όσο και της μετάφρασης. Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων ή ακόμη και στο θάνατο του οργανισμού.

Τα μόρια του RNA είναι, επίσης, πολύ πιο ευαίσθητα στην οξειδωση από τα μόρια του DNA (Tanaka, Chock et al., 2007). Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να συνδέονται με το γεγονός ότι τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA και του RNA δεν είναι οργανωμένα σε συμπαγή διάταξη και δεν συνδέονται με ιστόνες, όπως στο αντίστοιχο πυρηνικό DNA. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται πλησίον της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία θεωρείται η κύρια πηγή δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (Cadenas and Davies, 2000).

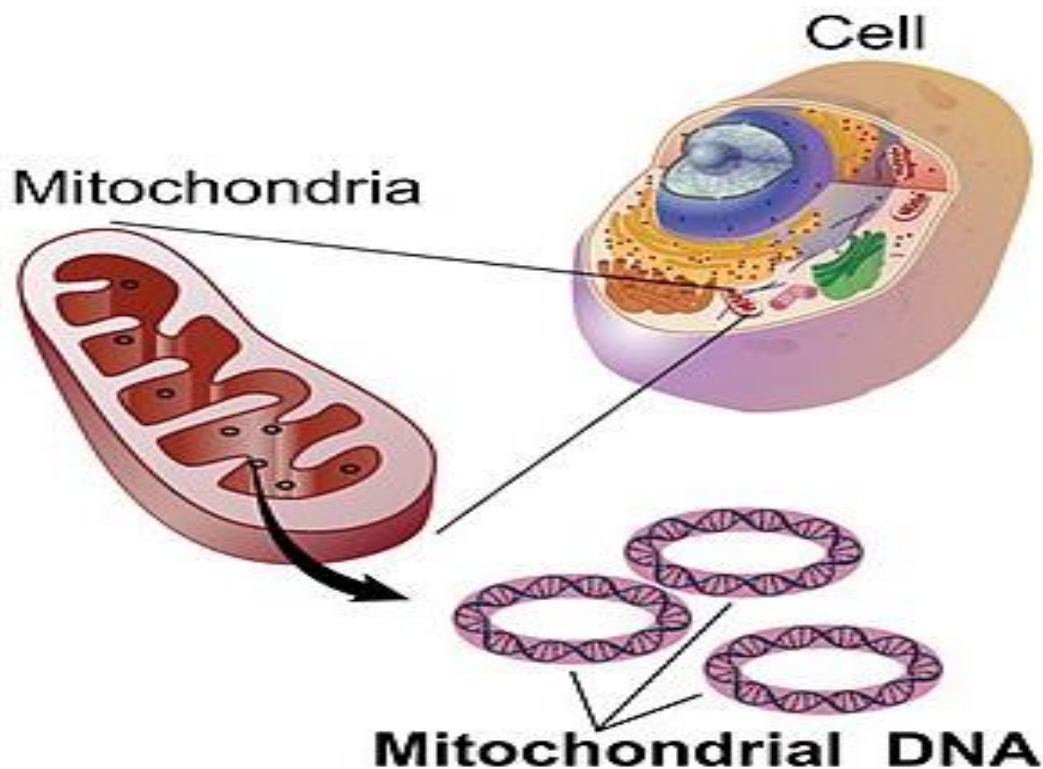
Οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA κατά κύριο λόγο προκαλούνται από τις ρίζες του υδροξυλίου. Βασικό στο παραπάνω αποτελεί το σημείο δημιουργίας τους καθώς οι ρίζες αυτές έχουν χρόνο ζωής μερικά μικροδευτερόλεπτα. Από αυτό συμπεραίνουμε πως οι ρίζες του υδροξυλίου που δημιουργούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι αδύνατο να βλάψουν το DNA, καθώς είναι αρκετά μακριά. Ωστόσο λιγότερο δραστικές ρίζες μπορούν να διαχέονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις.

Επιπλέον περίπτωση αποτελεί η δέσμευση ιόντων μετάπτωσης, κυρίως σιδήρου, απευθείας στο DNA, οδηγώντας σε δημιουργία ριζών υδροξυλίου πολύ κοντά σε αυτό.

### Αποτελέσματα οξειδωτικής τροποποίησης DNA

- Σχάση αλυσίδων, μονών και διπλών
- Ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων
- Τροποποιήσεις βάσεων του DNA
- Διασύνδεση τύπου DNA-DNA, DNA-πρωτεΐνης

### Μιτοχονδριακό DNA



Εικόνα 1.3 Μιτοχονδριακό DNA

Η γενετική πληροφορία για τη σύνθεση των πρωτεϊών κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο DNA του πυρήνα, ένα μικρό κομμάτι DNA όμως βρίσκεται και στα μιτοχόνδρια.

Το μιτοχονδριακό DNA έχει παρατηρηθεί πως είναι πιο ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες από το αντίστοιχο πυρηνικό. Οι λόγοι οι οποίοι οδηγούν σε ένα τέτοιο συμπέρασμα είναι οι εξής :

- Δεν προστατεύεται από τη συμπαγή οργάνωση και την περιτύλιξη γύρω από ιστόνες
- Βρίσκεται πολύ κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία είναι ένα από τα κύρια σημεία δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου
- Τα μιτοχόνδρια δε διαθέτουν τόσο αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

Οι ασθένειες κατά τις οποίες πιστεύεται πως οφείλονται στις οξειδωτικές βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA όλο ένα και αυξάνονται. Μερικές από αυτές είναι οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις, η αρτηριοσκλήρυνση.

## Βλάβες στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες στον ενδοκυττάριο αλλά και στον εξωκυττάριο χώρο αποτελούν, επίσης, στόχο για τη δράση των δραστικών ελευθέρων ριζών (Dunlop, Brunk et al., 2011). Το μεγάλο ενδιαφέρον, όμως, για τη μελέτη της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα, όταν έγινε γνωστό ότι οξειδωτικές τροποποιήσεις σε ορισμένες απ' αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος εντός αλλά και μεταξύ των κυττάρων (redox signaling) (Brewer, Garcia et al., 2015).

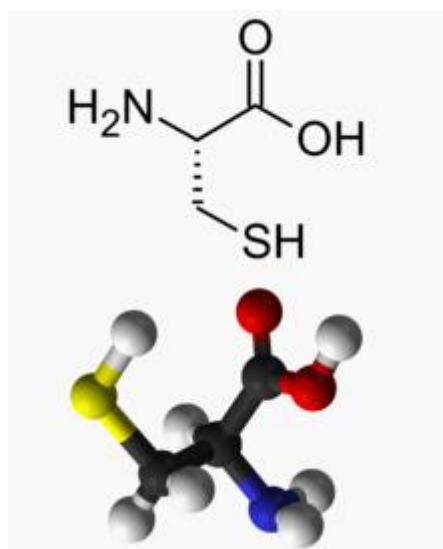
Η λειτουργία των πρωτεϊνών μπορεί να διαταραχτεί μόνο όταν προσβληθούν συγκεκριμένα αμινοξέα ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό κέντρο τους καθώς οι περισσότερες από αυτές μπορούν να δεχτούν σημαντικές οξειδωτικές τροποποιήσεις χωρίς ωστόσο να επηρεαστούν.

Η οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων, πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες στη γενετική λειτουργία του οργανισμού. Επιπλέον οι οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες μεταγραφής έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων.

Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αμινοξέα τα οποία είναι ευαίσθητα στην οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες, η σημαντικότητα των αμινοξέων για τη δράση της πρωτεΐνης καθώς και η ικανότητα που έχουν τα κύτταρα να διορθώνουν τις βλάβες που προκαλούνται στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, είναι οι λόγοι από τους οποίους εξαρτώνται οι επιπτώσεις που θα υπάρξουν σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη αν αυτή προσβληθεί από μια ελεύθερη ρίζα.

Η **κυστεΐνη**, η **μεθειονίνη**, η **τυροσίνη**, η **ιστιδίνη**, η **φαινυλαλανίνη** και η **τρυπροφάνη** αποτελούν τους πιο ευάλωτους στόχους των καταλοίπων πρωτεϊνών κατά τη συνθήκη όπου επικρατεί το οξειδωτικό στρες.

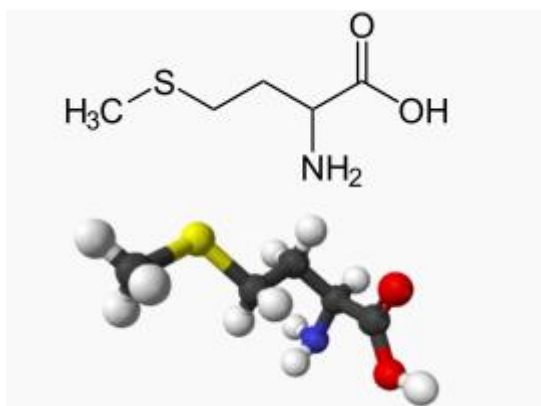
### Κυστεΐνη



Διαθέτει την ικανότητα να ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες των πρωτεϊνών. Δεδομένου της θέσης της, στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών, μπορεί και μαρτυρά την ένταση του

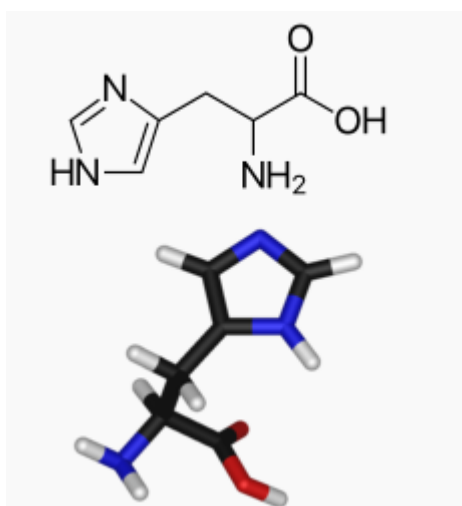
οξειδωτικού στρες καθώς η οξείδωσή της οδηγεί σε τροποποίηση της λειτουργίας των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

### Μεθειονίνη



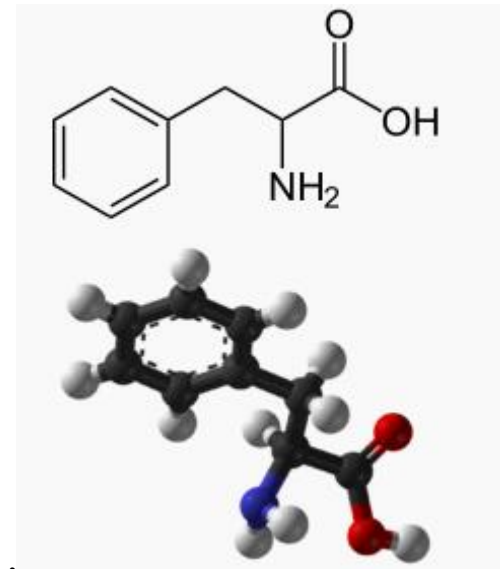
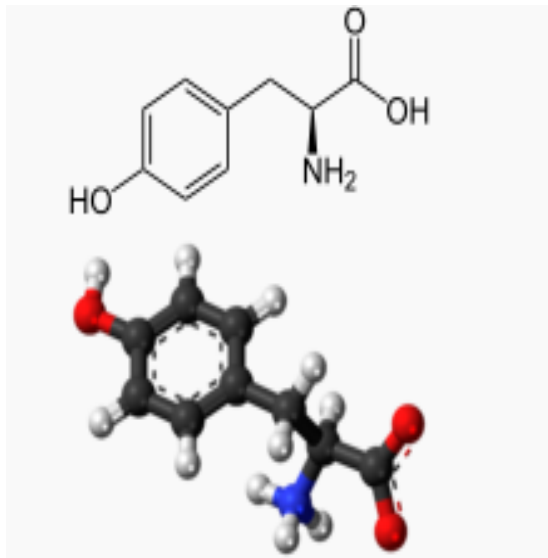
Η μεθειονίνη είναι ένα από τα πιο ευαίσθητα κατάλοιπα αμινοξέων στις πρωτεΐνες απέναντι στη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Boschi-Muller, Gand et al., 2008).

### Ιστιδίνη



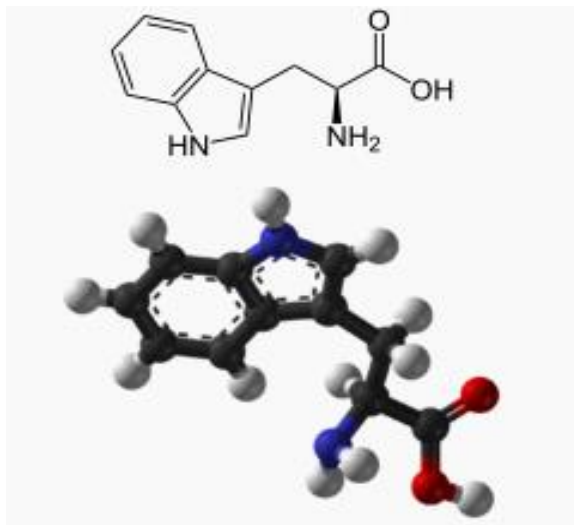
Η οξείδωση της ιστιδίνης μπορεί να οδηγήσει σε δυο περιπτώσεις, είτε σε ομοιοπολική σύνδεση της με ηλεκτρόφιλα μόρια είτε στο σχηματισμό 2-οξοϊστιδίνης. Η οξείδωση της εμπλέκεται στη δημιουργία αδιάλυτων συσσωμάτων πρωτεϊνών. Εάν τα επίπεδα των συσσωματωμάτων αυτών αυξηθούν σημαντικά, εμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και έχουν κατηγορηθεί ως υπεύθυνα για τη διαδικασία της γήρανσης (Kurz, Eaton et al., 2010)

### Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη



Στην τυροσίνη και τη φαινυλαλανίνη η δράση των ελεύθερων ριζών οδηγεί σε δημιουργία μιας σειράς από ενδιάμεσες ρίζες οι οποίες σχηματίζουν όρθο-,μέτα-,πάρα- τυροσίνες. Ανάλογα με τη θέση που έχουν τα συγκεκριμένα κατάλοιπα στη δομή της πρωτεΐνης εξαρτώνται και οι τροποποιήσεις που ενδέχεται (ή και όχι) να προκληθούν.

### Τρυπτοφάνη



Τα κατάλοιπα της τρυπτοφάνης συνήθως οξειδώνονται από ελεύθερες ρίζες OH,ROO,RO δημιουργώντας έτσι Ν0φορμυλοκινουρενίνη και κινουρενίνη τα οποία λόγω του έντονου φθορισμού τους γίνονται εύκολα αντιληπτά.

## 1.2 Αντιοξειδωτικά

Με τη πάροδο του χρόνου ο άνθρωπος, έπειτα από τις τελευταίες εξελίξεις (νέοι ιοί), στρέφεται σε λύσεις που θα οδηγήσουν στη βελτίωση της καθημερινής του ζωής. Αυτό έχει ως αντίκτυπο και την προσοχή του ως προς την υγεία του, την διατροφή του (επαρκούς και βέλτιστης διατροφής) , τη σωματική και πνευματική άσκηση. Παρατηρείται μεγάλο



ενδιαφέρον ως προς τα αντιοξειδωτικά. Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση η οποία βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα και έχει τη δυνατότητα να καθυστερεί ή και να εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (Haliwell,2001)

Η ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό έχει ως

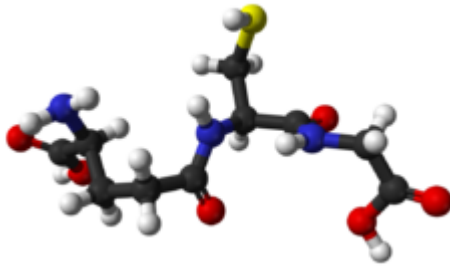
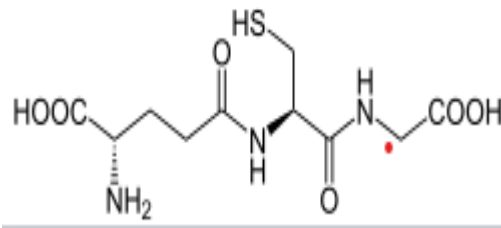
- Ενζυμα
- Μη ενζυμικές πρωτεΐνες
- Μικρού μοριακού βάρους
- Χωρίς ενζυμική δράση

Πιο συγκεκριμένα και αναλύοντας τις παραπάνω κατηγοριοποιήσεις συναντούμε :

### Ενζυμα με αντιοξειδωτική δράση

- **Υπεροξειδίο δισμουτάση** : Ελαττώνει το χρόνο ζωής των δραστικών ριζών. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τις αντιδράσεις μετατροπής της δραστικής ρίζας του οξυγόνου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) είτε προς μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>) είτε προς υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ο έλεγχος της δισμουτάσης του υπεροξειδίου στα πλαίσια του ελέγχου του Οξειδωτικού Στρες, μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό των υποκείμενων αιτιών για πολλά νοσήματα και κλινικές διαταραχές, έτσι ώστε να σχεδιασθούν οι κατάλληλες εξατομικευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Υπάρχουν δυο τύποι SOD οι οποίοι σχετίζονται με την παρουσία μετάλλων στο μόριο του ενζύμου :
  - (α) χαλκού/ψευδαργύρου, προστατεύει το κυτταρόπλασμα των κυττάρων
  - (β) μαγγάνιου προστατεύει τα μιτοχόνδριαΈρευνες έχουν δείξει πως εμφανίζει δυνατότητες ως αντιγηραντική θεραπεία καθώς τα επίπεδα της είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα παραγωγής ελεύθερων ριζών με τη πάροδο του χρόνου ( τα επίπεδα της μειώνονται ενώ τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών αυξάνονται)
- **Καταλάση** : Διασπά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό, το συναντούμε στα υπεροξυσώματα, αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια.
- **Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης** : Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Van Kuijk et al., 1987). Δρα σε οργανικά υπεροξείδια, που απελευθερώνονται από τη δράση φωσφολιπασών καθώς και στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Thomas et al., 1990).

- **Γλουταθειόνη :**



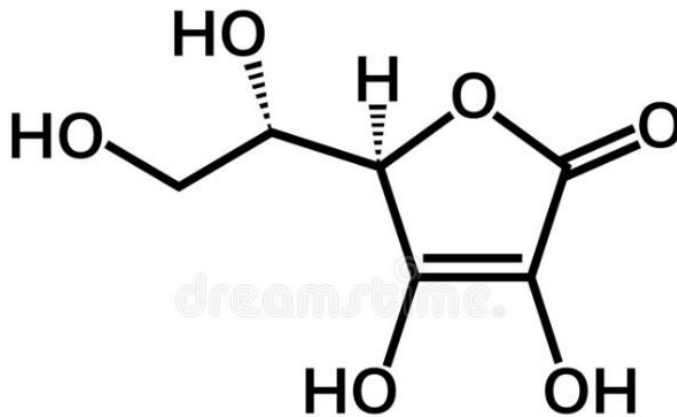
Τη συναντάμε στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Πρόκειται για ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού. Ιδιότητες που μπορεί να προσφέρει στον οργανισμό :

- 1) **Βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη.** Έρευνες έδειξαν πως άτομα τα οποία είχαν χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης είχαν σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη καύση λίπους και την αύξηση στα ποσοστά αποθήκευσης του
  - 2) **Μείωση κυτταρικής βλάβης στο συκώτι** που οφείλεται σε λιπώδη ηπατική νόσο (λιπαρές εναποθέσεις στο συκώτι)
  - 3) **Δρα ως βοήθημα σε αυτοάνοσες ασθένειες**
  - 4) **Μειώνει τις επιπτώσεις του διαβήτη**
  - 5) **Βελτιώνει την ψορίαση**
  - 6) **Μειώνει τα συμπτώματα της νόσου Πάρκινσον**
- **Αναγωγής της Γλουταθειόνης :** πρόκειται για μια φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει τη μετατροπή του διμερούς της γλουταθειόνης στην ανοιγμένη της μορφή  
**Μη ενζυμικές πρωτεΐνες με αντιοξειδωτική δράση**
  - **Τρανσφερρίνη-Φερριτίνη :** Ο σίδηρος έχει την τάση να λειτουργεί ως συνένζυμο οξειδωτικών αντιδράσεων έχοντας ως αποτέλεσμα σε ελεύθερη κατάσταση να βοηθά τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Οι δυο πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά καθώς τον διατηρούν δεσμευμένο

- **Σερουλοπλασμίνη** : Στη περίπτωση του χαλκού, λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο με τη Τρανσφερρίνη-Φερριτίνη
- **Αλβουμίνη** : Βρίσκεται στο πλάσμα και είναι από τις πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες ως προς την αντιοξειδωτική της δράση

### 1.2.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες με μικρό μοριακό βάρος

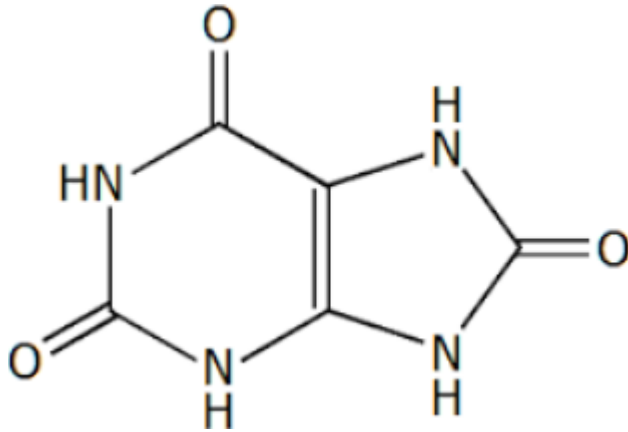
- **Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)** :



Πρόκειται για ένα υδρόφιλο αντιοξειδωτικό με ισχυρή δράση. Βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου και συμμετέχει στη διατήρηση του συνδετικού ιστού (δόντια, οστά, τένοντες, αγγεία, δέρμα) μέσω της σύνθεσης κολλαγόνου

Μεγάλη ποσότητα ασκορβικού οξέος εντοπίζεται σε λαχανικά και φρούτα (εσπεριδοειδή). Η σημαντικότητά του βρίσκεται στο γεγονός πως μπορεί να αντιδράσει με πληθώρα ελεύθερων ριζών.

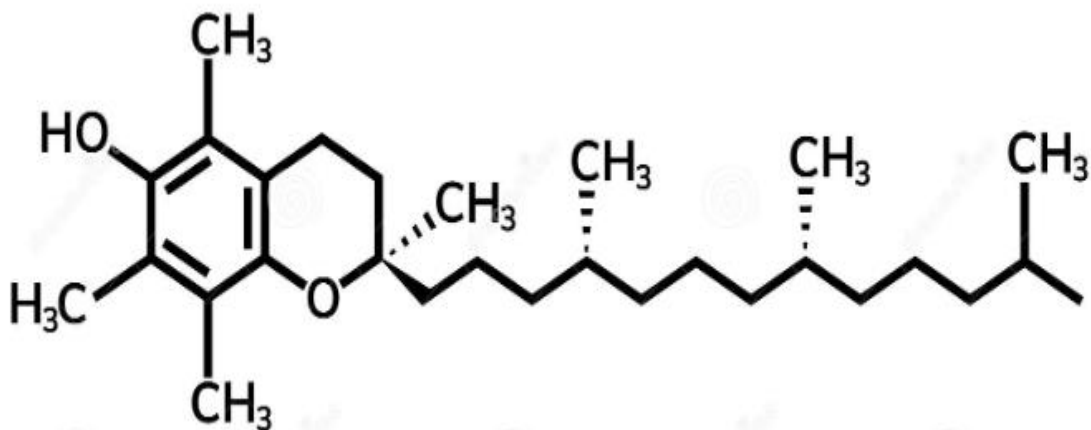
- **Ουρικό οξύ** :



Εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οξειδωαναγωγικής ισορροπίας.

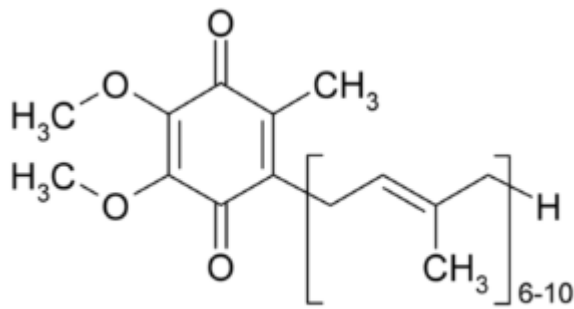
Έχει βρεθεί πως σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί αρνητικό δείκτη για παθολογικές καταστάσεις.

