

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ**  
**ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΗ**  
**ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ**

***ΜΟΣΧΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ***

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Μπιζέλης Ι. Αν. Καθηγητής**

**Χαρισμάδου Μ. Λέκτορας**

**Μασούρας Θ. Επ. Καθηγητής**

**Αθήνα, Μάιος 2010**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>a/a</b>	<b>Τίτλος</b>	<b>Σελίδα</b>
	Περίληψη	3
	Εισαγωγή	4
	<b>Α' Μέρος - Βιβλιογραφική ανασκόπηση</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Φλαβονοειδή</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Γενικά</b>	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Η χημεία των φλαβονοειδών</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Δομή και ονοματολογία</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Γενικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2.1</b>	<b>Φαρμακολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2.2</b>	<b>Άλλες θεραπευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Ιστορική αναδρομή των φλαβονοειδών</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Προσδιορισμός των φλαβονοειδών</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών</b>	<b>23</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Αναβολισμός</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Η γενετική βάση των φλαβονοειδών</b>	<b>26</b>
<b>1.5</b>	<b>Ο ρόλος των φλαβονοειδών στη φυσιολογία των φυτών</b>	<b>28</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Ο ρόλος των φλαβονοειδών ως μεταφορείς μηνυμάτων</b>	<b>31</b>
<b>1.6</b>	<b>Η φαρμακολογία των φλαβονοειδών στα ζώα</b>	<b>31</b>
<b>1.6.1</b>	<b>Φαρμακοδυναμική</b>	<b>32</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Οξεία τοξικότητα των φλαβονοειδών</b>	<b>34</b>
<b>1.6.3</b>	<b>Μακροπρόθεσμες επιπτώσεις των φλαβονοειδών</b>	<b>34</b>
<b>1.6.4</b>	<b>Ο καταβολισμός των φλαβονοειδών</b>	<b>35</b>
<b>1.7</b>	<b>Άλλες ιδιότητες των φλαβονοειδών</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>Εσπεριδοειδή και εσπεριδίνη</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Γενικά</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Καταγωγή και εξάπλωση της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών</b>	<b>39</b>
<b>2.3</b>	<b>Σύσταση των καρπών</b>	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>Εσπεριδίνη</b>	<b>41</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Γενικά</b>	<b>41</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Ιστορική αναδρομή</b>	<b>42</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Ιδιότητες</b>	<b>43</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Χημεία</b>	<b>43</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Προσδιορισμός και ανάλυση της εσπεριδίνης</b>	<b>44</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Τοξικότητα</b>	<b>45</b>
<b>2.4.7</b>	<b>Αλληλεπίδραση της εσπεριδίνης με φάρμακα και συστατικά των τροφών</b>	<b>45</b>
<b>2.4.8</b>	<b>Φαρμακοκινητική</b>	<b>46</b>

2.4.9	Φαρμακολογικές ιδιότητες	47
3	Υποπροϊόντα εσπεριδοειδών στη διατροφή μηρυκαστικών	50
3.1	Εισαγωγή	50
3.2	Υποπροϊόντα εσπεριδοειδών	52
3.2.1	Γενικά	52
3.2.2	Ροέλευση και θρεπτική σύσταση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών	52
3.2.3	Η χρήση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στη διατροφή μηρυκαστικών	54
3.3	Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στα μηρυκαστικά	55
3.3.1	Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών κατά την ανάπτυξη	55
3.3.2	Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στην γαλακτοπαραγωγή	56
3.4	Συμπεράσματα	57
	B' Μέρος - Πειραματικό μέρος	59
4.1	Σκοπός του πειράματος	60
5	Υλικά και μέθοδοι	61
5.1	Ζωικό υλικό	61
5.2	Επέμβαση στη διατροφή των προβατίνων κατά τη διάρκεια του πειράματος	61
5.3	Μετρήσεις παραμέτρων γάλακτος	63
5.3.1	Γαλακτομετρήσεις	64
5.3.2	Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών γάλακτος	65
5.3.4	Προσδιορισμός σύνθεσης της λιπαρής φάσης δειγμάτων γάλακτος	66
5.3.5	Προσδιορισμός της εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στα δείγματα γάλακτος	69
6	Αποτελέσματα	74
6.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος	74
6.2	Προφίλ λιπαρών οξέων	77
6.3	Ανίχνευση εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στο γάλα	85
6.4	Σχολιασμός	88
6.4.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος και σύνθεση λιπαρής φάσης	88
6.4.2	Ανίχνευση της εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στο γάλα	89
7	Συμπεράσματα	91
	Βιβλιογραφία	92

# ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΗ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

## ΜΟΣΧΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

Τμήμα Ζωικής Επιστήμης και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί εάν επηρεάζονται τα χαρακτηριστικά και η ποιότητα του γάλακτος έπειτα από την ενσωμάτωση εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο προβατίνων. Παράλληλα, ερευνήθηκε η παρουσία ή όχι της εσπεριδίνης στο γάλα.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 15 αμελγόμενες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, στην 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> γαλακτική περίοδο. Οι προβατίνες χωρίστηκαν σε τρεις ίσες ομάδες, με κριτήρια το σωματικό βάρος, τη γαλακτοπαραγωγή τους και την ημέρα απογαλακτισμού τους.

Το σύστημα διατροφής που εφαρμόστηκε ήταν ατομική διατροφή για το μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΣΖ) καθώς και για τις χονδροειδείς. Κατά την κύρια πειραματική περίοδο οι προβατίνες διατράφηκαν με μίγμα ΣΖ αλευρώδους υφής, στο οποίο είχε ενσωματωθεί πρόμιγμα εσπεριδίνης με αλεύρι. Στα ζώα της ομάδας Α χορηγήθηκε ημερησίως 1 gr εσπεριδίνης/kg ΣΖ, ενώ στην ομάδα Β χορηγήθηκαν 3 gr εσπεριδίνης/kg ΣΖ. Η ομάδα Μ αποτέλεσε τον μάρτυρα του πειράματος.

Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν δύο μήνες· οι πρώτες 15 ημέρες αποτέλεσαν στάδιο προσαρμογής των ζώων στο χώρο και στην ατομική διατροφή τους, ενώ οι επόμενες 45 ημέρες την κύρια πειραματική περίοδο. Συνολικά πραγματοποιηθούν τέσσερις ατομικές δειγματοληψίες γάλακτος· μία πριν και τρεις μετά την ενσωμάτωση της εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο, ανά 15 ημέρες.

Σε κάθε δειγματοληψία γάλακτος εξεταστήκαν για κάθε προβατίνα ατομικά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος (πρωτεΐνη, λακτόζη, λίπος, άνευ λίπους στερεά και ολικά στερεά) και μελετήθηκε η σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος με τη χρησιμοποίηση Αέριου Χρωματογράφου (GC). Τέλος, με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) εξετάστηκε η ύπαρξη της εσπεριδίνης και του μεταβολίτη της, εσπεριτίνη, στο γάλα.

Η χορήγηση της εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο προβατίνων δεν επέφερε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και στη σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Ενδέχεται οι ποσότητες που χορηγήθηκαν να ήταν μικρές ώστε να επιφέρουν οποιαδήποτε μεταβολή. Όμως, ανιχνεύθηκε η παρουσία της στα δείγματα γάλακτος.

Αντίστοιχα πειράματα με εσπεριδίνη σε μηρυκαστικά δεν έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα ώστε να συγκριθούν και να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, η εσπεριδίνη αποτελεί γόνιμο έδαφος για μελλοντική έρευνα σε μηρυκαστικά και στα παραγόμενα προϊόντα τους χάρη στις ευεργετικές της ιδιότητες.

**Λέξεις κλειδιά:** Εσπεριδίνη, HPLC, σιτηρέσιο

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λήξη του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου σηματοδοτεί την έναρξη της προσπάθειας ανεύρεσης κατάλληλων ουσιών οι οποίες θα αναστέλλουν την οξειδωση των λιπαρών οξέων των τροφίμων. Ωστόσο, παρά την ανακάλυψη πολλών συνθετικών χημικών ουσιών, λίγες μόνο έγιναν αποδεκτές από τον Οργανισμό Τροφίμων. Για τον λόγο αυτό συνεχίστηκαν οι προσπάθειες ώστε να ανακαλυφθούν ουσίες οι οποίες είτε θα μείωναν τη διαδικασία της οξειδωσης των τροφών είτε θα δρούσαν προστατευτικά ή/και ενάντια στην οξειδωση με την απαραίτητη προϋπόθεση ότι δεν θα έβλαπταν την υγεία του ανθρώπου.

Το γεγονός αυτό ώθησε την έρευνα για ανάπτυξη συντηρητικών προερχόμενων από φυσικές πηγές καθώς και «ήπιων» μεθόδων συντήρησης. Σημαντικές πηγές φυσικών συντηρητικών θεωρούνται τα φυτά. Πολλά φυτά είναι άριστες πηγές ουσιών, όπως τα φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά συστατικά, τα οποία όχι μόνο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά συντηρητικά, αλλά ενδεχομένως να συμβάλουν στη βελτίωση της υγείας του καταναλωτή.

Τέτοιου είδους ουσίες ανακαλύφθηκαν στον χυμό και την φλούδα των εσπεριδοειδών, σε πέταλα λουλουδιών καθώς και σε άλλα φυτικά προϊόντα. Αρχικά οι Shradet και Johnson (1934) παρατήρησαν τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του χυμού πορτοκαλιού. Στη συνέχεια οι Svirbely και Szent-Gyorgyi (1932) απέδωσαν μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του χυμού πορτοκαλιού στα φαινολικά συστατικά του τα οποία αργότερα προσδιορίστηκαν ως φλαβονόλες.

Αργότερα, οι φλαβόνες και τα παράγωγά τους εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, έγιναν αποδεκτές ως προσθετικά στα τρόφιμα. Κάποιες από αυτές τις ουσίες είναι η κουερκετίνη, η εσπεριδίνη, η ρουτίνη και η ναρινγίνη. Επίσης έρευνες έδειξαν ότι οι ουσίες αυτές, ανεξάρτητα από το είδος της φλαβόνης που εμπεριέχεται στο μόριό τους, παρουσιάζουν φαρμακευτική δράση με ιατρικό ενδιαφέρον, δεν είναι τοξικές αλλά έχουν ευεργετικές ιδιότητες.

Στις μέρες μας η μελέτη των φλαβονοειδών κερδίζει διαρκώς έδαφος λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τόσο στον κλάδο της ιατρικής όσο και στον κλάδο της ζωοτεχνίας. Εκτός από την ευεργετική δράση τους στην υγεία του ανθρώπου, μελετάται και η επίδραση τους στα αγροτικά ζώα (Fegeros et al., 1995· Bampidis and Robinson, 2005· Volanis et al., 2006· Vasta et al., 2008· Bock et al., 2008), και στα προϊόντα αυτών (π.χ. γάλα - αβγά). Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες και στα ποντίκια με σκοπό να ερευνηθεί ο μεταβολισμός της εσπεριδίνης (Yamada et al., 2006· Matsumoto et al., 2004).

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε, η μελέτη των χαρακτηριστικών του γάλακτος προβατίνων, οι οποίες κατανάλωσαν σιτηρέσιο έπειτα από την ενσωμάτωση εσπεριδίνης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και η σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Παράλληλα, ερευνήθηκε η ανίχνευση της εσπεριδίνης στο γάλα.

**Α΄ ΜΕΡΟΣ:**

***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ***

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

### 1.1 Γενικά

Είναι γνωστό από την αρχαιότητα ότι τα φλαβονοειδή έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση ασθενειών. Πρόσφατα, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή έχει αυξηθεί για τους εξής κυρίως λόγους:

- ✓ Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, χρωστικές οι οποίες ανευρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα των φυτών. Οι βοτανολόγοι με τη χρήση των σύγχρονων μεθόδων Χρωματογραφίας μπορούν εύκολα να κατηγοριοποιήσουν και να κατατάξουν τα φυτά σε διάφορα είδη, βασιζόμενοι στην ύπαρξη των φλαβονοειδών. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη, χρήσιμη και απλή στη διαδικασία.
- ✓ Ένας ακόμη λόγος για το αυξανόμενο ενδιαφέρον στην μελέτη των φλαβονοειδών αποτελούν οι βιομηχανίες φαρμάκων οι οποίες αναζητούν διαρκώς φυτά τα οποία θα περιέχουν ουσίες με θεραπευτικές ιδιότητες. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα φλαβονοειδή έχουν ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου (Havsteen, 1983).
- ✓ Τέλος, ένας τρίτος λόγος για την στροφή του ερευνητικού ενδιαφέροντος στα φλαβονοειδή είναι η απαίτηση του σύγχρονου ανθρώπου να καταναλώνει «φυσικά» προϊόντα με ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό.

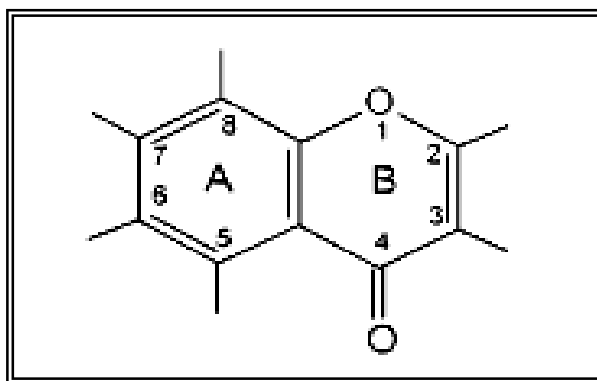
Τα τελευταία 30 χρόνια, η βιβλιογραφία για τα φλαβονοειδή έχει αυξηθεί ραγδαία και περισσότερα από 1000 άρθρα έχουν δημοσιευτεί. Τα περισσότερα άρθρα διαπραγματεύονται τον ρόλο των φλαβονοειδών στην φυσιολογία των φυτών και ελάχιστα αναφέρονται στις επιδράσεις που πραγματοποιούνται στην φυσιολογία των ζώων. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο να συνεχιστεί η έρευνα για τον τρόπο δράσης των φλαβονοειδών αφού υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα.

Τα φλαβονοειδή ανευρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα των φυτών και ενδέχεται, χωρίς να έχει εξακριβωθεί, ότι συμμετέχουν στην φωτοσύνθεση (Mukohata et al., 1978). Αντίθετα, είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο τα φλαβονοειδή συμμετέχουν στην γονιδιακή ρύθμιση και στον μηχανισμό μεταλλάξεων.

## 1.2 Η χημεία των φλαβονοειδών

### 1.2.1 Δομή και ονοματολογία

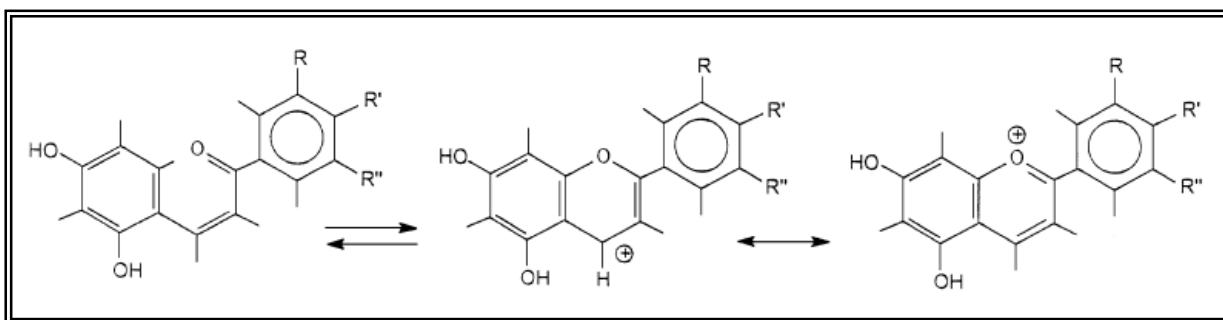
Ο όρος φλαβονοειδή αναφέρεται στις χρωστικές των φυτών, οι περισσότερες εκ των οποίων προέρχονται από την βενζο-γ-πυρόνη, συνώνυμο της χρωμόνης (Hassing et al., 1999; Harbone, 1964 και 1967; Croft, 1998) (Εικόνα 1.1).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.1** Δομή της βενζο-γ-πυρόνης. Η ονοματολογία των παραγώγων εξαρτάται από την αρίθμηση των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου.

Η ομάδα των φλαβονοειδών αποτελείται από τις:

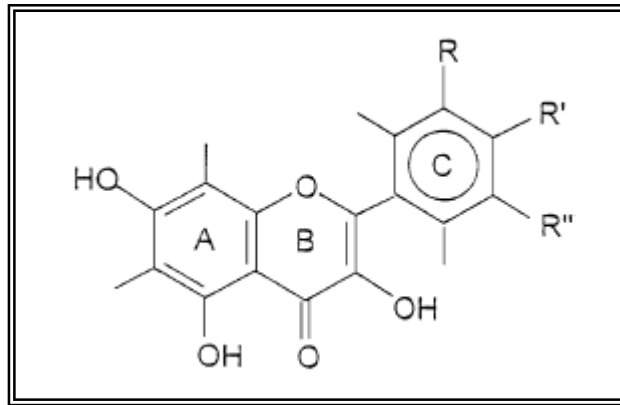
- ✓ ανθοκυανίδες, γλυκοζίτες των ανθοκυανιδών (Εικόνα 1.2),



**ΕΙΚΟΝΑ 1.2** Δομή, ταυτοποίηση και μεσομέρεια των ανθοκυανιδινών.

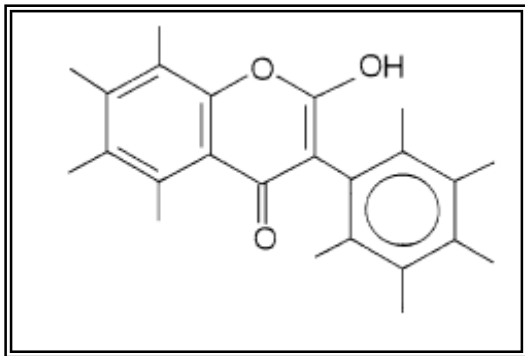
- ✓ φλαβονόλες, 2-φαινύλ-3-υδροξύ-χρωμόνες (Εικόνα 1.3),





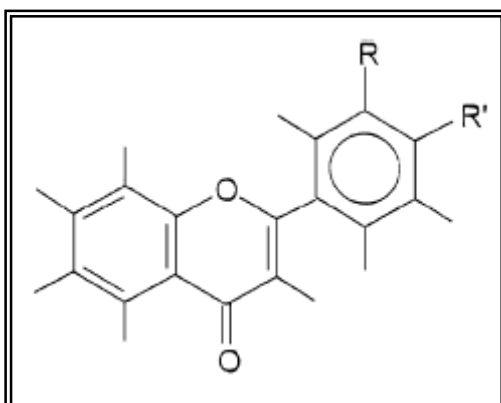
**ΕΙΚΟΝΑ 1.3** Δομή των φλαβονολών. Παραδείγματα: καμφερόλη,  $R = H$   $R' = OH$   
κουερκετίνη,  $R = OH$   $R' = OH$ .

- ✓ ισό - φλαβονόλες, 3- φαινύλ -2- υδροξύ - χρωμόνες (Εικόνα 1.4),



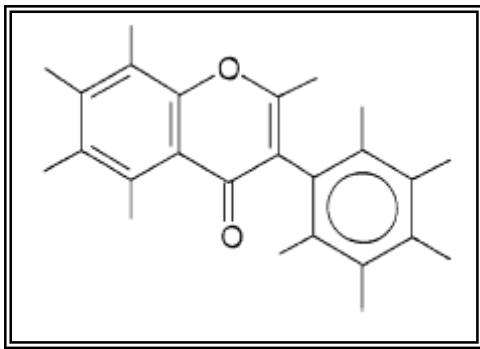
**ΕΙΚΟΝΑ 1.4** Δομή των ισοφλαβονολών

- ✓ φλαβόνες, 2- φαινύλ - χρωμόνες (Εικόνα 1.5),

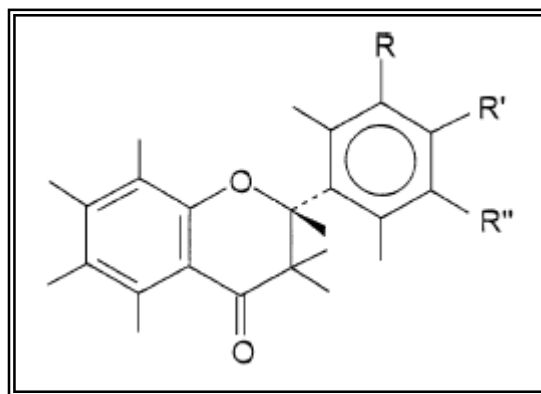


**ΕΙΚΟΝΑ 1.5** Δομή των φλαβόνων.  
Παραδείγματα: ορυσίνη,  $R = H$   $R' = H$   
απιγενίνη,  $R = H$   $R' = OH$   
λουτεολίνη,  $R = OH$   $R' = OH$

- ✓ ισο - φλαβόνες, 3- φαινύλ - χρωμόνες (Εικόνα 1.6),
- ✓ φλαβάνες, 2- φαινύλ -3- διϋδρο - χρωμόνες, 2- φαινύλ - φλαβανόνες (Εικόνα 1.7),

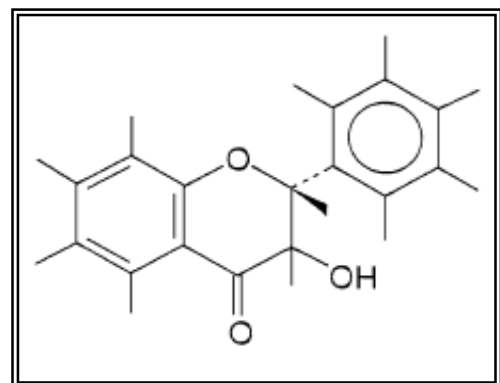
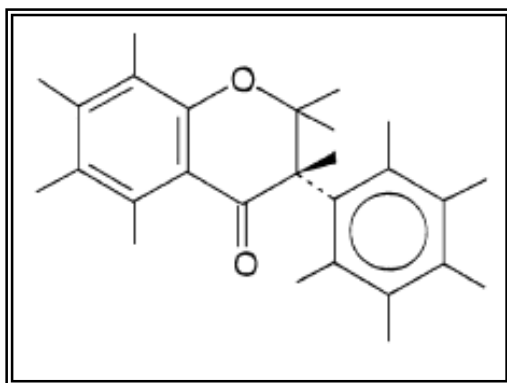


**ΕΙΚΟΝΑ 1.6** Δομή των ισοφλαβόνων.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.7** Δομή των φλαβανόνων. Παραδείγματα: ναρινγερίνη, R= H' R'= OH, R''= OH' εριοδικτιόλη, R = OH' R'= OH, R''= OH' λικουιριτίνη, R = H' R'= OH, R''= OH.

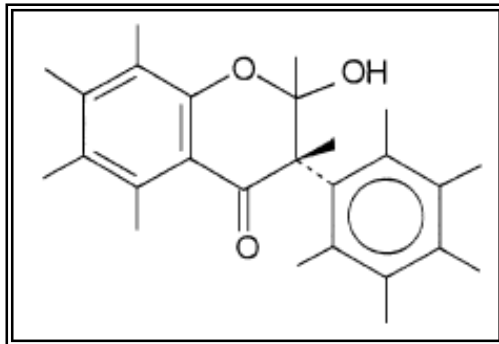
- ✓ ισό - φλαβόνες, 3- φαινύλ -2- διϋδρο - χρωμόνες (Εικόνα 1.8),
- ✓ φλαβανόλες, 2- φαινύλ -3- υδρο -3- υδροξυ - χρωμόνες (κατεχίνες) (Εικόνα 1.9),



**ΕΙΚΟΝΑ 1.8** Δομή των ισοφλαβανονών

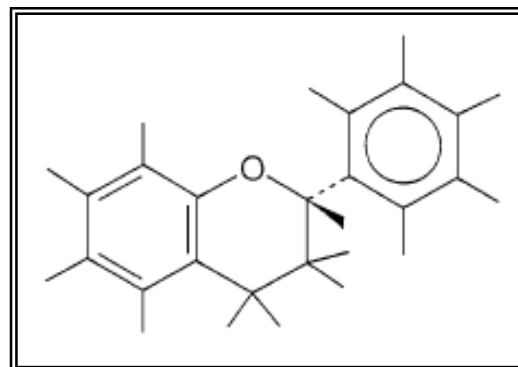
**ΕΙΚΟΝΑ 1.9** Δομή των φλαβανολών

- ✓ ισό - φλαβανόλες, 2- υδρό -2- υδροξύ -3- φαινύλ - χρωμόνες (Εικόνα 1.10),
- ✓ φλαβάνες, 2- φαινύλ -δι- υδρο - βενζο -γ- πυράνες (Εικόνα 1.11),

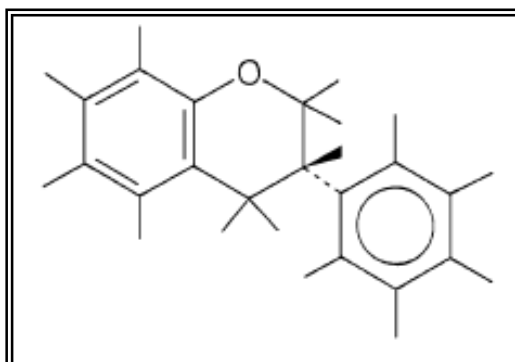


**ΕΙΚΟΝΑ 1.10** Δομή των ισοφλαβανόλων

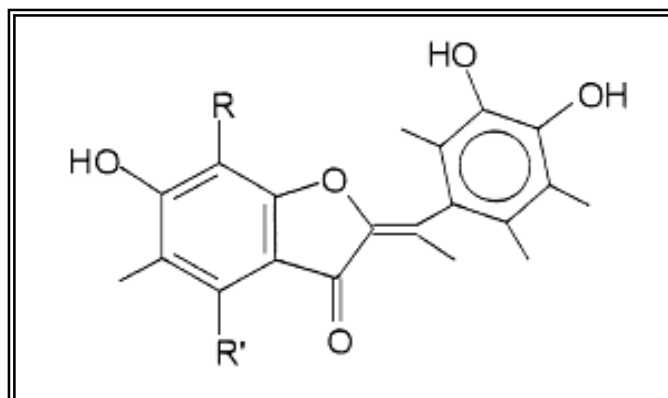
**ΕΙΚΟΝΑ 1.11** Δομή των φλαβάνων



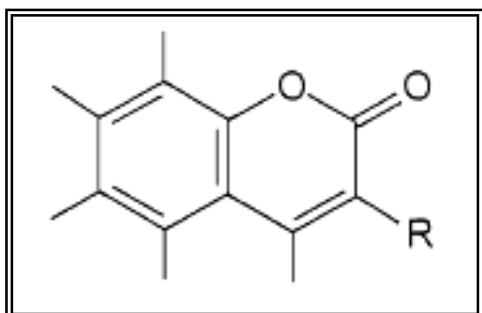
- ✓ ισό - φλαβάνες, 3- φαινύλ -δι- υδρο -γ- βενζο - πυράνες (Εικόνα 1.12),
- ✓ αουρόνες, βενζό - φουρόνες (Εικόνα 1.13),
- ✓ κουμαρίνες, παράγωγα της βενζό -γ- πυρόνης (Εικόνα 1.14),



**ΕΙΚΟΝΑ 1.12** Δομή των ισοφλαβανών

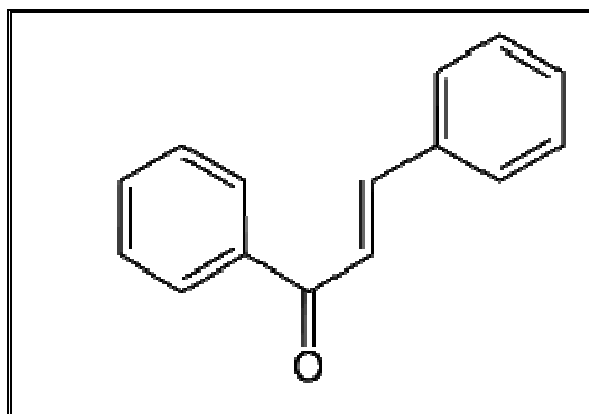


**ΕΙΚΟΝΑ 1.13** Δομή των σουρώνων. Παραδείγματα: σουρενσιδίνη, R= H; R' = OH  
 σουλφουρετίνη, R= H R' = H μαρινετίνη, R= OH R' = OH.

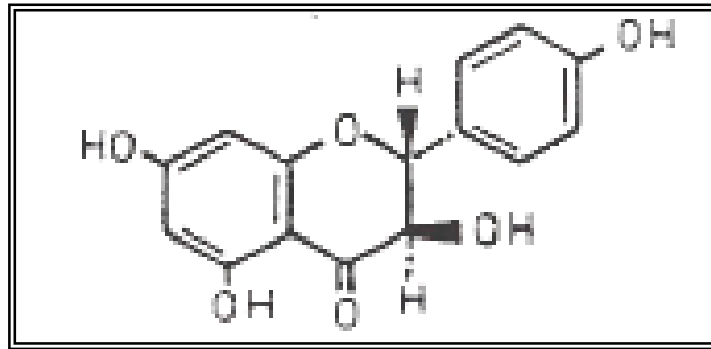


**ΕΙΚΟΝΑ 1.14** Δομή των κουμαρινών

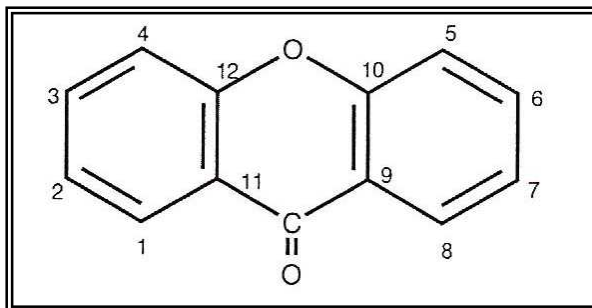
- ✓ χαλκόνες 1,3 διφαινυλ-2-προπεν-1-όνη (Εικόνα 1.15),
- ✓ διϋδροχαλκόνες (παράγωγα της 2- φαινυλοχρωμανόνης) (Εικόνα 1.16) και
- ✓ ξανθόνες (παράγωγα της 2- φαινυλοχρωμόνης) (Εικόνα 1.17).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.15** Δομή των  
 χαλκονών



**ΕΙΚΟΝΑ 1.16** Δομή των διϋδροχαλκονών

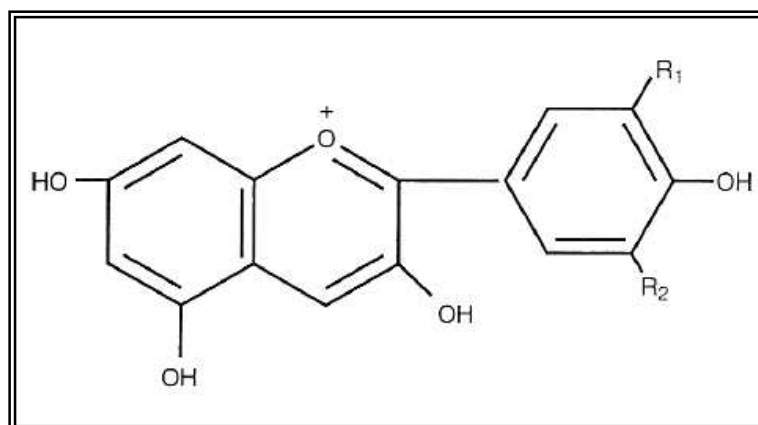


**ΕΙΚΟΝΑ 1.17** Δομή των ξανθονών

## 1.2.2 Γενικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά

### ✓ Ανθοκυάνες

Η ονομασία ανθοκυάνη αρχικώς χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ενώσεις που ήταν υπεύθυνες για το χρώμα των ανθέων του αραβοσίτου. Αργότερα εφαρμόστηκε σε ενώσεις που ήταν διαλυτές στο νερό και το χρώμα τους ήταν κόκκινο, μωβ, μπλε ή βιολετί στους καρπούς και τα άνθη. Παράγονται από το κατιόν 2-φαινυλοβενζοπυρίλιο, κοινός ως κατιόν φλαβίλιο. Οι ανθοκυάνες απαντούν σε όλα τα αγγειόσπερμα εκτός από τα Caryophyllaceae. Γενικώς χαρακτηρίζουν το χρώμα των ανθέων και των καρπών, έχουν βρεθεί επίσης σε βράκτια φύλλα, ακόμη και σε ρίζες. Έχουν το γενικό τύπο, με OH στη θέση C-3 (Εικόνα 1.18).



**Εικόνα 1.18** Δομή ανθοκυανιδίων Παραδείγματα: R1=R2=H=Πελαργονιδίνη  
R1=OH R2=H= Κυανιδίνη R1=R2=OH= Δελφινίνη

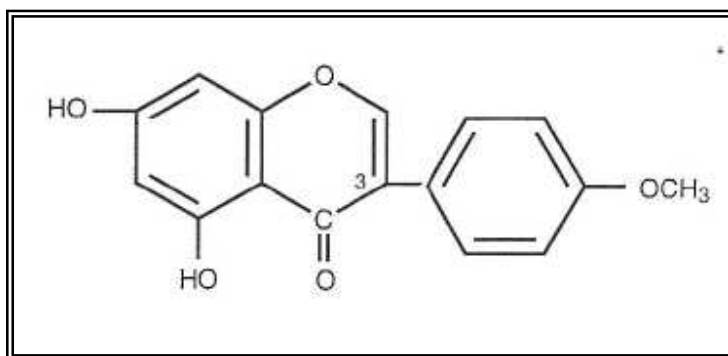
#### *Ιδιότητες των ανθοκυανιδίων*

Διάφορες βιολογικές δοκιμασίες έδειξαν ότι οι ανθοκυάνες ελαττώνουν τη διαπερατότητα και ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων. Η δράση αυτή πιθανώς να οφείλεται στο δεσμό που αναπτύσσεται μεταξύ αυτών και του κολλαγόνου των τοιχωμάτων των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Κατά αυτό τον τρόπο γίνεται αναστολή της δράσης των πρωτεοελυτικών ενζύμων ελαστάση και κολλαγενάση. Η ιδιότητα αυτή των ανθοκυανών, έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση αυτών στη θεραπεία συμπτωμάτων, όπως της φλεβικής ανεπάρκειας και για την προστασία των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων από την ευθραυστότητά τους.

Η χημική συμπεριφορά των ανθοκυανών σε υδατικά διαλύματα εξαρτάται από τις ιδιότητες του κατιόντος 2-φαινυλοβενζοπυριλίου, το οποίο στον ταυτόχρονα είναι ένα ασθενές δισόξινο και ένα καλό ηλεκτρόφιλο ιόν. Σε ισχυρή μέση οξύτητα pH<3 το κατιόν που σχηματίζεται έχει χρώμα κόκκινο και σταθερό, ενώ σε μέση οξύτητα pH μεταξύ 4 - 5 το κατιόν χάνει ένα ή δύο πρωτόνια και έτσι σχηματίζεται μια ανυδροβάση, η οποία είναι ουδέτερη ή ιονίζεται αντίστοιχα σε κινόνη χρώματος μπλε. Με την προσθήκη νερού το κατιόν μετατρέπεται σε ψευδοβάση (καρβινόλη), η οποία είναι σχετικά άχρωμη, τελικό στάδιο είναι ο σχηματισμός χαλκόνης. Εάν το pH αυξάνεται τότε αυτές ιονίζονται περισσότερο και η δομή τους καταστρέφεται.

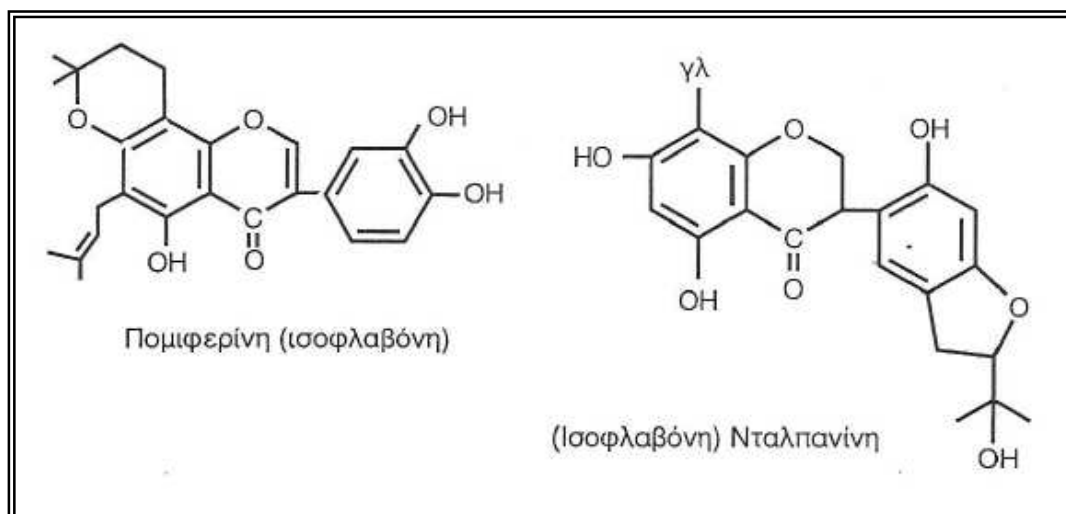
#### ✓ **Ισοφλαβόνες – Ισοφλαβανόλες**

Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν από τις άλλες τάξεις των φλαβονοειδών στο ότι είναι 3-φαινυλοχρωμόνες Π.χ. η βιοχανίνη. (Εικόνα 1.19)



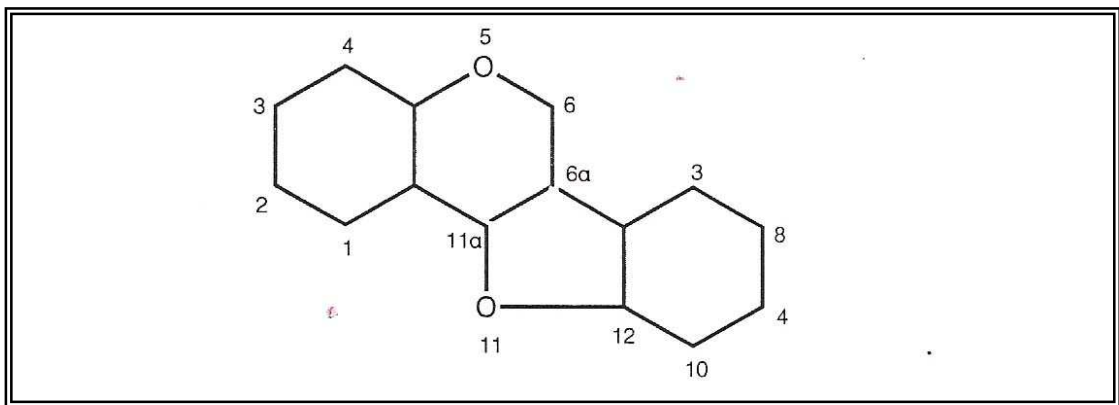
**Εικόνα 1.19** Βιοχανίνη

Είναι γνωστές περίπου 600 ενώσεις με σκελετό ισοφλαβόνης. Μπορούν να διαιρεθούν σε 12 τάξεις σύμφωνα με τα επίπεδα οξείδωσης και το είδος του δακτυλίου που μπορεί να είναι ενωμένος στο βασικό σκελετό της ισοφλαβόνης (Εικόνα 1.20).



