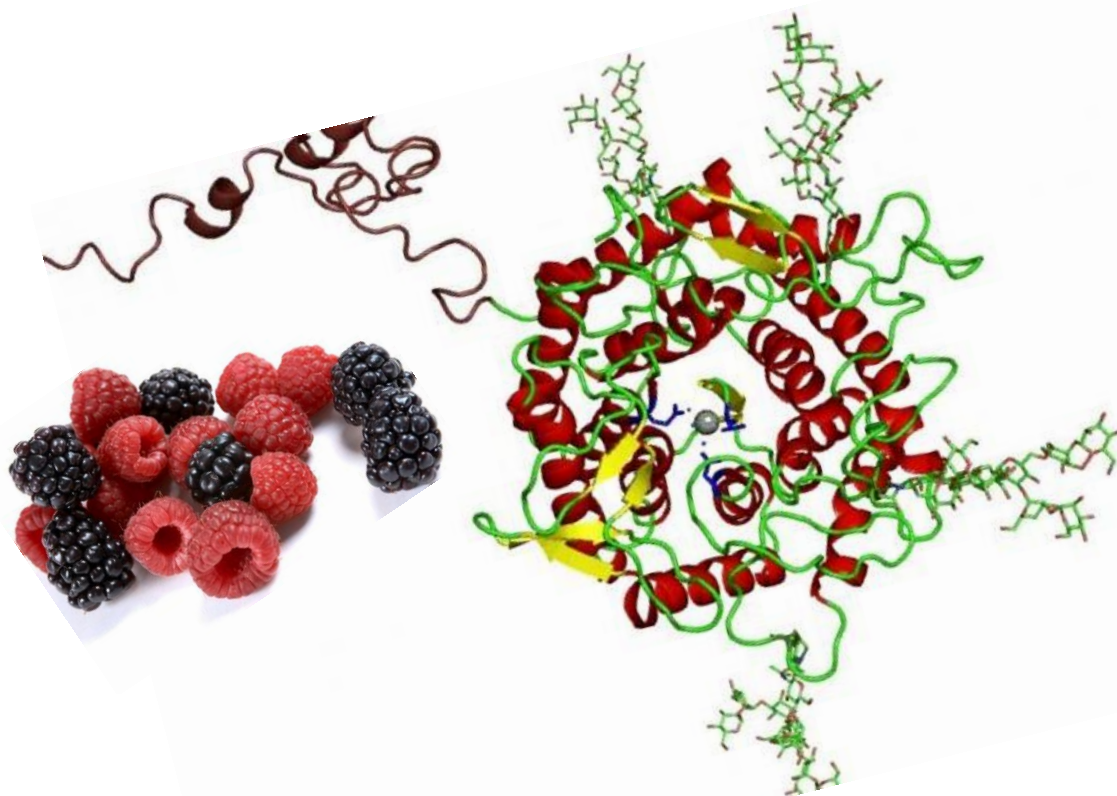


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»,
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ *Rubus spp.* ΩΣ
ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΟΥ
ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ.



ΜΑΡΙΑ Δ. ΠΑΠΑΙΩΑΝΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Ν. Λάμπρου

ΑΘΗΝΑ 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΘΕΜΑ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ *Rubus spp.* ΩΣ
ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΟΥ
ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ.**

**ΜΑΡΙΑ Δ. ΠΑΠΑΙΩΑΝΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Ν. Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής
Τεχνολογίας Γ.Π.Α,**

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Ν. Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής,

Ι. Κλώνης, Καθηγητής,

Μ. Φλεμετάκης, Επίκουρος Καθηγητής,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, με τίτλο «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στην γεωπονία», στην κατεύθυνση «Βιοδραστικά προϊόντα και πρωτεϊνική τεχνολογία, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013.

Η ανάθεση και η επίβλεψη της εργασίας έγινε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λάμπρου Νικόλαο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση και την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής .

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κα. Ευαγγελία Παπά (ΕΤΕΠ), στην Δρ. Ευαγγελία Χρονοπούλου και την Υποψ. Δρ. Μαριάννα Χαντζηκωνσταντίνου , για το αμείωτο ενδιαφέρον, τη συμπαράσταση και τη βοήθειά τους, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή του. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω γενικά όλα τα παλιά και νεότερα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου καθώς η στήριξή τους στάθηκε πολύτιμη βοήθεια για τη συγγραφή της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ι. Κλώνη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μ. Φλεμετάκη.

Στην οικογένειά μου...

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	8
Abstract.....	9

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Το γένος <i>Rubus spp.</i>	11
1.2. Ελεύθερες ρίζες – Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS).....	13
1.3. Αντιμετώπιση της δράσης των ROS – Αντιοξειδωτικά.....	17
1.4. Διάκριση αντιοξειδωτικών.....	20
1.5. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών.....	21
1.5.1. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών.....	22
1.6. Αντιοξειδωτικά και ανθρώπινος οργανισμός.....	23
1.7. Φαινολικές ενώσεις.....	25
1.7.1. Εισαγωγή.....	25
1.7.2. Δομή - κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.....	26
1.7.3. Ανθοκυανίνες.....	28
1.8. Αντιοξειδωτική δράση στα βατόμουρα.....	30
1.9. Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	31
1.9.1. Μέθοδος Folin – Ciocalteu.....	32
1.9.2. Μέθοδος DPPH.....	33
1.9.3. Μέθοδος ABTS.....	34
1.9.4. Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay).....	35
1.9.5. Μέθοδος προσδιορισμού Ανθοκυανινών.....	36
1.10. Ένζυμα και ενζυμική δραστηριότητα.....	37
1.10.1. Κινητική της Ενζυμικής Αντιδράσεως.....	38
1.10.2. Αναστολή Ενζυμικής δραστηριότητας.....	39
1.11. Ελαστάση.....	42
1.12. Τυροσινάση.....	43
1.13. Ακετυλοχολινεστεράση.....	45
1.14. Σκοπός.....	46

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Εξοπλισμός.....	48
2.2. Υλικά.....	48
2.2.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό των φαινολικών οξέων.....	48
2.2.2. Διαλύματα για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP.....	49
2.2.3. Διαλύματα για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS.....	50
2.2.4. Διαλύματα για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο.....	50

DPPH.....	50
2.2.5. Διαλύματα για το προσδιορισμό Ανθοκυανινών.....	50
2.2.6. Διαλύματα για το προσδιορισμό των φλαβονοειδών.....	50
2.2.7. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του Ενζύμου Τυροσινάση.....	51
2.2.8. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του ενζύμου Ελαστάση.....	51
2.2.9. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση.....	52
2.2.10. Βιολογικό υλικό.....	52
2.3. Μέθοδοι.....	53
2.3.1. Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου φαινολών – Μέθοδος Folin Ciocalteu.....	53
2.3.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP (Ferric anion Reducing Antioxidant Power).....	55
2.3.3. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-ϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH)	57
2.3.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα οδό ABTS.....	58
2.3.5. Προσδιορισμός Ανθοκυανινών.....	59
2.3.6. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	60
2.3.7. Μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου τυροσινάσης.....	62
2.3.8. Μελέτη αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ελαστάση.....	63
2.3.9. Μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης.....	65
Κεφάλαιο 3	
Αποτελέσματα	
3.1. Μέθοδος Folin - Ciocalteu	68
3.2. Μέθοδος FRAP.....	70
3.3. Μέθοδος DPPH.....	72
3.4. Μέθοδος ABTS.....	74
3.5. Προσδιορισμός Ανθοκυανινών.....	76
3.6. Προσδιορισμός Φλαβονοειδών.....	78
3.7. Μελέτη αναστολής δραστηριότητας Τυροσινάσης.....	80
3.8. Μελέτη αναστολής δραστηριότητας Ελαστάσης.....	83
3.9. Μελέτη αναστολής δραστηριότητας Ακετυλοχολινεστεράσης.....	85
Κεφάλαιο 4	
4.1. Συζήτηση.....	87
Κεφάλαιο 5	
5.1. Βιβλιογραφία.....	93

Περίληψη

Εδώ και αρκετά χρόνια, οι ερευνητές δείχνουν αυξημένο ενδιαφέρον τα αντιοξειδωτικά συστατικά και τον ρόλο τους στην προστασία και στην ομαλή λειτουργία των οργανισμών. Το μεγάλο, αυτό, ενδιαφέρον που υπάρχει για τα αντιοξειδωτικά οφείλεται στην πληθώρα των βιοδραστικών και αντιοξειδωτικών τους ικανοτήτων. Πολλά φρούτα και λαχανικά αποτελούν πηγές πλούσιες σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Επιπλέον, στις μέρες μας, τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετα σε πολλά τρόφιμα βελτιώνοντας έτσι την ποιότητά τους. Τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στη πρόληψη ποικίλων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος τα καρδιαγγειακά νοσήματα οι εκφυλιστικές ασθένειες κ.α. Μεγάλο ενδιαφέρον παρατηρείται, επίσης, στην μελέτη συγκεκριμένων ενζύμων τα οποία σχετίζονται με την σωστή και υγιή λειτουργία των οργανισμών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων «άρδευση», «έδαφος», «ηλιακό φως» και «ποικιλία» στην τελική συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, ανθοκυανινών και φλαβονοειδών, στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στη ικανότητα αναστολής των ενζύμων τυροσινάση, ελαστάση και ακετυλοχολινεστεράση, από 22 διαφορετικούς καρπούς βατόμουρων του γένους *Rubus spp.*

Τα 22 διαφορετικά δείγματα εκχυλίστηκαν σε συγκεκριμένα εκχυλίστηκα μέσα, ανάλογα με τις μεθόδους και προσδιορίστηκαν οι παραπάνω ιδιότητες. Τα αποτελέσματα, όπως ήταν αναμενόμενο, φανέρωσαν ότι τα βατόμουρα είναι φρούτα πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά και ότι οι παράγοντες «άρδευση», «έδαφος», «ηλιακό φως» και «ποικιλία» επηρεάζουν τις βιοδραστικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα η ποικιλία του φυτού φαίνεται να επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την βιοχημική σύσταση των καρπών. Επίσης, ο συνδυασμός περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την καλλιέργειά τους, μπορεί να επηρεάσει τις βιοδραστικές τους ιδιότητες. Από τη μελέτη, επιβεβαιώθηκε η μεγάλη διατητική αξία των καρπών αυτών. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι καρποί *Rubus spp* είναι κατάλληλοι για την εφαρμογή τους στην ανάπτυξη προϊόντων τόσο στην φαρμακευτική όσο και στην κοσμετολογία.

Abstract

For several years, researchers show an increased interest in the antioxidants and their role in the protection and the smooth functioning of organizations. This large interest for the antioxidants is caused to the multitude of bioactive and antioxidant capacity. Many fruits and vegetables are rich sources of antioxidant compounds. In addition, nowadays, the antioxidants used as additives in many foods thereby improving their quality. Antioxidants help to prevent of various diseases associated with the oxidative stress such as cancer cardiovascular disease, degenerative diseases etc. Much interest is observed also in the study of certain enzymes associated with the proper and healthy functioning of organisms.

In this thesis we studied the effect of the agents 'irrigation', 'territory', 'sunlight' in the cultivation of plants and "variety" in the final concentration of phenolic compounds, anthocyanins and flavonoids, antioxidant capacity, and ability to inhibit specific enzymes in 22 different blackberry and raspberry fruits, genus *Rubus* spp . For the determination of total phenolic content the method of Folin-Ciocalteu was applied and the antioxidant capacity of the samples identifying with method of, method of DPPH and the method of ABTS. The determination of total content of fruit in anthocyanins was done by a method based on the pH, and the determination of total content of fruit in flavonoids was done by a method based on Quercetin. Furthermore, specific methods were applied for the study of the existence inhibitors of tyrosinase, elastase and acetylcholinesterase.