- **α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε) :**



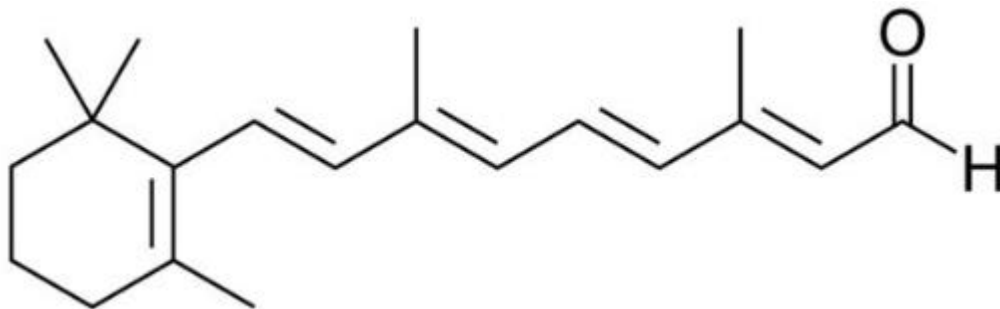
Η αντιοξειδωτική της δράση πραγματοποιείται μέσω προσφοράς του υδρογόνου του αρωματικού δακτυλίου. Ανήκει στις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Η δράση της μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση καθώς προστατεύει από την οξείδωση άλλες αντιοξειδωτικές βιταμίνες. Παρουσιάζει σημαντική αντιθρομβωτική δράση και συμβάλλει στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου και των καρδιαγγειακών νοσημάτων

- **Συνένζυμο Q-10 :**



Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998). Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, μεταφέρει ηλεκτρόνια. Συμμετέχει στη διαδικασία παράγωγης ενέργειας και προστατεύει τα λιπίδια των μεμβρανών από τη δράση των ελεύθερων ριζών. Επίσης έχει καθοριστικό ρολό στη μετατροπή των τροφών σε ενέργεια.

- **Καροτένια (Βιταμίνη Α) :**



Συμμετέχει στη δημιουργία νέων κυττάρων και εμφανίζει ιδιαίτερη σημασία για την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Δρα ως προστασία έναντι της εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου και βοηθά στην καλή υγεία των ματιών και του δέρματος. Η κύρια ικανότητά τους είναι να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες.

Εντοπίζονται σε φρούτα με κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα και στα λαχανικά με πράσινους και σκούρους πράσινους χρωματισμούς.

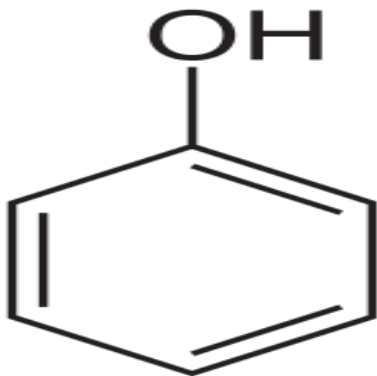
### 1.2.2 Πολυφαινόλες

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στις πολυφαινόλες καθώς χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική ικανότητα ως προς την ανθρώπινη υγεία.

Πρόκειται για ομάδα φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής. Πολύ καλές πηγές πολυφαινόλων αποτελούν τα φρούτα και τα ροφήματα, το τσάι και το κόκκινο κρασί καθώς επίσης και τα δημητριακά.

## Κατηγορίες και Πηγές πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και προκύπτουν από δύο αποσυνθετικά μονοπάτια, το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al.,2000) Με τον όρο φαινόλες αναφερόμαστε σε ενώσεις όπου διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο με έστω μια υποκατάσταση υδροξυλομάδας.



Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που διαθέτουν

Οι κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών είναι : τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάσες.

### Φλαβονοειδή

Αρκετές μελέτες επικεντρώνονται πάνω στις φυτικές αυτές πολυφαινόλες καθώς μονοπωλούν το ενδιαφέρον μας λόγω των πιθανών ευεργετικών επιδράσεων που έχουν στη υγεία μας εξαιτίας των ισχυρών αντιοξειδωτικών ικανοτήτων τους. Μπορούν και ενεργοποιούν ενζυμα τα οποία μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, καρδιακών παθήσεων και εκφυλιστικών παθήσεων που σχετίζονται με τη γήρανση. Ανάλογα με το σχηματισμό που έχουν στο χώρο διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- **Φλαβονόλες** : Έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση στη διατροφή (κρεμμύδι, μπρόκολο, μήλο,κεράσι,μούρα,τσάι, κόκκινο κρασί)
- **Φλαβόνες** : θυμάρι, μαϊντανός
- **Ισοφλαβόνες** : Κύρια πηγή για την πρόσληψη από τον οργανισμό αποτελεί η σόγια, όσπρια

- **Φλαβανόνες** : Πλουσιότερη πηγή όπου συναντώνται είναι το πράσινο τσάι
- **Ανθοκυανιδίνες** : κεράσι, σταφύλι

Αμέσως μετά τα φλαβονοειδή το ενδιαφέρον μας απασχολούν τα φαινολικά οξέα.

Βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα και διακρίνονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κινναμικού οξέος.

Διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι :

- **Κουμαρικό οξύ**
- **Φερουλικό οξύ** : Πρόκειται για χαρακτηριστικό οξύ των δημητριακών
- **Γαλλικό οξύ** : Η πιο σημαντική πηγή είναι το τσάι
- **Βανιλικό οξύ**
- **Σιναπικό οξύ**

### **Λιγνάια**

Συναντώνται σε μικρά ποσοστά στα τρόφιμα, μεγαλύτερες ποσότητες εμπεριέχονται στο λιναρόσπορο και το λάδι του.

### **Στιλβένια**

Τα στιλβένια απατώνται σε μικρές ποσότητες στη καθημερινή διατροφή με εξαίρεση τη trans-ρεσβερατρόλη, η οποία έχει αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις και την εντοπίζουμε στο κρασί καθώς και στο φλοιό των κόκκινων σταφυλιών (Bhat,2002).

### **Αντιοξειδωτική ικανότητα πολυφαινολών**

Από τους κυριότερους και πιο σημαντικούς τρόπους δράσης των φαινολικών οξέων καθώς και των φλαβονοειδών είναι η εξουδετέρωση της ρίζας, το οποίο οδηγεί στη διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Επιπρόσθετα ορισμένες πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσω της αναστολής ενζύμων τα οποία έχουν οξειδωτικές ιδιότητες καθώς επίσης και μέσω της προστασίας άλλων αντιοξειδωτικών

## 2.1 Καφές



Εικόνα 2.1.1, Καφές

Στα μέσα του 17<sup>ου</sup> αιώνα προερχόμενος από την Αφρική ο καφές έκανε αισθητή την παρουσία του σε όλη την Ευρώπη. Αποτελεί ένα ρόφημα το οποίο κατατάσσεται στα 3 πιο καταναλισκόμενα ροφήματα σε όλο τον κόσμο (ως λογικό το πιο γνωστό είναι το νερό κι έπειτα το τσάι). Η σύσταση του καφέ συνδέεται άμεσα με την **περιοχή προέλευσης** του καθώς και με τις **κλιματολογικές συνθήκες** που επικρατούν.

Τα δυο κύρια είδη καφέ όπου κατακλύζουν την αγορά παγκοσμίως είναι η **Arabica** ποικιλία η οποία προέρχεται από την **Αιθιοπία** και η **Robusta** η οποία προέρχεται από την **Αφρική**.

Παρά την πολύ μεγάλη ομοιότητα που έχουν στα μάτια μας οι κόκκοι καφέ που προέρχονται από τις παραπάνω περιοχές, διαφέρουν σε πολλά περισσότερα σημεία από ότι είχαμε υποθέσει.

**Η περιεκτικότητα καφεΐνης που συναντούμε στην ποικιλία Robusta είναι πολύ μεγαλύτερη, κατά προσέγγιση διπλάσια από εκείνη της ποικιλίας Arabica, ωστόσο υστερεί σε αιθέρια έλαια τα οποία είναι υπεύθυνα για το άρωμα και την γεύση του τελικού αποτελέσματος.**

Στον καφέ υπάρχουν διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις (Borelli et al, 2002) όπως το **φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με την 5-OH του κινικού οξέος και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ, η κερκετίνη, η μυρικετίνη (Παπαγεωργίου, 2005) , οι ταννίνες (Farah & Donangelo, 2006), οι προανθοκυανίνες (Parras et al., 2006) , οι ανθοκυανιδίνες όπως οι κυανιδίνες, οι πελαργονιδίνες και μία πεονιδίνη και οι λιγνάνες (Farah & Donangelo, 2006).**



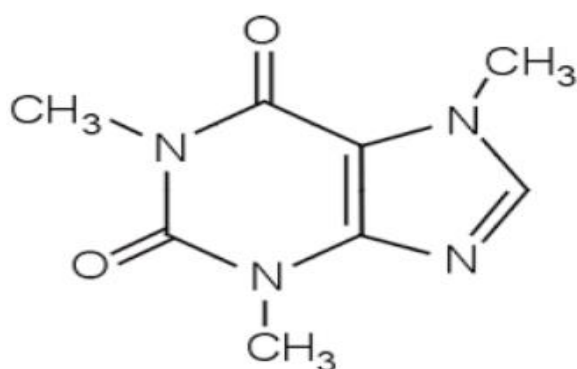
Άλλα αντιοξειδωτικά είναι τα **μελανοειδή** που αποτελούν προϊόντα της αντίδρασης Maillard μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και επηρεάζουν το χρώμα και το άρωμα του καφέ (Lopez-Galilea et al, 2006, Cammerer & Kroh, 2006), **η καφεΐνη, και οι τοκοφερόλες** (α,β,γ) μαζί με τις τοκοτριενόλες (Gonzalez, 2001).

Ο καφές δικαίως έχει χαρακτηριστεί ως την πιο συχνή καταναλώσιμη πηγή διαιτητικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ενώσεις οι οποίες έχουν εκτιμηθεί πως εξουδετερώνουν την δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως οι κύριους συντελεστές για την δημιουργία του οξειδωτικού στρες.

### 2.1.1 Αντιοξειδωτικά στον Καφέ. Χημική Σύσταση του Καφέ

Ο καφές περιέχει μεγάλες ποσότητες **βιοδραστικών ενώσεων** συμπεριλαμβανομένων της **καφεΐνης, φαινολικών ενώσεων, τριγωνελίνης, διτερπενίων και διαλυτών φυτικών ινών.**

#### ΚΑΦΕΪΝΗ



Πρόκειται για μια **μεθυλοξανθίνη** που ανήκει στα **αλκαλοειδή**. Χαρακτηριστικό της είναι η πικρή γεύση η οποία με την σειρά της παρουσιάζεται και σαν αίσθημα στο τελικό ρόφημα του καφέ. Πρόκειται για μια ουσία η οποία μολονότι έχει υποβληθεί σε πληθώρα ερευνών και μελετών, η επίδραση που έχει στην υγεία δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ως θετική ή αρνητική. Ευρέως γνωστό είναι πως η καφεΐνη επιδρά στο νευρικό σύστημα ως ανταγωνιστής ενός υποδοχέα της αδενοσίνης. Από τα αρχαία χρόνια γνωρίζουμε πως *ΠΑΝ ΜΕΤΡΟΝ ΑΡΙΣΤΟΝ* κάτι που εφαρμόζεται απόλυτα στην περίπτωση της καφεΐνης.

Η μερική πρόσληψη καφεΐνης έχει αποδειχθεί πως οδηγεί σε επαγρύπνηση, καλύτερη διάθεση, αποδοτικότερη ικανότητα μάθησης καθώς και αυξημένο αίσθημα άθλησης. Ωστόσο η πρόσληψή της σε περίσσεια μπορεί να οδηγήσει σε άγχος, ταχυκαρδία, τρέμουλο και φυσικά αϋπνία. Οι μεταβολίτες της καφεΐνης και ιδιαίτερα η 1-μεθυλοξανθίνη και το 1-μεθυλουρικό οξύ, έχουν επιδείξει αντιοξειδωτική δράση σε *in vitro* μελέτες και η *in vivo* σιδηροαναγωγική ιδιότητα του κανονικού καφέ είναι υψηλότερη από εκείνη του καφέ χωρίς καφεΐνη. Η αντιβακτηριδιακή δράση του κανονικού καφέ κατά των μικροοργανισμών που

προκαλούν τερηδόνα ήταν επίσης υψηλότερη από εκείνη του καφέ χωρίς καφεΐνη. Έχει αντιοξειδωτική ικανότητα και ραδιοπροστατευτική επίδραση στους ιστούς.

Η καφεΐνη απορροφάται ταχύτατα και αποτελεσματικά από τον ανθρώπινο οργανισμό και στην συνέχεια μεταβολίζεται στο ήπαρ, και παράγονται διμεθυλξανθίνες και μεθυλουρικό οξύ τα οποία θεωρούνται αντιοξειδωτικά (Crews et al., 2001).

## **ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ**

Η τριγωνελλίνη είναι ένα αλκαλοειδές που προέρχεται από τη βιολογικά ενζυματική μεθυλίωση του νικοτινικού οξέος. Κάνει αισθητή την παρουσία της στο ρόφημα του καφέ μέσω της πικρής γεύσης, σε τέτοιο βαθμό όπου κατά την διαδικασία του καβουρδίσματος, ψήσιμο δηλαδή κόκκων καφέ, μπορεί να δώσει δυσάρεστη γεύση και οσμή (Το καβούρδισμα υποβαθμίζει το μόριο της τριγωνελλίνης). **Σε σύγκριση πάντα των δυο πιο γνωστών ποικιλιών κόκκων καφέ, το ποσό της τριγωνελλίνης στην ποικιλία Robusta είναι περίπου τα δύο τρίτα από αυτό που βρέθηκε στην ποικιλία Arabica.** Έχει θεωρηθεί ως **φυτοιστρογόνο** καθώς και ότι μπορεί να συμβάλλει στην **βελτίωση της μνήμης**.

### **Διαλυτές φυτικές ίνες**

Οι διαλυτές φυτικές ίνες στον καφέ αποτελούνται από πολυσακχαρίτες υψηλού μοριακού βάρους οι οποίοι αυξάνουν το ιξώδες του παρασκευάσματος του καφέ. Οι γαλακτομαννάνες και οι αραβινογαλακτάνες τύπου 2 είναι οι πιο σημαντικοί τύποι των διαλυτών φυτικών ιών στον καφέ.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι ενώσεις αυτές είναι δύσκολο να αφομοιωθούν από τον άνθρωπο και ως εκ τούτου φτάνουν στο παχύ έντερο ανέπαφες χρησιμεύοντας ενδεχομένως ως υποστρώματα για την ευεργετική ζύμωση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου. Θετικό είναι το αποτέλεσμα στον οργανισμό έπειτα από την πρόσληψη φυτικών ιών καθώς βοηθούν στη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα, στη ρύθμιση γλυκόζης και στην **έκκριση ινσουλίνης**. Οι ζυμώσιμοι πολυσακχαρίτες αποικοδομούνται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου προς λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (Π.χ., οξικό, προπιονικό, και βουτυρικό). Αυτή η διαδικασία μειώνει το pH του παχέος εντέρου, παρεμποδίζει την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων ειδών και υποστηρίζει την ανάπτυξη προβιοτικών οργανισμών.

### **Νερό**

Καθοριστικό ρολό έχει η παρουσία του νερού στο κόκκο καφέ καθώς η μεγάλη ποσότητα υγρασίας είναι ανεπιθύμητη. Η αλλοίωση της γεύσης και του αρώματος είναι ένα πιθανό αποτέλεσμα καθώς η αύξηση του μικροβιακού φορτίου που ελλοχεύει κινδύνους για την υγεία έπειτα από την κατανάλωση. Παρόλα αυτά η χαμηλή υγρασία παράγει ρωγμές στους σπόρους και τους εμποδίζει να βλαστήσουν.

### **Υδατάνθρακες**

Οι υδατάνθρακες είναι κύρια συστατικά του καφέ και μπορεί να ευθύνονται για περισσότερο από το 50% του ξηρού του βάρους. Η σακχαρόζη είναι σημαντική για την γεύση και την ποιότητα του καφέ.

Οι υδατάνθρακες που εμπεριέχονται στους κόκκους καφέ χρησιμεύουν στην αντίδραση Maillard καθώς και την καραμελοποίηση. Είναι επομένως σημαντικές για την δημιουργία χρώματος και αρώματος καθώς και της οξύτητας που χαρακτηρίζει το τελικό ρόφημα. Το παρασκεύασμα του καφέ περιέχει μια σημαντική ποσότητα διαλυτών φυτικών ινών, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο ως υπόστρωμα προβιοτικών μικροοργανισμών στο ανθρώπινο έντερο.

### **Πρωτεΐνες**

Οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, και τα ελεύθερα αμινοξέα είναι ζωτικής σημασίας για τη γεύση του καφέ, δεδομένου ότι χρειάζονται για την αντίδραση Maillard. Ωστόσο, ο καφές δεν είναι μια καλή διατροφική πηγή πρωτεΐνης επειδή στερείται απαραίτητα αμινοξέα.

### **Ιχνοστοιχεία**

Τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στον καφέ είναι το κάλιο (1.1%), το ασβέστιο (0.2%) και το μαγνήσιο (0.2%). Πολλά άλλα στοιχεία υπάρχουν σε ποσότητες που δεν μπορούν να ανιχνευθούν (Belitz & Grosch, 1999).

## **2.1.2 Αντιοξειδωτικά στον Καφέ**

Στον καφέ υπάρχουν φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις (Borrelli et al., 2002). Άλλα αντιοξειδωτικά του καφέ θεωρούνται και οι τοκοφερόλες (α,β,γ) μαζί με τις τοκοτριενόλες (Gonzalez, 2001). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ουσιών του καφέ μειώνεται λόγω της θερμικής του επεξεργασίας αλλά εξαιτίας των σχηματιζόμενων προϊόντων από την αντίδραση Maillard η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του καφέ διατηρείται ή ακόμη και ενισχύεται (Lopez-Galilea et al., 2006, Cammerer & Kroh, 2006, Borrelli et al., 2002).

Τα μελανοειδή τα οποία βρίσκονται στο διαλυτό μέρος του καβουρδισμένου καφέ αποτελούν προϊόντα της αντίδρασης Maillard μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και επηρεάζουν το χρώμα και το άρωμα του καφέ (LopezGalilea et al., 2006, Cammerer & Kroh, 2006). Τα μελανοειδή είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ροφήματος του καφέ και είναι υπεύθυνα για την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και την ικανότητα δέσμευσης μετάλλων που έχει το ρόφημα του καφέ (Borrelli et al., 2002). Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας οφείλεται κυρίως σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Cammerer & Kroh, 2006).

Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

- **Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά:**

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι

φαινολικές ενώσεις. Παραδείγματα πρωτογενών αντιοξειδωτικών αποτελούν η ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η ΤΒΗQ (δι-τριπ-βουτυλουδροκινόνη), ο ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φυσικές και συνθετικές τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά. (Γαλάνης και Δούλιας, 2001). Όσον αφορά στα φαινολικά αντιοξειδωτικά δρουν μέσω του μηχανισμού ελεύθερων ριζών. Αντιδρούν με αυτές και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Η δράση τους αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό λέγεται συνέργεια ή συνεργισμός ή συνεργιστική δράση (Μπόσκος, 1997).

- **Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά:**

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κάποιες ομάδες αντιοξειδωτικών με διαφορετικές ιδιότητες και είναι: 1. Ενώσεις που δημιουργούν χημικά σύμπλοκα (συνεργιστικές ενώσεις). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως αυτά του 22 χαλκού και του σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύουν σωματίδια που δρουν ως εκκινητές της οξειδωσης. Παραδείγματα αποτελούν το κιτρικό οξύ, τα αμινοξέα, το αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), κ.ά. Ωστόσο για να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική τους δράση, πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό (Roberfroid & Calderon, 1990). 2. Ενώσεις που απομακρύνουν το οξυγόνο. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με το οξυγόνο οπότε, σχηματίζοντας ενώσεις με αυτό, εμποδίζουν την αντίδρασή του με τα λιπίδια που αποτελεί έναρξη της αυτοοξειδωσης. Την ικανότητα αυτή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), ο παλμιτικός του εστέρας, το ερυθροβικό οξύ και τα άλατά του με νάτριο, κ.ά. (Pokorny et al., 2001). 3. Τα αναγωγικά, τα οποία αναγεννούν φαινόλες και εμφανίζουν το φαινόμενο του συνεργισμού. Το ασκορβικό οξύ, με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (για να είναι λιποδιαλυτό) πιστεύεται ότι αναγεννά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά, παρέχοντας υδρογόνο στις φαινόξυ-ρίζες και έτσι έχει μία έμμεση δράση ως αντιοξειδωτικό. Ως, αναγωγικό, το ασκορβικό οξύ μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες, που σχηματίζονται στην ενζυμική αμαύρωση των φαινολικών ουσιών και αυτό παρέχει μία προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών. 4. Οι αποσβεστές διηγεργμένου (singlet) οξυγόνου, οι οποίοι απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο. Εδώ ανήκουν οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο. 5. Ένζυμα. Αυτά δρουν είτε απομακρύνοντας το εν διαλύσει οξυγόνο, είτε απομακρύνοντας συστατικά του τροφίμου που είναι ευοξειδωτά. Παραδείγματα για την κατηγορία αυτή αποτελούν αντίστοιχα η οξειδάση της γλυκόζης, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Roberfroid & Calderon, 1990). 6. Η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια. 7. Τέλος σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση. Τέτοια είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard (Μπόσκος, 1997). Τα αντιοξειδωτικά με βάση την προέλευσή τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες : 23 • Φυσικά αντιοξειδωτικά: Η πλειοψηφία των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Οι τοκοφερόλες είναι η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία. Διακρίνονται σε δύο ομάδες, τις τοκοφερόλες (Τοο) και τις τοκοτριενόλες (Τοο-3). Η κάθε ομάδα περιλαμβάνει τέσσερα ομόλογα, δηλαδή α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη και αντίστοιχα α-, β-, γ- και δ - τοκοτριενόλη. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από το α- ομόλογο προς το δ-, εν αντιθέσει με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται

(Γαλάνης & Δούλιας, 2001). • Συνθετικά αντιοξειδωτικά: Τα αντιοξειδωτικά αυτά συντίθενται βιομηχανικά. Πολλά από αυτά, αν και παρουσιάζουν ακόμη και έντονη αντιοξειδωτική δράση, δεν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, λόγω των αρνητικών επιπτώσεών τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συνθετικά αντιοξειδωτικά, που επιτρέπονται ως πρόσθετα τροφίμων είναι το BHT, το BHA, το Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E), το TBHQ. Στις μέρες μας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά μέσα χρησιμοποιούνται σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας. Στην κατηγορία των τροφίμων και των ειδών διατροφής τα αντιοξειδωτικά επιβραδύνουν την αυτοξείδωση των λιπών και προστατεύουν μ'αυτόν τον τρόπο την επιβλαβή επίδραση του οξυγόνου στα λίπη, τα καροτινοειδή, τις λιποδιαλυτές βιταμίνες A και E και σ' άλλα συστατικά των τροφίμων. Οι συστηματικές έρευνες έχουν οδηγήσει στη διατύπωση των βασικών αρχών, που διέπουν την εφαρμογή των αντιοξειδωτικών ουσιών στη βιομηχανία των τροφίμων. Γενικά, οι ουσίες αυτές δρουν ως σταθεροποιητές της διατροφικής και φυσικής αξίας των προϊόντων. Ασφαλώς δεν χρησιμοποιούνται για την αναβάθμιση της ποιότητας στις πρώτες ύλες ή κατά τα στάδια της επεξεργασίας και συντήρησης των τελικών προϊόντων.

Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο σκέλος της εργασίας, τα αντιοξειδωτικά αφορούν φυσικές ουσίες που εμπεριέχονται στα τρόφιμα και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό. Περιέχονται επίσης στα τρόφιμα με σκοπό τη συντήρησή τους. Είναι σημαντικό επομένως να εμβαθύνουμε και να αναφερθούμε στα οφέλη που αποκομίζουμε από ένα από τα πιο διαδεδομένα και καταναλισκόμενα ροφήματα, το καφέ. Συμφώνα με έρευνα όπου δημοσιεύτηκε παρατίθενται τα αποτελέσματα που παρατηρηθήκαν μέσω πειραματικής διεργασίας αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος καφέ από διαφορετικές περιοχές του κόσμου και το πώς αυτή μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου και ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής του (ηλεκτρική καφετιέρα-γαλλική πρέσα).

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έγινε μέσω της δοκιμασίας DPPH. Η έκφραση των αποτελεσμάτων, της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH από τα δείγματα καφέ, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox για την δοκιμασία DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα nmol Trolox, ως nmol trolox ανά κούπα ροφήματος (250 mL) και ως ποσότητες μL ροφήματος καφέ που απαιτούνται για 50% δέσμευση της ρίζας DPPH. Όλα τα δείγματα ροφήματος καφέ έδειξαν αντιοξειδωτική δράση με μικρή μείωσή της μέσα σε διάστημα 1 ώρας, ενώ ούτε οι διαφορετικοί τρόποι παρασκευής του μετέβαλλαν την αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων.