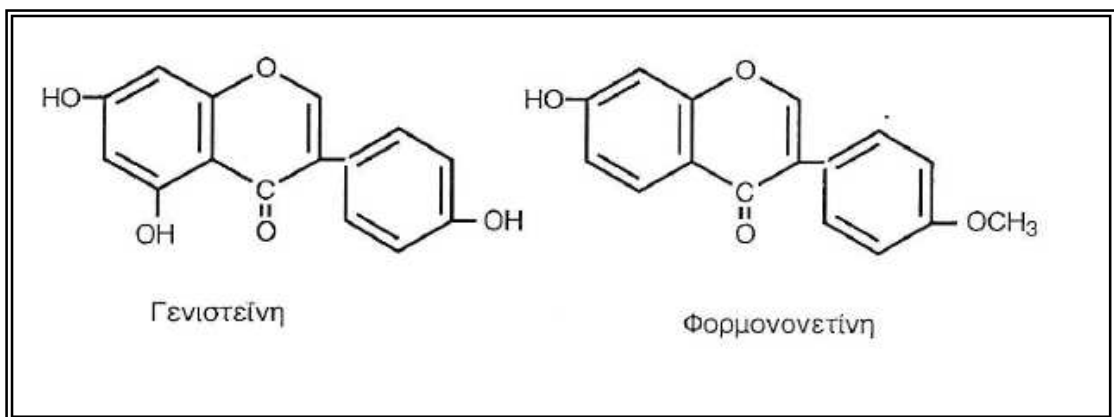
**Εικόνα 1.20** Παραδείγματα ισοφλαβονών

Οι περοκαρπάνες που έχουν τέσσερους δακτυλίους είναι μια από τις μεγαλύτερες τάξεις των ισοφλαβονών και έχουν τον γενικό τύπο της Εικόνας 1.21.



**Εικόνα 1.20** Γενικός τύπος πτεροκαρπανών

Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο αντιμυκητοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση. Επίσης οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν μια σειρά από βιολογικές ιδιότητες. Όπως έδειξαν οι έρευνες, πρόβατα που βόσκουν σε λιβάδια που είναι πλούσια στο φυτό *Trifolium sulterraneum*, για μακρά περίοδο, παρουσιάζουν ιδιότητες οιστρογόνων. Δύο ισοφλαβόνες, η γενιστεΐνη και φορμονονετίνη, απομονώθηκαν από το ως άνω φυτό (Εικόνα 1.21).



**Εικόνα 1.21** Δύο ισοφλαβόνες: η γενιστεΐνη και φορμονονετίνη,

#### *Ιδιότητες των φλαβονών - φλαβονολών*

Ο όρος "flavone" προέρχεται από το λατινικό flavus = κίτρινο. Απαντούν είτε ως άγλυκα είτε σε μορφή γλυκοσιδών. Σπουδαιότερες είναι η απιγενίνη, η λουτεολίνη και οι γλυκοσίδες τους.

Οι φυσικές φλαβόνες είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης κυμαίνεται από 0 έως 7. Ο βαθμός υδροξυλίωσης μπορεί να έχει βιογενετική σημασία διότι σε χαμηλό βαθμό υδροξυλίωσης επικρατούν οι φλαβόνες (3-θέση ελεύθερη), ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες (με OH στη θέση C-3). Σπουδαιότερες είναι: κουερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη, ισοραμνετίνη και οι γλυκοσίδες τους.



Η ύπαρξη ή όχι OH στη θέση C-3 έχει σημαντική βιοσυνθετική, φυσιολογική, φαρμακολογική και αναλυτική σημασία.

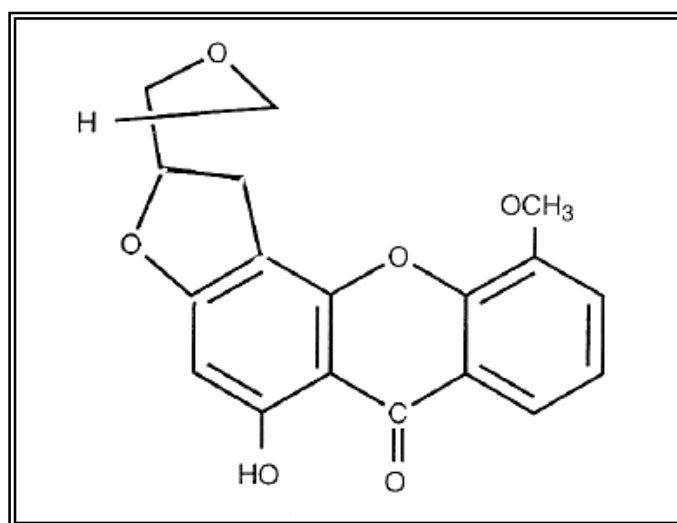
✓ **Χαλκόνες, σουρόνες, διϋδροχαλκόνες**

Είναι μικρές ομάδες χρωστικών, οι οποίες είναι κίτρινες και σε αλκαλικό περιβάλλον μετατρέπονται σε κόκκινες. Ο οικολογικός τους ρόλος στη φύση σε σχέση με το χρώμα των φυτών και κυρίως των ανθέων είναι σημαντικός. Οι διϋδροχαλκόνες είναι υδρογονωμένα παράγωγα των χαλκονών και είναι άχρωμες. Οι χαλκόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας γέφυρας με τρία άτομα άνθρακος με ένα ακόρεστο (α,β) δεσμό, οι δε σουρόνες από την παρουσία του δακτυλίου της βενζιλιδίνης. Απαντούν π.χ. στα δέντρα του είδους Prunus όπως (η αμυγδαλιά, η βερικοκιά, η κερασιά), στο πιπέρι (*Piper methysticum*), στο λυκίσκο και άλλα φυτά.

✓ **Ξανθόνες**

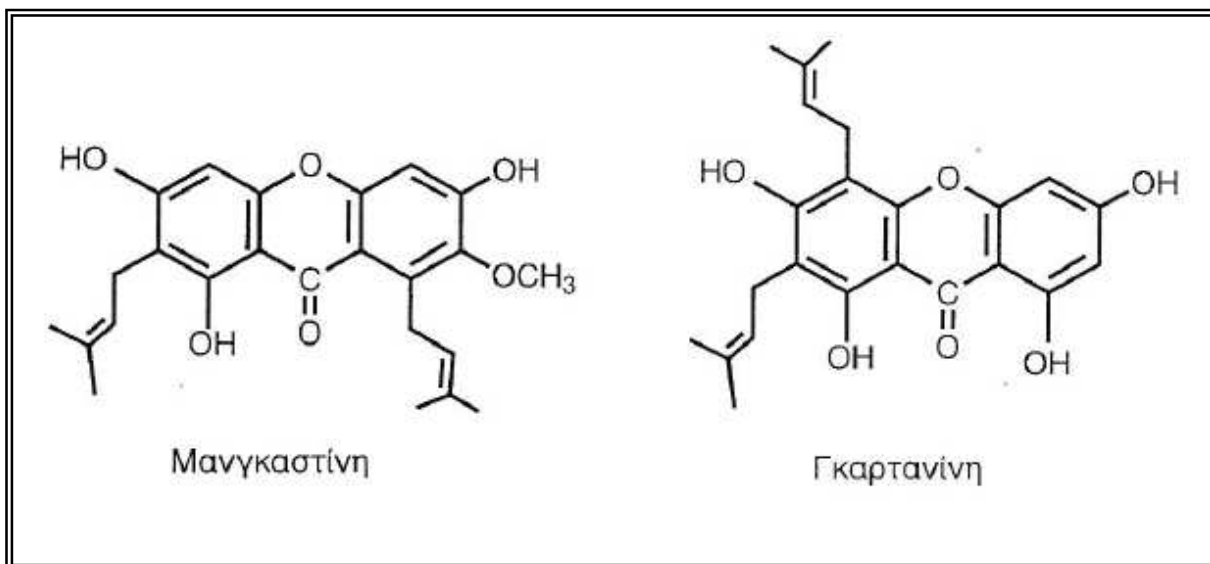
Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν των φλαβονών και φλαβονολών στο ότι ο φαινολικός δακτύλιος είναι ενωμένος με το βενζοϋρανόιο στη θέση 9,10.

Απαντούν σε περιορισμένο αριθμό οικογενειών όπως στις Gentianaceae, Polygonaceae, Leguminosae, Phamnaceae. Βρέθηκαν επίσης στις πτέρες και σε μερικούς μύκητες. Οι ξανθόνες παρουσιάζουν κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Από το φυτό *Psorospermum tetrifugum* (Cruciferae), φυτό της τροπικής Αφρικής, απομονώθηκε η ξανθόνη ψωροσπερίνη (Εικόνα 1.22) με αντιλευχαιμικές ιδιότητες *in vivo* στην P388 λεμφοκυτταρική λευχαιμία στα ποντίκια.



**Εικόνα 1.22** Η ξανθόνη ψωροσπερίνη

Επίσης, βρέθηκαν διάφοροι μικροοργανισμοί που παράγουν ξανθόνες, με αντιμικροβιακή δράση. Παρόμοια δράση δείχνουν οι ξανθόνες που απομονώθηκαν από τα φυτά *Gareinia mangostana* και *Callophyllum inophyllum* (Gruciferae) (Εικόνα 1.23).



**Εικόνα 1.23** Ξανθόνες που απομονώθηκαν από τα φυτά *Gareinia mangostana* και *Callophyllum inophyllum*

### 1.2.2.1 Φαρμακολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών

- ✓ Αντιφλεγμονώδη δράση

Το 1930 ο Szant Györgi έδειξε ότι εκχυλίσματα από τα είδη του γένους *Citrus* αυξάνουν την αντίσταση (αντοχή) των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων.

Αργότερα, μελετώντας αρκετά φλαβονοειδή, διάφοροι ερευνητές έδειξαν ότι αυτά έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία πιθανώς να οφείλεται στην αναστολή μερικών ενζυμικών συστημάτων τα οποία εμπλέκονται κατά το σχηματισμό και εξέλιξη της φλεγμονής.

- ✓ Αναστολή της ελευθερωμένης ισταμίνης

Η κουερκετίνη και άλλα φλαβονοειδή είναι αποκλειστικοί αναστολείς την ισταμίνης που ελευθερώνεται από διάφορους παράγοντες. Η κουερκετίνη αρχικώς

βρέθηκε να είναι περισσότερο δραστικός αναστολέας της ισταμίνης που ελευθερώνεται από τα ανθρώπινα βασεόφιλα κύτταρα αλλά αργότερα αποδείχτηκε, με μελέτες που έγιναν πάνω σε κύτταρα περιτόναιου ποντικών, ότι η λουτεολίνη και αμεντοφλαβόνη έχουν υψηλότερη δράση.

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την ελευθερούμενη ισταμίνη, ακόμη δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Η συγγένεια δομής-δράσης μελετάται.

✓ **Αποτελέσματα στη σύνθεση των προσταγλαδινών και λευκοτρινών**

Όπως είναι γνωστό, οι λευκοτρίνες και η σειρά των προσταγλανδινών, παράγονται στα λευκοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια), κατά το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και άλλων πολυακορέστων λιπαρών οξέων, δια της μεσολάβησης διαφόρων ενζυμικών συστημάτων.

Η κουερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος με αναστολή των φωσφολιπασών. Επίσης βρέθηκε ότι έχει δράση στην αναστολή του συστήματος των 5-λιποξογενασών οι οποίες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτρίνες και ότι τα άγλυκα αναστέλλουν το σχηματισμό προσταγλαδινών ενώ οι αντίστοιχοι γλυκοσίδες, αυξάνουν αυτόν.

Μερικές ενώσεις π.χ. η μπαϊκαλεΐνη, αναστέλλουν την λιποξογενάση, αλλά άλλες, όπως οι 2,5,6',7-τετραϋδροξυφλαβανόνη, έχουν αντίθετο αποτέλεσμα.

Από το φυτό *Sideritis migronensis* πρόσφατα απομονώθηκε η ένωση hypoletin-8-0- glucoside με ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

✓ **Φλαβονοειδή και διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων**

Η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Το φαινόμενο αυτό γίνεται ορατό σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, μετά από συμπτώματα όπως τα οιδήματα, αιμορραγικό σύνδρομο και υπέρταση. Παθήσεις οι οποίες συνήθως συνδέονται με αύξηση της διαπερατότητας των τοιχωμάτων των αιμοφόρων τριχοειδών αγγείων, είναι ο διαβήτης, οι αιμορροΐδες, το σκορβούτο, τα διάφορα έλκη.

Πρόσφατες μελέτες με φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν φλαβονοειδή, απέδειξαν ότι αυτά μειώνουν τη διαπερατότητα και ευθραυστότητα των τοιχωμάτων των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων.

Ένα τέτοιο σκεύασμα, είναι το Venoruton, παράγωγο της ρουτίνης. Η ρουτίνη απαντά σε πολλά φυτά και κυρίως απομονώθηκε από το φυτό *Sophora japonica*. Επίσης βρέθηκε ότι οι γλυκοσίδες της ανθοκυάνης που απομονώθηκε από το *Vacinium myrtillus* είναι περισσότερο δραστικοί από το Venoruton.

Μια άλλη ομάδα φλαβονοειδών που ελαττώνουν τη διαπερατότητα των τριχοειδών είναι οι προκυανιδίνες. Οι ουσίες αυτές πιστεύεται ότι είναι η βάση για θεραπεία του σκορβούτου.

Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι οι προκυανιδίνες, ιδιαίτερα οι διμερείς, σταθεροποιούν το κολλαγόνο, με το σχηματισμό σταυρωτών συνδέσμων, προς ένα μεγαλύτερο σε μήκος μόριο από ότι κάνουν άλλα φλαβονοειδή, με αποτέλεσμα να οδηγούν στην αντοχή των αγγείων.

✓ Δράση στην καρδιά

Γνωστή είναι η χρήση των εκχυλισμάτων των ειδών *Grategus* για τη θεραπεία διαφόρων τύπων διαταραχών της καρδιάς. Επίσης οι πολυφαινόλες ειδών *Vitis* π.χ. *Vitis vinifera*, έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρωση. Το κόκκινο χρώμα του κρασιού οφείλεται σε πολυφαινολικές ενώσεις, όπως τις ανθοκυανιδίνες και τους γλυκοσίδες τους ανθοκυάνες και σε προανθοκυανιδίνες που είναι ολιγομερή παράγωγα φλαβον-3-ολες ή φλαβον-3,4-διόλες.

Οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις του κρασιού έχουν προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρωση. Έχουν αντιοξειδωτική δράση που εμποδίζει την οξείδωση της χοληστερόλης LDL (λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας), επίσης υποχοληστεριναιμική δράση και βιταμινική δράση P στα αγγεία.

✓ Δράση κατά του έλκους

Πειράματα απέδειξαν ότι μερικά φλαβονοειδή αποτρέπουν (εμποδίζουν) το σχηματισμό ελκών, μετριάζουν τον πόνο και σταματούν την αιμορραγία.

Πρόσφατες μελέτες *in vivo* σε ποντίκια έδειξαν ότι η μυρικετίνη και ο γναφαλοσίδης ήταν οι πιο αποτελεσματικότερες των ουσιών που δοκιμάστηκαν.

Ιδιαίτερη δράση έχουν οι (+) - κατεχίνες, αποτρέποντας το σχηματισμό ελκών στα κουνέλια. Οι διμερείς και τριμερείς κατεχίνες που απομονώθηκαν από το *Lindera umbellata* (Lauraceae), είναι περισσότερο δραστικές από τις μονομερείς και τετραμερείς.

✓ Δοκιμή στη θεραπεία του καταρράκτη

Γνωρίζουμε ότι στους διαβητικούς, υπάρχει αύξηση της γλυκόζης στο αίμα του ανθρώπου. Επί πλέον στο φακό του ματιού παράγεται σορβιτόλη ή δουλκιτόλη από μετατροπή της γλυκόζης με επίδραση της ρεδοκτάσης.

Η δουλκιτόλη δε μπορεί να μεταβολισθεί σε άλλο προϊόν και ως εκ τούτου σχηματίζεται μια υάλινη στοιβάδα μέσα στους φακούς και να δημιουργείται ο

λεγόμενος «καταρράκτης». Επί πλέον συγκέντρωση δουλκινόλης στο μάτι αυξάνει την οσμωτική πίεση με αποτέλεσμα τον πόνο.

Τα φλαβονοειδή είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου με περισσότερο ισχυρά την κουερκετίνη και μυρικετίνη. Επίσης τα μεθυλιωμένα παράγωγα στο C-6 ή C-8 είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου.

Έτσι, μπορεί να τους δοθεί ένας ρόλος στη θεραπεία του καταρράκτη, αποτρέποντας το σχηματισμό της δουλκινόλης.

### **1.2.2.2 Άλλες θεραπευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών**

#### ✓ Αντικαρκινική

Τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα (όπως η τανγκερετίνη) και η νομπιλετίνη παρουσιάζουν έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους από ότι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα.

#### ✓ Αντιοξειδωτική

Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των ελευθέρων ΟΗ. Σαν ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται η κουερκετίνη, μυρικετίνη, γκοσουπετίνη, κερκεταγενίνη. Η κουερκετίνη εμποδίζει την οξείδωση των πολυακορεστών λιπαρών οξέων και προστατεύει στους χυμούς των εσπεριδοειδών από την αυτοοξείδωση της βιταμίνης C. Οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να παγιδεύουν το ανιόν υπεροξειδίου.

#### ✓ Αντιθρομβωτική

Η δράση οφείλεται μάλλον στην αναστολή της σύνθεσης εικοσανοειδών. Οι επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν χαμηλό ποσοστό στεφανιαίας νόσου σε γαλλικές πόλεις, όπου οι κάτοικοι των περιοχών αυτών καταναλώνουν κόκκινο κρασί. Επίσης, τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών ελαττώνουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και δρουν αντιθρομβωτικά. Ο χυμός του λεμονιού μειώνει την χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ενώ του πορτοκαλιού αυξάνει την χοληστερόλη HDL (λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας).

### **1.2.3 Ιστορική αναδρομή των φλαβονοειδών**

Τα φλαβονοειδή τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες γνωστές ομάδες φυσικών προϊόντων. Από τη στιγμή που σχεδόν τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι χρωστικές, το χρώμα τους είναι αναμφισβήτητα

συνδεδεμένο με ορισμένες πολύ σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Εξάλλου το πλήθος των φλαβονοειδών στο φυτικό βασίλειο, σε όλα τα γεωγραφικά πλάτη, ενισχύει αυτόν τον ισχυρισμό. Είναι γνωστό ότι όλα τα χρώματα του ορατού φάσματος, συμπεριλαμβανομένου και της περιοχής UV, αντιπροσωπεύονται από τα φάσματα των φλαβονοειδών. Σαν αποτέλεσμα, οι ηλεκτρονικές ιδιότητές τους δεν σχετίζονται μόνο με τη δέσμευση και τη μεταφορά ενέργειας, αλλά επίσης και με τη βιολογική επιλεκτικότητα. Το τελευταίο δεν αφορά μόνο την προσέλκυση διάφορων εντόμων και πουλιών αλλά και την ενεργοποίηση των φωτοευαίσθητων γονιδίων, όπως έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα στο κριθάρι με τα φωτοευαίσθητα γονίδια ανάπτυξης (Kirby & Styles, 1970). Παρόλο που υπάρχει αυξημένη απορρόφηση φωτός από τα φλαβονοειδή και ανευρίσκονται σε όλα τα φυτικά κύτταρα με πλαστίδια, δεν έχει βρεθεί κάποια συμμετοχή των φλαβονοειδών στα αρχικά στάδια της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Προφανώς, τα φυτά χρησιμοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία όχι μόνο σαν πηγή ενέργειας αλλά και για τη γονιδιακή ρύθμιση.

Μια άλλη εντυπωσιακή ηλεκτρονική ιδιότητα των φλαβονοειδών είναι ο φθορισμός τους, αν και παραμένει ακόμα άγνωστος ο ρόλος της ιδιότητας αυτής. Ωστόσο, μια ενδεχόμενη λειτουργία του φθορισμού είναι η εξής: μικρές ποσότητες ενέργειας μεταφέρονται χάρη στον φθορισμό με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των χρωστικών που σχετίζονται με τα φωτοευαίσθητα γονίδια.

Η αφθονία και η μεγάλη ποικιλομορφία των φλαβονοειδών καθιστούν αυτές τις χρωστικές κατάλληλες για τη συστηματική ταξινόμηση των ειδών. Παράλληλα είναι γνωστή η στενή συσχέτιση των φλαβονοειδών με γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία ανάπτυξης. Τέτοιου είδους γονίδια θα αναμενόταν να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε περιβαλλοντικές αλλαγές και έτσι να αντικατοπτρίζουν τόσο τη φύση του βιότοπου όσο και την ανταγωνιστικότητα των ειδών.

Οι λόγοι για την τεράστια ποικιλομορφία των φλαβονοειδών είναι οι εξής:

- ✓ οι διαφοροποιήσεις στην δομή του δακτυλίου της αγλυκόνης και στο στάδιο οξειδωσής της,
- ✓ οι διαφοροποιήσεις στην έκταση της υδροξυλίωσης της αγλυκόνης και οι θέσεις των υδροξυλομάδων,
- ✓ οι διαφοροποιήσεις στον σχηματισμό των υδροξυλομάδων π.χ. με μεθυλομάδες, υδατάνθρακες ή ισοπρενοειδή.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω διαφοροποιήσεων αποδεικνύει ότι τουλάχιστον θεωρητικά υπάρχουν πάνω από  $2 \times 10^6$  φλαβονοειδή. Μέχρι σήμερα, πάνω από  $2 \times 10^3$  διαφορετικά φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί και ο αριθμός αυτός αυξάνεται ραγδαία (Bilyk & Sapers, 1985; Farkas et al., 1986; Cizmarik & Matel, 1970 και 1973; DuBois & Sneden, 1995). Επειδή τα μέλη της ομάδας των φλαβονοειδών συνδέονται στενά, όσον αφορά τη δομή τους, είναι δύσκολο να διαχωριστούν μεταξύ τους (Hostettmann & Hostettmann, 1982). Εξαιτίας του μεγάλου μοριακού βάρους και

της πολύπλοκης δομής αυτών των ενώσεων, η ταυτοποίηση και η χημική σύνθεση αποτελεί πρόκληση για τους χημικούς, ακόμη και σήμερα.

Όπως αναφέρθηκε, τα φλαβονοειδή εξαρτώνται από την περιεκτικότητά τους σε γλυκοζίτες, ισοπρενοειδή και αλιφατικούς αιθέρες. Σαν αποτέλεσμα για την εκχύλιση των φλαβονοειδών από διάφορες ουσίες όπως για παράδειγμα το μέλι, το κερί, η πρόπολη και οι φυτικοί ιστοί, μπορεί να πραγματοποιηθεί με εύρος διαλυμάτων, από νερό μέχρι αιθυλαιθέρα. Τα εκχυλίσματα συχνά αποτελούν κλάσματα υδροξυλαπατίτη πριν πραγματοποιηθεί ο τελικός διαχωρισμός με την μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρισης (Cancalon, 1999) ή με την εφαρμογή HPLC (Galensa & Herrmann, 1979· Garcia-Viguera et al., 1993· Greenaway et al., 1987 και 1991· Watson & Pitt, 1998· Watson & Oliveira, 1999· Ishii et al., 1996· Gawron et al., 1952).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί πολλές ερευνητικές μελέτες σχετικά με τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών. Κυριότερες αποτελούν οι εργασίες των εξής: Mabry et al., 1970· Markham, 1982· Harborne, 1988a και 1988b· Bankova et al., 1982 και 1987· Pangarova et al., 1980 και 1986· Garcia-Viguera et al., 1993· και Bonvehi et al., 1994.

### 1.3 Προσδιορισμός των φλαβονοειδών

Η πλήρης ανάλυση της ολοκληρωμένης δομής και ο τρόπος σχηματισμού ενός φλαβονοειδούς είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαιτεί την εφαρμογή μεθόδων προχωρημένης τεχνολογίας όπως για παράδειγμα [ $^1\text{H}$ ]- και [ $^{13}\text{C}$ ]-NMR-φασματοόμετρο, [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-συσχετισμένο φασματοόμετρο, κυκλικό διχρωϊσμό, οπτικό περιστροφικό, φασματοόμετρο μάζας και διάθλαση ακτινών X. Όμως, από την στιγμή που ελάχιστα εργαστήρια είναι εξοπλισμένα με τέτοιου είδους μηχανήματα ώστε να πραγματοποιούν τέτοιου είδους αναλύσεις, απλούστερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών είναι επιθυμητές. Οι σύγχρονες χρωματογραφικές τεχνικές όπως η HPLC αποτελεί απαραίτητο εξοπλισμό των βιοχημικών εργαστηρίων αφού αποτελούν μια εξαιρετική λύση για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών. Μια φθηνότερη μέθοδος για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών που υπάρχουν σε ένα εκχύλισμα, είναι ο συνδυασμός της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και ο φθορισμός (Jay et al., 1975· Ghisalberti, 1979· Nikolov et al., 1976· Hladon et al., 1980· Lavie, 1978· Chi et al., 1994· Glencross et al., 1972· McMurrrough et al., 1985· Issaq, 1997· Karting & Hiermann, 1978).

Η προετοιμασία ενός δείγματος για ανάλυση παρουσιάζει δυσκολίες επειδή οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών είναι πολικά μόρια και άρα διαλυτά στο νερό, ενώ οι αγλυκόνες είναι μη πολικά μόρια, (Calman, 1972). Σαν αποτέλεσμα, για την εκχύλιση των αγλυκονών πρέπει να χρησιμοποιηθούν μη πολικοί διαλύτες. Για παράδειγμα η μεθανόλη είναι ένας κατάλληλος διαλύτης ο οποίος επιτρέπει την εκχύλιση των

περισσότερων φλαβονοειδών. Τελευταία κερδίζει έδαφος η χρήση CO<sub>2</sub> κατά την διαδικασία εκχύλισης λιποφιλικών φλαβονοειδών. Οι Mabry et al (1984) και Markham (1982) δημοσίευσαν πρώτοι μεθόδους και τεχνικές για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών.

## 1.4 Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

### 1.4.1 Αναβολισμός

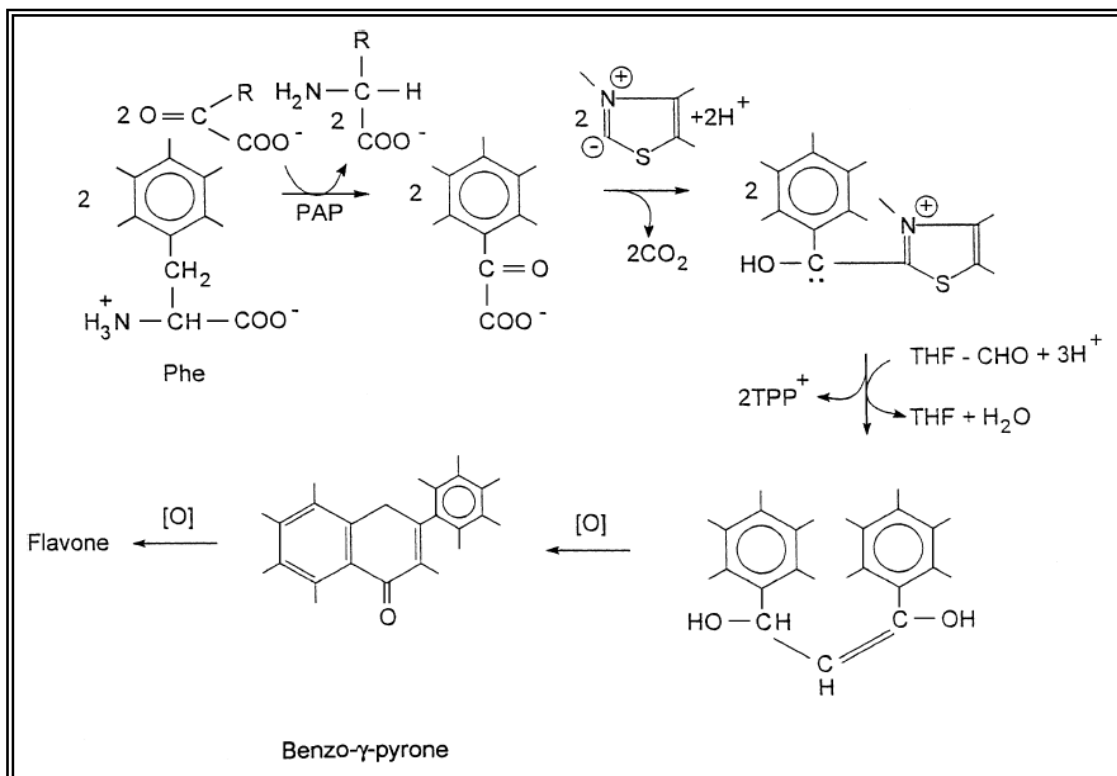
Όλα τα κύτταρα που ανευρίσκονται στα πράσινα μέρη των φυτών είναι ικανά να συνθέτουν φλαβονοειδή. Η βιοσύνθεση ξεκινάει πάντα με την παρουσία του αμινοξέος φαινυλαλανίνη το οποίο χρησιμοποιείται ανάλογα με το είδος του φλαβονοειδούς που απαιτείται να συντεθεί (Czihay et al., 1976).

Αρχικά, η αμινομάδα απομακρύνεται μέσω της τρανσαμίνωσης ή της οξειδωτικής απαμίνωσης με παράλληλη παραγωγή φαινυλοσταφυλικού οξέος, ενώ η αμινομάδα μετατρέπεται σε κετο-οξύ μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος ή απελευθερώνεται σαν ένα ιόν αμμωνίου. Έπειτα, δύο μόρια φαινυλοσταφυλικού οξέος μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης με την πυροφωσφατική θειαμίνη παράγουν δύο μόρια ενεργής αλδεύδης όπου μαζί με το τμήμα του άνθρακα C<sub>1</sub> ( -CHO ) μέσω ενός οξειδωτικού σταδίου σχηματίζεται η φαινυλ -γ- χρωμόνη (Εικόνα 1.24).

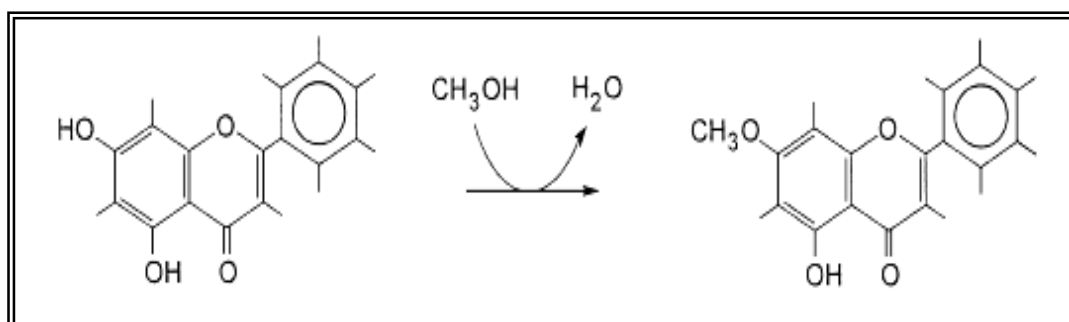
Εν συνεχεία, η φλαβόνη υδροξυλιώνεται από έναν αριθμό συγκεκριμένων οξυγενασών ώστε να παραχθούν μεμονωμένα φλαβονοειδή. Ο δακτύλιος της φλαβόνης μπορεί να σχηματιστεί επίσης από την γ-χρωμόνη μέσω της αναγωγής του τετραϋδροφολικού συνενζύμου (THF). Οι ισοφλαβόνες και κατ' επέκταση οι ισοφλαβάνες μπορούν να σχηματιστούν με μια ανάλογη διαδικασία. Ωστόσο, τα στάδια της συμπύκνωσης είναι διαφορετικά λόγω των διαφορετικών ενζύμων που συμμετέχουν στην διαδικασία (Gardiner et al., 1980; Lahann & Purucker, 1975; Link et al., 1943; Funa et al., 1999).

Η μεθυλίωση των υδροξυλομάδων πραγματοποιείται συνήθως με κατάλυση της μεθανόλης από ειδικές μεθυλάσες, όπου παρόμοιες αντιδράσεις είναι γνωστές και στα κύτταρα των ζωικών οργανισμών (Εικόνα 1.25) (Gauthier et al., 1998). Οι υδατάνθρακες για να ενωθούν με τις υδροξυλομάδες, που συνήθως πραγματοποιείται στον άνθρακα C<sub>3</sub>, φτάνουν σαν μονοσακχαρίτες ενεργοποιημένοι από την ουριδινοδιφωσφορικό οξύ (UDP) στο ανωμερικό άτομο άνθρακα και διαδοχικά ενώνονται με την αγλυκόνη (Εικόνα 1.26) (Matern et al., 1981; Heller & Forkmann, 1988).

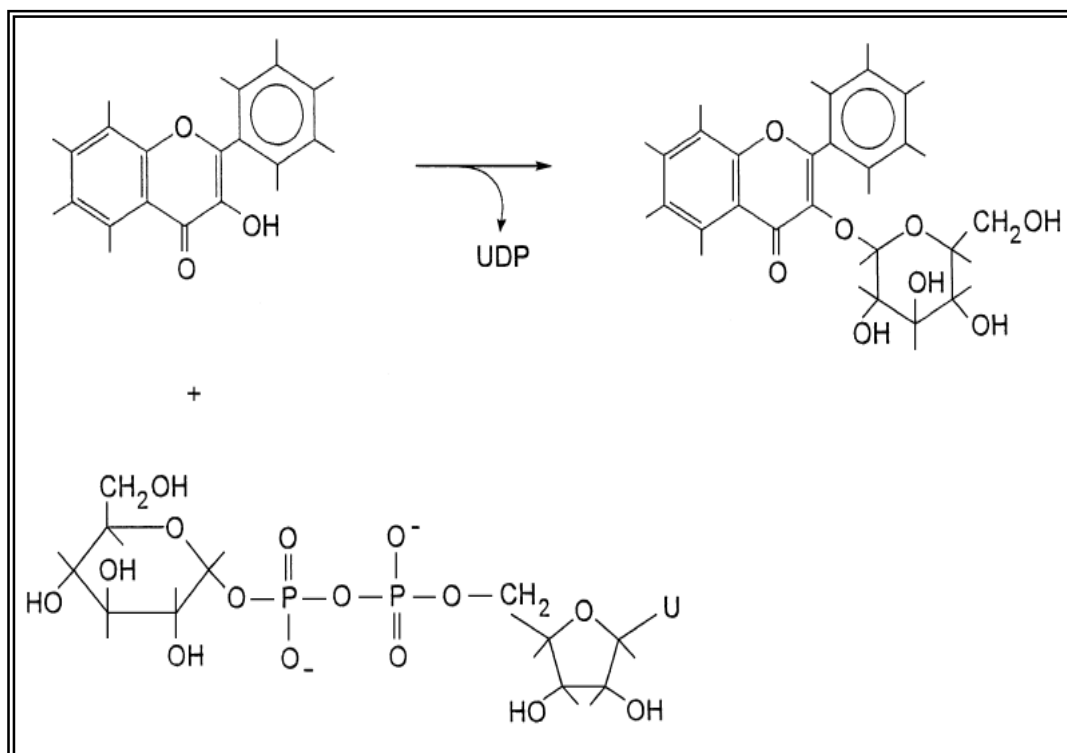




**ΕΙΚΟΝΑ 1.24** Βιοσύνθεση μιας φλαβόνης. Phe: φαινυλαλανίνη, PAPA: πυριδοξαλική φωσφατάση, TPP<sup>+</sup>: θειαμινική πυροφωσφατάση, flavone: φλαβόνη, benzo-γ-pyrone: βενζο-γ-πυρόνη

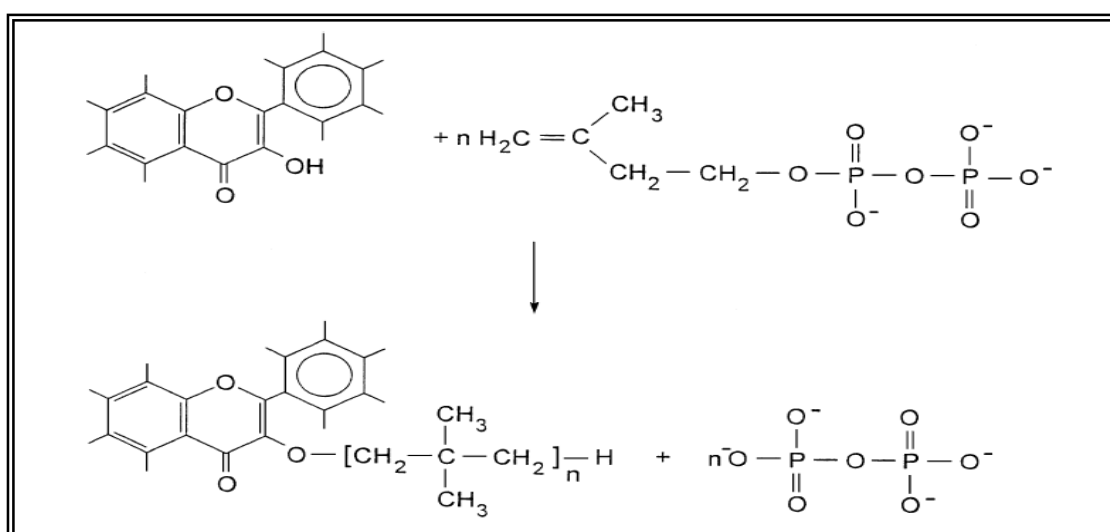


**ΕΙΚΟΝΑ 1.25** Μεθυλίωση της φλαβόνης από μια μεθυλάση



**ΕΙΚΟΝΑ 1.26** Γλυκοζυλίωση της φλαβονόλης από την UDP-γλυκόζη καταλυόμενη από την ουριδυλ- τρανσφεράση (UDP: ουριδινοδιφωσφορικό οξύ)

Τα συζευγμένα ισοπρενοειδή των φλαβονοειδών σχηματίζονται από την δράση της βιολογικής μονάδας του ισοπρενίου, την πυροφωσφορική ισοπενθενύλη. Η σύζευξη συνήθως πραγματοποιείται στην θέση C<sub>3</sub> της γ-χρωμόνης (Εικόνα 1.27).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.27** Ισοπρενυλίωση της φλαβονόλης από την πυροφωσφορική ισοπενθενύλη. Συνήθως n= 5 έως 10.

