

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Α-
ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΤΟΜΑΤΑΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΗΜΑΙΟΦΟΡΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Α-
ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΤΟΜΑΤΑΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΗΜΑΙΟΦΟΡΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ



Επιβλέπων: Ιωακείμ Σπηλιόπουλος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

«ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ

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

Υπογραφή

ΣΗΜΑΙΟΦΟΡΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

5-10-2016

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
Συστατικά τμήματα.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΤΙΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1 Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	17
1.2 Μέθοδοι αντιοξειδωτικής ικανότητας:.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	21
2.1 ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	21
2.1.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα καροτενοειδών.....	22
2.1.2 Προετοιμασία και Καθαρισμός Καροτενοειδών	24
2.1.3 Προσδιορισμός Καροτενοειδών Με Χρωματογραφία.....	25
2.2 Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ	26
2.3 ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α.....	26
2.4 ΛΥΚΟΠΕΝΙΟ	27
2.4.1 Μέθοδος εκτίμησης λυκοπενίου	29
2.4.2 Φασματοσκοπικός Προσδιορισμός Λυκοπενίου	29
2.5 Συνέμφυμο Q10.....	29
2.6 ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	30
2.7 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	31
2.7.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	32
2.7.2 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	33
2.7.3 Ταννινες.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	36
3.1 Μηχανισμός Αυτοοξειδωσης	36
3.2 Διάγραμμα αντιδράσεων	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ.....	39
4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΚΑΙ Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ	40
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας κύριο Ιωακείμ Σπηλιόπουλο για την καθοδήγηση του, την υπομονή του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και τη βοήθεια του στο να γραφτεί η παρούσα πτυχιακή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου οι οποίοι με στήριξαν και με ενθάρρυναν καθ' όλη τη διάρκεια της σπουδαστικής μου πορείας. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον παππού μου ο οποίος βοήθησε και ήταν ο κύριος παράγοντας στην υλοποίηση του δικού μου αυτού του στόχου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετές χρόνιες ασθένειες αλλά και η γήρανση του ανθρώπινου οργανισμού μπορούν να αντιμετωπιστούν με διαφόρων ειδών αντιοξειδωτικά. Μερικές από τις κατηγορίες αυτών των αντιοξειδωτικών είναι το β-καροτένιο (το οποίο αλληλεπιδρά με ελεύθερες ρίζες και προστατεύει τους φωτοευαίσθητους ανθρώπους), η βιταμίνη Α (η οποία παράγεται στο ήπαρ), το λυκοπένιο το οποίο και δίνει το κόκκινο αυτό χρώμα της τομάτας, το Q10 που αναπλάθει βιταμίνη E, η βιταμίνη E και μεταλλικά. Οι παραπάνω ενώσεις ανήκουν στα καροτενοειδή.

Μια άλλη κατηγορία αντιοξειδωτικών είναι οι πολυφαινόλες οι οποίες περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα τα οποία μειώνουν το οξειδωτικό στρές, τα φλαβονοειδή που έχουν αντικαρκινική δράση και οι τανίνες.

Η συγκεκριμένη πτυχιακή αναφέρεται σε πειραματική έρευνα που έγινε σε διάφορες ποικιλίες τομάτας για να μετρηθεί η συγκέντρωση λυκοπενίου και το β-καροτενίου. Η τομάτα έρχεται δεύτερη παγκοσμίως σε κατανάλωση και θεωρείται ότι συμβάλλει στην υγιεινή διατροφή αλλά κι ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες.

Στην πειραματική αυτή έρευνα χρησιμοποιήθηκαν: η φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του λυκοπενίου και η φωτομετρική μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού λυκοπενίου και β-καροτενίου.

Λέξεις κλειδιά: τομάτα, λυκοπένιο, αντιοξειδωτικά, φωτομετρικός προσδιορισμός

ABSTRACT

Several chronic diseases and aging of the human body can be treated with various antioxidants. Some of the classes of such antioxidant is beta carotene (which interacts with free radicals and protecting the photosensitive humans), vitamin A (which is produced in the liver), lycopene which gives the red color in tomato, the Q10 which regenerates vitamin E, vitamin C and minerals. The above compounds are the carotenoids.

Another category of antioxidants are the polyphenols which include phenolic acids that reduce oxidative stress, flavonoids have anti-cancer activity and tannins.

This project presents an experimental research conducted in different tomato varieties to measure the concentration of lycopene and beta-carotene. The tomato is second worldwide in consumption and is thought to contribute to healthy eating but also to have anticancer properties.

In this pilot study were used: the photometric method for determining the lycopene and photometric method of simultaneous determination of lycopene and beta-carotene.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Γενικά χαρακτηριστικά της τομάτας

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

Μια μεσαίου μεγέθους τομάτα περιέχει το 47% βιταμίνης C και 22% βιταμίνης A που χρειάζεται ημερησίως ο ανθρώπινος οργανισμός. Το λυκοπένιο που υπάρχει στη τομάτα και είναι πηγή διαιτητικών είναι το βασικό κόκκινο καροτενοειδές της τομάτας κι έχει αρκετά υψηλή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με β-καροτένιο και ασταξανθίνη.

Η γεύση αυτή που ξεχωρίζει τη τομάτα είναι ένα μείγμα σακχάρων, οξέων, αμινοξέων, μετάλλων και πτητικών ενώσεων. Ο γονότυπος, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και οι πολιτιστικές συνθήκες συμβάλλουν στην ποσότητα και την ποιότητα των φωτοχημικών ενώσεων. Στη συγκομιδή ωστόσο το στάδιο ωριμότητας αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα γεύσης και ποιότητας της τομάτας διότι κατά την ωρίμανση αυξάνονται οι αρωματικές πτητικές ουσίες.

Τα πτητικά της τομάτας χωρίζονται σε έξι ομάδες: παράγωγα λιπιδίων, συνδεδεμένα καροτενοειδή, παράγωγα αμινο-οξέων, παράγωγα υδατανθράκων και συνδεδεμένα τερπενοειδή και λιγνίνες. Έχουν βρεθεί πάνω από 400 πτητικές ουσίες μετά από μελέτες αλλά μικρός αριθμός από αυτά συμβάλλουν στη γεύση της τομάτας, μερικά από αυτά είναι η ακεταλδεΐδη, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, ενανάλη, 2-μεθυλοβουτανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη.

Για την εκχύλιση πτητικών ενώσεων χρησιμοποιείται δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου ή εκχύλιση διαλύτη. Μια νέα τεχνική είναι η ITEX που χρησιμοποιείται για εκχύλιση από διαφορετικές μήτρες. Είναι τεχνική που μοιάζει με τα συστήματα εξάχνισης και παγίδας. Μετά την εξαγωγή του μεταβολίτη με ITEX μέθοδο γίνεται αέρια χρωματογραφία. Ο μεταβολίτης από τον υπερκείμενο χώρο πάνω από το υλικό του φυτού που εξάχθηκε κατακρεμνίζεται σε ιόντα που ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας. Αυτό το μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα έπειτα ταυτοποιείται.(Socasi, 2013)

Οι κύριες χώρες που παράγεται η τομάτα είναι οι Κίνα, Η.Π.Α, Τουρκία. Με βάση τη βοτανολογία η τομάτα είναι φρούτο μούρο και καλλιεργείται σαν λαχανικό. Υπάρχουν πολλά είδη, άρα η σύνθεση της διαφέρει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης, το κλίμα, το χρόνο ανάπτυξης και τις συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης. Είναι η πιο σημαντική πηγή λυκοπενίου. Η φαινολική ένωση χλωρογενικό οξύ που υπάρχει στις τομάτες έχει ηπατοπροστατευτική, αντιϊική και υπογλυκαιμική ικανότητα.(Slimestad, 2009)

Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση της τομάτας αλλά και των προϊόντων τομάτας έχει αυξηθεί. Χυμοί τομάτας, κέτσαπ έχουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και σχηματίζουν λειτουργίες κυτταρικού ενζύμου κι αυτό οφείλεται σε βασικές ενώσεις. Οι πολυφαινόλες λειτουργούν ως προστάτες της υγείας κι εφόσον υπάρχουν στη τομάτα αυτή θεωρείται βασικό συστατικό υγιεινής διατροφής.