The 22 different samples were extracted to specific extracted solutions, depending on the methods and determined photometrically their biochemical properties. The results, unsurprisingly, have revealed that those fruits are rich in antioxidants and that the agents 'irrigation', 'territory', 'sunlight' and 'variety' affecting their bioactive properties. Specifically, the variety of the plant affected to a greater extent the biochemical composition of fruits, but a right combination of environmental conditions during their cultivation can increase bioactive capabilities of fruit. Was therefore confirmed their highly nutritious. Also according with the results *Rubus* spp fruits are suitable for use in the pharmaceutical and in cosmetology.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1. 1. Το γένος *Rubus spp.*

Τα *Rubus* είναι ένα μεγάλο γένος ανθοφόρων φυτών της οικογένειας *Rosaceae* και υποοικογένειας *Rosoideae*. Η γενική ονομασία *Rubus* σημαίνει βατόμουρο, στα Λατινικά και προέρχεται από τη λέξη *rubber*, που σημαίνει «κόκκινο». Στα μέλη του γένους αυτού ανήκουν τα σμέουρα και τα βατόμουρα. Τα περισσότερα από αυτά τα φυτά έχουν ξυλώδη στελέχη με αγκάθια, τρίχες και αδένες. Το γένος *Rubus spp.* περιλαμβάνει πολυάριθμα είδη και υβρίδια, χαμηλών, συνήθως αγκαθωτών θάμνων, με ευρεία εξάπλωση σε όλο τον κόσμο και ιδιαίτερα στις βόρειες περιοχές. Τα φυτά αυτά τα συναντούμε σε δασώδεις κυρίως περιοχές, φράκτες, θαμνότοπους, στις όχθες των ρυακιών ακόμα και στις άκρες των δρόμων. Το βατόμουρο είναι το βρώσιμο φρούτο που παράγεται από οποιοδήποτε είδος των φυτών αυτού του γένους. Οι καρποί αυτοί είναι χυμώδεις και εύγεστοι, στην αρχή πράσινοι, έπειτα κοκκινόξανθοι και τελικά μαύροι και γυαλιστεροί. Είναι ανθεκτικά φυτά και αντέχουν στις παγωνιές. Γενικά η συγκομιδή των βατόμουρων είναι οικονομικά και οικολογικά σημαντική σε πολλές χώρες. Το ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα φρούτα έχει αυξηθεί πρόσφατα, επειδή αποτελούν εξαιρετικές πηγές βιταμινών, αντιοξειδωτικών και άλλων πολύτιμων θρεπτικών συστατικών. Έτσι λοιπόν λόγω της υψηλής διατητικής τους αξίας μπορούν να αποτελέσουν μια ευέλικτη πρώτη ύλη για τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών βιομηχανιών.



Εικόνα 1.1. Καρποί *Rubus* (Linnaeus, 2007)

Το γένος *Rubus spp.* (*Rosaceae*) είναι μία από τις πιο δύσκολες ομάδες φυτών όσον αφορά την ταξινόμηση και την εξελικτική ιστορία. Περιλαμβάνει 429 - 750 είδη, τα οποία ομαδοποιούνται σε 12 υπογένη. Αυτό οφείλεται στον συχνό υβριδισμό, στην μεγάλη μορφολογική ποικιλία, στον αγενή πολλαπλασιασμό και την υψηλή εμφάνιση πολυπλοειδίας (πάνω από δύο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος ανά κύτταρο). Περίπου το 60 % όλων των ειδών *Rubus* είναι πολυπλοειδείς και ο υβριδισμός είναι γνωστό ότι συμβαίνει μεταξύ στενά συγγενικών ειδών και σε πολλές περιπτώσεις μεταξύ μελών ομάδων με μακρινή συγγένεια. Λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος, την πολυπλοκότητα και τη σημασία της *Rubus*, δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι δεν υπάρχει μια ολοκληρωμένη μελέτη της ταξινόμησης και στις σχέσεις του έχει γίνει από το 1914 (Klein, 2009)

Πίνακας 1.1. Επιστημονική ταξινόμηση γένους *Rubus* spp. (Linnaeus, 2007).

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ:	<i>Plantae</i>
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ:	Αγγειόσπερμα
OLDER	<i>Rosales</i>
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:	<i>Rosaceae</i>
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:	<i>Rosoideae</i>
ΦΥΛΗ:	<i>Rubae</i>
ΓΕΝΟΣ:	<i>Rubus</i>

1. 2. Ελεύθερες ρίζες – Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ελεύθερη ρίζα θεωρείται ένα άτομο ή ένα μόριο που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Επομένως βιολογικά ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα ασταθή μόρια που έχουν ηλεκτρόνια διαθέσιμα για να αντιδράσουν με διάφορα οργανικά υποστρώματα. Η παρουσία των ελεύθερων ριζών σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επικίνδυνη για τους ζωντανούς οργανισμούς, λόγω της ικανότητάς τους να βλάπτουν τα οργανίδια των κυττάρων (Somogyi et al., 2007). Επίσης υπάρχουν και οι διρίζες όπου δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κάποια απόσταση μεταξύ τους αλλά στο ίδιο μόριο (Schlesier et al., 2002).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άλλοτε θετικά ή αρνητικά φορτισμένες και άλλοτε ηλεκτρικά ουδέτερες. Είναι εξαιρετικά ασταθείς και πολύ δραστικές, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και αποτελούν ικανή ανεξάρτητη ύπαρξη. Αντιδρούν με οργανικά υποστρώματα όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA και μέσω της διαδικασίας της οξείδωσης προκαλούν βλάβη σε αυτά τα μόρια, διαταράσσουν τη φυσιολογική τους λειτουργία, και επομένως μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες (Krishnaiah et. al., 2006, Somogyi et al., 2007).

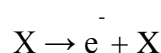


Εικόνα 1.2. Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.

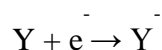
Κατά τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται από το ένα μόριο/άτομο σε άλλο με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Schlesier et al., 2002).

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται με τους εξής τρεις τρόπους:

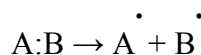
- Με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο.



- Με πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο



- Με ομολυτική σχάση ενός δεσμού και επομένως τον σχηματισμό δυο μοριακών θραυσμάτων που διαθέτουν από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο.



Δύο πολύ σημαντικές αντιδράσεις στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών που οδηγούν στην παραγωγή της πολύ δραστηκής ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου είναι:

- Αντίδραση Fenton: $Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^\cdot + OH^-$
- Αντίδραση Haber-Weiss: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^\cdot + OH^-$

Η έντονη ηλιακή ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση, το κάπνισμα, η σωματική κόπωση, το άγχος, η κακή διατροφή, και η λήψη φαρμάκων είναι μερικοί από τους παράγοντες που ενισχύουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Εκτός από τις εξωγενείς πηγές, η μεταφορά ηλεκτρονίων αποτελεί μια ενδογενής πηγή ελευθέρων ριζών που παράγονται στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα η διαρροή των ηλεκτρονίων που προκύπτει από τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως αυτές στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι η κύρια πηγή των ελευθέρων ριζών (Fridovich, 1986).

Τα οξειδωτικά σχηματίζονται στα κύτταρα του σώματος μας, κυρίως από τις ακόλουθες τέσσερις ενδογενείς πηγές:

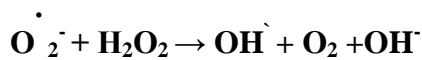
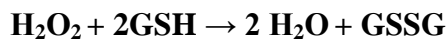
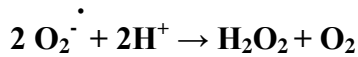
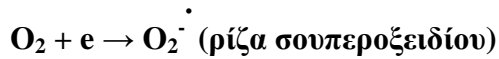
1. Κατανάλωση του O_2 από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της κανονικής αερόβιας αναπνοής για την παραγωγή H_2O π.χ. ρίζα υδροξυλίου.

2. Η καταστροφή των βακτηρίων και των μολυσμένων κυττάρων απελευθερώνει μονοξείδιο του αζώτου, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ενεργές μορφές οξυγόνου.

3. Η αποδόμηση των λιπαρών οξέων και άλλων μορίων από υπεροξυσωματίδια, όπου τα οργανίδια παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου ως υποπροϊόν, το οποίο στη συνέχεια ανοικοδομείται από την καταλάση. Το υπεροξείδιο που ανοικοδομείται περνά σε άλλα κοντινά «διαμερίσματα» του κυττάρου οδηγώντας έτσι σε οξειδωτική βλάβη του DNA (Krishnaiah et al., 2007).

Το πιο διαδεδομένο είδος των ελεύθερων ριζών είναι οι «ενεργές μορφές οξυγόνου» (Reactive Oxygen Species, ROS), οι οποίες είναι πιο οξειδωτικές από το ίδιο το οξυγόνο και συνεπώς πάρα πολύ τοξικές για τα κύτταρα. Όταν το μοριακό οξυγόνο ανάγεται πλήρως ή μερικώς τότε δημιουργούνται οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Brand, 2004). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ROS παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν θεμελιώδεις βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, είναι τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού διεργασίες. (Shigenaga et al., 1994) Ο όρος «ενεργές μορφές οξυγόνου» χρησιμοποιείται γενικώς για την ρίζα υπεροξειδίου ($O^{\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), την υδροξυλική ρίζα (OH), τις υπεροξειδικές (ROO^{\cdot}) και αλκόξυ- (RO^{\cdot}) ρίζες, το μοριακό οξυγόνο στην διεγερμένη κατάσταση (1O_2), τη ρίζα NO^{\cdot} και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($OONO^{\cdot}$) (Μπόσκου, 2004).

Σήμερα είναι δεκτό ότι κατά τον κανονικό μεταβολισμό στον ανθρώπινο οργανισμό γεννώνται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που μετατρέπονται σε ενεργά συστατικά ικανά να βλάψουν το DNA, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Η σειρά αντιδράσεων που μπορούν να προκαλέσουν τον σχηματισμό επικίνδυνων ελεύθερων ριζών είναι:



Αρχικά σχηματίζεται μια ρίζα σουπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία ανάγεται με την αντίστοιχη δισμουτάση προς υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο απομακρύνεται με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί του σώματος όμως δεν αρκούν γιατί παρουσία ιόντων μετάλλων (σιδήρου, μαγγανίου), η ρίζα του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρούν προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου.

Οι ρίζες αυτές είναι εξαιρετικά ενεργές και αφαιρούν υδρογόνα από το πλησιέστερο διαθέσιμο μόριο λιπιδίου, πρωτεΐνης ή νουκλεϊκού οξέος. Το αρχικό αυτό στάδιο εξελίσσεται σε μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση στην οποία οφείλεται η πολύ βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Στο σημείο αυτό, πιστεύουν οι επιστήμονες ότι βρίσκεται ο ρόλος των αντιοξειδωτικών. Πιο συγκεκριμένα δρουν ως αποσβέστες ριζών, αφού η υπεροξειδάση απομακρύνει μεν τα υπεροξείδια αλλά δεν μπορεί να αποτρέψει τον σχηματισμό νέων αλυσίδων υπεροξειδωσης (Μπόσκου, 2004, Schlesier et al., 2002).

Σε όλα τα κύτταρα υπάρχει ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών παραγόντων και παραγόντων που προκαλούν οξειδωση. Μια σοβαρή ανισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα το οξειδωτικό στρες προκαλείται από ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών παραγόντων ή από την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και ενεργών μορφών οξυγόνου, από περιβαλλοντικές τοξίνες όπως αυτές που προκαλούνται από το κάπνισμα ή από ακατάλληλη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων όπως με χρόνια φλεγμονώδη νόσο. Οι επιστήμονες, σήμερα γνωρίζουν ότι υφίσταται μια

σχέση μεταξύ ελεύθερων ριζών και διάφορων ασθενειών που πλήττουν τον σύγχρονο άνθρωπο αλλά και μεταξύ των ελευθέρων ριζών και στην οξειδωση διάφορων συστατικών των τροφίμων (Lee et al., 2004).

Πίνακας 1.2. Παραδείγματα ελευθέρων ριζών.

Όνομα	Μοριακός Τύπος	Σχόλια/Παραδείγματα
Άτομο υδρογόνου	H^\bullet	Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα.
Trichloromethyl radical (ρίζατριχλωρομεθυλίου)	CCl_3^\bullet	Αποτέλεσμα του μεταβολισμού του CCl_4 .
Superoxide radical (ρίζα σουπεροξειδίου)	O_2^\bullet	Ρίζα με κεντρικό άτομο το οξυγόνο.
Hydroxyl radical (ρίζα υδροξυλίου)	OH^\bullet	Πολύ δραστική, αντιδρά με όλα τα βιομόρια.
Thiyl/perthiyl radical (θειλικές/υπερθειλικές ρίζες)	$\text{RS}^\bullet/\text{RSS}^\bullet$	Ρίζες με κεντρικό άτομο το θείο.

1.3. Αντιμετώπιση της δράσης των ROS – Αντιοξειδωτικά

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν ενζυμικές και μη ενζυμικές ενώσεις, τα λεγόμενα αντιοξειδωτικά, για να υπερασπιστούν τους εαυτούς τους ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Ο όρος «αντιοξειδωτικά» μπορεί να χρησιμεύσει ως μια ετικέτα για κάθε ουσία της οποίας η παρουσία, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση ενός υποστρώματος, παρεμποδίζοντας έτσι την δράση των ελευθέρων ριζών. (Somogyi et al., 2007). Επομένως, αντιοξειδωτικές θεωρούνται όλες οι ενώσεις οι οποίες οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες πριν καταστρέψουν βιολογικά μόρια (Frankel & Meyer, 2000).

