ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΟΦΙΑ ΤΖΕΒΕΛΕΚΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΟΦΙΑ ΤΖΕΒΕΛΕΚΟΥ

Επιβλέπων: Ιωακείμ Σπηλιόπουλος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

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

ΣΟΦΙΑ ΤΖΕΒΕΛΕΚΟΥ

02/04/2017

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα 4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6
ABSTRACT 8
1.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΜΑΤΑΣ 10
2.3.Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών 18
2.3.1. Καροτενοειδή ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
2.3.2. Β-Καροτένιο 20
2.3.3. Βιταμίνη Α 21
2.3.4. Λυκοπένιο 21
2.3.4.1. Μέθοδος εκτίμησης λυκοπενίου με φασματοσκοπία 23
2.3.5. Συνένζυμο Q10 23
2.3.6. Βιταμίνη Ε 24
2.3.7. Πολυφαινόλες 25
2.3.7.1. Φαινολικά Οξέα 26
2.3.7.2. Φλαβονοειδή 28
2.3.7.3. Τανίνες 29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ 31
3.2. Μηχανισμός Αυτοοξείδωσης 32
3.3. Διάγραμμα αντιδράσεων 33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 41
5.1. Σκοπός Πειράματος 41
5.3. Μέθοδος Προσδιορισμού Λυκοπενίου 43
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 50
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 50
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 50

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή Ιωακείμ Σπηλιώπουλο τον υπέυθυνο καθηγητή για την πτυχιακή μου εργασία, για την καθοδήγηση του και τις συμβουλές του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξη, την υπομονή και τη βοήθειά τους κατά την προσπάθεια υλοποίησης του στόχου μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιοξειδωτική ικανότητα της τομάτας εξαρτάται από την ποικιλία της και τις συνθήκες επεξεργασίας. Οι σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών είναι το λυκοπένιο το οποίο δίνει το κόκκινο αυτό χρώμα της τομάτας και ανήκει στα καροτενοειδή, καθώς επίσης και οι πολυφαινόλες οι οποίες περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή που έχουν αντικαρκινική δράση.

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία αναφέρεται σε πειραματική έρευνα που έγινε σε διάφορες ποικιλίες τομάτας για να μετρηθεί η συγκέντρωση λυκοπενίου και πολυφαινολών.

Στην πειραματική αυτή έρευνα χρησιμοποιήθηκαν: η φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του λυκοπενίου με λιπόφυλη εκχύλιση και η φωτομετρική μέθοδος Folin για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών.

Λέξεις κλειδιά: τομάτα, λυκοπένιο, αντιοξειδωτικά, φωτομετρικός προσδιορισμός, πολυφαινόλες .

ABSTRACT

The antioxidant activity of a tomato is affected by according to the type and process conditions. The most important of tomato are antioxidants are lycopene, which gives its red color and belongs to the carotenoids, and polyphenols which include phenolic acids and flavonoids that have anticancer activity.

This specific thesis deals with the experimental research on the concentration of lycopene and polyphenols of nine tomato varieties.

The following methods were used: the photometric method for the determination of lycopene after lipophylic extraction and photometric Folin method for the determination of polyphenols after hyfrophylic extraction.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΑΡΠΟΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.1. Δομή Καρπού

Η τομάτα (Solanum Lycopersicum ή Lycopersiconesculentum Mill) ανήκει στην οικογένεια της πατάτας Solanaceae και είναι φυτό ποώδες το οποίο ευδοκιμεί σε όλο τον κόσμο κι αποτελεί τη δημοφιλέστερη καλλιέργεια κήπου. Ο καρπός της έρχεται δεύτερος σε κατανάλωση παγκοσμίως και αυτό γιατί συμβάλλει σε μια καλή, ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή, λόγω των διαφόρων ενώσεων που δρούν ευεργερτικά στον οργανισμό του ανθρώπου.

Η δομή της τομάτας περιέχει το περικάρπιο, τον ιστό πλακούντα και σπόρια. Επίσης το δέρμα του περικαρπίου έχει επιπλέον επιδερμικό στρώμα. Ο ιστός της είναι συμπαγής. Η επιδερμίδα περιβάλλεται από λεπτή επιπλέον επιδερμίδα και πολυεδρικά κύτταρα. Η τομάτα δημιουργεί τρίχες και αδένες που πέφτουν κατά την ωρίμανση. Οι τρίχες περιέχουν πέντε κελιά, οι αδένες από την άλλη αποτελούνται από μονοκύτταρο μίσχο και κορυφή δύο ή τεσσάρων κυττάρων. Κατά την γήρανση του καρπού τομάτας σημειώθηκε πάχυνση επιδερμίδας και απουσία στομάτων επιδερμίδας. Στην ανάπτυξη τα κύτταρα αυξάνουν το μέγεθος τους.

Όσο το φρούτο ωριμάζει κύτταρα μπορεί να αποσυντεθούν. Τα ωάρια αναπτύσσονται προς τα έξω μέσω παρεγχύματος το οποίο περιβάλλει πλήρως τους σπόρους που αναπτύσσονται σε ομοιογενείς ιστούς κυττάρων σε μονά τοιχώματα.(Salunkhe, 1974)

1.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΜΑΤΑΣ

Σάκχαρα

Η περιεκτικότητα σακχάρων δίνει την γέυση στις τομάτες, μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι τόσο πιο έντονη είναι η γεύση. Τα ελεύθερα σάκχαρα D-φρουκτόζη και D-γλυκόζη αποτελούν πάνω από το 60% των διαλυτών στερεών. Τα σάκχαρα και η ποσότητα αυτών συνδέεται άμεσα με το στάδιο ωρίμανσης. Καθώς η ωρίμανση προχωρά αυξάνονται και τα σάκχαρα.

Άμυλο

Το άμυλο και η περιεκτικότητα αυτού στις τομάτες εξαρτάται από την ωριμότητα του καρπού. Στο στάδιο ωρίμανσης όπου ο καρπός έχει πράσινο χρώμα έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα σε άμυλο κι όσο η ωρίμανση προχωρά το άμυλο μειώνεται και στο τελικό στάδιο ωρίμανσης η περιεκτικότητα είναι σχετικά χαμηλή.

Πηκτίνες

Οι πηκτινικές ουσίες αλλάζουν κατά την ωρίμανση καθώς σε πράσινο καρπό η πρωτοπηκτίνη κυριαρχεί, έπειτα όμως στην πορεία της ωρίμανσης μειώθηκε η πρωτοπηκτίνη λόγω μερικής ενζυματικής υδρόλυσης και αυξήθηκε η διαλυτή πηκτίνη. Έλλειψη ποσότητας πηκτικού επιφέρει μαλάκωμα του καρπού κατά την ωρίμανση.

Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς βιταμίνη C δεν επηρεάζεται από την πορεία της ωρίμανσης. Οι τιμές όμως διαφέρουν από ποικιλία σε ποικιλία. Για παράδειγμα τομάτες οι οποίες ωρίμασαν γρηγορότερα είχαν μεγαλύτερο ποσοστό βιταμίνης C από άλλες που ωρίμασαν πιο αργά.

Οργανικά οξέα

Μερικά από τα οργανικά οξέα είναι το κιτρικό, μηλικό, οξικό, μυρμηγκικό, γαλακτικό και άλλα. Όσο προχωρά η ωρίμανση τόσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε οξέα με μέγιστη τιμή στο στάδιο όπου ο καρπός είναι ρόζ, έπειτα μειώνεται η περιεκτικότητα. Η οξύτητα είναι σημαντική για την γεύση αλλά και για τη θανάτωση μικροοργανισμών όπως θερμόφιλοι, σηπτικοί, αναερόβιοι και βουτηρικοί οι οποίοι δεν αναπτύσσονται σε ph<4,3. Με ph>5 είναι δύσκολο να θανατωθούν τα σπόρια μικροοργανισμών.

Αμινοξέα

Συνολικά τα αμινοξέα παραμένουν σταθερά ποσοτικά κατά την ωρίμανση. Η σύνθεσή τους όμως επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επίσης μερικά αμινοξέα μπορούν να δράσουν ως πρόδρομα πτητικών ενώσεων.

Πρωτεϊνες και ένζυμα

Οι πτητικές ενώσεις μειώνουν την περιεκτικότητα σε πρωτεϊνες. Τα ένζυμα σε κάθε στάδιο ωρίμανσης καθορίζονται από τις ταχύτητες σύνθεσης και αποδόμησης όπως και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα ένζυμα και η καταλυτική τους δράση παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και το άρωμα του καρπού.

Στεροειδή

Στην τομάτα εμπεριέχονται η τοματίνη, ένα γλυκοζιτικό στερεοειδές αλκαλοειδές και ίχνη σολανίνης. Η τοματίνη έχει μέγιστο στο στάδιο όπου ο καρπός έχει πράσινο χρώμα και μειώνεται φτάνοντας στη μισή ποσότητα όταν ο καρπός κιτρινίζει. Στο τελικό στάδιο, δηλαδή όταν είναι κόκκινος ο καρπός, έχει σχεδόν χαθεί όλη η τοματίνη.

Χρωστικές ουσίες

Μέχρι τη στιγμή της φωτοσύνθεσης οι χλωροφύλλες α,β κυριαρχούν ως πράσινο. Τα χρώματα που παίρνει στη συνέχεια ο καρπός είναι πράσινο-κίτρινο, κίτρινο-πορτοκαλί, πορτοκαλί-κίτρινο, πορτοκαλί-κόκκινο, κόκκινο. Το β-καροτένιο και το λυκοπένιο βοηθούν στο κόκκινο χρώμα. Υπάρχουν κι άλλα καροτενοειδή όπως φυτοένιο, φυτολουένιο τα οποία είναι άχρωμα.