Λόγω των διαφόρων ποικιλιών τομάτας που υπάρχουν οι πολυφαινόλες και κατ' επέκταση η περιεκτικότητά τους διαφέρει σημαντικά στις διάφορες ποικιλίες. Επίσης παράγοντας που συμβάλλει στην ποιότητα της τομάτας είναι η θερμική επεξεργασία και οι συνθήκες αποθήκευσης. Μελέτες μάλιστα έδειξαν ότι οι συνθήκες αποθήκευσης δημιουργούν ζημίες στο λυκοπένιο και στο ασκορβικό οξύ. Μπορεί να συμβεί αμαύρωση κι έτσι να υποβιβαστούν τα προϊόντα που έχουν ως βάση τη τομάτα.(Vallverdu-Queralt, 2011)

Πιο συγκεκριμένα η τομάτα η οποία επεξεργάζεται σε βιομηχανικό επίπεδο υπόκειται σε ξήρανση, παστερίωση, θέρμανση και άλλες διεργασίες έτσι ώστε να αδρανοποιηθούν ένζυμα και μικροοργανισμοί. Ωστόσο με αυτές τις θερμικές επεξεργασίες ξεχωρίζει το δέρμα από το σώμα του φρούτου, μειώνεται η υγρασία του, συμπυκνώνεται και μαλακώνει ο ιστός του. Παρ' όλα αυτά όμως κατά την επεξεργασία αυτή μπορεί να υπάρξουν αλλαγές σε χρώμα, δομή, γεύση και άλλα χαρακτηριστικά του φρούτου. Η περιεκτικότητα λυκοπενίου το οποίο είναι βασικό αντιοξειδωτικό αλλά και άλλα καροτενοειδή μειώνεται κατά τη θερμική επεξεργασία. Με επεξεργασίες όπως ο ατμός, τα μικροκύματα βελτιώνονται οι αντιοξειδωτικές ικανότητες και οι θρεπτικές ιδιότητες της τομάτας. Η βιταμίνη C καταστρέφεται όταν το φρούτο δέχεται θερμική επεξεργασία λόγω αντιδράσεων οξείδωσης και της θερμότητας που εφαρμόζεται με τον αέρα, το οξυγόνο με τέτοιες θερμοκρασίες οδηγεί σε οξειδωτικό στρες. (Caranoglu, 2010)

Η τομάτα δεν παθαίνει απόπτωση, είναι φρούτο πλαδαρό και περιέχει σπόρους. Οι κύριες ποικιλίες τομάτας στο εμπόριο έχουν σφαιρικό σχήμα, όμως μερικές ποικιλίες μπορεί να έχουν επιμηκυμένο σχήμα που μοιάζει με αυτό του αχλαδιού. Το βάρος της τομάτας κυμαίνεται στο 56,7 έως 170,1 ή 198,45 g για επιτραπέζιες ποικιλίες τομάτας και 255,15-340,2 g για κονσερβοποιήσιμες ποικιλίες. Διατομώντας την τομάτα, φαίνεται ότι ο καρπός έχει 2-25 κοιλότητες.

Η ποιότητα της εξαρτάται από τις ποσότητες ιστού που υπάρχουν εσωτερικά και εξωτερικά των τοιχωμάτων. Η τομάτα μπορεί να χωριστεί σε πέντε τμήματα: εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα, εσωτερική κοιλότητα ιστού, ζελατινώδη χαρτοπολτό, σπόρια και δέρμα. Αυτά τα τμήματα συμβάλουν στην ποιότητα της τομάτας διότι έχουν περισσότερα διαλυτά στερεά, αναγωγικά σάκχαρα και ξηρή ύλη.

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

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

Είτε μετά από επεξεργασία, είτε φρέσκια η τομάτα περιέχει ποικιλία βιταμινών, μετάλλων και δευτεροβάθμιων φυτοχημικών όπως καροτενοειδή, ανθοκυανίνες κι άλλες φαινολικές ενώσεις.

Συστατικά τομάτας

Σάκχαρα

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

Άμυλο

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

Πηκτίνες

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

Ασκορβικό οξύ

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

Οργανικά οξέα

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

Αμινοξέα

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

Πρωτεΐνες και ένζυμα

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

Στερεοειδή

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

Χρωστικές ουσίες

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

Φλαβονοειδή

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

Λιπίδια

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

Μεταλλικά ιόντα

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

Η αντιοξειδωτική ικανότητα της τομάτας ανάλογα με τον τύπο και τις συνθήκες επεξεργασίας μπορεί να αλλάξει. Παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων που υπάρχουν στη τομάτα και στα προϊόντα της, τα οποία έχουν πολύτιμα στοιχεία για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου. Οι μέθοδοι για την αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών *in vivo* δίνουν άμεσα δεδομένα βιοδιαθεσιμότητας και χρησιμοποιούνται για μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Τα μειονεκτήματα είναι η μεταβλητότητα ατόμων σε φυσιολογική κατάσταση και η αλληλεπίδραση των θρεπτικών συστατικών με άλλα συστατικά στη διατροφή. (Kamiloglu, 2012)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΤΙΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζωή ξεκινά από την παιδική ηλικία και με το πέρασμα των χρόνων φτάνει στα γηρατειά και τελικά στο θάνατο. Οι ηλικιωμένοι που σύμφωνα με έρευνες θα αυξηθούν πληθυσμιακά στο μέλλον προσβάλλονται από ασθένειες της καρδιάς καθώς κι από χρόνιες παθήσεις. Ωστόσο η διαδικασία της γήρανσης μπορεί να επιβραδυνθεί με διάφορα αντιοξειδωτικά.

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

ROS είναι οι ενώσεις οξυγόνου οι οποίες έχουν ελεύθερες ρίζες όπως το ανιόν υπεροξειδίου, υδροπéροξυλ ρίζα, ρίζα υδροξυλίου, και άλλα. RNS είναι αντιδραστήρια ειδών αζώτου που προέρχονται από αντιδράσεις NO με O_2^- και σχηματίζουν ONOO⁻. Ο μηχανισμός διαμόρφωσης ONOO⁻ είναι $NO \cdot + O_2^- \cdot$. RSS είναι ενώσεις θείου και σχηματίζονται από την αντίδραση του ROS μεθειόλες. Υπό οξειδωτικές συνθήκες προέρχονται απόθειόλες και δημιουργούν δισουλφίδιο-S-μονοξειδίο ή δισουλφίδιο-S-διοξειδίο ως ενδιάμεσο μόριο. Τέλος μια αντίδραση με μειωμένηθειόλη οδηγεί σε δημιουργίαθειϊκού ήθειϊκού οξέος.

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

Οι εσωτερικοί παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών είναι η παραγωγή τους μέσα στο μιτοχόνδριο λόγω οξειδάσης της ξανθίνης, ισχαιμίας, σωματικής

άσκησης, φαγοκυττάρωσης και άλλων. Υπάρχουν όμως και εξωτερικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα, ακτινοβολία, φυτοφάρμακα, περιβαλλοντικοί ρύποι και άλλα. Τα κύτταρα παρουσιάζουν συνέπειες οξειδωτικού στρές κυρίως όταν η ισορροπία παραγωγής και εξουδετέρωσης ROS με αντιοξειδωτικά κλείνει προς αυξημένη παραγωγή ROS.

1.1 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για να δημιουργηθεί ένα πρότυπο μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης με φυσικά αντιοξειδωτικά. Οι ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα είναι καθαρές για να αντέξουν τις όποιες συνθήκες αλλά και θεραπείες όπως και να αντέξουν περισσότερο πάνω στο ράφι.

Τα ΒΗΤ(βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) και ΒΗΑ(υδροξανισόλη) είναι τα πιο γνωστά χημικά αντιοξειδωτικά. Το ΤΒΗQ(τριτ-βουτυλδροκινόνη) που βοηθά στη διατήρηση της θρεπτικής αξίας, χρώματος και αρώματος της τροφής των ζώων. Ο Οκτυλεστέρας ο οποίος μετά την κατανάλωση υδρολύεται σε γαλλικό οξύ και οκτανόλη που υπάρχουν σε πολλά φυτά και είναι ακίνδυνα για τον άνθρωπο. Και τέλος το ΝDGA(νορδιυδρογοναιαρετικό οξύ). (Carocho, 2012)

1.2 Μέθοδοι αντιοξειδωτικής ικανότητας:

- Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη βοήθεια του DPPH (2,2 διφαινύλ-1-πικρύλ υδραζύλιο). Είναι μια οικονομική και απλή μέθοδος και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται αρκετά συχνά. Σε αυτή τη μέθοδο ποσότητα DPPH σε μεθανόλη επωάζονται. Στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι επωάζονται για 20 λεπτά και μετριέται η απορρόφηση τους. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ και όπως σε όλες τις πειραματικές μεθόδους η κάθε μέτρηση γίνεται 3 φορές. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι βιολογικές τομάτες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών από ότι οι συμβατικές.

