

---

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΟΥ ΒΟΤΑΝΟΥ ΤΟΥ  
ΤΑΥΓΕΤΟΥ *ORIGANUM SCABRUM*



ΠΟΛΙΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΚΕΙΜ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
Ι Δ Ρ Υ Μ Α



ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

---

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΟΥ ΒΟΤΑΝΟΥ ΤΟΥ  
ΤΑΥΓΕΤΟΥ *ORIGANUM SCABRUM*

ΠΟΛΙΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

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.

Πολίτη Βασιλική

Υπογραφή

.....

10 - 6 - 2016

.....

## Περιεχόμενα

Ευρετήριο Πινάκων.....	4
Ευρετήριο Σχημάτων.....	5
Πίνακας Εικόνων.....	6
Ευχαριστίες.....	7
Περίληψη.....	8
Abstract .....	9
Εισαγωγή.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	11
1.1 Γενικά.....	11
1.2 Δράση και κατηγορίες αντιοξειδωτικών .....	11
1.2.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά .....	11
1.2.2 Συνθετικά αντιοξειδωτικά .....	19
1.3 Μέθοδοι παραλαβής αντιοξειδωτικών .....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ .....	25
2.1 Ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου .....	25
2.2 Διαδικασία Αυτοξειδωσης.....	26
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοξειδωση .....	28
2.4 Δράση αντιοξειδωτικών κατά της οξειδωσης και μηχανισμοί.....	29
2.5 Οξειδωτικό στρες και η σημασία των αντιοξειδωτικών για τον άνθρωπο .....	30
2.6 Οξειδωση στα τρόφιμα και τα αντιοξειδωτικά στην βιομηχανία τροφίμων ....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ....	34
3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	35
3.2 Μέθοδος FRAP .....	37
3.3 Μέθοδος DPPH .....	38
3.4 Μέθοδος ORAC .....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΤΑ ΒΟΤΑΝΑ .....	42

4.1 Αντιοξειδωτικά και η χρήση των βοτάνων .....	42
4.2 Βότανα της οικογένειας των Χειλανθών και η αντιοξειδωτική τους δράση ....	44
4.2.1 Αιγιάννης ( <i>Salvia sclarea</i> ) .....	44
4.2.2 Δενδρολίβανο ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	44
4.2.3 Δίκταμο ( <i>Origanum dictamnus</i> L.).....	45
4.2.4 Θυμάρι ( <i>Thymus Vulgaris</i> L.).....	45
4.2.5 Ματζουράνα ( <i>Origanum majorana</i> L.) .....	46
4.2.6 Μελισσόχορτο ( <i>Melissa officinalis</i> L.).....	46
4.2.7 Ρίγανη ( <i>Origanum vulgare</i> L.) .....	47
4.2.8 Τσάι του βουνού ( <i>Sideritis sp.</i> ) .....	47
4.2.9 Ύσσωπος ( <i>Hyssopus Officinalis</i> ) .....	48
4.2.10 Φασκόμηλο ( <i>Salvia officinalis</i> L.).....	48
4.2.11 Φλισκούνι ( <i>Mentha pelegium</i> ).....	49
4.2.12 Λαγορίγανη ( <i>Origanum scabrum</i> ).....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	55
5.1 Παραλαβή δείγματος και εκχυλίσεις.....	55
5.2 Ολικές φαινόλες .....	56
5.2.1 Πειραματική πορεία .....	57
5.2.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .....	57
5.3 Μέθοδος FRAP .....	58
5.3.1 Πειραματική πορεία .....	59
5.3.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .....	59
5.4 Μέθοδος DPPH.....	60
5.4.1 Πειραματική πορεία .....	60
5.4.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .....	61
5.5 Μέθοδος ORAC .....	62
5.5.1 Πειραματική πορεία .....	63
5.5.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
6.1 Ολικές φαινόλες .....	64
6.2 FRAP .....	66
6.3 DPPH.....	68
6.4 ORAC.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 <sup>ο</sup> : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ .....	72
7.1 Ολικές φαινόλες .....	72
7.2 FRAP .....	72
7.3 DPPH.....	73
7.4 ORAC.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία .....	74
Ελληνική Βιβλιογραφία .....	78

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διάφορων τεχνικών εκχυλίσεων.....	24
Πίνακας 2: Ενεργές μορφές οξυγόνου και η δράση τους (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).....	26
Πίνακας 3: Αποτελέσματα 11 βοτάνων για τις μεθόδους Folin- Ciocalteu και ABTS.....	50
Πίνακας 4: Αποτελέσματα 11 βοτάνων για τις μεθόδους DPPH και FRAP.....	52
Πίνακας 5: Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	57
Πίνακας 6: Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων της μεθόδου FRAP.....	59
Πίνακας 7: Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων της μεθόδου DPPH.....	61
Πίνακας 8: Η αναγωγική ικανότητα των διάφορων εκχυλισμάτων λαγορίγανης. Η τιμή με αστερίσκο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.....	66
Πίνακας 9: Αντιοξειδωτική ικανότητα σε mg trolox/g λαγορίγανης. Οι τιμές που υποδεικνύονται με τα ίδια γράμματα έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά .....	68
Πίνακας 10: Αποτελέσματα δοκιμασίας ORAC σε ισοδύναμα Trolox. Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά .....	70

## Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο των ολικών φαινολών.....	64
Σχήμα 2: Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg gallic acid/1g Λαγορίγανης. Οι στήλες που υποδεικνύονται με αστερίσκο έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά. ....	65
Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου FRAP.....	66
Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της αναγωγικής ικανότητας των διαφορετικών εκχυλισμάτων. Η στήλη που υποδεικνύεται με αστερίσκο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες .....	67
Σχήμα 5: Πρότυπη καμπύλη μεθόδου DPPH.....	68
Σχήμα 6: Αποτελέσματα DPPH των διαφορετικών εκχυλιτών. Οι στήλες που υποδεικνύονται με τα ίδια γράμματα έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά .....	69
Σχήμα 7: Πρότυπη καμπύλη μεθόδου ORAC.....	70
Σχήμα 8: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ORAC σε ισοδύναμα Trolox.....	71



## Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Δομή βιταμίνης C και βιταμίνης E (Oroian <i>et</i> Escriche, 2015) .....	13
Εικόνα 2: Δομή β-καροτενίου και λυκοπενίου (Oroian <i>et</i> Escriche, 2015) .....	14
Εικόνα 3: Δομή καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος .....	15
Εικόνα 4 Δομή φλαβονοειδών (Oroian <i>et</i> Escriche, 2015) .....	16
Εικόνα 5: Δομή φλαβονόλης.....	17
Εικόνα 6: Δομή ανθοκυανιδίνης .....	17
Εικόνα 7: Δομή τανίνης (Oroian <i>et</i> Escriche, 2015) .....	18
Εικόνα 8: Δομή λιγνάνης (Oroian <i>et</i> Escriche, 2015). .....	18
Εικόνα 9: Δομή BHT, BHA και Octyl gallate (Yehye <i>et al.</i> , 2015 ; Fernández-Álvarez <i>et al.</i> , 2014).....	20
Εικόνα 10: Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών (Leopoldini <i>et al.</i> , 2011) .....	34
Εικόνα 11: Αναγωγή του συμπλόκου FeCl <sub>3</sub> -TPTZ σε έγχρωμο προϊόν .....	38
Εικόνα 12: Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH.....	38
Εικόνα 13: Φυτά λαγορίγανης που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο .....	54
Εικόνα 14: Το φυτό της λαγορίγανης όπως φύτετε στον Ταύγετο .....	54

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ι. Σπηλιόπουλο, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, για την ανάθεση της παρούσας εργασίας και για την απεριόριστη καθοδήγησή του στην υλοποίηση αυτής.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τους κυρίους Δελλή και Κάρτσωνα για την παροχή του δείγματος και πληροφοριών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## Περίληψη

Το *Origanum scabrum* πρόκειται για ένα ενδημικό βότανο του Ταϋγέτου και ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών. Τα Χειλανθή είναι μια από τις μεγαλύτερες ομάδες φυτών που έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, με πολλά από αυτά τα βότανα να χρησιμοποιούνται καθημερινά στην μεσογειακή διατροφή είτε για τον αρωματισμό των φαγητών είτε ως αφέψημα. Στα Χειλανθή κατατάσσονται φυτά όπως είναι η ρίγανη, το θυμάρι, το φασκόμηλο και το τσάι του βουνού.

Τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως οι ουσίες οι οποίες παρεμποδίζουν τις αντιδράσεις που προκαλούνται από την παρουσία ελεύθερων ριζών. Δρουν μέσω διάφορων μηχανισμών προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο το περιβάλλον τους από τις αρνητικές επιπτώσεις. Διαχωρίζονται σε φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά με την κατηγορία των φυσικών να περιέχει τις φαινολικές ενώσεις, τις βιταμίνες και τα καροτενοειδή.

Για τους λόγους αυτούς πολλοί ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην μελέτη των αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στα βότανα χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές προσδιορισμού αυτών, τόσο για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους με μεθόδους όπως η Folin-Ciocalteu, όσο και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας με την χρήση μεθόδων όπως είναι η FRAP, η DPPH κτλ. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος του *Origanum scabrum* σε νερό, ακετόνη 75% και μεθανόλη 75% με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, FRAP, DPPH και ORAC. Η μέγιστη τιμή πολυφαινολών με την Folin-Ciocalteu ήταν στα εκχυλίσματα μεθανόλης και ακετόνης με  $14,39 \pm 3,31$  και  $14,42 \pm 4,24$  mg gallic acid/g λαγορίγανης αντίστοιχα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν από  $11,74 \pm 0,74$  για το νερό έως  $16,93 \pm 0,42$  για την μεθανόλη (σε mg trolox/g λαγορίγανης). Τα εκχυλίσματα μεθανόλης έχουν τις υψηλότερες τιμές και για τις μεθόδους FRAP και ORAC με  $16,4 \pm 1,25$  και  $168,08 \pm 22,3$  mg trolox/g λαγορίγανης αντίστοιχα.

*Λέξεις κλειδιά:* αντιοξειδωτικά, εκχύλιση αντιοξειδωτικών, ελεύθερες ρίζες, οξειδωτική τάγγιση, φαινολικές ενώσεις, *Origanum scabrum*, μέθοδος Folin - Ciocalteu, FRAP, DPPH, ORAC

## Abstract

*Origanum scabrum* is a native herb of Taygetos mountain and it belongs to the Lamiaceae family. The Lamiaceae is one of the largest groups of plants which have strong antioxidant capacity and they have a daily use in Mediterranean diet for food flavoring or as a decoction. Plants such as oregano, thyme, sage and mountain tea are classified in Lamiaceae family.

Antioxidants are defined as substances which inhibit the reactions caused by the presence of free radicals. They act via various mechanisms protecting their environment from the adverse effects caused by free radicals. They are classified into natural and synthetic antioxidants with the natural being the phenolic compounds, vitamins and carotenoids.

For all the reasons above researchers, have shifted their interest to the study of antioxidants contained in herbs, using several assay techniques, to determine their concentrations with methods such as Folin-Ciocalteu, and their antioxidant capacity using methods such as FRAP and DPPH. In the present study, the antioxidant activity of the extract of *O. scabrum* in water, acetone 75% and methanol 75%, is studied with the Folin-Ciocalteu, FRAP, DPPH and ORAC methods. The results showed the polyphenol concentrations with the Folin-Ciocalteu reagent to be  $14,39 \pm 3.31$  for methanol extracts and  $14,42 \pm 4,24$  for acetone extracts (mg gallic acid/g). The higher antioxidant activity with DPPH was  $16,93 \pm 0,42$  mg trolox/g for the methanol extracts. Also methanol had the higher antioxidant activity for FRAP assay with  $16,4 \pm 1,25$  mg trolox/g and for ORAC with  $168,08 \pm 22,3$  mg trolox/g

*Key words:* antioxidants, antioxidants extraction, free radicals, oxidative rancidity, phenolic compounds, *Origanum scabrum*, Folin – Ciocalteu method, FRAP, DPPH, ORAC

## Εισαγωγή

Για αυτήν την εργασία επιλέχτηκε το ενδημικό βότανο *O. scabrum* με σκοπό την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος του. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα αντιοξειδωτικά, στο τρόπο που κατατάσσονται και λειτουργούν, αλλά και στις διάφορες μεθόδους εκχύλισης των φυσικών αντιοξειδωτικών από τα φυτά. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναλύετε η έννοια της οξείδωσης, οι μηχανισμοί της και οι επιπτώσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό και στα τρόφιμα. Επιπλέον γίνεται αναφορά και στην επίδραση που έχουν τα φυσικά αντιοξειδωτικά στην προστασία των τροφίμων και του οργανισμού έναντι της οξείδωσης.

Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του βοτάνου, ενώ στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται συνοπτική αναφορά 11 άλλων βοτάνων της ίδιας οικογένειας και των διάφορων τεχνικών που έχουν εφαρμοστεί σε αυτά. Στο πέμπτο κεφάλαιο υπάρχει η καταγραφή των διαδικασιών εκχύλισης που ακολουθήθηκαν για την παραλαβή του δείγματος, αλλά και ο τρόπος εφαρμογής των διάφορων μεθόδων. Στο έκτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα σχετικά αποτελέσματα και οι πρότυπες καμπύλες για κάθε τεχνική. Στο τελευταίο κεφάλαιο γίνεται σχολιασμός των αποτελεσμάτων αυτών και προσπάθεια σύγκρισης τους με τα αποτελεσμάτων των υπόλοιπων βοτάνων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 1.1 Γενικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που αναστέλλουν ή καθυστερούν τις διεργασίες οξειδωσης που γίνονται κάτω από την επίδραση των ενεργών μορφών οξυγόνου ή του ατμοσφαιρικού. Συμβάλουν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε παθολογικές καταστάσεις που προέρχονται από την οξειδωση και την δράση των ελεύθερων ριζών. Χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, πολυμερών και πετροχημικών προϊόντων (Pisoschi *et* Negulescu, 2011). Στα τρόφιμα τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως οι προστιθέμενες οργανικές ουσίες που επιβραδύνουν ή αναστέλλουν τις οξειδωτικές αλλοιώσεις, όπως είναι το τάγγισμα των λιπών και οι μεταβολές στο χρώμα των τροφίμων (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009). Πρόκειται για οργανικές ενώσεις που στο μόριο τους έχουν μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλουν και την αντιοξειδωτική δράση που έχουν στα τρόφιμα (Σφλώμος, 2011). Είναι ετερογενής κατηγορία μορίων, όπου η δράση τους εξαρτάται από τα χημικά χαρακτηριστικά τους και την θέση που έχουν μέσα στο τρόφιμο (εγγύτητα στην μεμβράνη φωσφολιπιδίων, στην υδατική φάση κ.α.) (Oroian *et* Escriche, 2015)

### 1.2 Δράση και κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Ο πρώτος διαχωρισμός που γίνεται στην προσπάθεια κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών σε ομάδες, είναι ο διαχωρισμός τους σε ενδογενή (αντιοξειδωτικά που συντίθενται στον οργανισμό) και σε εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικής προελεύσεως, όπως είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση ή μη ενζυματικής προελεύσεως, όπως το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη και οι μεταλλοθειονίνες. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται ανάλογα με την προέλευση τους σε φυσικά και συνθετικά (Pisoschi *et* Negulescu, 2011). Έτσι πιο αναλυτικά:

#### 1.2.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Πρόκειται για τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα φυτά για την προστασία των λιπιδίων τους από την οξειδωση. Με την δράση τους εξασφαλίζετε η σταθερότητα των τελικών προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα προϊόντα

της ελαιοπαραγωγής όπου κατά την διεργασία μεταφέρονται τοκοφερόλες από το φυτό στο έλαιο και παραμένουν ακόμα και αν υποστεί ραφινάρισμα (σε μικρές ποσότητες). Πολλά αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν βιταμινική δράση όπως είναι το ασκορβικό οξύ, ενώ ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή είναι συστατικά πολλών φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών. (Σφλώμος, 2011)

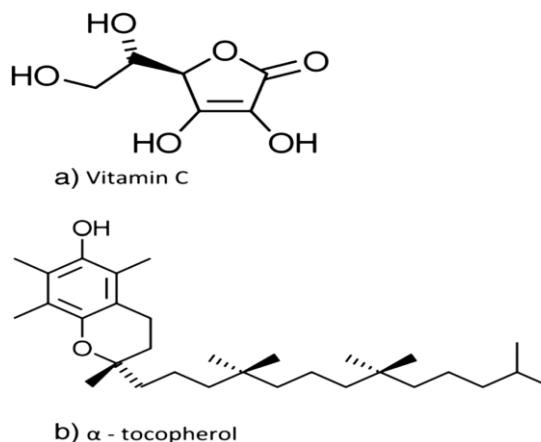
Τα φυσικά αντιοξειδωτικά ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες παρεμβαίνουν στους κύκλους οξείδωσης και αναστέλλουν ή επιβραδύνουν την οξειδωτική βλάβη που προκαλείτε στα βιομόρια. Οι κύριες κατηγορίες ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση είναι: οι βιταμίνες (βιταμίνη C και βιταμίνη E), τα καροτενοειδή (καροτένια και ξανθοφύλλες) και οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, λιγνάνες και στιλβένια) (Oroian *et Escriche*, 2015). Επιπλέον φυσικά αντιοξειδωτικά θεωρούνται οιθειώδης ενώσεις, το σελήνιο (Se), το μαγγάνιο, οι πρωτεΐνες, ο σίδηρος, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, η κυστεΐνη, το α-λιποϊκό οξύ (ALA) και οι μεταλοπορφυρίνες (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009).

### **Βιταμίνες**

Βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ, ασκορβικό οξύ): Είναι συγγενής της γλυκόζης και πιστεύεται ότι είναι το πιο σημαντικό υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Η βιταμίνη C είναι αποτελεσματική στην καταστροφή των ριζών σουπεροξειδίων και υδροξυλίων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, των αντιδραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Δρα εναντίον των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) αναστέλλοντας την οξείδωση. Η βιταμίνη C έχει, σε διαρθρωτικό επίπεδο, 4-OH ομάδες οι οποίες μπορούν να δωρίσουν υδρογόνο σε ένα οξειδωτικό σύστημα. Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός της βιταμίνης C προτάθηκε από τους Bendichm *et al.*, το 1986. Σε pH 7, το ασκορβικό ανιόν είναι η επικρατούσα μορφή, λόγω της όξινης φύσης του ασκορβικού οξέος (Oroian *et Escriche*, 2015).

Βιταμίνη E: Με τον όρο βιταμίνη E αναφερόμαστε σε μια ομάδα χημικών ενώσεων που αποτελείτε από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες. Επιδρά ως λιποδιαλυτικό αντιοξειδωτικό στους ανθρώπους και λειτουργεί μέσω δυο πρωτογενών μηχανισμών (Oroian *et Escriche*, 2015). Στην φύση υπάρχουν οχτώ τοκοφερόλες από τις οποίες μόνο οι τέσσερις έχουν αντιοξειδωτική δράση. Αυτές είναι οι α, β, γ και δ-τοκοφερόλη. Οι τοκοφερόλες υπάρχουν σε ιδιαίτερα μεγάλη

συγκέντρωση στα εδώδιμα έλαια όπως το ελαιόλαδο, το σογιέλαιο, το ηλιανθέλαιο, το αραβοσιτέλαιο και τα πίτυρα ρυζιού (Μπλούκας, 2004).



