

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ  
ΚΟΥΜΑΡΑ(*Arbutus unedo* L.)ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ  
ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ»



ΛΑΜΠΡΟΥ ΛΗΔΑ

ΑΜ:2011027

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ  
ΚΟΥΜΑΡΑ(*Arbutus unedo* L.) ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ  
ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΜΠΡΟΥ ΛΗΔΑ

ΑΜ:2011027

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ποσοτικοποιήθηκαν συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά συστατικά που υπάρχουν στα κούμαρα και στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική τους δράση. Αυτά είναι οι ολικές φαινόλες, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες, οι προανθοκυανίνες καθώς και η ολική αντιοξειδωτική δράση των φρούτων, εφαρμόζοντας δυο μεθόδους.

Οι αναλύσεις έγιναν με τέσσερα διαφορετικά εκχυλίσματα με διαφορετικούς διαλύτες, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η καταλληλότερη μέθοδος για κάθε ομάδα φαινολικών ενώσεων που εξετάστηκαν.

Μετά από το πειραματικό μέρος και την παραλαβή των αποτελεσμάτων, βγήκε το συμπέρασμα ότι τα κούμαρα είναι μια πολύ καλή αντιοξειδωτική πηγή, καθώς περιείχαν υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (659,38mg rutin/100g ξερό κούμαρο). Εντός της ομάδας των φλαβονοειδών ανήκουν οι ανθοκυανίνες και οι προανθοκυανίνες που βρίσκονται κι αυτές σε υψηλά ποσοστά. Τέλος προσδιορίστηκε ως πιο λειτουργικός διαλύτης στην πλειοψηφία των αναλύσεων ο οξικός αιθυλεστέρας.

Με βάση όλα τα παραπάνω μελλοντικά ίσως υπάρξουν προοπτικές και δυνατότητες αξιοποίησης των φρούτων σε διάφορους τομείς.

Λέξεις κλειδιά: κούμαρα, αντιοξειδωτικά, αντιοξειδωτική δράση, φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, προανθοκυανίνες

## ABSTRACT

The aim of the present study was to identify and quantify the antioxidant components present in strawberry tree fruits. These components are the total phenols, flavonoids, anthocyanins, the proanthokyanines and total antioxidant activity of fruits, using two methods. Analyzes were performed with four different extracts by different solvents, in order to determine the most suitable method for each group of phenolic compounds.

After the experimental part and obtaining the results, it was concluded that the fruits of strawberry tree is a very good antioxidant source as containing high flavonoid content (659,38mg rutin / 100g dry fruit). Within the group of flavonoids include anthocyanins and proanthokyanines located and these high rates. Finally it proved that ethyl acetate was more effective on the most analyzes.

In conclusion there may be prospects and possibilities utilization of fruits of strawberry tree in the future in various fields.

Keywords: *arbutus unedo*, strawberry tree, antioxidants, antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, proanthokyanines

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου Ιωακείμ Σπηλιόπουλο, για την ασταμάτητη και ανεκτίμητη βοήθειά του, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ όλη τη διάρκεια του πειραματικού και γραπτού μέρους της εργασίας μου.

Για την ασταμάτητη υποστήριξη όλα τα χρόνια των φοιτητικών μου σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με βοήθησε να τα φέρω εις πέρας.

Τέλος , θα ήθελα να ευχαριστήσω τα προσφιλή μου πρόσωπα για την υποστήριξή τους κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

## ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΉΣ ΕΥΘΥΝΗΣ

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

Υπογραφή

Λάμπρου Λήδα

..... - ..... -2016

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 «ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ» .....	11
1.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ .....	12
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	14
1.3.1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	15
1.3.2 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΟΥΜΑΡΩΝ» .....	24
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΟΥΜΑΡΙΑ .....	24
2.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΡΠΟΥ .....	25
2.2.1 ΦΑΙΝΟΛΕΣ .....	25
2.2.2 ΟΞΕΑ .....	30
2.2.3 ΣΑΚΧΑΡΑ .....	34
2.2.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ .....	35
2.2.5 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	36
2.2.6 ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	37
2.2.7 ΦΥΛΛΑ/ ΚΟΤΣΑΝΙ/ ΡΙΖΕΣ/ ΣΠΟΡΟΙ .....	37
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΟΥΜΑΡΟΥ .....	38
2.3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	38
2.3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ .....	39
2.3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΩΝ .....	41
2.3.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ .....	44
2.3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ .....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ» .....	51
3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	51
Εκχύλιση με μεθανόλη 70% και ακετόνη 70% .....	51
Εκχύλιση με μεθανόλη 70% .....	52
Εκχύλιση με ακετόνη 70% .....	52
Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα .....	53
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU .....	55
3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ .....	56

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ.....	57
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΥΑΝΙΔΙΝΩΝ με τη μέθοδο DMAC .....	58
3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ DRPH.....	59
3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FRAP .....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 « ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ» .....	61
4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΩΝ .....	61
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ (Folin-Ciocalteu).....	61
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ .....	64
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ.....	66
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ (DMAC).....	69
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ .....	72
ΜΕΘΟΔΟΣ DRPH.....	72
ΜΕΘΟΔΟΣ FRAP .....	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	76
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τρόφιμα, μεταποιημένα ή μη, υφίστανται φυσικά κάποιες αντιδράσεις οξειδωσης ,με το πέρασμα του χρόνου, οι οποίες περιορίζουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής τους προκαλώντας τους αλλοιώσεις.

Ένας τρόπος για τον περιορισμό, την επιβράδυνση, ακόμα και την παρεμπόδιση αυτών των αλλοιώσεων στα τρόφιμα είναι η χρήση κάποιων ουσιών γνωστών ως αντιοξειδωτικά. Αυτά, χωρίζονται ανάλογα με τη φύση τους σε φυσικά (υπάρχουν κυρίως στην χλωρίδα) και στα συνθετικά. Τα συνθετικά έχουν ευρύτερη χρήση σε σχέση με τα φυσικά, όμως αποτελούν αμφιλεγόμενο ζήτημα για τους επιστήμονες, διότι δεν είναι απόλυτα γνωστή η επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία. Μελέτες έχουν δείξει ότι μακροχρόνια ίσως είναι τοξικά, καρκινογόνα και συνυπεύθυνα για ασθένειες, ενώ άλλες τα καθιστούν ασφαλή για την υγεία του ανθρώπου. Για τους παραπάνω λόγους τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στα φυσικά αντιοξειδωτικά, με μελλοντικό σκοπό την σταδιακή αντικατάσταση των συνθετικών με αυτά.

Τα μούρα γενικά, και πιο συγκεκριμένα τα κούμαρα που είναι το αντικείμενο μελέτης της εν λόγω εργασίας, είναι φρέσκα φρούτα τα οποία πέρα από το ότι αξιοποιούνται για πολλές χρήσεις μέσω της μεταποίησης (πχ παρασκευή μαρμελάδων), παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε φυσικά αντιοξειδωτικά, με βασικό παράδειγμα τις πολυφαινόλες. Γι' αυτό και ενδείκνυνται η κατανάλωσή τους για μια υγιεινή διατροφή. Σε γενικές γραμμές όλων των ειδών τα μούρα περιέχουν άφθονες αντιοξειδωτικές ομάδες, κάποιες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και κάποιες σε χαμηλότερες. Ωστόσο, η παρούσα πτυχιακή ασχολείται με την μέτρηση των φλαβονοειδών, των ανθοκυανίνων, των προανθοκυανίνων, των ολικών φαινολών καθώς και γενικά την αντιοξειδωτική δράση των φρούτων της κουμαριάς (*Arbutus unedo L.*).

Το πρώτο κεφάλαιο της εργασίας πραγματεύεται γενικά για τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και το οξειδωτικό στρες, αλλά και πως αυτά αντιμετωπίζονται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Ακόμα, περιλαμβάνει το

διαχωρισμό των αντιοξειδωτικών και αναλύονται εκτενέστερα τα φυσικά αντιοξειδωτικά.

Το δεύτερο κεφάλαιο ασχολείται κυρίως με την κουμαριά και τους καρπούς της. Αναφέρεται η σύσταση του κούμαρου, καθώς και οι διάφοροι τρόποι και μέθοδοι μελέτης των συστατικών της.

Στο τρίτο κεφάλαιο υπάρχουν αναλυτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν στην παρούσα πειραματική εργασία για τον προσδιορισμό του κάθε συστατικού που αναλύθηκε. Το τέταρτο κεφάλαιο περιέχει τα αποτελέσματα των πειραμάτων καθώς και συμπεράσματα/συζήτηση.

Σκοπός της όλης πειραματικής δραστηριότητας είναι η μελέτη των φυσικών αντιοξειδωτικών των καρπών της κουμαριάς, με μελλοντικό στόχο την αξιοποίησή τους ως πιθανό συντηρητικό στα τρόφιμα, αποτρέποντας έτσι τις αλλοιώσεις σε αυτά.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 «ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ»

## 1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ και ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με μονήρη ηλεκτρόνια, είναι ιδιαίτερα ασταθή και έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα παίρνοντας ένα ηλεκτρόνιο από τα γειτονικά τους μόρια και με αυτόν τον τρόπο ξεκινάνε αλυσιδωτές αντιδράσεις. Προέρχονται από τρία στοιχεία τα οποία είναι τα εξής:

- **Οξυγόνο** δημιουργώντας έτσι ενεργές μορφές οξυγόνου (**ROS, reactive oxygen species**). Ο όρος ROS περιέχει όλες οι ρίζες που περιέχουν οξυγόνο, καθώς και όλες οι ενώσεις που μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές. Παραδείγματα αποτελούν το ανιόν υπεροξειδίου, η ρίζα υδροξυλίου, το μονοξειδίο του αζώτου κ.α.
- **Άζωτο** δημιουργώντας έτσι ενεργές μορφές αζώτου (**RNS, nitrogen reactive oxygen species**). Τα RNS προέρχονται από NO που αντιδρούν με το οξυγόνο. Το NO παράγεται με τη δράση του ενζύμου συνθάση του NO από αργινίνη.
- **Θείο** δημιουργώντας αντίστοιχα ενεργές μορφές θείου (**RSS, reactive sulfur species**) που σχηματίζονται εύκολα όταν αντιδρούν ROS με θειόλες.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργούνται είτε εσωτερικά στον οργανισμό ως φυσιολογική λειτουργία του μεταβολισμού (πχ μέσω διαδικασιών φλεγμονής, σωματικής άσκησης φαγοκυττάρωσης κ.α.), είτε από εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι κλπ.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου, αζώτου και θείου εξουδετερώνονται με την βοήθεια ορισμένων ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά διατηρώντας μια ισορροπία. Αν αυτή η ισορροπία διαταραχθεί και τείνει στην υπερπαραγωγή ενεργών μορφών τότε τα κύτταρα αρχίζουν να επηρεάζονται από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Κύριοι στόχοι των ενεργών μορφών είναι οι πρωτεΐνες, τα μόρια του DNA και RNA, τα σάκχαρα και τα λιπίδια όπου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες. (Δημόπουλος & Αντωνοπούλου, 2009; Carocho & Ferreira, 2012)

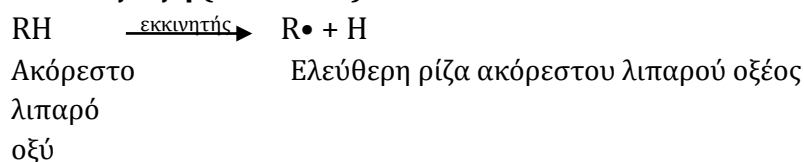
## 1.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ

Πολλά συστατικά των τροφίμων οξειδώνονται κατά την έκθεσή τους στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τέτοια είναι τα λίπη, τα έλαια και τα αρωματικά έλαια τα οποία ταγγίζουν όταν εκτίθενται στον αέρα.

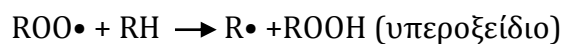
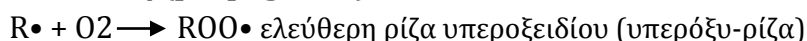
Η οξείδωση αποτελεί τη σημαντικότερη αλλοίωση των λιπών και ελαίων. Κατά την οξείδωση, με την καταλυτική δράση της θερμότητας, του φωτός, των μετάλλων και άλλων καταλυτών, ιόντα υδρογόνου αποσπώνται από το πρώτο άτομο άνθρακα που σχηματίζει ακόρεστο δεσμό στα λιπαρά οξέα του τριγλυκεριδίου. Το τριγλυκερίδιο στην περίπτωση αυτή μεταπίπτει σε μια ασταθή κατάσταση, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων. Αυτές αντιδρούν έντονα με το οξυγόνο και σχηματίζουν ρίζες υπεροξειδίων. Οι ρίζες υπεροξειδίων αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα και σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων και υδροϋπεροξειδία. Τα τελευταία διασπώνται σε οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα και αλκοόλες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή, γεύση) στα λίπη και έλαια καθώς και στα τρόφιμα που περιέχουν λίπος. Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων που απαντούν στις λιπαρές ουσίες είναι μια αυτοκαταλυτική αντίδραση, κατά την οποία τα προϊόντα της οξείδωσης ενεργούν ως καταλύτες της ίδιας της αντίδρασης. (Μπλούκας, 2004; Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

Σχηματικά τα στάδια του αυτοκαταλυτικού μηχανισμού της οξείδωσης, αποδίδονται ως εξής:

### 1.Εισαγωγή (initiation)



### 2.Διάδοση (propagation)



### 3. Τερματισμός (termination)



Όπου RH = λιπαρό οξύ

R•, ROO• = ελεύθερες ρίζες

ROOH = υπεροξειδία

RR, ROOR = προϊόντα τελικής αντίδρασης

(Κυριτσάκης, 2007)

Η οξείδωση των λιπαρών ουσιών, γνωστή ως **οξειδωτική τάγκιση** (oxidate rancidity), καθώς και των άλλων συστατικών των τροφίμων, όπως οι χρωστικές και οι βιταμίνες, επηρεάζει αρνητικά:

- Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων και κυρίως την οσμή και τη γεύση
- Το χρώμα
- Τη θρεπτική αξία

Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται ως ενδιάμεσα προϊόντα κατά την οξείδωση των λιπών είναι δυνατόν ν' αποτελέσουν την αιτία για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς και καρκίνο.

Έτσι παρά το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι αντιδράσεις οξείδωσης είναι ωφέλιμες για το τρόφιμο, ορισμένες μπορούν ν' αποδειχθούν επιβλαβείς. Ο έλεγχος και επιπλέον ο περιορισμός αυτών των επιβλαβών αντιδράσεων στα τρόφιμα επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

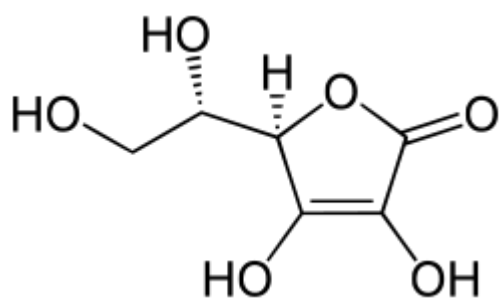
- Μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης των τροφίμων
- Απουσία οξυγόνου από το περιβάλλον του τροφίμου και ιδιαίτερα με τη συσκευασία του προϊόντος υπό κενό σε περιέκτη αδιαπέραστο στη διείσδυση του οξυγόνου
- Μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο προϊόν.

Αν τα παραπάνω μέτρα δεν είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν ή δεν είναι αποτελεσματικά, τότε ο μόνος τρόπος ελέγχου και αντιμετώπισης της οξειδωτικής τάγκισης είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. (Μπλούκας, 2004; Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

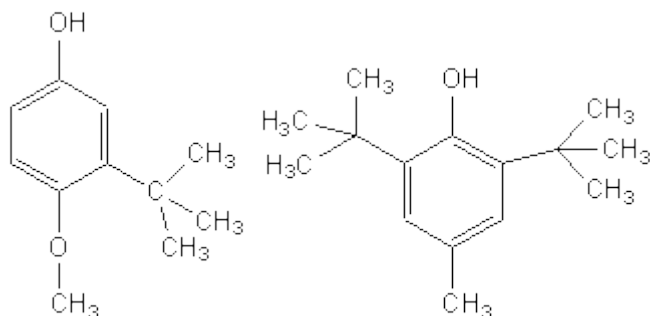
### 1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από ένα μόριο στόχο. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα σημαντική, επειδή καταστέλλει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Πρόσφατα ο όρος «αντιοξειδωτικά» έχει επεκταθεί και σε εκείνες τις ενώσεις που διακόπτουν την αλυσίδα αντιδράσεων στην οξείδωση των λιπιδίων ή απενεργοποιούν το οξυγόνο.

Πρόκειται για φυσικές (**φυσικά αντιοξειδωτικά**) ή συνθετικές οργανικές ουσίες (**συνθετικά αντιοξειδωτικά**) που περιέχουν στο μόριό τους μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλεται και η αντιοξειδωτική τους δράση. Ένα παράδειγμα φυσικού αντιοξειδωτικού είναι η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ, ενώ η βουτυλική υδρόξυανισόλη (BHA) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως προαναφέρθηκε αποτελούν αμφιλεγόμενο ζήτημα για τους επιστήμονες διότι άλλοι τα θεωρούν ασφαλή για την υγεία του ανθρώπου και άλλου όχι.



Εικόνα 1.3.1 Βιταμίνη C



Εικόνα 1.3.2 BHT

Ακολουθεί πίνακας όπου παρουσιάζονται οι έξι γενικές κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται τα αντιοξειδωτικά, ο τρόπος δράσης τους καθώς και οι ενώσεις οι

οποίες ανήκουν σε κάθε μια κατηγορία. (Αρβανιτογιάννης et al., 2001; Carocho et al., 2012)

**Πίνακας 1.3.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών**

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΕΝΩΣΕΙΣ
Πρωτοταγή	Αναστέλλουν αντιδράσεις οξείδωσης παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες.	Φαινολικές ενώσεις (ΒΗΑ, ΒΗΤ, ΤΒΗQ, ΡG, τοκοφερόλες, καφεϊνικό οξύ, καρσονόλη)
Δεσμευτές οξυγόνου	Αντιδρούν με το οξυγόνο και ελαττώνουν την συγκέντρωση του σε ένα κλειστό σύστημα.	Ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του
Δεσμευτές μετάλλων	Δεσμεύουν μέταλλα των οποίων η μεταφορά ηλεκτρονίων μπορεί να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες.	Οξέα ή παράγωγα που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις π.χ. EDTA, κιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ, άλατα
Αναγωγικά	Συnergειακή δράση (αναγέννηση φαινολών).	Ασκορβικό οξύ
Απενεργοποιητές μονήρους οξυγόνου		Τοκοφερόλες και β-καροτένια
Ένζυμα	Απομάκρυνση ενεργών ειδών οξυγόνου.	

(Πηγή Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

### 1.3.1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι φαινολικά παράγωγα κι έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την αντίδραση των ελεύθερων ριζών των λιπαρών οξέων με το οξυγόνο χάριν της φαινολικής δομής που διαθέτουν. Αυτές οι ενώσεις προσθέτονται στα τρόφιμα ώστε αυτά να μπορούν να αντέχουνε διάφορες μεταχειρίσεις και συνθήκες, καθώς και να παρατείνεται η ζωή στο ράφι. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πρόκειται για ενώσεις που παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπου δεν πρέπει να

υπερβαίνουν τα 200ppm (100-200ppm) καθώς και να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της λιπαρής φάσης. (Σφλώμος, 2011; Carocho et al, 2012)

Το φαινύλιο που περιέχεται στο μόριο αυτών των αντιοξειδωτικών ενεργεί ως δότης πρωτονίων και εμποδίζει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αυτοοξειδωσης των λιπών. Οι ελεύθερες ρίζες του αντιοξειδωτικού που σχηματίζονται κατά την αντίδραση αυτή είναι σταθερές και συνεπώς δεν έχουν την ικανότητα της παραπέρα οξείδωσης των λιπών και ελαίων. Κατά συνέπεια, τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι τόσο αποτελεσματικότερα, όσο γρηγορότερα προσθέτονται στο τρόφιμο, ώστε να εμποδίσουν το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών στα λιπαρά οξέα. Ακόμα επιβραδύνουν την οξείδωση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. (Μπλούκας, 2004; Σφλώμος, 2011)

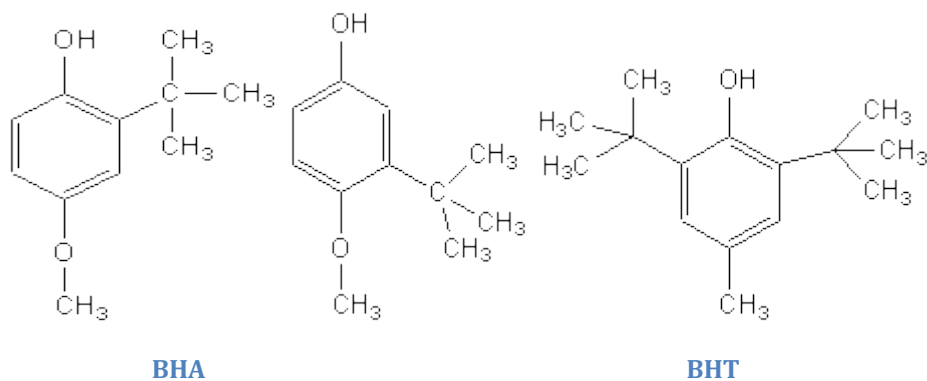
Πρόσφατα γίνονται έρευνες για την τοξικότητα των συνθετικών αντιοξειδωτικών που ίσως οδηγεί σε καρκινογενέσεις. Παρόλο που ήδη γίνεται η προσπάθεια να αντικατασταθούν πλήρως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά με τα φυσικά, η ολοκληρωτική απαγόρευσή τους δεν φαίνεται πιθανή στο άμεσο μέλλον.