Φλαβονοειδή

Το χρώμα που δίνουν τα φλαβονοειδή στον καρπό προσφέρει ευχαρίστηση στο μάτι του καταναλωτή. Επίσης δίνουν στυφή γεύση στη τομάτα και το σύνολό τους αυξάνεται όσο προχωρά η ωρίμανση.

Λιπίδια

Τα λιπίδια περιέχουν τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, στερόλες και εστέρες αυτών, ελεύθερα λιπαρά οξέα και υδρογονάνθρακες. Τα λιπίδια βρίσκονται στο περικάρπιο της τομάτας και δεν σχετίζονται με το χρώμα του καρπού.

Μεταλλικά ιόντα

Εξαιτίας αύξησης διαπερατότητας και οργάνωσης κυττάρου οξεοβασικής ισορροπίας και ενεργοποίησης ενζυματικών συστημάτων αυξάνονται τα μεταλλικά. Αν και βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στον καρπό ως ξηρές ουσίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και τη διατροφική σύνθεση προϊόντος.(Salunkhe, 1974)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

2.1. Γενικά

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να είναι είτε άτομο, είτε μόριο ή ιόν το οποίο έχει μονήρες ηλεκτρόνιο. Όταν το μονήρες ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε οξυγόνο, άζωτο, θείο οι ενώσεις ονομάζονται ROS, RNS, RSS.(Carocho, 2012)

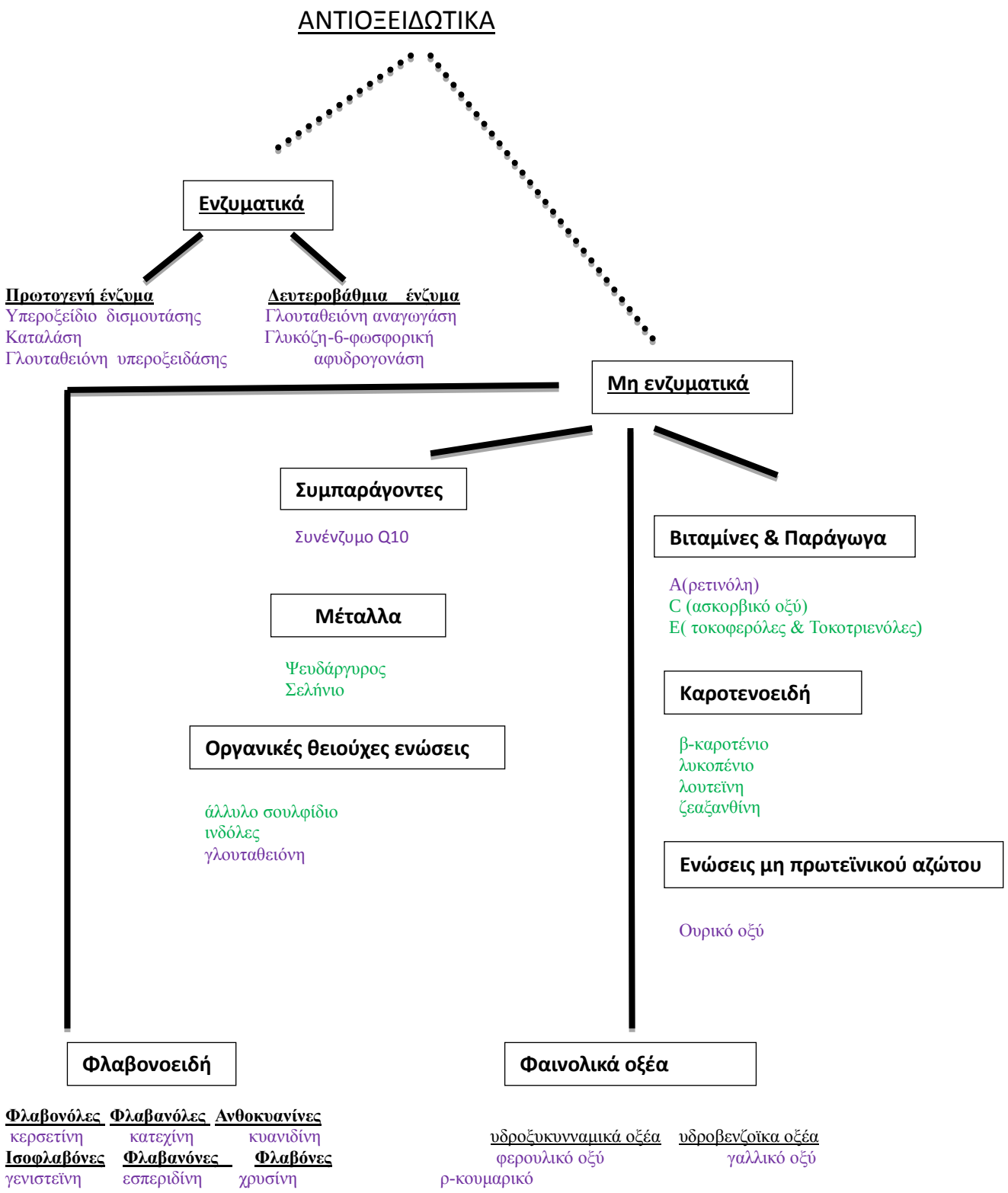
ROS είναι οι ενώσεις οξυγόνου οι οποίες έχουν ελεύθερες ρίζες όπως το ανιόν υπεροξειδίου, υδροπεροξύλ ρίζα, ρίζα υδροξυλίου, και άλλα. RNS είναι αντιδραστήρια ειδών αζώτου που προέρχονται από αντιδράσεις NO με O_2^- και σχηματίζουν $ONOO^-$. RSS είναι ενώσεις θείου και σχηματίζονται από την αντιδραση του ROS με θειόλες. Υπό οξειδωτικές συνθήκες προέρχονται από θειόλες και δημιουργούν δισουλφίδιο-S-μονοξείδιο ή δισουλφίδιο-S-διοξείδιο ως ενδιάμεσο μόριο. Τέλος μια αντίδραση με μειωμένη θειόλη οδηγεί σε δημιουργία θειϊκού ή θειϊκού οξέος.

Το ανιόν του υπεροξειδίου που σχηματίζεται από τον διαχωρισμό υπεροξύλ ρίζας σε ph 7 είναι αρκετά δραστικό και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα μορια για την παραγωγή ROS απευθείας ή μέσω ενζύμου ή μέταλλο-καταλυτικών διεργασιών. Το ιόν υπεροξειδίου μπορεί να μετατραπεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου μέσω αυτοξειδοαναγωγής με δισμουτάση υπεροξειδίου και με νερό από το ένζυμο καταλάση. Άν το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με καταλύτη σιδήρου Fe^{2+} συμβαίνει Fenton αντίδραση και σχηματίζεται ρίζα υδροξυλίου.

Οι εσωτερικοί παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών είναι η παραγωγή τους μέσα στο μιτοχόνδριο λόγω οξειδάσης της ξανθίνης, ισχαιμίας, σωματικής άσκησης, φαγοκυττάρωσης και άλλων. Υπάρχουν όμως και εξωτερικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα, ακτινοβολία, φυτοφάρμακα, περιβαλλοντικοί ρύποι και άλλα. Τα κύτταρα παρουσιάζουν συνέπειες οξειδωτικού στρές κυρίως όταν η ισορροπία παραγωγής και εξουδετέρωσης ROS με αντιοξειδωτικά κλίνει προς αυξημένη παραγωγή ROS.

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Με τη σειρά τους τα ενζυμικά χωρίζονται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Τα πρωτογενή περιλαμβάνουν τρία ενδογενή ένζυμα τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Το ένα είναι η γλουταθειόνη υπεροξειδάση η οποία δίνει δύο ηλεκτρόνια για να ελαττώσει τα υπεροξέιδια ώστε να μην δημιουργηθούν σελενόλες και εξουδετερώνει υπεροξείδια που μπορούν να γίνουν πιθανά υποστρώματα της Fenton αντίδρασης. Η καταλάση η οποία είναι το δεύτερο ενδογενές ένζυμο μετατρέπει το υδρογόνο σε υπεροξείδιο σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Τέλος το υπεροξείδιο της δισμουτάσης μετατρέπει ανιόντα υπεροξειδίου σε υπεροξείδια υδρογόνου.

