

Προσδιορισμός του φυτοχημικού περιεχομένου και της βιοδραστικότητας των καρπών και προϊόντων (χυμοί) που παράγονται από το ρόδι (*Punica granatum*)



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΟΡΦΑΝΟΥΔΑΚΗ Ν. ΑΡΓΥΡΩ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ ΣΕΡΚΟ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α**

ΑΘΗΝΑ 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:
« Προσδιορισμός του φυτοχημικού περιεχομένου και της
βιοδραστικότητας των καρπών και προϊόντων (χυμοί) που
παράγονται από το ρόδι (*Punica granatum*)»

Αργυρώ Ν. Ορφανουδάκη

Επιβλέπων

Χαρουτουνιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α

Εξεταστική Επιτροπή

Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γεωργίου Κων/νος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Χαρουτουνιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθήνα 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία έλαβε χώρα κατά το χρονικό διάστημα 2010-2012 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Καταρχήν, τις πιο θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα **καθηγητή κ. Χαρουτουνιάν Σέρκο**, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλο το πέρασ της μελέτης αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Στάγκο Δημήτριο** για τους βιολογικούς προσδιορισμούς που μου προσέφερε πάνω στις βιοδραστικές μεθόδους που ασχολήθηκα.

Οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υποψήφια **Διδάκτορα Αποστόλου Άννα**, η οποία με αμέριστη θέληση και υπομονή συνέβαλλε στην άψογη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας για την άριστη συνεργασία μας και την βοήθεια τους και ιδιαίτερα την υποψήφια **Διδάκτορα Τζαννέτου Ευαγγελία** καθώς και τη **Δρ. Κουλοχέρη Σοφία** για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την άριστη συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους **γονείς μου** για την ενθάρρυνση, την καθοδήγηση, την ηθική και υλική υποστήριξη που μου προσέφεραν από την αρχή των σπουδών μου.

Σχεδιασμός και στόχοι της διατριβής

Ο καρπός της ροδιάς διαθέτει γνωστές από την αρχαιότητα ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες και αξιόλογη βιολογική δράση, με αποτέλεσμα να έχει αποτελέσει στόχο πολλών ερευνών που σχετίζονται με τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης και της αντιοξειδωτικής δράσης.

Αντικείμενο της διατριβής είναι η μελέτη της ποικιλίας Wonderful που ευδοκιμεί στην Ελλάδα ως προς το φυτοχημικό περιεχόμενο των φρέσκων καρπών, των χυμών τους και των υπολειμμάτων που παράγονται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας-χυμοποίησης τους. Στο πλαίσιο αυτό, η επεξεργασία των υπό μελέτη δειγμάτων έδωσε εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες εκχυλίσματα των οποίων προσδιορίστηκε το περιεχόμενο σε:

- ολικά φλαβονοειδή
- ολικά φαινολικά
- επιμέρους βιοδραστικές πολυφαινόλες [γαλλικό οξύ, επικατεχίνη, καφεϊκό οξύ, (+)-κατεχίνη, κερκετίνη, π-κουμαρικό οξύ, ρουτίνη (ρουτινοσίδης της κερκετίνης), *trans*-ρεσβερατρόλη, φερουλικό οξύ, φλοριζίν, πρωτοκατεχικό οξύ, ελλαγικό οξύ και χλωρογενικό οξύ].

Επιπλέον, αποτιμήθηκε η βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων με τη διενέργεια των παρακάτω προσδιορισμών:

- Αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους DPPH και ABTS
- Αντιμεταλλαξιογόνου δράσης έναντι των μεταλλάξεων που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (OH^\bullet) και (ROOH^\bullet) με τη μέθοδο DNA plasmid relaxation.

Από τα αποτελέσματα των οποίων συμπεραίνεται:

- Από τα μόρια που προσδιορίστηκαν, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκαν το ελλαγικό και π-κουμαρικό οξύ.
- Την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες διαθέτουν τα εκχυλίσματα των φλοιών του καρπού της ροδιάς.
- Τα εκχυλίσματα από τον φλοιό και η πούλπα που απορρίπτεται λίγο πριν την τελική παραλαβή του χυμού περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών.
- Όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν διαθέτουν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και με τις δύο μεθόδους (DPPH και ABTS), με δραστικότερα τα εκχυλίσματα των φλοιών.

- Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε για τις μεταλλάξεις που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (OH[•]) και (ROOH[•]) με τη μέθοδο DNA plasmid relaxation. Την ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση είχαν τα εκχυλίσματα των φλοιών.

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φλοιός των καρπών της ροδιάς είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε πολυφαινόλες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στάδια επεξεργασίας του ροδιού, είναι το στάδιο επεξεργασίας που ξεχωρίζει. Ιδιότητα που του προσδίδει σημαντικό ερευνητικό και οικονομικό ενδιαφέρον καθώς περιέχει αξιόλογες βιολογικές δράσεις.

SUMMARY

The fruit of pomegranate has been known for its beneficial for the health properties and for its significant biological activity, thus has been the target of numerous of investigations related to the determination of chemical composition and antioxidant activity.

The purpose of the current thesis is to study the Wonderful variety that is flourished in Greece regarding the phytochemical content of fresh fruit, juice and residue produced at various stages of processing- production of juice. In this context, the final extract, after processing, were found to obtain high concentrations of polyphenols which were estimated as:

- Total flavonoids
- Total phenolic
- Individual bioactive polyphenols [gallic acid, epicatechin, caffeic acid, (+)-catechin, quercetin, p-coumaric acid, rutin (quercetin rutinosis's), *trans*-resveratrol, ferulic acid, florizin, protocatechuic acid, chlorogenic acid and ellagic acid].

Furthermore, the bioactivity of extracts evaluated by performing the following determinations:

- Antioxidant capacity with DPPH and ABTS methods
- Antimutagenetic activity against mutations caused by free hydroxyl radicals (OH^\bullet) and (ROOH^\bullet) method via the DNA plasmid relaxation.

From the results of these assays it is concluded that:

- From all the compounds determined in the extracts, ellagic and p-coumaric acid were found to be at the highest concentrations.
- The highest content of total phenolic was observed in the extracts of the peel of the fruit of pomegranate.
- Extracts from the peel and the pulp (discarded just before the final delivery of the juice) contained the highest concentration of total flavonoids.
- All tested extracts strong antioxidant activity with both methods (DPPH and ABTS), with stronger the extracts of peel.
- The antimutagenetic action of the extracts was estimated for the mutations caused by free radicals (OH^\bullet) and (ROOH^\bullet) method via the DNA plasmid relaxation. The stronger antimutagenetic action was observed for the extracts of peel.

The experimental results showed that the peel of the pomegranate fruit is particularly rich in polyphenols compared to the other processing stages of the pomegranate, is the stage that stands out. Specifically, the study of the peel due to its valuable biological activities, shows important research and economic interest.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	1
1.2 Γενικά στοιχεία.....	2
1.3 Βοτανική ταξινόμηση-Οργανογραφία.....	3
1.3.1 Βοτανικοί χαρακτήρες του είδους <i>Punica granatum</i>	3
1.3.2 Τρόπος καρποφορίας.....	4
1.3.3 Περίοδος καρποφορίας.....	4
1.3.4 Επικονίαση και Γονιμοποίηση.....	4
1.3.5 Πολλαπλασιασμός.....	4
1.3.6 Ποικιλίες.....	4
1.4 Παραγωγή.....	5
1.5 Εμπορική διάσταση.....	7
1.6 Κόστος Εγκατάστασης.....	8
1.7 Τιμή και Απόδοση.....	9
1.8 Προοπτικές Καλλιέργειας.....	9
1.9 Χημική σύσταση ροδιού.....	10
1.10 Το ρόδι ως λειτουργικό τρόφιμο.....	11
1.11 Φαινολικά συστατικά.....	12
1.11.1 Ταννίνες.....	14
1.12 Βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων του ροδιού.....	16
1.13 Λειτουργικές ιδιότητες ροδιού.....	17
1.13.1 Καρδιαγγειακή υγεία.....	17
1.13.2 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.....	18
1.13.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες.....	19
1.13.4 Αντιδιαβητικές ιδιότητες.....	20
1.13.5 Βελτίωση της υγείας του δέρματος.....	20
1.13.6 Βελτίωση της στοματικής υγείας.....	21
1.13.7 Αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	22
1.13.8 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες.....	23
1.13.9 Διάφορες ιδιότητες του ροδιού.....	23

Κεφάλαιο 2. Οι πολυφαινόλες

2.1 Κατηγορίες και χημικοί τύποι.....	25
2.1.1 Απλές φαινόλες και φλαβονοειδή.....	26
2.1.2 Ταννίνες.....	28
2.2 Φυσιολογικές δράσεις.....	28
2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	29
2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	31
2.4 Μεταβολισμός πολυφαινολών.....	32

2.5 Ανεύρεση στη φύση.....	34
----------------------------	----

Κεφάλαιο 3. Τεχνικές και μέθοδοι

3.1 Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography).....	37
3.1.1. Γενικά.....	37
3.1.2 Ανάλυση των πολυφαινολών με HPLC (πρόσφατα δεδομένα).....	38
3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολών.....	39
3.3 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	40
3.4 Δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών.....	42
3.4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.....	43
3.4.1.1. Αρχή της μεθόδου.....	43
3.4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+.....	44
3.4.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	44
3.4.3 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.....	45
3.4.3.1 Γενικά.....	45
3.4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	46
3.4.5. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	48
3.4.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	48
3.4.6 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).....	49
3.4.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	49

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος

4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών.....	50
4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	50
4.1.2 Όργανα.....	50
4.1.3 Δείγματα που μελετήθηκαν.....	50
4.1.4 Πειραματική πορεία.....	53
4.2 Διαχωρισμός και απομόνωση των κυρίων κλασμάτων του εκχυλίσματος του ροδιού.....	54
4.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	54
4.2.2 Όργανα.....	54
4.2.3 Μέθοδος ανάλυσης HPLC.....	54
4.2.4 Προετοιμασία διαλυμάτων.....	55
4.2.5 Ανάλυση του εκχυλίσματος.....	55
4.2.6 Ανάλυση πρότυπων πολυφαινολών.....	56

4.2.7 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολών.....	57
4.2.8 Προσδιορισμός φαινολών.....	58
4.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου	59
4.3.1. Υλικά και αντιδραστήρια.....	59
4.3.2. Όργανα.....	59
4.3.3. Πειραματική πορεία.....	59
4.4 Προσδιορισμός συνόλου φλαβονοειδών.....	60
4.4.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	60
4.4.2 Όργανα.....	60
4.4.3 Πειραματική πορεία.....	61
4.5 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	62
4.5.1 Μέθοδοι.....	62
4.5.2 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	62
4.5.3 Υλικά.....	62
4.5.3.1 Πλασμιδιακό DNA.....	62
4.5.3.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	62
4.5.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.....	63
4.5.4.1 Πειραματική πορεία.....	63
4.5.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	64
4.5.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+.....	65
4.5.5.1 Πειραματική πορεία.....	65
4.5.5.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	66
4.5.6 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	67
4.5.6.1 Πειραματική διαδικασία.....	67
4.5.6.2 Στατιστική ανάλυση.....	68
4.5.7 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).....	69
4.5.7.1 Πειραματική πορεία.....	69
4.5.7.2 Στατιστικά ανάλυση.....	71

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

5.1 Ανάλυση HPLC.....	71
5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολών.....	75
5.3 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	76
5.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.....	77
5.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+.....	78

5.6 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	79
5.7 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).....	80

Κεφάλαιο 6. Συζήτηση

6.1 Σύγκριση ανάλυση HPLC.....	81
6.2 Σύγκριση μεθόδου ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών.....	82
6.3 Σύγκριση της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+.....	82
6.6 Σύγκριση της επαγόμενης από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	82
6.7 Σύγκριση της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).....	83

Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα.....

83

Κεφάλαιο 8. Βιβλιογραφία.....

85

Κεφάλαιο 9. Παραρτήματα.....

104

Συντομογραφίες

- **EA:**Ελλαγικό οξύ
- **ETs:**ελλαγοτανίνη
- **GTS:**γαλλοτανίνη
- **ORAC:** οξύ γλυκουρονίδιο (oxygen radical absorbance capacity)
- **ACE :**αγγειοτασίνη
- **PGE:** προσταγλαδίνη
- **DPPH:** *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*
- **ABTS:** *2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)*
- **ACE:** αγγειοτασίνη
- **COX-2:** cyclooxygenase-2
- **COX:** cyclooxygenase
- **COX-1:** cyclooxygenase-1
- **PTGES:** επιπέδων της προσταγλανδίνης E συνθάσης
- **Fe-NTA:** nitrilotriacetate
- **PP:** πολυφαινόλες

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Το ρόδι (*Punica granatum L.*) είναι ένας αρχαίος καρπός που καταναλώνεται διαχρονικά από ποικίλους πολιτισμούς για χιλιάδες χρόνια. Η χρήση του ροδιού χρονολογείται από τα βιβλικά έτη, ενώ οι αναφορές για τις θεραπευτικές του ιδιότητες χάνονται στα βάθη των χιλιετιών (Longtin 2003). Τα σπέρματα του ροδιού αντιπροσώπευαν για τους Βαβυλώνιους τη μετενσάρκωση και αναγέννηση. Για τους Πέρσες το αήττητο στη μάχη, ενώ για τους αρχαίους Κινέζους ήταν σύμβολα μακροζωίας και αθανασίας (Aviram et al. 2000).

Το ρόδι ανήκει στην οικογένεια των *Punicaceae*. Παρότι η καταγωγή του τοποθετείται στην ευρύτερη περιοχή της Περσίας και της βόρειας Ινδίας, καλλιεργείται συστηματικά από την αρχαιότητα στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου με αποτέλεσμα να έχει πλέον «πολιτογραφηθεί» ως φυτό της περιοχής αυτής (Meerts et al. 2009). Σήμερα, το ρόδι καλλιεργείται σε πολλές περιοχές της υψηλίου, με κυριότερες χώρες παραγωγής το Ιράν, την Ινδία, τις χώρες της Μεσογείου, τα ξηρότερα τμήματα της Νοτιοανατολικής Ασίας, τη Μαλαισία, τις Ανατολικές Ινδίες και την τροπική Αφρική. Σε μικρότερο βαθμό καλλιεργείται σε ξηρότερα μέρη των πολιτειών των ΗΠΑ στη Καλιφόρνια και την Αριζόνα. Επίσης καλλιεργείται στη Κίνα, την Ιαπωνία και τη Ρωσία (Fadavi et al. 2006).

Τα βρώσιμα μέρη του ροδιού καταναλώνονται νωπά ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φρέσκου χυμού, κονσερβοποιημένων ποτών, ζελέ, μαρμελάδας ή ως αρωματικά-χρωστικά στα ποτά (Fadavi et al. 2005; Mousavinejad et al. 2009). Παράλληλα, χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή φυτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, φυσικών καλλυντικών, ως καρύκευμα, ως πρόσθετο τροφίμων ή ως συμπλήρωμα διατροφής. Από την αρχαιότητα, το ρόδι έχει καθιερωθεί ως "θεραπευτική τροφή" με πολλές ευεργετικές επιδράσεις για τη θεραπεία ποικίλων δυσλειτουργιών του οργανισμού και ασθενειών (Vidal et al. 2003). Στο πλαίσιο αυτό, το ρόδι χρησιμοποιείται ευρύτατα στη λαϊκή ιατρική για την εξάλειψη ποικίλων εντερικών λοιμώξεων, διαφόρων τύπων έλκους, τη θεραπεία της άφθας, διάρροιας, δυσεντερίας, οξέωσης, αιμορραγίας, την καταπολέμηση των παρασίτων και ως αντισκωληκικό φάρμακο, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και ως αντιτυρετικό (Larrosa et al. 2010; Lee et al. 2010).

Τα τελευταία χρόνια ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων έχει αρχίσει να υιοθετεί ένα περισσότερο «υγιεινό» τρόπο ζωής ως μέσον πρόληψης ασθενειών που σχετίζονται με την αύξηση του προσδόκιμου χρόνου ζωής (καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, άνοια κλπ), με επακόλουθο να αυξηθεί η ζήτηση για διατροφικά προϊόντα, τα οποία εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, να έχουν και ευεργετική επίδραση στην υγεία (Viuda-Martos et al. 2010a). Η τάση αυτή ενισχύεται από μελέτες που δείχνουν ότι η συχνότητα εκδήλωσης των ασθενειών αυτών μειώνεται σημαντικά σε ομάδες ανθρώπων που διατρέφονται κυρίως με φρούτα και λαχανικά. Σήμερα, οι καταναλωτές (και η βιομηχανία τροφίμων) έχουν εστιάσει μεγάλο τμήμα του ενδιαφέροντός τους στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων λειτουργικών τροφίμων. Τα τρόφιμα της κατηγορίας αυτής εκτός από την κάλυψη βασικών διατροφικών

αναγκών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό στον τομέα πρόληψης των ασθενειών ή της επιβράδυνσης της προόδου των χρόνιων παθήσεων (Viuda-Martos et al. 2010b).

Παρότι έως σήμερα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ποια από τα συστατικά που εμπεριέχονται στα φυτικής προέλευσης τρόφιμα, ασκούν προστατευτικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, εντούτοις υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις/αποδείξεις που αποδίδουν έναν ουσιαστικό ρόλο στην πρόληψη των χρόνιων ασθενειών. Τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή των παραπάνω μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά και λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση μιας σειράς λειτουργικών αναγκών. Οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, στυλβένια, φαινολικά οξέα κλπ) αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία των βιοδραστικών μορίων αφού λόγω της σημαντικής αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι διαπιστωμένο ότι ασκούν μια σαφώς ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Άλλωστε είναι πλέον γνωστό ότι η ανεπαρκής πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών (π.χ. βιταμίνη E και C, καρροτενοειδή κλπ) οδηγεί στην οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA, με αποτέλεσμα την εκδήλωση πολλών χρόνιων παθήσεων και ασθενειών.

Έτσι, το ρόδι, ένας καρπός με τεκμηριωμένη θεραπευτική και θεραπευτική αξία εξαιτίας της πολυσχιδούς διατροφικής και θεραπευτικής του λειτουργίας, είναι ένα από τα φυτά εκ των οποίων μελετήθηκε το περιεχόμενο σε βιοδραστικά μόρια, γνωρίζοντας τεράστια ανάπτυξη και εφαρμογή (Martinez et al. 2006; Jaiswal et al. 2010).

1.2 Γενικά Στοιχεία

Η ροδιά (*Punica granatum L.*) καλλιεργείται κυρίως στις εύκρατες περιοχές, σε χαμηλό και υψηλό υψόμετρο. Είναι σχετικά ανθεκτική στο ψύχος, ενώ δεν απαιτεί ιδιαίτερες εδαφικές συνθήκες. Ωστόσο, οι μεγαλύτερες και ποιοτικότερες αποδόσεις της επιτυγχάνονται σε εδάφη πλούσια, βαθιά, με pH από 5.5 έως 7, με συχνή υγρή λίπανση. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ροδιάς ευδοκίμει σε όλες τις περιοχές που διαθέτουν μεσογειακό κλίμα, με πολύ μεγάλες δυνατότητες επέκτασης της καλλιέργειας σε ξηρές περιοχές με εδάφη υψηλής αλατότητας (Δρογούδη Π et al. 2007) .

Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα για την εμπορική καλλιέργεια της ροδιάς αποτελεί το σχίσμο των καρπών. Το φυσιολογικό αυτό φαινόμενο έχει πολλαπλά αίτια όπως η μεγάλη διακύμανση μεταξύ ημερήσιας και νυχτερινής θερμοκρασίας, η διακύμανση της εδαφικής υγρασίας, η καθυστέρηση της συγκομιδής, οι προσβολές από έντομα και οι ασθένειες καθώς και η έλλειψη βορίου στους νεαρούς καρπούς (Δρογούδη Π et al. 2007) .

1.3 Βοτανική ταξινόμηση-Οργανογραφία

Η ροδιά ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*, στο γένος *Punica* και στο είδος *Punica granatum L.*

Η ροδιά είναι διπλοειδής ($2n=16$, $n=8$).

1.3.1 Βοτανικοί χαρακτήρες του είδους *Punica granatum*

Το φυτό ροδιά είναι θάμνος ή μικρό δένδρο φυλλοβόλο. Τα φύλλα είναι αντίθετα, μικρά, λογχοειδή και γυαλιστερά. Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους, των οποίων η μακροσκοπική διάκριση είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Οι οφθαλμοί απαντούν πάντοτε πλάγια σε βλαστό ή σε λογχοειδή βλάστηση. Επάκρια, σε κανονική ή λογχοειδή βλάστηση, φέρει πάντοτε αγκάθι. Οι οφθαλμοί φέρονται μέχρι τη βάση του αγκαθιού, σε αντίθετη διάταξη, ανά δύο σε κάθε κόμβο (ξυλοφόροι ή μικτοί καρποφόροι, ή ο ένας ξυλοφόρος και ο άλλος μικτός καρποφόρος).

Τα άνθη (ένα έως αρκετά) φέρονται επάκρια της τρέχουσας βλάστησης (ένα επάκρια και τα άλλα ανά ένα πλάγια). Είναι μεγάλα, καμπανοειδή ή κυλινδρικά, κόκκινα ή και λευκοκίτρινα. Κάθε άνθος αποτελείται από πέντε ή περισσότερα σέπαλα, ισάριθμα πέταλα και από πολυάριθμους κόκκινους στήμονες, με κίτρινους ανθήρες. Η ωοθήκη είναι περίγυνη, πολύχωρη, με πολυάριθμες σπερματικές βλάστες σε κάθε χώρο. Ο στύλος είναι κιτρινοκόκκινος και περίπου 2.5 εκ. σε μήκος. Το στίγμα είναι σφαιρικό ή κολοβό και κιτρινοπράσινο. Τα άνθη βασικά είναι δύο τύπων: τα καρποφόρα (μεγάλα, μακρόστυλα, μακροστήμονα, έγχρωμα, με τους ανθήρες και το στίγμα στο ίδιο ύψος) και τα άγονα (μικρότερα, βραχύστυλα, βραχυστήμονα, με στίγμα πολύ χαμηλότερα από τους ανθήρες). Σποραδικά απαντούν άνθη ενδιάμεσου τύπου (άνθη με στύλους του ίδιου μήκους με τα μακρόστυλα ή τόσο βραχείς όσο στα βραχύστυλα). Τα άνθη με τους μακρούς στύλους συνήθως γονιμοποιούνται, αλλά σπάνια οι καρποί αυτοί φθάνουν στην ωρίμανση, παραμορφώνονται και γίνονται ελαττωματικοί. Αντίθετα, τα βραχύστυλα άνθη δεν γονιμοποιούνται και γρήγορα πέφτουν. Τα πέταλα αυτών είναι ωχρορόδινα και η γύρη είναι άγονη (Hodgson, 1917). Τα μακρόστυλα άνθη συνήθως σχηματίζονται σε παλιό ξύλο, ενώ τα βραχύστυλα σε νέα βλάστηση. Το σχετικό ποσοστό του καθενός επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Ο καλύτερος καρπός παράγεται από τα πρώιμα άνθη, πιθανόν γιατί αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια πιο ευνοϊκών μετεωρολογικών συνθηκών (Evreinoff, 1953).

Ο καρπός είναι ράγα, έχει μεγάλο μέγεθος και σχήμα σφαιρικό. Ο φλοιός είναι κοκκινοπράσινος ή βιολετί κατά την ωρίμανση. Ένας κανονικός καρπός περιέχει κατά μέσο όρο περίπου 667 σπόρους (Kihara, 1958). Κάθε σπέρμα περιβάλλεται από σάρκα ροδοκόκκινη ή λευκοκίτρινη, χυμώδη, γλυκιά ή υπόξινη, μερικές φορές ελαφρά στυφή.

1.3.2 Τρόπος καρποφορίας

Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται την άνοιξη (μέσα Μαρτίου έως μέσα Απριλίου) και δίνουν κανονική βλάστηση ή λογχοειδή βλάστηση, που φέρουν ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους οφθαλμούς. Οι μικτοί καρποφόροι εκπτύσσονται επίσης την άνοιξη (Μάιο) και δίνουν βραχεία βλάστηση (συνήθως άφυλλη) με άνθη επάκρια. Η λογχοειδής βλάστηση είτε φέρει επάκρια αγκάθι και πλάγια συνήθως δυο οφθαλμούς από τους οποίους ο ένας είναι συνήθως μικτός, είτε μόνον αγκάθι. Ήτοι καρποφορεί από μικτούς καρποφόρους οφθαλμούς, σε τρέχουσα βλάστηση, επάκρια.

1.3.3 Περίοδος καρποφορίας

Η ροδιά μπαίνει σε αξιόλογη καρποφορία από το 3^ο-4^ο χρόνο της ηλικίας της. Η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται από 40 έως 50 χρόνια.

1.3.4 Επικονίαση και Γονιμοποίηση

Οι ποικιλίες της ροδιάς είναι αυτογόνιμες και για αυτό δεν υπάρχει πρόβλημα επικονίασης στην καλλιέργεια του οπωροφόρου αυτού δένδρου. Τα άνθη της στερούνται νέκταρος και επομένως η μέλισσα φαίνεται να μην είναι αναγκαία για την αύξηση της παραγωγής. Αναφέρεται ότι τα έντομα των γένων *Cetonia* και *Trichodes* πιθανό να ευνοούν την επικονίαση και γονιμοποίηση των ανθέων της ροδιάς, ως γυρεοσυλλέκτες, καθώς τα επισκέπτονται (Knuth, 1908). Στις ΗΠΑ μερικοί παραγωγοί πιστεύουν ότι η μέλισσα ευνοεί την καρπόδεση της ροδιάς.

Ο Kihara (1958) αναφέρει την ύπαρξη άσπερμης ποικιλίας, της οποίας, ενώ η γύρη είναι στείρα (άγονη) ο καρπός αναπτύσσεται κανονικά. Είχε το ήμισυ περίπου (307) του κανονικού αριθμού των σπερμάτων, που στερούνταν ζωτικότητας, αλλά ο καρπός ήταν κανονικός.

1.3.5 Πολλαπλασιασμός

Η ροδιά πολλαπλασιάζεται εύκολα με ξυλοποιημένα χειμερινά μόσχευματα, παραφυάδες, φυλλοφόρα καλοκαιρινά μοσχεύματα και *in vitro*.

Πολλαπλασιάζεται όμως και με ενοφθαλμισμό με όρθιο T πάνω σε υποκείμενα σπορόφυτα (δε συνηθίζεται). Τα υποκείμενα σπορόφυτα παράγονται από σπέρματα (δεν αναπαράγεται πιστά η ποικιλία), που βλαστάνει πολύ εύκολα.

1.3.6 Ποικιλίες

Οι πλέον αξιόλογες ξενικές ποικιλίες της ροδιάς είναι η *Dolce Nostrana* (έντονο κόκκινο χρώμα, σπόροι γλυκείς, φλοιός λεπτός), *Dolce Alapia* (σπόροι γλυκείς, φλοιός λεπτός), *Dolce a Dente di Cavallo* (σπόροι επιμήκεις), *Amara verace* (υπόξινη, φλοιός ανοικτόχρωμος κόκκινος), *Wonderful* (θεωρείται μια από τις καλύτερες), *Ruby Red*, *Early Red* και *Granada*.

Οι Ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες έχουν προέλθει ως σπορόφυτα και

στο εμπόριο φέρονται με το όνομα του τόπου προέλευσης.

Wonderful- η ποικιλία που μελετήθηκε στη διατριβή

Η ποικιλία Wonderful κατάγεται από τη Φλόριντα των ΗΠΑ. Ο καρπός της είναι μεγάλος, με χρώμα βαθύ μωβ έως κόκκινο (Εικόνα 1.1). Ο φλοιός του καρπού έχει μέτριο πάχος και σάρκα με βαθύ κόκκινο χρώμα, η οποία είναι χυμώδης με θαυμάσια γεύση κρασιού. Τα σπερματά της δεν είναι σκληρά, ενώ οι καρποί προσφέρονται περισσότερο για την παρασκευή χυμών παρά για νωπή κατανάλωση. Το δένδρο είναι ζωηρό και παραγωγικό. Αποτελεί σπουδαία εμπορική ποικιλία της Καλιφόρνια.

Εικόνα 1.1 Άθος και καρπός της ποικιλίας Ροδιάς Wonderful

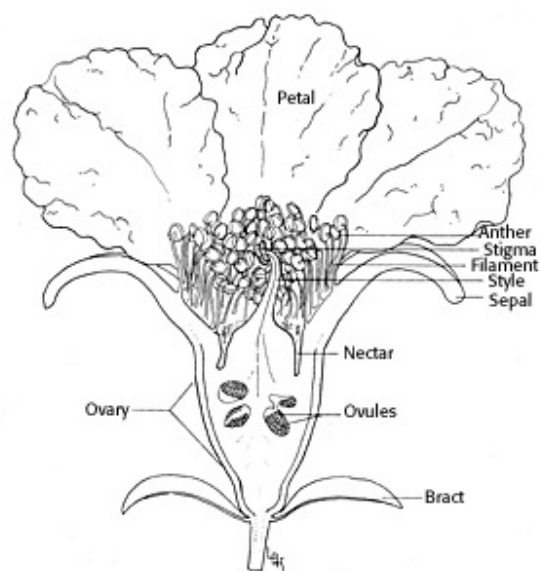


Figure 161. - Longitudinal section of 'Wonderful' Pomegranate flower, x2.



1.4 Παραγωγή

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται ετησίως στους 2.250.000 τόνους (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1. 1 Σημαντικότερες χώρες παραγωγής ροδιών

Χώρα	Παραγωγή (τόνοι)	Ποσοστό
Ινδία	1.200.000	53,33%
Ιράν	650.000	28,89%
Η.Π.Α	100.000	4,44%
Τουρκία	75.000	3,33%
Ισπανία	60.000	2,67%
Ισραήλ	20.000	0,89%

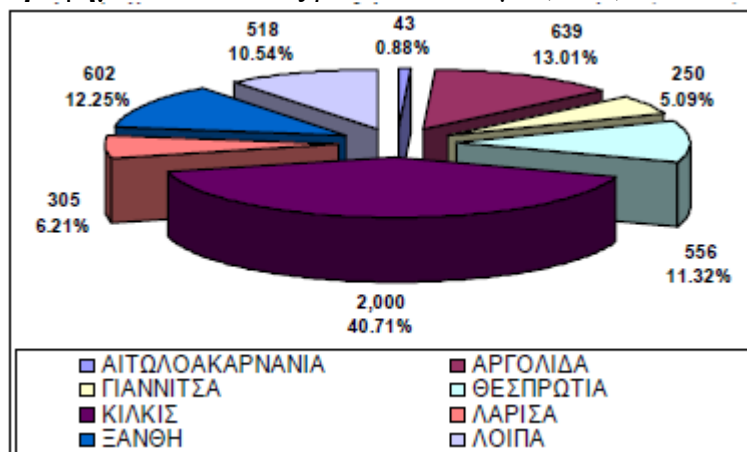
Λοιπές	145.000	6,44%
Σύνολο	2.250.000	

(Πηγή: <http://www.citrogold.co.za/Pomtechwebsite.pdf>)

Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία, φαίνεται ότι σε πολλές χώρες –με σημαντικότερο το Ισραήλ (Abelson J.2006) – οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά λόγω νέων φυτεύσεων. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ροδιάς είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια (Lionakis S. 1994). Σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (1989), μόνο το 10% του συνόλου των δέντρων βρίσκονταν σε οργανωμένους οπωρώνες ενώ η συνολική ετήσια παραγωγή, ανερχόταν σε 2.700 τόνους περίπου. Ωστόσο, τη δεκαετία του '90 μειώθηκαν σημαντικά τόσο οι εκτάσεις των κανονικών οπωρώνων όσο και η συνολική παραγωγή. Σήμερα, ο κύριος όγκος ροδιών στην Ελλάδα παράγεται στην περιοχή της Ερμιόνης (300-400 τόνοι), όπου η ροδιά αποτελεί παραδοσιακή καλλιέργεια.

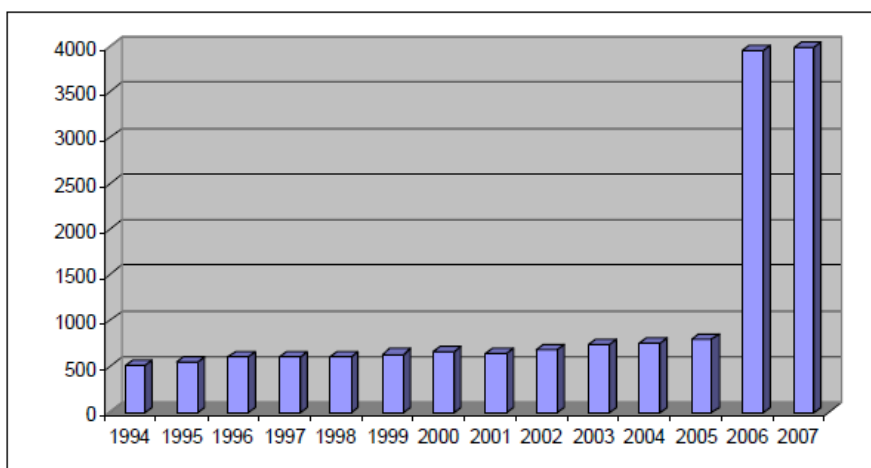
Τα τελευταία χρόνια, πολλοί παραγωγοί έχουν προβεί σε νέες φυτεύσεις δέντρων ροδιάς κυρίως της ποικιλίας Wonderful, στην Αργολίδα, την Ηλεία, τη Λακωνία, τα Γιαννιτσά, η Ξάνθη, τη Λάρισα και τα Φάρσαλα (Ορφανός, 2000; Φραγκούλη Ν, 2006). Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, τα τελευταία χρόνια, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις έχουν αυξηθεί τουλάχιστον κατά 3 χιλιάδες στρέμματα, φτάνοντας συνολικά τα 4.000 στρέμματα περίπου (Γραφήματα 1.1, 1.2).

Γράφημα 1.1 Εκτάσεις ροδιών ανά νομό (2006)



Πηγή: Υπ.Α.Α.τ.

Γράφημα 1.2 Συνολικές εκτάσεις ροδιών στην Ελλάδα (1994-2007)



(Πηγή: Υπ.Α.Α.Τ.)

1.5 Εμπορική διάσταση

Τα τελευταία χρόνια βρίσκεται σε εξέλιξη μεγάλη διαφημιστική καμπάνια στις Η.Π.Α. με στόχο την ενημέρωση των καταναλωτών για τις ευεργετικές ιδιότητες του ροδιού. Μετά το 2003 στην αγορά των Η.Π.Α. εμφανίστηκαν 961 νέα προϊόντα με βάση το ρόδι. Η διαφήμιση του προϊόντος οδήγησε στην κατακόρυφη αύξηση της ζήτησής του στις Η.Π.Α., ενώ ο απόηχος που έφτασε στην Ευρώπη τόνωσε σημαντικά τη ζήτησή του στις ευρωπαϊκές αγορές. Όμως οι προσφερόμενες ποσότητες ροδιών δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής πώλησης.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι το μεγαλύτερο βάρος της διαφημιστικής εκστρατείας είχε εστιαστεί στην ανάδειξη της θρεπτικής του αξίας, ενώ μετά το 2002 οι περισσότερες μελέτες στόχευσαν στις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητές του. Αυτές αποδίδονται κατά κύριο λόγο στην παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αντιοξειδωτικών ουσιών (τριπλάσια ποσότητα σε σχέση με το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι).

Για να καλυφθούν οι ανάγκες της ελληνικής αγοράς, εισάγονται ετησίως μεγάλες ποσότητες ροδιών (κυρίως από Τουρκία, Ιράν, Ινδία, Αίγυπτο και Ισραήλ). Σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία η ελληνική αγορά απορροφά 1.000-1.200 τόνους ροδιών ετησίως, εκ των οποίων οι 800 τόνοι εισάγονται. Οι εισαγόμενες ποσότητες αφορούν κυρίως ρόδια ξινών ή ημίξινων ποικιλιών που χαρακτηρίζονται από την πολύ καλή εξωτερική εμφάνιση. Επίσης, τα τελευταία χρόνια προωθούνται στην αγορά ολοένα και περισσότερα επώνυμα προϊόντα που περιέχουν ρόδι. Η ποικιλία των προϊόντων αυτών δεν περιορίζεται μόνο σε προϊόντα διατροφής (χυμοί, ποτά, αναψυκτικά, γιαούρτια, παγωτά, μαρμελάδες, καφές) αλλά περιλαμβάνει και καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής.

1.6 Κόστος Εγκατάστασης

Το κόστος εγκατάστασης μιας φυτείας ροδιού ανέρχεται περίπου στα 1330 €/στρέμμα, και περιλαμβάνει τις δαπάνες που πραγματοποιούνται κατά τα πρώτα τρία χρόνια, όσο διαρκεί η περίοδος εγκατάστασης της φυτείας (Πίνακας 1.2). Οι δαπάνες του πρώτου έτους αφορούν κατά κύριο λόγο την εγκατάσταση των δενδρυλλίων και του αρδευτικού συστήματος. Όσον αφορά τα απαιτούμενα εργατικά για το διάστημα αυτό, περιλαμβάνονται κυρίως η χάραξη του δέντρωνα, η φύτευση των δενδρυλλίων και η τοποθέτηση των καλαμιών υποστήριξης. Έτσι, η εργασία καταλαμβάνει ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικών δαπανών εγκατάστασης και οι επενδύσεις σε πάγια ανέρχονται στο 84% του συνολικά απαιτούμενου ποσού.

Το δε απαιτούμενο κεφάλαιο κίνησης για το διάστημα αυτό ισοδυναμεί με το κόστος του πετρελαίου, αφού κατά το πρώτο έτος δεν εφαρμόζονται λιπάνσεις και φυτοφάρμακα. Τέλος, το ενοίκιο εδάφους, υπολογίζεται με βάση το ενοίκιο της αρδευόμενης γης σε συγκεκριμένη περιοχή (πχ 30 €/στρέμμα). Στο δεύτερο έτος παρατηρείται μία μεγάλη μείωση των δαπανών καθώς οι μεγάλες δαπάνες εγκατάστασης (αγορά δενδρυλλίων και συστήματος άρδευσης) έχουν ήδη πραγματοποιηθεί, ενώ στο τρίτο και τελευταίο έτος εγκατάστασης, τα δέντρα μπαίνουν σε παραγωγή καλύπτοντας έτσι μικρό μέρος των δαπανών.

Πίνακας 1.2 Κόστος Εγκατάστασης Φυτείας Ροδιάς (€/στρέμμα)

Εργασία	1 ^ο Έτος	2 ^ο Έτος	3 ^ο Έτος	Σύνολο
	33	33	28	94
Μεταβλητό Κεφάλαιο	40	52	78	170
Σταθερό Κεφάλαιο	524	19	-	543
Αγορά Δενδρυλλίων	244			
Σύστημα άρδευσης	242			
Λοιπά	38			
Έδαφος	30	30	30	90
Τόκοι	20	33	47	100
Εκτιμώμενη Αξία Παραγωγής	0	0	145	145
Σύνολο	647	167	38	852
Δαπάνες σταθερού κεφαλαίου*				480
Σύνολο	807	327	198	1332

*Απόσβεση, ασφάλιση, συντήρηση και τόκοι κτιρίων και μηχανημάτων για 3 έτη

Το κόστος εγκατάστασης προέκυψε από επιτόπια έρευνα σε ομάδα παραγωγών ροδιών στην περιοχή του Κιλκίς.

1.7 Τιμή και Απόδοση

Η εμπορικά αξιοποιήσιμη παραγωγή στην υπό εξέταση περιοχή ξεκινάει το τρίτο έτος, με μέσο όρο αναμενόμενης απόδοσης να ανέρχεται στα 100 κιλά/στρέμμα περίπου. Όσον αφορά την τιμή διάθεσης των ροδιών, σύμφωνα με τις εκτιμήσεις των παραγωγών η τιμή πώλησης αναμένεται να κυμανθεί γύρω στο 1 €/κιλό. Επισημαίνεται ότι η εμπορική αξία του καρπού επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το μέγεθός του.

Έτσι, τα μεγαλύτερου μεγέθους ρόδια (>400 gr) πωλούνται ακριβότερα, ενώ τα πολύ μικρού μεγέθους έχουν πολύ μικρότερη εμπορική αξία. Επίσης, ο καρπός πρέπει να έχει έντονο κόκκινο χρώμα και καλά διαμορφωμένο στέμμα για να έχει αυξημένη εμπορική αξία (Blumenfeld A. et al.2000). Σύμφωνα με τους Δρογούδη και Τσιπουρίδη, ένας καλός οπωρώνας 8-10 ετών, αποδίδει 1,8-2,5 τόνους/στρέμμα εμπορεύσιμα ρόδια, ενώ η απόδοση ελαττώνεται βαθμιαία μετά το 25^ο-30^ο έτος.

1.8 Προοπτικές Καλλιέργειας

Θετικοί Παράγοντες

- Ελλειμματικό προϊόν στην ελληνική και διεθνή αγορά
- Στο επίκεντρο της προσοχής σε πολλές χώρες του κόσμου
- Πολλά νέα προϊόντα με βάση το ρόδι εμφανίζονται συνεχώς στη διεθνή και εγχώρια αγορά
- Πολλές εταιρίες που παράγουν προϊόντα με βάση τα ρόδια θα μπορούσαν να συνεργαστούν με Έλληνες παραγωγούς, αυξάνοντας έτσι την προστιθέμενη αξία των προϊόντων τους
- Οι Έλληνες καταναλωτές προτιμούν τα ντόπια προϊόντα από τα εισαγόμενα
- Οι καταναλωτές τείνουν να αγοράζουν προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας
- Η διεθνής βιομηχανία ζητάει όλο και περισσότερο προϊόν για να καλύψει τις ανάγκες της
- Οι κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη της καλλιέργειας

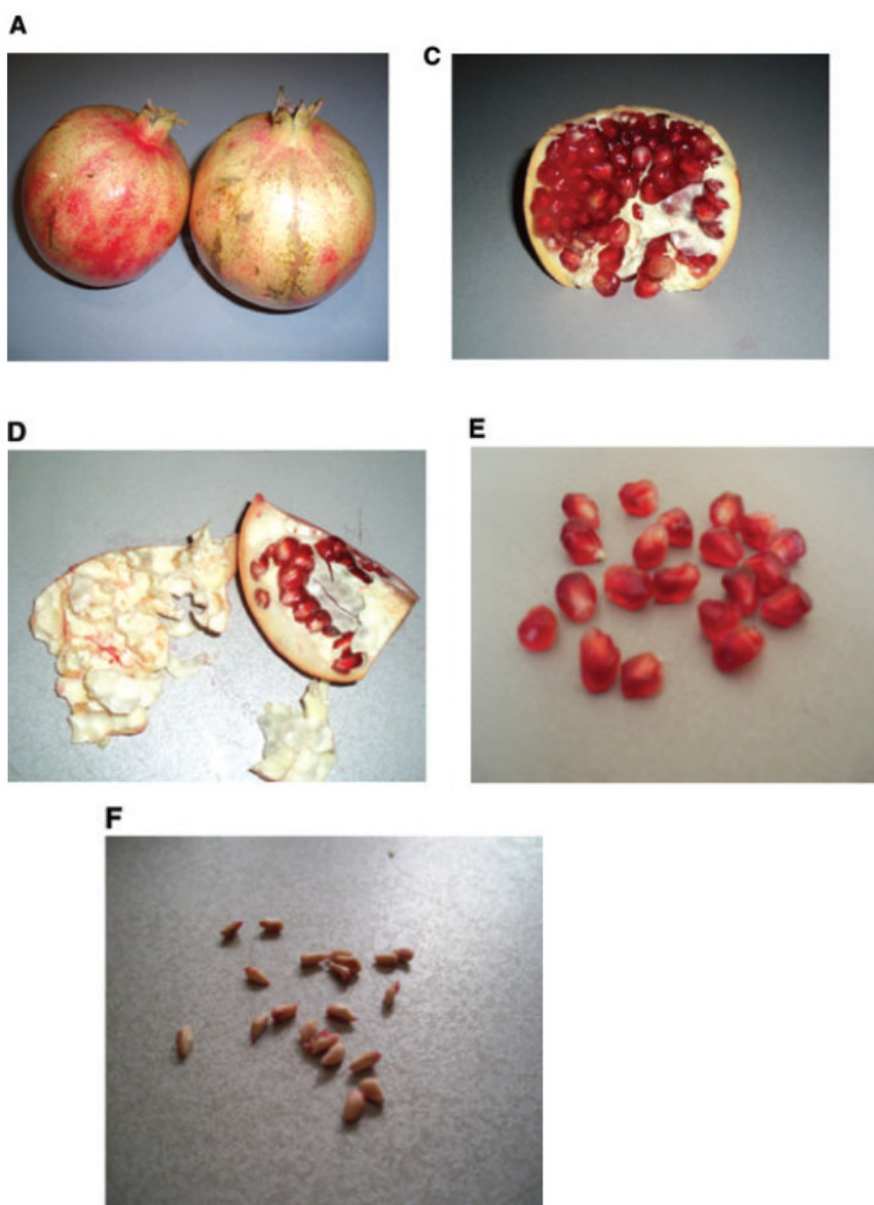
Αρνητικοί Παράγοντες

- Τα περιθώρια αύξησης της κατανάλωσης είναι σχετικά περιορισμένα και έτσι μία απότομη αύξηση της προσφοράς, μπορεί να οδηγήσει όχι μόνο σε κατακόρυφη πτώση της τιμής του αλλά και σε αδυναμία πώλησής του
- Η νωπή κατανάλωση παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες συγκριτικά με τα υπόλοιπα φρούτα
- Δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα για τις αποδόσεις των εισαγόμενων ποικιλιών στις ελληνικές εδαφοκλιματικές συνθήκες
- Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η δημοτικότητα των ροδιών θα ελαττωθεί με την ανακάλυψη της επόμενης 'σούπερ' τροφής (Abelson J, 2000).