Τα πιο συχνά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι τα παρακάτω:

- E310 Γαλλικός προπυλεστέρας
  - E311 Γαλλικός οκτυλεστέρας
  - E312 Γαλλικός δωδεκυλεστέρας
  - E320 Βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA) (1,0 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)
  - E321 Βουτυλικό υδροξυτολουόλιο (BHT) (0,25 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)
- Τριτογενής-βουτυλο-υδροξινόνη

(Μπλούκας, 2004; Σφλώμος, 2011; Carocho et al, 2012)





### 1.3.2 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα φυτά, τα ζώα αλλά και ο άνθρωπος διαθέτουν κάποιες ποσότητες αντιοξειδωτικών και ενζύμων, ενδογενώς, για την προστασία των λιπιδίων τους από την οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα του ανθρώπου χωρίζεται και δυο μεγάλες ομάδες, τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Παρά την αξιοσημείωτη δράση του ενδογενούς συστήματος σε πολλές περιπτώσεις δεν επαρκεί και γι αυτό το λόγο οι άνθρωποι εξαρτώνται από διαφόρων ειδών αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα τρόφιμα έτσι ώστε να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων ριζών σε χαμηλά επίπεδα.

Λόγω του ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δεν είναι βέβαιο ότι δεν επιδρούν αρνητικά στην υγεία του ανθρώπου, η προσοχή στράφηκε στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αυτά είναι φυσικές οργανικές ουσίες που περιέχουν στο μόριό τους μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλεται και η αντιοξειδωτική τους δράση. (Dai et al., 2010; Carocho et al., 2012)

## ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων, που έχει ως κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους την ύπαρξη ενός ή και παραπάνω αρωματικού δακτυλίου που συνήθως έχει υποκαταστάτη υδροξυλομάδα.

Οι φαινολικές ενώσεις κυριαρχούν στο φυτικό βασίλειο, γι αυτό και είναι αναπόσπαστο μέρος της διατροφής του ανθρώπου, και είναι γνωστό ότι υπάρχουν περισσότερες από 8.000 φαινολικές δομές που μπορούν να είναι είτε απλά μόρια είτε σύνθετα. Είναι ευρέως διαδεδομένες ως συστατικά των φυτικών τροφών (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, ελαιόλαδο κλπ.) των ποτών (τσάι, καφές, μπύρα, κρασί κλπ.) και εν μέρει ευθύνονται για οργανοληπτικές ιδιότητες αυτών. Για παράδειγμα φαινολικά συμβάλλουν στην πικρή και στυφή γεύση των φρούτων και λαχανικών.

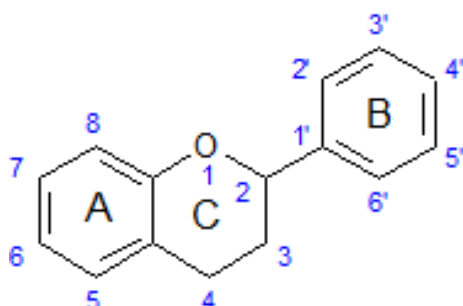
Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να καταταχθούν σε:

- **Απλές φαινόλες**, όταν έχουν ένα φαινολικό δακτύλιο (φαινολικά οξέα και κουμαρίνες)
- **Πολυφαινόλες**, όταν διαθέτουν δυο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους (φλαβονοειδή, στιλβένια, λιγνάνια, ταννίνες)

Οι φαινόλες αποκτούν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών και λοιπών σημαντικών ιδιοτήτων τους. (Δημόπουλος et al, 2009; Dai et al, 2010)

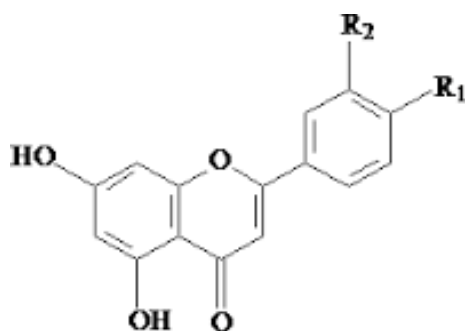
## ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

### ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ



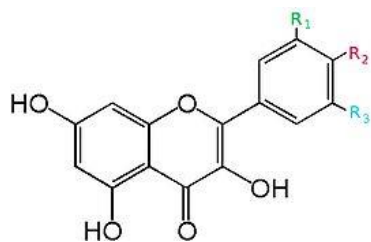
Σχήμα 1.3.2.1 Χημική δομή φλαβονοειδών

Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων και επομένως και των πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή. Αποτελούνται από μια μεγάλη αντιοξειδωτική ομάδα χαμηλού μοριακού βάρους πολυφαινολών. Η χημική δομή των φλαβονοειδών στηρίζεται στην ύπαρξη του φλαβανικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους A και B και από έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο, ο οποίος φέρει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορούν να διακριθούν σε έξι (6) υποομάδες οι οποίες είναι: φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβαν-3-όλες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες. (Carocho et al, 2012; Leopoldini et al, 2010)



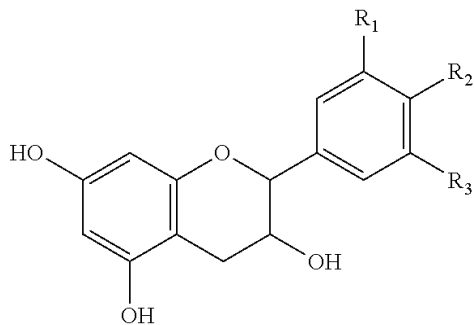
Φλαβόνες	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Απιγενίνη	H	H
Λουτεολίνη	H	OH

Σχήμα 1.3.2.2 Χημική δομή φλαβόνης (Πηγή Dai et al, 2010)



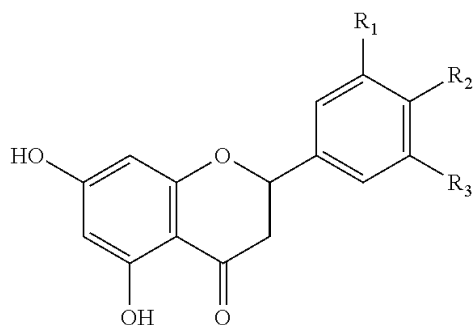
Φλαβονόλες	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Καμπεφερόλη	H	OH	H
Κερκετίνη	OH	OH	H
Μυρικετίνη	OH	OH	OH

Σχήμα 1.3.2.3 Χημική δομή φλαβονόλης(Πηγή Dai et al, 2010)



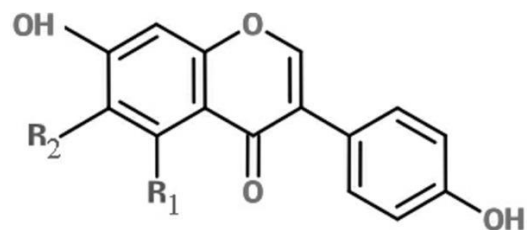
Φλαβανόλες	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Κατεχίνη	OH	OH	H
Γαλλοκατεχίνη	OH	OH	OH

Σχήμα 1.3.2.4 Χημική δομή φλαβανόλης(Πηγή Dai et al, 2010)



Φλαβανόνες	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Εσπερετίνη	OH	OCH <sub>3</sub>
Εριοδικτυόλη	OH	OH
Ναρινγενίνη	H	OH

Σχήμα 1.3.2.5 Χημική δομή φλαβανόνης(Πηγή Dai et al, 2010)



Ισοφλαβόνες	R <sub>1</sub>
Δαιδζεινη	H
Γενιστεΐνη	OH

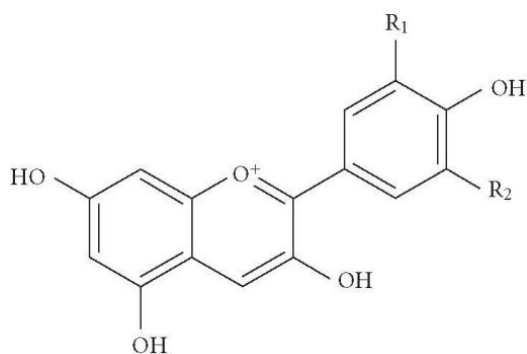
Σχήμα 1.3.2.6 Χημική δομή ισοφλαβόνων(Πηγή Dai et al, 2010)

Τα δομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση είναι: α) η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 και καρβονυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου β) η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C

και γ) η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου Β. Τα φλαβονοειδή δρουν με δυο μηχανισμούς ως αντιοξειδωτικά. Κυρίως διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξείδωσης δίνοντας άτομα υδρογόνου στις ρίζες, όπως όλα τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση. Στο σχηματισμό συμπλόκων συμμετέχουν το υδροξύλιο στη θέση 3 και το καρβονύλιο στη θέση 4 των φλαβονολών ή το καρβονύλιο στη θέση 4 και ένα υδροξύλιο στη θέση 5 των φλαβονολών, των φλαβονών και των φλαβανινών. Μερικά από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή είναι η κατεχίνη, η γαλλική κατεχίνη, η κερκετίνη και η καμπεφερόλη.( Carocho et al, 2012; Leopoldini et al, 2010)

Οι φλαβονόλες διαφέρουν από τις φλαβανόνες λόγω μιας ομάδας υδροξυλίου στη θέση C3, και από έναν C2-C3 διπλό δεσμό. Οι φλαβανόνες και οι φλαβόνες συνήθως βρίσκονται στα ίδια φρούτα και συνδέονται με συγκεκριμένα ένζυμα, ενώ οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες σπανίως βρίσκονται μαζί. Οι ανθοκυανίνες επίσης απουσιάζουν από φυτά πλούσια σε φλαβανόνες ενώ είναι υπεύθυνες για το πορτοκαλί, κόκκινο, μπλε, και μωβ χρώμα σε πολλά φρούτα και λαχανικά.

Οι ανθοκυανίνες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυσικών φλαβονοειδών χρωστικών. Στα φυτά βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών, κυρίως στη θέση C3, των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανίνες και προκύπτουν με όξινη υδρόλυση των πρώτων. Ο θεμελιώδης πυρήνας των ανθοκυανιδίων είναι το χλωριούχο βανζοπυρίλιο, αλλά η μητρική τους ουσία είναι το χλωριούχο 2-φαινυλοβενζοπυρίλιο ή αλλιώς χλωριούχο φλαβύλιο. Κύριος εκπρόσωπος είναι η κυανιδίνη. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις και έχουν επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Τα όξινα άλατα είναι συνήθως κόκκινα και τα μεταλλικά συνήθως μπλε.( Carocho et al, 2012; Leopoldini et al, 2010; Σφλώμος, 2011)



Ανθοκυανίνες	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Παιονιδίνη	OCH <sub>3</sub>	H
Πετουνιδίνη	OCH <sub>3</sub>	OH
Μαλβιδίνη	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Σχήμα 1.3.2.7 Χημική δομή ανθοκυανίνων(Πηγή Dai et al, 2010)

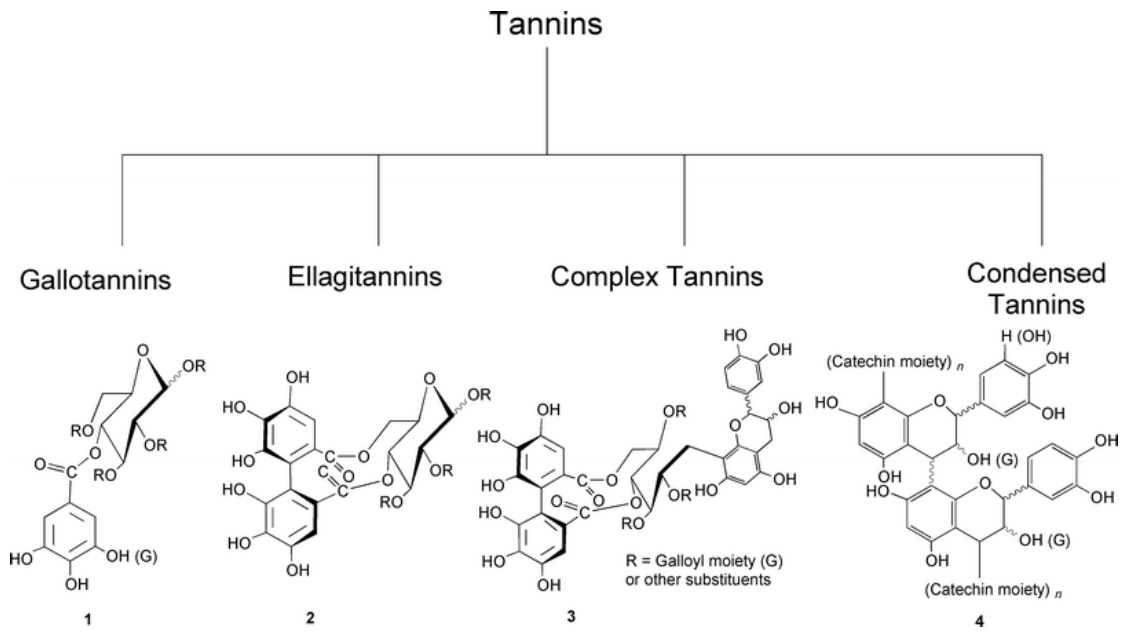
## TANNINES

Οι ταννίνες είναι μια ακόμα σημαντική κατηγορία των πολυφαινόλων. Είναι σημαντικές για την διατροφή του ανθρώπου και συνήθως χωρίζονται σε δυο ομάδες οι οποίες είναι :

- A) οι υδρολυόμενες ταννίνες και
- B) οι μη υδρολυόμενες ταννίνες

Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι ενώσεις που περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή άλλης πολυόλης εστεροποιημένης με γαλλικό οξύ. Η μεγάλη ποικιλία στη δομή αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές δυνατότητες στο σχηματισμό οξειδωτικής σύνδεσης.

Οι μη υδρολυόμενες ταννίνες είναι ολιγομερή ή πολυμερή φλαβαν-3-όλης συνδεδεμένη μέσω ενός δεσμού άνθρακα. Αναφέρονται επίσης ως προανθοκυανιδίνες επειδή αποσυντίθενται σε ανθοκυανιδίνες μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της όξινης καταλάσης υπό θέρμανση σε όξινα διαλύματα αλκοόλης. (Dai et al., 2010; Carocho et al., 2012; Leopoldini, et al., 2010)



**Εικόνα 1.3.2.1** Χημική δομή υδρολύμενων ταννίνων(γαλλοταννίνες,ελλαγιταννίνες) και μη υδρολύμενων ταννίνων (condensed tannins) (Πηγή *Khanbabaee et al, 2001*)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΟΥΜΑΡΩΝ»



### 2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΟΥΜΑΡΙΑ

Η κουμαριά χωρίζεται σε δυο είδη, τα οποία είναι *Arbutus unedo L.* και *Arbutus andrachnael*, ανήκει στην οικογένεια *Ericaceae* και υποοικογένεια *Vaccinioides* (ή *Arbutus*). Είναι ένας αειθαλής θάμνος που παραδοσιακά κατάγεται από τις μεσογειακές χώρες, ωστόσο καλλιεργείται και ευδοκιμεί και σε άλλες περιοχές όπως είναι για παράδειγμα οι χώρες της ανατολικής Ευρώπης.(Ayaz et al, 2000; Fortalezas et al, 2010)

Ως προς την εμφάνισή τους οι καρποί των κούμαρων είναι σφαιρικοί, περίπου 2 εκατοστά σε διάμετρο και το χρώμα τους είναι κίτρινο όταν είναι άγουροι ενώ κόκκινο όταν ωριμάζουν. Είναι γευστικά μόνο όταν είναι πλήρως ώριμοι, κάτι που γίνεται το φθινόπωρο. Σπάνια καταναλώνονται ως φρέσκα φρούτα λόγω της ιδιαίτερης και πικρής τους γεύσης, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες εφαρμογές στις τοπικές αγροτικές κοινότητες, όπως για παράδειγμα για την παρασκευή μαρμελάδων και αλκοολούχων ποτών (π.χ. λικέρ, τσίπουρο). (Fortalezas et al, 2010; Oliveira et al, 2011)

Οι βρώσιμοι καρποί των κούμαρων παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο ως μεταποιημένο προϊόν, αλλά και ως φρέσκο φρούτο λόγω των υψηλών



συγκεντρώσεων τους σε αντιοξειδωτικά, όπως φαινολικές ενώσεις, βιταμίνη C, βιταμίνη E και καρροτενοειδή. Οι καρποί όπως και τα φύλλα είναι γνωστά για τις αντισηπτικές, διουρητικές και καθαρτικές τους ικανότητες. (Riihinen, 2005; Ayaz et al, 2000)

## 2.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΡΠΟΥ

Τα κούμαρα, όπως και πολλών ειδών μούρα, λόγω των συστατικών που περιέχει καταφέρνει να κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Εξαιτίας αυτών των συστατικών μπορεί να υπάρξει στο άμεσο μέλλον ένα ευρύ φάσμα χρήσης των καρπών της που θα είναι προσοδοφόρο σε πολλούς τομείς όπως για παράδειγμα στη συντήρηση των τροφίμων.