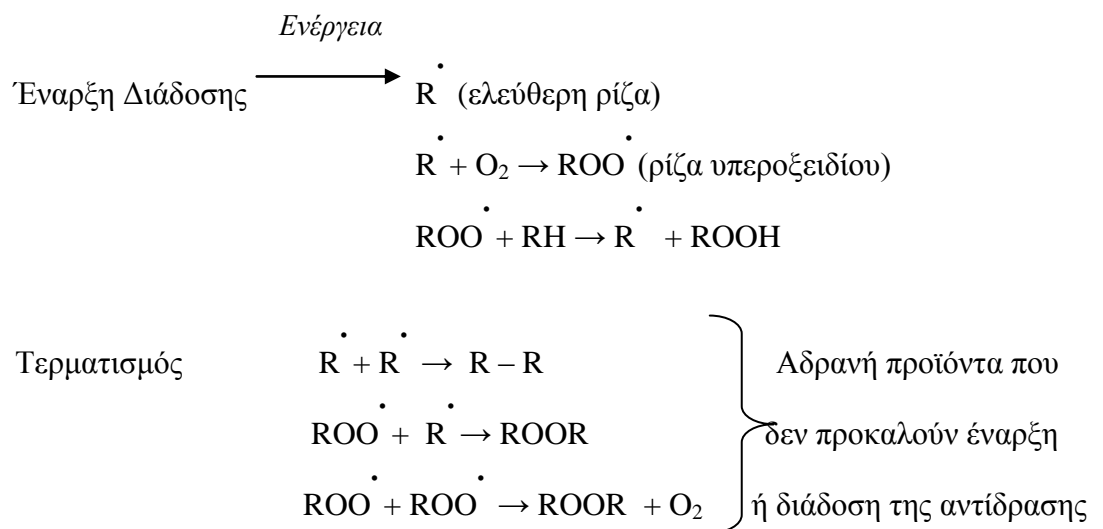
Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να πληρεί τα παραπατώ:

- Να μην επιδρά αρνητικά στον ανθρώπινο οργανισμό
- Ακόμη και όταν βρίσκεται σε πολύ μικρή περιεκτικότητα, να είναι πολύ αποτελεσματικό

- Να μην επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του τροφίμου, δηλαδή να μην του αλλοιώνει την γεύση και τη οσμή
- Στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου να είναι όσο το δυνατό πιο σταθερό
- Να είναι, έστω και λίγο, υδροδιαλυτό (Μπόσκου, 2004)

Τα αντιοξειδωτικά, λοιπόν, αφού μπορούν να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύουν και το ανθρώπινο σώμα από το οξειδωτικό στρες, το οποίο είναι η κύρια αιτία κάποιων καρκίνων και τα καρδιακά νοσήματα (Sun et. al., 2007). Στην επιστήμη των τροφίμων, τα αντιοξειδωτικά έχουν ένα ευρύτερο πεδίο εφαρμογής, δεδομένου ότι περιέχουν συστατικά που εμποδίζουν τα λίπη στα τρόφιμα από τάγγισμα, έτσι προστίθενται σε διάφορα τρόφιμα για την πρόληψη ή την καθυστέρηση της φθοράς τους από τη δράση του οξυγόνου στον αέρα. Στη βιοχημεία και στην ιατρική, αντιοξειδωτικά είναι τα ένζυμα ή άλλες οργανικές ουσίες, όπως βιταμίνη E ή β-καροτένιο, που είναι ικανές να εξουδετερώσουν τις βλαβερές συνέπειες της οξείδωσης σε ζωικούς ιστούς. Η δράση των αντιοξειδωτικών γίνεται με δύο κύριους μηχανισμούς οι οποίοι λειτουργούν σχεδόν παράλληλα. Ο πρώτος μηχανισμός βασίζεται στη προσφορά μονήρους ηλεκτρονίου ενώ ο δεύτερος μηχανισμός στην μεταφορά και προσφορά υδρογόνου (Huang et al., 2005).

Η αλληλουχία αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών μπορεί να παρασταθεί σχηματικώς ως εξής (Μπόσκου, 2004):



Φυτοχημικά είναι οι χημικές ουσίες που εξάγονται από φυτά. Αυτές οι χημικές ουσίες έχουν ταξινομηθεί ως πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς συστατικά, ανάλογα με το ρόλο τους στο μεταβολισμό των φυτών (Krishnaiah et al., 2007). Τα πρωτοταγείς συστατικά περιλαμβάνουν τα κοινά σάκχαρα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, πουρίνες και πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων, κλπ. Ενώ τα δευτερογενή συστατικά περιλαμβάνουν τα αλκαλοειδή (προέρχονται από αμινοξέα), τα τερπένια (μία ομάδα των λιπιδίων) και τα φαινολικά (που προέρχεται από υδατάνθρακες) Δευτερογενείς μεταβολισμός είναι η μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεταβολικών προϊόντων τα οποία παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς ή όργανα ή/και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Οι μεταβολίτες αυτοί προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού (π.χ. ακετυλοσυνένζυμο-Α, ορισμένα αμινοξέα, κ.ά.). Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται στενά με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτικών ειδών. Συνδέεται επίσης με πολλούς οικολογικούς ρόλους, όπως η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, η επικονίαση, ο ανταγωνισμός με άλλα είδη κ.ά. Επίσης η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών η οποία συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης, δηλαδή τον μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων. Η ικανότητα επομένως κάθε φυτού να παράγει τους μεταβολίτες αυτούς, ακολουθεί ένα ιδιαίτερο πρότυπο στο χώρο και στο χρόνο.

Με βάση τη βιοσυνθετική οδό μέσω της οποίας παράγονται και τα χαρακτηριστικά του μορίου, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται συνήθως σε τρεις μεγάλες ομάδες.

- Η ομάδα των φαινολικών ουσιών περιλαμβάνει μεταβολίτες οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου στο μόριό τους και συντίθενται κυρίως μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού ή/και του μηλονικού οξέος.
- Τα τερπένια παράγονται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού και πρόδρομο μόριο το ακέτυλο συνένζυμο Α.
- Η ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες προέρχονται κυρίως από αμινοξέα.
- Οι κηροί, η κουτίνη και η σουβερίνη, παρόλο που παραδοσιακά δεν θεωρούνται ως ενεργοί δευτερογενείς μεταβολίτες, θα αναφερθούν εν συντομία επειδή αποτελούν μια ενδιαφέρουσα ομάδα αμυντικών μορίων (Καραμπουρνιώτης, 2011).

Οι φυτικής προέλευσης αντιοξειδωτικές ενώσεις, πιστεύεται ότι έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου, αφού τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μας παρέχουν ανεπαρκή προστασία έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου και γενικά των ελεύθερων ριζών.

1.4. Διάκριση αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά με βάση την προέλευση τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Φυσικά αντιοξειδωτικά: είναι φαινολικές ενώσεις (τοκοφερόλες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα), ενώσεις αζώτου (αλκαλοειδή, παράγωγα χλωροφύλλης, αμινοξέα, και αμίνες), καροτενοειδή καθώς και ασκορβικό οξύ. Πολλά από τα φυσικά αντιοξειδωτικά, ειδικά τα φλαβονοειδή, επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβακτηριδιακών, αντι-ιών, αντιφλεγμονωδών, αντιαλγικών, αντιθρομβωτικών και αγγειοδιασταλτικών ιδιοτήτων τους (Velioğlu et al., 1998), προκαλώντας, έτσι. Πολύ θετικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Pokorný et al., 2001).

- Συνθετικά αντιοξειδωτικά: είναι ενώσεις με φαινολικές δομές διαφόρων βαθμών υποκατάστασης αλκυλίου. Τα αντιοξειδωτικά αυτά συντίθενται βιομηχανικά. Η χρήση αυτών των ενώσεων, ωστόσο, είναι περιορισμένη λόγω της καρκινογόνου δράσης τους (Velioğlu et al., 1998)

Τα περισσότερα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα συνθετικά (Krishnaiah et al., 2007).

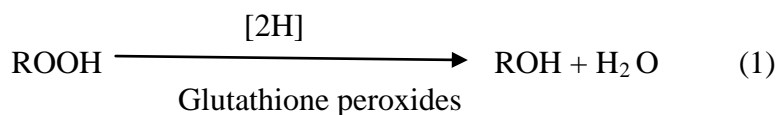
1.5. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών

Η διαρκής ανάγκη αντιμετώπισης μιας πιθανής οξειδωτικής βλάβης στα κυτταρικά συστατικά υποχρεώνει τους αερόβιους οργανισμούς, μεταξύ αυτών και τα φυτά, στην ανάπτυξη ενός αντιοξειδωτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά ένζυμα και αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να δράσουν κατά διάφορους τρόπους, όπως

- Συνέργεια: μπορεί να οριστεί ως το φαινόμενο κατά το οποίο ένας αριθμός ενώσεων, όταν υπάρχουν μαζί στο ίδιο σύστημα, έχουν πιο εντονότερη επίδραση.
- Ανταγωνισμό
- Με την βοήθεια άλλων ενώσεων όπως τα συν-αντιοξειδωτικά και οι επιβραδυντές οξείδωσης, ενώσεις δηλαδή, που μειώνουν το ρυθμό της οξείδωσης χωρίς να εμφανίζουν μία διακριτή φάση υστέρησης της οξείδωσης (Krishnaiah et al., 2007).

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα προληπτικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικά που προκαλούν σπάσιμο των αλυσίδων των ελεύθερων ριζών. Τα προληπτικά αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την οξείδωση μειώνοντας το ρυθμό πυροδότησης της αλυσίδας. Στις περισσότερες περιπτώσεις το προϊόν υδροϋπεροξειδίου, ROOH της οξείδωσης είναι η αιτία για τη διαδικασία έναρξης. Ορισμένα ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μπορούν να μετατρέψουν το H₂O₂ σε H₂O και, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εξίσωση (1).



Αντιοξειδωτικά υπεύθυνα για το σπάσιμο της αλυσίδας είναι γενικά φαινόλες ή αρωματικές αμίνες (Krishnaiah et al., 2007).

1.5.1. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών

- **Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά:**

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι φαινολικές ενώσεις όπως η ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η ΤΒΗQ (δι-τριπ-βουτυλουδροκινόνη), ο ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά.

- **Δεσμευτές μετάλλου:**

Δεσμεύουν μέταλλα τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες π.χ οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό οξύ, φωσφορικό, άλατα κλπ.

- **Δεσμευτές οξυγόνου:**

Ελαττώνουν την συγκέντρωση οξυγόνου σε ένα κλειστό σύστημα, αφού πρώτα αντιδράσουν μαζί του.

- **Αποσβέστες διεγερμένου οξυγόνου:**

Απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο.
π.χ. τοκοφερόλες και β-καροτένιο

- **Αναγωγικά:**

Αναγεννούν φαινόλες με συνέργεια, όπως το ασκορβικό οξύ.

- **Ένζυμα:**

Απομακρύνουν ενεργά είδη οξυγόνου, όπως η δισμουτάση σουπεροξειδίου, υπεροξειδάση γλουταθειόνης και οξειδάση γλυκόζης-καταλάση.

- **Μεθιλοσιλικόνη και στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα:**

Εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια, όπως π.χ. πολύ-διμεθυλοσιλοξάνιο, Δ⁵-αβεναστερόλη-κιτροσταδιενόλη

- *Αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση:*
π.χ. Φωσφορολιπίδια – προϊόντα αντιδράσεων Maillard (Μπόσκου, 2004).

1.6. Αντιοξειδωτικά και ανθρώπινος οργανισμός.

Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς άμυνας για να περιορίσουν το επίπεδο των δραστικών οξειδωτικών και τη ζημία που προκαλείται από αυτούς (Krishnaiah et al., 2007). Γενικά η κατανάλωση τροφών όπως φρούτα και λαχανικά με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά στοιχεία αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Kahkonen, 1999). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου αλληλεπιδρούν με κυτταρικά συστατικά όπως λιπίδια, πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων και των βάσεων του DNA (Atoui et al., 2005). Το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται τροποποιεί μόνιμα το γενετικό υλικό με αποτέλεσμα τη πρόκληση πολυάριθμων εκφυλιστικών ή χρόνιων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση και καρκίνο (Krishnaiah et al., 2007).

Η παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου είναι αποτέλεσμα των αερόβιων μεταβολικών διεργασιών στα ανθρώπινα κύτταρα του σώματος και τα προϊόντα οξείδωσης που δημιουργούνται μέσω αυτών των αντιδράσεων μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα που σχετίζεται με τη γήρανση και τον καρκίνο (Xiaonan et. al., 2012). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν θραύση του DNA, επάγουν την διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης, και την οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (Lee et al., 2004). Κατά την τελευταία δεκαετία, οι ερευνητές έχουν σημειώσει σημαντική πρόοδο στην ερευνά για το ρόλο των ενεργών μορφών οξυγόνου και την σχέση τους με πολλούς τύπους ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλικού επεισοδίου, της καρδιαγγειακής νόσου, του άσθματος, της αρθρίτιδας, της βλάβης του αμφιβληστροειδούς, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας κ.α. Η πρώτη γραμμή άμυνας του σώματος είναι μια σειρά από μονοπάτια ενζύμων που περιλαμβάνουν την καταλάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την υπεροξειδική δισμουτάση (Xiaonan et. al., 2012).

Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποστηρίζει την ιδέα ότι τα αντιοξειδωτικά συστατικά στα τρόφιμα, που παρέχεται από την καθημερινή διατροφή, μπορεί να απενεργοποιήσουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Choe et. al., 2009). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν επίσης αναφερθεί στη σημασία των αντιοξειδωτικών στα λειτουργικά τρόφιμα και στα

συμπληρώματα διατροφής ή στα «φαρμακοτρόφιμα» για τη διατήρηση ή τη βελτίωση της υγείας μειώνοντας τον κίνδυνο ή τις επιπτώσεις των χρόνιων ασθενειών (Xiaonan et. al., 2012).

Γήρανση είναι η διαδικασία συσσώρευσης των ποικίλων επιζήμιων αλλαγών στα κύτταρα και τους ιστούς λόγω της προχωρημένης ηλικίας, με αποτέλεσμα την αύξηση των κινδύνων στις ασθένειες και στον θάνατο (Harman, 2000). Οι κυτταρικές μεμβράνες οξειδώνονται εύκολα και χάνουν τη λειτουργικότητά τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γήρανσης. Η γήρανση επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου και του τρόπου ζωής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και την γενετική διάθεση. Οι κύριες αιτίες της διαδικασίας γήρανσης φαίνεται να σχετίζονται με τις ενεργές μορφές οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες (Lee et al., 2004).

Τα μιτοχόνδρια καταναλώνουν περισσότερο από το 90% του οξυγόνου στους αερόβιους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελούν τη κύρια πηγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Ames et. al., 1993). Ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα του σώματος, συμπεριλαμβανομένου της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της λιπιδιοδιαλυτής βιταμίνης E, των καροτενίων, και της υδατοδιαλυτής βιταμίνης C, ρυθμίζουν την ισορροπία των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών. Όσο γήρανση προχωρά, η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων καθώς και η ικανότητα του οργανισμού να απενεργοποιεί τις επιβλαβείς ενεργές μορφές οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες, μειώνεται. Έτσι λοιπόν η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών που περιέχουν υψηλές ποσότητες αντιοξειδωτικών συστατικών βοηθάει τον οργανισμό να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες. Τα μιτοχόνδρια και οι πυρήνες έχουν το δικό τους DNA. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ευπαθή σε οξειδωτικές βλάβες. Η ρίζα υδροξυλίου οξειδώνει γουανοσίνη ή θυμίνη προς 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη και τη θυμίνη σε γλυκόλη, με αποτέλεσμα να αλλάζει το DNA και να οδηγεί σε μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση. Η συγκέντρωση των οξειδωμένων βάσεων DNA αυξάνεται σε ανθρώπους με χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή κάτω από οξειδωτικές τάσεις, όπως το κάπνισμα. Μικρές βλάβες στο DNA μπορούν να επισκευαστούν από την DNA-γλυκοζυλάση. Εάν το οξειδωτικό στρες, όμως, είναι πολύ μεγάλο, το σύστημα επιδιόρθωσης DNA δεν είναι αρκετό, οπότε η μεταλλαξιογένεση και η καρκινογένεση μπορεί να επαχθούν (Lee et al., 2004).

Η γήρανση συνδέεται στενά με την συσσώρευση των ανενεργών ή λιγότερο ενεργών και περισσότερο θερμικών και ασταθών μορφών πολλών ενζύμων. Οι ελεύθερες μορφές οξυγόνου μπορούν να προσβάλλουν τις πρωτεΐνες και να παράγουν καρβονύλια και άλλες τροποποιήσεις αμινοξέων. Έκθεση των ενζύμων σε ενεργές μορφές οξυγόνου προκαλεί αλλαγές στην καταλυτική δραστηριότητα τους, στη σταθερότητα στη θερμότητα, και στη πρωτεολυτική ευαισθησία τους, παρόμοιες με αυτές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Berlett et. al.,1997).

1.7. Φαινολικές ενώσεις

1.7.1. Εισαγωγή

Φαινολικές ενώσεις και οι πολυφαινόλες είναι πανταχού παρούσες σε φυτά με πάνω από 8.000 δομές. Σαν φυσικά αντιοξειδωτικά που είναι, οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, είναι αντιμεταλλαξιόγones, και μπορούν να αναστείλουν την δράση των ελεύθερων ριζών. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη κατανάλωση των φαινολικών ενώσεων μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και ορισμένων τύπο καρκίνου. (Lee et al., 2004). Έτσι οι πολυφαινόλες διατίθενται και σε σκευάσματα ως συμπληρώματα διατροφής. Επηρεάζουν πολλαπλές αισθητηριακές ιδιότητες των τροφίμων, όπως η γεύση και το χρώμα, και να συμβάλλουν στο άρωμα και τη γεύση πολλών τροφίμων φυτικής προέλευσης. Η συμβολή των ουσιών αυτών στο άρωμα οφείλεται κυρίως στην παρουσία πτητικών φαινολών (Landete, 2012).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια ομάδα χημικών ουσιών, οι οποίες είναι δευτερογενής μεταβολίτες και πιο συγκεκριμένα προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού και του οξικού οξέος και περιέχουν στο μόριό τους την χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης. Στη φύση, οι φαινολικές ενώσεις, βρίσκονται συνήθως συζευγμένες με σάκχαρα και οργανικά οξέα και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριους τύπους: φλαβονοειδών και μη-φλαβονοειδή (Εικόνα 1.3) (Landete, 2012, Crozier et al.2009).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι αναγωγικά μέσα και μπορούν να επιβραδύνουν το ρυθμό οξειδωσης των άλλων μορίων. Αυτές που περιέχονται στα τρόφιμα μπορούν να βοηθήσουν στον περιορισμό της οξειδωτικής βλάβης ενεργώντας άμεσα με τις ενεργές μορφέ οξυγόνου ή διεγείροντας τα ενδογενή συστήματα άμυνας. Οι φαινολικές ομάδες

μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματίσουν σχετικά σταθερές ρίζες φαινοξυλίου, διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης σε κυτταρικά συστατικά. Η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικών ενώσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική δομή τους (Landete, 2012).

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία στους βρώσιμους καρπούς και γενικά στα τρόφιμα. Η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα προσδιορίζεται από τη δομή τους, το μέγεθος, τη διαλυτότητα, του βαθμού γλυκοζυλίωσης, και σύζευξη με άλλες ενώσεις (Hannum, 2004).

1.7.2. Δομή - κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες αναλόγως του αριθμού των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που προσδένονται αυτά. Διακρίσεις γίνονται έτσι ανάμεσα στα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, στυλβένια, και λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή αποτελείται από 2 αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα τα οποία σχηματίζουν ένα οξυγονωμένο ετερόκυκλο (τρίτο δακτύλιο). Έτσι ανάλογα με τον τύπο του οξυγονωμένου ετερόκυκλου μπορούν να διακριθούν σε 6 υποκατηγορίες: οι φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες, και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες (Manach et al., 2004).

A. Φλαβονοειδή

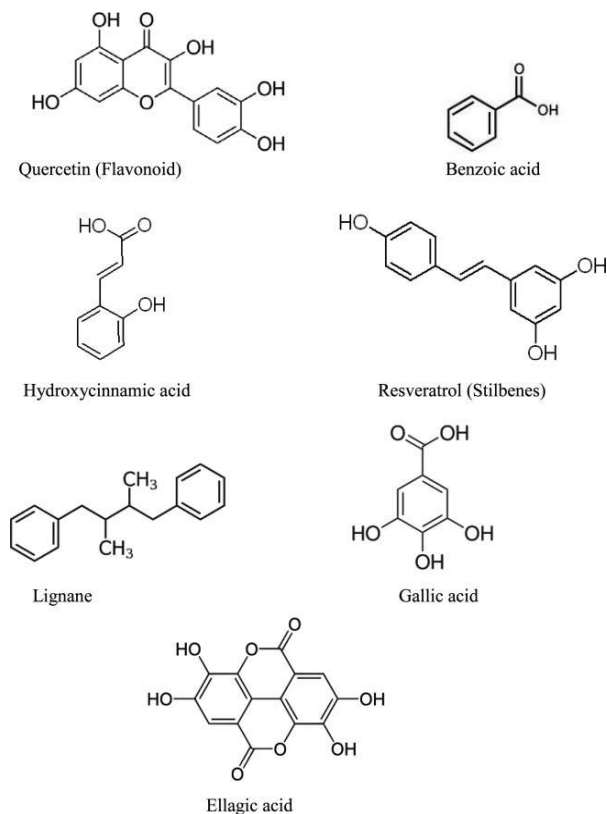
Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων. Ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια ενώσεων με κοινή δομή διφαινυλοπροπάνιο (C6-C3-C6) με διαφορετικούς βαθμούς υδροξυλίωσης, οξείδωσης και υποκατάστασης. Αυτές οι ενώσεις, που ονομάζεται επίσης πολυφαινόλες, συνήθως απαντώνται ως γλυκοζίτες σε φυτά (Pietta P. G., 2000; Crozier et al.2009). Είναι κίτρινες χρωστικές, ανάλογες στην δομή με τις ανθοκυανίνες. Σήμερα είναι γνωστά, περίπου, 400 φλαβονοειδή τα οποία ανήκουν στις εξής ομάδες: φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβανόνες, αουρόνες και χαλκόνες (Μπόσκου, 2004). Τα φλαβονοειδή παρεμβαίνουν στις δραστηριότητες των ενζύμων, που εμπλέκονται στην παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (Wong S. P. Et. al., 2004). Με βάση τη δομή του ανθρακικού σκελετού διακρίνονται σε : φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και προανθοκυανιδίνες. Κάθε ομάδα φλαβονοειδών είναι

διαφορετική, ανάλογα με τον αριθμό του υδροξυλίου, μεθοξυλίου, και άλλους υποκαταστάτες στις 2 δακτυλίους βενζολίου. Το πιο ευρέως διαδεδομένο φλαβονοειδές είναι η κερσετίνη,. Τα φλαβονοειδή έχουν τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες αφού μπορούν να φτιάξουν σύμπλοκα με μέταλλα αναστέλλοντας, έτσι, την έναρξη της οξείδωσης των λιπιδίων (Lee et al., 2004, Heim et al., 2002).

Η κερσετίνη είναι ένα γνωστό φλαβονοειδές στην οποία έχει αποδοθεί η αναστολή της γήρανσης του DNA (Cushnie et. al., 2005)

B. Μη Φλαβονοειδή - Φαινολικά οξέα

Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1), όπως το γαλλικό οξύ και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (C6-C3). Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπτικό οξύ. Η περιεκτικότητα των βρώσιμων φυτών σε υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι γενικά πολύ χαμηλή, με εξαίρεση ορισμένα κόκκινα φρούτα, το μαύρο ραπανάκι, και τα κρεμμύδια.. Επιπλέον, υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι συστατικά σύνθετων δομών, όπως ταννίνες που επίσης τις συναντάται σε κόκκινα φρούτα όπως φράουλες, σμέουρα, βατόμουρα κ.α. (Manach et al.,2004).



Εικόνα 1.3. Φλαβονοειδής και μη φλαβονοειδής φαινολικές ενώσεις (Landete, 2012).

1.7.3. Ανθοκυανίνες

Είναι μια κατηγορία κοκκινωπών υδατοδιαλυτών χρωστικών πολύ διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο. Χημικώς αποτελούν το άγλυκο μέρος των γλυκοζιτών των οποίων το σάκχαρο είναι συνήθως η γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη (Μπόσκου, 2004).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια μεγάλη υποκατηγορία των φλαβονοειδών και είναι χρωστικές ουσίες των φυτών και χάρη σε αυτές εξασφαλίζεται το κόκκινο, μπλε και μοβ χρώμα των λουλουδιών και φρούτων. Η δομή και το χρώμα των ανθοκυανινών, οπότε και ο ρυθμός αλλοίωσης τους μεταβάλλονται με το pH. Σε χαμηλό pH έχουν κόκκινο χρώμα και καθώς το pH μεγαλώνει το χρώμα γίνεται μπλε και τελικά μετατρέπεται σε μια άχρωμη ένωση (Hannum, 2004, Μπόσκου, 2004).

Όλες οι φυσικές ανθοκυανίνες είναι γλυκοζίτες, με τα αντίστοιχα άγλυκα να ονομάζονται ανθοκυανιδίνες. Η περιεκτικότητα των καρπών σε ανθοκυανίνες αυξάνεται όσο προχωρά το στάδιο ωρίμανσης τους. Οι ανθοκυανίνες έχουν δειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αντιοξειδωτικές και σε μελέτες *in vitro* εμπόδισαν την δράση ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου (Hannum, 2004).