Η μέθοδος μέσω της οποίας προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των ροφημάτων ονομάζεται **ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH** ‘

Η μέθοδος DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρύλουδράζυλο) είναι μία μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών 1,1-διφαινυλο-2-πικρύλουδράζυλο (DPPH). Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολικών, αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών. Πρόκειται για πειραματική διαδικασία μέσω της οποίας δεσμεύονται οι ελεύθερες ρίζες του DPPH από τις πολυφαινόλες του δείγματος και στη συνέχεια φασματοφωτομετρείται το συνολικό διάλυμα αντίδρασης.

Δεν αποτελεί χρονοβόρα διεργασία. Οι φωτομετρήσεις πραγματοποιούνται περίπου μία ώρα μετά την παρασκευή του διαλύματος στα 520-700nm.

Η αυξημένη δέσμευση ελεύθερων ριζών ισοδυναμεί με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία διακρίνεται από χρωματική αλλαγή του διαλύματος, από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο, και ως συνέπεια τη μειωμένη τιμή απορρόφησης. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στην προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Balentine et al., 1997, Roginsky & Lissi, 2004). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (μονάδες συγκέντρωσης) συνήθως σε mmol/l (Roginsky & Lissi, 2004).

### **Γαλλική πρέσα**



*Εικόνα*

2.1.2

Για την γαλλική πρέσα διηθήθηκαν 3g τριμμένου καφέ, 50ml νερού όπου θερμάνθηκαν σε βραστήρα έως ότου η θερμοκρασία που επικρατεί είναι 100 βαθμοί κελσίου.

### **Ηλεκτρική καφετιέρα**



*Εικόνα 2.1.2*

Για την γαλλική πρέσα διατέθηκαν 3g τριμμένου καφέ, 50ml νερού όπου ξεκινά η εκχύλιση έως ότου η θερμοκρασία που επικρατεί είναι 96 βαθμοί κελσίου. Έπειτα από πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε σε γνωστοποιημένη ερευνά αντλούμε τα παρακάτω συμπεράσματα σχετικά με τα διαφορετικά είδη καφέ, καθώς και με τους διαφορετικούς τρόπους παρασκευής του

- Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση για τον καφέ που προέρχεται από την Αιθιοπία παρουσιάζει η παρασκευή του μέσω της ηλεκτρικής καφετιέρας
- Το παραπάνω είναι διακριτό και στην περίπτωση του καφέ από την Νικαράγουα (σε μικρότερο ωστόσο βαθμό)
- Σε αντίθεση με τα προηγούμενα ο καφές που προέρχεται από την Κέννα εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στη μέθοδο παρασκευής με γαλλική πρέσα
- Το ίδιο φαινόμενο με τον καφέ από την Κέννα παρατηρείται και στον καφέ από την περιοχή της Κολομβίας αλλά και του καφέ από το Ελ Σαλβαδόρ καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στη μέθοδο παρασκευής με γαλλική πρέσα

Συγκεντρωτικά και αντλώντας το μέσο όρο από τις παραπάνω διαδικασίες συμπεραίνεται πως ο καφές που παρασκευάζεται μέσω της γαλλικής πρέσας διέθεται ελάχιστα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τον καφέ που παρασκευάζεται με την ηλεκτρική καφετιέρα.

Ανεξάρτητα από τον τρόπο εκχύλισης τους, το τελικό ρόφημα που προσήλθε από τους κόκκους καφέ από τις περιοχές Νικαράγουα και Ελ Σαλβαδόρ παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

## 2.2 Δίκταμος



Ένα ευρέως διαδεδομένο φυτό προερχόμενο από το νησί της Κρήτης, όπου μόνο εκεί μπορεί να βρεθεί, είναι το **δίκταμο** ή αλλιώς **έρωντας**. Αποτελεί ένα ενδημικό φυτό που είναι γνωστό από την εποχή του Μίνωα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Το δίκταμο έχει συγγενικές σχέσεις με το φυτό της ρίγανης, διατηρεί τα φύλα του όλη την περίοδο του έτους, έχει αργή ανάπτυξη και φτάνει σε ύψος τα 30-40 εκατοστά. Η κύρια ονομασία του προέρχεται από το βουνό Δίκτης που βρίσκεται στο νόμο Λασιθίου και της λέξης θάμνος. Η ονομασία έρωντας πιστεύεται πως δόθηκε από τις ρισοκίνδυνες ενέργειες που χρειαζόταν να κάνουν όσοι ήθελαν να το συλλέξουν από τις απόκρημνες και βραχώδης τοποθεσίες. Θεωρείται λοιπόν πως διέθεταν ρισοκίνδυνο πάθος για αυτό το φυτό, όπως ακριβώς και στον ερώτα.

Για να έχει πλούσια ανθοφορία και βλάστηση το δίκταμο χρειάζεται άφθονο ήλιο, ωστόσο είναι πολύ ανθεκτικό και σε ακραίες θερμοκρασίες είτε αυτές είναι χαμηλές είτε υψηλές. Δεδομένου του ότι χρειάζεται καλό αερισμό και αποφυγή υγρασιακών συνθηκών το δίκταμο αναπτύσσεται καλύτερα σε υψόμετρο άνω των 300 μέτρων. Όπως αναφέραμε αποτελεί ένα εξαιρετικά διαδεδομένο φυτό από τα αρχαία χρόνια καθώς χρησιμοποιούταν ως φάρμακο, ως αφέψημα μεταγενέστερα καθώς επίσης και ως καρύκευμα. Λόγω των παραπάνω αξίζει να σημειώσουμε την τεχνική με την οποία μπορούμε να δημιουργήσουμε νέα φυτά δικτάμου. Δύο είναι οι τρόποι, με σπόρο ή με μόσχευμα. Με τον σπόρο θα χρειαστεί περισσότερος χρόνος για την παραγωγή του, αλλά θα κερδίσουμε ένα φυτό με καλύτερο ριζικό σύστημα. Πιο γρήγορη μέθοδος αποτελεί το μόσχευμα κατά το οποίο τμήματα του βλαστού του φυτού κόβονται και μεταφέρονται σε γλάστρες φυτώριου, κι έπειτα τοποθετούνται σε δροσερό περιβάλλον.



Η προσθήκη της ορμόνης ριζοβολιάς βοηθά σημαντικά στο μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας για τη δημιουργία καινούριων φυτών. Ύστερα από τη δημιουργία ακολουθεί η συγκομιδή. Κόβονται τα φύλλα του φυτού στο στάδιο της ανθοφορίας από τα τέλη Μαΐου μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρίου. Για να μειωθεί η απώλεια αιθέριων ελαίων χρειάζεται να γίνει η συγκομιδή τις πρωινές ώρες που δεν έχει πολύ ζέστη. Έπειτα τοποθετείται το φυτό σε δίσκους όπου αφήνονται σε καλά αεριζόμενους και σκιερούς χώρους για 2-3 εβδομάδες κι ύστερα συλλέγεται το αποξηραμένο τελικό προϊόν. Για την αποθήκευση το τοποθετούμε σε αεροστεγή βάζα, τοποθετώντας τα σε χώρους μακριά από φως και υγρασία.

### 2.2.1 Χρήσεις του δίκταμου

Αναφέρεται ως φάρμακο το οποίο βοηθά στη καταπολέμηση των στομαχικών διαταραχών. Βοηθά σε διάφορες στιγμές της καθημερινότητας όπως, πονοκέφαλους, νευραλγίες, ηπατικές παθήσεις, αλλά και σε πόνους περιόδου. Το αιθέριο έλαιο του δίκταμου ανακουφίζει από μυϊκούς, ρευματικούς πόνους, αλλά και παθήσεις του δέρματος.

#### **Διασκεδαστική αναφορά (fun fact)**

Το δίκταμο λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων έχει εμφανιστεί και σε ταινίες μυθιστορηματικού περιεχόμενου (Harry Potter) όπου αποκαλύπτονται οι δυνατότητες του για την ίωση του ανθρώπου έπειτα από δάγκωμα φιδιού. Όσο «μυθιστόρημα» κι αν ακούγεται η ικανότητα αυτή εμφανίζεται και στην εποχή του Διοσκουρίδη όπου το χρησιμοποιούσαν ως αντίδοτο για τα τσιμπήματα από δηλητηριωδών ζώων, όπως φιδιών.

Φεύγοντας από τα μυθιστορήματα, επανερχόμαστε στη σύγχρονη χρήση του δίκταμου όπου φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις φαρμακοβιομηχανίες καθώς επίσης και στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών. Το δίκταμο εμπεριέχει φαινολικά οξέα τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή καθώς επίσης και αντικαρκινική ιδιότητα.

Λειτουργικά είναι τα τρόφιμα που περιέχουν θρεπτικά συστατικά που ωφελούν την υγεία. Ορισμένοι τύποι περιέχουν φυσικά συστατικά που βελτιώνουν την υγεία, ενώ άλλοι τύποι εμπλουτίζονται με συμπληρώματα ή άλλα πρόσθετα συστατικά που έχουν σχεδιαστεί για να βελτιώνουν την υγεία. Η υψηλή περιεκτικότητα του δίκταμου σε αιθέρια έλαια, οδήγησε μελέτες να αναδείξουν την σημαντική χρήση του στη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων.

Το δίκταμο αποτελεί κομμάτι της καθημερινότητας ακόμη κι αν δε δίνεται η σημασία που του αρμόζει. Ένα επουλωτικό χειλιών που προμηθεύεται ο καταναλωτής από το γειτονικό φαρμακείο είναι πολύ πιθανό να εμπεριέχει δίκταμο. Παρουσιάζεται επίσης σε καραμέλες για τον βήχα, σε αλοιφές οι οποίες χρησιμοποιούνται για εντριβές κατά τη διάρκεια ενός κρυολογήματος, σε συμπληρώματα διατροφής καθώς επίσης και σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών και νυχιών.

Οι γρήγοροι ρυθμοί που μας επιβάλλει όλο ένα και περισσότερο η καθημερινότητα, έχουν στρέψει τον άνθρωπο στην αναζήτηση λύσεων όπου θα του κάνουν λίγο πιο εύκολη την οποιαδήποτε καθημερινή συνήθεια. Μια τέτοια καθημερινή συνήθεια είναι και το φαγητό. Με την πάροδο του χρόνου ο άνθρωπος στρέφεται στο γρήγορο φαγητό. Τα έτοιμα γεύματα και οι υπέρ τροφές (superfoods) κάνουν αισθητή τη παρουσία τους στη λίστα των καταναλωτών καθώς βελτιώνουν την ημερησία πρόσληψη σε περισσότερα θρεπτικά συστατικά, από ότι ένα γρήγορο γεύμα (fast food). Επίσης τα διάφορα βότανα που χρησιμοποιούνται αναδεικνύουν όλο και περισσότερες γεύσεις οι οποίες μέχρι και σήμερα μας ήταν άγνωστες. Αισθητή κάνει την παρουσία του και ο δίκταμος όπου παρόλο της πικρής γεύσης του χρησιμοποιείται σε αρκετές γαστρονομικές επιλογές, όπου λόγω του παραπάνω προσδίδουν στο γεύμα μια πιο ιδιαίτερη γεύση. Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο τα φύλλα του φυτού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία λικέρ, σάλτσας ψαριού, καθώς να προστεθεί και σε σαλάτες. Η γεύση του τοποθετείται μεταξύ της ρίγανης και του θυμαριού υποδηλώνοντας έτσι την έντονη παρουσία του σε οποιοδήποτε τρόφιμο. Η προσθήκη του δίκταμου στη καθημερινή διατροφή δεδομένου της φαρμακευτικής καθώς και της αντιμικροβιακής ιδιότητάς του έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των λειτουργικών τροφών.

### 2.2.2 Αντιοξειδωτική Δράση Δίκταμου

Όπως φαίνεται από την αρχή της έρευνας υπάρχουν δύο ειδών αντιοξειδωτικά, τα φυσικά και τα συνθετικά.

Η τάση της εποχής προστάζει στη σύγχρονη βιομηχανία την εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών ως εναλλακτική λύση για τη χρήση των συνθετικών. Δεδομένου αυτού πραγματοποιούνται αρκετές έρευνες για την εύρεση μπαχαρικών και βοτάνων τα οποία ταιριάζουν στο κάθε ένα διαφορετικό τρόφιμο. Έχει παρατηρηθεί πως η χρήση εκχυλισμάτων αντί καρπών και φύλλων είναι προτιμότερη σε μαρινάρισμα κρεάτων.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του δίκταμου πραγματοποιήθηκε έρευνα από τους Moller, Ling berg Madseb, Altonen, Skibsted. Η έρευνα βασίστηκε στην αδρανοποίηση ελεύθερων ριζών εκχυλισμάτων του Δίκταμου και της ικανότητας που έχει να αναστέλλει την ανάπτυξη δευτερογενών προϊόντων οξειδωσης λιπιδίων σε ένα μοντέλο φαγητού βασισμένο στο κρέας γαλοπούλας. Η έρευνα βασίστηκε στη σύγκριση του δίκταμου με το συγγενικό φυτό της ρίγανης. Το υδατικό διάλυμα του δίκταμου συγκριτικά με το διάλυμα της ρίγανης περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Οι τιμές που καταγράφηκαν σχετικά με τη περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων και στα δυο φυτά είναι αρκετά κοντά και μπορούν να συγκριθούν ( 21,7 meq/l για το δίκταμο και 20,7 meq/l για τη ρίγανη). Από το παραπάνω μπορεί να βγει το συμπέρασμα πως οι ιδιότητες του δίκταμου δε σχετίζονται και τόσο με την περιεκτικότητα του σε φαινικές ενώσεις. Η έρευνα οδήγηθηκε στο συμπέρασμα πως ο δίκταμος οφείλει τις ιδιότητές του στο γεγονός κατά το οποίο οι φαινολικές του ενώσεις είναι περισσότερο εκχυλίσσιμες με το νερό συγκριτικά με άλλα βότανα και φυτά όπως αυτό της ρίγανης. Το τελικό αποτέλεσμα έδειξε πως στο κομμάτι του κρεατος το οποιο δεν ηταν θωρακισμενο

από το διάλυμα του δίκταμου αυξήθηκαν πολύ γρήγορα οι τιμές των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης συγκριτικά με το κομμάτι κρέατος όπου είχε καλυφθεί με το παραπάνω διάλυμα

Σε μια δεύτερη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε από τους (Γεωργία Κουρή, Δημ. Τσιμογιάννης, Χάιδω Βαρδούκη, Βασιλική Ορεοπούλου (2007), είχε ως σκοπό την παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής δράσης του δίκταμου έπειτα από τρεις διαδικασίες εκχύλισης ώστε να διαχωριστούν τα αντιοξειδωτικά από το βότανο και να απομονωθεί ένα τελικό αποτελεσματικό εκχύλισμα.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Α

Περιελάμβανε διαδοχικές εκχυλίσεις με πετρελαϊκό αιθέρα ,διαιθυλεθέρα και αιθανόλη

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Β

Περιελάμβανε διαδοχικές εκχυλίσεις με πετρελαϊκό αιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Γ

Περιελάμβανε διαδοχικές εκχυλίσεις με αιθανόλη

Πιο αποτελεσματικό έναντι των ελεύθερων ριζών παρατηρήθηκε να είναι το ροσμαρινικό οξύ το οποίο απομονώθηκε στο διάλυμα αιθανόλης της Α διαδικασίας και επίσης στο διάλυμα αιθανόλης της Γ διαδικασίας.

Συνδυαστικά διεξήχθη επιπλέον ερευνά σχετικά με τη προστατευτική οξειδωτική δράση εκχυλισμάτων του δίκταμου όταν προστεθεί σε δείγμα βαμβακελαίου

Από την παραπάνω ερευνά αντλήθηκαν τα εξής συμπεράσματα :

Ο δίκταμο (*origanum dictamnus*, επιστημονική ονομασία) περιέχει κυρίως φαινικές ενώσεις, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα με την ικανότητα συνεισφοράς υδρογόνου και προστασίας του λαδιού από οξείδωση. Καταλληλότερη μέθοδος συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών του δίκταμου είναι η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα.

### 2.2.3 Αντιοξειδωτική Δράση Αιθέριου Έλαιου Δικτάμου

Το πέρας των ετών μας δημιουργεί όλο και πιο έντονο το αίσθημα της αναζήτησης για φυσικά και φυτικά μέσα με τα οποία μπορούμε να καλύψουμε ανάγκες καθώς και να προστατευτούμε. Παύει πλέον να υπάρχει η τάση στο να βρούμε τεχνητά μέσα με τα οποία θα διευκολύνουμε τη ζωή μας και αναζητούμε φυσικά μέσα με τα οποία θα βελτιώσουμε τη καθημερινότητά μας.

Συχνό φαινόμενο αποτελούν οι τροφικές δηλητηριάσεις και σε συνδυασμό με την επιθυμία για νέα λειτουργικά τρόφιμα έχουν στρέψει την προσοχή μας στα αιθέρια έλαια

Μελέτη η οποία έγινε από τους

- Γρηγορία Μητροπουλου
- Ελήνη Φίτσιου
- Ελισάβετ Σταυροπούλου
- Ελένη Παπαβασιλοπούλου
- Μανώλης Βαμβακιάς
- Αγλαΐα Παππά
- Αντιγόνη Ορεοπούλου

Η *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα του αιθέριου ελαίου *O. dictamnus* και των κύριων συστατικών του διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία σάρωσης DPPH. Η δοκιμασία DPPH είναι μια αξιόπιστη δοκιμή για την εκτίμηση της ικανότητας των μελετημένων ενώσεων να καθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες. Η αρχή της ανάλυσης βασίζεται στην αλλαγή χρώματος του διαλύματος DPPH από μωβ σε κίτρινο καθώς η ρίζα σβήνεται από το αντιοξειδωτικό. Στα πειράματά μας, διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου *O. dictamnus* επώαστηκαν παρουσία DPPH για 30 λεπτά. Το αιθέριο έλαιο επέδειξε σημαντική δόσοεξαρτώμενη αναστολή της δραστηριότητας της DPPH υποδηλώνοντας σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η καρβακρόλη ήταν το μόνο συστατικό που κατέγραψε την αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των συστατικών του αιθέριου ελαίου, ενώ το γ-τερπινένιο, το p-κυμένιο και η λιναλοόλη δεν παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, προκαλώντας μόνο έως 4% αναστολή της DPPH στην υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου *O. dictamnus* αποδίδεται κυρίως στην καρβακρόλη του κύριου συστατικού του

Η χρωματική αλλαγή παρατηρείται όταν η ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνεται από το αντιοξειδωτικό. Έπειτα ακολουθεί η ταυτοποίηση των συστατικών με GC-MS

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 44 ενώσεις και τα κύρια συστατικά που ανιχνεύθηκαν ήταν η καρβακρόλη (52,2%), ακολουθούμενη από το γ-τερπινένιο (8,4%), το π-κυμένιο (6,1%), λιναλοόλη (1,4%) και καρνοφυλλένιο (1,3%). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα κύρια συστατικά αιθέριου ελαίου *O. dictamnus* έδειξαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι των κοινών αλλοιώσεων των τροφίμων και των παθογόνων βακτηρίων. Το αιθέριο έλαιο του δίκταμου υπέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση λόγω της καρβακρόλης η οποία ήταν η μονή που κατέγραψε αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα σε γ-τερπινένιο, λιναλοόλη και p-cymene

Εκτός από την αναστολή της δημιουργίας αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) ή την άμεση σάρωση των ελεύθερων ριζών, η αντιοξειδωτική δράση επεκτείνεται επίσης σε

πολλές άλλες κυτταρικές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της μεταγωγής σήματος και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων, που οδηγεί σε ρύθμιση προς τα πάνω κυτταρικές αντιοξειδωτικές άμυνες. Οι περισσότερες βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες ασκούν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στην υγεία μέσω της τροποποίησης της λειτουργίας σηματοδότησης των κυττάρων. Η κερσετίνη, για παράδειγμα, που είναι το πιο άφθονο φλαβονοειδές στα φρούτα και τα λαχανικά, δεν είναι μόνο ένα ισχυρό άμεσο αντιοξειδωτικό καθαρίζοντας τα ROS, αλλά επίσης ασκεί αντιοξειδωτική δράση ενισχύοντας τη δεσμευτική δραστηριότητα που προκαλείται από το ARE (αντιοξειδωτικό αποκρινόμενο στοιχείο) μέσω της αύξησης του NRF2 επίπεδα έκφρασης, οδηγώντας έτσι σε ανοδική ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Πολύ ενδιαφέρον, σε μια μελέτη που χρησιμοποίησε ένα πειραματικό μοντέλο ηπατοκυτταρικού καρκινώματος που προκαλείται από αιθυλνιτροζαμίνη, έδειξε ότι η συμπλήρωση καρβακρόλης εξασθένησε σημαντικά τις αλλοιώσεις που σχετίζονται με τη μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων των ιστών (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης και αναγωγή της γλουταθειόνης). Ισχυρή αντικαρκινική δράση στον καρκίνο του ήπατος. Ομοίως, σε άλλη μελέτη, η χορήγηση καρβακρόλης αύξησε τις δραστηριότητες των ξενοβιοτικών-μεταβολιστικών ενζύμων στο ήπαρ ποντικού. Θα άξιζε να διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες εάν το αιθέριο έλαιο *O. dictamnus* και/ή τα μεμονωμένα συστατικά του ασκούν τέτοια αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας σηματοδότησης των κυττάρων με αποτέλεσμα την ανοδική ρύθμιση του κυτταρικού αντιοξειδωτικού δυναμικού.

Συνοψίζοντας, ο δίκταμος αποτελεί ευεργετική ουσία για το βήχα, τον πονόλαιμο, τον πονοκέφαλο, το κοινό κρυολόγημα, για δερματικές παθήσεις, για παθήσεις εντέρου και στομάχου.

Η καλή αντιοξειδωτική του ικανότητα συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες το οποίο είναι υπεύθυνο για ασθένειες όπως διαβήτης, καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις.

### 2.3 Ρόδι (*Punica granatum*)

Το ρόδι είναι ο καρπός του φυτού ροδιάς, που είναι φυτό του γένους πουνική (*Punica*) της οικογένειας πουνικίδες (*Punicaceae*). Ανήκει στην τάξη μυρτώδη (*Myrtales*). Το γένος πουνική περιλαμβάνει δύο είδη, με σημαντικότερη την Πουνική τη ροιά ή Ροιά η κοινή (*Punica granatum*). Αυτή είναι γνωστή με τα κοινά ονόματα ροδιά, ροϊδιά, ρογδιά και ρωβιά (στην Κύπρο). Καλλιεργείται κυρίως για τους καρπούς της, από τους οποίους παρασκευάζονται δροσιστικά ποτά και σιρόπια (γρεναδίνη), όπως επίσης και για καλλωπιστικούς σκοπούς (νάνες και διπλανθείς ποικιλίες κυρίως). Καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο και ευδοκimei σε θερμές περιοχές, στα νησιά και στις εσωτερικές πεδιάδες. Είναι φυλλοβόλος και αγκαθωτός θάμνος μέχρι 1-1,5 μέτρα ύψος ή μικρό δέντρο, που δεν ξεπερνά όμως τα 5 μέτρα. Έχει μεγάλα μονήρη άνθη, και βγαίνουν είτε στην άκρη των βλαστών από ένα, είτε πολλά μαζί, συνήθως κόκκινα και σπανιότερα λευκά. Τα φύλλα της είναι πράσινα, ωσειδή, γυαλιστερά. Η ροδιά απαντάται σε διάφορες μορφές, οι κυριότερες από τις οποίες είναι: οι οξύκαρπες (ξινόρροδα) και οι γλυκόκαρπες (γλυκόρροδα) καθώς και σε μορφή νάνου. Δέντρο ανθεκτικό, σπάνια προσβάλλεται από παράσιτα. Πολλαπλασιάζεται με

μοσχεύματα ή παραφυάδες. Ο καρπός της είναι το ρόδι και είναι σωροκάρπιο ή συγκάρπιο από πολλές δρύπες (παλαιότερα ονομαζόταν σίδιο). Από τα ρόδια παράγεται το αναψυκτικό ροδάδα. Ο χυμός του ροδιού αντιπροσωπεύει τα τρία τέταρτα του βάρους του. Ο φλοιός των καρπών είναι πλούσιος σε ταννίνη και χρησιμοποιείται στην κατεργασία των δερμάτων, ακόμα και στη βαφή των μαλλιών. Αφέψημα του φλοιού του καρπού και της ρίζας χρησιμοποιείται ως ανθελμινθικό και ιδίως κατά της ταινίας, γιατί περιέχει ένα αλκαλοειδές. Οι καρποί της ωριμάζουν το φθινόπωρο και συλλέγονται πριν αρχίσουν οι βροχές και τέλος αποθηκεύονται σε ξηρό περιβάλλον. (Ephraim Lansky, Robert A Newman, 2007).



### «Η ροδιά ως δέντρο» (Natalia Golovanova, 2016)

#### 2.3.1 Ποικιλίες ροδιού

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες ροδιάς ανά τον κόσμο και παρακάτω αναφέρονται τα είδη των πιο ποικιλόμορφων κρατών.

