

ΤΕΙ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ
ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΣΑΚΙΡΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΩΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

**«ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ
ΕΥΘΥΝΗΣ»**

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην Πτυχιακή μου Εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης του Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η Πτυχιακή Εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

.....

Υπογραφή Τσακίρη Σταυρούλα

.....

1-06-2016

.....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή μελετά τα αντιοξειδωτικά συστατικά που περιέχονται στην τομάτα της ποικιλίας Χίου. Το πρώτο μέρος της εργασίας είναι θεωρητικό και αναλύει την δράση των αντιοξειδωτικών και την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία. Ακολουθεί ανάλυση των τριών μεθόδων, όπου έγινε η μέτρηση των ολικών φαινολών, των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων και της συγκέντρωσης του λυκοπενίου της ποικιλίας αυτής. Οι μετρήσεις αφορούν τα τρία στάδια ωρίμανσης της τομάτας, Mature, Brake και Red ripe καθώς επίσης και την ωρίμανση του σταδίου Brake εκτός φυτού σε συνθήκες δωματίου. Το δεύτερο μέρος της εργασίας είναι πειραματικό και περιλαμβάνει τις μετρήσεις που έγιναν με τις μεθόδους προσδιορισμού Folin Ciocalteu, DPPH, FRAP, ORAC σε λιπόφιλα και υδρόφιλα δείγματα. Από τα διάφορα αντιοξειδωτικά φαίνεται να υπερτερούν οι πολυφαινόλες, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο στάδιο της ώριμης τομάτας, το Red ripe. Σε μικρότερη συγκέντρωση έρχονται τα φλαβονοειδή με παρόμοια συγκέντρωση σε όλα τα στάδια ωρίμανσης και το λυκοπένιο με μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά το στάδιο Red ripe. Στις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH, Frap και ORAC οι τιμές είναι μεγαλύτερες στα υδρόφιλα δείγματα έχοντας τεράστια διαφορά από τα λιπόφιλα. Όσο αφορά την ωρίμανση της τομάτας εκτός φυτού παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών των αντιοξειδωτικών από εκείνες όπου είχαμε φυσιολογική ωρίμανση κατά τη μέθοδο DPPH στα υδρόφιλα και στα λιπόφιλα δείγματα. Στη μέθοδο Frap τα λιπόφιλα δείγματα παρουσίασαν αύξηση της συγκέντρωσης του λυκοπενίου.

ABSTRACT

This project studies the antioxidants ingredients that are contained on a certain variety of tomato, Chios' tomatoes. The initial part of the project is theoretical and it analyses the action of antioxidants and their effect on human's body. To continue with, it comes the analyses of the three methods, where the measurement of the total phenols happens, the antioxidants' capacities and the gathering of lycopene on the certain tomato variety. The measurements concern the three stages of a tomato's maturation MADURE, BRAKE and RED RIPE but also the maturation on Brake's stage separated from the plant under room's conditions. The second part of the project is experimental and contains the measurements that occurred with the methods of determination FOLIN, CIOCALTEU, DPPH, FRAP, ORAC on lipophilic and hydrophilic samples. From the different antioxidants it seems to dominate the polyphenols with greater existence on the mature tomato stage-RED RIPE. In less gathering are the flavonoids with similar existence in all the stages of maturation and the lycopene in more existence during the stage of RED RIPE. In the measurements of the antioxidant capacity by the methods DPPH, FRAP and ORAC the results are bigger on the hydrophilic parts having a huge difference than the lipophilic. As far as the tomato maturation separated from the plant is concerned, it was observed an increase on the results of the antioxidants than those they had a normal maturation during DPPH method on the hydrophilic and on the lipophilic samples and an increase of the lycopene gathering!!!!!!

Λέξεις κλειδιά :

Τομάτα

Αντιοξειδωτικά

Ελεύθερες ρίζες

Πολυφαινόλες

Φλαβονοειδή

Φαινολικά οξέα

Λυκοπένιο

Αντιοξειδωτική δράση

DPPH

FRAP

ORAC

Folic Ciocalteu

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	3
Λέξεις κλειδιά :	5
Τομάτα	5
A. Θεωρητικό Μέρος.....	8
1. Εισαγωγή: Το φυτό <i>Solanum lycopersicum</i> (τομάτα)	8
2. Αντιοξειδωτικά	12
2.1 Ορισμός αντιοξειδωτικών	12
2.2 Βιολογική Αντιοξειδωτική άμυνα	12
2.3 Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμός ελεύθερων ριζών.	13
2.3.1 Κατάταξη αντιοξειδωτικών	14
2.3.2 Η δράση των αντιοξειδωτικών	16
2.3.3 Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων	17
2.4 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών	18
2.4.1 Αντιοξειδωτικά φυτοχημικά	19
2.4.2 Αντιοξειδωτικές βιταμίνες	19
2.4.3 Αντιοξειδωτικά ένζυμα	20
2.5 Τα αντιοξειδωτικά της ντομάτας	21
2.5.1 Φαινολικές ενώσεις (πολυφαινόλες).....	21
2.5.2 Καροτενοειδή	22
2.5.3 Λυκοπένιο	23
2.5.4 Φλαβονοειδή	25
2.5.5 Φαινολικά οξέα	28
2.6 Οφέλη αντιοξειδωτικών στην υγεία	31
2.6.1 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία	31
2.6.2 Η σημασία του λυκοπενίου για την υγεία	34
3. Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικών και φαινόλων	37
3.1 Μέθοδοι ET	39
3.1.1 Η μέθοδος DPPH	40
3.1.2 Η μέθοδος FRAP	43
3.2 Μέθοδοι HAT	44
3.2.1. Η μέθοδος ORAC	45
4. Η μέθοδος Folin Ciocalteu.....	49
B. Πειραματικό Μέρος	51
5. Προσδιορισμός ολικών φαινόλων με τη μέθοδο Folin Ciocalteu.....	51
5.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	51

5.2 Διαδικασία	51
5.3 Εκχύλιση δείγματος.....	52
5.4 Μέτρηση δείγματος	53
6. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών (Total Flavonoids)	54
6.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.....	54
6.2 Διαδικασία	54
7. Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Antioxidant Activity) με χρήση της μεθόδου DPPH..	55
7.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.....	55
7.2 Μέτρηση δείγματος	56
8. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος τομάτας με χρήση της μεθόδου FRAP	57
8.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.....	57
8.2 Μετρήσεις δείγματος (λιπόφιλο ή υδρόφιλο).....	58
9. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου ORAC	59
9.1 Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης	59
9.2 Μέτρηση δείγματος ή πρότυπων	59
9.3 Μέτρηση τυφλού	60
10. Προσδιορισμός Λυκοπενίου	61
Γ. Αποτελέσματα-συζήτηση.	62
11. Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu.....	62
12.Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών (Total Flavonoids)	64
13. Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Antioxidant Activity) με χρήση της μεθόδου DPPH....	66
14. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος τομάτας με χρήση της μεθόδου FRAP	68
15. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου ORAC	70
16.Προσδιορισμός Λυκοπενίου	72
17. Συμπεράσματα.....	73
Βιβλιογραφία	74

A. Θεωρητικό Μέρος

1. Εισαγωγή: Το φυτό *Solanum lycopersicum* (τομάτα)

Η τομάτα, αλλιώς και ντομάτα, (*Solanum lycopersicum* L.) είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό της οικογένειας των Σολανοειδών (*Solanaceae*). Είναι ένα καρποφόρο φυτό της οικογένειας των στρυχνιδών ή σολανιδών. Πρόκειται για ένα από τα πιο συνηθισμένα φυτά στην Ελλάδα, που από τους καρπούς του φτιάχνεται η πιο απλή σαλάτα, η τοματοσαλάτα και παράλληλα παρασκευάζεται η σάλτσα – ντομάτα που χρησιμοποιείται στη μαγειρική. Αποτελεί το δεύτερο σε κατανάλωση λαχανικό στον κόσμο.

Είναι φυτό θερμόφιλο και ηλιόφιλο. Καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, ακόμη και στις βόρειες, ψυχρές περιοχές σε θερμοκήπια λόγω της μεγάλης θρεπτικής αξίας. Η τομάτα είναι το δεύτερο σε κατανάλωση λαχανικό στον κόσμο. Η καταγωγή της είναι από τη Λατινική Αμερική και στην Ευρώπη πρέπει να μεταφέρθηκε μετά το 16ο αι. από τους Ισπανούς αποίκους. Στην Ελλάδα η εισαγωγή της έγινε το 1818 στην Αθήνα.

Η τομάτα είναι ποώδες ετήσιο, διετές και σπάνια πολυετές φυτό. Το ύψος του είναι μικρό (φτάνει το ένα μέτρο) και επειδή οι βλαστοί του είναι τρυφεροί, υποστηρίζονται από πασσάλους. Εμφανίζει κεντρική ρίζα η οποία είναι ευδιάκριτη με αρκετές δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Αναπαράγεται με ευκολία ακόμα και στο ύψος του λαιμού γεγονός που αποτελεί σημάδι κακού αερισμού ή υπερβολικής υγρασίας του υποστρώματος. Ο βλαστός είναι κεντρικός με φύλλα, στις μασχάλες των οποίων εκφύονται πλευρικοί βλαστοί. Είναι κυλινδρικός, με μήκος μέχρι τα 10 μέτρα και εσωτερικά πλήρης. Αρχικά, είναι τρυφερός και χυμώδης, αλλά αργότερα ξυλοποιείται και είναι σχετικά εύθραυστος (Petro-Turza M, 1987).

Εμφανίζονται δύο τύποι ποικιλίας βλαστών:

- Indeterminate
- determinate

Τα φύλλα είναι σύνθετα με 3,4,5 ζεύγη φυλλαρίων και ένα φυλλάριο στην άκρη. Το μέγεθος των φύλλων είναι χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας τομάτας. Τα άνθη χωρίζονται σε ταξιανθίες των 2, 3 έως 20 ανθέων. Παρατηρείται πράσινος δερματώδης κάλυκας 5 σέπαλα, στεφάνη κίτρινη με 5 πέταλα και 5 ή περισσότερους στήμονες. Τέλος, η ωοθήκη αποτελείται από 2 έως 7 χώρους.

Η τομάτα καλλιεργείται σε ειδικά ζεστούς τόπους (το χειμώνα στα θερμοκήπια), καθώς - όπως αναφέρθηκε και παραπάνω- αποτελεί ένα φυτό θερμοφιλό και ηλιόφιλο. Σε καλά οργωμένο και λιπασμένο χώμα σπέρνεται ο σπόρος (περιέχεται στο εσωτερικό του καρπού). Κατά το Μάρτιο και έως το Μάιο (αν η σπορά έχει γίνει το Φλεβάρη), ακολουθεί η μεταφύτευση που συνοδεύεται με ειδικές φροντίδες, όπως σκαλίσματα, ποτίσματα, παραχώματα κλπ.

Περίπου το Μάιο με Ιούνιο ωριμάζουν οι καρποί και μαζεύονται. Σε πολλά μέρη η παραγωγή είναι πλούσια και η συγκομιδή γίνεται ως το Νοέμβριο. Στα θερμοκήπια βέβαια η καλλιέργεια της ντομάτας γίνεται ολόκληρο το χρόνο, και μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και στις βόρειες, ψυχρές περιοχές.

Έχουν καταγραφεί περισσότερες από 12.000 ποικιλίες τομάτας σε όλο τον κόσμο. Παραδοσιακές ποικιλίες επιβιώνουν της επιδρομής των μοντέρνων υβριδίων, λόγω της προτίμησής τους από μικροπαραγωγούς, για τα ανώτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά, αρώματος, γεύσης και υφής. Τα σύγχρονα υβρίδια υπερτερούν στην ποσότητα και στην διάρκεια παραγωγής, εμφανίζουν ανοχή σε ασθένειες και μεγάλη διάρκεια εμπορικής ζωής (μεγάλη μεταλλευτική διάρκεια-extended self life).

Έπειτα, οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχουν είναι αυξημένες λόγω των ειδικών τεχνικών διασταύρωσης που χρησιμοποιούν οι εταιρίες εμπορίας σπόρων.

Η τομάτα αντέχει την ζέστη και την ξηρασία, αλλά όχι το κρύο. Αν η θερμοκρασία κατά την διάρκεια της άνθησης είναι πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή, η γύρη δεν μπορεί να βλαστήσει και τα άνθη δεν γονιμοποιούνται με αποτέλεσμα είτε την πτώση των ανθέων ή το σχηματισμό σχεδόν άσπερμων διογκωμένων καρπών.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι τομάτας, ανάλογα με το μέγεθος, με τον χρόνο ωρίμανσης, αλλά και το σχήμα τους.

Με βάση τον χρόνο ωρίμανσης των καρπών, διακρίνονται σε:

- πρώιμες (50-65 ημερών),
- μέσης περιόδου (70-80 ημερών) και
- όψιμες (85-95 ημερών).

Με βάση τον τρόπο καλλιέργειας, διακρίνονται σε:

- Α) Υπαίθριες (βιομηχανικές και επιτραπέζιες): καθορισμένης ανάπτυξης, το μικρό ύψος του φυτού το κάνει εύκολο στην χρήση του και έχει σχετικά μικρό κόστος παραγωγής. Επίσης, η ταυτόχρονη ωρίμανση των καρπών μειώνει την περίοδο συγκομιδής και μειώνεται το κόστος, εφόσον οι υπαίθριες καλλιέργειες λόγω του μη ελεγχόμενου περιβάλλοντος, είναι πολύ δύσκολο να διατηρηθούν υγιείς για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Β) Θερμοκηπίου: τα μη καθορισμένης ανάπτυξης φυτά, χρησιμοποιούνται σε καλλιέργεια στο θερμοκήπιο, εξαιτίας της μεγαλύτερης και λιγότερο ταυτόχρονης περιόδου συγκομιδής, (Σε αυτή την περίπτωση το ελεγχόμενο περιβάλλον του θερμοκηπίου μας επιτρέπει να διατηρήσουμε την καλλιέργεια υγιή και την συγκομιδή στο μέγιστο δυνατό επίπεδο).

Το κυριότερο κριτήριο ποιότητας της τομάτας είναι το ομοιόμορφο κοκκίνισμα των καρπών, το οποίο οφείλεται σε δύο καροτενοειδείς χρωστικές: το λυκοπένιο και το β-καροτένιο. Η τομάτα περιέχει βιταμίνες Α,Β,С, D και διάφορα άλατα, σίδηρο, φώσφορο και ιώδιο. Είναι μια από τις καλύτερες φυτικές τροφές που υπάρχουν στον κόσμο.



2. Αντιοξειδωτικά

2.1 Ορισμός αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση των συστατικών των τροφίμων (Μπόσκος, 1997) επειδή έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών(οι σημαντικότερες είναι μορφές οξυγόνου που έχουν υποστεί μερική αναγωγή) με δύο βασικούς μηχανισμούς, μεταφέροντας και προσφέροντας υδρογόνο και προσφέροντας μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί λειτουργούν σχεδόν παράλληλα και με κυριαρχία του ενός ή του άλλου μηχανισμού (Prior et al., 2005).

2.2 Βιολογική Αντιοξειδωτική άμυνα

Αποτελείται από τα υδατοδιαλυτά και τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Τα υδατοδιαλυτά περιλαμβάνουν την ανοιγμένη γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ και το ουρικό οξύ . Τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν τη βιταμίνη E, τις ουβικινόνες και τα καροτενοειδή. Πολλοί υδροξυκινναμωμικών οξέων μαζί με προϊόντα σύζευξης αυτών έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται τόσο στο δέρμα όσο και στο πολτό της ντομάτας. Αυτά τα φαινορικά είναι κυρίως παρόν ως οικογένεια των εστέρων που σχηματίζονται μεταξύ ορισμένων υδροξυκινναμωμικών οξέων και κυνικού οξέος. Αυτοί οι εστέρες είναι μερικές φορές συλλογικά γνωστά ως χλωρογενικό οξέα,(Clifford,1985). επιπλέον ίχνη βανιλλικού και σαλικυλικού οξέος βρέθηκαν στην κόκκινη τομάτα.

- Η ανοιγμένη γλουταθειόνη δρα σαν αναγωγικός παράγοντας μετατρέποντας τις δισουλφιδρικές ομάδες σε θιόλες. Επίσης, αποτελεί υπόστρωμα για την υπεροξειδάση και την τρανσφεράση της γλουταθειόνης.
- Το ασκορβικό οξύ είναι ένας αναγωγικός παράγοντας ικανός να προστατεύσει τα κύτταρα από ισχυρά οξειδωτικά. Σε διάφορες μελέτες έχει δειχθεί ότι το ασκορβικό

οξύ αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των ελευθέρων ριζών στο υδατοδιαλυτό μέρος. Οι τομάτες περιέχουν υψηλά επίπεδα της βιταμίνης C και μάλιστα αυτή και τα προϊόντα της είναι η τρίτη σημαντικότερη πηγή αυτής της βιταμίνης σε πολλές χώρες του κόσμου, μετά τις πατάτες και τα εσπεριδοειδή. Η κατανάλωση 2 ντοματών είναι ικανή να καλύψει κατά το ήμισυ την ημερήσια ανάγκη του ανθρώπινου οργανισμού στη βιταμίνη αυτή (Pantos, C.E. and Markakis, P., 1973).

- Το ουρικό οξύ και τα καροτενοειδή συμπεριφέρονται ως «καθαριστές των ριζών», το ίδιο και η βιταμίνη E και οι ουβικινόνες οι οποίες υπάρχουν κυρίως στις μεμβράνες.

2.3 Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμός ελεύθερων ριζών.

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς και ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Αρχικά δημιουργείται με κάποιο τρόπο μία ελεύθερη ρίζα (έναρξη). Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξειδωσης είναι τα υδρουπεροξειδία. Αυτά στην συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδρουπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου (διάδοση). Με τον τρόπο αυτό οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές αναγεννώντας συνέχεια νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η αντίδραση θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες. Η Αλληλουχία των αντιδράσεων μπορεί να παραταθεί ως εξής:

Έναρξη: $R\bullet$

(ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση: $R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$

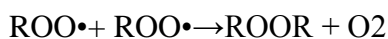
(ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO\bullet + RH \rightarrow ROOH + R\bullet$

$ROOH + RH \rightarrow RO\bullet$

Τερματισμός: $R\bullet + R\bullet \rightarrow R-R$

$ROO\bullet + R\bullet \rightarrow ROOR$



Τα τελευταία είναι αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης. Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι αρωματικές ενώσεις, που διαθέτουν μια τουλάχιστον ελεύθερη υδροξυλική ή αμινική ομάδα. Οι σημαντικότερες ενώσεις που προστίθενται στα τρόφιμα ανήκουν στις πολυκυκλικές φαινόλες με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Μπόσκος, 1997). Γενικά η τάξη των αντιοξειδωτικών των τροφίμων περιέχει τις ενώσεις εκείνες που εμποδίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, που σχετίζονται με την οξείδωση των λιπιδίων.