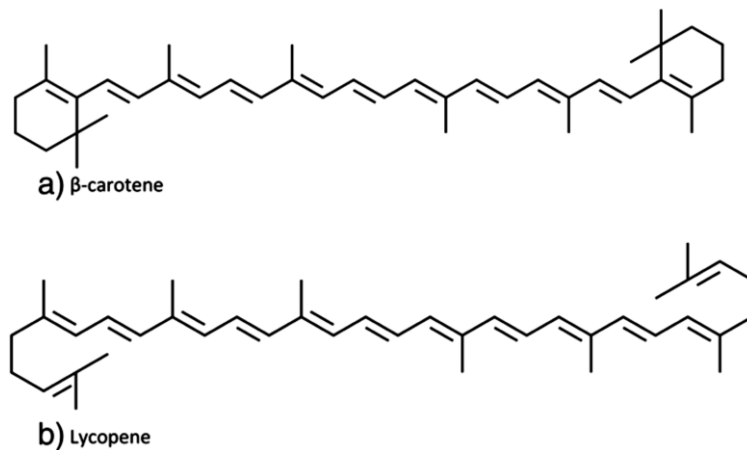
**Εικόνα 1:** Δομή βιταμίνης C και βιταμίνης E (Oroian *et* Escriche, 2015)

### Καροτενοειδή

Τουλάχιστον 60 καροτενοειδή εμφανίζονται σε φρούτα και λαχανικά που καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Τα κύρια καροτενοειδή στην καθημερινή μας διατροφή είναι:  $\alpha$ -,  $\beta$ -καροτένιο, το λυκοπένιο, οι ξανθοφύλλες, η ζεαξανθίνη και η λουτεΐνη. Τα καροτενοειδή είναι σημαντικά όχι μόνο για την δραστηριότητα τους ως προβιταμίνη A, αλλά και για ένα φάσμα άλλων ενεργειών στα βιολογικά συστήματα (Oroian *et* Escriche, 2015).

Το  $\beta$ -καροτένιο είναι μια λιποδιαλυτή προβιταμίνη και αποτελείται από δύο ομάδες ρετινόλης. Το λυκοπένιο έχει έντεκα συζευγμένους και δύο μη συζυγείς διπλούς δεσμούς. Είναι από τους πιο αποτελεσματικούς αποσβέστες οξυγόνου των φυσικών καροτενοειδών (Perretti *et al.*, 2013). Οι πολλοί συζευγμένοι διπλοί δεσμοί του λυκοπενίου είναι αυτοί που το καθιστούν ως ένα δυναμικά ισχυρό αντιοξειδωτικό, και πιστεύεται ότι αυτοί είναι υπεύθυνοι για τις ευεργετικές επιδράσεις του. Οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα καροτινοειδή που συντίθενται εντός των πλαστιδίων και συνήθως εμφανίζονται ως οι κίτρινες χρωστικές ουσίες στα φύλλα. Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη είναι συντακτικά ισομερή που διαφέρουν μόνο στην διαμόρφωση τους σε μία από τις χαρακτηριστικές ομάδες κυκλοεξενίου που πλευρίζουν τα άκρα και των δύο ενώσεων. (Oroian *et* Escriche, 2015)



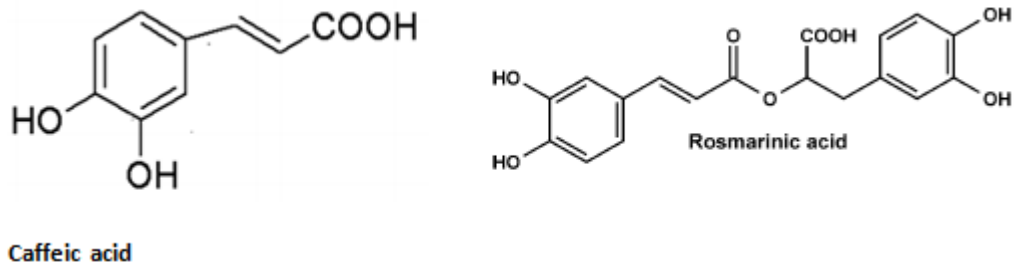


**Εικόνα 2:** Δομή  $\beta$ -καροτενίου και λυκοπενίου (Oroian *et* Escriche, 2015)

### Φαινολικές ενώσεις - Πολυφαινόλες:

Οι φαινολικές ενώσεις είναι κατηγορία χημικών ενώσεων και ανήκουν στην ομάδα των λιποειδών καθώς εκχυλίζονται με οργανικούς διαλύτες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν χιλιάδες μέλη με ετερογενείς δομές. Κοινό χαρακτηριστικό τους όμως είναι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου που έχει ως υποκατάστατη υδροξυλομάδα. Ένας από τους τρόπους κατάταξης των φαινολικών ενώσεων σε ομάδες είναι με βάση των αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους. Έτσι γίνεται η διάκριση των φαινολικών ενώσεων σε απλές φαινόλες, οι οποίες περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο όπως είναι τα φαινολικά οξέα και οι κουμαρίνες, και σε πολυφαινόλες οι οποίες περιέχουν δύο ή και περισσότερους δακτυλίους (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Τα φαινολικά οξέα διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με την δομή που διαθέτουν. Η πρώτη ομάδα είναι τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (γαλλικό οξύ) και η δεύτερη τα παράγωγα του κιναμικού (Škronánková *et al.*, 2012). Αυτές οι ομάδες αποτελούνται από ένα βενζοϊκό δακτύλιο δεσμευμένο σε μια καρβοξυλική ομάδα (βενζοϊκό οξύ) ή από έναν βενζοϊκό δακτύλιο δεσμευμένο σε κιναμινικό οξύ (Oroian *et* Escriche, 2015). Στα φαινολικά οξέα ανήκουν το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό (παράγωγο του καφεϊκού οξέως) που αποτελούν δυο από τις πιο σημαντικές ενώσεις που προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση σε πολλά βότανα (Škronánková *et al.*, 2012)



**Εικόνα 3:** Δομή καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος

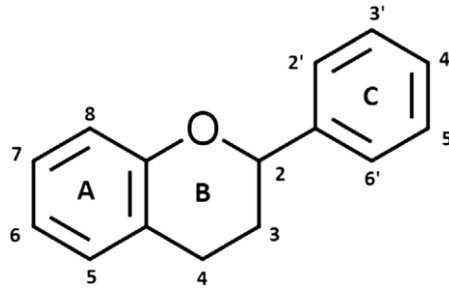
Με βάση τον αριθμό των φαινολικών δαχτυλίων, γίνεται ο διαχωρισμός των πολυφαινολών σε διάφορες υποκατηγορίες όπως είναι τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, οι λιγνάνες και οι τανίνες. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι πολυφαινόλες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από φυτά, λόγω των φαρμακολογικών δραστηριοτήτων τους (Goszcz *et al.*, 2015). Οι πολυφαινόλες έχουν την δυνατότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο. Πρόκειται για δευτερογενής μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά για την προστασία τους έναντι στου παθογόνους οργανισμούς, στην υπεριώδη ακτινοβολία, στα παράσιτα και στα αρπακτικά. Επιπλέον συνεισφέρουν και στα χρώματα των φυτών. Έχουν αναφερθεί πάνω από 8000 φαινολικές δομές που είναι διάσπαρτες σε όλο το φυτικό βασίλειο, με πολλές από αυτές να υπάρχουν στα τρόφιμα.

Η αντιοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών έχει συσχετισθεί με την προαγωγή της υγείας του ανθρώπου, ενώ οι κύριες διατροφικές πηγές πρόσληψης τους προέρχονται από τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα δημητριακά, τα βότανα αλλά και από ποτά όπως είναι οι χυμοί το κρασί και ο καφές (Škrovnáková *et al.*, 2012).

Το ενδιαφέρον για τα φαινολικά αντιοξειδωτικά συστατικά των τροφίμων έχει αυξηθεί και λόγω, των δράσεων τους ως ρυθμιστές της μεταγωγήσης του αίματος, των αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Οι πολυφαινόλες μπορεί να ασκήσουν και έμμεση αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα στο ανθρώπινο σώμα (Oroian *et Escriche*, 2015)

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε:

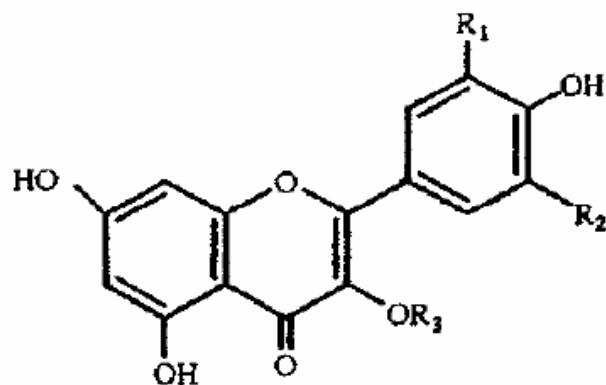
**A.) Φλαβονοειδή:** είναι από τις πιο σημαντικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και η χημική δομή τους στηρίζεται στην ύπαρξη ενός φλαβανικού σκελετού ( C15 με μορφή C6 – C3 – C6) ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους και από έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο που φέρει οξυγόνο



**Εικόνα 4** Δομή φλαβονοειδών (Oroian *et* Escriche, 2015)

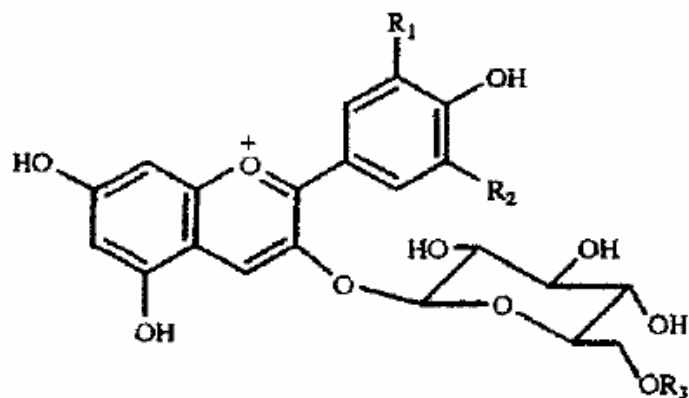
Ανάλογα με τον βαθμό οξείδωσης που έχει ο ετεροκυκλικός δακτύλιος, τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε αρκετές ομάδες (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009). Τα πιο αντιπροσωπευτικά φλαβονοειδή είναι: φλαβόνες ,φλαβανόνες , φλαβονόλες , φλαβανόλες (αλλιώς φλαβαν-3-όλες ή κατεχίνες ), ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες (Oroian *et* Escriche, 2015)

- Φλαβονόλες και Ισοφλαβόνες: προσδιορίζονται από τη θέση της ομάδας αλκοόλης επί του δακτυλίου C. Οι κυρίαρχες διατροφικές φλαβονόλες είναι η κουερσετίνη, η μυρικετίνη, η ρουτίνη, η ισοχαμερτίνη και η καεμφερόλη. Η κουερσετίνη πρόκειται για μια σημαντική φλαβανόλη που είναι παρούσα σε φρούτα και λαχανικά, κυρίως στα φύλλα, άλλα και σε άλλα μέρη των φυτών με την μορφή αγλυκόνων και γλυκοζιτών στα οποία μία ή περισσότερες ομάδες σακχάρου δεσμεύονται με φαινολικές ενώσεις (Oroian *et* Escriche, 2015) Οι ισοφλαβόνες είναι μία ομάδα ετεροκυκλικών ενώσεων οξυγόνου και ανήκουν στην οικογένεια των φυτοιστρογόνων. Οι κύριες μορφές των ισοφλαβονών στα φυτά είναι γλυκοζίτες με ένα σάκχαρο (π.χ., γλυκόζη, γαλακτόζη , ραμνόζη, κ.λπ.)



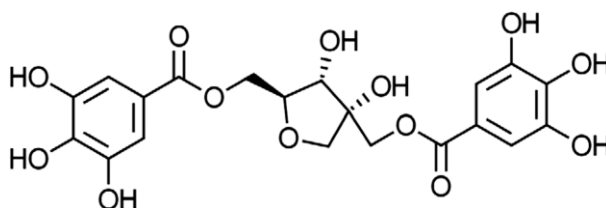
**Εικόνα 5:** Δομή φλαβονόλης

- Φλαβόνες και Φλαβανόνες : Χημικά οι φλαβόνες, δεν έχουν μια 3-υδροξυομάδα. Βρέθηκαν σε όλα τα μέρη των φυτών, στα υπέργεια τμήματα τους (στέλεχος, φύλλα, μπουμπούκια, φλοιό, αγκάθια κλπ) αλλά και στις ρίζες και τα ριζώματα (Oroian *et* Escriche, 2015)
- Φλαβανόλες (κατεχίνη) και Ανθοκυανίνες: οι φλαβανόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά με οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα δέρματα των βατόμουρων, των σταφυλιών και των μήλων. Τα ισομερή κατεχίνη (trans διαμόρφωση) και επικατεχίνη (cis διαμόρφωση) σχηματίζουν πολυμερή που αναφέρονται συχνά ως προανθοκυανιδίνες (Tsaο *et al.*, 2003). Οι ανθοκυανιδίνες στα φυτά υπάρχουν κυρίως στην γλυκοζιτική τους μορφή, τις ανθοκυανίνες και είναι από τα κύρια συστατικά των κόκκινων, μπλε και μωβ χρωστικών σε λουλούδια φρούτα και λαχανικά. Το χρώμα τους εξαρτάτε από το pH όπου είναι κόκκινο σε όξινες συνθήκες και μπλε σε βασικές (Σουφλερός, 2012)



**Εικόνα 6:** Δομή ανθοκυανιδίνης

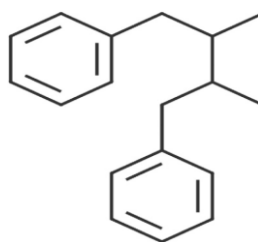
**Β.) Τανίνες:** έχουν μοριακή μάζα μέχρι 30.000 Da, και παράγονται από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Σύμφωνα με τη δομή τους, οι ταννίνες μπορούν να διαχωριστούν σε γενικές γραμμές, σε δύο κατηγορίες μακρομορίων, τις υδρολυόμενες τανίνες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες τανίνες έχουν μοριακή μάζα που κυμαίνεται μεταξύ 500 και 5000 Da. Εκτός από την στυπτικό χαρακτήρα τους, έχουν και σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους με μοριακό βάρος έως και 30.000 Da. (Oroian *et* Escriche, 2015)



**Εικόνα 7:** Δομή τανίνης (Oroian *et* Escriche, 2015)

**Γ.) Στιλβένια:** εμφανίζουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια γέφυρα αιθανίου, και υπάρχουν σε μονομερή (ρεσβερατρόλη, οξυρεσβερατρόλη) αλλά και σε ολιγομερή μορφή ως ολιγομερή στιλβενίων (δυμερή, τριμερή ή πολυμερή ρεσβερατρόλη) ή άλλα στιλβένια (π.χ., έψιλον-βινιφερίνη,) (Charles, 2013). Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με άλλες φαινολικές ενώσεις.

**Δ.) Λιγνάνες:** ομάδα φαινολικών ενώσεων, οι οποίες εμφανίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο λιναρόσπορο και άλλους σπόρους, ρίζες, φύλλα, καρπούς και τα ξυλώδη μέρη των ανώτερων φυτών και τα δημητριακά. Δομές των λιγνάνες αποτελούνται από ένα σκελετό προπυλοβενζολίου (C6-C3) (Oroian *et* Escriche, 2015).



**Εικόνα 8:** Δομή λιγνάνης (Oroian *et* Escriche, 2015).

### 1.2.2 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

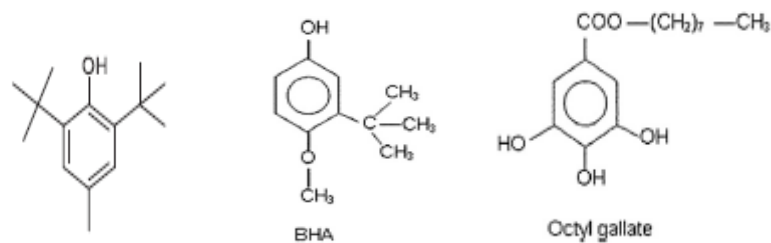
Τα αντιοξειδωτικά αυτά παρασκευάζονται τεχνητά και χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για την συντήρηση των τροφίμων. Είναι παράγωγα φαινολών και δρουν ως δότες πρωτονίων παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και καθυστερώντας την έναρξη αυτοοξειδωσης των λιπών (Μπλούκας, 2004). Προστίθενται σε μικρές συγκεντρώσεις (100-200 ppm), ενώ πρέπει να έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της λιπαρής φάσης. Όσο πιο πολικό είναι ένα αντιοξειδωτικό τόσο πιο δραστικό θεωρείτε καθώς έχει την τάση να συσσωρεύεται στην επιφάνεια της λιπαρής φάσης και να έρχονται τα ίδια σε επαφή με τον αέρα (Σφλώμος, 2011)

Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά της κατηγορίας αυτής είναι η βουτυλιομένη υδροξυανισόλη (BHA – E320), ο προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος (PG – E310), το βουτυλιομένο υδροξυτουόλιο (BHT – E321), και η τριτοταγής-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ). Τα BHA, BHT και PG χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες για την συντήρηση τροφίμων όπως είναι τα πατατάκια, το λάδι και οι σούπες.