Οι ελληνικές ποικιλίες ροδιάς είναι οι εξής:

- Πολιτική: ο καρπός είναι είναι μετρίου μεγέθους 500 με 600 γρ. με φλούδα λεπτή πράσινη ελαφρώς ξανθή προς το μέρος που τη βλέπει ο ήλιος. Οι σπόροι είναι μετρίου μεγέθους κόκκινη, γλυκός σαρκώδη και είναι αρκετά εκλεκτή ποικιλία αλλά οι καρποί της δε διατηρούνται πολύ.
- Καραβέλος: έχει καρπούς μεγάλου μεγέθους και πράσινους, τα καρπίδιά της είναι μεγάλα και πλούσια σε χυμούς με ανοιχτό κόκκινο χρώμα στην αρχή και πιο βαθύ κόκκινο στην ωρίμανσή τους πολύ γλυκιές γεύσης και με μικρά σπέρματα.
- Γλυκιά Πατρών: ωριμάζει κατά τους μήνες Αύγουστο - Σεπτέμβριο, έχει ογκώδες καρπούς με χρωματιστό περίβλημα και μικρά καρπίδια με πολύ ωραία γεύση.
- Ερμιόνης: το φυτό προήλθε από την περιοχή της Ερμιόνης στην Πελοπόννησο και στη Νάουσα ο καρπός έχει μεγάλο μέγεθος σε κόκκινο χρώμα, ο σπόρος είναι μεγάλος με έντονο κόκκινο χρώμα μαλακό σπέρμα και γλυκό χυμό. Είναι αξιόλογη ελληνική ποικιλία και υπερτερεί στο κόκκινο χρώμα καρπού και σπόρου σε σύγκριση με την ισπανική Mollar de elche η οποία είναι επίσης γλυκιά και έχει μαλακό σπέρμα. Επίσης καλύπτει τις προτιμήσεις καταναλωτών που τους αρέσουν τα γλυκά

ρόδια και διατηρείται στο ψυγείο για μικρότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τη Wonderful.

- Λειφάνια: η ποικιλία αυτή παράγει μεγάλα ρόδια έως 1 κιλό το ένα με φλούδα μάλλον λεπτή ερυθρορόδυνη και οι σπόροι είναι μετρίου μεγέθους και δεν διατηρούνται πολύ οι καρποί της μετά τη συγκομιδή.
- Τσιπορόδια: ποικιλία που παράγει μέτριους καρπούς έως μεγάλους με οδόντες στον κάλυκα, ο φλοιός είναι λεπτός, με βαθύ ερυθροπόρφυρο χρώμα και οι σπόροι είναι χονδροί μάλλον ξανθοί, γίνονται λίγο γλυκοί όταν προχωρήσει η ωρίμανση.
- Χονδρορόδια: οι καρποί είναι πολύ μεγάλοι με χοντρή ερυθρωπή φλούδα και οι σπόροι είναι μετρίου μεγέθους και έχουν γλυκόξινη γεύση.
- Κρασορόδια: ο καρπός έχει μέτριο ή μικρό μέγεθος με φλούδα λεπτή, πολύ κόκκινη που συχνά σκάει και οι σπόροι είναι κόκκινοι. Ο καρπός δεν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη συγκομιδή.
- Γούνες: ο καρπός είναι μικρός μέχρι μέτριος με φλούδα χοντρή, μαλακιά με χρώμα βυσσινί προς το μέρος που το βλέπει ο ήλιος και οι σπόροι έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα. Ο καρπός δεν διατηρείται πολύ μετά την συγκομιδή.
- Ξινορόδια: ο καρπός είναι μικρός με φλούδα χοντρή πολύ κόκκινη και οι σπόροι έχουν έντονη ξινή γεύση. Επίσης ο καρπός διατηρείται για αρκετό χρόνο μετά την συγκομιδή.
- Ξινή Πατρών: ωριμάζει τον Οκτώβριο. Έχει καρπούς πολύ ογκώδεις, με λεπτό, σκληρό και χρωματιστό φλοιό. Τα καρπίδιά της είναι πολύ κόκκινα με ξινή γεύση και η ποικιλία αυτή είναι κατάλληλη για παραγωγή χυμού και γρεναδίνης.

Οι ινδικές ποικιλίες ροδιάς είναι οι εξής:

- Alandi: Η ποικιλία αυτή της ροδιάς περιλαμβάνει καρπίδια με βαθύ ροζ χρώμα και πολύ σκληρά σπέρματα. Έχει γλυκόξινη γεύση.
- Bedana: Καρπός μεσαίου προς μεγάλου μεγέθους. Σκούρος ή λευκός ο φλοιός. Ροζ ή άσπρα καρπίδια με μαλακό σπέρμα. Είναι γλυκιά ποικιλία.



Ινδική ποικιλία ροδιάς Bedana

- Dholka: Καρπός μεγάλου μεγέθους. Φλοιός παχύς κίτρινο-κόκκινος. Καρπίδια άσπρα με σκληρό σπέρμα. Γλυκιά ποικιλία.
- Ganesh: Ποικιλία με κίτρινο-ροζ φλοιό, ροζ-κόκκινα καρπίδια και πολύ μαλακό σπέρμα. Γλυκόξινη ποικιλία



#### Ινδική ποικιλία Ganesh

- **Arakta:** Καρπός μεγάλος με βαθύ κόκκινο φλοιό. Καρπίδια χρώματος βαθύ ροζ ή κόκκινα με σκληρά σπέρματα. Γλυκόξινη ποικιλία.



#### Ινδική ποικιλία Arakta

- **Mridula:** Αειθαλής θάμνος με καρπούς σκούρου κόκκινου χρώματος, βάρους 250gr με μαλακά σπέρματα. Κατάλληλη ποικιλία με ογκομετρούμενη οξύτητα 0,47% και γλυκιά γεύση.
- **Bhagwa:** Δημοφιλής ποικιλία με ελκυστικό, λεπτό, κόκκινο φλοιό. Ροζ γλυκά καρπίδια με μέτριας σκληρότητας σπέρματα.
- **Ruby:** Πρώιμη ποικιλία. Καρπός με λεπτό φλοιό, κόκκινα καρπίδια με γλυκιά γεύση και μαλακά σπέρματα.

Οι Αμερικάνικες ποικιλίες ροδιάς είναι οι εξής:

- **Ποικιλία ροδιάς Grenada:** Προήλθε από την Wonderful μέσα από γενετική επιλογή και ωριμάζει ένα μήνα νωρίτερα από αυτή. Ο καρπός της έχει έντονο κόκκινο χρώμα και ο φλοιός χονδρός και σκληρός. Τα καρπίδιά της έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα.



#### Grenada

- **Sweet:** Ο φλοιός είναι πρασινοκόκκινος. Ο χυμός που προέρχεται από αυτή την ποικιλία έχει ροζ χρώμα και πολύ γλυκιά γεύση. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και σαν καλλωπιστικό δέντρο.



- Paper shell: Οι καρποί της είναι μεγάλοι, κόκκινοι και τα καρπίδιά της μικρά, αρωματικά με πολύ γλυκιά γεύση. Ωριμάζει Σεπτέμβριο - Οκτώβριο.
- Spanish rudy: Ο καρπός της είναι σφαιρικός, μετρίου μεγέθους, με φλοιό έντονου κόκκινου χρώματος. Τα καρπίδιά της είναι κόκκινα, γλυκά με σχετικά μαλακά σπέρματα.
- Balegal: Προέρχεται από την Καλιφόρνια. Ο καρπός της είναι στρογγυλός, μετρίου μεγέθους. Χαρακτηριστικό είναι το ροζ χρώμα του φλοιού.
- Grab: Δημιουργήθηκε στα εργαστήρια του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια. Ο καρπός της είναι μεγάλος και τα καρπίδιά της δίνουν κόκκινο χυμό όξινης γεύσης.
- Green globe: Προέρχεται από την Καλιφόρνια. Ο καρπός της είναι μεγάλος και τα καρπίδιά της είναι γλυκά και αρωματικά. Ο φλοιός είναι πράσινου χρώματος.
- Early foothill: Ποικιλία με βαθύ κόκκινα καρπίδια και μεσαίας σκληρότητας σπέρματα. Γλυκόξινη ποικιλία. Ωριμάζει 2-4 εβδομάδες νωρίτερα από την Wonderful.
- Ποικιλία ροδιάς Wonderful: Είναι η πιο ευρέως καλλιεργούμενη ποικιλία στις ΗΠΑ. Τα τελευταία χρόνια, φυτεύσεις ροδιάς στην Ελλάδα έγιναν χρησιμοποιώντας κυρίως αυτή την ποικιλία. Στη Β. Ελλάδα συγκομίζεται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου. Πιθανώς περιοχές της Β. Ελλάδας να μην είναι οι πλέον κατάλληλες για την καλλιέργειά της αφού μπορεί οι καρποί να αντιμετωπίζουν προβλήματα σχισίματος ή και μετασυλλεκτικών σήψεων εξαιτίας χαμηλών θερμοκρασιών και βροχοπτώσεων κατά τη συγκομιδή (Οκτώβριο-Νοέμβριο). Αναφέρεται πως αυτή η ροδιά έχει μικρή προς μέτρια απόδοση/στρέμμα, που συνήθως δεν είναι μεγαλύτερη από 1,8 τόνους/στρέμμα, όμως Ισραηλινοί γεωπόνοι υποστηρίζουν πως συγκομίζουν περί τους 4 τόνους/στρέμμα. Η εξωτερική εμφάνιση του καρπού και των σπόρων είναι πολύ ελκυστική. Έχει μεγάλο μέγεθος καρπού, ομοιόμορφο κόκκινο χρώμα φλοιού, βαθύ κόκκινο χρώμα σπόρων, ημίσκληρα σπέρματα και γλυκόξινη γεύση.



Wonderful

- Early wonderful: Ποικιλία με βαθύ κόκκινα καρπίδια και μεσαίας σκληρότητας σπέρματα. Είναι γλυκόξινη ποικιλία και ωριμάζει 2 εβδομάδες νωρίτερα από την Wonderful.
- Eversweet: Καρποί ροζ προς κόκκινου χρώματος με ροζ καρπίδια και μαλακό σπέρμα. Είναι γλυκιά ακόμα και πριν την ωρίμανση.

- Golden globe: Πολύ μεγάλου μεγέθους καρπός, χρυσοπράσινου και με ροζ-κόκκινο χρωματισμό. Καρπίδια ροζ και κόκκινα με μαλακά μικρά σπέρματα. Είναι γλυκιά ποικιλία.

Οι Τουρκικές ποικιλίες ροδιάς είναι οι εξής:

- Ak anar: Ωριμάζει τον Σεπτέμβριο. Οι καρποί της έχουν μέτριο μέγεθος. Ο φλοιός της είναι χοντρός λευκού-κίτρινου χρώματος. Τα καρπίδιά της είναι αρκετά μεγάλα και έχουν ανοιχτό χρώμα.
- Tchercherdekis: Ωριμάζει τον Οκτώβριο. Οι καρποί της είναι αρκετά μεγάλοι, χρώματος κίτρινου και κόκκινου. Τα καρπίδιά της είναι μικρά με υποτυπώδη σπέρματα.
- Kyzyl anar: Ωριμάζει τον Οκτώβριο. Οι καρποί της είναι αρκετά μεγάλοι, χρώματος κίτρινου και κόκκινου. Ο φλοιός της είναι χονδρός με βαθύ κόκκινο χρώμα. Τα καρπίδιά της είναι πολύ μικρά και κόκκινα.
- Kara anar: Ωριμάζει τον Δεκέμβριο. Οι καρποί της είναι αρκετά μεγάλοι. Ο φλοιός τους είναι σκληρός και χρώματος κόκκινου - ιώδες. Τα καρπίδιά της είναι μεγάλα και κόκκινου χρώματος.
- Asinar: Ο καρπός είναι μεγάλου μεγέθους με μέσο βάρος 505gr. Έχει κόκκινα καρπίδια με μαλακό σπέρμα και γλυκόξινη γεύση.
- Eksilik: Ξινή ποικιλία με 5% ογκομετρούμενη οξύτητα και κόκκινα καρπίδια.
- Emar: Φλοιός βαθού κόκκινου χρώματος. Τα καρπίδια είναι κόκκινα. Είναι γλυκιά ποικιλία με χαμηλή ογκομετρούμενη οξύτητα.
- Fellahyemez: Καρπός με μεγάλα ροζ καρπίδια και μαλακά σπέρματα. Γλυκιά ποικιλία με χαμηλή ογκομετρούμενη οξύτητα.
- Katirbasi: Καρπός μεγάλου μεγέθους με μέσο βάρος 517gr. Έχει μεγάλα κόκκινα καρπίδια και γλυκόξινη γεύση.
- 07' N 08' Hicaznar: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι σκούρα κόκκινα με μέσης σκληρότητας σπέρμα και η γεύση είναι γλυκόξινη. Καλλιεργείται καλά σε χώρες της Μεσογείου και είναι εξαγωγήμη ποικιλία.
- 33 N 26 Cekirdeksiz: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια έχουν χρώμα ροζ ή κόκκινο με μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- 33 N 16 Silifke asisi: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κόκκινο όπως και τα καρπίδια με μέσης σκληρότητας σπέρματα και γλυκόξινη γεύση.
- 31 N 06 Lefan: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με μέσης σκληρότητας σπέρμα και γλυκόξινη γεύση.
- 31 N 07 Katirbasi: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι κόκκινα με μέσης σκληρότητας σπέρμα και γλυκόξινη γεύση.
- 33 N 23 Cevlik: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- 07 N 14 Mayhos: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι κόκκινου χρώματος με σκληρά σπέρματα και ξινή γεύση.
- 33 N 12 Eksi goknar: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και κόκκινο. Τα καρπίδια είναι σκούρου κόκκινου χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- 07 N 03 Yufka Kabuk: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο. Τα καρπίδια είναι ανοιχτού ροζ χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.

- 33 N 11 Asi nar: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα κίτρινο και ροζ. Τα καρπίδια είναι ανοιχτού ροζ χρώματος με μέσης σκληρότητας σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- 01 N 04 Fellahyemez: Ο φλοιός του καρπού της συγκεκριμένης ποικιλίας ροδιάς έχει χρώμα κίτρινο και ροζ. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 1: Ο φλοιός του καρπού έχει ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 2: Ο φλοιός του καρπού αυτής της ποικιλίας ροδιάς έχει ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 8: Ο φλοιός του καρπού έχει χρώμα ροζ. Τα καρπίδια είναι κόκκινου χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 10: Ο φλοιός του καρπού έχει ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι κόκκινου χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 12: Ο φλοιός του καρπού έχει ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με σκληρά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 1261: Ο φλοιός του καρπού έχει σκούρο ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι ανοιχτού ροζ χρώματος με μαλακό σπέρμα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 1267: Ο φλοιός του καρπού αυτής της ποικιλίας ροδιάς έχει σκούρο κόκκινο χρώμα. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- Izmir 1445: Ο φλοιός του καρπού έχει ροζ χρώμα. Τα καρπίδια είναι ροζ χρώματος με μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.

Οι ισπανικές ποικιλίες ροδιάς είναι:

- Blanca: Ωριμάζει τον Σεπτέμβριο με Οκτώβριο. Έχει καρπούς μετρίου μεγέθους. Ο φλοιός των καρπών της είναι λείος, τα καρπίδιά της είναι κόκκινα, χυμώδεις και με γλυκιά γεύση.
- Dultse colorada: Η ποικιλία αυτή ωριμάζει τον Οκτώβριο. Έχει καρπούς ογκώδεις, με λείο και λεπτό φλοιό, το οποίο παίρνει κόκκινο χρώμα στα τμήματα εκείνα της επιφάνειας του φλοιού που δέχονται άμεσα το ηλιακό φως. Τα καρπίδιά της είναι μεγάλα και κόκκινα.
- Cagin: Ωριμάζει τον Οκτώβριο. Οι καρποί της είναι μεγάλου μεγέθους με χρωματιστό φλοιό. Τα καρπίδιά της είναι μικρά, κόκκινα και έντονα όξινα, με σκληρά σπέρματα. Ποικιλία κατάλληλη για παρασκευή χυμών και γρεναδίνης.
- Pignonenca: Η ποικιλία αυτή έχει μεγάλους χρωματιστούς καρπούς, με κόκκινα καρπίδια, που είναι ανθεκτικοί στις μεταφορές και τη διατήρησή τους για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Valenciana: Η ποικιλία αυτή συγκομίζεται τον Αύγουστο, με λίγα εγκαύματα από τον ήλιο και μικρό κίνδυνο προσβολής από τα έντομα ή τον άσχημο καιρό. Είναι χαμηλής απόδοσης και ποιότητας εξωτερικών χαρακτηριστικών, ενώ έχει και μικρό μέγεθος.
- Mollar de elche: Η ποικιλία αυτή συγκομίζεται τέλη Σεπτέμβρη με μέσα Νοέμβρη. Παρουσιάζει εγκαύματα από τον ήλιο και σχισίματα φλοιού, αλλά έχει πολύ καλές αποδόσεις, τα εξωτερικά χαρακτηριστικά είναι εξαιρετικά, οι καρποί είναι μεγάλου

μεγέθους, είναι πολύ αποδεκτή από τον καταναλωτή και θεωρείται η πιο εμπορική ποικιλία στη Δυτική Ευρώπη.

- Agridulce de ojos 4: Είναι ποικιλία αυτή έχει μέσο βάρος καρπού 524gr, με κόκκινα καρπίδια και σκληρά σπέρματα. Έχει γλυκόπικρη γεύση με μέτρια οξύτητα.
- Borde de albaterra: Είναι ποικιλία με μέσο βάρος καρπού 370gr, με καρπίδια βαθύ κόκκινα και σκληρά σπέρματα. Έχει πικρή γεύση και υψηλή οξύτητα.
- Mollar de elche 15: Είναι ποικιλία με μέσο βάρος καρπού 272gr, με καρπίδια βαθύ κόκκινα και μαλακά σπέρματα. Έχει γλυκιά γεύση και χαμηλή οξύτητα.
- Mollar de orihuela: Είναι ποικιλία με μέσο βάρος καρπού 414gr, με καρπίδια χρώματος ροζ-κόκκινα με μαλακά σπέρματα. Έχει γλυκιά γεύση και χαμηλή οξύτητα.
- Pinon tierno de ojos 9: Είναι ποικιλία με μέσο βάρος καρπού 405gr, με καρπίδια χρώματος ροζ-κόκκινα με μαλακά σπέρματα. Έχει γλυκιά γεύση και χαμηλή οξύτητα.

### 2.3.2 Αντιοξειδωτική δράση

Αν και ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει διάφορα ενζυμικά συστήματα για να εξισορροπήσει τις ελεύθερες ρίζες, η κύρια αντιμετώπισή τους γίνεται από τα διατροφικά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη K, φαινολικά συστατικά β-καροτένιο, λυκοπένιο και σελήνιο. Το ρόδι είναι πλούσιο σε βιταμίνες K και C, φυλλικό οξύ, παντοθενικό οξύ, B6, μέταλλα, φυτικές ίνες και αντιοξειδωτικές ουσίες. Γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι οι: ελλαγιτανίνες, φλαγονοειδή, ανθοκυανιδίνες, ανθοκυανινίνες, οιστρογονικές φλαβονόλες και φλαβόνες. Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε υδατοδιαλύτα-υδρόφιλα και λιποδιαλυτά-υδρόφοβα. Γενικά τα υδρόφιλα δρουν στο εσωτερικό του κυττάρου και το αίμα, ενώ το υδρόφοβα δρουν στις μεμβράνες των κυττάρων προστατεύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωση τροφίμων, που περιέχουν αντιοξειδωτικά, βοηθάει τον οργανισμό στην αντιμετώπιση των συνεπειών της οξειδωσης. Το ρόδι περιέχει μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών σε σχέση με άλλα φρούτα, αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας των φαινολικών συστατικών. Τέλος, έχει γίνει γνωστό από έρευνες πως κυριαρχούν στο ρόδι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβονόνες όπως επίσης και οι φαινολικοί εστέρες και τα φαινολικά οξέα. (Moneim Ahmed E. Abdel, 2012)

Σύμφωνα με την Noda et al 2002, η οποία ασχολήθηκε με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καρπών της ροδιάς και των ανθοκυανίνων παρατηρήθηκε πως όλοι οι ιστοί των καρπών περιείχαν πολυφαινόλες με τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις εντοπίζονται στις μεμβράνες και οι χαμηλότερες στα σπέρματα. Επίσης, σε χυμό ροδιού που έχει παρασκευαστεί από την σύνθλιψη ολόκληρου καρπού, παρατηρήθηκαν πολυφαινόλες σε υψηλότερη συγκέντρωση (5 Mm) σε σύγκριση με άλλους χυμούς καρπών που θεωρούνται πλούσιοι σε αντιοξειδωτικά όπως σταφύλι 3,3 Mm και ακτινίδιο 2,2 Mm. Επίσης, στην ίδια μελέτη βγήκε το συμπέρασμα πως οι καρποί της ροδιάς περιέχουν πολυφαινόλες με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι ανθοκυανίνες και οι ταννίνες της μεμβράνης του καρπού είναι τα αντιοξειδωτικά με την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ο χυμός του ροδιού έχει την υψηλότερη

συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών σε σχέση με τους χυμούς άλλων καρπών (A. Koutelidakis, 2016).