2.3.1 Κατάταξη αντιοξειδωτικών

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

- Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά:

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων 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), ηΤΒΗQ (δι-τριπ-βουτυλουδροκινόνη), οΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φυσικές και συνθετικές τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά. (Γάλαρης 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 χηλικά σύμπλοκα (συνεργιστικές ενώσεις). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως αυτά του χαλκού και του

σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύουν σωματίδια που δρουν ως εκκινητές της οξειδωσης. Παραδείγματα αποτελούν το κιτρικό οξύ, τα αμινοξέα, το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), κ.ά. Ωστόσο για να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική τους δράση, πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό (Roberfroid and 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 φαινοξυ-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 διεγερμένου (singlet) οξυγόνου, οι οποίοι απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο. Εδώ ανήκουν οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο.

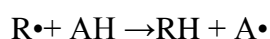
5. Ένζυμα. Αυτά δρουν είτε απομακρύνοντας το εν διαλύσει οξυγόνο, είτε απομακρύνοντας συστατικά του τροφίμου που είναι ευοξειδωτα. Παραδείγματα για την κατηγορία αυτή αποτελούν αντίστοιχα η οξειδάση της γλυκόζης, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Roberfroid and Calderon,1990).

6. Η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια.

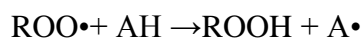
7. Τέλος σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση. Τέτοια είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard (Μπόσκος, 1997).

2.3.2 Η δράση των αντιοξειδωτικών

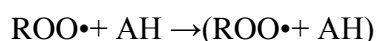
Η δράση των αντιοξειδωτικών στηρίζεται στην απομάκρυνση ή την εξουδετέρωση των ROO• και R• ελεύθερων ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις στη πλήρη αναστολή της οξειδωσης (στα σουλφονικά, στη διάσπαση από τα υπεροξειδία). Επειδή τα περισσότερα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών ROO• και R•, με τη δημιουργία μιας ανενεργού και αντιοξειδωτικής ελεύθερης ρίζας (Roberfroid and Calderon 1990). Η απενεργοποίηση και η αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας συντελεί στην άρση της αλυσιδωτής αντίδρασης και στην παραγωγή σταθερών προϊόντων, μέσω διμερισμού. Η άμεση αντίδραση του αντιοξειδωτικού(AH) μ' ένα υπόστρωμα ελεύθερης ρίζας R, δίνεται από την αντίδραση:



Και φαίνεται να μην έχει την παραμικρή σχέση με την αντίδραση του αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα ενός υπεροξειδίου ROO:



Με τον ίδιο μηχανισμό δημιουργείται και ένα σύμπλοκο μεταξύ του μορίου του αντιοξειδωτικού και της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου:



Που μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες και να οδηγήσει στην αναστολή της οξειδωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις (μερική πίεση ατμοσφαιρικού οξυγόνου-θερμοκρασία δωματίου) διασπάται η αλυσίδα της ελεύθερης ρίζας και έχουμε σύγκρουση δύο ελεύθερων υπεροξειδικών ριζών:



Επιγραμματικά αποδεικνύεται, πως όλοι οι αναστολείς της οξειδωσης πρέπει αφενός να είναι ενεργοί, ώστε να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες και να διασπάσουν την αλυσίδα και αφετέρου μεταφορικά ενεργά, για να αποφευχθεί η άμεση αντίδραση του οξυγόνου με την ανταλλασσόμενη ελεύθερη ρίζα. Η μεγάλη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, σε

συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις κατά τη φάση της διάδοσης, μπορεί για παράδειγμα να οδηγήσει στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ως μεταφορέων και κατά συνέπεια στη δράση τους ως προοξειδωτικών. Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθιστούν ολοφάνερο πως η προσθήκη των αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται πολύ πριν από το στάδιο της προαγωγής (διάδοση). Αν όμως στο υπόστρωμα αυξηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, τότε το προστιθέμενο αντιοξειδωτικό ανταποκρίνεται γρήγορα και θα καταναλωθεί, οπότε είναι πλέον αδύνατο να επιβραδυνθεί με παρεμβολή η πρόοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης (Μπόσκος, 1997).

2.3.3 Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών

Λόγω της αντιοξειδωτικής αυτής τους δράσης, τα τελευταία χρόνια οι πολυφαινόλες έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι ενώσεις αυτές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνος, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως «δεσμευτές» ελευθέρων ριζών.

Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν και αναστέλλουν την οξείδωση μέσω ελευθέρων ριζών με 3 τρόπους:

(α) Αντιδρούν και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό. Έτσι, καθίστανται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, που είναι όμως πολύ σταθερές λόγω της πολυφαινολικής δομής που μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά.

(β) Δρουν ως δεσμευτές μεταλλικών ιόντων τα οποία ξεκινούν τη διαδικασία της οξείδωσης, μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου.

(γ) Αναγεννούν ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά του οργανισμού, τη βιταμίνη Ε.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών εξαρτάται πολύ από τη δομή της πολυφαινόλης. Αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν οι ortho- και para- διφαινολικές ενώσεις, ενώ η φαινόλη είναι αδρανής ως αντιοξειδωτικό. Τα φλαβονοειδή θεωρούνται

πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά και αυτό συμβαίνει διότι διαθέτουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά χαρακτηριστικά:

- δομή ortho-κατεχόλης (ortho-διφαινολική ομάδα στο Β δακτύλιο)
- 2-3 συζυγιακός διπλός δεσμός με 4-οξο λειτουργική ομάδα
- ομάδες υδροξυλίου σε θέσεις 3, 5.

Ένα φλαβονοειδή που συγκεντρώνει και τα 3 από τα πιο πάνω χαρακτηριστικά είναι η κερκετίνη και θεωρείται ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά.

Συγχρόνως, η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών εντείνεται με την αύξηση του βαθμού υδροξυλίωσης και μειώνεται με την αύξηση του βαθμού γλυκοζυλίωσης.

Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης αντιθρομβωτικό και αγγειοπροστατευτικό ρόλο και υπολιπιδαιμική δράση (Α. Χίου, 2007).

2.4 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στη φύση. Αυτά είναι:

- τα φυτοχημικά,
- οι βιταμίνες και
- τα ένζυμα.

Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά έχουν βρεθεί σε φυτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυτά είναι εκτεθειμένα στην υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας.

Επειδή τα φυτά δημιουργούν ένα μεγάλο αριθμό από ελεύθερες ρίζες, έχουν αποκτήσει ένα φυσικό σύστημα προστασίας ενάντια σε αυτές διότι είναι υπεύθυνες για σοβαρές κυτταρικές βλάβες που μπορούν να οδηγήσουν το φυτό ακόμα και σε θάνατο. Αυτή η προστασία προέρχεται από φυσικώς ενυπάρχοντα αντιοξειδωτικά.

2.4.1 Αντιοξειδωτικά φυτοχημικά

Τα φυτοχημικά είναι αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται φυσικά από τα φυτά για τα προστατευτούν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνθρωποι που περιλαμβάνουν στη δίαιτα τους πηγές φυτοχημικών έχουν επωφεληθεί από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτών. Τα φυτοχημικά περιλαμβάνουν τις εξής κατηγορίες:

- Καροτενοειδή
- Αλληλοσουλφίδια
- Πολυφαινόλες

Τα περισσότερα φυσικά ολόκληρα τρόφιμα, όπως τα δημητριακά ολικής αλέσεως, τα φρούτα και τα λαχανικά, περιέχουν φυτοχημικά, ενώ τα μεταποιημένα ή εξευγενισμένα τρόφιμα περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες ή και καθόλου φυτοχημικά.

2.4.2 Αντιοξειδωτικές βιταμίνες

Ο άνθρωπος δεν παράγει αντιοξειδωτικές βιταμίνες φυσικά, έτσι είναι σημαντικό να περιλαμβάνονται διατροφικές πηγές αυτών στην καθημερινή πρόσληψη τροφής, είτε μέσω τροφίμων είτε με συμπληρώματα. Οι κοινές αντιοξειδωτικές βιταμίνες περιλαμβάνουν τις βιταμίνες A, C, E, και φολικό οξύ.

- Η βιταμίνη A είναι ιδιαίτερα σημαντική για την βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, την υγεία των ματιών, την επισκευή των ιστών και τα επίπεδα της χοληστερόλης.
- Η βιταμίνη C βοηθάει στην προστασία του δέρματος από τις βλάβες που μπορεί να προκαλέσει η υπεριώδης ακτινοβολία, προωθεί την καλύτερη απορρόφηση του σιδήρου, παρέχει μεγαλύτερη αντίσταση στις μολύνσεις και βοηθά στην ρύθμιση της χοληστερόλης στο αίμα.

- Η βιταμίνη E είναι σημαντική για την διατήρηση υγιών αιμοφόρων αγγείων, τη βελτίωση των συνθηκών του δέρματος.
- Το φολικό οξύ είναι σημαντικό για τις γυναίκες που βρίσκονται σε ώριμη αναπαραγωγική ηλικία, ιδιαίτερα στην πρόσληψη της ανάπτυξης του νευρικού σωλήνα του εμβρύου.
- Το συνένζυμο Q10 (CoQ10) το οποίο μοιάζει με βιταμίνη, παράγεται από τον οργανισμό μας και έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα απαραίτητο συστατικό στη βασική λειτουργία των κυττάρων. Η παραγωγή της ουσίας αυτής μειώνεται φυσικά καθώς γερνάμε και η μείωση της έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών και καταστάσεων που σχετίζονται με την ηλικία (Yilmaz E, 2001).

2.4.3 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες και από μέταλλα, προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο σαν μέρος της καθημερινής διαίτας.

Τα ένζυμα αυτά παράγονται από το ανθρώπινο σώμα και είναι τα εξής:

- δισμουτάση του σουπεροξειδίου, που μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 .
- καταλάση, που μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και οξυγόνο.
- υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) κι επίσης ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό ενώ η ίδια μετατρέπεται σε οξειδωμένη μορφή και
- τρανσφεράση της γλουταθειόνης, που επίσης ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH).

Προκειμένου τα αντιοξειδωτικά ένζυμα να παρέχουν την βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση, περιλαμβάνουν συμπαράγοντες, όπως: ο σίδηρος Fe, ο χαλκός Cu, το σελήνιο Se, το μαγνήσιο Mg και ο ψευδάργυρος Zn.

Η ποιότητα της πηγής των ενζύμων αυτών έχει ένα αντίκτυπο στην ποιότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

2.5 Τα αντιοξειδωτικά της ντομάτας

Η τομάτα έχει αναγνωριστεί ως η πιο σημαντική πηγή λυκοπενίου, ενός κόκκινου χρώματος καροτενοειδούς που σχετίζεται με πολλά οφέλη για την υγεία. Εκτός από το λυκοπένιο, η ντομάτα περιέχει έναν αριθμό πολυφαινόλων. Στις πολυφαινόλες ανήκουν τα φλαβονοειδή, όπως είναι η νερατζινίνη η κερκετίνη και η ρουτίνη, και φαινολικά οξέα όπου γίνεται αναφορά στην ύπαρξη φερουλικού, το καφεϊκού και χλωρογενικού οξέος (Walker , 1962), καθώς επίσης και τα στυλβένια και οι λιγνάνες (Παπαγεωργίου, 2005), που μπορούν να συμβάλουν σε μια υγιεινή διατροφή.

Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε όλα τα χερσαία φυτά καθώς και σε όλα τα όργανα των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των ανθών, των καρπών, των φύλλων, του στελέχους και της ρίζας. Η κατανομή λαμβάνοντας υπόψη την δομική ποικιλομορφία και τις ποσότητες μπορεί να ποικίλει σημαντικά μέσα στο φυτό.

2.5.1 Φαινολικές ενώσεις (πολυφαινόλες)

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα τα φυτά, αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του και είναι απαραίτητα συστατικά της φυσιολογίας τους, καθώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στην παραγωγή τους και στη μορφολογία τους. επίσης παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι των παθογόνων οργανισμών και μερικές φορές έναντι των φυτοφάγων ζώων, καθώς τα κάνουν στυφά και σκληρά. Μπορεί να καθορίσουν το χρώμα των φυτών (π.χ. οι ανθοκυανίνες είναι κόκκινες, μπλε ή μοβ), ωστόσο, δεν είναι όλες χρωματισμένες. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες π.χ. η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και των ποτών φυτικής προέλευσης οφείλονται ως ένα βαθμό στις πολυφαινόλες. Η οξείδωση των πολυφαινόλων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης έχει σαν αποτέλεσμα είτε επιθυμητά (για παράδειγμα η καφέ χρώση του κακάο κατά την επεξεργασία) είτε ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά στα τρόφιμα (όπως ο σχηματισμός ανεπιθύμητου χρώματος και γεύσης σε φρούτα και λαχανικά).

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι μία πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τις λιγνάνες (Παπαγεωργίου, 2005). Οι τρεις πρώτες από τις ομάδες αυτές είναι παρούσες σε σημαντική ποσότητα στις τομάτες.

Η δομή τους ποικίλει και έτσι μπορούμε να συναντήσουμε απλές φαινολικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα με έναν ανθρακικό σκελετό 6 ατόμων άνθρακα, μέχρι σύνθετες φαινολικές ενώσεις αποτελούμενες από πολυμερισμένα μόρια όπως είναι οι τανίνες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στον φαινολικό δακτύλιο και ανάλογα με την δομή του ανθρακικού σκελετού κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή, στα στιλβένια και τις λιγνάνες (Manach et al., 2004).

2.5.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή συνιστούν μια ομάδα έγχρωμων, πολυακόρεστων και λιπόφιλων φυτικών χρωστικών στα οποία οφείλουν πολλά φρούτα και λαχανικά το έντονο κόκκινο, κίτρινο η πορτοκαλί χρώμα τους (Amstrong and Hearst, 1996). Δεν συντίθενται στον οργανισμό ανθρώπων και ζώων αλλά λαμβάνονται με τη διατροφική κατανάλωση φρούτων η λαχανικών. Στους ζωικούς ιστούς εντοπίζονται κυρίως ως βιταμίνη Α, που έχει τα καροτενοειδή ως πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεσή της στο σώμα.

Στα φυσικά προϊόντα το πιο κοινό καροτενοειδές είναι η κίτρινη-πορτοκαλί χρωστική ουσία του καρότου (carota Daucus), το β-καροτένιο. Από χημική άποψη τα καροτενοειδή ανήκουν στα ισοπρενοειδή και στα λιποειδή. Είναι πολυτερπένια με 40 άτομα άνθρακα και 8 ισοπρενοειδείς ομάδες. Ανήκουν επίσης στα πολυένια δηλαδή έχουν μια σειρά από εναλλασσόμενους απλούς και διπλούς δεσμούς που ονομάζονται συζυγιοκοί. Το πλήθος των συζυγιοκικών δεσμών για τα διάφορα καροτένια κυμαίνεται από 3 έως 15. Το πλήθος αυτό καθορίζει και τις οπτικές ιδιότητες του κάθε καροτενοειδούς, που τυπικά απορροφά φως με μήκος κύματος 400 έως 500 nm, κι έτσι τελικά εμφανίζεται με χρώμα κόκκινο, κίτρινο η πορτοκαλί 50 (Saija et al., 1995).

Η χημική τους δομή διαφέρει με πολλούς τρόπους που τελικά εκτός από το χρώμα επηρεάζουν επίσης και τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Η αποτελούμενη

από 40 άτομα άνθρακα πολυενική αλυσίδα, η οποία θα μπορούσε να θεωρηθεί η ραχοκοκαλιά του μορίου, μπορεί να καταλήγει σε κυκλικές ομάδες τερματισμού (ιονονικοί δακτύλιοι) και μπορεί να συμπληρωθεί με το οξυγόνο που περιέχει λειτουργικές ομάδες. Τα καροτενοειδή υπάρχουν και στις δύο trans- και cis- μορφές ισομερών. Η trans- μορφή μπορεί να μετατραπεί στις cis- μορφές από την έκθεση στο φως, τη θερμότητα, ή από κάποια χημική αντίδραση.

Τα καροτενοειδή κατατάσσονται σε δύο ομάδες, ανάλογα με την η απουσία ή την παρουσία οξυγόνου πέρα από το υδρογόνο και άνθρακα, σε:

- α) υδρογονάνθρακες, που ονομάζονται καροτένια, και
- β) υδροξυλιωμένα παράγωγα, τις ξανθοφύλλες

Τα καροτένια είναι τα καροτενοειδή που ανήκουν στην τάξη των υδρογονανθράκων Με 11-13 συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Το β-καροτένιο αποτελείται από μια πολυενική αλυσίδα με εννιά trans- (E) διπλούς δεσμούς, στα άκρα της οποίας συνδέονται δύο β-ιονονικοί δακτύλιοι. Με οξειδωτική σχάση του διπλού δεσμού μεταξύ C9 και C10 το β-καροτένιο μετατρέπεται σε δύο μόρια μιας αλδεΐδης, της ρετινάλης. Ισομερή με το β-καροτένιο είναι το α-καροτένιο, με το διπλό δεσμό του ενός δακτυλίου σε Θέση 3', 4', το γ-καροτένιο, με τον ένα δακτύλιο διανοιγμένο μεταξύ C1' και C2' και με δύο διπλούς δεσμούς στις θέσεις 2', 3' και 6', 1' και το λυκοπένιο, η χρωστική της τομάτας, με διανοιγμένους και τους δύο δακτυλίους. Χαρακτηριστικό του λυκοπενίου και του β-καροτένιου είναι ότι τα μόριά τους είναι συμμετρικά. Το β-καροτένιο απαντά μερικές φορές στη φύση καθαρό, συνήθως όμως συνοδεύεται από τα καροτένια α και γ (Saija et al., 1995)

Τα κύρια καροτενοειδή που περιέχονται στην τομάτα είναι το φυτοένιο, φυτοφλουένιο και λυκοπένιο. Το λυκοπένιο, στο οποίο οφείλεται το κόκκινο χρώμα της τομάτας, είναι το κύριο καροτενοειδές, ενώ σε μικρότερες ποσότητες περιέχονται αλλά καροτενοειδή όπως β-καροτένιο, γ-καροτένιο, ζ-καροτένιο, νευροσπορένιο και λουτεΐνη. Επίσης περιέχονται τα άχρωμα προκαροτενοειδή φυτοένιο και φυτοφλουένιο (Khachik, 2002).