Γενικά τα συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι επιβλαβή για τον ανθρώπινο οργανισμό και έχουν απαγορευτεί από τις παιδικές τροφές. Οι κανονισμοί σχετικά με την προσθήκη συνθετικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα διαφοροποιείτε μεταξύ των χωρών ακόμα και αυτών που ανήκουν στην ευρωπαϊκή ένωση, έτσι για παράδειγμα χώρες όπως η Αυστρία και η Ελβετία δεν χρησιμοποιούν το BHT, ενώ το TBHQ χρησιμοποιείτε μόνο στην Αμερική. Βάση των κανονισμών της ευρωπαϊκής ένωσης τα φαινολικά αντιοξειδωτικά που επιτρέπονται είναι ο γαλλικός προπυλεστέρας (E310), ο γαλλικός οκτυλεστέρας (E311), ο γαλλικός δωδεκυλεστέρας (E312), η BHA και BHT (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009)

- Γαλλικός προπυλεστέρας (propyl gallate): ουσία με μορφή λευκής σκόνης με γκρίζα απόχρωση. Ευαίσθητη σε θέρμανση και λόγω αυτού έχει περιορισμένη χρήση σε προϊόντα που υφίστανται θερμική επεξεργασία. Έχει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό και σχετικά μικρή στα λίπη και έλαια. Σε συνδυασμό με τα BHA και BHT αποτελεί αποτελεσματικό μέσω προστασίας λιπών και ελαίων. (Μπλούκας, 2004)

- Γαλλικός οκτυλεστέρας (octyl gallate) και Γαλλικός δωδεκυλεστέρας (dodecyl gallate): ουσίες περισσότερο διαλυτές σε λίπη και έλαια, και λιγότερο διαλυτές στο νερό σε σχέση με τον γαλλικό προπυλεστέρα. Λόγο του μεγάλου μορίου τους έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τον γαλλικό προπυλεστέρα (για ίσες συγκεντρώσεις) (Μπλούκας, 2004)
- Βουτυλική υδροξυανισόλη (butylated hydroxyanisole, BHA): Λιποδιαλυτή ουσία αλλά αδιάλυτη στο νερό. Έχει μορφή λευκού στερεού και χαρακτηριστική φαινολική οσμή η οποία γίνεται αντιληπτή κατά το ψήσιμο των τροφίμων (Μπλούκας, 2004)
- Βουτυλικό υδροξυτουόλιο (butylated hydroxytoluene, BHT): ουσία εύκολα διαλύτη στα λίπη και αδιάλυτη στο νερό. Είναι σταθερότερη από την BHA σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Έχει μορφή λευκού κρυσταλλικού υλικού με μειωμένη αντιοξειδωτική δράση. (Μπλούκας, 2004)
- Τριτοταγής-βουτυλο-υδροκινόνη (tetra-butyl-hydroquinone, TBHQ): λευκό κρυσταλλικό υλικό και είναι μέτρια διαλυτό στα λίπη και έλαια. Θεωρείται από τα πιο πρόσφατα αντιοξειδωτικά για τα τρόφιμα. (Μπλούκας, 2004)



**Εικόνα 9:** Δομή BHT, BHA και Octyl gallate (Yehye *et al.*, 2015; Fernández-Álvarez *et al.*, 2014)

### 1.3 Μέθοδοι παραλαβής αντιοξειδωτικών

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την ανάλυση των αντιοξειδωτικών. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αλλά και την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των διαφορετικών αντιοξειδωτικών ουσιών. Ωστόσο, πριν από τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών, είναι απαραίτητη η εξαγωγή των διαφορετικών ενώσεων από το τρόφιμο - δείγμα. Αυτό καθίσταται δυνατό με την χρήση οργανικών διαλυτών, υπερκρίσιμων υγρών, μικροκυμάτων, υπερκρίσιμου νερού, υψηλή υδροστατική πίεση, παλμικά ηλεκτρικά πεδία και υπέρηχους (Oroian *et Escriche*, 2015).

Η απόδοση της εκχύλισης των αντιοξειδωτικών ενώσεων από το φυτικό υλικό επηρεάζεται κυρίως από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείται η διαδικασία της εκχύλισης υγρού-στερεού. Κάθε φυτικό υλικό, λόγω της δόμησης και της σύνθεσης του, έχει μοναδικές ιδιότητες. Έτσι η συμπεριφορά του δείγματος που προκύπτει από το σύστημα υλικού-διαλύτη είναι απρόβλεπτη.

#### A. Εκχύλιση με διαλύτες:

Η εκχύλιση με την χρήση διαλύτη είναι μια διαδικασία διαχωρισμού στην οποία εφαρμόζεται ένας διαλύτης για να εξάγει/διαχωρίσει ένα επιθυμητό συστατικό (η διαλυμένη ουσία) από ένα στερεό δείγμα. Ο συντελεστής διαχωρισμού για την εκχύλιση με διαλύτη είναι η χημική ισορροπία του συστατικού, μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης ενώ η κινητήρια δύναμη για την εκχύλιση με την χρήση διαλύτη είναι η διαφορά συγκέντρωσης του συστατικού μεταξύ των δύο φάσεων.

Ένας ιδανικός διαλύτης πρέπει να έχει τα ακόλουθα επιθυμητά χαρακτηριστικά: θα πρέπει να είναι χημικά σταθερός και να έχει επιλεκτικότητα, η διαλυτότητα της ουσίας σε αυτόν να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, ενώ να είναι ελάχιστη για τα άλλα συστατικά, να είναι εύκολα επανακτήσιμος και τέλος θα πρέπει να έχει χαμηλό ιξώδες για την εύκολη άντληση και μεταφορά. Η διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας των μορίων καθορίζει την αμοιβαία διαλυτότητα, ενώ βρέθηκε ότι η προσθήκη μιας ορισμένης ποσότητας νερού (5-10 mL, ανάλογα με το υλικό) σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες βελτιστοποιεί την συνολική απόδοση της εκχύλισης. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη προέκυψε ότι οι εκχυλίσεις που γίνονται με απόλυτη μεθανόλη έχουν υψηλότερη απόδοση από



εκείνες με την καθαρή αιθανόλη και ακετόνη (όταν δηλαδή αυξάνετε η πολικότητα του διαλύτη). Η συνδυασμένη χρήση του νερού και οργανικών διαλυτών μπορεί να διευκολύνει την εξαγωγή των χημικών ουσιών. Για την εκχύλιση των καροτενοειδών (όπως είναι το λυκοπένιο) που είναι περισσότερο λιποδιαλυτά χρησιμοποιούνται διαλύτες μη πολικοί ή πολικοί απροτικοί, όπως είναι ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη (Oroian *et Escriche*, 2015).

### **B. Χρήση υπέρηχων:**

Η χρήση των υπερήχων είναι μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές στην βιομηχανία καθώς ενισχύει τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Ο ρυθμός μεταφοράς είναι αυξημένος καθώς προκαλείτε ρήξη του φυτικού ιστού και έτσι βελτιώνετε η απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ουσιών στο διαλύτη. Αυτό βασίζεται στην δημιουργία φυσαλίδων κατά την διάρκεια μιας εκχύλισης, οι οποίες όταν καταρρέουν δημιουργούν τοπικά φαινόμενα πίεσης με αποτέλεσμα να γίνεται έκσταση στο φυτικό ιστό (Oroian *et Escriche*, 2015).

### **Γ. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά :**

Η διαφορά της μεθόδου αυτής σε σύγκριση με την εκχύλιση με διαλύτη είναι ότι χρησιμοποιεί τους διαλύτες όταν αυτοί βρίσκονται στην υπερκρίσιμη μορφή τους. Σε αυτή την μορφή τα ρευστά έχουν επιθυμητές ιδιότητες μεταφοράς που ενισχύουν προσαρμοστικότητα τους ως διαλύτες. Οι εκχυλίσεις αυτές είναι γρήγορες (10-60 λεπτά), επιλεκτικές, δεν χρειάζεται να γίνει επιπλέον διαχωρισμός των ουσιών και υπάρχει δυνατότητα να γίνουν ακόμα και με μικρή ποσότητα δείγματος (Said *et al.*, 2015). Οι εκχυλίσεις με την χρήση υπερκρίσιμου νερού εφαρμόζονται κυρίως για την εξαγωγή των φυσικών προϊόντων από βότανα και φυτά. Το νερό στην υπερκρίσιμη μορφή του έχει θερμοκρασία μεταξύ 100° C και 374° C και υψηλή πίεση ώστε να διατηρείτε σε υγρή φάση (κάτω από την κρίσιμη πίεση 22 MPa) (Oroian *et Escriche*, 2015).

#### **Δ. Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων :**

Πρόκειται για μια δημοφιλή τεχνική γιατί μειώνει τον χρόνο εκχύλισης και του διαλύτη που χρησιμοποιείται. Η πίεση και θερμοκρασία μπορούν να ελεγχθούν ενώ εάν η διαδικασία λάβει χώρα σε κλειστό δοχείο, εκτός από την μείωση του χρόνου παρατηρείται και αύξηση της απόδοσης. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από φυτά

#### **Ε. Χρήση υψηλής υδροστατικής πίεσης:**

Η χρήση της βελτιώνει τις ταχύτητες μεταφοράς μάζας, καθώς αυξάνει την διαπερατότητα των κυττάρων καθώς και την δευτερεύουσα διάχυση μεταβολιτών σύμφωνα με τις αλλαγές στις μεταβατικές φάσεις (Oroian *et Escriche*, 2015).

**Πίνακας 1:** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διάφορων τεχνικών εκχύλισεων

Τεχνική	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Εκχύλιση με διαλύτες	Φτηνή, δεν χρειάζεται ιδιαίτερο εξοπλισμό, ο διαλύτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά αλλά και να αυτοματοποιηθεί	Χρονοβόρα επιμολύνει το περιβάλλον, χρήση υψηλών θερμοκρασιών, υπολείμματα διαλύτη στο εκχύλισμα, χαμηλή επιλεκτικότητα και αποδοτικότητα.
Χρήση υπέρηχων	Εναλλακτική τεχνική, απλή οικονομική και αποδοτική. Η χρήση διαλύτη δεν είναι απαραίτητη, φιλική στο περιβάλλον χαμηλές θερμοκρασίες	Για εκχύλιση πολυφαινολών, η χρήση των υπέρηχων πρέπει να εφαρμοσθεί για μια ώρα σε θερμοκρασία 70 °C.
Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά	Τεχνική φιλική προς το περιβάλλον. Δυνατότητα χρήσης μεγαλύτερου αριθμού εκχυλιτών. Επιλεκτικότητα . Μη τοξική και μη εύφλεκτη.	Γίνετε χρήση μη πολικών διαλυτών εκχύλισης όπως είναι το CO <sub>2</sub>
Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων	Μη χρονοβόρα τεχνική με υψηλή αποδοτικότητα και χρήση λιγότερης ενέργειας αλλά και διαλύτη.	Απαραίτητη η χρήση φυγόκεντρου ή διηθητικού μέσου. Μείωση της αποδοτικότητας στην εκχύλιση μη πολικών ενώσεων.
Χρήση υψηλής υδροστατικής πίεσης	Εκχύλιση ισχυρών, ασθενών, και μη πολικών ενώσεων και παραλαβή ουσίας σε υψηλή καθαρότητα.	Δεν υπάρχει ευελιξία στην επιλογή του δοχείου που θα γίνει η τεχνική. Περίπλοκη στο χειρισμό των υλικών

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η οξείδωση ορίζεται ως η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο, μόριο ή ιόν. Το σθένος μιας ουσίας, δηλαδή η οξειδωτική της κατάσταση μειώνεται από την πρόσληψη ή την δέσμευση των ηλεκτρονίων της, και κατά συνέπεια η ουσία ανάγεται. Σε μια οξειδο-αναγωγική αντίδραση η αναγωγική ένωση προσφέρει τα ηλεκτρόνια της και έτσι η ίδια οξειδώνεται

Κατά την αυτοοξείδωση των λιπών, η λιπαρή ύλη απορροφά οξυγόνο από την ατμόσφαιρα με αποτέλεσμα το προϊόν να οξειδώνεται (Σφλώμος, 2011). Το οξυγόνο συμμετέχει σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του οργανισμού, εξαιτίας της ικανότητας του να δέχεται μονήρη ηλεκτρόνια και να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009)

### 2.1 Ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου

Γενικά ως ελεύθερες ρίζες ορίζεται ένα άτομο ή μόριο που έχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα τροχιακό του. Οι ρίζες αυτές αντιδρούν εύκολα με τα γειτονικά τους μόρια παίρνοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο (και μετατρέποντας αυτά στην συνέχεια σε ελεύθερες ρίζες) αρχίζοντας έτσι μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων. Είναι επικίνδυνες για τον οργανισμό αφού μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή μακρομορίων όπως είναι το DNA και οι πρωτεΐνες, και να οδηγήσουν ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο και παθολογικές καταστάσεις. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν διάφορα συστήματα ασφαλείας με ένα από αυτά να είναι τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά και οι διάφορες δράσεις τους (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) ορίζονται όλες οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο καθώς και αυτές που εύκολα θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες. Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται μερικές ενεργές μορφές οξυγόνου καθώς και η δραστηριότητά τους.

**Πίνακας 2:** Ενεργές μορφές οξυγόνου και η δράση τους (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009)

ROS	Όνομα	Ιδιότητες
$O_2$	Οξυγόνο	Διπλή ελεύθερη ρίζα με μικρή οξειδωτική ικανότητα
$O_2^-$	Ανιόν υπεροξειδίου	Ελεύθερη ρίζα με μεγάλη οξειδωτική ικανότητα
$HO\cdot$	Ρίζα υδροξυλίου	Ελεύθερη ρίζα με μεγάλη οξειδωτική ικανότητα
$RO\cdot$	Ρίζα αλκοξειδίου	Ελεύθερη ρίζα
$ROO\cdot$	Ρίζα υπεροξειδίου	Ελεύθερη ρίζα

Οι ρίζες  $RO\cdot$  και  $ROO\cdot$  δημιουργούνται κατά την αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου και του ανιόντος υπεροξειδίου με οργανικά μόρια κυρίως λιποειδή (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

## 2.2 Διαδικασία Αυτοξειδωσης

Κατά την αυτοξειδωση το τριγλυκερίδιο μεταπίπτει σε μια ασταθή κατάσταση και σχηματίζει ρίζες λιπαρών οξέων ( $R\cdot$ ) που αντιδρούν με το οξυγόνο σχηματίζοντας ρίζες υπεροξειδίου ( $ROO\cdot$ ). Με την σειρά τους αυτές αντιδρούν με λιπαρά οξέα σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων (ξεκινώντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις) και υδροϋπεροξειδία ( $ROOH$ ), που και αυτά μετά διασπώνται σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα και αλκοόλες. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για την δυσάρεστη γεύση και οσμή που έχουν τα τρόφιμα με οξειδωτική τάγγιση. Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι αυτοκαταλυτική αντίδραση (Μπλούκας, 2004).

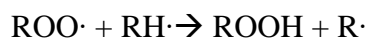
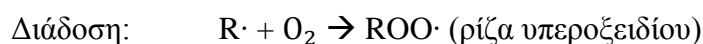
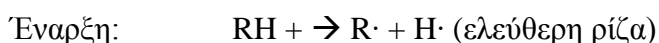
Ο βαθμός της αυτοξειδωσης τους εξαρτάτε από την σύσταση που έχουν τα λιπαρά οξέα, το βαθμό ακορεστότητας τους, την φύση του υποστρώματος που εκτίθεται στο οξυγόνο αλλά και την παρουσία και την δράση των αντιοξειδωτικών. Εκτός από το οξυγόνο άλλοι παράγοντες που βοηθούν στο σχηματισμό των ελεύθερων ριζών είναι η παρουσία του όζοντος ( $O_3$ ), τα φυτοφάρμακα, οι ανθεκτικοί

οργανικοί ρύποι (POP), τα φάρμακα, οι ακτινοβολίες UV και γ και το κάπνισμα (Σφλώμος, 2011).

Η αυτοξειδωση πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις. Την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009). Πιο αναλυτικά:

- Στην φάση εκκίνησης αρχίζει να απορροφάτε το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, εάν και η ποσότητα του προσροφημένου παραμένει χαμηλή. Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής ο βαθμός της αυτοξειδωσης εξαρτάτε από την σύσταση των λιπαρών οξέων. Όσοι περισσότεροι διπλοί δεσμοί υπάρχουν τόσο πιο σύντομη είναι η εναρκτήρια φάση και τόσο μεγαλύτερος ο βαθμός της οξειδωσης. Αποσπάται ένα άτομο H- από μια μεθυλενομάδα (-CH-) γειτονική προς τον διπλό δεσμό και έτσι σχηματίζετε η ελεύθερη ρίζα ατόμου υδρογόνου και μια ελεύθερη ρίζα στο άτομα άνθρακα του μεθυλενίου. Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται παρουσία φωτός και μετάλλων. (Σφλώμος, 2011)
- Κατά την φάση της διάδοσης το οξυγόνο προστίθεται απευθείας στο ενεργοποιημένο μεθυλένιο και προκύπτει μια υπεροξειδική ελεύθερη ρίζα. Έπειτα παράγετε υδροϋπεροξειδίο (πρωτογενές προϊόν) και μια νέα ρίζα, όταν μια υπεροξειδική ελεύθερη ρίζα αντιδρά με την μεθυλομάδα ενός άλλου ακόρεστου λιπαρού οξέος. Με αυτόν τον τρόπο το σύστημα οδηγείτε σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Σφλώμος, 2011).
- Κατά την τρίτη φάση γίνεται η διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που όπως έχει αναφερθεί είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη των δυσάρεστων οσμών και γεύσεων στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρά οξέα. Ο γενικός μηχανισμός διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων ακολουθεί τρία στάδια όπου στο πρώτο γίνεται η δημιουργία νέων ελεύθερων ριζών και στα άλλα δυο η παραγωγή των δευτερογενών προϊόντων της αντίδρασης (κετόνες λιπαρά οξέα κλπ) (Σφλώμος, 2011).\

Συνοπτικά η αλληλουχία των αντιδράσεων παρατάσσετε ως εξής:



### 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοξειδωση

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοξειδωση είναι οι εξής :

1. Έναρξη ακόρεστων λιπαρών στην λιπαρή ύλη: αποτελεί μια βασική προϋπόθεση αφού βάση του μηχανισμού της, ενεργοποιούνται οι γειτονικές ως προς τον διπλό δεσμό μεθυλενομάδες, ενώ η έναρξη δυο γειτονικών διπλών δεσμών αυξάνει την δραστηριότητα τους.
2. Διαθεσιμότητα οξυγόνου: η παρουσία του είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της αυτοξειδωσης. Έτσι στην βιομηχανία τροφίμων, για την διατήρηση των λιπαρών υλών ανέπαφων θα πρέπει η συσκευασία τους να γίνεται υπό κενό αλλά και απομάκρυνση του οξυγόνου.
3. Ηλιακή ακτινοβολία και θερμοκρασία: η θερμότητα και το φως καταλύουν την δημιουργία ελεύθερων ριζών κατά την έναρξη της αυτοξειδωσης. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η αποθήκευση των λιπαρών υλών σε χαμηλές θερμοκρασίες ενώ παράλληλα πρέπει οι συσκευασίες τους να αποκλείουν την διέλευση του φωτός.
4. Παρουσία μετάλλων: πολλά μέταλλα όπως Cu, Fe κλπ καταλύουν την αυτοξειδωση. Έτσι τα υλικά συσκευασίας αλλά και ο εξοπλισμός θα πρέπει να είναι ελεύθερα αυτών των μετάλλων για την αποφυγή της οξειδωσης.

5. Χαμηλή υγρασία: η ύπαρξη υγρασίας δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στην αντίδραση της οξείδωσης για αυτό και είναι επιθυμητή στα προϊόντα σε χαμηλή περιεκτικότητα.
6. Αντιοξειδωτικά: όπως έχει αναφερθεί η παρουσία των ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών δρα ανασταλτικά στην διαδικασία της αυτοοξείδωσης. (Σφλώμος, 2011)

#### 2.4 Δράση αντιοξειδωτικών κατά της οξείδωσης και μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά στον οργανισμό ή στα τρόφιμα λειτουργούν ως αποσβέστες ηλεκτρονίων. Η δράση τους είναι δηλαδή, η δέσμευση των ελεύθερων ριζών ή η αναστολή της παραγωγής τους. Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης που χρησιμοποιούν τα αντιοξειδωτικά, γίνετε ο διαχωρισμός τους σε ομάδες. Ο διαχωρισμός κατατάσσει τα αντιοξειδωτικά σε πρωτοταγή, τα οποία διακόπτουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών και στα δευτεροταγή που έχουν προληπτική δράση και διασπούν τα υδροϋπεροξειδία επιβραδύνοντας έτσι τον ρυθμό εκκίνησης της αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί στον πολυμερισμό. (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009) Στα πρωτοταγή ανήκουν οι φαινολικές ενώσεις και οι τοκοφερόλες. Στα δευτεροταγή οι δράσεις των αντιοξειδωτικών είναι:

1. Ως δεσμευτές οξυγόνου. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του.
2. Ως δεσμευτές μετάλλου, όπου είναι το κιτρικό οξύ, το τρυγικό οξύ και το EDTA
3. Ως αποσβέστες διεγερμένου οξυγόνου που είναι το β-καροτένιο και οι τοκοφερόλες
4. Ως αναγωγικά που ρόλος τους είναι η αναγέννηση των φαινολικών αντιοξειδωτικών.
5. Και τέλος ως πολλαπλής δράσης φωσφολιπίδια (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009).