Επίσης, το ρόδι (*Punica granatum L.*) είναι εγγενές στην περιοχή της Μεσογείου και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς και στη λαϊκή ιατρική πολλών χωρών. Στην Ινδία, χρησιμοποιείται με τη μορφή χυμού, συμπύκνωμα, κονσερβοποιημένα ποτά, κρασί, μαρμελάδα και ζελέ. Ο χυμός περιέχει μια μικρή ποσότητα πηκτίνης, ασκορβικού οξέος και φλαβονοειδή. Η διαλυτή πολυφαινολική περιεκτικότητα του χυμού (0,2-1,0%) περιλαμβάνει ανθοκυανίνες, κατεχίνες, ελλαγικές τανίνες και γαλλικά και ελλαγικά οξέα (8). Προηγούμενες μελέτες έξω από το εργαστήριο έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση του μεθανολικά εκχυλίσματα φλούδας ροδιού σε διάφορα *in vitro* μοντέλα (9). Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιορίσει το προστατευτικό αποτέλεσμα της τροφοδοσίας του μεθανολικού εκχυλίσματος της φλούδας ροδιού σε αλμπίνο αρουραίους του στελέχους Wistar κατά των τοξικών επιδράσεων του τετραχλωράνθρακα (CCl<sub>4</sub>) από βιοχημικές και ιστοπαθολογικές μεθόδους. Το επίπεδο των διαφόρων ROS-combating ενζύμων στο ήπαρ, συγκεκριμένα καταλάση, υπεροξειδάση και SOD, και η υπεροξείδωση των λιπιδίων υπολογίστηκαν σε ομογενοποιημένα ήπατος για την προστασία που παρέχει το μεθανολικό εκχύλισμα της φλούδας ροδιού κατά της τοξικότητας CCl<sub>4</sub>. Η απόδοση του εκχυλίσματος που λαμβάνεται από τη φλούδα του ροδιού χρησιμοποιώντας το MeOH βρέθηκε να είναι 10,38 (0,89% (w/w)). Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα του εκχυλίσματος [(+)-ισοδύναμο κατεχίνης] βρέθηκε ότι είναι 42% (w/w). Με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) εντοπίστηκε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας ροδιού περιέχει γαλλικό οξύ και ελλαγικό οξύ ως κύρια συστατικά μαζί με άλλα συστατικά. Οι ταυτότητες των δύο αυτών συστατικών επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό των σχετικών χρόνων συγκράτησης και με ακίδα με αντίστοιχα πρότυπα. Τα ποσοστά γαλλικού και ελλαγικού οξέος βρέθηκαν να είναι 7,5 και 54,6%, αντίστοιχα σε εκχύλισμα MeOH. Η παρουσία ελλαγικού οξέος, γαλλικού οξέος και το τριτ-γαλλικό οξύ έχει αναφερθεί στον χυμό ροδιού. Πρόσφατα, η αντιοξειδωτική δράση του EtOAc, του MeOH και του νερού εκχυλίσματα από φλούδες και σπόρους ροδιού έχουν αναφερθεί σε διάφορα μοντέλα *in vitro*. Ανάμεσα σε όλα τα αποσπάσματα, το εκχύλισμα MeOH φλούδας ροδιού έχει αναφερθεί ότι έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση σε διάφορα μοντέλα. Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη, μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα από φλούδες ροδιού έχει χρησιμοποιηθεί. Σε πείραμα επίδρασης στην υγεία των αρουραίων, ακολούθησε προεπεξεργασία CCl<sub>4</sub> με εκχυλίσματα φλούδας ροδιού (επεξεργασία CCl<sub>4</sub> στα επίπεδα καταλάσης), με SOD και με ένζυμα υπεροξειδάσης προκαλώντας υπεροξείδωση λιπιδίων σε ομογενοποιημένα του ήπατος. Η θεραπεία αρουραίων με εφάπαξ δόση CCl<sub>4</sub> στα 2,0 g/kg σώματος: Το βάρος μειώνει σημαντικά τα επίπεδα καταλάσης, υπεροξειδάσης, και SOD κατά 81, 89 και 49%, αντίστοιχα. Αφ' ετέρου, η υπεροξείδωση των λιπιδίων αυξάνεται ~ 3 φορές σε σύγκριση με τον έλεγχο που οφείλεται στη θεραπεία CCl<sub>4</sub>. Ωστόσο, η προκαταρκτική αγωγή των αρουραίων με το μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας ροδιού στα 50 mg/kg (σε όρους των ισοδυνάμων κατεχίνης) διατηρεί την καταλάση, την υπεροξειδάση και το SOD, οι οποίες είναι συγκρίσιμες με τις τιμές ελέγχου των ενζύμων. Αυτό δείχνει την προστασία που παρέχει η σίτιση εκχυλίσματος φλούδας ροδιού στους αρουραίους διατηρώντας τα επίπεδα από αυτά τα ένζυμα, ακόμη και μετά από θεραπεία με CCl<sub>4</sub>. Οι τιμές υπεροξείδωσης των λιπιδίων έχουν αποδειχθεί ότι αποκαθίστανται κατά 54%, καθώς σε σύγκριση με τον έλεγχο που δείχνει αντιλιπιδικές, υπεροξειδωτικές επιδράσεις του στα συστατικά του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού. Η επίδραση της ελεύθερης ρίζας στα μέσα ηπατικά αποτοξινωτικά ένζυμα (καταλάση, SOD, και υπεροξειδάση) μείωσαν την ενζυμική δραστηριότητα, κυρίως την καταλάση και υπεροξειδάση, λόγω αδρανοποίησης ενζύμων κατά τον καταλυτικό κύκλο. Σε αυτές τις συνθήκες, το εκχύλισμα ροδιού που περιέχει το ελλαγικό οξύ και το γαλλικό οξύ δρα καταστροφικά για την ελεύθερη ρίζα, μειώνοντας τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου και το ανιόν υπεροξειδίου και, κατά συνέπεια, την υπεροξείδωση λιπιδίων και αδρανοποίηση ενζύμου, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτό μπορεί επίσης να φανεί προς την πιθανή de novo σύνθεση αυτών των ενζύμων που προκαλείται από τα συστατικά του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού. Το CCl<sub>4</sub> έχει μελετηθεί εκτενώς ως ηπατική τοξική ουσία και μεταβολίτες, όπως η ρίζα τριχλωρομεθυλίου (CCl<sub>3</sub>) και τριχλωρομεθυλ

υπεροξυ ρίζα (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) εμπλέκονται στην παθογένεση της βλάβης του ήπατος και των νεφρών. Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι το CCl<sub>4</sub> προκαλεί αλλαγές γύρω από την κεντρική φλέβα του ήπατος και άλλες οξειδωτικές βλάβες με τη διαρροή των ενζυμικών δεικτών όπως το GOT και το GPT στον ορό. Πραγματοποιήθηκαν ιστοπαθολογικές μελέτες για το ήπαρ(άνθρακας επεξεργασμένος με τετραχλωρίδιο και μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας ροδιού που έχουν υποστεί επεξεργασία). Η μαζική γενιά ελεύθερων ριζών στην ηπατική βλάβη που προκαλείται από το CCl<sub>4</sub> προκαλεί απότομη αύξηση του υπεροξειδωση λιπιδίων στο ήπαρ. Στην περίπτωση αρουραίων που υποβλήθηκαν σε προκαταρκτική αγωγή με εκχύλισμα φλούδας ροδιού ακολουθούμενο από έκθεση σε CCl<sub>4</sub>, το ήπαρ αποδείχθηκε ότι διατηρεί φυσιολογική ηπατική αρχιτεκτονική με λίγες περιοχές να αιμορραγούν μεταξύ των στηλών των ηπατοκυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα την προστασία που παρέχεται από το εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Ο Lin έδειξε ότι το συκώτι χρειάζεται την προστατευτική και αντιοξειδωτική δράση ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων κατά της ηπατικής βλάβης που προκαλείται από το CCl<sub>4</sub>, ενδέχεται να περιλαμβάνει και μηχανισμούς που σχετίζονται με επιδράσεις σάρωσης ελεύθερων ριζών. Ο Singh et al. επίσης περιέγραψε την ηπατοπροστατευτική και αντιλιπιδική υπεροξειδωτική δράση ελλαγικού οξέος έναντι της επαγόμενης από CCl<sub>4</sub> ηπατοτοξικότητας στο ήπαρ αρουραίου. Οι φαινολικές ενώσεις, όπως καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κυαναρίνη και κυαναροσίδη, επιδρούν θετικά ενάντια της τοξικότητας του υδροϋπεροξειδίου του τριτ-βουτυλίου

Το πόρισμα των ανωτέρω μελετών είναι ότι το εκχύλισμα MeOH από τον φλοιό του ροδιού έχει ένα ενισχυτικό/συντηρητικό ρόλο στα ένζυμα του ήπατος, που συμμετέχουν στην καταστροφή των ROS. Ακόμα, προστατεύει από το τοξικό CCl<sub>4</sub> όπως δείχνουν ιστοπαθολογικές εξετάσεις ύπατος. Ακόμα, το περίβλημα του ροδιού έχει ποικιλία φαινολικών ενώσεων με αποτέλεσμα να έχει πληθώρα δράσεων. Χρειάζεται βέβαια εμπάθυνση με την κάθε φαινολική ένωση ξεχωριστά για την ερμηνεία των ενισχυτικών μηχανισμών των ενζύμων και τον προστατευτικό ρόλο που έχει στο ήπαρ. Τέλος πρέπει να μελετηθεί και η πιθανή συνέργεια των ενώσεων που θα βοηθά στην καταπολέμηση των ROS.

## 2.4 Χαρούπι

Τα λιγότερο γνωστά είδη φρούτων, συμπεριλαμβανομένου του χαρουπιού, έχουν αποκτήσει μεγαλύτερη δημοτικότητα πρόσφατα. Περιλαμβάνουν υψηλή περιεκτικότητα σε μη θρεπτικά, θρεπτικά συστατικά, και βιοδραστικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα, καθώς και θρεπτικές ενώσεις όπως τα σάκχαρα, αιθέρια έλαια, καροτενοειδή, βιταμίνες και μέταλλα. Τα λιγότερο γνωστά φρούτα έχουν ξεχωριστή γεύση, εξαιρετική φαρμακευτική αξία και λειτουργίες όπου βοηθούν στη φροντίδα της υγείας (Engin & Mert, 2020; Eydurán et al., 2015; Gundogdu et al., 2014 Kaskoniene et al., 2020). Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.) είναι ένα αειθαλές δέντρο που ανήκει στο οικογένεια Leguminosae ή Fabaceae (υποοικογένεια Caesalpinioideae) που προέρχεται από την περιοχή της Μεσογείου. Έχει ευρεία εκμετάλλευση από την αρχαιότητα λόγω των βρώσιμων καρπών του (που συνήθως αναφέρονται ως λοβοί ή απλώς χαρούπι). Εξακολουθεί να χρησιμοποιείται επί του παρόντος σε βιομηχανίες αγροδιατροφής και σε σκοπούς αποκατάστασης εδάφους (Tous & Antoni, 2013). Τα τελευταία χρόνια, η μέση παραγωγή του λοβού ή χαρουπιού στον κόσμο μειώθηκε από 165.990 τόνους το 2013 (Yatmaz & Turhan, 2018) σε 136.612,75 τόνους το 2018 (FAOSTAT, 2020). Οι χαρουπιές χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για να ληφθεί κόμμι χαρουπιού (LBG, πυκνωτικό E410) από τους σπόρους των λοβών που αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του βάρους του λοβού.



*κόμμι χαρουπιού*

Η εμφάνιση φθηνότερων υποκατάστατων του LBG, όπως το γκουάρ ή η κόμμι ξανθάνης, από χαρουπιές η καλλιέργεια δεν είναι πλέον κερδοφόρα στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Lopez-S 'anchez' et al., 2018). Ωστόσο, πολλές χώρες εξακολουθούν να καλλιεργούν χαρουπιές, κάτι που δικαιολογείται από πλευράς φαρμακολογικών συμφερόντων και βιομηχανίας τροφίμων. Οι κύριοι παγκόσμιοι παραγωγοί λοβού χαρουπιού από το 2015 έως το 2018 ήταν η **Πορτογαλία** (28,83%), η **Ιταλία** (23,11%), το **Μαρόκο** (16,11%) και η **Τουρκία** (10,39%) (FAOSTAT, 2020). Οι τέσσερις κύριες γενετικές ομάδες του *C. siliqua* που εντοπίστηκαν είναι στο νότιο Μαρόκο, στη νότια Ισπανία και στην κεντρική Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένων τύπων γονιδίων από την Πορτογαλία, την Αλγερία, τη Γαλλία, τη Σαρδηνία, τη Σικελία και τις Βαλεαρίδες. Η χρήση του χαρουπιού χρονολογείται στους αρχαίους Αιγύπτιους που έτρεφαν τα ζώα με λοβούς χαρουπιών και φημίζονται επίσης ότι χρησιμοποίησαν το κόμμι ως βοηθητικό στο δέσιμο της μούμιας

Οι Άραβες χρησιμοποιούσαν τον σπόρο του χαρουπιού ως μονάδα του βάρους. Ονόμασαν τον σπόρο qirat ή karāt, και το τυπικό βάρος του σπόρου του χαρουπιού έγινε η μονάδα βάρους του χρυσού και των πολύτιμων λίθων. Σήμερα, οι λοβοί χαρουπιών χρησιμοποιούνται συνήθως σε κέικ, μπισκότα, ποτά και διάφορα σνακ στην Αίγυπτο. Οι μαρμελάδες και τα λικέρ παρασκευάζονται από χαρούπι σε Τουρκία, Μάλτα, Πορτογαλία, Ισπανία και Σικελία. Στη Λιβύη, ένα σιρόπι που ονομάζεται rub εκχυλίζεται από χαρούπι και χρησιμοποιείται για την παρασκευή ασίδα, ένα παραδοσιακό γλυκό.



*γλυκό asida*

Η χαρουπιά είναι είδος φυτού ανθεκτικό στην ξηρασία και πολύ καλά προσαρμοσμένο στις κλιματικές συνθήκες της περιοχής της Μεσογείου με ρίζες ανθεκτικές στην υπερχειλίση (Gucel & Sakcali, 2012). Δεδομένης της αυξανόμενης κλιματικής κρίσης, το φυτό αυτό απαιτεί λίγη συντήρηση και μπορεί να είναι μια καλή λύση στο μέλλον, τόσο οικολογικά όσο και οικονομικά. Η Santos et al. (2019) κατέληξε στο συμπέρασμα πως το φυτό της χαρουπιάς μπορεί και αναπτύσσεται καλύτερα στις θερμικές συνθήκες που εντοπίζονται στη περιοχή του Αλγκάρβε, μία περιορισμένη περιοχή με καλά καθορισμένο κλίμα στην Πορτογαλία. Αυτή η μελέτη επιβεβαιώνει ότι η χαρουπιά εντοπίζεται περισσότερο σε ζεστές περιοχές με χαμηλές απαιτήσεις ψύξης, όπου οι θερμοκρασίες κυμαίνονταν μεταξύ 16 και 36 °C για περισσότερο από το 50% των ωρών του έτους. Αυτό το χαρακτηριστικό θεωρείται ένας από τους βασικούς λόγους όπου η χαρουπιά έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη πυροπροστασία των αγροδασικών οικοσυστημάτων της Μεσογείου. Άλλωστε είναι απαραίτητο συστατικό της μεσογειακής βλάστησης, όπου πρακτικά αν το φυτό δεν κλαδευτεί, μετατρέπεται σε θάμνο. Ένας ακόμη λόγος είναι ο εύκολος πολλαπλασιασμός του στη φύτευση (Srecec et al., 2017).

Το χαρούπι πέρα από τα οφέλη που παρέχει στην υγεία έχει και μεγάλες δυνατότητες στη βιομηχανία τροφίμων

Χαρακτηριστικό του είναι το ισχυρό άρωμα το οποίο παραμένει ακόμη και μετά την επεξεργασία του (Goulas et al., 2016. Αυτή η μοναδική ικανότητα εξηγείται από την παρουσία **οξέων, εστέρων και αλδεϋδών/κετονών** που εκπέμπονται από τα φρούτα και τη σκόνη της χαρουπιάς, τα οποία είναι **πηητικές οργανικές ενώσεις που συμβάλλουν στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την άμυνα του φυτού** (Krokou et al., 2019, σ. 35365–35374).

Η διαφοροποίηση και η καινοτόμος ανάπτυξη της βιομηχανίας τροφίμων, καθώς και ο τεχνολογικός εκσυγχρονισμός δημιούργησε την ανάγκη για νέες στρατηγικές επέκτασης της γραμμής προϊόντων Lobanov et al. (2018) μελέτησε τον οικονομικό αντίκτυπο της ενσωμάτωσης φυτικών συστατικών στην καινοτόμο παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με βάση τους το αλεύρι. Ειδικότερα, η παραγωγή κουλουριού λεκιθίνης με τη προσθήκη 4% χαρουπιού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λίπος και φυτικές ίνες και τη μείωση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, σε συνδυασμό με καλύτερη απόδοση παραγωγής από τη παραγωγή κουλουριού λεκιθίνης χωρίς χαρούπι. Η τιμή του κουλουριού με χαρούπι είναι μόλις 6% υψηλότερη από εκείνη του κουλουριού όπου δεν έχει προστεθεί χαρούπι. Αυτή η ανάλυση επιτρέπει την αναγνώριση του χαρουπιού ως εξαιρετική πρώτη ύλη για τη παραγωγή ψωμιού και αλευριού χωρίς γλουτένη, εμπλουτισμένα με βιταμίνες, μέταλλα και πρωτεΐνες. Αυτή η εργασία στοχεύει να



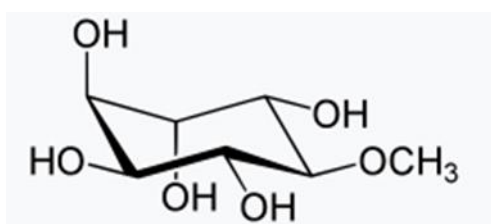
ανασκοπήσει και να αναδείξει τις ευεργετικές πτυχές από το χαρούπι και τη δυνατότητα χρήσης του, ως λειτουργικού συστατικού στη βιομηχανία τροφίμων, ανοίγοντας νέες προοπτικές για αυτή τη βιώσιμη καλλιέργεια.

#### 2.4.1 Χαρακτηριστικά και επεξεργασία χαρουπιού

Ως λειτουργικό τρόφιμο ορίζεται ένα τρόφιμο ή ποτό που περιέχει διατροφικούς ή βιοδραστικούς παράγοντες με οφέλη για την υγεία, οι οποίοι είναι περισσότεροι από εκείνους που θα προσλαμβάνονταν από την καθημερινή διατροφή (McClements & Xiao, 2014). Στις μέρες μας, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα συμπληρώματα που προέρχονται από φυσικά, παραδοσιακά και μη παραδοσιακά τρόφιμα ως πιθανές πηγές ενίσχυσης της υγείας (Baumel et al., 2018). Σχετικά με αυτό, το χαρούπι (*Ceratonia siliqua* L.) έχει δυναμικά σημαντική σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των φυτοχημικών συστατικών (Goulas et al., 2016), των αρωματικών ιδιοτήτων (Foundation & Aue, 1997), και των διατροφικών ωφελειών (Παπαευσταθίου & Αγαπίου, 2018). Η χαρουπιά φτάνει τα 8-17 μέτρα ύψος, με φαρδύ ημισφαιρικό στέμμα και χοντρό κορμό με καφέ, τραχύ φλοιό και γερά κλαδιά. Το δέντρο παράγει καρπούς σε βρώσιμο φασόλι/λοβό, που είναι επίσης γνωστό ως χαρούπι. Τα φασόλια (λοβοί) κρέμονται σε μορφή συστάδας και παραμένουν πράσινα μέχρι να ωριμάσουν πλήρως. Το ώριμο φρούτο είναι ένας μακρύς λοβός σε σχήμα κιμιτάριου (10–25 cm) και περιέχει αρκετά σκληρούς σπόρους όπου είναι ενσωματωμένοι σε πολτό. Οι λοβοί ποικίλλουν σημαντικά σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως διάσταση, μέγεθος, βάρος, σχήμα, πυκνότητα, χρώμα και αναλογία σπόρων λόγω διαφορών στην ποικιλία και στις κλιματικές συνθήκες (Benchikh et al., 2014 Nasarabbas et al., 2016 Tous & Antoni, 2013). Η αναλογία σπόρων προς πολτό μπορεί να ποικίλλει μεταξύ τους από 10-20% έως και 80–90%, αυξάνοντας από καλλιεργούμενο σε άγριο τύπο, καθώς το τμήμα πολτού του άγριου τύπου είναι μικρότερο από το καλλιεργούμενο (Yatmaz & Turhan, 2018). Οι σπόροι χαρουπιού χαρακτηρίζονται από καφέ χρώμα, σημαντική σκληρότητα, μήκος περίπου 10 mm και βάρος περίπου 0,2 g ανά σπόρο. Οι σπόροι αποτελούνται από φλούδα (30–33% w/w), ενδοσπέρμιο (42–46% w/w) και σπόρο (23–25% w/w). Οι λοβοί χαρουπιών είναι πλούσιοι σε σάκχαρα (45–52%) και ακατέργαστες ίνες (έως 40%) αλλά φτωχοί σε πρωτεΐνη (2–7%) (Nasar-abbas et al., 2016). Η περισσότερη πρωτεΐνη βρίσκεται στο φύτρο των σπόρων (55-65%) (Dakia et al., 2007) και το ενδοσπέρμιο των σπόρων περιέχει υψηλό ποσοστό γαλακτομαννάνης (80-85%) (Barak & Mudgil, 2014). Λόγω των διαφορών στη σύνθεση και στις λειτουργικές ιδιότητες, ο πολτός χαρουπιού και οι σπόροι χρησιμοποιούνται χωριστά για την παραγωγή πολλών προϊόντων. Η παραγωγή πρωτογενών προϊόντων χαρουπιού όπως αλεύρι, σκόνη, και σιρόπι, απαιτεί διαχωρισμό των σπόρων από τον λοβό (Loullis & Pinakoulaki, 2018). Οι λοβοί του χαρουπιού ξηραίνονται μετά τη συγκομιδή για να μειωθεί υγρασία περίπου στο 8%, και στη συνέχεια, διαχωρίζονται οι σπόροι από το τμήμα πολτού. Ο πολτός επεξεργάζεται διαφορετικά, ανάλογα με το αν θα χρησιμοποιηθεί για ζωτροφές ή για τρόφιμα. Για ζωτροφές, ο πολτός διαχωρίζεται σε μεγέθη με βάση το είδος ζώων που πρέπει να τραφούν. Στη βιομηχανία τροφίμων, ο πολτός υποβάλλεται σε επεξεργασία για τη λήψη σιροπιού από χαρούπι και σκόνη χαρουπιού (Tous & Antoni, 2013). Το σιρόπι από χαρούπι λαμβάνεται αφήνοντας τον αλεσμένο πολτό χαρουπιού σε νερό. Το μείγμα στη συνέχεια στραγγίζεται και βράζεται μέχρι να αποκτήσει την επιθυμητή συνοχή (Ozcan et al., 2009). Οι Aziz και Hicham (2014) βελτιστοποίησαν την παραγωγή σιροπιού από χαρούπι από διαφορετικούς πληθυσμούς μαροκινών χαρουπιών. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν έναν πειραματικό σχεδιασμό για να διερευνήσουν την επίδραση **τριών παραμέτρων** (θερμοκρασία εκχύλισης, χρόνος εκχύλισης και αναλογία νερού προς πολτό). Ως αποτέλεσμα, οι βέλτιστες

συνθήκες ήταν η θερμοκρασία εκχύλισης **43,45 °C**, ο χρόνος εκχύλισης **2,40 ώρες** και η αναλογία εκχύλισης διαλύτη (νερό) στον πολτό **2,27 (v/w)**. Το σιρόπι που αποδίδεται από το διαφορετικές περιοχές κυμαίνεται μεταξύ **28,76** και **37,22 g/100 g (% w/w)**. Ο πολτός αφαιρείται πρώτα για παραγωγή σκόνης χαρουπιού, διαχωρισμένος σε διαφορετικά μεγέθη, ψημένα και στο τέλος αλεσμένα σε λεπτή σκόνη, που ονομάζεται αλεύρι χαρουπιού ή σκόνη (Yousif & Alghzawi, 2000). Με βάση το χρόνο και τη θερμοκρασία ψήσιματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί λαμβάνουμε αντιστοίχως ελαφρά, μέτρια και υψηλά ψημένη σκόνη χαρουπιού. Γενικά, το συμβατικό ψήσιμο του πολτού του χαρουπιού αναφέρεται σε θερμοκρασίες 120-180°C (κυρίως γύρω στους 150 °C) και στο χρονικό διάστημα των 10-60 λεπτών.

**Επιπλέον, το εκχύλισμα D-pinitol (3-o-methyl-d-chiro-inositol) λαμβάνεται από πολτό χαρουπιού.**



Αυτή η φυσική ένωση, που σχετίζεται με τη σημαντική οικογένεια ινσιτολών, υπάρχει στο χαρούπι σε υψηλά επίπεδα και αυξάνει την αξία αυτού, λόγω της φαρμακολογικής της σημασίας η οποία σχετίζεται με αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες (Lopez-S 'anchez' et al., 2018). Εκτός από την κλασική εκχύλιση που σχετίζεται με την παραγωγή σιροπιού από χαρούπι, μελετήθηκε η εκχύλιση της **D-pinitol** από το πολτό, με χρήση μικροκυμάτων (Ersan et al., 2020), με χρήση CO<sub>2</sub> (Chafer ´ & Berna, 2014) και με τη χρήση υπερήχων (Tetik & Yüksel, 2014).

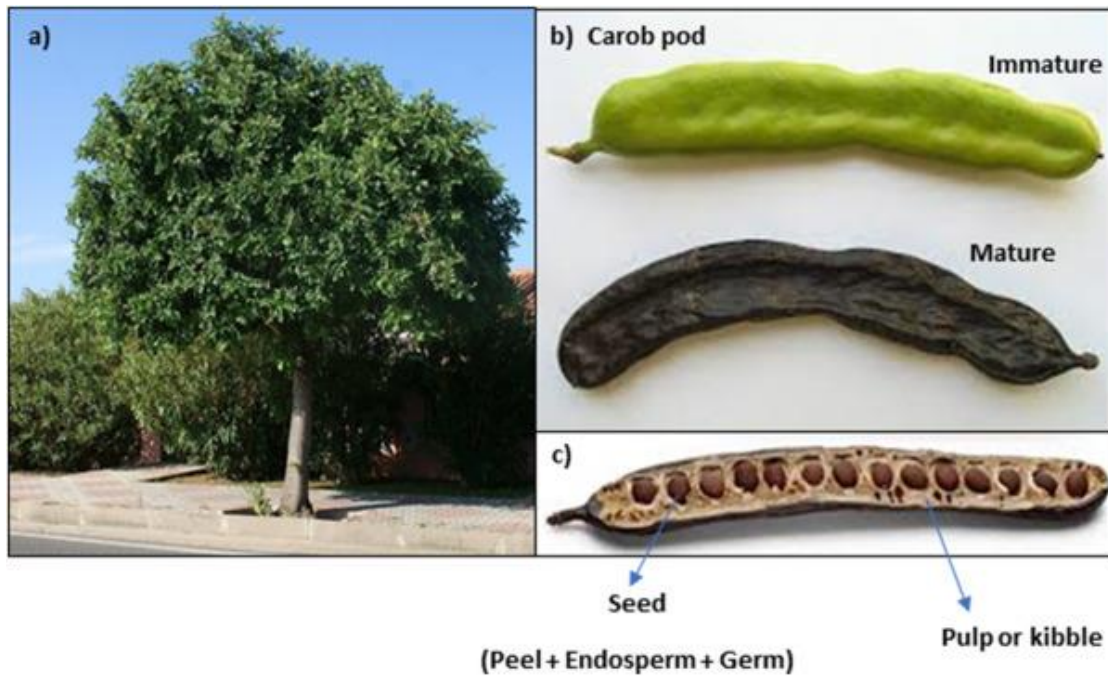
Τέλος, ο σπόρος του χαρουπιού αποτελείται από **τρία μέρη**: τη φλούδα (φλοιός), το ενδοσπέρμιο και το φύτρο. Αρχικά, οι σπόροι αποφλοιώνονται με επεξεργασία με αραιό θειικό οξύ ή με θερμομηχανική επεξεργασία γνωστή ως **όξινο peeling** και **θερμικό peeling**, αντίστοιχα (Prajarati et al., 2013). Το απομονωμένο ενδοσπέρμιο στη συνέχεια αλέθεται και κοσκινίζεται για να ληφθεί λεπτόκοκκη σκόνη σωματιδίων χαρουπιών (LBG), ένα πολυμερές που χρησιμοποιείται ως ένα φυσικό πρόσθετο τροφίμων και έχοντας πολλές εφαρμογές στη φαρμακευτική βιομηχανία (Barak & Mudgil, 2014).