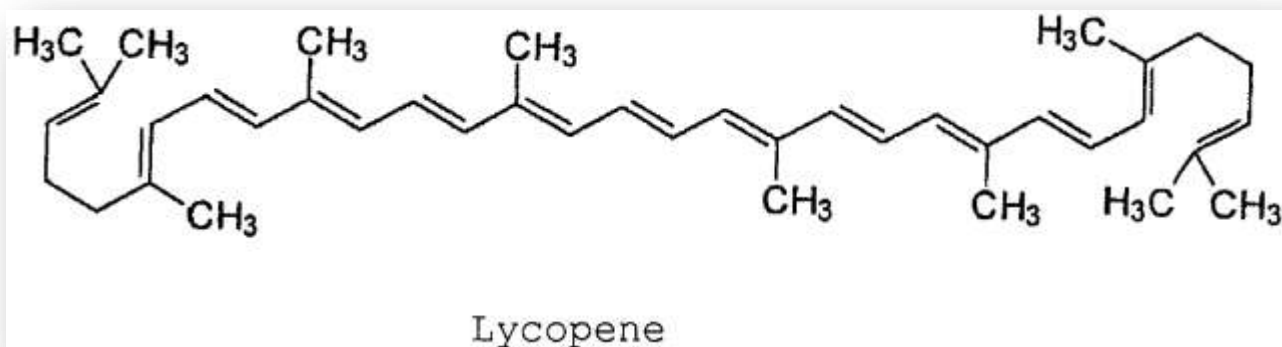
2.5.3 Λυκοπένιο

Το λυκοπένιο είναι μία χρωστική ουσία που δημιουργεί το κόκκινο χρώμα στις ώριμες ντομάτες αλλά και σε άλλα φρούτα. Θεωρείται το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό με προστατευτική δράση ειδικά έναντι του καρκίνου του προστάτη, αλλά και σε άλλες κακοήθειες.

Σύμφωνα με την οργανική χημεία, είναι ένα άκυκλο ισομερές της β-καροτίνης, ένας πολύ ακόρεστος υδρογονάνθρακας ανοικτής αλυσίδας που περιέχει 11 συζευγμένους και 2 μη συζευγμένους διπλούς δεσμούς, όπως φαίνεται παρακάτω στην εικόνα. Από τις φυσικές φυτικές πηγές του, υπάρχει κυρίως σε μια trans διαμόρφωση. Όπως και τα άλλα καροτενοειδή είναι η θερμοδυναμικά σταθερότερη μορφή.



Σχήμα 2.1.: Χημικός τύπος Λυκοπενίου



Σχήμα 1.2. : Τρισδιάστατη αναπαράσταση του λυκοπενίου

2.5.4 Φλαβονοειδή

Από τις σημαντικότερες κατηγορίες είναι αυτή των φλαβονοειδών, με σκελετό C6-C3-C6, η οποία διακρίνεται περαιτέρω σε 13 υποομάδες. Αυτές είναι οι χαλκόνες, οι διϋδροχαλκόνες, οι χρυσόνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι διϋδροφλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι φλαβανόλες, οι ανθοκυανιδίνες, τα ισοφλαβονοειδή και τέλος τα διφλαβονοειδή, οι προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες. Τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν την πιο κοινή και ευρέως διαδεδομένη ομάδα φαινολικών παραγώγων των φυτών. Το σύνολο των φλαβονοειδών φθάνει σε αριθμό τα 5000 μέλη.

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται δυνητικά χρήσιμες ενώσεις, με πιθανές δράσεις κατά της φλεγμονής, των καρδιαγγειακών νοσημάτων και τον καρκίνο. Τα φλαβονοειδή που κατά κύριο λόγο περιέχονται στην τομάτα είναι οι φλαβονόλες και οι φλαβονόνες.

Η ναριγκενίνη (4',5,7-τριυδροξυφλαβονόνη) είναι, όχι απλώς ο βασικός εκπρόσωπος των φλαβονονών στην τομάτα, αλλά και η κύρια ένωση μεταξύ του συνόλου των πολυφαινολών, ιδίως στο φλοιό όπου και εκπροσωπεί πάνω από το 50 % του συνόλου. Άλλη σημαντική πηγή της είναι τα εσπεριδοειδή. Στα εσπεριδοειδή η ναριγκενίνη εμφανίζεται ως γλυκοζίτης, ενώ στην τομάτα εντοπίζεται κυρίως στο φλοιό ως αγκλυκόνη. Παρά το γεγονός ότι πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η ναριγκενίνη είναι παρούσα στην τομάτα σε ελεύθερη μορφή, κάποιες άλλες δείχνουν ότι ο γλυκοζίτης της

ναριγκενίνης είναι επίσης παρών. Έχει αναφερθεί ακόμα η παρουσία της χαλκοναριγκενίνης (Ruh et al., 1995).

Η άλλη ομάδα φλαβονοειδών που εντοπίζονται σε μεγάλα ποσά στην ντομάτα είναι οι φλαβονόλες. Η κύρια φλαβονόλη στις τομάτες είναι ο γλυκοζίτης της κερκετίνης που έχει πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την α-τοκοφερόλη.

Μαζί με τη συνεχή βελτίωση των μεθόδων και οργάνων για την απομόνωση και τον καθορισμό των φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών ενώσεων, δομικές πληροφορίες, με αυξημένο επίπεδο ακρίβειας έχουν γίνει διαθέσιμες για έναν μεγάλο αριθμό των τέτοιων ενώσεων.

Μεταξύ των 13 διαφορετικών κύριων τάξεων των φλαβονοειδών, ενώσεις που ανήκουν στις διυδροχαλκόνες, στις χαλκόνες, στις φλαβανόνες και στις φλαβονόλες έχουν αναφερθεί από μη διαγονιδιακές ντομάτες.

Στην παρούσα ανασκόπηση, παρουσιάζεται μια συλλογή των φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών ενώσεων που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα από διαφορετικές ποικιλίες ντομάτας. Παραλλαγμένες ποικιλίες συχνά παραμελούνται σε μελέτες, και αυτό, συνδέεται με το γεγονός ότι τα

Η ιστορία της ανάλυσης των φλαβονοειδών στις ντομάτες ξεκινά το 1933, όταν ο Euler και οι συνεργάτες του πρωτομελέτησαν το εσωτερικό της ντομάτας.

Βρέθηκε ότι ένα κίτρινο φλαβονοειδές το οποίο είναι αδιάλυτο στο δισουλφίδιο, αλλά διαλυτό σε αλκαλικά. Ωστόσο, εκείνη την εποχή δεν επιχειρήθηκε περαιτέρω ταυτοποίηση.

Η ρουτίνη είχε προηγουμένως απομονωθεί από τα φύλλα του φυτού ντομάτας και αργότερα από την επιδερμίδα του στελέχους της ντομάτας. Ο Ewart είχε νωρίτερα σημειώσει ότι μια χρωστική ουσία που απέκτησε από φύλλα τομάτας φάνηκε να είναι παρόμοια ή πανομοιότυπη με κιτρινίνη, αλλά προφανώς δεν έγινε καμία προσπάθεια ταυτοποίησης. Η κιτρινίνη, μια κίτρινη τοξίνη των μυκήτων, που αρχικά απομονώθηκε από *Penicillium citrinum*, δεν έχει ανιχνευθεί σε ντομάτες.

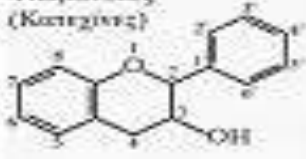
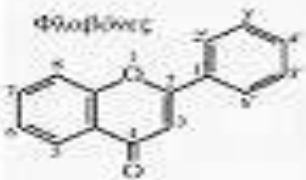
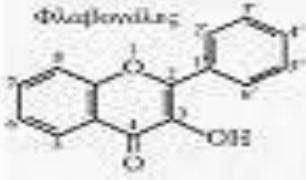
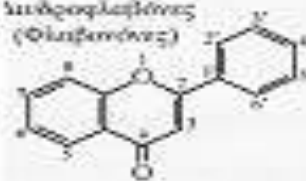
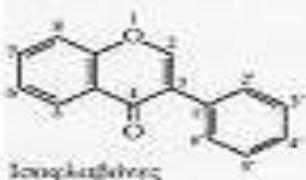
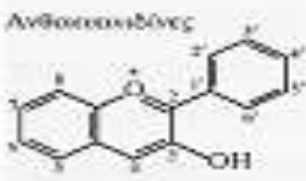
Οι Piringer και Heinze ανέφεραν ότι το φως είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη ενός μη χαρακτηρισμένο φλαβονοειδούς στην επιδερμίδα του καρπού της ποικιλίας Rutgers. Από τους καρπούς των τριών ποικιλιών τομάτας - Ponderosa, Rutgers και SunnyRay (yellowfleshed) – απομονώθηκαν δύο φλαβονοειδή για πρώτη φορά (1958) και χαρακτηρίστηκαν ως νεραντζινίνη και κερκετίνη, με βάση τα υπολογιζόμενα μοριακά βάρη, τα σημεία τήξης και τα ευρετήρια διάθλασης σε σύγκριση με αυθεντικά δείγματα. Κανένα φλαβονοειδές δεν ανιχνεύθηκε από τον βλαστό της τομάτας. Τα φύλλα από δύο από τις ποικιλίες αναφέρθηκαν περιέχουν κερκετίνη και ρουτίνη, ενώ η ποικιλία Rutgers περιείχε μόνο κερκετίνη.

φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις σχετίζονται τον τελευταίο καιρό με ωφέλιμες ενώσεις για την υγεία (Andersen ØM and Markham K, 2006).

Η εμφάνιση της ρουτίνης σε κονσερβοποιημένους πολτούς ντομάτας περιγράφηκε το 1968. Αυτή η ένωση έχει βρεθεί να είναι η κύρια φλαβονοειδής ένωση σε ώριμες τομάτες στις περισσότερες από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν.

Σε ώριμες τομάτες από την ίδια ποικιλία αναφέρθηκε και η ύπαρξη των ουσιών: κερκετίνη και ενός άλλου τριγλυκοσιδίου της κερκετίνης. Επίσης, μια ιχνοποσότητα ενός μη χαρακτηρισμένου παράγωγου της κερκετίνης ανιχνεύτηκε μαζί με τέσσερα παράγωγα καμφερόλης. Οι δομές τους χαρακτηρίζονται ως ανάλογες προς τις τέσσερις ενώσεις κερκετίνης, τριγλυκοσιδίου της κερκετίνης και ένα μη χαρακτηρισμένο γλυκοζίτη της καμφερόλης (Andersen ØM and Markham K, 2006).

Οι καλλιεργητές γνωρίζουν ότι η καλύτερη πηγή για τη βελτίωση του φυτού σοδειάς είναι συχνά τα άγρια είδη. Τα άγρια είδη διατηρούν ποικιλομορφία αλληλομορφών (γνωρισμάτων), τα οποία χάνονται κατά τη διάρκεια της εξημέρωσης και της καλλιέργειας. Μέχρι σήμερα, άγρια είδη ντομάτας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βελτίωση της αντίστασης στις ασθένειες της τομάτας, αλλά δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά για τα χαρακτηριστικά που αφορούν την υγεία.

Γενική δομή	Φλαβονοειδές	Υποκαταστάτες
<p>Φλαβανόλες (Κατεχίνες)</p> 	<p>(+)-Κατεχίνη (-)-Επικατεχίνη 3-Γαλλοϋλο-επικατεχίνη</p>	<p>3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-γαλλικό</p>
<p>Φλοβόνες</p> 	<p>Χρυσίνη Απιγενίνη Λουτεολίνη 4',7-διγλυκοσίδιο-λουτεολίνης</p>	<p>5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-OH 5,4'-OH, 4',7-γλυκόζη</p>
<p>Φλαβονόλες</p> 	<p>Καμφερόλη Κερκετίνη Μυρικετίνη Ταμαριξετίνη</p>	<p>3,5,7,4',-OH 3,5,7,3', 4',-OH 3,5,7,3', 4',5',-OH 3,5,7,3',-OH, 4'-OCH₃</p>
<p>Λιθρανοφλαβόνες (Φλαβονόλες)</p> 	<p>Ναρινγενίνη Ναρινγίνη Ταξιφολίνη Εσπεριδίνη</p>	<p>5,7,4'-OH 5, 4'-OH, 7-ραμνογλυκόζη 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH</p>
<p>Ισοαυλαβόνες</p> 	<p>Γενιστίνη Γενιστεΐνη Δαϊδζίνη Δαϊδζεΐνη</p>	<p>5,4'-OH, 7-γλυκόζη 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-γλυκόζη 7,4'-OH</p>
<p>Ανθοκυανιδόνες</p> 	<p>Απιγενιδίνη Κυανιδίνη</p>	<p>5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH, 3,5-OCH₃</p>

Σχήμα 2.3. Δομή των φλαβονοειδών. (Heim et al., 2002).


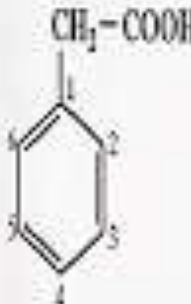
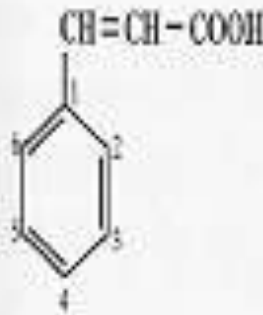
2.5.5 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την δεύτερη πιο διαδεδομένη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, τα οποία ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα (Manach et al., 2004). Στην τάξη αυτή ανήκουν τα υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, τα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωνικού οξέος. Κυριότερος αντιπρόσωπος των παραγώγων αυτών είναι το καφεϊκό οξύ, που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με την 5-OH του κινικού οξέος και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ (Παπαγεωργίου, 2005). Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπτικό οξύ (Manach et al., 2004). Στο Σχήμα 2.4. δίνεται η δομή των φαινολικών οξέων (Παπαγεωργίου, 2005).

Μια σειρά από φαινολικά οξέα περιέχονται στη ντομάτα, με κυριότερα το κα-φεϊκό και το χλωρογενικό (Minoggio M et al., 2003). Άλλα φαινολικά οξέα όπως κουμαρικό, φερουλικό, σιναπικό, βανιλικό και σαλικυλικό υπάρχουν σε μικρότερα ποσά στην τομάτα (Davies J.N and Hobson G.E., 1981). Οι διάφορες ποικιλίες τομάτας μπορεί να διαφέρουν στα επίπεδα και στη σύνθεση σε φαινολικά οξέα.

Πολλά υδροξυκινναμωμικά οξέα μαζί με τα προϊόντα σύζευξής τους έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται τόσο στο έρμα όσο και στον πολτό της τομάτας. Αυτά τα φαινολικά ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των εστέρων που σχηματίζεται μεταξύ ορισμένων υδροκινναμωμικών οξέων και κινικού οξέος. Αυτοί οι εστέρες είναι συλλογικά γνωστά ως χλωρογενικό οξύ (Clifford, 1985).

Τα χλωρογενικά οξέα και σχετικές ενώσεις με τα οξέα αυτά είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις πέρα από τα φλαβονοειδή στις ντομάτες. Τα χλωρογενικά οξέα έχουν μια σειρά από ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία όχι μόνο επειδή δρουν ως αντιοξειδωτικά, αλλά δρουν και ως ηπατοπροστατευτικά, υπογλυκαιμικά και με αντιϊκή δράση. Αυτά τα οξέα μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνα για μια κάπως στυφή γεύση.

Γενική δομή	Υδροξύ-παράγωγα	Υποκαταστάτης
 <p>Βενζοϊκό οξύ</p>	<p>Υδροξυβενζοϊκό οξύ Βανιλϊκό οξύ Συρενγικό οξύ Πρωτοκατεχικό οξύ Γαϊλϊκό οξύ</p>	<p>4-OH 4-OH, 3-OCH₃ 4-OH, 3,5-OCH₃ 3,4-OH 3,4,5-OH</p>
 <p>Φαινυλοξικό οξύ</p>	<p>π-Υδροξυφαινοξικό οξύ Ομοβανιλϊκό οξύ</p>	<p>4-OH 4-OH, 3-OCH₃</p>
 <p>Κινναμϊκό οξύ</p>	<p>ο-Κουμαρϊκό οξύ π-Κουμαρϊκό οξύ Καρεϊκό οξύ Φερουϊκό οξύ Σινναπϊκό οξύ Χλωρογενϊκό οξύ Ροσμαραρινϊκό οξύ</p>	<p>2-OH 4-OH 3,4-OH 4-OH, 3-OCH₃ 4-OH, 3,5-OCH₃ Εστέρας του καρεϊκού με κινϊκό οξύ Διμερές του καρεϊκού οξέος</p>

Σχήμα 2. 4. : Δομή των φαινολικών οξέων. (Παπαγεωργίου, 2005).

2.6 Οφέλη αντιοξειδωτικών στην υγεία

Η γενική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός οργανισμού εξαρτάται από τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο αίμα.

Υπό διερεύνηση όμως είναι το κατά πόσο τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της νόσου ή αν είναι ένα από τα αποτελέσματα αυτής. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών στο αίμα ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων εκφυλιστικών νόσων. Λόγω του ότι οι διάφορες τροφές μπορούν να περιέχουν ένα μεγάλο συνδυασμό αντιοξειδωτικών ουσιών με διαφορετικό αντιοξειδωτικό δυναμικό η κάθε μία η λήψη τους κατά τη διατροφή επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα (Berry OttawayP.,2001).

Είναι γνωστό ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά απαιτούν εκτεταμένες και δαπανηρές δοκιμές για να διαπιστωθεί η ασφάλειά τους για την πιθανή χρήση ως συμπληρώματα διατροφής, και για το λόγο αυτό, υπάρχει ενδιαφέρον για τη χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών (Berry OttawayP.,2001).

2.6.1 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία

Οι πολυφαινόλες παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμέ-νων μορφών καρκίνου κι επιπλέον παρουσιάζουν κι άλλες δράσεις, πολλές από τις οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία (Hertog MGL et all., 1995).

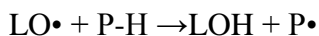
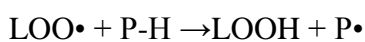
Οι κυριότερες δράσεις των πολυφαινολών συνοψίζονται παρακάτω:

- Επιδρούν στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να καταβυθίζουν πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη δράση είναι πιο έντονη σε πολυφαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό υδροξυλίωσης.
- Παρεμποδίζουν την απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al που συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

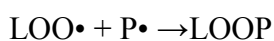
- Μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα
- Προστατεύουν τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος
- Παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση
- Παρουσιάζουν αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση.
- Έχουν αντιαλλεργικές ιδιότητες καθώς μπορούν να εμποδίσουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μάλιστα ο μηχανισμός δράσης τους διαφέρει ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκουν.
- Παρουσιάζουν αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO.
- Προστατεύουν το DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές.