Τα αντιοξειδωτικά, δρουν μετατρέπόμενα προσωρινά σε ελεύθερες ρίζες. Προσφέρουν δηλαδή τα ηλεκτρόνια τους στις ελεύθερες ρίζες, έτσι αυτές εξουδετερώνονται, ενώ το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται προσωρινά σε ελεύθερη ρίζα αφού έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Όμως τα αντιοξειδωτικά αυτά έχουν την ικανότητα να αποβάλουν το ασύζευκτο αυτό ηλεκτρόνιο χωρίς να δημιουργούν βλάβες στα κύτταρα-οργανισμό λόγω των συστημάτων των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Οι δράσεις και οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και ηλεκτρονίων εξηγούν πάρα πολλά χημικά φαινόμενα που συνοδεύουν όχι μόνο την τροφική αλυσίδα αλλά σχεδόν όλο το σύνολο των βιοχημικών κύκλων της ζωής, όπως είναι η γήρανση των κυττάρων και του οργανισμού αλλά και η ενοχοποίηση τους για καρκινογενέσεις (Σφλώμος, 2011)

## **2.5 Οξειδωτικό στρες και η σημασία των αντιοξειδωτικών για τον άνθρωπο**

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε πολλές παθολογικές και φυσιολογικές καταστάσεις στον οργανισμό. Είναι μέρος την άμυνας του οργανισμού και βοηθούν τα φαγοκύτταρα να καταπολεμήσουν παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ συμμετέχουν και σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του οργανισμού. Όμως όπως έχει ήδη αναφερθεί πρόκειται για πολύ δραστικά μόρια που σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχουν τοξική δράση και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009). Αυτό ευθύνεται στην οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών που έχουν την δυνατότητα να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από σημαντικά μόρια που μπορεί να βρίσκονται στο περιβάλλον τους, (όπως είναι τα νουκλεϊνικά οξέα) και τα τροποποιούν σε μη φυσικές και επικίνδυνες δομές/ουσίες. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι κατά κύριο λόγο μη αντιστρεπτές. Με αυτό τον τρόπο ερεθίζουν και καταστρέφουν τους ιστούς που τα περιέχουν και τους οδηγούν σε πολλές σημαντικές χημικές (οξειδώσεις), οργανοληπτικές (τάγγισμα) και βιολογικές αλλοιώσεις (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Ένα από τα χαρακτηριστικά παραδείγματα για την επίδραση των ελευθέρων ριζών και των αλλοιώσεων που προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι η προβολή του DNA από αυτές οδηγώντας σε καρκινογένεση, αλλά και η αντίδραση με την LDL χοληστερόλη που οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας και αθηροσκλήρωσης (Σφλώμος, 2011). Έτσι γίνεται εμφανής η ανάγκη του οργανισμού

να διατηρεί την ισορροπία ανάμεσα στα προ-οξειδωτικά και στα αντιοξειδωτικά μόρια. Όταν επέρχεται διαταραχή αυτής της ισορροπίας τα προ-οξειδωτικά μόρια αυξάνονται και αυτό οδηγεί στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων και ασθενειών στον ανθρώπινο οργανισμό έχει γίνει πλέον αποδεκτός. Το συσχετίζουν με την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης (Kojoda *et* Harrison, 1999), της νόσου Alzheimer, με το Parkinson, το εγκεφαλικό, την ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον καρκίνο (Pisoschi *et* Negulescu, 2011)

Συνεπώς η ανάγκη για πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής είναι απαραίτητη για την θωράκιση του ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών ενάντια των παθήσεων που αναφέρθηκαν είναι οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες εκτός από την παρουσία τους στα φυτικά τρόφιμα (και την πρόληψη αυτών μέσω του φαγητού και των ροφημάτων) έχουν απομονωθεί και από τα φαρμακευτικά φυτά και βότανα, και λόγω της δράσης τους εντάσσονται στην κατηγορία των φυτοχημικών συστατικών τα οποία χρησιμεύουν ως τροφοφάρμακα. Γενικά οι φαινολικές ουσίες βρίσκονται σε πολλά και διαφορετικά αγροτικά προϊόντα από τα βότανα και τα φρούτα μέχρι το κρασί. Απαντώνται σε όλες τις μορφές από τις πιο απλές όπως είναι το γαλλικό οξύ και τις τανίνες, μέχρι τις πιο σύνθετες δομές όπως είναι οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή (Σφλώμος, 2011).

Το ενδιαφέρον για την μελέτη των πολυφαινολών και την δράση τους εναντίων των καρδιαγγειακών νοσημάτων ξεκίνησε εξαιτίας της παρατήρησης του «γαλλικού παράδοξου» από τους επιστήμονες. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι στους Γάλλους οι οποίοι καταναλώνουν με την τροφή τους πολύ μεγάλη ποσότητα λιπαρών υλών (πολλές από αυτές κορεσμένα λίπη, όπως τυριά, βούτυρο, φουα γκρά κτλ) η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων είναι αρκετά μικρότερη από ότι άλλων λαών με παρόμοιο διαιτολόγιο. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι Γάλλοι καταναλώνουν μαζί με το φαγητό τους μεγάλες ποσότητες φλαβονοειδών λόγω της αυξημένης κατανάλωσης κρασιού.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δράσης των πολυφαινόλων έναντι των χρόνιων νοσημάτων είναι η επίδραση τους στην πρόληψη και θεραπεία της Ισχαιμικής καρδιοπάθειας (στεφανιαία νόσο), λόγω των πλειοτροπικών ιδιοτήτων τους και της διαρθρωτικής πολυμορφίας τους. Ειδικότερα, οι πολυφαινόλες μειώνουν την μυοκαρδιακή κατανάλωση οξυγόνου, αυξάνουν την παροχή οξυγόνου, ενισχύσουν τον μεταβολισμό μετά από έμφραγμα, αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και των θρόμβων, προωθούν την αγγειογένεση ή την αποκατάσταση τους, προστατεύουν το υπόλοιπα κύτταρα του μυοκαρδίου και βοηθούν στην αποκατάσταση της σύσπασης του. (Du *et al.*, 2016). Επιπλέον πρόσφατες έρευνες σε λαούς της Άπω Ανατολής (οι οποίοι καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες πράσινου κυρίως τσαγιού) έδειξαν ότι σε μεγάλο δείγμα γυναικών (60.000) που κατανάλωναν 2-3 φλιτζάνια τσαγιού την ημέρα μείωσαν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων κατά 10%. (Σφλώμος, 2011).

## 2.6 Οξείδωση στα τρόφιμα και τα αντιοξειδωτικά στην βιομηχανία τροφίμων

Η οξείδωση των τροφίμων είναι ένα πρόβλημα μεγάλης οικονομικής σημασίας στην παραγωγή των τροφίμων καθώς μειώνει την οργανοληπτική και διατροφική ποιότητα αυτών. Πιο ευαίσθητα στην οξείδωση είναι τα λίπη και έλαια με την διατροφική ποιότητα αλλά και ασφάλεια των τροφίμων να μειώνετε από την δημιουργία των δευτερευόντων προϊόντων της αντίδρασης (διάσπαση του υδροϋπεροξειδίου σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα και αλκοόλες), όταν αυτά επεξεργάζονται ή μαγειρεύονται (τηγανιτά τρόφιμα). (Μπλούκας, 2004).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται και από την βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικά ώστε να μειωθεί η χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών λόγω των πιθανών κινδύνων που κρύβουν αυτά για την υγεία του ανθρώπου. Σε έρευνα που έγινε πρόεκυψε ότι ο γαλλικός προπυλεστέρας προκάλεσε μεταβολή στα νεφρά των πειραματόζωων. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται προέρχονται από εκχυλίσματα βοτάνων και καρυκευμάτων, από όσπρια, σιτηρά, ελαιούχους σπόρους, φρούτα και λαχανικά (Μπλούκας, 2004).

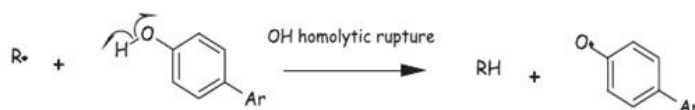
Επιπρόσθετα υπάρχει χρήση αντιοξειδωτικών που είναι όμοια με τα φυσικά αντιοξειδωτικά (ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E), αλλά έχουν την μορφή της α-τοκοφερόλης και του β-καροτενίου. Έχουν την ίδια δομή με αυτή που έχουν οι φυσικές ενώσεις, αλλά αυτά παρασκευάζονται συνθετικά (Škronánková *et al.*, 2012).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

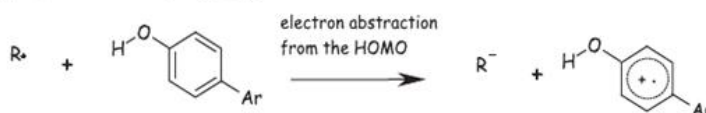
Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων βιολογικής προέλευσης υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, που διαφέρουν μεταξύ τους στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος αλλά και στην πολυπλοκότητα τους, στον εργαστηριακό εξοπλισμό, στον χρόνο που χρειάζεται αλλά και στην ικανότητα τους να αναλυθούν λιπόφιλα και υδρόφιλα δείγματα. Η ταξινόμηση των μεθόδων αυτών γίνεται σε δυο κατηγορίες βάση του μηχανισμού με τον οποίο δρουν. Έτσι υπάρχουν οι μέθοδοι που βασίζονται στην μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT μέθοδοι) και σε μεθόδους που βασίζονται στην μεταφορά ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET μέθοδοι).

Στην πρώτη κατηγορία οι μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα που έχει το αντιοξειδωτικό να δίνει ένα άτομο υδρογόνου, καταστρέφοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από την παραγωγή των ελεύθερων ριζών. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μέθοδος ORAC (Huang *et al.*, 2005)

### 1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



### 2. Single Electron Transfer (SET)



**Εικόνα 10:** Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών (Leopoldini *et al.*, 2011)

Η δεύτερη κατηγορία βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε ένα οξειδωτικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα αυτό να ανάγεται. Κατά την αναγωγή του αντιδραστηρίου γίνεται αλλαγή του χρώματος του. Ο βαθμός της αλλαγής αυτής εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών

που υπάρχουν στο δείγμα προς μέτρηση, ενώ θεωρείτε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ίση με την αναγωγική ικανότητα. Η εφαρμογή πολλαπλών SET μεθόδων για την για την μέτρηση της μείωσης της ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού οδηγεί συχνά σε εξαιρετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων τους (Huang *et al.*, 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφοροι μέθοδοι όπως είναι η FRAP, η μέθοδος των ολικών φαινολών με την χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, η DPPH, η TEAC κα.

Σε κάποιες περιπτώσεις τα αντιοξειδωτικά δρουν μέσω πολλαπλών μηχανισμών ή μέσω ενός μηχανισμού ανάλογα με την αντίδραση του συστήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα καροτενοειδή που ενώ δεν είναι πολύ καλοί αποσβέστες υδροϋπεροξειδίων σε σχέση με τις φαινολικές ενώσεις και άλλα αντιοξειδωτικά, είναι πολύ καλοί αποσβέστες ηλεκτρονίων κάτι στο οποίο τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι αναποτελεσματικά (Prior *et al.*, 2005).

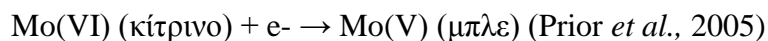
Παρακάτω αναφέρονται οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

### 3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Γνωστή και ως μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολών με αρχική χρήση την ανάλυση πρωτεϊνών, επωφελούμενη την δραστικότητα του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείτε, ενάντια στο πρωτεϊνικό υπόλοιπο της τυροσίνης, η οποία περιέχει μια φαινυλομάδα. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των ολικών φαινολών στο κρασί και από τότε έχει βρει διάφορες χρήσεις. Είναι μια μέθοδος απλή και βολική, με αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα.

Πρόκειται για μια φωτομετρική τεχνική που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέως από τα οποία αποτελείτε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο τυπικά παρασκευάζεται με το βρασμό για 10h , του μείγματος μολυβδαινικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 25 gr), συμπυκνωμένου υδροχλωρικού οξέος (100ml), φωσφορικού οξέος 85% και νερού (700ml). Μετά το βρασμό προστίθεται θειϊκό λίθιο ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 150gr). Έτσι προκύπτει διάλυμα έντονου κίτρινου χρώματος. Η επιμόλυνση των αναγωγικών ουσιών οδηγεί στην εμφάνιση πράσινου χρώματος, όπου με την προσθήκη οξειδωτικών επαναφέρετε το

επιθυμητό, κίτρινο χρώμα. Οι αναγωγικές αντιδράσεις οδηγούν στην εμφάνιση κυανού χρώματος. Πιστεύετε ότι το μολυβδαίνιο είναι πιο εύκολο να αναχθεί στο σύμπλοκο και η αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα μεταξύ των αντιδρώντων και Mo (VI):- (Huang *et al.*, 2005).



Το αντιδραστήριο FC δεν είναι ειδικό στα φαινολικά συστατικά καθώς μπορεί να αναχθεί και από μη φαινολικά συστατικά όπως είναι η βιταμίνη C και ο Cu(I). Η αντίδραση των φαινολικών συστατικών με το αντιδραστήριο FC γίνεται μόνο κάτω από βασικές συνθήκες και για αυτό το λόγο γίνεται ρύθμιση του pH με διάλυμα ανθρακικού νατρίου ώστε  $\text{pH} \approx 10$ . Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών κατατάσσετε στην κατηγορία SET. Αυτό υποστηρίζετε από την δημιουργία και την ύπαρξη φαινολικών ανιόντων τα οποία ανάγουν το αντιδραστήριο FC. Η εμφάνιση του κυανού χρώματος δεν εξαρτάτε από την δομή που έχουν τα φαινολικά συστατικά (Huang *et al.*, 2005).

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu έχει μερικά πλεονεκτήματα όπως είναι

1. Το αντιδραστήριο είναι εμπορικά διαθέσιμο, και η διαδικασία είναι τυποποιημένη.
2. Η απορρόφηση σε μεγάλο μήκος κύματος του χρωμοφόρου (730 nm) ελαχιστοποιεί την πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω της καταμέτρησης και των χρωστικών του δείγματος καθώς πολλά οργανικά δείγματα περιέχουν χρωστικές ουσίες.
3. Είναι μια γενικά αποδεκτή τεχνική που εφαρμόζετε για τα αντιοξειδωτικά τροφικής προελεύσεως σε όλο τον κόσμο
4. Έχει παραχθεί μια μεγάλη βάση δεδομένων με συγκρίσιμα αποτελέσματα

(εκφράζετε ως συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες, αντί για μείωσης της παραγωγικής ικανότητας). Η μέθοδος Folin-Ciocalteu εφαρμόζετε σε υδατικά διαλύματα (Huang *et al.*, 2005).

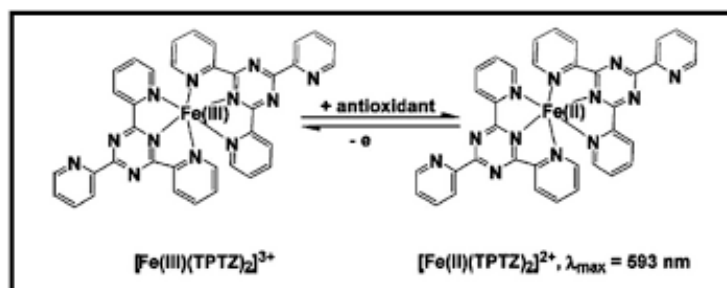
Για την απόκτηση αξιόπιστων αλλά και προβλέψιμων αποτελεσμάτων απαραίτητη προϋπόθεση είναι (Prior *et al.*, 2005):

- A. Η σωστή αναλογία του όγκου μεταξύ του αντιδραστηρίου και του αλκαλίου
- B. Εφαρμογή του βέλτιστου χρόνου αντίδρασης και θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του χρώματος
- C. Οπτική πυκνότητα  $\lambda_{\max}$  στα 765 nm
- D. Χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο

### 3.2 Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric iron reducing antioxidant power) είναι μέθοδος απλή, φθηνή, γρήγορη και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ισχύος ενός φυτικού εκχυλίσματος. Αρχικά αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain για την μέτρηση της αναγωγικής ισχύος στο πλάσμα και έπειτα προσαρμόστηκε κατάλληλα για την χρήση της σε δείγματα βοτανικής προελεύσεως (Prior *et al.*, 2005). Η αντίδραση μετρά την αναγωγή του σύμπλοκου τριχλωριούχου σιδήρου – TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) σε ένα έγχρωμο προϊόν (σε όξινο pH, ώστε να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου). Με την μέθοδο FRAP δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε ενώσεις που δρουν ως αποσβέστες ελεύθερων ριζών (μεταφορά υδρογόνου), ιδιαίτεραθειόλες και πρωτεΐνες.

Τα αποτελέσματα της FRAP μπορεί να διαφέρουν παρά πολύ, ανάλογα με την χρονική διάρκεια της ανάλυσης. Οι φαινόλες που δεσμεύουν το σίδηρο ή έχουν την ικανότητα να διασπώνται σε ενώσεις με χαμηλή ή διαφορετική δραστηριότητα, αναλύονται καλύτερα σε σύντομα χρονικά διάστημα όπως είναι τα 4 min, ενώ ενώσεις όπως είναι οι πολυφαινόλες αντιδρούν πιο αργά και χρειάζονται μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης για να ανιχνευθούν (Huang *et al.*, 2005).





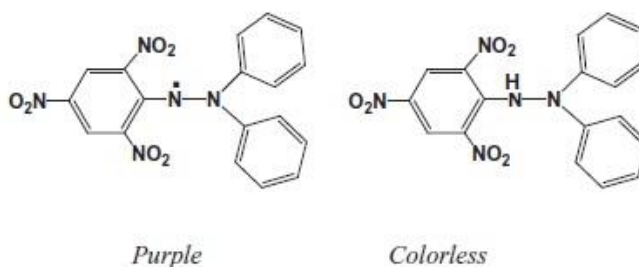
**Εικόνα 11:** Αναγωγή του συμπλόκου Fe Cl<sub>3</sub>-TPTZ σε έγχρωμο προϊόν

Η σειρά της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών μπορεί να διαφέρει και να αλλάξει ανάλογα με το χρόνο αντίδρασης. Με την δοκιμασία αυτή δεν μπορούμε να μετρήσουμε αντιοξειδωτικά που περιέχουν στο μόριο τους θειόλες όπως είναι η γλουταθειόνη, μετράει μόνο την αναγωγική ικανότητα με βάση το ιόν τρισθενούς σιδήρου (Prior *et al.*, 2005).