Υπάρχουν περίπου 17 ανθοκυανιδίνες που βρίσκονται στη φύση, ενώ μόνο 6 από αυτές είναι οι πιο δημοφιλείς:

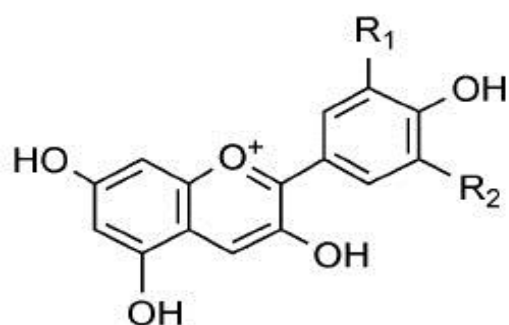
- Κυανιδίνη (Cy),
- Δελφινιδίνη (Dp),
- Πετουνιδίνη (Pt),
- Πεονιδίνη (Pn),
- Πελαργονιδίνη (Pg),
- Μαλβιδίνη (MB)

Οι ανθοκυανίνες ποικίλουν ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση σύνδεσης των υδροξυλίων και των σακχάρων που συνδέονται στο μόριο καθώς επίσης και με την φύση και τον αριθμό των αλειφατικών ή αρωματικών οξέων που συνδέονται στα σάκχαρα.

Οι ανθοκυανίνες έχουν σημαντικές λειτουργίες στην φυσιολογία των φυτών. Πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικονίαση και στη διασπορά των σπόρων. Λόγω των έντονων χρωμάτων τους που προσδίδουν στα φυτά, οι ανθοκυανίνες θεωρούνται υπεύθυνες για φυσικές χρωστικές ύλες στη βιομηχανία τροφίμων (Wu et. al., 2006)

Έχει γίνει γενικά αποδεχτό ότι οι ανθοκυανίνες αποτελούν συστατικά με πληθώρα ευεργετικών δράσεων, οι οποίες είναι οι εξής:

- Αντιοξειδωτική δράση
- Αντιφλεγμονώδης δράση
- Αγγειοπροστατευτική δράση
- Υπογλυκαιμική δράση
- Αντικαρκινική δράση



Εικόνα 1.4. Γενική δομή ανθοκυανιδινών.

Πίνακας 1.3. Δομή μερικών ανθοκυανιδινών (Wu X. et. al., 2006).

Ανθοκυανιδίνη	R₁	R₂
Πελαργονιδίνη	H	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Κυανιδίνη	OH	H
Πετουνιδίνη	OMe	OH
Πεονιδίνη	OMe	H
Μαλβιδίνη	OMe	OMe

1.8. Αντιοξειδωτική δράση στα βατόμουρα

Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό, οι οποίες συνδέονται με τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από εκφυλιστικές ασθένειες (Pellegrini et. al., 2003). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών έχει πολλά οφέλη για την υγεία αφού την προστατεύει από χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων και ορισμένων μορφών καρκίνου (Patil et. al., 2012). Οι διαιτητικές συνήθειες πιστεύεται να επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη αυτών των χρόνιων και εκφυλιστικών νόσων (Willett, 2002). Έχει αποδειχθεί ότι μια διατροφή πλούσια σε φρούτα μειώνει την οξειδωτική βλάβη στο DNA, αποτρέποντας έτσι ένα κρίσιμο βήμα στην έναρξη της καρκινογένεσης (Djuric et al., 1998).

Τα βατόμουρα αποτελούν μια πλούσια πηγή βιταμίνης C, καροτενοειδών, και γενικά πολλών πολυφαινολικών ενώσεων. Καταναλώνονται ευρέως όχι μόνο σε νωπή και κατεψυγμένη μορφή, αλλά και σε μεταποιημένη μορφή, συμπεριλαμβανομένων των κονσερβοποιημένων φρούτων, γιαούρτια, ποτά, μαρμελάδες και ζελέ. Επιπλέον, έχει υπάρξει μια αυξανόμενη τάση στην πρόσληψη εκχυλισμάτων βατόμουρων ως συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα και σε συμπληρώματα διατροφής (Rommel & Wrolstad 1993, Patil et. al., 2012).

Οι φαινολικές ενώσεις στα μούρα έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, και διάφορες άλλες βιολογικές ιδιότητες (Seeram, 2008). Λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων που συνδέονται με τα βατόμουρα, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής τους δράσης είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση της κατανάλωσης βατόμουρων στην ανθρώπινη υγεία (Qin et al, 2010).

1.9. Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

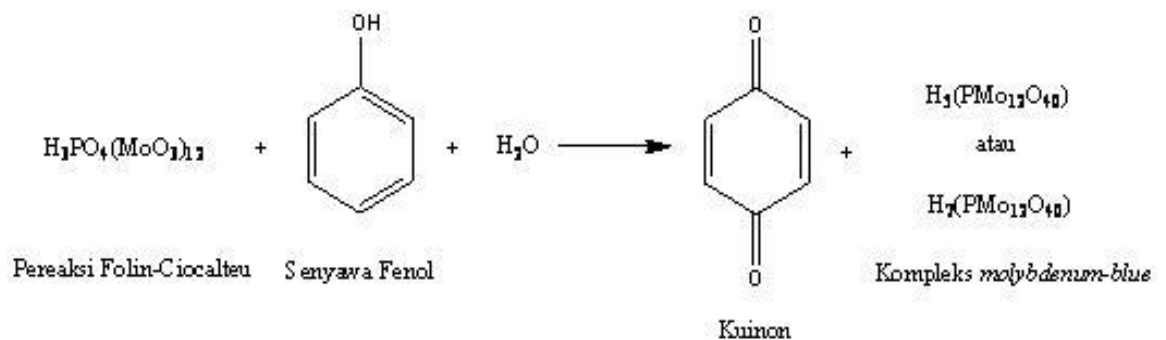
Υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι οποίες στηρίζονται στους μηχανισμούς δράσης των αντιοξειδωτικών. Οι μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας ταξινομούνται δύο κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους:

- ❖ Μεθόδους που βασίζονται στη μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT-μέθοδοι). Στηρίζονται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να παρεμποδίζει τη δράση των ελεύθερων ριζών προσφέροντας σε αυτές ένα μόριο υδρογόνου.
- ❖ Μεθόδους που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET-μέθοδοι), οι οποίες περιλαμβάνουν μία οξειδοαναγωγική αντίδραση με το οξειδωτικό ως δείκτη του τελικού σημείου της αντίδρασης. (Huang et al., 2005). Στηρίζονται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες μεταφέροντας ηλεκτρόνια σε αυτές, με αποτέλεσμα να ανάγονται και να αλλάζουν χρώμα. Ο βαθμός αλλαγής του χρώματος, επηρεάζεται από την ύπαρξη και τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ενώσεων στο υπό μελέτη δείγμα. Σε αυτή την κατηγορία μεθόδων ανήκουν οι εξής:
 - Η μέθοδος Folin – Ciocalteu η οποία βασίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ολικών φαινολικών σε διάφορα εκχυλίσματα (Singleton et al., 1999).
 - Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), κατά την οποία παρατηρείται έντονος μπλε χρωματισμός και αύξηση της απορρόφησης των αναγόμενων μορφών των αντιδραστηρίων (Apak et al., 2007, Huang et al., 2005).
 - Μέθοδος ABTS/TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) και DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging) όπου υφίσταται αποχρωματισμός των οξειδωτικών αντιδραστηρίων (Huang et al., 2005).

Για εγκυρότερα αποτελέσματα, στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, πρέπει να εφαρμόζονται τουλάχιστον δύο ή περισσότερες μεθόδους και στο τέλος να γίνεται σύγκριση στις γενικές τάσεις των τιμών της αντιοξειδωτικής δράσης για το κάθε δείγμα (Frankel et al., 2000).

1.9.1. Μέθοδος Folin – Ciocalteu

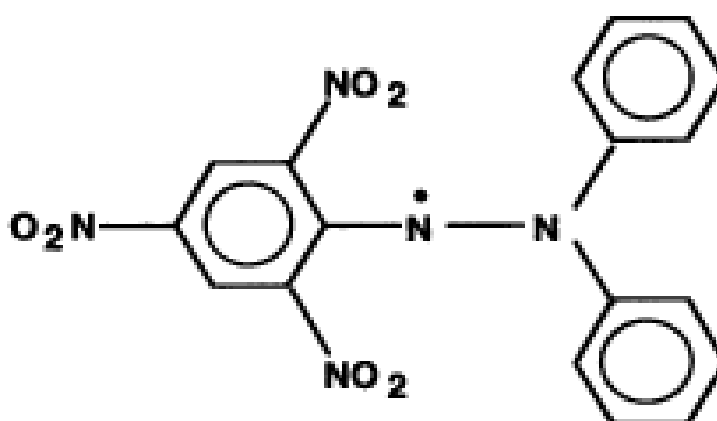
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος. Πρόκειται για ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα, κίτρινου χρώματος. Εμπλέκει οξείδωση σε αλκαλικό διάλυμα φαινολών με αποτέλεσμα να προκύπτει προϊόν με μπλε χρώμα, το οποίο απορροφά στο ορατό και είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W). Οι πολυφαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η μέθοδος αυτή είναι μια διαδικασία γρήγορη, φθηνή και ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν δουλεύουμε με πολλά δείγματα σε μικρή κλίμακα (Balentine et al., 1997; Cicco et. al., 2009).



Εικόνα 1.5. Αντίδραση Folin-Ciocalteu με φαινολική ένωση.

1.9.2. Μέθοδος DPPH

Η 1,1-Διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα η οποία διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα άτομο αζώτου (Sharma et. al., 2008). Είναι μια από τις λίγες σταθερές ρίζες οργανικού αζώτου που υπάρχουν στο εμπόριο. Η μέθοδος DPPH (1,1-διφαινύλο-2-πικρύλοϋδράζυλο) είναι επίσης μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας η οποία βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Η μέθοδος αυτή είναι τεχνικά απλή και δεν είναι χρονοβόρα διαδικασία. Μετά την αντίδραση των αντιοξειδωτικών με την ρίζα, το χρώμα του διαλύματος εξασθενίζει. Το ποσοστό του DPPH υπολογίζεται σε ποσοστό % και είναι ανάλογο με τις αντιοξειδωτικές συγκεντρώσεις. Η κινητική της αντιδράσεως μεταξύ DPPH και αντιοξειδωτικών, όμως, δεν είναι γραμμική σε συγκεντρώσεις DPPH, οπότε η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται χρησιμοποιώντας το IC₅₀, της η συγκέντρωσης δηλαδή που προκαλεί μια μείωση στην αρχική συγκέντρωση DPPH κατά 50% (Huang et al., 2005). Το φως, το οξυγόνο και το pH του μίγματος της αντίδρασης επηρεάζουν επίσης την απορρόφηση του DPPH (Ozcelik et. al., 2003)

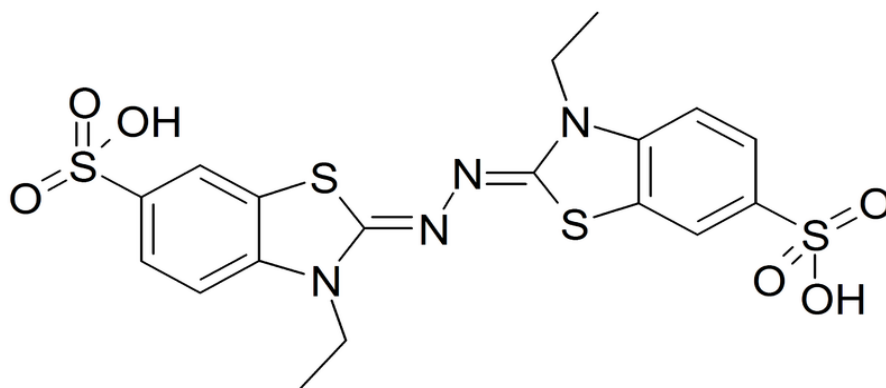


Εικόνα 1.6. Η ελεύθερη ρίζα DPPH.

1.9.3. Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος ABTS μετρά τη σχετική ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν τη ρίζα ABTS. Η ρίζα ABTS παράγεται από την αντίδραση ενός ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα (π.χ. υπερμαγγανικό κάλιο ή υπερθειικό κάλιο) με ABTS. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον έλεγχο του αποχρωματισμού του ρίζας ABTS (Miller et al., 1997).

Η μέθοδος παρουσιάζει πολυάριθμα πλεονεκτήματα. Είναι ταχεία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία ευρεία περιοχή τιμών pH (9, 10), σε αμφοτέρα υδατικά και οργανικά συστήματα διαλυτών. Επίσης, έχει καλή επαναληψιμότητα και απλή να εκτέλεση (Awika et. al., 2003). Είναι εύκολη και ακριβής, αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις και δεν απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες για την παραγωγή της ρίζας ABTS. (Cano et. al., 2002). Όπως και στην μέθοδο DPPH, έτσι και εδώ η κινητική της αντιδράσεως μεταξύ ABTS και αντιοξειδωτικών δεν είναι γραμμική, οπότε η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται χρησιμοποιώντας το IC₅₀, την συγκέντρωση δηλαδή που προκαλεί μια μείωση στην αρχική συγκέντρωση ABTS κατά 50%.