Τα δευτερογενή ένζυμα περιλαμβάνουν την γλουταθειόνη αναγωγάσης και την γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση. Η γλουταθειόνη αναγωγάσης ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη και η ανακύκλωσή της εξουδετερώνει πιο πολλές ελεύθερες ρίζες. Η γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση αναγεννά NADPH (συνένζυμο αναβολικών αντιδράσεων) κι έτσι δημιουργεί αναγωγικό περιβάλλον. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει αναλυτικά τις κατηγορίες των αντιοξειδωτικών.(Carocho, 2012)



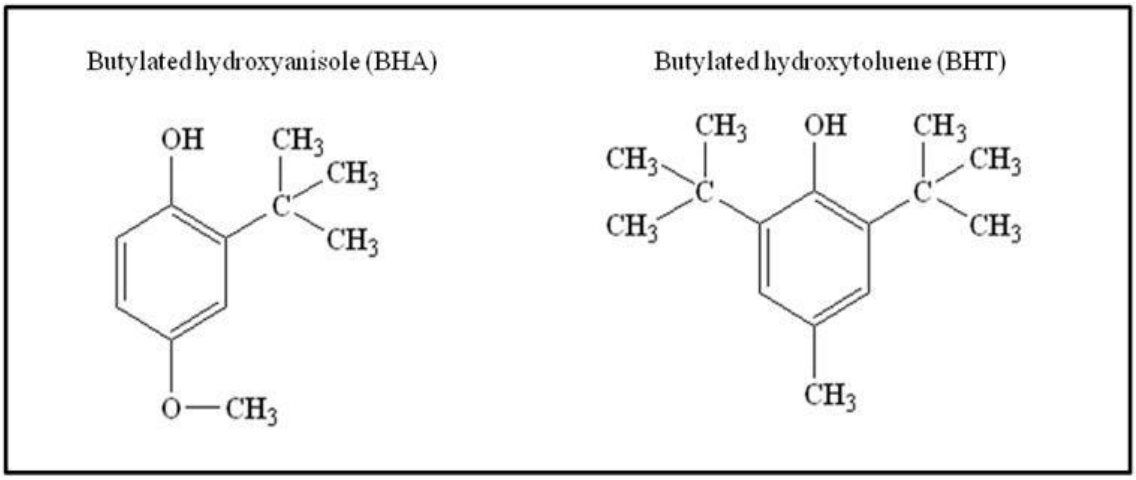
Εικόνα 2.1. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται οι κατηγορίες των αντιξειδωτικών. Με μώβ γράμματα είναι τα εξωγενή αντιοξειδωτικάκαι με πράσινα τα ενδογενή αντιοξειδωτικά.(Carocho, 2012)

2.2. Κατάταξη Αντιοξειδωτικών

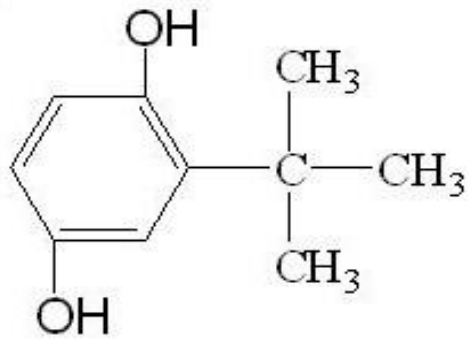
Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

• **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 BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), ηTBHQ (δι-τριτ-βουτυλουδροκινόνη), oPG (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).



Εικόνα 2.2.Χημικές δομές BHT και BHA.



TBHQ

Εικόνα 2.3.Χημική δομή TBHQ.

• **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 οξείδωσης. 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 αυτοοξείδωσης. Την ικανότητα αυτή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), ο παλμιτικός του εστέρας, το ερυθορβικό 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 διαλυμένο οξυγόνο, είτε απομακρύνοντας συστατικά του τροφίμου που είναι ευοξείδωτα. 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.Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

2.3.1. Καροτενοειδή

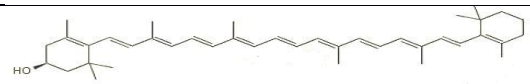
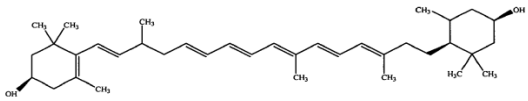
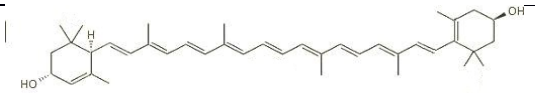
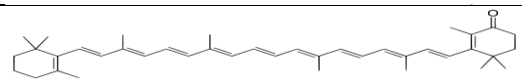
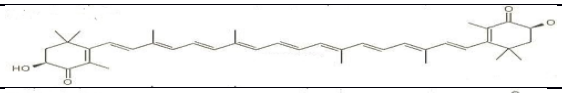
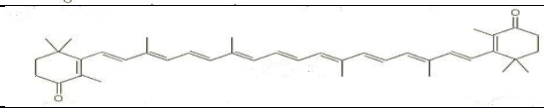
Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές οι οποίες δημιουργούνται από τα φυτά και από μικροοργανισμούς όχι όμως από ζώα. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες: τους καροτενοειδείς υδρογονάνθρακες (καροτένια) που εμπεριέχουν ενώσεις όπως λυκοπένιο και β-καροτένιο, και τα οξυγονωμένα καροτενοειδή όπως οι ξανθοφύλλες, ζεαξανθίνη και λουτεϊνη. Τα καροτενοειδή έχουν μια σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, το υψηλής ενεργειακής κατάστασης μονοατομικό οξυγόνο ξαναγυρνά στην διεγερμένη κατάσταση βοηθώντας να ικανοποιηθούν περισσότερα είδη ριζών. Οι μοναδικές ελεύθερες ρίζες που καταστρέφουν τα καροτενοειδή είναι οι υπεροξειδικές ρίζες.

Επίσης τα καροτενοειδή υπάρχει περίπτωση να εμφανίσουν προοξειδωτικές επιπτώσεις λόγω αυτό-οξείδωσης με υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου που δημιουργούν ρίζες υδροξυλίου.(Carocho, 2012)

Δομικά τα καροτενοειδή είναι πολισοπρενοειδή βουτηριλιωμένα ύδροξυτολουόλια (BHT) και είναι ενωσεις οι οποίες δημιουργούνται από συνδέσεις ουράς-ουράς μορίων γερανύλγερανυλ C_{20}. Όλα τα καροτενοειδή παράγονται από το μητρικό σκελετό με $C_{40.}$ Διακρίνονται σε καροτενοειδή υδρογονανθράκων τα οποία δημιουργούνται μόνο από Η και C και λέγονται καροτένια, και τα οξειδωμένα καροτενοειδή τα οποία έχουν ομάδες Ο-υποκαταστάτη όπως υδροξύλιο, κετό και εποξειδικά προϊόντα, αυτά λέγονται ξανθοφύλλες.

Τα καροτενοειδή έχουν σύστημα συζευγμένου διπλού δεσμού από το οποίο παράγονται κάποια φασματομετρικά χαρακτηριστικά. Στα άκρα του μορίου τα καροτενοειδή παρουσιάζουν γραμμικές ή κυκλικές ενώσεις, κυκλοεξάνιο και κυκλοπεντάνιο. Αυτός ο συνδυασμός των ενώσεων με προσθήκη ομάδων που περιέχουν οξυγόνο και αλλαγές στο επίπεδο υδρογόνωσης είναι η αιτία σχηματισμού των περισσότερων δομών των καροτενοειδών.(Oliver, 2000)

Πίνακας 1. Αντιοξειδωτική ικανότητα μετρημένη ως TEAC των διαφορων καροτενοειδων.(Miller, 1996)

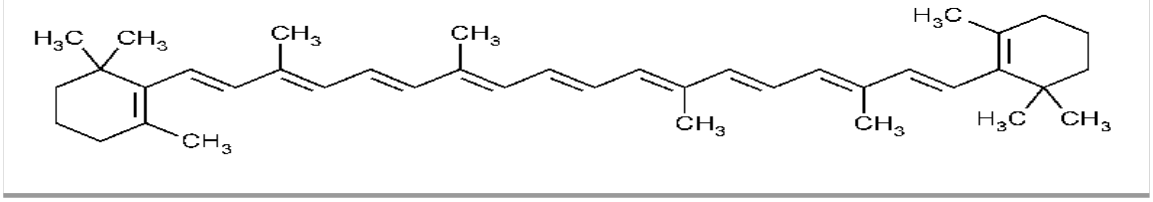
Καροτενοειδή	Δομή	TEAC mM
Λυκοπένιο		2,9 ± 0,15
β –καροτένιο		1,9 ± 0,1
α-καροτένιο		1,3 ± 0,04
β-κρυπτοξανθίνη		2,0 ± 0,02
Ζεαξανθίνη		1,4 ± 0,04
Λουτεϊνη		1,5 ± 0,1
Echinenone		0,7 ± 0,2
Ασταξανθίνη		0,03 ± 0,03
Κανθαξανθίνη		0,02 ± 0,02

2.3.2. Β-Καροτένιο

Το β-καροτένιο το οποίο ανήκει στα καροτενοειδή έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρα με ελεύθερες ρίζες και λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό σπασμένης αλυσίδας. Προστατεύει και από ασθένειες ανθρώπων οι οποίοι είναι φωτοευαίσθητοι.

Το β-καροτένιο έχει χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα στη τομάτα από ότι το λυκοπένιο. In vivo μελέτες έδειξαν ότι η θερμική επεξεργασία μειώνει ή και αλλάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του β-καροτενίου. Επίσης το β-καροτένιο μαζί με άλλα καροτενοειδή μπορεί να μειωθεί λόγω πηκτίνης η οποία αποτελεί το ένα τρίτο του κυτταρικού τοιχώματος της τομάτας.

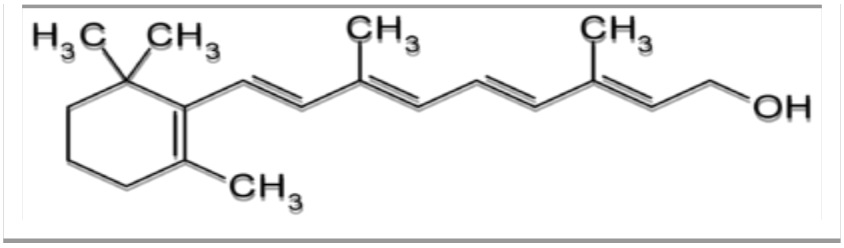
Στις in vitro μελέτες έδειξαν ότι το λυκοπένιο και η απορρόφηση του ενισχύεται από την θερμική επεξεργασία και η απορρόφηση β-καροτενίου αυξήθηκαν με επεξεργασία υψηλής πίεσης.(Miller, 1996; Kamiloglu 2012)



Εικόνα 2.4. Χημική δομή β -καροτενίου.