## 1.4.2 Η γενετική βάση των φλαβονοειδών

Η γενετική των φλαβονοειδών αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί τα φλαβονοειδή προσέφεραν έφορο έδαφος στην συστηματική κατάταξη των φυτών. Ο λόγος είναι ότι τα γονίδια των ενζύμων που μεσολαβούν στην βιοσύνθεση των φλαβονοειδών εκφράζονται εύκολα, τα προϊόντα είναι εύκολα αναγνωρίσιμα καθώς και οι χρωστικές διαφοροποιούνται αρκετά ώστε να γίνονται εύκολα διακριτές. Επίσης, τα φλαβονοειδή προσφέρουν ταξινομικά κριτήρια τα οποία στηρίζονται περισσότερο στην έκφραση της γενετικής δομής παρά στην κλασική μορφολογική δομή, για παράδειγμα το σχήμα των φύλλων, ο αριθμός των σπόρων. Επιπλέον, τα γονίδια περιέχουν όλες τις πληροφορίες σχετικά με την ατομικότητα κάθε είδους το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα η γενετική προσέγγιση των φυτών να εμφανίζεται ως η πιο θεμελιώδης βάση για την ταξινόμησή τους. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή δεν παράγονται μόνο χάρη σε εξωτερικά ερεθίσματα αλλά επίσης λόγω μεταβολικών αντιδράσεων ικανών να κινήσουν περαιτέρω γενετικές διεργασίες. Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η ενεργοποίηση γονιδίων, η μετάλλαξη ή η διόρθωση των βλαβών του DNA (Zahringer et al., 1978´ Cea et al., 1983´ Peters et al., 1986´ Disseling, 1996´ Fekermann et al., 1998´ Ching & Baguley, 1987´ Chin, 1999).

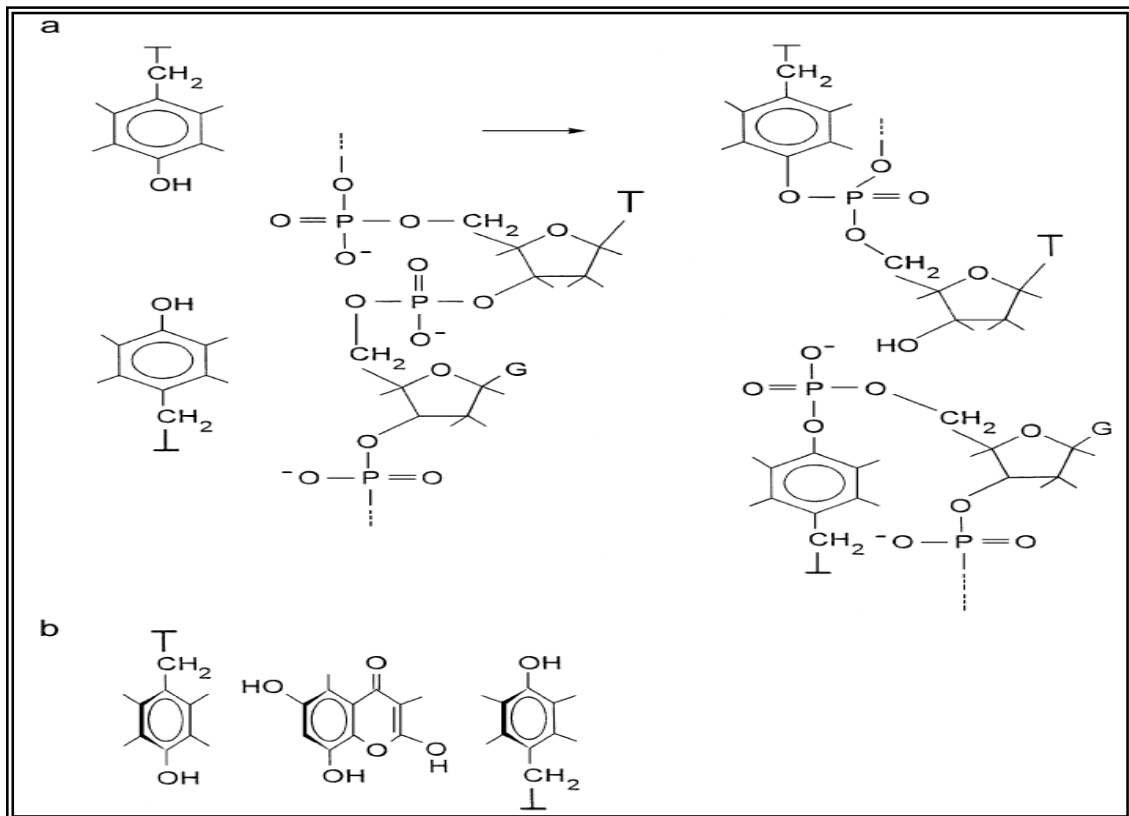
Η βιοχημική δραστηριότητα των φλαβονοειδών στα γονίδια μελετήθηκε από διατροφική σκοπιά για πρώτη φορά από τον Singleton (1981). Εκτιμάται ότι ένας μέσος υγιής άνθρωπος προσλαμβάνει ημερησίως μέσω της τροφής 1 με 2 γραμμάρια φλαβονοειδών. Γνωρίζοντας την χημική δραστηριότητα των φλαβονοειδών, ένα τέτοιο ποσό πρόσληψης δημιουργεί το εξής ερώτημα: η ποσότητα αυτή είναι ικανή να δημιουργήσει τοξικότητα ή δυσλειτουργία στον ανθρώπινο οργανισμό (Ritov et al., 1995). Είναι γνωστό ότι ορισμένα άτομα είναι ευαίσθητα στα φλαβονοειδή. Συγκεκριμένα το 3 - 5% του πληθυσμού παρουσιάζει αλλεργίες λόγω των αντισωμάτων που έχουν ανευρεθεί στο ανθρώπινο αίμα και σχετίζονται με τα φλαβονοειδή.

Κορυφαίοι διατροφολόγοι συνιστούν την κατανάλωση κόκκινου κρασιού χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά του σε φλαβονοειδή και τη θετική επίδρασή του στο κυκλοφορικό σύστημα λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους.

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί η μεταλλαξιγόνο δράση ορισμένων φλαβονοειδών, με προεξέχον παράδειγμα την κουερκετίνη, γεγονός το οποίο προκαλεί ανησυχία επειδή κάποιες μεταλλάξεις τελικά οδηγούν στον καρκίνο. Παρόλα αυτά, καμία συσχέτιση δεν έχει βρεθεί ανάμεσα στα φλαβονοειδή και στον ανθρώπινο καρκίνο. Επιπλέον, ορισμένα φλαβονοειδή προδιαθέτουν για μια αντι - μεταλλαξιγόνο δράση (Choi et al., 1994´ Agullo et al., 1996 και 1997´ Anderson et al., 1997 και 1998).

Να σημειωθεί ότι έχει ανακαλυφθεί ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης της κουερκετίνης στο DNA και συγκεκριμένα ο ρόλος της στην αναχαίτιση της δράσης της τοποϊσομεράσης II (Duthie & Dobson, 1999) και IV (Bernard et al., 1997). Το ένζυμο αυτό ανοίγει την διπλή έλικα του DNA με σκοπό να δημιουργηθούν πρόσθετα τμήματα της αλυσίδας ή αντίγραφα αυτής. Στη συνέχεια, η διπλή έλικα του DNA επανενώνεται

αλλά το τελικό αυτό στάδιο αναστέλλεται υπό την επίδραση της κουερκετίνης. Αποτέλεσμα αυτής της θραύσης είναι η ύπαρξη μιας μονόκλωνης αλυσίδας, η οποία μπορεί να είναι αρκετή για να δημιουργηθεί εκ νέου η δίκλωνη αλυσίδα, αλλά παρόλα αυτά έχουν χαθεί γενετικές πληροφορίες. Η ύπαρξη της μονόκλωνης αλυσίδας έχει σαν συνέπεια την έναρξη μηχανισμών επιδιόρθωσης όπου, είτε θα δημιουργηθεί εκ νέου ανέπαφη η δίκλωνη αλυσίδα είτε σπανιότερα θα συμβεί μια μετάλλαξη.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.28** α) Οι δύο φαινολικές αλυσίδες της τυροσίνης στο ενεργό μέρος της τοποϊσομεράσης II συνήθως σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με τις φωσφατάσες του DNA. T= θυμίνη. β) Παράθεση του φλαβονοειδούς κουερκετίνη ανάμεσα στις δύο αλυσίδες της τυροσίνης

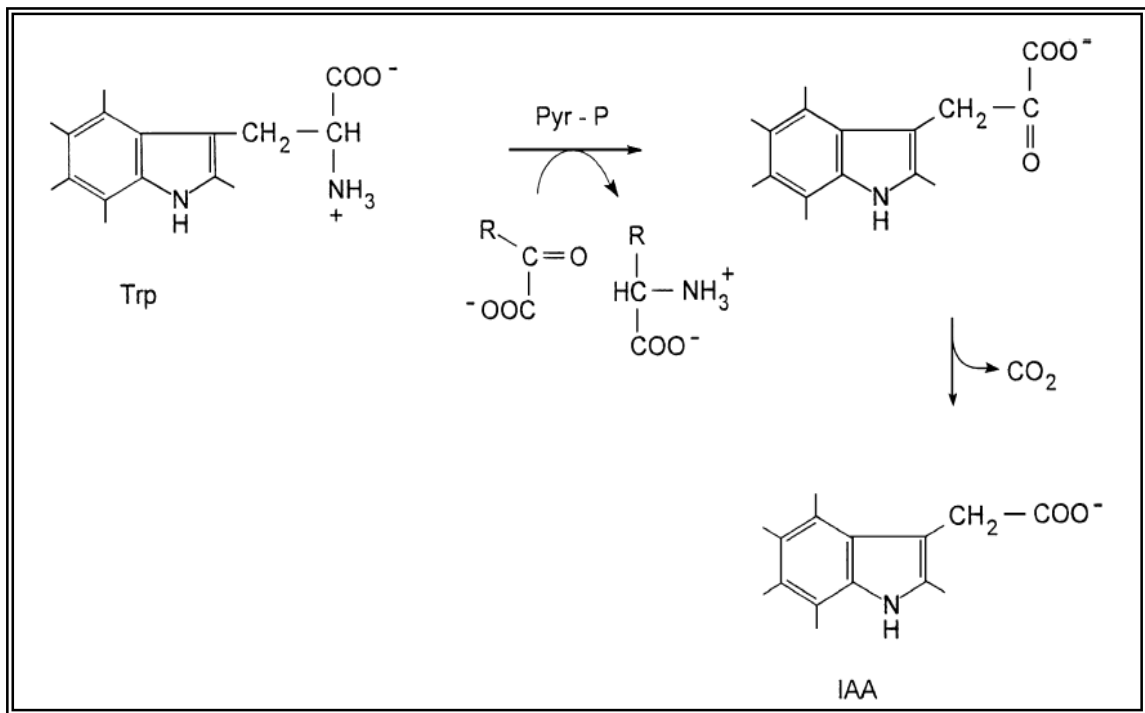
Τα δύο άκρα του DNA συνδέονται παροδικά με το ενεργό μέρος της τοποϊσομεράσης όπου εδρεύουν οι δύο αλυσίδες της τυροσίνης. Η δομή της κουερκετίνης μοιάζει με τον φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης. Έτσι, το συγκεκριμένο φλαβονοειδές ενδέχεται να παρατίθεται ανάμεσα στους δύο φαινολικούς δακτυλίους, πιθανώς λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Ενδεχομένως, στο γεγονός αυτό να στηρίζεται και η θεωρία περί μεταλλάξεων (Εικόνα 1.19) (Howard et al., 1994<sup>1</sup> Leteurtre et al., 1994<sup>2</sup> Freudenreich & Kreuzer, 1994).

Τα φλαβονο-ευαίσθητα γονίδια σχετίζονται με τη γεωγραφικού μήκους ανάπτυξη, την απόκριση στο στρες και στον χρωματισμό πετάλων ανθέων. Ωστόσο, λίγες λεπτομέρειες είναι γνωστές σχετικά με τον μηχανισμό δράσης.

## **1.5 Ο ρόλος των φλαβονοειδών στη φυσιολογία των φυτών**

Τα φλαβονοειδή αποτελούν ουσιαστικά συστατικά των κυττάρων ανώτερων φυτών. Οι περισσότερες ιδιότητές τους μοιάζουν με αυτές των λιποδιαλυτών βιταμινών, αλλά χάρη στο χρώμα και στην οσμή τους εξυπηρετούν ως μέσο επικοινωνίας με το περιβάλλον (Middleton & Teramura, 1993· Harborne et al., 1976· Brouillard & Cheminat, 1988· Harborne, 1986, 1988a και 1988b). Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή συνεισφέρουν στην γονιμοποίηση των ανθέων και στην διασπορά των σπόρων επειδή προσελκύουν έντομα, πουλιά και ζώα. Η ρόλος των φλαβονοειδών στην ανάπτυξη των φυτών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων καθώς αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την διασταύρωση των φυτών, στην γεωργική οικονομία και στην παγκόσμια υγεία (Moyano et al., 1996). Επιπλέον, ο ρόλος αυτός είναι σχεδόν όμοιος και στα ζώα. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την υποψία ότι πιθανόν τα φλαβονοειδή επηρεάζουν τον μεταβολισμό ανάπτυξης των ζωικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και αυτά του ανθρώπου (Groteweld et al., 1994· Jiang et al., 1999· Ceriani et al., 1999· Ghosal & Jaiswal, 1980· Fragner, 1964· Albrecht et al., 1999). Ωστόσο, τέτοιου είδους έρευνες παρακωλύονται εξαιτίας της δυσκολίας του σχεδιασμού μιας μακροχρόνιας δίαιτας που να αφορά αποκλειστικά τη συντήρηση ενός οργανισμού και να είναι εντελώς απαλλαγμένη από την παρουσία φλαβονοειδών.

Ο τρόπος δράσης των φλαβονοειδών στην ανάπτυξη των φυτών, ο οποίος είναι γνωστός, είναι εν μέρει έμμεσος και σχετίζεται με την δράση των αυξινών. Κύριος εκπρόσωπος αυτής της ομάδας, το ινδολυλοξικό οξύ (IAA), σχηματίζεται από την τρυπτοφάνη μέσω απαμίνωσης ή τρανσαμίνωσης της φωσφορικής πυριδοξάλης (Pyr-P) ακολουθούμενη από αποκαρβοξυλίωση (Εικόνα 1.29).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.29** Μεταβολική μετατροπή της τρυπτοφάνης σε IAA.

Trp: τρυπτοφάνη, Pyr-P: φωσφορικής πυριδοξάλης, IAA: ινδολυλ- οξικό οξύ

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο η αυξητική ορμόνη ενδέχεται να απομακρυνθεί από το κύτταρο με σκοπό την διασπορά της στο φυτό μέσω του αγγειακού συστήματος. Η αυξητική ορμόνη εξέρχεται από το κύτταρο είτε απευθείας από την κυτταρική μεμβράνη, η οποία είναι διαπερατή στα αρωματικά συστατικά, ή το πιθανότερο μέσω εγκλεισμού σε κύστεις που σχηματίζονται στα διαμερίσματα της συσκευής Golgi, είτε μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου ακολουθούμενη από εξωκυττάρωση.

Άλλα κύτταρα μπορούν να προσλάβουν το IAA μέσω ενός υποδοχέα διαμεσολαβητή της ενδοκύττωσης ή μέσω μιας κυτταρικής μεμβράνης εξειδικευμένης στα αρωματικά συστατικά. Είναι γνωστό ότι στον άνθρωπο ο αιματο-εγκεφαλικός φραγμός περιέχει έναν μεταφορέα για την ορμόνη σεροτονίνη (5- υδροξυτρυπταμίνη) η οποία ομοιάζει με το IAA. Απαιτείται ATP για την ενεργή μεταφορά της σεροτονίνης και γλυκόζης εντός του εγκεφάλου (Crone, 1965 και 1986' Shoshan et al., 1980' Kimmich & Randles, 1978). Τα κοκκιώματα των σιτευτικών κυττάρων περιέχουν σεροτονίνη και ισταμίνη όπου η εξωκυττάρωση των ουσιών αυτών στο αίμα πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού  $\text{Ca}^{2+}$  -εξαρτώμενου (Wilson et al., 1991' Fewtrell & Gomperts, 1977a, 1977b' Van Canegham, 1972), δηλαδή είναι εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP (Cyclic adenosine monophosphate - cAMP). Ωστόσο, η διαδικασία αναστέλλεται από τα φλαβονοειδή τα οποία εμποδίζουν την υδρόλυση του cAMP από την φωσφοδιεστεράση (PDE) (Pene et al., 1988' Bradley & Cazort, 1970' Conti & Setnikar, 1975' Herbst, 1970' Setnikar et al., 1960' Saponara & Bosisio, 1998).

Είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία των φλαβονοειδών εμπλέκεται στην σύνθεση των εικοσανοειδών, κυρίως των προσταγλανδινών, τα οποία μέσω της στερεοχημικής παρεμπόδισης προλαμβάνουν την ένωση με το υπόστρωμα του αραχιδονικού οξέος. Ενδεχομένως οι ουσίες αυτές να εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταφοράς στην κυτταρική μεμβράνη (Jacobs & Rubery, 1988· Schubert et al., 1999). Είναι ακόμα άγνωστο εάν οι προσταγλανδίνες ή παρόμοιες ουσίες ανοίγουν συγκεκριμένες οδούς στην κυτταρική μεμβράνη των φυτών ή εάν συμμετέχουν μέσω της εξωκυττάρωσης στην κοκκιώδη στοιβάδα. Ωστόσο, ειδικοί υποδοχείς στην μεμβράνη ζωικών κυττάρων για τις προσταγλανδίνες είναι γνωστές (Kurachi et al., 1989· van Canegham, 1972), καθώς επίσης τα εικοσανοειδή μπορεί να επηρεάζουν την παραγωγή της φωσφοκινάσης. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται σε γενετικούς λόγους από τη στιγμή όπου τα εικοσανοειδή ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τα ένζυμα (Medina et al., 1994· Fine et al., 1992· Lorenzo et al., 1996).

Τα εικοσανοειδή από μόνα τους σχηματίζονται μετά την επαγωγή της κυκλοξυγονάσης (COX) από τις ορμόνες και τις κυτοκίνες, τους ινοβλάστες και άλλους παράγοντες αύξησης (Vane, 1971· Vane et al., 1994). Με αυτή την προοπτική, τα φλαβονοειδή είναι πιο σωστό να κατατάσσονται ως βοηθητικές αυξίνες στην φυσιολογία του φυτού (Jacobs & Rubery, 1988· Stenlid, 1976). Κατά συνέπεια αυξάνουν την συγκέντρωση του IAA διότι παρεμποδίζουν την «διαρροή» του από τα κύτταρα. Σαν αποτέλεσμα, η έκφραση του γονιδίου οδηγεί σε μακροχρόνια αύξηση του φυτικού κυττάρου εξαιτίας του IAA. Η συγκέντρωση των ελεύθερων φλαβονοειδών αυξάνεται έπειτα από αύξηση της συγκέντρωσης της φαινυλαλίνης ή από την αναστολή της γλυκοζυλίωσης και γλυκοσιδάσης (Partridge & Keen, 1976).

Μια επιπλέον ιδιότητα των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα της κουερκετίνης στην φυσιολογία των φυτών είναι η αναστολή της μεταφοράς ενέργειας κατά τη διάρκεια της φωτοφωσφορύλιωσης (Mukohata et al., 1978· Cantley & Hammes, 1976). Ο Cantley ανακάλυψε θέσεις σύνδεσης της κουερκετίνης στον χλωροπλάστη. Ωστόσο ο ακριβής τρόπος δράσης παραμένει άγνωστος και απαιτεί αποσαφήνιση.

Εξαιτίας της παρόμοιας δομής των φλαβονοειδών με την ουβικινόνη (συνένζυμο Q10 με αντιοξειδωτική δράση) έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν ή να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες.

Τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό του αζώτου στα φυτά μέσω της ικανότητας αζωτοδέσμευσης βοηθώντας στην διαδικασία σχηματισμού φυματίων στις ρίζες τους. Στα φυμάτια αυτά υπάρχουν βακτήρια που έχουν την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης, τα λεγόμενα αζωτοδεσμευτικά, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, τα οποία συμβιώνουν με τα ψυχανθή φυτά. Το φυτό εμποδίζει την μετατροπή του αζώτου σε αμμωνία διατηρώντας το επίπεδο του οξυγόνου σε χαμηλά επίπεδα και τα βακτήρια παράγουν τις τρεις πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αζωτοδέσμευση: την αναγωγή της νιτρογενάσης, τη νιτρογενάση και το συνένζυμο FeMo-co, το οποίο είναι πολύ ευαίσθητο στην παρουσία οξυγόνου (Mortenson & Thorneley, 1979). Κύριος ρόλος των φλαβονοειδών είναι ενδεχομένως η επίδρασή τους επί των γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες απαραίτητες για τα κύτταρα

των φυματίων. Επίσης είναι πολύ σημαντική η συμμετοχή τους στην μείωση του επιπέδου οξυγόνου διότι τα φλαβονοειδή είναι αντιοξειδωτικά.

### **1.5.1 Ο ρόλος των φλαβονοειδών ως μεταφορείς μηνυμάτων**

Γενικά η συνεργασία απαιτεί επικοινωνία και οργάνωση. Στην περίπτωση της συμβίωσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και των ψυχανθών φυτών, τα φλαβονοειδή συμμετέχουν με ποικίλους τρόπους και ρόλους στην μεταφορά μηνυμάτων. Φαινομενικά, τα ψυχανθή φυτά για να καλύψουν τις βιολογικές τους διεργασίες έχουν ανάγκη από αζωτούχες ουσίες όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα ή η αμμωνία. Έχει ανακαλυφθεί ότι τα ψυχανθή απελευθερώνουν εκκρίματα, τα οποία περιέχουν διάφορα φλαβονοειδή, από τις ρίζες τους στο έδαφος. Τα εκκρίματα αυτά εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα επηρεάζοντας τα γονίδια τα οποία προάγουν την δημιουργία φυματίων καθώς και την αζωτοδέσμευση. Οι Srivastava et al. (1999) ανακάλυψαν με την βοήθεια της HPLC τα εξής έξι φλαβονοειδή: ναρινγενίνη, δαϊφζεΐνη, εσπεριτίνη, ναρινγίνη, 7- υδροξύ - κουμαρίνη και λουτεολίνη που περιέχονταν σε εκκρίματα ψυχανθών. Το κάθε φλαβονοειδές μεμονωμένα ήταν ικανό να επηρεάσει την έκφραση των βακτηριακών γονιδίων που σχετίζονται με τα φυμάτια αλλά ωστόσο ο συνδυασμός της ναρινγενίνης και της δαϊφζεΐνης απέδωσαν την μεγαλύτερη βιολογική επίδραση.

Όταν τα βακτηριακά κύτταρα φτάνουν στις ρίζες του φυτού απελευθερώνουν λιποχιτοολιγοσακχαρίτες ευνοώντας τους παράγοντες που σχετίζονται με τον σχηματισμό φυματίων. Σαν αποτέλεσμα επέρχεται παραμόρφωση των ριζών και κάθετη διαίρεση των κυττάρων με ταυτόχρονη είσοδο των βακτηριακών κυττάρων ανάμεσα στα ενδοδερμικά στρώματα των φυτικών κυττάρων τις επονομαζόμενες πλάγιες ρωγμές των ριζών (Gough et al., 1997). Οι Broughton & Perret (1999) απέδειξαν ότι κατά την συμβίωση των ψυχανθών φυτών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, η διαδικασία σχηματισμού των φυματίων πραγματοποιείται χάρη στην ικανότητα των βακτηρίων να δημιουργούν πλασμίδια τα οποία μεταφέρουν τα απαραίτητα γονίδια. Τα φλαβονοειδή σε όλη αυτή τη διεργασία συνεισφέρουν θετικά επιταχύνοντας την διαδικασία διαμέσου των γονιδίων.

## **1.6 Η φαρμακολογία των φλαβονοειδών στα ζώα**

Ως τώρα, η επιστήμη της φαρμακολογίας είχε επικεντρώσει τις προσπάθειές της κυρίως στις ισχυρές τοξίνες των φυτών και στα προβλήματα που θα προκαλούσαν κατά την κατανάλωσή τους, καθώς επίσης και σε ουσίες οι οποίες έβρισκαν εφαρμογή στην ιατρική. Αντίθετα, φυσικά προϊόντα τα οποία καταναλώνονταν καθημερινά σε μεγάλες



ποσότητες ως συστατικά μιας φυσιολογικής διατροφής του ανθρώπου, αλλά ήταν ελάχιστα τοξικά, είχαν σχεδόν αγνοηθεί (Hughes & Wilson, 1977· Gabor, 1981). Τα φλαβονοειδή ανήκουν σε αυτή την κατηγορία των ουσιών.

Το υψηλό κόστος για τις φαρμακολογικές αναλύσεις αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για την περαιτέρω διερεύνηση των φλαβονοειδών. Ωστόσο, η κατανάλωση των ουσιών αυτών ενδεχομένως μακροχρόνια, εξαιτίας της έστω και μικρής τοξικότητάς τους, να έβλαπταν την υγεία όπως για παράδειγμα κατά την συσσώρευσή τους σε όργανα μείζονος σημασίας, ειδικά στο ήπαρ, ή διαμέσου διάφορων επιπλοκών στο ανοσολογικό σύστημα. Οι λόγοι αυτοί αποτέλεσαν την κινητήριο δύναμη ώστε να διερευνηθούν διεξοδικά οι επιδράσεις των φλαβονοειδών. Πρόσφατα, τα φλαβονοειδή έγιναν αντικείμενο έρευνας για πολλούς επιστήμονες (Di Carlo et al., 1999· Wada et al., 1999). Επίσης, ένας επιπρόσθετος προβληματισμός διαμορφώθηκε από τη στιγμή που μπορεί τα φλαβονοειδή να επηρεάζουν τον μεταβολισμό των φαρμάκων (Conney et al., 1981).

Η περιορισμένη τοξικότητα των φλαβονοειδών αποδίδεται στην χαμηλή διαλυτότητα της αγλυκόνης στο νερό και ο γρήγορος καταβολισμός του πυρήνα της πυρόνης στο ήπαρ. Η μικρή ικανότητα διαλυτότητας των φλαβονοειδών στο νερό συχνά παρεμποδίζουν την ιατρική εφαρμογή αυτών των ουσιών. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη των ημισυνθετικών υδατοδιαλυτών φλαβονοειδών για την θεραπεία της υπέρτασης και της αιμορραγίας, αποτέλεσε μια σημαντική πρόοδο στον τομέα αυτό. Παραδείγματα τέτοιων φλαβονοειδών είναι η υδροξυ - μεθυλ - ρουτοσίδη και η ινοσιτόλ-2-φωσφορική κουερκετίνη (Calias et al., 1996).

### **1.6.1 Φαρμακοδυναμική**

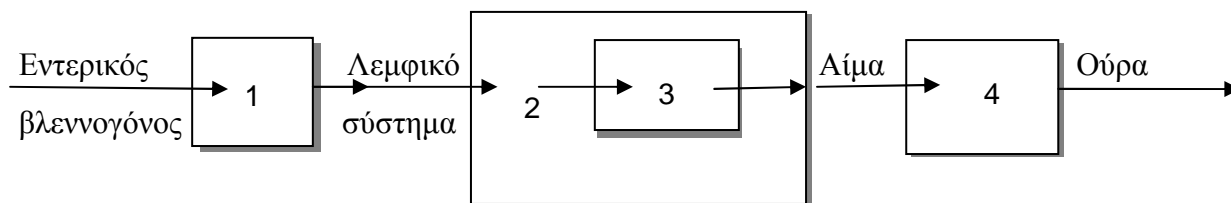
Τα φλαβονοειδή που σχετίζονται με τη θρέψη απορροφώνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα (Crespy et al., 1999· Pforte et al., 1999), ενώ τα φλαβονοειδή με θεραπευτικές ιδιότητες χορηγούνται απευθείας στο μολυσμένο ιστό, εάν αυτό είναι εφικτό, όπως για παράδειγμα στο δέρμα, στον οισοφάγο, την ρινική κοιλότητα ή το αγγειακό σύστημα (Metzner et al., 1979· Heilmann & Merfort, 1998· Masquelier et al., 1979· Spilkova & Hubik, 1986 και 1988· Spilkova & Dusek, 1996· Hollman & Katan, 1997 και 1998· Hollman et al., 1996· Hollman, 1997· Rice-Evans & Miller, 1996· Maxwell & Thorpe, 1996· Di Carlo et al., 1999· Balentine et al., 1997· Gabor, 1988· Booth et al., 1956· Cheng et al., 1969· Griffiths & Barrow, 1972· Griffiths & Smith, 1972a και 1972b· Griffiths, 1975· Petrakis et al., 1959· Piller, 1977· Simpson et al., 1969· Struckmann, 1999). Με τη βοήθεια των βακτηριακών ενζύμων πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο απελευθέρωση γλυκοζιτών από την αγλυκόνη των φλαβονοειδών. Περίπου το 15% της αγλυκόνης των φλαβονοειδών απορροφάται από τις μικέλλες της χολής και μέσω των επιθηλιακών κυττάρων περνάει στην λέμφο (Day et al., 1998· Spencer et al., 1999). Ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος καθορίζει την

αποτελεσματικότητα της απορρόφησης των γλυκοζιτών από το λεπτό έντερο είναι η έλλειψη σακχάρων. Ο Hollman και οι συνάδελφοί του (Hollman & Katan, 1999' Hollman et al., 1999a) απέδειξαν ότι οι γλυκοζίτες της κουερκετίνης από τα κρεμμύδια απορροφιόντουσαν καλύτερα σε ποσοστό 52% σε σχέση με την καθαρή αγλυκόνη της οποίας το ποσοστό απορρόφησής της ήταν 24%.

Τα υπολείμματα των φλαβονοειδών αποβάλλονται με τα κόπρανα και κάποια με τα ούρα (Choudhury et al., 1999). Η λέμφος που μεταφέρει τα φλαβονοειδή εισέρχεται στην κεντρική αρτηρία κοντά στο ήπαρ και η πλειοψηφία αυτών απορροφάται (περίπου το 80%) πιθανόν στην πρώτη δίοδο (Casley-Smith & Casley-Smith, 1986). Ένα μέρος των φλαβονοειδών ενδεχομένως προσκολλάται στον ορό της αλβουμίνης, ενώ το υπόλοιπο παραμένει συζευγμένο και διατηρεί τις αντιοξειδωτικές ικανότητές του (Manach et al., 1998). Τα ηπατοκύτταρα μεταφέρουν τα φλαβονοειδή στη συσκευή Golgi, ίσως και στα υπεροξυσώματα, όπου μέσω της οξειδωσης αποδομούνται (Griffiths & Smith, 1972a, 1972b). Μέρος της οξειδωτικής αποδόμησης των αγλυκονών των φλαβονοειδών πραγματοποιείται και στο λεπτό έντερο, καθώς ορισμένα βακτηριακά ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να ανοίγουν το σκελετό του άνθρακα των φλαβονοειδών (Winter et al., 1989).

Τα προϊόντα εκκρίνονται με τη βοήθεια «μεταφορέων» οργανικών οξέων στο αίμα και ακολούθως αποβάλλονται από τους νεφρούς (Bourne & Rice-Evans, 1999). Η χρόνος ημιζωής ενός τυπικού φλαβονοειδούς στο σώμα έχει υπολογισθεί ότι είναι περίπου μια με δύο ώρες όμως δεν έχουν δημοσιευθεί ακριβή δεδομένα. Δεδομένου ότι υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με τον ρυθμό μεταφοράς των φλαβονοειδών καθώς και με τα προϊόντα αποδόμησής τους, η πρόταση ενός ολοκληρωμένου και ρεαλιστικού μοντέλου θα ήταν ελλιπής (Honcha et al., 1995' Griffiths & Barrow, 1972' Lenne-Gouverneur et al., 1999). Παρόλα αυτά έχει μελετηθεί η έκκριση των οργανικών οξέων από τους νεφρούς στα ούρα σε ποντίκια (Moller, 1969). Επίσης, έχει δοθεί ένα αρχικό μοντέλο της φαρμακοδυναμικής των φλαβονοειδών στα ανώτερα θηλαστικά (Σχήμα 1.1)

Το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή δεν συσσωρεύονταν στο ήπαρ και τα προϊόντα αποδόμησής τους (καφεϊκό και σινναμικό οξύ καθώς και τα παράγωγά τους) αποβάλλονταν τελείως μέσω των ούρων με ρυθμό παρόμοιο με αυτήν της καφεΐνης, δεν κατέστησε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν άμεσα περαιτέρω έρευνες για την λεπτομερή σκιαγράφηση της διαδικασίας απέκκρισής τους.



**Σχήμα 1.1** Μοντέλο της φαρμακοδυναμικής των φλαβονοειδών στα ανώτερα θηλαστικά. Διέλευση των φλαβονοειδών από τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου (1), μέσω του λεμφικού συστήματος στα ηπατοκύτταρα (2) και στη συσκευή Golgi (3) ή στα υπεροξυσωμάτια, είσοδος ξανά στην κυκλοφορία του αίματος και τέλος στους νεφρούς για να αποβληθούν με τα ούρα.

### 1.6.2 Οξεία τοξικότητα των φλαβονοειδών

Εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας των φλαβονοειδών στο νερό, στον ελάχιστο χρόνο παραμονής τους στο λεπτό έντερο καθώς και στον μικρό συντελεστή απορρόφησης τους, είναι απίθανο να υπάρξουν στον ανθρώπινο οργανισμό συμπτώματα οξείας τοξικότητας μετά από την κατανάλωσή τους. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της ευαισθησίας λόγω των αλλεργιών (Petersen, 1977· Petersen & Afzelius, 1977· Hausen & Wollenweber, 1988· Hausen et al., 1987a και 1987b)

Συνεπώς, τα περιθώρια ασφαλείας στη χορηγούμενη ποσότητα φλαβονοειδών για θεραπευτικούς λόγους στον άνθρωπο είναι πολύ μεγάλα και ξεπερνούν κάθε άλλο χορηγούμενο φάρμακο (Grotz & Gunther, 1971). Ωστόσο, είναι απαραίτητο να δίνεται προσοχή κατά την ενδοφλέβια χορήγηση ακάθαρτων εκχυλισμάτων φλαβονοειδών. Τέτοιου είδους πράξη ενδέχεται να οδηγήσει σε αναφυλακτικό σοκ ή σε παρεμφερείς ανοσολογικές κρίσεις. Τέτοιου είδους περιστατικά έχουν καταγραφεί ήδη και επομένως είναι σκόπιμο η χορήγηση των φλαβονοειδών να γίνεται μόνο στην καθαρή μορφή τους.

### 1.6.3 Μακροπρόθεσμες επιπτώσεις των φλαβονοειδών

Από την εμφάνιση του ανθρώπινου είδους στην γη, περίπου πριν τέσσερα εκατομμύρια χρόνια, τα φλαβονοειδή συμμετείχαν καθημερινά στην διατροφή του. Σύμφωνα με τους αρχαιολόγους και τους ανθρωπολόγους, η καθημερινή κατανάλωση των φλαβονοειδών από τον άνθρωπο πιθανόν παρέμεινε σταθερή για μια μεγάλη χρονική περίοδο δεδομένου ότι δεν παραλλάχτηκαν οι διατροφικές συνήθειες και τα

συστατικά των τροφών παρέμειναν τα ίδια. Συνεπώς, η κατανάλωση των φλαβονοειδών δεν επέφερε αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπινου είδους με το πέρασμα των χρόνων.

Παρόλα αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα φλαβονοειδή των φυτών επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων και πιθανόν να προτρέπουν διαφόρων ειδών μεταλλάξεις στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η καθημερινή κατανάλωση φλαβονοειδών από τους ανθρώπους προκαλεί προβληματισμό στον επιστημονικό χώρο, αν και ο χρόνος ημιζωής τους περιορίζεται σε λίγες ώρες περιορίζοντας δραματικά τις αρνητικές επιδράσεις τους.