#### *Όξινο και θερμικό peeling*

- Το LBG που παράγεται από το όξινο peeling είναι υπόλευκο και έχει υψηλό ιξώδες.
- Το LBG που παράγεται από το θερμομηχανικό peeling είναι κάπως πιο σκούρο λόγω των διεργασιών θέρμανσης ή ψησίματος.

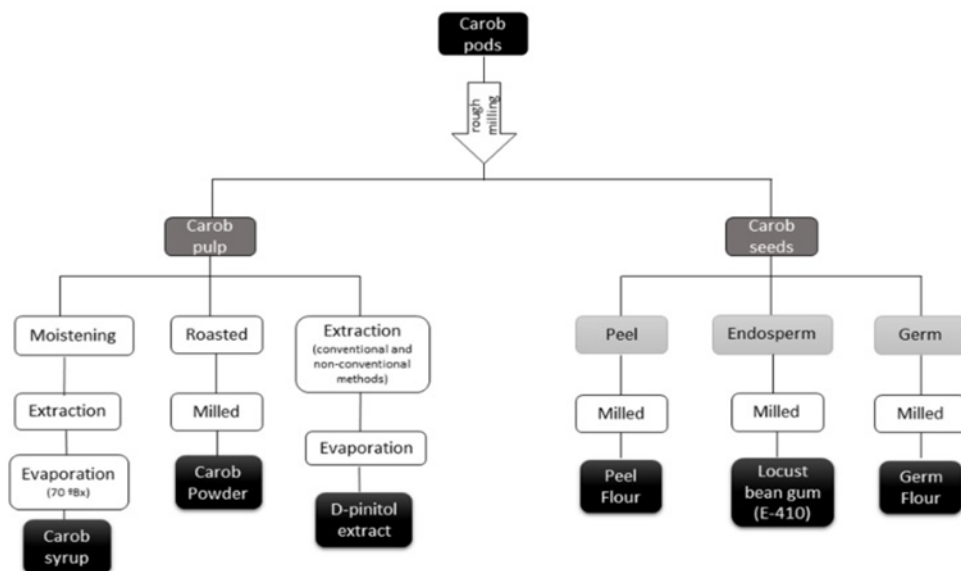
Το παραγόμενο LBG μπορεί να διαλυαστεί περαιτέρω με διάλυση στο νερό υπό συνθήκες θέρμανσης. Η διαδικασία όπου ακολουθείται είναι φιλτράρισμα ώστε να αφαιρεθούν οι

αδιάλυτες ουσίες και στη συνέχεια ξήρανση και άλεση για την απόκτηση διαυγασμένου ή καθαρισμένου LBG (Tous & Antoni, 2013).



α) Χαρουπόδεντρο (*Ceratonia siliqua L.*),

β) Άγουρος και ώριμος λοβός χαρουπιού, γ) Συστατικά λοβού χαρουπιού (Tous & Antoni, 2013).



Κύριες βιομηχανικές χρήσεις του καρπού της χαρουπιάς (Durazzo et al., 2014; Ersan et al., 2020 Tounsi et al., 2017; Yousif & Alghzawi, 2000)

## 2.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

**Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και τα δραστικά είδη αζώτου (RNS)** είναι μια μεγάλη ποικιλία ελεύθερων ριζών και ιόντων. Παράγονται είτε από φυσιολογικούς κυτταρικούς μεταβολισμούς (διεργασία κυτταρικής οξειδοαναγωγής) ή από εξωτερικές πηγές (ρύπανση, καπνός τσιγάρου, ακτινοβολία, φάρμακα, αλκοόλ, μαγείρεμα). Αυτά τα είδη παίζουν διπλό ρόλο τόσο ως τοξικά όσο και ως ευεργετικές ενώσεις. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των δύο ανταγωνιστικών ιδιοτήτων είναι μια ουσιαστική πτυχή της ζωής. Σε χαμηλά ή μέτρια επίπεδα, **ROS** και **RNS** ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα στις κυτταρικές αποκρίσεις και στη ανοσοποιητική λειτουργία. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν **οξειδωτικό στρες, μία επιβλαβής διαδικασία που μπορεί να βλάψει όλες τις κυτταρικές δομές.**

Το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη χρόνιων και εκφυλιστικών παθήσεων όπως καρκίνος, αρθρίτιδα, γήρανση, αυτοάνοσες διαταραχές, καρδιαγγειακά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Το ανθρώπινο σώμα έχει διάφορους μηχανισμούς για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες:

- Με την παραγωγή αντιοξειδωτικών, που είτε παράγονται φυσικά, όπου μπορούν να ταξινομηθούν ως **ενζυματικά αντιοξειδωτικά** (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, γλουταθειόνη υπεροξειδάση και αναγωγάση γλουταθειόνης), ή **μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά** (λιποειδές οξύ, γλουταθειόνη, L-αργινίνη, συνένζυμο Q10, λακτοφερρίνη, κ.λπ.)

- Παρέχεται **εξωτερικά μέσω τροφών ή/και συμπληρωμάτων** όπως βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλη), καροτενοειδή, πολυφαινόλες όπως οι ανθοκυανίνες, τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα και το ουρικό οξύ.

Τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά δρουν ως «καθαριστές ελεύθερων ριζών» με την πρόληψη και την επιδιόρθωση ζημιών που προκαλούνται από ROS και RNS (Graves, 2012, Lushchak, 2014, Pham-Huy et al., 2008).

Με τη χρήση διαφορετικών in vitro δοκιμασιών όπως :

- DPPH
- ABTS
- FRAP

Έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων χαρουπιού (Benchikh & Louail'eche, 2014, Carbas et al., 2019, Goulas & Georgiou, 2020, Mekhoukhe et al., 2018, σελ. 1–11; Quiles-Carrillo et al., 2019).

Οι περισσότερες από αυτές τις διεργασίες, έχουν μελετήσει διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης φαινολών, και έχουν άμεσα συσχετίσει την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις με την αντιοξειδωτική δράση.

Οι Goulas and Hadjisolomoou (2019) μελέτησαν την επίδραση της τριπλής πέψης στη σταθερότητα της φαινολικής και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας σε προϊόντα χαρουπιού. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα φαινολικά χαρακτηριστικά του χαρουπιού υποβαθμίζονται, απελευθερώνονται από τη μήτρα τροφίμων ή συνδέονται με άλλα τρόφιμα ή συστατικά του πεπτικού χυμού. Επιπλέον φανερώθηκε ο σημαντικός ρόλος της μήτρας του φαγητού καθώς τα συστατικά του φαγητού είχαν προστατευτική δράση ενάντια σε αλλαγές του pH και στην ενζυμική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της πέψης. Επιπρόσθετες έρευνες έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτάται επίσης από το ωριμότητα του καρπού του χαρουπιού. Benchikh et al. (2014) έδειξε ότι οι λοβοί χαρουπιών περιέχουν την υψηλότερη ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά ολικά, φλαβονοειδή και ασκορβικό οξύ κατά το άγουρο στάδιο. Επομένως, η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από Saci et al. (2019), υποδηλώνοντας ότι το εκχύλισμα άγουρου χαρουπιού μπορεί να παρέχει μια σημαντική πηγή δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά

Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος χαρουπιού λόγω της ισχυρής του επίδρασης σάρωσης στα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες, Rtibi et al. (2015a, 2015b) απέδειξε την ικανότητα του υδατικού εκχυλίσματος λοβών χαρουπιών να αναστέλλουν τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO). Η ικανότητα να μπλοκάρει τη δραστηριότητα της MPO, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής του υποχλωριώδες οξέος (HOCl) από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Το χαρουπόμελο είναι ένα επιπλέον καλά μελετημένο προϊόν με βάση το χαρούπι. Η σύνθεση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο των λουλουδιών που χρησιμοποιούν οι μέλισσες (Wang & Li, 2011). Οι El-Haskoury et al. (2017) χαρακτήρισαν τη φυσικοχημική σύνθεση και την αντιοξειδωτική δράση του χαρουπόμελου όπου συλλέγεται στο Μαρόκο. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μελιού συσχετίστηκε με τα βιοχημικά του συστατικά, όπως η ολική φαινόλη και η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή. Προηγουμένως, οι El-Haskoury et al. (2015) αναφέρθηκαν ότι το χαρουπόμελο έχει διουρητική, νατριουρητική και καλιουρητική δράση χωρίς παρενέργειες της υποκαλιαιμίας που παρατηρήθηκαν με τη χρήση φουροσεμίδης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

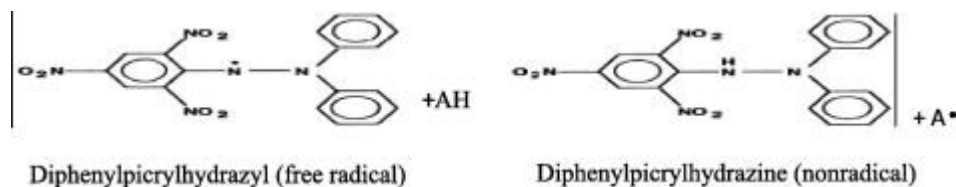
Χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι για τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ιδιότητας των δειγμάτων (δίαιτες, φυτικά εκχυλίσματα, εμπορικά αντιοξειδωτικά κ.λπ.). Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται όλες οι πιθανές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ιδιότητας διαφόρων δειγμάτων. Μια συγκεντρωμένη περιγραφή όλων των διαθέσιμων *in vitro* και *in vivo* αντιοξειδωτικών μοντέλων θα παρείχε παραγωγικά πλεονεκτήματα στους ερευνητές αυτού του πεδίου μειώνοντας τον χρόνο τους για ανασκόπηση βιβλιογραφίας και ανάπτυξη μεθόδων. Σε αυτή την εργασία, έχουν γίνει προσπάθειες να συμπεριληφθούν και οι *in vivo* μέθοδοι και να αναλυθεί η συχνότητα χρήσης διαφορετικών μεθόδων.

Η αντιοξειδωτική δράση δεν πρέπει να συμπεραίνεται με βάση ένα μόνο μοντέλο αντιοξειδωτικής δοκιμής. Στην πράξη πραγματοποιούνται αρκετές *in vitro* διαδικασίες για την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ενεργειών με τα δείγματα που ενδιαφέρουν. Μια άλλη πτυχή είναι ότι τα μοντέλα αντιοξειδωτικών δοκιμών ποικίλλουν από διαφορετικές απόψεις. Επομένως, είναι δύσκολο να συγκριθεί πλήρως μια μέθοδος με άλλη. Γιαυτό σε αυτή το κεφάλαιο θα επικεντρωθούμε στην ομαδοποίησή τους. Ο ερευνητής πρέπει να επαληθεύσει κριτικά τις μεθόδους ανάλυσης πριν υιοθετήσει αυτή για τον ερευνητικό του σκοπό. Γενικά, οι *in vitro* αντιοξειδωτικές δοκιμές που χρησιμοποιούν παγίδες ελεύθερων ριζών είναι σχετικά εύκολες. Μεταξύ των μεθόδων σάρωσης ελεύθερων ριζών, η μέθοδος DPPH είναι επιπλέον γρήγορη, απλή (δηλαδή δεν εμπλέκεται με πολλά βήματα και αντιδραστήρια) και φθηνή σε σύγκριση με άλλα μοντέλα δοκιμής. Από την άλλη, η δοκιμασία αποχρωματισμού ABTS είναι εφαρμόσιμη τόσο για υδρόφιλα όσο και για λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Στην συνέχεια, περιγράφονται όλες οι μέθοδοι *in vitro* και είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κάποιος μπορεί να βελτιστοποιήσει λογικά την αντίστοιχη μέθοδο για να εξυπηρετήσει τον πειραματικό του στόχο, καθώς καμία μέθοδος δεν είναι απόλυτη στη φύση του.

### 3.1 *In vitro* μοντέλα

#### 3.1.1 Δραστηριότητα σάρωσης DPPH

Το μόριο 1, 1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλ (α,α-διφαινυλ-β-πικρυλυδραζυλ· DPPH) χαρακτηρίζεται ως σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της μετεγκατάστασης του εφεδρικού ηλεκτρονίου πάνω από το συνολικό μόριο, καθώς το μόριο δεν διμερίζεται, όπως θα συνέβαινε με τις περισσότερες άλλες ελεύθερες ρίζες. Η μετεγκατάσταση του ηλεκτρονίου προκαλεί επίσης το βαθύ ιώδες χρώμα, στο φάσμα απορρόφησης διαλύματος αιθανόλης με κέντρο περίπου 517 nm. Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με αυτό ενός υποστρώματος (ΑΗ) που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε αυτό δημιουργεί τη μειωμένη μορφή με την απώλεια αυτού του ιώδους χρώματος.



Προκειμένου να αξιολογηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό μέσω της δέσμευσης ελεύθερων ριζών από τα δείγματα δοκιμής, παρακολουθείται η αλλαγή στην οπτική πυκνότητα των ριζών DPPH. Σύμφωνα με τους Manzocco et al., 1998 το εκχύλισμα δείγματος (0,2 mL) αραιώνεται με μεθανόλη και προστίθενται 2 mL διαλύματος DPPH (0,5 mM). Μετά από 30 λεπτά, η απορρόφηση μετράται στα 517 nm. Το ποσοστό της δέσμευσης ριζών DPPH υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση όπως δίνεται παρακάτω:

$$\% \text{ inhibition of DPPH radical} = \left( \frac{A_{br} - A_{ar}}{A_{br}} \right) \times 100$$

όπου  $A_{br}$  είναι η απορρόφηση πριν από την αντίδραση και  $A_{ar}$  είναι η απορρόφηση αφού λάβει χώρα η αντίδραση.

### 3.1.2 Δοκιμασία σάρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

Τα ανθρώπινα όντα εκτίθενται στο  $H_2O_2$  έμμεσα μέσω του περιβάλλοντος σχεδόν περίπου 0,28 mg/kg/ημέρα με πρόσληψη κυρίως από φυλλώδεις καλλιέργειες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να εισέλθει στο ανθρώπινο σώμα μέσω της εισπνοής ατμού ή ομίχλης και μέσω της επαφής με τα μάτια ή το δέρμα. Το  $H_2O_2$  αποσυντίθεται γρήγορα σε οξυγόνο και νερό και αυτό μπορεί να παράγει ρίζες υδροξυλίου ( $OH$ ) που μπορούν να ξεκινήσουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και να προκαλέσουν βλάβη στο DNA στο σώμα.

Η ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων να καθαρίζουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να εκτιμηθεί σύμφωνα με τη μέθοδο των Ruch et al. (1989). Ένα διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (40 mM) παρασκευάζεται σε ρυθμιστικό φωσφορικών (50 mM pH 7,4). Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προσδιορίζεται με απορρόφηση στα 230 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Εκχύλισμα (20–60 μg/mL) σε απεσταγμένο νερό προστίθεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και η απορρόφηση στα 230 nm προσδιορίζεται μετά από 10 λεπτά έναντι ενός τυφλού διαλύματος που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χωρίς υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ποσοστό δέσμευσης υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ scavenged } (H_2O_2) = \left[ \frac{A_i - A_t}{A_i} \right] \times 100$$

όπου  $A_i$  είναι η απορρόφηση του ελέγχου και  $A_t$  είναι η απορρόφηση της δοκιμής.

### 3.1.3 Δραστηριότητα δέσμωσης μονοξειδίου του αζώτου

Το NO<sup>•</sup> δημιουργείται σε βιολογικούς ιστούς από ειδικές συνθήκες μονοξειδίου του αζώτου, οι οποίες μεταβολίζουν την αργινίνη σε κιτροουλίνη με το σχηματισμό του NO<sup>•</sup> μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης πέντε ηλεκτρονίων (David, 1999, Ghafourifar and Cadenas, 2005, Marletta, al, 198. 1989· και Virginia et al., 2003). Η ένωση νιτροπρωσσικού νατρίου είναι γνωστή ότι αποσυντίθεται σε υδατικό διάλυμα σε φυσιολογικό pH (7,2) παράγοντας NO<sup>•</sup>. Υπό αερόβιες συνθήκες, το NO<sup>•</sup> αντιδρά με το οξυγόνο για να παράγει σταθερά προϊόντα (νιτρικά και νιτρώδη), οι ποσότητες των οποίων μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Griess (Marcocci et al., 1994). Δύο (2) mL νιτροπρωσσικού νατρίου 10 mM διαλυμένα σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού αλατούχου διαλύματος (pH 7,4) αναμειγνύονται με 0,5 mL δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,2–0,8 mg/mL). Το μίγμα στη συνέχεια επωάζεται στους 25°C. Μετά από 150 λεπτά επώασης, 0,5 mL του επωασθέντος διαλύματος αποσύρεται και αναμιγνύεται με 0,5 mL αντιδραστήριου Griess [(1,0 mL αντιδραστήριου σουλφανλικού οξέος (0,33% σε 20% παγόμορφο οξικό οξύ σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά με 1 mL (1-ναφθυλ)αιθυλενοδιαμίνης (0,1% w/v)]. Το μίγμα στη συνέχεια επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και η απορρόφησή του μετράται στα 546 nm. Η ποσότητα της αναστολής των ριζών του μονοξειδίου του αζώτου υπολογίζεται σύμφωνα με αυτήν την εξίσωση:

$$\% \text{ inhibition of NO radical} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$$

όπου A<sub>0</sub> είναι η απορρόφηση πριν από την αντίδραση και A<sub>1</sub> είναι η απορρόφηση μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης με το αντιδραστήριο Griess.

### 3.1.4 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υπεροξυνιτρώδους

Το υπεροξυνιτρικό (ONOO<sup>-</sup>) είναι ένα κυτταροτοξικό με ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες σε διάφορα κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των σουλφυδρυλίων, των λιπιδίων, των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων και μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, υπεροξείδωση λιπιδίων, καρκινογένεση και γήρανση. Παράγεται in vivo από ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα Kupffer, ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Η ρίζα υπεροξυνιτρώδους είναι ένα σχετικά σταθερό είδος σε σύγκριση με άλλες ελεύθερες ρίζες, αλλά μόλις πρωτονιωθεί δίνει εξαιρετικά δραστικό υπεροξυνιτρικό οξύ (ONOOH), που αποσυντίθεται με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (1,9 s) στους 37 °C για να σχηματίσει διάφορα κυτταροτοξικά και που μπορεί να προκαλέσει την οξείδωση ομάδων θειόλης (-SH) στις πρωτεΐνες, νίτρωση τυροσίνης, υπεροξείδωση λιπιδίων και επίσης αντιδράσεις νιτρώσεως, που επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και τη μεταγωγή σήματος. Μπορεί τελικά να συμβάλει σε τραυματισμό κυττάρων και ιστών με θραύση κλώνου DNA και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, π.χ. σε θυμοκύτταρα, φλοιώδη κύτταρα και κύτταρα λευχαιμίας HL-60. Ο υπερβολικός σχηματισμός του μπορεί επίσης να εμπλέκεται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση. Λόγω της έλλειψης ενδογενών ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση της ρίζας ONOO<sup>-</sup>, η ανάπτυξη ειδικών ριζών ONOO<sup>-</sup> έχει μεγάλη σημασία. Η μέθοδος που περιγράφεται από τους Kooy et al., 1994 περιλαμβάνει τη χρήση αποθεματικού διαλύματος διυδροξυροδαμίνης 123 (DHR 123, 5 mM) σε διμεθυλοφορμαμίδιο που καθαρίζεται με άζωτο και αποθηκεύεται



στους -80 °C. Το διάλυμα εργασίας με DHR 123 (τελική συγκέντρωση 5 μM) αραιώνεται από το αρχικό διάλυμα και τοποθετείται σε πάγο στο σκοτάδι αμέσως πριν από το πείραμα. Ρυθμιστικό διάλυμα, 50 mM φωσφορικό νάτριο (pH 7,4), που περιέχει 90 mM χλωριούχο νάτριο και 5 mM χλωριούχο κάλιο με 100 μM διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (DTPA) καθαρίζονται με άζωτο και τοποθετούνται σε πάγο πριν από τη χρήση. Η δραστηριότητα σάρωσης του ONOO<sup>-</sup> με την οξειδωση του DHR 123 μετράται σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού μικροπλάκας με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 485 nm και 530 nm σε θερμοκρασία δωματίου, αντίστοιχα. Το υπόβαθρο και οι τελικές εντάσεις φθορισμού μετρώνται 5 λεπτά μετά τη χορήγηση χωρίς 3-μορφολινοσυνδονιμίνη (SIN-1) ή καθαρό (ONOO<sup>-</sup>). Η οξειδωση του DHR 123 με αποσύνθεση του SIN-1 αυξήθηκε σταδιακά ενώ το καθαρό ONOO<sup>-</sup> οξειδώνει γρήγορα το DHR 123 με την τελική του ένταση φθορισμού να είναι σταθερή με την πάροδο του χρόνου.

### 3.1.5 Μέθοδος ισοδύναμης αντιοξειδωτικής ικανότητας Trolox (TEAC)/Δοκιμασία αποχρωματισμού κατιόντων ριζών ABTS

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα φασματοφωτόμετρο σειράς διόδων για τη μέτρηση της απώλειας χρώματος όταν ένα αντιοξειδωτικό προστίθεται στο μπλε-πράσινο χρωμοφόρο ABTS<sup>•+</sup> (2,2-αζινο-δις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)). Το αντιοξειδωτικό μειώνει το ABTS<sup>•+</sup> σε ABTS και το αποχρωματίζει. Το ABTS<sup>•+</sup> είναι μια σταθερή ρίζα που δεν βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να μετρηθεί όπως περιγράφεται από τους Seeram et al. (2006). Τα κατιόντα των ριζών ABTS παρασκευάζονται με προσθήκη στερεού διοξειδίου του μαγγανίου (80 mg) σε ένα υδατικό διάλυμα αποθέματος 5 mM ABTS (20 mL χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα Na/K 75 mM με pH 7). Το Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ), ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό πρότυπο. Κατασκευάζεται μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης για το Trolox σε συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 και 350 μM. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σύμφωνα με την αντιοξειδωτική δράση σε ρυθμιστικό διάλυμα Na/K, pH, 7. Τα αραιωμένα δείγματα αναμιγνύονται με 200 μL διαλύματος κατιόντων ρίζας ABTS<sup>•+</sup> σε πλάκες 96 φρεατίων και η απορρόφηση διαβάζεται (στα 750 nm) μετά από 5 λεπτά σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας. Οι τιμές TEAC μπορούν να υπολογιστούν από την τυπική καμπύλη Trolox και να εκφραστούν ως ισοδύναμο Trolox (σε mM).

### 3.1.6 Μέθοδος αντιοξειδωτικής παραμέτρου ολικής παγίδευσης ριζών (TRAP).

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην προστασία που παρέχουν τα αντιοξειδωτικά στη διάσπαση φθορισμού της R-φυκοερυθρίνης (R-PE) κατά τη διάρκεια μιας ελεγχόμενης αντίδρασης υπεροξειδωσίας. Ο φθορισμός της R-Φυκοερυθρίνης σβήνει από το ABAP (υδροχλωρικό 2,2'-αζω-δις(2-αμιδινο-προπάνιο)) ως γεννήτρια ριζών. Αυτή η αντίδραση σβέσης μετράται παρουσία αντιοξειδωτικών. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό αξιολογείται με μέτρηση της αποσύνθεσης του αποχρωματισμού. Σύμφωνα με τους Ghiselli et al. (1995) 120 μL αραιωμένου δείγματος προστίθενται σε 2,4 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,4), 375 μL διαποσταγμένου νερού, 30 μL αραιωμένου R-PE και 75 μL ABAP. Η κινητική της αντίδρασης στους 38 °C καταγράφεται για 45 λεπτά με φασματόμετρο φωταύγειας. Οι

τιμές TRAP υπολογίζονται από το μήκος της φάσης υστέρησης που οφείλεται στο δείγμα σε σύγκριση με το τυπικό.

### 3.1.7 Δοκιμασία αναγωγικής-αντιοξειδωτικής ισχύος σιδήρου (FRAP).

Αυτή η μέθοδος μετρά την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το σίδηρο. Βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου και χλωριούχου 2,3,5-τριφαινυλ-1,3,4-τριαζα-2-αζονιακυκλοπεντα-1,4-διενίου (TPTZ) στη σιδηρούχα μορφή σε χαμηλό pH. Αυτή η μείωση παρακολουθείται με μέτρηση της αλλαγής στην απορρόφηση στα 593 nm, χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο συστοιχίας διόδων. Η αντιοξειδωτική δοκιμασία μπορεί να διεξαχθεί με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain (1999). Τρία χιλιοστόλιτρα παρασκευασμένου αντιδραστηρίου FRAP αναμιγνύονται με 100  $\mu$ L αραιωμένου δείγματος. Η απορρόφηση στα 593 nm καταγράφεται μετά από επώαση 30 λεπτών στους 37 °C. Οι τιμές του FRAP μπορούν να ληφθούν συγκρίνοντας την αλλαγή απορρόφησης στο μίγμα δοκιμής με εκείνες που λαμβάνονται από αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $Fe^{3+}$  και εκφράζονται ως mM ισοδυνάμων  $Fe^{2+}$  ανά kg (στερεά τροφή) ή ανά L (ποτά) δείγματος.