Σύμφωνα λοιπόν με διάφορες έρευνες έχουν ταυτοποιηθεί στους καρπούς της κουμαριάς φαινολικά συστατικά τα οποία έχουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση, λιπαρά και οργανικά οξέα, σάκχαρα, διάφορες πτητικές ενώσεις καθώς και μεταλλικά στοιχεία. Όπως είναι φυσικό, δεν θα μπορούσαν να λείπουν ενδιαφέροντα συστατικά στα φύλλα, στο κοτσάνι, στις ρίζες, στους σπόρους αλλά και γενικότερα σε ολόκληρο τον θάμνο του δένδρου φράουλας. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί το ότι ανάλογα με το μέρος που ευδοκιμούν και τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν, τα κούμαρα παρουσιάζουν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές. Παρακάτω ακολουθεί εκτενέστερη ανάλυση. (Miguel et al, 2014; Fortalezas et al, 2010)

### 2.2.1 ΦΑΙΝΟΛΕΣ

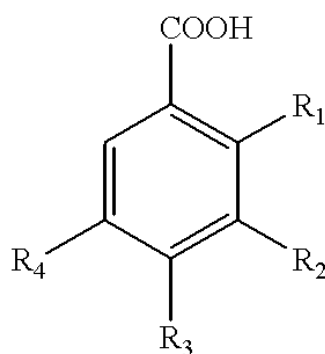
Έχει προαναφερθεί ότι οι φαινόλες είναι χημικές ενώσεις που περιέχουν έναν ή και παραπάνω αρωματικό δακτύλιο στο δυναμικό τους. Στις φαινόλες κυρίως, είναι γνωστό ότι οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση των κούμαρων. Σε ένα γενικό πλαίσιο, στα μούρα τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα βενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκιναμικά οξέα, οι φλαβονόλες,

οι ανθοκυανίνες, οι φλαβαν-3-όλες, οι προανθοκυανιδίνες και οι ελλαγιταννίνες. (Oliveira et al, 2011)

Όσον αναφορά πιο συγκεκριμένα το γένος *Arbutus*, στο οποίο ανήκει και η κουμαριά, παρουσιάζονται συστατικά που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες φαινολών. Αυτά είναι τα φαινολικά οξέα, οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες και οι ανθοκυανίνες. (Miguel et al, 2014)

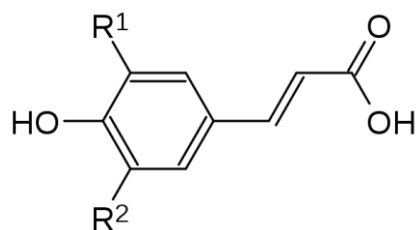
Τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν σε φρούτα του δένδρου φράουλας, που είχαν υποστεί πλήρη ωρίμανση στη περιοχή Caceres της Ισπανίας, σύμφωνα με τους Miguel G. et al., χωρίζονται σε επτά υποκατηγορίες. Αυτές οι κατηγορίες μαζί με τα ποσοστά τους είναι οι εξής:

- a) Προανθοκυανιδίνες και κατεχίνη (474,1mg/100g και 313,4mg/100g αντίστοιχα)
- b) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (112,2mg/100g)
- c) Ελλαγιταννίνες
- d) Ελλαγικό οξύ (6,9mg/100g)
- e) Υδροξυκιναμμωμικά οξέα (1mg/100g)
- f) Φλαβονόλες (3,6mg/100g)
- g) Ανθοκυανίνες(5,8mg/100g)



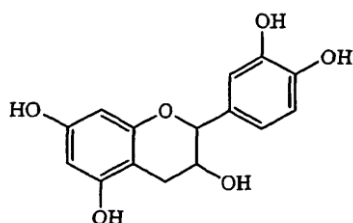
Βενζοϊκά οξέα	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
p-υδροξυβενζοϊκό	H	H	OH	H
πρωτοκατεχινικό	H	OH	OH	H
Βανιλλικό	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Συριγγικό	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Γαλλικό	H	OH	OH	OH
Σαλικυλικό	OH	H	H	H
Γεντισικό	OH	H	H	OH

Σχήμα 2.2.1.1 Χημική δομή βενζοϊκού οξέος (Πηγή Leopoldini et al, 2011)

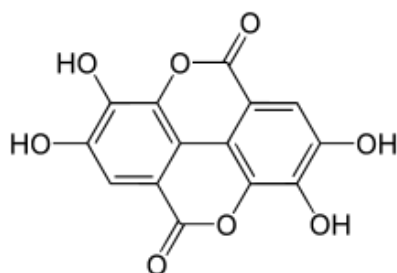


Υδροξυκινναμωμικά οξέα	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Π-κουμαρικό οξύ	H	H
Καφεϊκό οξύ	OH	H
Φερουλικό οξύ	OCH <sub>3</sub>	H
Σιναπικό οξύ	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

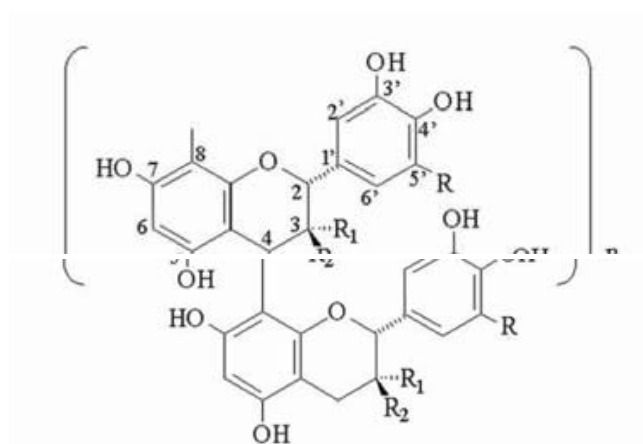
Σχήμα 2.2.1.2 Χημική δομή υδροξυκινναμωμικών οξέων(Πηγή Leopoldini et al, 2011)



Σχήμα 2.2.1.3 Χημική δομή κατεχίνης(Πηγή Leopoldini et al, 2011)



Σχήμα 2.2.1.4 Χημική δομή ελλαγικού οξέος(Πηγή Leopoldini et al, 2011)



Σχήμα 2.2.1.5 Χημική δομή προανθοκυανίνων(Πηγή Leopoldini et al, 2011)

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στα κούμαρα, σύμφωνα με τους παραπάνω συγγραφείς, και στην Πορτογαλία οι τρεις κυριότερες κατηγορίες που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι φλαβαν-3-όλες με 60,93mg/100g, ακολουθούσαν

οι ανθοκυανίνες με ποσοστό 13,77mg/100g και τέλος οι φλαβονόλες με όχι και τόση μεγάλη διαφορά από τις ανθοκυανίνες με ποσοστό 10,86mg/100g.(Miguel et al, 2014)

Με βάση μια άλλη έρευνα των Ayaz et al., είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η συνολική περιεκτικότητα των φαινολών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το στάδιο ωριμότητας του καρπού. Έτσι στα άγουρα φρούτα οι φαινόλες έφταναν στο  $25 \pm 2,5 \text{mg}/100\text{g}$  εκχυλίσματος και τα ώριμα φρούτα ποσοστιαία ήταν κοντά με τα άγουρα με ποσοστό  $26,8 \pm 2,4 \text{mg}/100\text{g}$  εκχυλίσματος. Η μεγάλη διαφορά παρατηρήθηκε στο ενδιάμεσο στάδιο ωρίμανσης όπου η συγκέντρωση των φαινολών εκτοξεύτηκε στο  $48,3 \pm 4,5 \text{mg}/100\text{g}$ . Καθαρή εικόνα υπήρξε και στα φρούτα όπου τα άγουρα είχαν ποσοστό 6,3mg/g ξηρού καρπού, 12,13mg/g ξηρού καρπού στο ώριμο στάδιο και 213mg/g ξηρού καρπού στο ενδιάμεσο στάδιο.(Ayaz et al, 2000)

Τα φαινολικά οξέα που προσδιορίστηκαν στα κούμαρα ήταν το γαλλικό οξύ και εφτά παράγωγά του ( $10,7 \pm 0,04 \text{mg}/\text{g}$  ξηρού καρπού), το πρωτοκατεχοϊκό ( $0,6 \pm 0,03 \text{mg}/\text{g}$  ξηρού καρπού) το γεντισικό ( $1,9 \pm 0,11 \text{mg}/\text{g}$  ξηρού καρπού), το ρ-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλλικό και το μ-ανισικό οξύ.

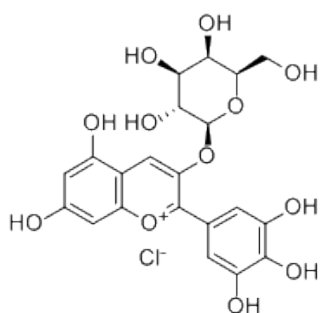
Όσον αναφορά το ελλαγικό οξύ, αυτό βρίσκεται κυρίως στα φυτά με τη μορφή ελλαγιταννίνης, η οποία αποτελείται από ελλαγικό οξύ δεσμευμένο με ένα μόριο σακχάρου. Το ελλαγικό οξύ αποτελεί το κύριο συστατικό αρκετών φυτών που φέρουν ταννίνες, που παράγουν γαλλοταννίνες (γνωστή κατηγορία ταννινών που μαζί με άλλες φαινολικές ενώσεις πιθανότατα να συμβάλουν στη χαρακτηριστική πικρή γεύση των φρούτων) οι οποίες όταν υδρολύονται, διασπώνται σε ελλαγικό και γαλλικό οξύ. Τέλος πιστεύεται ότι το ελλαγικό οξύ έχει αντιοξειδωτικές ικανότητες και προστατεύει από τους ιούς, από τον καρκίνο του παχέος εντέρου, τους πνεύμονες και τον οισοφάγο. (Miguel et al, 2014; Kylli, 2011; Pallauf et al, 2008 )

Επίσης ακόμα μία ομάδες φαινολών, είναι οι ανθοκυανίνες που ανήκουν στα φλαβονοειδή και ταυτοποιήθηκαν στα κούμαρα, αυξάνονται από άγουρο σε ώριμο κατά μεγάλο βαθμό. Στα άγουρα φρούτα υπολογίζεται  $0,25 \pm 0,02 \text{mg}/\text{g}$  ξηρού καρπού, ενώ στα ώριμα τετραπλασιάζεται το ποσοστό φτάνοντας το

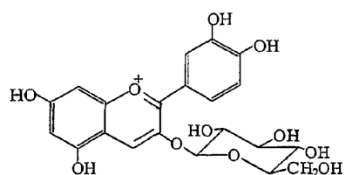
1,01±0,01mg/g ξηρού καρπού. Βρέθηκαν τέσσερις διαφορετικές ανθοκυανίνες οι οποίες είναι:

- ✓ Η δελφιδίνη-3-γαλακτοσίδη
- ✓ Η κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη
- ✓ Η κυανιδίνη-3-αραβινοσίδη και
- ✓ Η κυανιδίνη-3-γαλακτοσίδη

Γενικά οι ανθοκυανίνες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και λέγεται ότι η ανθοκυανίνη και η κυανιδίνη έχουν προσδιοριστεί ως το κύριο αίτιο για το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του καρπού. Τέλος οι φλαβονόλες που βρέθηκαν ήταν η κερσετίνη και η καμπεφερόλη. (Miguel et al, 2014; Oliveira et al, 2011)

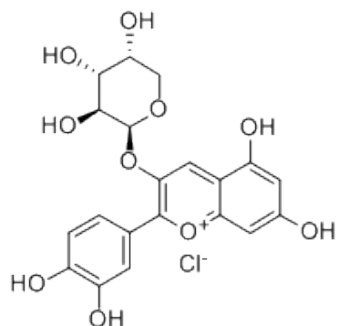


Σχήμα 2.2.1.6 Χημική δομή δελφιδίνη-3-γαλακτοσίδης(Πηγή Oliveira et al, 2011)

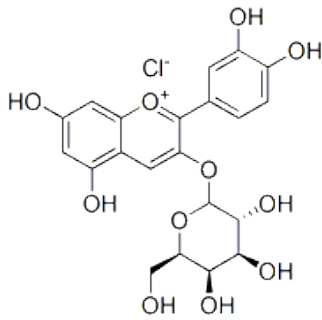


cyanidin-3-glucoside

Σχήμα 2.2.1.7 Χημική δομή κυανιδίνη-3-γλυκοσίδης(Πηγή Oliveira et al, 2011)



Σχήμα 2.2.1.8 Χημική δομή κυανιδίνη-3-αραβινοσίδης(Πηγή Oliveira et al, 2011)



Σχήμα 2.2.1.9 Χημική δομή κυανιδίνη-3-γαλακτοσίδης(Πηγή Oliveira et al, 2011)

## 2.2.2 ΟΞΕΑ

Στη σύσταση των κούμαρων συγκαταλέγονται τα λιπαρά καθώς και κάποια οργανικά οξέα. Τα οξέα αυτά επηρεάζουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κούμαρων.(Ayaz et al, 2000)

### ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Σύμφωνα με τους Miguel G. et al., τα κούμαρα από την περιοχή Caceres της Ισπανίας, την κεντρική και δυτική Ισπανία, καθώς και την Κροατία, μετά από τις απαιτούμενες αναλύσεις παρουσίασαν ύπαρξη λιπαρών οξέων. Και στις τρεις περιπτώσεις, με μικρές διαφορές στα ποσοστά, τα κύρια λιπαρά οξέα ήταν το α-λινολενικό, το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ. Φυσικά συνολικά δεν ήταν μόνο αυτά αλλά ταυτοποιήθηκαν είκοσι (20) λιπαρά οξέα. Όμως όλα τα άλλα, εκτός από τα παραπάνω, εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του 1%. Τα ίδια κύρια λιπαρά οξέα αναφέρεται ότι βρίσκονται και σε άλλων ειδών μούρα όπως είναι το μύρτιλλο, το κράνμπερι, η φράουλα, η μαύρη σταφίδα κ.α. Επίσης σε γενικές γραμμές τα ποσοστά λιπαρών οξέων δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης που βρίσκονται.

### Πίνακας 2.2.2.1 Ποσοστά ακόρεστων λιπαρών οξέων (%)

Ποσοστά κύριων ακόρεστων λιπαρών οξέων (%)			
	Α-λινολενικό	Λινελαϊκό	Ελαϊκό
Caceres Ισπανία	36,51	21,5	21,01
Κεντρική και δυτική Ισπανία	31,26	24,2	24,82
Κροατία	34,8	31,3	14,9
1	43,1	18,8	26,8

(Πηγή Miguel et al, 2014)

Το κυρίαρχο κορεσμένο λιπαρό οξύ που μετρήθηκε σε όλες τις παραπάνω περιοχές ήταν το παλμιτικό οξύ του οποίου τα ποσοστά διέφεραν από περιοχή σε περιοχή (8,2% στην Ισπανία κ' 19% στην Κροατία).(Miguel et al, 2014; Pallauf et al, 2008 )

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (**PUFA**) αποτελούν το κύριο κλάσμα των λιπαρών οξέων στα κούμαρα και αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 52% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Μια σημαντική πληροφορία που πρέπει να σημειωθεί είναι πως παρουσιάστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις έρευνας, ευνοϊκές αναλογίες ω3 και ω6 λιπαρών, λόγω της πλούσιας παρουσίας του α-λινολενικού οξέος.

Μια ακόμα σημαντική κατηγορία των λιπαρών οξέων όπως είναι τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (**MUFA**) δεν θα μπορούσε να απουσιάζει. Τα ποσοστά τους δεν δείχνουν να εξαρτώνται από το στάδιο ωριμότητας του φρούτου καθώς δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις, με ποσοστά 27% στο ώριμο στάδιο και 33,5% στο άγουρο.

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (**SFA**) παρουσιάστηκαν σε χαμηλά ποσοστά και δεν έδειξαν να επηρεάζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παραμένοντας σχεδόν σταθερά.

Σε σύγκριση με άλλα μούρα, τα φρούτα του δένδρου φράουλας, παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά. Έχοντας τα SFA σε χαμηλή περιεκτικότητα και τα PUFA με κύριο εκπρόσωπο το α-λινολενικό οξύ. Μούρα όπως το μύρτιλλο, η φράουλα, το κράνμπερι κ.α. παρουσιάζουν επίσης, όπως το κούμαρο, στους

σπόρους τους υψηλά ποσοστά MUFA και PUFA κυρίως ω3 και ω6 λιπαρά.(Oliveira et al, 2011)

Πίνακας 2.2.2.2 Ποσοστά ακόρεστων λιπαρών οξέων (%)

Ποσοστά ακόρεστων λιπαρών οξέων (%)			
	A-λινολενικό	Λινελαϊκό	Ελαϊκό
Άγουρο στάδιο	36,9	20,14	29,4
Ωριμο στάδιο	43,1	18,8	26,8

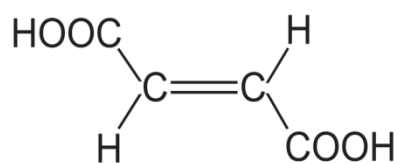
(Πηγή Oliveira et al, 2011)

## ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα οργανικά οξέα στα κούμαρα και γενικότερα στα μούρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της ποιότητας των φρούτων όσο και στη διατροφική αξία.(Ayaz et al, 2000)

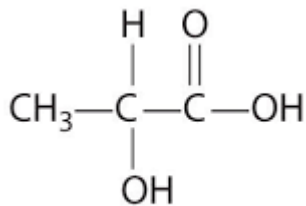
Η έρευνα των Miguel G. et al., ταυτοποίησε τα εξής οργανικά οξέα στα κούμαρα της Σαμψούντας της Τουρκίας (μαζί με τις χημικές δομές τους):

- **Φουμαρικό οξύ** (1,49 mg/g)



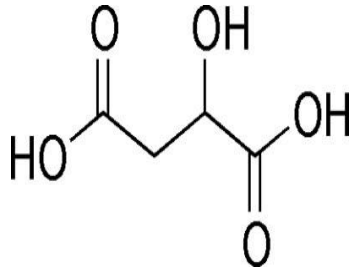


- Γαλακτικό οξύ (0,49 mg/g)

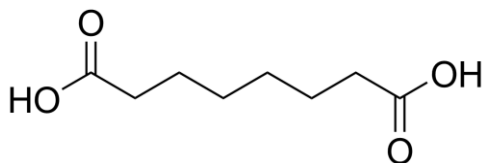


Lactic acid

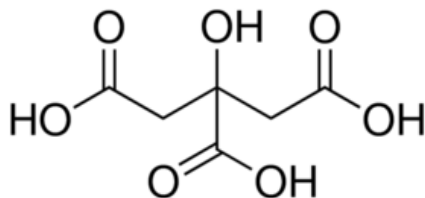
- Μηλικό οξύ (0,84 mg/g)



- Σουβερικό οξύ (0,23 mg/g) &



- Κιτρικό οξύ (0,01 mg/g)



Τα ίδια οργανικά οξέα ταυτοποιήθηκαν κι από τους Pallauf et al,2008. Στην Ισπανία εκτός από τα παραπάνω οξέα βρέθηκε και οξαλικό οξύ σε ποσοστό 95,53 mg/100g, ενώ το φουμαρικό οξύ σχεδόν το μισό σε ποσοστό 0,73 mg/100g. Επίσης δεν παρατηρήθηκε ποσοστιαία διαφορά όταν δείγμα λήφθηκε από δυο περιοχές, από τρεις διαφορετικές χρονιές, με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.(Pallauf et al, 2008)

### 2.2.3 ΣΑΚΧΑΡΑ

Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα επηρεάζει αισθητά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κούμαρων. Τα σάκχαρα σε αυτά τα φρούτα αυξάνονται ανάλογα με την ωρίμανση του φρούτου. Όσο προχωράει το επίπεδο ωρίμανσης, σταδιακά αυξάνονται και τα σάκχαρα. Ενδεικτικά περιέχουν 14% του ξηρού βάρους τα άγουρα και 43-52% τα ώριμα. Η διαφορά αντιλαμβανόμαστε πως είναι αισθητή. (Pallauf et al, 2008; Oliveira et al, 2011)

Όταν ο καρπός είναι άγουρος το κυριότερο σάκχαρο με το υψηλότερο ποσοστό είναι η σακχαρόζη, αλλά καθώς ο καρπός ωριμάζει η φρουκτόζη αντικαθιστά την σακχαρόζη και γίνεται το σημαντικότερο και με το πιο υψηλό ποσοστό σάκχαρο. Ακόμα, η ταυτοποίηση των σακχάρων βοήθησε στην διαλεύκανση των διάφορων χρωστικών που υπάρχουν στο κούμαρο.

Τα κυρίαρχα σάκχαρα που βρέθηκαν στα κούμαρα από τρεις διαφορετικές περιοχές της Τουρκίας ήταν:

- Η **φρουκτόζη** (27,8%)
- Η **γλυκόζη** (21,5%)
- Η **σακχαρόζη** (1,8%) και
- Η **μαλτόζη** (1,1%)

Σε τρεις περιοχές της Πορτογαλίας τα σάκχαρα με τις υψηλότερες περιεκτικότητες ήταν η φρουκτόζη με ποσοστό 24,21%, ακολουθούσε η γλυκόζη με 12,14% και τέλος η σακχαρόζη με μόλις 4,2%.

Γενικά δεν επηρεάζεται μόνο η φρουκτόζη κατά την ωρίμανση αλλά και η γλυκόζη.

Ακολουθεί ενδεικτικός πίνακας με τα ποσοστά (%) της γλυκόζης και της φρουκτόζης. (Miguel et al, 2014; Oliveira et al, 2011)

### Πίνακας 2.2.3.1 Ποσοστά γλυκόζης και φρουκτόζης (%)

	Γλυκόζη (%)	Φρουκτόζη (%)
Κεντρική Ισπανία	12,5	20,8
Δυτική Ισπανία	6,5	12,69
Κροατία	5,27	12,64
Τουρκία	21,5	27,8
Πορτογαλία	12,14	24,21

(Πηγή Miguel et al, 2014)



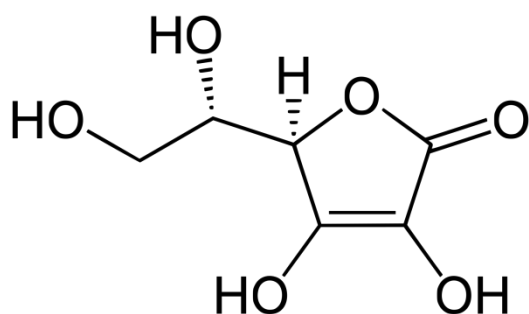
Εικόνα 2.2.3.1 α) άγουρο στάδιο β) ενδιάμεσο στάδιο γ) ώριμο στάδιο

### 2.2.4 BITAMINES

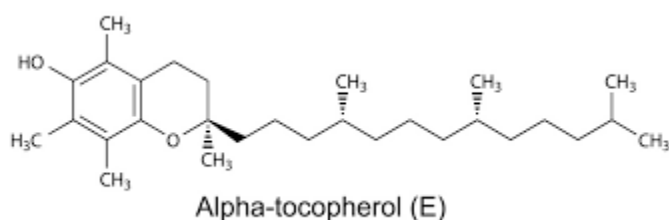
Οι βιταμίνες που περιέχουν τα κούμαρα είναι η **E** και η **C** (ή αλλιώς ασκορβικό οξύ). Καθοριστικής σημασίας και για τις δυο βιταμίνες αποτελεί η ημερομηνία συγκομιδής των φρούτων.