### 3.3 Μέθοδος DPPH

Το DPPH (2,2'-diphenylpicryl hydrazyl) πρόκειται για μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες ρίζες αζώτου, με απορροφήσεις σε ορατό και υπεριώδες, με μέγιστο μήκος κύματος τα 515 nm (Huang *et al.*, 2005). Έχει ένα βαθύ μοβ χρώμα και όταν αντιδρά με άλλες ρίζες, ηλεκτρόνια, ή άτομα υδρογόνου οδηγείτε σε απώλεια του χρώματος του. Είναι υδρόφοβο και έτσι όλες οι αντιδράσεις πρέπει να γίνουν σε οργανικούς διαλύτες. Από την βιβλιογραφία αναφέρετε ότι οι αντιδράσεις του οφείλονται ως επί των πλείστον σε HAT μηχανισμούς, ενώ οι αντιδράσεις του με διαλύτες που είναι ισχυρά δεσμευτικοί στο υδρογόνο όπως είναι η μεθανόλη, (ο διαλύτης που χρησιμοποιείτε πιο συχνά) παρεμποδίζουν την απελευθέρωση ατόμων υδρογόνου και έτσι ενισχύονται οι SET αντιδράσεις.

Οι αντιδράσεις του DPPH είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στις συνθήκες του συστήματος όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση, δηλαδή στην ύπαρξη νερού και διαλύτη, στο pH, στο οξυγόνο και στην έκθεση στο φως. Η ύπαρξη και των δύο μηχανισμών αντιδράσεων (SET και HAT) είναι ιδιαίτερα εμφανής στην μεταβλητότητα των αντιδράσεων που παρουσιάζει το DPPH με διαλύτη (Schaich *et al.*, 2015)



**Εικόνα 12:** Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH

Τα αποτελέσματα εκφράζονται και ως το ποσοστό του DPPH (% DPPH<sub>rem</sub>) που απομένει στο δείγμα και είναι αντιστρόφως ανάλογο με την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο Το ποσοστό υπολογίζεται ως :

$$\%DPPH_{rem} = 100 * \frac{DPPH_{rem}}{DPPH_{T=0}}$$
, όπου το DPPH<sub>T=0</sub> είναι το αρχικό ποσοστό DPPH στο δείγμα.

Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών εξαρτάτε από το χρόνο αντίδρασης τους και κατηγοριοποιείται ως ταχεία (για χρόνο αντίδρασης <5 min), ενδιάμεση (για χρόνο αντίδρασης 5-30 min) και αργή (για χρόνο αντίδρασης >30 min). Επιπλέον η παράμετρος AE (antiradical efficiency, αποτελεσματικότητα κατά των ριζών) εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού και υπολογίζεται ως  $AE = \left(\frac{1}{EC_{50}}\right) * T_{EC50}$  όπου ως EC<sub>50</sub> ορίζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί μία μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% ενώ T<sub>EC50</sub> ως ο χρόνος που απαιτείται για την προσέγγιση μιας σταθερής κατάστασης με συγκέντρωση EC<sub>50</sub> υπολογίζεται από την κινητική καμπύλη. (Huang *et al.*, 2005).

Τέλος διαπιστώθηκε ότι τυχαία οξέα ή βάσεις που υπάρχουν στο διαλύτη μπορούν να επηρεάσουν την ιοντική ισορροπία των φαινολών και να προκαλέσουν μείωση ή αύξηση, των μετρήσεων (Huang *et al.*, 2005).

### 3.4 Μέθοδος ORAC

Η δοκιμασία ORAC είναι μια φθορισμομετρική τεχνική. Αρχικά στην διαδικασία γίνονται χρήση της β-φυκοερυθρίνης (β-PE, φθορίζουσα πρωτεΐνη που απομονώνεται από το *Porphyridium cruentum*) ως ανιχνευτής της αντίδρασης. Η μείωση του φθορισμού της β-PE παρείχε μια ένδειξη της καταστροφής που δημιουργείται από την αντίδραση της με τις ρίζες υδροϋπεροξειδίων. Αργότερα, βρέθηκε ότι β-PE είχε πολλά μειονεκτήματα όπως την μεγάλη μεταβλητότητα της από παρτίδα σε παρτίδα, τον αποχρωματισμό της από την έκθεση στο φως, την αλληλεπίδραση της με μερικές πολυφαινόλες και την μείωση του φθορισμού της ακόμη και χωρίς την προσθήκη ελεύθερων ριζών (Prior, 2015).

Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων η β-PE αντικαταστάθηκε από την φλουορεσκεΐνη. Πρόκειται για μια συνθετική μη πρωτεϊνική ουσία που δρα ως ανιχνευτής και δεν έχει τους περιορισμούς της β-PE. Η μέθοδος ανήκει στην κατηγορία του μηχανισμού δράσης μεταφοράς οξυγόνου και αποτελεί ένα άμεσο μέτρο καταμέτρησης την αντιοξειδωτικής ικανότητας των λιπόφιλων και υδρόφιλων συστατικών ενάντια των ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος είναι σχετική με τις *in vivo* συνθήκες, αφού χρησιμοποιεί υδροϋπεροξειδία που είναι από τις πιο διαδεδομένες ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Από τα πιο βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι έχει αυτοματοποιηθεί και προσαρμόζεται ανάλογα με την προέλευση του δείγματος (πλάσμα, ιστός, τρόφιμα) (Prior, 2015).

Στην μέθοδο ORAC η θερμοκρασία που πραγματοποιείτε η αντίδραση είναι μέγιστης σημασίας και απαιτείτε προσεκτικός και συστηματικός έλεγχος της. Ο βαθμός της θερμοκρασίας εξαρτάτε από τι ένωση χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών (για το AAPH η θερμοκρασία είναι 37 °C). Η διατήρηση της θερμοκρασίας στα επιθυμητά επίπεδα εξασφαλίζει την έγκαιρη και πλήρη αποσύνθεση του οξειδωτικού μέσου. Σε περίπτωση που οι θερμοκρασίες δεν επιτευχθούν η αντίδραση που πραγματοποιείτε είναι αργή και ανεπαρκής που ως αποτέλεσμα οδηγεί στην μη επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Επιπρόσθετα η αργή και προβληματική αυτή αντίδραση, μπορεί να παρερμηνευτεί ως αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας που μελετάτε και να οδηγήσει στην υπερεκτίμηση της (Schaich *et al.*, 2015).

Τυπικά η διαδικασία που εφαρμόζεται στην ORAC είναι η ανάμιξη του δείγματος (ή του control ή των πρότυπων) με διάλυμα φλουορεσκεΐνης και η επώαση σε θερμοκρασία 37°C πριν προστεθεί διάλυμα AAPH (δημιουργεί ελεύθερες ρίζες) για να ξεκινήσει η αντίδραση. Η ένταση του φθορισμού μετράτε στα 485 nm (ex)/525 nm (em), για 35 λεπτά με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και pH (37°C και pH 7.4) καθ' όλη την διαδικασία. Όσο προχωράει η αντίδραση η φλουορεσκεΐνη καταναλώνετε και η ένταση του φθορισμού της μειώνετε. Η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού αναστέλλει αυτήν την διεργασία (Huang *et al.*, 2005).

Είναι η μόνη μέθοδος που παρακολουθείτε η δράση των ελεύθερων ριζών μέχρι τέλους και χρησιμοποιεί την περιοχή κάτω από την καμπύλη (στο διάγραμμα του αποτελέσματος) για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων συνδυάζοντας έτσι τόσο το ποσοστό της αναστολής και το μήκος του χρόνου αναστολής των ελεύθερων ριζών σε μια μονάδα (Krishnaiah *et al.*, 2011)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΤΑ ΒΟΤΑΝΑ

### 4.1 Αντιοξειδωτικά και η χρήση των βοτάνων

Διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει την επίδραση της πρόσληψης φυσικών αντιοξειδωτικών μέσω της τροφής σε διάφορες ασθένειες καθώς τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τα φυτά έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες. Τα βότανα και τα μπαχαρικά αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πηγή φυτικών αντιοξειδωτικών (πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, βιταμίνες, καροτενοειδή κα). Τα αντιοξειδωτικά αυτά μπορούν να δράσουν αυτόνομα αλλά και πιο αποτελεσματικά σε συνδυασμό όταν δρουν συνεργιστικά. Τα καροτενοειδή, ιδιαίτερα β-καροτένιο, η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη υπάρχουν σε ορισμένο ποσό, ειδικά σε κάποια φρέσκα βότανα όπως είναι η ρίγανη, ο βασιλικός, το φασκόμηλο, το δεντρολίβανο, το θυμάρι και διάφορα είδη μέντας. Το περιεχόμενο των καροτενοειδών σε αποξηραμένα φυτά είναι περίπου το μισό της περιεκτικότητάς τους σε νωπά (Škronánková *et al.*, 2012).

Μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και από την βιομηχανία τροφίμων. Εκτός της χρήσης τους ως αντιοξειδωτικά για τα τρόφιμα χρησιμοποιούνται και για τα αντιμικροβιακά και λειτουργικά συστατικά που περιέχουν, αλλά και ως αντικαταστάτες των τεχνιτών αρωματικών και χρωστικών υλών. Επιπλέον αξιοποιούνται και στις βιομηχανίες παραγωγής καλλυντικών (για τις ίδιες ιδιότητες με την βιομηχανία τροφίμων) και αρωμάτων (τα αιθέρια έλαια και οι αρωματικές ενώσεις), αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς από τις φαρμακοβιομηχανίες. Για αυτούς τους σκοπούς μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρο το φυτό ή μέρος του όπως είναι τα φύλλα, οι βλαστοί, τα άνθη αλλά ακόμα και τα ριζώματα (Škronánková *et al.*, 2012).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην φυσική μορφή τους, όπως απομονώνονται από τα φαρμακευτικά φυτά, ακατέργαστα ή κατεργασμένα με ξήρανση ή απομονωμένα με διάφορες τεχνικές εκχύλισης όπως με τη χρήση οργανικών διαλυτών, υπερκρίσιμων ρευστών κα. Ο τύπος αλλά και οι ποσότητες των αντιοξειδωτικών ενώσεων που περιέχονται στα φυτά ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ειδών και ποικιλιών. Επίσης επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές και κλιματολογικές συνθήκες, τις εποχιακές αλλαγές, τον βαθμό ωρίμανσης, τις

γεωργικές πρακτικές και από την γεωγραφική περιοχή που φύονται (Yesil-Celiktas *et al.*, 2007)

Στα εκχυλίσματα και αφειγήματα των φυτών το περιεχόμενο και η σύνθεση των αντιοξειδωτικών τους εξαρτάται από την τεχνική της εκχύλισης, τις συνθήκες της (χρόνος και η θερμοκρασία), και τους διαλύτες. Διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, το νερό, η ακετόνη και ο συνδυασμός τους, χρησιμοποιούνται συχνά για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τα φυτά. Ακόμη και μετά την απομάκρυνση των πτητικών αιθέριων ελαίων, αρωματικά φυτά μπορούν να ξηραίνονται, να αλέθονται και να χρησιμοποιούνται ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, είτε άμεσα είτε μετά από εκχύλιση.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτών όπως είναι τα βότανα και τα φαρμακευτικά φυτά έχουν μελετηθεί ευρέως. Τα πιο κοινά φυτά με πλούσια αντιοξειδωτική δράση ανήκουν σε διάφορες οικογένειες όπως είναι τα Χειλανθή (*Lamiaceae*). Στην οικογένεια των Χειλανθών ανήκουν φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως όπως είναι το δενδρολίβανο, η ρίγανη, το θυμάρι και η ματζουράνα. Οι κύριες αντιοξειδωτικές ουσίες που υπάρχουν στα βότανα της οικογένειας των Χειλανθών είναι το ροσμαρινικό οξύ (Rosmarinic acid, RA), το καφεϊκό οξύ (Caffeic acid, CA) και (Škronánková *et al.*, 2012).

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών στα εκχυλίσματα των φυτών. Παρακάτω θα γίνει αναφορά στις μελέτες που έχουν γίνει πάνω στην αντιοξειδωτική δράση έντεκα κύριων βοτάνων της οικογένειας των Χειλανθών.

## 4.2 Βότανα της οικογένειας των Χειλανθών και η αντιοξειδωτική τους δράση

### 4.2.1 Αιγιάννης (*Salvia sclarea*)

Η Σάλβια η ερυθρανθής (στα αγγλικά clary-common clary) ανήκει στο ίδιο γένος με διάφορα είδη του φασκόμηλου και είναι αυτοφυές στην Ελλάδα. Χρησιμοποιείται ως τσάι ειδικά στις περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας αλλά και στην Ευρώπη. Επιπλέον χρησιμοποιείτε και το αιθέριο έλαιο του ως σταθεροποιητής στην αρωματοποιία αλλά και σε προϊόντα όπως είναι οι κρέμες σαπούνια και (Κουτσός, 2006). Σε εκχυλίσματα μεθανόλης και νερού τα οποία μετρήθηκαν για την αντιοξειδωτική του ικανότητα έδειξαν ότι οι τιμές για τις ολικές φαινόλες ήταν 169 mg GAE/g ξηρού βάρους (υδατική εκχύλιση) και 242 mg GAE/g ξηρού βάρους (οργανικός διαλύτης). Για την DPPH οι τιμές είναι σε IC<sub>50</sub> 16 ± 0.5 μg/mL για το υδατικό ενώ 27 ± 0.6 μg/mL για την εκχύλιση μεθανόλης (Stagos *et al.*, 2012)

### 4.2.2 Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.)

Είναι ένα φυτό με κέντρο καταγωγής τις Μεσογειακές χώρες της Ν. Ευρώπης και στην χώρα μας βρίσκεται αυτοφυές σε περιοχές της Στερεάς Ελλάδας και σε ορισμένα νησιά του Ιονίου και Αιγαίου πελάγους. Ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών και χρησιμοποιείτε ως αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό αλλά και στην μαγειρική ως άρτυμα και αφένημα. Στις βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων χρησιμοποιείτε το αιθέριο έλαιο του (Κουτσός, 2006). Πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, με την περιεκτικότητα τους στο φυτό να εξαρτάτε από την ποικιλία, την ανάπτυξη και την ωριμότητα του, αλλά και από τις κλιματικές και εποχιακές αλλαγές (Škronánková *et al.*, 2012). Τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο δενδρολίβανο είναι το καρνοσικό οξύ και το ροσμαρινικό που υπάρχουν κυρίως στα φύλλα του φυτού. Σε μελέτη που έγινε μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του δενδρολίβανου με την μέθοδο DPPH. Οι τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η χρήση νερού και αιθανόλης ως διαλύτες και η ταυτόχρονη χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων (Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012). Επιπλέον από την

εργασία των Wojdyło *et al.*, 2007 βρέθηκαν οι τιμές για ολικές φαινόλες, ABTS και FRAP

#### 4.2.3 Δίκταμο (*Origanum dictamnus* L.)

Συγγενικό φυτό με την ρίγανη και το όνομα του είναι παραφθορά της σύνθετης λέξης δίκταμος (δίκτης και θάμνος) που σημαίνει θάμνος του Δίκτη (βουνό της Κρήτης) όπου και το φυτό είναι ενδημικό. Οι φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Τα φύλλα και τα άνθη του φυτού χρησιμοποιούνται ως αφέψημα για την ανακούφιση παθήσεων του στομάχου, ως τονωτικό, διαιρετικό του νευρικού συστήματος και ως επουλωτικό πληγών (Κουτσός, 2006). Σε έρευνα που έγινε από τους Lemonis *et al.*, 2013 προτάθηκε η χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> για την εκχύλιση του δίκταμου, αφού οι κοινές τεχνικές, (χρήση θερμότητας, διαλύτες κτλ) οδηγούν σε κατώτερης ποιότητας εκχύλιση καταστρέφοντας τα βιοδραστικά μόρια που περιέχονται σε αυτό. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα φύλλα και άνθη του φυτού. Για την ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας των εκχυλισμένων αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH όπου βρέθηκε το EC<sub>50</sub> = 1450 g εκχυλίσματος/kg DPPH. Οι Skotti *et al.*, 2014 στην ερευνά τους σύγκριναν υδατικές εκχυλίσεις στην προσπάθεια να ποσοτικοποιήσουν τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα υδατικά διαλύματα (και αφεψήματα) διαφόρων βοτάνων, αλλά και την τοξικότητα αυτών. Σύγκριναν την επίδραση που έχει η θερμοκρασία στην παραλαβή των αντιοξειδωτικών από τα φυτά αλλά και η χρήση των υπερήχων.

#### 4.2.4 Θυμάρι (*Thymus Vulgaris* L.)

Χρησιμοποιούνται τα φύλλα και τα άνθη του νωπά ή ξερά στην μαγειρική όπως και αυτά της ρίγανης. Κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του θυμαριού είναι η θυμόλη και χρησιμοποιείται στην ιατρική ως ήπιο αντισηπτικό. Η θυμόλη υπάρχει και σε άλλα φυτά της οικογένειας των Χειλανθών. (Κουτσός, 2006). Γνωστό για τα οφέλη του στην υγεία, το αφέψημα του θυμαριού ή τα αιθέρια έλαια του χρησιμοποιούνται για την αντισπασμωδική δραστηριότητα τους στους βρόγχους και στο έντερο, ως ανοσοδιεργιτικό, αντιμικροβιακό, αποχρεμπτικό, βλεννολυτικό και βρογχοδιασταλτικό. Επιπλέον βοηθάει στην πέψη. Έτσι βάση αυτών των γνώσεων διεξάχθηκε έρευνα που έδειξε ότι το αφέψημα του θυμαριού έχει την υψηλότερη



συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, με αποτελεσματικότητα εναντίον των gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων. Επιπλέον στην ίδια μελέτη αναλύθηκαν και δείγματα που είχαν παρασκευαστεί με έγχυση (προσθήκη βραστού νερού σε 1 γραμμάριο αποξηραμένου θυμαριού) και με εκχύλιση μεθανόλης 80%. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν ότι οι ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση είναι υδατοδιαλυτές (Martins *et al.*, 2015).