1.9 Χημική σύσταση ροδιού

Το ρόδι ως καρπός (Εικόνα 1.2) έχει πολύτιμα συστατικά στα διάφορα μέρη του. Αυτά μπορούν να διαχωριστούν στα παρακάτω ανατομικά τμήματα: φλοιός (peel), σπέρματα (seeds) και επισπέρμια (arils). Ένα άλλο πολύ σημαντικό προϊόν που παράγεται από το ρόδι είναι ο χυμός, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τα επισπέρμια ή από ολόκληρο το καρπό.

Εικόνα 1.2: Διάφορα τμήματα ροδιού φρούτου **A:** καρπός ροδιού, **C:** τμήμα ροδιού, **D:** φλοιός ροδιού (peel), **E:** επισπέρμιο ροδιού (arils), **F:** σπέρματα ροδιού (seeds)



Η χημική σύσταση του καρπού (Εικόνα 1.2) διαφέρει και εξαρτάται από την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, το μικροκλίμα, την ωριμότητα συλλογής, τις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης (Poyrazoglu et al. 2002; Barzegar et al. 2004; Fadavi et al. 2005).

Σημαντικές διαφορές έχουν αναφερθεί στο περιεχόμενό τους σε οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά, σάκχαρα, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και μεταλλικά ιχνοστοιχεία ανάλογα με το έτος και τόπο παραγωγής (Aviram et al. 2000; Mirdehghan and Rahemi 2007; Çam et al. 2009; Davidson et al. 2009; Tezcan et al. 2009). Περίπου το 50% του βάρους του καρπού αντιστοιχεί στο φλοιό, ο οποίος αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή βιοδραστικών συστατικών όπως φαινολικών παραγώγων, φλαβονοειδών, ελλαγοταννινών (ETs) και προανθοκυανιδινών (Li et al. 2006), μεταλλικά στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, άζωτο, φώσφορο, μαγνήσιο και νάτριο (Mirdehghan and Rahemi 2007) και πολυσακχαριτών (Jahfar et al. 2003).

Το εδώδιμο τμήμα του ροδιού (50%) είναι κατά 40% το επισπέρμιο και 10% τα σπέρματα. Το επισπέρμιο περιέχει κατά 85% νερό, 10% σάκχαρα (κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη) και 1.5% πηκτίνες, οργανικά οξέα (πχ ασκορβικό, κιτρικό και μαλικό οξύ) και άλλα βιοδραστικά συστατικά όπως φαινολικά κυρίως ανθοκυαννίνες (Aviram et al. 2000; Tezcan et al. 2009).

Τα σπέρματα είναι πλούσια σε συνολικά λιπίδια, αφού στο ρόδι αποτελούν το 12% από το 20% του συνολικού βάρους των σπερμάτων. Τα λιπίδια αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα (n-3) λιπαρά οξέα, κυρίως λινολενικό και λινελαϊκό, πουνικό οξύ, ελαϊκό, στεατικό και παλμιτικό (Ozgul-Yucel 2005; Fadavi et al. 2006). Επίσης τα σπέρματα περιέχουν πρωτεΐνες, ακατέργαστες ίνες, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, πηκτίνες, σάκχαρα, πολυφαινόλες, κυρίως όμως τα φυτοοιστρογόνα γενιστεΐνη και κουμεστρόλη και το στεροειδές οιστρόνη (El-Nemr et al. 2006; Syed et al. 2007).

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ευεργετικές δράσεις στην υγεία που αναφέρονται στη πρόληψη νοσημάτων, προέρχονται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και οφείλουν τη δράση τους στο περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά συστατικά (Galaverna et al. 2008). Στο πλαίσιο αυτό το περιεχόμενο των καρπών του ροδιού σε βιοδραστικά συστατικά όπως πολυφαινόλες, οξέα, φλαβονοειδή και ταννίνες προσδιορίζει εν πολλοίς τη θρεπτική τους αξία (Aviram et al. 2000).

1.10 Το ρόδι ως λειτουργικό τρόφιμο

Δεν υπάρχει ένας και μοναδικός ορισμός της έννοιας του λειτουργικού τροφίμου (Palou et al. 2003). Παρότι ο όρος «λειτουργικό τρόφιμο» έχει καθοριστεί αρκετές φορές (Roberfroid 2002), δεν υπάρχει ακόμη ένας ενιαία αποδεκτός ορισμός για την ομάδα αυτή των τροφίμων (Alzamora et al. 2005). Στις περισσότερες χώρες δεν υπάρχει νομικός ορισμός του όρου, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός μεταξύ συμβατικών και λειτουργικών τροφίμων ακόμη και για τους εμπειρογνώμονες στα τρόφιμα (Niva 2007).

Αρκετοί ορισμοί εργασίας έχουν κατά καιρούς προταθεί από ποικίλες οργανώσεις σε διάφορες χώρες και χρησιμοποιούνται από επαγγελματικές ομάδες και εμπόρους. Στο πλαίσιο αυτό, λειτουργικά τρόφιμα θεωρούνται εκείνα που περιλαμβάνουν οποιοδήποτε τρόφιμο ή συστατικό τροφίμων που μπορεί να έχει οφέλη για την υγεία πέρα από τη βασική διατροφή (IFIC 2009).

Αντίστοιχα, σε μια πρόσφατη έκθεση του Ινστιτούτου Τεχνολόγων Τροφίμων

(IFT 2009) ως λειτουργικά ορίζονται τα «τρόφιμα που παρέχουν οφέλη για την υγεία πέρα από τη βασική διατροφή, παρέχοντας βασικές θρεπτικές ουσίες συχνά πέρα από τις ποσότητες που απαιτούνται για την κανονική συντήρηση-ανάπτυξη ή/και άλλα βιοδραστικά συστατικά που προσδίδουν οφέλη για την υγεία ή επιθυμητά φυσιολογικά αποτελέσματα». Η Συντονισμένη Δράση της ΕΕ για τα Λειτουργικά Τρόφιμα χαρακτηρίζει ένα τρόφιμο ως λειτουργικό όταν αποδεικνύεται σε ικανοποιητικό βαθμό ότι μπορεί να επηρεάσει ευεργετικά μία ή περισσότερες λειτουργίες-στόχους στο σώμα (πέρα από την επαρκή θρέψη) με έναν τρόπο που σχετίζεται είτε σε μια βελτιωμένη κατάσταση της υγείας και ευεξίας ή/και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Στο πλαίσιο αυτό, τα λειτουργικά τρόφιμα δεν κυκλοφορούν σε χάπια ή κάψουλες, αλλά θα πρέπει να παραμένουν τρόφιμα και η αποτελεσματικότητά τους να αποδεικνύεται σε ποσότητες που καταναλώνονται στη διατροφή (E.C. 1999). Αντιθέτως, στις Ηνωμένες Πολιτείες τα λειτουργικά τρόφιμα δεν αναγνωρίζονται επίσημα ως ρυθμιστική κατηγορία από το FDA.

Η έννοια των λειτουργικών τροφίμων είναι πολύπλοκη και μπορεί να αναφέρεται σε πολλές πιθανές πτυχές, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων που λαμβάνονται από οποιαδήποτε διαδικασία, των οποίων ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι ότι ένα ή περισσότερα από τα συστατικά τους έστω και αν δεν είναι το ίδιο το συστατικό που μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργία-στόχο του οργανισμού με έναν συγκεκριμένο και θετικό τρόπο, προωθώντας μια φυσιολογική ή ψυχολογική επίδραση πέρα από την απλή θρεπτική επίδραση (Viuda-Martos et al. 2010a). Η θετική επίδραση των λειτουργικών τροφίμων μπορεί να περιλαμβάνει τη διατήρηση της υγείας ή της ευεξίας ή και τη μείωση του κινδύνου από μια δεδομένη ασθένεια (Pérez -A'lvarez et al.2003).

Λειτουργικό τρόφιμο μπορεί να παραχθεί με τροποποίηση ενός ή περισσότερων συστατικών ή ακόμα και καταργώντας το ίδιο το συστατικό (Pérez -A'lvarez et al.2003). Για την ανάπτυξη αυτών των τύπων προϊόντων, πρέπει να αξιολογηθούν οι αντιλήψεις των καταναλωτών, οι πιο σημαντικές πτυχές για την επίτευξη ποιότητας ώστε να είναι καλή η γεύση, και τέλος να εμφανίζονται υγιεινά και να έχουν θρεπτική αξία (García-Segovia et al.2007). Επίσης, ο Pérez -A'lvarez το 2008, περιγράφει ότι οποιαδήποτε λειτουργικό τρόφιμο πρέπει να είναι ασφαλές, υγιεινό και νόστιμο.

Το ρόδι είναι σύμφωνο με τον παραπάνω ορισμό με διάφορους τρόπους, αν και η συγκρότηση της κάθε λειτουργίας του θα περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών του για να προσδιοριστούν οι ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία.

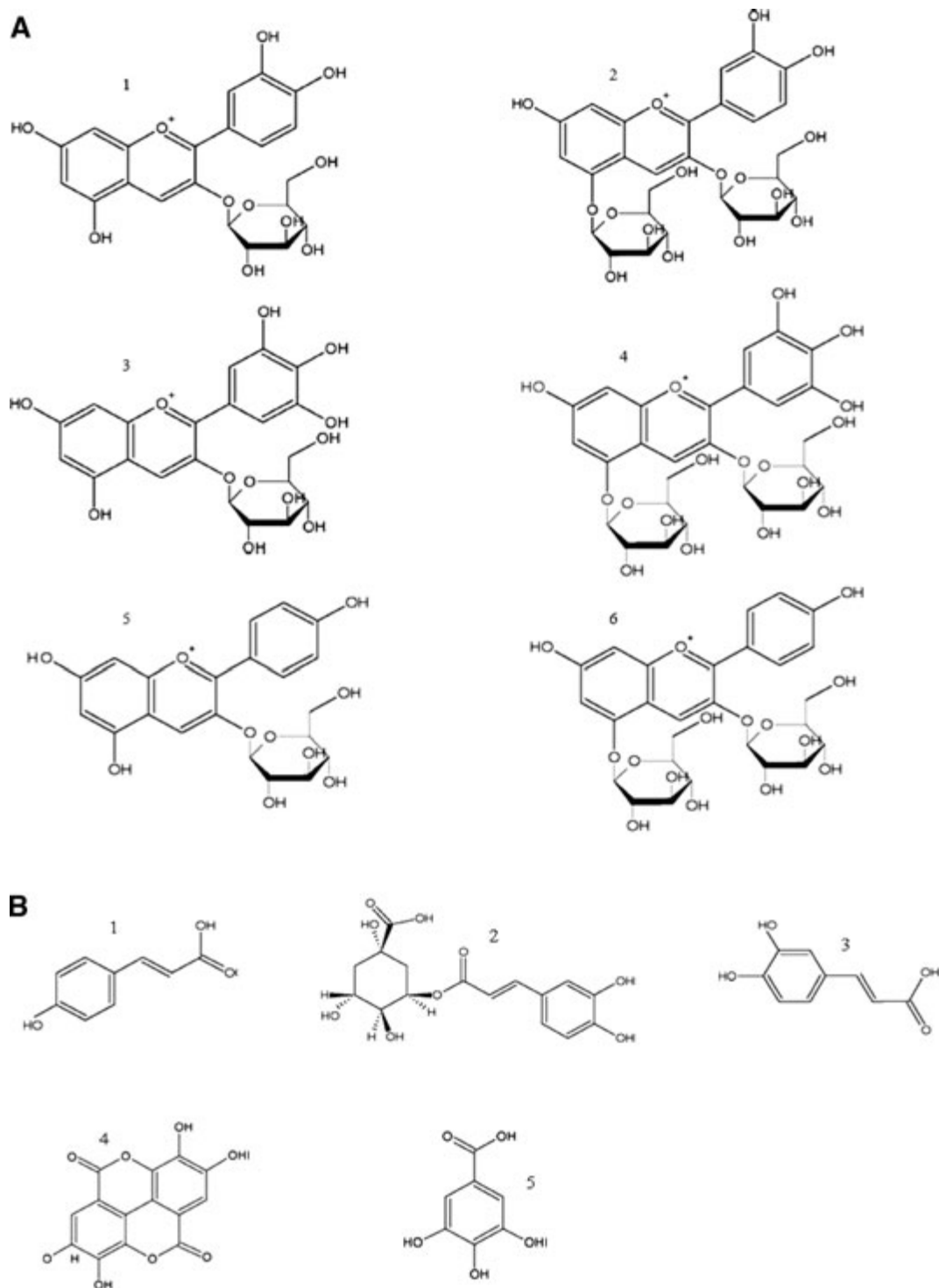
1.11 Φαινολικά συστατικά

Η κυριότερη κατηγορία μορίων που είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο τμήμα των λειτουργικών ιδιοτήτων του καρπού του ροδιού είναι οι φαινολικές ενώσεις σε οποιαδήποτε από τις μορφές τους (Viuda-Martos et al. 2010a). Οι φυσικές πολυφαινόλες περιλαμβάνουν είτε απλά μόρια (φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή, στυλβένια) ή/και τα πολυμερή τους (λιγνάνες, μελανίνες, ταννίνες), με πλέον διαδομένα τα φλαβονοειδή (Soobrattee et al. 2005).

Από χημική άποψη ως φαινολικά οξέα ορίζονται τα μόρια που διαθέτουν

έναν αρωματικό δακτύλιο δεσμευμένο σε έναν ή περισσότερους από τους υδρογονωμένους υποκατάστατες, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών τους παραγώγων (Marín et al. 2001). Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα, τοποθετημένα σε C₆-C₃-C₆ διαμόρφωση. Ουσιαστικά, η δομή τους αποτελείται από 2 αρωματικούς δακτυλίους που συνενώνονται με 3-άνθρακα γέφυρα, συνήθως με τη μορφή από ένα δακτυλίδι ετεροκυκλικών (Balasundram et al. 2006).

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών που υπάρχουν στα επισπέρμια του ροδιού, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χυμού. Αυτές οι χρωστικές ουσίες δίνουν στο καρπό και στο χυμό το κόκκινο χρώμα (AFAQ et al. 2005). Στο χυμό του ροδιού παρουσιάζεται μια μεγάλη ποικιλία ανθοκυανινών (Σχήμα 1.1), κυρίως κυανιδίνη-3-*O*-γλυκοζίτης, κυανιδίνη-3,5-δι-*O*-γλυκοζίτης, δελφινιδίνη-3-*O*-γλυκοζίτης, δελφινιδίνη-3,5-δι-*O*-γλυκοζίτης, πελαργονιδίνη-3-*O*-γλυκοζίτης και πελαργονιδίνη-3,5-δι-*O*-γλυκοζίτης (Lansky and Newman 2007; Jaiswal et al. 2010). Οι κύριες διαφορές μεταξύ τους είναι ο αριθμός των υδροξυλομένων ομάδων, η φύση και ο αριθμός των συνδεδεμένων σακχάρων με τη δομή τους, οι αλειφατικές ή αρωματικές καρβοξυλομάδες είναι συνδεδεμένες με το σάκχαρο στο μόριο, και η θέση αυτών των ομολόγων (Kong et al 2003). Τα φαινολικά οξέα που υπάρχουν στο χυμό του ροδιού (Σχήμα 1.2β) μπορούν να διαχωριστούν σε δυο ομάδες: (1) υδροξυβενζοϊκά οξέα, κυρίως γαλλικό οξύ και ελλαγικό οξύ (EA) (Amakura et al. 2000) και (2) υδροξυκινναμικά, κυρίως το καφεϊκό οξύ, γλωρογενικό οξύ, και π-κουμαρικό οξύ (Poyrazoglu et al 2002).



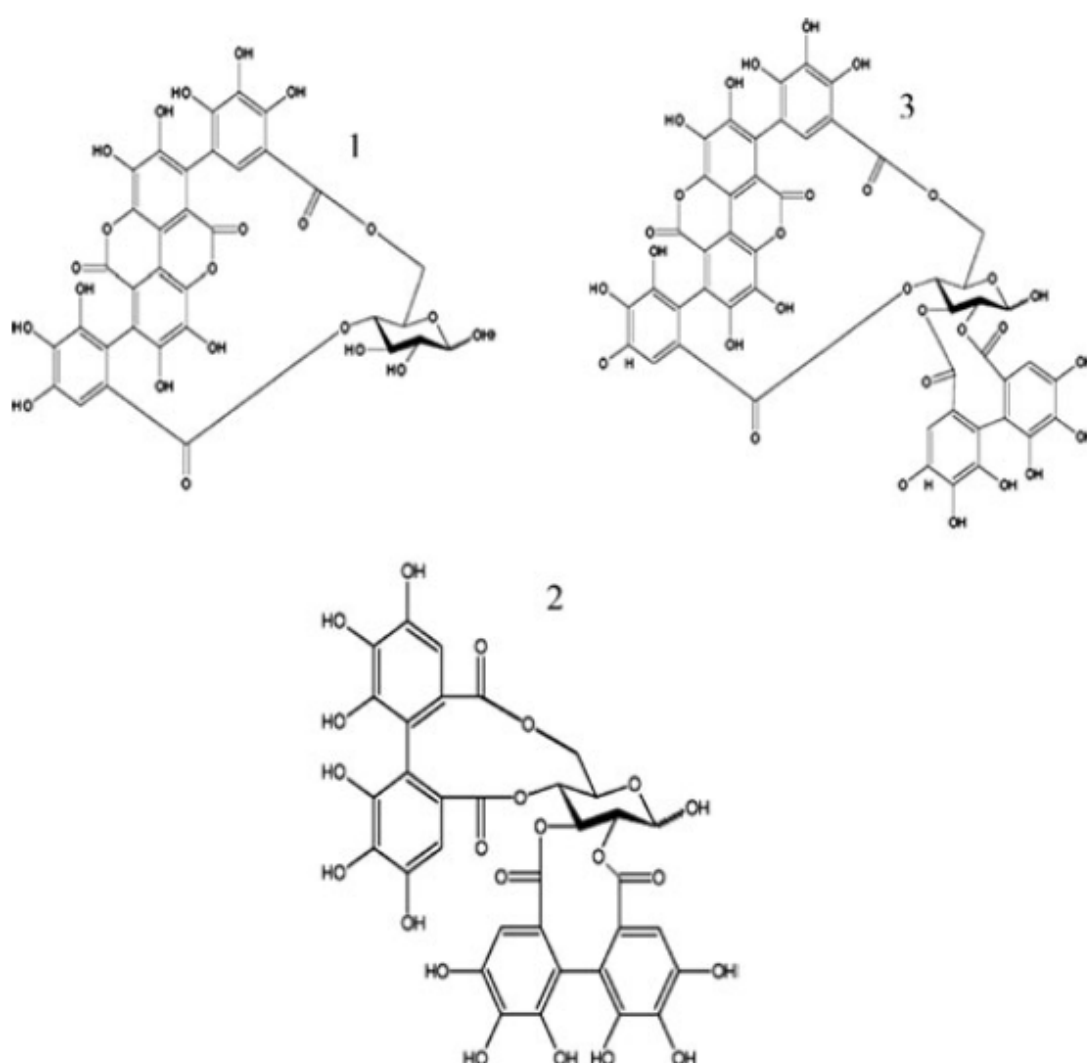
Σχήμα 1.1–(1A) Σημαντικότερες ανθοκυάνες όπου παρουσιάζονται στο χυμό του ροδιού 1: κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 2: κυανιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη, 3: δελφινίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 4: δελφινίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη, 5: πελαργονιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 6: πελαργονιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη.
 (2B) Σημαντικότερα φαινολικά οξέα όπου παρουσιάζονται στο χυμό του ροδιού: 1: π-κουμαρικό οξύ, 2: χλωρογενικό οξύ, 3: καφεϊκό οξύ, 4: ελλαγικό οξύ ΕΑ, 5: γαλλικό οξύ.

1.11.1 Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι υψηλού μοριακού βάρους πολυφαινόλες διαιρούνται σε 3 βιολογικές και χημικές διακριτές ομάδες: συμπυκνωμένες ταννίνες ή

προανθοκυανιδίνες (όπου βρίσκονται στο τσάι, τα σταφύλια, τα βατόμουρα, και ούτω καθεξής) και υδρολυόμενες ταννίνες ή ETs (όπου βρίσκονται στα σμέουρα, φράουλες, και ούτω καθεξής), καθώς και γαλλοταννίνες (GTS) (Seeram et al.2005a).

Ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε υδρολυόμενες ταννίνες (Σχήμα 1.2), κυρίως πουνικαλίνη, πεντουνκαλαγίνη και πουνικαλαγίνη (Seeram et al.2005b). Διαφέρουν από τις προανθοκυανιδίνες ως προς τη χημική τους δομή. Οι ETs είναι εστέρες από εξαϋδροξυδιφενικό οξύ και μια πολυόλη, συνήθως γλυκόζη ή κουινικό οξύ (Clifford and Scalbert 2000). Εκτός από ETs, ο φλοιός του ροδιού περιέχει υδροξυβενζοϊκά οξέα, όπως γαλλαγικό, ΕΑ, ΕΑ και γλυκοζίτες (Amakura et al.2000). Από τις ανθοκυανίνες είναι κυρίως η κυανιδίνη, η πελαργονιδίνη και η δελφινιδίνη (Noda et al.2002) και από τα φλαβονοειδή, η καμφερόλη, η λουτεολίνη και η κερκετίνη (Van Elswijk et al.2004).



Σχήμα 1.2: Οι σημαντικότερες ETs όπου παρουσιάζονται στο φλοιό του ροδιού. 1: πουνικαλίνη; 2: πεντουνκαλαγίνη; 3: πουνικαλαγίνη

1.12 Βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων του ροδιού

Παρά το γεγονός ότι τα στοιχεία υπέρ της χρήσης του ροδιού είναι πολύ ελπιδοφόρα, χρειάζονται εκτενείς μελέτες για να κατανοήσουμε πλήρως τη δυνατή συμβολή του για την ανθρώπινη υγεία πριν από τη σύσταση της τακτικής κατανάλωσης του (Syed et al.2007). Λίγα είναι γνωστά για την απορρόφηση, τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοκατανομή και το μεταβολισμό των κυρίων βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν στα ρόδια και σε άλλα φρούτα όπως π.χ. τα φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, ταννίνες, παρόλο που ίσως μοιράζονται κοινά μονοπάτια (Petti and Scully 2009).

Τα άγλυκα μέρη, δηλαδή, οι μη συζευγμένες μορφές γενικά απορροφώνται ανέπαφα από το πεπτικό σύστημα, ενώ οι εστέρες, γλυκοζίτες ή πολυμερή πρέπει να υδρολύονται προτού απορροφηθούν (Petti and Scully 2009). Μια μελέτη πέψης *in vitro* στο χυμό του ροδιού έδειξε ότι οι φαινολικές ενώσεις του ροδιού είναι διαθέσιμες κατά τη διάρκεια της σε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (29%). Παρ' όλα αυτά, λόγω του pH, οι ανθοκυάνες σε μεγάλο βαθμό μετατρέπονται σε μη-ερυθρές και / ή υποβαθμίζονται (97%), παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται για τη βιταμίνη C (Pèrez-Vicente et al.2002).

Οι μικροοργανισμοί του στόματος και του εντέρου είναι επίσης υπεύθυνοι για τις πολυφαινόλες και ταννίνες όπου υποβαθμίζονται σε άγλυκα μέρη και περιστασιακά για την παραγωγή των διαφόρων απλών αρωματικών οξέων (Petti and Scully.2009). Σε άλλη *in vivo* μελέτη, των Seeram και των συνεργατών του το 2004, κατά την οποία ένας άνθρωπος κατανάλωνε χυμό ροδιού (180 mL) που περιέχει EA (25 mg) και υδρολυόμενη ETs (318 mg, όπως punicalagins) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα EA επίπεδα ανιχνεύονται στο ανθρώπινο πλάσμα σε μέγιστη συγκέντρωση (31,9 ng / mL) μετά από 1 ώρα αλλά απομακρύνονται γρήγορα, μετά από 4 ώρες.

Οι Seeram και οι συνεργάτες του, το 2008a καθιέρωσαν την βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών από το εκχύλισμα του χυμού του ροδιού και σε υγρή μορφή και σε σκόνη. Έτσι, 16 υγιείς εθελοντές διαδοχικά κατανάλωναν με μια εβδομάδα διαλλείματος μεταξύ θεραπειών το χυμό του ροδιού (240 mL, Wonderful ποικιλία φρούτων), ένα υγρό πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού (240 mL), και ένα σε σκόνη πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού (1 g). Η τρίτη παρέμβαση, παρείχε 857, 776, και 755 mg πολυφαινολών και ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αντίστοιχα. Η βιοδιαθεσιμότητα του πλάσματος, κρίνεται από τα EA επίπεδα πάνω από την 6-ώρα, όπου δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην καμπύλη για την περιοχή κάτω από τη Τρίτη παρέμβαση: $0,14 \pm 0,05$, $0,11 \pm 0,03$ και $0,11 \pm 0,04$ $\mu\text{mol h} / \text{L}$ για το χυμό του ροδιού, το υγρό πολυφαινολικό εκχύλισμα και το εκχύλισμα πολυφαινολών σε σκόνη, αντίστοιχα. Ο χρόνος της μέγιστης συγκέντρωσης ήταν καθυστερημένος στην περίπτωση του εκχυλίσματος πολυφαινολών σε σκόνη ($2,58 \pm 0,42$ ώρες) συγκριτικά με χυμό ροδιού ($0,65 \pm 0,23$ ώρες) και του υγρού πολυφαινολικού εκχυλίσματος ($0,94 \pm 0,06$ h) (Seeram et al.2008a).

Οι Mertens-Talcott και η ομάδα τους το 2006, κατέδειξαν την απορροφητικότητα του EA από ρόδι υψηλής περιεκτικότητας σε περιεχόμενο ελλαγιταννίνης και των *ex vivo* συνεπειών των αντιοξειδωτικών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποίησαν μια μελέτη σε 11 υγιή άτομα. Κάθε άτομο έλαβε 2 κάψουλες όπου

περιέχονται 400 mg εκχύλισμα ροδιού. Το 800 mg εκχυλίσματος όπου χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιείχαν 330,4 mg από τις σημαντικότερες πουνικαλαγίνες ETs και 21,6 mg της ελλατικού οξέος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα EA από το εκχύλισμα είναι βιοδιαθέσιμα, με παρατηρηθείσα C_{max} από 33 ng / mL σε t_{max} από 1 ώρα.

Έτσι, βάσει των περιορισμένων ανθρωπίνων μελετών, φαίνεται ότι η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας του ροδιού σε πολυφαινόλες, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της ατομικής μεταβλητότητας, της διαφορετικής επεξεργασίας του χυμού του ροδιού και τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, όπου θα πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητες για την ανίχνευση των χαμηλών μεταγευματικών συγκεντρώσεων αυτών των μεταβολιτών (Basu and Penugonda 2009).

1.13 Λειτουργικές ιδιότητες ροδιού

Προς το παρόν, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για τις λειτουργικές ιδιότητες του ροδιού. Το «Science Direct», η βάση δεδομένων το 2010 αναφέρει 770 επιστημονικές εργασίες όπου αφορούν τις λειτουργικές ιδιότητες (αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, ή για την καταπολέμηση των αγγειακών παθήσεων, διαβήτη και καρκίνο) του ροδιού και των παραγώγων του όπως το χυμό, το έλαιο των σπερμάτων, το φλοιό και ούτω καθεξής. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να έχουν ισχυρότερη επιστημονική υποστήριξη.

Το ρόδι θα μπορούσε να θεωρηθεί ως λειτουργικό τρόφιμο επειδή έχει πολύτιμα συστατικά σε διάφορα μέρη του καρπού του που εμφανίζει λειτουργικά και φαρμακευτικά αποτελέσματα. Αυτά μπορεί να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Çam et al. 2009), ως αντικαρκινικοί (Hamad and Al-Momene 2009) ή ως αντιηπατοτοξικοί (Celik et al.2009) παράγοντες και να βελτιώσουν την καρδιαγγειακή υγεία (Davidson et al. 2009). Έχει αποδειχθεί ότι το ρόδι έχει αντιμικροβιακή (Duman et al.2009), αντιφλεγμονώδη (Lee et al.2010), αντι-ική (Haidari et al.2009), αντιδιαβητική (Xu et al. 2009) ιδιότητα και μπορεί να βελτιώσει την υγεία του στόματος (Di Silvestro et al.2009) και του δέρματος (Aslam et al. 2006).

Επίσης, το ρόδι μπορεί να προλάβει την άνοια-Alzheimer (Singh et al.2008) ,να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος (Türk et al. 2008) και να βοηθήσει στην στυτική δυσλειτουργία στους άντρες ασθενείς (Forest et al.2007). Ωστόσο, ελάχιστες καλά ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές έχουν ολοκληρωθεί και τα αποτελέσματα αυτά, δεν έχουν θεσπιστεί. Οι Lansky και Newman το 2007 αναφέρουν ότι βαθύτερη έρευνα σε αυτό το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο καλείται να εκτιμήσει τη συνολική αξία και την ασφάλεια του ροδιού ως ένα ανέπαφο καρπό ή των διαφόρων παραγώγων όπου προέρχονται από τα συστατικά του.

1.13.1 Καρδιαγγειακή υγεία

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της στεφανιαίας καρδιακής πάθησης είναι δυσλιπιδαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από τα αυξημένα επίπεδα της χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDLC)

και από τη μειωμένη-υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL-C) (Esmailzadeh and Azadbakht.2008). Η οξειδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνων (LDL) πιστεύεται ότι συντελεί στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο (Heinecke 2006).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των επιπέδων ολικής χοληστερόλης και της LDL-C αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Russo et al.2008) και θα μπορούσαν να παράγουν αθηροσκλήρωση. Η αθηροσκλήρωση, μια σημαντική εκφυλιστική ασθένεια των αρτηριών περιλαμβάνει μια σειρά από οξειδώσεις και τροποποιήσεις στις φλεγμονές εντός του αρτηριακού τοιχώματος (Fan and Watanabe 2003). Η υπερβολική οξειδωση στο αγγειακό σύστημα μειώνει τα επίπεδα του αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου, όπου μπορεί να προκαλέσει τραυματισμούς στους ιστούς, να προωθήσει την οξειδωση των πρωτεϊνών και τις βλάβες στο DNA και να επάγει τις προ-φλεγμονές (Xu and Touyz.2006). Το οξειδωτικό στρες προκαλεί φλεγμονή ενεργοποιώντας τα μονοπάτια όπου παράγονται οι μεσολαβητές των φλεγμονών όπως το μόριο της πρόσφυσης και των κυτταροκινών προ-φλεγμονών (Valko et al.2007).

Σε *in vitro* δοκιμές σε ζώα και ανθρώπους έχουν εξεταστεί οι επιπτώσεις των διαφόρων συστατικών του ροδιού για την πρόληψη και εξασθένιση της οξειδωσης της LDL και της αθηροσκλήρωσης (Aviram et al.2000; Fuhrman et al.2005; Ignarro et al.2006; Sezer et al.2007; Basu and Penugonda 2009; Davidson et al.2009; Fuhrman et al.2010).

Η υψηλή αρτηριακή πίεση ή υπέρταση είναι μια από τους πιο σημαντικούς και διαδεδομένους παράγοντες κινδύνου και η μεγαλύτερη ενιαία συμβολή για την καρδιαγγειακή νόσο σε όλο τον κόσμο (López et al. 2006). Ο Aviram και οι συνεργάτες του το 2004, ανέφεραν ότι μετά από κατανάλωση 1 έτους χυμό του ροδιού, η συστολική πίεση μειώθηκε κατά 21%, ένα αποτέλεσμα όπου οι ερευνητές το στηρίζουν στις ιδιαίτερα αντιοξειδωτικές ικανότητες των πολυφαινολών του ροδιού.

Σε παρόμοια μελέτη, ο Aviram και ο Dornfeld το 2001, εξέτασαν την επίδραση της κατανάλωσης του χυμού του ροδιού (50 mL, 1.5 mmol των ολικών πολυφαινολών ανά ημέρα, για 2 εβδομάδες) σε υπερτασικούς ανθρώπους για την αρτηριακή τους πίεση και τον ορό του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ACE) δραστηριότητας. Οι ερευνητές ανέφεραν 36% μείωση στον ορό δραστηριότητας ACE και τέλος παρατηρήθηκε μείωση κατά 5% στη συστολική αρτηριακή πίεση.

1.13.2 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Η φλεγμονή, είναι το πρώτο φυσιολογικό αμυντικό σύστημα του ανθρώπινου σώματος, που μπορεί να προστατεύσει από τραυματισμούς που προκαλούνται από φυσικές πληγές, δηλητήρια και ούτω καθεξής. Αυτό το αμυντικό σύστημα, ονομάζεται επίσης και βραχυπρόθεσμη φλεγμονή όπου μπορεί να καταστρέψει μολυσματικούς οργανισμούς, να εξαλείψει ερεθισμούς και να διατηρεί τις κανονικές, φυσιολογικές λειτουργίες, ωστόσο μακροχρόνιες και υπερβολικές φλεγμονές μπορούν να προκαλέσουν τέτοιες δυσλειτουργίες της κανονικής φυσιολογίας όπως

π.χ. άσθμα, ρευματική αρθρίτιδα (Lee et al.2010). Η διαδικασία της φλεγμονής ενεργοποιείται από διάφορες χημικές ή/και βιολογικές πτυχές όπου περιλαμβάνουν προ-φλεγμονώδων ένζυμα και κυτταροκίνες, χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις όπως εικοσανοειδών, ή την ενζυματική αποικοδόμηση των ιστών (Dao et al.2004).

Αρκετές μελέτες (Cho et al.2004) έχουν συνδέσει την cyclooxygenase-2 (COX-2) με την διαδικασία της φλεγμονής. Αυτό το ένζυμο είναι μια ισομορφή της cyclooxygenase (COX), η οποία είναι υπεύθυνη για την κατάλυση του αραχιδονικού οξέος με την προσταγλανδίνη. Η άλλη ισομορφή είναι cyclooxygenase-1 (COX-1), η οποία ρυθμίζει τις ομοιοστατικές διεργασίες (Dao et al.2004). Αρκετές μελέτες, έχουν επισημάνει τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των καρπών των ροδιών (Lansky και Newman 2007; Shukla et al.2008; Larrosa et al. 2010;Lee et al. 2010).

1.13.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Πολλά από τα μη θρεπτικά συστατικά των φρούτων και λαχανικών είναι γνωστό ότι έχουν δυναμική δραστηριότητα ως παράγοντες χημειοπραστασίας κατά του καρκίνου. Μεταξύ των μηχανισμών δράσης όπου προτείνονται για αυτά είναι οι ενώσεις (Tanaka and Sugie 2008): (1) η αναστολή των ενζύμων φάσης I ή της απόφραξης του σχηματισμού καρκινογόνων (2) η επαγωγή της φάσης II (αποτοξίνωσης) ενζύμων (3) οι σαρώσεις των DNA-αντιδρώντων (4) η διαφοροποίηση των ομοιοστατικών ορμονών (5) η καταστολή του υπερπολλαπλασιασμού των κυττάρων όπου προκαλούνται από καρκινογόνες ουσίες (6) η επαγωγή της απόπτωσης (7) η κατάθλιψη των όγκων αγγειογένεσης και (8) η αναστολή της φαινοτυπικής έκφρασης των προνεοπλασματικών και νεοπλασματικών κυττάρων.

Αρκετές μελέτες, έχουν διαξευχθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του καρπού του ροδιού και των παραγώγων του όπου είναι προικισμένο με μια πολύ υψηλή και αντιοξειδωτική δράση ως ανασταλτικός, αντιεπεμβατικός και προ-αποπτωτικός παράγοντας σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ζωικά μοντέλα (Afaq et al.2005; Lansky et al.2005a, 2005b; Lansky and Newman 2007; Syed et al.2007; Hong et al.2008; Hamad and Al-Momene 2009).

Ο Koyama και οι συνεργάτες του το 2010, ανέφεραν ότι η θεραπεία του καρκίνου του προστάτη LAPC4 των κυττάρων με 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματα ροδιού όπου παρασκευάζονται από το φλοιό και τα επισπέρμια εκτός των σπερμάτων με τυποποιημένο περιεχόμενο ελλαγιταννινών όπου περιέχονται 37% πουνικαλλαγίνες, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της απόπτωσης.

Έχει αποδειχθεί ότι το έλαιο των σπερμάτων του ροδιού και οι πολυφαινόλες που έχουν υποστεί ζύμωση καθυστερούν την οξειδωση και τη σύνθεση των προσταγλανδινών, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού και την εισβολή και προώθηση των καρκινικών κυττάρων απόπτωσης του μαστού. Σε μια μελέτη όπου ο Malik και η ομάδα του το 2005 διεξήγαγαν με τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη αξιολόγησαν τις αντιπολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος του καρπού του ροδιού.

Το εκχύλισμα του καρπού του ροδιού (10 σε 100 μg/mL; 48 ώρες) είναι ως θεραπεία είναι εξαιρετικά επιθετική για τα ανθρώπινα κύτταρα του προστάτη PC3 όπου οδήγησε σε μια δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την επαγωγή της απόπτωσης.

1.13.4 Αντιδιαβητικές ιδιότητες

Ο διαβήτης είναι η πιο συχνή νόσος μεταβολισμού στον κόσμο και εξακολουθεί να αυξάνεται. Η Διεθνής Ομοσπονδία του διαβήτη αναφέρει ότι 194 εκατομμύρια άνθρωποι είχαν διαβήτη το 2003, όπου μέχρι το 2025 θα αυξηθεί σε 333 εκατομμύρια (Sicree et al.2003). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, είναι η Τρίτη πιο διαδεδομένη ασθένεια μετά τις καρδιαγγειακές και ογκολογικές παθήσεις. Ένας από τους τρόπους για τον έλεγχο του σακχαρώδη διαβήτη είναι μέσω της διατροφής και εδώ το ρόδι και τα παράγωγα του μπορούν να παίξουν κάποιο ρόλο. Πράγματι, πολλές μελέτες έχουν περιγράψει τις αντιδιαβητικές ιδιότητες του (Huang et al.2005; Li et al.2005; Katz et al.2007; Parmar and Kar 2007; Li and et al.2008; Bagri et al.2009).

Ο Das και οι συνεργάτες του το 2001, ερεύνησαν την υπογλυκαιμική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων των σπερμάτων του ροδιού σε αρουραίους που ήταν διαβητικοί από στρεπτοζοτοκίνη. Το εκχύλισμα των σπερμάτων (300 και 600 mg/kg, από το στόμα) προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε διαβητικούς αρουραίους κατά 47% και 52% αντίστοιχα, μετά από 12 ώρες.

Τα κυριότερα συστατικά όπου παρουσιάζουν αντιδιαβητικές ιδιότητες είναι οι πολυφαινόλες, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν τη γλυκαιμία μέσω διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της απορρόφησης της γλυκόζης από το έντερο ή της πρόσληψης του από περιφερικούς ιστούς (Scalbert et al.2005). Οι υπογλυκαιμικές επιπτώσεις των διακετυλιωμένων ανθοκυαννινών σε δοσολογία 10 mg/kg διατροφής, όπου παρατηρήθηκαν όταν η μαλτόζη ήταν η πηγή της γλυκόζης αλλά όχι με σακχαρόζη ή γλυκόζη η ίδια (Matsui et al.2002). Αυτό υποδηλώνει, ότι οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στην αναστολή της α-γλυκοσιδάσης στο βλεννογόνο του εντέρου.

Αρκετές μελέτες *in vitro*, σε καλλιεργημένα κύτταρα, έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη γλυκόζης από περιφερικούς ιστούς, η οποία μειώνει τη γλυκόζη του αίματος (Scalbert et al.2005). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την αναστολή της γλυκογένεσης (Waltner-Law et al.2002), τη πρόσληψη της γλυκόζης των αδρενεργικών υποδοχέων (Cheng and Liu 2000) και τέλος την διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης όπου απελευθερώνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος (Ohno et al.1993).

1.13.5 Βελτίωση της υγείας του δέρματος

Οι βλάβες στο δέρμα εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της φυσικής διαδικασίας της γήρανσης και η ζημιά επιδεινώνεται σε χρονίως εκτεθειμένο δέρμα στον ήλιο (φωτογήρανση) (Lancker 1995). Η παρατεταμένη έκθεση σε υπεριώδης ακτινοβολία (UV) έχει εντοπιστεί ως αιτία των σοβαρών δυσμενών επιπτώσεων στο ανθρώπινο δέρμα όπως το οξειδωτικό στρες, η πρόωρη γήρανση του δέρματος, τα ηλιακά

εγκαύματα, η ανοσοκαταστολή και ο καρκίνος του δέρματος (Widmer et al.2006).

Ο Aslam και οι συνεργάτες του το 2006, αναφέρουν ότι το έλαιο των σπερμάτων του ροδιού αλλά όχι τα υδατικά εκχυλίσματα που έχουν υποστεί ζύμωση χυμός, φλοιός ή πάστα σπερμάτων έδειξαν να υποστηρίζουν το πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στο μονοστρωματικό πολιτισμό.

Αντίθετα, το εκχύλισμα από το φλοιό του ροδιού (και σε μικρότερο βαθμό, τόσο η ζύμωση του χυμού και τα εκχυλίσματα της πάστας σπερμάτων) τόνωσε τον τύπο σύνθεσης προκολλαγόνου I και ανέστειλε τη μήτρα μεταλλοπρωτεΐνης-1 (MMP-1;διάμεση κολλαγενάση) από την παραγωγή δέρματος ινοβλάστες, αλλά δεν είχε την υποστήριξη της ανάπτυξης-επίδρασης στα κερατινοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το υγρό εκχύλισμα ροδιού (κυρίως από το φλοιό του ροδιού) προωθεί την αναγέννηση του χορίου και το έλαιο των σπερμάτων, την προώθηση της αναγέννησης της επιδερμίδας.

Ο Syed και η ομάδα του το 2006, πρότειναν ότι το εκχύλισμα του ροδιού μπορεί να προστατεύσει από την UVA μεσολάβηση κυτταρική βλάβη που εμφανίζεται κυρίως μέσω της απελευθέρωσης αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και είναι υπεύθυνη για την ανοσοκαταστολή φωτοδερματοπάθειας με απόσπασμα της είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας για την απάμβλυνση UVA με τη μεσολάβηση από ζιμιές από τη διαμόρφωση κυτταρικών μονοπατιών και χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης.