Κούμαρα της βορειοανατολικής Πορτογαλίας που αναλύθηκαν περιείχαν βιταμίνη E με πιο σημαντικό συστατικό την γ-τοκοφερόλη. Ωστόσο, η ανώτατη ποσότητα της βιταμίνης βρέθηκε σε άγουρα φρούτα, η οποία μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.

Η βιταμίνη C βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης με ποσοστό μόλις 150-280mg/100g νωπού βάρους. Όμως τα ποσοστά της είναι συγκρίσιμα με ποσοστά άλλων φρούτων όπως είναι τα μήλα, τα ροδάκινα και τα δαμάσκηνα. (Ayaz et al, 2000; Pallauf et al, 2008)



Σχήμα 2.2.4.1 Βιταμίνη C (Πηγή Dehmolaei et al, 2013)



Σχήμα 2.2.4.2 Βιταμίνη E (Πηγή Padayatty et al, 2003)

## 2.2.5 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η ανάλυση των κούμαρων από τους Miguel et al., απέδειξε ύπαρξη πτητικών συστατικών. Στα πορτογαλικά δείγματα ταυτοποιήθηκαν σαράντα μία (41) ενώσεις. Οι αλκοόλες αποδείχθηκαν οι κύριες πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν και στα τρία στάδια ωρίμανσης και ακολουθούν οι αλδεΐδες και οι εστέρες.

Οι υπόλοιπες χημικές τάξεις που βρέθηκαν μετά από τις αναλύσεις ήταν νορισοπρενοειδή παράγωγα, σερκιτερπένια και μονοτερπένια σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Γενικά οι πτητικές ουσίες στην πορεία της ωρίμανσης μειώνονται.

Τέλος αιθέριο έλαιο συλλέχθηκε από δείγματα της Βορειοανατολικής Τουρκίας και είχε ως συστατικά δεκαεξανοϊκό οξύ, δωδεκανοϊκό αιθυλεστέρα, λινελαϊκό αιθυλεστέρα και δεκατετρανοϊκό οξύ. (Miguel et al, 2014)

## 2.2.6 ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία που βρίσκονται στα κούμαρα μεταβάλλονται ανά χρονιά, ανά περιοχή και φυσικά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Όμως αυτό δεν τα εμποδίζει από το να αποτελούν μια καλή πηγή ανόργανων συστατικών.

Ενδεικτικά σε κάποια τούρκικα δείγματα βρέθηκαν τα παρακάτω μέταλλα και ιχνοστοιχεία:

- Κάλιο (**K**) με ποσοστό 14909 mg/kg
- Ασβέστιο (**Ca**) με ποσοστό 4959 mg/kg
- Φώσφορο (**P**) με ποσοστό 3669 mg/kg
- Μαγνήσιο (**Mg**) με ποσοστό 1316 mg/kg
- Νάτριο (**Na**) με ποσοστό 701 mg/kg

Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν τα: Κάδμιο(**Cd**), Χαλκός (**Cu**), Λίθιο (**Li**), Μαγγάνιο (**Mn**), Μόλυβδος (**Pb**) και Στρόντιο (**Sr**).

Σύμφωνα με τους συγγραφείς η περιεκτικότητα του Καλίου, του Μαγνησίου, του Χαλκού και του Μαγγανίου επηρεάστηκε σημαντικά από το έτος συγκομιδής.

Τέλος σε δείγματα της Κροατίας, της Πορτογαλίας και της Ισπανίας ταυτοποιήθηκαν και ποσότητες σιδήρου (Fe) και ψευδαργύρου (Zn) που δεν βρέθηκαν στα δείγματα της Τουρκίας.(Miguel et al, 2014)

## 2.2.7 ΦΥΛΛΑ/ ΚΟΤΣΑΝΙ/ ΡΙΖΕΣ/ ΣΠΟΡΟΙ

Είναι πολύ φυσικό το ότι εκτός από τα φρούτα της κουμαριάς και τα υπόλοιπα τμήματα του φυτού παρουσιάζουν ενδιαφέρον, διότι αρκετά συστατικά εμπεριέχονται στα φύλλα, στο κοτσάνι, στις ρίζες, στους σπόρους και γενικότερα σε ολόκληρο το δένδρο της φράουλας.

Τα φύλλα της κουμαριάς είναι γνωστά για τις αντισηπτικές, διουρητικές και καθαρτικές τους ικανότητες. Στα φύλλα λοιπόν περιέχονται αρκετά ενδιαφέροντα συστατικά. Ένα από αυτά είναι οι ταννίνες (ελλαγιταννίνες και

γαλλοτανίνες) των οποίων τα ποσοστά τους κυμαίνονται μεταξύ 36-37% του νωπού βάρους. Ακόμα περιέχουν α-τοκοφερόλη, κερσετίνη, ισοκερσετίνη, φλαβανόλες, φλαβονόλες, υπεροσίδη και χλωρογενικό οξύ. Όμως οι συγκεντρώσεις τους μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου. Αξιοσημείωτο είναι ότι μερικές από τις παραπάνω ενώσεις βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φύλλα παρά στα φρούτα.

Στο κοτσάνι βρέθηκε κατεχίνη και επικατεχίνη, μονομερή που αποτελούν τις προανθοκυανιδίνες και ανήκουν στην ομάδα των φλαβονοειδών. Μερικές από τις ενώσεις που βρέθηκαν στις ρίζες ήταν επίσης η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το βενζοϊκό οξύ. Οι σπόροι περιείχαν χαμηλά κορεσμένα λιπαρά οξέα, υψηλή συγκέντρωση σε ελαϊκό οξύ και ω6 και ω3 ακόρεστα λιπαρά οξέα. (Miguel et al, 2014)

## **2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΟΥΜΑΡΟΥ**

### **2.3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Παραπάνω αναφέρθηκαν ενδεικτικά κάποια ποσοστά και συγκεντρώσεις διάφορων ομάδων που περιέχονται και ταυτοποιήθηκαν στα κούμαρα. Όμως δεν αναφέρθηκε πως οι συγκεντρώσεις αυτές και η ποσοτικοποίηση τους εξαρτώνται και φυσικά μεταβάλλονται από τον τρόπο ή τους τρόπους που θα διαχειριστείς το φρούτο.

Η προετοιμασία του δείγματος λοιπόν, από το φυτό στο εργαστήριο, είναι αρκετά σημαντική. Συνήθως τα δείγματα αντιμετωπίζονται με άλεση και ομογενοποίηση, η οποία προηγείται της ξήρανσης. Η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους, οι οποίοι είναι ξήρανση υπό αέρα και ξήρανση με ψύξη. Σε γενικές γραμμές η ξήρανση με ψύξη διατηρεί υψηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών σε δείγματα φυτών σε σχέση με εκείνα που έχουν ξηρανθεί με αέρα. Ωστόσο, οι διεργασίες ξήρανσης, συμπεριλαμβανομένης και της ξήρανσης με ψύξη, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες επιδράσεις στα χαρακτηριστικά των φρούτων. (Dai et al, 2010)

### 2.3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Ο τρόπος της εκχύλισης αποτελεί επίσης έναν πολύ σημαντικό και βασικό παράγοντα που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα, καθώς κάποιες μέθοδοι είναι αποτελεσματικότεροι από άλλους. Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι είναι:

- a) Ο τύπος των διαλυτών με ποικίλες πολικότητες,
- b) Ο χρόνος εκχύλισης,
- c) Η θερμοκρασία
- d) Η αναλογία δείγματος προς διαλύτη
- e) Η χημική σύνθεση του δείγματος
- f) Τα φυσικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Ένας άλλος σημαντικός λόγος που ο τρόπος εκχύλισης είναι βασικός, είναι το ότι επειδή τα φυτικά υλικά περιέχουν φαινολικές ομάδες από απλές έως και πολύ σύνθετες, αλλά και το ότι μπορούν να συνδέονται και με άλλα συστατικά (πχ υδατάνθρακες και πρωτεΐνες), δεν υπάρχει διαδικασία καθολικής εξόρυξης κατάλληλη για την εκχύλιση όλων των φαινολικών συστατικών. Έτσι λοιπόν ανάλογα με το τι θέλουμε να εκχυλίσουμε χρησιμοποιούμε διαφορετική μέθοδο και συνεπώς διαφορετικό διαλύτη και διαφορετικές συνθήκες, αναλόγως με το τι δρα αποτελεσματικότερα με κάθε συστατικό.

Οι διαλύτες όπως είναι η μεθανόλη, η ακετόνη, η αιθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας καθώς και οι συνδυασμοί τους, χρησιμοποιούνται ευρέως για εκχυλίσεις από φυτικά υλικά, συχνά με διαφορετικές αναλογίες νερού. Η επιλογή του διαλύτη λοιπόν επηρεάζεται από το ποσό και το ποσοστό των πολυφαινολών που εξάγονται. Ενδεικτικά:

- Η μεθανόλη είναι αποτελεσματικότερη σε εκχυλίσεις πολυφαινολών με χαμηλό μοριακό βάρος, ενώ οι υψηλότερου μοριακού βάρους εκχυλίζονται αποτελεσματικότερα με υδατικό διάλυμα ακετόνης.
- Για εκχύλιση ανθοκυανίνων από φυτικά δείγματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά συνήθως χρησιμοποιείται μεθανόλη ή ακετόνη.

- Μίγμα ακετόνης νερού, έχει αποδειχθεί πως έχει τα καλύτερα αποτελέσματα σε εκχυλίσεις υδροξυκιναμικών οξέων, σε σχέση με διαλύτη υδατικής μεθανόλης.
- Ο υδατικός διαλύτης μεθανόλης όμως, είναι αποτελεσματικότερος της υδατικής ακετόνης όταν πρόκειται για εκχύλιση φλαβαν-3-ολών και προκυανιδίων.
- Η αιθανόλη αποτελεί καλό διαλύτη για την εκχύλιση πολυφαινολών και είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Όσον αναφορά τη θερμοκρασία, μία αύξησή της μπορεί να προωθήσει την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των ουσιών, με αύξηση τόσο της διαλυτότητας όσο και του ρυθμού μεταφοράς μάζας. Επιπλέον το ιξώδες και η επιφανειακή τάση των διαλυμάτων μειώθηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία, κάτι που βοηθά τους διαλύτες να είναι αποτελεσματικότεροι και να αυξάνουν το ποσοστό εξαγωγής. Ωστόσο, πολλές φαινόλες υδρολύονται εύκολα και οξειδώνονται.

Οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης και οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν ν' αυξήσουν την πιθανότητα οξείδωσης των φαινολών, γεγονός που θα έχει ως αποτέλεσμα φυσικά την μείωση της απόδοσης των εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες εκχυλίζονται μεταξύ 20-50°C επειδή η παραπάνω θερμοκρασία προκαλεί ταχεία υποβάθμιση αυτών.

Γενικά η εκχύλιση των φαινολών, και όχι μόνο, μπορεί να επηρεάζεται κι από άλλους παράγοντες εκτός αυτών που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπως είναι για παράδειγμα η αναλογία διαλύτη στερεού και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος. Γι αυτό το λόγο γίνονται δοκιμαστικές εκχυλίσεις έτσι ώστε να βρεθεί η ιδανικότερη μέθοδος που θα δίνει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα για κάθε περίπτωση. (Dai et al, 2010; Fortalezas et al, 2010)

Στη δικιά μας περίπτωση, για το κούμαρο, σύμφωνα με τους Oliveira et al., μετά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν οι συνθήκες που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα είναι όταν μια λεπτή ξηρή σκόνη του δείγματος των κούμαρων (1,5g) εκχυλίζεται χρησιμοποιώντας 25ml 96% αιθανόλη για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για ένα σωστότερο αποτέλεσμα οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται εις τριπλούν, ακολουθεί διήθηση μέσω διηθητικού χαρτιού



και εξάτμιση υπό κενό στους 40°C. Όλα τα εκχυλίσματα επαναδιαλύονται σε νερό, με μια τελική συγκέντρωση 50mg/ml.

### 2.3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΩΝ

Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται όσον αναφορά τις φαινόλες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Σ' αυτές που μετράνε τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά, καθώς και σε αυτές που μετράνε μια συγκεκριμένη ομάδα ή κατηγορία των φαινολικών ενώσεων.

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Λόγω της ετερογένειας των φυσικών φαινολών αλλά και λόγω πιθανής παρεμβολής από άλλες εύκολα οξειδωμένες ουσίες, είναι αναμενόμενο το γεγονός ότι αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών, δυστυχώς όμως καμία από αυτές δεν είναι τέλεια. Μεταξύ αυτών των μεθόδων είναι η μέθοδος Folin-Denis (FD), η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C), η τιτλοδότηση με υπερμαγγανικό, η χρωματομετρία με άλατα σιδήρου και η απορρόφηση υπεριώδους. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερη η **Folin-Ciocalteu** (F-C), σε σύγκριση με τις άλλες.

Το αντίστοιχο αντιδραστήριο είναι μείγμα από φωσφοροβολφραμικό ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) και φωσφορομολυβδενικό οξύ ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Η μέθοδος αυτή λοιπόν, βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου, σε αλκαλικό περιβάλλον, από τις φαινολικές ενώσεις σε σύμπλοκα φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος, έτσι ώστε να σχηματίσουν μπλε σύμπλοκα που καθορίζονται φασματοσκοπικά περίπου στα 760nm. Μειονεκτεί όμως επειδή είναι πολύ γενική μέθοδος μετράει και άλλα υποστρώματα οξείδωσης εκτός των ολικών φαινολών, με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η μέτρηση.

Παρόλα αυτά όμως, η δοκιμασία F-C αποτελεί μια γρήγορη, απλή και αποτελεσματική μέθοδο και χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών.(Dai et al, 2010; Τσακίρης, 2014)

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ

Οι ανθοκυανίνες, όπως έχει προαναφερθεί, αποτελούν μια από τις έξι υποομάδες των φλαβονοειδών και είναι υπεύθυνες για τα διάφορα χρώματα των φυτών. Αυτή η ομάδα φαινολικών ενώσεων εκχυλίζεται με όξινη υδατική μεθανόλη 80%. Προστίθεται συνήθως μικρή ποσότητα οξέος (TFA, οξικό ή μυρμηκικό οξύ) με σκοπό να επιτευχθεί σταθεροποίηση των ανθοκυανίνων. Για περαιτέρω καθαρισμό, στο εκχύλισμα εφαρμόζεται σε μία στήλη Amberlite XAD-7, όπου σάκχαρα, φαινολικά και οργανικά οξέα ξεπλένονται με όξινο νερό. Το υπόλοιπο φαινολικό κλάσμα εκλούεται με μεθανόλη.

Μετά την εκχύλιση, η απλούστερη δοκιμασία για τον υπολογισμό και προσδιορισμό των ανθοκυανίνων, βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος μεταξύ 490-550nm, όπου όλες οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μέγιστο. Αυτή η ζώνη είναι μακριά από τις ζώνες απορρόφησης των άλλων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν φασματικά μέγιστα στην περιοχή UV. Σ' αυτή τη μέθοδο η απορρόφηση του δείγματος μετράται σε pH=1 (ανθοκυανίνες ως έγχρωμα άλατα οξυγόνου), καθώς και σε pH=4,5 (ανθοκυανίνες ως άχρωμες ημικετάλες).

Η απορρόφηση υπολογίζεται ως εξής:

$$A = (A_{\text{vismax}} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{\text{vismax}} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$$

Η συγκέντρωση των ανθοκυανίνων στη συνέχεια υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Lambert-Beer χρησιμοποιώντας την μοριακή απορρόφηση ( $\epsilon$ ) της κυανιδίνης-3-γλυκοζίτης. (Kylli, 2011; Riihinen, 2005; Lohachoompol et al, 2004)

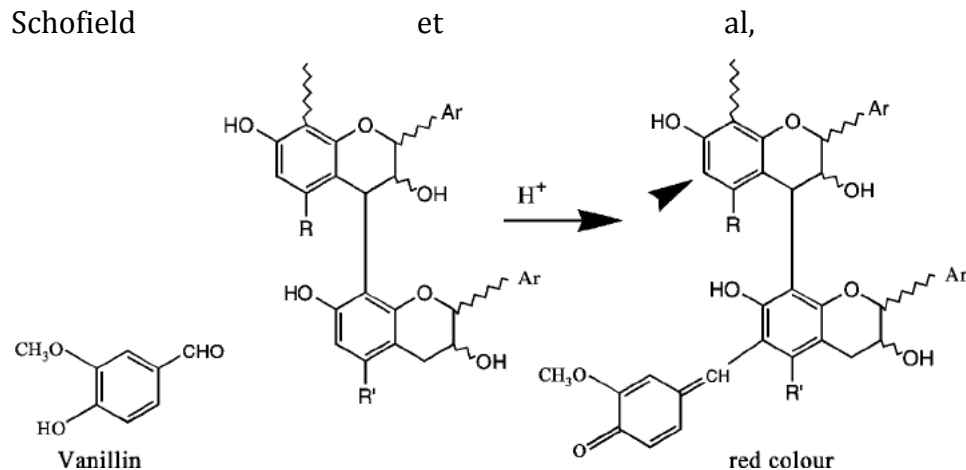
## ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΡΟΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ

Η συγκέντρωση των προανθοκυανίνων σε ένα φαινολικό εκχύλισμα μπορεί να προσδιορισθεί με αρκετούς τρόπους. Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν με τη χρήση του αντιδραστηρίου 4-διμεθυλαμινοκινναμωμική αλδεϋδη ή πιο σύντομα **DMAC**. Η αντίδραση αυτή έχει μέγιστο μήκος κύματος στα 640nm εξαλείφοντας έτσι την παρεμβολή ανθοκυανίνων.

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι μονομερείς φλαβαν-3-όλες έχουν πιο έντονη αντίδραση με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο σε σχέση με ολιγομερείς και πολυμερείς ανθοκυανίνες. (Kylli, 2011)

Για τον προσδιορισμό των προανθοκυανίνων υπάρχει κι άλλη μια μέθοδος, η **μέθοδος της βανιλίνης**. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση της βανιλίνης με συμπυκνωμένες ταννίνες, επομένως και προανθοκυανίνες, και τη δημιουργία έγχρωμων συμπλόκων. Η επιτυχία της μεθόδου βασίζεται στο είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται, στην φύση και τη συγκέντρωση του οξέος (συνήθως ως καλύτερος καταλύτης λειτουργεί το θειικό οξύ), στον χρόνο της αντίδρασης, στη θερμοκρασία, στη συγκέντρωση της βανιλίνης καθώς και στον τύπο των σημείων αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν. (Sun et al, 1998; Schofield et al, 2001)

Η μέθοδος της βανιλίνης χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα λόγω της ευαισθησίας της, της απλότητας της κι επειδή είναι αρκετά συγκεκριμένη σε ένα στενό εύρος φλαβανολών(μονομερών και πολυμερών) και διυδροχαλκόνων (έχουν απλό δεσμό στη 2 ή 3 θέση και ελεύθερη υδροξυλομάδα επί του δακτυλίου Β). Για πολλά χρόνια η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ευρέως σαν πρότυπο χρωματομετρικής μεθόδου για τις φλαβανόλες. Ωστόσο, παρουσιάζει έλλειψη επαναληψιμότητας και για αυτό το λόγο έχει αντικατασταθεί από άλλες μεθόδους όπως με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. (Sun et al, 1998; Schofield et al, 2001)



**Σχήμα 2.3.3.1** Απεικονίζεται η δοκιμασία της βανιλίνης για συμπυκνωμένες ταννίνες. Το βέλος δείχνει μια δεύτερη θέση της αντίδρασης. (Πηγή Schofield et al, 2001)

## ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ

Η εκχύλιση των φλαβονολών από διάφορα φυτικά υλικά έχει πραγματοποιηθεί και με αλκοολικούς αλλά και με οργανικούς διαλύτες. Η αιθανόλη και η μεθανόλη έχουν αποδειχθεί ότι είναι οι αποτελεσματικότεροι διαλύτες για την εκχύλιση φλαβονολών. Για την ανάλυση των φλαβονολών ως αγλυκόνες, θα πρέπει να υδρολυθούν. Εκτελείται λοιπόν υδρόλυση σε 50% υδατική μεθανόλη που περιείχε 1,2 M HCl και τριτ-βουτυλοϋδροκινόνη ως αντιοξειδωτικό με θέρμανση στους 85°C για 2 ώρες. Η υδρόλυση έχει χρησιμοποιηθεί για να απλοποιηθεί η χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων, όπως είναι οι φλαβονόλες. (Riihinen, 2005)

## ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Για την αφαίρεση σακχάρων και οργανικών οξέων από φαινολικά εκχυλίσματα χρησιμοποιείται η τεχνική της εκχυλίσσης στερεής φάσης (**solid phase extraction**) SPE. Το μειονέκτημά του ωστόσο είναι ότι οι φλαβαν-3-όλες και οι προανθοκυανίνες μπορεί να δεσμεύονται με το προσροφητικό υλικό.