Οι πολυφαινόλες διακόπτουν η αναστέλλουν την οξειδωση μέσω ελευθέρων ριζών είτε γιατί αντιδρούν μαζί τους και τις εξουδετερώνουν, είτε γιατί δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα, τα οποία πολύ συχνά είναι οι εκκινητές μίας οξειδωσης και δη-μιουργούν χηλικό σύμπλοκο, είτε τέλος γιατί αναγεννούν τη βιταμίνη E, ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού.

Μπορούν να δράσουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές των αλυσωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (P-H) είναι άριστοι δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου σε ρίζες λιπιδίων (LOO•, LO•) σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση (Sahidi F and Wanasundara J, 1992):.



Το αποτέλεσμα των παραπάνω αντιδράσεων είναι οι πολυφαινόλες να απενεργοποιούν τις ρίζες μετατρέπόμενες οι ίδιες σε ρίζες. Παρ' όλα αυτά φαινοξυ-ρίζες (P•) που σχηματίζονται έχουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα λόγω της πολυφαινολικής δομής, η οποία μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά. Τα ενδιάμεσα της φαινοξυρίζας έχουν τη δυνατότητα να τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:



Με τον παραπάνω μηχανισμό δράσης οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να προστατέψουν τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως της LDL και τα λιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών από οξειδωση, γεγονός τα οποία συμβάλλουν στην αθηρογένεση και τη δυσλειτουργία των κυττάρων, αντίστοιχα. (Sahidi F and Wanasundara J, 1992).

Ένα μεγάλο πλήθος από τα φαινολικά συστατικά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινογένεση παρουσιάζοντας σημαντική αντικαρκινική δράση (hiroze M et all, 1999).

Σε ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα των φαρμακολογικών εφαρμογών τα φαινολικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυττάρων προερχόμενα από ανθρώπινους και ζωικούς καρκίνους, όπως λευχαιμία, γαστρικό καρκίνο, καρκίνο του πεπτικού σωλήνα, κ.ά. (Huang et all, 1983).

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως έχει αναφερθεί, εμποδίζουν την οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών, οι οποίες εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και την ανάπτυξη καρκίνου. Ελαττώνουν επίσης τη βιοδραστικότητα διάφορων καρκινογόνων ουσιών. Επιπλέον τα υδροξυλιωμένα φλαβονοειδή αλληλεπιδρούν και αναστέλλουν την μεταλλακτική ικανότητα των μεταβολιτών των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, που θεωρούνται ισχυρά μεταλλαξιογόνα και καρκινογόνα. Τα φλαβονοειδή κερκετίνη, καμφερόλη, γαλανγίνη, απιγενίνη και ναριγκίνη μπορούν να αναστείλουν ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση καρκινογόνων παραγόντων στον άνθρωπο, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι ετεροκυκλικές αμίνες. Έρευνες έχουν δείξει ότι φαινολικές ενώσεις όπως οι κατεχίνες, συμβάλλουν στην αύξηση της δράσης αρκετών οξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της αναγωγάσης της κινόνης (lin YL et al., 1998).

Πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX-2). Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολλών μορφών καρκίνου και οι αναστολείς του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης (COX-2) θεωρούνται σημαντικοί προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέου εντέρου (Mutoh et al., 2000). Επίσης, κάποια φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ παίζουν ρόλο στην άμυνα

του οργανισμού απέναντι στην καρκινογένεση αναστέλλοντας τον σχηματισμό των συστατικών με νιτρώδη ομάδα.

2.6.2 Η σημασία του λυκοπενίου για την υγεία

Η πρόσληψη λυκοπενίου, η αύξηση της συγκέντρωσης του στο σώμα και η δραστηριοποίηση του ως αντιοξειδωτικό οδηγεί στην παγίδευση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αυξάνοντας έτσι το συνολικό δυναμικό τους και μειώνοντας την οξειδωτική βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Αυτή η μείωση της οξειδωτικής καταπόνησης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο κίνδυνο για πολλές ασθένειες. Εναλλακτικά, η αυξημένη συγκέντρωση λυκοπενίου στον οργανισμό μπορεί να ρυθμίσει τις λειτουργίες των γονιδίων, να βελτιώσει τη διακυτταρική επικοινωνία, να ρυθμίσει την ορμονική έκκριση και την ανοσολογική απόκριση.

Το λυκοπένιο παρουσιάζει πολλές και σημαντικές δράσεις για τον οργανισμό. Μετά την απορρόφηση του από το έντερο εναποτίθεται στο συκώτι, στους πνεύμονες, στον προστάτη, στο παχύ έντερο και στο δέρμα. Μέχρι τώρα σημαντικός αριθμός ερευνών έδειξαν ότι το λυκοπένιο και ειδικότερα αυτό που προέρχεται από την ντομάτα και τα παράγωγα της, μπορεί να συμβάλλει στην καταπολέμηση διαφόρων σημαντικών παθήσεων που ταλανίζουν την ανθρωπότητα.

Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται:

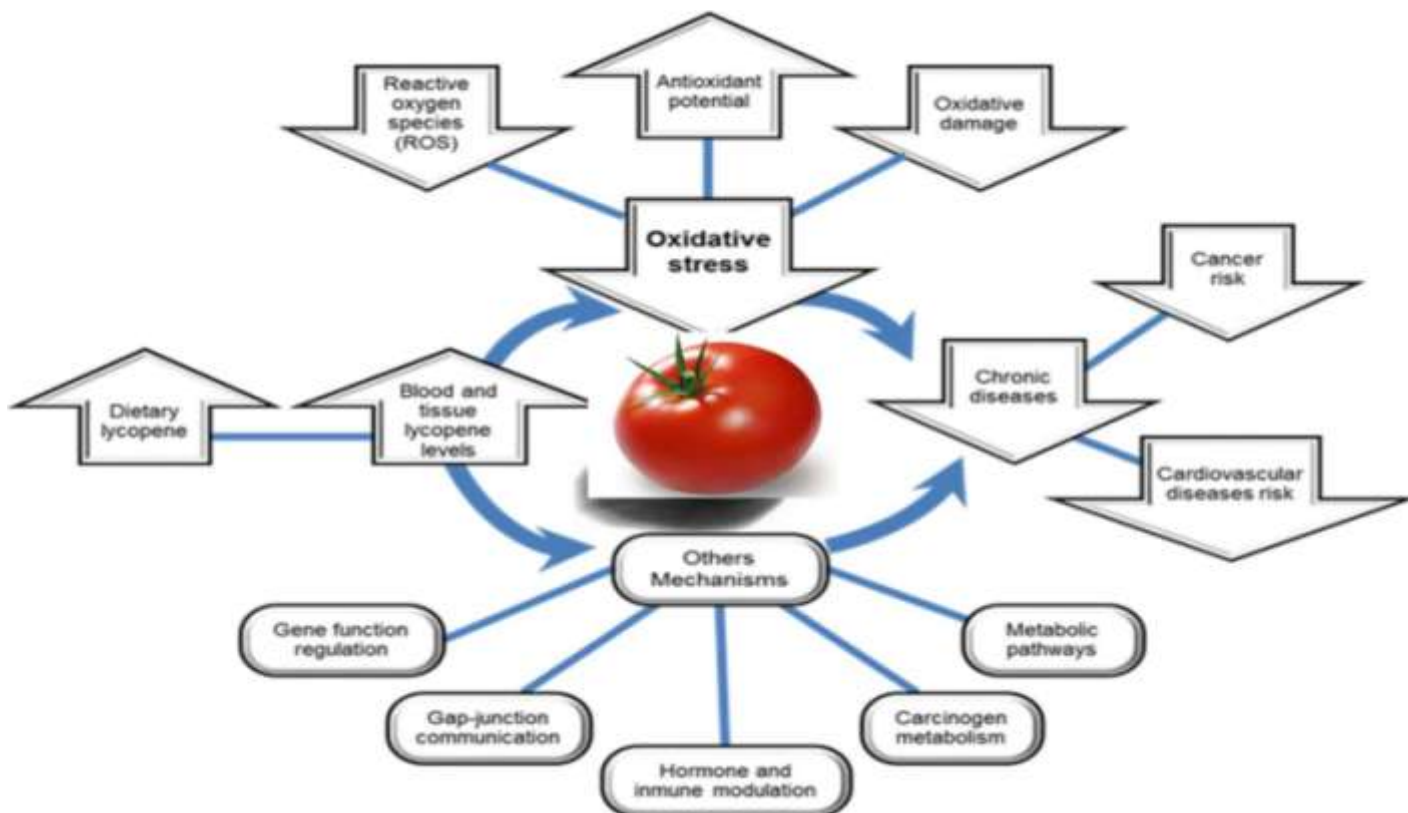
- **Καρδιακές παθήσεις, έμφραγμα του μυοκαρδίου**
Επιστημονικές έρευνες απέδειξαν πως το λυκοπένιο προστατεύει την LDL χοληστερόλη από οξείδωση (προστασία των αρτηριών από το σχηματισμό πλάκας) και πως η συγκεκριμένη δράση του λυκοπενίου ενισχύεται σημαντικά από την ύπαρξη ενός άλλου καροτενοειδούς, αυτού της λουτεΐνης, η οποία υπάρχει στο σπανάκι και στο καλαμπόκι.
- **Καρκίνος προστάτη, πεπτικού συστήματος (στόματος, οισοφάγου, στομάχου, παχέου εντέρου), μαστού, τραχήλου της μήτρας, ωοθηκών.**

Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η τακτική και επαρκής κατανάλωση της ντομάτας (καλύτερα βιολογικές) μειώνει το συνολικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε ποσοστό που φτάνει ακόμα και το 40%.

Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται πως το λυκοπένιο έχει την ικανότητα να καταστέλλει καλλιέργειες κακοηθών κυττάρων από καρκίνους της στοματικής κοιλότητας. Η έρευνα αυτή προστίθεται στον κατάλογο μελετών που έγιναν τα τελευταία χρόνια και που δείχνουν ότι το λυκοπένιο έχει ευεργετικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Η ουσία αυτή βρίσκεται μέσα σε κόκκινου χρώματος λαχανικά και φρούτα όπως η ντομάτα, το καρπούζι, η γκουάβα, η φράουλα και άλλα. Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά της είναι ότι διατηρείται και στα παράγωγα της ντομάτας όπως οι σάλτσες ντομάτας (πίτσα), κέτσαπ, σούπες και άλλα.

Μέχρι τώρα, έρευνες έδειξαν ότι η ουσία αυτή μπορεί να έχει δράση εναντίον διαφόρων καρκίνων, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του εντέρου, του παγκρέατος και τώρα της στοματικής κοιλότητας. Οι μελέτες αυτές είναι ενθαρρυντικές για τις έρευνες που πραγματοποιούνται πάνω σε τύπους καρκίνων της στοματικής κοιλότητας που είναι ιδιαίτερα (Χουλούμα, 2012). Έπειτα, οι άνδρες που καταναλώνουν πολύ συχνά τομάτες μειώνουν σημαντικά τις πιθανότητες τους να παρουσιάσουν καρκίνο του προστάτη (Giovannucci, E. et al., 1995).

Τέλος, ο καρκίνος της ωοθήκης παρουσιάζει αύξηση της συχνότητας του. Στις γυναίκες είναι ο τέταρτος συχνότερος καρκίνος. Ο μέσος όρος της ηλικίας κατά την οποία προσβάλλονται οι γυναίκες είναι 63 ετών. Η ασθένεια μπορεί να παρουσιαστεί με διάφορους τρόπους. Δυστυχώς η ασθενής παρουσιάζει συμπτώματα μόνο όταν η κακοήθεια αυτή προχωρήσει αρκετά. Σε αρκετές περιπτώσεις η διάγνωση γίνεται όταν η ασθένεια βρίσκεται σε προχωρημένα στάδια. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βοστώνη, υποστηρίζει ότι οι γυναίκες οι οποίες τρώνε άφθονα καρότα και ντομάτες



Σχήμα 2. 5.: Συνοπτική παράθεση των θετικών επιδράσεων του λυκοπενίου για τον ανθρώπινο οργανισμό

έχουν μειωμένο κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο της ωοθήκης (Χαλούμα, 2012).

- **Απώλεια όρασης, καταρράκτης**

Έρευνες έδειξαν ότι το λυκοπένιο βοηθά στην πρόληψη του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας στους ηλικιωμένους, που είναι η κυριότερη αιτία τύφλωσης στα άτομα αυτά.

- **Οστεοπόρωση**
- **Ανδρική στειρότητα**
- **Προεκλαμψία στην εγκυμοσύνη**
- **Διαβήτη**

3. Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικών και φαινολών

Τα τελευταία χρόνια, η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας των τροφίμων είναι φλέγον ζήτημα για τους επιστήμονες και τους ερευνητές που ασχολούνται με τους τομείς της υγείας και της διατροφής. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της σύνθεσης των τροφίμων, ο διαχωρισμός και η μεμονωμένη μελέτη του κάθε αντιοξειδωτικού είναι χρονοβόρα, δαπανηρή και μη αποτελεσματική, διότι δεν λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστατικών σε ένα μίγμα τροφίμου. Επομένως η ανάπτυξη μεθόδων που θα στοχεύουν στην γρήγορη ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των υπό εξέταση δειγμάτων κρίνεται αναγκαία.

Η επιλογή μίας μεθόδου ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας είναι αρκετά δύσκολη, αφού υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων που θεωρείται ότι μετράνε την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα *in vitro*. Στην ανασκόπηση των Frankel και Meyer, οι συγγραφείς σημειώνουν ότι είναι προβληματική η χρήση μίας μονοδιάστατης μεθόδου για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας στα πολύπλοκα δείγματα τροφίμων και βιολογικών δειγμάτων. Ωστόσο υπάρχουν κάποιοι βασικοί άξονες πάνω στους οποίους κινούνται όλες οι ποσοτικές μέθοδοι.

Ένα γενικό πρωτόκολλο ελέγχου πρέπει να:

- Επιλέγει ένα υπόστρωμα,
- δοκιμάζει ποικίλες οξειδωτικές συνθήκες όπως το pH, οι διαλύτες κλπ.,
- μετράει τα πρωτογενή και δευτερογενή προϊόντα της οξειδωσης,
- συγκρίνει αντιοξειδωτικά στις ίδιες μοριακές συγκεντρώσεις με τα ενεργά συστατικά
- ποσοτικοποιεί με βάση τον ρυθμό σχηματισμού ή την αποσύνθεση ενός προϊόντος.

Έχει επικρατήσει, οι μέθοδοι να ποσοτικοποιούν με βάση την τιμή IC₅₀, η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ή του μίγματος αντιοξειδωτικών που πετυχαίνει την

μείωση του αρχικού σήματος απορρόφησης, φωταύγειας ή φθορισμού κατά 50% (half maximal inhibitory concentration). Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται γιατί οδηγεί σε αποτελέσματα ανεξάρτητα από το αρχικό σήμα (Re,1999).

Επίσης οι μέθοδοι πολιτικοποιούνται με βάση πρότυπη καμπύλη γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως ασκορβικό οξύ, Trolox (ένα συνθετικό ανάλογο της βιταμίνης E). Με αυτό τον τρόπο η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μίγματος εκφράζεται σε ισοδύναμα ασκορβικού οξέος ή Trolox.

Οι μέθοδοι γενικά διαφέρουν στα χρησιμοποιούμενα συστήματα, στις συνθήκες αντίδρασης, στην τεχνική ανίχνευσης και στις μεθόδους ποσοτικοποίησης.

Γενικά, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, (hydrogen atom transfer reaction based assays, HAT) (Wright et al., 2001)
- στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (single electron transfer reaction based assays, ET) (Wright et al., 2001)

Οι ET μέθοδοι που θα αναλυθούν είναι :

- DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) όπου θεωρείται ότι βασίζεται κυρίως σε ET αντιδράσεις (Ou et al., 2005).
- FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) Όπου βασίζεται σε ET αντιδράσεις (Cao et al., 1997).

Η Μέθοδος HAT που θα αναλυθεί είναι:

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Prior, 2003).

Η μέθοδος μετρήσεις συγκέντρωσης ολικών πολυφαινόλων που θα αναλυθεί είναι:

- Folin Ciocalteu.

3.1 Μέθοδοι ET

Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν δύο συστατικά στο μίγμα της αντίδρασης, το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό.



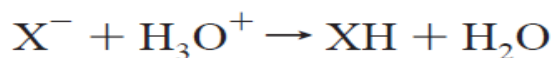
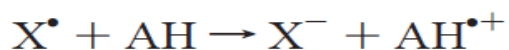
Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

Το οξειδωτικό προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό οδηγώντας σε αλλαγή του χρώματος του πρώτου. Ο βαθμός αλλαγής του χρώματος είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Το τελικό σημείο της αντίδρασης, που προσδιορίζεται φωτομετρικά, είναι το σημείο όπου το χρώμα παύει να αλλάζει και φτάνει σε πλατό.

Η μεταβολή της απορρόφησης ΔA συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού δίνει μία γραμμική καμπύλη ως το τελικό σημείο της αντίδρασης. Η κλίση της γραμμής αντανακλά την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού, η οποία εκφράζεται ως ισοδύναμη αυτής του αντιοξειδωτικού Trolox (Troloxequivalent, TE) ή του γαλλικού οξέος (Gallic acidequivalent, GAE). Αυτές οι μέθοδοι μοιάζουν με τις οξειδοαναγωγικές μεθόδους της κλασσικής χημικής ανάλυσης (A. Jimenez-Escring, 2000).

Ο μηχανισμός των αντιδράσεων ET είναι (Wright et al., 2001):

Εικόνα 6. Μηχανισμός αντιδράσεων ET.



3.1.1 Η μέθοδος DPPH

Από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης είναι η δοκιμή δέσμευσης της DPPH•, δηλαδή της ιώδους ρίζας του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH•). Το DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου.

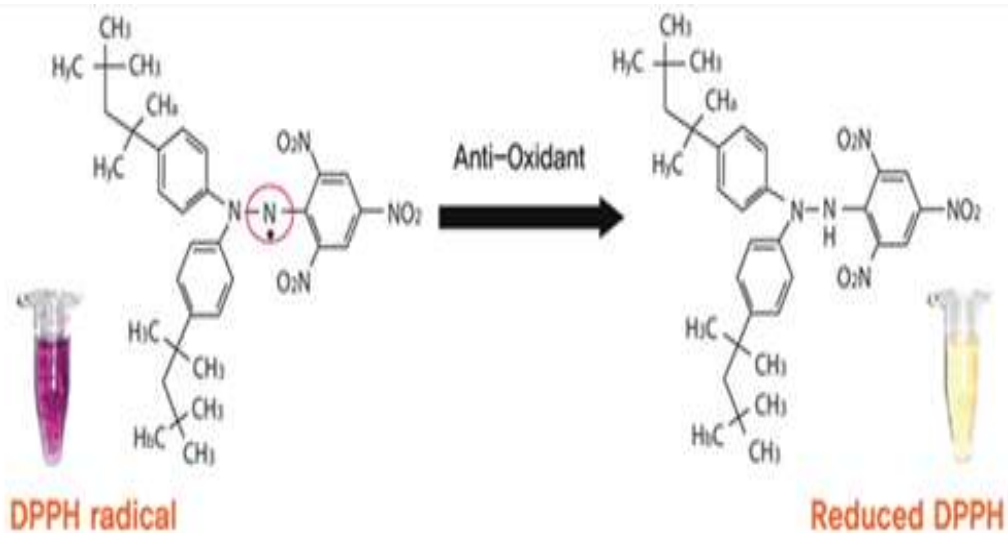
Η ρίζα αυτή δε διμερίζεται και ενώ δέχεται πολύ εύκολα μονήρη ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου, οξειδώνεται πολύ δύσκολα. Η κατανάλωσή του, από τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματός του, η οποία παρακολουθείται στα 515 nm (Bondet, 1997), όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.