- Λεύκανση β-καροτενίου. Για να πραγματοποιηθεί η λεύκανση β-καροτενίου ποσότητα αυτού αναμειγνύονται με λινελαϊκό οξύ, Tween 20(μη ιονικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοχημικές εφαρμογές) και χλωροφόρμιο το οποίο εξατμίζεται. Έπειτα συμπληρώνεται οξυγονομένο νερό και σε ποσότητα του παραγόμενου αυτού γαλακτώματος προστίθεται δείγμα δοκιμής. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και αφήνονται σε λουτρό νερού 50⁰ C. Οι μετρήσεις ξεκινώντας από το μηδέν γίνονται ανά 30 λεπτά μέχρι να συμπληρωθούν 2 ώρες ή μέχρι να εξαφανιστεί το χρώμα του β-καροτενίου. Εδώ τα αποτελέσματα μας φέρνουν στο συμπέρασμα ότι οι βιολογικές τομάτες έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις συμβατικές τομάτες.

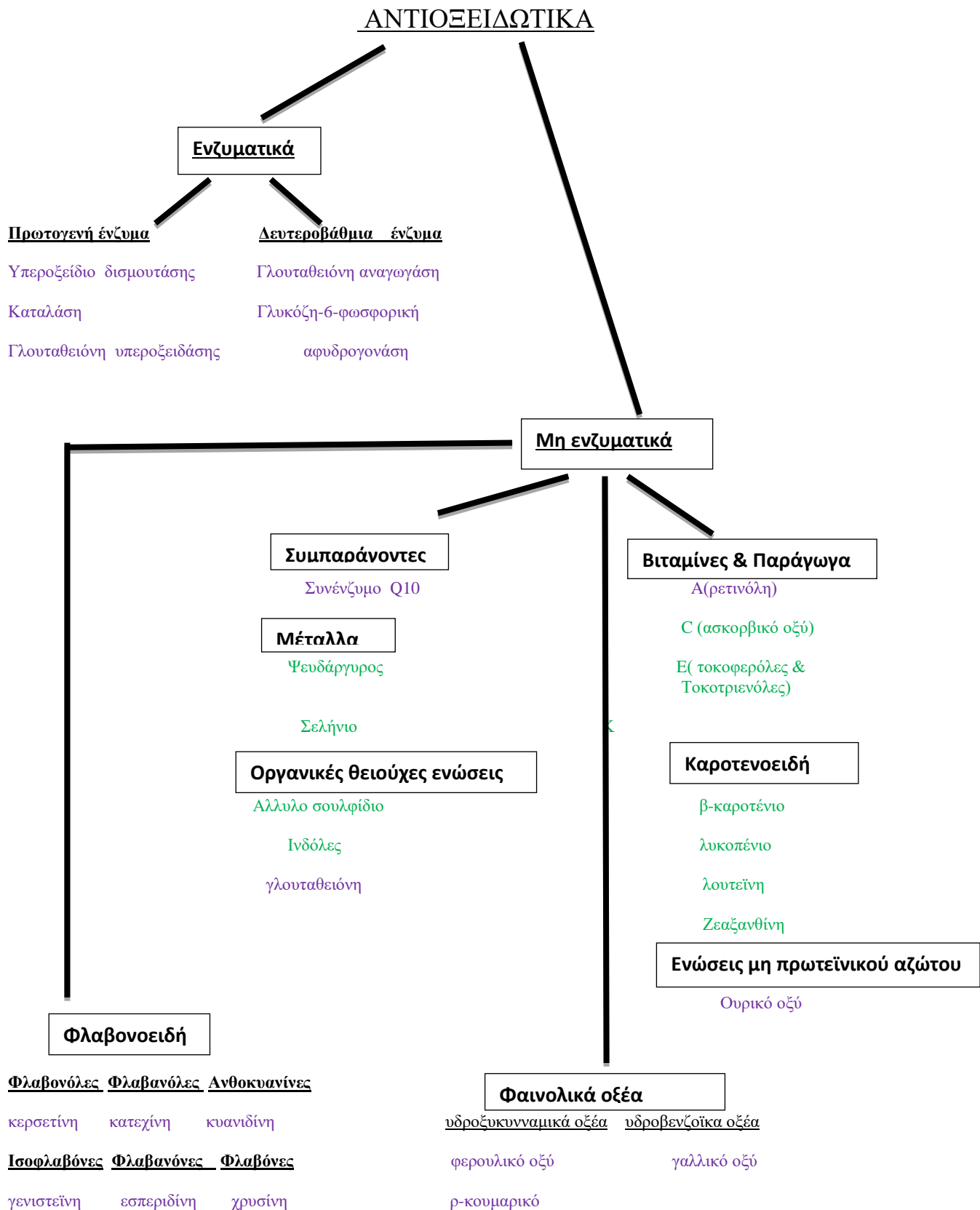
- Σύστημα θειοκυανικού με γαλάκτωμα λινελαϊκού οξέως. Λινελαϊκό οξύ με Tween 20(μη ιονικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται σε βιοχημικές εφαρμογές) και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα αναμειγνύονται. Σε αυτό το γαλάκτωμα που προκύπτει συμπληρώνεται το δείγμα δοκιμής και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και επωάζονται για 120 ώρες στους 37⁰ C. Ως πρότυπο χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ. Κάθε 24 ώρες λαμβάνονται δεδομένα μέτρησης αιθανόλης με θειοκυανικό αμμώνιο και το παραπάνω μείγμα με σιδηρούχο χλώριο αφήνονται για 3 λεπτά και φωτομετρούνται. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο στις βιολογικές όσο και στις συμβατικές τομάτες η ικανότητα αναστολής σχηματισμού του υπεροξειδίου είναι υψηλή.

- Αντιοξειδωτική δύναμη αναγωγικού σιδήρου. Το αντιδραστήριο FRAP περιέχει ρυθμιστικό οξικό, TPTZ σε υδροχλωρικό οξύ και χλωριούχο σίδηρο σε υδροχλωρικό οξύ. Αυτό είναι το αντιδραστήριο το οποίο αναμειγνύεται με το δείγμα τομάτας. Γίνονται αρχικά μετρήσεις χωρίς το δείγμα ή TPTZ για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να επιδράσουν οι συγκεκριμένες ενώσεις. Έτσι λοιπόν το αντιδραστήριο προθερμαίνεται στους 30⁰ C κι εκεί μετριέται η απορρόφηση με τυφλό ρυθμιστικό διαλύματος οξικού. Έπειτα ανακινείται για 15 δευτερόλεπτα και μένει στους 27⁰ C για 90 λεπτά. Μέγιστη απορρόφηση σημαίνει μεγάλη δύναμη αναγωγικού σιδήρου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως ισχύ ισοδύναμου Trolox.

Οι βιολογικές τομάτες έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις συμβατικές.(Kanabur, 2014)

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

Τα δευτεροβάθμια ένζυμα περιλαμβάνουν την γλουταθειόνη αναγωγάσης και την γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση. Η γλουταθειόνη αναγωγάσης μειώνει τη γλουταθειόνη ως αντιοξειδωτικό και άρα μειώνει τη μορφή της. Επίσης η ανακύκλωσή του εξουδετερώνει πιο πολλές ελεύθερες ρίζες. Η γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση αναγεννά NADPH (συνένζυμο αναβολικών αντιδράσεων) κι έτσι δημιουργεί αναγωγικό περιβάλλον. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει αναλυτικά τις κατηγορίες των αντιοξειδωτικών.(Carocho, 2012)



Εικόνα 1. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται οι κατηγορίες των αντιοξειδωτικών. Με μώβ γράμματα είναι τα εξωγενή αντιοξειδωτικά και με πράσινα τα ενδογενή αντιοξειδωτικά. (Carocho, 2012)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

2.1 ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ

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

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

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

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

2.1.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα καροτενοειδών

Η παρασκευή ριζών κατιόντος ABTS⁺ γίνεται με το πέρασμα υδατικού διαλύματος ABTS (2,2'-αζινοδις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6 σουλφονικό άλας διαμμώνιου οξέος) μέσω διοξειδίου του μαγγανίου σε Whatman διηθητικό χαρτί. Η περίσσεια μαγγανίου αφαιρείται μέσω φίλτρου σύριγγας Whatman. Έπειτα το διάλυμα αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS προς απορρόφηση στα 734 nm και προ-επωάστηκαν στους 30 °C πριν να χρησιμοποιηθούν.




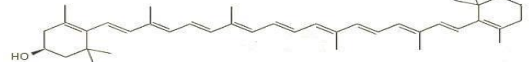
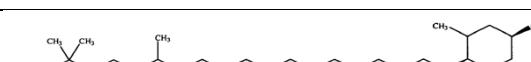

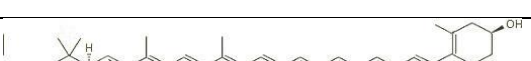

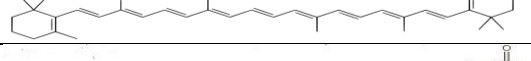
Ως αντιοξειδωτικό πρότυπο για τη δοκιμασία της μυοσφαιρίνης ferryl/ ABTS χρησιμοποιήθηκε το Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ). Trolox παρασκευάζονται σε PBS για χρήση ως πρότυπο αποθεμάτων. Σε αυτές τις συνθήκες η διαλυτότητα του Trolox σε PBS προσεγγίζεται και απαλοί υπέρηχοι χρησιμοποιούνται για να διαλυθούν οι κρυστάλλοι. Νέα πρότυπα φτιάχνονται κάθε μέρα με αραιώση Trolox σε PBS.