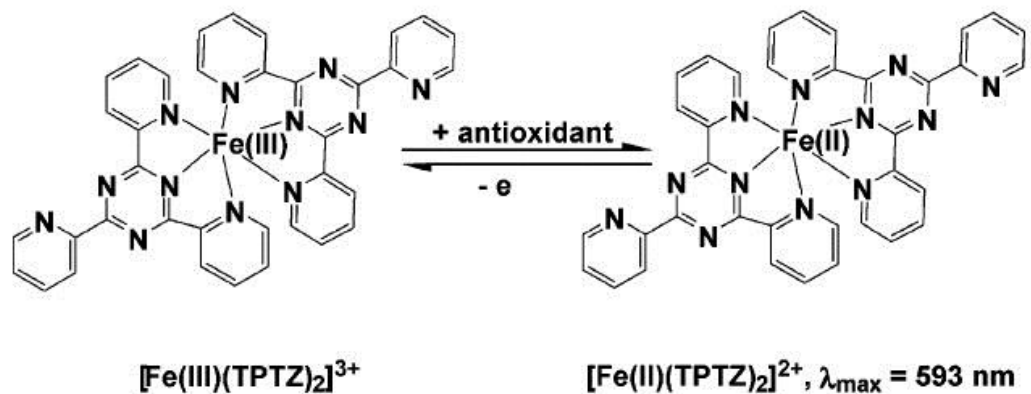


Εικόνα 1.7. Η ελεύθερη ρίζα ABTS.

1.9.4. Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay)

Η μέθοδος FRAP είναι η μοναδική μέθοδος που μετρά άμεσα την αντιοξειδωτική ικανότητα των υπό εξέταση δειγμάτων. Είναι γρήγορη φασματοφωτομετρική μέθοδος και συνεπώς κατάλληλη για την εκτίμηση των συνολικών αντιοξειδωτικών στα φυτά. Στη μέθοδο FRAP, γενικά, προκατεργασία δεν απαιτείται, οι στοιχειομετρικοί συντελεστές είναι σταθεροί και η γραμμικότητα διατηρείται πάνω από ένα ευρύ φάσμα (Halvorsen B et. al., 2011)

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου Fe^{+3} -τριπυριδυλοτριαζίνη (Fe^{+3} -TPTZ) σε δισθενή μορφή. Το διάλυμα αποκτά έντονο μπλε χρώμα και απορροφά στα 593 nm (Benzie & Strain, 1996). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (Huang et al., 2005).

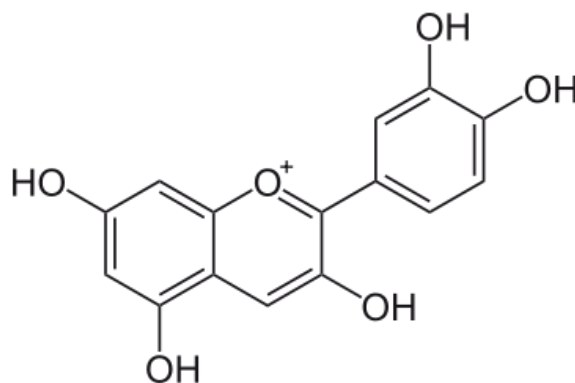


Εικόνα 1.8. Αναγωγή του συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ σε Fe^{2+} -TPTZ παρουσία αντιοξειδωτικού (Huang et al., 2005).

1.9.5. Μέθοδος προσδιορισμού Ανθοκυανίνων

Ο προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανινών έγινε με μέθοδο του διαφορικού pH. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τους τεχνολόγους τροφίμων και οι καλλιεργητές δένδροκηπευτικών για την αξιολόγηση της ποιότητας των νωπών και μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωμοφόρα ομάδα των ανθοκυανινών αλλάζει χημική δομή ανάλογα με το pH και πιο συγκεκριμένα αποχρωματίζεται σε pH 4,5. Έτσι, η διαφορά στην απορρόφηση της χρωστικής ουσίας είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συνολικής μονομερούς ανθοκυανίνης. Ανθοκυανίνες σε πολυμερική μορφή είναι ανθεκτικές στην αλλαγή χρώματος με την αλλαγή στο pH. Επομένως, πολυμερισμένες μορφές ανθοκυανίνης δεν μπορούν να προσδιοριστούν με τη μέθοδο αυτή, επειδή απορροφούν τόσο σε pH 4,5 και 1,0.

Η απορρόφηση θα πρέπει να μετράται στο μέγιστο σημείο του διαλύματος χρωστικής ουσίας, καθώς και η περιεκτικότητα της χρωστικής θα πρέπει να υπολογίζεται με βάση το μοριακό βάρος (Mr) και μοριακό συντελεστή απόσβεσης των μεγάλων ανθοκυανινών στη μήτρα. Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα κυανιδίνης-3-γλυκοζίτης, η οποία είναι η πιο κοινή χρωστική ανθοκυανίνης που βρίσκονται στη φύση (Lee et al., 2005)



Εικόνα 1.9. Δομή Κυανιδίνης.

1.10. Ένζυμα και ενζυμική δραστηριότητα

Τα ένζυμα είναι βιομόρια με πρωτεϊνική σύσταση, που έχουν ως φυσιολογική τους λειτουργία την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων. Ως εκ τούτου ονομάζονται και βιοκαταλύτες. Πιο συγκεκριμένα, η λειτουργία ενός ενζύμου βασίζεται στην επιτάχυνση της αντιδράσεως την οποία καταλύει (δηλαδή στην αύξηση της ταχύτητας), ώστε να επιτευχθεί το σημείο ισορροπίας συντομότερα, συγκριτικά με την αντίδραση απουσία ενζύμου. Το ένζυμο δεν επηρεάζει το σημείο ισορροπίας της αντιδράσεως, ούτε υφίσταται κάποια μόνιμη αλλοίωση στο πέρας της αντιδράσεως.

Κάθε ένζυμο έχει ξεχωριστό υπόστρωμα. Ως υποστρώματα κάθε ενζύμου θεωρούνται οι ενώσεις επί των οποίων το ένζυμο επιφέρει την καταλυτική του δράση, σχηματίζοντας συγκεκριμένα προϊόντα. Ορισμένα ένζυμα, προκειμένου να δράσουν, δεσμεύουν μη πρωτεϊνικά μόρια, τους συμπαραγόντες. Συχνά ο συμπαραγών είναι κάποιο μεταλλοϊόν ή οργανικό μόριο αντιστρεπτά και χαλαρά δεσμευμένο στο ένζυμο, οπότε ονομάζεται συνένζυμο (δεν έχει πρωτεϊνική σύσταση). Στην περίπτωση που ο συμπαραγών είναι ισχυρά δεσμευμένος στο ένζυμο, π.χ. μέσω ομοιοπολικού δεσμού, και δεν απομακρύνεται μετά το πέρας της αντιδράσεως, ονομάζεται προσθετική ομάδα. Το σύμπλοκο ενζύμου-συμπαραγόντα είναι δραστικό και ονομάζεται ολοένζυμο, ενώ το ένζυμο χωρίς το συμπαραγόντα είναι αδρανές και ονομάζεται αποένζυμο.

Τα ένζυμα αναλυτικών, διαγνωστικών και θεραπευτικών εφαρμογών, τα οποία ανήκουν στα ένζυμα μικρού όγκου (παραγωγής ή αγοράς), αποτελούν παρασκευάσματα μεσαίας έως πλήρους ενζυμικής καθαρότητας. Τα ένζυμα αυτά διατίθενται με βάση τις μονάδες συγκεκριμένης ενζυμικής δραστηριότητας του παρασκευάσματος ανά μονάδα βάρους του παρασκευάσματος (enzyme units/g) ή ανά μονάδα βάρους της συνολικής πρωτεΐνης του παρασκευάσματος (enzyme units/mg protein) (Κλώνης, 1997).

1.10.1. Κινητική της Ενζυμικής Αντιδράσεως

Τα ένζυμα, ως καταλύτες, ελαττώνουν δραστικά τον απαιτούμενο χρόνο για την επίτευξη του σημείου ισορροπίας της αντιδράσεως, χωρίς να μεταβάλλουν τη θέση της και χωρίς να τροποποιούνται τα ίδια κατά τρόπο μη αντιστρέψιμο. Αυτό επιτυγχάνεται, αφενός με το να δεσμεύουν το υπόστρωμα στην ενεργό περιοχή ή στο ενεργό κέντρο (μία καταλυτικά κρίσιμη για κάθε ένζυμο κοιλότητα) και αφετέρου, να μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια που αντιστοιχεί στη μεταβατική κατάσταση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης (ΔG), συγκριτικά με την απαιτούμενη ενέργεια απουσία ενζύμου.

Η συνολική ενζυμική αντίδραση, γενικά, διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

- Φάση I: φάση ενάρξεως (initiation phase), η οποία διαρκεί από δέκατα του δευτερολέπτου έως λίγα δευτερόλεπτα. Σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, το οποίο ακολούθως διασπάται σε προϊόν και αρχικό ένζυμο. Κατά την έναρξη της αντίδρασης η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου είναι, συνήθως, πολύ μικρότερη από την συγκέντρωση του υποστρώματος και ελαττώνεται γρήγορα προσεγγίζοντας το μηδέν. Παράλληλα παρατηρείται αύξηση του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος ώστε τελικά να ακολουθήσει η επόμενη φάση στην οποία αντικαθιστάται η δυναμική ισορροπία.

- Φάση II: φάση δυναμικής ισορροπίας ή σταθεροποίησης (steady-state), στην οποία αντιστοιχεί η αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως u_0 (initial reaction rate). Τα αντιδρώντα βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και το σύστημα λειτουργεί με μέγιστη αποδοτικότητα. Η φάση αυτή είναι χρήσιμη για την μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας, της συγκέντρωσης ενζυμικών υποστρωμάτων και τον σχεδιασμό νέων ενζυμικών διεργασιών.

Φάση III: Μη γραμμική φάση (non-linear phase), η οποία αποτελεί το κύριο τμήμα της ενζυμικής αντιδράσεως και διαρκεί μέχρι τη λήξη της τυπικά, την επίτευξη του σημείου ισορροπίας. Στη φάση αυτή η αρχική ταχύτητα ελαττώνεται σταδιακά (Κλώνης, 1997).

1.10.2. Αναστολή Ενζυμικής δραστηριότητας.

Η αντίδραση στην οποία συμμετέχει μόνο ένα υπόστρωμα είναι δυνατόν να επηρεαστεί αρνητικά από την παρουσία αναστολέων ενζυμικής δραστηριότητας. Οι αναστολείς αυτοί έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση του (Κλώνης, 1997).

Σήμερα πολλά από αυτά χρησιμοποιούνται τόσο στην κοσμετολογία όσο και στην φαρμακευτική. Με βάση το μηχανισμό δράσης των καλλυντικών ή των φαρμάκων, μπορούν να ομαδοποιηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

1) Αντιστρεπτοί ενζυμικοί αναστολείς.

α) Συναγωνιστικοί αναστολείς.

Αποτελεί την πιο συνηθισμένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη χημική μορφή φαρμάκων. Η μορφή αυτή μιμείται τη δομή του υποστρώματος ή του συνενζύμου ενός ενζύμου. Για παράδειγμα αν η μοριακή βάση κάποιας ασθένειας είναι ένζυμο που αναγνωρίζουν σαν υπόστρωμα νουκλεοτίδια ή νουκλεοζίτες τότε αυτά, αναστέλλονται αποτελεσματικά από ουσίες που μιμούνται τη δομή των πουρινών ή πυριμιδινών. Τέτοια ένζυμα είναι οι DNA και RNA πολυμεράσες, φωσφοδιεστεράσες, οξειδάση της ξανθίνης, συνθάση του θυμιδυλικού κ.α.

β) Αναστολείς που μιμούνται το σύμπλοκο της μεταβατικής κατάστασης.

Σύμφωνα με τη θεωρία της *μεταβατικής κατάστασης*, αναστολείς που μιμούνται τη δομή του συμπλόκου της μεταβατικής κατάστασης δεσμεύονται εξαιρετικά ισχυρά στα ένζυμα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά τους υποστρώματα ή συνηθισμένους συναγωνιστικούς αναστολείς. Έτσι λοιπόν το σύμπλοκο της μεταβατικής κατάστασης χαρακτηρίζεται από υψηλή τιμή ελευθέρως ενέργειας Gibbs (ΔG) και πολύ μικρή τιμή σταθεράς διάστασης K_D του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα όπως φαίνεται και στην εξίσωση:

$$\Delta G = -RT \ln K_D \quad \text{ή} \quad K_D = e^{-\Delta G/RT}$$

Όπου: R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων

T: η απόλυτη θερμοκρασία.