Η χρονική διάρκεια της μεθόδου ποικίλει από 10 λεπτά μέχρι 6 ώρες (Frankel and Meyer, 2000). Η συγκέντρωση της ρίζας σε οργανικούς διαλύτες μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση της μείωσης της απορρόφησης στα 517 nm (Molyneux P., 2004). Τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως σε τιμές αποτελεσματικής συγκέντρωσης EC50 (μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH• κατά 50%) και χρόνους TEC50 (χρόνος που χρειάζεται για την επίτευξη της σταθερής κατάστασης όταν η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού είναι ίση με τη EC50) (Prior et al., 2005).

Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών κατηγοριοποιείται σύμφωνα με το χρόνο που απαιτείται για την εμφάνιση ενός πλατό, δηλαδή για να φτάσει η απορρόφηση του μίγματος της αντίδρασης σε σταθερή τιμή, σε τρεις κατηγορίες:

- Γρήγορα αντιοξειδωτικά, <5 min,
- Ενδιάμεσα αντιοξειδωτικά, 5-30 min,
- Αργά αντιοξειδωτικά, >30 min.

Αν και η μέθοδος φαίνεται να περιλαμβάνει μία αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η αντίδραση μεταξύ φαινολών και DPPH βασίζεται σε αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου. Το κρίσιμο στάδιο για την ταχύτητα της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνει μία διαδικασία ταχείας μεταφοράς ηλεκτρονίου από τα φαινοξυ-ανιόντα (ArO-) στη ρίζα DPPH•. Η μεταφορά του ατόμου υδρογόνου από το ουδέτερο

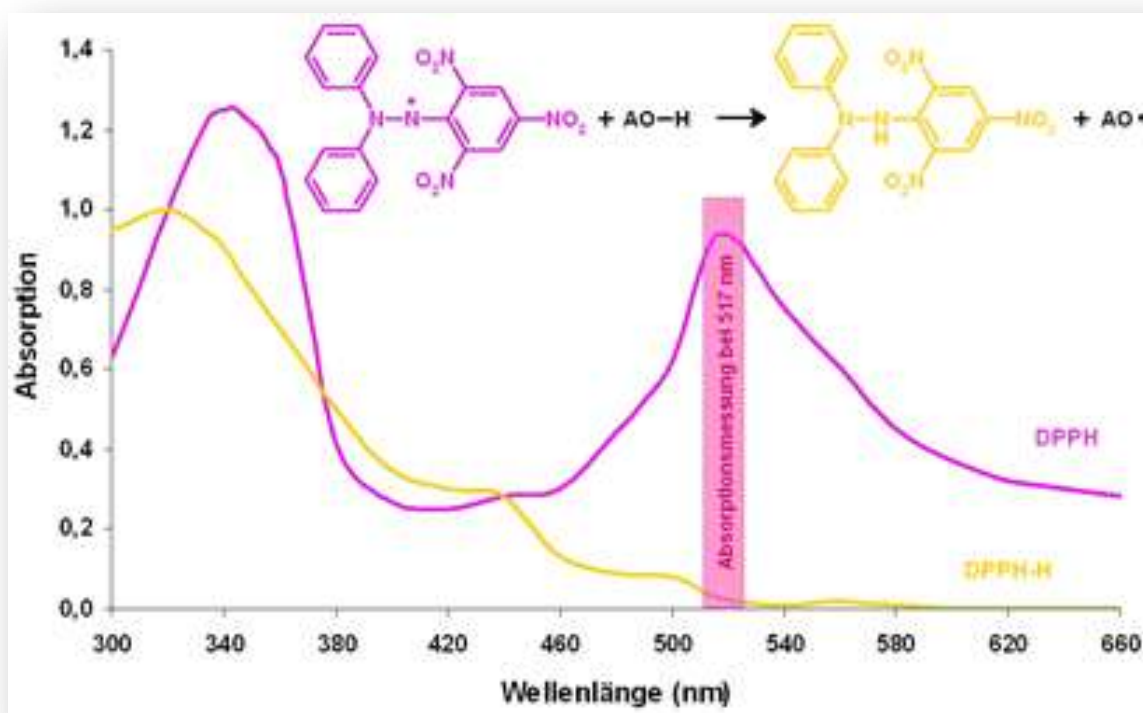


Σχήμα 3. 1.

μόριο ArOH στο DPPH• γίνεται πολύ αργά σε διαλύτες που είναι ισχυροί πρωτονιοδέκτες, όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη.

Αναφέρεται επίσης ότι η παρουσία μικρών ποσοτήτων οξέων ή βάσεων μπορεί να επηρεάσει δραματικά την ισορροπία ιονισμού των φαινολών και να προκαλέσει την μείωση ή την ενίσχυση αντίστοιχα των μετρούμενων σταθερών ταχύτητας.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται αποτελέσματα από ένα πείραμα με τη μέθοδο DPPH και μας επιτρέπει να αντιληφθούμε καλύτερα τον τρόπο με τον οποίο αυτή λειτουργεί.



Σχήμα 3.2.: Καμπύλη απορρόφησης του δείγματος στα διάφορα μήκη κύματος του φάσματος του ορατού. Οι μετρήσεις για την παραπάνω μέθοδο παίρνονται στα 517 nm. Η μείωση της απορρόφησης όταν το διάλυμα γίνεται κίτρινο είναι εμφανής και μεγιστοποιείται στα 517 nm. Έτσι τα 517 nm αποτελούν σημείο αναφοράς για τις μετρήσεις της μεθόδου αυτής.

Η μέθοδος DPPH είναι τεχνικά απλή αλλά παρουσιάζει μερικά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση της. Το DPPH αποτελεί μία πολύ σταθερή ρίζα αζώτου, που δεν δείχνει όμως ομοιότητα με τις πολύ ενεργές υπεροξυ-ρίζες που παίρνουν μέρος στην λιπιδική υπεροξειδωση. Πολλά αντιοξειδωτικά που θα αντιδρούσαν γρήγορα με υπεροξυ-ρίζες, αντιδρούν αργά ή καθόλου με το DPPH. Αυτό εκφράζεται με τις τιμές του TIC50 που κυμαίνονται μεταξύ 1,15 min για το ασκορβικό οξύ και 103 min για την ρουτίνη (rutin). Η μέθοδος είναι εύκολη, ακριβής, ευαίσθητη και οικονομική καθώς η ρίζα είναι σταθερή και δεν χρειάζεται να παραχθεί όπως σε άλλες δοκιμές. Οι περιορισμοί της μεθόδου απορρέουν από το γεγονός ότι η ρίζα είναι αδιάλυτη στο νερό (Arnao et al.,

1999), δεν έχει ομοιότητα με τις υπεροξυ-ρίζες που σχετίζονται με την οξείδωση των ακόρεστων λιπιδίων (Prior et al., 2005).

Η μέθοδος έχει βρει ίσως τις περισσότερες από κάθε άλλη μέθοδο εφαρμογές όπως:

- η σύγκριση των ομόλογων σειρών αντιοξειδωτικών,
- η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών ενώσεων, κρασιών, συστατικών καπνού (Frankel and Meyer, 2000) και
- αντιοξειδωτικών στα φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, φύκια και μανιτάρια

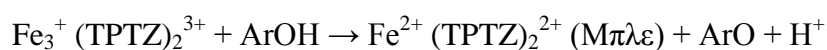
Για όλους τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιείται ευρύτατα στον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών στην τομάτα.

3.1.2 Η μέθοδος FRAP

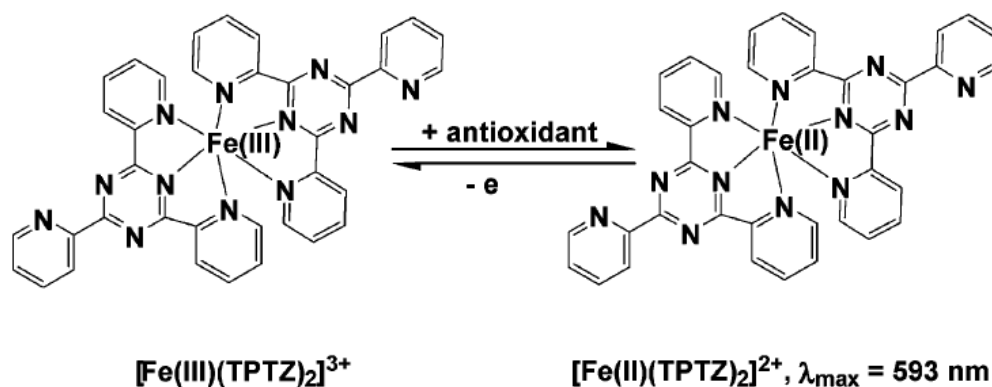
Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Benzie και Strain (1996) για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος του αίματος και από τότε έχει τροποποιηθεί για την χρήση της και σε άλλα φυσικά προϊόντα όπως το εκχύλισμα τομάτας.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη (Fe_3^+ -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe_2^+ -TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση διεξάγεται σε pH = 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη (Benzie, 1996).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω:



όπου ArOH= φαινολικό αντιοξειδωτικό, TPTZ: 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη.



Σχήμα 3.3. : Μηχανισμός αντίδρασης της μεθόδου FRAP (Agric, 2005).

Λόγω της βαθμιαίας μείωσης της απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου για μερικές κατηγορίες φαιολικών αντιοξειδωτικών όπως τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή, θα πρέπει να επέλθει ένας συμβιβασμός ανάμεσα στις τεχνικές μέτρησης (π.χ. γρήγορη έναντι καθυστερημένης μέτρησης της απορρόφησης στους 37⁰C). Οι τιμές που λαμβάνονται με μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm σε χρόνο 4 min λαμβάνουν υπόψη την κινητική της αντίδρασης καλύτερα από τις τιμές που λαμβάνονται στα 60 min. Πρέπει επομένως στα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζεται και η κινητική της αντίδρασης και η θερμοδυναμική αυτής ώστε να συλλέγονται χρήσιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων των τροφίμων (Perkampus, 1991).

FRAP αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν δραματικά ανάλογα με την χρονική κλίμακα ανάλυσης (Pulido, 2000). Η μέθοδος FRAP δεν μετρά θειώλης αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη. Μετρά στην πραγματικότητα μόνο την αναγωγική ικανότητα με βάση το ιόν τρισθενούς σιδήρου, η οποία δεν είναι σχετική με αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες δοκιμές ολικής αντιοξειδωτικής δύναμης, η μέθοδος FRAP είναι απλή, γρήγορη, φθηνή, και στιβαρό και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό.

3.2 Μεθοδοι HAT

Η βάση της δοκιμασία HAT χρησιμοποιώντας ανιχνευτές φθορισμού έχει μία μηχανιστική ομοιότητα προς την υπεροξείδωση των λιπιδίων, αλλά κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος (στην περίπτωση αυτή του ανιχνευτή) είναι συχνά

μικρότερη από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις πραγματικές καταστάσεις. Στα συστήματα τροφίμων η αντιοξειδωτική συγκέντρωση είναι πολύ μικρότερη από εκείνη του υπόστρωμα (π.χ., λιπιδίου). Μένει να φανεί εάν η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία που βασίζεται αντίδραση HAT, χρησιμοποιώντας ένα μοριακό ανιχνευτής που μπορεί να μεταφραστεί σε εφαρμογές σε ένα πραγματικό σύστημα τροφίμων, η οποία είναι επίσης συχνά ετερογενές και υπό διαφορετικές οξειδωτικές συνθήκες στρες. Είναι γνωστό ότι η κατανομή του αντιοξειδωτικού σε δύο φάσεις έχει μεγάλη επίδραση στην αποτελεσματικότητά της (Huang et al., 1996).

Μηχανιστικά, η αντίδραση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της μεταφοράς άτομου υδρογόνου μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν. Η προφανής αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της μεταφοράς πρωτονίων-ηλεκτρονίων (PCET) (Nakanishi et al., 2002). Θεωρητικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντίδραση με τοκοφερόλη οξυρίζε υφίσταται κυρίως την αντίδραση μεταφοράς άτομου υδρογόνου (Wright et al., 2001).

3.2.1. Η μέθοδος ORAC

Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) βασίζεται στην ύπαρξη ενός φθορισμομετρικού δείκτη και μιας ένωσης που παράγει ελεύθερες ρίζες. Η προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει αντιοξειδωτικά, όπως κάποιο τρόφιμο ή βιολογικό υγρό, οδηγεί σε αναστολή της φθοράς φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας, η οποία υπολογίζεται με χρήση φθορισμομέτρου (Ou et al., 2001).

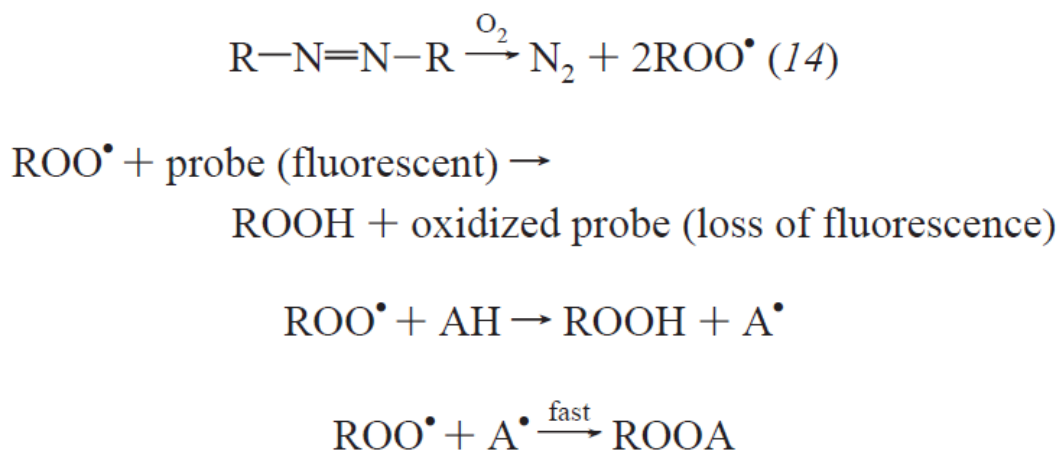
Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι οι:

- βήτα-φυκοερυθρίνη,
- φθορεσκεΐνη και
- πυρογαλλόλη

και διαφέρουν σε σταθερότητα και δραστηκότητα.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μέσω θερμικής από σύνθεσης μίας αζωτοένωσης, ώστε να δώσει μία σταθερή ροή υπεροξυλο - ριζών σε ένα κορεσμένο διάλυμα αέρα. Τα αντιοξειδωτικά συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για τις ρίζες και εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση του υποστρώματος.

Ο μηχανισμός της μεθόδου ORAC είναι



Σχήμα 3. 4.: Μηχανισμός της μεθόδου ORAC. (Agric, 2005).

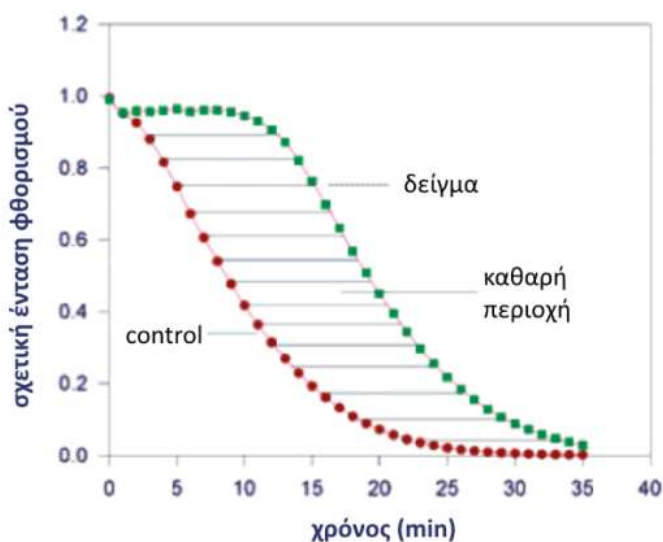
Η δοκιμασία ORAC ακολουθεί την αντίδραση για εκτεταμένες περιόδους, για παράδειγμα, 30 min. Υπολογισμός των προστατευτικών αποτελεσμάτων ενός αντιοξειδωτικού (AOX) είναι από τις καθαρές ολοκληρωμένες περιοχές που βρίσκονται υπό τον φθορισμό. Οι καμπύλες αποσύνθεσης (AUC) [AUC_{AOX}-AUC_{no AOX}], όπως φαίνεται στο Σχήμα, και τους λογαριασμούς για το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί, με αρχικό ρυθμό, και συνολική έκταση της αναστολής σε μία ενιαία τιμή. Οι τιμές ORAC που συνήθως αναφέρεται ως ισοδύναμα Trolox. Μία πρότυπη καμπύλη δημιουργείται χρησιμοποιώντας την AUC για πέντε πρότυπα συγκεντρώσεις Trolox, και τα ισοδύναμα Trolox του δείγματος υπολογίζεται με τον ακόλουθο γραμμικό ή τετραγωνική σχέσεις (Y) $a + bX$, γραμμικό? ή Y) $a + bX + cX^2$

Η μέθοδος μετρά την αντιοξειδωτική δράση απομάκρυνσης έναντι του υπεροξυλική ρίζα, που προκαλείται από 2,2'-αζωδις- (2-αμιδινο-προπάνιο) διυδροχλωρίδιο (AAPH), στους 37 ° C. Φλουορεσκεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής φθορισμού. Η απώλεια του φθορισμού ήταν ένας δείκτης της έκτασης της αποσύνθεσης, από την αντίδραση του με την υπεροξυλική ρίζα. Συνήθως η χρονική υστέρηση στην απώλεια του φθορισμού που

προκαλείται από τα αντιοξειδωτικά συγκρίνεται με αυτή ενός διαλύματος control που δεν περιέχει αντιοξειδωτικά. Το εμβαδόν της καθαρής περιοχής είναι ανάλογο της αντιοξειδωτικής ενεργότητας του δείγματος (Thairong et al.,2006).