Τα καροτενοειδή λαμβάνονται όλα εκτός από ασταξανθίνη. Ήταν καθαρά με HPLC κατά 97% εκτός από ασταξανθίνη 100%. Έπειτα τα καροτενοειδή διαλύονται σε ακετόνη και αραιώνονται σε 90% εξάνιο/10% ακετόνη.

Η μοριακή απορροφητικότητα μετριέται μεταξύ 444nm-480nm. Μετά από προσθήκη διαλύματος ABTS⁺ σε κλάσματα Trolox ή διαλύματα καροτενοειδών και αναμειγνύονται σε δίνη για 30 λεπτά. Η απορρόφηση στα 734 nm λαμβάνεται ένα λεπτό πριν την έναρξη της ανάμειξης σε φασματοφωτόμετρο Beckman με ηλεκτρονικά Peltier ορίζεται στους 30°C.

PBS τυφλό και εξάνιο/ακετόνη τυφλό έτρεξαν σε κάθε δοκιμασία. Η καμπύλη δόσης-απόκρισης για Trolox αποτελείται από τον σχεδιασμό της απορρόφησης στα 734nm(ως ποσοστό της απορρόφησης της ανεμπόδιστης ρίζας κατιόντος) και βασίζεται σε τριπλούς προσδιορισμούς. Τα καροτενοειδή αξιολογούνται σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και κάθε ένωση αναλύθηκε εις τριπλούν. Έτσι προήλθε η αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox για κάθε ένωση. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει την αντιοξειδωτική ικανότητα μετρημένη σε TEAC των καροτενοειδών. (Miller, 1996)

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

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

2.1.2 Προετοιμασία και Καθαρισμός Καροτενοειδών

Στην ανάλυση των καροτενοειδών ένα από τα βασικά προβλήματα είναι η έλλειψη διαθεσιμότητας των κατάλληλων πρότυπων ενώσεων. Λόγω της ποικιλομορφίας, της αστάθειας και της παρουσίας ισομερών αυτής της ομάδας ενώσεων τις κάνει δυσεύρετες στο εμπόριο. Μερικά πιο κοινά καροτενοειδή είναι το β-καροτένιο, η λουτεΐνη, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη και πιο σπάνια η καψανθίνη, η καρορομπίνη και άλλες οι οποίες μπορούν να βρεθούν στο εμπόριο. Παρ' όλα αυτά δεν αρκεί να βρούμε αυτά τα καροτενοειδή στο εμπόριο αλλά και να είναι καθαρά για ένα χρωματογραφικό επίπεδο κι έτσι χρειάζονται επιπλέον στάδια καθαρισμού.

Στα πρότυπα καροτενοειδών γινόταν παραδοσιακά αυτοσχέδια προετοιμασία όπου από φρούτα και λαχανικά με μια διαδικασία καθαρισμού λαμβάνονται πρότυπα παρασκευάσματα από τα δείγματα των πιο σημαντικών καροτενοειδών. Κάποιες από τις μεθόδους για καθαρά πρότυπα καροτενοειδών είναι ο διαχωρισμός φάσεων, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και χρωματογραφία υγρού (LC) αλλά και η HPLC η οποία είναι η πιο συχνή στις μέρες μας.

Για να ληφθεί αρκετά καθαρό διάλυμα καροτενοειδών πρέπει να γίνουν δύο ή και τρία στάδια καθαρισμού τα οποία είναι η σαπωνοποίηση, ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση. Χρησιμοποιούνται πηγές καροτενοειδών όπως πράσινο λάχανο που δίνει νεοξανθίνη, σπανάκι που δίνει βιολαξανθίνη, γεώμηλα που δίνουν ανθεραξανθίνη, πάπρικα που δίνει καρορομπίνη και άλλες. Για να προσδιορίσουμε τα ποσοτικά ατομικά καροτενοειδή που καθαρίστηκαν χρησιμοποιούμε τα φασματοφωτομετρικά χαρακτηριστικά τους. Η φασματοφωτομετρία και η HPLC εξασφαλίζουν το βαθμό καθαρότητας του πρότυπου διαλύματος για λόγους εμπορικούς και προετοιμασίας καθαρισμένων προτύπων.

Η παρασκευαστική μέθοδος HPLC σε αντίθεση με την αναλυτική γίνεται με χρήση στηλών με μεγαλύτερο μέγεθος σωματίδια στατικής φάσης και στηλών με μεγαλύτερο ρυθμό ροής (7 ή 10 μ m). Πρέπει ωστόσο να λαμβάνονται κάποιες προφυλάξεις για να μην παρουσιαστεί υποβάθμιση ή ισομερισμός καθαρών χρωστικών ουσιών. Οι συνθήκες παρασκευής και αποθήκευσης στο σκοτάδι αποθεματικού διαλύματος είναι 22 °C, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και χρήση διαλυτών με αντιοξειδωτικά. Το πρότυπο διάλυμα παράγεται από αραιώση διαλύματος αποθέματος με κατάλληλο διαλύτη και να μετρηθεί η συγκέντρωση με φασματομετρία. Η καθαρότητα επιβεβαιώνεται με HPLC.(Oliver, 2000)

2.1.3 Προσδιορισμός Καροτενοειδών Με Χρωματογραφία

Οι περισσότεροι μέθοδοι χρωματογραφίας έχουν αντικατασταθεί από την HPLC, η οποία είναι πιο γρήγορη, δεν καταστρέφει και αυτοματοποιεί εύκολα τις τεχνικές αυτές. Τα HPLC χρωματογραφήματα είναι πιο συμπαγή, ακριβή, με απλή χρήση και αυτοματοποιημένα. Έχουν λογισμικό για τον έλεγχο των παραμέτρων της συσκευής ώστε αυτόματα και ταυτόχρονα με τα χρωματογραφήματα να γίνεται η σύμπτυξη δεδομένων και ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων. Οι ανιχνευτές έχουν υψηλή ευαισθησία και ηλεκτρική ακρίβεια και χρησιμοποιούνται σε ευρύ φάσμα μήκους κύματος το οποίο μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας.

Τα συστήματα DAD έχουν ανιχνευτές για τον διαχωρισμό HPLC ενώσεων με χαρακτηριστική απορρόφηση, όπως καροτενοειδή. Αυτά καταγράφουν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης φασματική περιοχή 190-800nm

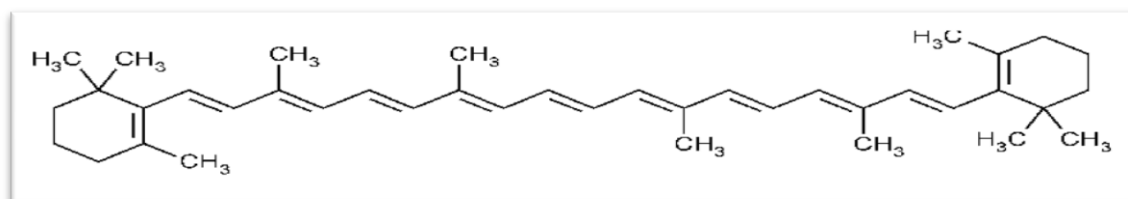
Η GS αέρια χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από αστάθεια και χαμηλή πτητικότητα για αυτό δεν είναι κατάλληλη για ανάλυση καροτενοειδών. Είναι επέκταση της φασματομετρίας μάζας (MS). Μια νέα μέθοδος με δύο διαφορετικούς ανιχνευτές MS δοκιμάζονται για καροτενοειδή. Δηλαδή LC-ιονισμός ηλεκτροψεκασμού MS(ESI) και LC-ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης MS(APCI).(Oliver, 2000)

2.2 Β-KAROTENIO

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

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

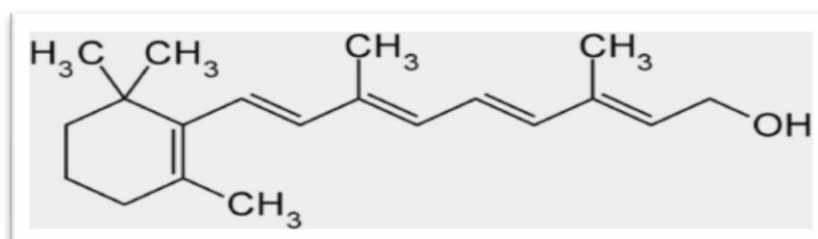
Στις in vitro μελέτες έδειξαν ότι το λυκοπένιο και η απορρόφηση του ενισχύεται από την θερμική επεξεργασία και η απορρόφηση β-καροτενίου αυξήθηκαν με επεξεργασία υψηλής πίεσης.(Miller, 1996; Kamiloglu 2012)



Εικόνα 2 . Χημική δομή β -καροτενίου.(BiotechnemiNano, 2011)

2.3 BITAMINH A

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



Εικόνα 3. Χημική δομή βιταμίνης Α.(Belitz et.al, 2009)

2.4 ΛΥΚΟΠΕΝΙΟ

Το λυκοπένιο είναι συμμετρικό, γραμμικό και μη κυκλικό καροτενοειδές του β-καροτενίου κι έχει δεκατρείς διπλούς δεσμούς. Οι έντεκα από αυτούς είναι συζευγμένοι σε κάθε άκρο. Αυτοί οι διπλοί δεσμοί βρίσκονται στην αλυσίδα πολυενίου του λυκοπενίου. Χωρίζεται σε δύο μορφές με αποτέλεσμα να δημιουργούνται χιλιάδες ισομερή.