Συμπερασματικά, οι κίνδυνοι που οφείλονται στην κατανάλωση των φλαβονοειδών είναι αναμφίβολα μικρής σημασίας. Επιπλέον, είναι αναπόφευκτη η κατανάλωσή των φλαβονοειδών επειδή η απομάκρυνσή τους από την καθημερινή διατροφή του ανθρώπου καθίσταται αδύνατη μιας και περιέχονται σχεδόν σε όλες τις τροφές όπως τα λαχανικά, τους χυμούς και τα φρούτα. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια παρατηρήθηκε έπειτα από τρεις βδομάδες συνεχούς χορήγησης υψηλών δόσεων φλαβονοειδών, μορφολογικές αλλοιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων το οποίο οδήγησε στη νέκρωσή τους και σταδιακά στον θάνατο των πειραματόζωων (Nagao et al., 1981· Ambrose et al., 1951 και 1952).

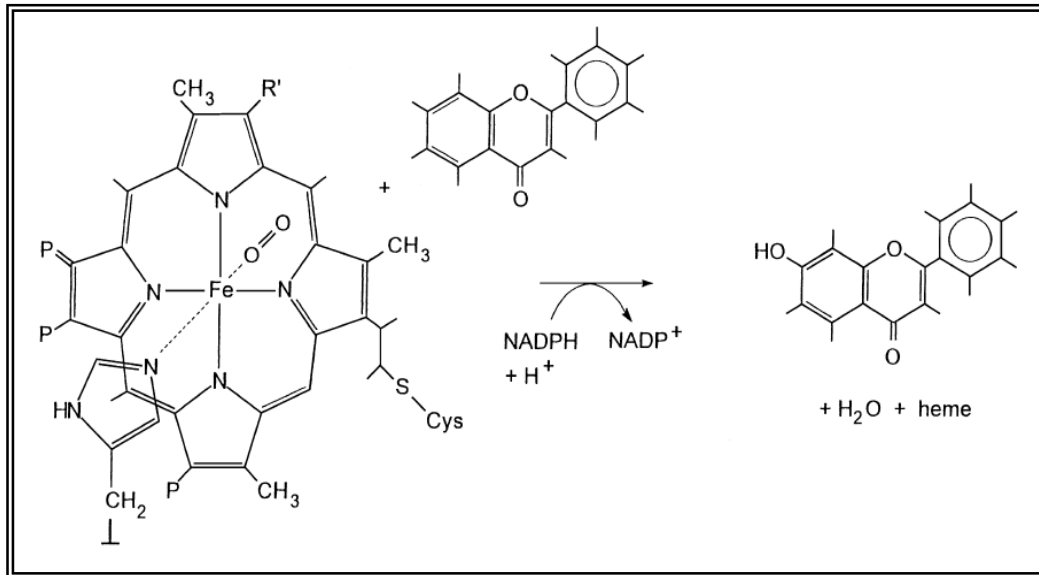
Καταλήγοντας, τα φλαβονοειδή προάγουν την υγεία και την ευεξία του ανθρώπου ενώ οι μεταλλάξεις και τα τοξικά φαινόμενα περιορίζονται σε περιπτώσεις αλλεργιών ή σε χορήγηση μεγάλων δόσεων, κάτι το οποίο ισχύει για όλες τις ουσίες (Cea et al., 1983· Sahu et al., 1981· Seino et al., 1979· Beretz et al., 1978· Brown et al., 1977· Sugimura et al., 1977).

#### **1.6.4 Ο καταβολισμός των φλαβονοειδών**

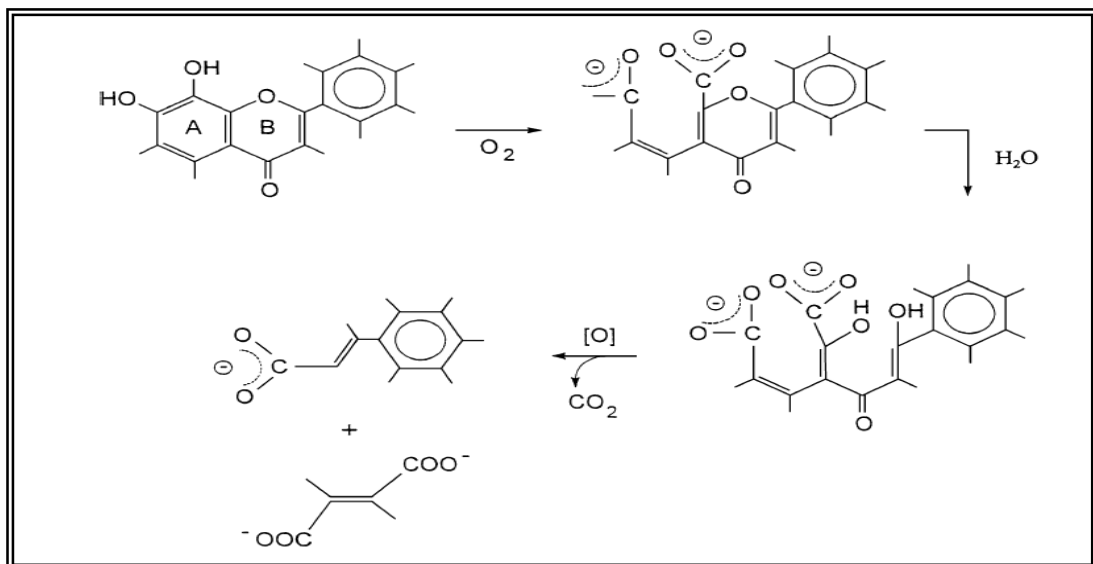
Στα φλαβονοειδή, όπως και σε άλλες αρωματικές ουσίες, ο δακτύλιος ανοίγει λόγω της υδροξυλίωσης σε κατάλληλες κενές θέσεις. Τέτοιου είδους δυνατές θέσεις είναι οι εξής: C3, C5, C8, C'1 και C'5 για τις φλαβόνες και C2, C5 - C8, C'1 - C'5 για τις ισοφλαβόνες. Όπως και με πολλές θεραπευτικές ουσίες, τα φλαβονοειδή υποκινούν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τα ισοένζυμα των οξυγενασών ειδικά για συγκεκριμένη αγλυκόνη του φλαβονοειδούς. Για την αντίδραση αυτή μεσολαβεί το κυτόχρωμα P450 (Boulton et al., 1999· Dai et al., 1997) καθώς και THF (τετραϋδροφολικό οξύ), NADPH, FAD (φλαβινο - αδενο - δινουκλεοτίδιο),  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Fe}^{2+}$  τα οποία εισάγουν ένα από τα άτομα του οξυγόνου στο φλαβονοειδές, ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου σχηματίζει ένα μόριο νερού (Εικόνα 1.30).

Το προαπαιτούμενο για το άνοιγμα της δομής του αρωματικού δακτυλίου είναι η ύπαρξη γειτονικών υδροξυλομάδων διότι παρέχουν την θέση για την έναρξη της οξειδωτικής διαδικασίας. Δυστυχώς, τα απαραίτητα προπαρασκευαστικά στάδια

καταβολισμού των φλαβονοειδών εγκυμονούν τον κίνδυνο των μεταλλάξεων ή της καρκινογένεσης αλλά το αντίθετο θα οδηγούσε σε συσσώρευση αρωματικών ουσιών στο ήπαρ (Εικόνα 1.31) με καταστροφικά αποτελέσματα για αυτό.



**Εικόνα 1.30** Ενεργοποίηση του οξυγόνου από το κυτόχρωμα P450 σε συγκεκριμένο ισοένζυμο της οξυγενάσης με παράλληλη προετοιμασία για την υδροξυλίωση του φλαβονοειδούς και απελευθέρωση ενός μορίου νερού.



**Εικόνα 1.31** Οξειδωτικό άνοιγμα του δακτυλίου ενός φλαβονοειδούς για την παραγωγή κουμαρικού, κινναμικού, μυρμηκικού και καφεϊκού οξέος καθώς και παραγώγων τους. Τα παραπάνω εκκρίνονται μέσω των νεφρών μέσα σε μία ώρα.

## 1.7 Άλλες ιδιότητες των φλαβονοειδών

Πέρα των όσων αναφέρθηκαν τα φλαβονοειδή σχετίζονται και με τα εξής:

- ✓ εμπλέκονται ως ρυθμιστές στην ανοσολογία παρουσιάζοντας παρόμοια δράση με τα T- λεμφοκύτταρα (Schwartz & Middleton, 1984· Schwartz et al., 1982· Hughes, 1999· Middleton, 1998),
- ✓ απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες γεγονός το οποίο προσδίδει στα φλαβονοειδή θεραπευτικό και προφυλακτικό ρόλο κατά των μολύνσεων, των φλεγμονών, των εγκαυμάτων ή αλλοιώσεων από ακτινοβολία (Fritz-Niggli & Frohlich, 1980· Fritz-Niggli & Rao, 1978· Fritz-Niggli, 1968· Calzada et al., 1999).
- ✓ μεταφέρουν ηλεκτρόνια κατά την κατάλυση αντιδράσεων συμμετέχοντας έτσι σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες (Chang et al, 1994)
- ✓ επηρεάζουν το ορμονικό σύστημα και δρουν σαν ορμόνες τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Έρευνες έδειξαν ότι πρόβατα τα οποία διατράφηκαν με ενσίρωμα τριφυλλιού παρουσίασαν οίστρο, ενδεχομένως λόγω ότι τα φλαβονοειδή συμπεριφέρθηκαν σαν οιστρογόνα (Sonnenbichler and Pohl, 1980).
- ✓ επηρεάζουν τις αισθήσεις π.χ. το οσφρητικό σύστημα (Horisberg et al., 1991)
- ✓ και τέλος τα φλαβονοειδή έχουν θεραπευτικές ιδιότητες σε περιπτώσεις υπέρτασης, χοληστερίνης, αιμορραγιών, φλεγμονών, οίδημάτων, χαλάρωσης του συνδετικού ιστού, ρευματικών παθήσεων. Επίσης, προλαμβάνουν τα γαστρικά έλκη, τη νόσο του Αλτσχάιμερ, τη στεφανιαία νόσο της καρδιάς καθώς και μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών κατά του καρκίνου και του ιού του AIDS.

Συνοψίζοντας, τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυσικών συστατικών, μικρού μοριακού βάρους, πολυφαινολικά συστατικά ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο ως δευτερεύοντες μεταβολίτες. Αντιπροσωπεύουν μια από της πιο σημαντικές και ενδιαφέρουσες κλάσεις των βιολογικά ενεργών συστατικών και ανευρίσκονται τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και σε γλυκοζίτες. Η δομή τους βασίζεται στη φλαβόνη (2- φαινυλ- χρωμόνη ή 2- φαινυλ- βενζοπυρόνη), χαρακτηρίζεται από C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ανθρακικό σκελετό όπου τα C<sub>6</sub> είναι αρωματικοί δακτύλιοι. Τα φλαβονοειδή υπάρχουν σε όλα τα μέρη του φυτού συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των λαχανικών, των σπόρων, των φύλλων, των ανθέων και του φλοιού (Middleton, 1984).

Ο Dr Albert Szent-Gyorgi, ένας διάσημος Ουγγρός ερευνητής, ανακάλυψε ότι τα φλαβονοειδή της φλούδας των εσπεριδοειδών εμποδίζουν την αιμορραγία των τριχοειδών αγγείων ενώ ήταν ο πρώτος που ανέφερε την βιολογική δραστηριότητα των φλαβονοειδών σε συσχέτισμό με το σκορβούτο (Szent-Gyorgi, 1938). Το ευρύ φάσμα των βιολογικών δραστηριοτήτων τόσο της ομάδας των φλαβονοειδών στο σύνολο όσο και για κάθε φλαβονοειδές μεμονωμένα, τα καθιστά ως την μεγαλύτερη τάξη φυσικών

ουσιών που εμπλέκεται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Για αυτό και συχνά αποκαλούνται και βιοφλαβονοειδή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### *Εσπεριδοειδή και εσπεριδίνη*

#### 2.1 Γενικά

Η σημασία των εσπεριδοειδών στην γεωργία και στην παγκόσμια οικονομία οφείλεται στην ευρεία εξάπλωσή τους και στη μεγάλη παραγωγή τους. Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε χώρες που έχουν τροπικό και υποτροπικό κλίμα, κατάλληλο έδαφος, επαρκή υγρασία και είναι απαλλαγμένες από παγετούς.

Η καλλιεργούμενη έκταση σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται σε 24 εκατομμύρια στρέμματα, της οποίας το 80% ανήκει στις παραμεσόγειες χώρες και στη Βόρειο και Κεντρική Αμερική. Το υπόλοιπο 20% στην Άπω Ανατολή, Νότιο Αμερική και σε άλλες χώρες του Νότιου ημισφαιρίου, συμπεριλαμβανομένων της Νοτίου Αφρικής και της Αυστραλίας. Η παραγωγή σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται σε 67.398.000 τόνους. Για κάθε είδος αντιστοιχούν κατά προσέγγιση τα εξής ποσοστά: πορτοκαλιά 65%, λεμονιά 10%, γκρέϊπ φρουτ 10%, μανταρινιού 12% και λοιπά είδη 3%.

#### 2.2 Καταγωγή και εξάπλωση της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae, στην υποοικογένεια Aurantioideae, στη φυλή Citrae και στην υποφυλή Citrinae. Είναι ιθαγενή της Ν.Α. Ασίας και μάλιστα της Α. Ινδίας, παρουσιάζουν όμως συγγενείς φυλογενετικές μορφές που εκτείνονται μέχρι την κεντρική Κίνα, Ιαπωνία, Αφρική και Αυστραλία. Παρόλο που πολλές από τις υπάρχουσες ποικιλίες των εσπεριδοειδών καλλιεργούνταν από τους αρχαίους ακόμα χρόνους, οι προγεννήτορές τους παραμένουν ακόμα άγνωστοι.

Στην Ευρώπη το πρώτο γνωστό είδος από τα εσπεριδοειδή ήταν η κιτριά (*Citrus medica*). Η καλλιέργειά της στην Περσία περιγράφεται από τον Θεόφραστο γύρω στο 300 π.Χ. Στις ανατολικές μεσογειακές χώρες διαδόθηκε από τους Εβραίους, για να επεκταθεί αργότερα στην Ιταλία και στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες (Webber, 1967).

Η νερατζιά (*Citrus aurantium*) ήταν γνωστή στους Άραβες οι οποίοι και διέδωσαν την καλλιέργειά της στην Ανατολική Μεσόγειο γύρω στον 10<sup>ο</sup> αιώνα και αργότερα στην Αφρική και Νότια Ευρώπη. Η λεμονιά (*Citrus limon*), η λιμεττία (*Citrus*



aurantifolia) και η φράππα (*Citrus grandis*) διαδόθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο κατά το πρώτο ήμισυ του 12<sup>ου</sup> αιώνα.

Η πορτοκαλιά (*Citrus sinensis*) εισήχθηκε από την Κίνα και διαδόθηκε στην Ερώπη από τους Πορτογάλους κατά τον 10<sup>ο</sup> αιώνα. Να αναφερθεί ότι η πορτοκαλιά καλλιεργούνταν στην Ευρώπη πριν ακόμα την φέρουν οι Πορτογάλοι αλλά η χρήση των καρπών δεν ήταν πολύ διαδεδομένη. Οι καρποί της χρησιμοποιούνταν σαν καρύκευμα και ήταν κατώτερης ποιότητας από εκείνη που έφεραν οι Πορτογάλοι.

Η μανταρινιά (*Citrus reticulata*) δεν είχε εισαχθεί στην Ευρώπη μέχρι του νεότερους χρόνους, καλλιεργούνταν όμως στην Κίνα και την Ιαπωνία από πολύ παλιά. Το πρώτο δέντρο μανταρινιάς εισήχθηκε στην Αγγλία το 1805 και από εκεί διαδόθηκε στις Μεσογειακές χώρες.

Τα εσπεριδοειδή ήταν άγνωστα στο Δυτικό ημισφαίριο μέχρι τον ερχομό του Κολόμβου, ο οποίος κατά το δεύτερο ταξίδι του το 1493 μετέφερε σπόρους από πορτοκάλια, λεμόνια και κίτρα στη νήσο Ταϊτή. Αργότερα τον 16<sup>ο</sup> αιώνα έγιναν και νέες εισαγωγές σπόρων από τους Πορτογάλους και τους Ισπανούς.

Οι περισσότερες ποικιλίες των διαφόρων ειδών των εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται σήμερα σε όλη την υφήλιο προήλθαν κυρίως από επιλογή και μεταλλαγές.

## 2.3 Σύσταση των καρπών

Η σύσταση των καρπών των φλαβονοειδών έχει ως εξής:

- ✓ νερό σε περιεκτικότητα 70 - 92%,
- ✓ οργανικά οξέα με κύριο οξύ το κιτρικό οξύ που απαντάται στο χυμό των καρπών ενώ το μηλικό, μηλονικό και οξαλικό απαντούν στον φλοιό αυτών,
- ✓ άμυλο,
- ✓ αμινοξέα,
- ✓ βιταμίνες με σημαντικότερες την βιταμίνη C και την προβιταμίνη A,
- ✓ σάκχαρα,
- ✓ καροτινοειδή με σημαντικότερα τις καροτίνες και τις ξανθοφύλλες,
- ✓ φλαβόνες που είναι γλυκοζίτες, όπου τα σάκχαρα συνήθως η ραμνόζη και η γλυκόζη, συνδέονται με μια φλαβονόνη. Η εσπεριδίνη είναι μια συνήθως άγευστη φλαβόνη που απαντάται στα πορτοκάλια, τα λεμόνια και σε μερικά άλλα είδη. Αντίθετα, η ναρινγίνη που απαντάται κυρίως στα γκρέϊπ φρούτ είναι μια φλαβόνη με δριμεία γεύση. Επίσης, στα εσπεριδοειδή υπάρχει και η λιμονίνη που λόγω της έντονης της γεύσης προκαλεί την πικρή γεύση στο χυμό των καρπών.

✓ και τέλος τα αιθέρια έλαια και οι πηκτίνες.

Τα παραπάνω αποδεικνύουν την σημαντικότητα των εσπεριδοειδών στην διατροφή του ανθρώπου και των αγροτικών ζώων εξαιτίας της μεγάλης θρεπτικής τους αξίας.

## 2.4 Εσπεριδίνη

### 2.4.1 Γενικά

Η εσπεριδίνη είναι ένα φτηνό και άφθονο υποπροϊόν της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών και είναι το επικρατέστερο φλαβονοειδές στα πορτοκάλια και τα λεμόνια. Στα πρώιμα πορτοκάλια, η εσπεριδίνη μπορεί να ανευρεθεί σε ποσοστό 14% του βάρους του καρπού (Barthe et al., 1988). Συνήθως η παρουσία της εσπεριδίνης σχετίζεται με την ύπαρξη της βιταμίνης C. Αρχικά, ορισμένα συμπτώματα, όπως το μελάνιασμα εξαιτίας της ευθραυστότητας των αγγείων, αποδιδόταν αποκλειστικά στην έλλειψη της βιταμίνης C. Ωστόσο, έρευνες έφεραν στο φως ότι τα βιοφλαβονοειδή (που παλαιότερα ονομάζονταν βιταμίνη P) αποτελούν βασικό παράγοντα μείωσης του μελανιάσματος καθώς και ότι βελτιώνουν την διαπερατότητα και την ακεραιότητα των τριχοειδών αγγείων. Στα βιοφλαβονοειδή αυτά ανήκουν η εσπεριδίνη, η κιτρίνη, η ρουτίνη, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι κατεχίνες και η κουερκετίνη.

Έως και το 1949, η κιτρίνη θεωρούνταν μίγμα δύο φλαβονοειδών, της εριδικτυόλης και της εσπεριδίνης, με δράση παρόμοια με αυτή μιας βιταμίνης (Scarborough & Bacharach, 1949). Η ουσία αυτή μετέπειτα ονομάστηκε βιταμίνη P εξαιτίας της ιδιότητάς της να μειώνει την ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων και να βοηθά στην παράταση της ζωής των οριακά σκορβουτικών ινδικών χοιριδίων με εμφανή μείωση της υποβιταμίνωσης C. Παρόλα που ο όρος βιταμίνη P εγκαταλείφθηκε σύντομα, υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ότι η κιτρίνη συμπεριφερόταν ως αντιοξειδωτικό με δράση αντίστοιχη αυτή της βιταμίνης C (Clemetson, 1989). Η έλλειψη της εσπεριδίνης έχει συνδεθεί με την έλλειψη στεγανότητας των τριχοειδών, καθώς επίσης με πόνους στα άκρα, αδυναμία και κράμπες κατά τον νυχτερινό ύπνο. Παράλληλα, συμπληρώματα εσπεριδίνης βοηθούν στην μείωση οιδημάτων ή υπερβολικού πρηξίματος στα πόδια εξαιτίας της συσσώρευσης υγρών. Όπως και με άλλα βιοφλαβονοειδή, η εσπεριδίνη δίνει άριστα αποτελέσματα όταν χορηγείται ταυτόχρονα με την βιταμίνη C. Δεν έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα τοξικότητας κατά την κανονική χορήγηση της εσπεριδίνης.

Η εσπεριδίνη αρχικά ανακαλύφθηκε το 1827 από τον Lebreton αλλά όχι στην καθαρή της μορφή και αυτό έπειτα από συνεχείς έρευνες και προσπάθειες (Fluckiger & Hanbury, 1986). Αν και έχει αποδοθεί στην εσπεριδίνη ένα ευρύ φάσμα δράσης με

ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες, ωστόσο δεν υπάρχουν συγκεκριμένες ερευνητικές εργασίες.

## 2.4.2 Ιστορική αναδρομή

Η εσπεριδίνη απομονώθηκε σε μεγάλες ποσότητες από τον φλοιό των πορτοκαλιών *Citrus aurantium* L. (Kanes et al., 1993) Emim et al., 1994), *Citrus sinensis* (Horowitz & Gentili, 1963), *Citrus unshiu* (Kawaguchi et al., 1997) κι άλλα είδη του γένους των εσπεριδοειδών (οικογένεια Rutaceae). Έχει αναφερθεί η ύπαρξη της εσπεριδίνης και σε άλλα φυτά εκτός των εσπεριδοειδών όπως στα γένη Fabaceae (Bhalla & Dakwake, 1978), Betulaceae (Pawlowskal, 1980), Lamiaceae (Kokkalou & Karetanidis, 1988) και Papilionaceae. Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία εσπεριδίνης στον φλοιό του *Zanthoxylum avicennae* και *Zanthoxylum cuspidatum* (οικογένεια Rutaceae) (Arthur et al., 1956). Τα φυτά αυτά είναι αυτοφυή στο Χονγκ Κονγκ. Η παρουσία της εσπεριτίνης -7- β - νεοεσπεριδοσίδη (νεοεσπεριδίνη) πρόσφατα ανακαλύφθηκε στα φυτά *Cynara humilis* και *Cynara cornigera*, δύο είδη του γένους *Cynara* (αγριαγκινάρα) που ευδοκιμούν στην Ελλάδα (Chinou & Harvala, 1997). Τέλος, η εσπεριδίνη έχει απομονωθεί από τις ρίζες του φυτού *Acathorpanax setchuenensis* (οικογένεια Araliaceae) που συλλέχθηκε στην επαρχία Sichuan της Κίνας (Zhao et al., 1999).

Ωστόσο, η εσπεριδίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στα πράσινα φρούτα και η συγκέντρωση αυτή αυξάνεται κατά την αποθήκευσή τους (Higby, 1941). Οι Kawaguchi et al. (1997) ασχολήθηκαν με την κατανομή της εσπεριδίνης στο επικάρπιο, μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο καθώς και στο χυμό των εσπεριδοειδών. Η κατανομή και η συγκέντρωση της εσπεριδίνης στους διάφορους ιστούς των ώριμων καρπών του *Citrus sinensis* υπολογίστηκε με τη χρήση ραδιοανωσολογικής μεθόδου και βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα υπήρξε στις μεμβράνες και στην εντεριώνη ενώ πολύ μικρότερη συγκέντρωση εσπεριδίνης υπήρχε στους σπόρους. Στους σπόρους η συγκέντρωση της εσπεριδίνης αυξήθηκε έπειτα από την έναρξη της βλάστησής τους. Το γεγονός αυτό προσδίδει μια συνάφεια ανάμεσα στην αύξηση της περιεκτικότητας του φλαβονοειδούς παράλληλα με την έναρξη της βλαστήσεως του σπόρου (Barthe et al., 1988).

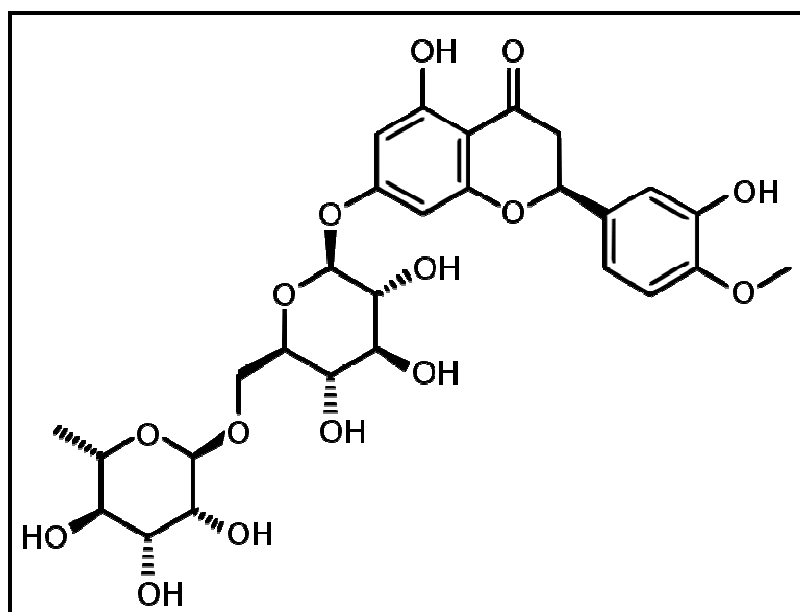
Η εσπεριδίνη βρίσκεται σε κρυστάλλινη ή σφαιροκρυστάλλινη μορφή εντός των κυττάρων (Evans, 1996). Πρόσφατα οι Di Mauro et al., (1999) ανακάλυψαν μια καινοτόμο μέθοδο απομόνωσης εσπεριδίνης από την πούλπα πορτοκαλιών από τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας των εσπεριδοειδών.

### 2.4.3 Ιδιότητες

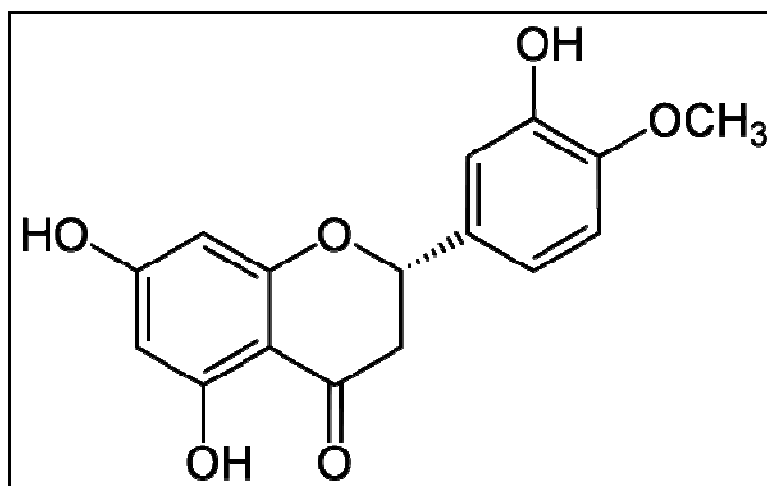
Η καθαρή εσπεριδίνη έχει την μορφή καρφίτσας ενώ το χρώμα της είναι ανοιχτό ή σκούρο κίτρινο. Το σημείο βρασμού της κυμαίνεται από τους 258° έως τους 262° C. Ο μοριακός τύπος της είναι C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub> το μοριακό της βάρος είναι 610,57 daltons. Είναι εύκολα διαλυτή σε αραιό άλκαλι και με πυριδίνη δίνει ένα καθαρό κίτρινο διάλυμα. Επίσης είναι ελαφρώς διαλυτή στην μεθανόλη και σχεδόν αδιάλυτη στην ακετόνη, την βενζίνη και το χλωροφόρμιο. Η διαλυτότητα της εσπεριδίνης στο νερό είναι 1 προς 50 (Budavari, 1996). Έχει την ιδιότητα να σχηματίζει σύμπλεγμα κρυστάλλων με άλλους όμοιους γλυκοζίτες, γεγονός το οποίο επηρεάζει σημαντικά τη διαλυτότητα και άλλες φυσικές ιδιότητες. Σαν αποτέλεσμα είναι δύσκολο να ανακτηθεί η καθαρή μορφή της εσπεριδίνης (Higby, 1941). Ωστόσο, εκπλύσεις με ζεστό νερό και εκχύλιση με μεθυλική αλκοόλη 95% βοηθούν στην ανάκτηση της εσπεριδίνης σε καθαρή μορφή (King & Robertson, 1931). Τέλος να σημειωθεί ότι η εσπεριδίνη είναι άγευστη και άοσμη (Kometani et al., 1996).

### 2.4.4 Χημεία

Η εσπεριδίνη (Εικόνα 2.1) είναι ένας γλυκοσίδης της φλαβονόνης, συμπεριλαμβανομένης και μιας αγλυκόνης, της εσπεριτίνης (Εικόνα 2.2) ή μεθυλεριοδικτιόλη (Evans, 1996), ενωμένη με έναν δισακχαρίτη, την ρουτινόση.



Εικόνα 2.1 Εσπεριδίνη



**Εικόνα 2.2** Εσπεριτίνη

Ο δισακχαρίτης ( $C_{12}H_{22}O_{10}$ ) συντίθεται από ένα μόριο ραμνόσης και με μια γλυκόζη, σχηματίζοντας έτσι μια από τις δύο ισομερικές μορφές, την ρουτινόση ή την νεοεσπεριδόση. Η ρουτινόση με την νεοεσπεριδόση διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στην θέση σύνδεσης των δύο μονάδων σακχάρων (Harborne, 1994). Η θέση των σακχάρων στην εσπεριδίνη καθορίζεται μερικώς από το στάδιο της υδρόλυσης (Fox et al., 1953).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχει μια συσχέτιση ανάμεσα στη δομή του δισακχαρίτη και στην παρουσία ή απουσία της πικρής γεύσης στην ουσία (Horowitz & Gentili, 1963). Η ρουτινοσίδη είναι άγευστη, ενώ η νεοεσπεριδοσίδη έχει πολύ πικρή γεύση. Η νεοεσπεριδοσίδη συσσωρεύεται κυρίως στα γκρέιπφρουτ ενώ η ρουτινοσίδη που δεν είναι πικρή κυριαρχεί στα πορτοκάλια και τα λεμόνια (Horowitz, 1961).

#### **2.4.5 Προσδιορισμός και ανάλυση της εσπεριδίνης**

Τόσο η εσπεριδίνη όσο και η εσπεριτίνη εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης μιας φλαβονόνης, με μέγιστο μήκος απορρόφησης UV τα 286 και 289 nm, αντίστοιχα (Jurd, 1962).

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της εσπεριδίνης είναι οι εξής:

- ✓ μέθοδος NMR (Mabry et al., 1970; Agarwal, 1989),
- ✓ φθορισμομετρικός προσδιορισμός (Kaito et al., 1979),
- ✓ φασματομετρικός προσδιορισμός (Malesev et al., 1997),
- ✓ ραδιοανοσολογία (RIA) (Barthe et al., 1988),
- ✓ τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Cancalon, 1999),

✓ χρωματογραφικές μέθοδοι, κυρίως με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται μια στήλη C-18 αντίστροφης φάσης και έναν ανιχνευτή UV 280 ή 285 nm. Οι διαλύτες έκλουσης είναι συνήθως το νερό, το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και η τετραϋδροφουράνη (Fisher, 1978· Castele et al., 1982· Rouseff, 1988· Rouseff et al., 1992· Mouly et al., 1993· Wang et al., 1994· Mouly et al., 1998· Saija et al., 1998· Ross et al., 2000). Πρόσφατα, χρησιμοποιούνται πιο σύγχρονες μέθοδοι όπως για η LC-MS (liquid chromatography/mass spectrometry).

#### **2.4.6 Τοξικότητα**

Σε γενικά πλαίσια τα βιοφλαβονοειδή των εσπεριδοειδών, συμπεριλαμβανομένου και της εσπεριδίνης, αποδείχτηκαν ασφαλή και χωρίς αρνητικές επιδράσεις και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Pizzorno Jr & Murray, 1999). Ο Sieve (1952) βασιζόμενος σε ένα πείραμα που πραγματοποίησε σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, απέδειξε ότι η φωσφορυλιωμένη εσπεριδίνη ήταν μη τοξική για τον οργανισμό, εύκολα απορροφήσιμη, δεν συσσωρευόταν και δεν προκαλούσε αλλεργικά επεισόδια.

Σε ένα πείραμα των Damon και των συνεργατών του (1987), χορηγούνταν σε ποντίκια από το στόμα μεθυλιωμένη εσπεριδίνη σε ποσοστό 5% της διατροφής τους και δεν παρατηρήθηκαν μεταλλαξιογόνες ή καρκινικές επιδράσεις. Επίσης και οι Kawabe et al. (1993) δεν παρατήρησαν τοξικές επιδράσεις της εσπεριδίνης έπειτα από χορήγησή της σε ποντίκια. Τέλος η εσπεριδίνη δεν επηρέασε την καθημερινή κατανάλωση της τροφής, το σωματικό βάρος και στον συντελεστή απόδοσης της τροφής (Kawaguchi et al., 1997).

#### **2.4.7 Αλληλεπίδραση της εσπεριδίνης με φάρμακα και συστατικά των τροφών**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για αλληλεπίδραση της εσπεριδίνης με τα κοινά φαρμακευτικά σκευάσματα ή με τα συστατικά των τροφών (Kawaguchi et al., 1997). Συγκεκριμένα, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε εθελοντές δεν βρέθηκαν αλληλεπιδράσεις, όταν χορηγήθηκε εσπεριδίνη ταυτόχρονα με βιταμίνες, ενδοκρινή φάρμακα και αμφεταμίνες (Sieve, 1952). Η εσπεριδίνη, όπως και άλλα φλαβονοειδή, βρέθηκε ότι αλληλοεπιδρά με την δαουνομυκίνη (Melzig et al., 1997).

## 2.4.8 Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική της εσπεριδίνης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο υπάρχουν ελάχιστες μελέτες ο οποίες διαπραγματεύονται το εν λόγω θέμα κυρίως σε ποντίκια (Yamada et al., 2006) και σε χοίρους (Bock et al., 2008; Labib et al., 2004).

### ✓ Απορρόφηση

Με σκοπό να μελετηθεί η απορρόφηση της εσπεριδίνης κατά την χορήγησή της από το στόμα πραγματοποιήθηκε το εξής πείραμα: σε υγιείς εθελοντές άντρες ηλικίας 25 ετών, χορηγήθηκαν 500mg από την ουσία μέσα σε νερό και ισοδύναμη ποσότητα χυμού από γκρέιπ φρούτ και πορτοκάλια. Η εσπεριδίνη απορροφήθηκε από τον γαστρεντερικό σωλήνα και στις δύο περιπτώσεις αλλά η συσσώρευσή της στα ούρα αποδεικνύει μικρή βιοδιαθεσιμότητα (<25%). Η αγλυκόνη, εσπεριτίνη, ανιχνεύθηκε τόσο στα ούρα όσο και στο αίμα. Τα απορροφούμενα φλαβονοειδή των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών πιστεύεται ότι υφίστανται γλυκουρονίδωση πριν την απέκκριση τους με τα ούρα (Ameer et al., 1996).

### ✓ Μεταβολισμός

Η μεταβολική μοίρα έξι φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης, μελετήθηκε σε ποντίκια έπειτα από την χορήγησή τους από το στόμα. Το κύριο μεταβολικό προϊόν που ανιχνεύθηκε στα ούρα ήταν το m-υδροξυφαινυλπροπιονικό οξύ καθώς και μικρότερες ποσότητες m-κουμαρικού οξέως και αγλυκόνες. Οι αγλυκόνες βρέθηκαν τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και συζευγμένες με γλυκουρονικό οξύ. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η απορρόφηση πραγματοποιήθηκε στον γαστρεντερικό σωλήνα ακολουθούμενη από αφυδροξυλίωση και απομεθυλίωση με σκοπό την παραγωγή του m-υδροξυφαινυλπροπιονικού οξέως. Επιπλέον, η εσπεριτίνη ήταν πιο εύκολα απορροφήσιμη από την εσπεριδίνη σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, κουνέλια και ανθρώπους (Booth et al., 1958).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στον άνθρωπο, η εσπεριδίνη μετατράπηκε στην αγλυκόνη εσπεριτίνη στο λεπτό έντερο από τα υπάρχοντα βακτήρια, παράγοντας την άλφα-ραμνισοδάση και την βήτα-γλυκοσιδάση. Επίσης βρέθηκε ότι η αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα και η κυτταροτοξικότητα του μεταβολίτη (εσπεριτίνη) που σχηματίστηκε στο λεπτό έντερο του ανθρώπου ήταν εντονότερη από την μητρική χημική ένωση (εσπεριδίνη) (Kim et al., 1998).

### ✓ Απέκκριση

Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα με σκοπό να ερευνηθεί η απέκκριση της εσπεριτίνης και της ναρινγενίνης στο πλάσμα και στα ούρα. Για τον σκοπό αυτό,

υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν χυμό από γρέιπ φρουτ και πορτοκάλια. Δείγματα αίματος και ούρων συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με την μέθοδο της HPLC όπου και παρατηρήθηκε η βιοδιαθεσιμότητα της εσπεριδίνης (Erlund et al., 2001). Επίσης, να αναφερθεί ότι έρευνες σε ζώα έχουν δείξει την πλήρη απέκκριση σκευάσματος εσπεριδίνης Daflon-500 mg® (εσπεριδίνη 50 mg και διοσμίνη 450 mg) (Servier, Ελβετία), 96 ώρες μετά τη χορήγησή του, χωρίς καμία ένδειξη συσσώρευσης του σε κάποιο ζωτικό όργανο (Meyer, 1994).