Για να γίνει πιο ευρέως εφαρμόσιμη, η δοκιμασία ORAC έχει προσαρμοστεί έτσι ώστε να μετρά λιπόφιλα και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά (Wright et al., 2001). Τα λιπόφιλα και υδρόφιλα συστατικά εκχυλίζονται επιλεκτικά πριν από τον προσδιορισμό (Prior et al., 2003). Έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της AOC πολλών ενώσεων και δειγμάτων τροφίμων. Η δοκιμασία ORAC παρέχει αντιδράσεις με ελεγχόμενης πηγής περοξυλ ριζών των αντιοξειδωτικών με λιπίδια τόσο τροφίμων όσο και φυσιολογικών συστημάτων, και μπορεί να προσαρμοστεί για την ανιχνεύσει τόσο των υδρόφιλων όσο και των υδρόφοβων αντιοξειδωτικών, μεταβάλλοντας τη ρίζα πηγή και το διαλύτη (Prior et al., 2003). Η αντίδραση έχει καθοριστεί να είναι ένας μηχανισμός HAT (Ou et al., 2001).

Επειδή η αντίδραση ORAC είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία, στενός έλεγχος της θερμοκρασίας σε όλη την διάρκεια είναι απαραίτητος. Γίνεται επώαση του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης στους 37 ° C πριν από την χρήση, ώστε να διαλυθεί και να μειωθεί η μεταβλητότητα της ενδο-δοκιμασίας (Prior et al., 2003). Μικρές διαφορές θερμοκρασίας στις εξωτερικά της μικροπλάκας μπορεί να μειώσουν την αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας (Lussignoli et al.,1999).



Σχήμα 3.5.: ORAC αντιοξειδωτική δράση της εξεταζόμενο δείγμα εκφράζεται ως η καθαρό εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (Agric, 2005).

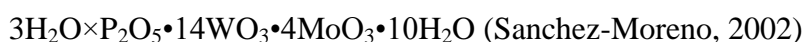
Η ένταση του φθορισμού (485-525nm) μετράται για 35 λεπτά σε pH=7,4 και στους 37°C (Prior et al., 2005).

4. Η μέθοδος Folin Ciocalteu

Η μέθοδος Folin Ciocalteu είναι μία φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων της τομάτας από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικό κανενός φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν έως σήμερα ταυτοποιηθεί. Η μέθοδος βασίζεται σε μία χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων από φωσφο-μολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin Ciocalteu εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE).

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin Ciocalteu reagent, FCR) με τις ακόλουθες δομές:



σε φωσφορομολυβδενικό / φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον. (singleton et al., 1999, singleton et al., 2004).

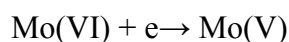
Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (725nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (35%, w/v) που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αφενός, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των

φαινολικών ιόντων (Balentine et al., 1997). Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Σουφλερός, 1997).

Το αντιδραστήριο FC παρασκευάζεται τυπικά με βρασμό (για 10 h) μίγματος βολφραμικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), μολυβδαινικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g), συμπυκνωμένου υδροχλωρικού οξέος (100 ml), 85% φωσφορικού οξέος (50 ml) και νερού (700 ml). Μετά το βρασμό, προστίθεται θειικό λίθιο ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) στο μίγμα ώστε να προκύψει διάλυμα έντονου κίτρινου χρώματος, το αντιδραστήριο FC.

Η κατανάλωσή του από αναγωγικά αντιδραστήρια οδηγεί σε διάλυμα πράσινου χρώματος και η προσθήκη οξειδωτικών μπορεί να διατηρήσει το επιθυμητό κίτρινο χρώμα.

Αμφίδρομες αναγωγικές αντιδράσεις ενός ή δύο ηλεκτρονίων σχηματίζουν ενώσεις κυανού χρώματος, πιθανώς $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα μεταξύ των αναγωγικών και του Mo(VI):



Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu είναι μη ειδικό στα φαινολικά συστατικά διότι μπορεί να αναχθεί και από άλλα μη φαινολικά συστατικά όπως η βιταμίνη C και ο Cu(I). Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το FCR μόνο υπό βασικές συνθήκες, γι' αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση με διάλυμα ανθρακικού νατρίου σε pH 10. Ο ιοντισμός ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικού ανιόντος, το οποίο ανάγει το FCR. Η αντίδραση αυτή υποστηρίζει τον μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου. Τα κυανού χρώματος συστατικά που σχηματίζονται, είναι ανεξάρτητα από τη δομή των φαινολικών συστατικών, αποκλείοντας την πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του κεντρικού μετάλλου και των φαινολικών συστατικών. Η μέθοδος των ολικών φαινολών με χρήση του FCR είναι απλή και αναπαραγωγική. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά στη μελέτη των φαινολικών αντιοξειδωτικών (Hang et al., 2005).

B. Πειραματικό Μέρος

5. Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu

5.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- Διάλυμα Folin Ciocalteu :1 ml αντιδραστήριο Folin Ciocalteu αναμειγνύονται με 7ml νερό. Διατηρείται στους -20°C
- Διάλυμα 20% Na₂CO₃ :2± 0,0010g σε ποτήρι ζέσεως διαλύονται 80ml νερό με βρασμό, αφού κρυώσει σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με νερό.

Παρασκευάζουμε 7 πρότυπα διαλύματα Gallic acid με συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10 µg/ml

5.2 Διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμειγνύονται 500 µl πρότυπο διάλυμα (ή νερό για το control) με 500 µl διαλύματος Folin Ciocalteu και 4 ml νερό και ανακινούνται με Vortex. Αφήνονται σε αναμονή για τρία λεπτά και προσθέτουμε 1000 µl διαλύματος 20% Na₂CO₃ και ανακινούνται με Vortex. Αναμονή δύο ώρες και έπειτα φωτομέτρηση στα 725 nm

5.3 Εκχύλιση δείγματος

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- Μεθανόλη 75% :σε 60 ml μεθανόλη προστίθενται 20 ml νερό.
- NaOH 1M σε μεθανόλη 75%: σε ογκομετρική φιάλη των 10ml τοποθετούνται 0,8 g NaOH, διαλύονται σε λίγη μεθανόλη των 75% και συμπληρώνεται με μεθανόλη 75% μέχρι την χαραγή.
- Ακετόνη/νερό 1/1 v/v : αναμιγνύονται 5ml ακετόνης με 5 ml νερό.
- Διάλυμα potassium acetate 1M: 0,982 g potassium acetate σε ογκομετρική των 10 ml διαλύονται σε νερό μέχρι την χαραγή.

Διαδικασία

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται $2 \pm 0,01$ g δείγματος, 2 ml μεθανόλη 75% και 1 ml HCL 1M.
2. Το μείγμα ομογενοποιείται για ένα 1 min στο Vortex.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται στους 37°C για 30 min και αναδεύεται σε Vortex.
4. Κατόπιν προστίθεται 1ml διαλύματος NaOH 1M σε μεθανόλη 75% και αναδεύεται σε Vortex για 1 min.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στις 6000 στροφές.
6. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml.
7. Στο σωλήνα που περιέχει το στερεό υπόλειμμα προστίθενται 2 ml μίγματος ακετόνης/νερό 1/1 v/v και το μείγμα αναδεύεται σε Vortex για 1 min.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στις 6000 στροφές.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στην ίδια ογκομετρική φιάλη που περιέχει το υπερκείμενο από το στάδιο 6.
10. Συμπληρώνεται με μεθανόλη 75% μέχρι την χαραγή.

Το διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη.

Το διάλυμα θα χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin Ciocalteu και για προσδιορισμό φλαβονοειδών.

5.4 Μέτρηση δείγματος

Τα επόμενα διαλύματα δείγματος και control ετοιμάζονται παράλληλα. Το control χρησιμοποιείται ως τυφλό για την φωτομέτρηση. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 500 μl διάλυμα δείγματος (ή μεθανόλη 75% για το control) με 500 μl διαλύματος Folin Ciocalteu και 4 ml νερό ανακινούνται με Vortex. Ακολουθεί αναμονή 3 min και προστίθενται 1000 μl διαλύματος Na_2CO_3 20% και αναδεύεται σε Vortex. Ακολουθεί αναμονή 2 ωρών στο σκοτάδι και έπειτα φωτομέτρηση στα 725 nm.

6. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών (Total Flavonoids)

6.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Διαλύματα

- Διάλυμα NaNO_2 5% : $2,5 \pm 0,001$ g NaNO_2 τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, διαλύονται σε λίγο νερό και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή .
- Διάλυμα AlCl_3 : $1,000 \pm 0,001$ g AlCl_3 τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml, διαλύονται σε λίγο νερό και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με νερό.
- Διάλυμα NaOH 1M

Παρασκευάστηκαν 8 πρότυπα διαλύματα rutin συγκέντρωσης 360, 240, 120, 60, 24,5 $\mu\text{g/ml}$ rutin.

6.2 Διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 500 μl διάλυμα μείγματος (ή μεθανόλης 75% για το τυφλό) με 1,5 ml μεθανόλη 75% και ανακινούνται με Vortex. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl 10% AlCl_3 και αναδεύεται σε Vortex. Προσθέτουμε 100 μl potassium acetate 1M, ανακίνηση στο Vortex. Τέλος προσθέτουμε 2,8 ml νερό, ανακινούμε στο Vortex και το αφήνουμε σε αναμονή 30 min σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Φωτομετρούμε στα 415nm.

7. Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Antioxidant Activity) με χρήση της μεθόδου DPPH

7.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- Stock διάλυμα DPPH σε μεθανόλη: διαλύονται $0,024 \pm 0,001$ g DPPH σε μεθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20°C .
- Working διάλυμα σε DPPH σε μεθανόλη 0,004%: λαμβάνονται 10 ml από το stock διάλυμα και αραιώνονται με 45ml μεθανόλη. Ανακινούνται με Vortex. Το διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι να καταναλωθεί. Ελέγχεται η απορρόφησή του στα 515 nm να είναι $1,1 \pm 0,02$ (με τυφλό μεθανόλη). Αν η απορρόφησή του δεν φτάνει αυτό το ποσό, απορρίπτεται και φτιάχνουμε άλλο.

Διαδικασία

Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 100, 50, και 20 μM .

Μετρήσεις

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3,8 ml working DPPH και 200 μl ενός πρότυπου διαλύματος (ή με μεθανόλη για control) και αναδεύονται σε Vortex. Σε κυψελίδα τοποθετούνται 3 ml διαλύματος και φωτομετρούνται ύστερα από 30 min στα 517 nm χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως τυφλό.

Τα διαλύματα διατηρούνται σε σκοτάδι μεταξύ των μετρήσεων.

Μέτρηση δείγματος και control

Για την μέτρηση δείγματος θα χρησιμοποιηθούν υδρόφιλα και λιπόφιλα εκχυλίσματα.

Υδρόφιλη εκχύλιση δείγματος

Σε $2,00 \pm 0,01$ g τομάτα τοποθετούνται 10 ml νερό. Αναμειγνύονται στο Vortex για 2 min. Φυγοκέντρωση για 10 min σε 6000 rpm. Το υγρό φυλάσσεται στη κατάψυξη.

7.2 Μέτρηση δείγματος

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3,8 ml working DPPH και 200 μl υδρόφιλο εκχύλισμα (ή με νερό για control) και αναδεύονται σε Vortex. Σε κυψελίδα τοποθετούνται 3 ml διαλύματος και φωτομετρούνται ύστερα από 30 min στα 517 nm χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως τυφλό.

Λιπόφιλη εκχύλιση

Σε δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονται 2g τομάτας και προστίθενται 2,5 ml μεθανόλη. Το μείγμα αναδεύεται σε Vortex για 30 sec. Έπειτα προσθέτουμε 2ml tris pH 7,5 και αναδεύεται σε Vortex για 30 sec. Ο σωλήνας αφήνεται σε σκοτάδι για 5 min. προσθέτουμε 2ml χλωροφόρμιο και ακολουθεί ανάδευση για 1 min σε Vortex. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 6000 στροφές. Διαχωρίζουμε τις δύο στοιβάδες. Η κάτω στοιβάδα είναι η στοιβάδα του χλωροφορμίου. Μεταφέρουμε την κάτω στοιβάδα σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώνεται υπό κενό σε rotary evaporator. Το υπόλειμμα που θα μείνει διαλύεται σε 5 ml 2-προπανόλη. Σε όλη την διαδικασία αποκλείουμε το φως όσο μπορούμε.

Μέτρηση δείγματος

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3,8 ml working DPPH και 200 μl λιπόφιλου εκχυλίσματος (ή με 2-προπανόλη για control) και αναδεύονται σε Vortex. Σε κυψελίδα τοποθετούνται 3 ml διαλύματος και φωτομετρούνται ύστερα από 30 min στα 517 nm χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως τυφλό.

8. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος τομάτας με χρήση της μεθόδου FRAP

8.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- Διάλυμα FeCl_3 (0,02M Fe^{+3}): 0,135 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και διαλύονται σε λίγο νερό και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή.
- Διάλυμα HCl 0,004M.
- Διάλυμα TPTZ (0,01M): 0,0781 g TPTZ τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και διαλύονται σε λίγο HCl 0,04M και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή.
- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{CHOOH}/\text{CH}_3\text{CHOO}\text{Na}$ 0,03M και pH 3,6: 1,869g $\text{CH}_3\text{CHOO}\text{Na}$ και 16 ml glacial CH_3COOH τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 1L και προστίθενται νερό μέχρι την χαραγή.
- Αντιδραστήριο FRAP : αναμειγνύονται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{CHOOH}/\text{CH}_3\text{CHOO}\text{Na}$ με 1 ml διαλύματος FeCl_3 και 1ml διαλύματος TPTZ. Το διάλυμα παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά.

Διαδικασία

Παρασκευάστηκαν 8 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 1000 , 800, 400, 200, 100, 50 και 20 μM

Αρχικά, 2,9ml αντιδραστήριο FRAP αναμειγνύονται σε 100 μl πρότυπου διαλύματος. Το μίγμα θερμαίνεται στους 37°C για 10 min (ανακινείται 1-2 φορές). Κατόπιν ψύχεται και φωτομετρείται στα 593 nm σε 5min.

Τυφλό: 2,9ml αντιδραστήριο FRAP αναμειγνύονται με 100 μl νερό.

8.2 Μετρήσεις δείγματος (λιπόφιλο ή υδρόφιλο)

Αρχικά, 2,9 ml αντιδραστήριο FRAP αναμιγνύονται με 100μl δείγματος. Το μίγμα θερμαίνεται στους 37°C για 10 min (ανακινείται 1-2 φορές). Κατόπιν ψύχεται σε τρεχούμενο νερό και φωτομετρείται στα 593 nm σε 5min.

Τυφλό: 2,9ml αντιδραστήριο FRAP αναμιγνύονται με 100 μl μεθανόλη για υδρόφιλη εκχύλιση ή 2-προπανόλη για λιπόφιλη εκχύλιση.

9. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου ORAC

9.1 Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης

Παρασκευή διαλυμάτων

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH =7,4 75mM : 5,85g phosphate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MB= 156) και 3,01g disodium phosphate, heptahydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MB=178) τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 300 ml και προστίθενται νερό μέχρι την χαραγή.
- Διάλυμα AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino-propane)dihydrochloride) 515mM : 0,6983g AAPH (MB 271,19) τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml και προστίθενται μέχρι την χαραγή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (με pH=7,4 75mM). Το διάλυμα αποθηκεύεται στην κατάψυξη και στο σκοτάδι.
- Διάλυμα Fluorescein $6,30 \times 10^{-8}$ M : 0,0021g fluorescein τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προστίθενται μέχρι την χαραγή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (με pH=7,4 75mM).
- Από το παραπάνω διάλυμα Fluorescein λαμβάνονται με αυτόματη πιπέτα 0,1 ml και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προστίθενται μέχρι την χαραγή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (με pH=7,4 75mM). Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση $6,30 \times 10^{-8}$ M.

Πρότυπα διαλύματα Trolox

Τα πρότυπα διαλύματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 100, 50, 25, 12.5 και 6.25 μM

9.2 Μέτρηση δείγματος ή πρότυπων

1. Αναμιγνύονται 1700 μl διαλύματος Fluorescein με 40 μl δείγματος (ή 40 μl πρότυπο Trolox). Ανάδευση με Vortex και το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 min.
2. Στο μίγμα προστίθεται διάλυμα 220μl διαλύματος AAPH και ανάδευση με Vortex.
3. Το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 30 sec.
4. Αμέσως μεταφέρεται στην κυψελίδα και αρχίζει η μέτρηση.

9.3 Μέτρηση τυφλού

1. Αναμιγνύονται 1700μl διαλύματος Fluorescein με 40 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (με pH=7.4, 75mM). Ανάδευση με Vortex και το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 min.
2. Στο μίγμα προστίθεται διάλυμα 220μl διαλύματος AAPH και ανάδευση με Vortex.
3. Το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 30 sec.
4. Αμέσως μεταφέρεται στην κυψελίδα και αρχίζει η μέτρηση.

10. Προσδιορισμός Λυκοπενίου

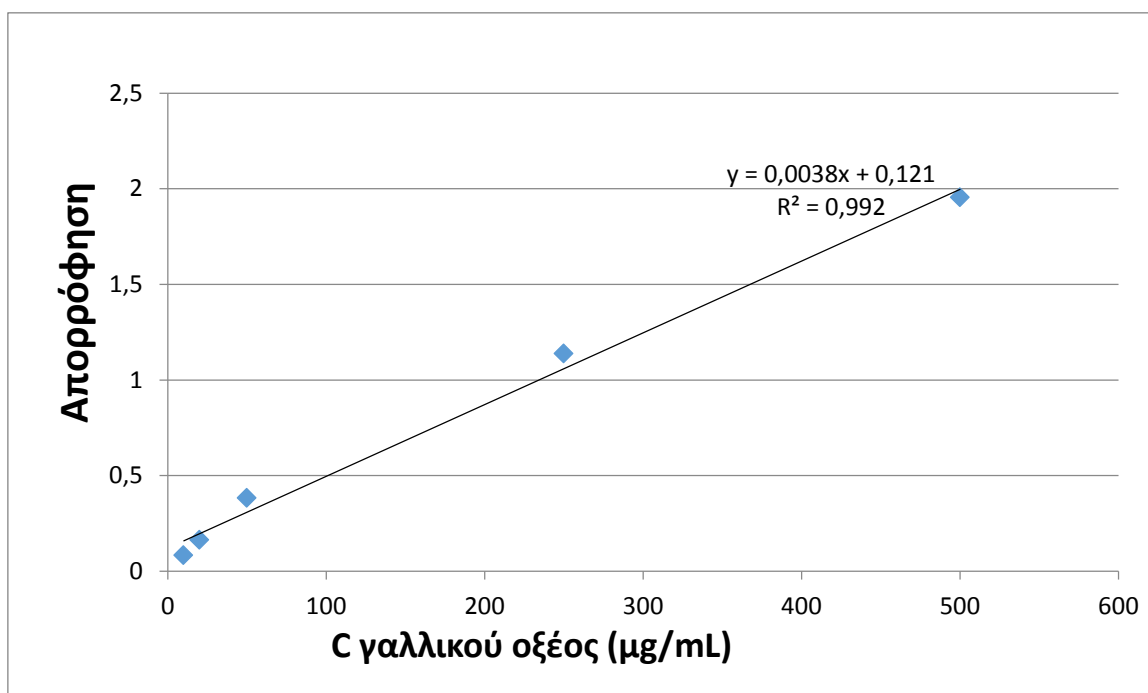
Σε $1.00 \pm 0,01$ g ντομάτας και 0,25 g BHT προστίθενται 10 ml εξάνιο 5ml ακετόνης και 5ml μεθανόλης (2/1/1 v/v). Ο σωλήνας τυλίγεται με αλουμινόχαρτο για να αποκλειστεί το φως και ακολουθεί Vortex για 30 min. Έπειτα προστίθενται 10ml νερό και ακολουθεί Vortex για 2 min. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται για 5 min στα 6000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml (με αλουμινόχαρτο για να μην μπαίνει φως) και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με hexane. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 472nm και στα 502nm με τυφλό hexane.