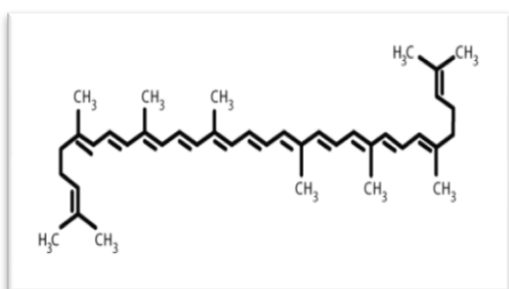
Τα trans λυκοπενίου μετατρέπονται σε cis-ισομερή λόγω φωτός ή θερμότητας ή κάποιας χημικής αντίδρασης που εισέρχεται πλαγίως κατά μήκος του συζευγμένου διπλού δεσμού. Το λυκοπένιο μαζί με λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας μεταφέρονται σε ιστούς του ήπατος, του προστάτη και άλλων οργάνων.

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

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

Ωστόσο η παρουσία ιών στη διατροφή μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου αλλά και άλλων καροτενοειδών. Επειδή το λυκοπένιο έχει λιπόφιλη ιδιότητα μετά την κατανάλωση του ενσωματώνεται σε μικύλλια τα οποία είναι ανακατεμένα και μέσω παθητικής διάχυσης απορροφούνται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.

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



Εικόνα 4. Χημική δομή λυκοπενίου.(BiotechemiNano, 2011)

2.4.1 Μέθοδος εκτίμησης λυκοπενίου

Το λυκοπένιο εκχυλίζεται από τομάτες με εξάνιο, μεθανόλη, ακετόνη, 2:1:1 που περιέχει 2,5% BHT. Η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος εξανίου μετριέται στα 502nm φασματοφωτομετρικά έναντι τυφλού εξανίου. Ο συντελεστής απόσβεσης (E%) 3150 συντελεί στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του λυκοπενίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ppm(μέρη ανά εκατομμύριο) λυκοπενίου ως μέσω \pm SEM (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης). Για να επικυρωθεί η φασματοφωτομετρία γίνεται και HPLC με στήλη αναστροφής φάσης C18 (Vydec 201H554, Στήλη, Separations Group) και ανιχνευτή απορρόφησης (60). Το λυκοπένιο ποσοτικοποιήθηκε από HPLC χρησιμοποιώντας καθαρό πρότυπο λυκοπενίου (Sigma Chemical Co.).(Rao, 1998)

2.4.2 Φασματοσκοπικός Προσδιορισμός Λυκοπενίου

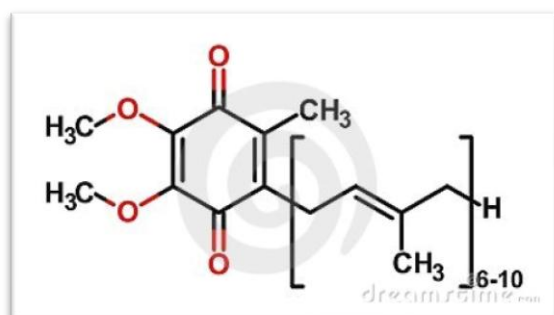
Με μέθοδο των Sharma και Le Maguer έγινε εκχύλιση λυκοπενίου σε τομάτες με εξάνιο:αιθανόλη:ακετόνη (2:1:1). Έπειτα 1 g δείγματος ομογενοποιήθηκε και 25 ml εξανίου:αιθανόλης:ακετόνης και τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναμεικτήρα για 30 λεπτά. Το διάλυμα αφήνεται να χωριστεί σε πολικά και μη πολικά στρώματα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

2.5 Συνέζυμο Q10

Στις μεμβράνες αλλά και στα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος υπάρχει το συνέζυμο Q10, το οποίο συμβάλλει στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην αναπνευστική αλυσίδα. Επίσης το Q10 εμποδίζει τις λιπιδικές ρίζες υπεροξειδίου να δημιουργηθούν, αν και έχει ειπωθεί ότι μπορεί να εξαφανίσει αυτές τις ρίζες ακόμα κι αν αυτές έχουν ήδη δημιουργηθεί.

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

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

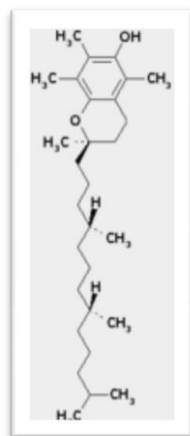


Εικόνα 5. Χημική δομή Q10.(Πωρίας, 2015)

2.6 ΒΙΤΑΜΙΝΗ E

Η βιταμίνη E (τοκοφερόλες) έχει οκτώ ισομορφές με τέσσερις τοκοφερόλες και τέσσερις τοκοτριενόλες. Η αντιοξειδωτική δράση βρίσκεται στην ομάδα κεφαλής χρωμανίου. Ωστόσο καταστέλλει την υπεροξειδωση λιπιδίων δίνοντας το φαινολικό υδρογόνο του σε ρίζες υπεροξειδίου οι οποίες δημιουργούν ρίζες τοκοφερόλης που όμως δεν είναι χημικά ενεργές και ικανές για οξειδωτική αλυσιδωτή αντίδραση. Είναι κύρια λιποδιαλύτης, προφυλάσσει τις δομές των λιπιδίων και τις μεμβράνες διαλύοντας την αλυσίδα αντιοξειδωτικού που διαλύει αλυσίδες και περιέχεται στο πλάσμα. (Carocho, 2012)

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



Εικόνα 6. Χημική δομή βιταμίνης E.(Belitz et.al, 2009)

2.7 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

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

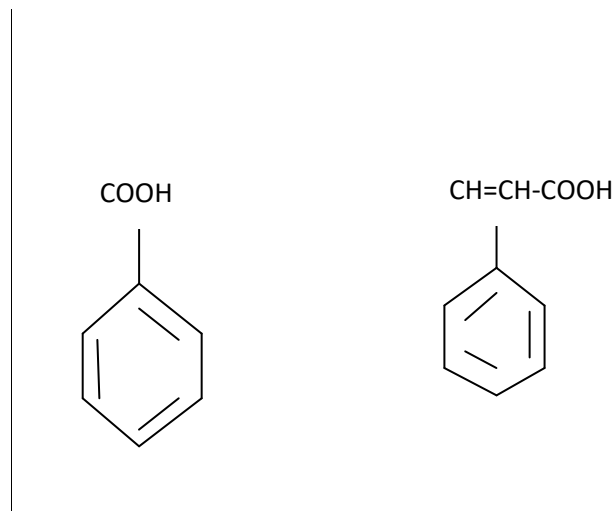
Υπάρχουν περιβαλλοντικοί, χημικοί, φυσικοί, μεταβολικοί και γενετικοί παράγοντες που συντελούν στον καρκίνο οι οποίοι υποβαθμίζουν ή επάγουν, έμμεσα ή άμεσα τον καρκίνο. Διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στη μείωση των μορφών καρκίνων και στην πρόληψη θνησιμότητας τους. Συνεπώς η μελέτη αυτών των αντιοξειδωτικών τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική και επιτακτική. Τα αντιοξειδωτικά έχουν και βιολογικές δράσεις που αφορούν την διάπλαση καρκινογένεσης.