#### 4.2.5 Ματζουράνα (*Origanum majorana* L.)

Φυτό που καλλιεργείται σε ολόκληρη την Ελλάδα. Θεωρείτε φαρμακευτικό και χρησιμοποιείτε και ως άρτυμα. Οι βλαστοί του περιέχουν αιθέρια έλαιο που χρησιμοποιείτε στην φαρμακοποιία αλλά και την αρωματοποιία. Έχει αντισπασμωδικές, αντινευραλγικές και αντισηπτικές δράσεις (Σκουμπρής, 1998). Μορφολογικά έχει μεγάλη ομοιότητα με την ρίγανη αλλά με πιο ήπια γεύση. Γενικά διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με κύριες ουσίες το καρνοσικό οξύ, RA και CA, των οποίων η περιεκτικότητα εξαρτάτε της ηλιοφάνειας και των κλιματικών αλλαγών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλισμάτων εξαρτάτε και από το διαλύτη εκχύλισης (πολικοί διαλύτες-καλύτερη εκχύλιση) (Škronánková *et al.*, 2012). Σε έρευνα με την χρήση 4 οργανικών διαλυτών αποδείχτηκε ότι η μεθανόλη είναι ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης αφού τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (και ολικές φαινόλες) σε σχέση με τους άλλους 3 διαλύτες (αιθανόλη, διεθυλεθέρα, εξάνιο). (Hamdy Roby *et al.*, 2013)

#### 4.2.6 Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.)

Φυτό αυτοφυές στην Ελλάδα και στην Ν. Ευρώπη. Στην Ελλάδα φύτετε σε ορεινές δασώδεις περιοχές (μέχρι τα 800 μ. υψόμετρο). Τα φύλα του νωπά ή αποξηραμένα χρησιμοποιούνται στην μαγειρική, την ζαχαροπλαστική και για την παρασκευή ποτών ή αφεψημάτων. Ως αφέψημα η χρήση του είναι ηρεμιστική, για διαταραχές του ύπνου και του γαστρεντερικού. (Κουτσός, 2006). Σε ανάλυση δειγμάτων αιθανόλης με HPLC-DAD βρέθηκε ότι τα κύρια συστατικά που υπάρχουν στο εκχύλισμα είναι η ρουτίνη (9.51%), το καφεϊκό οξύ (6.20%), η κουερσετίνη (5,32%) και το ελλαγικό οξύ (4,96%).επιπλέον βρέθηκε η τιμή IC<sub>50</sub> 48,76 ± 1,94 g/mL (συγκέντρωση που αναστέλλει το 50% του DPPH) (Kamdem *et al.*, 2013). Άλλες έρευνες έδειξαν ότι το εκχύλισμα του μελισσόχορτου είναι σε θέση να

παγιδεύσει ένα ευρύ φάσμα συνθετικών και φυσικών ελεύθερων ριζών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς δείχνει ότι το εκχύλισμα μπορεί να έχει τη δυνατότητα να αποτρέπει την οξειδωτική βλάβη *in vivo* και τη πρόληψη του οξειδωτικού στρες. Εκτός της ποσότητας των ολικών φαινολών βρέθηκε και η ταχύτητα καταστροφής του καροτενίου, στην οποία το εκχύλισμα έδειξε εξαιρετικά υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Dastmalchi *et al.*, 2008). Η αντιοξειδωτική δράση του μελισσόχορτου έχει μελετηθεί και από τους Wojdyło *et al.*, 2007.

#### 4.2.7 Ρίγανη (*Origanum vulgare L.*)

Φυτό το οποίο ανήκει στο γένος *Origanum* και περιλαμβάνει 49 είδη, υποείδη και ποικιλίες. Απαντάτε σε όλες τις παραμεσογειακές χώρες της Ευρώπης και της Αφρικής αλλά και σε εύκρατες ζώνες σε Αμερική και Ασία. Στην χώρα μας ιθαγενές φυτό είναι το είδος *Origanum vulgare ssp. Hirtum*, και είναι διεθνώς γνωστή ως Ελληνική ρίγανη. Θεωρείται από τις καλύτερες του κόσμου με άριστη ποιότητα. (Κουτσός, 2006). Η ουσία η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική ικανότητα που έχει ρίγανη είναι το ροσμαρινικό οξύ το οποίο περιέχετε σε ένα ποσοστό του 5%. Εκτός του ροσμαρινικού οξέος, η ρίγανη περιέχει τοκοφερόλες φλαβονοειδή, καφεϊκό οξύ και παράγωγα του φαινολικού οξέος. Η διαφοράς στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των υδατικών διαλυμάτων του φυτού (ως και 70% μεταβλητότητα στις τιμές) μπορεί να αποδοθεί στις κλιματικές αλλαγές και κυρίως στην θερμοκρασία. Η αποτελεσματικότητα του εναντίον της οξείδωσης των λιπών σχετίζεται και με την μέθοδο και τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε αλλά και της δομής των αντιοξειδωτικών ουσιών (Škronánková *et al.*, 2012). Η αντιοξειδωτική ικανότητα της ρίγανης έχει μελετηθεί από διάφορες ομάδες ερευνητών. Σε μια από αυτές η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εξετάστηκε από διάφορες μεθόδους όπως είναι οι ολικές φαινόλες, DPPH, FRAP και ABTS (Wojdyło *et al.*, 2007)

#### 4.2.8 Τσάι του βουνού (*Sideritis sp.*)

Με αυτό το όνομα αναφέρονται πολλά φυτά του γένους *Sideritis* τα οποία είναι ενδημικά και αυτοφυή στα βουνά της Ελλάδας. Κύρια χρήση το φυτού είναι ως αφέψημα το οποίο είναι ιδιαίτερα δημοφιλές. Έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος (Κουτσός, 2006).

Σε αναλύσεις που έγιναν σε δύο είδη του γένους *Sideritis* τα *Sideritis raeseri ssp. raeseri* και *Sideritis raeseri ssp. attica* οι ολικές φαινόλες (σε mg GAE/gr ξηρου δειγματος) για τα υδατικά διαλύματα είναι 273 και 90 αντίστοιχα. (Stagos *et al.*, 2012)

#### 4.2.9 Ύσσωπος (*Hyssopus Officinalis*)

Γνωστό και ως Ύσσωπος ο φαρμακευτικός είναι της οικογένειας των Χειλανθών με ανθελμινθικές αποχρεμπτικές και αντιασθματικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται και ως άρτυμα (Σκουμπής, 1998). Φυτό της παραδοσιακής ιατρικής, με έρευνες να έχουν διεξαχθεί για την περιεκτικότητα του σε αντιοξειδωτικά αλλά και την τοξικότητα που μπορεί να έχει σε μεγάλες δόσεις. Στην εργασία των Skotti *et al.*, 2014 μελετήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα του φυτού με τρεις διαφορετικές πειραματικές πορείες για την προετοιμασία του δείγματος. Στην πρώτη διεργασία χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό θερμοκρασίας δωματίου με εμβάπτιση των φύλλων του φυτού, και το εκχύλισμα αναλύθηκε με 3 διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών (DPPH, ABTS και FC). Στην δεύτερη διεργασία χρησιμοποιήθηκε θερμό νερό 85 ° C και στην τρίτη πειραματική πορεία έγινε ταυτόχρονη χρήση νερού θερμοκρασίας δωματίου με υδατόλουτρο υπερήχων. (Skotti *et al.*, 2014)

#### 4.2.10 Φασκόμηλο (*Salvia officinalis L.*)

Φυτό της οικογένειας των Χειλανθών γνωστό από τα αρχαία χρόνια, αυτοφυές σε χώρες της μεσογείου της Αδριατικής, της Ν. Ευρώπης και της Μ Ασίας. Στην Ελλάδα υπάρχουν πάνω από 20 είδη. Χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε πολλά τρόφιμα, ως άρτυμα στην μαγειρική και σε μορφή αφεψημάτος όπου καταπολεμά τις φλεγμονές του στόματος, το κρυολόγημα και τις γαστρεντερικές διαταραχές (Κουτσός, 2006). Πρόκειται για ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της οικογένειας των Χειλανθών και είναι διαδεδομένο σε όλο τον κόσμο. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού οφείλετε κυρίως από την περιεκτικότητά του σε ροσμαρινικό οξύ, κορνοσικό και με την περιεκτικότητά του σε αυτά τα στοιχεία να εξαρτάται από την ποικιλία και τα χαρακτηριστικά της. Για την απομόνωση των αντιοξειδωτικών έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί τρόποι παραλαβής τους, όπως είναι η χρήση πολικών διαλυτών, η χρήση υπερκρίσιμων ρευστών και η απόσταξη με υδρατμούς του

αιθέριου ελαίου (Škronánková *et al.*, 2012). Στις εργαστηριακές έρευνες των Stagos *et al.*, 2012 και Wojdyło *et al.*, 2007 έγινε χρήση τριών διαφορετικών εκχυλιτών και τα δείγματα εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

#### 4.2.11 Φλισκούνη (*Mentha pelegium*)

Είδος μέντας που αυτοφύεται σε όλη την Ευρώπη σε όχθες λιμνών, ποταμιών και σε υγρά εδάφη. Το άρωμα της μοιάζει με αυτό του δυόσμου και της μέντας, και το αιθέριο έλαιο της χρησιμοποιείται από την κοσμετολογία και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή μενθόλης (αρωματισμό τσιγάρων, φαρμακευτικών σκευασμάτων κα) (Κουτσός, 2006). Το αιθέριο έλαιο του έχει αποδεδειγμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική επιλογή για την αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών και πρόσθετων στην βιομηχανία τροφίμων. Μελετήθηκε η *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (νερό και οργανικοί διαλύτες), με το εκχύλισμα του ζεστού νερού να έχει την μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών ( $EC_{50} = 16.3 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο (Teixeira *et al.*, 2012), και έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη των Stagos *et al.*, 2012 με δείγμα από την Ελλάδα όπου και εκεί έγινε εκχύλιση με νερό και οργανικό διαλύτη

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας των διάφορων αποτελεσμάτων που έχουν βρεθεί για τα βότανα που αναφέρθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο

**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα 11 βοτάνων για τις μεθόδους Folin- Ciocalteu και ABTS

	Διαλύτης	Ολικές φαινόλες	ABTS	Παραπομπές
<i>S. sclarea</i>	Νερό	169 mgGae/g DW	IC50 38±08 μg/mL	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	242 mg Gae/g DW	IC50 20±1.2 μg/mL	
<i>R. officinalis</i>	MeOH 80%	1.71 ± 0.02 mg GAE/100 g DW	38.7 ± 0.11 μM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
	Αιθανόλη	902 ± 32 ppm GAE		Rodríguez-Rojo <i>et al.</i> , 2012
<i>O. dictamnus</i>	Νερό 85 °C	0.320 ± 0.001 mg CA/mL	1.61 ± 0.01 μmol Trolox/mL	Skotti <i>et al.</i> 2014
	Νερό θερμοκρασίας δωματίου	0.142 ± 0.006 mg CA/mL	0.85 ± 0.01 μmol Trolox/mL	
	Νερο+υπέρηχοι	0.173 ± 0.002 mg CA/mL	0.90 ± 0.01 μmol Trolox/mL	
<i>T. Vulgaris</i>	MeOH 80%	0.58 ± 0.02 mg GAE/100 g DW	35.4 ± 0.12 μM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
<i>O. majorana</i>	MeOH	5.20 ± 2.65 mgGAE/g ξ.εκχ.		Hamdy Roby <i>et al.</i> , 2013
	Αιθανόλη	4.65 ± 1.00 mgGAE/g ξ.εκχ		
	Διεθυλεστέρας	4.55 ± 1.00 mgGAE/g ξ.εκχ		
	Εξάνιο	3.90 ± 1.00 mgGAE/g DW εκχ		
<i>M. officinalis</i>	MeOH 80%	13.2 ± 0.13 mg GAE/100 g DW	10.6 ± 0.09 μM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
<i>O. vulgare</i>	MeOH 80%	0.15 ± 0.01 mg GAE/100 g DW	19.9 ± 1.00 μM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
<i>S.raeseri ssp. raeseri</i>	Νερό	273 mg Gae/g DW	IC50 90 ± 0.6 μg/mL	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	430 mg Gae/g DW	IC50 38 ± 1.5 μg/mL	

<i>S.raeseri ssp. attica</i>	Νερό	90 mg Gae/g DW	IC50 95 ± 2.3 µg/mL	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	Αιθανόλη	170 mg Gae/g DW	IC50 65 ±0.8µg/mL	
<i>H. officinalis</i>	Νερό 85 °C	0.197 ± 0.002 mg CA/mL	1.03 ± 0.02 µmol Trolox/mL	Skotti <i>et al.</i> 2014
	Νερό θερμοκρασίας δωματίου	0.054 ± 0.002 mg CA/mL	0.35 ± 0.02 µmol Trolox/mL	
	Νερό +υπέρηχοι	0.066 ± 0.003 mg CA/mL	0.43 ± 0.04 µmol Trolox/mL	
<i>S. officinalis</i>	MeOH 80%	8.25 ± 0.09 mgGAE/100 g DW	17.0 ± 0.23 µM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
	MeOH	184 mgGae/g DW	IC50 18±0.3 µg/mL	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	Νερό	91 mgGae/g DW	IC50 17±0.6 µg/mL	
<i>M. pelegium</i>	Νερό	188 mgGae/g DW	IC50 13 ± 0.8 µg/mL	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	138 mgGae/g DW	IC50 30 ± 0.3 µg/mL	

(όπου DW= ξηρό βάρος)

**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα 11 βοτάνων για τις μεθόδους DPPH και FRAP

	Διαλύτης	DPPH	FRAP	Παραπομπές
<i>S. sclarea</i>	Νερό	IC50 27±0.6μg/mL	-	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	IC50 25±0.5 μg/mL	-	
<i>R. officinalis</i>	MeOH 80%	513 ± 5.99 mg GAE/100 g DW	662 ± 4.66 μM trolox	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
	Αιθανόλη	EC50 99 ± 2 μg/ml		Rodríguez- Rojo <i>et al.</i> , 2012
<i>O. dictamnus</i>	Νερό 85°C	1.50 ± 0.01 μmol Trolox/mL		Skotti <i>et al.</i> 2014
	Νερό θερμοκρασίας δωματίου	0.77 ± 0.01 μmol Trolox/mL		
	Νερό+ υπέρηχοι	0.89 ± 0.02 μmol Trolox/mL		
<i>T. Vulgaris</i>	MeOH 80%	295 ± 5.83 μMtrolox/100 g DW	693 ± 5.87 μMtrolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
	Νερό, Αφέψιμα	EC50 = 112.3 ± 5.4 μg/mL		Martins <i>et al.</i> , 2015
	Έγχυση Με βραστο νερο	EC50 = 126.3 ± 3.9 μg/mL		
<i>O. majorana</i>	MeOH	EC50 0.0013 ± 0.0001		Hamdy Roby <i>et al.</i> , 2013
	Αιθανόλη	EC50 0.0025 ± 0.0005		
	Διεθυλεστέρας	EC50 0.0020 ± 0.0003		
	Εξάνιο	EC50 0.0035 ± 0.0009		
<i>M.officinalis</i>	MeOH 80%	36.1 ± 1.03 μMtrolox/100 g DW	61.8 ± 0.91 μMtrolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
<i>O. vulgare</i>	MeOH 80%	79.6 ± 2.04 μMtrolox/100 g DW	405 ± 2.22 μMtrolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
<i>S.raeseri ssp. raeseri</i>	Νερό	IC50 94 ± 1.0 μg/mL	I	Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	IC50 31 ± 0.6 μg/mL		

<i>S.raeseri ssp. attica</i>	Νερό	IC50 71 ± 0.6 μg/mL		Stagos <i>et al.</i> , 2012
	Αιθανόλη	IC50 43 ± 0.6 μg/mL		
<i>H. officinalis</i>	Νερό 85 °C	1.03 ± 0.01 μmol Trolox/mL		Skotti <i>et al.</i> 2014
	Νερό θερμοκρασίας δωματίου	0.26 ± 0.03 μmol Trolox/mL		
	Νερό+ υπέρηχοι	0.25 ± 0.01 μmol Trolox/mL		
<i>S. officinalis</i>	MeOH 80%	41.2 ± 1.11 μM trolox/100 g DW	167 ± 1.01 μM trolox/100 g DW	Wojdyło <i>et al.</i> , 2007
	MeOH	IC50 18 ± 2.1 μg/mL		Stagos <i>et al.</i> , 2012
	Νερό	IC50 21 ± 1.0 μg/mL		
<i>M. pelegium</i>	Νερό	IC50 26 ± 0.6 μg/mL		Stagos <i>et al.</i> , 2012
	MeOH	IC50 28 ± 1.0 μg/mL		

(όπου DW= ξηρό βάρος)



#### 4.2.12 Λαγορίγανη (*Origanum scabrum*)

Είναι ένα ελληνικό ενδημικό φυτό και μπορεί κανείς να το βρει μόνο στον Ταΰγετο, τον Πάρνωνα και σε βουνά της Εύβοιας. Πρόκειται για μια πολυετή αρωματική πόα ύψους 10-30cm και ανήκει στο γένος *Origanum* της οικογένειας των Χειλανθών . Τα φύλλα του είναι αντίθετα και διάστικτα από μικροσκοπικούς αδένες (παράγουν αιθέριο έλαιο).



**Εικόνα 13:** Φυτά λαγορίγανης που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο

Τα άνθη διατάσσονται σε ομάδες στις άκρες των βλαστών, οι οποίες γέρνουν προς τα κάτω. Τα βράκτια είναι μεγάλα και πορφυρά και οι στεφάνες είναι επίσης πορφυρές, συμπέταλες και δίχειλες. Φυτρώνει σε σχισμές ασβεστολιθικών βράχων, σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1000 μ.



**Εικόνα 14:** Το φυτό της λαγορίγανης όπως φύετε στον Ταΰγετο

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.1 Παραλαβή δείγματος και εκχυλίσαις

Το δείγμα μετά την συγκομιδή του φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη και στην συνέχεια κορνιτοποιήθηκε με την χρήση υγρού αζώτου, έως ότου είχε την μορφή σκόνης. Για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών του βοτάνου έγιναν εκχυλίσαις χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικούς διαλύτες. Οι διαλύτες αυτοί είναι μεθανόλη 75%, ακετόνη 75%, νερό με θερμοκρασία 75 °C και νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Οι διαδικασίες εκχύλισης αποτελούνται από τα εξής στάδια:

Για την εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες και νερό σε θερμοκρασία δωματίου:

1. Αρχικά ζυγίζονται 0.1g ( $\pm 0.01$ ) Λαγορίγανης, τοποθετούνται σε Falcon και προστίθενται 5ml από τον διαλύτη εκχύλισης (είτε μεθανόλη 75% ή ακετόνη 75% ή νερό)
2. Το μείγμα ομογενοποιείτε με Vortex για 30 δευτερόλεπτα
3. Τοποθετείτε στους υπερήχους για 10 λεπτά
4. Έπειτα στην φυγόκεντρο στα 6000 rpm για 5 λεπτά
5. Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού με πιπέτα pasteur και μεταφορά του σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, μέσω χάρτινου ηθμού
6. Στο στερεό που έμεινε προστίθενται 4ml διαλύτης
7. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4
8. Το υπερκείμενο μεταφέρετε στην ίδια ογκομετρική φιάλη που περιέχει το υπερκείμενο από το στάδιο 5, μέσο χάρτινου ηθμού
9. Τέλος συμπληρώνετε μέχρι την χαραγή με τον διαλύτη εκχύλισης και το διάλυμα μεταφέρετε σε falcon.