Η προσροφητική ρητίνη “amberlite XAD-7” μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην απομόνωση των σακχάρων και οργανικών οξέων, πριν τον διαχωρισμό των ελλαγιταννίνων και των ανθοκυανίνων από τις άλλες φαινολικές ενώσεις. (Kylli, 2011)

## 2.3.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Σε γενικές γραμμές, οι παραδοσιακές και ευρέως διαδεδομένες φασματοφωτομετρικές δοκιμασίες, παρέχουν απλές και γρήγορες μεθόδους ποσοτικοποίησης και ανάλυσης των φαινολικών ενώσεων από εκχυλίσματα φυτικών δειγμάτων. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας των φαινολικών ενώσεων, καθώς και λόγω της διαφορετικής δραστηριότητάς τους στα διάφορα

αντιδραστήρια, χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα ιδιαίτερα ευαίσθητων μεθόδων που οδηγεί σε διαφορετικά και συχνά μη συγκρίσιμα αποτελέσματα. Αυτές οι μέθοδοι είναι οι σύγχρονες τεχνικές χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.(Dai et al, 2010)

## **ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ**

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πτητικών ενώσεων και βασίζεται στην κατανομή των συστατικών ενός πτητικού δείγματος ανάμεσα σε ένα μη πτητικό διαλύτη (στατική φάση) και ένα αέριο (κινητή φάση ή φέρον αέριο). Πρόκειται για μια ταχεία μέθοδο και απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα δείγματος (μόλις μερικά  $\mu\text{g}$ ). Η αέρια χρωματογραφία διακρίνεται σε δυο κατηγορίες οι οποίες είναι η χρωματογραφία αερίου-υγρού (**Gas-Liquid Chromatography, GLC**) και η χρωματογραφία αερίου-στερεού(**Gas-Solid Chromatography, GSC**) οι οποίες διαφέρουν ως προς την στατική φάση.

Οι τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ειδικά για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών. Η κύρια ανησυχία αυτής της τεχνικής είναι η χαμηλή μεταβλητότητα των φαινολικών ενώσεων. Πριν την χρωματογραφία οι φαινολικές ενώσεις συνήθως μετατρέπονται σε περισσότερο πτητικά παράγωγα μέσω της μεθυλίωσης καθώς και μέσω άλλων τεχνικών.(Αρβανιτογιάννης et al, 2008; Dai et al, 2010)

## **ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η σημαντικότερη εξέλιξη στην τεχνική της χρωματογραφικής ανάλυσης. Το κύριο πλεονέκτημα της είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες, γι αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κ.τ.λ., καθώς και ουσίες που δεν μπορούν να εξαερωθούν. Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι υγρό και η στατική φάση είναι επίσης

υγρό που συγκρατείται σε σωματίδια στερεού υλικού πλήρωσης πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης. Η υγρή χρωματογραφία χωρίζεται σε δυο βασικές κατηγορίες, την χρωματογραφία κανονικής φάσης (**Normal Phase Chromatography, NPC**) και την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (**Reverse Phase Chromatography, RPC**). (Αρβανιτογιάννης et al, 2008)

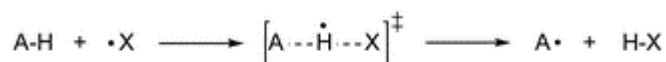
Η HPLC αποτελεί σήμερα την πιο δημοφιλή και αξιόπιστη τεχνική για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων. Είναι σημαντικό το ότι υπάρχουν ποικίλες κινητές φάσεις για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών, για διαφορετικά δείγματα φυτικών εκχυλισμάτων και τροφίμων. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή προσφέρει την ευκαιρία ν' αναλύσει ταυτόχρονα όλα τα στοιχεία των φαινολικών ενώσεων μαζί με τα παράγωγά τους ή τα προϊόντα αποδόμησης.

Με την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPC), παρατηρήθηκε βελτιωμένος διαχωρισμός των διάφορων κατηγοριών των φαινολικών. Επίσης διαπιστώθηκε ότι και η θερμοκρασία της στήλης παίζει σημαντικό ρόλο και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον διαχωρισμό των φαινολών όπως είναι για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες. Γενικά μια σταθερή θερμοκρασία συνιστάται για να υπάρξει επαναληψιμότητα και να αποφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. (Αρβανιτογιάννης et al, 2008; Dai et al, 2010; Hukkanen et al, 2006)

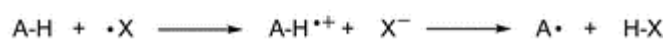
### 2.3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Οι μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, σ αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις **μεταφοράς ατόμου υδρογόνου**, και σ αυτές που βασίζονται σε **αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων**.

(i) "Classical" Hydrogen Atom Transfer (HAT)



(ii) Electron Transfer - Deprotonation



Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η μέθοδος TRAP (**Total Radical-trapping Parameter**), και η μέθοδος ORAC (**Oxygen Radical Absorbance Capacity**). Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι FRAP (**Ferric Reducing Antioxidant Power**), DPPH, TEAC (**Trolox Equivalent Activity**), και CUPRAC (**Cupric Reducing Antioxidant Capacity**). (Prior et al, 2005; Dai et al, 2010)

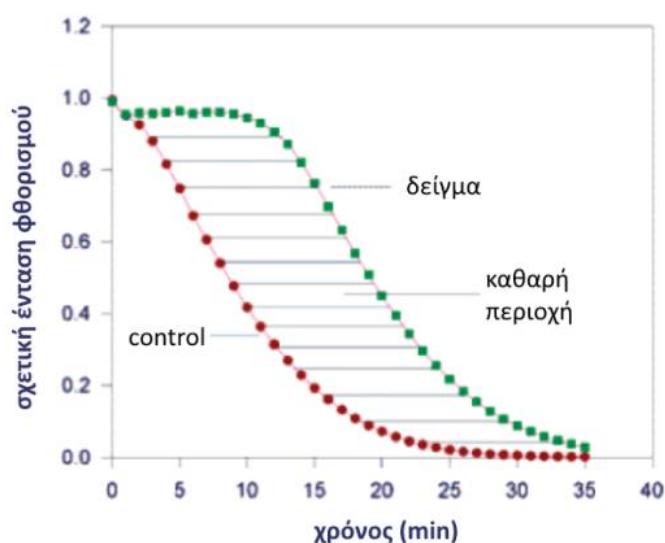
#### ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΤΟΜΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ

Η μέθοδος **ORAC** χρησιμοποιείται συχνά για την μέτρηση της οξειδωτικής καταστροφής της φθορίζουσας ένωσης, fluorescein, με τη βοήθεια του φθορισμόμετρου. Η καταστροφής της προκαλείται από το αντιδραστήριο AAPH (2,2-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride) που λειτουργεί ως γεννήτρια ριζών υπεροξυλίου. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών. Στην βασική αρχή της ORAC μια υπεροξυλική ρίζα αντιδρά με έναν φθορίζοντα ανιχνευτή για να σχηματίσει ένα μη φθορίζον προϊόν, το οποίο μπορεί εύκολα να ποσοτικοποιηθεί με φθορισμό. Η αντιοξειδωτική ικανότητα καθορίζεται από την ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται με την πάροδο του χρόνου. (Prior et al, 2005; Kylli, 2011)

Για ν αποφευχθεί η υποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης και για να υπολογισθούν όλες οι πιθανές επιπτώσεις των δευτερογενών αντιοξειδωτικών προϊόντων, η μέθοδος ακολουθεί την αντίδραση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο

υπολογισμός των αποτελεσμάτων ενός αντιοξειδωτικού γίνεται από τις καθαρές ολοκληρωμένες περιοχές κάτω από τις καμπύλες φθορισμού, δηλαδή από το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.3.3.2.

Γενικά η μέθοδος ORAC θεωρείται ότι μιμείται την αντιοξειδωτική δράση των φαινολών σε βιολογικά συστήματα καλύτερα από άλλες μεθόδους. Ωστόσο, η μέθοδος συχνά απαιτεί τη χρήση δαπανηρού εξοπλισμού και είναι συνήθως μια χρονοβόρα διαδικασία. (Prior et al, 2005; Dai et al, 2010)

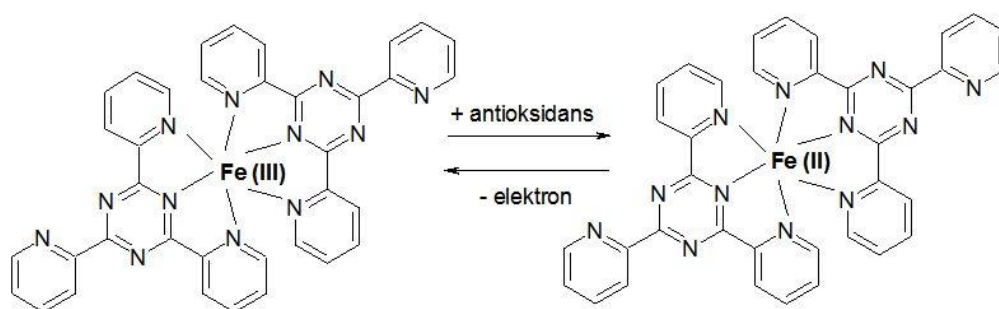


Σχήμα 2.3.3.2 ORAC η αντιοξειδωτική δράση του εξεταζόμενου δείγματος εκφράζεται ως το καθαρό εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (Πηγή Prior et al, 2005)

## ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ

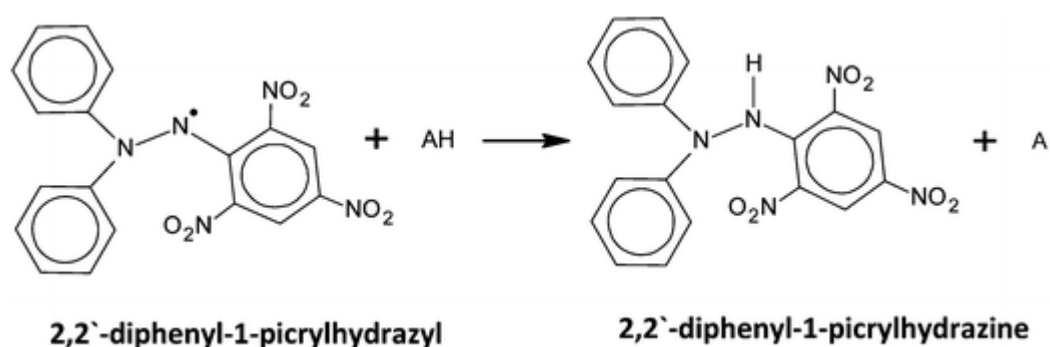
Η μέθοδος **FRAP** βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να μειώνουν τη συγκέντρωση του τριχλωρικού σιδήρου. Η αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε μπλε παρατηρείται σε 593-595nm. Αυτή η μέθοδος δεν αντιδρά σε αντιοξειδωτικά που περιέχουν στο μόριό τους θειόλες, όπως είναι για παράδειγμα η γλουταθειόνη. (Prior et al, 2005; Leopoldini et al, 2010)





Σχήμα 2.3.3.3 Αναγωγή του συμπλόκου  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ σε  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ παρουσία αντιοξειδωτικού (Πηγή Prior et al, 2005)

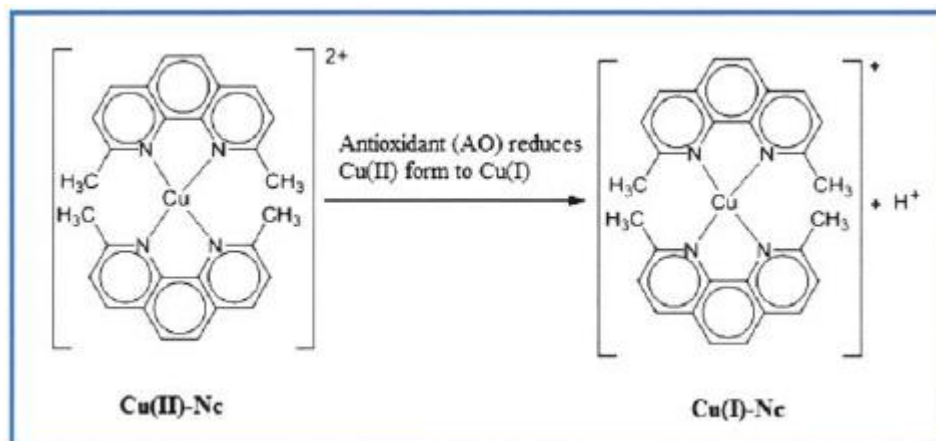
Το **DPPH** είναι μια σταθερή ρίζα μωβ χρώματος που όταν έρθει σε επαφή με φαινολικές ενώσεις αποσταθεροποιείται και παίρνει κίτρινο χρώμα. Η αλλαγή χρώματος μετράται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 517nm. Στη μέθοδο αυτή ο αποχρωματισμός μπορεί να συμβαίνει είτε μέσω μιας αντίδρασης μεταφοράς ατόμου υδρογόνου ή μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου, και γι αυτό το λόγο ανήκει και στις δυο κατηγορίες. Επίσης τα μικρά μόρια που έχουν καλύτερη πρόσβαση στην ρίζα έχουν και μεγαλύτερη δράση έναντι των ριζών. Το πλεονέκτημα της μεθόδου DPPH είναι το ότι δεν απαιτεί πολύ χρόνο, καθώς και ούτε εξειδικευμένο μηχανισμό. Αυτοί οι λόγοι την καθιστούν απλή, εύκολη και γρήγορη. (Prior et al, 2005; Dai et al, 2010; Kylli, 2011)



Σχήμα 2.3.3.4 DPPH (Πηγή Pyrzyńska et al, 2013)

Στη μέθοδο **CUPRAC** οι ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου καταστέλλονται από τις φαινολικές ενώσεις. Λόγω της χαμηλής μέγιστης απορρόφησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου προστίθεται στο μίγμα της

αντίδρασης ένας χρωμογόνος παράγοντας. Μετά από επώαση για 30 λεπτά, η απορρόφηση μετράται στα 450nm. (Prior et al, 2005; Dai et al, 2010)



Σχήμα 2.3.3.4 Αναγωγή του  $\text{Cu}^{2+}$  σε Cu μέσω αντιοξειδωτικού (Πηγή Ozyurek et al, 2011)

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ»**

### **3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

**Εκχύλιση με μεθανόλη 70% και ακετόνη 70%**

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Μεθανόλη 70%

Ακετόνη 70%

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

1. Λαμβάνεται 1g  $\pm 0,01$  δείγματος, τοποθετείται σε falcon 50ml και προστίθενται 10ml μεθανόλης 70%.
2. Ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex για 3min.
3. Φυγοκέντρωση στις 6000 στροφές για 5min.
4. Εν συνεχεία το υπερκείμενο υγρό φιλτράρεται και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 20ml.
5. Στο στερεό που έμεινε προστίθενται 10ml ακετόνης 70% και ακολουθεί ανακίνηση με vortex για 3min.
6. Φυγοκέντρωση στις 6000 στροφές για 5min.
7. Το υπερκείμενο υγρό φιλτράρεται και τοποθετείται στην ογκομετρική φιάλη των 20ml μαζί με το προηγούμενο.
8. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη 70%.
9. Το υγρό μεταφέρεται σε falcon A και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

## Εκχύλιση με μεθανόλη 70%

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Μεθανόλη 70%

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ακολουθούνται τα ίδια βήματα με την προηγούμενη εκχύλιση με την μόνη διαφορά ότι στο στάδιο 5 προστίθεται πάλι μεθανόλη 70%. Διατηρείται σε falcon B.

## Εκχύλιση με ακετόνη 70%

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ακετόνη 70%

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ακολουθούνται τα ίδια βήματα με τις προηγούμενες εκχυλίσεις με τη διαφορά ότι στα στάδια 1, 5, 8 προστίθεται ακετόνη 70%. Φυλάσσεται σε falcon Γ.

## Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Οξικός αιθυλεστέρας

Μεθανόλη

HCl 37%

Νερό

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε 1g  $\pm$ 0,01 δείγματος προστίθενται 5ml οξικού αιθυλεστέρα.
2. Ομογενοποιούνται με την βοήθεια του vortex για 3min.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 5min.
4. Το υγρό μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη.
5. Στο στερεό που έμεινε προστίθενται άλλα 5ml οξικού αιθυλεστέρα και επαναλαμβάνονται τα στάδια 2 και 3.
6. Η εκχύλιση με 5ml οξικού αιθυλεστέρα πραγματοποιείται για ακόμα 2 φορές(σύνολο 4 φορές άρα  $4 \times 5 = 20$ ml οξικού αιθυλεστέρα)
7. Το αδιάλυτο στερεό αποθηκεύεται για το στάδιο 14.
8. Στη διαχωριστική χοάνη που υπάρχουν τα 20ml οξικού αιθυλεστέρα προστίθενται και 10ml νερό.
9. Ακολουθεί ανακίνηση της διαχωριστικής χοάνης κι έπειτα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να διαχωριστούν οι στοιβάδες. Η κάτω στοιβάδα (νερό) μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 25ml.
10. Στη διαχωριστική χοάνη προστίθενται άλλα 10ml νερό και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση.
11. Η κάτω στοιβάδα (νερό) μεταφέρεται στην ογκομετρική φιάλη μαζί με τα άλλα 10ml νερό, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και φυλάσσεται σε falcon Δ1.

12. Στη διαχωριστική χοάνη μένει ο αιθυλεστέρας που μεταφέρεται σε σφαιρική των 50ml και συμπυκνώνεται σε rotary evaporator με θέρμανση μέχρι 35°C.
13. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 7-8ml μεθανόλη και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη και φυλάσσεται σε falcon Δ2.
14. Στο αδιάλυτο από τις εκχυλίσεις (στάδιο 7) προστίθενται 10ml μεθανόλης και ακολουθεί ανακίνηση με vortex για 3min.
15. Συνεχίζουμε με φυγοκέντρηση για 5min στις 6000 στροφές.
16. Το υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 20ml.
17. Στο στερεό που έμεινε προστίθενται άλλα 10ml μεθανόλη και ομογενοποιούνται με τη βοήθεια του vortex για 3min.
18. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 6000 στροφές. Το στερεό που μένει χρησιμοποιείται στο στάδιο 21.
19. Το υγρό προστίθεται στην ογκομετρική φιάλη των 20ml μαζί με τα 10ml μεθανόλης από το στάδιο 16.
20. Συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη και φυλάσσεται σε falcon Δ3.
21. Στο στερεό που έμεινε στο στάδιο 18 προστίθενται 9,5ml HCl 37% και θερμαίνεται στους 60°C για 2 ώρες.
22. Ψύχεται και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml αφού περαστεί από φίλτρο.
23. Συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη και φυλάσσεται σε falcon Δ4.

### **3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU**

#### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ**

Παρασκευάζονται 7 πρότυπα διαλύματα gallic acid με συγκεντρώσεις:

1000μg/ml, 500μg/ml, 250μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 20μg/ml, 10μg/ml

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα Folin-ciocalteu

Διάλυμα 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 500μl δείγμα (ή νερό για το control) με 500μl αντιδραστηρίου Folin-ciocalteu και 4ml νερό και ανακινούνται με vortex. Μετά από 3min προστίθενται 1000μl διαλύματος 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και ανακινούνται με vortex. Ακολουθεί αναμονή για 2 ώρες στο σκοτάδι και έπειτα φωτομέτρηση στα 725nm χρησιμοποιώντας το control ως τυφλό.

### 3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

#### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ**

Παρασκευάστηκαν 8 πρότυπα διαλύματα κατεχίνης με συγκεντρώσεις:

500μg/ml, 200μg/ml, 30μg/ml, 20μg/ml, 16μg/ml, 12μg/ml, 8μg/ml, 5μg/ml

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα  $\text{NaNO}_2$  5%

Διάλυμα  $\text{AlCl}_3$  10%

Διάλυμα  $\text{NaOH}$  1M

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ**

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 300μl δείγματος , 1,3 μl νερό και 100μl διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  5%.
- Μετά από 6 λεπτά προστίθενται 200μl διαλύματος  $\text{AlCl}_3$  10% και ακολουθεί ανάδευση με vortex. (στο control 200μl νερό)
- Μετά από 5 λεπτά προστίθενται 600μl διαλύματος  $\text{NaOH}$  1M και αναδεύονται με τη βοήθεια του vortex.
- Προστίθενται 400μl νερό.
- Το διάλυμα φωτομετρείται αμέσως στα 415nm χρησιμοποιώντας το control ως τυφλό.