2.7.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

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

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

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



Εικόνα 7. Χημικές δομές βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος.(Μάντη, 2007)

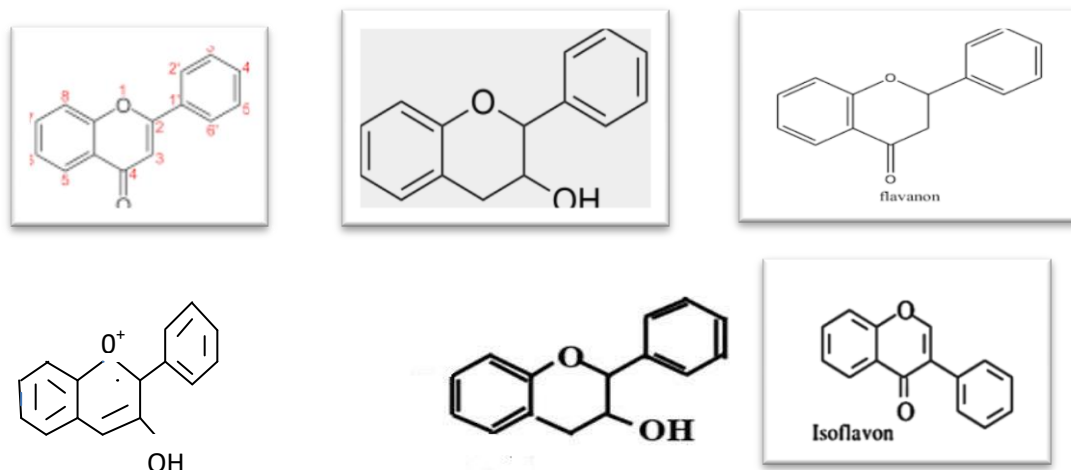
2.7.2 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

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



Εικόνα 8. Χημική δομή ναριγκενίνης και κερκετίνης.(Μάντη, 2007;Word Journal of Pharmaceutical Research, 2015)

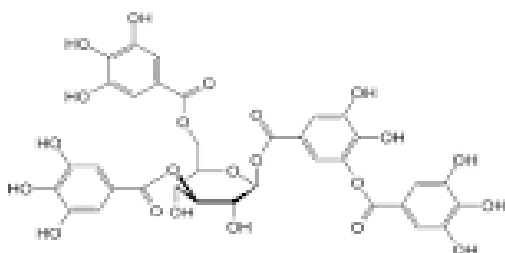
Τα φλαβονοειδή έχουν ικανότητα σάρωσης ελεύθερων ριζών που συμβάλλει στην αντικαρκινική δράση. Έχουν τη δράση να μην πολλαπλασιάζουν και να βοηθούν την απόπτωση των κυτταρικών γραμμών καρκίνου. Επίσης επιβραδύνουν την εισβολή και τη μετάσταση των καρκίνων. Στα φυτά υπάρχουν τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες. Με τα φλαβονοειδή να είναι πρώτα στην πλεονότητα των φαινολικών που λαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής του. Τα φλαβονοειδή επίσης χωρίζονται σε έξι υποομάδες οι οποίες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες που διαφοροποιούνται λόγω κατάστασης οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου C. (Leopoldini, 2010; Dai, 2010)



Εικόνα 9. Χημικές δομές φλανόνης, φλαβανόλης, φλαβανόνης, ανθοκυανίνης, φλαβονόλης και ισοφλαβόνης. (Atmitos, n.d.)

2.7.3 Ταννινες

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



Εικόνα 10. Χημική δομή τανίνης. (Μάντη, 2007)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

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

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

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

3.1 Μηχανισμός Αυτοοξείδωσης

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

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

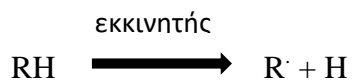
2)Διάδοση: οι ελεύθερες ρίζες $R\cdot$ αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς υπέροξυ-ρίζες ($ROO\cdot$) οι οποίες μετατρέπονται σε υδρουπεροξειδία ($ROOH$) μετά από την απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος στο οποίο δεν έχει αρχίσει η οξειδωση. Τα υδρουπεροξειδία είναι ασταθή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

3)Τερματισμός: σε αυτό το στάδιο σταθεροποιούνται τα προϊόντα. Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον μηχανισμό αυτοοξειδωσης. Η ενέργεια για να συμβεί αυτό εξασφαλίζεται από το φώς. Η αποικοδόμηση υδρουπεροξειδίων χρειάζεται από υψηλή θερμοκρασία παρουσία ιόντων μετάλλων.

Ο αυτόματος τερματισμός της οξειδωσης δεν μπορεί να συμβεί γιατί υπάρχει περίπτωση να αντιδράσουν όλες οι ελεύθερες ρίζες μεταξύ τους. Μπορούν όμως να παρεμποδιστούν οι αντιδράσεις διάδοσης με προσθήκη πρωτοταγών αντιοξειδωτικών τα οποία δρουν με ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνονται. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει την διαδικασία της αυτοοξειδωσης και τις αντιδράσεις που συμβαίνουν. (Moigrădean, 2007; Κυριτσάκης 2007)

3.2 Διάγραμμα αντιδράσεων

Έναρξη



Ακόρεστο λιπαρό οξύ
ελεύθερη ρίζα ακόρεστου λιπαρού οξέος

Διάδοση



Ελεύθερη ρίζα υπεροξειδίου



Υδροϋπεροξείδιο

Τερματισμός



Αδρανή προϊόντα



Αδρανή προϊόντα



Αδρανή προϊόντα

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

RR , ROOR = προϊόντα τελικής αντίδρασης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ

- 1) Σε 2g τομάτας προστίθενται 2,5ml μεθανόλη(όχι 75% μεθανόλη) και ανάδευση με vortex για 30sec
- 2) Μετά προστίθεται 2ml Tris (μπάφερ αλάτων) pH 7,5 και vortex για 30sec
- 3) Αφήνεται ήρεμο για 5min στο σκοτάδι
- 4) Μετά προστίθεται 2ml χλωροφόρμιο και ανάδευση vortex για 1min
- 5) Έπειτα φυγοκέντρηση για 5min
- 6) Διαχωρίζεις τις δύο στοιβάδες και τις κρατάς χωριστά σε δύο falcon (η στοιβάδα που ήταν από κάτω είναι του χλωροφορμίου-για σιγουριά ρίχνουμε λίγο χλωροφόρμιο στην πάνω στοιβάδα, αν διαχωριστούν οι στοιβάδες είναι OK αλλιώς ήταν ανάποδα οι στοιβάδες)
- 7) Η στοιβάδα του χλωροφορμίου μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώνεται υπό κενό σε rotary evaporator
- 8) Στο υπόλειμμα προστίθεται 3ml Hexane και vortex για 2min
- 9) Φυγοκέντρηση
- 10) Το υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml (αν το υγρό έχει αιωρούμενα στερεά το περνάμε πρώτα από φίλτρο διαμέτρου 25mm με πόρους 0,2μ μέσω σύριγγας 5ml. Κατόπιν το φίλτρο ξεπλένεται με 1ml καθαρό Hexane και τα υγρά μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml)
- 11) Στο στερεό προστίθεται άλλα 3 ml Hexane, vortex και φυγοκέντρηση
- 12) Το υγρό μεταφέρεται στην ίδια ογκομετρική φιάλη 10ml μαζί με το προηγούμενο υγρό(αν έχει αιωρούμενα στερεά το περνούμε από φίλτρο πρώτα όπως προηγούμενα)
- 13) Συμπληρώνεται με Hexane μέχρι τη χαραγή
- 14) Φωτομέτρηση στα 502nm με τυφλό Hexane(E%=3150)

4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΚΑΙ Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ

Σε falcon 15ml προστίθενται 1,000-0,01g ή 1,000+0,01g τομάτας 4ml ακετόνης και 6ml Hexane (εξάνιο) και λίγοι κόκκοι BHT. Ο σωλήνας τυλίγεται με αλουμινόχαρτο, vortex για 2min. Φυγόκεντρο στα 6000rpm για 3min. Από την πάνω φάση λαμβάνονται 3ml και φωτομετρούνται στα 663,645, 505 και 453 nm με τυφλό καθαρό εξάνιο. Το falcon φυλάσσεται με πάμα και αλουμινόχαρτο.

Το ίδιο δείγμα μετριέται σε όλα τα μήκη κύματος. Δηλαδή: α) μηδενίζεται το φωτόμετρο με εξάνιο στα 663nm, μετριέται η απορρόφηση του δείγματος, β) το δείγμα φυλάσσεται σε καθαρό σωλήνα, γ) μηδενίζεται το φωτόμετρο με εξάνιο στα 645nm, δ) το δείγμα από το σωλήνα μεταφέρεται στην κυψελίδα και μετριέται η απορρόφηση του, ε) η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα 505 και 453nm. Επειδή μεταξύ των μετρήσεων χάνονται σταγόνες δείγματος μπορούμε σε κάθε μέτρηση να συμπληρώνουμε μερικές σταγόνες δείγματος (με απλό σταγονόμετρο) από την πάνω φάση του αρχικού falcon.