1.13.6 Βελτίωση της στοματικής υγείας

Το ρόδι περιέχει παράγοντες, ιδίως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, τα οποία ασκούν δράσεις που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ότι ευνοούν την καλή στοματική υγεία κυρίως σε σχέση με την ανάπτυξη της ουλίτιδας (Di Silvestro et al.2009).

Ο Vasconcelos και οι συνεργάτες του το 2003, αναφέρουν ότι ένα τζελ όπου περιέχει εκχύλισμα ροδιού και εφαρμόζεται 3 φορές την ημέρα για 15 ημέρες ήταν αποτελεσματικό για ασθενείς που προσβάλλονται από καντινίαση που συνδέεται με τη στοματική οδοντοστοιχία. Το στοματικό ξέπλυμα με εκχύλισμα ροδιού μείωσε τις δραστηριότητες του σάλιου, για το ασπαρτικό οξύ, ενός δείκτη ζημίας κυττάρων όπου παρουσιάζει υψηλές τιμές με τη περιοδοντική νόσο (Nomura et al.2006).

Η παλαιότερη υπόθεση της άμεσης αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων είναι δυνητική και ισχύει για την εξήγηση της προληπτικής δράσης σε ασθενείς στη στοματική κοιλότητα, που οι πολυφαινόλες έρχονται σε άμεση επαφή με τους ιστούς πριν απορροφηθεί και μεταβολιστεί (Halliwell et al.2000) και δραστηριοποιούνται σε άγλυκα μέρη από τον άνθρωπο και βακτηριακά ένζυμα (Walle et al.2005).

Πράγματι, η βλεννογόνος του στόματος, που οι πολυφαινόλες φθάνουν σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους ιστούς εκτίθενται συνεχώς σε οξειδωτικό στρες από το περιβάλλον και τη διατροφή (Johnson 2004).

1.13.7 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η χρήση χημικών ή συνθετικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση (όπως αναστολείς, μειωτήρες ανάπτυξης, ή ακόμη και απενεργοποιητές) είναι μια από τις παλαιότερες τεχνικές για τον έλεγχο της ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η εφαρμογή των συντηρητικών στα τρόφιμα είναι θεμελιώδης, αν και θα πρέπει να διατηρείται η ασφάλεια τους (Viuda-Martos et al.2008). Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, είτε μικροβιακής, ζωικής ή φυτικής προέλευσης που δείχνουν βακτηριοστατική/μυκητοστατική ή βακτηριοκτόνο/μυκητοκτόνο δράση που επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και μεταξύ άλλων διώχνουν τις δυσάρεστες οσμές, δυσάρεστες γεύσεις, τα προβλήματα στην υφή ή τις αλλαγές στο χρώμα που οφείλονται κυρίως σε ενζυματικά ή μεταβολικά συστήματα των κυριότερων μικροοργανισμών που οδηγούν στην αλλοίωση των τροφίμων (Feng and Zheng 2007).

Η αντιμικροβιακή δράση του κοινών ποικιλιών του ροδιού έχουν μελετηθεί ευρέως, σε αρκετές *in vitro* μελέτες αποδεικνύοντας την βακτηριοκτόνο δράση του ενάντια σε πολλούς παθογόνους και μερικές φορές σε αντιβιοτικά-ανθεκτικά οργανισμών (Reddy et al.2007; McCarrell et al.2008; Al-Zoreky 2009; Choi et al.2009; Gould et al.2009).

Ο Braga και οι συνεργάτες του το 2005(a) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ροδιού μπορούν να εμποδίσουν ή να καθυστερήσουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και μετέπειτα τη παραγωγή της εντεροτοξίνης σε συγκέντρωση 0.01%, 0.05%, και 1% v/v. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος (0.01% v/v), καθυστέρησε την ανάπτυξη των βακτηρίων και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (1% v/v), η αύξηση είχε εξαλειφθεί. Σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 0.05% (v/v), η παραγωγή *Staphylococcus* εντεροτοξίνης αναστάληκε.

Επίσης, ο Prashanth και η ομάδα του το 2001, ανέφεραν ότι μεθανολικό εκχύλισμα φλοιών των καρπών του ροδιού είναι ενεργό έναντι *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, και *Salmonella typhi*. Το 2005, ο Voravuthikunchai και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι το χλωροφορμικό, το αιθανολικό και το υγρό εκχύλισμα του ροδιού έδειξαν υψηλή δράση εναντίων στελεχών της *E. coli* O157:H7 ιδίως όσων αφορά την αναστολή της *verocytotoxin*. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή είναι ακόμα ασαφής, αν και ενεργά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφική ή/και τα μεταγραφικά βήματα (Sakagami et al.2001).

Γενικά, οι αντιμικροβιακές ουσίες έχουν διαφορετική συγκέντρωση αναστολής ή κατώτατα όρια αδρανισμού. Τα όρια αυτά εξαρτώνται από τους ειδικούς στόχους αντιμικροβιακών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών τοιχωμάτων, κυτταρικής μεμβράνης, των μεταλλικών ενζύμων, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και των γενετικών συστημάτων (Raybaudi-Massilia et al. 2009). Ο ακριβής μηχανισμός ή στόχος για τα αντιμικροβιακά τρόφιμα συχνά δεν είναι γνωστός ή σαφώς καθορισμένος. Είναι δύσκολο να προσδιορίσει μια συγκεκριμένη ενέργεια, που η δράση της αλληλεπιδρά με πολλές άλλες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.

1.13.8 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η οξειδωτική επιδείνωση είναι ένας από τους κύριους ενόχους της μείωσης της ποιότητας και της αποδοχής των προϊόντων διατροφής. Αυτή η διαδικασία, κινείται από την έκθεση στο ένζυμο lipoxygenase, στη θερμότητα, ιονίζουσα ακτινοβολία, το φως, τα ιόντα μετάλλου και των καταλυτών μεταλλο-πρωτεΐνες (Daker et al.2008). Η οξείδωση οδηγεί σε σημαντική απώλεια της θρεπτικής αξίας ενός τροφίμου, δεδομένου ότι συνεπάγεται απώλεια βιταμινών και απαραίτητων λιπαρών οξέων. Επίσης, επηρεάζει τα αισθητήρια της ποιότητας του τροφίμου δηλαδή αλλαγές στο χρώμα, υφή, γεύση και μειώνει την διάρκεια ζωής του και μπορεί να οδηγήσει σε απόρριψη από τους καταναλωτές (Fernández-López et al.2007).

Η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού έχει γίνει αντικείμενο πολλών μελετών (Naveena et al.2008; Çam et al. 2009; Mousavinejad et al.2009; Tezcan et al.2009), οι περισσότεροι πραγματοποίησαν *in vitro* και *in vivo* έρευνες. Όλες αυτές οι δραστηριότητες μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικές φαινολικές ενώσεις όπου παρουσιάζονται στο ρόδι συμπεριλαμβανομένων των ισομερών πουνικαλλαγίνη, ΕΑ παραγώγων και ανθοκυανινών (δελφινίνη, κυανιδίνη και πελαργονίδινη 3- γλυκοζίτες και 3,5-διγλυκοζίτες). Αυτές είναι γνωστές ενώσεις για τις ιδιότητες τους να καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων *in vitro* (Gil et al.2000; Noda et al.2002).

Ωστόσο, ο Tzulker και οι συνεργάτες του το 2007, πρότειναν ότι η πουνικαλλαγίνη που προέρχεται από το φλοιό που είναι ένα από τα σημαντικότερα φυτοχημικά που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού του ροδιού ενώ οι ανθοκυανίνες παίζουν ελάχιστο ρόλο σε αυτή την δραστηριότητα.

1.13.9 Διάφορες ιδιότητες του ροδιού

Προκαταρκτικά ευρήματα της έρευνας υποδεικνύουν ότι πέρα από τα πιθανά οφέλη για την καρδιά, το διαβήτη, το δέρμα, τα δόντια, τον καρκίνο, το ρόδι μπορεί να παρέχει και ένα πλήθος ακόμα οφελών στον οργανισμό. Ωστόσο, πιο πειστικές μελέτες, απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτά τα αποτελέσματα γιατί υπάρχουν λίγα.

- **Αντι-ικές ιδιότητες**

Ο Haidari και οι συνεργάτες του το 2009, αξιολόγησαν 4 πολυφαινόλες σε εκχυλίσματα ροδιού ΕΑ, καφεϊκό οξύ, λουτεολίνη και πουνικαλλαγίνη γιατί αυτές οι ενώσεις μπλοκάρουν την αντιγραφή του RNA ιού, που παρεμποδίζεται η συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του RBC's του ιού και είχε ιοκτόνο αποτελέσματα.

- **Αντιδιαρροϊκά ιδιότητες**

Ο Pillai το 1992, ερεύνησε την αντιδιαρροϊκή δραστηριότητα του υγρού και με αλκοόλ εκχυλισμάτος των καρπών του ροδιού στο φλοιό σε 3 πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποίησαν λευκοπαθικών αρουραίων. Τα αποσπάσματα παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα σε αρουραίους, σε σύγκριση με υδροχλωρική λοπεραμίδη, ένα πρότυπο σε αντιδιαρροϊκά φάρμακα. Στη

μικροχλωρίδα του εντέρου. Η κατανάλωση προϊόντων ροδιού οδηγεί σε σημαντική συσσώρευση του ETs στο παχύ έντερο (Seeram et al.2006), που αυτά αλληλεπιδρούν με το συγκρότημα της μικροχλωρίδας του εντέρου.

- **Ποιότητα του σπέρματος**

Η κατανάλωση χυμού ροδιού οδήγησε σε αύξηση της επιδιδυμίδας της συγκέντρωσης του σπέρματος, της κινητικότητας του σπέρματος, της σπερματογένεσης, της πυκνότητας των κυττάρων και της διαμέτρου των σπερματικών σωληναρίων και της βλαστικής στοιβάδας κυττάρων πάχος, επίσης μειώθηκε και το ανώμαλο ποσοστό σπέρματος συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Türk et al.2008).

- **Στυτική δυσλειτουργία**

Ο Forest και η ομάδα του το 2007, διεξήγαγαν μια καλά ελεγχόμενη με χυμό ροδιού για τη θεραπεία από ήπια έως μέτρια στυτική δυσλειτουργία στους άντρες. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα άτομα που κατανάλωναν χυμό ροδιού είχαν περισσότερες πιθανότητες βελτίωσης. Η ελεγχόμενη, τυχαία με εικονικό, διπλή-τυφλή διασταυρούμενη δοκιμή συμμετείχαν 53 άνδρες με ήπια έως μέτρια ανικανότητα. Οι συμμετέχοντες κατανάλωναν τυφλά χυμό ροδιού ή εικονικό φάρμακο για 4εβδομάδες. Μετά από μια περίοδο 2 εβδομάδων μεταπήδησαν σε θεραπείες.

- **Παχυσαρκία**

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, προσφάτως υπάρχουν περισσότεροι από 1 δισεκατομμύριο υπέρβαροι ενήλικες, 300 εκατομμύρια από τα οποία είναι παχύσαρκα (Mackay και Mensah 2004).

Ο Cerdà και οι συνεργάτες του το 2003, ερεύνησαν τις επιδράσεις του εκχυλίσματος ροδιού (6% punicalagin) σε θηλυκά ποντίκια μετά από μια έκθεση σε μια δίαιτα που περιέχει το 20% του εκχυλίσματος για 37 μέρες. Η έκθεση στο εκχύλισμα ροδιού οδήγησε σε μια πρόσληψη των 480 mg punicalagin/kg/ημέρα. Μια σημαντική μείωση στην κατανάλωση τροφής και το σωματικό βάρος των ζώων κατά το πρώιμο μέρος της μελέτης παρατηρήθηκε.

- **Διασφάλιση της υγείας του ήπατος**

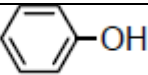

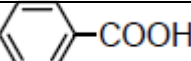
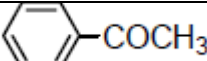
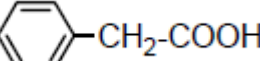
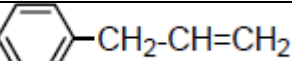
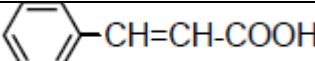
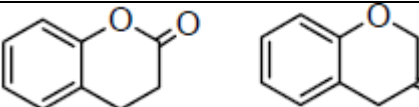
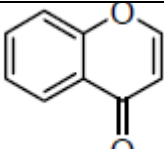
Ο Kaur και η ομάδα του το 2006, αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική και ηπατοπροστατευτική δραστηριότητα των λουλουδιών του ροδιού. Η αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος εξετάστηκε *in vivo* και βρέθηκε να παρουσιάζει ισχυρή προστατευτική δραστηριότητα σε οξεία οξειδωτική βλάβη των ιστών σε ζωικό μοντέλο: σίδηρος nitrilotriacetate(Fe-NTA) ηπατοτοξικότητα που προκαλείται σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το λουλούδι του ροδιού κατέχει ισχυρές και αντιοξειδωτικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες.

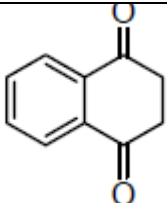
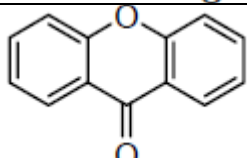
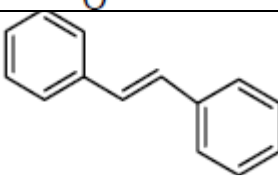
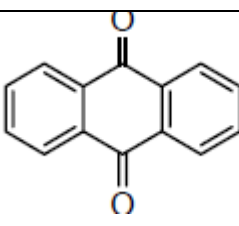
Κεφάλαιο 2. Οι πολυφαινόλες

2.1 Κατηγορίες και χημικοί τύποι

Αρκετά διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο είναι οι πολυφαινόλες (φαινολικές ενώσεις, PP) όπου ήδη περισσότερες από 8000 έχουν ταυτοποιηθεί (Harborne, 1993). Οι πολυφαινόλες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Με τον όρο “πολυφαινόλες” στη διεθνή βιβλιογραφία νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απευθείας με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες είναι απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα ή υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Βρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Μονοσακχαρίτης ή δισακχαρίτης ή ολιγοσακχαρίτης μπορεί να είναι το υδατανθρακικό τους τμήμα. Ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη και απαντώνται επίσης η γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, αραβινόζη καθώς και το γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Επίσης μπορούν οι PP να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

Τουλάχιστον σε 10 κατηγορίες διακρίνονται οι πολυφαινόλες ανάλογα με τη βασική τους χημική δομή (Harborne, 1989). Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες είναι αυτή των φλαβονοειδών (Σχήμα 2.1), η οποία διακρίνεται σε παραπάνω από 13 υποκατηγορίες διαθέτοντας επί συνόλου περισσότερα από 5000 μέλη. Στο (Σχήμα 2.1) παρατίθενται οι σημαντικότερες τάξεις πολυφαινοικών ενώσεων.

Απλές φαινόλες		Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, συριγγικό, Βανιλικό (αλδευδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνό στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοειδή		
(Υδροξυ)κιναμωμικά οξέα		Φερουλικό, καφεικό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		

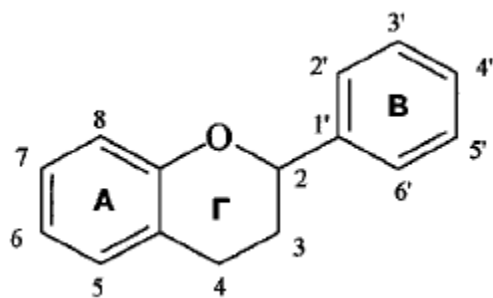
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στιλβένια		
Ανθρακινόνες		Εμοδίνη κ.α.
Φλαβονοειδή		
Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες		

Σχήμα 2.1: οι σημαντικότερες τάξεις πολυφαινολών

2.1.1 Απλές φαινόλες και φλαβονοειδή

Ευρέως διαδεδομένες στη φύση είναι οι απλές φαινόλες όπως η φαινόλη, η θυμόλη, η κρεσόλη, η ορκινόλη, η ρεζορκινόλη, η υδροκινόνη και διάφορα παράγωγα όπως η αρμπουτίνη και η σησαμόλη. Στα ανώτερα φυτά και φτέρες απαντούν τα φαινολικά παράγωγα όπως τα υδροβενζοϊκά ή φαινολικά οξέα (βανιλλικό, γαλλικό) και οι αλδεΐδες όπως η βανιλίνη. Στη φύση ανευρίσκονται ελεύθερες ή και με τη μορφή μεθυλό- και αίθυλο- εστέρων και γλυκοζιτών (Harborne. 1989). Τα φαινυλοπροπανοειδή και τα υδροξυκιναμμικά οξέα είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με σπουδαιότερους εκπροσώπους το *π*-κουμαρικό, το καφεϊκό και το σιναπικό καθώς και τα παράγωγα τους. Οι ξανθόνες αποτελούνται από 13 άτομα άνθρακα, οι ναφθοκινόνες από 10 άτομα άνθρακα και τα στιλβένια από 14 άτομα άνθρακα. Το κύριο συστατικό των λιγνινών είναι οι κινναμικές αλκοόλες όπως η σιναπική αλκοόλη ενώ οι χρωμόνες είναι λιγότερο γνωστές από τις κουμαρίνες, οι οποίες βρίσκονται υπό μορφή γλυκοζιτών (π.χ. σκοπολετίνη).

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, κατεχίνες (φλαβανόλες) και χαλκόνες. Στο (Σχήμα 2.2) φαίνεται η γενική δομή των φλαβονοειδών και η κατάταξη τους βάσει Harborne (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.2: Βασική δομή και αρίθμηση φλαβονοειδών

Φλαβονοδιόλες Χαλκόνες		
Ανθοκυανιδίνες Διυδροχάλκονες		Σημαντικά υδατοδιαλυτά πιγμέντα λουλουδιών πελαργονιδίνη, δελφινίνη, κ.α.
Χρυσόνες Ισοφλαβονοειδή		Γενιστεΐνη κ.α.
Φλαβόνες		Απιγενίνη, λουτεολίνη, διοσμιτίνη, Ο-γλυκοζίτες και C-γλυκοζίτες
Διφλαβονοειδή, Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες		
Φλαβονόλες		Κερκετίνη, μυρισετίνη Συνήθως ως Ο-γλυκοζίτες
Διυδρόφλαβονόλες		
Φλαβανόνες		Ναριγενίνη, εσπεριδίνη
Φλαβονόλες		

Σχήμα 2.3: Ταξινόμηση φλαβονοειδών τροφίμων

Τα φλαβονοειδή είναι σχετικά μικρού μοριακού βάρους, γενικά ευδιάλυτα ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (βαθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης κ.α.). Οι διαφορές των επιμέρους μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίσταται στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτύλιους Α και Β (Vinson, 1998) και στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3- υδροξυ ή 2-οξο ομάδων). Μεταξύ αυτών η φλαβόνη λουτεολίνη και η φλαβόνη κερκετίνη, είναι οι πιο κοινές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε πληθώρα φυτών στη φύση.

Οι φλαβονόλες συναντώνται ως *O*-γλυκοζίτες, ενώ οι *O*-γλυκοζίτες και οι *C*-γλυκοζίτες είναι πολύ κοινοί (Hermann, 1988). Ως *O*- αλλά και ως *C*-γλυκοζίτες απαντώνται φλαβανόνες όπως η εσπεριδίνη. Η πιο σημαντική ομάδα υδατοδιαλυτών φυτικών χρωστικών είναι οι ανθοκυανίνες (γλυκοζίτες ανθοκυανιδίων) όπως π.χ. η κυανιδίνη όπου είναι υπεύθυνες για το χρώμα των λουλουδιών και καρπών των ανωτέρων φυτών. Οι πολυμερείς χρωστικές που προκύπτουν με συμπύκνωση των ανθοκυανιδίων με διάφορα άλλα φλαβονοειδή δίνουν το χρώμα του κόκκινου κρασιού (Mazza, 1995).

2.1.2 Ταννίνες

Είναι ενώσεις μεσαίου έως χαμηλού μοριακού βάρους. Οι ταννίνες είναι υδροξυλιωμένα μόρια όπου είναι ικανά να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάθρακες και πρωτεΐνες. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα βασίζεται και η στυφή γεύση τροφών όπου είναι πλούσια σε ταννίνες, σχηματίζονται ιζήματα με πρωτεΐνες του σιέλου. Σε δύο κύριες ομάδες κατηγοριοποιούνται οι ταννίνες: τις υδρολυόμενες όπου περιέχουν γαλλικό οξύ και τις συμπυκνωμένες ταννίνες, πολυμερή των φλαβονοειδών.

- **Υδρολυόμενες ταννίνες:** Αποτελούνται από γαλλικό οξύ ή εξαϋδροξυδιφενικό οξύ εστεροποιημένο με μια πολυόλη όπου είναι κυρίως γλυκόζη (Porter, 1989). Δημιουργούνται πολυμερή με υψηλού μοριακού βάρους από την συμπύκνωση των μεταβολίτων αυτών. Η πιο γνωστή υδρολυόμενη ταννίνη είναι το ταννικό οξύ.
- **Συμπυκνωμένες ταννίνες:** Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Προκύπτουν από πολυμερισμό μιας φλαβαν-3-όλης (κατεχίνη, επικατεχίνη, κ.α.) με ένα μόριο φλαβαν-3,4-διόλης ή λευκοανθοκυανιδίνης. Η οξειδωτική συμπύκνωση πραγματοποιείται μεταξύ του άνθρακα C₄ του ετεροκυκλικού δακτυλίου και των ανθράκων C₆ ή C₈ των γειτονικών μονάδων (Porter, 1989). Αξιοσημείωτο, είναι ότι οι προανθοκυανιδίνες και οι υδρολυόμενες ταννίνες χαμηλού μοριακού βάρους είναι διαλυτές σε διάφορους διαλύτες (νερό και οργανικούς), ενώ οι υδρολυόμενες υψηλού μοριακού ταννίνες είναι αδιάλυτες. Τέλος, αδιάλυτες παραμένουν και οι ταννίνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος ή με πολυσακχαρίτες.

2.2 Φυσιολογικές δράσεις

Σε ένα σημαντικό ποσοστό οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις εξαρτάται η στυφή και πικρή γεύση

των τροφίμων και ποτών. Η ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων είναι αποτέλεσμα των οξειδωτικών μεταβολών όπως π.χ. η καφέ χρώση του κακάο κατά την επεξεργασία ή οξειδωτικός πολυμερισμός των πολυφαινολών κατά την παρασκευή μαύρου τσαγιού. Η ενζυμική αντίδραση καφέ χρώσης των φαινολικών ενώσεων (καταλυόμενη από την οξειδάση της πολυφαινόλης) και οι ενζυμικές αντιδράσεις καφέ χρώσης είναι υπεύθυνες για το ανεπιθύμητο χρώμα και γεύση σε φρούτα και λαχανικά (Ho et al, 1992).

Οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό αφού προσφέρουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνων (Hertog et al, 1995). Τέλος, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν και άλλες δράσεις, πολλές από τις οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία.

Οι κυριότερες δράσεις συνοψίζονται παρακάτω:

1. Επίδραση στην απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων

Παρεμποδίζουν τα ιόντα που συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών κυρίως από φλαβονοειδή που προκαλούν μείωση της απορρόφησης Fe, Cu, Zn, Na, Al υπό τη δημιουργία συμπλόκου

2. Επίδραση στη πέψη μακροθρεπτικών συστατικών

Κυρίως οι αρκετά πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων)

Το αποτέλεσμα αυτής της επίδρασης είναι ότι καθυστερείται η απορρόφηση

3. Προστασία των επιθυλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος

4. Ταννίνες (PP ελαιολάδου) μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα

5. Αντικαρκινική δράση (στο παχύ έντερο, απόπτωση καρκινικών κυττάρων)

6. Οι ταννίνες αυξάνουν τα επίπεδα HDL και μειώνουν τα επίπεδα LDL χοληστερόλης στο αίμα

7. Αντιαλλεργικές δράσεις (παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων)

8. Προστασία του DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές

9. Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση

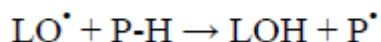
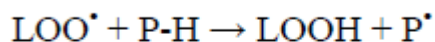
10. Αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO

11. Αντιοξειδωτική δράση

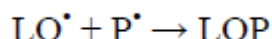
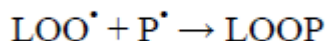
Προστασία της LDL χοληστερόλης από οξείδωση έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αποτιθέμενης χοληστερόλης στους ιστούς και στη συνέχεια τη μείωση του ρυθμού παραγωγής αθηρωματικής πλάκας, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιοπαθειών.

2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

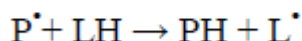
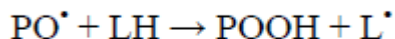
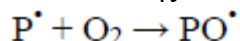
Η προστατευτική ιδιότητα των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές των αλυδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων, κυρίως όσων έχουν ορθο-διφαινολική, κατεχολική, σύνταξη στο μόριο τους. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (P-H) είναι άριστοι δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου σε ρίζες λιπιδίων (LOO·,LO·), όπως φαίνεται στο σχήμα (Shahidi and Wanasundara, 1992).



Οι φαινοξυ-ρίζες (P[•]) που σχηματίζονται είναι σχετικά σταθερές και δύσκολα επιτρέπουν την συνέχιση της αλυσωτής αντίδρασης. Η φαινοξυ-ρίζα σταθεροποιείται με διασπορά των ασύζευκτων ηλεκτρονίων μέσω συντονισμού (Shahidi and Wanasundara, 1992). Επιπρόσθετα, οι φαινοξυ-ρίζες μπορούν να τερματίζουν τις αλυσωτές αντιδράσεις αντιδρώντας με άλλες ρίζες:



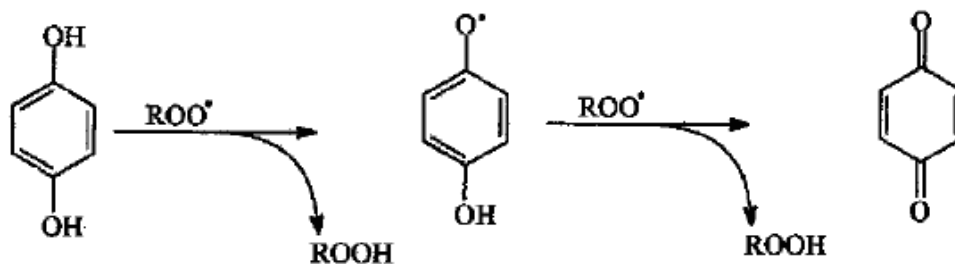
Επίσης, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά όσο πιο ασθενής είναι ο δεσμός P-H. Ενώ, η φαινόλη είναι αδρανές αντιοξειδωτικό, τα ορθο- και παρα- διφαινολικά παράγωγα έχουν την αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αυξάνει με την υποκατάσταση ατόμων H με αίθυλο- ή *n*-βουτυλο- ομάδες λόγω αύξησης της ηλεκτρονικής πυκνότητας του OH μέσω του επαγωγικού φαινομένου (Bravo, 1998). Η σταθερότητα της φαινοξυ-ρίζας αυξάνεται με την παρουσία μεγάλων ομάδων στην ορθο- θέση και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ταχύτητα των αντιδράσεων διάδοσης



Η εισαγωγή μιας δεύτερης υδροξυ- ομάδας στην ορθο- ή παρα- θέση μιας φαινόλης αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση της. Η δραστηριότητα ενός 1,2- διυδροξυ- βενζοϊκού παραγώγου αυξάνεται με την σταθερότητα της φαινοξυ-ρίζας μέσω ενός υδρογονικού δεσμού.

Η αντιοξειδωτική ιδιότητα διυδροξυβενζοϊκών παραγώγων αποδίδεται σε ένα βαθμό στο γεγονός ότι η αρχικά σχηματιζόμενη ρίζα ημικινόνης μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω προς κινόνη, αντιδρώντας με μια δεύτερη λιπιδική ρίζα όπως στο παρακάτω σχήμα (Shahidi and Wanasundara, 1992).

Σχήμα 2.4



Η ορθο- διφαινολική δομή ορισμένων φαινυλαλκοολών, φαινυλοξέων, και φλαβονοειδών τους προσδίδει αντίστοιχα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Servii et al, 1996). Παράδειγμα, η υδροξυτυροσόλη, μια ο-διφαινολική ένωση που θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό στο ελαιόλαδο (Deiana et al, 1999).

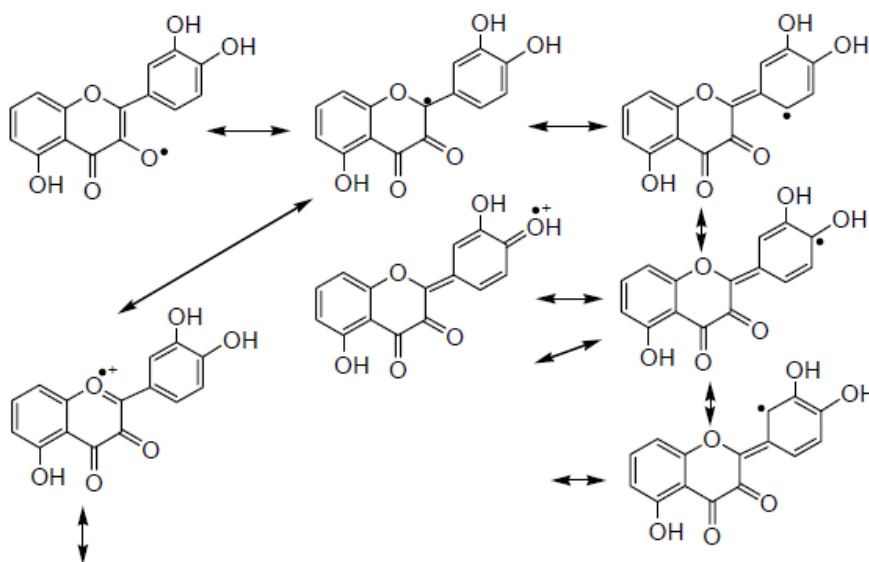
Τα φλαβονοειδή είναι από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά γιατί έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά στοιχεία:

- 2-3 συζυγιακό διπλό δεσμό με 4-οξο λειτουργική ομάδα
- Δομή όρθο-κατεχόλης (ορθο-διφαινολική ομάδα στο Β δακτύλιο)
- Ομάδες υδροξυλίου σε θέσεις 3,5 (Ratty and Das, 1988, Bors et al., 1990).

Η κερκετίνη λόγω αυτής της δομής αναμένεται να είναι πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό από την κατεχίνη ή άλλες φλαβονόλες. Στο (Σχήμα 2.5) φαίνονται κάποιες δομές συντονισμού που σταθεροποιούν την ρίζα των φλαβονοειδών.

Η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται από το βαθμό υδροξυλίωσης των φλαβονοειδών, η οποία μειώνεται από την παρουσία σακχάρου στο μόριο. Ενώ π.χ. κάποιιοι γλυκοζίτες δεν είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις, τα αντίστοιχα αγλυκά μέρη μπορεί να είναι (Ratty and Das, 1988). Σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι μη εκκυλιζόμενες πολυφαινόλες (πολυμερείς προανθοκυανιδίνες και υψηλού μοριακού βάρους υδρολυόμενες ταννίνες) είναι 15 έως 30 φορές ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τα διαλυτά φαινολικά συστατικά, στα οποία αποδίδεται παραδοσιακά η αντιοξειδωτική δράση. Π.χ. η αντιοξειδωτική δράση της κατεχίνης είναι διπλάσια από αυτή της βιταμίνης E (Rice and Evans, 1995).

Σχήμα 2.5 Μερικές δομές συντονισμού που σταθεροποιούν την ρίζα των φλαβονοειδών



2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Οι πολυφαινόλες εφόσον δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσω διαφορετικών μηχανισμών η αντιοξειδωτική τους δράση μπορεί να προσδιοριστεί μέσω διαφόρων τεχνικών που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές είναι:

- εκτίμηση της βλάβης πρωτεϊνών
- εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων (TBARS)
- εκτίμηση της βλάβης του DNA υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες
- δέσμευση ελευθέρων ριζών IO_2^{\cdot} , $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}$, $\text{ABTS}^{\cdot+}$, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*) |
- μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση), αντιοξειδωτικών (ουρικό οξύ κ.α.) και βιταμινών (E, C και β-καροτένιο)

2.4 Μεταβολισμός πολυφαινολών

Στην Δανία διεξήχθη μια μελέτη όπου αναφέρεται ότι η ημερήσια πρόσληψη φλαβονών, φλαβονολών και φλαβονονών ανέρχεται στα 28 mg, ενώ αντίστοιχες μελέτες για την πρόσληψη των υπολοίπων πολυφαινολών (Leth & Justesen 1998). Για την απορρόφηση των πολυφαινολών στο γαστρεντερικό σωλήνα, δεν γνωρίζουμε πολλά δηλαδή αν συγκρατούνται στον οργανισμό μετά την απορρόφηση και ποια η πλήρης βιολογική τους δράση.

Η απορρόφηση και ο μεταβολισμός των φαινολικών παραγώγων των τροφίμων επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες: ο βαθμός γλυκοζυλίωσης/ακυλίωσης, η βασική τους δομή (παράγωγα βενζολίου ή φλαβόνης), η διαλυτότητα, η σύζευξη με άλλα φαινολικά παράγωγα, , ο βαθμός πολυμερισμού και το μέγεθος του μορίου. Τα φαινολικά οξέα, τα ελεύθερα απλά φαινολικά συστατικά, τα φλαβονοειδή και τα άγλυκα μέρη απορροφώνται απευθείας από το βλενογόνο του λεπτού εντέρου (King et al, 1996).

Από τον πεπτικό σωλήνα επιμύων έχει δειχθεί ότι απορροφώνται τα ελεύθερα φαινολικά (κιναμικό οξύ και τα παράγωγα του όπως π.χ. π-κουμαρικό, καφεϊκό κ.α.). Αντιθέτως, οι γλυκοζίτες πρέπει να υδρολυθούν στα αντίστοιχα άγλυκα μέρη πριν την απορρόφηση. Θεωρείται ότι δεν πραγματοποιείται απορρόφηση στα θηλαστικά εξαιτίας της απουσίας από τις κατάλληλες β-γλυκοσιδάσες. Μόνο μερική απορρόφηση γλυκοζιτών κερκετίνης θεωρείται ότι πραγματοποιείται στο ανώτερο τμήμα του εντέρου, γεγονός που αποδίδεται στη δράση γλυκοσιδάσων από βακτήρια που αποικίζουν τον ειλεό (King et al, 1996, Hollman et al, 1996). Οι περισσότεροι γλυκοζίτες περνούν στο παχύ έντερο όπου υδρολύονται από την εντερική μικροχλωρίδα δίνοντας ελεύθερα άγλυκα μέρη (Griffiths and Barrow, 1972).

Στο έντερο τα άγλυκα μέρη απορροφώνται μέσω του εντερικού επιθηλίου, μεθυλιώνονται και σχηματίζουν ενώσεις είτε με γλυκουρονικό οξύ είτε μεθειικό άλας. Το κύριο όργανο όπου εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πολυφαινολών είναι το ήπαρ, ενώ η μεσολάβηση και άλλων οργάνων όπως ο νεφρός ή ο εντερικός βλενογόνο θεωρείται πιθανή, εφόσον και σε αυτά έχουν βρεθεί ένζυμα του μεταβολισμού των πολυφαινολών. Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες σε αρουραίους που τους χορηγήθηκαν κατεχίνη, φλαβονόλες (κερκετίνη, ρουτίνη, ισομεντίνη) και γενιστεΐνη, ανιχνεύτηκαν στο πλάσμα τους συζευγμένα και 3-O-μεθυλιωμένα παράγωγα. Οι παραπάνω μεταβολίτες εκκρίνονται στα ούρα ή στη χολή, αποδεσμεύονται με την δράση της εντερικής μικροχλωρίδας, εισέρχονται στην εντεροηπατική κυκλοφορία και επαναρροφώνται. Εναλλακτικά, μπορεί να μεταβολισθούν πλήρως και να μετατραπούν σε απλά φαινολικά οξέα μετά από

υδρόλυση των φλαβονικών δομών τους με βακτηρικά ένζυμα. Τα φαινολικά οξέα που σχηματίζονται ως προϊόντα διάσπασης όπως π.χ. τα ελεύθερα διαλυτά φαινολικά οξέα απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο και εκκρίνονται στα ούρα (Hollman, 1997).

Γενικά είναι ελάχιστα γνωστά για την ικανότητα πρόσληψης και παραμονής των φαινολικών συστατικών ή των συζυγών τους μορφών και των παραγώγων τους στον οργανισμό. Μελέτες σε πειραματόζωα που έγιναν για την απορρόφηση και μεταβολισμό των πολυφαινολών στο έντερο έδειξαν ότι με ^{14}C -σημασμένες φαινόλες δείχνουν ότι μερική απορρόφηση λαμβάνει χώρα. Έτσι, μόνο το 20% από την ^{14}C -κερκετίνη όποτε χορηγήθηκε σε αρουραίους απορροφήθηκε, το 30% εκκρίθηκε και το υπόλοιπο 50% μεταβολίσθηκε ως προς φαινολικό οξύ και CO_2 . Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί απορρόφηση 20% των ισοφλαβονών σόγιας σε αρουραίους, από την οποία 21% εκκρίνεται στα κόπρανα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των αγλυκόνων μερών και γλυκοζιτών (King et al, 1996).

Μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους, έχει δείξει ότι μόνο μερική απορρόφηση των πολυφαινολών. Η απορρόφηση της χορηγούμενης κερκετίνης μέσω του στόματος σε υγιή άτομα με ειλεοστομία έδειξε ότι κυμαίνεται σε 24% και 52% των χορηγηθέντων αγλυκόνων και γλυκοζιτών, αντίστοιχα. Σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της κερκετίνης σε πλάσμα αρουραίων δεν είχε σημαντικές διαφορές 16 ώρες μετά τη στιγμή όπου έφθασαν στο μέγιστο όριο συγκέντρωσης (Hollman et al, 1997). Επίσης, προτάθηκε ότι ο ρυθμός της αποβολής των μεταβολιτών της κερκετίνης ήταν σχετικά χαμηλός και ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα μπορούν εύκολα να διατηρηθούν με μια τακτική παροχή φλαβονοειδών στην διατροφή (Manach et al, 1995). Επίσης, σε μια παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε, βρέθηκε ότι μετά από τη λήψη μαύρου τσαγιού η συγκέντρωση ολικών κατεχινών στο αίμα ήταν $0,17\mu\text{mol/L}$ ενώ μετά από την πρόληψη πράσινου τσαγιού $0,55\mu\text{mol/L}$ (Van der Hof et al, 1998).

Τέλος, οι ερευνητές μελέτησαν την κινητική της απορρόφησης και της αποβολής των κατεχινών του τσαγιού και βρήκαν ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα επιτυγχάνονται 2 ώρες μετά από τη λήψη του τσαγιού και ότι ο χρόνος ημισείας αποβολής ποικίλει μεταξύ 4,8 και 6,9 ωρών για τις κατεχίνες του πράσινου και μαύρου τσαγιού αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είχαν μεγάλες διαφορές συγκριτικά με αυτά του Hollman και των συνεργατών του το 1996, οι οποίοι βρήκαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα της κερκετίνης ύστερα από την πρόληψη και ότι ο χρόνος ημισείας αποβολής ήταν 16,8 ώρες.

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό και στην έκταση της απορρόφησης και της αποβολής των διατροφικών πολυφαινολών, οι οποίες εξαρτώνται από την χημική τους δομή. Σε πιο πρόσφατες έρευνες φαίνεται ότι η υδροξυτυροσόλη απορροφάται στο έντερο (Manna et al, 2000), όπως και η ολεωρωπαΐνη σε πειράματα με αρουραίους (Edgecombe et al, 2000). Σχετικά, με την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη του ελαιολάδου, έχει προταθεί η αποβολή τους από τους νεφρούς σε αυτούσια μορφή ή με την μορφή των μεταβολιτών τους (Visioli et al, 2000). Σε αντίθεση με την προηγούμενη έρευνα, έχει προταθεί ότι μεγάλο μέρος των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου απορροφώνται από τον οργανισμό (Vissers et al, 2002) και σε *in vivo* πειραματική μελέτη σε αρουραίους, η υδροξυτυροσόλη σε διάλυμα ελαιολάδου είναι 99% βιοδιαθέσιμη, ενώ

σε υδατικό διάλυμα 75% και η τυροσόλη σε διάλυμα ελαιολάδου είναι 98% βιοδιαθέσιμη, ενώ σε υδατικό διάλυμα 71% (Tuck et al, 2001).

Τέλος, σαν συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι ο μεταβολισμός και η απορρόφηση των πολυφαινόλων εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- Χημική δομή (επηρεάζεται από τον βαθμό γλυκοζυλίωσης/ακυλίωσης)
- Σύζευξη με άλλες ΡΡ
- ΜΒ
- Βαθμό πολυμερισμού
- Διαλυτότητα
- Βασική δομή (βενζοϊκός ή φλαβονοειδικός πυρήνας)

2.5 Ανεύρεση στη φύση

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες σε στα εδώδιμα φυτά (λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, ξηρούς καρπούς κ.α.) και ποτά (κρασί, μπύρα, τσάι, κακάο κ.α.). Διαφορές στη συγκέντρωση πολυφαινόλων υπάρχουν, ακόμα και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους, καθώς και η παρουσία των πολυφαινόλων στα φυτά επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες: α) γενετικοί β) τη βλάστηση γ) το βαθμός ωρίμανσης δ) τη ποικιλία ε) την επεξεργασία και ζ) την αποθήκευση (Hermann, 1988, Porter, 1989, Mazza, 1995).

Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετά ευρέα όρια. Οι κυριότερες πολυφαινόλες στα όσπρια και δημητριακά είναι τα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ταννίνες. Η περιεκτικότητα των πολυφαινόλων στα δημητριακά είναι συνήθως λιγότερη από το 1% της ξηρής ουσίας. Στα όσπρια, υψηλότερη περιεκτικότητα πολυφαινόλων διακρίνεται στις πιο σκούρες ποικιλίες όπως π.χ. τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*). Τα λαχανικά περιέχουν κυρίως φλαβονοειδείς γλυκοζίτες ενώ στα περισσότερα όσπρια βρίσκουμε τις ισοφλαβόνες όπως π.χ. τη γενιστεΐνη. Σε αντίθεση με τα παραπάνω στοιχεία, δεν συναντάμε σημαντική συγκέντρωση φλαβονοειδών σε ρίζες και βολβούς εκτός από τα κρεμμύδια και την γλυκόριζα. Επιπρόσθετα, φρούτα όπως μήλα και εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, αντίστοιχα, ενώ φλαβανόνες είναι άφθονες σε εσπεριδοειδή (εσπεριδίνη) και δαμάσκηνα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι φλαβανόλη και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στο φλοιό (Kühnau, 1976).