### 3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ

#### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Παρασκευάζουμε δυο διαλύματα με  $\text{pH}=1$  και  $\text{pH}=4,5$  με τις παρακάτω προσθήκες:

Για  $\text{pH}=1$ : αναμιγνύονται 12,5ml 2M KCl και 37,5 ml 0,2M HCl

Για  $\text{pH}=4,5$ : αναμιγνύονται 40ml sodium acetate 1M, 24ml HCl 1M και 36ml νερό.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα κάνω τα εξής:

- 500μl δείγματος προστίθενται σε 4ml διαλύματος  $\text{pH}=1$
- 500μl δείγματος προστίθενται σε 4ml διαλύματος  $\text{pH}=4,5$
- Τα δυο διαλύματα δείγματος φωτομετρούνται στα 510nm καθώς και στα 700nm με τυφλό το αντίστοιχο διάλυμα (διάλυμα με  $\text{pH}=1$  ή διάλυμα με  $\text{pH}=4,5$ ).

### **3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΥΑΝΙΔΙΝΩΝ με τη μέθοδο DMAC**

#### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ**

Παρασκευάστηκαν 13 πρότυπα διαλύματα κατεχίνης με συγκεντρώσεις:

2000μg/ml, 1500μg/ml, 1000μg/ml, 750μg/ml, 500μg/ml, 250μg/ml,  
125μg/ml,

#### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ DMAC**

3ml HCl (37%) προστίθενται σε 27ml αιθανόλη και το διάλυμα ψύχεται στο ψυγείο (4°C) για 15min. Στο μίγμα προστίθεται DMAC 0,030g ±0,001 και διαλύεται με ανακίνηση και φυλάσσεται στο σκοτάδι και στο ψυγείο μεταξύ των μετρήσεων.

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗ**

Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε με τον εξής τρόπο:

Αναμιγνύονται 2350μl αιθανόλης , 100μl διαλύματος DMAC και 50μl εκχύλισμα και ανακινούνται με το vortex για 10sec. Διατηρούνται στο σκοτάδι για 10 λεπτά και εν συνεχεία φωτομετρούνται στα 640nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλό αιθανόλη.

### **3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ DPPH**

#### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ**

Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις:

1000 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 20 $\mu$ M

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Stock διάλυμα DPPH σε μεθανόλη

Working διάλυμα DPPH σε μεθανόλη

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3,8 working διάλυμα DPPH και 200 $\mu$ l δείγματος (ή 200 $\mu$ l μεθανόλη για το control) και αναδεύονται στο vortex. Σε κυψελίδα τοποθετούνται περίπου 3ml διαλύματος και φωτομετρούνται μετά από 30min στα 517nm χρησιμοποιώντας ως μεθανόλη τυφλό. Τα διαλύματα διατηρούνται στο σκοτάδι κατά την αναμονή αλλά και μεταξύ των μετρήσεων.

### **3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

#### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ**

Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις:

1000μM, 800μM, 400μM, 200μM, 100μM, 50μM, 20μM

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα FeCl<sub>3</sub>

Διάλυμα HCl 0,04M

Διάλυμα TPTZ 0,01M

Ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa 0,3M και pH=3,6

Αντιδραστήριο FRAP: αναμιγνύονται 15ml Ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, 1,5ml Διάλυμα FeCl<sub>3</sub> και 1,5ml διάλυμα TPTZ.

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ**

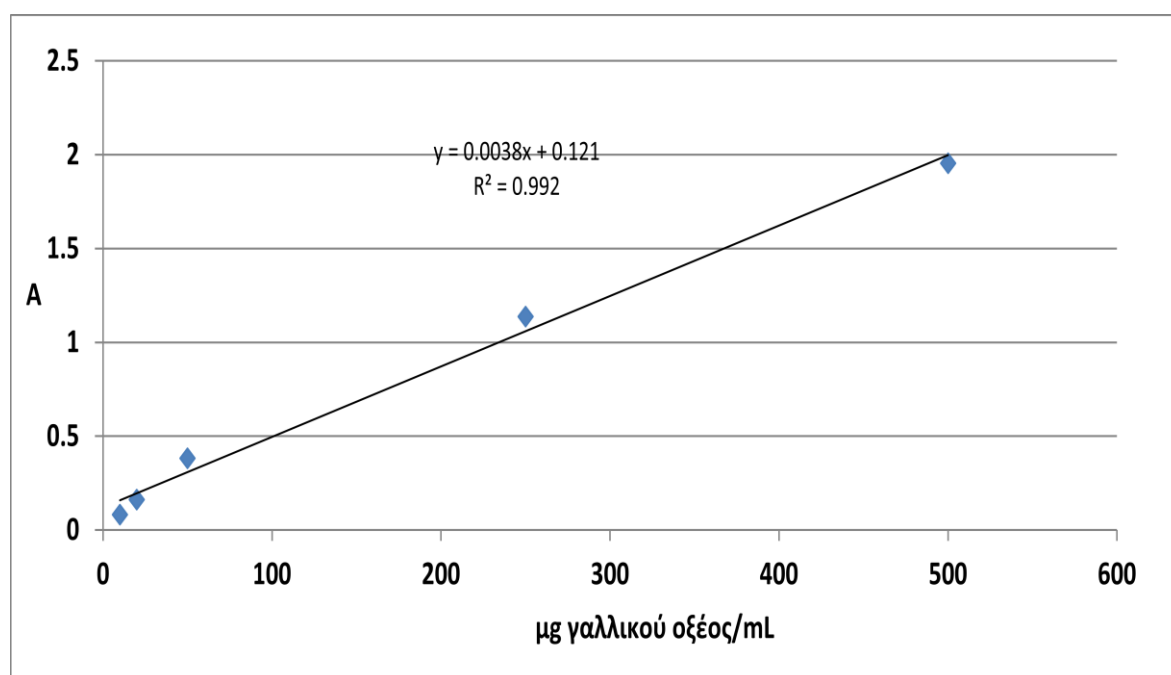
2,9ml αντιδραστήριο FRAP αναμιγνύονται με 100μl δείγματος (100μl μεθανόλη για το control). Το μίγμα θερμαίνεται στους 37°C για 10min (ανακινείται 1-2 φορές). Κατόπιν ψύχεται σε τρεχούμενο νερό και φωτομετρείται στα 593nm μέσα σε 5min.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 « ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ»

### 4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΩΝ

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ (Folin-Ciocalteu)

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών στα κούμαρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου folin-ciocalteu. Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και τα αποτελέσματα αυτών εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος ανά 100g ξερού κούμαρου. Πρώτα φυσικά μετρήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα, των οποίων η πρότυπη καμπύλη παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 4.1.1 Πρότυπη καμπύλη ολικών φαινολών

Οι εκυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικούς διαλύτες και με έναν συνδυασμό αυτών. Οι διαλύτες ήταν η μεθανόλη 70% (αραίωση μεθανόλης 100% με νερό) , η ακετόνη 70% (αραίωση με νερό), ο συνδυασμός μεθανόλης 70% και ακετόνης 70% και τέλος ο οξικός αιθυλεστέρας. Όσον

αναφορά τον οξικό αιθυλεστέρα, εκχυλίστηκαν κατά τη μέθοδο αυτή και μελετήθηκαν τέσσερα διαλύματα. Αυτό συμβαίνει διότι χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω από ένας διαλύτες, έτσι ώστε να καταφέρουμε να εκχυλίσουμε όσο το δυνατόν περισσότερα συστατικά μέσω της ίδιας εκχύλισης από το ίδιο δείγμα, αξιοποιώντας το στο έπακρο. Το πρώτο εκχύλισμα, το Δ1, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του κούμαρου, προέκυψε από την διαχωριστική χοάνη κατά τα πρώτα στάδια. Το εκχύλισμα Δ2 είναι η στοιβάδα από την οποία διαχωρίστηκε το Δ1, συμπυκνώθηκε και διαλύθηκε σε μεθανόλη. Το εκχύλισμα Δ3 προήλθε από το αδιάλυτο στερεό των εκχυλίσεων όταν προσθέσαμε σε αυτό μεθανόλη, το φυγοκεντρήσαμε και παραλάβαμε ένα διάλυμα 20ml. Τέλος το Δ4 προέκυψε από το ίδιο αδιάλυτο στερεό που εκχυλίσαμε το Δ3, αφού του προσθέσαμε HCl και το εκχυλίσαμε όπως αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

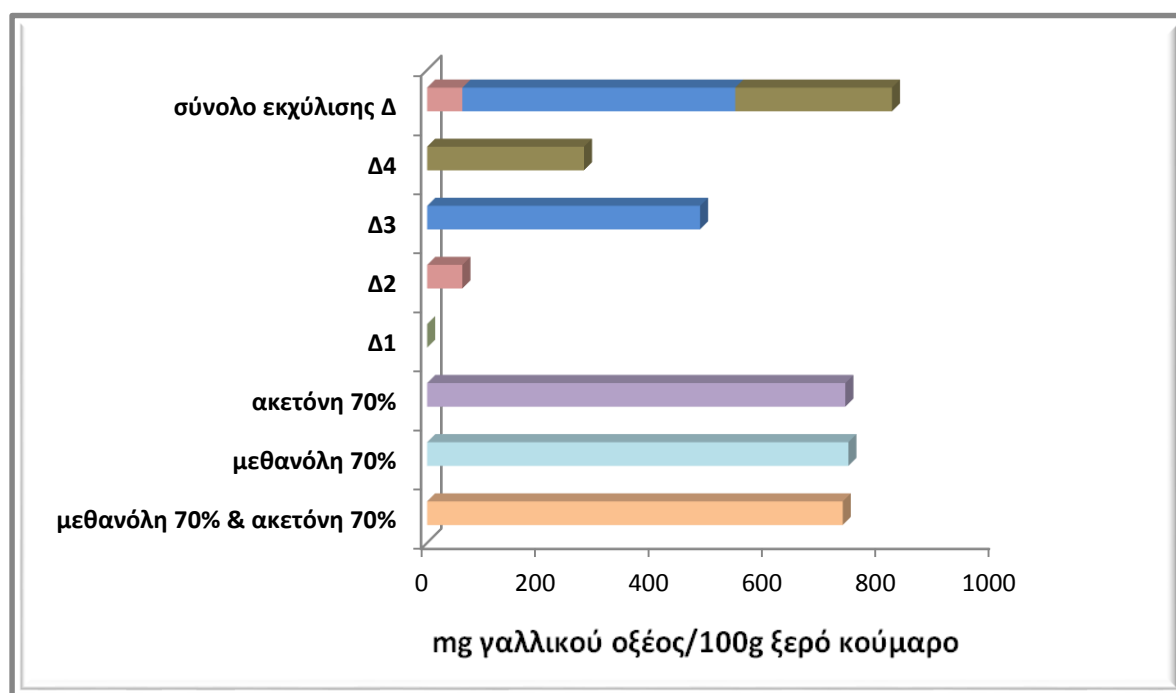
Όταν πραγματοποιήθηκε λοιπόν η μέθοδος F-C για κάθε ένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα με τους διαφορετικούς διαλύτες, όπως είναι φυσικό τα αποτελέσματα παρουσίασαν διαφορές. Οι διαλύτες μεθανόλη 70%, ακετόνη 70% και ο συνδυασμός τους, ήταν οι πιο αποτελεσματικοί, έχοντας ένα μικρό προβάδισμα η μεθανόλη 70% με  $740,98 \pm 79,67$  mg γαλλικού οξέος /100g ξερό κούμαρο, ακολουθεί η ακετόνη με  $735,61 \pm 64,96$  mg GAE/100g ξερό κούμαρο και τέλος ο συνδυασμός των δύο παραπάνω διαλυτών έδωσε αποτέλεσμα ολικών φαινολών  $731 \pm 117,06$  mg GAE/100g ξερό κούμαρο. Όπως βλέπουμε οι διαφορές μεταξύ τους είναι ελάχιστες.

Στα εκχυλίσματα της μεθόδου με τον οξικό αιθυλεστέρα το Δ1 έδωσε μηδενικό αποτέλεσμα σε σχέση με το Δ2 που η περιεκτικότητά του σε ολικές φαινόλες είναι  $61,97 \pm 13$  mg GAE/100g. Το υψηλότερο αποτέλεσμα το είχε το εκχύλισμα Δ3 με  $480 \pm 88,32$  mg GAE/100g, και τέλος το Δ4 με  $275,86 \pm 30,99$  mg GAE/100g. Ωστόσο, η εκχύλιση με τον οξικό αιθυλεστέρα φαίνεται ότι ήταν ακόμα πιο αποτελεσματική από τις παραπάνω, διότι προσθέτοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών των επιμέρους εκχυλισμάτων προκύπτει υψηλότερη συγκέντρωση. Αυτό ίσως οφείλεται στα ποικίλα διαλύματα και διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στο ίδιο δείγμα,

έχοντας έτσι την ικανότητα να εκχυλίσουν περισσότερες φαινολικές ενώσεις. Όλα τα παραπάνω φαίνονται στον πίνακα 4.1.1 και γραφικά στο σχήμα 4.1.2.

**Πίνακας 4.1.1 Αποτελέσματα ολικών φαινολών**

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
mg γαλλικού οξέος /100g ξερό κούμαρο	731±117,06	740,98±79,67	735,61±64,96	0	61,97±13	480±88,32	275,86±30,99

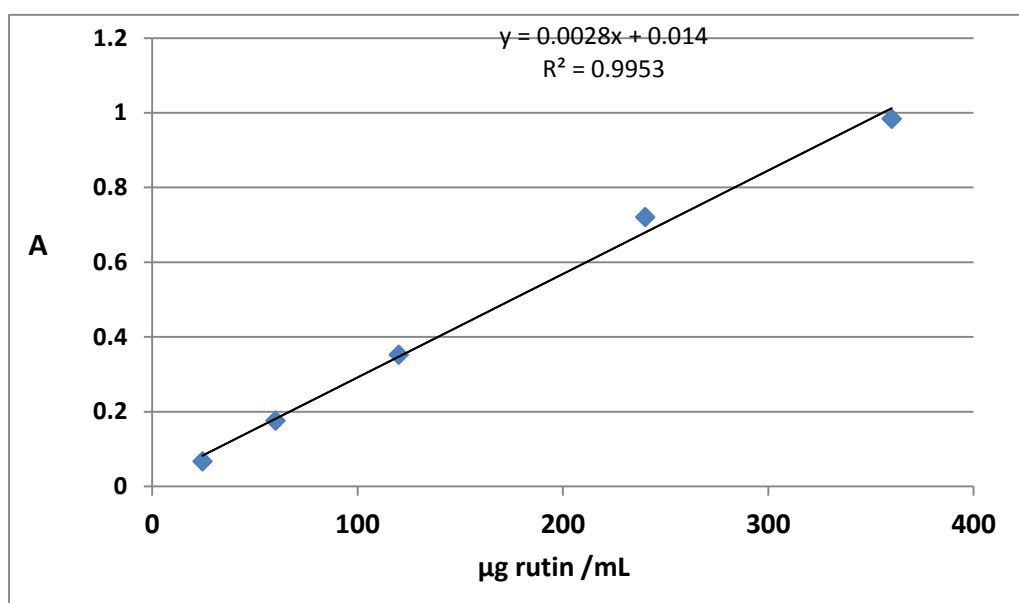


**Σχήμα 4.1.2 Αποτελέσματα ολικών φαινολών**

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα όλες οι εκχυλίσεις είχαν αποτελέσματα με μικρές αποκλίσεις, όμως συνολικά η εκχύλιση Δ με τον οξικό αιθυλεστέρα καθίσταται αποτελεσματικότερη όσον αναφορά τις ολικές φαινόλες.

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου (potassium acetate). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράζονται mg ρητίνης ανά 100g ξερού κούμαρου. Παρακάτω φαίνεται η πρότυπη καμπύλη.



Σχήμα 4.1.3 Πρότυπη καμπύλη φλαβονοειδών

Μεταξύ των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με μεθανόλη 70%, ακετόνη 70% και συνδυασμό των δύο παραπάνω οι συγκεντρώσεις φλαβονοειδών που προέκυψαν είναι αυτές που φαίνονται στον πίνακα 4.2. Με συγκέντρωση  $83,57 \pm 5,51$  mg rutin/100g ξερό κούμαρο παρουσιάζεται η ακετόνη 70%, ενώ με  $71,84 \pm 3,16$  mg rutin/100g ακολουθεί η μεθανόλη 70%. Όχι και τόσο αποτελεσματικός αποδείχθηκε ο συνδυασμός μεθανόλης 70% και ακετόνης 70% με συγκέντρωση μόλις  $63,57 \pm 4,12$  mg rutin/100g.

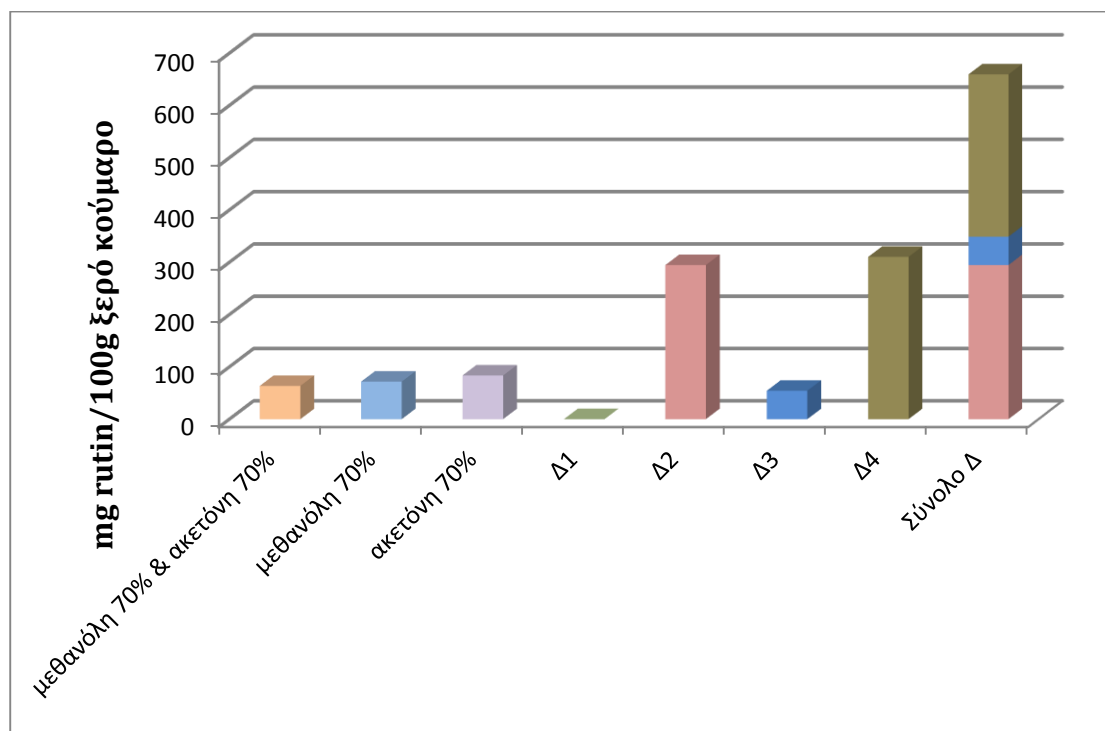
Στην τέταρτη εκχύλιση με τον οξικό αιθυλεστέρα το εκχύλισμα Δ1 είναι μηδενικό, όπως και παραπάνω στις ολικές φαινόλες. Αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει το εκχύλισμα Δ4 με  $310,36 \pm 31,06$  mg rutin/100g και αμέσως μετά το εκχύλισμα Δ2 με συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών  $294,73 \pm 46,27$  mg rutin/100g. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση συναντάμε στο



εκχύλισμα Δ3 με αποτέλεσμα 54,29±4,35 mg rutin/100g. Συνολικά η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα έχει μια συγκέντρωση περίπου 659,38 rutin/100g.

Πίνακας 4.1.2 Αποτελέσματα φλαβονοειδών

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
mg rutin/100g ξερό κούμαρο	63,57±4,12	71,84±3,16	83,57±5,51	0	294,73±46,27	54,29±4,35	310,36±31,06



Σχήμα 4.1.4 Αποτελέσματα Φλαβονοειδών

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω γράφημα η μέθοδος εκχύλισης που πραγματοποιείται με τον οξικό αιθυλεστέρα είναι κατά πολύ πιο αποτελεσματική από τις άλλες τρεις.

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ

Ο προσδιορισμός των ανθοκυανίνων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του διαφορικού pH. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωμοφόρα ομάδα των ανθοκυανίνων αλλάζει χημική δομή ανάλογα με το pH (1 ή 4,5) και είτε αλλάζει χρώμα, είτε αποχρωματίζεται. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από δύο φορές. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου γλυκοζίτη-3 της κυανιδίνης (για συντομία θα αναφέρεται ως G3C) επειδή είναι η κυρίαρχη ανθοκυανίνη στα κούμαρα, ανά 100g ξηρού καρπού.