Επίσης μελετήθηκε η αποδόμηση και η απέκκριση της <sup>14</sup>C- εσπεριδίνης μεθυλχαικόνης, ένα υδροδιαλυτό, ημισυνθετικό παράγωγο της εσπεριδίνης, σε ποντίκια. Κατά την χορήγηση, από το στόμα, μιας δόσης σε αναλογία 10 mg/kg ζώντος βάρους, παρατηρήθηκε απορρόφηση έπειτα από 1 με 2 ώρες. Το ίδιο ίσχυε και κατά την ενδοφλέβια χορήγηση. Βάση του κινητικού προτύπου αίματος που παρατηρήθηκε, προτάθηκε ένας εντεροηπατικός κύκλος με σχετικά καλή βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας. Η απέκκριση μέσω των ούρων ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή μέσω των κοπράνων αλλά ήταν παρόμοια με αυτήν κατά την ενδοφλέβια χορήγηση. Συνοπτικά, η απέκκριση κατά κύριο λόγο πραγματοποιείται τις πρώτες 24 ώρες ανεξάρτητα από την οδό χορήγησής της (Chanal et al., 1981).

## 2.4.9 Φαρμακολογικές ιδιότητες

Η εσπεριδίνη χορηγείται σαν συμπλήρωμα σε θεραπευτικές αγωγές και έχουν παρατηρηθεί θετικές επιδράσεις σε ποικίλους τομείς οι οποίοι αναφέρονται παρακάτω.

### ✓ Αντιφλεγμονώδης δράση

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν φαρμακολογικά δεδομένα για την αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση της εσπεριδίνης (Galati et al., 1994). Την ίδια χρονιά οι Emim και οι συνεργάτες του παρουσίασαν την εσπεριδίνη ως μια φτηνή ουσία με αντιφλεγμονώδη δράση, κατάλληλη για ασθενείς με υπερευαισθησία στα συμβατικά μη στεροειδή φάρμακα.

Επίσης, η εσπεριδίνη σε συνδυασμό με την διοσμίνη έχουν εμφανή αντιφλεγμονώδη δράση, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, πιθανόν εξαιτίας της αναστολής σύνθεσης των εικοσανοειδών και της αντιοξειδωτικής τους δράσης κατά των ελεύθερων ριζών (Jean & Bodinier, 1994). Τέλος, πιστεύεται ότι η αντιφλεγμονώδης δράση σχετίζεται και με την μείωση της παραγόμενης ισταμίνης (Friesenecker et al., 1995).



✓ Αντιμικροβιακή δράση

Η εσπεριδίνη και η εσπερετίνη, καθώς και άλλα φλαβονοειδή, παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση *in vitro* εναντίον πολλών φυτικών και ζωικών μικροβίων, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

*Αντιβακτηριδιακή δράση*

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένου και της εσπερετίνης αναστέλλουν την ανάπτυξη του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε ανθρώπους (Bae et al., 1999). Ωστόσο, οι Islam και Ahsan (1997) παρατήρησαν ότι η εσπεριδίνη δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά των *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shirigella flexneri* και *Vibrio cholera* κατά την ανάπτυξή τους σε τρυβλία με άγαρ.

*Αντιμυκητιακή δράση*

Η αντιμυκητιακή δράση της εσπεριδίνης έχει αναφερθεί για δόση που κυμαίνεται από 1 έως 10 mg κατά των *Botrytis cinerea*, *Trichoderma glaucum* και *Aspergillus fumigates* (Krolicki & Lamer-Zarawska, 1984). Αντίθετα, δεν παρουσίασε καμία αντιμυκητιακή δράση ενάντια των *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus niger* και *Trichoderma* spp (Islam & Ahsan, 1997).

*Αντιϊκή δράση*

Σε δύο *in vitro* μελέτες των Wacker και Eilmes (1975) αναφέρεται ότι η εσπεριδίνη δρα ως αντιϊκός παράγοντας κατά την χρησιμοποίησή της σε καλλιέργεια κυττάρων ενάντια του ιού της φυσαλιδώδους στοματίτιδας. Παράλληλα, υπάρχουν αναφορές για την αντιϊκή δράση της εσπεριδίνης κατά του ιού της γρίπης (Wacker & Eilmes, 1975, Wacker & Eilmes, 1978). Σχετικά πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί η δράση των φλαβονοειδών καθώς και της εσπεριδίνης ενάντια των ερπητοϊών (Lee et al., 1999b, Middleton, 1984). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με μελέτες η εσπεριδίνη φαίνεται να μην έχει κάποια αντιϊκή δράση ενάντια του ιού HIV (Hu et al., 1994), του ιού της ψευδολύσσας, κάποιων ιών από το σύμπλεγμα των ερπητοϊών (Mucsi & Pragai, 1985) και των ρινοϊών (Tsuchiya et al., 1985). Οι Bae et al. (2000) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα ορισμένων φλαβονοειδών κατά των ροταϊών που προκαλούν διάρροια στα παιδιά και βρέθηκε ότι η εσπεριδίνη παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση κατά του ιού. Επίσης, τα νεράτζια (*Citrus aurantium*) που περιέχουν εσπεριδίνη και νεοεσπεριδίνη σαν κύρια συστατικά, έχει βρεθεί ότι έχουν ανασταλτική επίδραση κατά της μόλυνσης από τον ροταϊό (Kim et al., 2000).

### *Δράση κατά των ζυμομυκήτων*

Η εσπεριδίνη δεν βρέθηκε να έχει ανασταλτική δράση κατά του *Candida albicans* και *Saccharomyces cerevisiae* κατά την *in vitro* ανάπτυξή τους σε τρυβλία με άγαρ (Islam & Ahsan, 1997).

#### ✓ Επίδραση της εσπεριδίνης στη γονιμότητα

Η εσπεριδίνη και τα παράγωγά της μελετούνται εδώ και χρόνια για το εάν και με ποιο τρόπο επηρεάζουν τη γονιμότητα και των δύο φύλων. Στα τέλη τις δεκαετίας του 1940, η φωσφορυλιωμένη εσπεριδίνη βρέθηκε να δρα σαν ανασταλτικός παράγοντας μειώνοντας την δραστηριότητα του ενζύμου ναλουρονιδάση που υπάρχει στο σπέρμα και το οποίο βοηθάει στην διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο (Beiler & Martin, 1948' Beiler & Martin, 1952). Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια (Beiler & Martin, 1952), σε ανθρώπους (Sieve, 1952) και σε κουνέλια (Chang & Pincus, 1953' Joyce & Zaneveld, 1985) επιβεβαιώνοντας την ανασταλτική επίδραση της φωσφορυλιωμένης εσπεριδίνης στο σπέρμα.

#### ✓ Αντικαρκινική δραστηριότητα

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών πλήθος ερευνών και πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σχετικά με την αντικαρκινική δράση της εσπεριδίνης και της αγλυκόνης εσπερετίνης. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα, χάρη στην καταστολή της καρκινογένεσης, παρατηρήθηκαν κατά τη χρήση εσπεριδίνης σε συνδυασμό με την δυοσμίνη σε αρσενικά ποντίκια (Yang et al., 1997). Ακολούθησαν κι άλλα πειράματα κατά τα οποία η εσπεριδίνη παρουσίασε αντικαρκινική δράση (Berkanda et al., 1998' Koyunky et al., 1999' Franke et al., 1998).

#### ✓ Άλλες ιδιότητες της εσπεριδίνης

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η εσπεριδίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση ενάντια των ελεύθερων ριζών (Jovanovic et al., 1994' Bouskela et al., 1997' Kroyer et al., 1986' Brasseur et al., 1986' Yuting et al., 1990' Wang & Zheng, 1992' Miyake et al., 1997' Deng et al., 1997' Suarez et al., 1998' Malterud & Rydland, 2000) και της υπερϊώδους ακτινοβολίας (Schoemaker et al., 1995' Mortimer, 1997' Dalle Carbonare & Pathak, 1992' Darr & Fridovich, 1994' Bonina et al., 1998' Saija et al., 1998).

Τέλος η εσπεριδίνη σύμφωνα με τον Smith (1964) βρέθηκε να ρυθμίζει τα επίπεδα των οιστρογόνων σε μια κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 94 γυναίκες.

Συμπερασματικά, η εσπεριδίνη καθώς και η αγλυκόνη της, εσπερετίνη, είναι πολλά υποσχόμενες ουσίες καθώς παρουσιάζουν σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες σε πλήθος ασθενειών και διαταραχών. Ωστόσο θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω κλινικές μελέτες ώστε να εδραιωθεί η χρήση τους τόσο για θεραπευτικούς όσο και για προληπτικούς σκοπούς στον άνθρωπο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### *Υποπροϊόντα εσπεριδοειδών στη διατροφή μηρυκαστικών*

#### 3.1 Εισαγωγή

Ορισμένες Μεσογειακές χώρες χαρακτηρίζονται από ακραίες καιρικές συνθήκες. Σε αυτές τις περιοχές η διαθέσιμη βλάστηση για βοσκή είναι περιορισμένη και υπάρχει πολλές φορές μόνο για μικρά χρονικά διαστήματα. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη τη χρήση γεωργικής γης για την παραγωγή χονδροειδών τροφών για τη διατροφή των αγροτικών ζώων, οξύνοντας έτσι το πρόβλημα του υποσιτισμού του ανθρώπινου πληθυσμού και αυξάνοντας το κόστος διατροφής στην κτηνοτροφία.

Μια ενδιαφέρουσα πρόκληση για τον επιστημονικό χώρο της ζωικής παραγωγής είναι η ανεύρεση εναλλακτικών πρόσθετων υλών στη διατροφή των αγροτικών ζώων, στοχεύοντας στη μείωση της περιβαλλοντικής μόλυνσης και στο κόστος παραγωγής. Επίσης, επιδιώκεται η καλή υγεία των ζώων και ταυτόχρονα η βέλτιστη παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων τόσο από ποσοτικής όσο και από ποιοτικής άποψης. Ένα άμεσο πλεονέκτημα που θα προκύψει από την χρήση εναλλακτικών πρόσθετων υλών (Grasser et al., 1995) είναι η περίσσεια δημητριακών καρπών, με στόχο την κατανάλωσή τους από τους ανθρώπους. Τέλος, θα μειωθεί το κόστος των προγραμμάτων για την επεξεργασία των αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων.

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, κατά την προσθήκη καρπών ψυχανθών στο σιτηρέσιο μικρών μηρυκαστικών (π.χ. αρακά, κουκιά κ.ά. ) ή υποπροϊόντων της αγρο-βιομηχανίας (π.χ. πούλπα πορτοκαλιών, πούλπα ζαχαρότευτλων, σπέρματα λιναριού ή πάστα ελιάς) δεν παρατηρήθηκε ποσοτική ή ποιοτική αλλαγή στην παραγωγή των κτηνοτροφικών προϊόντων. Ωστόσο, ορισμένες από τις εναλλακτικές πρόσθετες ύλες περιέχουν δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως για παράδειγμα οι ταννίνες, οι οποίες όταν βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο ασκούν αρνητική επίδραση στην παραγωγικότητα των ζώων

Πρόσφατα έχουν μελετηθεί νέα φυτικά είδη όπως η ασπερούλα (*Asperula odorosa*), το ραδίκι (*Cichorium intybus*) και το κάρθαμο (*Carthamus tinctorius*), τα οποία αποτελούν μέρος του σιτηρέσιου μικρών μηρυκαστικών μέσω της βόσκησης. Παρόλα αυτά, η χρήση των εναλλακτικών πρόσθετων υλών στο σιτηρέσιο των μικρών μηρυκαστικών είναι λιγότερο εφαρμόσιμη στα γαλακτοπαραγωγά ζώα από ότι στα κρεοπαραγωγά. Ο λόγος είναι ότι οι εναλλακτικές πρόσθετες ύλες έχουν μικρή θρεπτική αξία και δεν καλύπτουν τις υψηλές ενεργειακές ανάγκες γαλακτοπαραγωγής, ενώ αντίθετα καλύπτουν τις ανάγκες ενός ζώου κρεοπαραγωγής.

Τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές έχουν στραφεί σε έναν υγιεινότερο τρόπο διατροφής, αναζητώντας τρόφιμα απαλλαγμένα από βλαβερές για τον ανθρώπινο οργανισμό ουσίες. Σαν αποτέλεσμα, η επιστημονική κοινότητα αναζητά διαφορετικές πρόσθετες ύλες ζωοτροφών οι οποίες θα προάγουν την υγεία των ζώων (για παράδειγμα τα αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών, τα αντιοξειδωτικά, τα προβιοτικά, οι βιταμίνες, τα αμινοξέα, τα ιχνοστοιχεία και τέλος τα υποπροϊόντα της αγρο-βιομηχανίας), αντικαθιστώντας τα συμβατικά αντιβιοτικά, ενώ παράλληλα θα επηρεάζουν θετικά τα κτηνοτροφικά προϊόντα και κατ' επέκταση την υγεία του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η σύσταση των λιπαρών οξέων του γάλακτος και του κρέατος έχουν αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου. Το χρώμα του κρέατος αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τους καταναλωτές κατά την αγορά, ενώ το άρωμα και η τρυφερότητα αξιολογούνται αργότερα κατά την διάρκεια της κατανάλωσης αυτού. Είναι ευρέως γνωστό ότι η διατροφή των ζώων επηρεάζει σημαντικά το χρώμα του κρέατος, το προφίλ των λιπαρών οξέων του κρέατος και του γάλακτος καθώς και το άρωμά τους (Chilliard et al., 2000). Τέλος, οι περισσότερες εκ των πτητικών ουσιών οι οποίες παραλαμβάνονται μέσω της βοσκής, όπως για παράδειγμα τα τερπένια, μεταφέρονται στο κρέας, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι ουσίες αυτές μπορούν να ανιχνευθούν και να αποτελέσουν δείκτες διατροφικών προτιμήσεων των ζώων καθώς και δείκτες γεωγραφικής προέλευσης (Forss, 1993).

Τα υποπροϊόντα της αγρο-βιομηχανίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς ως συμπλήρωμα στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών χάρη στις μικροβιακές ζυμώσεις που πραγματοποιούνται στην μεγάλη κοιλία τους, αξιοποιώντας στο έπακρον την υψηλή περιεκτικότητα των υποπροϊόντων σε ινώδεις ουσίες. Σαν αποτέλεσμα πραγματοποιείται η κάλυψη σε θρεπτικά συστατικά για συντήρηση, ανάπτυξη, αναπαραγωγή και παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων.

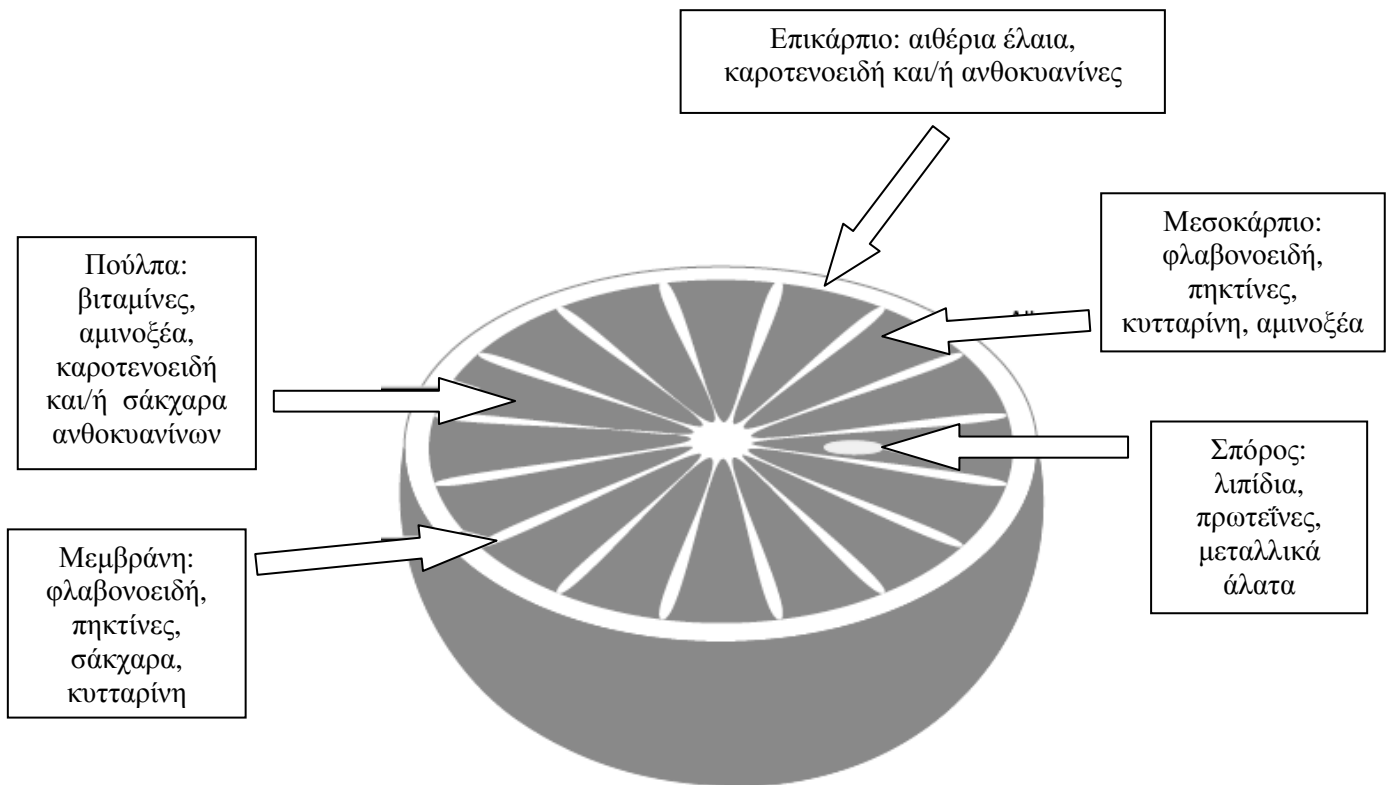
## 3.2 Υποπροϊόντα εσπεριδοειδών

### 3.2.1 Γενικά

Τα υποπροϊόντα των εσπεριδοειδών, τα οποία ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία και τις μεθόδους παραγωγής, αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής των μηρυκαστικών παγκοσμίως. Για την περίοδο 2000 με 2003 η παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών ανήλθε κατά μέσο όρο σε 69,4 χιλιάδες τόνους τον χρόνο (USDA/FAS, 2003). Το γένος των εσπεριδοειδών περιλαμβάνει διάφορα είδη (Kale & Adsule, 1995), με σημαντικότερο σε παγκόσμια κλίμακα το γλυκό πορτοκάλι (*Citrus sinensis*: 67,8% της παγκόσμιας παραγωγής εσπεριδοειδών' USDA/FAS, 2003), τα μανταρίνια (*Citrus reticulata*: 17.9%), τα λεμόνια (*Citrus limon*: 6.3%) και τα γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi*: 5.0%). Τέλος, το υπόλοιπο 3% που απομένει αναλογεί στο πικρό πορτοκάλι (*Citrus quarantium*, 3%), φράππα (*Citrus grandis*), στο κίτρο (*Citrus medica*) και στο λάιμ (*Citrus aurantifolia*). Περίπου το 24% της παγκόσμιας παραγωγής εσπεριδοειδών παράγεται στην Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Αίγυπτο, Τουρκία και Μαρόκο, με την Βραζιλία (24%) και τις ΗΠΑ (21%) να είναι οι κυρίαρχες χώρες.

### 3.2.2 Προέλευση και θρεπτική σύσταση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή πρωτίστως καταναλώνονται από τον άνθρωπο ως χυμό, φρέσκο ή επεξεργασμένο. Όταν ο χυμός απομακρυνθεί από το φρούτο παραμένουν κάποια υπολείμματα αποτελούμενα από τον φλοιό (επικάρπιο και μεσοκάρπιο), την πούλπα, τις μεμβράνες και τους σπόρους (Εικόνα 3.1). Τα παραπάνω υπολείμματα είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό αυτών αποτελούν την πρώτη ύλη από την οποία φτιάχνονται τα υποπροϊόντα των εσπεριδοειδών.



**Εικόνα 3.1** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων ενός πορτοκαλιού

(C. M. Lanza, 2003)

Η σύσταση των εσπεριδοειδών επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες όπως οι συνθήκες ανάπτυξης, η ωρίμανση, το υπέδαφος, η ποικιλία και το κλίμα (Kale & Adsule, 1995). Τα εσπεριδοειδή περιέχουν άζωτο (1-2 gr/kg), λιπίδια (ελαϊκό, λινολεϊκό, παλμιτικό, στεαρικό οξύ, γλυκερόλη και φυτοστερόλη), σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη), οξέα (κυρίως κιτρικό και μηλικό αλλά επίσης και ταρταρικό, βενζοϊκό, οξαλικό και ηλεκτρικό οξύ), αδιάλυτους υδατάνθρακες (κυτταρίνη, πηκτίνη), ένζυμα (πηκτινестεράση, φωσφατάση, υπεροξειδάση), φλαβονοειδή (εσπεριδίνη και ναρινγίνη), έλαια που υπάρχουν στον φλοιό (d- λιμονένιο), πτητικά συστατικά (αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, υδρογονάνθρακες), χρωστικές (καροτένια, ξανθοφύλλες), βιταμίνες (ασκορβικό οξύ, σύμπλεγμα της βιταμίνης B, καροτενοειδή) και μέταλλα (κυρίως ασβέστιο και κάλιο).

Τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών επηρεάζονται από ποικίλους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων της ποικιλίας και της διαδικασίας μεταποίησης τους (Ammerman & Henry, 1991).

### 3.2.3 Η χρήση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στη διατροφή μηρυκαστικών

Ένας μεγάλος αριθμός υποπροϊόντων εσπεριδοειδών χρησιμοποιείται ευρέως στη διατροφή των μηρυκαστικών χάρη στην ικανότητά αυτών να πέπτουν τις ινώδεις ουσίες των ζωοτροφών μέσω των ζυμωτικών φαινομένων της μεγάλης κοιλίας (Grasser et al., 1995). Το κυριότερο πλεονέκτημα των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών είναι το μικρό κόστος, ενώ παράλληλα δεν επηρεάζεται και η παραγωγικότητα των ζώων κατά την προσθήκη στη διατροφή τους.

Η πούλπα των εσπεριδοειδών συνήθως χορηγείται σε κομποστοποιημένη μορφή και πρέπει να προστίθεται σταδιακά στο σιτηρέσιο ώστε τα ζώα να συνηθίζουν την χαρακτηριστική οσμή και γεύση της (Bath et al., 1980). Επίσης, η πούλπα των εσπεριδοειδών μπορεί να χορηγηθεί καθαρή ή σε μορφή ενσιρώματος. Και οι δύο μορφές γίνονται γρήγορα αποδεκτές από τα μηρυκαστικά αλλά ωστόσο η πούλπα και τα σύμπηκτα από τα λεμόνια γίνονται πιο γρήγορα αποδεκτά σε σχέση με αυτά από τα πορτοκάλια και τα γκρέιπφρουτ (Bath et al., 1980).

Τα φρέσκα εσπεριδοειδή μπορούν εύκολα να καταναλωθούν από γαλακτοπαραγωγές αγελάδες αλλά παρόλα αυτά υπάρχουν προβλήματα κατά την μεταφορά, την αποθήκευση και τη διαχείρισή τους (Lundquist, 1995). Σχετικά με την φρέσκια πούλπα εσπεριδοειδών μπορεί να μεταφερθεί μόνο σε μικρές αποστάσεις εξαιτίας του υψηλού ποσοστού υγρασίας που περιέχει και του υψηλού κόστους των μεταφορικών (Grasser et al., 1995). Παράλληλα, πρέπει να καταναλώνεται γρήγορα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα που συχνά οδηγούν σε δευτερογενείς ζυμώσεις και την ανάπτυξη μούχλας, προσελκύοντας έντομα, όπως μύγες. Τέλος, η υγρή και κολλώδη φύση της πούλπας εσπεριδοειδών καθιστούν δύσκολη την αποθήκευσή της σε αποθήκη, υπόστεγο ή σιλό.

Τα φρέσκα εσπεριδοειδή μπορούν να καλύψουν τις ημερήσιες ανάγκες σε νερό των μηρυκαστικών, γεγονός πολύ σημαντικό για ορισμένες περιοχές του πλανήτη με περιορισμένα αποθέματα σε πόσιμο νερό. Η μη ισορροπημένη αναλογία Ca:P στα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της υποασβεστιαμίας στις αγελάδες κατά τον τοκετό (Bath et al., 1980). Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, κατά τη χορήγηση υψηλών ποσοστών πούλπας εσπεριδοειδών, αυξήθηκε ο κίνδυνος εμφάνισης της γαλακτικής οξέωσης στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Cullen et al., 1986). Πράγματι, είναι γνωστό ότι η αυξημένη ποσότητα πηκτινών στο σιτηρέσιο οδηγεί σε γαλακτική οξέωση διότι οι πηκτίνες μεταβολίζονται σε γαλακτικό οξύ. Παρόλα αυτά, η πούλπα εσπεριδοειδών δεν παρουσιάζει φαινόμενα γαλακτικής οξέωσης κατά τη χορήγησή της στα συνηθισμένα επίπεδα, δηλαδή 100 - 150 gr/kg ξηράς ουσίας.

Κατά τη διάρκεια επεξεργασίας της πούλπας εσπεριδοειδών προστίθεται οξικό ασβέστιο ή υπεροξειδίο του ασβεστίου, ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της κομποστοποίησης. Το ποσοστό του ασβεστίου που παραμένει στην πούλπα διαφέρει

ανάλογα με τη διαδικασία, αλλά ωστόσο αυξημένα επίπεδα ασβεστίου επηρεάζουν την κατανάλωση της τροφής.

Γενικά, τα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών δεν επηρεάζουν την κατανάλωση της τροφής κατά την προσθήκη τους σε σιτηρέσιο μηρυκαστικών. Για παράδειγμα, κατά την μερική ή ολική αντικατάσταση καρπού καλαμποκιού ή σιταριού από ζυμωμένη πορτοκαλόφλουδα ή λεμονόφλουδα σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες της φυλής Friesian, δεν επηρέασε την κατανάλωση της τροφής (Lanza, 1984). Οι Bhattacharya και Harb (1973) παρατήρησαν ότι η κατανάλωση της τροφής δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη στο σιτηρέσιο προβάτων της φυλής Awassi 400 gr ζυμούμενης πούλπας πορτοκαλιών ανά kg ξηράς ουσίας. Ωστόσο, κατά την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας η κατανάλωση μεταβλήθηκε και συγκεκριμένα μειώθηκε σε σύγκριση με ένα σιτηρέσιο που περιείχε καρπό καλαμποκιού.

Η περιεκτικότητα τις πούλπας εσπεριδοειδών σε πρωτεΐνες ανέρχεται περίπου στο 3 - 6% επί ξηρού βάρους, γεγονός το οποίο την καθιστά ως μια ζωοτροφή «φτωχή» ακόμα και για μηρυκαστικά. Η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να ανέλθει πάνω από 15% με την διαδικασία της κομποστοποίησης με ημιστερεά ζύμωση με επιλεγμένες καλλιέργειες ή μέσω του εμπλουτισμού με άζωτο, επιφέροντας την αναβάθμιση των στερεών αποβλήτων εσπεριδοειδών σε υψηλής ποιότητας ζωοτροφή. Η ζυμωμένη πορτοκαλόφλουδα μπορεί να υποκαταστήσει τα δημητριακά στο σιτηρέσιο μηρυκαστικών έως 30%.

Συγκεκριμένα, κατά τον εμπλουτισμό με άζωτο 450 gr ξηρής πούλπας πορτοκαλιού ανά kg ξηράς ουσίας, με ουρία ή με υδροξείδιο του αζώτου, δεν άλλαξε η ελκυστικότητα της τροφής στα πρόβατα (Rihani et al., 1993b). Επιπλέον, οι Βολάνης και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν ότι κατά τη χορήγηση 309 gr ενσιρωμένων πορτοκαλιών ανά kg ξηράς ουσίας στο σύνολο του σιτηρεσίου, έγιναν αποδεκτά από γαλακτοπαραγωγά πρόβατα, πιθανόν χάρη στο ευχάριστο άρωμά τους. Τέλος, τα πορτοκάλια έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να αρωματιστεί ευχάριστα το σιτηρέσιο προβάτων (Ralphs et al., 1995).

### **3.3 Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στα μηρυκαστικά**

#### **3.3.1 Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών κατά την ανάπτυξη**

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντικατάσταση του καρπού καλαμποκιού ή σιταριού με υποπροϊόντα εσπεριδοειδών, επιφέρει ισάξια αποτελέσματα και επιδράσεις στην ανάπτυξη των μηρυκαστικών.



Συγκεκριμένα, οι Xadjiranayiotou και Louka (1976) μελέτησαν τη θρεπτική αξία της κομποστοποιημένης πούλπας εσπεριδοειδών κατά την προσθήκη της σε σιτηρέσιο παχυνόμενων μόσχων, αντικαθιστώντας ένα μέρος από τον καρπό κριθαριού. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 44 αρσενικοί μόσχοι της φυλής Friesian, ηλικίας 120 ημερών, χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες και διατράφηκαν επί 48 εβδομάδες με άχυρο κριθαριού (1kg την ημέρα) και μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών κατά βούληση. Συγκεκριμένα, στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε καρπός κριθαριού (820 gr/kg) και σογιάλευρο (150 gr/kg) ενώ στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκε καρπός κριθαριού (200 gr/kg), κομποστοποιημένη πούλπα εσπεριδοειδών (600 gr/kg) και σογιάλευρο (180 gr/kg). Η αύξηση του σωματικού βάρους, η κατανάλωση της τροφής, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής και η εναπόθεση σωματικής μάζας παρέμειναν ίδια και στις δύο ομάδες. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η αντικατάσταση του καρπού κριθαριού με την πούλπα εσπεριδοειδών δεν επέφερε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των παχυνόμενων μόσχων. Καταλήγοντας αναφέρουν ότι η θρεπτική αξία της πούλπας εσπεριδοειδών προσεγγίζει αυτή του καρπού κριθαριού.

Να αναφερθεί ότι σε παρόμοια πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε μηρυκαστικά, κατά την προσθήκη στο μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών πούλπας εσπεριδοειδών, δεν επηρεάστηκε ανασταλτικά η ανάπτυξη και η αύξηση του σωματικού βάρους, συμπεραίνοντας ότι η πούλπα των εσπεριδοειδών έχει ίδια θρεπτική αξία με τους καρπούς των δημητριακών (Schalch et al., 2001' de Castro & Zanetti, 1998' Vijchulata et al., 1980' Henrique et al., 1998' Lanza, 1984' Brown & Johnson, 1991' Chen et al., 1981).

### **3.3.2 Επίδραση των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών στην γαλακτοπαραγωγή**

Ο Fegeros και οι συνεργάτες του (1995) μελέτησαν την διαθρεπτική αξία της πούλπας εσπεριδοειδών και την επίδρασή της τόσο στη γαλακτοπαραγωγική απόδοση όσο και στη σύστασή του γάλακτος κατά τη χορήγησή της σε 26 γαλακτοπαραγωγές προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Η παραγωγή γάλακτος, το λίπος, η πρωτεΐνη και λακτόζη δεν μεταβλήθηκαν εξαιτίας της κατανάλωσης πούλπας εσπεριδοειδών. Ωστόσο, το προφίλ των λιπαρών οξέων κατά κάποιο τρόπο μεταβλήθηκε και συγκεκριμένα μειώθηκε το ποσοστό των λιπαρών οξέων C4 to C10.

Ο Lanza (1984) αναφέρει ότι η μερική ή ολική αντικατάσταση του καρπού καλαμποκιού ή κριθαριού από κομποστοποιημένη πούλπα πορτοκαλιού ή λεμονιού στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αγελάδων φυλής Friesian, δεν επέφερε αρνητικά αποτελέσματα στο ποσοστό του παραγόμενου γάλακτος, στην λιποπεριεκτικότητα και στο άρωμα του γάλακτος.

Οι Belibasakis και Tsirogianni (1996) χορήγησαν σε 10 αγελάδες πούλπα εσπεριδοειδών και αξιολόγησαν την επίδρασή της στη σύσταση του γάλακτος καθώς και στους μεταβολίτες και ηλεκτρολύτες του ορού αίματος σε σχέση με 10 αγελάδες που διατρέφονταν με το συνηθισμένο σιτηρέσιο. Αναφέρουν ότι η γαλακτοπαραγωγή, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, η λακτόζη, τα ολικά στερεά και τα ολικά στερεά άνευ λίπους δεν μεταβλήθηκαν. Ωστόσο, στις αγελάδες που χορηγήθηκε η πούλπα παρατηρήθηκε αύξηση της λιποπεριεκτικότητας (44,8 gr/kg έναντι 41,2 gr/kg) καθώς και της παραγωγής λίπους (1,06 kg ανά ημέρα έναντι 0,95 kg ανά ημέρα). Δεν βρέθηκαν διαφορές στον ορό του αίματος όσον αφορά τις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη, ολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη, γλοβουλίνη, ουρία, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, Na, K, Ca, P, Mg και Cl. Όμως τα επίπεδα της χοληστερόλης ήταν υψηλότερα (2350 mg/l έναντι 2230 mg/l) στις αγελάδες που τους χορηγήθηκε πούλπα εσπεριδοειδών.

Σε ένα άλλο πείραμα, οι Volanis και οι συνεργάτες του (2004), χρησιμοποίησαν 96 γαλακτοπαραγωγά πρόβατα της φυλής Σφακίων και τα χώρισαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγούσαν ημερησίως 3 κιλά ενσιρώματος πορτοκαλιών αντικαθιστώντας μέρος του καρπού αραβοσίτου, του σογιάλεου και του σανού βρώμης που κατανάλωνε η δεύτερη ομάδα (μάρτυρας του πειράματος). Η γαλακτοπαραγωγή ήταν 12% υψηλότερη ενώ η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος ήταν 16% υψηλότερη στην πρώτη ομάδα όπου διατρέφονταν με ενσίρωμα πορτοκαλιών.

Συνοψίζοντας, η αντικατάσταση του καρπού καλαμποκιού καθώς και διάφορων άλλων αμυλούχων ζωοτροφών με υποπροϊόντα εσπεριδοειδών, δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος της γαλακτοπαραγωγής καθώς και στη σύσταση του γάλακτος των μηρυκαστικών (Van Horn et al., 1975, Wing et al., 1975, 1988, Sutton et al., 1987, Broderick et al., 2002, Leiva et al., 2000, Solomon et al., 2000).

### **3.4 Συμπεράσματα**

Εν κατακλείδι, η προσθήκη στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών υποπροϊόντων αγροβιομηχανίας (πάστα ελιών, μελάσα ζαχαρότευτλων, πούλπα εσπεριδοειδών) αποτελεί μια εναλλακτική πηγή υλών, διατηρώντας τόσο την παραγωγικότητα όσο και την ποιότητα των παραγόμενων ζωικών προϊόντων. Παρόλα αυτά για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος απαιτείται η χορήγηση της κατάλληλης ποσότητας υποπροϊόντων ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες του ζώου και να αποφευχθεί η παρουσία τυχόν αντιδιαιτητικών παραγόντων

Η θρεπτική αξία των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες και πρωτίστως από το είδος του καρπού και τον τρόπο μεταποίησής του. Τα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών χάρη στο φτηνό κόστος παραγωγής και στη θρεπτική αξία τους, κερδίζουν συνέχεια έδαφος στη διατροφή των μηρυκαστικών παγκοσμίως. Επίσης, μειώνεται η περιβαλλοντική μόλυνση, κάτι πολύ σημαντικό για την σύγχρονη

κοινωνία. Οι πιο συνηθισμένες μορφές που προστίθενται στο σιτηρέσιο είναι η πούλπα και το ενσίρωμα εσπεριδοειδών.

Σύμφωνα με έρευνες, τα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών γίνονται γρήγορα αποδεκτά κατά την προσθήκη τους σε σιτηρέσιο μηρυκαστικών. Χάρη στην υψηλή περιεκτικότητα τους σε πηκτίνες και ινώδεις ουσίες ευνοούν τα ζυμωτικά φαινόμενα στους προστομάχους, ενώ η πεπτικότητά τους δεν παραλλάσσει δραματικά ανάμεσα στα διάφορα είδη των μηρυκαστικών.

Τα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών μπορούν να προστεθούν είτε σε σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγής είτε ανάπτυξης. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι κατά την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων από τα μηρυκαστικά, ενδέχεται να προκληθεί παρακεράτωση στους προστομάχους (Loggins et al., 1968). Επίσης, αν οι συνθήκες μεταποίησης και αποθήκευσης των υποπροϊόντων εσπεριδοειδών είναι ελλιπής, αναπτύσσονται άμεσα διάφορα είδη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες με αρνητικές συνέπειες για την υγεία των μηρυκαστικών.

Παράλληλα, τα υποπροϊόντα εσπεριδοειδών εμπεριέχουν πολλά θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, φλαβονοειδή (εσπεριδίνη, ναρινγκερίνη) τα οποία προάγουν την υγεία των μηρυκαστικών και ενδεχομένως έμμεσα τον καταναλωτή των εν λόγω παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων.

**Β' ΜΕΡΟΣ:**

***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### 4.1 Σκοπός του πειράματος

Τις τελευταίες δεκαετίες τα φλαβονοειδή έχουν κινήσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών καθώς είναι ουσίες που ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά είδη και εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Μελέτες αποδεικνύουν ότι τα εσπεριδοειδή περιέχουν βιοενεργά συστατικά με προστατευτική δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό χωρίς η κατανάλωσή τους να επιβαρύνει με κατάλοιπα το φυσικό περιβάλλον. Σαν αποτέλεσμα, η μελέτη αυτών των ουσιών πρόσφερε γόνιμο έδαφος για την ανεύρεση νέων ιδιοτήτων και πεδίων εφαρμογής τους τόσο στον τομέα της ζωικής παραγωγής όσο και στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπου.