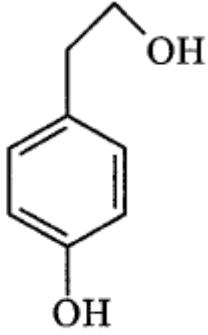
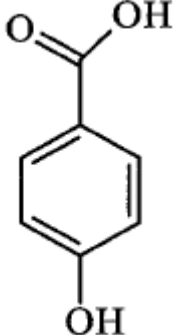
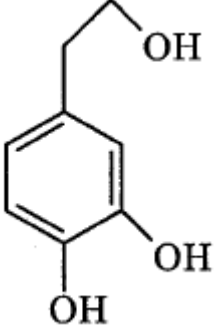
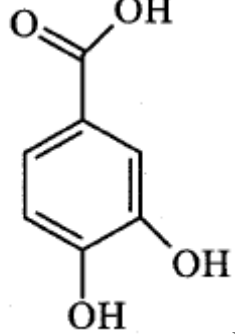
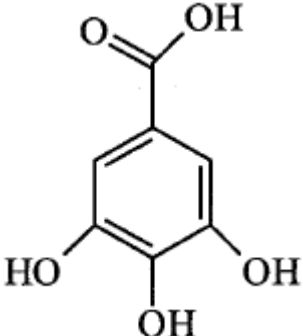
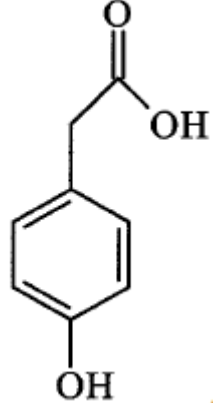
Το τσάι περιέχει κυρίως κατεχίνες όπου οι πιο σημαντικές είναι: ο(-)-3-γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), η (-) επιγαλλοκατεχίνη (EGC), ο (-)-3-γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (EGC) και η (-)-επικατεχίνη (EC), ενώ οι κύριες φλαβανόλες είναι η κερκετίνη, η καμφερόλη και η μυρισετίνη και ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από τις κατεχίνες. Απαντούν κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών. Η EGCG είναι πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (50-60% του συνόλου των κατεχινών) και θεωρείται ότι είναι το δραστικό του συστατικό.

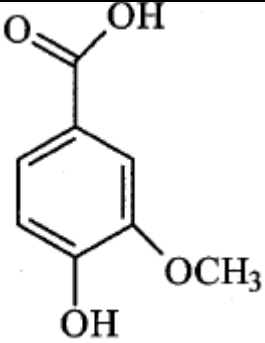
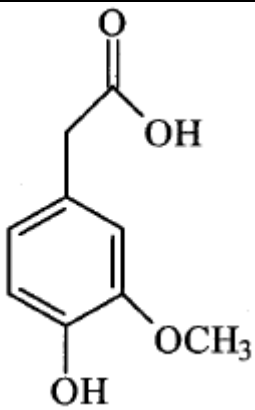
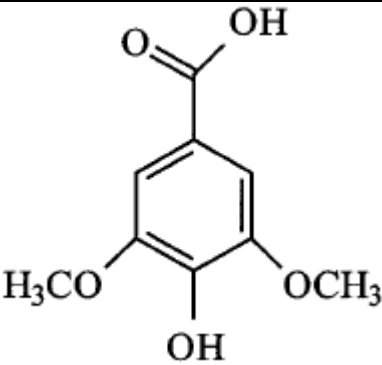
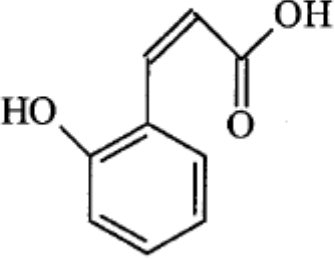
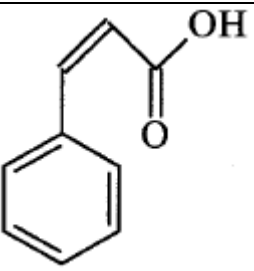
Η σειρά αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των τεσσάρων κύριων παραγώγων κατεχίνης έχει βρεθεί να είναι: EGCG>EGC=ECG>EC (Hu and Kitts, 2001). Έτσι, ενώ το πράσινο τσάι είναι πλούσιο σε φλαβανόλες, το μαύρο περιέχει μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων πολυφαινόλων όπως οι θεαφλαβίνες και οι θεαρουμπιγίνες

(Shao et al, 1995). Η πιο σημαντική πολυφαινόλη στους κόκκους του καφέ είναι το χλωρογενετικό οξύ. Στο κακάο η κυριότερη φλαβονόλη είναι η επικατεχίνη ενώ παρουσιάζεται υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και ταννίνες. Τέλος, οι πολυφαινόλες του κρασιού περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες και άλλα φλαβονοειδή.

Στο ελαιόλαδο, περιέχονται φαινολικά οξέα και υδρολυόμενες ταννίνες (Visioli and Galli, 1998), ενώ πλούσιοι σε ταννίνες είναι οι ξηροί καρποί. Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν το «πολικό πλάσμα» του και εμποδίζουν την αυτοξειδωση του, αποδίδοντας έτσι με αυτόν τον τρόπο την εξαιρετική θερμική του σταθερότητα και συνεισφέροντας στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γένση (Tsimidou et al, 1992). Οι σημαντικότερες είναι: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ολευρωπαΐνη και το πρωτοκατεχικό, γαλλικό, βανιλλικό, π-υδροξυ-βενζοϊκό, συριγγικό, 4-υδροξυ-φαινυλ-οξικό, ομαβανιλλικό, κινναμικό, ο-κουμαρικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιανπικό οξύ (Σχήμα 2.6).

Σχήμα 2.6

 <p>Τυροσόλη</p>	 <p>π-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ</p>
 <p>Υδροξυτυροσόλη</p>	 <p>Πρωτοκατεχικό οξύ</p>
 <p>οξύ Γαλλικό</p>	 <p>4-Υδροξυ-</p>

φαινυλοξικό	
 <p>Βανιλικό οξύ</p>	 <p>Ομοβανιλικό οξύ</p>
 <p>Συρινγικό οξύ</p>	 <p>α-Κουμαρικό οξύ</p>
 <p>Κινναμικό οξύ</p>	

Κεφάλαιο 3. Τεχνικές και μέθοδοι

3.1 Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography)

3.1.1. Γενικά

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε κλασική, όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση πετυχαίνεται λόγω της βαρύτητας και η στατική φάση αποτελείται από σχετικά μεγάλης διαμέτρου σωματίδια και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (Πολυσίου Μ., Ταραντίλης Π., 2004).

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- **Αντλία.** Η αντλία είναι η καρδιά ενός συστήματος HPLC. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλυση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλυση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής, η χωρητικότητα της κυμαίνεται από 1-500μL. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη.
- **Στήλες.** Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100cm. Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30cm. Η αποτελεσματικότητα μιας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Από πρώτη άποψη είναι φανερό ότι μια μακριά στήλη ή μια σειράς στηλών θα έχει οπωσδήποτε μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών. Όμως ταυτόχρονα η διάρκεια του διαχωρισμού θα είναι μεγαλύτερη. Αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της διαμέτρου των κόκκων του πληρωτικού υλικού. Το μέγεθος των κόκκων δεν πρέπει να είναι μόνο μικρό αλλά και ομοιόμορφο, το δε σχήμα σφαιρικό. Βασικό στοιχείο καθορισμού του αριθμού των θεωρητικών πλακών είναι η σταθερότητα παροχής της αντλίας καθώς και η ελάχιστη παροχή. Επίσης, σημαντικός παράγοντας είναι η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Μια λεπτή στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και φυσικά λίγο διαλύτη, επιτρέποντας εξοικονόμηση διαλύτη έως 80%.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι:

- α) πορώδες, με βάση τη πυριτική γη (silica)
 - β) μη πορώδες (pellicular)
 - γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστορόλιο
- Τα υλικά αυτά αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 5000 psi

Η στατική φάση μπορεί να καλυφθεί στο αδρανές υλικό:

- α) φυσικά, κατόπιν διάλυσης της στατικής φάσης στον κατάλληλο διαλύτη, προσθήκης του αδρανούς υλικού, ανάμειξης και απομάκρυνσης του διαλύτη με εξάτμιση υπό «κενό»
- β) χημικά, οπότε προκύπτει η λεγόμενη δεσμευμένη στατική φάση (bonded phase). Συνήθως χρησιμοποιούνται υποστρώματα με βάση τη πυριτική γη επί της οποίας με χημική αντίδραση προστίθεται η επιθυμητή ομάδα.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και κινητής φάσης διακρίνεται σε:

- α) κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη.
- β) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

- **Ανιχνευτές.** Χρησιμοποιούνται ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν.

Φωτόμετρο UV-Vis. Είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή για την HPLC. Οι ουσίες που μπορούν να αναλυθούν με αυτόν πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190-600 nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή αυτού:

- 1) Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος
- 2) Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μήκων κύματος
- 3) Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος βοηθά στη διαπίστωση της «καθαρότητας» μιας χρωματογραφικής κορυφής (εάν δηλαδή αυτή οφείλεται σε μια μόνο ουσία) γιατί μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες από μία πλήρη σάρωση μιας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.

- **Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής.** Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή.

3.1.2 Ανάλυση των πολυφαινολών με HPLC (πρόσφατα δεδομένα)

Τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό πολυφαινολών στα φυσικά προϊόντα, εφαρμόζονται σχεδόν αποκλειστικά μέθοδοι αναλυτικής χρωματογραφίας. Έπειτα, από την αποδοχή του Οργανισμού Αναλυτικής Χημείας (Assosiation of official Analytical Chemists, AOAC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-ανάστροφης φάσης (reversed-phase high liquid chromatography, RP-HPLC) σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (ultraviolet-visible, UV-Vis),

αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανάλυσης για τις συγκεκριμένες αναλύσεις (Romani et al, 1999). Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με την σύγκριση των κορυφών του δείγματος με αυτές των πρότυπων (standard) ουσιών.

Ο συνδυασμός της RP-HPLC με κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ και με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός για το διαχωρισμό των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου (Akasbi et al, 1993). Οι διαλύτες ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ ή μεθανόλη-οξικό οξύ αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί για τον επιτυχή διαχωρισμό τεσσάρων κατεχινών και καφεΐνης σε εκχύλισμα τσαγιού (Bronner et al, 1998). Παρόμοια επίπεδα κερκετίνης, καμφερόλης, μυρισετίνης και λουτεολίνης σε εκχύλισμα τσαγιού διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με RP-HPLC χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μεθανόλη-φωσφορικό οξύ ή ακετονιτρίλιο-φωσφορικό οξύ.

Οι Brenes και η ομάδα του το 1999 χρησιμοποίησαν την τεχνική αυτή για το προσδιορισμό απλών φαινολών όπως π.χ. το βανιλικό οξύ, τη βανιλίνη καθώς και άλλων φλαβονοειδών σε παρθένα ελαιόλαδα της Ισπανίας. Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση της χημικής δομής μιας ένωσης (4-ακετοξυαιθυλο-1,2-διυδροξυβενζόλιο) εφαρμόστηκε τεχνική MS και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*nuclear magnetic resonance, NMR*). Με την MS-NMR ταυτοποιήθηκαν στο ελαιόλαδο οι λιγνάνες (+)-1-ακετοξυπινορεσινόλη και (+)-πινορεσινόλη, μείζονα συστατικά του παρθένου ελαιολάδου (Owen et al, 2000).

Τέλος, εκτός από τη RP-HPLC /UV-Vis ή ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, στον προσδιορισμό πολυφαινολών εφαρμογή βρίσκουν και οι τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή υπερύθρου (*infrared liquid chromatography, IR-LC*) (Visser et al, 1997) και υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή κυκλικού διχρωισμού (*circular dichroism liquid chromatography, CD-LC*) (Bringmann et al, 1999).

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη και η εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR-LC) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα φυτικής δομής αγνώστων φαινολικών ενώσεων, εκτός των μεγαλομοριακών ταννινών.

3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Η εκτίμηση φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με τη χρωματομετρική δοκιμή Folin-Ciocalteu (F-C) (Singleton et al, 1974, Tsimidou, 1999, Visioli & Galli, 2002, Nackz & Shahidi, 2004, Carrasco-Pancorbo et al, 2005). Παρά τα μειονεκτήματα της αυτής δοκιμής, φαίνεται να πλεονεκτεί και να είναι αρκετά διαδεδομένη. Ο προσδιορισμός που διεξάγεται σε αλκαλικό περιβάλλον, στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με τις λειτουργικές υδροξύ ομάδες των φαινολικών ενώσεων, οπότε λαμβάνει χώρα οξείδωση των φαινολών και αναγωγή του αντιδραστηρίου σε μίγμα έγχρωμων οξειδίων (W_8O_{23} και Mo_8O_{23} , μπλε χρώμα). Η συγκέντρωση ενός φυτικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες εκφράζεται ως mg πρότυπης φαινόλης ανά kg ή (g) φυτικού υλικού ή δείγματος.

Το αποτέλεσμα μπορεί να επηρεαστεί ουσιαστικά από την επιλογή του

προτύπου και η σχετική συγκέντρωση των επιμέρους φαινολών στο προς ανάλυση δείγμα, καθώς και η μοριακή απορρόφηση ανά δραστική ομάδα φαινολών διαφοροποιείται (Blekas et al, 2002a, Hrnčirik & Fritsche, 2004).

Το σημαντικότερο μειονέκτημα όπου παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η μικρή εκλεκτικότητα της, καθώς και η παρουσία αναγόντων σακχάρων, ασκορβικού οξέος, αμινοξέων, ιόντων σιδήρου και ψευδαργύρου όπου μπορούν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό. Επιπρόσθετα, μεταξύ των μειονεκτημάτων της συγκαταλέγονται:

- ο απαιτούμενος χρόνος (παραπάνω από 1h)
- η μη εύχρηστη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων εφαρμογή της (τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου όπου εφαρμόστηκε από την Gutfinger (1981) σε πολικό εκχύλισμα ελαιολάδου)
- το σχετικό υψηλό κόστος του ειδικού αντιδραστήριου
- η σημαντική απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, η οποία μετά την αντίδραση, δεν μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

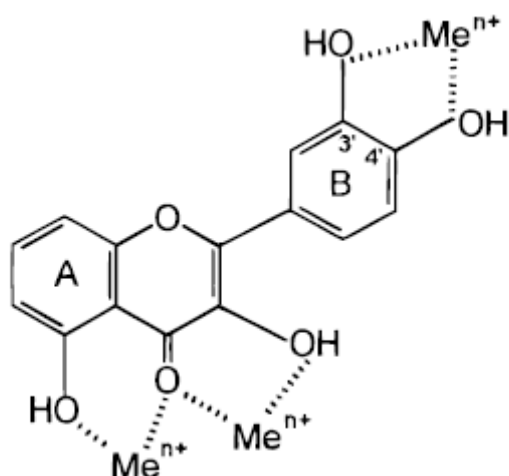
Τέλος, παρόλο όμως το συνεχές ενδιαφέρον για την αξιοποίηση φαινολικών πηγών και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, δεν έχει αντικατασταθεί.

3.3 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Για την ανάπτυξη μεθόδων για την εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται σε ένα φυτικό εκχύλισμα κατέληξαν στην βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων που στηρίζονται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης μεταξύ μετάλλων και φλαβονοειδών. Τα έγχρωμα προϊόντα της συμπλοκοποίησης μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Harborne, 1989, Voirin, 1993, Naczka & Shahidi, 2004, Malešev & Kuntić, 2007). Παρόλο όπου συνιστώνται τέτοιου τύπου χρωματομετρικές δοκιμές, η εκλεκτικότητά τους θεωρείται αμφισβητήσιμη στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα (Malešev & Kuntić, 2007).

Σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχολικές ομάδες του δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξύ 4-καρβονυλο ομάδες των δακτυλίων A και C

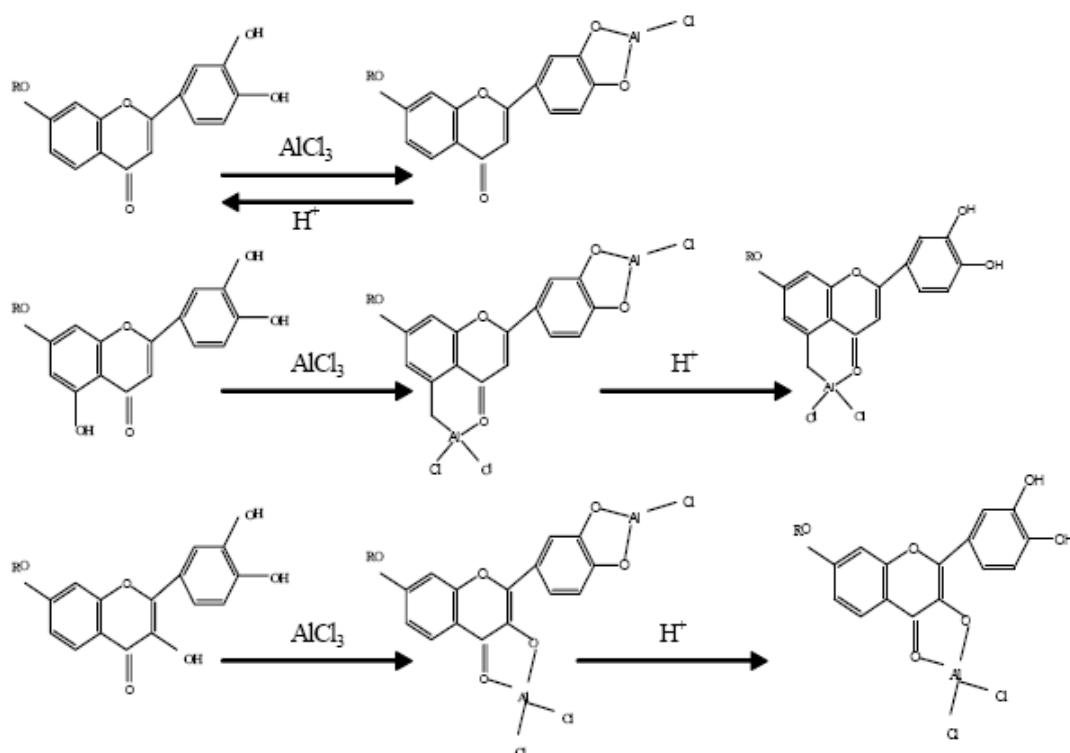
Σχήμα 3.1. Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων (Pietta, 2000).



Στην περίπτωση υποστρωμάτων με ταυτόχρονη παρουσία φλαβονοειδών και άλλων ενώσεων που έχουν παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά με αυτά των φλαβονοειδών (π.χ. κατεχολικές ομάδες) υπάρχει κίνδυνος λανθασμένων εκτιμήσεων (συμπροσδιορισμός). Στη βιβλιογραφία, η εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών ενός φυτικού υλικού πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο δοκιμών συμπλοκοποίησης μετάλλων-φλαβονοειδών (Naczka & Shahidi, 2006). Η διαφοροποίηση των δοκιμών έγκειται στην απουσία ή παρουσία του αντιδραστηρίου NaNO₂ και την ύπαρξη ή όχι οξέος. Παλαιότερη προσέγγιση -συμπλοκοποίηση απουσία NaNO₂ (Harborne, 1989, Voirin, 1993)- ο σχηματισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον, που πιθανώς αποτρέπει τη συμμετοχή κατεχολικών ομάδων στη συμπλοκοποίηση (Σχήμα 3.2).

Περισσότερες πληροφορίες για τη χημεία της αντίδρασης παρουσία NaNO₂ που πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον δεν βρέθηκαν.

Σχήμα 3.2. Σχηματισμός συμπλόκων φλαβονοειδών-AlCl₃ παρουσία και απουσία οξέος (Markham & Marby, 1968).



3.4 Δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών

Μεταξύ των διαφόρων δοκιμών εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, οι δοκιμές εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών βρίσκουν εφαρμογή σε τρόφιμα και βιολογικά συστήματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δέσμευση ελευθέρων ριζών αποτελεί τον κύριο μηχανισμό δράσης των παρεμποδιστών οξείδωσης, τουλάχιστον στα τρόφιμα (Gordon, 2001, Roginsky & Lissi, 2005). Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών μπορεί να αξιολογηθεί μέσω διάφορων απλών, οικονομικών και γρήγορων πειραματικών δοκιμών. Αυτές στοχεύουν στην προσφορά ποσοτικής πληροφορίας σχετικά με την αντιοξειδωτική ισχύ των μελετώμενων δειγμάτων σε συστήματα τροφίμων, αλλά και στην πρόβλεψη πιθανής συμπεριφοράς τους *in vivo*. Οι εν λόγω δοκιμές βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, παρά το γεγονός ότι οι ρίζες που χρησιμοποιούνται δεν είναι πάντοτε συναφείς προς αυτές ρεαλιστικών συνθηκών οξείδωσης ή ακόμα ότι οι εφαρμοζόμενες συνθήκες δεν προσομοιάζουν πάντοτε σε εκείνες που επικρατούν *in vivo* (Frankel, 2007).

Μεταξύ των πολυάριθμων δοκιμών εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Frankel, 2007, Laguerre, *et al.*, 2007, Singh & Singh, 2008, Karadag *et al.*, 2009, Moon & Shibamoto, 2009), δημοφιλέστερο εργαλείο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα πεδία των επιστημών τροφίμων και υγείας αποτελεί η γρήγορη και απλή δοκιμή δέσμευσης της συνθετικής ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζιλίου (DPPH•). Άλλη αξιόπιστη, γρήγορη και απλή τεχνική που βρίσκει συχνή εφαρμογή στα παραπάνω πεδία είναι η δοκιμή δέσμευσης της κατιοντικής ρίζας του δις-αμμωνιακού άλατος του 2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) ή ABTS. Στην περίπτωση που

επιθυμείται η αποφυγή της χρήσης συνθετικών ριζών και προτιμάται μία ρεαλιστικότερη προσέγγιση των συνθηκών που πραγματοποιούνται *in vivo*, είναι δυνατή η επιλογή ανάμεσα σε διάφορες μεθόδους που παρακολουθούν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν ρίζες (RO• ή ROO•) που ανήκουν στην κατηγορία εκείνων που σχηματίζονται *in vivo* σε βιολογικά συστήματα (Aruoma, 1994).

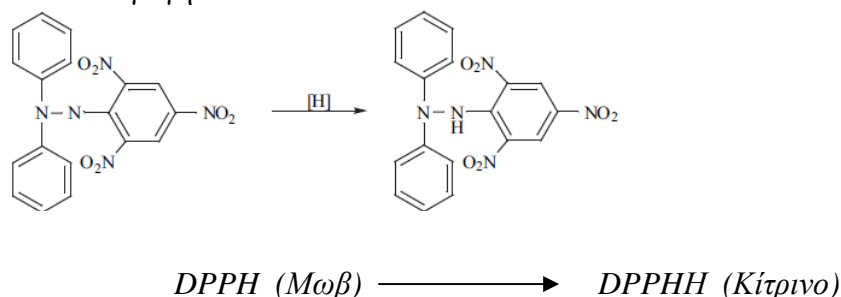
Μεταξύ των διαθέσιμων δοκιμών που στηρίζονται στη δέσμευση τέτοιου τύπου ριζών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η δοκιμή ORAC (oxygen radical absorbance capacity) και η δοκιμή αποχρωματισμού της κροκίνης (crocin bleaching assay ή CBA) (Ordoudi & Tsimidou, 2006a, Frankel, 2007, Singh & Singh, 2008, Karadag *et al.*, 2009).

3.4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

3.4.1.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams *et al.* Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams *et al.*, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior *et al.*, 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 3.3). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Σχήμα 3.3: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H



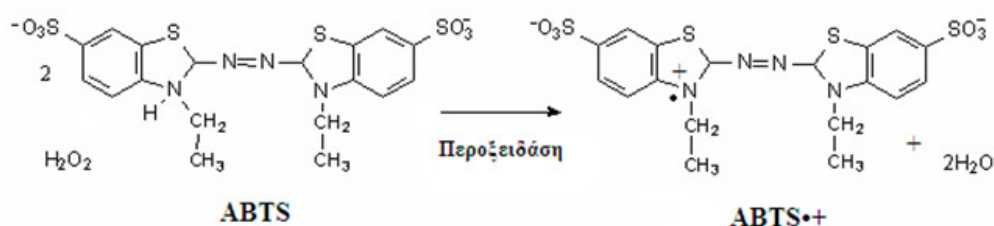
3.4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+

3.4.2.1 Αρχή της μεθόδου

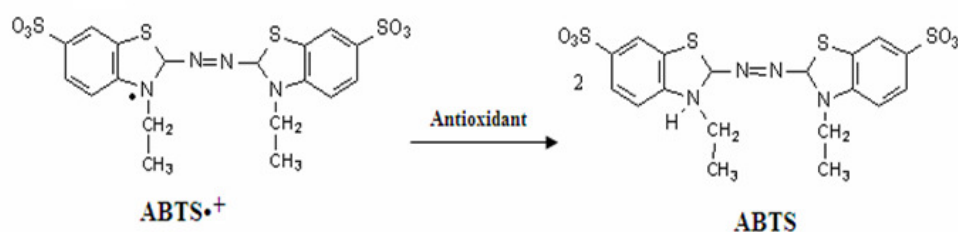
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS•+. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS•+ (κατιόν) (Σχήμα 3.4). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η πρόσληψη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS•+, ανάγεται είτε μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Σχήμα 3.5) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).

Σχήμα 3.4: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Σχήμα 3.5: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS



3.4.3 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

3.4.3.1 Γενικά

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

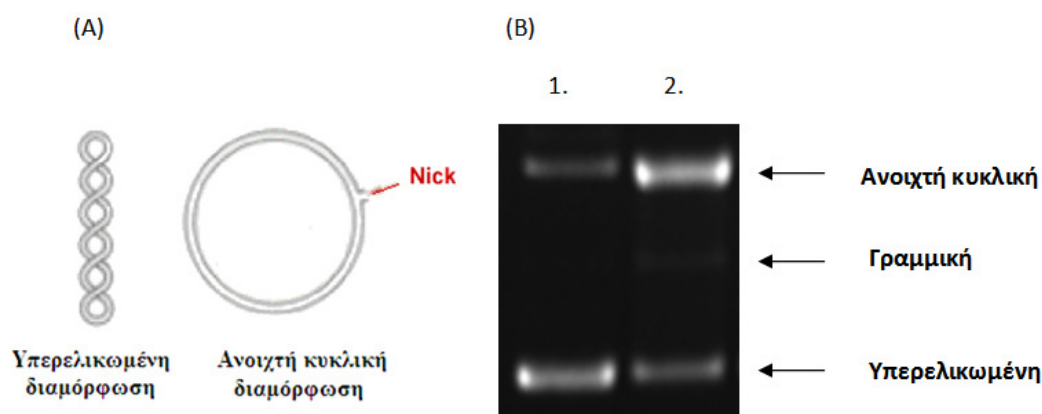
Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, και δύο ρίζες αντίστοιχα. Η ρίζα υδροξυλίου (OH•) και η ρίζα περοξυλίου (ROO•).

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Σχήμα 3.6).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Τη γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

Σχήμα 3.6: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.



(A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).

(B) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα.

Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των ριζών $\text{OH}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ να προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

3.4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα E. Coli DH5A.

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων E. Coli που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων E. Coli που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η

απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανάλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech . Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

3.4.5. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

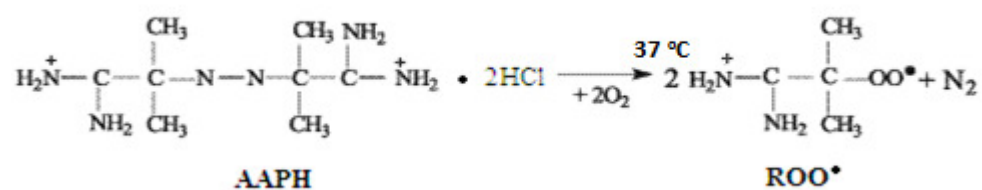
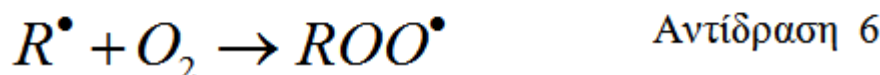
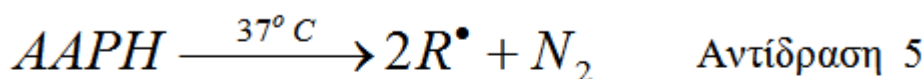
3.4.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001).

Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO• χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO• (Αντιδράσεις 5,6) (Σχήμα 3.7).

Σχήμα 3.7: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.



Οι ρίζες ROO• έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

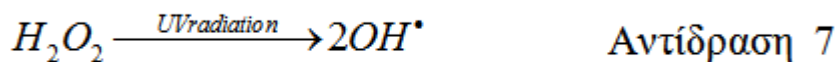
Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO•.

3.4.6 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)

3.4.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης μιας ουσίας απέναντι στη δράση των ριζών OH• βασίζεται στη μέθοδο των Keum et al. (2000).

Οι ρίζες OH• είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH• (Αντίδραση 7).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH• στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH•.

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος

4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- Δείγματα ροδιού από διάφορα στάδια επεξεργασίας
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (HPLC grade)
- Εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας (HPLC grade)
- Οξικός αιθυλεστέρας αναλυτικής καθαρότητας
- Θεικό νάτριο Na_2SO_4 (Sigma Aldrich)

4.1.2. Όργανα

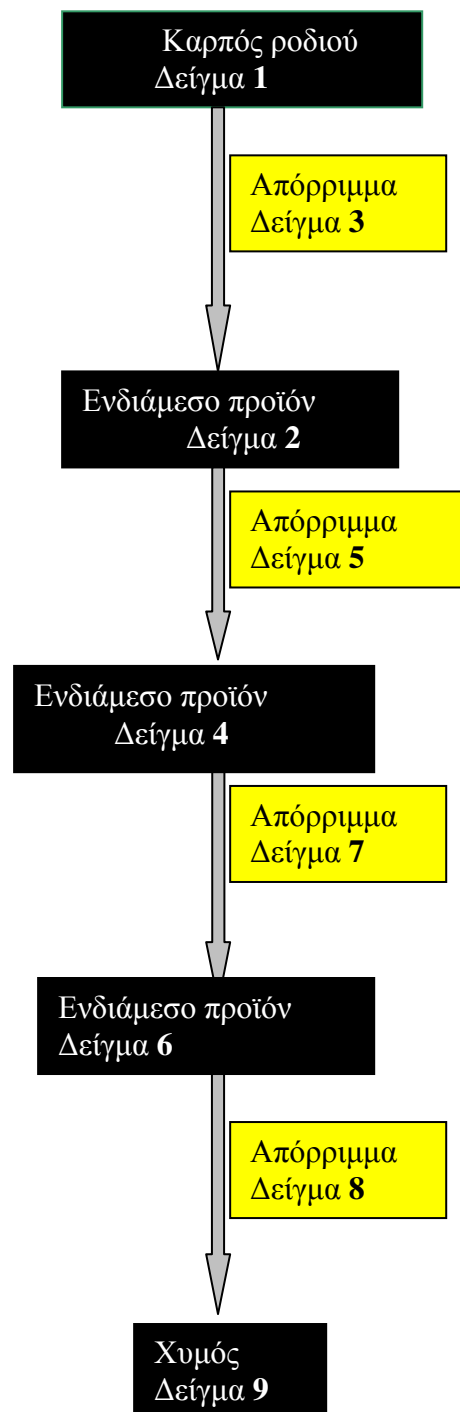
- Αναλυτικός ζυγός (Kern), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Λυοφιλωτής (Vir Tis, sentry 2.0)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Heidolph MR 3001)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Centution Scientific)
- Χωνί Büchner για τη διήθηση
- Περιστερόμενη συσκευή εξάτμισης κενού Heidolph
- Διαχωριστική χοάνη για την εκχύλιση

4.1.3 Δείγματα που μελετήθηκαν

Η ποικιλία ροδιού που μελετήθηκε στη διατριβή ήταν η Wonderful. Τα δείγματα των καρπών και τα στάδια επεξεργασίας τους (χυμοί, υπολείμματα, πούλπα) διατέθηκαν από την εταιρεία VITOM (αφοί Χριστοδούλου) το Νοέμβριο του 2011. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 4.1) απαριθμούνται τα κύρια στάδια μετατροπής του καρπού σε χυμό από τα οποία ελήφθησαν τα αντίστοιχα δείγματα της διατριβής.

Στον (Πίνακα 4.1) εμφανίζονται όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν κατά τη διενέργεια της παρούσας εργασίας καθώς και η μέθοδος ξήρανσης που ακολουθήθηκε.

Σχήμα 4.1



- **Δείγμα 1:** Πρώτη ύλη (Είσοδος) καρπός του ροδιού. Το δείγμα που εξετάστηκε δεν αφορούσε ολόκληρο το καρπό (ρόδι) αλλά μόνο το εδώδιμο μέρος του (είχαν αφαιρεθεί φλοιός και άσπρα τοιχώματα). Εμπεριέχονται τα επισπέρμια και τα σπέρματα.
- **Δείγμα 2:** ενδιάμεσο προϊόν που περιέχει μικρές ποσότητες από επισπέρμια (arils), φλοιούς, και άσπρα τοιχώματα. Προϊόν 1^ο σταδίου επεξεργασίας.
- **Δείγμα 3:** φλοιός (peels)-απόρριμμα 1^ο σταδίου.
- **Δείγμα 4:** ενδιάμεσο προϊόν υπό μορφή πουρέ. Εκχύμωση. Προϊόν 2^ο σταδίου επεξεργασίας.
- **Δείγμα 5:** άσπρα σπέρματα (seeds). Απόρριμμα 2^ο σταδίου.
- **Δείγμα 6:** ενδιάμεσο προϊόν υπό μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά.(1 φυγοκέντρηση). Προϊόν 3^ο σταδίου επεξεργασίας.
- **Δείγμα 7:** Απόρριμμα 3^ο σταδίου. Απόρριμμα φυγοκέντρωσης της πούλπας .
- **Δείγμα 8:** Απόρριμμα 4^ο σταδίου. Απόρριμμα 2^{ης} φυγοκέντρωσης της πούλπας.
- **Δείγμα 9:** Τελικό προϊόν (Εξοδος)-χυμός ροδιού.

Πίνακας 4.1

Δείγματα	Στάδια επεξεργασίας	Μέθοδος ξήρανσης
1	καρπός (εδώδιμο μέρος) (χωρίς τα άσπρα τοιχώματα και τα φλοιός)	Λυοφιλίωση
2	Ενδιάμεσο προϊόν (περικόρπια και φλοιός)	Λυοφιλίωση
3	Απόρριμμα (φλούδια)	Αέρας
4	Ενδιάμεσο προϊόν (σε μορφή πουρέ)	Λυοφιλίωση
5	Απόρριμμα (σπόροι)	Αέρας
6	Ενδιάμεσο προϊόν (σε μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά υπολείμματα)	Λυοφιλίωση
7	Απόρριμμα (μορφή πούλπας)	Λυοφιλίωση
8	Απόρριμμα (μορφή πούλπας)	Λυοφιλίωση
9	χυμός-τελικό προϊόν	Λυοφιλίωση

Συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας των δειγμάτων

Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν απουσία φωτός μέχρι την ανάλυση τους σε θερμοκρασία -25°C. Τα σπέρματα και ο φλοιός ξηράνθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα.

4.1.4 Πειραματική πορεία

Μετά τη λυοφιλίωση (ή ξήρανση για τα σπέρματα και τους φλοιούς), τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν ώστε να προσδιοριστεί η συνολική απόδοση. Στο (Πίνακα 4.2) που ακολουθεί δίνονται τα βάρη των δειγμάτων (g) πριν και μετά τη λυοφυλίωση.

Ποσότητα δείγματος (περίπου 30 g) τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και αναδεύτηκε για 40 min σε μαγνητικό αναδευτήρα με καθαρή μεθανόλη, λαμβάνοντας μέριμνα η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 25°C. Στη συνέχεια, το μίγμα διηθήθηκε από χωνί Büchner (Εικόνα 4.1), με χάρτινο ηθμό και συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C, δίνοντας ένα παχύρευστο υπόλειμμα. Αυτό επαναδιαλύθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και φυγοκεντρήθηκε για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα. Στη συνέχεια, το δείγμα εκχυλίστηκε τρεις φορές με καθαρό εξάνιο για να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες. Το διάλυμα που έμεινε συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C, δίνοντας το ζητούμενο εκχύλισμα σε στερεή μορφή. Το παραπάνω στερεό κατανεμήθηκε δυο φορές μεταξύ υδάτινης και οργανικής φάσης (οξικός αιθυλεστέρας). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με την προσθήκη μικρής ποσότητας Na₂SO₄ (για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα υγρασίας) και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Μετά το τέλος της διαδικασίας το στερεό υπόλειμμα (σε μορφή σκόνης) ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί η συνολική απόδοση. Στον (Πίνακα 4.2) που ακολουθεί δίνονται τα βάρη των δειγμάτων (g) πριν και μετά την εκχύλιση. Στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη και διηθήθηκε με φίλτρα σύριγγος PVD F 0,45 μm για να είναι δυνατή η εισαγωγή τους στο HPLC.



Εικόνα 4.1. Χωνί Büchner

Πίνακας 4.2 Απόδοση εκχύλισης

Δείγμα	Βάρος Δείγματος (g)		Απόδοση %
	Πριν την εκχύλιση	Μετά την εκχύλιση	
1	23,37	0,2307	0,99
2	15,27	0,1719	1,13
3	30,74	0,2633	0,86
4	8,64	0,1397	1,62
5	30,85	0,1008	0,33
6	30,30	0,3308	1,09
7	30,46	0,6490	2,13
8	31,25	0,6490	2,08
9	20,78	0,2997	1,44

Όλες οι παραπάνω πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν απουσία φωτός.

4.2 Διαχωρισμός και απομόνωση των κυρίων κλασμάτων του εκχυλίσματος του ροδιού

4.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- 1mg εκχύλισμα/ 1 mL μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας
- Μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (HPLC grade)
- Ακετονιτρίλιο (AcN) αναλυτικής καθαρότητας (HPLC grade)

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε στην HPLC καθαρίστηκε με συσκευή αντίστροφης όσμωσης Mill-Q Plus

4.2.2 Όργανα

- Υγρός χρωματογράφος: Hewlett Packard (HP1100) με αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P 4000)
- pH-μετρο, (HACH μοντέλο session 3)
- Συσκευή Mill-Q Plus
- Λογισμικό πακέτο Chemstation, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων

4.2.3 Μέθοδος ανάλυσης HPLC

Χρωματογραφία με HPLC αντίστροφης αναστροφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση

Στήλη: αναλυτική στήλη C18 (5 μm) (4.6 x 250 nm)

Ανιχνευτές: UV-Vis (280, 320, 360 nm)

Ροή διαλυτών: 1 mL/min

Πρόγραμμα βαθμιδωτής εκλύσεως: (Πίνακας 4.3)

Πίνακας 4.3

Min	A	B	C
0	100%	0	0
5	90%	10%	0
25	30%	70%	0
5	0	0	100%

A: Μεθανόλη/ Οξικό οξύ/ Νερό (10:2:88, v/v/v)

B: Ακετονιτρίλιο (C₂H₃N)

C: Νερό

4.2.4 Προετοιμασία διαλυμάτων

Παρασκευή κινητής φάσης

Διαλύτης A: Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα Μεθανόλη/Οξικό οξύ/Νερό (10:2:88, v/v/v)

Το διάλυμα παρασκευάστηκε με διάλυση 100 mL Μεθανόλη σε 880 mL Νερού καθαρότητας nanopure. Το pH ρυθμίστηκε στο 2,7 με την προσθήκη Οξικού οξέος. Το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό μέσω φίλτρου ώστε να κατακρατηθούν τα στερεά σωματίδια και να γίνει απαέρωση του διαλύματος, προκειμένου να μην δημιουργηθούν υπερβολικές φυσαλίδες κατά τη ροή του διαμέσου της στήλης.

Διαλύτης B: Ακετονιτρίλιο (C₂H₃N) HPLC.

Ο διαλύτης διηθήθηκε υπό κενό μέσω φίλτρου, πριν χρησιμοποιηθεί για την χρωματογραφική ανάλυση.

4.2.5 Ανάλυση του εκχυλίσματος

Από τα εκχυλίσματα του ροδιού (σε όλα τα στάδια επεξεργασίας) ελήφθησαν 20 µL και αναλύθηκαν με χρωματογραφία HPLC

Ο διαχωρισμός των φαινολών από τα εκχυλίσματα ή τα δείγματα του ροδιού έγινε με βαθμιδωτή έκλυση που διήρκεσε 35 min. Η μέθοδος όπου χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των Garima Pande & Casimir C. Akoh.2009. με ορισμένες τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός των μορίων.

Πριν την έναρξη της ανάλυσης προηγήθηκε έκπλυση των καναλιών (purge) με διαλύτη με ροή 5 mL/min για να απομακρυνθεί ο προηγούμενος διαλύτης και οι τυχόν φυσαλίδες από το σύστημα. Ακολούθησε ενεργοποίηση της στήλης με την αρχική αναλογία διαλυτών και η εξισορρόπηση της για τουλάχιστον 60 min.

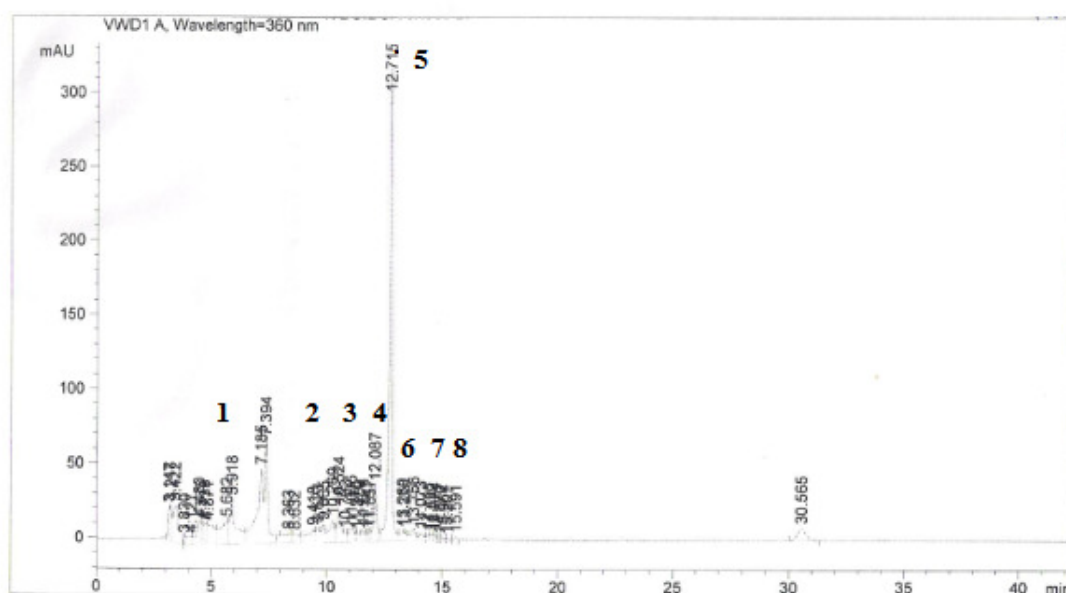
Ο καθαρός χρόνος της ανάλυσης του κάθε δείγματος ήταν 40 min όμως ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν περίπου 60 min, εφόσον μετά από το πέρας της ανάλυσης, ακολουθεί ένα διάστημα 25 min, στο οποίο περνάει διαδοχικά 100%

ακετονιτρίλιο (5min) από τη στήλη και 100% H₂O, προκειμένου να εκλουσθούν οι τυχόν εναπομένουσες ουσίες. Η διοχέτευση του νερού αποσκοπεί στην απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη εφόσον η απότομη αλλαγή από 100% ακετονιτρίλιο σε 95% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα θα προκαλούσε καταβύθιση των μορίων του άλατος μέσα στη στήλη με αρνητικές συνέπειες για τη στήλη και τη ποιότητα της ανάλυσης γενικότερα.

Τέλος, μετά το τέλος των αναλύσεων ακολούθησε ένα πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με H₂O/Ακετονιτρίλιο και τα κανάλια των διαλυτών ξεπλύθηκαν με H₂O για 20 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα οξέος και άλατος.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα (Εικόνα 4.2) της μεθόδου στα 360 nm. Οι κορυφές που παρουσιάζονται είναι οι εξής: **1.** γαλλικό οξύ, **2.** χλωρογενικό οξύ, **3.** καφεϊκό οξύ, **4.** ρουτίνη, **5.** ελλαγικό οξύ και π-κουμαρικό, **6.** φερουλικό οξύ, **7.** φλοριζίνη, **8.** πρωτοκατεχικό οξύ.