Γ. Αποτελέσματα-συζήτηση.

11. Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu

mg/ml Gallic acid	A
1000	1,559
500	1,954
250	1,137
100	0,831
50	0,383
20	0,163
10	0,083

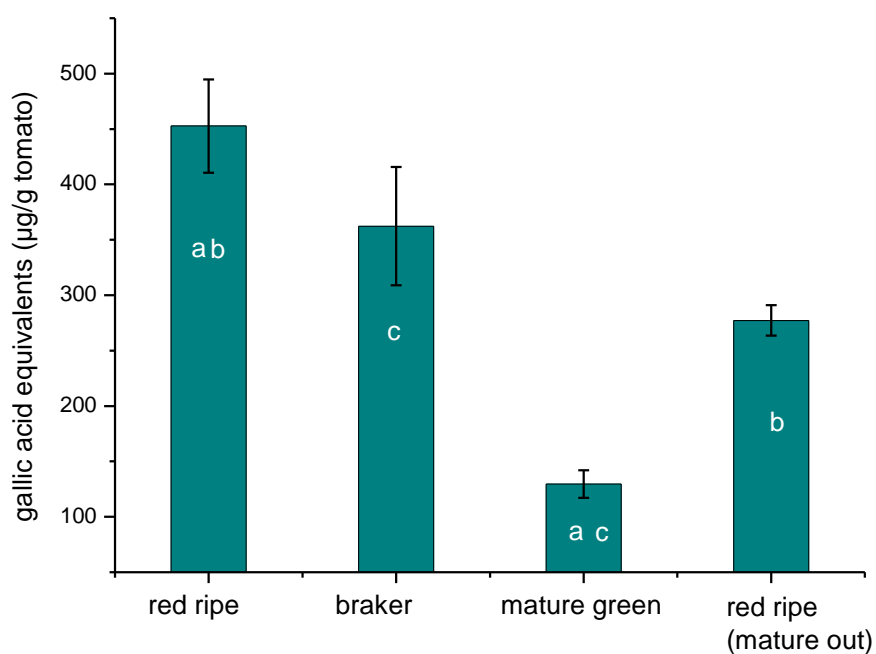
Πίνακας 11.1. : Συγκέντρωση προτύπων και απορρόφησή τους



Σχήμα 11. 2. : Πρότυπη καμπύλη μεθόδου Folin Ciocalteu

	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
Πολυφαινόλες ($\mu\text{g/g}$ ντομάτα)	452,63 \pm 73,13	399,35 \pm 93,98	129,6 \pm 17,68	277,193 \pm 23,73

Πίνακας 11.2. : Συγκέντρωση πολυφαινολών στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).

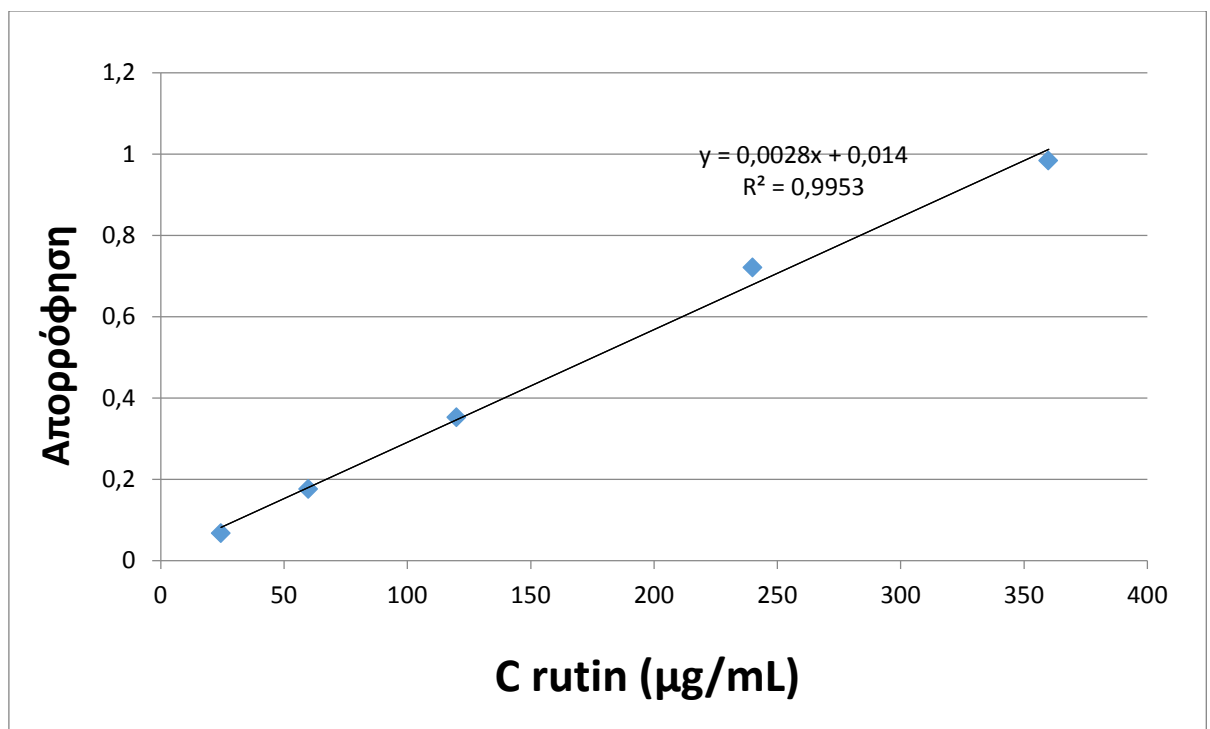


Σχήμα 11.3. : Συγκέντρωση πολυφαινολών στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out). Στήλες που υποδεικνύονται με το ίδιο γράμμα έχουν διαφορά στατιστικά σημαντική.

12. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών (Total Flavonoids)

C rutin (μg/ml)	A
360	0,984
240	0,721
120	0,352
60	0,176
24,5	0,067

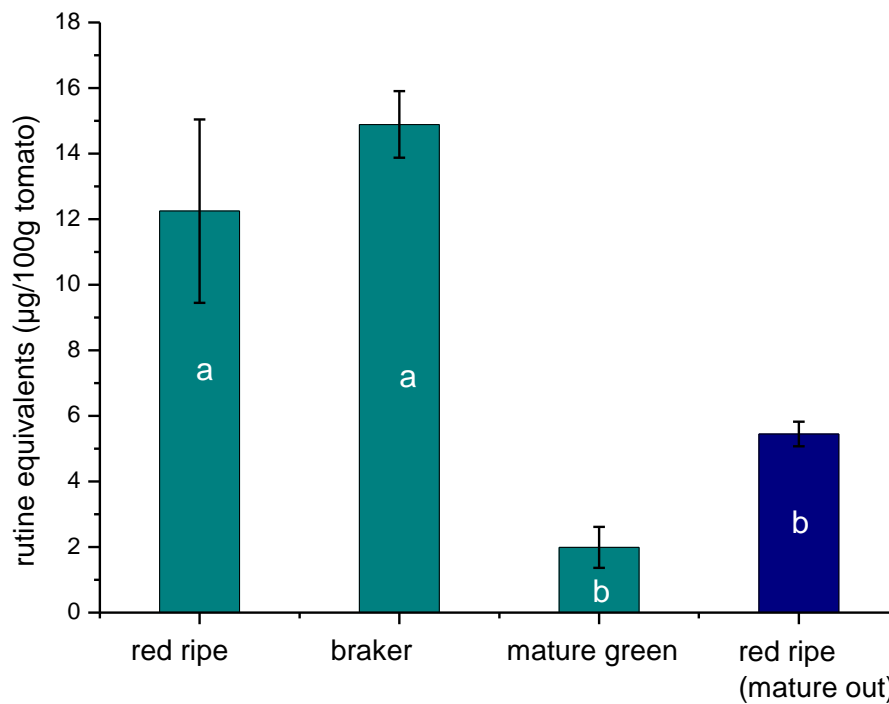
Πίνακας 12.1. : Συγκέντρωση προτύπων και απορρόφησή τους



Σχήμα 12.1. : Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού Ολικών Φλαβονοειδών.

	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
Φλαβονοειδή				
($\mu\text{g}/100\text{g}$ ντομάτα)	$12,25 \pm 7,84$	$14,89 \pm 1,70$	$1,985 \pm 0,88$	$5,446429 \pm 0,71$

Πίνακας 12.2. : Συγκέντρωση φλαβονοειδών και λυκοπένιου στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).



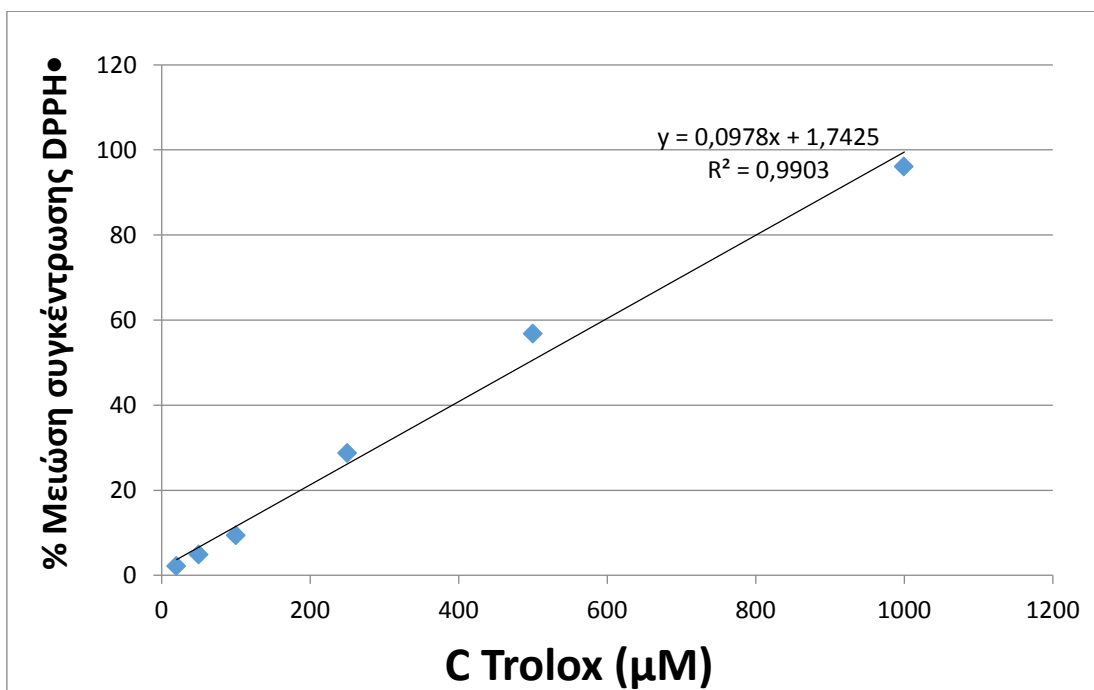
Σχήμα 12.2. : Συγκέντρωσης φλαβονοειδών στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out). Οι στήλες που υποδεικνύονται με ίδια γράμματα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

13. Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Antioxidant Activity) με χρήση της μεθόδου DPPH

Δείγματα (μM)	A σε 30 min
1000	0,040
500	0,440
250	0,726
100	0,923
50	0,969
20	0,997
control	0,019

Πίνακας 13.1. : Συγκέντρωση προτύπων και απορρόφησή τους.

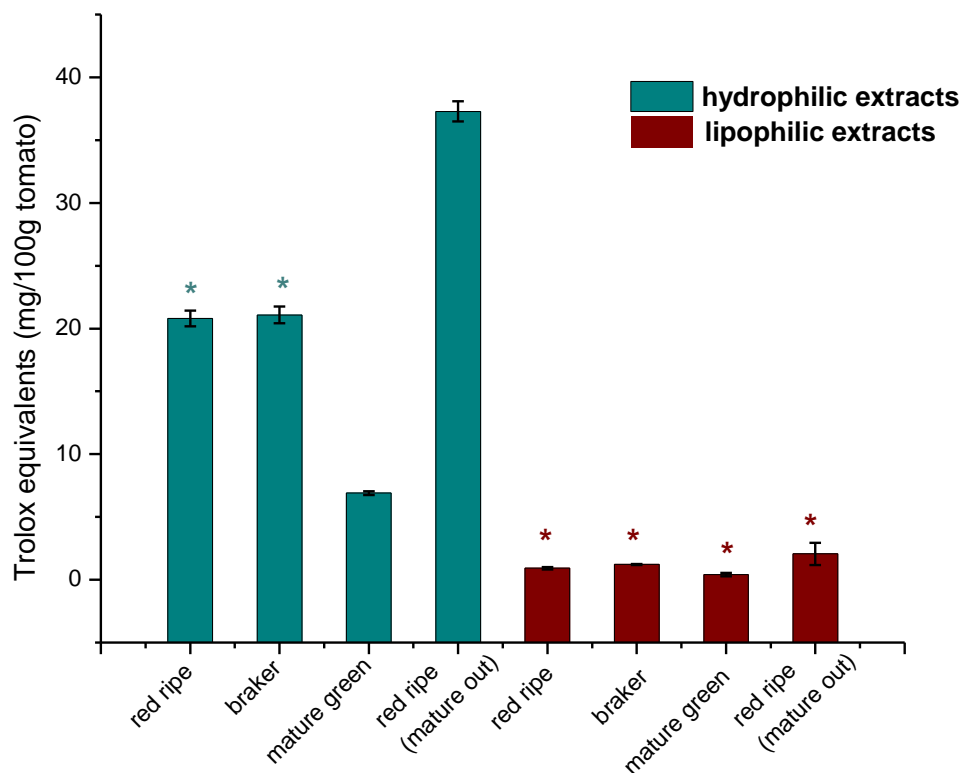
Με βάση τον παραπάνω πίνακα κατασκευάζεται η εξής πρότυπη καμπύλη:



Σχῆμα 13.1. : Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου DPPH.

	Υδροφιλο Εκχύλισμα				Λιπόφιλο Εκχύλισμα			
	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
DPPH (ισοδύναμα Trolox mg/100g ντομάτα)	20,81 ± 0,87	21,09 ± 1,17	6,90 ± 0,26	37,29 ± 1,39	0,92 ± 0,12	1,22 ± 0,05	0,42 ± 0,19	2,95 ± 0,16

Πίνακας 13.2. : Αντιοξειδωτικά ικανότητα υδροφιλων και λιπόφιλων εκχυλισμάτων στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).



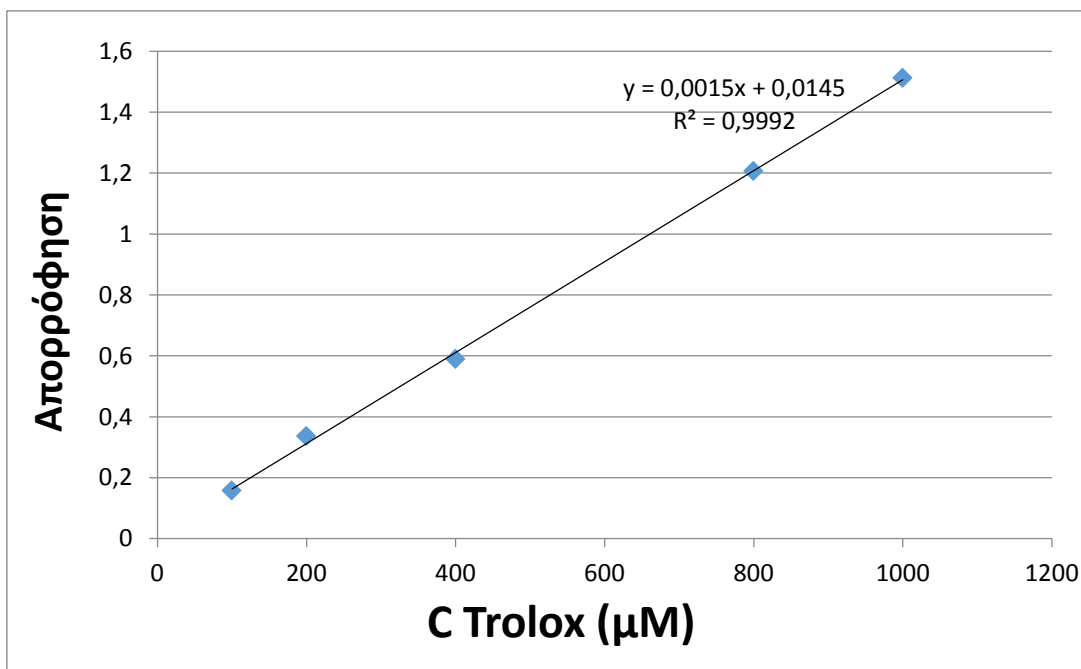
Σχήμα 13.2. : Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out) που προσδιορίστηκε με την μέθοδο DPPH. Ο αστερίσκος υποδεικνύει διαφορές μεταξύ των στηλών ίδιου χρώματος στατιστικά μη σημαντικές.

14. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος τομάτας με χρήση της μεθόδου FRAP

C (μM Trolox)	A
1000	1,512
800	1,206
400	0,589
200	0,336
100	0,158

Πίνακας 14.1. : Συγκέντρωση προτύπων και απορρόφησή τους

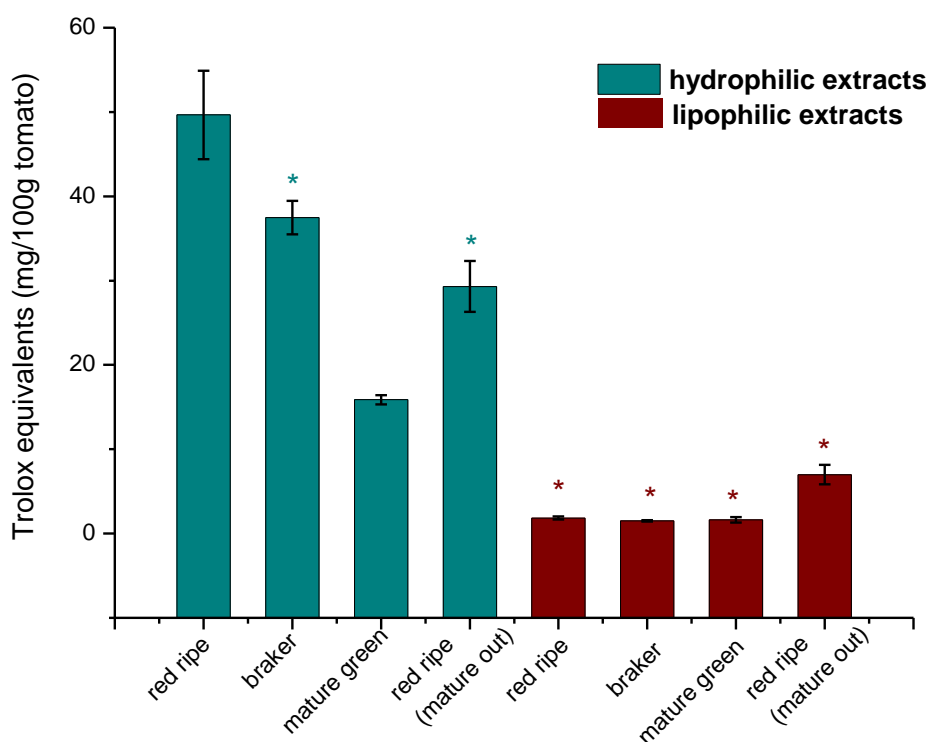
Με βάση το παραπάνω πίνακάκι κατασκευάζουμε την εξής πρότυπη καμπύλη:



Σχήμα 14.1. : Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου FRAP.

	Υδροφιλο Εκχύλισμα				Λιπόφιλο Εκχύλισμα			
	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
FRAP (ισοδύναμα Trolox mg/100g ντομάτα)	49,67 ± 9,10	37,48 ± 3,43	15,89 ± 0,95	29,31 ± 5,23	1,85 ± 0,34	1,49 ± 0,14	1,63 ± 0,44	6,99 ± 1,65

Πίνακας 14.2. : Αντιοξειδωτικά ικανότητα υδροφίλων και λιπόφιλων εκχυλισμάτων στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).



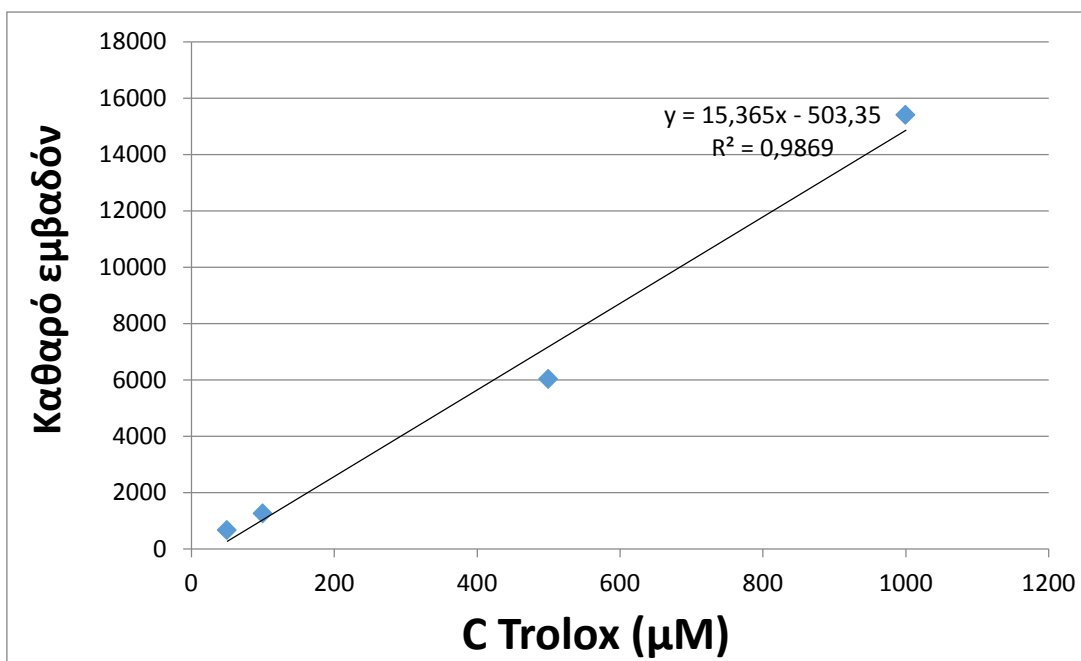
Σχήμα 14.2. : Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out) που προσδιορίστηκε με την μέθοδο FRAP. Ο αστερίσκος υποδεικνύει διαφορές μεταξύ των στηλών ίδιου χρώματος στατιστικά μη σημαντικές.

15. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου ORAC

Καθαρό εμβαδόν	μM Trolox
15396,25	1000
6027,79	500
1249,64	100
665,98	50

Πίνακας 15.1. : Συγκέντρωση προτύπων και απορρόφησή τους

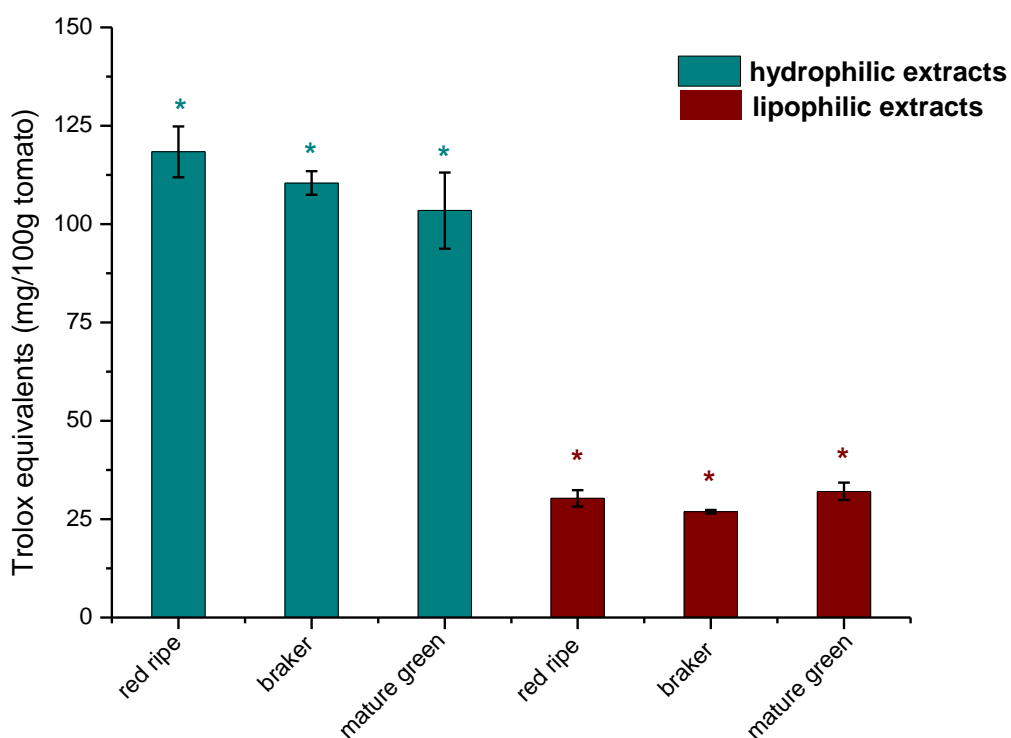
Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις κατασκευάζεται η εξής πρότυπη καμπύλη:



Σχήμα 15.1. : Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου ORAC

	Υδρόφιλο Εκχύλισμα				Λιπόφιλο Εκχύλισμα			
	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
ORAC (ισοδύναμα Trolox mg/100g ντομάτα)	118,372 ± 11,18	110,43 ± 5,21	103,44 ± 16,78	-	30,267 ± 3,59	26,90 ± 0,75	32,07 ± 5,38	-

Πίνακας 15.2. : Αντιοξειδωτικά ικανότητα υδρόφιλων και λιπόφιλων εκχυλισμάτων στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).

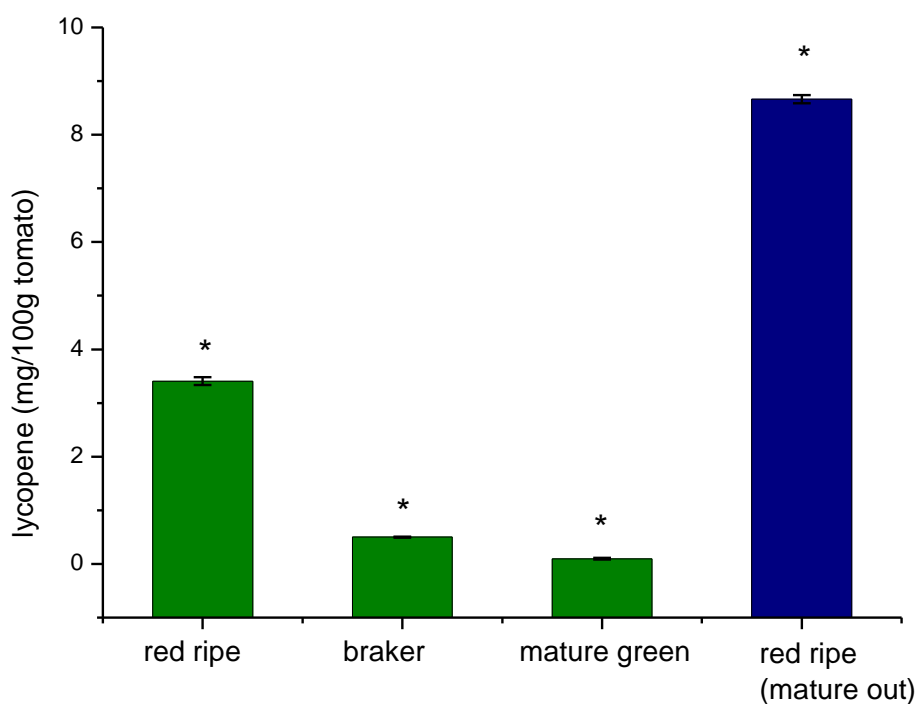


Σχήμα 15.2. : Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα τρία στάδια ωρίμανσης και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out) που προσδιορίστηκε με την μέθοδο ORAC. Ο αστερίσκος υποδεικνύει διαφορές μεταξύ των στηλών ίδιου χρώματος στατιστικά μη σημαντικές.

16.Προσδιορισμός Λυκοπενίου

	Red Ripe	Braker	Mature Green	Red Ripe (mature out)
Λυκοπένιο (mg/100g ντομάτα)	3,41 ± 0,13	0,50 ± 0,02	0,10 ± 0,03	8,66 ± 0,14

Πίνακας 16.1. : Συγκέντρωση πολυφαινολών, φλαβονοειδών και λυκοπενίου στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out).



Σχήμα 16.1. : Συγκέντρωσης λυκοπενίου στα τρία στάδια και μετά την ωρίμανση εκτός φυτού (red ripe mature out). Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά.

17. Συμπεράσματα

Εξετάζοντας τις πολυφαινόλες με τη μέθοδο Folin Ciocalteu παρατηρούμε ότι οι τιμές της τομάτας που ωρίμασαν εκτός φυτού είναι μειωμένες σχεδόν κατά το ήμισυ απ' ότι στα δείγματα τομάτας που ωρίμασαν στο φυτό. Επιπλέον κατά το στάδιο της άγουρης τομάτας οι περιεκτικότητες των πολυφαινολών κυμαίνονται στο $\frac{1}{4}$ από τις τιμές της, με φυσιολογική ωρίμανση. Στα φλαβονοειδή παρατηρούνται υψηλότερες τιμές στο στάδιο brake και χαμηλότερες στο mature green. Ενώ στα δείγματα τομάτας που έφτασαν στο τελικό στάδιο εκτός φυτού οι τιμές είναι σχεδόν στις μισές από αυτές των δειγμάτων σε φυσιολογική ωρίμανση. Στις μεθόδους DPPH και FRAP υπάρχει αύξηση αυτών από τις τομάτες μη φυσιολογικής ωρίμανσης εκτός φυτού σε σύγκριση με αυτές που ωρίμασαν πάνω στο φυτό. Οι τιμές του mature green είναι σχεδόν στο μισό απ' αυτές. Στα λιπόφιλα έχουμε παρόμοιες περιεκτικότητες σε όλα τα στάδια με μικρή αύξηση σ' αυτές που ωρίμασαν εκτός φυτού. Κατά τη διαδικασία ORAC έχουμε μικρές διαφορές σε όλα τα δείγματα. Ενώ στα λιπόφιλα παρατηρούμε το ίδιο φαινόμενο όπως και στις μεθόδους FRAP και DPPH. Τέλος στα δείγματα λυκοπενίου τα αποτελέσματα μη φυσιολογικού γινώματος είναι διπλάσια από αυτές του φυσιολογικού.

Βιβλιογραφία

- Γαλάρης, Δ. και Δούλιας, Π.Θ. (2001). Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. Χημικά Χρονικά, 2, 49-50.
- Μπόσκογ, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. 4^η Έκδοση, Κεφ. ΙΧ, σελ. 230-232, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.
- Παπαγεωργίου, Γ.Ε. (2005). Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδάση. University Studio Press, σελ. 114-126, Θεσσαλονίκη
- Σουφλερός Ηρ. Ευάγ. (1997), Οινολογία, επιστήμη και τεχνολογία, τόμος 1 και 2 Θεσσαλονίκη : Τυπογραφία Παπαγεωργίου
- Χουλούμα Π.,(2012). Αναλυτική και μοριακή χαρτογράφηση βιοσύνθεσης λυκοπενίου και αντιοξειδωτικής ικανότητας εμπορικά σημαντικών ποικιλιών τομάτας-Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου. Λεμεσός.
- Armstrong GA and Hearst JE (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal*. 10 (2): 228-37.
- Agric J. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 53, 1842-1856.
- Agric J. (2005). The Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements.. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.. 53, 4290-4302.
- Andersen ØM and Markham KR, (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC, Boca Raton, FL
- Arnao M., Cano A., Acosta M., (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31, 89-96
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C., (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37, 693–704.

- Benzie I. F. F. and Strain J. J., (1999). *Methods of Enzymology*, 299, 15.
- Berry Ottaway P., (2001). The roots of a healthy diet. *Chemistry and Industry* 22 January, pp. 42-45
- Benzie, I. F. F., (1996). An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry*., 111-116.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., (1996). The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
- Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C., (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology*., 30, 609-615.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997, 22, 749-760
- Clifford MN, (1985). Chlorogenic acids, in *Coffee*. Vol.1:Chemistry, ed. by Clarke RJ and Macrae R. Elsevier Applied Science, London.
- Davies, J.N and Hobson, G.E., (1981). The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15(3): 205-280.
- Frankel E. N. Meyer A. S., (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80, 1925.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Futakuchi M, Shirai T, Shibutani M, Uneyama C, Toyoda K, Iwata H., (1999). Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Letters*. 143(2):173-178

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S., (1995), Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* 155: 381-386

Huang, M.T., Wood, A. W., Newmark, H.L., (1983), Inhibition of the mutagenicity of bay region of diol-epoxide of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic flavonoids *Carcinogenesis* 4, 1631-1637

Huang, S. W.; Frankel, E. N.; Schwarz, K.; Aeschbach, R.; German, J. B. (1996). Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 44, 2951-2956

Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.; Deemer, E., (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated α -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 50, 1815-1821.

A. Jimenez-Escring, F. Sanchez-Muniz, (2000). "Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism," *Nutrition Research*, vol. 20.

Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B. (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoid and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine* 227(10): 845-851.

Lussignoli, S.; Fraccaroli, M.; Andrioli, G.; Brocco, G.; Bellavite, P., (1999). A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry.*, 269, 38-44.

Lin YL, Cheng CY, et al., (1998). Effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46:1893-99.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, 79(5), 727-747.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Science and Technol.*, 26(2),212.
- Minoggio, M.; Bramati, L.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Iemoli, L.; Santagelo, E.; Mauri, P.L.; Spigno, P.; Soressi, G.P.; Pietta, P.G., (2003). Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Annals of Nutrition and Metabolism* 47(2): 64-69.
- Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K., (2000). Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcinol-type structure. *Carcinogenesis*. 21(5):959-63
- Nakanishi, I.; Fukuhara, K.; Shimada, T.; Ohkubo, K.; Iizuka, Y.; Inami, K.; Mochizuki, M.; Urano, S.; Itoh, S.; Miyata, N.; Fukuzumi, S. (2002). Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical derived from a vitamin E analogue: mechanistic insight into antioxidative hydrogen transfer reaction of vitamin E. *Journal of the Chemical Society., Perkin Trans. 2*, 1520.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 49, 4619-4926.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.; Deemer, E. K.; Prior, R. L.; Huang, D., (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50, 2772-2777.
- Ou, B.; Prior, R. L.; Huang, D., (2005). The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
- Pantos, C.E.. Markakis, P., (1973). Ascorbic acid content of artificially ripened tomatoes. *Journal of Food Science* 38: 550.

Perkampus, (1991). H.-H. UV-Vis Atlas of Organic Compounds, 2nd ed.; VCH: New York, Part II, J4124, p 1139.

Petro-Turza M, (1987). Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International* 2:309–351

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon M. (2001). *Antioxidants in Food Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited.

Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R., (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 3273-3279.

Prior, R.L., Wu, X.L. and Schaich, K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., 53(10), 4290–4302.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F., (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 3396-3402.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol and Medicine*.,26 (9/10), 1231-1237.

Roberfroid, M. and Calderon, P., (1990). *Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological System*, 1,17-19, Belgium.

Ruh, M. F., Zacharewsky, T., Connor, K., Howell, J., Chen, I. , Safe, S., (1995). Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochemical Pharmacology*. 50:1485-1493

Shahidi F, Wanasundara J. (1992), Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67-103

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F., (1995).

Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine* 19:481-486.

Sanchez-Moreno C., (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International.*, 8, 121-137.

Shahidi F, Wanasundara J., (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67-103

Singleton, V.L.; Orthofer, R., (1999). Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* , 299, 152-178.

Singleton, V.L.; Rossi, J.A., Jr., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* , 16, 144-158.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L and Byrne DH., (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669–675.

Walker JRL, (1962). Phenolic acids in 'cloud' and normal tomato fruit wall tissue. *Journal of the Science of Food Agriculture.* 13:363–367.

Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A., (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society.* 123, 1173-1183.

Yilmaz E, (2001). The chemistry of fresh tomato flavour. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 25:149–155.