Για την εκχύλιση με νερό 75 °C:

1. Ζυγίζονται 0.1g ( $\pm 0.01$ ) Λαγορίγανης τοποθετούνται σε falcon και προστίθενται 5ml νερό
2. Το διάλυμα τοποθετείτε στους υπέρηχους για 5 λεπτά

3. Και κατόπιν τοποθετείτε σε νερό που θερμαίνεται στους 75 °C για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία παρακολουθείτε με θερμομόμετρο ώστε να μην πέσει η θερμοκρασία κάτω των 75 °C ή ανέβει.
4. Το falcon μετά τοποθετείτε στην φυγόκεντρο στις 6000 rpm για 5 λεπτά
5. Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού και μεταφορά του σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, μέσω χάρτινου ηθμού
6. Στο στερεό που έμεινε προστίθενται 3ml διαλύτης και vortex
7. Επανατοποθέτηση του σωλήνα στην φυγόκεντρο (6000 rpm για 5 λεπτά)
8. Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού στην ίδια ογκομετρική φιάλη του σταδίου 5 μέσω χάρτινου ηθμού
9. Συμπλήρωση με νερό μέχρι την χαραγή

Σε όλη την διαδικασία αποφεύγετε όσο το δυνατόν η έκθεση του δείγματος στο φως. Τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα. Κάθε φορά παρασκευάζονται φρέσκα εκχυλίσματα.

## 5.2 Ολικές φαινόλες

### Υλικά – Συσκευές

- i. Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- ii. Falcon
- iii. Μηχάνημα ανάδευσης, Vortex
- iv. Φυγόκεντρος
- v. Υδατόλουτρο υπερήχων
- vi. Θερμαντήρας
- vii. Θερμόμετρο
- viii. Πιπέτες pasteur γυάλινες
- ix. Ογκομετρικού κύλινδροι
- x. Ποτήρια ζέσεως
- xi. Πιπέτες
- xii. Χάρτινοι ηθμοί

### Διαλύματα:

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu: 1 ml αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (από την εταιρία Sigma-Aldrich) αναμιγνύονται με 7 ml νερό. Διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :  $20 \pm 0,0010$  g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  σε ποτήρι ζέσεως και διαλύονται σε 80 ml νερό με βρασμό. Αφού κρυώσει μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με νερό.
- Μεθανόλη 75%: Σε 60 ml μεθανόλη προστίθενται 20 ml νερό.
- Ακετόνη 75% : Σε 60 ml ακετόνη προστίθενται 20 ml νερό.

### 5.2.1 Πειραματική πορεία

Για την μέθοδο ολικών φαινολών με την χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu γίνεται η παρασκευή του δείγματος με την μέθοδο που αναφέρετε στον παρακάτω πίνακα και με χρήση του control διαλύματος ως τυφλό για την φωτομέτρηση (στα 725 nm). Τα διαλύματα πρότυπων και control ετοιμάζονται παράλληλα.

Διαλύματα δείγματος	control = τυφλό
500 μl διάλυμα δείγματος	500 μl από τον διαλύτη εκχύλισης
500 μl Folin-Ciocalteu	500 μl Folin-Ciocalteu
4 ml νερό	4 ml νερό
Αναμονή 3 min	Αναμονή 3 min
1000 μl 20% $\text{Na}_2\text{CO}_3$	1000 μl 20% $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Αναμονή 2 ώρες και φωτομέτρηση στα 725 nm	

**Πίνακας 5:** Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

### 5.2.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευάζουμε 7 πρότυπα διαλύματα Gallic acid με συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και μετρήθηκαν όπως αναφέρετε στην παράγραφο 5.2.1

### 5.3 Μέθοδος FRAP

#### Υλικά – Συσκευές:

- i. Falcon
- ii. Vortex
- iii. Υδατόλουτρο
- iv. Πιπέτες
- v. Ογκομετρικές φιάλες
- vi. Ογκομετρικού κύλινδροι
- vii. Ποτήρια ζέσεως
- viii. Φωτόμετρο
- ix. Κυψελίδες

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  (0.02 M  $\text{Fe}^{+3}$ ): 0,135 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και διαλύονται σε λίγο νερό μέχρι την χαραγή.
- Διάλυμα HCl 0.04M : 4 ml από HCl 1M σε 100 ml νερό
- Διάλυμα TPTZ 0.01M : 0,0781 g TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, 98% από την εταιρία Alfa Aesar) τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και διαλύονται σε λίγο HCl 0.04M και έπειτα συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή.
- Ρυθμιστικό  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  0.3M και pH 3.6: 1.869 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  και 16 ml glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$  τοποθετούνται σε ογκομετρική 1L και προστίθεται νερό μέχρι την χαραγή.
- Αντιδραστήριο FRAP: Αναμιγνύονται 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  0.3M, 1 ml διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  και 1 ml διάλυμα TPTZ. Ανακινείτε στο Vortex. Το διάλυμα παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά.

### 5.3.1 Πειραματική πορεία

Οι διαδικασίες εκχύλισης που ακολουθούνται για να παραχθεί το δείγμα (και για τους 4 διαλύτες) είναι οι ίδιες με εκείνες που αναφέρονται στην παράγραφο 5.1.

**Πίνακας 6:** Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων της μεθόδου FRAP

Σωλήνες δειγμάτων	Τυφλό
2,9 ml αντιδραστηρίου FRAP	2,9 ml αντιδραστηρίου FRAP
100 μl δείγματος	100 μl διαλύτη εκχύλισης
Θέρμανση στους 37°C για 10 min	
Ψύξη	
Φωτομέτρηση στα 593 nm μέσα σε 5 min	

### 5.3.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευάστηκαν οχτώ πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 1000 , 800, 400, 200, 100, 50 και 20 μM και μετρήθηκαν όπως αναφέρετε στην παράγραφο 5.3.1

## 5.4 Μέθοδος DPPH

### Υλικά- Συσκευές:

- i. Falcon
- ii. Πιπέτες
- iii. Ογκομετρικές φιάλες
- iv. Ογκομετρικού κύλινδροι
- v. Ποτήρια ζέσεως
- vi. Φωτόμετρο
- vii. Κυψελίδες 3ml
- viii. Αναλυτικός ζυγός

### Διαλύματα:

Για την μέθοδο παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH (αντιδραστήριο 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl της εταιρίας Sigma-Aldrich) σε μεθανόλη. Πιο αναλυτικά:

A.) Stock Διάλυμα DPPH σε μεθανόλη: Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml διαλύονται  $0,024 \pm 0,001$  g DPPH σε μεθανόλη και συμπληρώνεται μέχρι όγκου 100 ml.

Φυλάσσεται στους  $-20$  °C.

B.) Working Διάλυμα DPPH 0,004% σε μεθανόλη: Λαμβάνονται 10 ml από το stock διάλυμα και αραιώνονται με 45 ml 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.

### 5.4.1 Πειραματική πορεία

Οι διαδικασίες εκχύλισης που ακολουθούνται για να παραχθεί το δείγμα (και για τους 4 διαλύτες) είναι οι ίδιες με εκείνες που αναφέρονται στην παράγραφο 5.1.

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα δείγματα. Μετά από την αναμονή 30 λεπτών μηδενίζουμε το φωτόμετρο χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως τυφλό.

**Πίνακας 7:** Διαδικασίες κατασκευής και μέτρησης δειγμάτων της μεθόδου DPPH

Διαλύματα δειγμάτων	Control
3,8 ml Working διάλυμα DPPH 0,004% σε μεθανόλη	3,8 ml Working διάλυμα DPPH 0,004% σε μεθανόλη
200 μl εκχύλισμα	200 μl διαλύτη εκχύλισης
Φωτομέτρηση στα 517 nm σε 30 min	

#### 5.4.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 100, 50, και 20 μM και μετρήθηκαν όπως αναφέρετε στην παράγραφο 5.4.1



## 5.5 Μέθοδος ORAC

### Υλικά – Συσκευές:

- i. Ογκομετρικές φιάλες 5 ml, 100 ml και 250ml
- ii. Vortex
- iii. Falcon
- iv. Πιπέτες
- v. Υδατόλουτρο
- vi. Φθοροσίμετρο
- vii. Κυψελίδα
- viii. Ζυγός Ακριβείας
- ix. Μαγνητικός αναδευτήρας
- x. Πεχάμετρο

### Διαλύματα:

- Διάλυμα Fluorescein  $6.30 \times 10^{-8} \text{M}$ : 0.0021 g Fluorescein τοποθετούνται σε ογκομετρική των 100ml και προστίθεται μέχρι την χαραγή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (με pH=7.4 75mM). Από το παραπάνω διάλυμα λαμβάνονται 100 μl και τοποθετούνται σε ογκομετρική των 100ml και συμπληρώνετε μέχρι την χαραγή με διάλυμα φωσφορικών.
- Διάλυμα AAPH: Ζυγίζονται 0.6983 g AAPH και διαλύονται σε ογκομετρική των 5 ml με διάλυμα φωσφορικών (pH= 7.4). Φυλάσσετε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 :ζυγίζονται 0.66 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (MB=156) και 2.57 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (MB=178). Τοποθετούνται μέσα σε ποτήρι ζέσεως με περίπου 200 ml απιονισμένο νερό και αναδεύεται μέχρι να διαλυθούν όλα τα στερεά. Μετράτε το pH και σε περίπτωση που χρειάζεται ρύθμιση προσθέτουμε HCl ή NaOH (ανάλογα με την περίπτωση) έως ότου φτάσει σε pH 7.4. κατόπιν μεταφέρετε σε ογκομετρική των 250 ml και προστίθεται νερό μέχρι την χαραγή.

### 5.5.1 Πειραματική πορεία

Για την μέτρηση του δείγματος:

- i. Αρχικά ένα τέταρτο πριν αρχίσει η διαδικασία ανοίγουμε το φθοροσίμετρο και ρυθμίζουμε την θερμοκρασία στους 37 °C, και τοποθετούμε την κυβελίδα στην εσοχή του ώστε να αποκτήσει και αυτή την ίδια θερμοκρασία (η διατήρηση της θερμοκρασίας αυτής είναι αναγκαία για την σωστή διεξαγωγή του πειράματος)
- ii. Σε ένα falcon προσθέτουμε 1700 μl διάλυμα Fluorescein, 10 μl δείγματος και 30 μl ρυθμιστικό φωσφορικών. Αναδεύουμε με vortex.
- iii. Στην συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείτε στο υδατόλουτρο (θερμοκρασίας 37 °C) για δεκαπέντε λεπτά.
- iv. Μόλις περάσουν τα 15 λεπτά το βγάζουμε από το υδατόλουτρο και προστίθεται 220 μl AAPH
- v. Το μείγμα αναδεύετε στο vortex και τοποθετείτε για άλλα 30 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο.
- vi. Τέλος βάζουμε τα δείγμα στην κυβελίδα και αρχίζει η μέτρηση. Η μέτρηση του δείγματος κρατάει 30 λεπτά

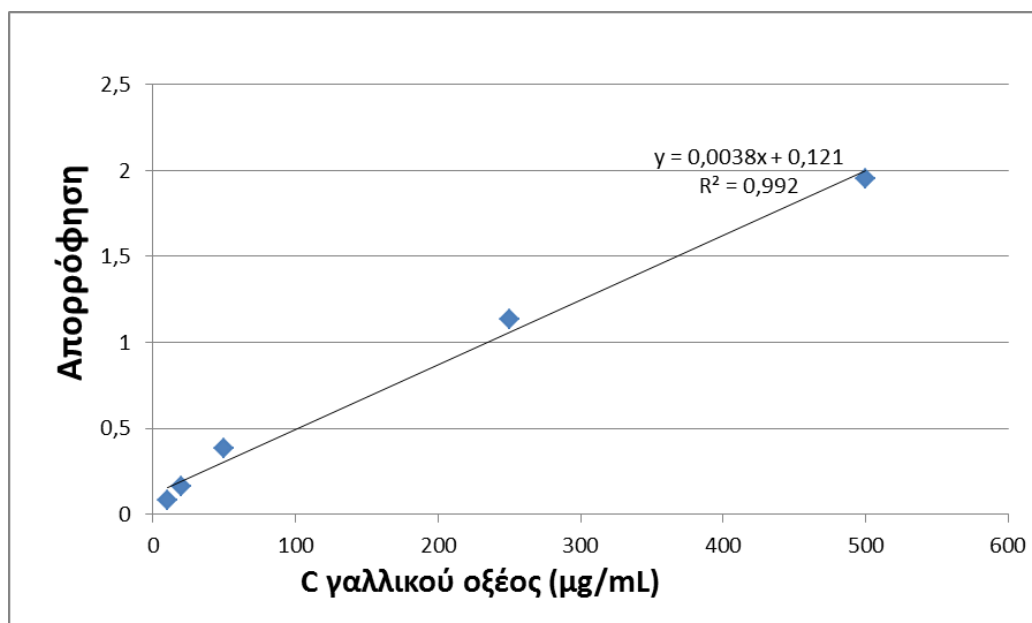
Η διαδικασία για το τυφλό είναι ίδια με αυτή του δείγματος μόνο που στην θέση των 10 μl και 30 μl φωσφορικών, προστίθεται 40 μl του διαλύματος φωσφορικών. Η ένταση του φθορισμού μετράτε στα 485 nm (ex)/520 nm (em)

### 5.5.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 100, 50, 25, 12.5 και 6.25 μM και μετρήθηκαν όπως αναφέρετε στην παράγραφο 5.5.1

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

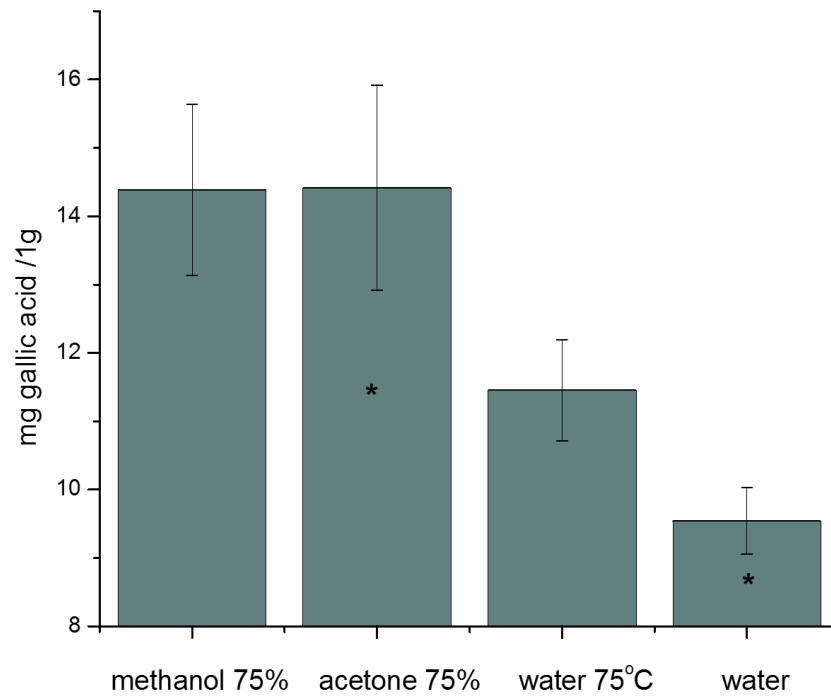
### 6.1 Ολικές φαινόλες



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για την μέθοδο των ολικών φαινολών

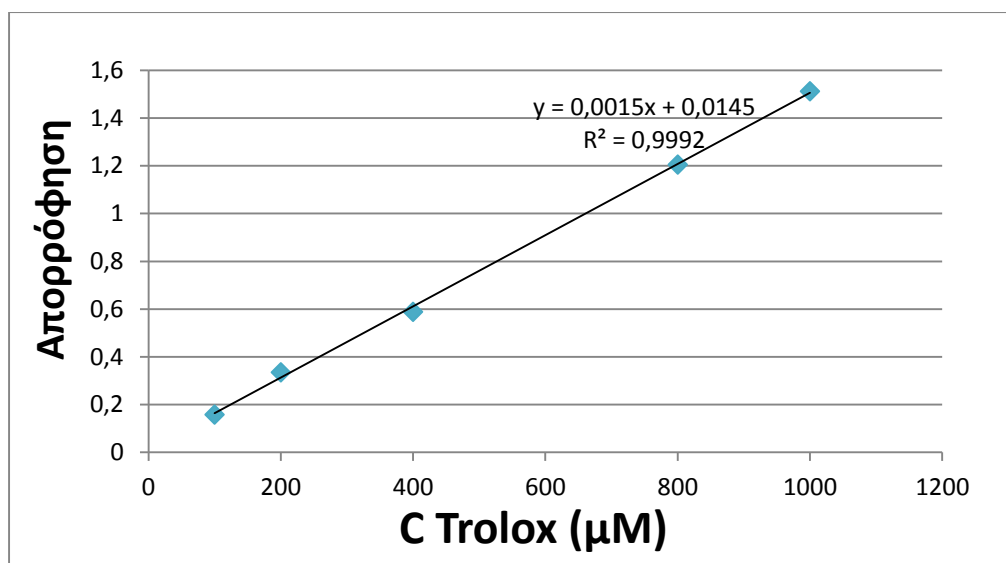
Πίνακας 8: Συγκέντρωση των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων λαγορίγανης. Οι τιμές που υποδεικνύονται με αστερίσκο έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά

	MetOH 75%	Acetone 75%	water 75°C	water
mg γαλλικού οξέος/g λαγορίγανης	14,39±3,31	14,42±4,24*	11,46±2,11	9,54±1,29*



**Σχήμα 2:** Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg gallic acid/1g Λαγορίγανης. Οι στήλες που υποδεικνύονται με αστερίσκο έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

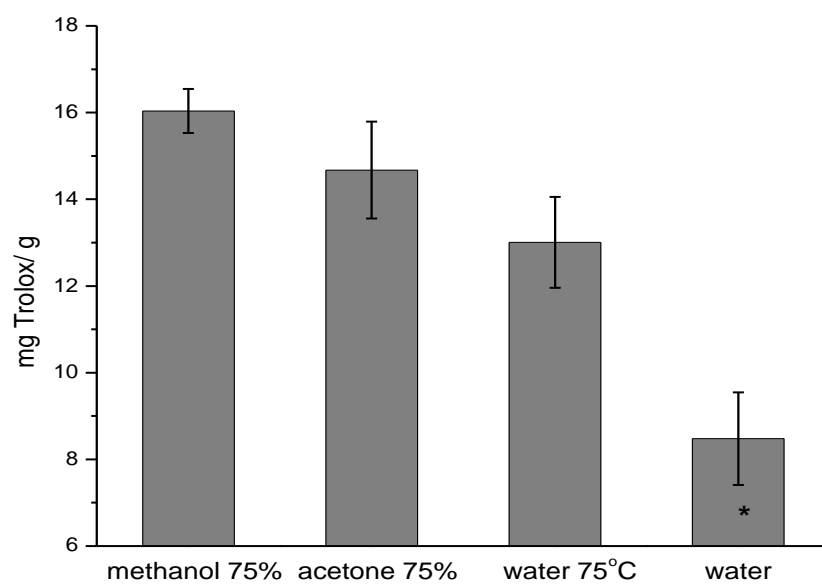
## 6.2 FRAP



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου FRAP.