Εικόνα 4.2



4.2.6 Ανάλυση πρότυπων πολυφαινολών

Παράλληλα με την ανάλυση του εκχυλίσματος του ροδιού έγινε ανάλυση δ/των πρότυπων πολυφαινολών. Τα πρότυπα αναλύθηκαν στα 320 nm με την ίδια μέθοδο ανάλυσης όπου χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων του ροδιού. Στον (Πίνακα 4.4) παρουσιάζονται οι πρότυπες πολυφαινολικές ενώσεις που αναλύθηκαν και οι χρόνοι κατακρατησής τους.

Πίνακας 4.4

Πρότυπες ουσίες	Χρόνοι κατακράτησης RT (min)
Ελλαγικό οξύ	12,525
Π-κουμαρικό οξύ	12,574
Κερκετίνη	16,891
Επικατεχίνη	10,749 *
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη	16,402
Κατεχίνη	8,951*
Φλοριζίνη (phloridzin)	14,748
Πρωτοκατεχικό οξύ	15,884
Γαλλικό οξύ	5,123
Καφεϊκό οξύ	10,566
Φερουλικό οξύ	13,234
Ρουτίνη	12,291
Χλωρογενικό οξύ	9,214

*Τα δύο αυτά πρότυπα αναλύθηκαν στα 280 nm γιατί εκεί είναι η μέγιστη απορρόφηση τους.

4.2.7 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολών

Για κάθε μία από τις πρότυπες ενώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης (stock solution) συγκέντρωσης από 1000 ppm έως το τυφλό, σε μεθανόλη. Τα διαλύματα αυτά φυλάχθηκαν στους -25°C απουσία φωτός. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώσεις προτύπων διαλυμάτων φαινολών, διαφόρων συγκεντρώσεων προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στο παρακάτω πίνακα (Πίνακα 4.5).

Πίνακας 4.5

Πρότυπη Ένωση	1 ^ο πρότυπο	2 ^ο πρότυπο	3 ^ο πρότυπο	4 ^ο πρότυπο	5 ^ο πρότυπο	6 ^ο πρότυπο
	Συγκέντρωση (ppm)	Συγκέντρωση (ppm)	Συγκέντρωση (ppm)	Συγκέντρωση (ppm)	Συγκέντρωση (ppm)	Συγκέντρωση (ppm)
Ελλαγικό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό
Π-κουμαρικό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό
Κερκετίνη	40	20	10	4	2	Τυφλό
Επικατεχίνη	40	20	10	4	2	Τυφλό
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη	40	20	10	4	2	Τυφλό
Κατεχίνη	40	20	10	4	2	Τυφλό
Φλοριζίνη (phloridzin)	40	20	10	4	2	Τυφλό
Πρωτοκατεχι	40	20	10	4	2	Τυφλό

Πρότυπη Ένωση	1 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)	2 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)	3 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)	4 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)	5 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)	6 ^ο πρότυπο Συγκέντρωση (ppm)
κό οξύ						
Γαλλικό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό
Καφεϊκό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό
Φερουλικό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό
Ρουτίνη	40	20	10	4	2	Τυφλό
Χλωρογενικό οξύ	40	20	10	4	2	Τυφλό

4.2.8 Προσδιορισμός φαινολών

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολών πραγματοποιήθηκε με βάση το χρόνο κατακράτησης τους (Retention time) και του φάσματος απορρόφησης των πρότυπων μορίων. Οι φαινόλες ανάλογα με τη δομή τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis, με αποτέλεσμα η ανάλυση τους να απαιτεί τη χρήση τριών μηκών κύματος (Πίνακας 4.5).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων ροδιού κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με εύρος συγκεντρώσεων από 2-40 ppm μέσω των οποίων προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα δείγματα (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6 Στοιχεία της μεθόδου ανάλυσης πολυφαινολών με HPLC

Πρότυπη ουσία	Μήκος κύματος (nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (ppm)	Εξίσωση	R ²
Ελλαγικό οξύ-Π-κουμαρικό οξύ	320	40-2	$\psi=8,617\chi-668,46$	0,9395
Κερκετίνη	320	40-2	$\psi=1,1174\chi-36,2$	0,9949
Επικατεχίνη	280	40-2	$\psi=1,1804\chi-40,697$	0,8857
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη	320	40-2	$\psi=8,0729\chi-359,36$	0,9901
Κατεχίνη	280	40-2	$\psi=0,0287\chi+30,178$	0,0723
Φλοριζίνη (phloridzin)	320	40-2	$\psi=1,5678\chi-48,63$	0,9938
Πρωτοκατεχικό οξύ	320	40-2	$\psi=0,1589\chi-5,2973$	0,9931
Γαλλικό οξύ	360	40-2	$\psi=0,5585\chi-72,493$	0,7983
Καφεϊκό οξύ	320	40-2	$\psi=2,6254\chi+117,79$	0,9792
Φερουλικό οξύ	320	40-2	$\psi=15,056\chi-680,7$	0,987

Πρότυπη ουσία	Μήκος κύματος(nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (ppm)	Εξίσωση	R ²
Ρουτίνη	360	40-2	$\psi=6,3372\chi-504,76$	0,9488
Χλωρογενικό οξύ	320	40-2	$\psi=7,1303\chi-336,37$	0,9858

4.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου

4.3.1. Υλικά και αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃, 20% w/v)
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας, EtOH
- Γαλλικό οξύ
- Απιονισμένο νερό

4.3.2. Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης
- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL
- Αναλυτικός ζυγός (Kern), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

4.3.3. Πειραματική πορεία

Σε ογκομετρική φιάλη (10 mL) προστίθεται απιονισμένο νερό (6 mL) και το προς εξέταση διάλυμα πολυφαινολών (100 μ L, 1 mg δείγμα/1 mL H₂O/EtOH 85:15). Έπειτα προστίθεται το αντιδραστήριο FC στο μίγμα (500 mL,1:1). Ακολούθησε ανάδευση και μετά την πάροδο 3 min, προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (1,5 mL) και τέλος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Το μίγμα παραμένει στο σκοτάδι για 2 h. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 725nm.

Παράλληλα φωτομετρείται τυφλό και πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με γαλλικό οξύ.

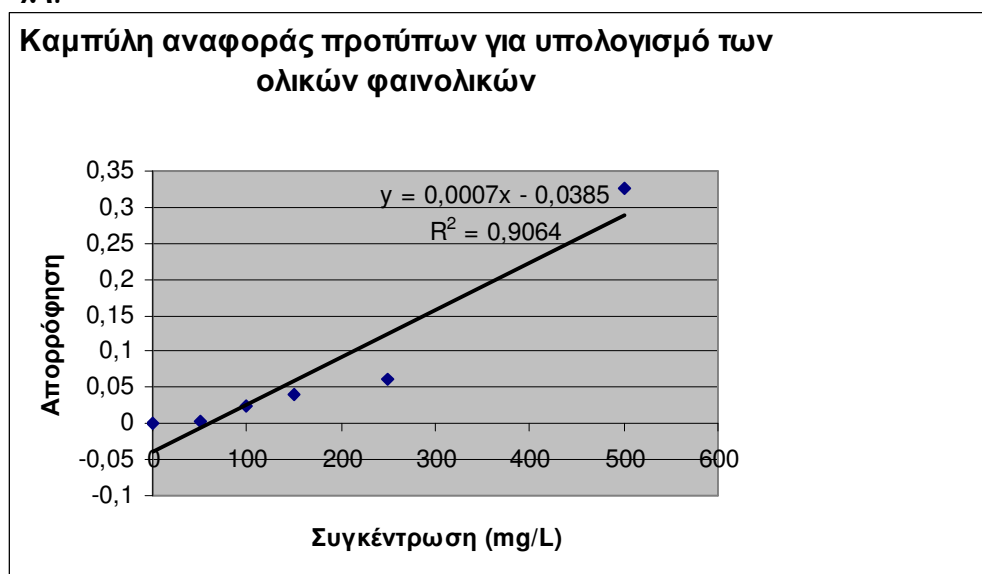
Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος:

Από μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα εργασίας σε περιοχή συγκεντρώσεων από 50-500 mg/L. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία της FC. Οι μετρήσεις Πίνακας 4.7, χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος, όπου C= συγκεντρωση και A= απορρόφηση στα 725 nm (σχήμα 4.2).

Πίνακας 4.7: Μετρήσεις απορρόφησης των προϊόντων αντίδρασης με πρότυπα γαλλικού οξέος

Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	0,004
100	0,024
150	0,04
250	0,0625
500	0,3255

Σχήμα 4.2



4.4 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Η μέθοδος βασίστηκε σε μια παραλλαγή των Gunes et al. 2002

4.4.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Διάλυμα NaNO_2 , 5%
- Διάλυμα AlCl_3 , 10%
- Διάλυμα NaOH , 1M
- Κατεχίνη

4.4.2 Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης
- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL
- Αναλυτικός ζυγός (Kern) , ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

4.4.3 Πειραματική πορεία

Σε ογκομετρική φιάλη (10 mL) προστίθεται 1 mL το προς εξέταση διάλυμα πολυφαινολών (100 μ L, 5mg σε ογκομετρική φιάλη των 10mL). Έπειτα, προστίθεται 4 mL απιονισμένο νερό και 0,3 mL NaNO₂, 5%. Στη συνέχεια, μετά την πάροδο 5 min προστίθεται 0,3 mL AlCl₃, 10%. Μετά από 1 min προστίθεται 2 mL NaOH, 1M και τέλος συμπλήρωση μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το μίγμα φωτομετρείται στα 510 nm.

Παράλληλα φωτομετρείται τυφλό και πρότυπα διαλύματα κατεχίνης για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με κατεχίνη.

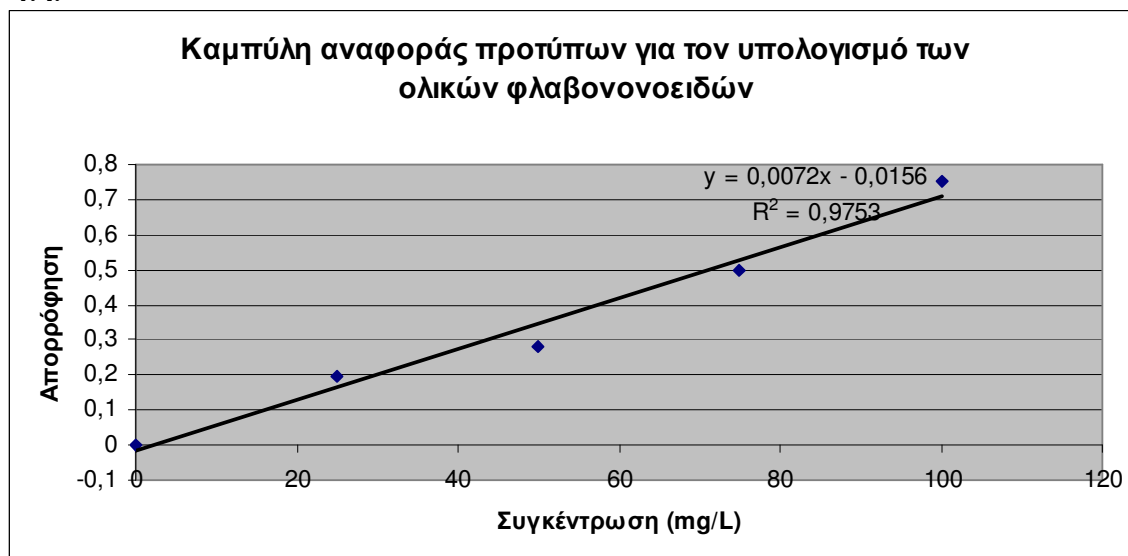
Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατεχίνης:

Από μητρικό διάλυμα κατεχίνης παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις σε περιοχή συγκεντρώσεων από 25-100 mg/L. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία των φλαβονοειδών. Οι μετρήσεις Πίνακας 4.8 χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης, όπου C= συγκέντρωση και A= απορρόφηση στα 510 nm (σχήμα 4.3).

Πίνακας 4.8: Μετρήσεις απορρόφησης των προϊόντων αντίδρασης με πρότυπα κατεχίνης

Συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
25	0,197
50	0,283
75	0,498
100	0,755

Σχήμα 4.3



4.5 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

4.5.1 Μέθοδοι

Τέσσερις συνολικά μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

4.5.2 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκαν κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Πρόκειται για δύο, κατά βάση ποιοτικές, *in vitro* μεθόδους οι οποίες ανιχνεύουν την αντιοξειδωτική ή μη ικανότητα ενός συγκεκριμένου συστατικού. Και οι δύο μέθοδοι, βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν ρίζες όπως η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζόλιο ή DPPH• (Brand-Williams et al., 1995) και 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS•+ (Rice-Evans et al., 1996).

Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης του συστατικού επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό του IC₅₀, της συγκέντρωσης δηλαδή στην οποία οι εξεταζόμενες ουσίες προκαλούν την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• ή ABTS•+, κατά 50% (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

4.5.3 Υλικά

4.5.3.1 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

4.5.3.2 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τις τέσσερις μεθόδους ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Merck-Γερμανία)

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma-Germany)
- Μεθανόλη (CH₃OH) (Merck- Germany)
- DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο) [(CH₃)₂SO] (Merck-Γερμανία)
- H₂O₂ (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

4.5.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

4.5.4.1 Πειραματική πορεία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μL μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH•) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μg/mL). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μL. Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει την μέθοδο. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH•) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.8). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1mL. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 4.9).

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH• σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 4.8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	9	8	7	6
Εκχύλισμα	-	-	50μL	50μL	50μL	50μL
Μεθανόλη	950μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL
DMSO	50 μL	50μL				
DPPH•	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
V τελ	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4

	Τυφλό	Control	9	8	7	6
Εκχύλισμα	-	-	50μL	50μL	50μL	50μL
Μεθανόλη	950μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL
DMSO	50 μL	50μL				
DPPH'	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
V τελ	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Πίνακας 4.9: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	Control	9	8	7	6	5
Εκχύλισμα	-	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
Μεθανόλη	950μL	900μL	950μL	950μL	950μL	950μL	950μL
DMSO	50 μL	50μL					
V τελικό	1mL	1 mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

4.5.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_d) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_d: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον

προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

4.5.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+

4.5.5.1 Πειραματική πορεία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μg/mL).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μL) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H₂O.

Διάλυμα H₂O₂ (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μL) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8 M αραιώνουμε με H₂O₂, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10mL αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050μL στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 2, 5, 10, 25, 50, μg/mL), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 4.10). Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει την μέθοδο. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε **μεθανόλη** χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 4.11).

Πίνακας 4.10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	9	8	7	6	5
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μL	400μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μL	500μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μL	50μL
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50mL	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							

	Τυφλό	Control	9	8	7	6	5
Εκχύλισμα	-	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
DMSO	50μL	50μL	-	-	-	-	-
V τελ	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL

Πίνακας 4.11: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε **μεθανόλη**

	Τυφλό	9	8	7	6	5
H ₂ O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Εκχύλισμα	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
DMSO	50μL	-	-	-	-	-
V τελ	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL	1050μL

4.5.5.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS•+ και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}\bullet+ = [(A_0 - A_d) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_d: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS•+ που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS•+ κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

4.5.6 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

4.5.6.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 mL TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

-PBS (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000mL), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 mL), Na₂HPO₄ 48,1mM (1,44gr/1000mL), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000mL). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

-AAPH 100mM: 13,56mg AAPH σε 500μL PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

-AAPH 15 mM: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/mL.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μL) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελεικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά

που βρίσκονται στο (Πίνακα 4.12).

Πίνακας 4.12: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control (-)	8 μ L	-	2 μ L	-
AAPH 15mM (+)	4 μ L	-	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (4 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (8 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (16 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (32 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (64 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (128 μ g/mL)	1 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Εκχ. (128 μ g/mL)	5 μ L	3 μ L	2 μ L	-

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μ L διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/mL) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

4.5.6.2 Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO•, που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και

S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{X}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

4.5.7 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)

4.5.7.1 Πειραματική πορεία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 mL TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση τριών εκ των εννέα εκχυλισμάτων και σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 75, 150, 300, 600, 1200, 2400, 4800 $\mu\text{g/mL}$. Τα συγκεκριμένα τρία δείγματα (3,7,9) ήταν τα μόνα τα οποία διαλύθηκαν σε νερό, κάτι το οποίο δε συνέβη στα υπόλοιπα έξι. Για το λόγο αυτόν μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεθανόλης, αιθανόλης και DMSO με τις ρίζες OH•. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η μεθανόλη και η αιθανόλη σε συγκεντρώσεις $\geq 0,1\%$ και το DMSO σε συγκεντρώσεις $\geq 0,05\%$ έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες OH•. Δοκιμάστηκε έτσι η δυνατότητας διάλυσης των έξι δειγμάτων τόσο σε συγκεντρώσεις κάτω του 0,1% μεθανόλης και αιθανόλης όσο και συγκεντρώσεις κάτω του 0,05% DMSO, χωρίς αποτέλεσμα.

Αμέσως πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 40mM. Το stock διάλυμα H_2O_2 (8,8M) αλλά και το αντίστοιχο αραιωμένο (40mM -αραίωση 1/44) είναι φωτοευαίσθητα, γι' αυτό και τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή τους διατηρούνται στον πάγο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στο (Πίνακα 4.13)

Πίνακας 4.13: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control (-)	2 μL	6 μL	-	2 μL	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μL	4 μL	-	2 μL	2 μL	+
Εκχ. (150)	2 μL	1 μL	3 μL	2 μL	2 μL	+

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
μg/mL)						
Εκχ. (300 μg/mL)	2 μL	1 μL	3μL	2μL	2μL	+
Εκχ. (600 μg/mL)	2 μL	1 μL	3μL	2μL	2μL	+
Εκχ. (1200 μg/mL)	2 μL	1 μL	3μL	2μL	2μL	+
Εκχ. (2400 μg/mL)	2 μL	1 μL	3μL	2μL	2μL	+
Εκχ. (4800 μg/mL)	2 μL	1 μL	3μL	2μL	2μL	+
Εκχ. (4800 μg/mL)	2 μL	3 μL	3μL	2 μL	-	-

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μL. Στο μίγμα της αντίδρασης περιέχονται 1μg (2μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl και 1 mM EDTA (pH 8), το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 40 mM H₂O₂ (2 μL).

Αμέσως μετά την προσθήκη του H₂O₂ τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται κάτω από μια λάμπα UV ακτινοβολίας 300 W (OSRAM) για 3 min σε απόσταση 50 cm. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8).

Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/mL) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (1μg πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ώστε να παρατηρηθεί τυχόν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA.

4.5.7.2 Στατιστικά ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH•, που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H₂O₂ υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

όπου:

S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S₀ το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία) και

S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία.

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

5.1 Ανάλυση HPLC

Κατά την επεξεργασία του ροδιού στα εννέα προαναφερθέντα στάδια (από καρπό έως χυμό) όπως εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία (όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 4) προσδιορίστηκαν οι εμπεριεχόμενες πολυφαινόλες ποιοτικά και ποσοτικά με HPLC. Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Πίνακα 5.1) καθώς και τα συγκριτικά σχήματα (5.1-5.10).

Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις καμπύλες αναφοράς με τις πρότυπες ουσίες. Τέλος, τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg ανά g ξηρής ουσίας.

Πίνακας 5.1 Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Π-κουμαρικό οξύ-Ελλαγικό οξύ	0,97	3,36	1,43	4,09	0,78	4,75	4,04	5,59	7,13
Χλωρογενικό οξύ	0,48	0,55	0,42	0,77	0,16	0,52	1,02	0,99	0,69
Κατεχίνη	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Κερκετίνη	0,33	0,42	0,31	0,56	0,13	0,40	0,73	0,74	0,50
Επικατεχίνη	0,64	0,43	0,31	0,78	0,19	0,73	1,24	0,85	0,62
Trans-ρεσβερατρόλη	0,44	0,50	0,38	0,72	0,15	0,50	0,96	0,94	0,66
Φλοριζίνη	0,36	0,46	0,29	0,53	0,11	0,37	0,70	0,68	0,48

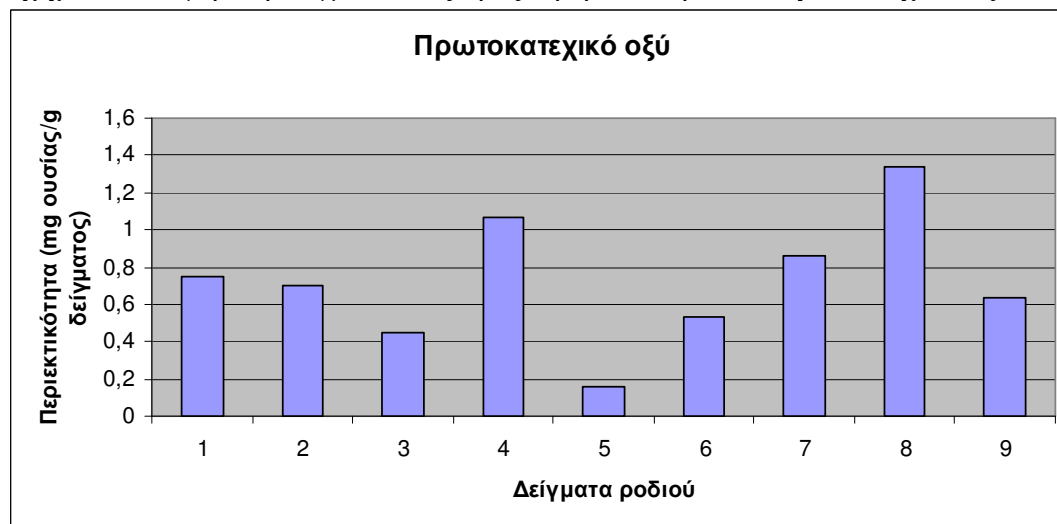
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(phloridzin)									
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,75	0,70	0,45	1,07	0,15	0,53	0,86	1,33	0,63
Γαλλικό οξύ	1,79	1,68	1,28	2,32	0,44	1,62	2,87	2,84	2,00
Καφεϊκό οξύ	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	Nd	nd	nd
Φερουλικό οξύ	0,45	0,53	0,39	0,74	0,16	0,50	0,98	0,95	0,67
Ρουτίνη	0,92	1,14	1,00	1,48	0,41	1,06	1,98	1,85	1,37

nd: not detected

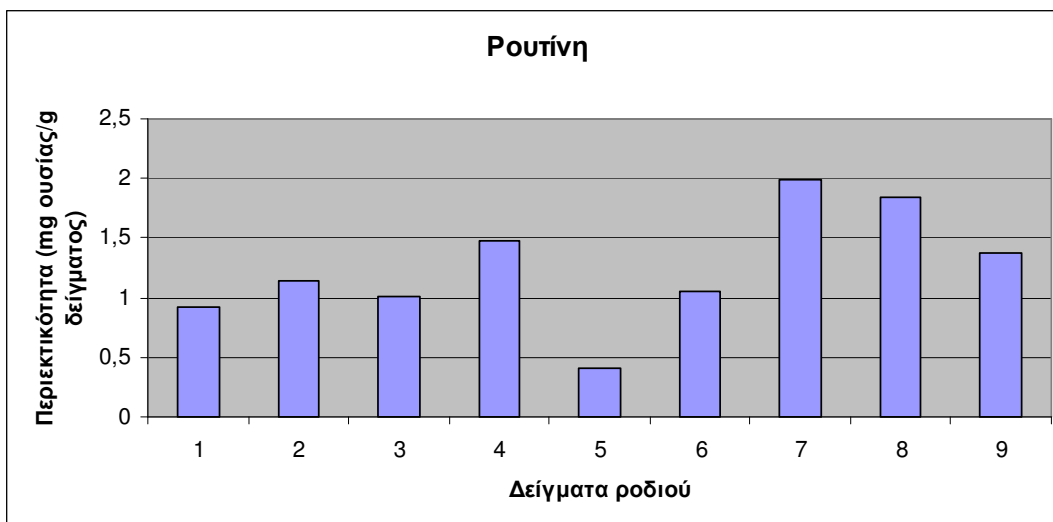
Σχήμα 5.1 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **κερκετίνη**



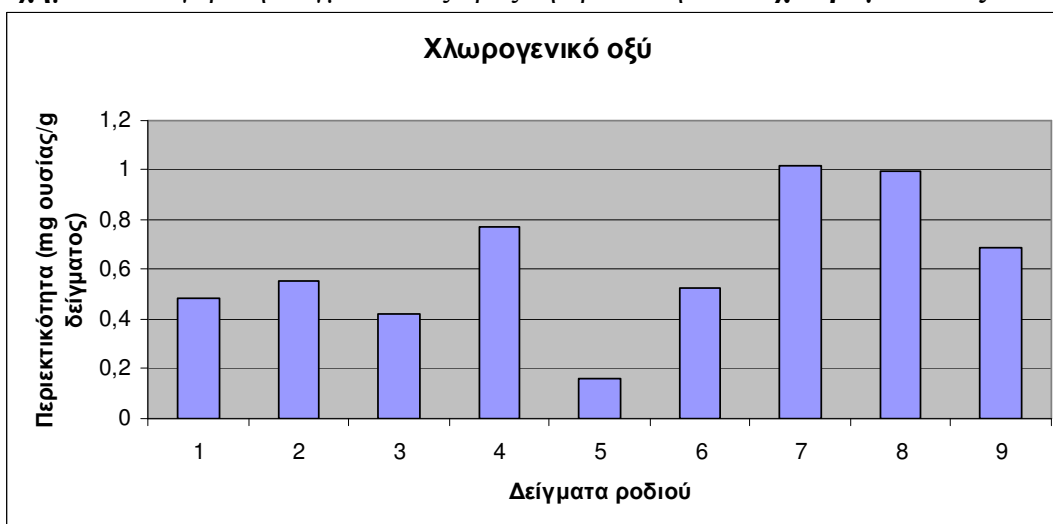
Σχήμα 5.2 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **πρωκατεχικό οξύ**



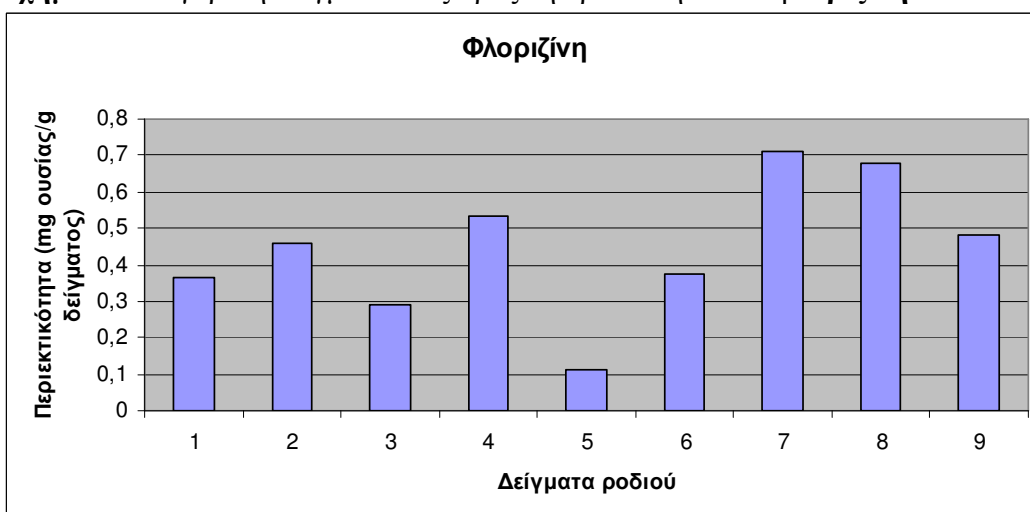
Σχήμα 5.3 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **ρουτίνη**



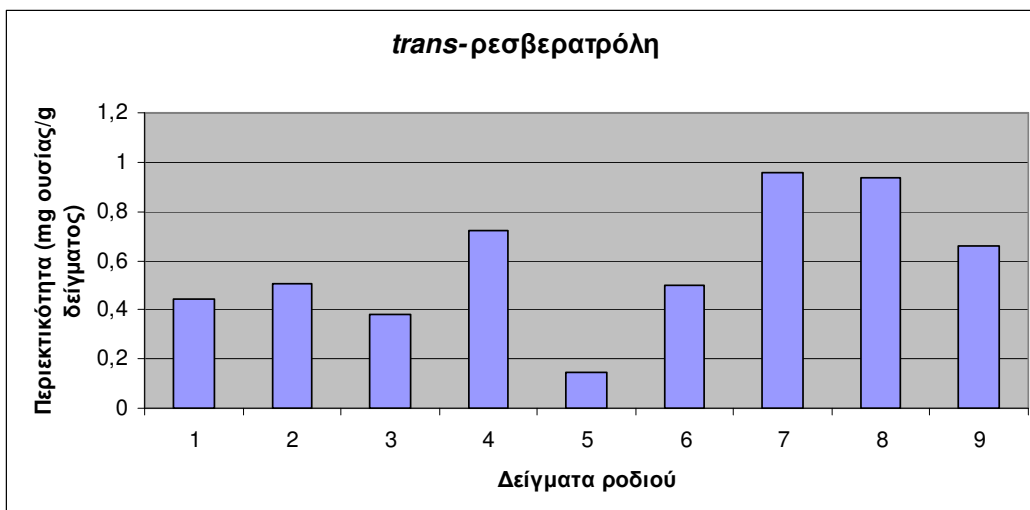
Σχήμα 5.4 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία *χλωρογενικό οξύ*



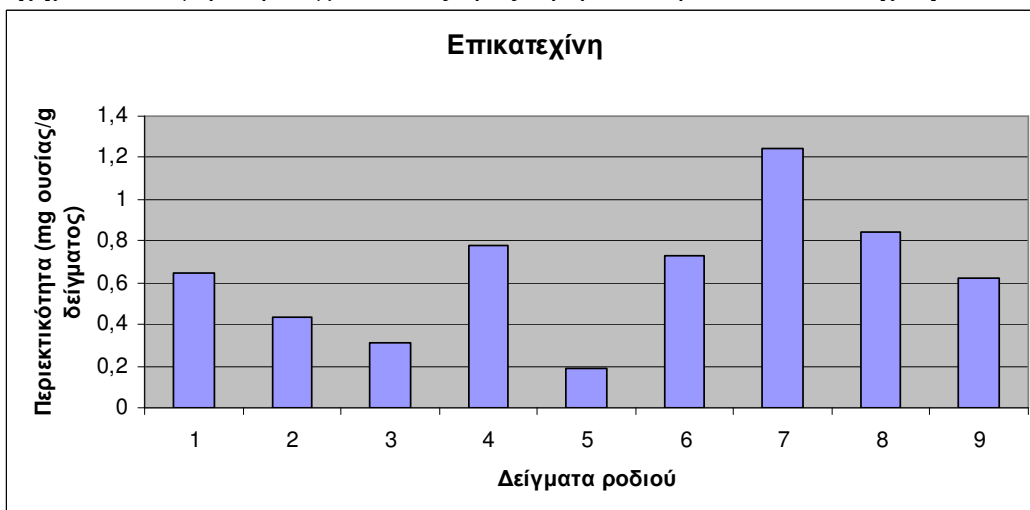
Σχήμα 5.5 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία *φλοριζίνη*



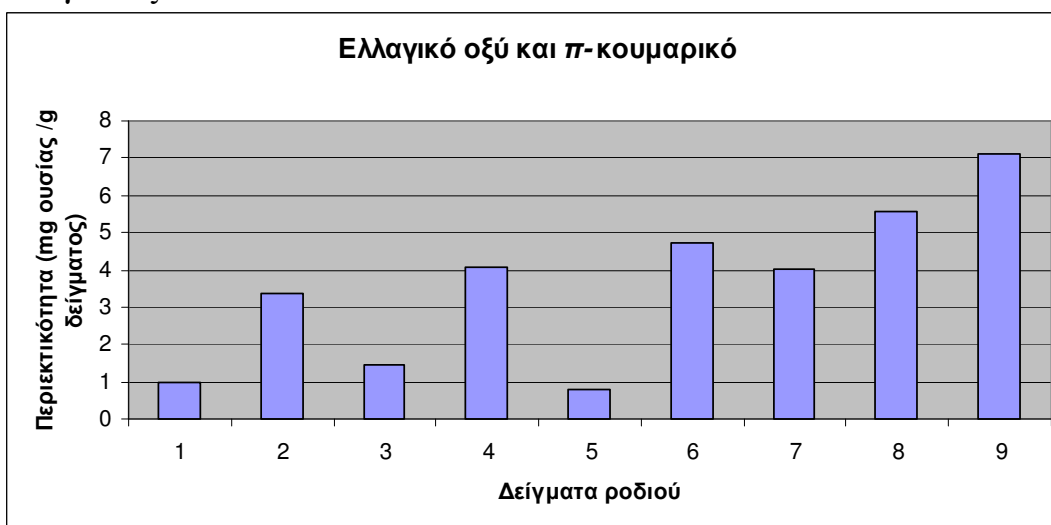
Σχήμα 5.6 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία *trans-ρεσβερατρόλη*



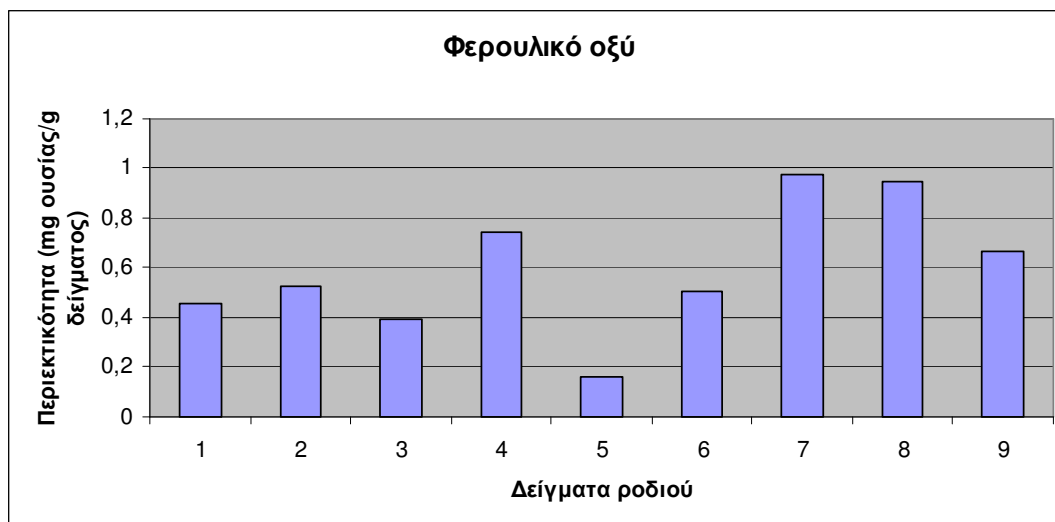
Σχήμα 5.7 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **επικατεχίνη**



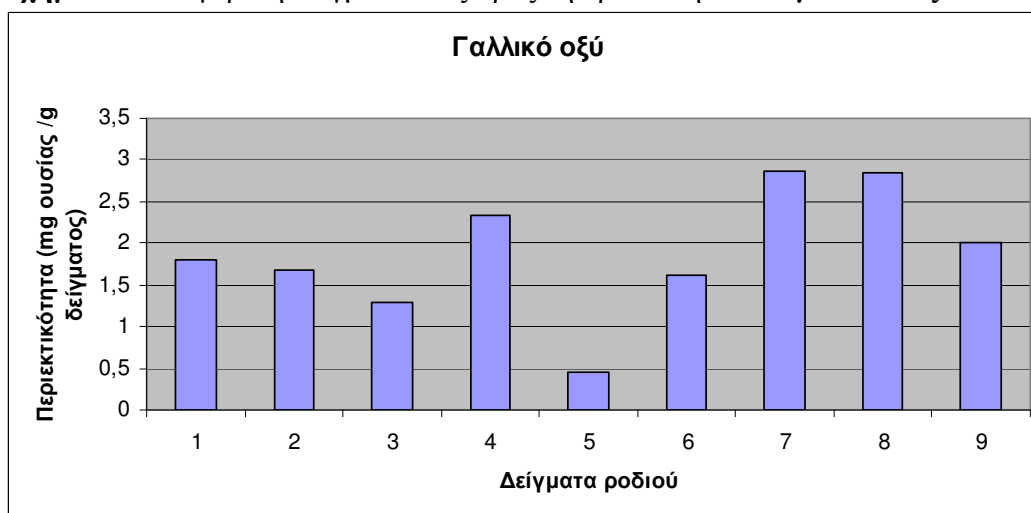
Σχήμα 5.8 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **π-κουμαρικό οξύ και ελλαγικό οξύ**



Σχήμα 5.9 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **φερουλικό οξύ**



Σχήμα 5.10 Σύγκριση δειγμάτων ως προς τη δραστική ουσία **γαλλικό οξύ**



5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε το σύνολο των εμπεριεχόμενων πολυφαινολών. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ήταν των Folin-Ciocalteu.

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.2) με τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και τα συγκριτικά σχήματα. Τα αποτελέσματα, υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg/L ξηρής ουσίας. Στο (Σχήμα 5.11) παρουσιάζει τη σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φαινολικών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.2

Δείγματα ροδιού	Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg/L)
1	309,28
2	382,14
3	1786,43

Δείγματα ροδιού	Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg/L)
4	216,43
5	595
6	307,86
7	456,43
8	719,28
9	405

Σχήμα 5.11 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση ολικών φαινολικών.



5.3 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

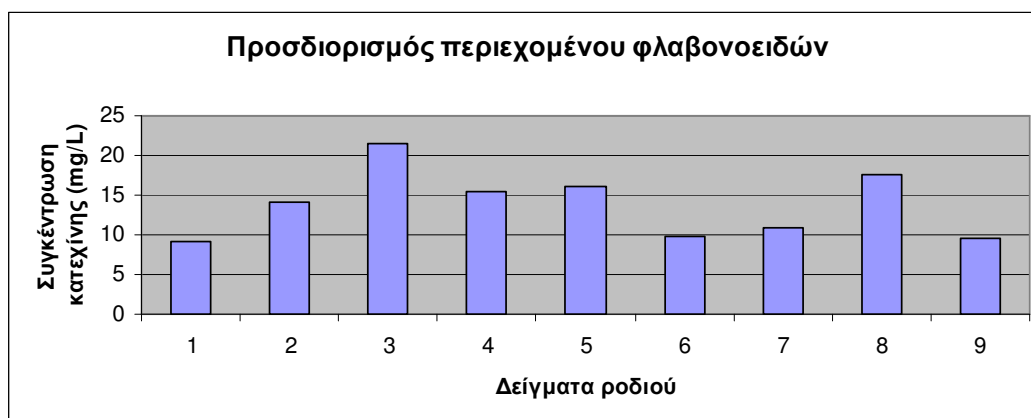
Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών, ήταν μια παραλλαγή του Gunes και των συνεργατών του.

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.3) με τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και τα συγκριτικά σχήματα. Τα αποτελέσματα, υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία τη κατεχίνη. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg/L ξηρής ουσίας. Στο (Σχήμα 5.12) παρουσιάζει τη σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.3

Δείγματα ροδιού	Συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)
1	9,11
2	14,11
3	21,61
4	15,36
5	16,05
6	9,80
7	10,92
8	17,58
9	9,67

Σχήμα 5.12 Απεικόνιση δειγμάτων ολικών φλαβονοειδών



5.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

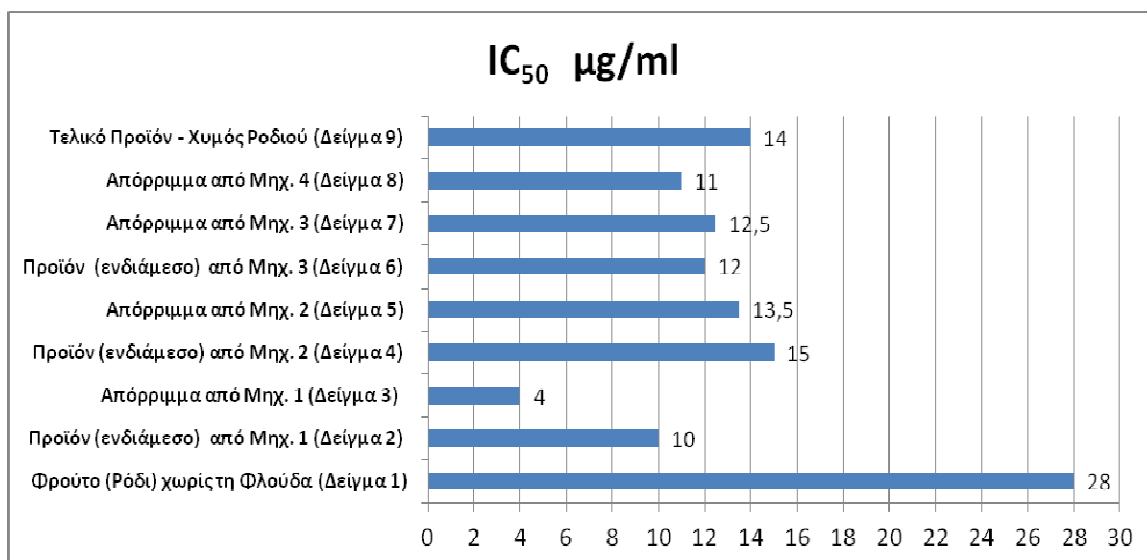
Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλισματά των ροδιών. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν η DPPH.

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.4) με τη σειρά δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε IC_{50} μg ανά mL. Στο (Σχήμα 5.13) παρουσιάζει τη σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.4

DPPH δειγμάτων ροδιού	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
1	28
2	10
3	4
4	15
5	13,5
6	12
7	12,5
8	11
9	14

Σχήμα 5.13 Σύγκριση των δειγμάτων με τη μέθοδο DPPH



5.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

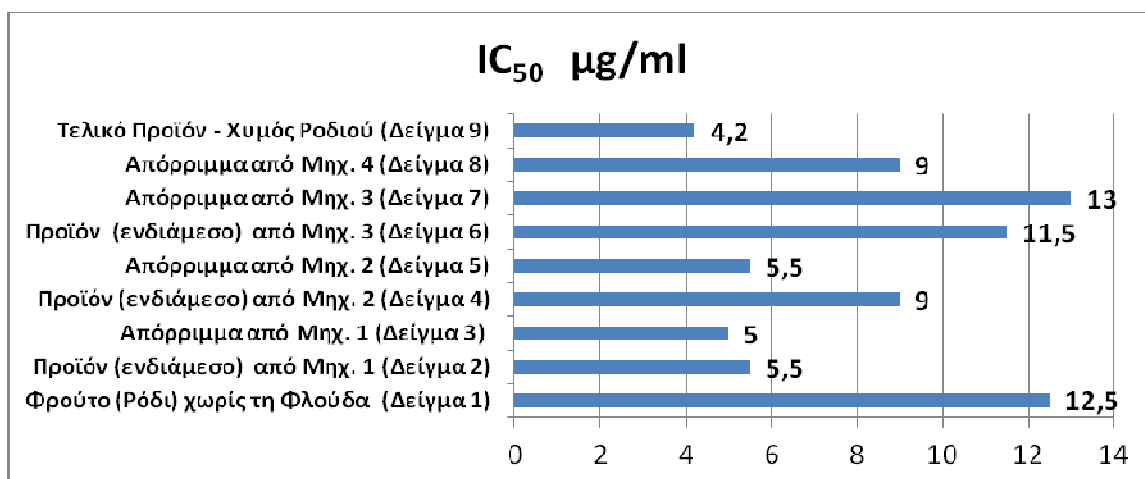
Επιπλέον, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των ροδιών χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος ABTS^{•+}.