Η εσπεριδίνη, μαζί με τη ναρινγερίνη, αποτελεί το κυρίαρχο φλαβονοειδές της πούλπας των εσπεριδοειδών και κυρίως των πορτοκαλιών. Είναι γνωστό ότι η Ελλάδα παράγει μεγάλες ποσότητες πορτοκαλιών και λεμονιών κατά τη διάρκεια ενός χρόνου. Μελλοντική αξιοποίηση των υποπροϊόντων της βιομηχανίας των εσπεριδοειδών, όπως η πούλπα των πορτοκαλιών, που περιέχει την εσπεριδίνη και η χρησιμοποίησή τους κατά την εκτροφή των αγροτικών ζώων ως συμπλήρωμα διατροφής, ενδεχομένως να επιφέρει θετικά αποτελέσματα τόσο στην κτηνοτροφία όσο και στην υγεία του ανθρώπου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε, η μελέτη των χαρακτηριστικών του γάλακτος προβατινών, Καραγκούνικης φυλής, οι οποίες κατανάλωσαν σιτηρέσιο έπειτα από την ενσωμάτωση εσπεριδίνης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος καθώς και η σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Παράλληλα, ερευνήθηκε η αντίχνευση της εσπεριδίνης στο γάλα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**

### ***Υλικά και Μέθοδοι***

#### **5.1 Ζωικό υλικό**

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Κτηνοτροφείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 15 αμελγόμενες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, ηλικίας 3 και 4 ετών, οι οποίες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες Α, Β και Μ, με κριτήριο το σωματικό βάρος και το ύψος της γαλακτοπαραγωγής τους. Οι προβατίνες εισήχθησαν στο πείραμα 40 μέρες μετά τη μέρα τοκετού τους, ενώ βρίσκονταν στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> γαλακτική τους περίοδο.

Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν δύο μήνες. Οι πρώτες 15 ημέρες (προπειραματική περίοδος) αποτέλεσαν στάδιο προσαρμογής των ζώων στις νέες συνθήκες ενσταβλισμού και στην ατομική διατροφή, ενώ οι επόμενες 45 ημέρες αφορούσαν την κύρια πειραματική περίοδο.

#### **5.2 Επέμβαση στη διατροφή των προβατινών κατά τη διάρκεια του πειράματος**

Το σύστημα διατροφής που εφαρμόστηκε ήταν ατομικό τόσο για τις συμπυκνωμένες ζωοτροφές όσο και για τις χονδροειδείς. Κατά την προπειραματική περίοδο, οι προβατίνες διατράφηκαν με κοινό εμπορικό μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την ενσωμάτωση της εσπεριδίνης, ενώ κατά την πειραματική περίοδο διατράφηκαν με το ίδιο μίγμα, στο οποίο είχε ενσωματωθεί η εσπεριδίνη σε αναλογία 1,2 g/kg μίγματος και 3 g/kg μίγματος για τις ομάδες Α και Β αντίστοιχα για κάθε μια προβατίνα, ενώ η ομάδα Μ αποτελούσε τον μάρτυρα του πειράματος και διατρέφονταν με το ίδιο μίγμα χωρίς την ενσωμάτωση της εσπεριδίνης.

Η εσπεριδίνη ήταν φαρμακευτικό σκεύασμα της εταιρείας MP Biomedicals, καθαρότητας 80%, μοριακού βάρους 610,60 και σε μορφή σκόνης, ανοιχτού κίτρινου χρώματος. Για να γίνει εφικτή η ενσωμάτωση της ουσίας χρησιμοποιήθηκε μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών αλευρώδους υφής. Εν συνεχεία παρασκευάστηκε ένα πρόμιγμα με αλεύρι και εσπεριδίνη και ακολούθως το πρόμιγμα ενσωματωνόταν στο μίγμα .

Το σιτηρέσιο καταρτίστηκε κατά τέτοιον τρόπο ώστε να καλύπτει τις ανάγκες συντήρησης και γαλακτοπαραγωγής των προβατίνων. Χορηγούνταν στα ζώα ατομικά σε δυο γεύματα ημερησίως σε ποσότητα 1,5 kg συμπυκνωμένων ζωοτροφών και 1 kg χονδροειδών. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό.

Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζεται η ποσοστιαία σύνθεση του μίγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζεται η χημική σύσταση του μίγματος και του χόρτου μηδικής αντίστοιχα, σύμφωνα με τα στοιχεία που δόθηκαν από την παρασκευάστρια εταιρεία ΦΥΡΚΟ.

Η χορήγηση του σιτηρεσίου στις προβατίνες γινόταν δύο φορές την μέρα. Κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής περιόδου, οι προβατίνες σταβλίζονταν ομαδικά καθ' όλο το 24ωρο, εκτός από τις ώρες 7:30 - 8:00 το πρωί και 4:00 - 4:30 το απόγευμα, όπου σε κάθε ένα ζώο του προσφερόταν το μίγμα αρχικά και το χόρτο μηδικής αργότερα, σε ειδικές ατομικές ταγίστρες. Στα ατομικά κελιά υπήρχαν ταγίστρες όπου αρχικά χορηγούνταν στις προβατίνες το προς κατανάλωση μίγμα και έπειτα τα χόρτο μηδικής.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1** Ποσοστιαία σύνθεση του μίγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών

<b>ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ</b>	<b>ΠΟΣΟΣΤΟ (%)</b>
Αραβόσιτος	54
Πίτυρα σίτου	20
Κριθάρι	4,50
Βαμβακόπιτα	3,30
Σογιάλευρο	14,50
Μαρμαρόσκονη	2,00
Φωσφορικό διασβέστιο	0,80
Αλάτι	0,45
Πρόμιγμα βιταμινών & ιχνοστοιχείων	0,45

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2** Χημική σύσταση του μίγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών και του χόρτου μηδικής

<b>ΑΝΑΛΥΣΗ</b>	<b>ΜΙΓΜΑ</b>	<b>ΧΟΡΤΟ ΜΗΔΙΚΗΣ</b>
Καθαρή Ενέργεια (MJ/kg)	7,16	4,17
Ξηρά Ουσία (%)	88,00	88,1
Ολικές Αζωτούχες (%)	15,30	16,8
Ινώδεις Ουσίες (%)	5,36	30,4
Υγρασία (%)	12,00	11,9
Τέφρα (%)	6,50	9,78
Ασβέστιο (%)	1,00	-
Ολικός Φώσφορος (%)	0,80	-
Βιταμίνες & Ιχνοστοιχεία (ανά kg τροφής):		
Βιταμίνη Α (I.U.)	10.000	
Βιταμίνη D3 (I.U.)	2.000	
Βιταμίνη Ε (mg)	11,6	

### **5.3 Μετρήσεις παραμέτρων γάλακτος**

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ατομικές δειγματοληψίες γάλακτος: μία δειγματοληψία πριν την προσθήκη εσπεριδίνης και τρεις μετά την προσθήκη της εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο, ανά 15 ημέρες. Η δειγματοληψία γάλακτος ήταν ατομική για κάθε προβατίνα ανά ομάδα. Η κωδικοποίηση των ομάδων και το πρόγραμμα των δειγματοληψιών αναφέρονται στον Πίνακα 5.3.



**Πίνακας 5.3** Πρόγραμμα δειγματοληψιών

15 ΗΜΕΡΕΣ (άνευ εσπεριδίνης)	45 ΗΜΕΡΕΣ (με εσπεριδίνη)		
<b>S0</b>	<b>S15</b>	<b>S30</b>	<b>S45</b>

*S0: η δειγματοληψία γάλακτος χωρίς την προσθήκη εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο  
S15, S30, S45: οι δειγματοληψίες γάλακτος ανά 15 ημέρες.*

Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν γαλακτομέτρηση, στη συνέχεια προσδιοριζόταν αρχικά τα χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος και ακολούθως η σύνθεση της λιπαρής φάσης. Τέλος, πραγματοποιούταν ανίχνευση της εσπεριδίνης στο γάλα.

### **5.3.1 Γαλακτομετρήσεις**

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις γαλακτομετρήσεις κατά τη διάρκεια των 45 ημερών: μια στην αρχή του πειράματος όπου δεν είχε χορηγηθεί η εσπεριδίνη στο σιτηρέσιο και ακολούθησαν άλλες τρεις ανά 15 ημέρες όπου είχε προστεθεί η ουσία. Οι μετρήσεις γινόντουσαν το απόγευμα της μίας μέρας και το πρωί της επόμενης και το άθροισμα αυτών των δύο μετρήσεων αποτελούσε την παραγόμενη ποσότητα γάλακτος της κάθε προβατίνας. Στον Πίνακα 5.4 δίνονται συνοπτικά οι γαλακτομετρήσεις που καταγράφηκαν.

**Πίνακας 5.4** Γαλακτομετρήσεις σε L

ΟΜΑΔΑ	ΠΡΟΒΑΤΙΝΑ	S0	S15	S30	S45
A	A1	0,62	0,60	0,55	0,50
	A2	1,85	1,60	1,77	1,60
	A3	1,15	1,70	0,95	1,00
	A4	1,50	1,65	1,35	1,20
	A5	1,65	2,05	1,95	2,00
B	B1	2,00	2,05	1,95	1,80
	B2	1,45	1,35	1,30	1,30
	B3	0,55	0,60	0,50	0,55
	B4	1,92	1,80	1,40	1,30
	B5	1,45	1,40	1,05	1,00
M	M1	2,30	1,90	2,10	1,80
	M2	1,30	0,95	1,20	1,15
	M3	0,75	0,75	0,85	0,70
	M4	2,15	1,90	1,75	1,70
	M5	1,20	1,00	0,90	0,85

*S0: η δειγματοληψία γάλακτος σε L χωρίς την προσθήκη εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο  
S15, S30, S45: οι δειγματοληψίες γάλακτος σε L ανά 15 ημέρες.*

### **5.3.2 Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών γάλακτος**

Για τον σκοπό αυτό, κάθε δείγμα γάλακτος περίπου 50 ml τοποθετήθηκε σε πλαστικό αποστειρωμένο δοχείο προσθέτοντας 0,125 ml συντηρητικό (NaN<sub>3</sub>). Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 °C, όχι περισσότερο από 12 ώρες, έως ότου ξεκινήσει η διαδικασία της ανάλυσης. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν με τη συσκευή CombiFoss 6000 FC Milkoscan (Εικόνα 5.1) τα εξής συστατικά του γάλακτος:

- ✓ πρωτεΐνη,
- ✓ λακτόζη,
- ✓ λίπος,
- ✓ άνευ λίπους στερεά συστατικά και
- ✓ ολικά στερεά.



**Εικόνα 5.1** συσκευή CombiFoss 6000 FC Milkoscan

### **5.3.4 Προσδιορισμός σύνθεσης της λιπαρής φάσης δειγμάτων γάλακτος**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των δειγμάτων βασίστηκε στα πρότυπα 172:(1995), 184:(1999) και 182:(1999) της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος (IDF).

- ✓ Αρχή της Μεθόδου

Κατά τη μέθοδο πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ποσότητας λίπους από αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος (10 ml) με τη χρήση αιθέρων. Ακολούθησε μεθυλεστεροποίηση των περιεχόμενων λιπαρών οξέων με την προσθήκη αντιδραστηρίου μεθυλίωσης (μεθανολικό διάλυμα καυστικού καλίου), με σκοπό να μετατραπούν αυτά σε πτητικά, ώστε να μπορούν να αναλυθούν. Η ανάλυση των μεθυλεστεροποιημένων λιπαρών οξέων (FAMES: Fatty Acids Methyl Esters) έγινε με τη χρήση Αέριου Χρωματογράφου (GC).

✓ Απαραίτητα αντιδραστήρια

- 1) αιθυλική αλκοόλη 99% καθαρότητας,
- 2) αμμωνία,
- 3) αιθυλικός αιθέρας,
- 4) πετρελαϊκός αιθέρας
- 5) αντιδραστήριο μεθυλίωσης  $\text{CH}_3\text{OK}$  2M (μεθανολικό διάλυμα καυστικού καλίου),
- 6) επτάνιο αναλυτικής χρωματογραφικής καθαρότητας 99% και
- 7) άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

✓ Εργαστηριακός εξοπλισμός

- 1) κύλινδρος Rose-gottlieb
- 2) ζυγός ακριβείας,
- 3) συσκευή περιστρεφόμενης απόσταξης (Rotary Evaporator),
- 4) δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ml με εσφυρισμένο πόμα,
- 5) πιπέτες του 1 ml και των 10 ml,
- 6) πουάρ,
- 7) πιπέτες Pasteur,
- 8) αναδευτήρας (Vortex),
- 9) πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες,
- 10) γυάλινες φιάλες και
- 11) αέριος χρωματογράφος (GC) (Εικόνα 5.2).

✓ Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη σύνθεσης της λιπαρής φάσης, φυγοκεντρήθηκαν 50 ml γάλακτος από κάθε δείγμα, σε φυγόκεντρο (Biofuge 17RS, Heraeus) στις 4.000 στροφές ανά λεπτό στους 4 °C για 4 λεπτά. Το υπερκείμενο τμήμα (κρέμα γάλακτος) τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και εφαρμόστηκε η μέθοδος Rose-gottlieb με σκοπό την

απομόνωση του λίπους του γάλακτος και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων.

Συγκεκριμένα, σε 10 ml γάλακτος που τοποθετήθηκαν στον κύλινδρο Rose-gottlieb, προστέθηκαν με προχοΐδα 1 ml αμμωνίας και 10 ml αιθυλικής αλκοόλης, τοποθετήθηκε το πώμα φελλού και ακολούθησε ελαφρά ανακίνηση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25 ml αιθυλικού αιθέρα και 25 ml πετρελαϊκού αιθέρα και οι παραπάνω διαλύτες αναμίχθηκαν για 30 δευτερόλεπτα. Ο κύλινδρος παρέμεινε σε ηρεμία για 20 λεπτά έως ότου επήλθε διαχωρισμός του περιεχομένου σε δύο σαφείς στοιβάδες, εκ των οποίων η άνω περιείχε το λίπος του γάλακτος εντός των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και η άλλη τα μη λιπαρά συστατικά του γάλακτος. Όταν η λιπαρή φάση στον κύλινδρο ήταν σαφής και διαυγής, μεταγγίστηκε με τη βοήθεια του πώματος σιφωνίων εντός φιάλης. Στη συνέχεια, στον κύλινδρο Rose-gottlieb προστέθηκαν 15 ml αιθυλικού αιθέρα και 15 ml πετρελαϊκού αιθέρα, αναμίχθηκαν για 15 δευτερόλεπτα όπως προηγουμένως και μετά την πάροδο 20 λεπτών ακολούθησε μετάγγιση της λιπαρής φάσης. Η φιάλη με το περιέχον λίπος τοποθετήθηκε σε συσκευή περιστρεφόμενης απόσταξης (Rotary Evaporator) έως ότου συμπληρώθηκε η απόσταξη των διαλυτών. Η αποστακτική συσκευή έφερε υδατόλουτρο με θερμοκρασία νερού στους 70 °C περίπου μέσα στο οποίο περιστρεφόταν η φιάλη και οι εξατμιζόμενοι διαλύτες απομακρύνονταν μέσω κενού. Μετά από 30 λεπτά είχε εξατμιστεί η μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτών και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur παραλείφθηκε το λίπος και αποθηκεύτηκε σε μικρούς πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, στην κατάψυξη.

Για την μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων του γάλακτος ζυγίστηκαν 0,4 g λίπους σε δοκιμαστικό σωλήνα με εσφυρισμένο πώμα των 10 ml, προστέθηκαν με πιπέτα 0,5 ml αντιδραστήριο μεθυλίωσης  $\text{CH}_3\text{OK}$  2M, 10 ml διαλύτης n-επτάνιο καθαρότητας 99% και τέλος μικρή ποσότητα άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  προς προσρόφηση τυχόν υπάρχουσας υγρασίας του δείγματος. Ακολούθησε ανάδευση για 1 min σε vortex και το δείγμα παρέμεινε σε ηρεμία περίπου για 1 ώρα έως ότου έγινε διαυγές.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια μικρο-σύριγγας απομονώθηκε 1 μl και έγινε εισαγωγή στον Αέριο Χρωματογράφο. Τα μεθυλεστεροποιημένα λιπαρά οξέα (FAMES) αναλύθηκαν με τη χρήση Αέριου Χρωματογράφου Shimadzu GC - 17A (Εικόνα 5.2) με τις εξής συνθήκες: στήλη της εταιρείας Supelco SP 2340 διαστάσεων μήκους 30 m και εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm, πάχος φιλμ 0.2 μm, ανιχνευτής με ιοντίζουσα ηλεκτρονική δέσμη (FID), φέρον αέριο He καθαρότητας 99,999 %, θερμοκρασία ανιχνευτή 270 °C και θερμοκρασία εισαγωγέα 250 °C. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που εφαρμόστηκε ήταν το ακόλουθο: αρχική θερμοκρασία στήλης 45°C για διάστημα 5 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό ανύψωσης 7 °C min<sup>-1</sup> έως τους 100 °C και παραμονή για χρονικό διάστημα 5 min, έπειτα αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό ανύψωσης 5 °C min<sup>-1</sup> έως τους 220 °C και παραμονή για χρονικό διάστημα 20 min.



**Εικόνα 5.2**

Αέριος Χρωματογράφος GC 17A

Οι μεθυλεστέρες εκλύονται από την στήλη ξεκινώντας από αυτόν με το μικρότερο αριθμό ατόμων άνθρακα, ενώ όσον αφορά το βαθμό κορεσμού των λιπαρών οξέων, αυξανόμενου του αριθμού των διπλών δεσμών, αυξάνεται και ο χρόνος κατακράτησης.

Τέλος, από το προφίλ των μεθυλεστέρων, συγκρίνοντας το ολοκληρωμένο εμβαδόν των κορυφών κάθε λιπαρού οξέος με το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών, προσδιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά η σύσταση του λίπους και η επί τοις εκατό αναλογία του ως προς αυτά τα λιπαρά οξέα.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SAS (2005) με ανάλυση διακύμανσης σε πρότυπο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

### **5.3.5 Προσδιορισμός της εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στα δείγματα γάλακτος**

Για την ανίχνευση της παρουσίας της εσπεριδίνης στο γάλα η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος του γάλακτος και στη συνέχεια ανάλυση στην HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης) (Εικόνα 5.3).



**Εικόνα 5.3** Συσκευή HPLC

✓ Αρχή της Μεθόδου

Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης (LC), η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό.

Στην HPLC είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης (gradient elution). Επίσης, είναι δυνατή η χρησιμοποίηση αναλυτικών στηλών σε σειρά, έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος.

Ο χρόνος ανάλυσης με την τεχνική της HPLC είναι συνήθως μικρός της τάξης των μερικών λεπτών, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητά της είναι πολύ καλές.

Γενικά, η HPLC είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Ενδείκνυται για την ανάλυση μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών.

Χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό πολλών χημικών ουσιών όπως αμινοξέων, υδατανθράκων, αλκαλοειδών, αφλατοξινών, βιταμινών, φαρμάκων, στεροειδών, αντιβιοτικών, λιπών, φλαβονοειδών κ.α.

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ELITE LaChrom HPLC, εφοδιασμένο με αντλία VWR HITATCH L-2130, αυτόματο δειγματολήπτη VWR HITATCH L-2200 και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, PDA) VWR HITATCH L-2455. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης RP Ultra C18 (250x4, 6mm, i.d. 5.0 μm, Restek) με προστήλη C18. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Agilent EZChrom Elite Client/Server Enterprise Data System.

✓ Απαραίτητα αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

- 1) πρότυπη ουσία εσπεριδίνης καθαρότητας 80% (MP Biomedicals),
- 2) πρότυπη ουσία εσπεριτίνης καθαρότητας 95% (Sigma, Aldrich),
- 3) μεθανόλη,
- 4) οξικό οξύ,

- 5) ακετονιτρίλιο (ACN) και
- 6) απιονισμένο νερό

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν HPLC grade και πριν τη χρήση τους διηθούνταν υπό κενό.

✓ Εργαστηριακός εξοπλισμός

- 1) σωληνάκια φυγόκεντρου των 10 ml,
- 2) στατώ,
- 3) αυτόματες πιπέτες των 1ml και 10 ml,
- 4) ρύγχι,
- 5) φυγόκεντρος Biofuge 17RS, Heraeus,
- 6) σύριγγες των 2,5 ml,
- 7) φίλτράκια με διάμετρο πόρων 0,45 μm
- 8) σωληνάκια erpendorf για αποθήκευση,
- 9) φιαλίδια HPLC,
- 10) αναδευτήρας τύπου Vortex και
- 11) σύστημα HPLC

✓ Πειραματική διαδικασία

Σε 1 ml γάλα προστέθηκαν 2 ml μεθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση του δείγματος και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές για 5 min. Το υπερκείμενο διηθήθηκε από φίλτρο με πορώδες 0,45μm και κατόπιν πραγματοποιήθηκε ξήρανση σε ρεύμα αζώτου. Τα δείγματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη (-80oC) μέχρι την ανάλυση.

Πριν την ανάλυση στην HPLC, στα δείγματα γινόταν ανασύσταση με απεσταγμένο νερό και μεθανόλη σε αναλογία 1:2 (300μl απεσταγμένο νερό/600μl μεθανόλης). Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 4000στροφές για 5 min και 20μl από το ανασυσταμένο δείγμα ενίονταν στην στήλη.



Επίσης, παρασκευάστηκαν και τα κάτωθι πρότυπα διαλύματα:

- ✓ Διαλύματα παρακαταθήκης:  
διαλύματα εσπεριδίνης/εσπεριτίνης σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0,4mg/ml.
- ✓ Πρότυπα διαλύματα (standard)  
διαλύματα εσπεριδίνης/εσπεριτίνης σε μεθανόλη σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 50 και 100 µg/ml.
- ✓ Πρότυπα διαλύματα εργασίας:  
διαλύματα εσπεριδίνης/εσπεριτίνης σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 50 και 100 µg/ml, που παρασκευάζονταν πριν την ανάλυση διαλύοντας τους κατάλληλους όγκους από το διάλυμα παρακαταθήκης σε γάλα μέχρι 1ml.

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονταν κάθε φορά που αναλύονταν τα δείγματα του γάλακτος και η προετοιμασία για την ανάλυση στην HPLC γινόταν όπως και στα δείγματα.

#### *Ανάλυση στην HPLC*

Για την ανάλυση με την HPLC, χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης διαλυτών (Πίνακας 5.5). Ο διαλύτης A ήταν διάλυμα οξικού οξέος 2% κ.ο και ο B ακετονιτρίλιο. Η έκλουση γινόταν σε θερμοκρασία 40°C και η ταχύτητα ροής ήταν 1 ml/min. Ο όγκος του δείγματος που ενιόταν στην στήλη ήταν 20µl και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 15 min. Η εσπεριδίνη και η εσπεριτίνη έδιναν κορυφές στα 285 nm σε χρόνο έκλουσης 7,83 min και 11,78 min αντίστοιχα.

**Πίνακας 5.5:** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για διαχωρισμό της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης σε HPLC

<b>Χρόνος (min)</b>	<b>Διαλύτης A (%)</b>	<b>Διαλύτης B (%)</b>	<b>Ταχύτητα έκλουσης (ml/min)</b>
0	100	0	1
2	75	25	1
5	60	40	1
8	50	50	1
10	50	50	1
12	75	25	1
14	100	0	1
15	100	0	1

Η σειρά προτύπων διαλυμάτων σε μεθανόλη (standard) και σε γάλα περιελάμβανε συγκεντρώσεις εσπεριδίνης και εσπεριτίνης 5 έως 100μg/ml. Το % ποσοστό ανάκτησης των δύο ουσιών προσδιορίστηκε από το λόγο της επιφάνειας των κορυφών στο γάλα μετά την κατεργασία, προς των πρότυπων διαλυμάτων αντίστοιχης συγκέντρωσης (standard) που ενιόνταν απευθείας στην στήλη.

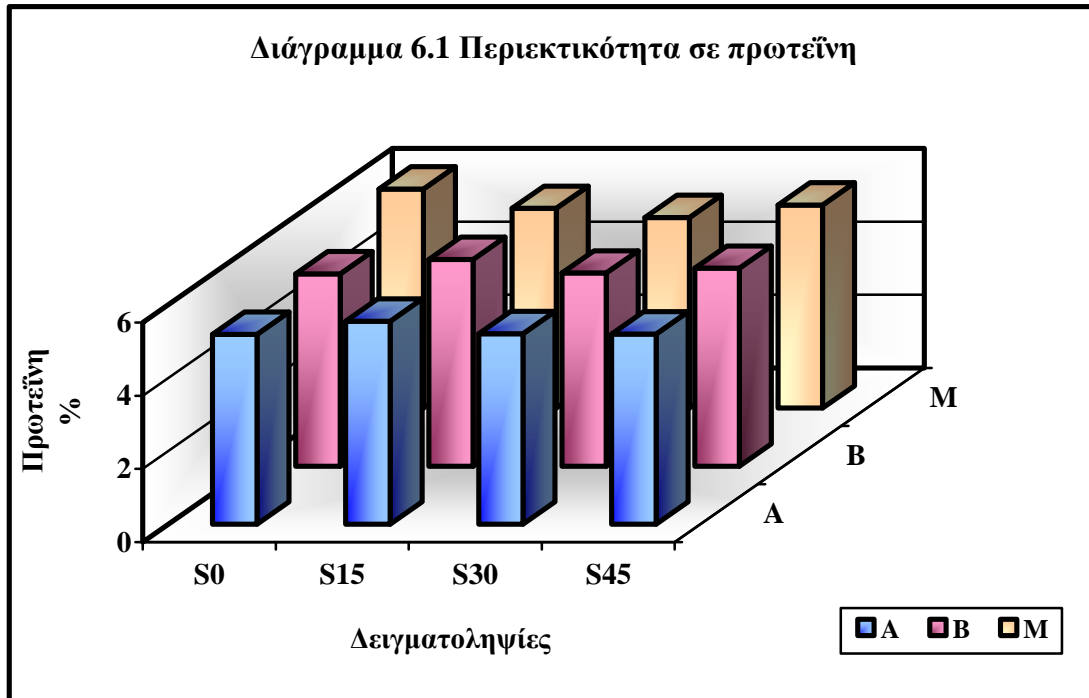
Για τα δείγματα με βάση τα χρωματογραφήματα που έδιναν γινόταν εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με τα πρότυπα διαλύματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

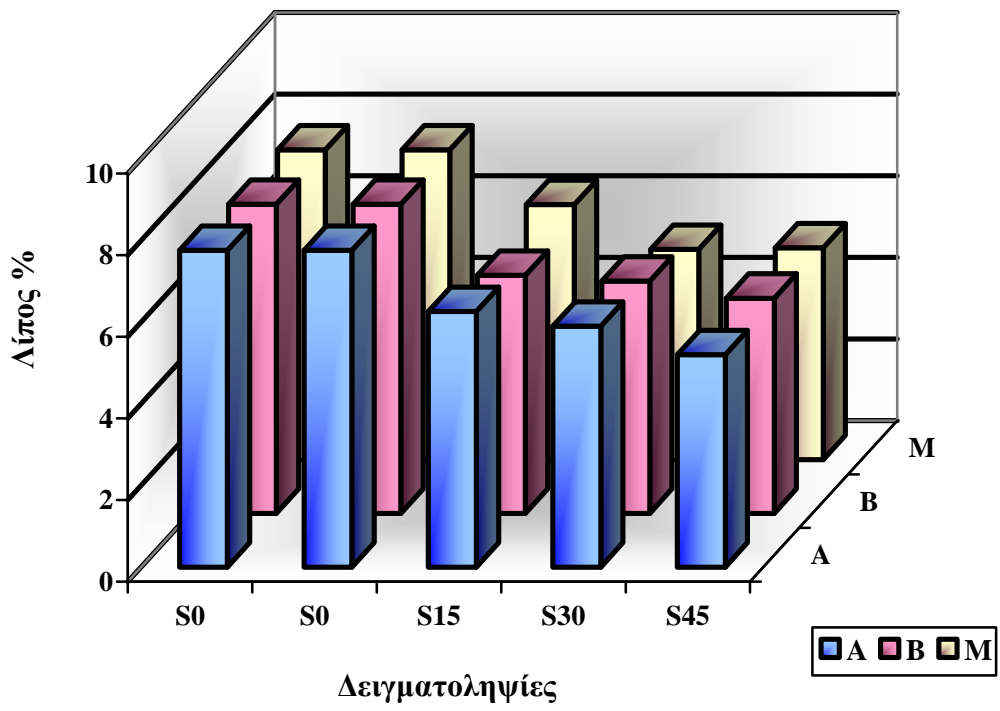
### Αποτελέσματα

#### 6.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος

Όσον αφορά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6.1, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ολικά στερεά και στη λακτόζη τόσο μεταξύ των ομάδων όσο και εντός αυτών κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών (δηλαδή από S0 έως S45). Σχετικά με την πρωτεΐνη, τα άνευ λίπους στερεά και το λίπος δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Όμως εντός των πειραματικών ομάδων και κατά την διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$  για την πρωτεΐνη,  $P < 0,001$  για τα άνευ λίπους στερεά και το λίπος). Στα διαγράμματα 6.1 και 6.2 που ακολουθούν παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λίπος, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6.2 Περιεκτικότητα σε λίπος



**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.1** Επίδραση προσθήκης εσπεριδίνης στα χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος μεταξύ και εντός των πειραματικών ομάδων (Μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση)

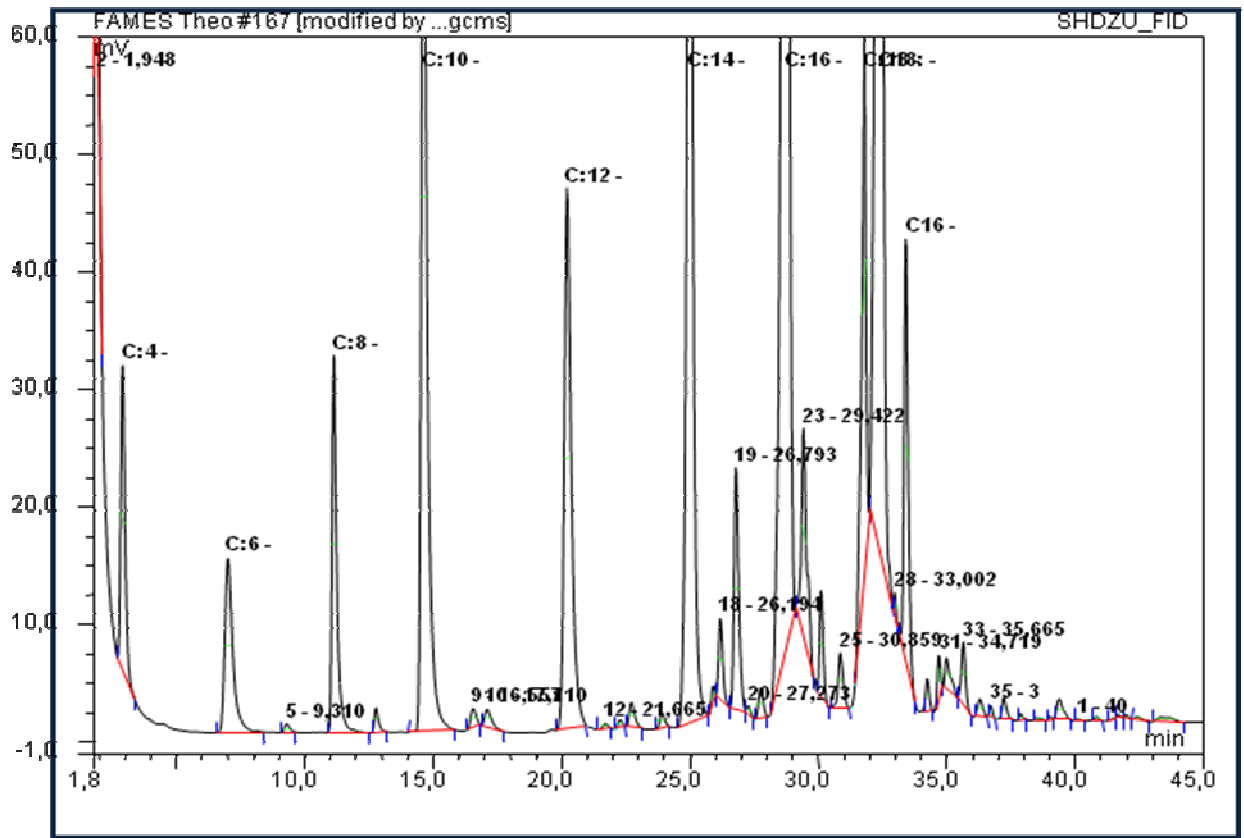
ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡ/ΚΑ	ΟΜΑΔΕΣ	S0	S15	S30	S45	Σημαντικό-τητα
ολικά στερεά (%)	A	17.19 $\pm$ 1.40	18.19 $\pm$ 0.50	16.96 $\pm$ 0.35	16.24 $\pm$ 0.32	ΜΣ
	B	18.13 $\pm$ 0.50	17.22 $\pm$ 0.82	16.83 $\pm$ 0.55	16.47 $\pm$ 0.40	
	M	18.90 $\pm$ 1.13(ΜΣ)	17.61 $\pm$ 0.36(ΜΣ)	16.1 $\pm$ 0.90(ΜΣ)	16.66 $\pm$ 0.53 (ΜΣ)	
πρωτεΐνη (%)	A	5.19 $\pm$ 0.17	5.55 $\pm$ 0.11	5.21 $\pm$ 0.10	5.20 $\pm$ 0.10	*§
	B	5.26 $\pm$ 0.22	5.65 $\pm$ 0.29	5.28 $\pm$ 0.26	5.41 $\pm$ 0.19	
	M	5.99 $\pm$ 0.26(ΜΣ)	5.46 $\pm$ 0.25(ΜΣ)	5.21 $\pm$ 0.15(ΜΣ)	5.55 $\pm$ 0.26 (ΜΣ)	
άνευ λίπους στερεά (SNF) (%)	A	10.35 $\pm$ 0.20	11.39 $\pm$ 0.15	11.06 $\pm$ 0.17	11.03 $\pm$ 0.16	***§
	B	10.27 $\pm$ 0.28	11.39 $\pm$ 0.31	11.13 $\pm$ 0.31	11.20 $\pm$ 0.18	
	M	10.86 $\pm$ 0.22(ΜΣ)	11.37 $\pm$ 0.23(ΜΣ)	11.00 $\pm$ 0.21(ΜΣ)	11.49 $\pm$ 0.26(ΜΣ)	
λακτόζη (%)	A	4.68 $\pm$ 0.05	4.70 $\pm$ 0.09	4.81 $\pm$ 0.08	4.76 $\pm$ 0.08	ΜΣ
	B	4.53 $\pm$ 0.20	4.60 $\pm$ 0.17	4.82 $\pm$ 0.06	4.69 $\pm$ 0.10	
	M	4.37 $\pm$ 0.05 (ΜΣ)	4.76 $\pm$ 0.12 (ΜΣ)	4.86 $\pm$ 0.14(ΜΣ)	4.83 $\pm$ 0.11 (ΜΣ)	
λίπος (%)	A	7.76 $\pm$ 0.39	6.26 $\pm$ 0.34	5.90 $\pm$ 0.30	5.20 $\pm$ 0.27	***§
	B	7.57 $\pm$ 0.57	5.83 $\pm$ 0.54	5.69 $\pm$ 0.25	5.27 $\pm$ 0.22	
	M	7.59 $\pm$ 0.8 (ΜΣ)	6.25 $\pm$ 0.15(ΜΣ)	5.15 $\pm$ 0.68(ΜΣ)	5.19 $\pm$ 0.28 (ΜΣ)	

ΜΣ: Μη Σημαντική διαφορά, § : \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$  , \*\*\*  $P < 0.001$

Τα αποτελέσματα αναλογούν σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) του συνόλου

A: Ομάδα A, κατανάλωση 1,2 gr εσπεριδίνης /kg τροφής ημερησίως, B: Ομάδα B, κατανάλωση 3 gr εσπεριδίνης /kg τροφής ημερησίως, M: Μάρτυρας

## 6.2 Προφίλ λιπαρών οξέων



**Εικόνα 6.1** Τυπικό χρωματογράφημα από τη συσκευή GC κατά την ανάλυση λιπαρής φάσης δείγματος γάλακτος.

Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζεται αναλυτικά το ποσοστό των λιπαρών οξέων από τα δείγματα γάλακτος και των τριών ομάδων. Όσον αφορά το βουτυρικό οξύ (C4) διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ομάδων ( $P < 0,05$ ) όσο και κατά την αλληλεπίδραση του χρόνου με την επέμβαση εντός των ομάδων ( $P < 0,05$ ). Όσον αφορά το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά εντός των ομάδων κατά την διάρκεια του χρόνου ( $P < 0,01$ ).