### 3.1.8 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υπεροξειδίου (SOD)

Αν και το ανιόν υπεροξειδίου είναι ένα ασθενές οξειδωτικό, τελικά παράγει ισχυρές και επικίνδυνες ρίζες υδροξυλίου καθώς και μονό οξυγόνο, που και τα δύο συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες (Meyer and Isaksen, 1995). Η δραστηριότητα σάρωσης ανιόντων υπεροξειδίου μπορεί να μετρηθεί όπως περιγράφεται από τους Robak and Gryglewski (1988). Οι ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου δημιουργούνται σε 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (16 mM, pH 8,0), που περιέχει 0,5 mL νιτρομπλέ τετραζολίου (NBT) (0,3 mM), 0,5 mL NADH (0,936 mM), διάλυμα και 1,0 mL εκχυλίσμα mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (16 mM, pH 8,0). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0,5 mL διαλύματος μεθοθεικής φαιναζίνης (PMS) (0,12 mM) στο μίγμα, επωάζεται στους 25 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια η απορρόφηση μετράται στα 560 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος.

### 3.1.9 Δραστηριότητα καθαρισμού ριζών υδροξυλίου

Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένα από τα ισχυρά δραστικά είδη οξυγόνου στο βιολογικό σύστημα που αντιδρά με τμήματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και προκαλεί βλάβη στο κύτταρο. Η ικανότητα σάρωσης των ριζών υδροξυλίου μετράται με τη μέθοδο των Kunchandy και Rao (1990). Το μίγμα της αντίδρασης (1,0 mL) αποτελείται από 100  $\mu$ L 2-δεοξυ-δριβόζης (28 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα  $KH_2PO_4$ -KOH 20 mM, pH 7,4), 500  $\mu$ L εκχυλίσματος, 200  $\mu$ L EDTA (1,04 mM) και 200  $\mu$ M  $FeCl_3$  ( 1:1 v/v), 100  $\mu$ L  $H_2O_2$  (1,0 mM) και 100  $\mu$ L ασκορβικού οξέος (1,0 mM) το οποίο επωάζεται στους 37 °C για 1 ώρα. Ένα χιλιοστόλιτρο θειοβαρβιτουρικού οξέος (1%) και 1,0 mL τριχλωροοξικού οξέος (2,8%) προστίθενται και επωάζονται στους 100 °C για 20 λεπτά. Μετά την ψύξη, η απορρόφηση μετράται στα 532 nm, έναντι ενός τυφλού δείγματος.

### 3.1.10 Μέθοδος ικανότητας αποτροπής ριζών υδροξυλίου (HORAC).

Η δοκιμασία HORAC που περιγράφεται από τους Ou et al. (2002) μετρά τη χηλική δράση των αντιοξειδωτικών σε συνθήκες αντιδράσεων τύπου Fenton που χρησιμοποιούν σύμπλοκο Co (II) και ως εκ τούτου την προστατευτική ικανότητα έναντι του σχηματισμού ρίζας υδροξυλίου. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 0,55 M παρασκευάζεται σε απεσταγμένο νερό και 4,6 mM Co (II) παρασκευάζεται με διάλυση 15,7 mg  $\text{CoF}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  και 20 mg πικολινικού οξέος σε 20 mL απεσταγμένου νερού. Φλουορεσκεΐνη – 170  $\mu\text{L}$  (60 nM, τελική συγκέντρωση) και 10  $\mu\text{L}$  δείγματος επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά απευθείας στον αναγνώστη πλακών. Μετά την επώαση 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (27,5 mM, τελική συγκέντρωση) και 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος Co (II) (τελική συγκέντρωση 230  $\mu\text{M}$ ) προστίθενται. Ο αρχικός φθορισμός μετρείται κάθε λεπτό, μετά το κούνημα. Για το τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Πρότυπα αντιοξειδωτικά διαλύματα 100, 200, 600, 800 και 1000  $\mu\text{M}$  (σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 75 mM, pH 7,4) χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Οι τελικές τιμές HORAC υπολογίζονται χρησιμοποιώντας μια εξίσωση παλινδρόμησης μεταξύ της τυπικής συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών και της καθαρής περιοχής κάτω από την καμπύλη. Μία μονάδα HORAC εκχωρείται στην καθαρή περιοχή προστασίας που παρέχεται από τυπικό αντιοξειδωτικό 1  $\mu\text{M}$  και η δραστηριότητα του δείγματος εκφράζεται ως  $\mu\text{M}$  τυπικά αντιοξειδωτικά ισοδύναμα ανά γραμμάριο νωπού βάρους των δειγμάτων. Το γαλλικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τυπικό αντιοξειδωτικό.

### 3.1.11 Μέθοδος ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC).

Το ORAC είναι μια ενδιαφέρουσα και επαναστατική νέα ανάλυση δοκιμαστικού σωλήνα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η «Αντιοξειδωτική Δύναμη» των τροφίμων και άλλων χημικών ουσιών. Αυτή η δοκιμή μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας είτε β-φυκοερυθρίνη (β-PE) είτε φλουορεσκεΐνη ως μόριο στόχο. Κατά την ανασκόπηση, το β-PE δεν συναντάται στις δημοσιεύσεις αργότερα από το 2005. Επομένως, φαίνεται ότι η φλουορεσκεΐνη αντικαθιστά το β-PE ως μόριο στόχο στον προσδιορισμό ORAC. Η δοκιμή πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) ως πρότυπο για τον προσδιορισμό του ισοδύναμου Trolox (TE). Στη συνέχεια, η τιμή ORAC υπολογίζεται από το ισοδύναμο Trolox και εκφράζεται ως μονάδες ή τιμή ORAC. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή ORAC, τόσο μεγαλύτερη είναι η «Αντιοξειδωτική Δύναμη».

### 3.1.12 Μέθοδος μείωσης ισχύος (RP)

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της αύξησης της απορρόφησης των μιγμάτων αντίδρασης. Η αύξηση της απορρόφησης υποδηλώνει αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Σε αυτή τη μέθοδο, η αντιοξειδωτική ένωση σχηματίζει ένα έγχρωμο σύμπλοκο με σιδηροκυανιούχο κάλιο, τριχλωροοξικό οξύ και χλωριούχο σίδηρο, το οποίο μετράται στα 700 nm. Η αύξηση της απορρόφησης του μίγματος της αντίδρασης υποδηλώνει τη αναγωγική ισχύ των δειγμάτων (Jayaprakash et al., 2001). Στη μέθοδο που περιγράφεται από τον Oyaizu (1986) προστίθενται 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,2 M (pH 6,6) και 2,5 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (1% w/v) σε 1,0 mL δείγματος διαλυμένο σε απεσταγμένο νερό. Το προκύπτον μίγμα επωάζεται στους 50°C για 20 λεπτά, ακολουθούμενο από την προσθήκη 2,5 mL Τριχλωροοξικού οξέος (10% β/ο). Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 10 λεπτά

για να συλλεχθεί η ανώτερη στιβάδα του διαλύματος (2,5 mL), αναμιγνύεται με απεσταγμένο νερό (2,5 mL) και 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> (0,1%, w/v). Η απορρόφηση στη συνέχεια μετράται στα 700 nm έναντι του τυφλού δείγματος.

### 3.1.13 Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου

Ο προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέσω του σχηματισμού συμπλόκου φωσφομολυβδαινίου. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην αναγωγή του Mo (VI) σε Mo (V) από την αναλύμενη ουσία του δείγματος και στον επακόλουθο σχηματισμό ενός συμπλόκου πράσινου φωσφορικού Mo (V) σε όξινο pH. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να υπολογιστεί με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Prieto et al. (1999). 0,1 mL διαλύματος δείγματος (100 µg) συνδυάζεται με 1 mL αντιδραστηρίου (0,6 M θειικό οξύ, 28 mM φωσφορικό νάτριο και 4 mM μολυβδαινικό αμμώνιο). Ο σωλήνας πωματίζεται και επωάζεται σε λουτρό ζέοντος νερού στους 95 °C για 90 λεπτά. Μετά την ψύξη του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου, η απορρόφηση του υδατικού διαλύματος μετράται στα 695 nm έναντι του τυφλού σε φασματοφωτόμετρο UV. Ένα τυπικό τυφλό διάλυμα περιείχε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου και τον κατάλληλο όγκο του ίδιου διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για το δείγμα και επωάζεται υπό τις ίδιες συνθήκες με το υπόλοιπο δείγμα. Για δείγματα άγνωστης σύνθεσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να εκφραστεί ως ισοδύναμα της α-τοκοφερόλης.

### 3.1.14 Μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου (FTC).

Αυτή η μέθοδος μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης όπως απεικονίζεται από τους Kikuzaki et al. (1991). Μίγμα 4 mg δείγματος (τελική συγκέντρωση 0,02% w/v) σε 4 mL αιθανόλης, 4,1 mL 2,51% λινολεϊκού οξέος σε αιθανόλη, 8,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,02 M (pH 7,0) και 3,9 mL απεσταγμένου νερού. Το φιαλίδιο με βιδωτό καπάκι τοποθετείται σε φούρνο στους 40 °C στο σκοτάδι. 0,1 mL του μίγματος της αντίδρασης μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και σε αυτόν προστίθενται 9,7 mL 75% (v/v) υδατικής αιθανόλης, ακολουθούμενα από 0,1 mL 30% υδατικού θειοκυανικού αμμωνίου και 0,1 mL χλωριούχου σιδήρου 0,02 M σε υδροχλωρικό οξύ 3,5%. Τρία λεπτά μετά την προσθήκη χλωριούχου σιδήρου στο μίγμα της αντίδρασης, η απορρόφηση του προκύπτοντος μίγματος (κόκκινο χρώμα) μετράται στα 500 nm κάθε 24 ώρες έως ότου η απορρόφηση του μάρτυρα φτάσει στο μέγιστο. Το τυπικό αντιοξειδωτικό (τελική συγκέντρωση 0,02% w/v) χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας και το μείγμα χωρίς το δείγμα χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

### 3.1.15 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA).

Η μέθοδος TBA, που περιγράφεται από τον Ottolenghi (1959) είναι η εξής: Η τελική συγκέντρωση δείγματος 0,02% w/v χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν τη μέθοδο. Δύο mL 20% τριχλωροξικού οξέος και 2 mL 0,67% θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν σε 1 mL διαλύματος δείγματος. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό ζέοντος νερού για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε μετά από ψύξη στις 3000 rpm για 20 λεπτά. Η δραστηριότητα απορρόφησης του υπερκειμένου μετρήθηκε στα 552 nm και καταγράφηκε αφού φτάσει στο μέγιστο.

### 3.1.16 Μέθοδος DMPD (N,N-διμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμινο διυδροχλωρική)

Η μέθοδος αποχρωματισμού κατιόντων ρίζας DMPD έχει αναπτυχθεί για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε τρόφιμα και βιολογικά δείγματα. Αυτή η ανάλυση βασίζεται στην αναγωγή του ρυθμισμένου διαλύματος έγχρωμου DMPD σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού και χλωριούχου σιδήρου. Η διαδικασία περιλαμβάνει μέτρηση της μείωσης της απορρόφησης του DMPD παρουσία σαρωτών στο μέγιστο απορρόφησής του στα 505 nm. Η δραστηριότητα εκφράστηκε ως ποσοστιαία μείωση της DMPD.

Οι Fogliano et al. (1999) έλαβε τη ρίζα με ανάμειξη 1 mL διαλύματος DMPD (200 mM), 0,4 mL χλωριούχου σιδήρου (III) (0,05 M) και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου στα 0,1 M, τροποποιώντας το pH σε 5,25. Το μείγμα πρέπει να διατηρείται στο σκοτάδι, υπό ψύξη και σε χαμηλή θερμοκρασία (4–5 °C). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα όταν 50 μL του δείγματος (αραίωση 1:10 σε νερό) προστίθενται σε 950 μL του διαλύματος DMPD+. Η απορρόφηση μετράται μετά από 10 λεπτά συνεχούς ανάδευσης, που είναι ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθούν σταθερές τιμές αποχρωματισμού. Τα αποτελέσματα ποσοτικοποιούνται σε mM Trolox στη σχετική καμπύλη βαθμονόμησης.

### 3.1.17 Μέθοδος β-καροτίνης λινολεϊκού οξέος/ προσδιορισμός συζευγμένου διενίου

Αυτή είναι μια από τις γρήγορες μεθόδους για τον έλεγχο των αντιοξειδωτικών, η οποία βασίζεται κυρίως στην αρχή ότι το λινολεϊκό οξύ, το οποίο είναι ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ, οξειδώνεται από τα «Είδη αντιδραστικού οξυγόνου» (ROS) που παράγονται από οξυγονωμένο νερό. Τα προϊόντα που σχηματίζονται θα ξεκινήσουν την οξείδωση της β-καροτίνης, η οποία θα οδηγήσει σε αποχρωματισμό. Τα αντιοξειδωτικά μειώνουν την έκταση του αποχρωματισμού, η οποία μετράται στα 434 nm και μετράται η δραστηριότητα.

Η μέθοδος όπως περιγράφεται από τους Kabouche et al. (2007): β-καροτένιο (0,5 mg) σε 1 mL χλωροφορμίου προστίθεται σε 25 μL λινολεϊκού οξέος και 200 mg γαλακτωματοποιημένου μίγματος tween-80. Το χλωροφόρμιο εξατμίζεται στους 40 °C, 100 mL απεσταγμένου νερού κορεσμένου με οξυγόνο προστίθενται αργά στο υπόλειμμα και το διάλυμα αναδεύεται έντονα για να σχηματιστεί ένα σταθερό γαλάκτωμα. Τέσσερα mL αυτού του μείγματος προστίθενται στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 200 μL δείγματος παρασκευασμένου σε μεθανόλη σε τελικές συγκεντρώσεις (25, 50, 100, 200 και 400 μg/mL). Μόλις το γαλακτωματοποιημένο διάλυμα προστεθεί στους σωλήνες, μετράται η μηδενική απορρόφηση χρόνου στα 470 nm. Οι σωλήνες επωάζονται για 2 ώρες στους 50 °C. Η βιταμίνη C μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στάνταρ. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται ως ποσοστό αναστολής (I%) σε σχέση με τον έλεγχο χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$I\% = [1 - (A_s - A_{s120}) / A_c - A_{c120}]$$

όπου  $A_s$  αρχική απορρόφηση,  $A_{s120}$  ήταν η απορρόφηση του δείγματος στα 120 λεπτά,  $A_c$  ήταν η αρχική απορρόφηση του αρνητικού ελέγχου και  $A_{c120}$  ήταν η απορρόφηση του αρνητικού ελέγχου στα 120 λεπτά.

### 3.1.18 Μέθοδος οξειδάσης ξανθίνης

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη ως υπόστρωμα μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά, με τη μέθοδο των Noro et al. (1983). Το εκχύλισμα (500  $\mu\text{L}$  από 0,1 mg/mL) και η αλλοπουρινόλη (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (σε μεθανόλη) αναμειγνύονται με 1,3 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,05 M, pH 7,5) και 0,2 mL διαλύματος οξειδάσης ξανθίνης 0,2 μονάδες/mL. Μετά από 10 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C), 1,5 mL διαλύματος υποστρώματος ξανθίνης 0,15 M προστίθεται σε αυτό το μείγμα. Το μίγμα επωάζεται και πάλι για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και στη συνέχεια η απορρόφηση μετράται στα 293 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο έναντι του τυφλού (0,5 mL μεθανόλη, 1,3 mL ρυθμιστικό φωσφορικού, 0,2 mL οξειδάση ξανθίνης). Το διάλυμα 0,5 mL μεθανόλης, 1,3 mL ρυθμιστικού φωσφορικού, 0,2 mL οξειδάσης ξανθίνης και 1,5 mL υποστρώματος ξανθίνης χρησιμοποιείται ως έλεγχος. Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\text{Percentage of inhibition} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

όπου  $A_s$  και  $A_c$  είναι οι τιμές απορρόφησης του δείγματος δοκιμής και του μάρτυρα, αντίστοιχα.

### 3.1.19 Μέθοδος αντιοξειδωτικής ικανότητας μείωσης ιόντων χαλκού (CUPRAC).

Το χρωμογόνο οξειδωτικό αντιδραστήριο της αναπτυσσόμενης μεθόδου CUPRAC, δηλαδή το χλωριούχο δις(νεοκουπροΐνη)χαλκός(II) [Cu(II)-Nc], αντιδρά με τις πολυφαινόλες [Ar(OH) $n$ ] με τον εξής τρόπο:



όπου τα απελευθερωμένα πρωτόνια μπορούν να ρυθμιστούν με το σχετικά συγκεντρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου. Σε αυτή την αντίδραση, οι δραστικές ομάδες πολυφαινολών Ar-OH οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και το Cu (II)-Nc ανάγεται στο πολύ χρωματισμένο χηλικό Cu (I)-Nc που δείχνει μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm.

Σύμφωνα με τους Arak et al. (2008), 1 mL 10<sup>-2</sup> M CuCl<sub>2</sub>, 1 mL νεοκουπροΐνης 7,5 × 10<sup>-3</sup> M και διάλυμα NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO 1 M προστίθενται στον γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 400  $\mu\text{L}$  φρεσκοπαρασκευασθέντος προτύπου διαλύματος και αραιώνονται στον τελικό όγκο των 4,1 mL με απιονισμένο νερό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για προσθήκες 400  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  και 50  $\mu\text{L}$  φρεσκοπαρασκευασμένων διαλυμάτων του δείγματος. Τα παρασκευασμένα διαλύματα αναμειγνύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Η απορρόφηση στα 450 nm προσδιορίζεται έναντι ενός τυφλού αντιδραστήριου με φασματόμετρο. Έχει αναφερθεί ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων ως ισοδύναμα Trolox (τιμές TEAC) με τη μέθοδο CUPRAC.

### 3.1.20 Δραστηριότητα χηλικοποίησης μετάλλων

Η φερροζίνη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με κόκκινο χρώμα σχηματίζοντας χηλικές ενώσεις με  $\text{Fe}^{2+}$ . Αυτή η αντίδραση περιορίζεται παρουσία άλλων χηλικών παραγόντων και οδηγεί σε μείωση του κόκκινου χρώματος των συμπλοκών σιδηροζίνης- $\text{Fe}^{2+}$ . Η μέτρηση της μείωσης του χρώματος καθορίζει τη χηλική δραστηριότητα για να ανταγωνιστεί τη φερροζίνη για τα ιόντα σιδήρου (Soler-Rivas et al., 2000). Η χηλοποίηση των ιόντων σιδήρου εκτιμάται με τη μέθοδο των Dinis et al. (1994). 0,1 mL του εκχυλίσματος προστίθεται σε ένα διάλυμα 0,5 mL χλωριούχου σιδήρου (0,2 mM). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0,2 mL φερροζίνης (5 mM) και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια η απορρόφηση μετράται στα 562 nm. Το EDTA ή το κιτρικό οξύ (Dinis et al., 1994) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας.

### 3.2 In vivo μοντέλα

Για όλες τις in vivo μεθόδους, τα δείγματα που πρόκειται να δοκιμαστούν συνήθως χορηγούνται στα πειραματόζωα (ποντίκια, αρουραίους, κ.λπ.) σε ένα καθορισμένο δοσολογικό σχήμα όπως περιγράφεται από την αντίστοιχη μέθοδο. Μετά από μια καθορισμένη χρονική περίοδο, τα ζώα συνήθως θυσιάζονται και χρησιμοποιούνται αίμα ή ιστοί για τον προσδιορισμό.

#### 3.2.1. Το σίδηρο μειώνει την ικανότητα του πλάσματος

Είναι ένα από τα πιο γρήγορα τεστ και πολύ χρήσιμο για ανάλυση ρουτίνας (Umesh et al., 2010). Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμάται με τη μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης που προκαλείται από το σχηματισμό ιόντων σιδήρου από αντιδραστήριο FRAP που περιέχει TPTZ (2,4,6-τριπυριδύλ-s-τριαζίνη) και  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Η απορρόφηση μετράται φασματοφωτομετρικά στα 593 nm. Η μέθοδος που απεικονίζεται από τους Benzie και Strain (1996) περιλαμβάνει τη χρήση δειγμάτων αίματος που συλλέγονται από το οπισθο-κογχικό φλεβικό πλέγμα αρουραίου σε ηπαρινισμένους γυάλινους σωλήνες στις 0, 7 και 14 ημέρες θεραπείας. Τρία mL πρόσφατα παρασκευασμένου και ζεστού (37 °C) αντιδραστήριου FRAP [1 mL (10 mM) διαλύματος 2,4,6 τριπυριδύλ-s-τριαζίνης (TPTZ) σε 40 mM HCl, 1 mL 20 mM  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού 0,3 M (pH 3,6)] αναμιγνύεται με 0,375 mL απεσταγμένου νερού και 0,025 mL δειγμάτων δοκιμής. Η απορρόφηση του ανεπτυγμένου χρώματος στην οργανική στιβάδα μετράται στα 593 nm. Η θερμοκρασία διατηρείται στους 37 °C. Οι μετρήσεις στα 180 s επιλέγονται για τον υπολογισμό των τιμών FRAP.

#### 3.2.2 Μειωμένη εκτίμηση γλουταθειόνης (GSH)

Η GSH είναι ένα ενδοκυτταρικό αναγωγικό και παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση, το μεταβολισμό και τη μεταφορά. Προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες, τα υπεροξειδία και άλλες τοξικές ενώσεις (Sapakal et al., 2008). Η ανεπάρκεια GSH στο φακό οδηγεί σε σχηματισμό καταρράκτη. Η γλουταθειόνη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στα νεφρά και συμμετέχει σε ένα σύστημα μεταφοράς που εμπλέκεται στην επαναρρόφηση των αμινοξέων. Η μέθοδος που απεικονίζεται από τον Ellman (1959) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Το ομογενοποίημα ιστού (σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 7,4) λαμβάνεται και προστίθεται με ίσο όγκο 20%

τριχλωροξικού οξέος (TCA) που περιέχει 1 mM EDTA για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες ιστού. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά πριν από τη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό (200  $\mu$ L) στη συνέχεια μεταφέρεται σε ένα νέο σετ δοκιμαστικών σωλήνων και προστίθεται με 1,8 mL του αντιδραστηρίου Ellman (5,5'-διθειοδις-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (0,1 mM) που παρασκευάζεται σε ρυθμιστικό φωσφορικών 0,3 M με 1% διαλύματος κιτρικού νατρίου). Στη συνέχεια, όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες συμπληρώνονται μέχρι τον όγκο των 2 mL. Μετά την ολοκλήρωση της συνολικής αντίδρασης, τα διαλύματα μετρούνται στα 412 nm έναντι του τυφλού. Οι τιμές απορρόφησης συγκρίθηκαν με μια τυπική καμπύλη που δημιουργήθηκε από γνωστή GSH.

### 3.2.3 Εκτίμηση υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GSHPx)

Το GSHPX είναι ένα seleno-ένζυμο του οποίου τα δύο τρίτα (στο ήπαρ) βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και το ένα τρίτο στα μιτοχόνδρια. Καταλύει την αντίδραση υδροϋπεροξειδίων με ανηγμένη γλουταθειόνη για να σχηματίσει δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG) και το προϊόν αναγωγής του υδροϋπεροξειδίου. Το GSHPx βρίσκεται σε όλους τους ιστούς, όντας παρόν ως τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα, κυτταρική υπεροξειδάση γλουταθειόνης, εξωκυτταρική υπεροξειδάση γλουταθειόνης, φωσφολιπιδικό υδροϋπεροξειδίου της γλουταθειόνης υπεροξειδάση και γαστρεντερική υπεροξειδάση γλουταθειόνης. Η μέτρηση του GSHPx λαμβάνεται υπόψη ιδιαίτερα σε ασθενείς που βρίσκονται υπό οξειδωτικό στρες για οποιοδήποτε λόγο. Η χαμηλή δραστηριότητα αυτού του ενζύμου είναι μία από τις πρώιμες συνέπειες μιας διαταραχής της ισορροπίας προοξειδωτικών/αντιοξειδωτικών (Paglia and Valentin, 1967, Yang et al., 1984). Σύμφωνα με τον Wood (1970), το Cytosolic GPx προσδιορίζεται μέσω κυψελίδας 3-mL που περιέχει 2,0 mL ρυθμιστικού φωσφορικού 75 mM/L, pH 7,0. Στη συνέχεια προστίθενται τα ακόλουθα διαλύματα: 50  $\mu$ L διαλύματος αναγωγάσης γλουταθειόνης 60 mM/L (30 U/mL), 50  $\mu$ L 0,12 M/L  $\text{NaN}_3$ , 0,10 από 0,15 mM/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 100  $\mu$ L 3,0 mM/L NADPH, και 100  $\mu$ L κυτοσολικού κλάσματος που λαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση στα 20.000 g για 25 λεπτά. Προστίθεται νερό για να γίνει ένας συνολικός όγκος 2,9 mL. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 100  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5 mM/L και η μετατροπή του NADPH σε NADP παρακολουθείται με συνεχή καταγραφή της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm σε διάστημα 1 λεπτού για 5 λεπτά. Η ενζυμική δραστηριότητα του GSHPx εκφράζεται σε mg πρωτεϊνών.