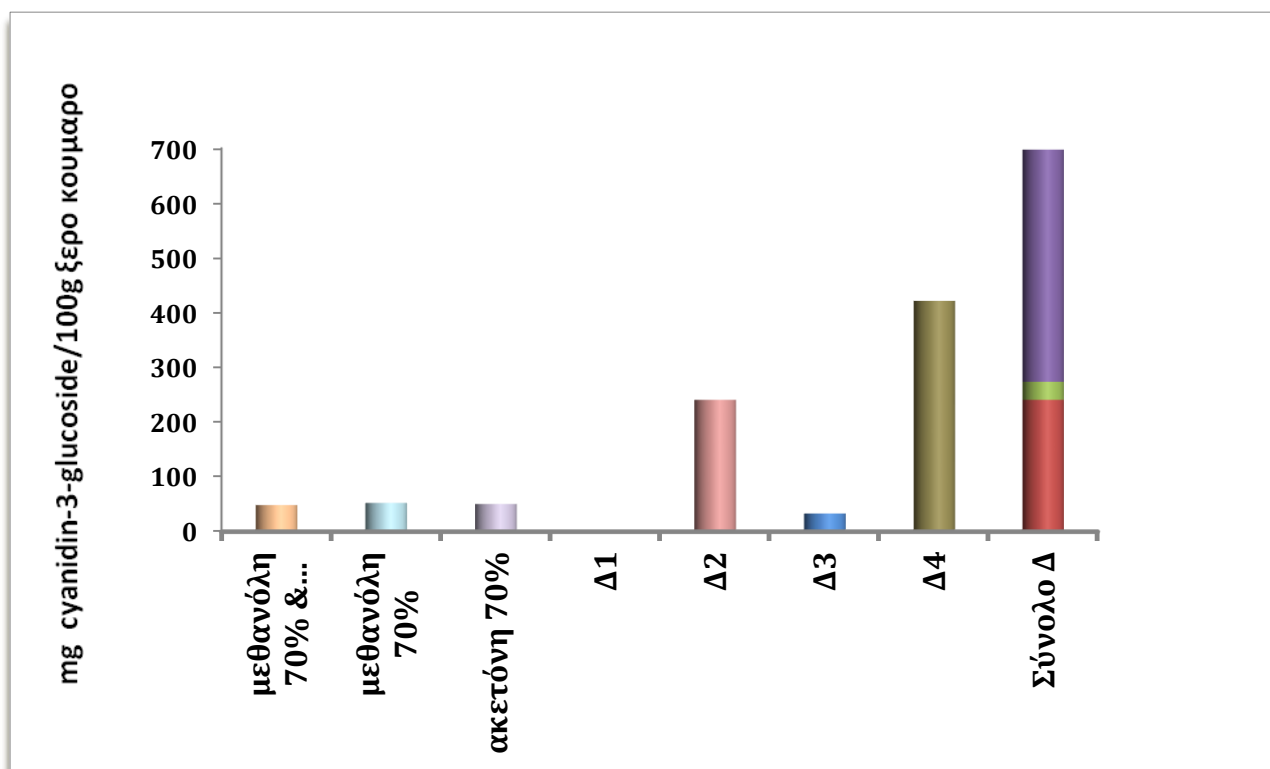
Οι εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν με διαλύτες την μεθανόλη, την ακετόνη και τον συνδυασμό τους, είναι πολύ κοντά στα αποτελέσματα όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα. Αντιθέτως το εκχύλισμα Δ4 παρουσιάζει μεγάλη συγκέντρωση  $422,57 \pm 0,25$  mg /100g ξηρού κούμαρου. Σε λίγο περισσότερη συγκέντρωση από τη μισή του εκχυλίσματος Δ4 είναι το εκχύλισμα Δ2. Τέλος με φανερή διαφορά το εκχύλισμα Δ3 παρουσιάζει συγκέντρωση  $33,06 \pm 2$  mg G3C/100g ξηρού κούμαρου. Συνεπώς οι συνολικές ανθοκυανίνες που ταυτοποιήθηκαν στη μέθοδο με τον οξικό αιθυλεστέρα είναι περίπου  $697,93$  mg G3C/100g ξηρού κούμαρου.

Πίνακας 4.1.3 Αποτελέσματα ανθοκυανίνων

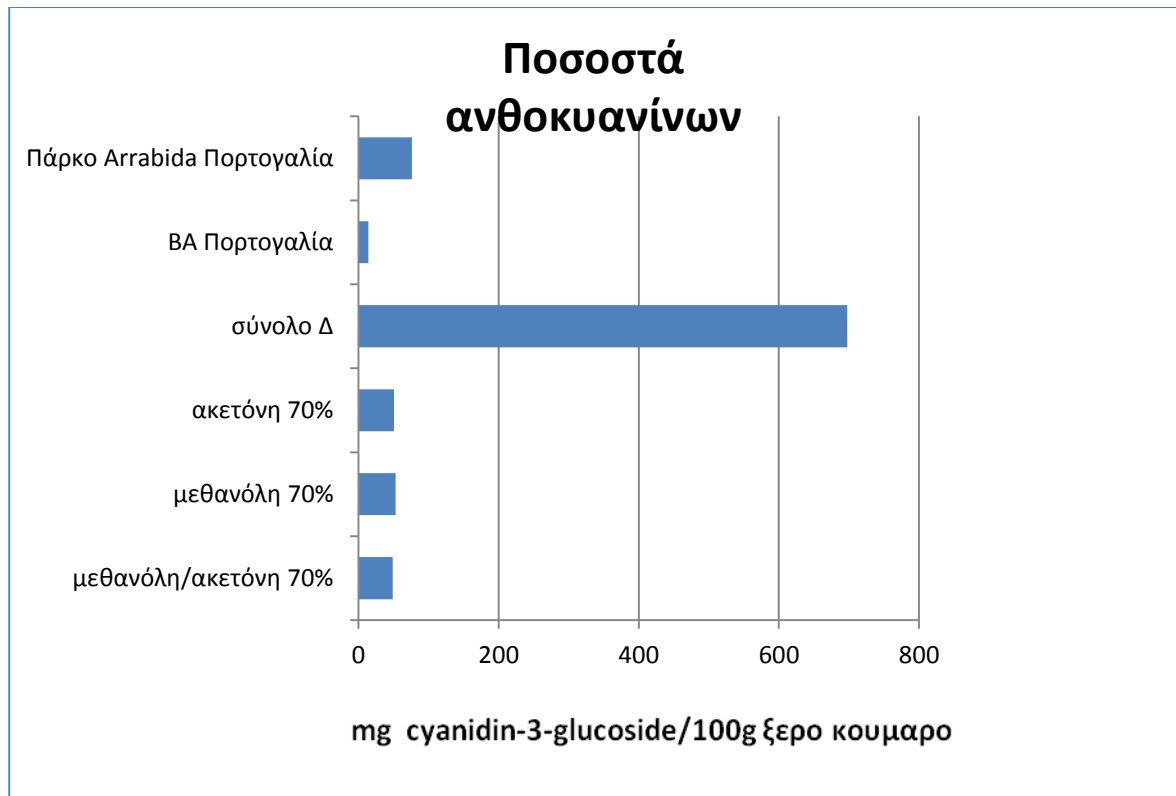
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
mg cyanidin-3- glucoside/100g ξηρό κούμαρο	48,67±2,58	52,60±5,59	50,60±6,30	0	242,30±2,37	33,06±2	422,57±0,25

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία μετά από πειράματα σε κούμαρα της βορειοανατολικής Πορτογαλίας τα αποτελέσματα των ανθοκυανίνων είναι σε πολύ μικρότερο ποσοστό από αυτά της Μεσσηνίας με συγκέντρωση  $13,77$ mg/100g ξηρού κούμαρου. Αντιθέτως στο φυσικό πάρκο Arrabida που

βρίσκεται επίσης στην Πορτογαλία, η συγκέντρωση των ανθοκυανίνων υπολογίστηκε σε ποσοστό 76,26 mg/100g ξηρού κούμαρου. Τα κούμαρα του πάρκου σε σχέση με αυτά της Μεσσηνίας που εκχυλίστηκαν με την μεθανόλη, την ακετόνη και την μεθανόλη/ακετόνη, έχουν υψηλότερη συγκέντρωση αλλά παραμένουν σχετικά κοντά. Όμως, σε σχέση με τα αποτελέσματα της εκχύλισης Δ όλα τα δείγματα της Πορτογαλίας είναι συντριπτικά πιο χαμηλά όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1.5.



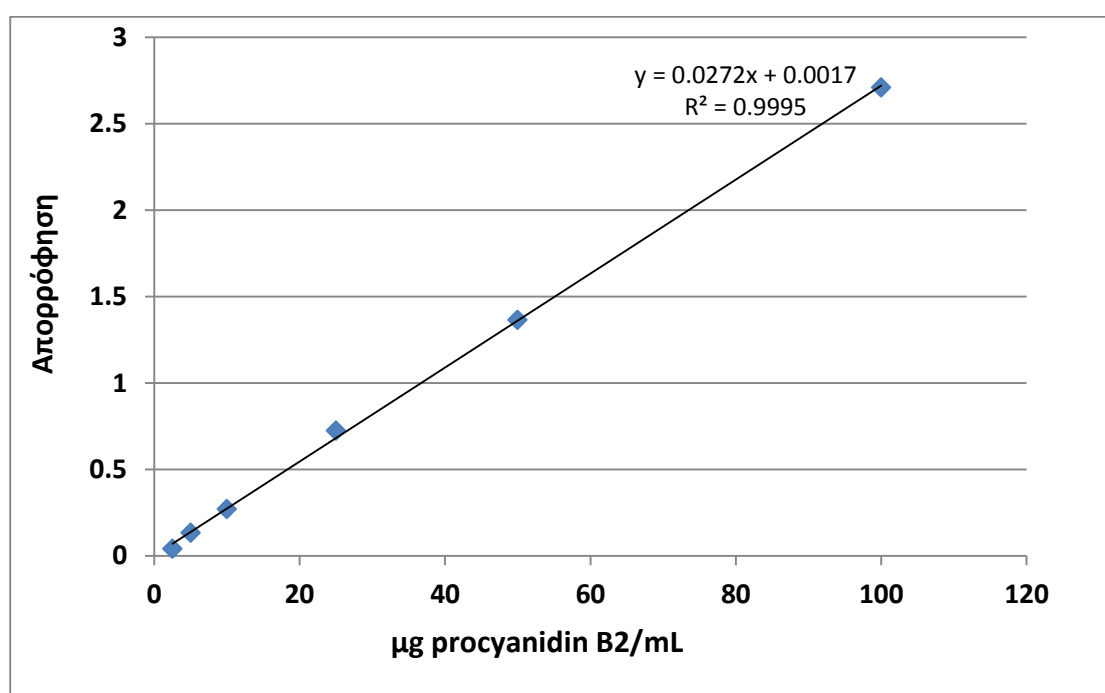
Σχήμα 4.1.5 Αποτελέσματα ανθοκυανίνων



Σχήμα 4.1.6 Συγκριτικά αποτελέσματα ανθοκυανίνων

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ (DMAC)

Η συγκέντρωση των προανθοκυανίνων υπολογίστηκε με την βοήθεια του αντιδραστηρίου 4-διμεθυλάμινο-κινναμαλδεΰδη ή για συντομία DMAC. Η κάθε μέτρηση έγινε από δυο φορές. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών εκφράζονται σε mg προκυανιδίνης B2 ανά 100g ξερό κούμαρο. Παρακάτω ακολουθεί η πρότυπη ευθεία.



Σχήμα 4.1.7 Πρότυπη ευθεία προανθοκυανίνων

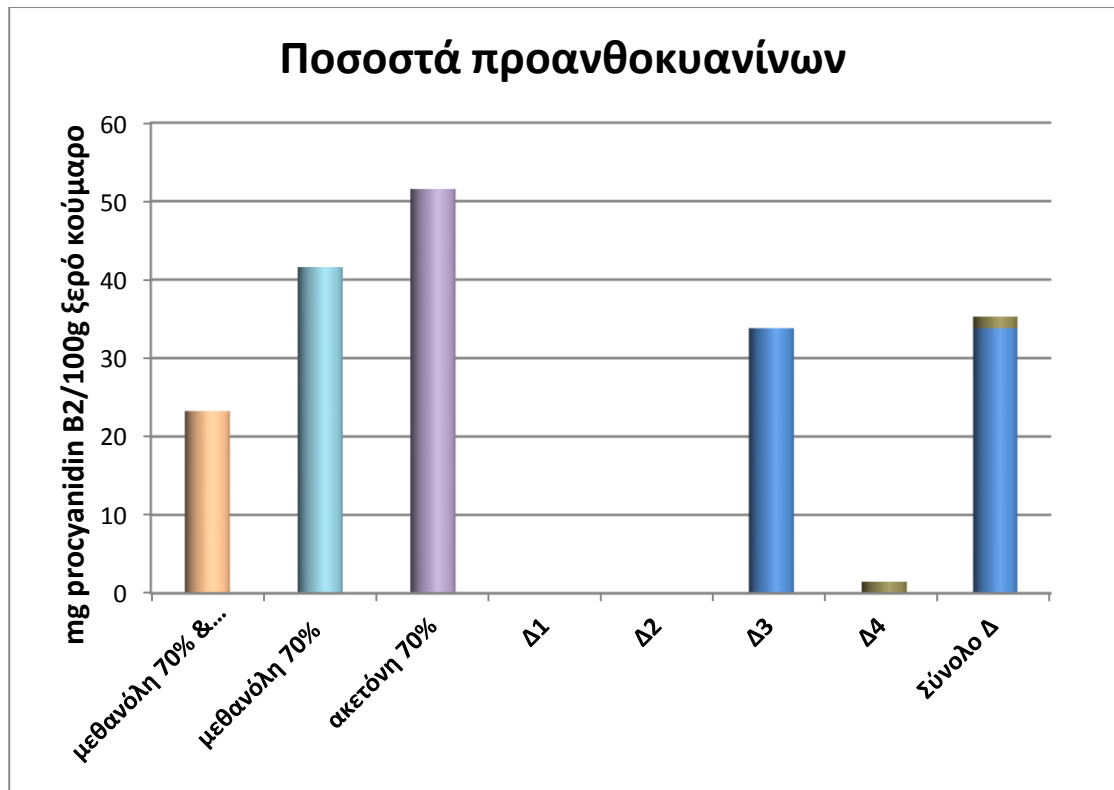
Αναποτελεσματική η μέθοδος της εκχύλισης όταν ο διαλύτης ήταν μεθανόλη/ακετόνη, καθώς η συγκέντρωση των προανθοκυανίνων υπολογίστηκε μόλις  $23,26 \pm 2,04$  mgB2/100g ξερό κούμαρο. Η ακετόνη 70% αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης με συγκέντρωση  $51,54 \pm 1,85$  mgB2/100g, ενώ δεν είχε μεγάλη διαφορά και η μεθανόλη 70% με συγκέντρωση  $41,59 \pm 1,94$  mgB2/100g. Τέλος από τα εκχυλίσματα τα Δ1 και Δ2 δεν περιείχαν καμία ποσότητα προανθοκυανίνων. Μία μικρή συγκέντρωση παρουσίασε το εκχύλισμα Δ4 και μία μεγαλύτερη το Δ3, με συγκεντρώσεις  $1,47 \pm 0,13$

mgB2/100g και 33,82±0,1 mgB2/100g αντίστοιχα. Το σύνολο προανθοκυανίνων δηλαδή της εκχύλισης Δ είναι 35,29 mgB2/100g.

**Πίνακας 4.1.4 Αποτελέσματα προανθοκυανίνων**

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
<b>mg procyanidin B2 /100g ξερό κούμαρο</b>	23,26±2,04	41,59±1,94	51,54±1,85	0	0	33,82±0,1	1,47±0,13

Με βάση τη βιβλιογραφία τα κούμαρα της περιοχής Σαλαμάνκα της Δυτικής Ισπανίας είχαν πολύ χαμηλότερα ποσοστά σε προανθοκυανίνες σε σχέση με αυτά της Μεσσηνίας. Όμως δεν μπορούμε να είμαστε ακριβείς στην σύγκριση, διότι δεν αναφέρεται το τρόπος μέτρησης τους. Η συγκέντρωσή τους φτάνει μόλις τα 27,46±0,989mgB2/100g ξερού κούμαρου. Αυτή η συγκέντρωση μπορεί να είναι υψηλότερη από εκείνη των φρούτων της Μεσσηνίας με διαλύτη εκχύλισης την μεθανόλη/ακετόνη, όμως είναι κατά πολύ χαμηλότερη σε περιεκτικότητα όταν η εκχύλιση των μεσσηνιακών κούμαρων πραγματοποιείται με ακετόνη 70%. Τέλος ενδιαφέρον είναι να αναφερθεί ότι το ποσοστό προανθοκυανίνων και σε άλλα μούρα και πιο συγκεκριμένα στο βατόμουρο και το κράνμπερι είναι πολύ υψηλότερα.



Σχήμα 4.1.8 Αποτελέσματα προανθοκυανίνων

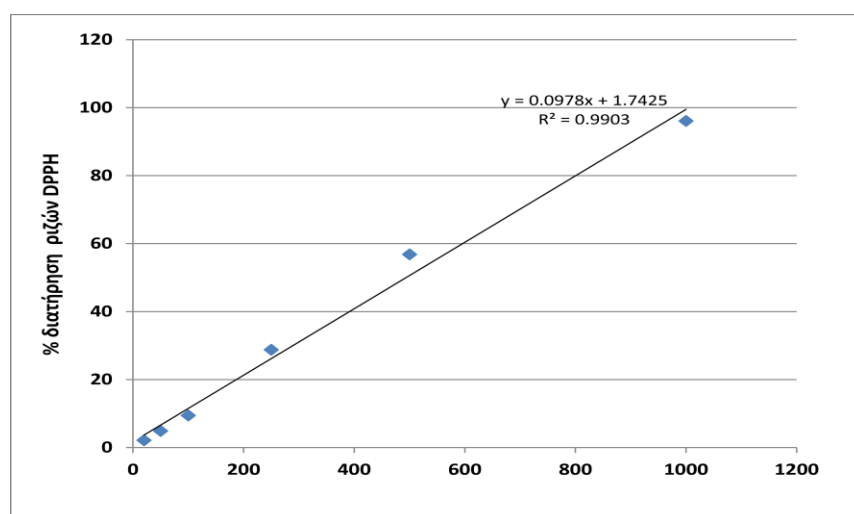
Το γράφημα 4.1.8 δείχνει ξεκάθαρα τις διαφορές των συγκεντρώσεων σε προανθοκυανίνες.

## 4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, επιλέχθηκαν δυο μέθοδοι για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κούμαρων. Η DPPH και η FRAP (Ferric Antioxidant Power Assay), που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίου. Επιλέχθηκαν δύο μέθοδοι για να είναι πιο ξεκάθαρη η εικόνα, αλλά κι επειδή αυτές οι δυο μέθοδοι είναι εύκολες και γρήγορες. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των δύο είναι ότι στην μέθοδο FRAP εκτιμάται άμεσα η αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων, θεωρώντας την αναγωγική ικανότητα και την αντιοξειδωτική ίσες, ενώ στη μέθοδο DPPH εκτιμάται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν τις συνθετικές ελεύθερες ρίζες του αντιδραστηρίου DPPH. (Prior et al, 2005)

### ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των κούμαρων υπολογίστηκε με την βοήθεια του αντιδραστηρίου DPPH. Η κάθε μέτρηση έγινε από δυο φορές. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών εκφράζονται σε mg trolox ανά 100g ξερό κούμαρο. Παρακάτω ακολουθεί η πρότυπη ευθεία.