Σχετικά με το καπροϊκό οξύ (C6), καπρυλικό οξύ (C8), καπρικό οξύ (C10), λαυρικό οξύ (C12), μυριστικό οξύ (C14), μυριστολεϊκό οξύ (C14:1), παλμιτικό οξύ (C16), στεατικό οξύ (C18), ελαϊκό οξύ (C18:1), λινολεϊκό οξύ (C18:2) και συζευγμένο λινολενικό οξύ (C18:3) δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ και εντός των ομάδων κατά την αλληλεπίδραση χρόνου και επέμβασης. Στην Εικόνα 6.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα από συσκευή Αέριου Χρωματογράφου (GC) κατά την ανάλυση λιπαρής φάσης από δείγμα γάλακτος.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2** Μεταβολές στα λιπαρά οξέα γάλακτος μεταξύ και εντός των πειραματικών ομάδων

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΟΜΑΔΕΣ	S0	S15	S30	S45	Σημαντικότητα
C4	A	2.46 ± 0.41	2.86 ± 0.27	2.55 ± 0.30	3.17 ± 0.30	*§
	B	2.40 ± 0.47	4.42 ± 0.72	3.18 ± 0.43	2.41 ± 0.24	
	M	2.55 ± 0.24 *§	1.97 ± 0.25 *§	2.11 ± 0.50 *§	2.11 ± 0.35 *§	
C6	A	2.44±0.27	2.54 ± 0.21	2.63 ± 0.09	2.92 ± 0.04	ΜΣ
	B	2.17±0.22	2.92 ± 0.21	2.43±0.12	2.58 ± 0.21	
	M	2.43 ± 0.35 (ΜΣ)	2.39 ± 0.31 (ΜΣ)	2.15 ± 0.20 (ΜΣ)	2.29 ± 0.12 (ΜΣ)	
C8	A	3.38±0.22	3.67 ± 0.33	3.54 ± 0.06	3.39 ± 0.15	ΜΣ
	B	3.11±0.33	3.86 ± 0.23	3.63 ± 0.20	3.07 ± 0.29	
	M	3.53 ± 0.13 (ΜΣ)	3.13 ± 0.43 (ΜΣ)	3.29 ± 0.30 (ΜΣ)	3.10 ± 0.11 (ΜΣ)	
C10	A	10.04±0.63	11.19 ± 1.95	11.37 ± 0.65	11.13 ± 0.85	ΜΣ
	B	9.43±1.03	12.00 ± 0.74	10.93 ± 0.88	10.10 ± 1.17	
	M	10.93 ± 0.08 (ΜΣ)	9.97 ± 1.32 (ΜΣ)	11.13 ± 1.22 (ΜΣ)	10.48 ± 0.68 (ΜΣ)	
C12	A	5.98±0.26	7.54 ± 0.63	6.60 ± 0.84	6.71 ± 0.71	ΜΣ
	B	5.52±0.79	6.96 ± 1.03	6.32 ± 0.65	6.12 ± 0.84	
	M	5.99 ± 0.53 (ΜΣ)	5.47 ± 1.11 (ΜΣ)	7.15 ± 0.78 (ΜΣ)	6.45 ± 0.50 (ΜΣ)	
C14	A	12.84±0.31	14.43 ± 0.73	13.39 ± 0.70	13.56 ± 0.47	ΜΣ
	B	12.82±0.83	13.26 ± 0.85	13.33 ± 0.59	12.90 ± 0.63	
	M	13.53 ± 0.18 (ΜΣ)	13.79 ± 0.43 (ΜΣ)	14.50 ± 0.64 (ΜΣ)	13.75 ± 0.40 (ΜΣ)	
C14:1	A	1.14 ± 0.20	0.85 ± 0.15	0.96 ± 0.29	0.76 ± 0.13	ΜΣ
	B	1.95 ± 0.55	0.75 ± 0.12	0.96 ± 0.25	1.12 ± 0.17	
	M	1.50 ± 0.70 (ΜΣ)	0.69 ± 0.11 (ΜΣ)	1.12 ± 0.30 (ΜΣ)	1.24 ± 0.40 (ΜΣ)	
C16	A	28.04±1.11	27.87 ± 1.28	25.57 ± 0.80	27.17 ± 1.23	ΜΣ
	B	26.44±0.91	25.05 ± 0.75	25.30 ± 0.89	25.61 ± 0.61	
	M	27.67 ± 1.11(ΜΣ)	27.14 ± 1.56 (ΜΣ)	26.31 ± 1.11 (ΜΣ)	27.08 ± 1.02 (ΜΣ)	

C16:1	A	4.21 ± 0.37	1.79 ± 0.68	2.72 ± 0.74	1.67 ± 0.60	**§
	B	5.91 ± 1.41	2.06 ± 0.69	3.10 ± 0.40	3.57 ± 0.31	
	M	4.23 ± 1.63 (ΜΣ)	1.97 ± 0.61 (ΜΣ)	2.90 ± 1.00 (ΜΣ)	3.54 ± 1.19 (ΜΣ)	
C18	A	5.26 ± 0.43	4.29 ± 0.55	5.62 ± 0.81	4.55 ± 0.73	ΜΣ
	B	5.07 ± 0.49	4.86 ± 0.20	5.98 ± 0.46	5.89 ± 0.46	
	M	5.52 ± 0.43 (ΜΣ)	6.04 ± 0.61 (ΜΣ)	4.98 ± 0.95 (ΜΣ)	5.69 ± 0.14 (ΜΣ)	
C18:1	A	18.54 ± 1.37	17.90 ± 2.55	19.76 ± 1.20	20.14 ± 1.18	ΜΣ
	B	18.86 ± 0.96	17.95 ± 1.19	19.74 ± 1.44	20.99 ± 1.89	
	M	17.43 ± 0.99 (ΜΣ)	21.59 ± 1.29 (ΜΣ)	18.67 ± 1.68 (ΜΣ)	19.23 ± 0.39 (ΜΣ)	
C18:2	A	1.36 ± 0.21	0.76 ± 0.21	0.92 ± 0.44	1.02 ± 0.63	ΜΣ
	B	2.54 ± 1.02	0.67 ± 0.18	0.75 ± 0.13	0.96 ± 0.18	
	M	1.21 ± 0.74 (ΜΣ)	0.56 ± 0.09 (ΜΣ)	0.90 ± 0.44 (ΜΣ)	1.13 ± 0.45 (ΜΣ)	
C18:3	A	3.63 ± 0.69	3.44 ± 0.46	3.61 ± 0.34	2.97 ± 0.74	ΜΣ
	B	3.06 ± 0.05	3.39 ± 0.17	3.51 ± 0.22	3.81 ± 0.26	
	M	2.97 ± 0.18 (ΜΣ)	4.40 ± 0.21 (ΜΣ)	3.35 ± 0.13 (ΜΣ)	3.28 ± 0.15 (ΜΣ)	
CLA	A	0.69 ± 0.08	0.88 ± 0.24	0.76 ± 0.10	0.83 ± 0.14	ΜΣ
	B	0.71 ± 0.04	1.88 ± 1.11	0.85 ± 0.15	0.85 ± 0.09	
	M	0.53 ± 0.07 (ΜΣ)	0.90 ± 0.13 (ΜΣ)	1.45 ± 0.74 (ΜΣ)	0.66 ± 0.03 (ΜΣ)	

ΜΣ: Μη Σημαντική διαφορά

§ : \* P<0.05 , \*\* P<0.01 , \*\*\* P<0.001

Τα αποτελέσματα αναλογούν σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) του συνόλου

A: Ομάδα A, κατανάλωση 1,2 gr εσπεριδίνης /kg τροφής ημερησίως

B: Ομάδα B, κατανάλωση 3 gr εσπεριδίνης /kg τροφής ημερησίως

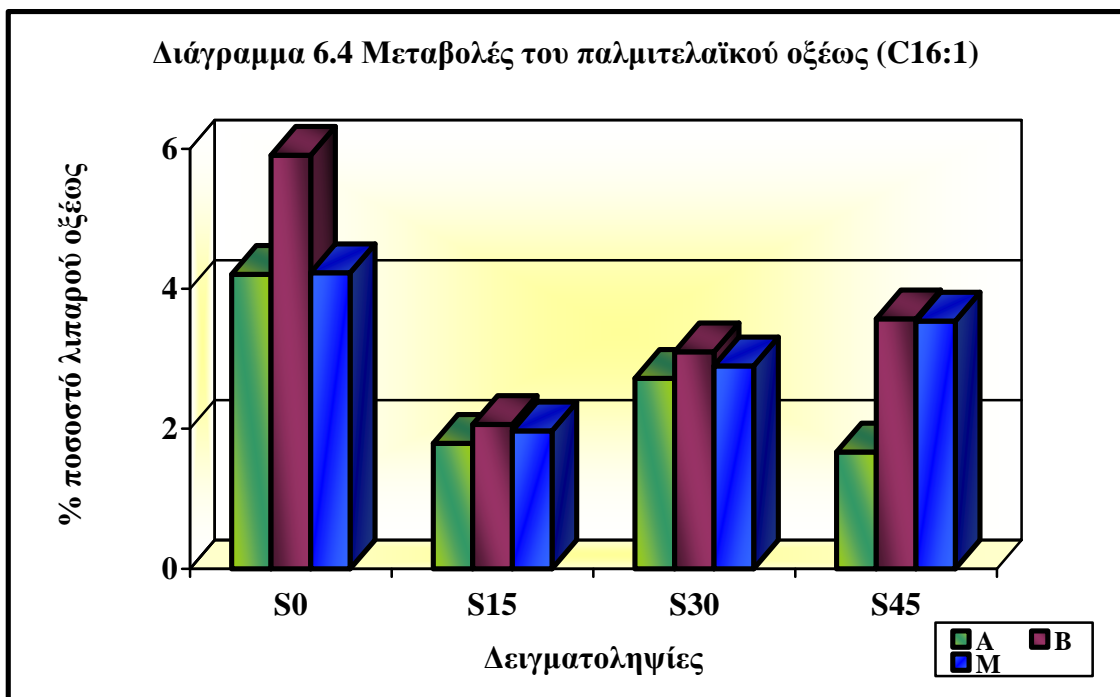
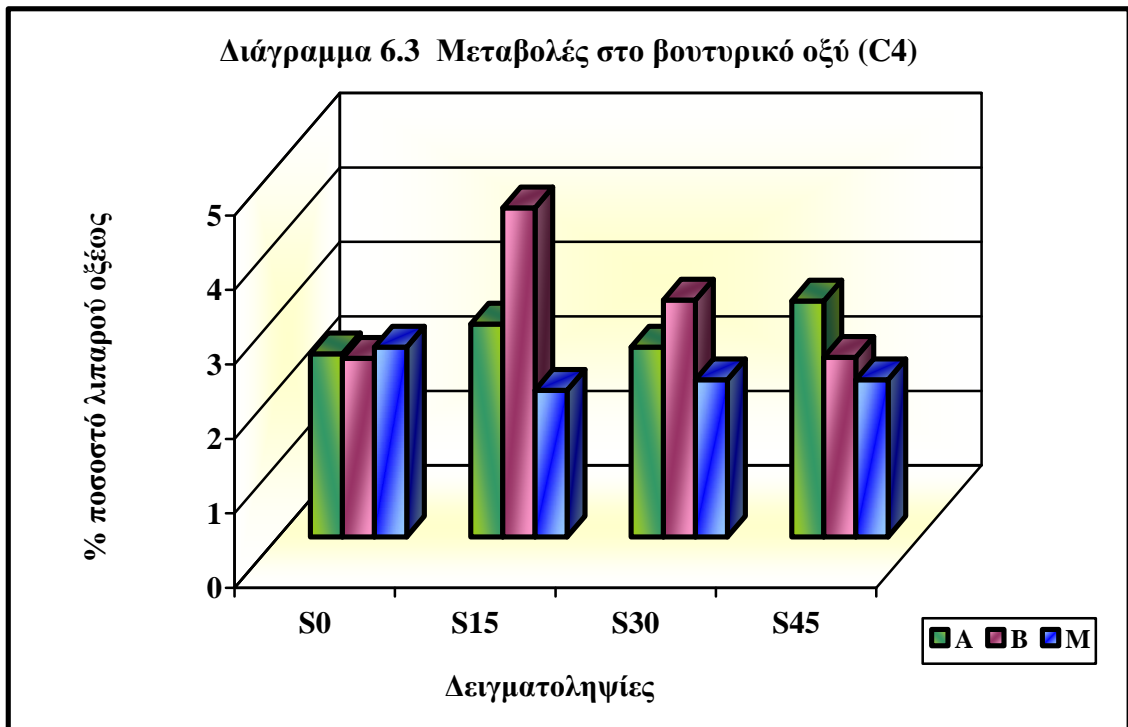
M: Μάρτυρας

S0: δείγματα γάλακτος κατά την 1<sup>η</sup> μέρα, χωρίς προσθήκη εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο

S15, S30, S45: δείγματα γάλακτος κατά την 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup> και 45<sup>η</sup> μέρα αντίστοιχα, με προσθήκη εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο



Στα Διαγράμματα 6.3 και 6.4 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα C4 και C16:1 αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών και για τις τρεις ομάδες.



Στον Πίνακα 6.3 που παρατίθεται στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα συνολικά ποσοστά των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA), μεσαίας αλυσίδας (MCFA) και μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (LCFA) για την κάθε ομάδα ξεχωριστά, καθώς και τα συνολικά ποσοστά κορεσμένων (SFA), πολυακόρεστων (PUFA) και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA).

Να σημειωθεί ότι, τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο λίπος μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων C που περιέχουν σε:

- ✓ λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας (SCFA) που περιέχουν 4 με 10 άτομα άνθρακα,
- ✓ λιπαρά οξέα μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας (MCFA) που περιέχουν 12 με 16 άτομα άνθρακα και
- ✓ λιπαρά οξέα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (LCFA) που περιέχουν πάνω από 18 άτομα άνθρακα.

Επίσης, τα λιπαρά οξέα ομαδοποιούνται ανάλογα με την ύπαρξη και τον αριθμό των διπλών δεσμών που έχουν στο μόριό τους σε:

- ✓ κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), τα οποία δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς,
- ✓ μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), τα οποία περιέχουν έναν διπλό δεσμό
- ✓ πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία περιέχουν περισσότερους από έναν διπλούς δεσμούς στο μόριό τους.

Επίσης στα διαγράμματα 6.5, 6.6 και 6.7 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των SCFA, MCFA και LCFA για τις ομάδες A, B και M, αντίστοιχα.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3

Συνολικό ποσοστό % του συνόλου των λιπαρών οξέων

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΟΜΑΔΕΣ	S0	S15	S30	S45	Σημαντικότητα
SCFA	A	18.32 ± 1.30	20.26 ± 2.64	20.09 ± 0.50	20.62 ± 0.79	ΜΣ
	B	17.11 ± 1.46	23.19 ± 1.10	20.17 ± 0.79	18.17 ± 1.58	
	M	19.43±0.64(ΜΣ)	17.46 ± 2.11 (ΜΣ)	18.67±1.64(ΜΣ)	17.97±0.67(ΜΣ)	
MCFA	A	52.20 ± 1.30	52.48 ± 2.13	49.25 ± 1.53	49.88 ± 1.50	ΜΣ
	B	52.65 ± 1.06	52.48 ± 2.13	49.00 ± 1.81	49.32 ± 1.30	
	M	52.92±1.57(ΜΣ)	49.05 ± 1.46 (ΜΣ)	51.97±1.81(ΜΣ)	51.05±0.58(ΜΣ)	
LCFA	A	29.48 ± 1.85	27.26 ± 3.64	30.67 ± 1.71	29.52 ± 1.97	ΜΣ
	B	30.24 ± 1.77	28.75 ± 2.23	30.83 ± 1.96	32.51 ± 2.61	
	M	27.66±0.93(ΜΣ)	33.49±1.51 (ΜΣ)	29.35±2.02(ΜΣ)	29.98±0.30(ΜΣ)	
SFA	A	70.43 ± 1.84	74.38 ± 3.16	71.27 ± 1.54	72.60 ± 1.08	ΜΣ
	B	66.97 ± 3.55	73.29 ± 2.58	71.09 ± 1.13	68.70 ± 2.09	
	M	72.14±1.83(ΜΣ)	69.89 ± 1.40 (ΜΣ)	71.62±2.37(ΜΣ)	70.95±1.84(ΜΣ)	
PUFA	A	5.68 ± 0.83	5.07 ± 0.65	5.29 ± 0.36	4.83 ± 0.34	ΜΣ
	B	6.31 ± 1.09	5.95 ± 1.24	5.11 ± 0.33	5.63 ± 0.30	
	M	4.71 ± 0.49(ΜΣ)	5.86 ± 0.30 (ΜΣ)	5.70 ± 0.61(ΜΣ)	5.07 ± 0.37(ΜΣ)	
MUFA	A	23.89 ± 1.46	20.54 ± 2.56	23.44 ± 1.38	22.57 ± 0.88	ΜΣ
	B	26.73 ± 2.49	20.76 ± 1.62	23.80 ± 0.95	25.67 ± 1.88	
	M	23.15±1.34(ΜΣ)	24.25 ± 1.14 (ΜΣ)	22.69±2.48(ΜΣ)	23.99±1.54(ΜΣ)	

SCFA: μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα C4 - C10, MCFA: μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα C12 - C16

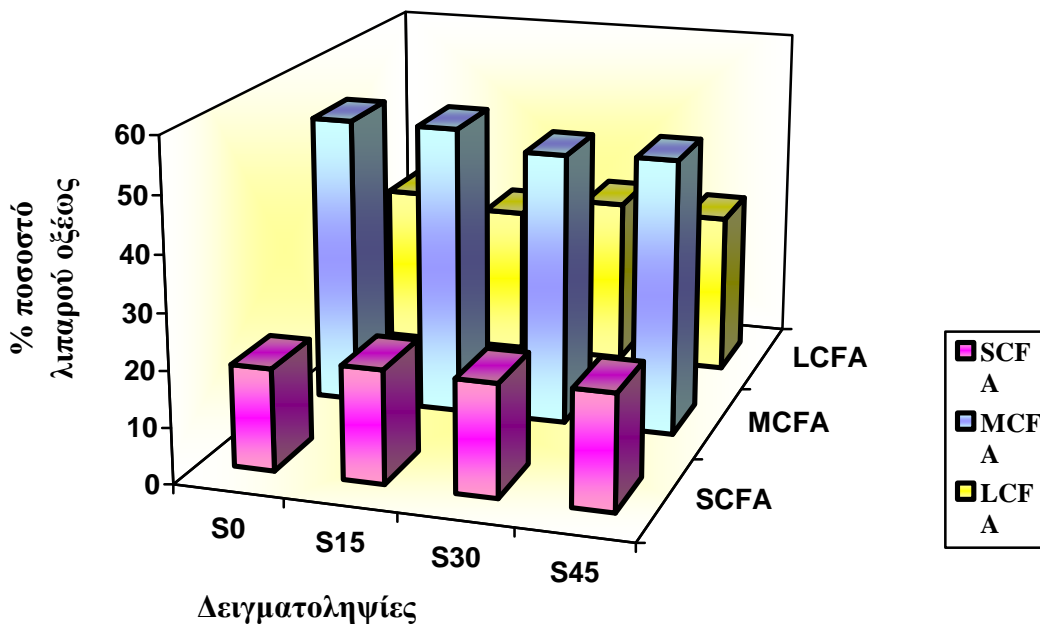
LCFA: μεγάλης αλυσίδας λιπαρά οξέα C18 - C18:3,

SFA: κορεσμένα λιπαρά οξέα C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18

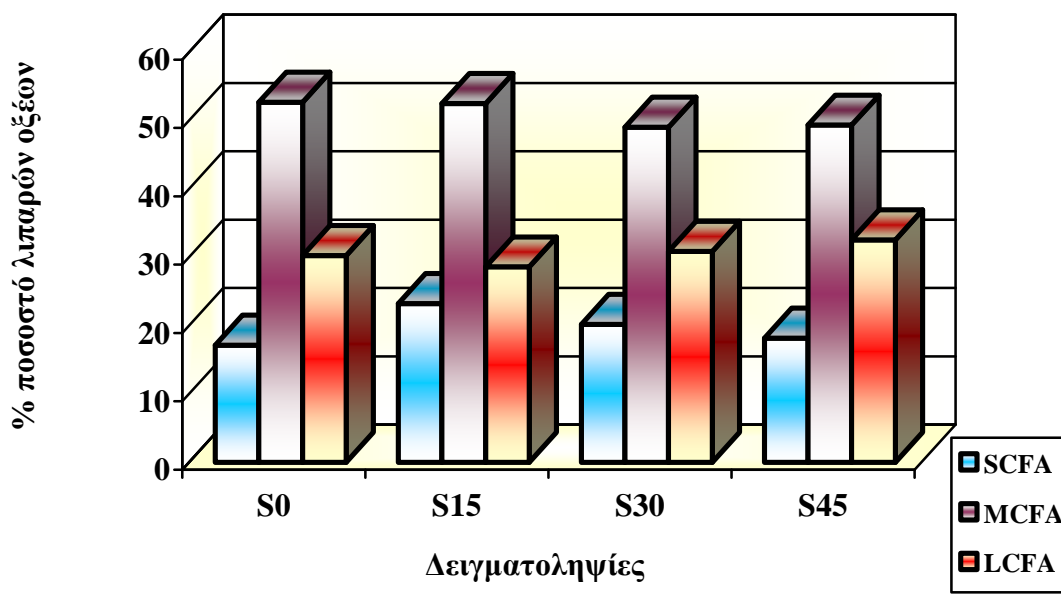
PUFA: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα C18:2, C18:3, C18:2, c-9, t-11 (CLA)

MUFA: μονοακόρεστα λιπαρά οξέα C14:1, C16:1, C18:1

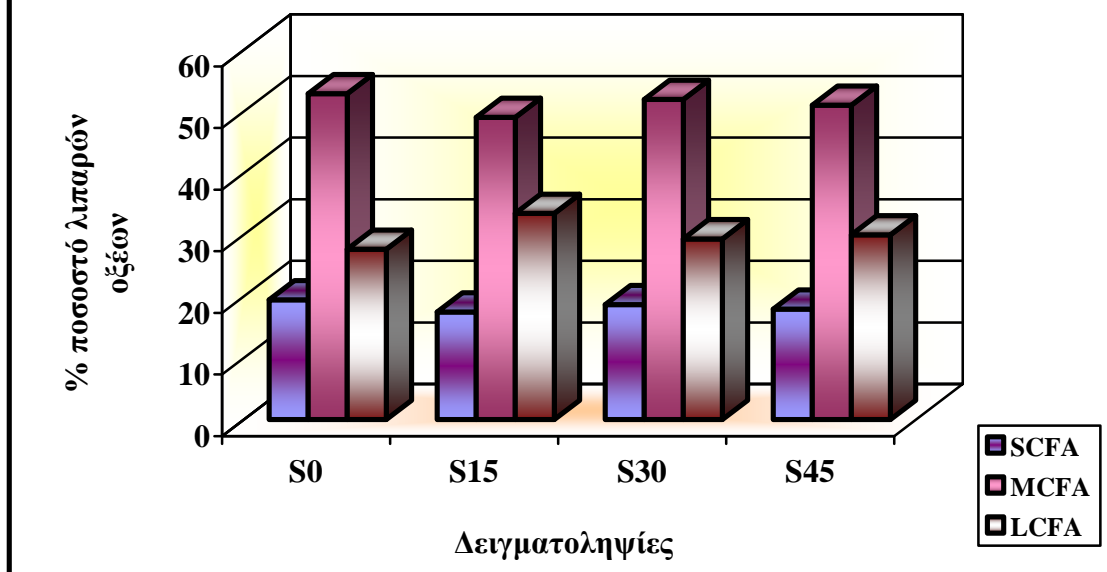
Διάγραμμα 6.5 Συγκέντρωση (%) των SCFA, MCFA και LCFA για την ομάδα A



Διάγραμμα 6.6 Συγκέντρωση (%) των SCFA, MCFA και LCFA για την ομάδα B



**Διάγραμμα 6.7 Συγκέντρωση (%) των SCFA, MCFA και LCFA για την ομάδα M**



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, όπως αυτά παρουσιάστηκαν στους παραπάνω πίνακες και σχεδιαγράμματα, τα λιπαρά οξέα που κυριαρχούν στο προφίλ των δειγμάτων κατά φθίνουσα σειρά συγκέντρωσης είναι τα εξής: παλμιτικό οξύ (C16) > ελαϊκό οξύ (C18:1) > μυριστικό οξύ (C14) > καπρικό οξύ (C10) > λαυρικό οξύ (C12) > στεαρικό οξύ (C18).

Τα λιπαρά οξέα μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας (MCFA) κατέχουν σε όλες τις δειγματοληψίες και για τις τρεις πειραματικές ομάδες τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, με ποσοστό να κυμαίνεται από 52.92 έως και 49.00 % του συνόλου των λιπαρών οξέων. Ακολουθούν και για τις δύο ομάδες και για όλες τις δειγματοληψίες, τα λιπαρά οξέα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (LCFA) με ποσοστό από 33.49 έως 27.26 % και τέλος τα λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας (SCFA) με ποσοστό να κυμαίνεται από 23.19 έως 17.11 %.

Ανάμεσα στις τάξεις των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν κυριαρχούν και για τις δύο πειραματικές ομάδες τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) με ποσοστό 74.38 - 66.97 %, ακολουθούν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) με ποσοστό 25.67 - 20.54 % και τέλος τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) με ποσοστό να κυμαίνεται από 5.95 - 5.71 %.

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες των λιπαρών οξέων είτε μεταξύ είτε εντός των ομάδων κατά τη διάρκεια του χρόνου.

### 6.3 Ανίχνευση εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στο γάλα

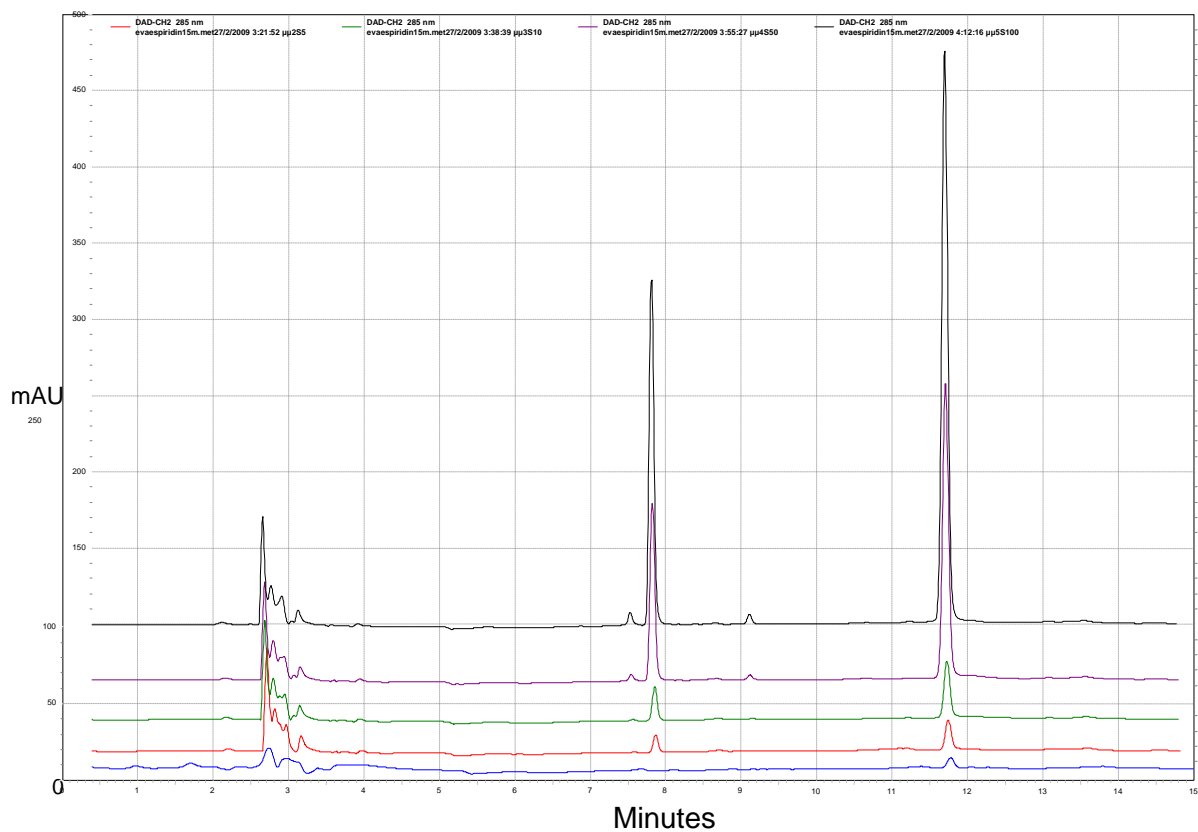
Όσον αφορά τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: η μέθοδος είναι σύντομη όσον αφορά τη διαδικασία της εκχύλισης των δειγμάτων και την μέτρηση στην HPLC.

Στην εικόνα 6.2 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα των προτύπων της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 50 και 100μg/ml, όπου διακρίνονται οι κορυφές σε χρόνο έκλουσης 7,83 min και 11,78 min αντίστοιχα.

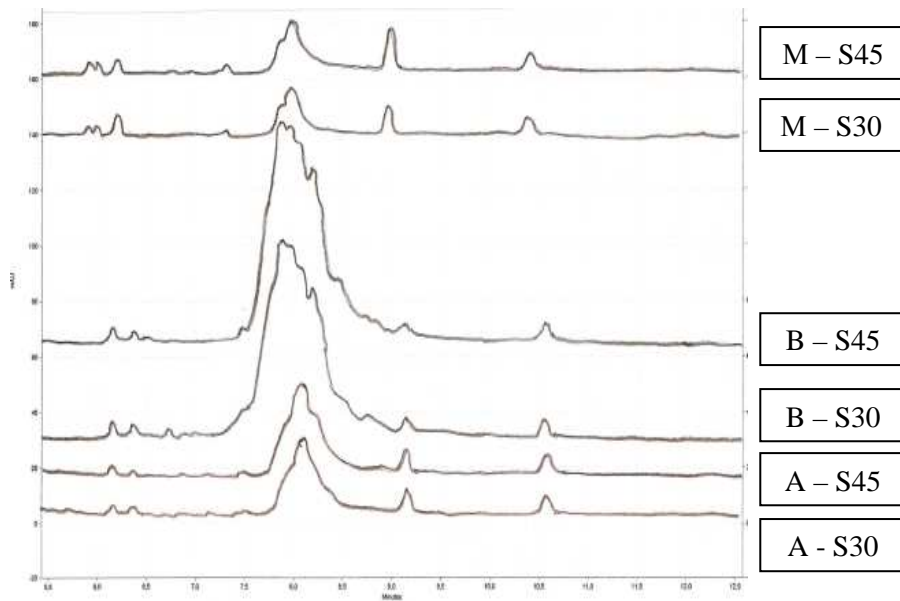
Η ανακτησιμότητα στο γάλα είναι ικανοποιητική. Το ποσοστό ανάκτησης στα δείγματα γάλακτος μετά την κατεργασία, κυμαινόταν από 85,3 έως 106,9% για την εσπεριδίνη και για την εσπεριτίνη από 83,6 έως 110,1%.

Από την ανάλυση των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση της εσπεριτίνης ήταν πολύ χαμηλή (κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης) για το λόγο αυτό δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της. Η εσπεριδίνη έδωσε μικτή (“απλωμένη”) κορυφή, η οποία κατέστη αδύνατον να διαχωριστεί.

Στην εικόνα 6.3 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των δειγμάτων M, B και A (δείγματα 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> δειγματοληψίας), όπου διακρίνονται οι κορυφές στις θέσεις της εσπεριδίνης (κορυφή από 7,5 min έως 9 min). Όσον αφορά τις “απλωμένες” κορυφές, λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο έκλουσης, αλλά και την μορφή τους μετά από συγχρωματογράφιση με πρότυπο διάλυμα, η εκτίμηση που έγινε είναι ότι ανήκει στην ζητούμενη ουσία ή ενδεχομένως και σε κάποιο παράγωγό της (conjugate), το οποίο με τις δυνατότητες της συγκεκριμένης μεθόδου δεν μπορεί να διαπιστωθεί.



**Εικόνα 6.2** Χρωματογράφημα προτύπων της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 50 και 100 µg/ml (από κάτω προς τα πάνω). Διακρίνονται οι κορυφές σε χρόνο έκλυσης 7,83 min για την εσπεριδίνη και 11,78 min για την εσπεριτίνη.



**Εικόνα 6.3** Χρωματογραφικό προφίλ των δειγμάτων M, B και A. Διακρίνονται οι κορυφές στις θέσεις της εσπεριδίνης (κορυφή από 7,5 min έως 9 min).

*M - S30 & S45: δείγμα ομάδας M από την 3<sup>η</sup> & 4<sup>η</sup> δειγματοληψία αντίστοιχα*

*B - S30 & S45: δείγμα ομάδας M από την 3<sup>η</sup> & 4<sup>η</sup> δειγματοληψία αντίστοιχα*

*A - S30 & S45: δείγμα ομάδας M από την 3<sup>η</sup> & 4<sup>η</sup> δειγματοληψία αντίστοιχα*



## 6.4 Σχολιασμός

### 6.4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος και σύνθεση λιπαρής φάσης

Από τα αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι η χορήγηση της εσπεριδίνης δεν επέφερε μεταβολές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος καθώς και στη σύνθεση της λιπαρή φάσης αυτού. Επίσης, η ποιοτική ανίχνευση της εσπεριδίνης στο γάλα είχε θετικά αποτελέσματα.

Σχετικά με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πρωτεΐνη ( $P < 0.05$ ), στο λίπος ( $P < 0.001$ ) και στα άνευ λίπους στερεά ( $P < 0.001$ ). Τα αποτελέσματα για τη λακτόζη, ήταν αναμενόμενα αφού όπως είναι γνωστό, η περιεκτικότητα της λακτόζης στο γάλα παραμένει σχετικά σταθερή και δεν επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διατροφή ή το περιβάλλον (Pulina and Nudda, 2004). Η πρωτεΐνη εμφάνισε ορισμένες αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών ενώ το λίπος σταδιακά μειώθηκε και για τις τρεις πειραματικές ομάδες.

Όσον αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση το βουτυρικό και το παλμιτελαϊκό οξύ. Συγκεκριμένα, για τα λιπαρά οξέα των οποίων το μήκος της αλυσίδας είναι κάτω από 16 άτομα άνθρακα, συντίθενται *de novo* στον μαστικό αδέν. Αυτή η *de novo* σύνθεση ενδεχομένως επηρεάζεται θετικά από το ενεργειακό ισοζύγιο του μηρυκαστικού με σκοπό τη συντήρηση και την έκκριση γάλακτος (Chilliard et al., 2001). Το αντίθετο συμβαίνει για τα λιπαρά οξέα των οποίων το μήκος της αλυσίδας είναι από 16 άτομα άνθρακα και πάνω, τα οποία προέρχονται είτε από τη διατροφή είτε από τη κινητοποίηση του σωματικού λίπους. Συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα C18 (στεαρικό οξύ) και C18:1 (ελαϊκό οξύ) είναι συνήθως συνδεδεμένα με τη κινητοποίηση των αποθεμάτων σωματικού λίπους (Chilliard et al., 2003).

Άρα, σύμφωνα με τα παραπάνω ήταν αναμενόμενο να μην επηρεαστεί η σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος διότι οι προβατίνες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος διατρέφονταν με σταθερή ποσότητα σιτηρεσίου χωρίς να μεταβληθεί. Όμως, στην αρχή της πειραματικής περιόδου τα πρόβατα εκδήλωσαν το φαινόμενο της νεοφοβίας, όχι μόνο εξαιτίας της ενσωμάτωσης της εσπεριδίνης αλλά και λόγω της αλλαγής στην υφή του σιτηρεσίου (αλευρώδης μορφή) (Simitzis et al., 2007). Αρχικά, παρατηρήθηκε μειωμένη κατανάλωση τροφής, αλλά εντός 2 με 3 ημερών παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης μέχρι τη σταθεροποίηση στα αρχικά επίπεδα και για τις τρεις ομάδες. Η μειωμένη αυτή κατανάλωση είχε μικρή διάρκεια ώστε να επιφέρει μεταβολές στο προφίλ των λιπαρών οξέων κατά την έναρξη του πειράματος, δηλαδή στην πρώτη δειγματοληψία.

Το φαινόμενο της νεοφοβίας αποτελεί χαρακτηριστική συμπεριφορά των μηρυκαστικών καθώς και όλων των αγροτικών ζώων. Αντίστοιχα, τα πρόβατα διαθέτουν εσωτερικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ελαχιστοποιούν τυχόν αρνητικές επιδράσεις των αντιδιαιτητικών παραγόντων της τροφής στη φυσιολογική τους λειτουργία (ομαλή διεξαγωγή των φαινομένων της θρέψης του ζώου) (Ralphs και Provenza, 1999). Κατά τη χορήγηση μιας νέας τροφής, τα ζώα την πλησιάζουν και τη δοκιμάζουν με προσοχή, καταναλώνοντάς την σε μικρές ποσότητες, ώστε να περιορίσουν τις αρνητικές επιπτώσεις πιθανών τοξικών συστατικών (Forbes, 2001). Με τον τρόπο αυτό αποκτούν διατροφική εμπειρία ως προς συγκεκριμένες τροφές, την οποία χρησιμοποιούν στις μελλοντικές διατροφικές τους επιλογές (Villalba et al., 2004).

Όπως αναφέρθηκε, το σιτηρέσιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων γάλακτος μηρυκαστικών τόσο στις αγελάδες (Jensen et al., 2002), όσο και στις αίγες (Chilliard et al., 2003) και στα πρόβατα (Addis et al., 2005). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το ποσοστό του CLA (συζευγμένο λινολεϊκό οξύ), σε αγελαδινό και πρόβειο γάλα, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το στάδιο γαλακτοπαραγωγής, τον αριθμό τοκετού (Kelly et al., 1998) και τη φυλή (Secchiari et al., 2001; White et al., 2001). Ωστόσο, η διατροφή είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη συγκέντρωση του CLA στο γάλα (Bauman and Griinari, 2000; Chilliard et al., 2000a; Collomb et al., 2002). Γενικά, η συγκέντρωση του CLA στο γάλα είναι υψηλότερη σε ζώα που διατρέφονται με χλωρά νομή ή βοσκούν ελεύθερα σε βοσκοτόπια, σε σχέση με εκείνα που διατρέφονται με ξηρά νομή.

Καταλήγοντας, στη παρούσα μελέτη συμπεραίνεται ότι η επέμβαση της προσθήκης εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο των προβατίνων δεν επηρέασε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος καθώς και τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων. Τέλος, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο βουτυρικό και στο παλμιτελαϊκό οξύ ενδεχομένως οφείλονται σε τυχαίους παράγοντες όπως η ατομικότητα του ζώου ή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

#### **6.4.2 Ανίχνευση της εσπεριδίνης και εσπεριτίνης στο γάλα**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 6.1.3 φαίνεται ότι τα δείγματα του πρόβειου γάλακτος που μελετήθηκαν περιείχαν εσπεριδίνη ή και μεταβολικά προϊόντα της εσπεριδίνης παραπλήσιας δομής, κάτι το οποίο θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω με τη χρήση φασματομετρία μάζας.