Σύμφωνα με τον ορισμό της μεταβατικής κατάστασης τα σύμπλοκα αυτά είναι εξαιρετικά ασταθή αφού εμφανίζουν μερικώς σχηματισμένους (ή αλλοιωμένους) χημικούς δεσμούς, πράγμα που δυσκολεύει τον σχεδιασμό δομικών αναλόγων των συμπλόκων της μεταβατικής κατάστασης. Επίσης, χημικά, τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν μη φυσιολογική συμπεριφορά συγκριτικά με αυτή που αναμένεται στο ελεύθερο διάλυμα. Γενικά οι αναστολείς αυτοί σχεδιάζονται ώστε να αποτελούν χημική μορφή των δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων που φυσιολογικά δεσμεύονται ταυτόχρονα στο ένζυμο και σχηματίζουν διπλό ή τριπλό σύμπλοκο κατά την καταλυτική αντίδραση.

γ) Μη συναγωνιστικοί αναστολείς.

Ένας μικρός αριθμός ενζύμων συμπεριφέρονται σε μη συναγωνιστικοί αναστολείς.

Σε αυτή την περίπτωση ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε διαφορετική θέση από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς όμως να απαγορεύει την δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο. Έτσι η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης δεν φθάνει ποτέ την τιμή της μέγιστης ταχύτητας αντιδράσεως χωρίς αναστολή (Κλώνης, 1997). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αναστολέων είναι το nevirapine το οποίο είναι ένας μη νουκλεοζιτικός αναστολέας του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή από τον ιό HIV. Το φάρμακο αυτό αλληλεπιδρά και δεσμεύεται σε ένα αλλοστερικό κέντρο αρκετά απομακρυσμένο από το ενεργό κέντρο. Η δέσμευση στο

κέντρο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της καταλυτικής αντίδρασης μεταβάλλοντας το καθοριστικό στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης. Συγκεκριμένα, απουσία αναστολέα το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης είναι οι διαμορφωτικές αλλαγές της δομής του ενζύμου που λαμβάνουν χώρα σε συνέπεια της δέσμευσης του υποστρώματος. Αντίθετα, παρουσία του αναστολέα nevirapine το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης μεταβάλλεται και είναι πλέον το αργό στάδιο της χημικής τροποποίησης (σηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού κατά τη σύνθεση του μονόκλωνου DNA από dNTPs) και έτσι μειώνεται συνολικά η ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης.

2) Μη αντιστρεπτοί ενζυμικοί αναστολείς.

Μέσω ομοιοπολικού δεσμού οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται χημικά και μόνιμα, είτε με το ένζυμο, είτε με την προσθετική ομάδα αυτού. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τις πλευρικές δραστικές ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων που είτε σχηματίζουν το ενεργό κέντρο, είτε βρίσκονται γειτονικά σε αυτό. Επίσης, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την προσθετική ομάδα του ενζύμου, όπως για παράδειγμα το FAD, FMN ή NADH. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν αποτέλεσμα την μόνιμη απώλεια της ενζυμικής δράσης.

Συγκεκριμένα η απώλεια της ενζυμικής δράσης μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες:

α) στην τροποποίηση της πλευρικής ομάδας ενός καταλυτικά σημαντικού αμινοξικού καταλοίπου του ενεργού κέντρου

β) στην τροποποίηση της πλευρικής ομάδας ενός αμινοξικού καταλοίπου που δε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική αντίδραση αλλά έμμεσα συμμετέχει στην διατήρηση της τρισδιάστατης δομής του ενεργού κέντρου ή μπορεί να βρίσκεται σε μια περιοχή που γειτονεύει με το ενεργό κέντρο (π.χ. στην είσοδο του ενεργού κέντρου). Στην περίπτωση αυτή ο αναστολέας αποτρέπει ή περιορίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο λόγω στερεοχημικών περιορισμών.

1.11. Ελαστικότητα

Το ανθρώπινο δέρμα χωρίζεται σε τρία στρώματα: την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό. Η εξωκυτταρική μήτρα είναι το εξωτερικό μέρος του δέρματος και αποτελείται από, μεταξύ άλλων, ινοβλάστες και πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου και της ελαστίνης. Η εξωκυτταρική μήτρα παρέχει ένα δομικό πλαίσιο που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την ελαστικότητα του δέρματος και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των φυσιολογικών λειτουργιών του σώματος. Η αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας έχει άμεσα συνδεθεί με τη γήρανση του δέρματος και συσχετίζεται με μια αύξηση στην δραστικότητα ορισμένων ενζύμων που εμπλέκονται στη γήρανση του δέρματος, όπως είναι η υαλουρονιδάση, ελαστάση και η κολλαγενάση (Bonnart et al, 2010).

Ελαστίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο συνδετικό ιστό η οποία είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητα του δέρματος και των πνευμόνων. Η πρωτεΐνη αυτή καταλύεται από το ένζυμο ελαστάση. Υποβάθμιση της ελαστίνης συμβαίνει από ενδοκυτταρικές αυξήσεις της ελαστάσης. Αύξηση των επιπέδων της ελαστάσης μπορεί να προκληθεί από την ηλικία ή / και επαναλαμβανόμενη υπεριώδους ακτινοβολίας και οδηγεί σε γήρανση του δέρματος. Με τη γήρανση, δηλαδή, η ελαστίνη μειώνεται, με αποτέλεσμα την απώλεια της αντοχής και ευκαμψίας του δέρματος η οποία οδηγεί σε ορατές ρυτίδες.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς κυτταρικούς μηχανισμούς. Όταν UV ακτινοβολία απορροφάται από το δέρμα τότε υπάρχει αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου που οδηγεί σε επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA και στις πρωτεΐνες ή μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση των γονιδίων που μεταβάλλουν τη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών. Υψηλά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου οδηγούν στην ενεργοποίηση της υαλουρονιδάσης, κολλαγενάσης και ελαστάσης, η οποία μπορεί να συμβάλει περαιτέρω στην γήρανση του δέρματος.

Έτσι λοιπόν πολλά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων. *In vitro* επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα φυτά έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση της ελαστάσης και πολλών άλλων ενζύμων όπως υαλουρονιδάση, κολλαγενάση και τυροσινάσης (Ndlovu et al, 2013).

1.12. Τυροσινάση

Μελανογένεση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που οδηγεί στη σύνθεση των χρωστικών μελανίνης, οι οποίες διαδραματίζουν έναν κρίσιμο προστατευτικό ρόλο έναντι φωτοκαρκινογένεσης του δέρματος. Μεταβολές στην μελανογένεση μπορεί να είναι υπεύθυνες για ορισμένα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δερματολογικών διαταραχών που σχετίζονται με μελανίνη υπερμελάγχρωση (Gomes et al. 2012).

Η αναστολή της τυροσινάσης είναι μία από τις κύριες στρατηγικές για τη θεραπεία της υπερμελάγχρωσης. Υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί που συνδέονται με αυτούς τους αναστολείς όπως είναι η υψηλή κυτταροτοξικότητα, η φτωχή διείσδυση στο δέρμα και χαμηλή σταθερότητα σε σκευάσματα (Nerya et al, 2004). Παρόλα αυτά, διάφορες χημικές ουσίες φυτικής προέλευσης έχουν δοκιμαστεί ως καλλυντικά και ως φαρμακευτικά προϊόντα για την πρόληψη υπερπαραγωγής της μελανίνης στα επιδερμικά στρώματα ή ως παράγοντες λεύκανσης.

Η αυξημένη ποσότητα μελανίνης οδηγεί σε περιπτώσεις διαταραχών του δέρματος, όπως τα σημεία ηλικίας, οι φακίδες, το μέλασμα και το κακόηθες μελάνωμα. Η τυροσινάση είναι γνωστό ότι είναι το ένζυμο κλειδί στην παραγωγή μελανίνης. Φυτά και τα εκχυλίσματά τους, είναι φθινοί και πλούσιοι πόροι των δραστικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναστέλλουν την δράση της τυροσινάσης, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία των δερματολογικών διαταραχών που σχετίζονται με μελανίνη (Gomes et al., 2012).

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο που περιέχει χαλκό και καταλύει δύο διακριτές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου και του μοριακού οξυγόνου με διάφορα φαινολικά υποστρώματα όπως η ο-υδροξυλίωση της μονοφαινόλης σε ο-διφαινόλες (μονοοξυγενάση ή δραστηριότητα cresolase) και την επακόλουθη οξείδωση ο-διφαινόλων προς ο-κινόνες (διφαινόλαση ή δραστηριότητα κατεχολάση) (Gomes et al., 2012). Στην βιοσύνθεση μελανίνης, η τυροσινάση μετατρέπει την L-τυροσίνη μονοφαινόλης, πρώτον στην L-DOPA (ο-διφαινόλη) και στην συνέχεια αυτήν σε ο-ντοπακινόνη, η οποία είναι αυτόματα κυκλάση σε μορφή λευκοντοπαχρώματος η οποία γρήγορα μετατρέπεται σε ντοπαχρώμα, το οποίο πολυμερίζεται και σχηματίζεται η μελανίνη (Faria et al., 2007)

Η μελανίνη είναι μια από τα πιο ευρέως κατανομημένες χρωστικές και βρίσκεται σε βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα. Το χρώμα του δέρματος και των μαλλιών των θηλαστικών καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων, από τους οποίους ο πιο σημαντικός είναι ο βαθμός και η κατανομή της μελανίνης. Η μελανίνη διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην απορρόφηση των ελεύθερων ριζών και προστατεύει το δέρμα από τα διάφορα είδη των ιοντιζουσών ακτινοβολιών, συμπεριλαμβανομένης και της UV ακτινοβολίας (Kim et. al., 2005).

Ωστόσο, η αυξημένη ποσότητα της μελανίνης οδηγεί σε μελαγχρωστικές διαταραχές του δέρματος και εμφανίζεται ως αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Διάφορες δερματολογικές διαταραχές, όπως τα σημεία ηλικίας, οι φακίδες, οι πανάδες, το μέλασμα και το κακόηθες μελάνωμα, προκύπτουν από τη συσσώρευση υπερβολικού επιπέδου της επιδερμικής μελάγχρωσης. Αναστολείς της τυροσινάσης ως εκ τούτου μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμοι για την θεραπεία ορισμένων δερματολογικών διαταραχών που σχετίζονται με την μελανίνη και βρίσκουν εφαρμογές σε καλλυντικά προϊόντα λεύκανση και αποχρωματισμό μετά από ηλιακά εγκαύματα. Παρά τις εκτεταμένες έρευνες σχετικά με τους παράγοντες λεύκανσης και την υπέρχρωση, οι υπάρχοντες παράγοντες παρουσιάζουν περιορισμό στη διάρκεια της υψηλής τοξικότητας, χαμηλή σταθερότητα, μικρή διείσδυση στο δέρμα, και ανεπαρκή δράση (Gomes et al., 2012)

Διάφορες ενώσεις, όπως κάποιοι αναστολείς της τυροσινάσης, υδροκινόνη, κοζικό οξύ, αρβουτίνη και κορτικοστεροειδή, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως δερματίτιδα και ερεθισμό του δέρματος, καταστροφή των μελανοκυττάρων, μεταφλεγμονώδη μελάγχρωση, ωχρονοσία, κυτταροτοξικότητα και τον καρκίνο του δέρματος (Kim et. al., 2005). Ως εκ τούτου, πολλοί αναστολείς τυροσινάσης που καταστέλλουν τη μελανογένεση έχουν μελετηθεί ενεργά με σκοπό την ανάπτυξη σκευασμάτων για τη θεραπεία της υπέρχρωσης (Khan et. al, 2005).

Στην μελέτη αυτή ελέγχθηκε αν τα επιλεγμένα φυτά *Rubus sp.* περιέχουν αναστολείς τυροσινάσης χρησιμοποιώντας *in vitro* δοκιμασίες, οι οποίοι μπορεί να προσφέρουν μια αποτελεσματική και ασφαλή θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση δερματολογικών διαταραχών που σχετίζονται με την μελανίνη.

1.13. Ακετυλοχολινεστεράση

Η Ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται στις νευρομυϊκές συνάψεις και σε ορισμένες συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η Ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και σε οξικό οξύ. Υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση στον βασικό υμένα των συναπτικών πτυχών της μυϊκής ίνας (Kandel et. al., 1995). Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο κλειδί στο χολινεργικό νευρικό σύστημα και είναι ένα από τα πιο μελετημένα ένζυμα στον τομέα της νόσου του Alzheimer. Η ακετυλοχολίνη συντίθεται με καταλυτική δράση του ενζύμου ακετυλο-τρανσφεράση της χολίνης, από χολίνη και ακέτυλοσυνένζιμο Α, στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων. Καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση και διασπάται σε χολίνη και οξικό οξύ, τα οποία χρησιμοποιούνται ξανά για την σύνθεσή της (Corbett et al. 1984).