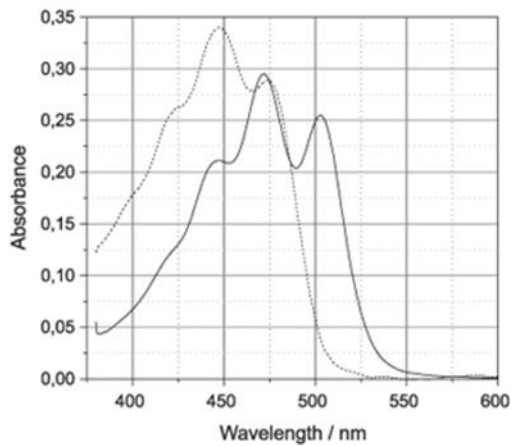
Αυτές ήταν οι τρεις μέθοδοι που ακολουθήθηκαν πειραματικά ώστε να έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα και διαγράμματα στους πίνακες 2,3 και στις εικόνες 11,12,13 τα οποία μας βοηθούν να κατανοήσουμε ποιος ήταν ο σκοπός των πειραμάτων αυτών. Ουσιαστικά οι παρακάτω πίνακες και εικόνες δείχνουν με ποσοστά τις περιεκτικότητες λυκοπενίου και β-καροτενίου σε διάφορες ποικιλίες τομάτας και σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης.

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση του εκχυλίσματος τομάτας σε 4 μήκη κύματος και υπολογίζεται από τις σχέσεις:

Λυκοπένιο (mg/100ml)=-0,0458 A663+0,204 A645+0,372 A505-0,0806 A453 (Εξίσωση 1)

β -καροτένιο (mg/100ml)=0,216 A663-1,22 A645-0,304 A505+0,452 A453 (Εξίσωση 2)

Ο ταυτόχρονος φωτομετρικός προσδιορισμός βασίζεται στην απορρόφηση εκχυλισμάτων ντομάτας σε 4 διαφορετικά μήκη κύματος της ορατής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στην εικόνα 11 δίνεται το φάσμα απορρόφησης του λυκοπενίου και του β καροτενίου. (Nagata, 1992)



Εικόνα 11. Φάσμα απορρόφησης λυκοπενίου (συνεχόμενη γραμμή) και β- καροτενίου (διακεκομμένη γραμμή)

Στους πίνακες 2,3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση περιεκτικότητας με φωτομέτρηση του λυκοπενίου και του β-καροτενίου στα στάδια ωρίμανση red ripe και breaker.

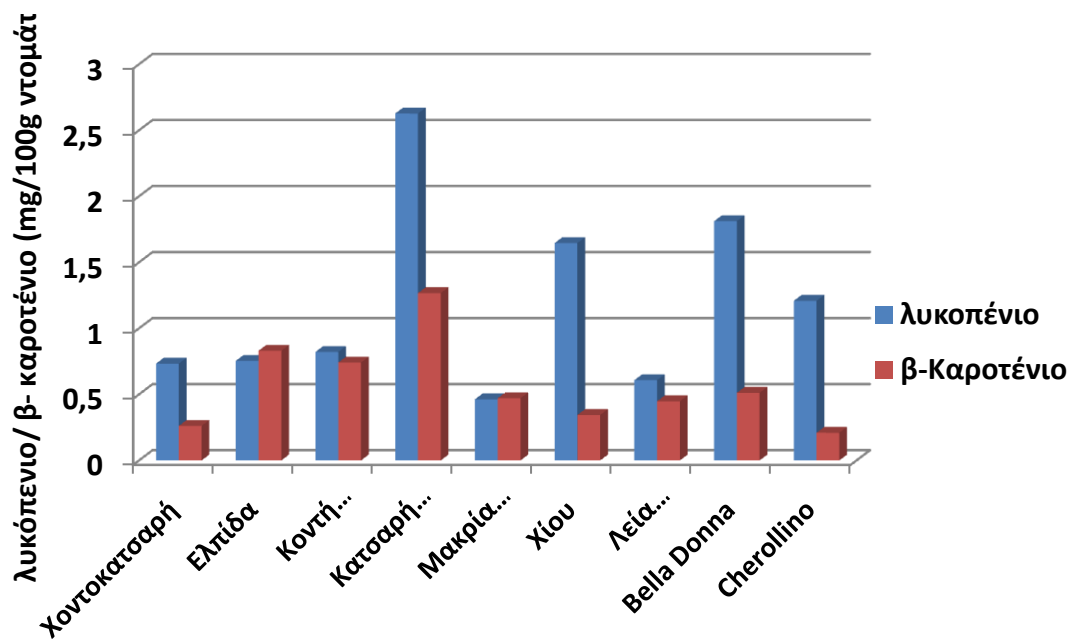
Πίνακας 2. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο των ντοματών στο στάδιο ωρίμανσης Red Ripe

Ποικιλία	Λυκοπένιο (mg/100ml ντομάτας)	β-Καροτένιο (mg/100ml ντομάτας)
Χοντοκατσαρή	0,73±0,40	0,26±0,11
Ελπίδα	0,75±0,20	0,83±0,16
Κοντή Κυθήρων	0,82±0,11	0,74±0,06
Κατσαρή Σαντορίνης	2,63±0,34	1,27±0,15
Μακρία Κυθήρων	0,46±0,04	0,47±0,15
Χίου	1,65±0,02	0,34±0,06
Λεία Σαντορίνης	0,61±0,02	0,45±0,01
Bella Donna	1,81±0,02	0,51±0,10
Cherollino	1,21±0,02	0,21±0,01

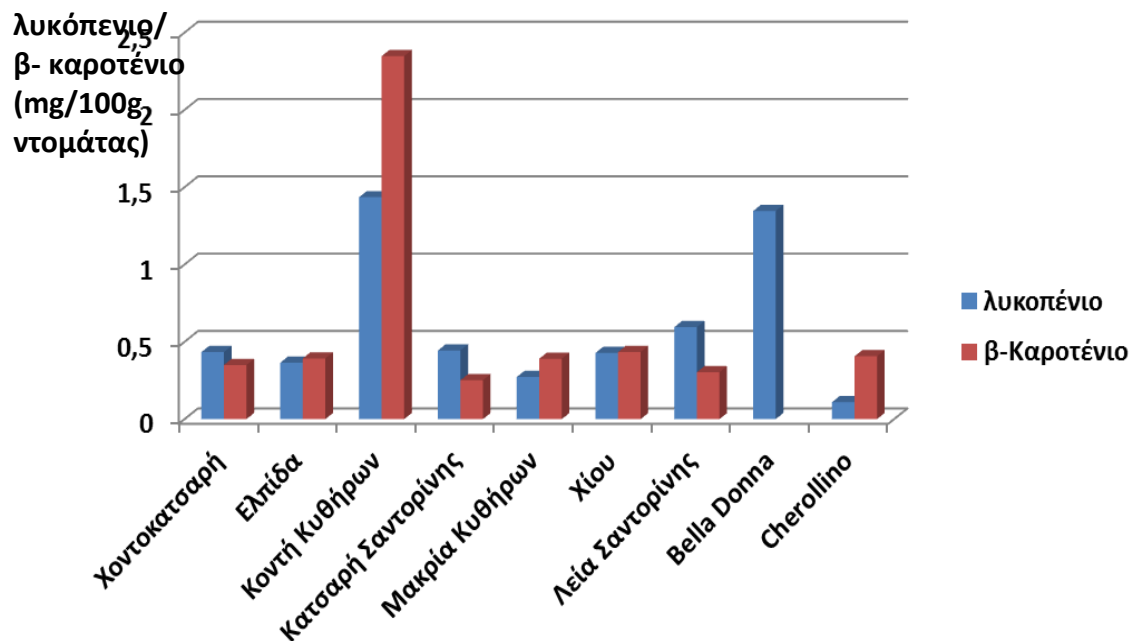
Πίνακας 3. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο των ντοματών στο στάδιο ωρίμανσης breaker.

Ποικιλία	Λυκοπένιο (mg/100ml ντομάτας)	β-Καροτένιο (mg/100ml ντομάτας)
Χοντοκατσαρή	0,43±0,03	0,35±0,03
Ελπίδα	0,36±0,17	0,39±0,16
Κοντή Κυθήρων	1,43±0,21	2,35±0,15
Κατσαρή Σαντορίνης	0,44±0,07	0,25±0,08
Μακρία Κυθήρων	0,27±0,04	0,39±0,05
Χίου	1,43±0,14	0,43±0,06
Λεία Σαντορίνης	0,60±0,03	0,31±0,04
Bella Donna	1,35±0,17	-
Cherollino	0,11±0,01	0,41±0,01

Στις παρακάτω εικόνες 12,13 φαίνεται η περιεκτικότητα λυκοπενίου και β-καροτενίου σε mg/100 g τομάτας στα στάδια red ripe και breaker. Τα αποτελέσματα αυτά προήλθαν από φωτομετρικές μετρήσεις.