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.5) με τη σειρά δραστηρότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι της ρίζας ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε IC₅₀ µg ανά mL. Στο (Σχήμα 5.14) παρουσιάζεται η σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.5

ABTS δειγμάτων ροδιού	IC ₅₀ µg/mL
1	12,5
2	5,5
3	5
4	9
5	5,5
6	11,5
7	13
8	9
9	4,2

Σχήμα 5.14 Σύγκριση των δειγμάτων με τη μέθοδο ABTS



5.6 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

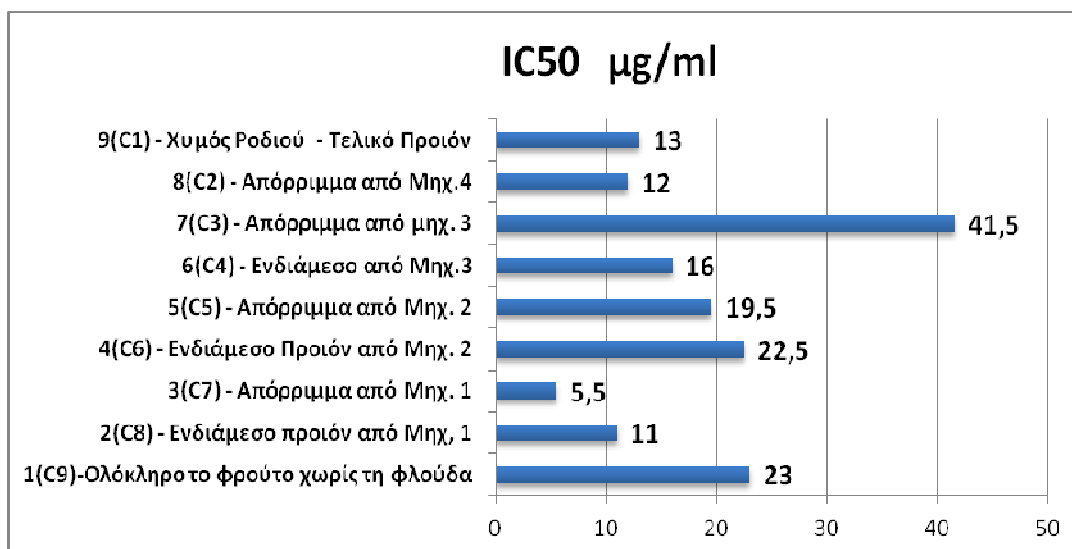
Για τα εννέα στάδια επεξεργασίας του ροδιού μελετήθηκε η επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.6) με τη σειρά δραστηριότητας της των εκχυλισμάτων έναντι των επαγόμενων από τις ρίζες ROO[•] ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε IC₅₀ μg ανά mL. Στο (Σχήμα 5.15) παρουσιάζει τη σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.6

Δείγμα ροδιού	IC ₅₀ μg/mL
1	23
2	11
3	5,5
4	22,5
5	19,5
6	16
7	41,5
8	12
9	13

Σχήμα 5.15 Σύγκριση των δειγμάτων



5.7 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)

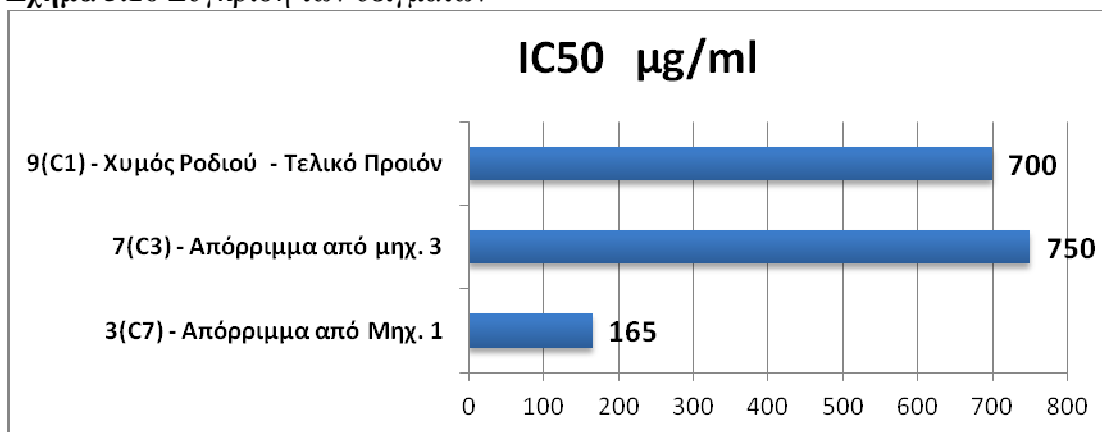
Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν στα τρία στάδια επεξεργασίας του ροδιού (δείγμα 3,7,9) η επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).

Παρακάτω παρατίθεται ο (Πίνακας 5.7) με τη σειρά δραστηριότητας της των εκχυλισμάτων έναντι των επαγόμενων από τις ρίζες OH• ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε IC₅₀ µg ανά mL. Στο (Σχήμα 5.16) παρουσιάζεται τη σύγκριση ως προς το προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 5.7

Δείγμα ροδιού	IC ₅₀ µg/M
3	165
7	750
9	700

Σχήμα 5.16 Σύγκριση των δειγμάτων



Κεφάλαιο 6. Συζήτηση

6.1 Σύγκριση ανάλυση HPLC

Στο σύνολο των εκχυλισμάτων των ροδιών, και από τα εννέα στάδια επεξεργασίας παρατηρήθηκε σημαντική ποσότητα βιοενεργών ουσιών. Από τη χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) διαπιστώθηκε υψηλή περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ, σε όλα τα δείγματα και για όλα τα στάδια επεξεργασίας, με το χυμό ροδιού (δείγμα 9) να παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση και στα δυο οξέα και τα σπέρματα (δείγμα 5) χαμηλότερη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε βιοενεργές ουσίες παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις της πούλπας (δείγμα 8), του ενδιάμεσου προϊόντος υπό μορφή πουρέ (δείγμα 4) καθώς και του απορρίμματος πριν το τελικό στάδιο του χυμού (δείγμα 7).

Τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφική ανάλυση (HPLC), είναι παρόμοια των αποτελεσμάτων από άλλες επιστημονικές έρευνες όπου έχουν διεξαχθεί.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο (Πίνακας 6.1, 6.2) όπου φαίνονται οι ποσότητες των δραστικών μορίων από άλλες επιστημονικές έρευνες. Τυχόν, διαφορές που παρουσιάζονται στις ποσότητες φαινολικών συστατικών οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, στις διαφορετικές ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε επιστημονική έρευνα καθώς και στο κλίμα και το έδαφος της συγκεκριμένης καλλιέργειας.

Πίνακας 6.1

Φαινολικά	Χυμός	Φλοιός	Μεσοκάρπια	Βιβλιογραφία
Ελλαγικό οξύ	7.2 ± 0.5 mg/L	637.7 ± 32.8 mg/kg ξηρής ουσίας	234.2 ± 13.0 mg/kg ξηρής ουσίας	Ulrike A. et al. 2011
Γαλλικό οξύ	1.8 ± 0.1 mg/L	270.4 ± 18.5 mg/kg ξηρής ουσίας	Nq	
Καφεϊκό οξύ	6.1 ± 0.2 mg/L	-	-	
Πρωτοκατεχικό οξύ	0.8 ± 0.0 mg/L	-	-	
Φερουλικό	3.6 ± 0.1	-	-	

Πίνακας 6.2

Φαινολικά	Σπέρματα	Πούλπα	Φλοιός	Βιβλιογραφία
Κατεχίνη	-	92.3±1.2 mg/100g ξηρής ουσίας	126.7±7.1 mg/100g ξηρής ουσίας	
Καφεϊκό οξύ	3.4 ±0.3 mg/100g ξηρής ουσίας	13.6± 1.2 mg/100g ξηρής ουσίας	21.4±3.8 mg/100g ξηρής ουσίας	
Επικατεχίνη	6.1 ±0.3 mg/100g ξηρής ουσίας	10.5±2.1 mg/100g ξηρής ουσίας	29.5± 3.1 mg/100g ξηρής ουσίας	
Φερουλικό	1.1± 0.3	1.8±0.3	18.9±1.6	

	mg/100g ξηρής ουσίας	mg/100g ξηρής ουσίας	mg/100g ξηρής ουσίας	GARIMA PANDE et al.2009
Π-κουμαρικό οξύ	3.2 ±0.1 mg/100g ξηρής ουσίας	7.5±0.5 mg/100g ξηρής ουσίας	5.1±0.3 mg/100g ξηρής ουσίας	
Κερκετίνη	11.1±1.4 mg/100g ξηρής ουσίας	72.1±5.9 mg/100g ξηρής ουσίας	99.2±7.2 mg/100g ξηρής ουσίας	

6.2 Σύγκριση μεθόδου ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών

Χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών προσδιορίστηκε οι ποσότητες αυτών στο σύνολο των δειγμάτων. Και με τις δυο μεθόδους παρατηρείται σημαντική ποσότητα ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών στο φλοιό και λιγότερη αλλά εξίσου σημαντική στη πούλπα και στα σπέρματα.

Τέλος, η ποσότητα των ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών στο καρπό (δείγμα 1) είναι μικρότερη σε σύγκριση με το χυμό (δείγμα 9). Αυτό εκτιμάται ότι οφείλεται στη περιεκτικότητα του τελικού σταδίου σε ποσότητα φλοιού του ροδιού.

6.3 Σύγκριση της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

Τα εκχυλίσματα των ροδιών σε όλα τα στάδια επεξεργασίας έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν παραπλήσια ή και ισχυρότερη μεταξύ των σταδίων. Και με τις δύο μεθόδους, που χρησιμοποιήθηκαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει ο φλοιός (δείγμα 3).

Η σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης μεταξύ των εκχυλισμάτων των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας διαφέρει μεταξύ των δύο εξεταζόμενων μεθόδων, αυτό οφείλεται στη διαφορετική χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Επιπρόσθετα, αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

6.6 Σύγκριση της επαγόμενης από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

Τα εκχυλίσματα των ροδιών έδειξαν ότι αναστέλλουν ισχυρά τις προκαλούμενες από ρίζες ROO• βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές από 5,5-41,5 IC₅₀ μg/mL. Ισχυρότερη δράση είχε ο φλοιός (δείγμα 3) τρία και ασθενέστερη το απόρριμα (δείγμα 7).

6.7 Σύγκριση της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).

Τα εκχυλίσματα των ροδιών έδειξαν ότι έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες OH• βλάβες στο πλασμιδιακό DNA από 165-700 IC₅₀ μg/mL. Ισχυρότερη δράση είχε το εκχύλισμα του φλοιού του ροδιού (δείγμα 3) ενώ την ασθενέστερη το απόρριμα (δείγμα 7).

Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών που προκαλούνται από τις ρίζες OH• στο DNA δείχνει πιθανώς ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκινογένεση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες) που οφείλονται σε επαγόμενες από ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA.

Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα

Το ρόδι ως καρπός παρουσιάζει εξαιρετικές βιολογικές δράσεις με πολλαπλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Ο φλοιός του ροδιού παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στάδια επεξεργασίας του.
- Το στάδιο πριν από τη παραγωγή του τελικού χυμού παρουσιάζει και αυτό υψηλές ποσότητες ολικών φαινολικών, ολικών φλαβονοειδών καθώς και σε αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιογόνο δράση.
- Παρουσιάζονται διακυμάνσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων σταδίων. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές ποσότητες συστατικών που εμπεριέχονται στο κάθε στάδιο π.χ. όπου υπάρχει ο φλοιός του ροδιού διακρίνονται καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια.
- Ο χυμός του ροδιού παρουσιάζει υψηλότερη ποσότητα σε ολικά φαινολικά, ολικά φλαβονοειδή καθώς και σε αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιογόνο δράση σε σχέση με το καρπό. Αυτό οφείλεται, στο ότι το τελικό στάδιο του χυμού περιέχεται ποσότητα φλοιού σε αντίθεση με το καρπό που εμπεριέχονται μόνο τα επισπέρμια και τα σπέρματα.

Η δράση του φλοιού (δείγμα 3) ως προς τα αποτελέσματα για την αντιοξειδωτική δράση και την αντιμεταλλαξιογόνο δράση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών.

Τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις και ίσως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτική δράση. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον δείχνουν τα αποτελέσματα από το φλοιό του

ροδιού, όπου είναι ένα προϊόν όπου δεν χρησιμοποιείται στη διατροφή. Έτσι, θα μπορούσαν να παρασκευαστούν με χαμηλό κόστος παρασκευάσματα καλλυντικών, συμπληρωμάτων διατροφής. Τέλος, χρειάζονται περισσότερες και πιο εμπειριστατωμένες μελέτες για το ρόδι και τις ευεργετικές του λειτουργίες στην υγεία.

Κεφάλαιο 8. Βιβλιογραφία

8.1 Κεφάλαιο 1

- **Abelson J.** 2006: Pomegranate sows seeds of popularity. *The Boston Globe*. 12-10.
- **Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H.** 2005: Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 113:423–33.
- **Al-Zoreky NS.** 2009: Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *Int J Food Microbiol* 134:244–8.
- **Alzamora SM, Salvatori D, Tapia SM, López-Malo A, Welti-Chanes J, Fito P.** 2005: Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J Food Eng* 67:205–14.
- **Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y.** 2000: High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatog A* 896:87–93.
- **Aslam MN, Lansky EP, Varani J.** 2006: Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 103:311–8.
- **Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B.** 2000: Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clinl Nutr* 71:1062–76.
- **Aviram M, Dornfeld L.** 2001: Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin-converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158(1):195–8.
- **Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T.** 2004: Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 23(3):423–33.
- **Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S.** 2009: Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol* 47:50–4.

- **Balasundram** N, Sundram K, Samman S. 2006: Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99:191–203.
- **Barzegar** M, Fadavi A, Azizi MH. 2004: An investigation on the physico-chemical composition of various pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Yazd. *Iranian J Food Sci Technol* 2:9–14.
- **Basu** A, Penugonda K. 2009: Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev* 67(1):49–56.
- **Blumenfeld** A., Shaya F. and Hillel R. Cultivation of pomegranate. In Melgarejo- Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.). 2000: Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology. Zaragoza : *CIHEAM-IAMZ*.
- **Braga** LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahaski JA, Carmo LS, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. 2005a: Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol* 96:335–9.
- **Çam** M, Hıslı Y, Durmaz G. 2009: Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 112:721–6.
- **Celik** I, Temur A, Isik I. 2009: Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chem Toxicol* 47(1):145–9.
- **Cerdá** B, Ceron JJ, Tomas-Barberan FA, Espin JC. 2003: Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem* 51:3493–501.
- **Cerdá** B, Espin JC, Parra S, Martinez P, Tomas-Barberan FA. 2004: The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 43:205–20.
- **Cheng** JT, Liu IM. 2000: Stimulatory effect of caffeic acid on alpha1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:122–7.
- **Cho** H, Yun CW, Park WK, Kong JY, Kim KS, Park Y, Lee S, Kim BK. 2004: Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res* 49:37–43.

- **Choi** JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, Kim MS, Sohn DH, Kim HS, Park H, Shin DW, Rho JR, Kwon DY. 2009: In vitro and in vivo antibacterial activity of Punica granatum peels ethanol extract against salmonella. *Evid Based Compl Alter Med* 17:1–8.
- **Clifford** MN, Scalbert A. 2000: Review: ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1118–25.
- **Daker** M, Abdullah N, Vikineswary S, Goh PC, Kuppusamy UR. 2008: Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. *Food Chem* 107:1092–8.
- **Dao** TT, Chi YS, Kim J, Kim HP, Kimb S, Parka H. 2004: Synthesis and inhibitory activity against COX-2 catalyzed prostaglandin production of chrysin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1165–7.
- **Das** AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Saha BP, Pal M. 2001: Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother Res* 15(7):628–9.
- **Davidson** MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provos JC, Liker H, Aviram M. 2009: Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame J Cardiol* 104(7):936–42.
- **Di Silvestro** RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. 2009: Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phytother Res* 23:1123–7.
- **Duman** AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. 2009: Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules* 14:1808–17.
- [EC] European Commission. 1999: European Commission concerted action on functional food science in Europe: Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr* 81(1):1–27.
- **El-Nemr** SE, Ismail IA, Ragab M. 2006: Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Die Nahrung* 34(7):601–6.
- **Esmailzadeh** A, Azadbakht L. 2008: Food intake patterns may explain the high prevalence of cardiovascular risk factors among Iranian women. *J Nutr* 138(8):1469–75.
- **Evreinoff**, V.A., 1953: Pomological studies of the pomegranate. *Ecole Natl. Super. Agron. Ann.* 1:141.154.

- **Fadavi A**, Barzegar M, Azizi MH, Bayat M. 2005: Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in Iran. *Food Sci Technol Int* 11:113–9.
- **Fadavi A**, Barzegar M, Azizi HM. 2006: Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *J Food Comp Anal* 19:676–80.
- **Fan J**, Watanabe T. 2003: Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10:63–71.
- **Feng W**, Zheng X. 2007: Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Cont* 18:1126–30.
- **Fernández-López J**, Viuda-Martos M, Sendra E, Sayas-Barber'a E, Navarro C, Pèrez-Alvarez JA. 2007: Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *Eur Food Res Technol* 226(1–2):1–6.
- **Forest CP**, Padma-Nathan H, Liker HR. 2007: Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study. *Int J Impot Res* 19(6):564–7
- **Fuhrman B**, Volkova N, Aviran M. 2005: Pomegranate juice oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J Nutr Biochem* 16:570–6.
- **Fuhrman B**, Volkova N, Aviran M. 2010: Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutr* 26(4):359–66.
- **Galaverna G**, Di Silvestro G, Cassano A, Sforza S, Docena A, Drioli E, Marchelli R. 2008: A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chem* 106:1021–30.
- **García-Segovia P**, Andres-Bello A, Martinez-Monzo J. 2007: Effect of cooking method on mechanical properties, color and structure of beef muscle (*M. pectoralis*). *J Food Eng* 80:813–21.
- **Gil MI**, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000: Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581–9.
- **Gould SWJ**, Fielder MD, Kelly AF, Naughton DP. 2009: Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. *BMC Comple Alter Med* 9:23.

- **Haidari M**, Ali M, Casscells SW, Madjid M. 2009: Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed*. DOI:10.1016/j.phymed.2009.06.002.
- **Halliwell B**, Zhao K, Whiteman ML. 2000: The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action. *Free Rad Res* 33:819–30.
- **Hamad AW**, Al-Momene W. 2009: Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnol* 25(1):286.
- **Hartmann, H.**, W. Flocker and A. Kofranek, 1981: *Plant Science* (growth, development and Utilization of cultivated plants) p.619. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- **Heinecke JW**. 2006: Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander. *J Exp Med* 203(4):813–6.
- **Hodgson, R.W.**, 1917: The pomegranate. Calif. Agr. Expt. Sta. Bul. 276, pp 162-163.
- **Hong MY**, Seeram NP, Heber D. 2008: Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells over-expressing the androgen receptor. *J Nut Biochem* 19:848–55.
- **Huang THW**, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. 2005: Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicol App Pharmacol* 207:160–9.
- **[IFIC]** International Food Information Council. 2009: Functional foods: attitudinal research. International Food Information Council web site. Available from: <http://www.ific.org/research/funcfoodsres02.cfm>. Accessed Oct 2009.
- **[IFT]** Institute of Food Technologists. 2009: Functional foods: opportunities and challenges. Institute of Food Technologists web site. Available from: http://members.ift.org/IFT/Research/IFTExpertReports/functionalfoods_report.htm. Accessed Oct 2009.
- **Ignarro LJ**, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. 2006: Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide* 15:93–102.
- **Jahfar M**, Vijayan KK, Azadi P. 2003: Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res J Chem Environ* 7:43–50.

- **Jaiswal V**, DerMarderosian A, Porter JR. 2010: Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum L.*). *Food Chem* 118:11–6.
- **Johnson IT**. 2004: New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mut Res* 551:9–28.
- **Katz SR**, Newman RA, Lansky EP. 2007: *Punica granatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *J Med Food* 10(2):213–7.
- **Kaur G**, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. 2006: *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 44(7):984–93.
- **Kihara, H.**, 1958: Breeding of seedless fruit. *Seiken Ziho* 9:1-7.
- **Kong JM**, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. 2003: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* 64(5):923–33.
- **Koyama S**, Cobb LJ, Mehta HH, Seeram NP, Heber D, Pantuck AJ, Cohen P. 2010: Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm IGF Res* 20(1):55–62.
- **Lan J**, Lei F, Hua L, Wang Y, Xing D, Du L. 2009: Transport behavior of ellagic acid of pomegranate leaf tannins and its correlation with total cholesterol alteration in HepG2 cells. *Biomed Chromatogr* 23:531–6.
- **Lansky EP**, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. 2005a: Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs* 23:11–20.
- **Lansky EP**, Harrison G, Froom P, Jiang WG. 2005b: Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™. *Invest New Drugs* 23:121–2.
- **Lansky EP**, Newman RA. 2007: *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177–206.
- **Larrosa M**, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuno M, Toti S, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espina JC. 2010: Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nut Biochem* 21(8):717–25.
- **Lavker RM**. 1995: Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: Gilchrist BA, editor. Photodamage. Cambridge, Mass.: *Blackwell Science*. p 123–35.

- **Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wanga CC.** 2010: Anti inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118:315–22.
- **Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD.** 2005: *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J Ethnopharmacol* 99:239–44.
- **Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S.** 2006: Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 96(2):254–60.
- **Li Y, Qi Y, Huang THW, Yamahara J, Roufogalis BD.** 2008 : Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α - γ activator properties. *Diab Obes Meta* 10(1):10–7.
- **Lionakis S.M.** 9-10 Nov 1994: Present Status and Future Prospects of the Cultivation in Greece of the Plants Fig, Japanese Persimmon, Pomegranate and Barbary Fig in : Cultures Fruitières Sous-Utilisées dans la Région Méditerranéenne. First meeting of the CIHEAM Cooperative Working Group on Underutilized Fruit Crops in the Mediterranean Region, Zaragoza (Spain).
- **Longtin R.** 2003: The pomegranate: nature's power fruit. *J Natl Cancer Inst* 95:346–8
- **López AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ.** 2006: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747–57.
- **Mackay J, Mensah G.** 2004: The atlas of heart disease and stroke. Geneva, Switzerland: World Health Org.
- **Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H.** 2005: Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 102(41):14813–8.
- **Marín FR, Martínez M, Uribealgo T, Castillo S, Frutos MJ.** 2001: Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem* 78:319–24.
- **Martínez JJ, Melgarejo P, Hernández F, Salazar DM, Martínez R.** 2006: Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties. *Sci Hortic* 110:241–6.
- **Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K.** 2002: Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem* 50:7244–8.

- **McCarrell** EM, Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, El-Sankary W, Naughton DP. 2008: Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Comple Alter Med* 8:64.
- **Martínez** JJ, Melgarejo P, Hernández F, Salazar DM, Martínez R. 2006: Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties. *Sci Hortic* 110:241–6.
- **Mc Gregor**, S.E., 1976: insect Pollination of Cultivated Crop Plants. *Agriculture Handbook* No.496. Agric. Res. Ser. USDA.
- **Meerts** IATM, Verspeek-Rip CM, Buskens CAF, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, van Huygevoort AHBM, van Otterdijk FM, van de Waart EJ. 2009: Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol* 47(6):1085–92.
- **Mertens-Talcott** SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. 2006: Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 54:8956–61.
- **Mirdehghan** SH, Rahemi M. 2007: Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit. *Sci Hort* 111(2):120–7.
- **Mousavinejad** G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. 2009: Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem* 115:1274–8.
- **Naveena** BM, Sen AR, Kingsly RP, Singh DB, Kondaiah N. 2008: Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *Int J Food Sci Technol* 43:1807–12.
- **Niva** M. 2007: “All foods affect health”: understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* 48:384–93.
- **Noda** Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. 2002: Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 50:166–71.
- **Nomura** Y, Tamaki Y, Tanaka T, Arakawa H, Tsurumoto A, Kirimura K, Sato T, Hanada N, Kamo K. 2006: Screening of periodontitis with salivary enzyme tests. *J Oral Sci* 48:177–83.
- **Ohno** T, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito Y, Tomono S, Kawazu S. 1993: Genistein augments cyclic adenosine 3'5'-monophosphate (CAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr Res* 19:273–85.

- **Ozerony**, G. Vand M.A. Ozerova, 1960: The relationship between the water regimes in fruit and leaves. *Fiziol. Rost.* 7:600-601.
- **Ozgul-Yucel S.** 2005: Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *J Am Oil Chem Soc* 82(12):893–7.
- **Palou A**, Serra F, Pico C. 2003 : General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *Eur J Clin Nutr* 57:12–7.
- **Parmar HS**, Kar A. 2007: Antidiabetic potential of Citrus sinensis and Punica granatum peel extracts in alloxan-treated male mice. *BioFac* 31(1):17–24.
- **Pèrez-Alvarez JA**, Sayas-Barber´a E, Fernández-López J. 2003: Aspectos generales de los alimentos funcionales. In: Pèrez-Alvarez JA, Sayas-Barber´a E, Fernández-López J, editors. Alimentos funcionales y dieta Mediterr´anea. Elche: Univ. Miguel Hern´andez. p 31–8.
- **Pèrez-Alvarez JA.** 2008 : Los alimentos del bienestar: alimentaci´on del siglo XXI. *IAlimentos* 3:54.
- **Pèrez-Vicente A**, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. 2002 : In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 50:2308–12.
- **Petti S**, Scully C. 2009: Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dent* 37:413–23.
- **Pillai NR.** 1992: Anti-diarrhoeal activity of Punica granatum in experimental animals. *Int J Pharmacol* 30(3):201–4.
- **Poyrazoglu E**, G¨okmen V, Artuk N. 2002: Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *J Food Comp Anal* 15:567–75.
- **Prashanth DJ**, Asha MK, Amit A. 2001: Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 72:171–3.
- **Raybaudi-Massilia RM**, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Mart´ın-Belloso O. 2009: Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 8:157–80.
- **Reddy MK**, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. 2007: Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum L.* *Planta Med* 73:461–7.
- **Roberfroid MB.** 2002: Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nut* 88:133–8.

- **Russo F**, Chimienti G, Riezzo G, Pepe G, Petrosillo G, Chiloiro M, Marconi E. 2008: Inulin-enriched pasta affects lipid profile and Lp(a) concentrations in Italian young healthy male volunteers. *Eur J Nutr* 47(8):453–9.
- **Sakagami Y**, Murata H, Nakanishi T, Inatomi Y, Watabe K, Iinuma M, Tanaka T, Murata J, Long FA. 2001: Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Health Sci* 47:473–7.
- **Sayas-Barbería E**, López-Vargas JH, Pérez-Alvarez JA. 2010b: The role of fiber in cardiovascular diseases: a review. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 9:240–58.
- **Scalbert A**, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2005: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nut* 45:287–306.
- **Seeram NP**, Lee R, Heber D. 2004: Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta* 348:63–8.
- **Seeram N**, Lee R, Hardy M, Heber D. 2005a: Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep Purif Technol* 41:49–55.
- **Seeram NP**, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005b: In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nut Biochem* 16:360–7.
- **Seeram N**, Liker H, Wang H, Elashoff R, Heber D, Aviram M, Ignarro L, Beldegrun A. 2006: Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12:4018–26.
- **Seeram NP**, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. 2006: Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 h. *J Nutr* 136:2481–5.
- **Seeram NP**, Zhang Y, McKeever R, Henning SM, Lee RP, Suchard MA, Li Z, Chen S, Thames G, Zerlin A, Nguyen M, Wang D, Dreher M, Heber D. 2008a: Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J Med Food* 11(2):390–4.
- **Sezer ED**, Akçay YD, İlhanbey B, Yıldırım HK, Sözmen EY. 2007: Pomegranate wine has greater protection capacity than red wine on low-density lipoprotein oxidation. *J Med Food* 10(2):371–4.

- **Shukla M**, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. 2008: Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutr* 24:733–43.
- **Sicree R**, Shaw JE, Zimmet PZ. 2003: The global burden of diabetes. In: Gan D, editor. Diabetes atlas. 2nd ed. Brussels: *Intl. Diabetes Federation*. p 15–71.
- **Singh M**, Arseneault M, Sanderson T, Morthy V, Ramassamy C. 2008: Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism and cellular and molecular mechanism. *J Agric Food Chem* 56:4855–73
- **Soobrattee MA**, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. 2005: Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Res* 579:200–13.
- **Syed DN**, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Afaq F, Mukhtar H. 2006: Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol* 82(2):398–405
- **Syed DN**, Afaq F, Mukhtar H. 2007: Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol* 17:377–85.
- **Tanaka T**, Sugie S. 2008: Inhibition of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *J Toxicol Pathol* 20(4):215–35.
- **Tezcan F**, Gu' ltekin-O' zgu'ven M, Diken T, O' zc,elik B, Erim FB. 2009: Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem* 115(3):873–7.
- **Türk G**, S'onmez M, Aydin M, Y'uce A, G'ur S, Y'uksel M, Aksu EH, Aksoy H. 2008: Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nut* 27(2):289–96.
- **Tzulker R**, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. 2007: Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem* 55:9559–70.
- **Valko M**, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007 :Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
- **Van Elswijk DA**, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, van der Greef J. 2004: Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochem* 65(2):233–41.

- **Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JC.** 2003: Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 46(5–6):192–6.
- **Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM.** 2003: Studies on the toxicity of *Punica granatum L. (Punicaceae)* whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol* 89:295–300.
- **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pèrez-Alvarez JA.** 2008: Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control* 19:1130–8.
- **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pèrez-Alvarez JA.** 2010a : Spices as functional foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nut In Press*.
- **Viuda-Martos M, López-Marcos MC, Fernández-López J, Sendra E, Sayas-Barber´a E, López-Vargas JH, Pèrez-Alvarez JA.** 2010b : The role of fiber in cardiovascular diseases: a review. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 9:240–58.
- **Viuda-Martos M., J. Fernández-López, and J.A. Pèrez-´Alvarez.**2010: Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp635-654
- **Voravuthikunchai SP, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Honda T.** 2005: Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Health Sci* 51(5):590–6.
- **Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK.** 2005: Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 135:48–52.
- **Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK.** 2002: Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 277:34933–40.
- **Widmer R, Ziaja I, Grune T.** 2006: Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radical Res* 40(12):1259–68.
- **Xu S, Touyz RM.** 2006: Reactive oxygen species and vascular remodeling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 22(11):947–51.
- **Xu KZY, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y.** 2009: Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *J Ethnopharmacol* 123(2):280–7.

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Δρογούδη Π.** και Τσιπουρίδης Κ. 2007: 1.Η καλλιέργεια της ροδιάς. Γεωργία-Κτηνοτροφία.
- **Ορφανός.** 2000: Ξεκίνησε μία Ενδιαφέρουσα Χρονιά για τα Ρόδια. Περιοδικό Φρουτονέα.93: 20-22
- **Ποντίκης Κ.** Ειδική Δενδροκομία. Ροδιά σελ.433-438
- **Στατιστική Επετηρίδα Ελλάδας,** 1984.
- **Φραγκούλη Ν.** Χρυσοφόρα ρόδια μέσω Ισραήλ σε Θεσσαλία και Β. Ελλάδα. Εφημερίδα Agrenda. 2006: 36.
- **Χρυσοχέρης, Φ.,** 1969: Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας.

8.2 Κεφάλαιο 2

- **Bors W,** Heller W, Michel C, Saran M.1990: Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186: 343-355
- **Bravo L,**1998: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Rev*,56: 317-333
- **Deiana M,** Aruoma IO, De Lourdes P, Bianchi M, Spencer PEJ, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu PF.1999 : Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Rad Bio Med*,26:762-769
- **Edgecombe SC,** Strech GL, Hayball PJ.2000: Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr*, 130:2996-3002
- **Griffiths LA,** Barrow A.1972: Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J*,130: 1161-1162

- **Harborne** JB.1989: Methods in plant biochemistry, *I: Plant phenolics*. London: Academic Press.
- **Harborne** JB.1993: *The flavonoids: Advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall.
- **Hermann** H.1988: On the occurrence of flavonol and flavanone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch*,186:1-5
- **Hertog** MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S et al.1995: Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*,155:381-386
- **Ho** CT, Lee CY, Huang MT.1992: Phenolic compounds in food and their effects on health, I: analysis, occurrence and chemistry. ACS Symposium Series 506. Washington, DC: American Chemical Society.
- **Hollman** PCH, De Vries JHM, Van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB.1995: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 62:1276-1282
- **Hollman** PCH, Van der Gaag M, Mengelers MJB, Van Trijp JM, De Vries JE, Katan MB.1996: Absorption and deposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med*, 21:703-707
- **Hollman** PCH.1997: Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr*,51 (S1): 66-69
- **Hu** C, Kitts DD.2001: Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Mol Cell Biochem*, 218:147-155
- **King** RA, Broadbent JL, Head RJ.1996: Absorption of the soy isoflavonone genistein in rats. *J Nutr*, 126:176-182
- **Kühnau** J.1976: The flavonoids: a class of semi-essential food components:their role in human nutrition.*World Rev Nutr Diet*,24:117-191
- **Leth** T, Justesen U. 1998: Analysis of flavonoids in fruits, vegetables and beverages by HPLC-UV and LC-MS and estimation of the total daily flavonoids intake in food. In: *Polyphenols in food*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities,pp 39-40
- **Manna** C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D' Angelo S, Zappia V.2000: Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in CaCO₂ cells. *FEBS Letters*,470:341-344
- **Manach** C, Morand C, Texier O, Favie ML, Agullo G, Demigne C, Regeat F, Remesy C.1995: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing

rutin or quercetin. *J Nutr*,125:1911-1922

- **Mazza G.**1995: Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*,35:341-371
- **Porter LW.**1989: Tannins. In: *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. London: Academic Press,pp 389-419
- **Ratty AK, Das NP.**1988: Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem Med Metab Biol*,39: 69-79
- **Rice-Evans C, Miller JN.**1995: Antioxidants-the case for fruits and vegetables in the diet. *Brit Food J*, 97:35-40
- **Servili M, Baldioli M, Miniati E, Montedoro GF.**1996: Antioxidant activity of new phenolic compounds extracts from virgin olive oil and their interaction with α -tocopherol and β - carotene. *Riv Ital Sostanze Grasse*, LXXIII : 55-59
- **Shahidi F, Wanasundara J.**1992: Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32: 67-103
- **Shao W, Powell C, Clifford MN.**1995: The analysis by HPLC of green, black and Puer teas produced in Yunnan. *J Sci Food Agric*, 57:417-426
- **Tsimidou M, Ppadopoulos G, Boskou D.** 1992 : Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by RP-HPLC by emphasis on UV detection. *Food Chem*, 44:53-60
- **Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I.**2001: The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labelled compounds to rats. *J Nutr*, 131: 1993-1996
- **Van der Hof KH, Kivits GAA, Weststrate JA, Tijburg LBM.**1998: Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr*,52: 56-359
- **Vinson AJ.**1998: Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. In: *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum Press., pp 151-164
- **Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A.**2000: Olive oil rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Comm*,278: 797-799
- **Visioli F, Galli C.**1998: The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev*, 56: 142-147
- **Vissers NM, Zock LP, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB.**2002: Olive oil

phenols are absorbed in humans. *J Nutr*,132: 409-41

8.3 Κεφάλαιο 3

- **Akasbi M**, Shoeman DW, Saari Csallany A.1993: High performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils *JAOCS*,70: 367-370
- **-Blekas, G.**, Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. 2002a : On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104, 340-346
- **Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset C.1995: “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Food Science and Technology*, 28, 25–30
- **Brenes M**, Garcia P, Rios JJ, Garrido A.1999: Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem*, 47:3535-3540
- **Bringmann G**, Messer K, Wohlarth M, Kraus J, Dumbuya K, Rucket M.1999: HPLC-MS-MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. *Anal Chem*, 71: 2678-2686
- **Bronner WE**, Beecher GR.1998: Method for determining the content of catechins in tea infusions by high liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 805:137-142
- **Carrasco-Pancorbo, A.**, Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez. 2005a :A Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci*, 28, 837-858.
- **Chang S.T.**, Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001:Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.
- **Frankel, N. E.** 2007 *In: Antioxidants in food and biology, facts and fiction.* Frankel, N. E. (Ed), The Oily Press, England.
- **Gordon, M.H.**, Paiva-Martins, F., Almeida, M. 2001:Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem*, 49, 2480-2485.
- **Gutfinger, T.**1981: Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 966–968.
- **Harborne, J. B.** 1989:Plant phenolics. *In: Methods in plant biochemistry.* Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds), Academic Press, , London, UK, pp. 1-27.

- **Hrciric** K, Fritsche S. 2004:Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in VOO. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 540-549.
- **Karadag**, A., Ozcelik,B., Saner, S. 2009:Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*, 2, 41-60.
- **Keum** Y.S., Park K.K., Lee J.M., Chun K.S., Park J.H., Lee S.K., Kwon H., Surh Y.J. 2000 :Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 150:41-8.
- **Laguerre**, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007 : Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- **Malešev**, D., Kuntić, V. 2007:Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72, 921-939.
- **Markham**, K. R. 1989:Flavones, flavonols and their glycosides. In: *Methods in plant biochemistry*, Volume 1: Plant phenolics. Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds), academic pres Inc., San Diego, pp. 209-212
- **Miller** N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. 1993: A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-12
- **Moon**, J.-K., Shibamoto, T. 2009:Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (5), 1655-1666.
- **Naczki**, M., Shahidi, F. 2006:Phenolics in cereals, fruits and vegetables, occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1523–1542
- **Ordoudi**, S. A., Tsimidou, M. Z. 2006a :Crocic bleaching assay step by step: observations and suggestions for an alternative validated protocol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1663-1671.
- **Owen** RW, Mier W, Giaacosa A, Hully EW, Spiegelhalder B, Bartsch H.2000: Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clin Chem*, 46:976-988
- **Pietta**, P-G. 2000:Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- **Prior** R, Xianli W, Schaich K.2005: “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856.

- **Re R**, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C.1999:“Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radicle Biologyl and Medicine*, 26: 1231–1237.
- **Rise-Evans C. A.**, Miller N. J., Paganga G.,1996: Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956.
- **Roginsky, V.**, Lissi, E. 2005a : Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92, 235-254.
- **Romani A**, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri FF, Cimato A.1999: Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J Agric Food Chem*, 47: 964-967
- **Singleton V. L.**, Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. 1974:Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.
- **Stagos D**, Karaberis E anf Kouretas D, 2005: Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo*: 741-747
- **Tsimidou, M.** 1999:Analysis of virgin olive oil polyphenols. *Seminars in Food Analysis*, 4 (1), 13-29.
- **Visioli, F.**, Galli, G. 2002:Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42, 209-221.
- **Visser T**, Vredenbergregt MJ, Ten Hove GJ, De Jong APJM, Somsen GW .1997: Gradient elution liquid chromatography-infrared spectometry at µg-1 level using capillary column switching and addition of a make-up liquid. A preliminary study. *Annal Chim Acta*, 342:151-158

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Πολυσίου Μόσχος** και **Ταραντίλης Πέτρος**. 2004:Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα Ενόργανη ανάλυση. σελ. 16-21

8.4 Κεφάλαιο 4

- **Garima Pande** and **Casimir C. Akoh**. **2009: Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars.** *J. Agric. Food*

Chem., 57, 9427–9436

- **Gunes G.**, Liu R. and Watkins B.C. 2002: Controlled-Atmosphere Effects on Postharvest Quality and Antioxidant Activity of Cranberry Fruits, *J. Agric. Food Chem.*,50, 5932-5938

Κεφάλαιο 9. Παραρτήματα

Περιεχόμενο συνολικών φλαβονοειδών

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	0,05
2	0,086
3	0,14
4	0,095
5	0,1
6	0,055
7	0,063
8	0,111
9	0,054

Πίνακας 9.1 Συγκέντρωση κατεχίνης

Περιεχόμενο συνολικών φαινολικών

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	0,178
2	0,229
3	1,212
4	0,113
5	0,378
6	0,177
7	0,281
8	0,465
9	0,245

Πίνακας 9.2 Συγκέντρωση γαλλικού οξέως

Ανάλυση HPLC

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	29,0225
2	10,9863
3	11,2954
4	7,7958
5	3,16703
6	10,6123
7	2,63481
8	4,00039
9	5,02078

Πίνακας 9.3 Ανάλυση της HPLC, γαλλικό οξύ

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	11,2248
2	26,0028
3	10,2981
4	9,51208
5	51,4805
6	14,177
7	10,453
8	5,99527

9	14,9028
---	---------

Πίνακας 9.4 Ανάλυση της HPLC, φερουλικό οξύ

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	179,241
2	1907,82
3	776,939
4	1512,34
5	1386,91
6	3079,14
7	967,22
8	1649,83
9	3589,38

Πίνακας 9.5 Ανάλυση της HPLC, π-κουμαρικό οξύ, ελλαγικό οξύ

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	36,5145
2	4,40688
3	2,24253
4	15,9592
5	28,2689
6	37,9742
7	28,051
8	7,39321
9	10,0104

Πίνακας 9.6 Ανάλυση της HPLC, επικατεχίνη

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	3,42802
2	3,83048
3	2,02878
4	2,05308
5	2,21604
6	7,75826
7	3,4788
8	5,17049
9	10,1809

Πίνακας 9.7 Ανάλυση της HPLC, ρεσβερατρόλη

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	9,2911
2	15,301
3	4,04738
4	3,08544
5	4,43061
6	4,9785
7	3,58197
8	2,44683
9	3,60986

Πίνακας 9.8 Ανάλυση της HPLC, φλοριζίνη

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	12,9247
2	14,8302
3	11,3169

4	3,67407
5	8,92478
6	6,68711
7	3,94885
8	4,86484
9	3,54712

Πίνακας 9.9 Ανάλυση της HPLC, χλωρογενικό οξύ

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	89,5738
2	140,108
3	240,098
4	74,0018
5	282,881
6	110,051
7	85,3969
8	58,7272
9	97,6134

Πίνακας 9.10 Ανάλυση της HPLC, ρουτίνη

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	6,75407
2	4,58358
3	3,02917
4	5,19757
5	2,21604
6	2,433
7	1,12516
8	4,91848
9	1,70029

Πίνακας 9.11 Ανάλυση της HPLC, πρωτοκατεχικό οξύ

Δείγματα ροδιού	Απορροφήσεις
1	1,35464
2	5,42586
3	3,76261
4	2,25831
5	9,0898
6	5,04004
7	2,05816
8	3,55464
9	2,53752

Πίνακας 9.12 Ανάλυση της HPLC, κερκετίνη

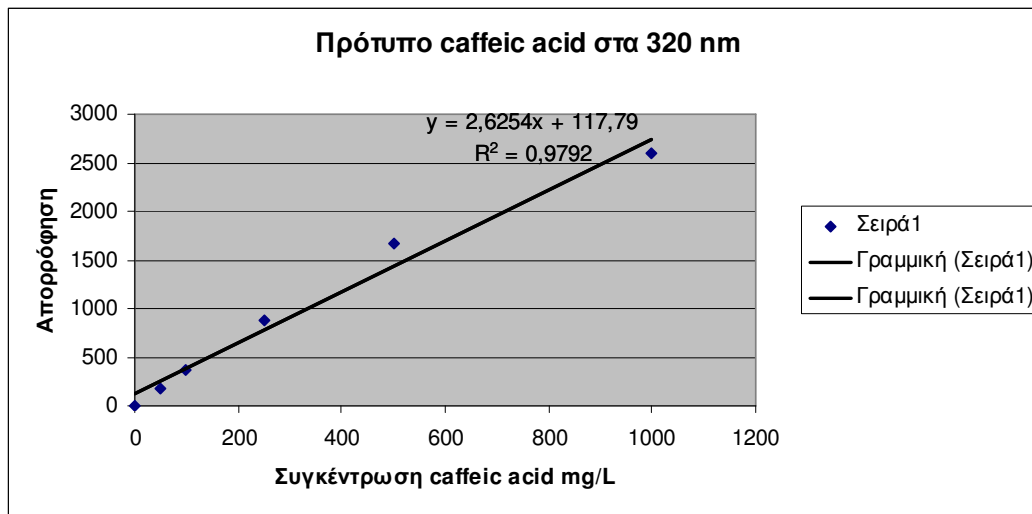
Πρότυπα HPLC

Πίνακας 9.13 Πρότυπο καφεϊκού οξέος

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	178
100	367
250	879

500	1667,58
1000	2603,33

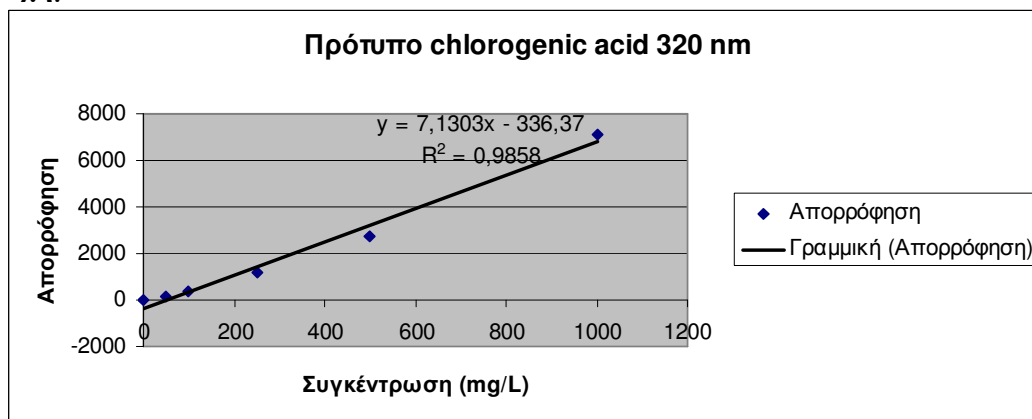
Σχήμα 9.1



Πίνακας 9.15 Προτύπου *χλωρογενικό οξύ*

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	143
100	367
250	1178,04
500	2741,8
1000	7099,24