2.3.3. Βιταμίνη Α

Η βιταμίνη Α που ανήκει επίσης στα καροτενοειδή παράγεται στο ήπαρ και δημιουργείται από την ανάλυση β-καροτενίου. Η βιταμίνη Α έχει δώδεκα μορφές οι οποίες απομονώνονται και η δράση της βοηθά σε εσωτερικά όργανα του ανθρώπου κατά κύριο λόγο αλλά και σε δέρμα, μάτια. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα οφείλεται στο συνδυασμό των ριζών υπεροξυλίου πριν την υπεροξείδωση στα λιπίδια.(Carocho, 2012)



Εικόνα 2.5. Χημική δομή βιταμίνης Α.(Belitz et.al, 2009)

2.3.4. 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. Είναι συμμετρικό, γραμμικό και μη κυκλικό καροτενοειδές του β-καροτενίου κι έχει δεκατρείς διπλούς δεσμούς. Οι έντεκα από αυτους είναι συζευγμένοι σε κάθε άκρο. Αυτοί οι διπλοί δεσμοί βρίσκονται στην

αλυσίδα πολυενίου του λυκοπενίου. Χωρίζεται σε δύο μορφές με αποτέλεσμα να δημιουργούνται χιλιάδες ισομερή.

Τα trans λυκοπενίου μετατρέπονται σε cis-ισομερή λόγω φωτός ή θερμότητας ή κάποιας χημικής αντίδρασης που εισέρχεται πλαγίως κατά μήκος του συζευγμένου διπλού δεσμού. Το λυκοπένιο μαζί με λιποπρωτεϊνες χαμηλής πυκνότητας μεταφέρονται σε ιστούς του ήπατος, του προστάτη και άλλων οργάνων.

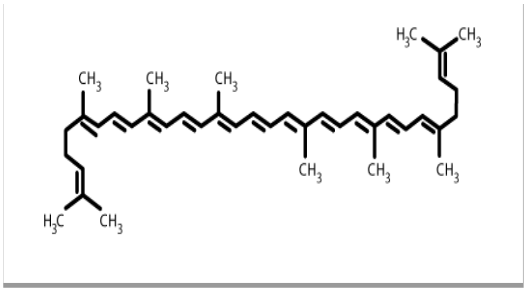
Τα cis-ισομερή έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα trans-λυκοπένια. Για να έχει δράση το λυκοπένιο στον ανθρώπινο οργανισμό πρέπει αυτό να απορροφηθεί στο αίμα. Η θρεπτική αξία του ωστόσο μπορεί να μετρηθεί με τη μέτρηση θρεπτικής βιοδιαθεσιμότητας. Το λυκοπένιο στη τομάτα βρίσκεται στους χρωμοπλάστες της και ως σύμπλοκα καροτενοειδών-πρωτεϊνών ή ως στερεοί μικροκρύσταλλοι συνδέονται με τη δομή της μεμβράνης. Όταν η τομάτα δέχεται επεξεργασία υπάρχει περίπτωση να τροποποιηθεί το συζευγμένο λυκοπένιο κι έτσι να επηρεάσει την βιοπροσπελασιμότητα του λυκοπενίου. Η επίδραση αυτή μελετάται και in vivo αλλά και in vitro. Η θερμική επεξεργασία έχει αρνητική επίδραση στη βιοπροσπελασιμότητα του λυκοπενιου. Όμως στο βρασμό, στο ψήσιμο, μικροκύματα δεν συμβαίνει κατι τέτοιο. (Kamiloglu, 2012)

Η απορρόφηση του λυκοπενίου κυμαίνεται στα 10-30% και είναι μικρότερη σε φρέσκες και μη επεξεργασμένες τομάτες από ότι σε επεξεργασμένες. Η βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου ουσιαστικά είναι η προσβασιμότητα του στον ανθρώπινο οργανισμό. Η απορρόφηση λυκοπενίου επηρεάζεται και από τη διατροφή και ιδιαίτερα από ίνες, λιπίδια, βιταμίνες, μέταλλα και άλλα καροτενοειδή. Το λυκοπένιο διαλύεται στο λάδι γιατί είναι υδρόφοβο. Άρα η κατανάλωση λυκοπενίου μαζί με λάδι βοηθά στην απορρόφησή του από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Ωστόσο η παρουσία ινών στη διατροφή μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου αλλά και άλλων καροτενοειδών. Επειδή το λυκοπένιο έχει λιπόφιλη ιδιότητα μετά την κατανάλωσή του ενσωματώνεται σε μικύλλια τα οποία είναι

ανακατεμένα και μέσω παθητικής διάχυσης απορροφούνται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.

Το λυκοπένιο στην ομογενοποίηση, την εκχύλιση χυμού και την αποστείρωση με ατμό παραμένει σταθερό. Κατά την επεξεργασία με θέρμανση κατά 10-30%. Τα cis-ισομερή και μετά την επεξεργασία παραμένουν σταθερά. Κατά την επεξεργασία της τομάτας θεραπείες όπως μηχανική διατάρραξη της υφής με ατμό μπορεί να μετουσιώσει τις πολύπλοκες λυκοπρωτεϊνες και να απελευθερωθεί το λυκοπένιο από το κυτταρικό πλέγμα κι έτσι να είναι διαθέσιμο για να απορροφηθεί ευκολότερα από τον οργανισμό.(Shi, 2004)



Εικόνα 2.6. Χημική δομή λυκοπενίου.

2.3.4.1. Μέθοδος εκτίμησης λυκοπενίου με φασματοσκοπία

Με μέθοδο των Sharma και Le Maguer έγινε εκχύλιση λυκοπενίου από τομάτες με εξάνιο: αιθανόλη:ακετόνη (2:1:1) 1 g δείγματος ομογενοποιήθηκε και 25 ml εξανίου:αιθανόλης:ακετόνης και τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναμεικτήρα για 30 λεπτά. Το διάλυμα αφήνεται να χωριστεί σε πολικά και μη πολικά στρώματα και μετριέται η απορρόφηση στα 472nm και 502nm με τυφλό εξάνιο. Η συγκέντρωση λυκοπενίου υπολογίστηκε με συντελεστή απόσβεσης (E% 1cm) 3450 σε εξάνιο στα 472nm και 3150 στα 502nm . Η συγκέντρωση εκφράστηκε ως mg/100g φρέσκων ουσιών.(Moigrădean, 2007)

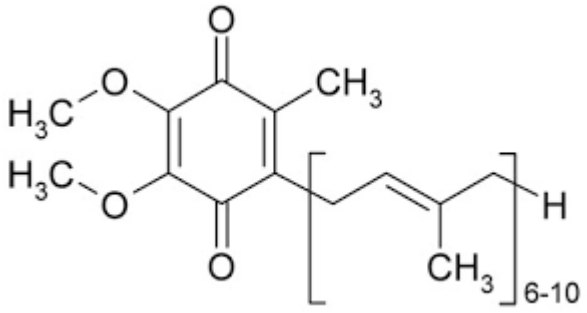
2.3.5. Συνένζυμο Q10

Στις μεμβράνες αλλά και στα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος υπάρχει το συνένζυμο Q10, το οποίο συμβάλλει στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην αναπνευστική αλυσίδα. Επίσης το Q10 εμποδίζει τις λιπιδικές ρίζες υπεροξυδίου να

δημιουργηθούν, αν και έχει ειπωθεί ότι μπορεί να εξαφανίσει αυτές τις ρίζες ακόμα κι αν αυτές έχουν ήδη δημιουργηθεί.

Ακόμη μια ικανότητα του Q10 είναι ότι αναγεννά την βιταμίνη Ε (που από μερικούς συγγραφείς πιο πιθανά γίνεται μέσω ασκορβικού δηλαδή βιταμίνης C).(Carocho, 2012)

Ένα άλλο όνομα για το συνένζυμο Q10 είναι ουβικινόνη και παράγεται με χημική ή ημι-χημική σύνθεση ή με μικροβιακή βιοσύνθεση. Ρυθμίζει το γονίδιο έκφρασης, ελέγχει την οξειδοαναγωγή και αφαιρεί αντιδραστικά είδη οξυγόνου. Όταν παράγεται συνένζυμο Q10 με μικροβιακή ζύμωση είναι αρκετά ισχυρό, φθηνό και απουσιάζουν ισομερή. Επίσης είναι λιποδιαλυτό και αν υπάρξει έλλειψη αυτού οι κυτταρικές λειτουργίες διαταράσσονται. Με την απουσία ή έλειψη συνένζυμου Q10 η κυτταρική διαίρεση δεν γίνεται σωστά και υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας όγκου (Ndikubwimana,2014).



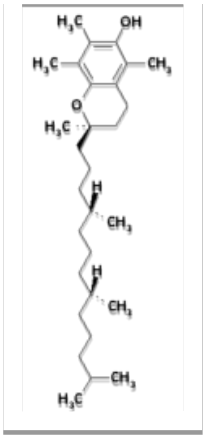
Εικόνα 2.7. Χημική δομή Q10.