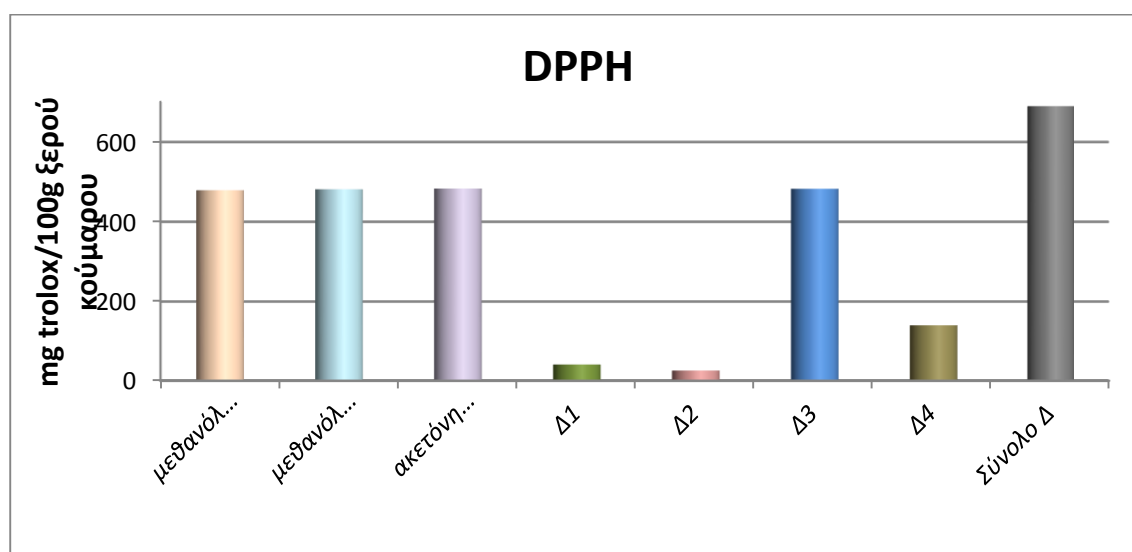
Σχήμα 4.2.1 Πρότυπη καμπύλη DPPH σε mg trolox



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 4.2.1 που ακολουθούν η καταλληλότερη και αποτελεσματικότερη μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κούμαρων αποδείχθηκε η εκχύλιση Δ. Αυτό αποδεικνύεται από την ολική συγκέντρωση όλων των διαφορετικών εκχυλισμάτων της μεθόδου η οποία φτάνει τα 689,23 mg trolox/100g ξερό κούμαρο. Στις υπόλοιπες τρεις μεθόδους δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά, καθώς η ακετόνη 70% έφτασε τα 483,09±1,41 mg trolox/100g ξερό κούμαρο, με ελάχιστη διαφορά ακολούθησε η μεθανόλη 70% με συγκέντρωση 481,23±2,68 trolox/100g ξερό κούμαρο και τέλος ο συνδυασμός των δύο με συγκέντρωση 478,86±3,47 mg trolox/100g ξερό κούμαρο.

Πίνακας 4.2.1 Αποτελέσματα DPPH

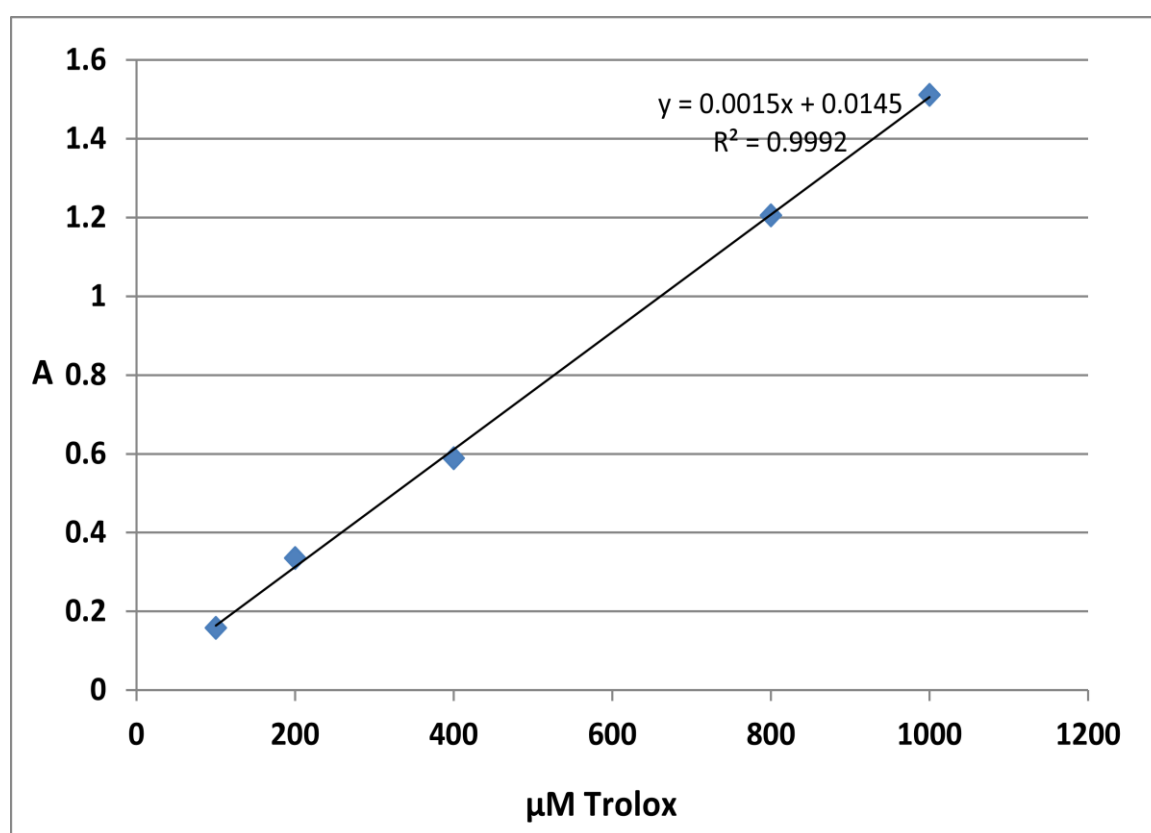
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
mg trolox/100 g ξερό κούμαρο	478,86±3,47	481,23±2,68	483,09±1,41	40,93±11,93	25,54±7,5 9	482,51±1,8	140,25±11,79



Σχήμα 4.2.2 Αποτελέσματα DPPH

## ΜΕΘΟΔΟΣ FRAP

Η μέθοδος FRAP, όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, στηρίζεται στη μείωση του θετικού φορτίου του τρισθενούς σιδήρου στο σύμπλοκο  $\text{Fe}^{3+}$  TPTZ κατά την παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού σε όξινο μέσο και στο σχηματισμό του συμπλόκου  $\text{Fe}^{2+}$  TPTZ, το οποίο έχει χρώμα μπλε (Prior et al, 2005). Οι μετρήσεις έγιναν από δύο φορές για κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg trolox/100g ξερό κούμαρο. Από κάτω ακολουθεί η πρότυπη ευθεία.



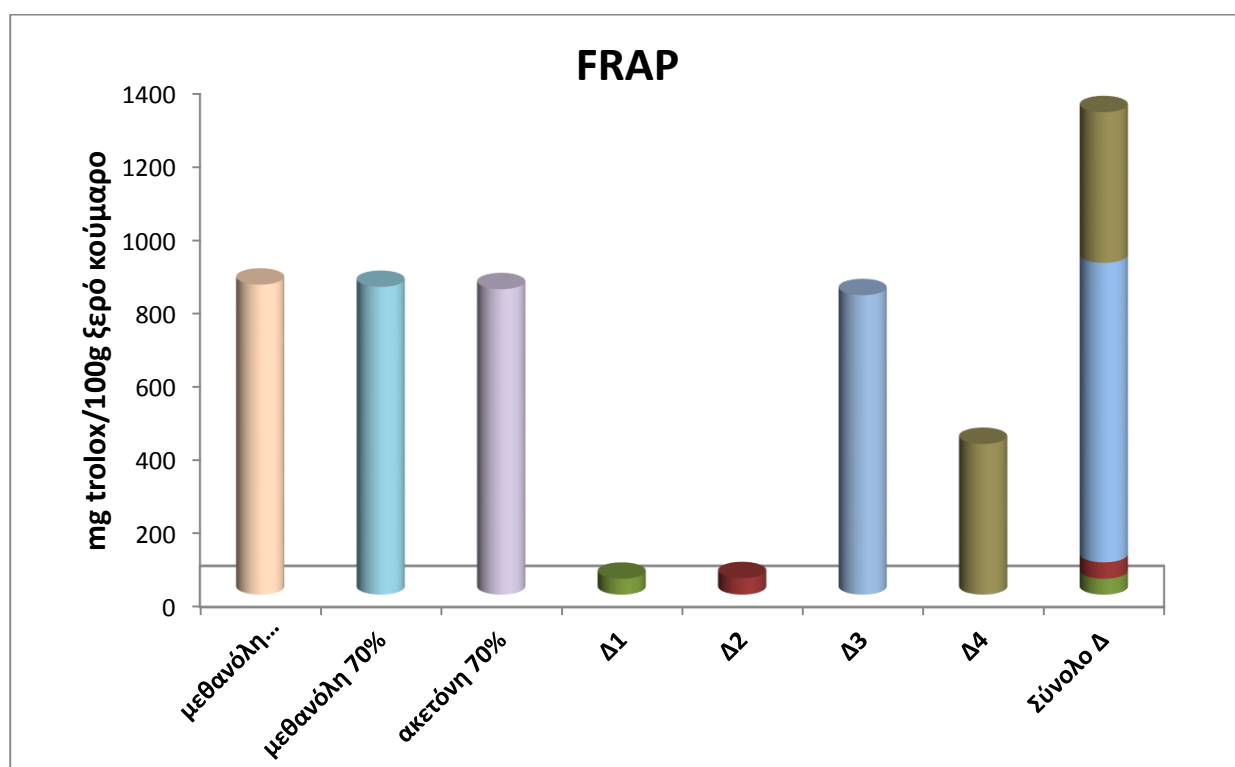
Σχήμα 4.2.3 Πρότυπη ευθεία FRAP

Όπως και προηγουμένως με το DPPH, έτσι και σ' αυτή τη μέθοδο μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας πιο αποτελεσματική μέθοδος αποδείχθηκε εκείνη με τον οξικό αιθυλεστέρα με συγκέντρωση 1316,68 mg trolox/100g ξερό κούμαρο. Επίσης και οι άλλοι τρεις διαλύτες είναι αρκετά κοντά. Ελάχιστα καλύτερη μέθοδος αποδείχθηκε εκείνη με διαλύτη τον συνδυασμό μεθανόλης/ακετόνης 70%, ακολουθεί η μεθανόλη 70% και έπειτα η

ακετόνη 70%, με συγκεντρώσεις  $846,03 \pm 0,19$ ,  $839,78 \pm 7,22$  και  $833,53 \pm 0,04$  mg trolox/100g ξερό κούμαρο, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.2.2 Αποτελέσματα FRAP

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ							
	μεθανόλη 70% & ακετόνη 70%	μεθανόλη 70%	ακετόνη 70%	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
mg trolox/100 g ξερό κούμαρο	$846,03 \pm 0,19$	$839,78 \pm 7,22$	$833,53 \pm 0,04$	$43,28 \pm 0,57$	$44,93 \pm 0,47$	$817,2 \pm 0,16$	$411,27 \pm 0,04$



Σχήμα 4.2.4 Αποτελέσματα FRAP

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές πειραματικές μελέτες οι οποίες αφορούν τους μικρούς καρπούς, μούρα, έτσι ώστε να προσδιορισθούν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά, όπως είναι για παράδειγμα τα ολικά φαινολικά, τα ολικά φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και η ολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα κούμαρα.

Σε γενικές γραμμές είναι εύκολα αντιληπτό ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση των διάφορων συστατικών, γεγονός που αποτελεί κύριο λόγο που έρευνες που ασχολούνται με το ίδιο αντικείμενο όπως είναι τα κούμαρα διαφέρουν από τόπο σε τόπο. Σημαντικό ρόλο παίζει το στάδιο ωριμότητας του καρπού, η μεθοδολογία εκχύλισης καθώς και οι εδαφοκλιματικές και καλλιεργητικές συνθήκες.

Σε όλες τις πειραματικές πορείες που πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των διάφορων φαινολικών ομάδων, καθώς και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κούμαρων, σε όλες εκτός από μια εξαίρεση υπερετεύρησε η ίδια μέθοδος. Αυτή η μέθοδος ήταν η εκχύλιση με τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα.

Στις ολικές φαινόλες με συγκέντρωση περίπου 817,83mg GAE/100g ξερό κούμαρο, είχε περίπου 80mg/100g διαφορά από τους άλλους διαλύτες. Από την άλλη μεριά στα φλαβονοειδή η συγκέντρωση που προέκυψε ήταν 659,38 mg rutin/100g, σχεδόν οκτώ φορές περισσότερη από τον επόμενο διαλύτη, την ακετόνη 70% που η συγκέντρωσή της έφτασε μόλις στα 83,75 mg rutin/100g. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση των ανθοκυανίνων όπου η εκχύλιση Δ παρουσιάζει συγκέντρωση 697,93mg G3C/100g, ενώ αμέσως επόμενη η μεθανόλη 70% με 52,6mg/100g, δηλαδή δεκατρείς φορές κάτω.

Φλαβονοειδή σε μούρα	
ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ σε mg rutin/g ξηρό μούρο
Evergreen blackberries	1,5
Red raspberries	0,79
Black raspberries	0,82

(Πηγή Wada et al, 2002)

Μόνο στην περίπτωση των προανθοκυανίνων όλα τα αποτελέσματα είναι σχετικά πιο κοντά μεταξύ τους. Με ένα μικρό προβάδισμα καλύτερη μέθοδος αποδείχθηκε εκείνη της ακετόνης 70% με συγκέντρωση 51,54 mgB2/100g ξερό κούμαρο.

Όσον αναφορά τη μεθανόλη 70%, την ακετόνη 70% και τον συνδυασμό μεθανόλη/ακετόνη 70%, σε γενικές γραμμές παρουσιάζουν αποτελέσματα με σχετικά μικρές αποκλίσεις μεταξύ τους.

ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΟΥΡΑ		
ΟΝΟΜΑΣΙΑ		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ σε mgGAE/g ξηρού καρπού
crowberry	<i>Empetrum nigrum</i>	50,8±1,0
strawberry	<i>Fragaria anassa</i>	23,7±0,5
gooseberry	<i>Ribes grossularia</i>	12,4±0,6
cloudberry	<i>Rubus chamaemorus</i>	16,2±0,1
raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	23,9±0,2
rowanberry	<i>Sorbus aucuparia</i>	18,7±0,8
bilberry	<i>Vaccinium myrtillus</i>	29,7±0,9
cranberry	<i>Vaccinium oxycoccus</i>	21,2±0,7
whortleberry	<i>Vaccinium uliginosum</i>	28,7±0,8
cowberry	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	24,9±0,4
evergreen blackberry	<i>Rubus iaciniatus</i>	30,94
boysenberry	<i>Rubus ursinus</i>	49,92
White mulberry	<i>Morus alba</i>	22,3-25,7

(Πηγή Kahkonen et al, 1999; Wada et al, 2002)

Στις μεθόδους προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και πάλι η εκχύλιση Δ αποδείχθηκε η αποτελεσματικότερη με συγκεντρώσεις 689,23mg trolox/100g στη μέθοδο DPPH και 1316,68mg trolox/100g ξερό κούμαρο στη μέθοδο FRAP. Η μεγάλη διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων πολύ πιθανόν να

οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος FRAP έχει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο DPPH.

Γενικά τα αποτελέσματα που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και σε άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με αντικείμενο τα κούμαρα αποδεικνύουν ότι είναι καλή πηγή αντιοξειδωτικών,  $\omega 3$  και  $\omega 6$  λιπαρών, βιταμινών καθώς και σακχάρων. Η πρόσληψη αυτών των μούρων μπορεί να επηρεάσει θετικά την υγεία των καταναλωτών, είτε λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είτε λόγω της περιεκτικότητας τους σε βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία.

Ακόμα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αφού τα κούμαρα παρουσιάζουν διαφορές στις περιεκτικότητες των συστατικών τους κατά τα διάφορα στάδια ωριμότητάς τους, θα πρέπει να προσδιοριστεί πιο θεωρείται το καταλληλότερο στάδιο με τα περισσότερα ωφέλιμα συστατικά. Το μόνο βέβαιο είναι ότι πρέπει ακόμα να γίνουν ακόμα πολλές έρευνες ώστε να αναλυθεί σε βάθος το συγκεκριμένο αντικείμενο. Με τη βοήθεια λοιπόν των ερευνών στο μέλλον σίγουρα υπάρχουν απεριόριστες δυνατότητες και εφαρμογές αξιοποίησης των κούμαρων σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αρβανιτογιάννης Σ. & Μποσνέα Λ. (2001), *Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης & Συσκευασίας Τροφίμων*, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press A.E.
- Αρβανιτογιάννης Σ., Σάνδρου Δ. & Κούρτης Λ. (2001), *Ασφάλεια Τροφίμων*, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press A.E.
- Αρβανιτογιάννης Σ., Βαρζάκας Θ. & Τζίφα Κ. (2008), *Έλεγχος Ποιότητας Τροφίμων*, Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Δημόπουλος Κ. & Αντωνοπούλου Σ. (2009), *Βασική Βιοχημεία (2<sup>η</sup> έκδοση)*, Αθήνα: Εκδόσεις Κ. Δημόπουλος-Σ.Αντωνοπούλου (Αυτοέκδοση)
- Κυριτσάκης Α. (2007), *Ελαιόλαδο(4<sup>η</sup> έκδοση)*, Θεσσαλονίκη: Copy City Digital.
- Μπλούκας , Ι. (2004), *Επεξεργασία και συντήρηση Τροφίμων* , Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Σφλώμος, Κ. (2011), *Χημεία Τροφίμων*, Τόμος 1<sup>ος</sup> (2<sup>η</sup> έκδοση), Αθήνα: Εκδόσεις ΝΟΤΑ
- Τσακίρης, Α. (2014), *Οινολογία (4<sup>η</sup> έκδοση)*, Αθήνα: Εκδόσεις Ψυχάλου

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ayaz F., Kucukislamoglu M. & Reunanen M. (2000), *Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry Tree (Arbutus unedo L. var. ellipsoidea) fruits*, Journal of Food Composition and Analysis, 13, 171-177.
- Carocho M. & Ferreira I. (2012), *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*, Elsevier, Food and chemical toxicology, 51, 15-25.
- Dai J. & Mumper R. (2010), *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*, Molecules, 15, 7313-7352.
- Dehmolaei A. & Vadi M. (2013), *Comparative study of adsorption isotherms of vitamin C on multi wall and single wall carbon nanotube*, Oriental Journal of Chemistry, 30, 233-236.
- Fortalezas S., Tavares L., Pimpão R., Tyagi M., Pontes V., Alves P. et.al (2010), *Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (Arbutus unedo)*, Nutrients, 2, 214-229.
- Hukkanen A., Polonen S., Karenlampi S., & Kokko H. (2006), *Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 112-119.
- Kahkonen M., Hopia A., Vourela H., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T. & Heinonen M. (1999), *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954-3962.
- Khanbabaee K. & Ree T. (2001), *Tannins: classification and definition*, The Royal Society of Chemistry, 18, 641-649.
- Kylli, P. (2011), *Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties*, Academic dissertation, University of Helsinki, Helsinki.
- Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2010), *The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants*, Elsevier, Food Chemistry, 125, 288-306.



- Lohachoompol V., Srzednicki G. & Craske J. (2004), *The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004:5, 248-252.
- Miguel M., Faleiro M., Guerreiro A. & Antunes M. (2014), *Arbutus unedo L.: chemical and biological properties*, Molecules, 19, 15799-15823.
- Oliveira I., Baptista P., Malheiro R, Casal S., Bento A. & Pereira J. (2011), *Influence of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity*, Elsevier, Food Research International, 44, 1401-1407.
- Özyürek M., Güçlü K., Tütem E., Başkan K., Erçağ E. et al. (2011), *A comprehensive review of CUPRAC methodology*, Analytical Methods, 3, 2439-2453.
- Padayatty S., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O. et al. (2003), *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*, Journal of the American College of Nutrition, 22, 18-35.
- Pallauf K., Rivas-Gonzalo J.C., Castilloc M.D., Canob M.P. & Pascual-Teresa S. (2007), *Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruits*, Elsevier, Journal of Food Composition and Analysis, 21, 273-281.
- Pantelidis G., Vasilakakis M., Manganaris G. & Diamantidis Gr. (2006), *Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries*, Elsevier, Food Chemistry, 102, 777-783.
- Prior R., Wu X. & 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, 4290-4302.
- Pyrzyńska K. & Pękal A. (2013), *Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples*, Analytical Methods, 5, 4288-4295.
- Riihinen, K. (2005), *Phenolic compounds in berries*, Doctoral dissertation, University of Kuopio, Kuopio.
- Schofield P., Mbugua D.M. & Pell A.N. (2001), *Analysis of condensed tannins: a review*, Elsevier, Animal Feed Science and Technology, 91, 21-40.

- Sun B., Ricardo-da-Silva J. & Spranger I. (1998), *Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, *46*, 4267-4274.
- Wada L. & Ou B., *Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries* (2002), Journal of Agricultural and Food Chemistry, *50*, 3495-3500.
- Yan R., Cao Y. & Yang B. (2014), *HPLC-DPPH Screening method for evaluation of antioxidant compounds extracted from semen oroxyli*, Molecules, *19*, 4409-4417.