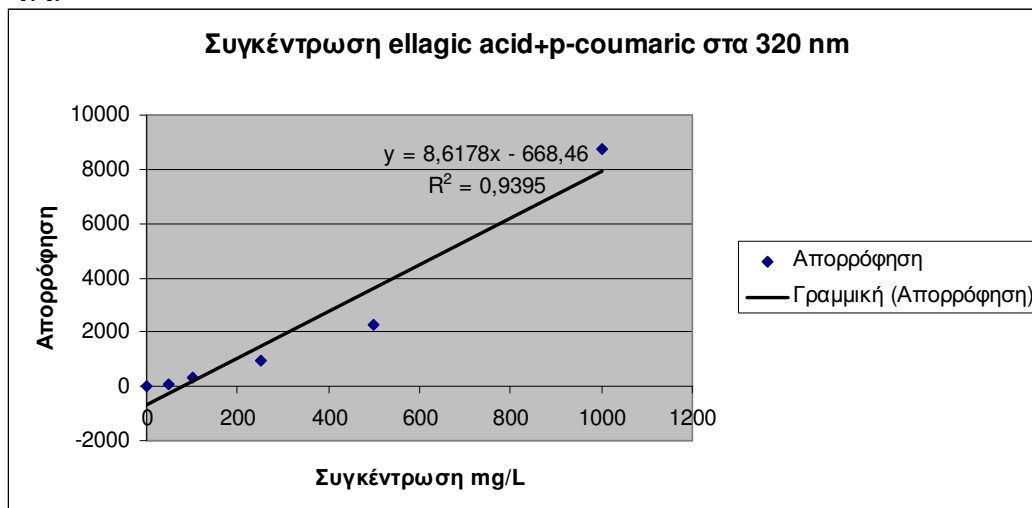
Σχήμα 9.2



Πίνακας 9.16 Προτύπου *π-κουμαρικό οξύ+ ελλαγικό οξύ*

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	73,4547
100	349,26
250	945,167
500	2243,08
1000	8752,04

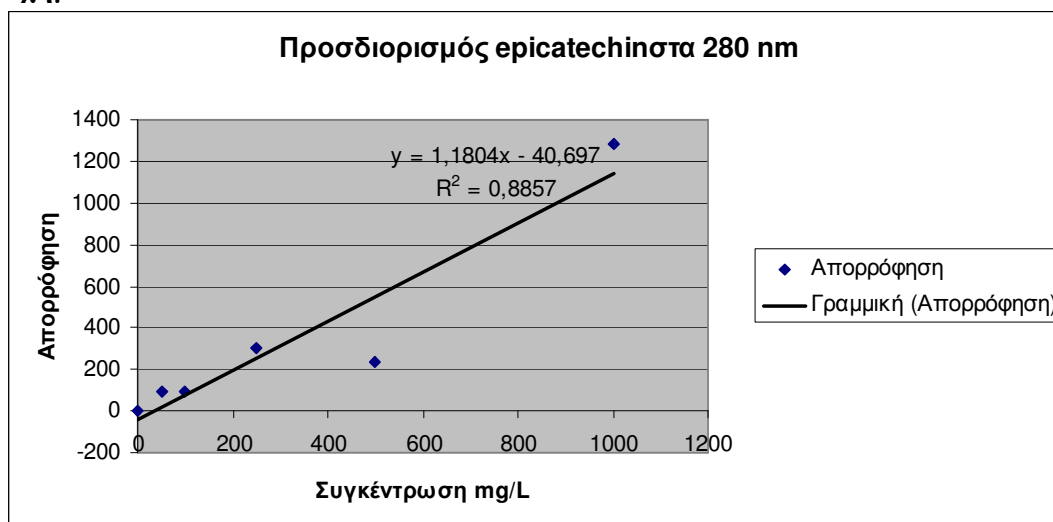
Σχήμα 9.3



Πίνακας 9.17 Προτύπο επικατεχίνης

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	89,5839
100	94,5978
250	300,773
500	232,047
1000	1281,49

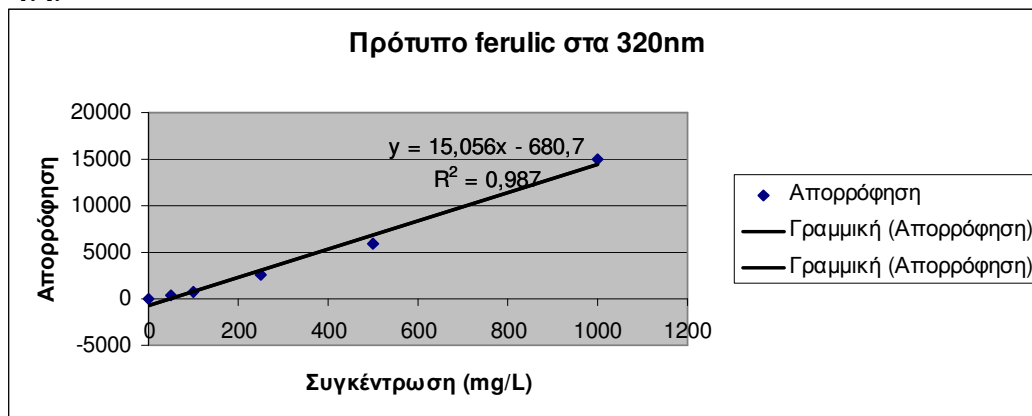
Σχήμα 9.4



Πίνακας 9.18 Προτύπο φερουλικό οξύ

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	320
100	820
250	2509,69
500	5883,13
1000	14.989

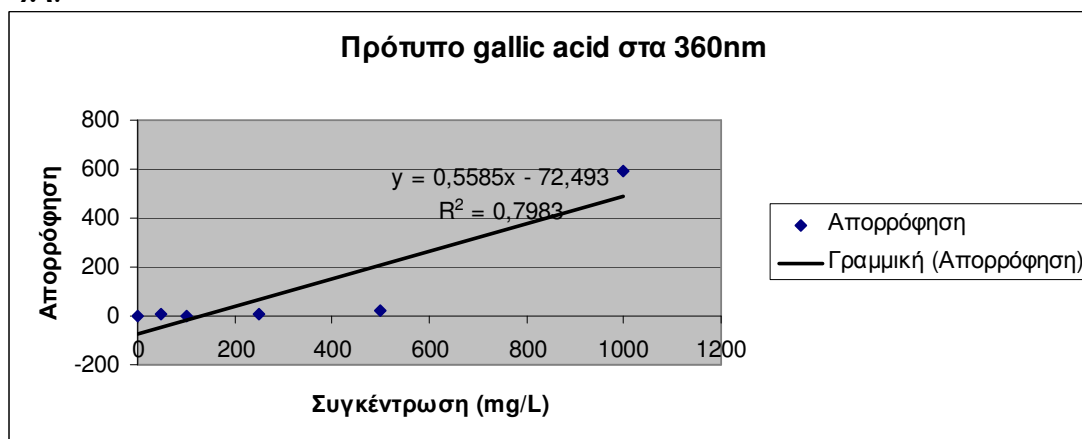
Σχήμα 9.5



Πίνακας 9.19 Προτύπο γαλλικό οξύ

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	5
100	3,60934
250	8
500	20
1000	589

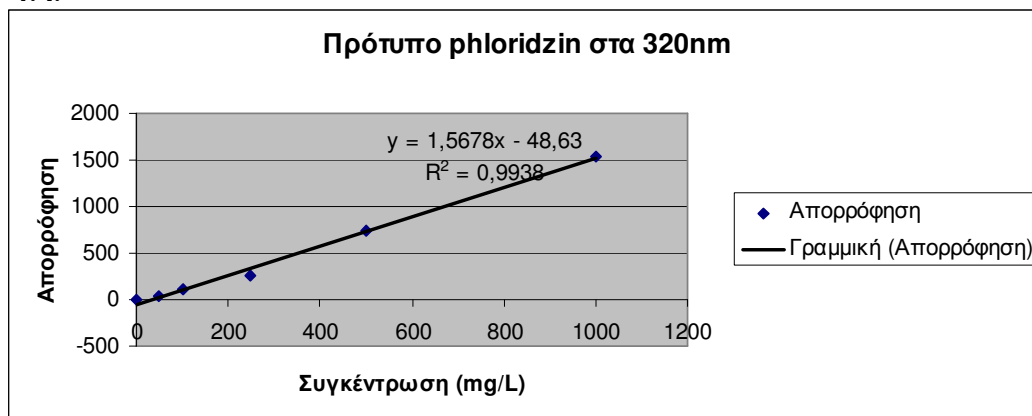
Σχήμα 9.6



Πίνακας 9.20 Προτύπο φλοριζίνη

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	46
100	110
250	253
500	739
1000	1538,63

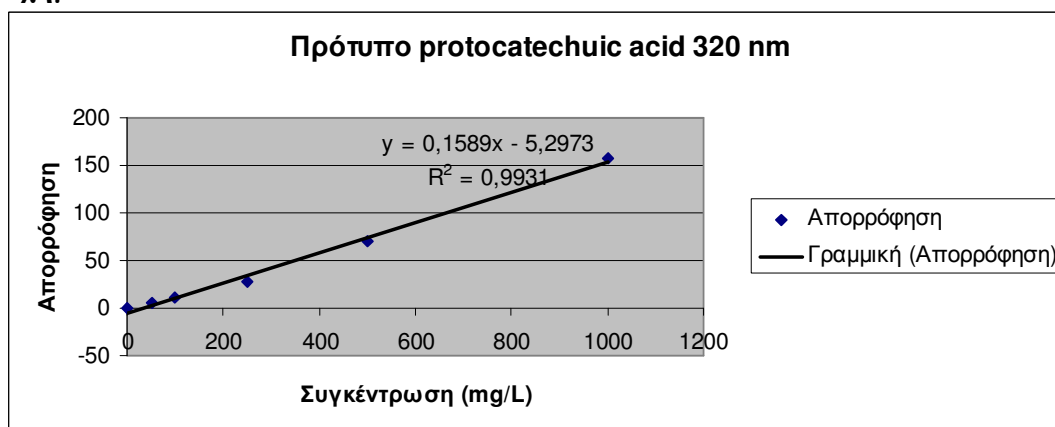
Σχήμα 9.7



Πίνακας 9.21 Πρότυπο *προτοκατεχικό οξύ*

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	5,54465
100	10,2347
250	27,2181
500	69,5046
1000	157,611

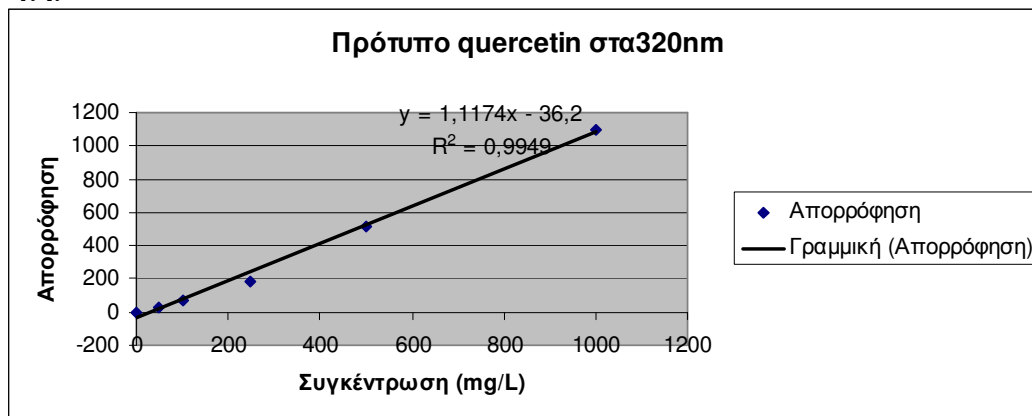
Σχήμα 9.8



Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	29,1788
100	73,4336
250	188,601
500	517,693
1000	1097,03

Πίνακας 9.22 Πρότυπο *κερκετίνη*

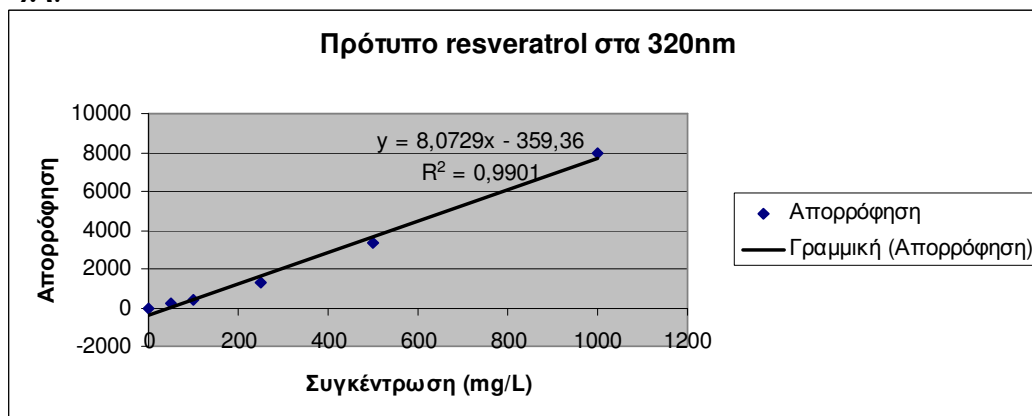
Σχήμα 9.9



Πίνακας 9.23 Πρότυπο ρεσβερατρόλη

Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	178,151
100	392,058
250	1327,54
500	3301,57
1000	7982,99

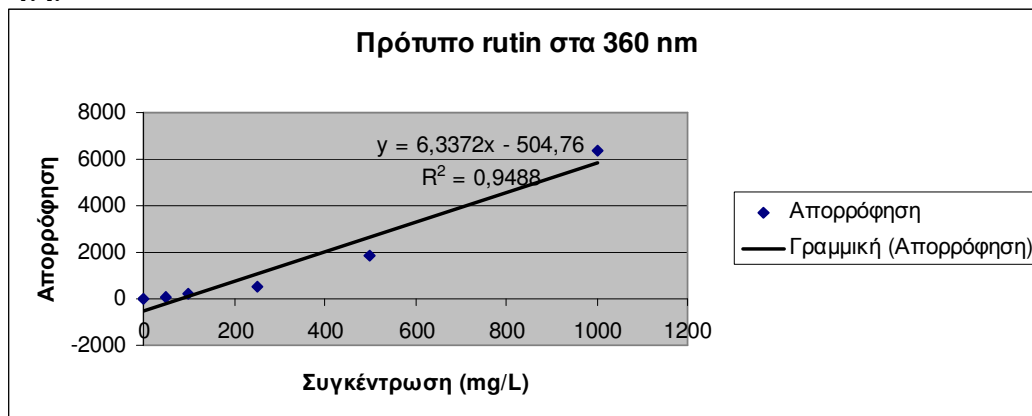
Σχήμα 9.10



Πίνακας 9.24 Πρότυπο ρουτίνη

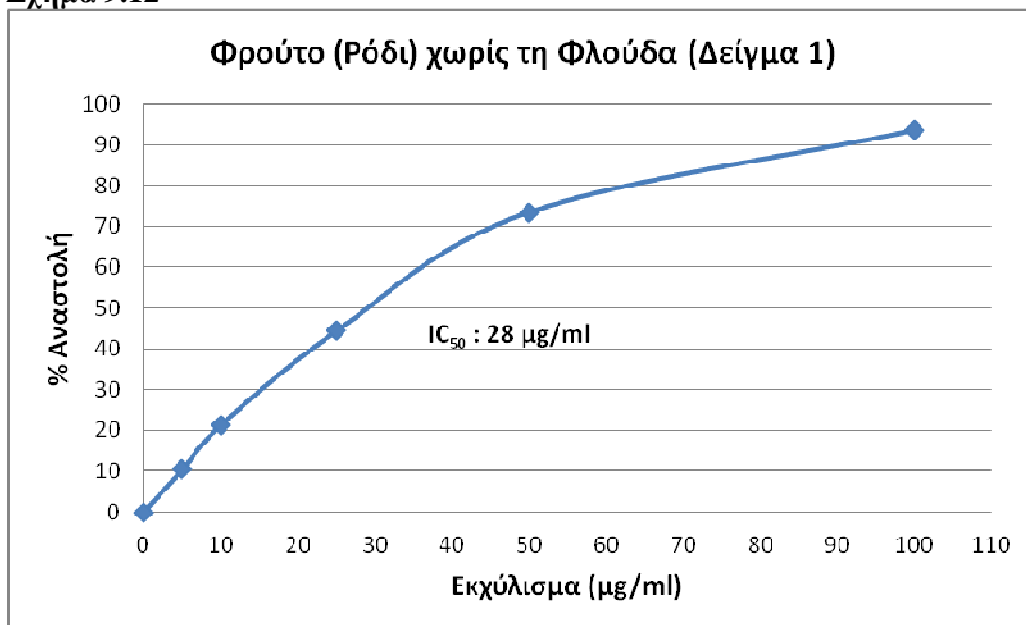
Συγκέντρωση (mg/L)	Απορρόφηση
0	0
50	88,5367
100	192,448
250	513,019
500	1864,61
1000	6353,5

Σχήμα 9.11



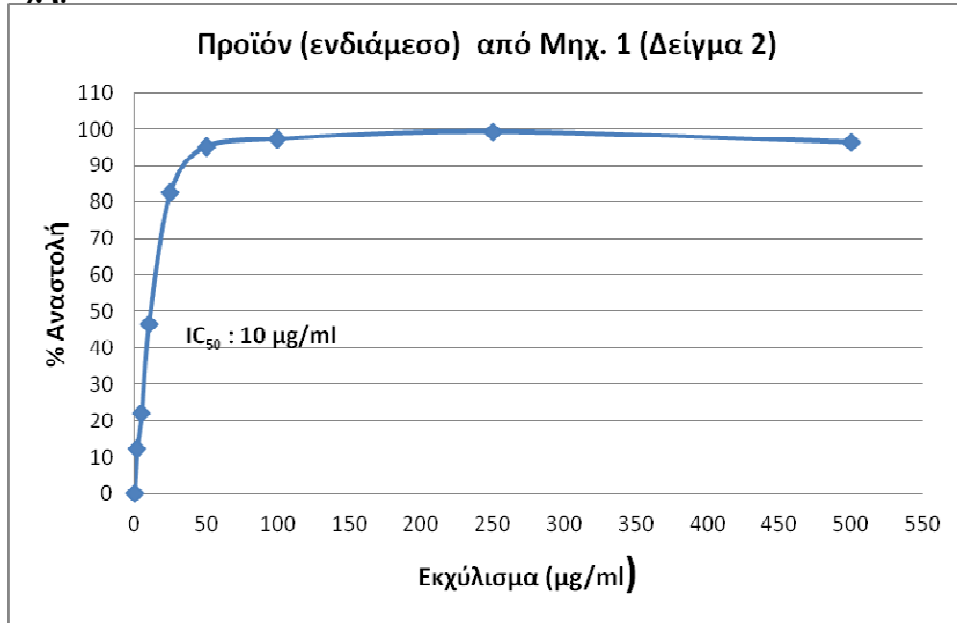
Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH'

Σχήμα 9.12

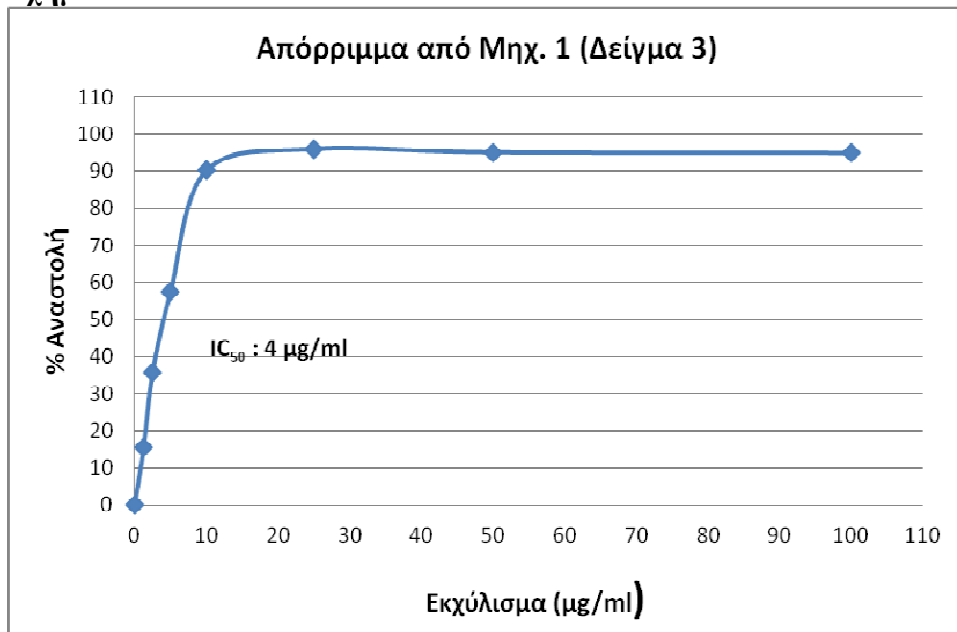


Σχήμα 9.13

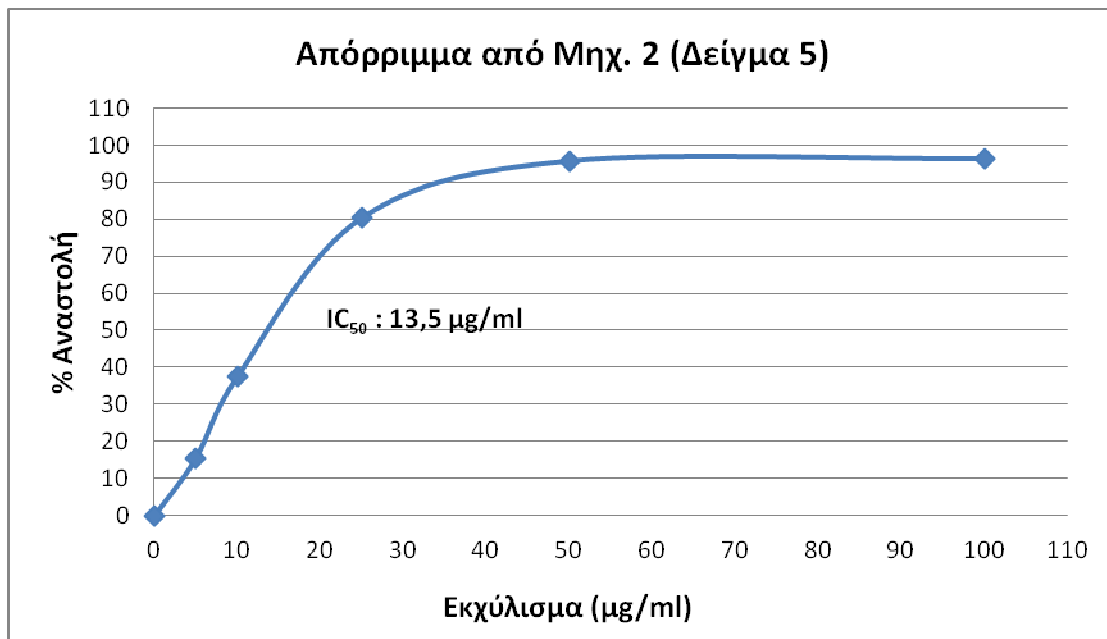
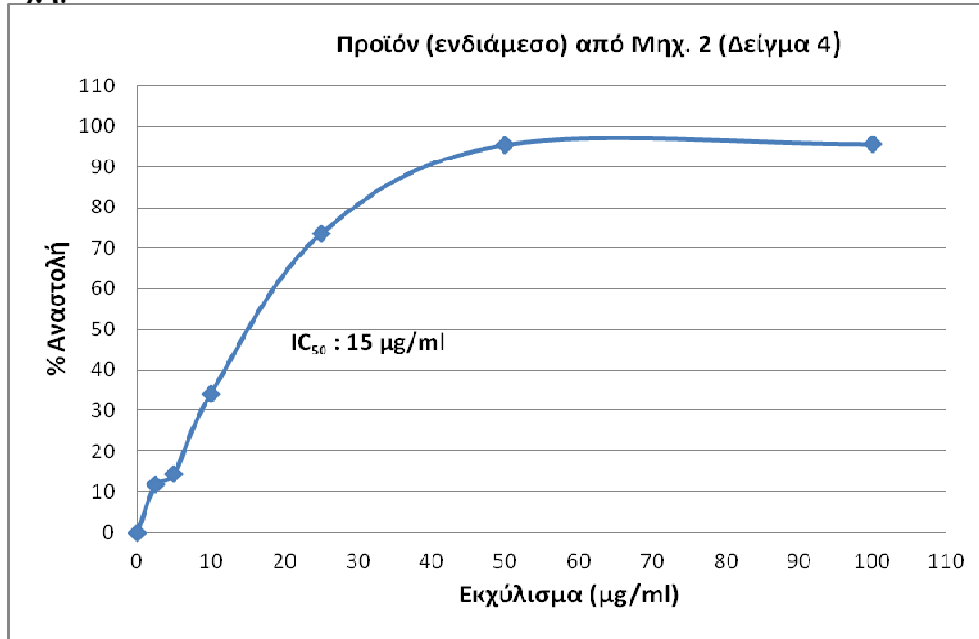
Σχήμα 9.14



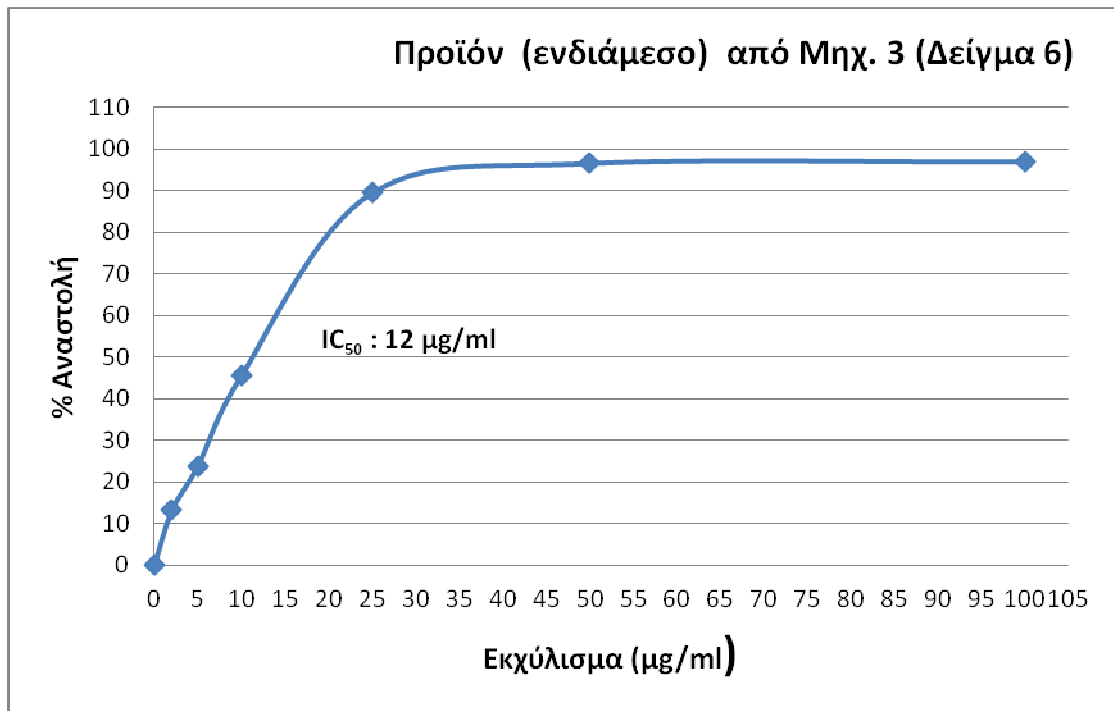
Σχήμα 9.15



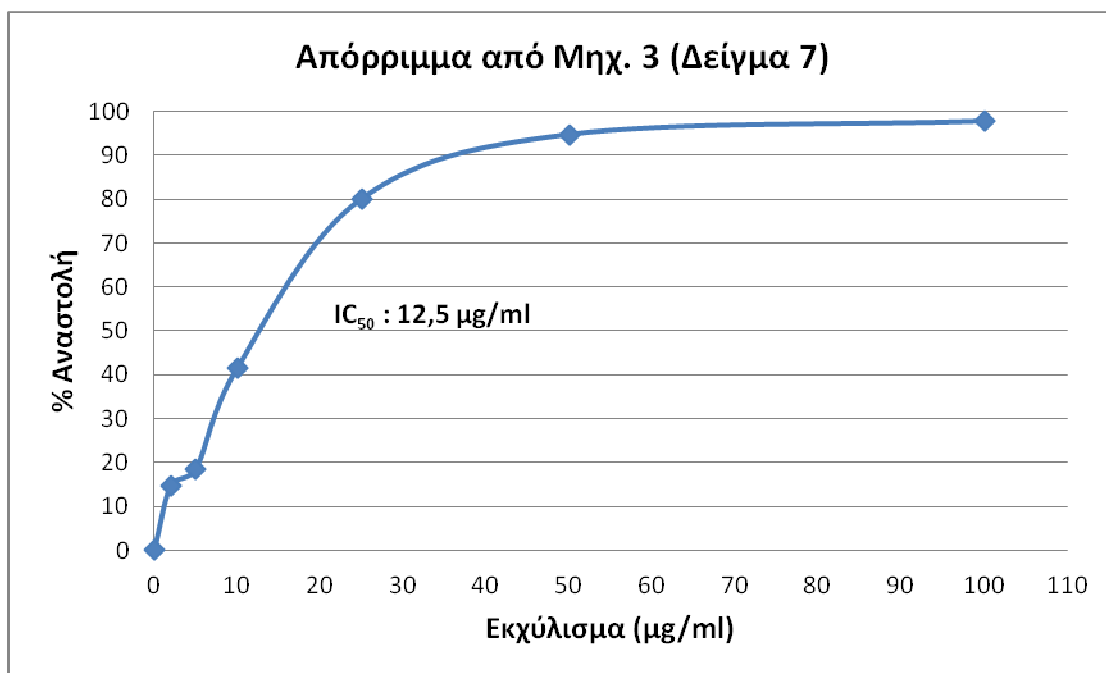
Σχήμα 9.16



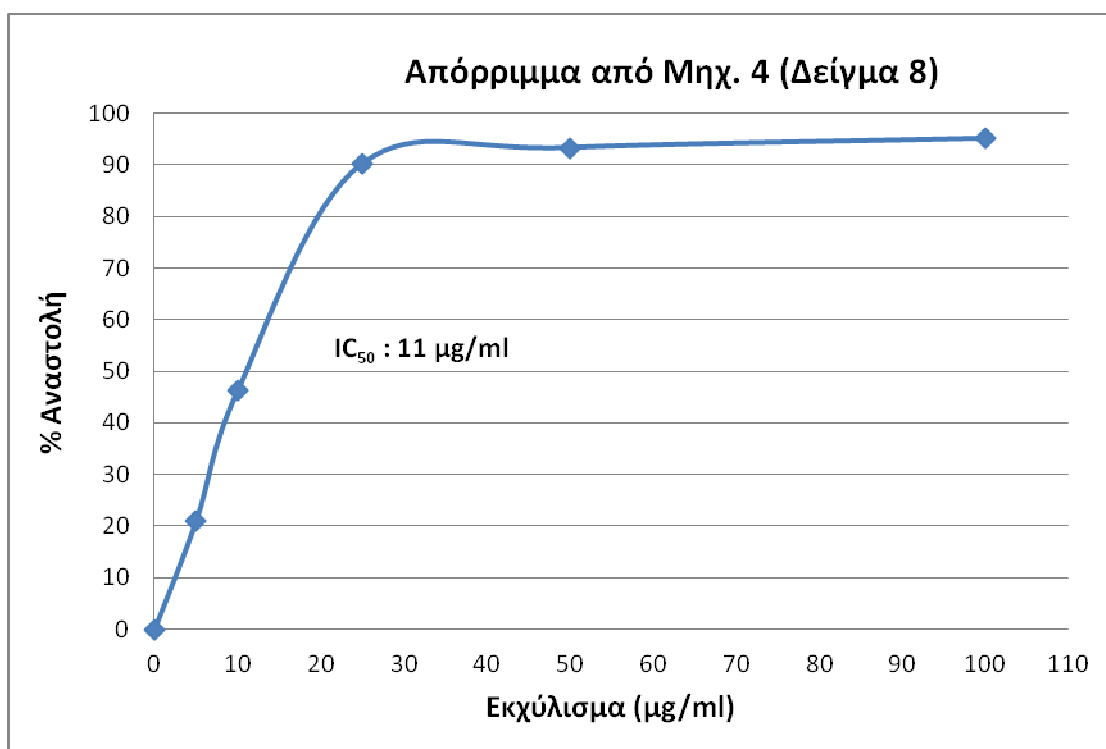
Σχήμα 9.16



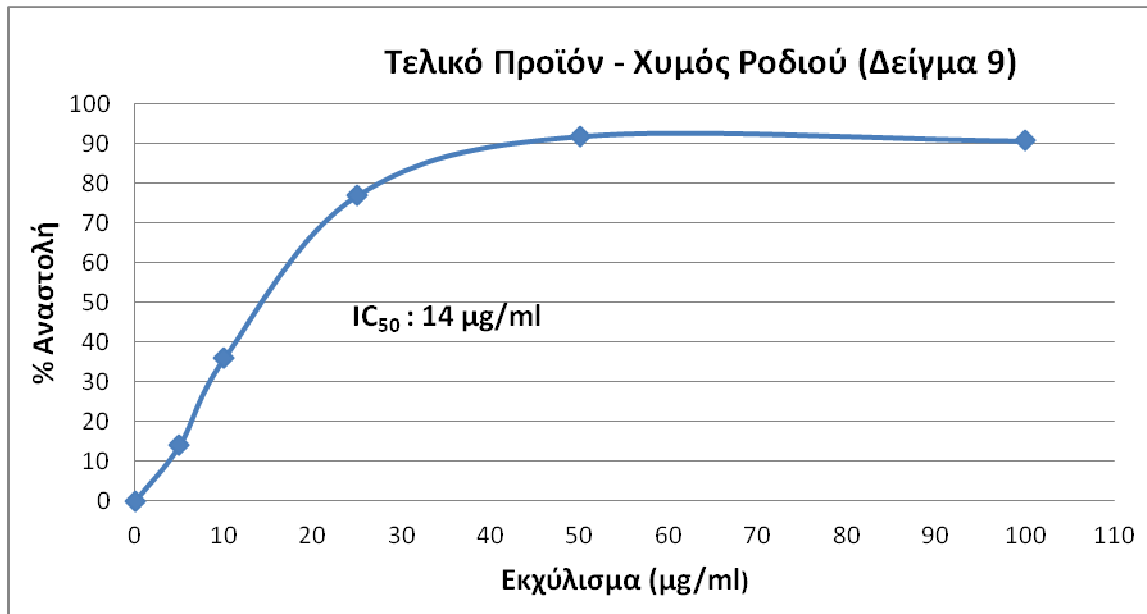
Σχήμα 9.17



Σχήμα 9.18



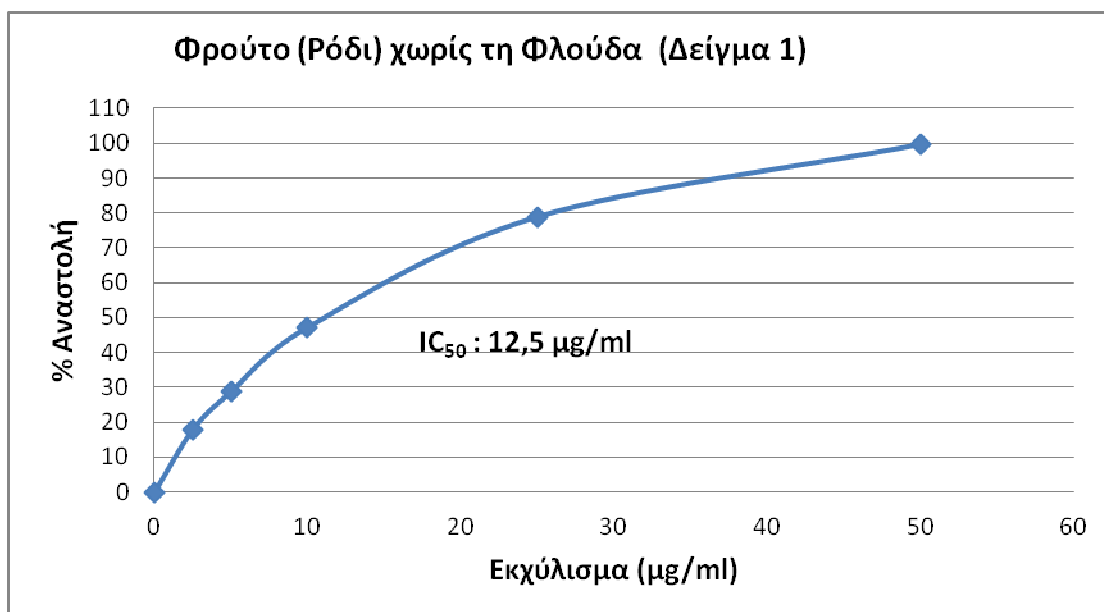
Σχήμα 9.19



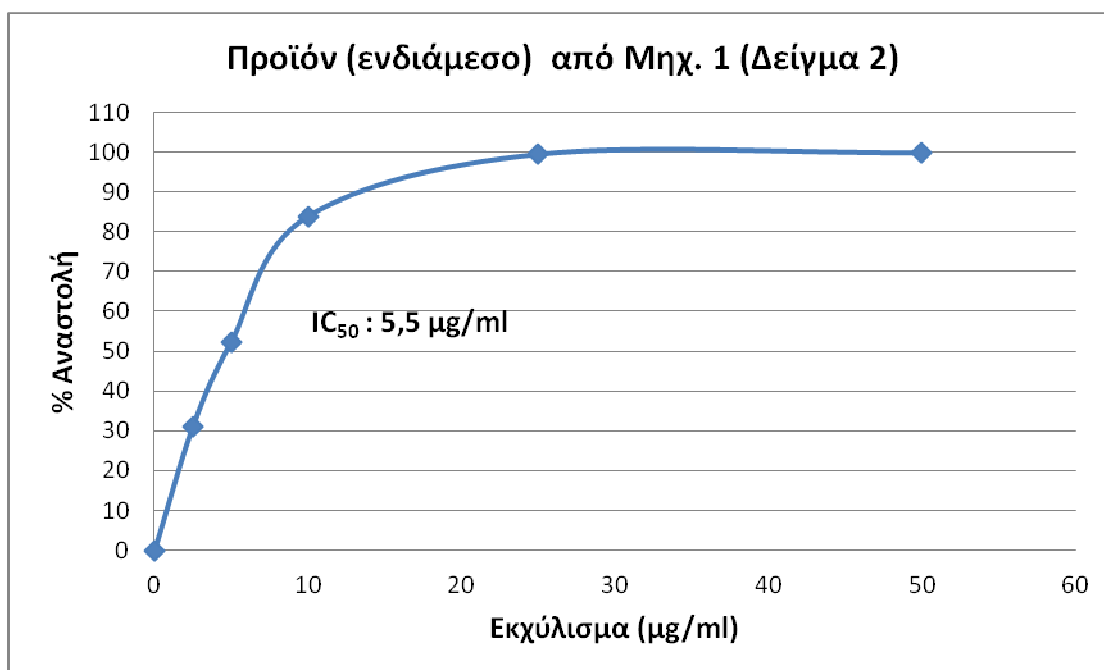
Σχήμα

9.20

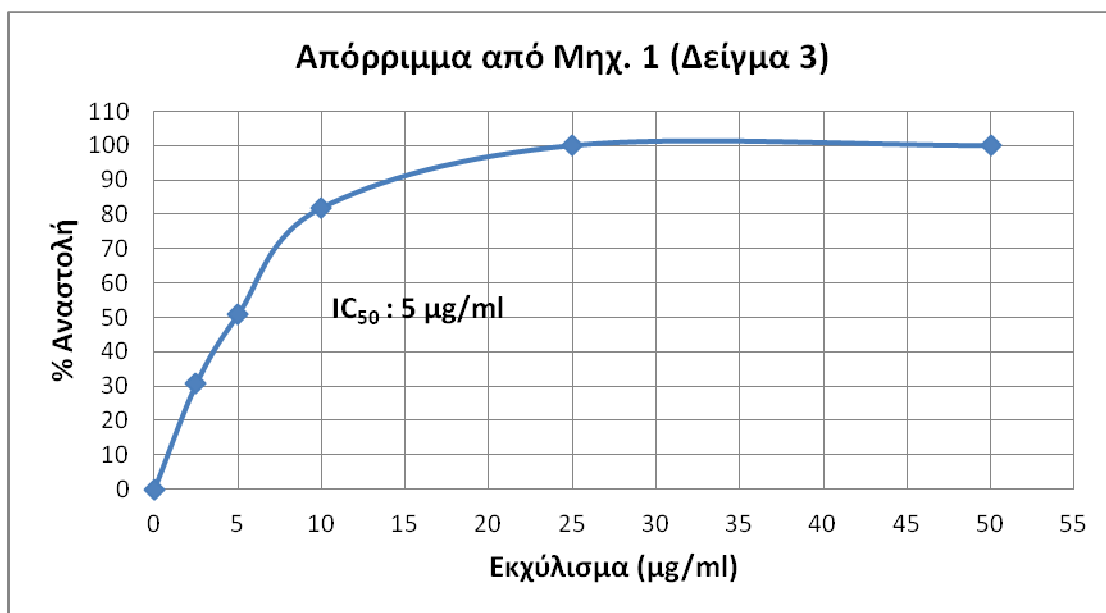
Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}