2.3.6. Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες) έχει οκτώ ισομορφές με τέσσερις τοκοφερόλες και τέσσερις τοκοτριενόλες. Η αντιοξειδωτική δράση βρίσκεται στην ομάδα κεφαλής χρωμανίου. Ωστόσο καταστέλλει την υπεροξείδωση λιπιδίων δίνοντας το φαινολικό υδρογόνο του σε ρίζες υπεροξειδίου οι οποίες δημιουργούν ρίζες τοκοφερόλης που όμως δεν είναι χημικά ενεργές και ικανές για οξειδωτική αλυσιδωτή αντρίδραση. Είναι κύρια λιποδιαλύτης, προφυλάσσει τις δομές των λιπιδίων και τις μεμβράνες

διαλύοντας την αλυσίδα αντιοξειδωτικού που διαλύει αλυσίδες και περιέχεται στο πλάσμα. (Carocho, 2012)

Επίσης αναστέλλει την παραγωγή ROS μορίων κατά την οξείδωση του λίπους και κατά την διάδοση ελεύθερων ριζοσπαστικών αντιδράσεων. Μείωνει τον κίνδυνο Alzheimer, καρκίνου, διαβήτη και άλλα.(Shi, 2004)



Εικόνα 2.8. Χημική δομή βιταμίνης Ε.

2.3.7. 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 πολυφαινολών 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).

Γενικά οι ενώσεις που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και ομάδες υδροξυλίου λέγονται φαινολικές και ανήκουν σε μια μεγαλύτερη ομάδα , τις πολυφαινόλες. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες κι έχουν πάνω από 8000 δομές από απλά φαινολικά οξέα ως πολυμερισμένες τανίνες. Υδροξυκινναμικά και υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι οι ουσίες από τις οποίες αποτελούνται τα φαινολικά οξέα. Υπάρχουν στο φυτικό υλικό ή και ως εστέρες γλυκοζίτες οι οποίοι δρούν ως χημικές ενώσεις και ελεύθερες ρίζες λόγω αντιοξειδωτικής ικανότητας. Το γαλλικό οξύ το οποίο ανήκει σε υδροξυβενζοϊκή ομάδα είναι πρόδρομος τανινών.(Carocho, 2012; Dai, 2010)

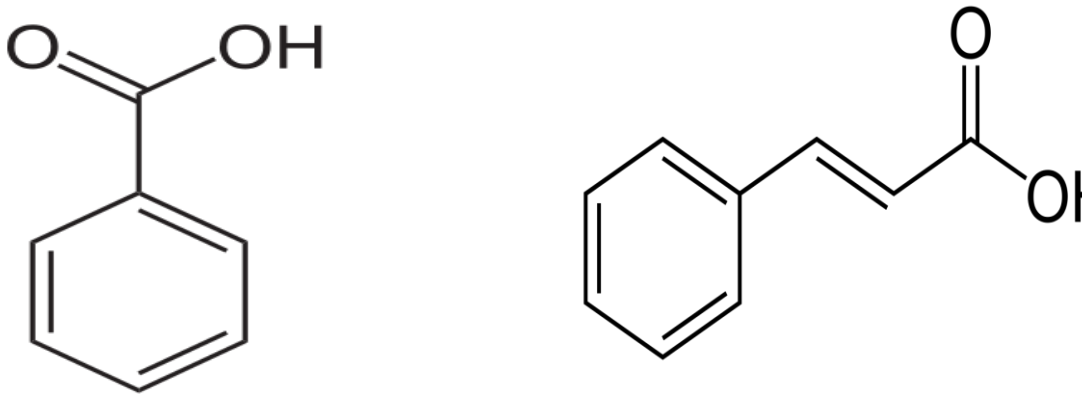
2.3.7.1. Φαινολικά Οξέα

Τα αντιοξειδωτικά μειώνουν το οξειδωτικό στρές και επιβραδύνουν ή σταματούν την οξείδωση υλικών που οξειδώνονται από σάρωση ελεύθερων ριζών. Το οξειδωτικό στρές μεταφράζεται ως μια κατάσταση σε ισορροπία όπου οι μεγάλες ποσότητες αντιδράσεων οξυγόνου ή και ειδών αζώτου ξεπερνούν την ικανότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών και προκαλούν οξείδωση ποικιλιών βιομακρομορίων όπως ένζυμα, πρωτεϊνες, DNA και λιπίδια. Στις χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, η γήρανση, στεφανιαία νόσος βασικός παράγοντας ανάπτυξης είναι το οξειδωτικό στρές. Ετσι τα φαινολικά έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες οι οποίες σαρώνουν ρίζες ειδών όπως ROS/RNS, καταστέλλουν ROS και σχηματίζουν RNS επιβραδύνοντας ένζυμα ή χηλικά ιχνοστοιχεία τα οποία παίρνουν μέρος στην

παραγωγή ελευθέρων ριζών, και ρυθμίζουν αυξητικά ή προφυλάσσουν την αντιοξειδωτική άμυνα.

Τα φαινολικά οξέα προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία, παθογόνα, παράσιτα. Εφόσον υπάρχουν σχεδόν σε όλο το μέρος του φυτού άρα αποτελεί μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Τα φαινολικά βρίσκονται σε φυτικές τροφές(όπως φρούτα, δημητριακά, σοκολάτα) σε ποτά (καφέ, μπύρα). Συνεισφέρουν στη στυφή και πικρή γεύση των χυμών φρούτων και λαχανικών διότι τα φαινολικά επιδρούν το ένα στο άλλο όπως η γλυκοπρωτεϊνη στο σάλιο.

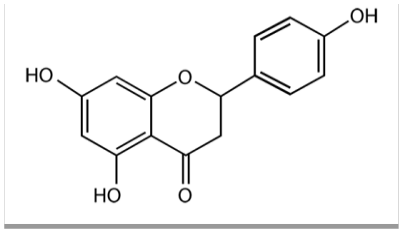
Τα φαινολικά αποτελούνται από έξι υποομάδες, μια από αυτές είναι οι ανθοκυανίνες που είναι γνωστές ως φλαβονοειδή και δίνουν τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πορτοκαλί και μώβ σε φρούτα αλλά και λαχανικά. Επίσης συνδράμουν στη γεύση και στη διαφορά χρώματος των κρασιών όσο και στο να διατηρηθεί, να ωριμάσει και να γηρανθεί το κρασί αντιδρώντας με οξυγόνο. Οι δύο κατηγορίες των φαινολικών οξέων είναι τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος(γαλλικό οξύ) και του κινναμωμικού οξέος (κουμαρικό, καφεϊκό). Το καφεϊκό υπάρχει σε φρούτα και λαχανικά εστεροποιημένο με κιναμμωμικο οξύ.(Dai, 2010)

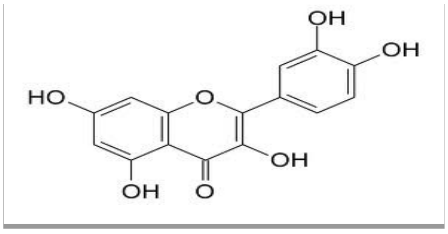


Εικόνα 2.9. Χημικές δομές βενζοϊκού και κιναμμωμικού οξέος.

2.3.7.2. Φλαβονοειδή

Η ιστορία της ανάλυσης και μελέτης των φλαβονοειδών στις τομάτες ξεκινά από το 1933, Όταν Euler et al. μελέτησαν την Golden Queen και ανακάλυψαν μία κίτρινη χρωστική που ήταν αδιάλυτη σε διθειάνθρακα όμως διαλυτή σε αλκάλια. Πιο πριν η πουτίνη εξωθήθηκε από φύλλα φυτού τομάτας και έπειτα από τη βλαστική επιδερμίδα. Ωστόσο ο Ewart ανακάλυψε την κιτρινίνη από τα φύλλα τομάτας η οποία είναι η κίτρινη μυκοτοξίνη που αρχικά εξωθήθηκε από *Penicillium citrimum* και δεν είχε βρεθεί στις τομάτες. Οι Piringer και Heinze ασχολήθηκαν με το φως και την σημασία του στην ανάπτυξη φλαβονοειδούς στην επιδερμίδα του καρπού. Οι Rutgers και Sunny Ray απομόνωσαν δύο φλαβονοειδή από τομάτα - Ponderosa τα οποία ήταν η ναριγκενίνη και η κερκετίνη.(Slimestad, 2009)

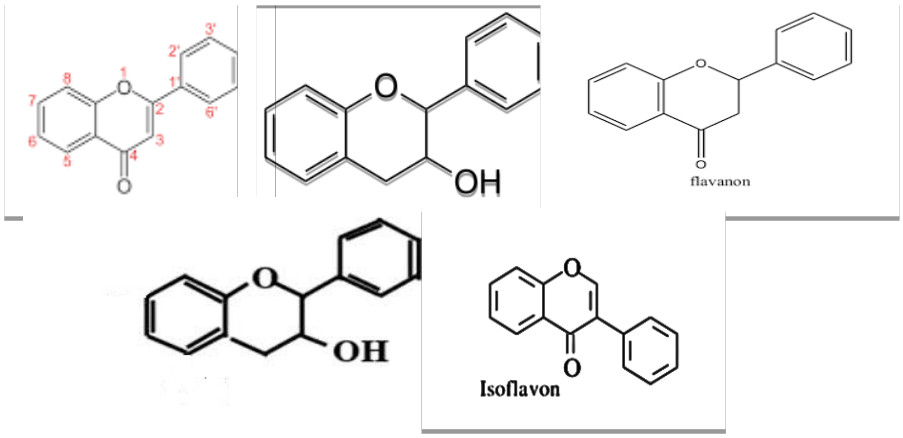




Εικόνα 2.10. Χημική δομή ναριγκενίνης και κερκετίνης.