Σύμφωνα με μια εργασία του Erlund (2004), κατά τη χορήγηση από το στόμα εσπεριδίνης σε χοίρους ανίχνευσε τη συγκεκριμένη ουσία και τον μεταβολίτη της, εσπεριτίνη, στο αίμα και στα ούρα των ζώων αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση από την

αρχική χορηγηθείσα ποσότητα . Ωστόσο, τα δύο флаβονοειδή δεν βρέθηκαν και στα κόπρανα των χοίρων υποθέτοντας ότι μεταβολίστηκαν περαιτέρω στο παχύ έντερο και απορροφήθηκαν σε διαφορετική μορφή. Παρόμοια συμπεράσματα παρουσιάζει και ο Yamada με τους συνεργάτες του (2006) κατά τη χορήγηση εσπεριδίνης σε ποντίκια.

Καταλήγοντας, δεδομένου ότι η εσπεριδίνη και ο μεταβολίτης της ανιχνεύεται στο αίμα, σύμφωνα με άλλες εργασίες, το οποίο σχετίζεται άμεσα με την σύνθεση του γάλακτος, επικυρώνει τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>

### Συμπεράσματα

Όπως αναλύθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο η χορήγηση της εσπεριδίνης στο σιτηρέσιο προβατίνων δεν επέφερε στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όσο και στη σύνθεση της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Ενδέχεται οι ποσότητες που χορηγήθηκαν να ήταν σχετικά μικρές ώστε να επιφέρουν οποιαδήποτε μεταβολή στα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν.

Αντίστοιχα πειράματα με χορήγηση εσπεριδίνης σε μηρυκαστικά δεν έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα ώστε να συγκριθούν και να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα. Όμως, υπάρχει ένα μεγάλος εύρος εργασιών σε μηρυκαστικά στα οποία χορηγήθηκε στο σιτηρέσιό τους πούλπα εσπεριδοειδών, η οποία περιέχει το φλαβονοειδές εσπεριδίνη. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές κατά τη χορήγηση πούλπας εσπεριδοειδών επίσης δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων.

Παρόλα αυτά, η εσπεριδίνη αποτελεί γόνιμο έδαφος για μελλοντική έρευνα σε αντίστοιχα πειράματα στα μηρυκαστικά και στα παραγόμενα προϊόντα τους χάρη στις ευεργετικές ιδιότητες που παρουσιάζει. Για ακριβή συμπεράσματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν κι άλλα πειράματα με την εσπεριδίνη, χορηγούμενη σε μεγαλύτερες ποσότητες και ενδεχομένως και σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:**

### **Ελληνική Βιβλιογραφία:**

Ποντίκης Κ., Ειδική Δενδροκομεία: Εσπεριδοειδή. Τόμος Τέταρτος. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης

### **Ξένη Βιβλιογραφία:**

Ambrose, A. M., Robbies, D. J., & de Eds, F. (1951). Comparative toxicities of quercetin and quercitrin. *J Am Pharm Assoc* 41, 119– 122.

Ambrose, A. M., Robbies, D. J., & de Eds, F. (1952). Comparative toxicities of quercetin and quercitrin. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 16, 119– 122.

Agullo G., Gamet-Payrastra L., Fernandez Y., Anciaux N., Demigne C., Remesy C. (1996). Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett*, 105: 61 - 70.

Agullo G., Gamet-Payrastra L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H., Payrastra B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemistry of Pharmacology*, 53: 1649 - 1657.

Ammerman, C.B., Henry, P.R., 1991. Citrus and vegetable products for ruminant animals. In: *Proceedings of the Alternative Feeds for Dairy and Beef Cattle Symposium, St. Louis, MO, USA*, pp. 103–110.

Albrecht H., Yoder J. I., Phillips D. A. (1999). Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiol*, 119: 585 - 592.

Anderson D., Basaran N., Dobrzynska M. M., Basaran A. A., Yu T. W. (1997). Modulating effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*, 17: 45 - 58.

Anderson D., Dobrzynska M. M., Basaran N., Basaran A., Yu T. W. (1998). Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutat Res*, 402: 269 - 277.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37, 693– 704.

Bampidis V. A., and Robinson P. H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128: 175 - 217.

- Bankova V. S., Popov S. S., Marekov N. L. (1982). High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography*, 242: 135 - 143.
- Bankova V. S., Popov S. S., Marekov N. L. (1983). A study on flavonoids of popolis. *Journal of Natural Products*, 46: 471 - 474.
- Bankova V. S., Dyulgerov A., Popov S. S., Marekov N. L. (1987). A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch*, 42e: 147 - 151.
- Bath, D.L., Dunbar, J.R., King, J.M., Berry, S.L., Leonard, R.O., Olbrich, S.E., 1980. By-products and unusual feedstuffs in livestock rations. *Western Regional Extension Publication No. 39*. USDA-ARS, Washington, DC, USA.
- Baumann B. and Bilkei G., 2003. Effect of dietary oregano extract on the development of swine dysentery in a pure culture challenge model. *Biol Tiermed*, in press.
- Bhattacharya, A.N., Harb, M., 1973. Dried citrus pulp as a grain replacement for Awasi lambs. *J. Anim. Sci.* 36, 1175–1180.
- Belibasakis, N.G., Tsirgogianni, D., 1996. Effects of dried citrus pulp on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60, 87–92.
- Bernard F. X., Sable S., Cameron B., Provost J., Desnottes J. F., Crouzet J., Blanche F. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 992 - 998.
- Bilyk A., Sapers G. M. (1985). Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish and red cabbage tissues. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 33: 226 - 228.
- Bock C., Waldmann K., Ternes W. (2008). Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutrition Research*, 28: 879 - 891.
- Bonvehi J. S., Coll F. V., Jorda R. E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71: 529 - 532.
- Boulton, D. W., Walle, U. K., & Walle, T. (1999). Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol* 51, 353– 359.
- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. A. (1999). Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods Enzymol* 299, 91– 106.
- Bradley D. V., Cazort, R. J. (1970). Relief of bladder spasms by flavoxate. A comparative study. *J Clin Pharmacol*, 10: 65 - 68.

- Broderick, G.A., Mertens, D.R., Simons, R., 2002. Efficacy of carbohydrate sources for milk production by cows fed diets based on alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 85, 1767–1776.
- Broughton W. J., Perret X. (1999). Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 305 - 311.
- Brown, W.F., Johnson, D.D., 1991. Effects of energy and protein supplementation of ammoniated tropical grass hay on the growth and carcass characteristics of cull cows. *J. Anim. Sci.* 69, 348–357.
- Brouillard R., Cheminat A. (1988). Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res*, 280: 93 - 106.
- Calias, P., Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H. N., & Dalarcao, M. (1996). Synthesis of inositol-2-phosphate-queretin conjugates. *Carbohydr Res*, 292: 83 - 90.
- Calman J. (1972). A new method for the assessment of tissue fluid concentrations of flavonoids. *Angiologica*, 9: 181 - 192.
- Cancalon, P. F. (1999). Analytical monitoring of citrus juices by using capillary electrophoresis. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 82: 95 - 106.
- Cantley, L. C., & Hammes, G. G. (1976). Investigation of quercetin binding sites on chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry*, 15 :1 - 8.
- Casley-Smith, J. R., & Casley-Smith, J. R. (1986). High-Protein Oedemas and the Benzo-gamma-pyrones. Sydney: Lippincott
- de Castro, A.K.M., Zanetti, M.A., 1998. Study of fiber inclusion in the diet of Holstein calves. *Rev. Bras. Zootec.* 27, 1193–1198.
- Cea G. F. A., Etcheberry K. F. C., Dulout F. N. (1983). Induction of micronuclei in mouse bone marrow cells by the flavonoid 5,30,40-trihydroxy-3,6,7,8-tetramethoxyflavone (THTMF). *Mutat Res*, 119: 339 – 342.
- Ceriani M. F., Darlington T. K., Staknis D., Mas P., Petti A. A., Weitz C. J., Kay S. A. (1999). Light-dependent sequestration of timeless by cryptochrome. *Science*, 285: 553 - 556.
- Chang, W. S., Lee, Y. L., Lu, F. J., & Chiang, H. C. (1994). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 13, 2165– 2170.
- Chen, M.C., Ammerman, C.B., Henry, P.R., Palmer, A.Z., Long, S.K., 1981. Citrus condensed molasses soluble as an energy source for ruminants. *J. Anim. Sci.* 53, 253–259.
- Cheng, K. -J., Krishnamurty, H. G., Jones, G. A., & Simson, F. J. (1969). Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Can J Microbiol* 16, 1365– 1371.

- Chi H., Hsieh A. K., Ny C. L., Lee H. K., Li S. F. Y. (1994). Determination of components in propolis by capillary electrophoresis and photodiode array detection. *Journal of Chromatography*, 680: 593 - 598.
- Chilliard Y., Ferlay A. and Doreau M., 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70: 31 - 48.
- Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J. and Lamberet G, 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86: 1751 - 1770.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M. and Doreau M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated linoleic acid. *Ann. Zootec.* 49: 181 - 205.
- Chin G. J. (1999). Chrytochrome, a yellow protein in bacteria and plants, which activates genes for chalcone biosynthesis. *Science* 285, 295.
- Ching L. M., Baguley B. C. (1987). Induction of natural killer cell activity by the antitumor compound flavone acetic acid (NSC 347512). *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23: 1047 - 1050.
- Choi J. S., Park K. Y., Moon S. H., Rhee S. H., Young H. S. (1994). Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system. *Arch Pharmacol Res*, 17: 71 - 75.
- Choudhury, R., Srail, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. A. (1999). Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med* 27, 278– 286.
- Cizmarik J., Matel I. Examination of the chemical composition of propolis. I.(1970) Isolation and identification of the 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. *Experientia*, 26: 713.
- Collomb M., Butikofer U., Sieber R., Jeangros B. and Bosset J.O., 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *Int. Dairy J.* 12: 649 - 659.
- Conney, A. H., Buening, M. K., Pantuck, E. J., Pantuck, C. B., Fortner, J. G., Anderson, K. E., & Kappas, A. (1981). Regulation of human drug metabolism by dietary factors. *Ciba Found Symp*, 76: 147 - 167.
- Conti M., Setnikar I. (1975). Flavoxate, a potent phosphodiesterase inhibitor. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 213: 186 – 189.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., & Remesy, C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol*, 277: G120 - G126.



- Croft K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854: 435 - 442.
- Crone C. (1965). Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. *J Physiol (Lond)*, 181: 103 - 113.
- Crone C. (1986). A blood-brain barrier as a tight epithelium: where is information lacking? *Ann N Y Acad Sci*, 481: 174 - 185.
- Czihay G., Langer H., Ziegler H. (1976). *Flavonoid Biosynthesis*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Cullen, A.J., Harmon, D.L., Nagaraja, T.G., 1986. In vitro fermentation of sugars, grains, and by-product feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. *J. Dairy Sci.* 69, 2616–2621.
- Dai, R., Jacobson, K. A., Robinson, R. C., & Friedman, F. K. (1997). Differential effects of flavonoids on testosterone-metabolizing cytochrome P450s. *Life Sci* 61, L75–L80.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65: 337 - 353.
- Gabor, M. (1988). Szent-Györgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. In V. Cody, J. B. Harborne, & A. Beretz (Eds.), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. II. Biochemical, Cellular and Medical Properties, Progress in Clinical and Biological Research* (pp. 1–15). New York: A.R. Liss.
- Grasser, L.A., Fadel, J.G., Garnett, I., DePeters, E.J., 1995. Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *J. Dairy Sci.* 78, 962–971.
- Disseling T. (1996). Molecular signals and cell responses in symbiosis. *Biological Chemistry of Hoppe Seyler*, 377: 915.
- DuBois J. L., Sneden A. T. (1995). Dehydrolicoisoflavone, a new isoflavone from *Swartzia polyphylla*. *Journal of Natural Product*, 58: 629 - 632.
- Duthie S. J., Dobson V. L. (1999). Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr*, 38: 28 - 34.
- Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringerin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851 - 874.
- Farkas L., Geratz J. D., Shaver S. R., Tidwell R. R. (1986). *Flavonoids and Bioflavonoids*. Amsterdam: Elsevier.
- Fegeros K., Zervas G., Stamouli S., Apostolaki E. (1995). Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *Journal of Dairy Science*, 78: No 5.

- Fekermann S., Schroder G., Schmidt J., Strack D., Edrad R. A., Helariutta Y., Elomaa P., Kotilainen M., Kilpelainen I., Proksch P., Teeri T. H., Schroder J. (1998). Secondary resistance. New pathways to polyketides in plants. *Nature (Lond)*, 396: 387 - 390.
- Fewtrell C. M., Gomperts B. G. (1977a). Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature*, 265: 635 - 636.
- Fewtrell C. M., Gomperts B. D. (1977b). Quercetin: a novel inhibitor of Ca<sup>2+</sup> influx and exocytosis in rat peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta*, 469: 52 - 60.
- Fine A., Matsui R., Zhan X., Poliks C. F., Smith B. D., Goldstein R. H. (1992). Discordant regulation of human type-1 collagen genes by prostaglandin E2. *Biochim Biophys Acta*, 1135: 67 - 72.
- Fegeros, K., Zervas, G., Stamouli, S., Apostolaki, E., 1995. Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *J. Dairy Sci.* 78, 1116–1121.
- Forbes J.M., 2001. Consequences of feeding for future feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* 128, (3), 461 - 468.
- Forss D. A., 1993. Effect of feed on flavour of dairy products. Pages 4 - 16 in *Milkfat Flavour Forum*. N. Z. *Dairy Res. Inst.*, Palmerston North, New Zealand
- Fragner P. (1964). *Vitamine, Chemie und Biochemie*. Jena: VEB Fischer.
- Freudenreich C. H., Kreuzer N. (1994). Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11007 - 11011.
- Fritz-Niggli, H. (1968). Inhibited oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria of congenitally jaundiced Gunn rats and the protective action of hydroxyethylrutosides against bilirubin-induced damage. *Med Exp* 18, 239–246.
- Fritz-Niggli, H., & Frohlich, E. (1980). Reduction of radiation-induced early skin damage (mouse foot) by O-(hydroxyethyl)-rutoside. (German). *ROFO Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed* 133, 316– 321.
- Fritz-Niggli, H., & Rao, K. (1978). Rutoside and radiation induced regression of experimental tumors. (German). *Fortschr Med* 96, 1198–1202.
- Funa N., Ohnishi Y., Fujii I., Shibuya M., Ebizuka Y., Horinouchi S. (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400: 897 - 899.
- Gabor M. (1981). The effect of O-(b-hydroxyethyl)-rutosides (HR) on the skin capillary resistance of rats. *Arzneimittelforschung*, 31: 442 - 445.
- Galensa R., Herrmann K. (1979). Analysis of flavonoid glycosides by high pressure liquid chromatography (German). *European Food Research and Technology*, 166: 355 - 356.

- Garcia-Viguera C., Ferreres F., Tomas-Barberau F. A. (1993). Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z Naturforsch*, 48: 731 - 735.
- Gardiner S. E., Schroeder J., Matern, U., Hammer D., Hahlbrock K. (1980). mRNA-dependent regulation of UDP-apiose synthase activity in irradiated plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 10752 - 10757.
- Gauthier A., Gulick P. J., Ibrahim R. K. (1998). Characterization of two cDNA clones which encode O-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch Biochem Biophys*, 351: 243 - 249.
- Gawron O., Duggan M., Grelecki C. J. (1952). Manometric determination of dissociation constants of phenols. *Analytical Chemistry*, 24: 969 - 970.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M. and Doreau M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated linoleic acid. *Ann. Zootec.* 49: 181 - 205.
- Ghisalberti E. L. (1979). Propolis. *Bee World*, 60: 59 - 84.
- Ghosal S., Jaiswal D. K. (1980). Chemical constituents of gentianacae. 28: flavonoids of *Enicostemma hyssopifolium* (Willd.) *Verd. J Pharm Sci*, 69: 53 - 56.
- Glencross R. G., Felsenstein G. N., King, H. G. G. (1972). Separation and determination of isoflavones in the protein concentrate from red clover leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 371 - 376.
- Gough C., Galera C., Vasse J., Webster G., Cocking E. C., Denarie J. (1997). Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Mol Plant Microbe Interact*, 10: 560 - 570.
- Grasser, L.A., Fadel, J.G., Garnett, I., DePeters, E.J., 1995. Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *J. Dairy Sci.* 78, 962–971.
- Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R. (1987). The analysis of bud exudate of *populus x euramerica* and propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Proceeding of the Royal Society of London*, 232: 249 - 272.
- Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley, F. A. (1991). The composition and plant origins of propolis. *A report of work at Oxford, Bee World 1*: 107 - 117.
- Griffiths, L. A. (1975). The role of the intestinal microflora in flavonoid metabolism. In L. Farkas, M. Babor, & F. Kalley (Eds.), *Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry* (pp. 201–213). Amsterdam: Elsevier.
- Griffiths, L. A., & Barrow, A. (1972). The fate of orally and parenterally administered flavonoids in the mammal. The significance of biliary excretion. *Angiologica* 9, 162– 174.

- Griffiths, L. A., & Smith, G. E. (1972a). Metabolism of quercetin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J* 130, 141–151.
- Griffiths, L. A., & Smith, G. E. (1972b). Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. *Biochem J* 128, 901– 911.
- Grotz, W., & Gunther, R. (1971). Prufung einer Coumarin-Rutin-Kombination auf Teratigenitat durch fetale Skelettuntersuchungen. *Arzneimittelforschung (Drug Res)* 21, 2016– 2022.
- Groteweld E., Drummond B. J., Bowen B., Peterson T. (1994). The myb-homologous P gene controls phlobophene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 76: 543 - 554.
- Hadjipanayiotou, M., Louka, A., 1976. A note on the value of dried citrus pulp and grape marc as barley replacements in calf fattening diets. *Anim. Prod.* 23, 129–132.
- Harborne, J. B. Plant polyphenols XI. (1964). The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 3: 151 - 160.
- Harborne, J. B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. *New York: Academic Press.*
- Harborne J. B., Inghaus J. L., King I., Payne M. (1976). The isopentenyl isoflavone luteone as a proinfectional antifungal agent in the genus lupines. *Phytochemistry*, 15: 1485.
- Harborne J. B. (1986). Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res*, 213: 15 - 24.
- Harborne J. B. (1988a). Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Progress in Clinical Biological Research*, 280: 17 - 27.
- Harborne J. B. (1988b). The Flavonoids. *Advances in Research Since 1980*. New York: Chapman and Hall.
- Hassig A., Liang W. X., Schwabl H., Stampfli K. (1999). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses*, 52: 479 - 481.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 30: 1141- 1148.
- Hausen, B. M., & Wollenweber, E. (1988). Propolis allergy (III). Sensitization studies with minor constituents. *Contact Dermatitis* 19, 296– 303.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E., Seuff, H., & Post, B. (1987a). Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis* 17, 163–170.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E., Seuff, H., & Post, B. (1987b). Propolis allergy (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid and ester. *Contact Dermatitis* 17, 171– 177.

- Heilmann, J., & Merfort, I. (1998). Current understanding of the metabolism of flavonoids. II. Adsorption and metabolism of flavones, flavonones, flavanes, proanthocyanidens and isoflavonoids. (German). *Pharm Unserer Zeit*, 27: 173 - 183.
- Heller W., Forkmann G. (1988). Biosynthesis. In J. B. Harborne (Ed.), *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980* (pp. 400 - 426). New York: Chapman and Hall.
- Henrique, W., Leme, P.R., Lanna, D.P.D., Coutinho-Filho, J.L.V., Peres, R.M., Justo, C.L., de Siqueira, P.A., Alleoni, G.F., 1998. Replacement of starch for pectin in diet with different concentrate levels. 1. Animal performance and carcass characteristics. *Rev. Bras. Zootec.* 27, 1206–1211.
- Herbst W. P. (1970). Double-blind comparison of flavoxate and propantheline as urologic anti-spasmodics. *J Biol Chem*, 240: 877.
- Hladon B., Bylka W., Ellnain-Wojtaszek L., Skrzypczak L., Szafarek P., Chodera A., Kowalewski Z. (1980). In vitro studies of the cytostatic activity of propolis extracts. *Arzneimittelforschung*, 30: 1847 - 1848.
- Hollman, P. C. (1997). Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr*, 51(suppl. 1): S66 - S69.
- Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 51: 305 - 310.
- Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl*, 20: 237 - 248.
- Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1999). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* 31(suppl.), S75–S80.
- Hollman, P. C., Hertog, M. G., & Katan, M. B. (1996). Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 24, 785–789
- Hollman, P. C., Bijlsman, M. N., van Gameren, Y., Cnossen, E. P., de Vries, J. H., & Katan, M. B. (1999a). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 31, 569–573.
- Hostettmann K., Hostettmann M. (1982). Analysis of flavonoids. In K. R. Markham (Ed.), *Techniques of Flavonoid Identification*. London, Academic Press: 1 - 15.
- Honcha, W., Platte, H. -D., Oesch, F., & Friedberg, T. (1995). Relationship between the microsomal epoxide hydrolase and the hepatocellular transport of bile acids and xenobiotics. *Biochem J* 311, 975– 979.
- Horisberger, J. -D., Jannin, P., Reuben, M. A., Lasater, L. S., Chow, D. C., Forte, J. G., Sachs, G., Rossier, B. C., & Geering, K. (1991). The H<sup>+</sup>- ATPase b-subunit can act as a surrogate for the b-subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- pumps. *J Biol Chem* 266, 19131–19134.

- Howard M. T., Neece S. H., Matson S. W., Kreuzer K. N. (1994). Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12031 - 12035.
- Hughes R. E., Wilson H. K. (1977). Flavonoids: some physiological and nutritional considerations. *Prog Med Chem*, 14: 285 - 301.
- Hughes, D. A. (1999). Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proc Nutr Soc* 58, 79– 84.
- Ishii K., Furuta T., Kasuya Y. (1996). Determination of naringin and naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B Biomedical Application*, 683: 225 - 229.
- Issaq H. J. (1997). Capillary electrophoresis of natural products. *Electrophoresis*, 18: 2438 - 2452.
- Jacobs M., Rubery P. H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, 241: 346 - 349.
- Jay M., Gonnet J. F., Wollenweber E., Voirin B. (1975). Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. *Phytochemistry*, 14: 1605 - 1612.
- Jiang Z., Swem L. R., Rushing B. G., Devanathan S., Tollin G., Bauer C. E. (1999). Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, 285: 406 - 409.
- Karting T., Hiermann A. (1978). Studies on the isolation of flavonoids using oxides and salts of divalent cations. 1. Studies on pure substances of chelating flavonoids. *Arch Pharm (Weinheim)*, 310: 737 - 743.
- Kimmich G. A., Randles J. (1978). Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. *Membr Biochem*, 1: 221 - 237.
- Kirby L. T., Styles E. D. (1970). Flavonoids associated with specific gene action in maize aleurone and the role of light in substituting for the action of a gene. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 12: 934 - 940.
- Kurachi Y., Ito H., Sugimoto T., Shimizu T., Miki I., Ui, M. (1989). Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G-protein-gated cardiac K<sup>+</sup>-channel. *Nature*, 337: 555 - 557.
- Lahann H., Purucker H. (1975). Bioflavonoide, "Vitamin P". In E. Muller, J. Houben, & T. Weyl (Eds.), *Methoden der Organischen Chemie* (pp. 962 - 976). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Lanza, A., 1984. Dried citrus pulp in animal feeding. In: Hollo, J. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Food Industries and the Environment*. Budapest, Hungary. *Elsevier Publishers, New York, NY, USA*, pp.189–198.

- Lanza C. M. (2003). Processed and derived products of oranges. *Elsevier Publishers, New York, NY, USA*, pp.1346 – 1354.
- Lavie P. (1978). A Remarkable Hive Product: Propolis. Bukarest: Apimondia.
- Leiva, E., Hall, M.B., Van Horn, H.H., 2000. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 83, 2866–2875.
- Lenne-Gouverneur, A. F., Lobstein, A., Haan-Archipoff, G., Duportail, G., Anton, R., & Kuhry, J. G. (1999). Interactions of the monomeric and dimeric flavones apigenin and amentoflavone with the plasma membrane of L929 cells; a fluorescence study. *Mol Membr Biol* 16, 157– 165.
- Leteurtre F., Fujimori A., Tanizawa A., Chabra A., Mazunder A., Kohlhagen G., Nakano H., Pommier Y. (1994). Saintopin, a dual inhibitor of topoisomerases I and II, as a probe for drug-enzyme interaction. *J Biol Chem*, 269: 28702 – 28707.
- Link K. P., Overman R. S., Sullivan W. R., Huebner C. F., Scheel L. D. (1943). Haemorrhagic sweet clover disease. XI. Hypo-prothrombinemia in the rat induced by salicylic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 147: 463 - 474.
- Loggins, P.E., Ammerman, C.B., Moore, J.E., Simpson, C.F., 1968. Effect of feeding long hay or sodium bicarbonate with ground or pelleted diets high in citrus pulp on lamb performance. *J. Anim. Sci.* 27, 745 - 750.
- Lorenzo P. S., Rubio M. C., Medina J. H., Adlergraschinsky E. (1996). Involvement of monamine oxidase and noradrenalin uptake in the positive chronotropic effects of apigenin in rat atria. *Eur J Pharmacol*, 312: 203 - 207.
- Lundquist, R., 1995. Current uses of traditional co-products. In: *Proceedings of the Second National Alternative Feeds Symposium, St. Louis, MO, USA*, pp. 95–104.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. G. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regeat, F., & Remesy, C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426, 331– 336.
- Masquelier, J., Michaud, J., Laparra, J., & Dumon, M. C. (1979). Flavonoids and pycnogenols. *Int J Vitam Nutr Res*, 49: 307 -311.
- Markham K. R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. London: *Academic Press*.
- Matern U., Potts J. R., Hahlbrock K. (1981). Two flavonoid-specific malonyltransferases from cell suspension cultures of *petrosilium horensense*. Partial purification and some properties of malonyl-CoA: flavone/ flavonol-7-O-glycoside malonyltransferase and malonyl-CoA: flavonol-3-O-glucoside malonyltransferase. *Arch Biochem Biophys*, 208: 233 - 241.

- Matsumoto H., Ikoma Y., Sugiura M., Yano M., Hasegawa Y. (2004). Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6653 - 6659.
- Maxwell, S., & Thorpe, G. (1996). Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity. *Br Med J* 313, 229.
- McMurrough I., Henningan G. P., Laughrey M. J. (1985). Quantitative analysis of hop flavonols using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 1102 -1106.
- Medina J. H., Viola H., Wolfman C., Marder M., Wasowski C., Calvo D., Paladini A. C. (1997). Overview - flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res*, 22: 419 - 425.
- Metzner, J., Bekemeier, H., Paintz, M., & Schneidewind, E. (1979). On the anti-microbiological activity of propolis and propolis constituents. (German). *Pharmazie*, 34: 97 -102.
- Middleton E. M., Teramura A. H. (1993). The role of flavonol glycosides and carotinoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol*, 103: 741 - 752.
- Middleton, E., Jr. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439, 175–182.
- Moller, J. V. (1969). Excretion of organic acids by the rat kidney. *Doctoral Thesis*, University of Aarhus.
- Mortenson L. E., Thorneley R. N. (1979). Structure and function of nitrogenase. *Annu Rev Biochem*, 48 :387 - 418.
- Moyano E., Martinez-Garcia J. F., Martin C. (1996). Apparent redundancy in Myp gen function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Abtirrhinum* flowers. *Plant Cell*, 8: 1519 - 1532.
- Mukohata Y., Nakabayashi S., Higashida M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215 - 218.
- Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T., & Sugimura, T. (1981). Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ Mutag* 3, 401– 419.
- Nikolov S., Giogieva E., Kaleva M., Vasileo V., Todarov S., Drianska S. (1976). Thin layer chromatography of propolis extracts. *Proceedings of the International Congress on Agriculture*, Grenoble (p. 235). Bukarest: Apimondia.
- Pangarova T., Pavlova A., Dimov N. (1980). On the analysis of flavonoids. *Pharmazie*, 35: 501 - 512.



- Pangarova T., Pavlova A., Dimov N. (1986). On the analysis of flavonoids. *Pharmazie*, 8: 501 - 502.
- Partridge E., Keen N. T. (1976). Association of the phytoalexin kievitone with single gene resistance of cowpeas to phytophthora-vigna. *Phytopathology*, 66: 426 - 429.
- Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Bonnefoy J. Y., Spits H., Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J. (1988). IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 6880 - 6884.
- Petersen, H. O. (1977). Allergy to propolis in patients with eczema. (Danish). *Ugeskr Laeger* 139, 2331–2333.
- Petersen, H. O., & Afzelius, H. (1977). Maximization test with propolis on albino guinea pigs. (Danish). *Ugeskr Laeger* 139, 2329–2331.
- Petrakis, P. L., Kallianos, A. G., Wender, S. H., & Slatler, M. R. (1959). Metabolic studies of quercetin labeled with <sup>14</sup>C. *Arch Biochem Biophys* 85, 264–271.
- Peters N. K., Frost J. W., Long S. R. (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233: 977 - 980.
- Pforte, H., Hempel, J., & Jacobasch, G. (1999). Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. *Nahrung*, 43: 205 - 208.
- Piller, N. B. (1977). Tissue levels of (3-<sup>14</sup>C) coumarin in the rat: distribution and excretion. *Br J Exp Pathol* 58, 28–34.
- Pulina G., and Nudda A., 2004, Milk Production. Pages 1-12 in Dairy Sheep Nutrition. G. Pulina and R. Bencini, ed. CAB International.
- Ralphs, M.H., Provenza, F.D., Wiedmeier, R.D., Bunderson, F.B., 1995. Effects of energy source and food flavor on conditioned preferences in sheep. *J. Anim. Sci.* 73, 1651–1657.
- Rihani, N., Garrett, W.N., Zinn, R.A., 1993a. Influence of level of urea and method of supplementation on characteristics of digestion of high-fiber diets by sheep. *J. Anim. Sci.* 71, 1657–1665.
- Rihani, N., Garrett, W.N., Zinn, R.A., 1993b. Effect of source of supplemental nitrogen on the utilization of citrus pulp-based diets by sheep. *J. Anim. Sci.* 71, 2310–2321.
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24, 790–795.
- Ritov V. B., Goldman R., Stoyanovsky D. A., Menshikova E. V., Kagan V. E. (1995). Antioxidant paradoxes of phenolic compounds: peroxy radical scavenger and lipid antioxidant, etoposide (VP-16), inhibits sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase via thiol oxidation by its phenoxyl radical. *Arch Biochem Biophys*, 321: 140 - 152.

- Sahu, R. K., Basu, R., & Sharma, A. (1981). Genetic toxicological of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutat Res* 89, 69– 74.
- Saponara R., Bosisio E. (1998). Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of *Ginkgo biloba* in rat adipose tissue. *J Nat Prod*, 61: 1386 - 1387.
- Schalch, F.J., Schalch, E., Zanetti, M.A., Brisola, M.L., 2001. Substitution of the corn grain ground by citric pulp in the early weaning of dairy calves. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 280–285.
- Schubert S. Y., Lansky E. P., Neeman I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*, 66: 11 - 17.
- Seino, Y., Naga, M., Yahago, T., Sugimura, T., Yasuda, T., & Nashimura, T. (1979). Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids. *Mutat Res* 68, 117–123.
- Shoshan V., Campbell K. P., MacLennan D. H., Frodis W., Britt B. A. (1980). Quercetin inhibits  $Ca^{2+}$  uptake but not  $Ca^{2+}$  release by sarcoplasmic reticulum in skinned muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 4435 - 4438.
- Shrader J. H., and Johnson A. H. (1934). Freezing orange juice. *Industrial And Engineering of Chemistry*, 26: 869 - 874.
- Secchiari P., Mele M., Serra A., Buccioni A., Antongiovanni M., Ferruzzi G., Paoletti F. and Andreotti L., 2001 Conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of three dairy sheep breeds. *Progr. Nutr.* 3: 37 - 42.
- Setnikar I., Bjarnason E. V., Dake, P. (1960). Pharmacological properties of piperidanoethyl-3-methyl-flavone-9-carboxylate hydrochloride, a smooth muscle relaxant. *J Pharmacol Exp Ther*, 130: 356 - 363.
- Simitzis P.E., Bizelis J.A., Fegeros K., Deligeorgis S.G., 2007. The effect of dietary supplementation with oregano essential oil on the ewe 's milk characteristics. *Animal Science Review* 37: 69 - 78.
- Simpson, F. J., Jones, G. A., & Wolin, E. A. (1969). Anaerobic degradation of some bioflavonoids by microflora of the rumen. *Can J Microbiol* 15, 972– 974.
- Solomon, R., Chase, L.E., Ben-Ghedalia, D., Bauman, D.E., 2000. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 1322–1329.
- Sonnenbichler, J., Mattersberger, J., & Hanser, G. (1980). Mechanism of silybin action, III. Resorption of the flavonolignane derivative silybin into rat liver cells. (German). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 361, 1751– 1756.
- Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srail, S. K., & Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458, 224– 230.

- Spilkova, J., & Dusek, J. (1996). Natural substances with antioxidant activity. (Czech). *Ceska Slov Farm*, 45: 296 - 301.
- Spilkova, J., & Hubik, J. (1986). The biological effects of flavonoids. (Czech). *Cesk Farm*, 35: 278 - 286.
- Spilkova, J., & Hubik, J. (1988). Biological actions of flavonoids. (German). *Pharm Unserer Zeit*, 17: 1 - 9.
- Srivastava P., Sharma P. K., Dogra R. C. (1999). Inducers of nod genes of *Rhizobium ciceri*. *Microbiol Res*, 154: 49 - 55 .
- Stenlid G. (1976). Effects of flavonoids on the polar transport of auxins. *Plant Physiol*, 38: 262 - 266.
- Struckmann, J. R. (1999). Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction: an overview. *J Vasc Res* 36(suppl. 1), 37–41.
- Svirbely, J. L., Szent-Gyorgui A. (1945). The chemical nature of vitamin C. *Biochemistry Journal*, 26: 865 - 870.
- Sugimura, T., Nagao, M., Matsushimua, T., Yahagi, T., Seino, Y., Shira, S., Sawamura, M., Natori, S., Yoshihara, K., Fukuoka, M., & Kuroyanagi, M. (1977). Mutagenicity of flavone derivatives. *Proc Jpn Acad* 53, 58–61.
- Sutton, J.D., Bines, J.A., Morant, S.V., Napper, D.J., Givens, D.I., 1987. A comparison of starchy and fibrous concentrates for milk production, energy utilization and hay intake by Friesian cows. *J. Agric. Sci., Camb.* 109, 375–386.
- van Canegham P. (1972). Influence of some hydrosoluble substances with vitamin P activity on the fragility of lysosomes invitro. *Biochem Pharmacol*, 21: 1543 - 1548.
- Van Horn, H.H., Marshall, S.P., Wilcox, C.J., Randel, P.F., Wing, J.M., 1975. Complete rations for dairy cattle. III. Evaluation of protein percent and quality, and citrus pulp-corn substitutions. *J. Dairy Sci.* 58, 1101–1108.
- Vane J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231: 232 - 235.
- Vane J. R., Mitchell J. A., Appleton I., Tomlinson A., Bishop-Bailey D., Croxtall J., Willoughby D. A. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 2046 - 2050.
- Vasta V., Nudda A., Cannas A., Lanza M., Priolo A. (2008). Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 223 - 246.
- Vijchulata, P., Henry, P.R., Ammerman, C.B., Potter, S.G., Palmer, A.Z., Becker, H.N., 1980. Effect of dried citrus pulp and cage layer manure in combination with monensin on performance and tissue mineral composition in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 50, 1022–1030.

- Villalba J.J., Provenza F.D. and Han G., 2004. Experience influences diet mixing by herbivores: implications for plant biochemical diversity. *Oikos* 107, 100 - 109.
- Volanis, M., Zoiopoulos, P., Tzerakis, K., 2004. Effects of feeding ensiled sliced oranges to lactating dairy sheep. *Small Rumin. Res.* 53, 15–21.
- Volanis M., Zoiopoulos P., Panagou, Tzerakis C. (2006). Utilization of an ensiled citrus pulp mixture in the feeding of lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 64: 190 - 195.
- Wada, S., He, P., Watanabe, N., Sakata, K., & Sugiyama, K. (1999). Suppression of D-galactosamine-induced rat liver injury by glycosidic flavonoids-rich fraction from green tea. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63: 570 - 572.
- Watson D. G., Pitt A. R. (1998). Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12: 153 - 156.
- Watson D. G., Oliveira E. J. (1999). Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 723: 203 - 210.
- Wilson B. S., Deanin G. G., Oliver J. M. (1991). Regulation of IgE receptor-mediated secretion from RBL-2H3 mast cells by GTP binding proteins and calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, 174: 1064 - 1069.
- Wing, J.M., 1975. Effect of physical form and amount of citrus pulp on utilization of complete feeds for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 58, 63–66.
- Wing, J.M., Van Horn, H.H., Sklare, S.D., Harris Jr., B., 1988. Effects of citrus molasses, distillers solubles and molasses on rumen parameters and lactation. *J. Dairy Sci.* 71, 414–420.
- Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R., Jr., & Bokkenheuser, V. D. (1989). C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 55, 1203– 1208.
- White S.L., Bertrand J.A., Wade M.R., Washburn S.P., Green J.T. and Jenkins T.C., 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 84: 2295 - 2301
- Yamada M., Tanabe F., Arai N., Mitsuzumi H., Miwa Y., Kubota M., Chaen H., Kibata M. (2006). Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (6): 1386 - 1394.
- Zahringer U., Ebel J., Grisebach H. (1978). Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Elicitor-induced increase in enzyme activities of flavonoid biosynthesis and incorporation of mevalonate into glyceollin. *Archiv Biochem Biophys*, 188: 450 - 455.