### 3.2.4 Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GSt)

Η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση πιστεύεται ότι παίζει έναν φυσιολογικό ρόλο στην έναρξη της αποτοξίνωσης πιθανών αλκυλιωτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακολογικών δραστικών ενώσεων. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την αντίδραση ενώσεων ομάδας -SH της γλουταθειόνης, εξουδετερώνοντας έτσι τις ηλεκτροφιλικές θέσεις τους και καθιστώντας τα προϊόντα πιο υδατοδιαλυτά. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως περιγράφεται από τον Jocelyn (1972). Το μίγμα της αντίδρασης (1 mL) αποτελούνταν από 0,1 N φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), 1 mM/L GSt, 1 M/L 1-γλωρο-2, 4-δινιτροβενζόλιο ως υπόστρωμα και κατάλληλη ποσότητα κυτοσόλης (6 mg πρωτεΐνης/ mL). Το μίγμα της αντίδρασης επώαζεται στους 37°C για 5 λεπτά και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του υποστρώματος. Η αύξηση στην απορρόφηση στα 340 nm μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά.



### 3.2.5 Μέθοδος υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Αυτή η μέθοδος περιγράφεται καλά από τους Mccord και Fridovich (1969) και μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος. Υπολογίζεται στο κυτταρόλυμα ερυθροκυττάρων που παρασκευάστηκε από το εναιώρημα 5% RBC. Σε 50  $\mu\text{L}$  του προϊόντος λύσης, προστίθενται 75 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (pH 8,2), 30 mM EDTA και 2 mM πυρογαλλόλης. Μια αύξηση στην απορρόφηση καταγράφεται στα 420 nm για 3 λεπτά με φασματοφωτόμετρο. Μία μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας είναι η 50% αναστολή του ρυθμού αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης όπως προσδιορίζεται από την αλλαγή στην απορρόφηση/λεπτό στα 420 nm. Η δράση του SOD εκφράζεται ως μονάδες/mg πρωτεΐνης.

### 3.2.6 Καταλάση (CAT)

Η δράση της καταλάσης μπορεί να προσδιοριστεί σε κυτταρόλυμα ερυθροκυττάρων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Aebi (Aebi, 1984). Πενήντα μικρολίτρα του προϊόντος λύσης προστίθενται σε κυψελίδα που περιέχει 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) και 1 mL 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η δραστηριότητα καταλάσης μετράται στα 240 nm για 1 λεπτό χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο. Ο μοριακός συντελεστής εξάλειψης του  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 43,6  $\text{M cm}^{-1}$  χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης. Μία μονάδα δραστηριότητας ισούται με 1 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  που αποικοδομείται ανά λεπτό και εκφράζεται ως μονάδες ανά χιλιοστόγραμμα πρωτεΐνης.

### 3.2.7 Δοκιμασία δραστηριότητας γ-γλουταμυλο τρανσπεπτιδάσης (GGT)

Σύμφωνα με τις Singhal et al. (1982), το δείγμα ορού προστίθεται σε διάλυμα υποστρώματος που περιέχει γλυκυλγλυκίνη,  $\text{MgCl}_2$  και g-Γλουταμυλ-ρ-νιτροανιλίδιο σε 0,05 M tris (ελεύθερη βάση), pH 8,2. Το μίγμα επωάζεται τις 37 °C για 1 λεπτό και η απορρόφηση διαβάζεται στα 405 nm σε διάστημα 1 m για 5 m. Η δραστηριότητα του GGT υπολογίζεται από τις τιμές απορρόφησης.

### 3.2.8 Δοκιμασία αναγωγής γλουταθειόνης (GR)

Το πανταχού παρόν τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH), το οποίο είναι η πιο άφθονη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους σε όλα σχεδόν τα κύτταρα, εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα ενζυματικών αντιδράσεων. Μια κύρια λειτουργία της GSH είναι να χρησιμεύει ως αναγωγικό στις διαδικασίες οξειδωσης-αναγωγής, μια λειτουργία που οδηγεί στο σχηματισμό δισουλφιδίου γλουταθειόνης (GSSG). Ανακαλύφθηκε στο ήπαρ ένα ασταθές στη θερμότητα σύστημα ικανό να μειώνει το GSSG. Το ένζυμο που εμπλέκεται άμεσα στη μείωση του GSSG. Η μέθοδος που απεικονίζεται από τους Kakkar et al. (1984) έχει ως εξής: Τα συκώτια (περίπου 400 g) λαμβάνονται από θανατωμένους αρουραίους (200-250 g). Τα συκώτια κόβονται σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιούνται σε 9 mL 0,25 M παγωμένης σακχαρόζης ανά g ήπατος αρουραίου σε ένα μπλέντερ. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται για 45 λεπτά στις 14.000 rpm. Τα σφαιρίδια εναιωρούνται σε μικρό όγκο 0,25 M σακχαρόζης και φυγοκεντρώνται. Τα υπερκείμενα συνδυάζονται με την προηγούμενη φυγοκέντρωση. Το συγκεντρωμένο υλικό ρυθμίζεται σε pH 5,5 με ψυχρό οξικό οξύ 0,2 M και φυγοκεντρείται

ξανά για 45 λεπτά στις 14.000 rpm. Ο ρυθμός οξειδωσης του NADPH από GSSG στους 30 °C χρησιμοποιείται ως τυπικό μέτρο της ενζυματικής δραστηριότητας. Το σύστημα αντίδρασης του 1 mL περιείχε: 1,0 mM GSSG, 0,1 mM NADPH, 0,5 mM EDTA, 0,10 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 7,6) και κατάλληλη ποσότητα δείγματος αναγωγάσης γλουταθειόνης για να δώσει μια αλλαγή στην απορρόφηση 0,03/00. ελάχ. Η οξειδωση 1 μM NADPH/min υπό αυτές τις συνθήκες χρησιμοποιείται ως μονάδα δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η ειδική δραστηριότητα εκφράζεται ως μονάδες ανά mg πρωτεΐνης.

### 3.2.9 Δοκιμασία υπεροξειδωσης λιπιδίων (LPO)

Το LPO είναι μια αυτοκαταλυτική διαδικασία, η οποία είναι μια κοινή συνέπεια του κυτταρικού θανάτου. Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκαλέσει υπεροξειδωτική βλάβη ιστού σε φλεγμονή, καρκίνο και τοξικότητα ξеноβιοτικών και γήρανση. Η μηλονοδιαλδεΐδη (MDA) είναι ένα από τα τελικά προϊόντα στη διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η μηλονοδιαλδεΐδη (MDA) σχηματίζεται κατά την οξειδωτική εκφύλιση ως προϊόν ελεύθερων ριζών οξυγόνου, η οποία είναι αποδεκτή ως δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων. Αυτή η μέθοδος που περιγράφεται από τους Ohkawa et al. (1979) έχει ως εξής: Οι ιστοί ομογενοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M pH 7,4 με ομογενοποιητή τεφλόν-γυαλιού. Το LPO σε αυτό το ομογενοποίημα προσδιορίζεται με μέτρηση των ποσοτήτων μηλονοδιαλδεΐδης (MDA) που παράγεται κυρίως. Προστίθενται ομογενοποίηση ιστού (0,2 mL), 0,2 mL 8,1% δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS), 1,5 mL 20% οξικού οξέος και 1,5 mL 8% TBA. Ο όγκος του μείγματος συμπληρώνεται στα 4 mL με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 95 °C σε λουτρό νερού για 60 λεπτά χρησιμοποιώντας γυάλινες σφαίρες ως συμπυκνωτή. Μετά την επώαση οι σωλήνες ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και ο τελικός όγκος έγινε στα 5 mL σε κάθε σωλήνα. Προστίθενται πέντε mL μίγματος βουτανόλης: πυριδίνης (15:1) και τα περιεχόμενα στροβιλίζονται επιμελώς για 2 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά, λαμβάνεται η ανώτερη οργανική στιβάδα και η OD της λαμβάνεται στα 532 nm έναντι ενός κατάλληλου τυφλού χωρίς το δείγμα. Τα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων μπορούν να εκφραστούν ως n moles αντιδραστικών ουσιών θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)/mg πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας συντελεστή εξάλειψης  $1,56 \times 10^5 \text{ ML cm}^{-1}$ .

### 3.2.10 Δοκιμασία LDL

Η απομονωμένη LDL πλένεται και υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι 150 mmol/L NaCl και 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA (pH 7,4) στους 4°C. Η LDL στη συνέχεια αποστειρώνεται με διήθηση (0,45 μM), διατηρείται υπό άζωτο στο σκοτάδι στους 4 °C. Η LDL (100 μg πρωτεΐνης/mL) επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με δείγματα. Στη συνέχεια, προστίθενται 5 μmol/L CuSO<sub>4</sub> και οι σωλήνες επωάζονται για 2 ώρες στους 37 °C. Η οξειδωση που προκαλείται από Cu<sup>2+</sup> τερματίζεται με την προσθήκη βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT, 10 μM). Στο τέλος της επώασης, η έκταση της οξειδωσης της LDL προσδιορίζεται με μέτρηση της παραγόμενης ποσότητας υπεροξειδίων λιπιδίων και επίσης με τη δοκιμασία αντιδραστικών ουσιών θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) στα 532 nm, χρησιμοποιώντας μηλονοδιαλδεΐδη (MDA) για την τυπική καμπύλη όπως περιγράφεται από Buege and Aust, 1978, El-Saadani et al., 1989.

## 4.0 Συμπέρασματα

Στην αρχή της ερευνάς μας είδαμε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να σχηματιστούν οι ελεύθερες ρίζες με τις σημαντικότερες από αυτές να είναι τα δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ)

Οι τρεις τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών είναι : 1) Ομοιοπολικές διασπάσεις. 2) Οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις με μεταφορά ηλεκτρονίου. 3) Από την αντίδραση ριζών με άλλες οργανικές ενώσεις

Η δημιουργία τους διαχωρίζεται σε δύο συνθήκες, στις φυσιολογικές διαδικασίες και στους εξωτερικούς παράγοντες

Από τα ΔΕΟ προκύπτει το οξειδωτικό στρες το οποίο δεν αποτελεί «καλό» για την υγεία μας, με αποτέλεσμα να προκαλεί ορισμένες παθήσεις όπως : καρδιαγγειακές παθήσεις – καρκίνος – νευροεκφυλιστικές ασθένειες – καταρράκτης – διαβήτης - καθώς και αυτοάνοσες ασθένειες

Όπως για κάθε πρόβλημα προσπαθούμε να βρούμε και μια λύση, έτσι οφείλουμε να πραγματοποιήσουμε και στη παραπάνω περίπτωση

Η λύση στο πρόβλημα είναι τα αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την οξείδωση πρώτων υλών όπως λίπη έλαια αρώματα βιταμίνες, κ.α. Πρόκειται για ουσίες που εμπεριέχονται στα τρόφιμα και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό

Η καθημερινή πρόσληψη αντιοξειδωτικών μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, ενώ μειώνει τον κίνδυνο θρομβώσεων, μειώνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

### **Καφές**

Πρόκειται για ένα από τα πιο διαδεδομένα ροφήματα που πρωτοεμφανίστηκε στη Ευρώπη, προερχόμενος από την Αφρική, στα μέσα του 17ου αιώνα

Τα δυο κύρια είδη καφέ όπου κατακλύζουν την αγορά παγκοσμίως είναι η Arabica ποικιλία η οποία προέρχεται από την Αιθιοπία και η Robusta η οποία προέρχεται από την Αφρική.

Στον καφέ υπάρχουν διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις

Εμπεριέχει μεγάλες ποσότητες βιοδραστικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων της καφεΐνης, φαινολικών ενώσεων, τριγωνελλίνης, διτερπερινίων και διαλυτών φυτικών ινών.

Ωστόσο πίσω από τις ευεργετικές δράσεις του καφέ ελλοχεύουν και μερικά απρόοπτα που μπορεί να προκληθούν . Η μερική πρόσληψη καφεΐνης έχει αποδειχθεί πως οδηγεί σε επαγρύπνηση, καλύτερη διάθεση, αποδοτικότερη ικανότητα μάθησης καθώς και αυξημένο αίσθημα άθλησης. Η πρόσληψή της σε περίσσεια μπορεί να οδηγήσει σε άγχος, ταχυκαρδία, τρέμουλο και φυσικά αϋπνία.

### **Δίκταμος**

Πρόκειται ένα φυτό το οποίο προέρχεται από την εποχή του Μίνωα και βρίσκεται στο νησί της Κρήτης

Από τα αρχαία κιόλας χρόνια είναι γνωστό για τις ευεργετικές του ικανότητες καθώς συμβάλλει στη καταπολέμηση των στομαχικών διαταραχών. Βοηθά σε διάφορες στιγμές της καθημερινότητας όπως, πονοκέφαλους, νευραλγίες, ηπατικές παθήσεις, αλλά και σε πόνους περιόδου. Επιπλέον το αιθέριο έλαιο του δίκταμου ανακουφίζει από μυϊκούς, ρευματικούς πόνους, αλλά και παθήσεις του δέρματος

Η αντιοξειδωτική δράση που χαρακτηρίζει το δίκταμο φανερώθηκε από πειράματα κατά τα οποία ένα μοντέλου φαγητού βασισμένο στο κρέας γαλοπούλας το οποίο είχε θωρακιστεί από διάλυμα δίκταμου φανέρωσε πιο αργή χρονικά αύξηση σε τιμές αιθέριο έλαιο του δίκταμου ανακουφίζει από μυϊκούς, ρευματικούς πόνους, αλλά και παθήσεις του δέρματος όπου δεν είχε εμποτιστεί

Συνοψίζοντας, ο δίκταμος αποτελεί ευεργετική ουσία για το βήχα, τον πονόλαιμο, τον πονοκέφαλο, το κοινό κρυολόγημα, για δερματικές παθήσεις, για παθήσεις εντέρου και στομάχου.

Η καλή αντιοξειδωτική του ικανότητα συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες το οποίο είναι υπεύθυνο για ασθένειες όπως διαβήτης, καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις

## **Ρόδι**

Το ρόδι απασχολεί τους ανθρώπους από τα αρχαία χρόνια, τόσο στην αρχαία Ελλάδα όσο και στις υπόλοιπες χώρες τις Μεσογείου. Από την μυθολογία παρουσιάζεται σαν καρπός που έχει φαρμακευτικές χρήσεις αλλά και για την παραγωγή ποτού. Σαν φυτό, είναι ένας θάμνος φυλλώδης που απαρτίζεται από τον κορμό όπου στηρίζονται τα φύλλα, τα άνθη και οι καρποί του. Επιπροσθέτως, είναι ένα πολυποίκιλο φυτό, με τις ποικιλίες του να διακρίνονται σε ελληνικές και ξένες, με την πιο δημοφιλή ξένη ποικιλία να είναι η Wonderful. Η περιεκτικότητά του σε ταννίνες, ανθοκυανίνες, πολυφαινόλες είναι ο λόγος που αναφέρεται σε διάφορες έρευνες να έχει φαρμακευτική δράση (αντιοξειδωτική, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή). Έτσι, παρουσιάζεται σαν ασπίδα του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών καθώς επίσης προστατεύει από παθήσεις όπως αρτηριοσκλήρυνση, φλεγμονές στην καρδιά και την υπέρταση.

Όσον αναφορά το χαρούπι, οι τρέχουσες τάσεις ενός υγιεινού τρόπου ζωής για την προαγωγή της υγείας και την πρόληψη ασθενειών οδήγησαν τη βιομηχανία τροφίμων στην αναζήτηση καινοτόμων προϊόντων διατροφής που είναι ωφέλιμα για την υγεία βασισμένα σε φυσικές πηγές. Η υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες και οι βιοδραστικές ενώσεις του καρπού της χαρουπιάς και των προϊόντων της (σκόνη, αλεύρι και σιρόπι) και η ευεργετική τους δράση σε γαστρεντερικές παθήσεις, διαβήτη, υπερλιπιδαιμία, φλεγμονή και οξειδωτικό στρες καθιστούν τα προϊόντα χαρουπιού νέα συστατικά τροφίμων, τα οποία έχουν δυνατότητες να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας ωφέλιμων για την υγεία προϊόντων διατροφής. Η ενσωμάτωση του χαρουπιού και των παράγωγων προϊόντων του σε σκευάσματα τροφίμων ενισχύει τη θρεπτική και λειτουργική αξία και βελτιώνει την τεχνολογική λειτουργικότητα προσδίδοντας ευεργετικές ρεολογικές ιδιότητες και παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής των τελικών προϊόντων. Προς το παρόν, η παραγωγή χαρουπάλευρου ή σκόνης γίνεται μόνο μετά τον διαχωρισμό του πολτού. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία των σπόρων βελτιώνει τον δείκτη συνοχής, τις τιμές αντοχής των

προϊόντων διατροφής, την αποτελεσματικότητα εκχύλισης πολυφαινόλων και φλαβονοειδών και την αντιοξειδωτική ικανότητα των προϊόντων. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των προϊόντων χαρουπιού και την αλληλεξάρτησή τους για την αποτελεσματική χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων.

Τέλος, οι 19 μέθοδοι *in vitro* και 10 *in vivo* χρησιμοποιούνται για σκοπούς αξιολόγησης αντιοξειδωτικών. Η μέθοδος DPPH είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για *in vitro* αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, ενώ η LPO βρέθηκε ως η περισσότερο χρησιμοποιούμενη *in vivo* αντιοξειδωτική δοκιμασία. Το εκχύλισμα αιθανόλης βρέθηκε με την υψηλότερη συχνότητα για μελέτη αντιοξειδωτικών. Έτσι, υπάρχει μεγάλη ποικιλία μεθόδων, όπου στην εκάστοτε περίπτωση μπορούμε να επιλέξουμε την ιδανικότερη για οποιαδήποτε μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης θέλουμε να εκτελέσουμε

## Βιβλιογραφία

- Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot M, Beilin LJ ‘‘Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine’’ *Clinical Science*, 91 449-458, 1996
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L, ‘‘Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products’’, *J Agric Food Chem*, 51 : 6657-6662, 2003
- Barberan FAT, Nunez JM, Tomas F, ‘‘An HPLC study of flavonoids from some Spanish *Sideritis* species’’. *Phytochemistry*, vol. 24, no. 6, 1285-1288, 1985
- Baruchel S, Wainberg MA, ‘‘The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus’’: *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 111-114: 1992
- Benzie IFF, Strain JJ, ‘‘The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power’’: the FRAP assay’’: *Anal Biochem*, 239, 70-76, 1996.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M, ‘‘Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies’’, *Methods in Enzymology*, 186, 343-355, 1990.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, ‘‘Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity’’, *Food Science and Technology*, 28, 25-30, 1995.
- Bravo L, ‘‘Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance’’, *Nutr Rev*, 56, (11): 317-33, 1998.
- Cao GH, Sofic E, Prior R, ‘‘Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships’’, *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 749-760, 1997
- Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J, ‘‘Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups’’ *Chemistry and Physics of Lipids* 76, 157-163, 1996.
- Cheynier V, ‘‘Polyphenols in foods are more complex than often thought’’, *Am J Clin Nutr*, 81:223-9, 2005.
- Duthie G, ‘‘Determination of activity of antioxidants in human subjects’’. *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 1015-1024, 1999

- Evans PH, ‘Free radicals in brain metabolism and pathology’, British Medical Bulletin, 49: 577-587, 1993
- Fiamegos YC, Nanos CG, Vervoort J, Stalikas CD, ‘Analytical procedure for the in-  
vial derivatization- extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and  
aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective  
detection’, J Chromatogram, 1041 (1-2), 2004.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, ‘Role of free radicals and catalytic metal ions in  
human disease: an overview’, in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzyme 186,  
1990.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI, ‘The characterization of  
antioxidants’, Food Chemical Toxicity, 33:601-617, 1995
- Heim K, ‘Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity  
relationships’, Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584, 2002
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L, ‘Polyphenols: Food  
sources and bioavailability’, Am J Clin Nutr, 79: 727-747, 2004.
- Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe, ‘Antioxidative action  
of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione  
peroxidase’, J Exp Clin Med, 24: 1-11, 1999.
- Sanchez-Moreno JA, Larrauri Saura-Calixto FA, ‘Procedure to measure the  
antiradical efficiency of polyphenols’, Journal of the Science of Food and Agriculture,  
76: 270-276, 1998
- Shahidi F, Wanasundara J, ‘Phenolic antioxidants’, Crit Rev Food Sci Nutr, 32: 67-  
103, 1992.
- Sies H, Stahl W, Sundquist A ‘Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C,  
betacarotene, and other carotenoids’, Annals of the New York Academy of Sciences,  
669: 7-20, 1995.
- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, ‘The role of oxidative stress in the genesis  
of heart disease’, CardioVasc Res, 40: 426-432, 1998.
- Dervijgh WJF, Bast A, ‘Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids’,  
Free Radical Biology and Medicine, 20: 331-342, 1996.
- N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, ‘Phenolic compounds in plants and  
agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,’  
Food Chem., 99 : 191–203, 2006.
- J. L. S. Mayer, S. M. Carmello-Guerreiro, and P. Mazzafera, ‘A functional role  
for the collectors of coffee flowers,’ AoB Plants, Jun. 2013.
- A. Farah and C. M. Donangelo, ‘Phenolic compounds in coffee,’ Brazilian J. Plant  
Physiol., 2006.
- S. Review, ‘Green Coffee Extract Improves Human Health’ 295–321, 2016
- S. C. Larsson and A. Wolk, ‘Coffee Consumption and Risk of Liver Cancer: A Meta-  
Analysis,’ Gastroenterology, 1740–1745, Apr. 2017.
- A. Santini et al., ‘Influence of different coffee drink preparations on ochratoxin A  
content and evaluation of the antioxidant activity and caffeine variations,’ Food  
Control, 1240–1245, Aug. 2011
- Moller, J. K. ., Lindberg Madsen, H., Aaltonen, T., & Skibsted, L. H. ‘Dittany  
(*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants’. Food  
Chemistry, 215–219. 1999.

- Krigas, N., Lazari, D., Maloupa, E., & Stikoudi, M. Introducing Dittany of Crete (*Origanum dictamnus* L.) to gastronomy: ‘A new culinary concept for a traditionally used medicinal plant’. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2), 112–118. 2015.
- Lemonis, Ilias Tsimogiannis, Dimitrios; Louli, Vasiliki; Voutsas, Epaminondas Oreopoulou, Vasiliki; Magoulas, Kostis ‘Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO<sub>2</sub> and liquid solvent’. *The Journal of Supercritical Fluids*, 48–53. 2013.
- Georgia Kouri Dimitrios Tsimogiannis; Haido Bardouki; Vassiliki Oreopoulou ‘Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*’. , 0–162. 2007.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O ‘Antimicrobial herb and spice compounds in food’. *Food Control*, 1199–1218. 2010.
- *Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of Origanum dictamnus (dittany) essential oil*. Gregoria Mitropoulou, Eleni Fitsiou, Elisavet Stavropoulou, Eleni Papavassilopoulou, Manolis Vamvakias, Aglaia Pappa, Antigoni Oreopoulou & Yiannis Kourkoutas
- Md. Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi, Md. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volume 21, Issue 2, 2013, Pages 143-152, ISSN 1319-0164
- *Αξιολόγηση ελληνικών και ξένων γονότυπων ροδιάς που καλλιεργούνται στην Ερμιόνη Αργολίδας, μεταπτυχιακή διατριβή του Πουλημένου Κωνσταντίνου, Αθήνα 2012.*
- *Ροδιά: Ο κόκκινος χρυσός της διατροφικής αξίας, από Δρ Δρογούδη Παυλίνα Αναπληρώτ. ερευνήτρια.*
- *Εγχειρίδιο για την καλλιέργεια της ροδιάς, από την ομάδα Δρ Δρογούδη Παυλίνα Αναπληρώτ. ερευνήτρια, Βασιλακάκη Μιλτιάδη Καθηγητής, Θωμίδη Θωμά Αναπλ. Καθηγητής, Ναβροζίδης Εμμανουήλ Καθηγητής, Παντελίδης Γεώργιος Δρ Μεταδιδακτορικός ερευνητής.*