Τα φλαβονοειδή έχουν ικανότητα σάρωσης ελέυθερων ριζών που συμβάλλει στην αντικαρκινική δράση. Έχουν τη δράση να μην πολλαπλασιάζουν και να βοηθούν την απόπτωση των κυτταρικών γραμμών καρκίνου. Επίσης επιβραδύνουν την εισβολή και τη μετάσταση των καρκίνων.Στα φυτά υπάρχουν τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και οι λιγνάνες. Με τα φλαβονοειδή να είναι πρώτα στην πλειονότητα των φαινολικών που λαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής του. Τα φλαβονοειδή επίσης χωρίζονται σε έξι υποομάδες οι οποίες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες, φλαβανόλες και

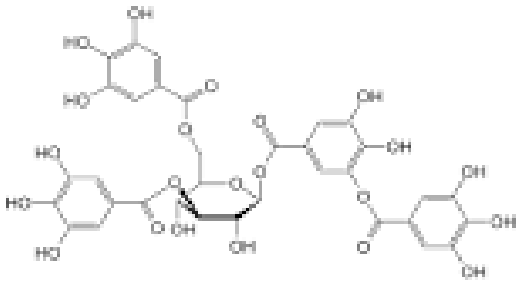
ανθοκυανίνες που διαφοροποιούνται λόγω κατάστασης οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου C.(Leopoldini, 2010; Dai, 2010)



Εικόνα 2.11. Χημικές δομές φλανόνης, φλαβανόλης, φλαβανόνης, ανθοκυανίνης, φλαβονόλης και ισοφλαβόνης.

2.3.7.3. Τανίνες

Οι τανίνες χωρίζονται σε υδρολύσιμες και συμπυκνωμένες. Οι υδρολύσιμες διαθέτουν πυρήνα γλυκόζης ή κάποιας άλλης πολυόλης εστεροποιημένο με γαλλικό οξύ και λέγονται γαλλοτανίνες, ή με εξαϋδροξυ διφαινολικό οξύ και λέγονται ελλαγιταννίνες. Αυτές οι ενώσεις με ποικιλία δομών προέρχονται από τις ικανότητες στη δημιουργία οξειδωτικής σύνδεσης.(Dai J, 2010)



Εικόνα 2.12. Χημική δομή τανίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

3.1. Γενικά

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν ώς: αναστολείς οξείδωσης μέσω ελεύθερων ριζών, αναστολείς δημιουργίας ελευθέρων ριζών λιπιδίων, καταστολείς οξυγόνου αλυσιδωτής αντίδρασης, ως αναγωγικά μέσα τα οποία δημιουργούν σταθερές ενώσεις από μετατροπή υπεροξειδίων.

Παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση λιπιδίων είναι η θερμοκρασία η οποία όταν είναι υψηλή επιταχύνει την οξειδωση, η παρουσία μετάλλων που δρούν ως καταλύτες της οξείδωσης. Όταν υπάρχουν ιόντα μετάλλων όπως Fe^{2+} και Fe^{3+} ή Cu^{+} και Cu^{2+} τα υπεροξείδια διασπώνται σε ρίζες $RO^{\cdot}$ και $ROO^{\cdot}$ Μέσω οξειδωαναγωγής. Το φως είναι ακόμα ένας παράγοντας ο οποίος επιταχύνει την οξείδωση μέσω του μηχανισμού της φωτοοξείδωσης. Τέλος το οξυγόνο το οποίο έρχεται σε επαφή με τα λιπίδια τα οξειδώνει και όσο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έρχονται σε επαφή τόσο πιο γρήγορα αυτά οξειδώνονται.

Τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση και υποβαθμίζουν την ποιότητα των λιπαρών υλών και των θρεπτικών τους συστατικών.(Rao, 1998)

3.2. Μηχανισμός Αυτοοξείδωσης

Ο μηχανισμός της αυτοοξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων προχωρά μέσω του μηχανισμού ελευθέρων ριζών και περιλαμβάνει μια σειρά από αλυσιδωτές αντιδράσεις. Η αυτοοξείδωση αυτόκαταλύεται και αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης.Αποτελείται από τρία στάδια:

1)<u>Εναρξη</u>: είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι να σχηματιστούν οι πρώτες ελεύθερες ρίζες. Είναι το στάδιο πριν εμφανιστεί η δυσάρεστη οσμή και γεύση. Σε αυτό το στάδιο δεν καταναλώνεται ατμοσφαιρικό οξυγόνο.

2)Διάδοση<u>:</u> οι ελεύθερες ρίζες $R^{\cdot}$ αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς υπεροξυ-ριζες ($ROO^{\cdot}$) οι οποίες μετατρέπονται σε υδροϋπεροξείδια (ROOH) μετά από την απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος στο οποίο δεν έχει αρχίσει η οξείδωση. Τα υδροϋπεροξείδια είναι ασταθή και διασπώνται με αποτέλεσμα να σχηματίζονται νέες ελεύθερες ρίζες οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό ριζών $R^{\cdot}$ και άλλες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

3)<u>Τερματισμός</u>: σε αυτό το στάδιο προκύπτουν σταθερά αδρανή προϊόντα. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει την διαδικασία της αυτοοξείδωσης και τις αντιδράσεις που συμβαίνουν (Moigrădean 2007,Κυριτσάκης 2007).

3.3. Διάγραμμα αντιδράσεων

Έναρξη

εκκινητής

$RH \longrightarrow R^{\cdot} + H$

Ακόρεστο λιπαρό οξύ — ελεύθερη ρίζα ακόρεστου λιπαρού οξέος

Διάδοση

$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$

Ελεύθερη ρίζα υπεροξειδίου

$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow R^{\cdot} + ROOH$

Υδροϋπεροξείδιο

Τερματισμός

$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RR$

Αδρανή προϊόντα

$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR$

Αδρανή προϊόντα

$ROO^{\cdot} + ROO \longrightarrow ROOR + O_2$

Αδρανή προϊόντα

Όπου $R^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$ = ελεύθερες ρίζες

RR, ROOR = προϊόντα τελικής αντίδρασης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

4.1 Επιλογή μεθόδου

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 οξείδωσης,
- 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 ποσοτικοποιούνται με βάση πρότυπη καμπύλη γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως ασκορβικό οξύ, Trolox (ένα συνθετικό

ανάλογο της βιταμίνης Ε). 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) .

4.2.Μέθοδοι ET

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

Οξειδωτικό + e → ανοιγμένη μορφή οξειδωτικού + οξειδωμένη μορφή αντιοξειδωτικού

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 ΔΑ 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).

4.2.1.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.

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

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 υπεροξείδωση. Πολλά αντιοξειδωτικά που θα αντιδρούσαν γρήγορα με υπεροξυ- ρίζες, αντιδρούν αργά ή καθόλου με το DPPH.

4.2.2. 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:

$Fe^{3+}(TPTZ)_2^{3+} + ArOH \rightarrow Fe^{2+}(TPTZ)_2^{2+}$ (Μπλε) + ArO + H^+

4.3.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 που μετρήθηκε χρησιμοποιώντας δοκιμασία που βασίζεται μέθοδο αντίδρασης 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 οξυρίζες υφίσταται κυρίως την αντίδραση μεταφοράς άτομου υδρογόνου (Wright et al., 2001)

4.3.1. 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 δραστικότητα.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.

4.4. 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 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: $3H_2O•P_2O_5•13WO_3•5MoO_3•10H_2O$ $3H_2O×P_2O_5•14WO_3•4MoO_3•10H_2O$ (Sanchez-Moreno, 2002) σε φωσφορομολυβδενικό / φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον.(Singleton et al., 1999). 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 50 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 ($Na_2WO_4 \bullet 2H_2O$, 100 g), μολυβδαινικού νατρίου ($Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$, 25 g), συμπυκνωμένου υδροχλωρικού οξέος (100 ml), 85% φωσφορικού οξέος (50 ml) και νερού (700 ml). Μετά το βρασμό, προστίθεται θειικό λίθιο ($Li_2SO_4 \bullet 4H_2O$, 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 ($PMoW_{11}O_{40}$). Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα μεταξύ των αναγωγικών και του Mo(VI): Mo(VI) + e→ Mo(V) 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).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. Σκοπός Πειράματος

Στην παρούσα πειραματική εργασία έγινε προσδιορισμός της περιεκτικότητας λυκοπενίου και πολυφαινολών σε 9 διαφορετικές ποικιλίες τομάτας σε 2 στάδια ωρίμανσης.

5.2. Μέθοδος Προσδιορισμού Φαινολών

5.2.1. Εκχύλιση

1) Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 2±0,01g δείγματος, 2ml 75% μεθανόλη και 1 ml HCL 1M.

2) Το μίγμα ομογενοποιείται για 1min.

3) Ο σωλήνας τοποθετείται στους 37°C για 30 min και ανακινείται περιοδικά.

4) Κατόπιν προστίθενται 1 ml διαλύματος NaOH 1M σε 75% μεθανόλη και ανακινείται για 1 min.

5) Φυγοκέντριση για 10 min στις 5000 στροφές.

6) Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml.

7) Στο σωλήνα που περιέχει το στερεό προστίθενται 2 ml μίγματος ακετόνης/νερό 1/1 v/v και το μίγμα ανακινείται για 1min.