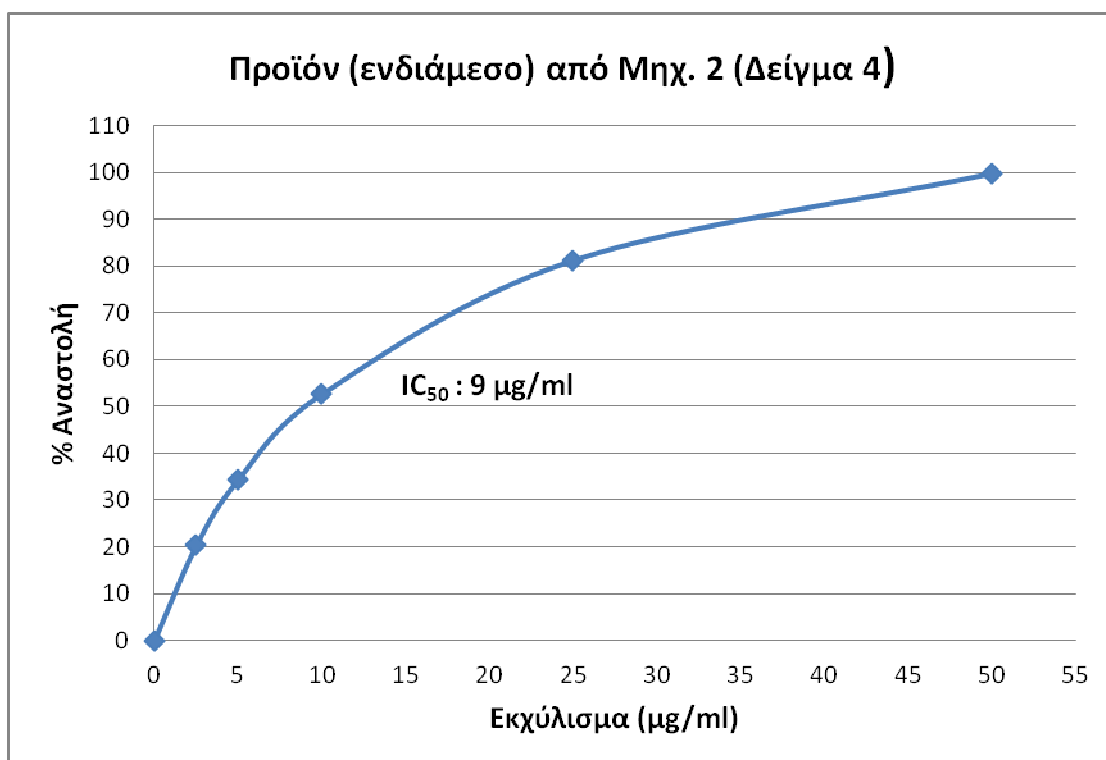
Σχήμα 9.21



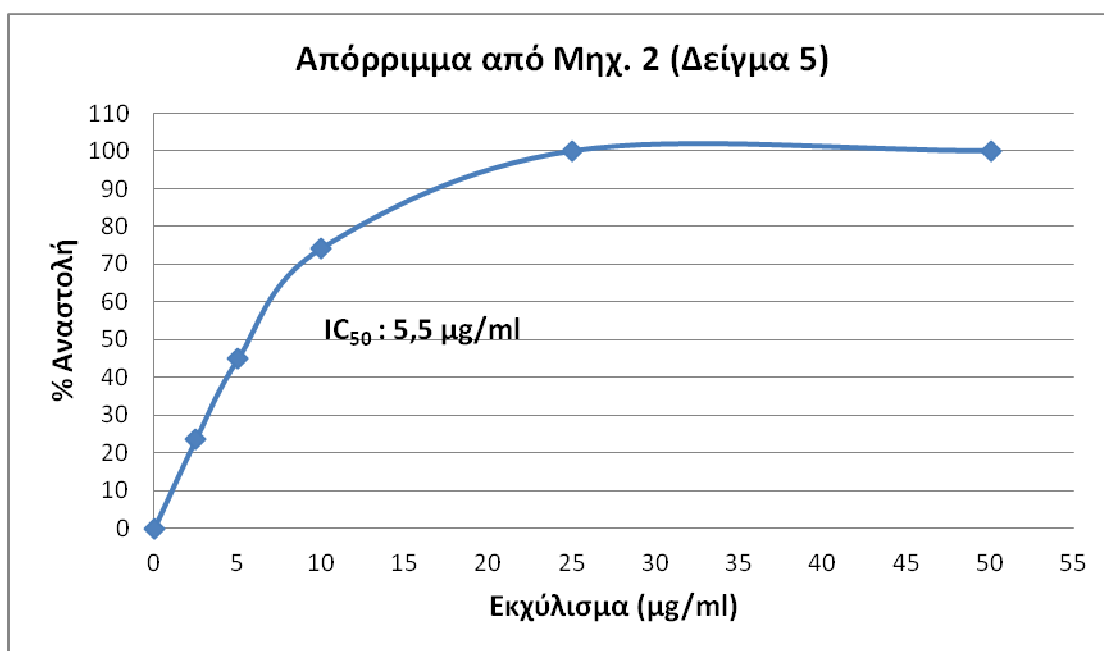
Σχήμα 9.22



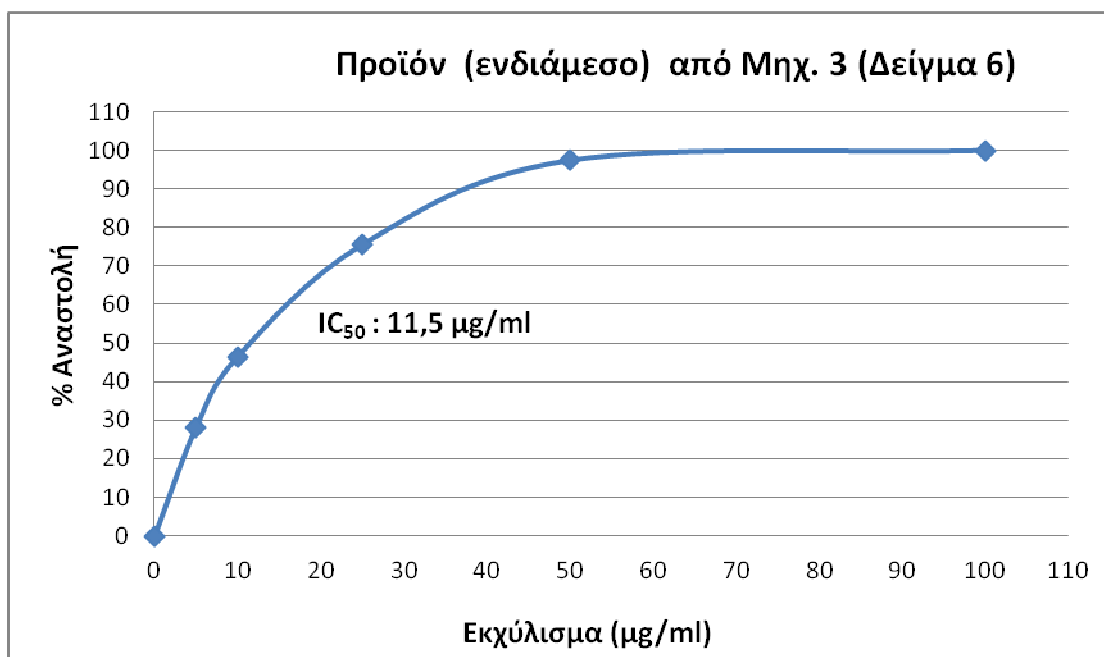
Σχήμα 9.23



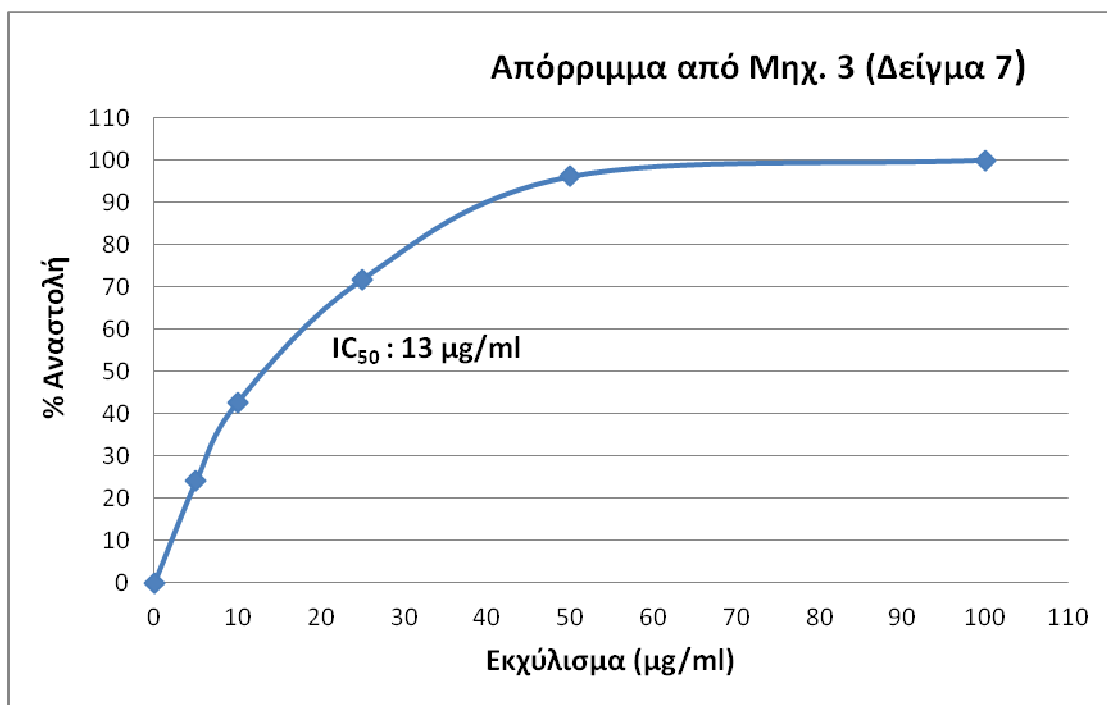
Σχήμα 9.24



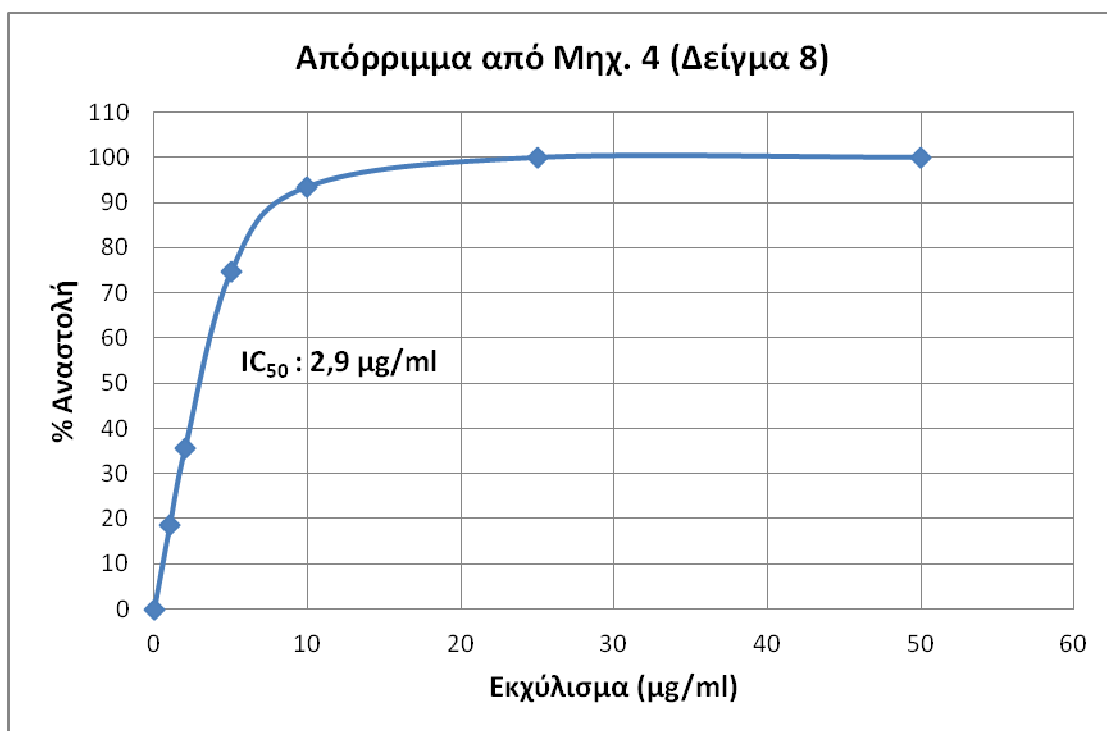
Σχήμα 9.25



Σχήμα 9.26

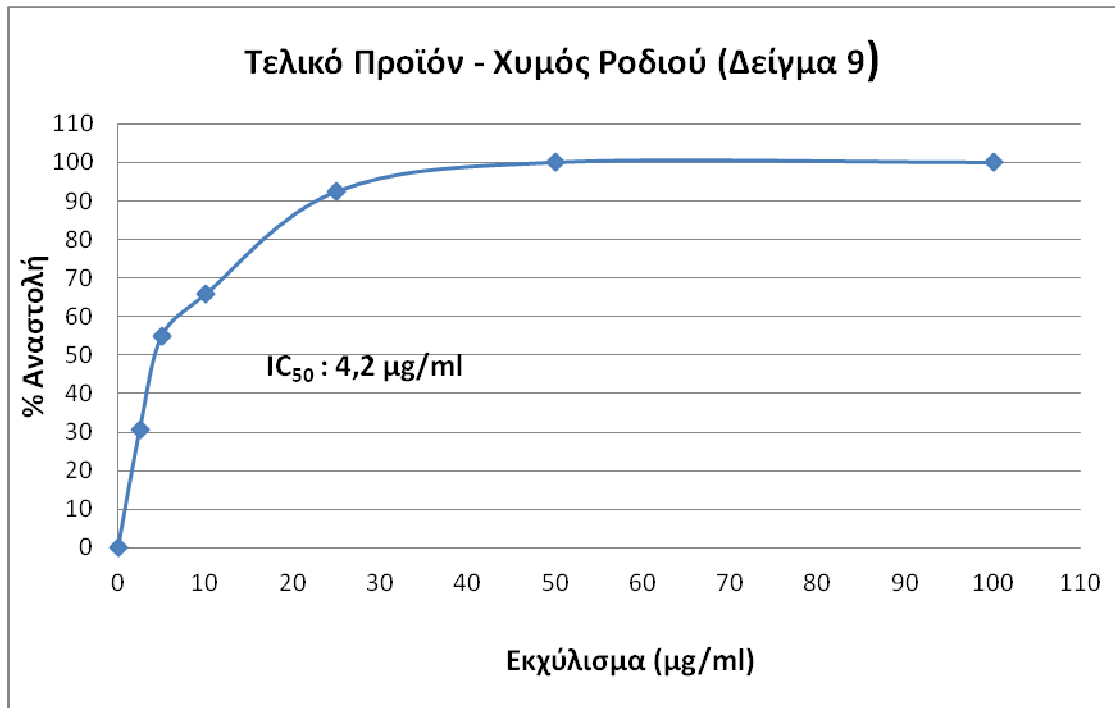


Σχήμα 9.27



Σχήμα

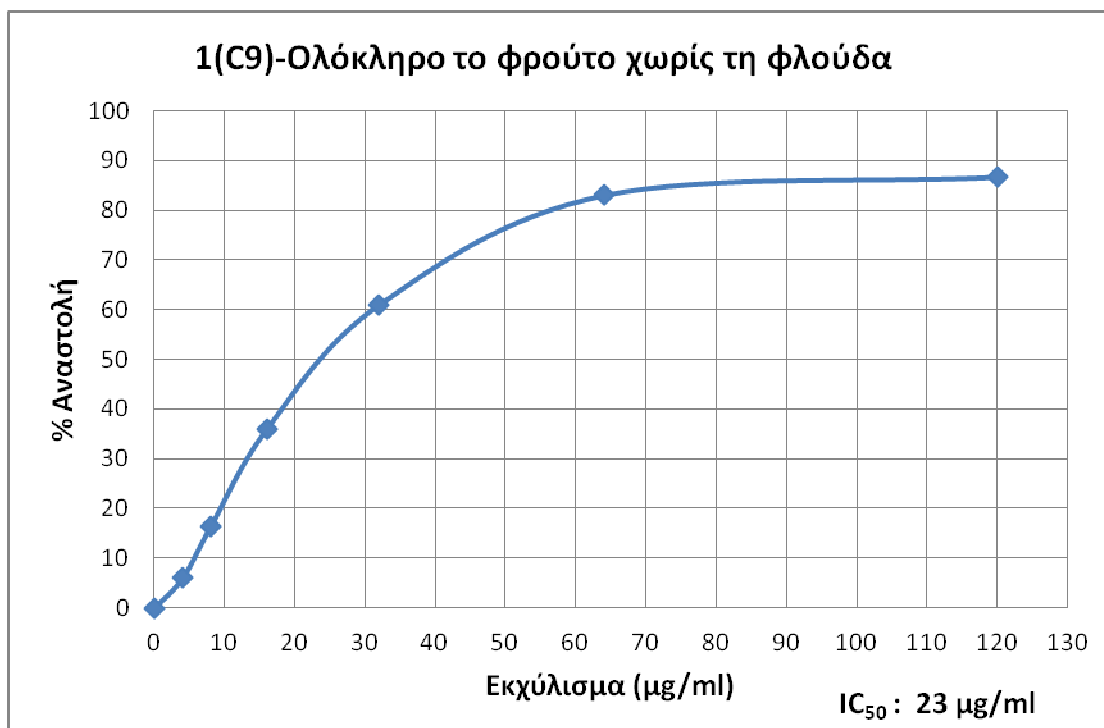
9.28



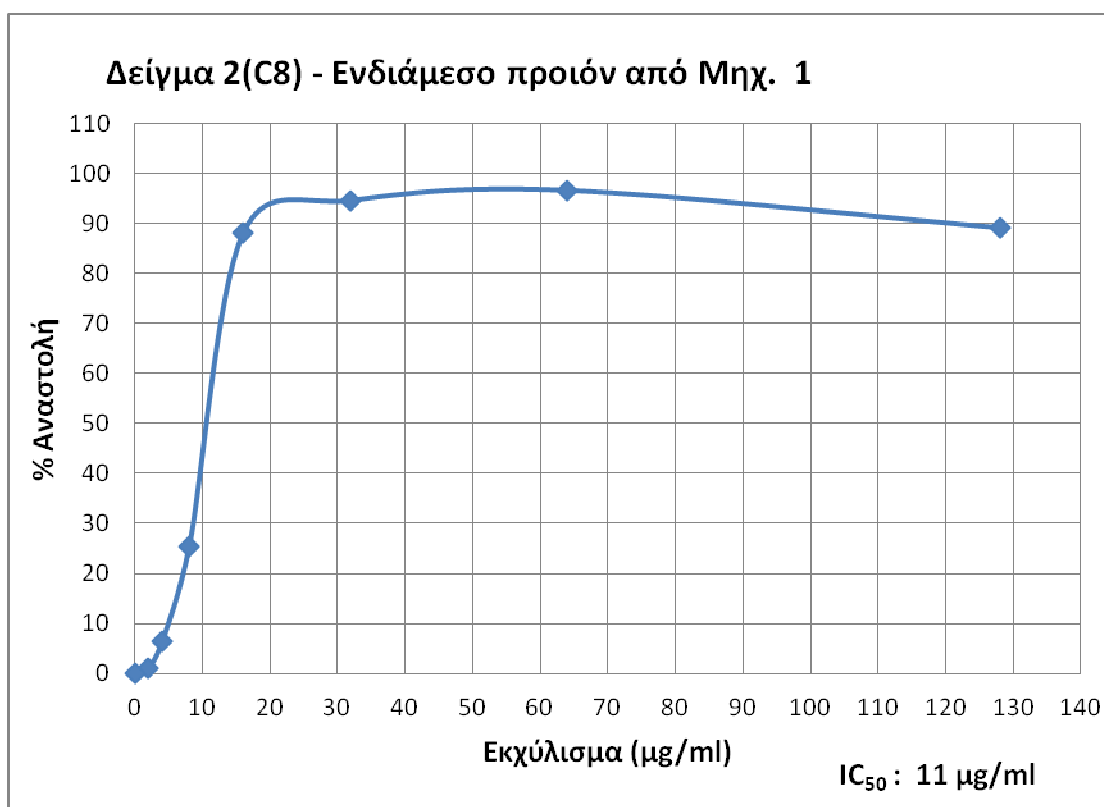
Σχήμα

9.29

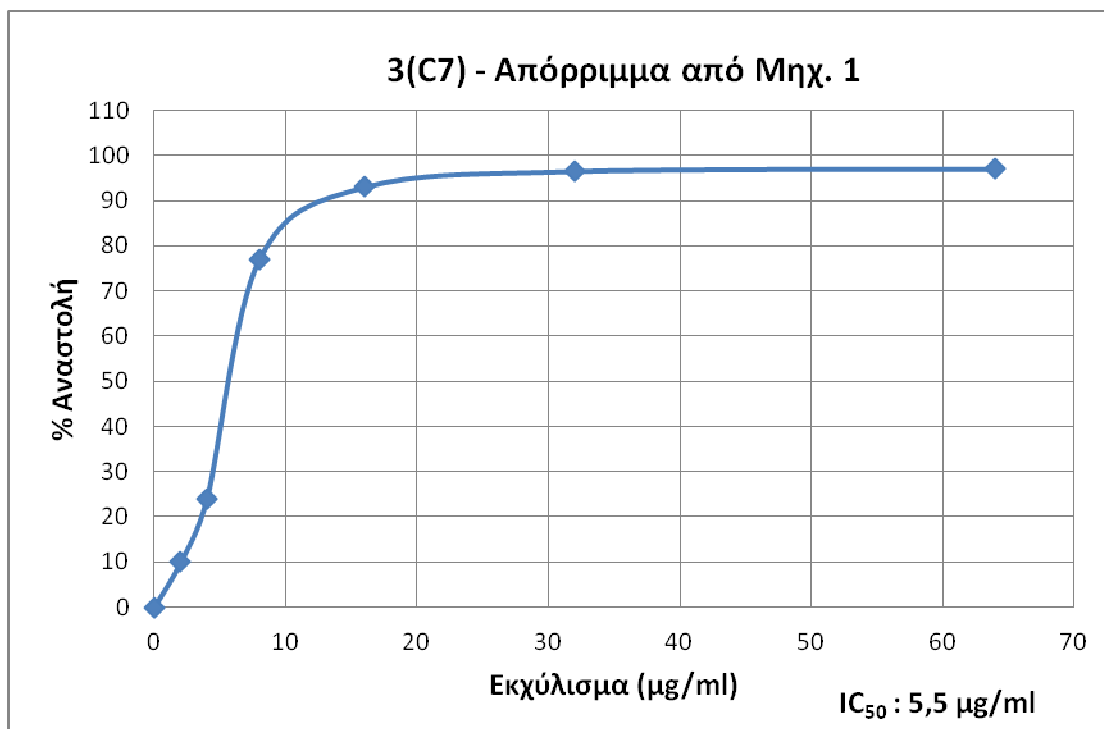
Επαγόμενη από ρίζες ROO' πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.



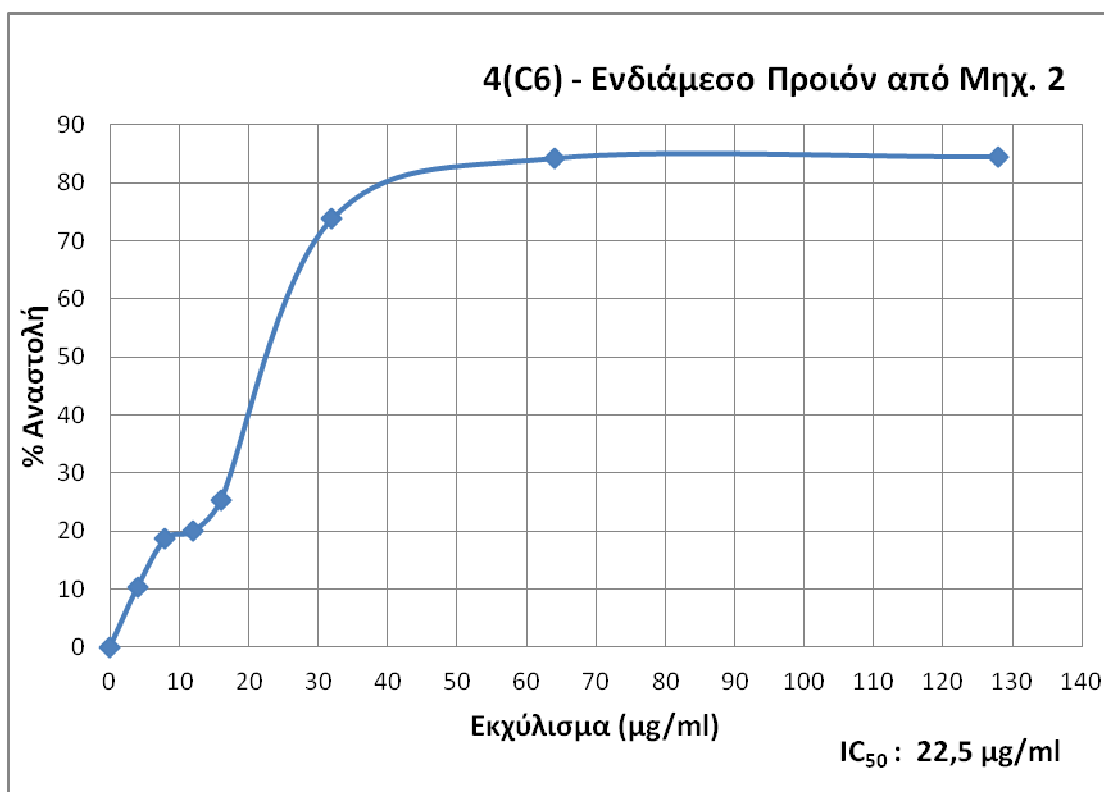
Σχήμα 9.30



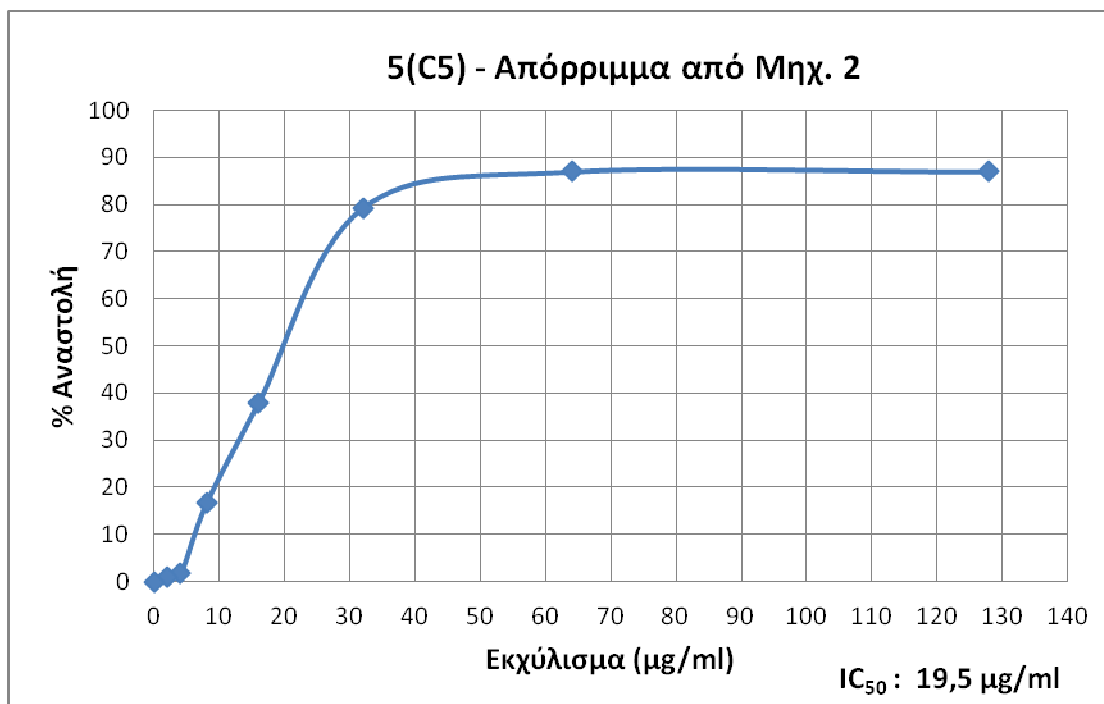
Σχήμα 9.31



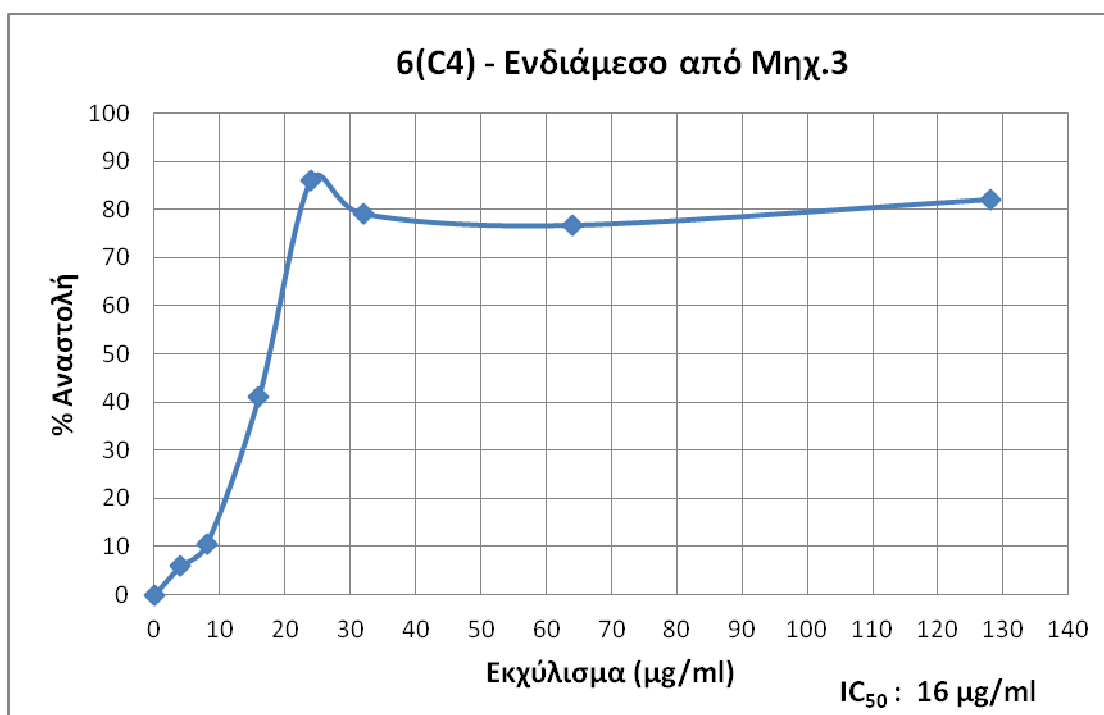
Σχήμα 9.32



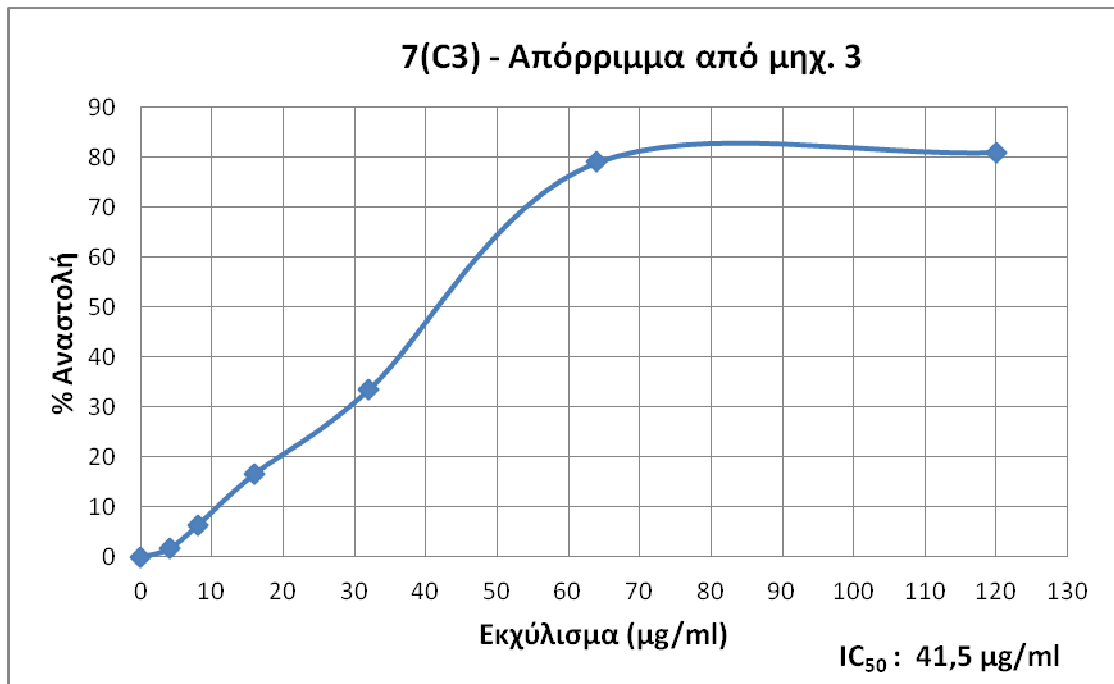
Σχήμα 9.33



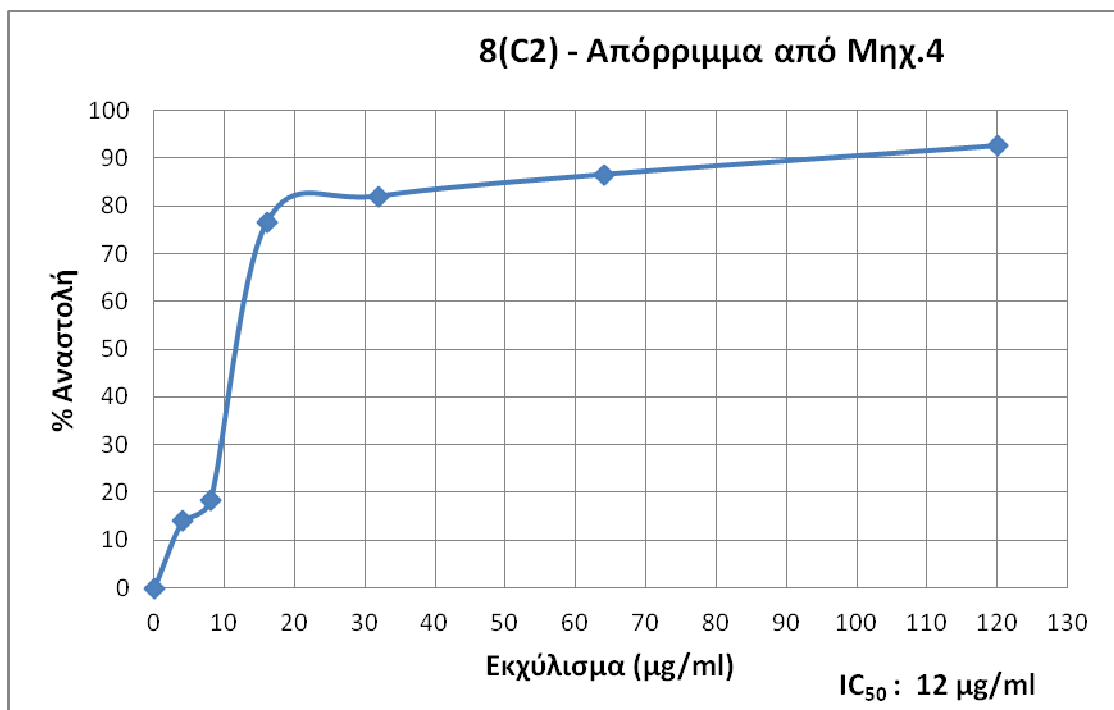
Σχήμα 9.34



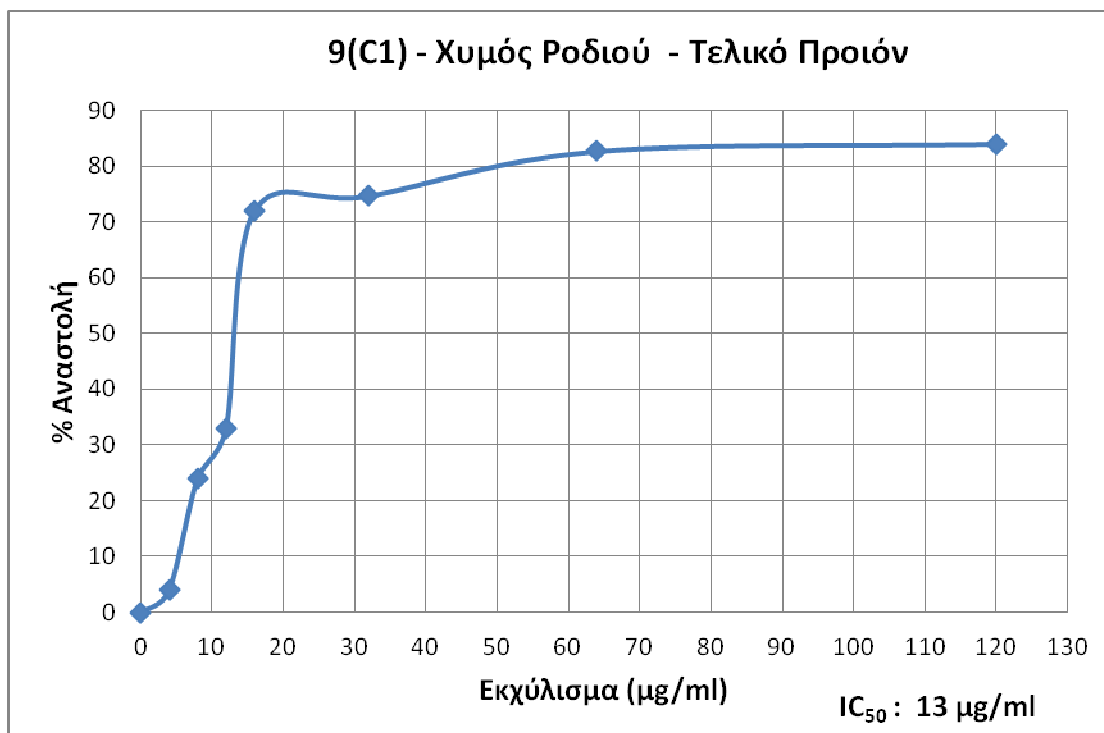
Σχήμα 9.35



Σχήμα 9.36

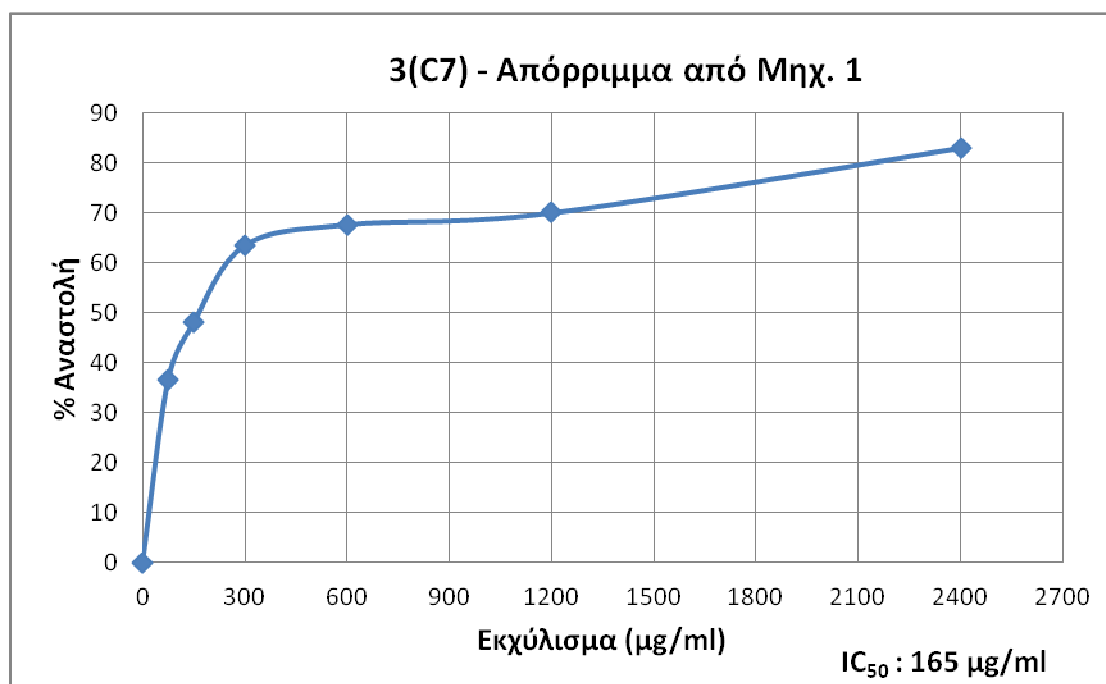


Σχήμα 9.37

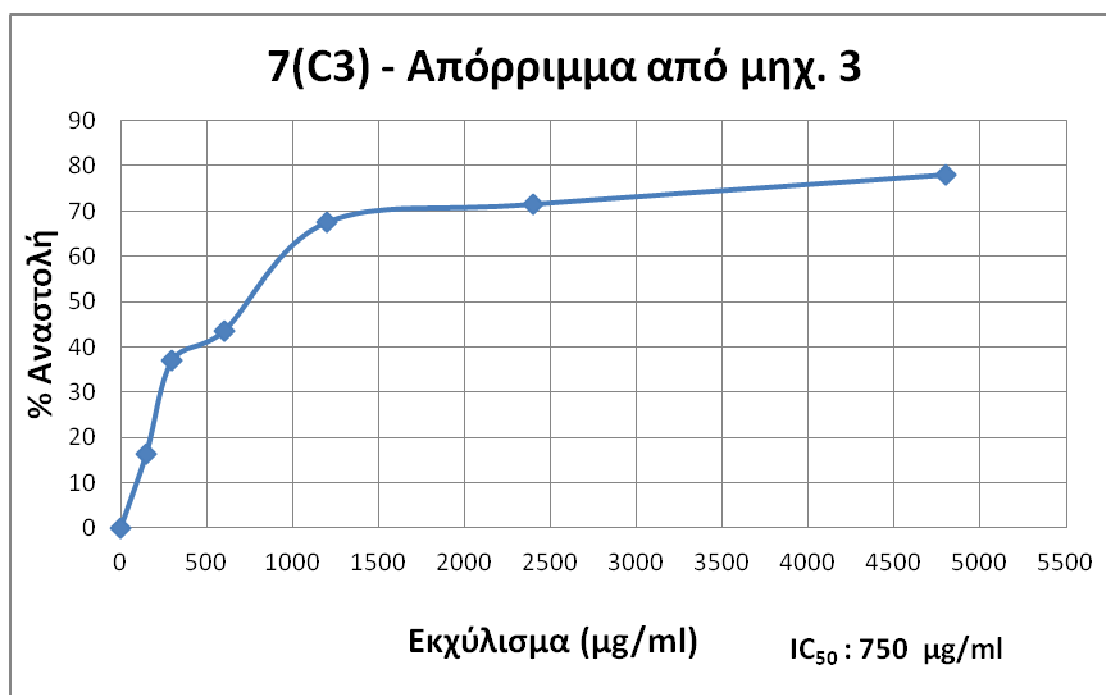


Σχήμα 9.38

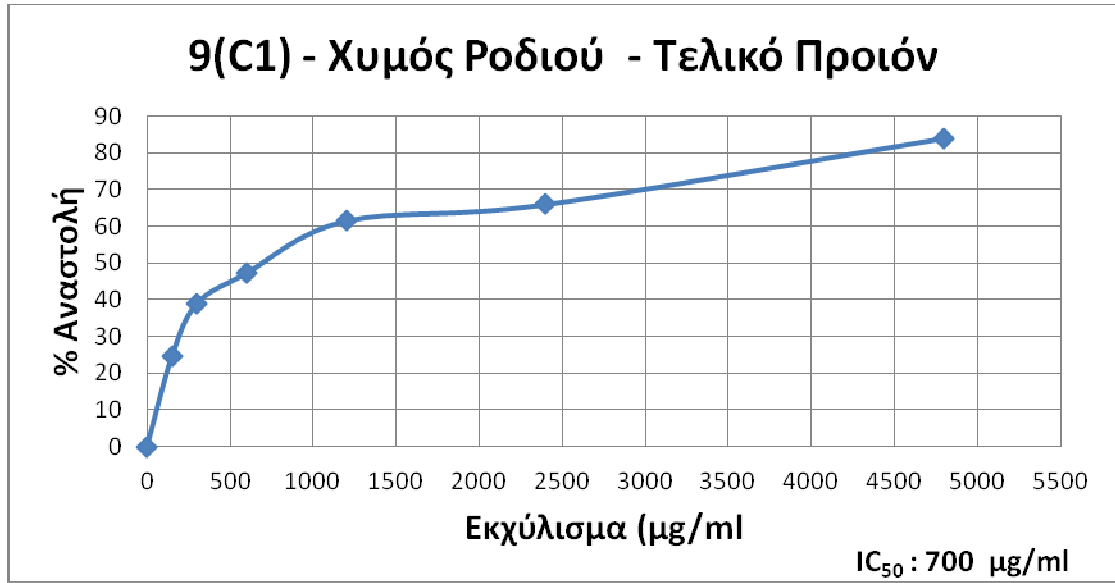
Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)



Σχήμα 9.39



Σχήμα 9.40



Σχήμα 9.41