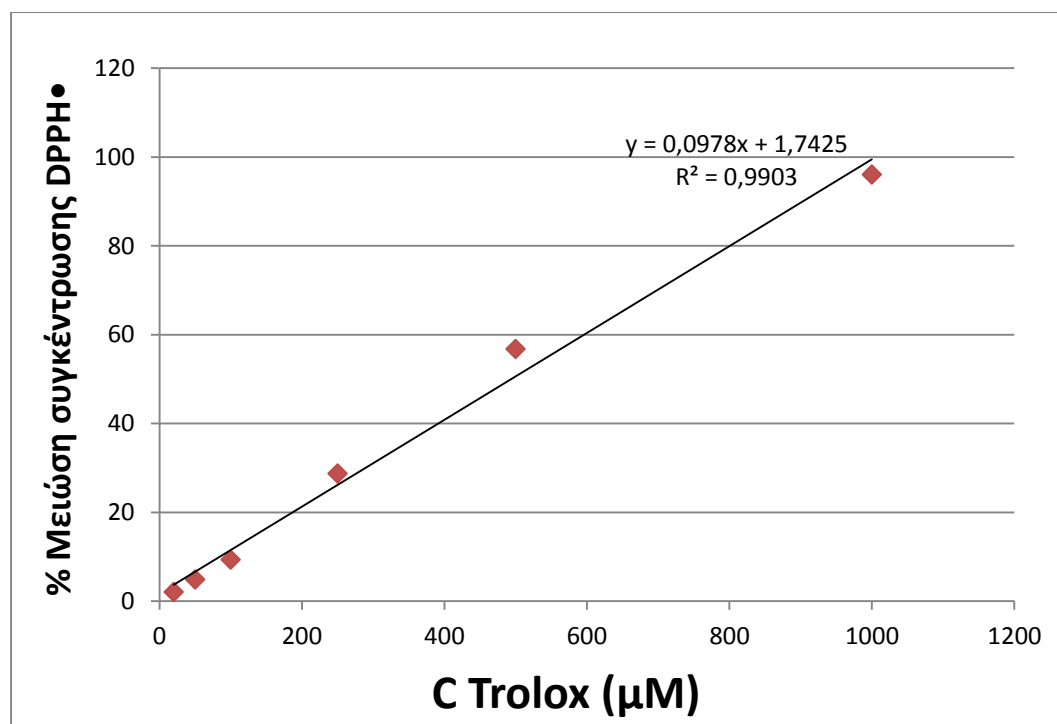
**Πίνακας 8:** Η αναγωγική ικανότητα των διάφορων εκχυλισμάτων λαγορίγανης. Η τιμή με αστερίσκο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες

	MetOH 75%	Acetone 75%	water 75°C	water
mg trolox/g λαγορίγανη	16,4±1,25	14,68±2,73	13,00±2,78	8,48±2,38*



**Σχήμα 4:** Σχηματική απεικόνιση της αναγωγικής ικανότητας των διαφορετικών εκχυλισμάτων. Η στήλη που υποδεικνύεται με αστερίσκο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες

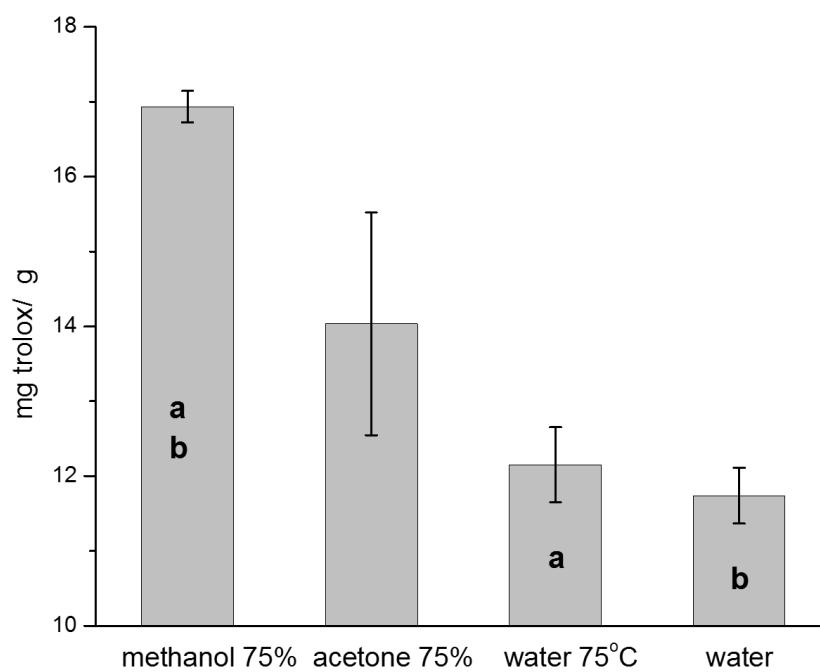
### 6.3 DPPH



Σχήμα 5: Πρότυπη καμπύλη μεθόδου DPPH

**Πίνακας 9:** Αντιοξειδωτική ικανότητα σε mg trolox/g λαγορίγανης. Οι τιμές που υποδεικνύονται με τα ίδια γράμματα έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά

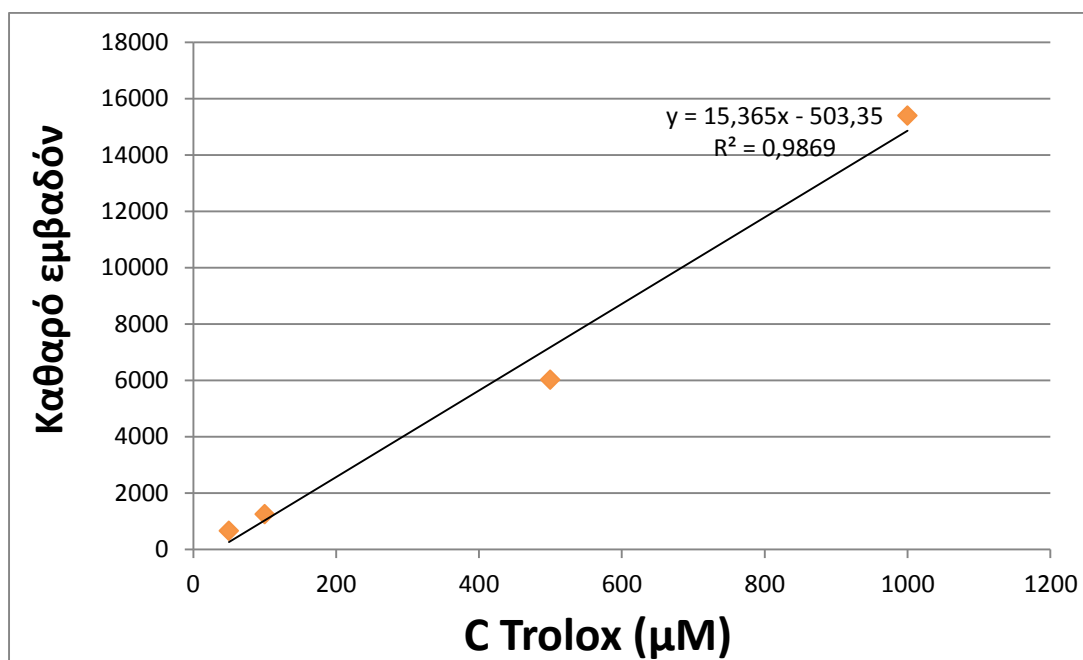
	MetOH 75%	Acetone 75%	water 75°C	water
mg trolox/g λαγορίγανη	16,93±0,42 <sup>α,β</sup>	14,03±2,97	12,15±1,23 <sup>α</sup>	11,74±0,74 <sup>β</sup>



**Σχήμα 6:** Αποτελέσματα DPPH των διαφορετικών εκχυλιτών. Οι στήλες που υποδεικνύονται με τα ίδια γράμματα έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά



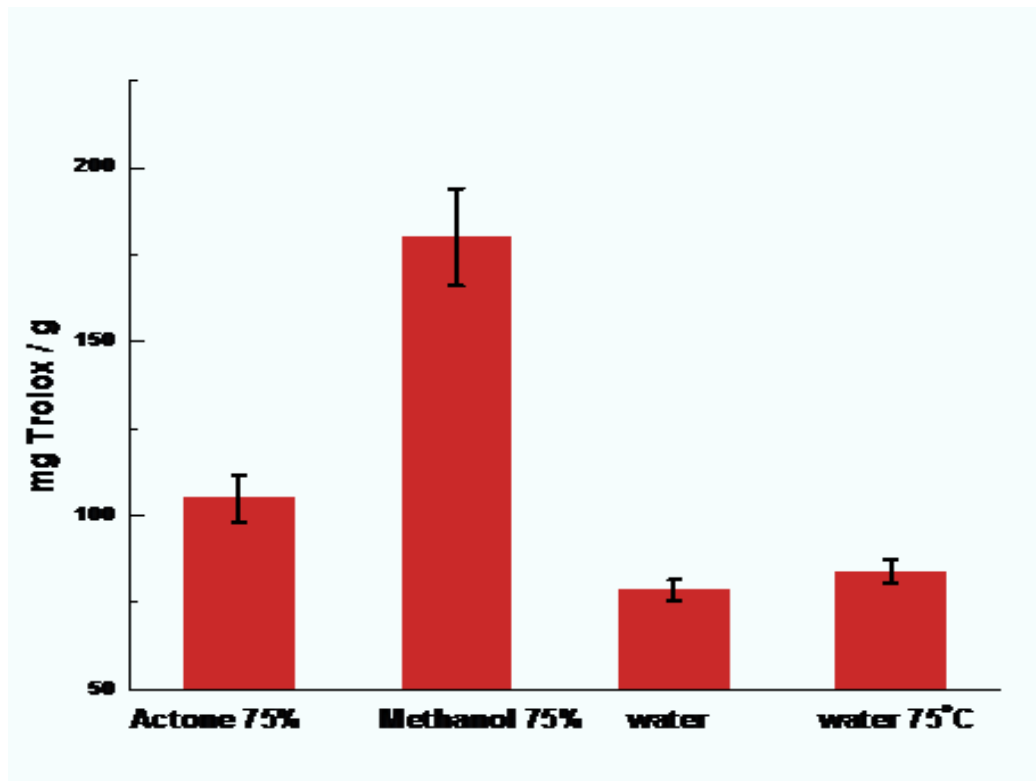
## 6.4 ORAC



Σχήμα 7: Πρότυπη καμπύλη μεθόδου ORAC

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα δοκιμασίας ORAC σε ισοδύναμα Trolox. Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά

	MetOH 75%	Acetone 75%	water 75°C	water
mgTrolox/g λαγορίγανης	168,08±22,3 <sup>b</sup>	105,01±18,03 <sup>a</sup>	78,63±7,79 <sup>a</sup>	84,02±10,23 <sup>a</sup>



**Σχήμα 8:** Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ORAC σε ισοδύναμα Trolox.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ

### 7.1 Ολικές φαινόλες

Βάση των αναλύσεων που πραγματοποιηθήκαν, τα δείγματα λαγορίγανης που είχαν ως διαλύτη την μεθανόλη 75% και την ακετόνη 75% είχαν μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολών σε σχέση με αυτά του θερμού νερού και του νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να συμφωνεί με αυτά που έχουν αναφερθούν για την χρήση οργανικών διαλυτών παρουσία νερού (αυξημένη απόδοση εκχύλισης των αντιοξειδωτικών σε σχέση με τους μη οργανικούς διαλύτες). Επιπλέον βάση των αναλύσεων που έχουν γίνει και στα άλλα βότανα της ίδιας οικογένειας φαίνεται ότι η μεθανόλη (πολικός διαλύτης) έχει την βέλτιστη απόδοση στις εκχυλίσεις με εξαίρεση μόνο των εκχυλίσεων που έχουν γίνει με ζεστό νερό στις οποίες εκεί βρίσκεται η μεγαλύτερη απόδοση. Αυτό έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Για την διαφορά αυτή όμως μπορεί να ευθύνονται πολλοί παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε (οι περισσότερες χρησιμοποιούσαν νερό 85°C και άνω), ο χρόνος εφαρμογής της αλλά και η ταυτόχρονη χρήση υπερήχων μικροκυμάτων κα. Επιπλέον σχεδόν σε όλες τις έρευνες η μέθοδος Folin-Ciocalteu είχε τροποποιηθεί. Τέλος σημαντικός παράγοντας είναι το ίδιο το φυτό αλλά και η περιεκτικότητα και το είδος των συστατικών που περιέχει.

### 7.2 FRAP

Με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για την μέθοδο FRAP, υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών που εμφανίζονται και στα 4 διαφορετικά εκχυλίσματα λαγορίγανης εκφρασμένα ως mg Trolox/g λαγορίγανης. Και σε αυτή την μέθοδο η μεγαλύτερη αναλογία παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα μεθανόλης 75%, ακολουθώντας η εκχύλιση την ακετόνης 75%, του θερμού νερού και τέλος το νερό σε θερμοκρασία παραβάλλοντος. Όπως και για την μέθοδο Folin-Ciocalteu έτσι και για εδώ φαίνεται ότι ο ιδανικότερος διαλύτης εκχύλισης είναι η μεθανόλη 75%

### 7.3 DPPH

Στην DPPH πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών που εμφανίζετε στα εκάστοτε εκχυλίσματα εκφρασμένο σε mg Trolox/g λαγορίγανης. Όπως και στις προηγούμενες αναλύσεις έτσι και εδώ φαίνεται να υπερισχύει το εκχύλισμα μεθανόλης έναντι των υπολοίπων με τελευταία την εκχύλιση του νερού. Συγκεκριμένα η αναλογία αντιοξειδωτικής ικανότητας/ποσότητας αντιοξειδωτικών στην μεθανόλη είναι σχεδόν η διπλάσια από αυτή των εκχυλίσεων νερού

### 7.4 ORAC

Βάση των αναλύσεων που έγιναν στην ORAC βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα με την μεθανόλη είναι αυτά που αναστέλλουν την καταστροφή της φλουορεσκεΐνης (λόγο οξείδωσης από το AAPH) για το περισσότερο χρόνο. Και εδώ η ποσότητα εκφράζεται ως mgTrolox/g λαγορίγανης

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Bendich A., Machlin L.J., Scandurra O., Burton G.W. and Wayner D.D.M. (1986). The antioxidant role of vitamin C: *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2, pp. 419–444.
- Charles, D. (2013). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer.
- Dastmalchi K., Dormana H.J.D, Oinonen P.P., Darwis Y., Laakso I. and Hiltunena R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract: *LWT*, 41, pp. 391–400
- Du G., Sun L., Zhao R., Du L., Song J., Zhang L., He G., Zhang Y. and Zhang J. (2016). Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease: *Pharmacology & Therapeutics*. Article in Press
- Fernández-Álvarez L., del Valle P., de Arriaga D., García-Armesto M.R. and Rúa J. (2014). Binary combinations of BHA and other natural and synthetic phenolics: Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant capacity: *Food Control*, 42, pp. 303-309
- Goszcz K., Deakin S. J., Duthie G.G., Stewart D., Leslie S.J., and Megson I. L. (2015). Antioxidants in cardiovascular therapy: Panacea or false hope? *Front Cardiovasc Med*, 2, 29.
- Hamdy Roby M.H., Sarhana M., Abdel-Hamed Selima K. and Khalel K.I (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, pp. 827– 831
- Huang D., Ou B. and Prior RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 1841-1856
- Kamdem J.P., Adeniran A., Augusti Boligon A., Vargas Klimaczewski C., Olalekan Elekofehinti O., Hassane W., Ibrahim M., Pansera Waczuk E.,

- Meinerza D.F. and Athayde M.L. (2013). Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products*, 51, pp. 26–34
- Kojoda G. and Harrison DG. (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 43, pp.562–567
  - Krishnaiah D., Sarbatly R. *et* Nithyanandam R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, pp. 217–233
  - Lemonis I., Tsimogiannis D., Loulia V., Voutsas E., Oreopoulou V. *and* Magoulas K. (2013) Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO<sub>2</sub> and liquid solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 76, pp. 48–53
  - Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants: *Food Chemistry*, 125, pp. 288-306
  - Martins N., Barros L., Santos-Buelga C., Silva S., Henriques M. and Ferreira I. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. *Food Chemistry*, 167, pp. 131–137
  - Oroian M. and Escriche I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, pp. 10-36
  - Perretti G., Troilo A., Bravi E., Marconi O., Galgano F., and Fantozzi P. (2013). Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, pp. 177–182
  - Petersen M. and Simmonds M. (2003). Molecules of Interest: Rosmarinic acid: *Phytochemistry*, 62, pp. 121–125
  - Pisoschi A.M. and Negulescu G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*

- Prior R.L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of functional foods*, 18, pp. 797–810
- Prior R.L., Wu X. and Schaich K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp.4290-4302
- Rodríguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D. and Cocero M.J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109, pp.98–103
- Said A. B., Guinot C., Ruiz J. C., Charton F., Dole P., Joly C. and Chalamet Y. (2015). Purification of post-consumer polyolefins via supercritical CO<sub>2</sub> extraction for the recycling in food contact applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 25–32.
- Schaich M., Tian X. and Xie J.(2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 782–796
- Skotti E., Anastasaki E., Kanellou G., Polissiou M., Petros A. and Tarantilis P.A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 53 pp. 46– 54
- Škrovánková S., Mišurcová L. and Machů L. (2012) Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67, pp. 75-124
- Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M. and Kouretas D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology* 50 pp. 4115–4124
- Teixeira B., Marquesa A., Ramosa C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira J.M.F, Saraiva J.A. and Nunes M.L (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36, pp.81–87

- Tsao R., Yang R., Young J.C. and Zhu H. (2003). Polyphenolic Profile in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 6347-6353
- Yehye W.A., Rahman N.A., Ariffin A., Abd Hamid S.B., Alhadi A.A., Kadir F.A. and Yaeghoobi M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review: *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, pp. 295-312
- Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., Wichers H.J., Bedir E. and Vardar-Sukan F. (2007). Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times: *European Food Research and Technology*, 224, pp. 443–451
- Wojdyło A., Oszmianski J. and Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs: *Food Chemistry*, 105, pp. 940–949



## Ελληνική Βιβλιογραφία

- Δημόπουλος Κ. και Αντωνοπούλου Σ. (2009) Βασική Βιοχημεία. 2<sup>η</sup> έκδοση με βελτιώσεις και προσθήκες. Αθήνα Σελ: 217-218, 63-69 (παράρτημα).
- Κοτροκόης Κ. και Παπαδογιαννάκης Ε. (2009). Διατροφή και χημεία τροφίμων στην δημόσια υγεία. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδη.
- Κουτσός Θ. (2006) Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη (2η ανατύπωση 2011)
- Μπλούκας Ι. (2004). Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Αθήνα: Αθ. Σταμούλη Σελ: 463-470
- Σκουμπής Β. (1998) Αρωματικά, Φαρμακευτικά και Μελισσοτροφικά Φυτά της Ελλάδας. Αθήνα: εκδόσεις ΑγροΤυπος
- Σουφλερός Ε. (2012). Οινολογία: επιστήμη και τεχνογνωσία. 2<sup>η</sup> έκδοση. Θεσσαλονίκη: Κεφ. 14, Σελ. 195-202
- Σφλώμος Κ. (2011). Χημεία Τροφίμων με Στοιχεία Διατροφής. Β' Έκδοση , Τόμος Ι, Κεφ. 4 Σελ. 267-276, Κεφ. 7 Σελ. 505-515