8) Φυγοκέντριση για 10 min στις 5000 στροφές.

9) Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται στην ίδια ογκομετρική φιάλη που περιέχει το υπερκείμενο από το στάδιο 6.

10) Συμπληρώνεται με μεθανόλη 75% μέχρι την χαραγή.

5.2.2. Διαδικασία Μέτρησης

1) Τυφλό : Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 500μl μεθανόλη 75% , 500μl Folin-Ciocaltue και 4ml νερό και αναμένουμε 3min. Έπειτα προστίθενται 1000μl 20% Na_2CO_3 και αφήνεται για 2h στο σκοτάδι.

2) Δείγμα : Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 500μl διάλυμα δείγματος, 500μl Folin-Ciocaltue και 4ml νερό και αναμένουμε 3min. Έπειτα προστίθενται 1000μl 20% Na_2CO_3 και αφήνεται για 2h στο σκοτάδι.

3) Φωτομέτρηση στα 725 nm

5.3. Μέθοδος Προσδιορισμού Λυκοπενίου

1) Σε 2g τομάτας προστίθενται 2,5ml μεθανόλη (όχι 75% μεθανόλη) και ανάδευση με vortex για 30sec

2) Μετά προστίθεται 2ml Tris (μπάφερ αλάτων) pH 7,5 και ανακινείται για 30sec

3) Αφήνεται ήρεμο για 5min στο σκοτάδι

4) Μετά προστίθεται 2ml χλωροφόρμιο και ανάδευση για 1min

5) Έπειτα φυγοκέντριση για 5min

6) Διαχωρίζεις τις δύο στοιβάδες

7) Η στοιβάδα του χλωροφορμίου μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώνεται υπό κενό σε rotary evaporator

8) Στο υπόλειμμα προστίθεται 3ml Hexane και ανακινείται για 2min

9) Φυγοκέντριση

10) Το υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml Στο στερεό προστίθεται άλλα 3 ml Hexane και γίνεται ανακίνηση και φυγοκέντριση.

11) Το υγρό μεταφέρεται στην ίδια ογκομετρική φιάλη 10ml μαζί με το προηγούμενο υγρό .Συμπληρώνεται με Hexane μέχρι τη χαραγή.

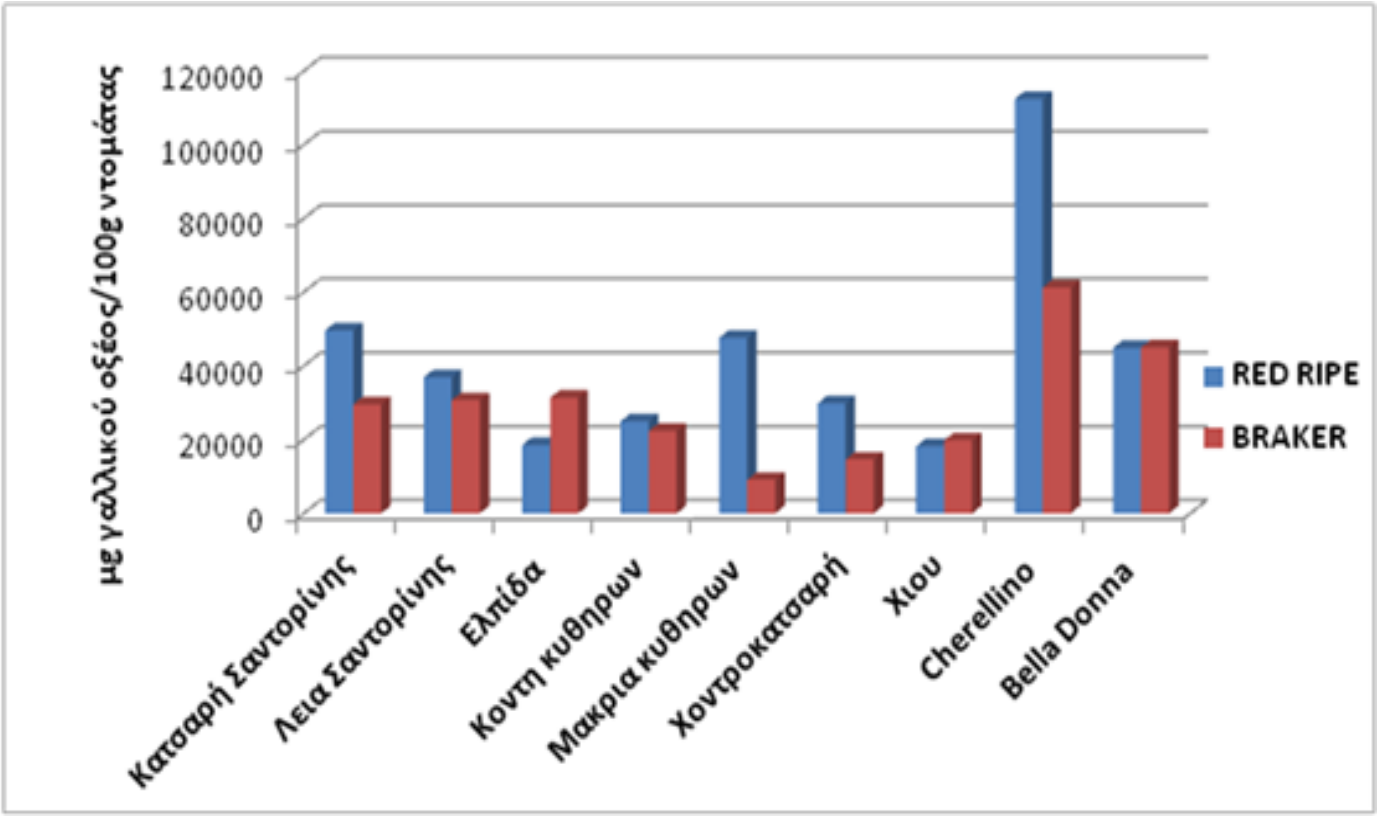
12) Φωτομέτρηση στα 502nm με τυφλό Hexane(E%=3150)

5.4. Αποτελέσματα

5.4.1. Περιεκτικότητα γαλλικού οξέος

Πίνακας 5.1. Περιεκτικότητα γαλλικού οξέος σε κάθε ποικιλία τομάτας στα στάδια ωρίμανσης Red Ripe και Braker.

Ποικιλία	RED RIPE (μg γαλλικού οξέος/100g ντομάτας)	BRAKER (μg γαλλικού οξέος/100g ντομάτας)
Κατσαρή Σαντορίνης	49605,26±1255,18	29517,54±759,67
Λεία Σαντορίνης	36885,96 ±2171,38	30657,89 ±1184,21
Ελπίδα	18508,77 ±1331,05	31315,78 ±1044,37
Κοντή Κυθήρων	24956,14 ±1222,57	22280,70 ±2919,55
Μακριά Κυθήρων	47587,71 ±1149,59	9078,94 ±455,80
Χοντροκατσαρή	29780,70 ±969,88	14605,26 ±573,53
Χίου	18157,89 ±2213,50	19780,70 ±856,10
Cherelino	112368,42 ±921,05	61228,07 ±662,26
Bella Donna	44868,42 ±1386,27	45000 ±1725,64