Εικόνα 12. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο των ντοματών στο στάδιο ωρίμανσης Red Ripe.



Εικόνα 13. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο των ντοματών στο στάδιο ωρίμανσης Braker.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πείραμα αυτό μελετήσαμε και μετρήσαμε μέσω της απορρόφησης την περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο. Αφού έγιναν ομογενοποιήσεις και εκχυλίσες των τοματών φωτομετρήθηκαν κι έτσι έχουμε τα αποτελέσματα στους παραπάνω πίνακες 2,3. Η απορρόφηση δείχνει πόσα μόρια λυκοπενίου και β-καροτενίου υπάρχουν στα δείγματα που μετρήθηκαν. Επίσης οι διαφορετικές ποικιλίες αναπτύχθηκαν στο ίδιο έδαφος κάτω από ίδιες καιρικές συνθήκες για αυτό το πείραμα.

Από τον Πίνακα 2 βλέπουμε την περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και β-καροτένιο στο στάδιο ωρίμανσης Red Ripe. Το λυκοπένιο είναι σε ποσότητες μεγαλύτερες από το β-καροτένιο. Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και σε β-καροτένιο έχει η Κατσαρή Σαντορίνης ενώ την μικρότερη ποσότητα σε λυκοπένιο έχει η Μακριά Κυθήρων και σε β-καροτένιο η Cherollino. Αυτό συμβαίνει γιατί σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης οι διαφορετικές ποικιλίες έχουν αποκτήσει το μεγαλύτερο μέρος της δομής τους και των χαρακτηριστικών τους.

Ο Πίνακας 3 αναφέρεται στις ίδιες μετρήσεις όμως σε διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης. Σε αυτό το στάδιο οι τομάτες δεν έχουν προλάβει να αναπτυχθούν πλήρως κι από αυτό συνεπάγεται ότι ούτε το λυκοπένιο αλλά ούτε και το β-καροτένιο βρίσκονται στις ποσότητες που ενδεικνύονται. Σε αυτόν τον πίνακα βλέπουμε ότι η Κοντή Κυθήρων μαζί με την Χίου έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο ενώ η Cherollino την μικρότερη. Όσον αφορά το β-καροτένιο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του στη Κοντή Κυθήρων ενώ δεν υπάρχει καθόλου στην Bella Donna.

Στην εικόνα 13 βλέπουμε το φάσμα απορρόφησης του λυκοπενίου και του β-καροτενίου και το συμπέρασμα που διαμορφώνουμε είναι ότι το β-καροτένιο έχει μια έντονη κορυφή (αυτό σημαίνει μέγιστη απορρόφηση) περίπου στα 440nm ενώ μετά τα 530 nm περίπου δεν υπάρχει απορρόφηση. Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε ουσία έχει συγκεκριμένο φάσμα απορρόφησης. Ομοίως για το λυκοπένιο βλέπουμε δύο πολύ έντονες κορυφές στα 475 nm και 520 nm περίπου και μετά τα 550 nm παύει να υπάρχει απορρόφηση. Άρα το λυκοπένιο απορροφάται ως τα 550 nm.

Η εικόνα αυτή μας δείχνει ότι το λυκοπένιο και το β-καροτένιο απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος. Επιπλέον εάν με τις εξισώσεις της σελίδας 37 μετρήσουμε τις απορροφήσεις μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε και να προσδιορίσουμε τις συγκεντρώσεις του λυκοπενίου και του β-καροτενίου.

Σε μερικές όμως περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι το β-καροτένιο υπήρχε σε μεγαλύτερες ποσότητες στ δείγματα τομάτας από το λυκοπένιο κάτι που είναι αδύνατο να συμβεί γιατί το λυκοπένιο υπερτερεί πάντα στις τομάτες. Ωστόσο το β-καροτένιο ως ουσία στη τομάτα έχει υπερεκτιμηθεί σε σχέση με το λυκοπένιο. Άρα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι κατά την πειραματική διαδικασία υπήρξαν σφάλματα που μπορεί να προκλήθηκαν είτε από ανθρώπινο παράγοντα είτε από μηχανικό.

Συνοψίζοντας οι διαφορετικές ποικιλίες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και άρα διαφορετικές περιεκτικότητες σε λυκοπένιο και β-καροτένιο. Επίσης οι απορροφήσεις διαφέρουν και κάθε μια τους μας δείχνει την ποσότητα των αντιοξειδωτικών που εξετάζουμε.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κυριτσάκης Α. (2007), Ελαιόλαδο(4η έκδοση), Θεσσαλονίκη: CopyCityDigital, p.p. 421-427, 429.
- Μάντη Κ. (2007). Παρασκευή μη αλκοολούχου ερυθρού οίνου και μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτού. Αθήνα: Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής.
- Πωρίας (2015). Συνέντευξη Q10-Τι είναι και τι πρέπει να γνωρίζουμε. Available at: www.porias.gr/2015/12/27/coq10/. Τελευταία επίσκεψη 3/6/2016.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Caroch 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.
- Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2010), The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, Elsevier, Food Chemistry, 125, 288-306.
- Socasi S., Socaciu C., Muresan C., Farcas A., Tofana M., Vicas S. & Pintea A. (2013), Chemometric discrimination of different tomato cultivars based on their volatile fingerprint in relation to lycopene and total phenolics content, Wiley Online Library, Phytochemical Analysis, 25, 161–169.
- Seybold C., Frohlich K., Bitsch R., Otto K. & Bohm V. (2004), Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7005-7010.
- Miller N., Sampson J., Candeias L., Bramley P. & Rice-Evans C. (1996), Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, FEBS Letters, 384 240-242.
- Slimestad R. & Verheul M. (2009), Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars, Wiley Interscience, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 89, 1255-1270.

- Vallverdu-Queralt A., Arranz S., Medina-Remon A., Casals-Ribes I. & Lamuela-Raventos R. (2011), Changes in phenolic content of tomato products during storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9358-9365.
- Rao A., Waseem Z. & Agarwal S. (1998), Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene, *Elsevier, Food Research International*, 10, 737-741.
- Moigrădean D., Lăzureanu A., Poiană M., Gogoasă I., Hărmănescu M. & Gergen I. (2007), Sunlight influence of lycopene content in tomatoes varieties, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, Communication- Food control*, 2, 369-372.
- Capanoglu E., Beekwilder J., Boyacioglu D., De Vos R. & Hall R. (2010), The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor& Francis, 50, 919-930.
- Kanabur V. & Reddy L. (2014), A study on antioxidant property of organic and conventional tomatoes, *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7, 2319-2372.
- Shi J., Qu Q., Kakuda Y., Yeung D. & Jiang Y. (2004), Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, 44, 559–573.
- Ndikubwimana J. & Lee B. (2014), Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q10, *Biotechnol Lett, Springer Science+Business Media Dordrecht*, 10, 1529-1587.
- Oliver J. & Palou A. (2000), Chromatographic determination of carotenoids in foods, *Elsevier, Journal of Chromatography A*, 881, 543–555.
- Kamiloglu S., Boyacioglu D. & Capanoglu E. (2012), The effect of food processing on bioavailability of tomato antioxidants, *Journal of Berry Research*, 3, 65–77.
- Nagata M; Yamashita I. (1992), Simple Method for Simultaneous Determination of chlorophyll and Carotenoids in Tomato Fruit, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*; vol.39; No.10; Page.925-928.
- Salunkhe D., Jadhav S. & Yu M. (1974), Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes- *H.Fds.hum.Nutr. XXIV*, 1/2 : 85-113.

- World Journal of Pharmaceutical Research (2015). Isolation, Characterization and evaluation of antibacterial activity of a flavanone derivative 8-hydroxyl narigenin from scaber linn. Available at: www.researchgate.net/publication/277709171-ISOLATION-CHARACTERIZATION-AND-EVALUATION-OF-ANTIBACTERIAL-ACTIVITY-OF-A-FLAVANONE-DERIVATIVE-8-HYDROXYL-NARIGENIN-FROM-SCABER-LINN.
- Belitz D.-H., Grosch w. & Schieberle P. (2009). Food chemistry. Springer, New York: 4th Edition, p.p. 403-420.
- Atmitos Chemistry e-Magazine (n.d.), Φρούτακαιλαχανικά. Γιατι είναι ωφέλιμα; Μέρος 1^ο. Available at: [www.atmitos.gr/frouta-ke-lachanika-giati-ine-ofelima-meros 1o/](http://www.atmitos.gr/frouta-ke-lachanika-giati-ine-ofelima-meros-1o/)
- BiotechemiNano (2011). Καροτενοειδή: γενικά στοιχεία και σπουδαιότητα τους. Available at: biotecheminano.blogspot.gr/2011/05/blog-post.html.