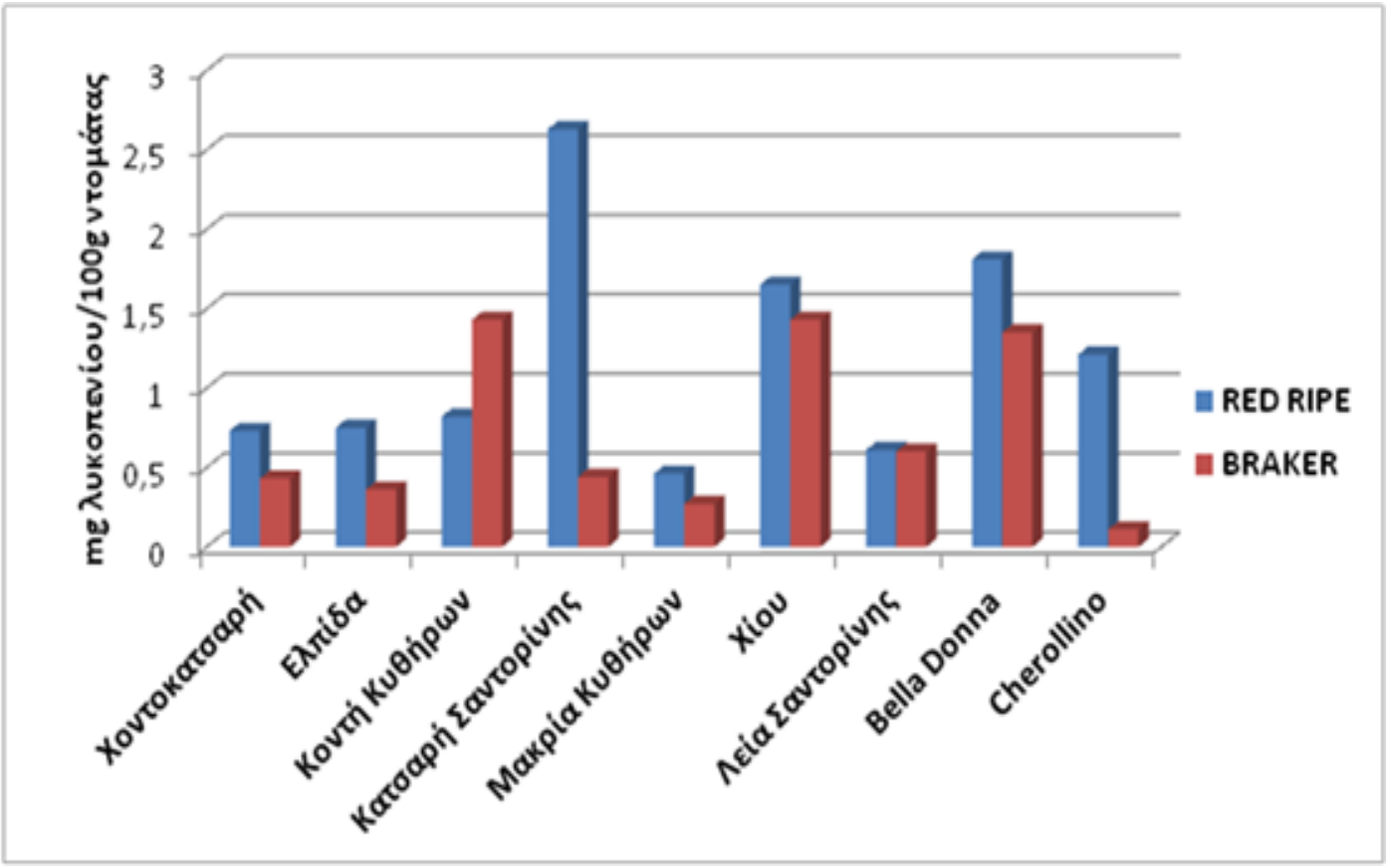


Εικόνα 5.1. Περιεκτικότητα πολυφαινολών σε κάθε ποικιλία τομάτας στα στάδια ωρίμανσης Red Ripe και Braker.

5.4.2. Περιεκτικότητα λυκοπενίου

Πίνακας 5.1. Περιεκτικότητα λυκοπενίου σε κάθε ποικιλία τομάτας στα στάδια ωρίμανσης Red Ripe και Braker.

Ποικιλία	Λυκοπένιο (mg/100g ντομάτας) RED RIPE	Λυκοπένιο (mg/100gντομάτας) BRAKER
Χοντοκατσαρή	0,73±0,40	0,43±0,03
Ελπίδα	0,75±0,20	0,36±0,17
Κοντή Κυθήρων	0,82±0,11	1,43±0,21
Κατσαρή Σαντορίνης	2,63±0,34	0,44±0,07
Μακρία Κυθήρων	0,46±0,04	0,27±0,04
Χίου	1,65±0,02	1,43±0,14
Λεία Σαντορίνης	0,61±0,02	0,60±0,03
Bella Donna	1,81±0,02	1,35±0,17
Cherollino	1,21±0,02	0,11±0,01



Εικόνα 5.2. Περιεκτικότητα λυκοπενίου σε κάθε ποικιλία τομάτας στα στάδια ωρίμανσης Red Ripe και Braker.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πείραμα αυτό μελετήσαμε και μετρήσαμε μέσω της φωτομετρικής μεθόδου την περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και πολυφαινόλες .

1) Για την συγκέντρωση των πολυφαινολών παρατηρούμε:

- Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες παρουσιάζει η ποικιλία Cherellino και στα δύο στάδια ωρίμανσης.

- Στο στάδιο Red Ripe μικρότερη περιεκτικότητα παρουσιάζει η Χίου ενώ στο στάδιο Braker η Μακριά Κυθήρων.

- Συγκρίνοντας τα δύο στάδια μεγαλύτερες διαφορές στην περιεκτικότητα πολυφαινολών διακρίνονται στις ποικιλίες Μακριά Κυθήρων , Cherellino και Κατσαρή Σαντορίνης.

2) Για την περιεκτικότητα σε λυκοπένιο:

- Στο στάδιο Red Ripe μικρότερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο παρουσιάζει η Μακριά Κυθήρων ενώ στο στάδιο Braker η Cherollino.
- Στο στάδιο Red Ripe μεγαλύτερη περιεκτικότητα παρουσιάζει η Κατσαρή Σαντορίνης ενώ στο στάδιο Braker η Κοντή Κυθήρων και η Χίου
- Ανάμεσα στα δύο στάδια μεγαλύτερες διαφορές στην περιεκτικότητα σε λυκοπένιο διακρίνεται στην Κατσαρή Σαντορίνης.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα περιεκτικότητας λυκοπενίου και πολυφαινολών στις δύο φάσεις ωρίμανσης παρατηρούμε :

- **Χοντροκατσαρή:** Τα επίπεδα λυκοπενίου και πολυφαινολών στις δύο φάσεις δεν παρουσιάζουν μεγάλες διάφορες. Αυτή είναι η μεγαλύτερη αισθητή διάφορα μεταξύ των αποτελεσμάτων.

- **Ελπίδα:** Το ποσοστό των πολυφαινολών στη φάση breaker είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό λυκοπενίου. Στη φάση red ripe επικρατεί το αντίθετο.

- **Κοντή Κυθήρων:** Το ποσοστό του λυκοπενίου είναι μεγαλύτερο και στις δύο φάσεις σε σχέση με αυτή των πολυφαινολών.

- **Κατσαρή Σαντορίνης:** Το ποσοστό λυκοπενίου στη φάση red ripe ξεπερνάει κατά πολύ το ποσοστό των πολυφαινολών, ενώ στη φάση braker είναι λίγο χαμηλότερο. Εδώ υπάρχει μια από τις πιο αισθητές διάφορες.

- **Μακριά Κυθήρων:** Στη φάση breaker τα ποσοστά λυκοπενίου και πολυφαινολών παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Στην red ripe το ποσοστό των πολυφαινολών είναι κάπως υψηλότερο.

- **Χίου:** Και στις δύο φάσεις το ποσοστό λυκοπένιο ξεπερνά κατά πολύ αυτό των πολυφαινολών. Αυτή είναι επίσης μια απο τις πιο αισθητές διάφορες ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης.

- **Λεία Σαντορίνης:** Το ποσοστό λυκοπενίου και στις δύο φάσεις είναι οριακά στο ίδιο επίπεδο. Το ποσοστό των πολυφαινολών είναι μεγαλύτερο από αυτό του λυκοπενίου και στις δύο φάσεις.

- **Bella Dona:** Το ποσοστό των πολυφαινολών και στις δύο φάσεις είναι οριακά στο ίδιο επίπεδο. Το ποσοστό λυκοπενίου είναι μεγαλύτερο από αυτό των πολυφαινολών.

- **Cherollino:** Πολύ μεγάλη διάφορα παρατηρείται μεταξύ των ποσοστών λυκοπενίου και πολυφαινολών στην φάση braker, όπου το ποσοστό λυκοπενίου είναι ελάχιστο. Στην φάση red ride το ποσοστό των πολυφαινολών ξεπερνά κατά πολύ το ποσοστό λυκοπενίου. Αυτή είναι άλλη μία από τις πιο αισθητές διάφορες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κυριτσάκης Α. (2007), Ελαιόλαδο(4η έκδοση), Θεσσαλονίκη: CopyCityDigital, p.p. 421-427, 429.
- Μπόσκος, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. 4η Έκδοση, Κεφ. ΙΧ, σελ. 230-232, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη
- Παπαγεωργίου, Γ.Ε. (2005). Βιοχημεια 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 : Τυπογραφεία Παπαγεωργίου

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Bondet,; 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
- 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.; Strain, J. J., (1996). The Ferric reducing ability of plasma n(FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239, 70-76.
- Belitz D.-H., Grosch w. & Schieberle P. (2009). Food chemistry. Springer, New York: 4th Edition, p.p 403-420

- Carocho M. & Ferreira I. (2012), A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives,Food and chemical toxicology, 51, 15-25.

- Dai J. & Mumper R. (2010), Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, Molecules, 15, 7313-7352.

- 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

- Kamiloglu S., Boyacioglu D. & Capanoglu E. (2012), The effect of food processing on bioavailability of tomato antioxidants, Journal of Berry Research, 3, 65–77.

- Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2010), The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, ~~Elsevier~~, Food Chemistry, 125, 288-306.

- Miller N., Sampson J., Candeias L., Bramley P. & Rice-Evans C. (1996), Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, FEBS Letters, 384 240-242.

- Moigrădean D., Lăzureanu A., Poiană M., Gogoaşă I., Hărmănescu M. & Gergen I. (2007), Sunlight influence of lycopene content in tomatoes varieties, Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, Communication- Food control, 2, 369-372.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., (2004). Polythenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical. Nutrition., 79(5), 727-747.

- 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 hydrogentransfer reaction of vitamin E. Journal of the Chemical Society., Perkin Trans. 2, 1520.

• Ndikubwimana J. & Lee B. (2014), Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q10, Biotechnol Lett, 10, 1529-1587.

• Oliver J. & Palou A. (2000), Chromatographic determination of carotenoids in foods, Journal of Chromatography A, 881, 543–555.

• 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.; Prior, R. L.; Huang, D., (2005). The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53, 1841-1856.

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

• 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 Bioly and Medicine.,26 (9/10), 1231-1237.

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

• Rao A., Waseem Z. & Agarwal S. (1998), Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene, Elsevier, Food Research International, 10, 737-741.

• Salunkhe D., Jadhav S. & Yu M. (1974), Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes- H.Fds.hum.Nutr. XXIV, 1/2 : 85-113.

• Shi J., Qu Q., Kakuda Y., Yeung D. & Jiang Y. (2004), Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 559–573.

• Slimestad R. & Verheul M. (2009), Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 89, 1255-1270.

• 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

• 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.

• 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.