Η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης είναι σημαντική τόσο από ιατρικής όσο και από και τοξικολογικής άποψης. Ορισμένες ουσίες που ομοιοπολικά αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα και ως παράγοντες χημικού πολέμου. Ορισμένοι αναστολείς χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία διαφόρων διαταραχών και ως συμπτωματική προσέγγιση για τη διαχείριση της νόσου του Alzheimer (Kraut et. al. ,2000)

Η ακετυλοχολινεστεράση, λοιπόν, είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ορθή ρύθμιση της συγκέντρωσης της ακετυλοχολίνης κατά την διάρκεια της νευροδιαβίβασης, διαδικασία που συνδέεται άμεσα με την μετάδοση μηνυμάτων στο νευρικό σύστημα. Συνεπώς οποιαδήποτε διαταραχή ή παρεμπόδιση της ομαλής δράσης του ενζύμου μπορεί να έχει πολύ άσχημες συνέπειες για τον οργανισμό με εσχάτη τον θάνατο (Corbett et al., 1984).

1.14. Σκοπός της μελέτης.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου, των ανθοκυανινών, των φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, σε βατόμουρα του γένους *Rubus spp.* Παράλληλα μελετήθηκε στους ίδιους καρπούς η ύπαρξη αναστολέων συγκεκριμένων ενζύμων (τυροσινάσης, ελαστάσης και ακετυλοχολινεστεράσης) και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα. Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από τέσσερεις διαφορετικές ποικιλίες και κάθε δείγμα καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος (φωτισμός, θερμοκρασία και έδαφος).

Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι

2.1. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (ορατού-υπεριώδους) της εταιρείας Hitachi (μοντέλο U-2000, με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm) με θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας. Χρησιμοποιήθηκε για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηρότητας.
- Φασματόμετρο μονής δέσμης. Χρησιμοποιήθηκε για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας και περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά.
- Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με το pHμετρο ORION μοντέλο 410 A
- Φυγόκεντροι Heraeus SEPATECH Contrifuge 17 RS, Varifyge 20 RS και η Heraeus Istruments Biofuge primo.
 - Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific
 - Ζυγός
 - Αναδευτήρας (Vortex)
 - Λουτρό Υπερήχων

2.2. ΥΛΙΚΑ

Διαλύματα

- 22 δείγματα Blackberries και Raspberries
- Αιθανόλη
- Μεθανόλη
- Απεσταγμένο νερό.

2.2.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό των φαινολικών οξέων

- Διάλυμα άνυδρου ανθρακικού νατρίου (25% w/v Na_2CO_3). Για την παρασκευή του αναμιγνύονται 50g Na_2CO_3 σε 200 mL ddH₂O.

- Διάλυμα Folin - Ciocalteu reagent

Διατίθεται στο εμπόριο και παρασκευάζεται ως εξής: 100g βολφραμικού νατρίου και 25g μολυβδαινικού νατρίου διαλύονται σε 700 mL αποσταγμένου νερού. Προστίθενται 50 mL H_3PO_4 (85% v/v), 100mL πυκνού HCL και φέρεται σε βρασμό για 10 ώρες, κάτω από κατακόρυφο ψυκτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 150g θεικού λιθίου, μερικές σταγόνες βρώμιου και φέρεται πάλι σε βρασμό για 15 min. Το μίγμα ψύχεται και συμπληρώνεται ο όγκος του στο 1L με αποσταγμένο νερό.

- Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέως (για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης).

Διαλύουμε 0,5gr γαλλικού οξέως σε 10 mL αιθανόλης και προσθέτουμε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

2.2.2. Διαλύματα για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

- Διάλυμα οξικού νατρίου $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (300mM).

Αποτελείται από 1,55gr $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ διαλυμένα σε 8mL οξικό οξύ και 492mL ddH₂O.

- Διάλυμα TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 10 mM και HCl 40 mM (φρέσκο).

Διαλύονται 6,25mg TPTZ με 6,66μL HCl (12M) και 1,9mL ddH₂O.

- Διάλυμα $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20mM) (φρέσκο).

Διαλύονται 10,812 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ σε 2mL ddH₂O.

- Διάλυμα FRAP.

Αποτελείται από διάλυμα $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, διάλυμα TPTZ και HCl και διάλυμα $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ σε αναλογία 10:1:1 αντίστοιχα.

- Ασκορβικό οξύ (1M) (για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης)

2.2.3. Διαλύματα για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS

- Διάλυμα ABTS (7mM).

Αποτελείται από 3,84 mg ($M_r=548,63$) ανά mL ddH₂O.

- Διάλυμα υπερθειικού καλίου, K₂O₈S₂ (2,45 mM).

Αναμιγνύονται 0,66 mg K₂O₈S₂ ($M_r=270,32$) ανά mL ddH₂O.

2.2.4. Διαλύματα για το προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

- Ελεύθερη ρίζα DPPH (2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl radical) (0,1mM).

Διαλύονται 0,2mg DPPH σε 5mL μεθανόλη.

2.2.5. Διαλύματα για το προσδιορισμό ανθοκυανών

- Διάλυμα χλωριούχου καλίου, KCl (0,025M), pH=1.

Αναμιγνύονται 0,372gr KCl σε 200mL ddH₂O και η ρύθμιση pH γίνεται με HCl 12M.

- Διάλυμα οξικού νατρίου (0,4M), pH=4,5.

Αποτελείται από 10,886 g οξικού νατρίου διαλυμένα σε 200mL ddH₂O.

2.2.6. Διαλύματα για το προσδιορισμό των φλαβονοειδών

- Διάλυμα νιτρώδες νατρίου.

Αναμιγνύονται 5gr νιτρώδες νατρίου σε 100mL ddH₂O (5% w/v).

- Διάλυμα χλωριούχου αργιλίου, AlCl₃.

Διαλύονται 10g χλωριούχου αργιλίου σε 100mL ddH₂O (10% w/v).

- Διάλυμα καυστικού νατρίου, NaOH (1M).

Αποτελείται από 1g NaOH διαλυμένο σε 1L ddH₂O.

- Διάλυμα κερσετίνης.

2mg κερσετίνης διαλύονται σε MeOH:ddH₂O (1:1) (για τον προσδιορισμό της πρότυπης καμπύλης).

- Διάλυμα εκχύλισης MeOH:ddH₂O.

Σε αναλογία 4:1 (v/v).

2.2.7. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του ενζύμου τυροσινάση

- Ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου, KH₂PO₄ 50mM (Mr= 136,09), pH=6,5.

Διαλύονται 1,36g KH₂PO₄ σε 200 mL ddH₂O και ρυθμίζεται το pH στο 6,5.

- L-Τυροσίνη 1mM (Mr= 181,2).

Διαλύονται 1,8 mg L-τυροσίνη σε 210 mL ddH₂O.

- Διάλυμα ενζύμου τυροσινάση

Διαλύονται 500-1000 units τυροσινάσης / mL ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ (50 mM, pH=6,5), δηλαδή 0,3mg - 0,5mg τυροσινάσης /mL διαλύματος.

2.2.8. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του ενζύμου ελαστάση

- Διάλυμα Tris-HCl 100mM (Mr= 121,14), pH=8.

Αποτελείται από 0,242gr Tris-HCl διαλυμένα σε 200mL ddH₂O.

- Διάλυμα SucAla₃-PNA 4,4mM (Mr= 451,43).

Διαλύεται 1mg SucAla₃-PNA σε 1mL ddH₂O.

- Διάλυμα ενζύμου ελαστάση 0,2-0,5 units/mL

Διαλύονται 1mg (4 units/mg) ελαστάσης σε 1mL Tris-HCl (stock).

Στη συνέχεια αραιώνεται 100μL (stock) και 900μL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM, pH=8), (0,4 units).

2.2.9. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH=8.

Διαλύονται 1,36g δισόξινου φωσφορικού καλίου σε 100mL ddH₂O.

- Υπόστρωμα ιωδιούχου ακετυλοθειοχολίνης.

Διαλύονται 10,8 mg ιωδιούχου ακετυλοθειοχολίνης σε 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH=8.

- DTNB 0,1M (Mr=396,35).

Σε 5mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH=8 διαλύονται 19,8mg DTNB και στην συνέχεια προσθέτουμε 9,5 mg άνυδρο ανθρακικό νάτριο.

- Διάλυμα βουτυρυλοχολινεστεράσης (20 units/mg)

Αποτελείται από 5units ενζύμου διαλυμένα σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH=7.

2.2.10. Βιολογικό υλικό

Τα δείγματα *Rubus* spp από τα οποία έγιναν τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ευγενική προσφορά της Dr. Liliana Sfichi- Duke (University of Agricultural Science and Veterinary Medicine “Ion Ionescu de la Brad”, Iasi, Romania, Department of Horticulture).

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1. Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου φαινολών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu:

Για το προσδιορισμό των ολικών φαινολών πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχέλιση του δείγματος με εκχυλιστικό μέσο MeOH:ddH₂O (4:1 v/v).

Η εκχέλιση του δείγματος έγινε με γουδί σε διάλυμα MeOH : ddH₂O και τα αφήνουμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες περίπου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.

- Σε κυψελίδα 1mL προσθέτουμε τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

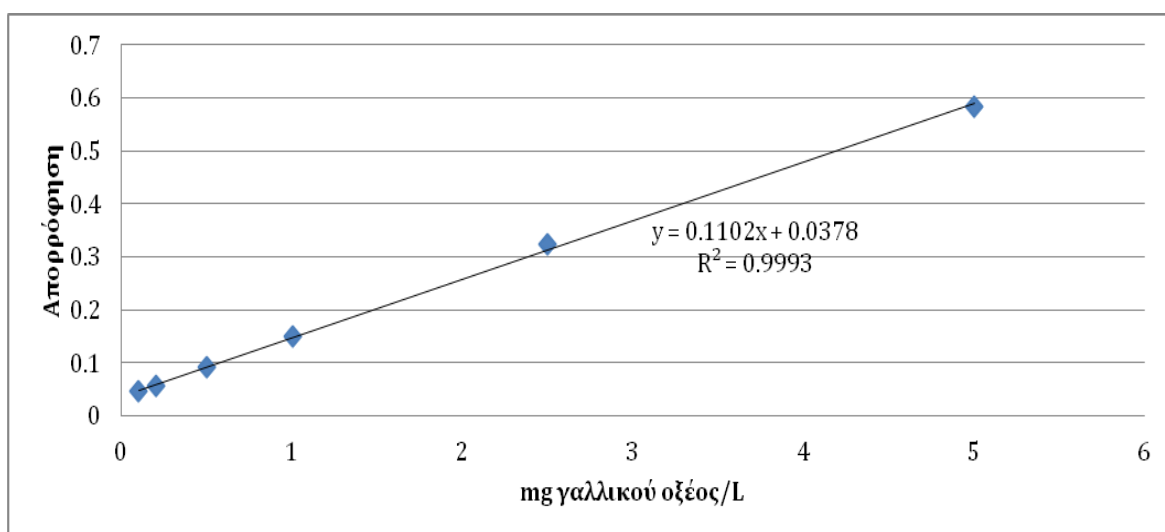
Πίνακας 2.1. Διαλύματα για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Δείγμα</i>
ddH₂O (μL)	800	790
Folin-Ciocalteu αντιδραστήριο (μL)	50	50
Δείγμα (μL)	-	10

- Ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
 - Προσθέτουμε 150μL ανθρακικού νατρίου (25% w/v) τα αναδεύουμε και τα αφήνουμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
 - Φωτομετρούμε στα 765nm
-
- Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία έχοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Μετρήσεις απορρόφησης για τον προσδιορισμό πρότυπης καμπύλης.

<i>Γαλλικό οξύ (mg/L)</i>	<i>Απορροφήσεις στα 765nm</i>
0,1	0,047
0,2	0,056
0,5	0,091
1	0,151
2,5	0,323
5	0,584



Σχήμα 2.1. Σχεδιάγραμμα πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος.

Η Πρότυπη Καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή $R^2=0,9993$ και ακολουθεί την εξίσωση $y = 0,1102x + 0,0378$, όπου y η απορρόφηση στα 765 nm και x η συγκέντρωση σε mg/L του γαλλικού οξέος (Σχήμα 2.1).

2.3.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP (Ferric anion Reducing Antioxidant Power)

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο ddH₂O, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Παρασκευάζεται το διάλυμα FRAP και αφήνεται στο υδατόλουτρο για 4 λεπτά, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.
- Σε κυβελίδα 1mL προσθέτονται τα ακόλουθα αντιδραστήρια (Πίνακας 2.3):

Πίνακας 2.3. Διαλύματα για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Δείγμα</i>
FRAP (μL)	988	988
Δείγμα (μL)	2 (ddH ₂ O αντί για δείγμα)	2

- Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση στους 37°C για 4 λεπτά.
- Φωτομέτρηση στα 593nm.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης:

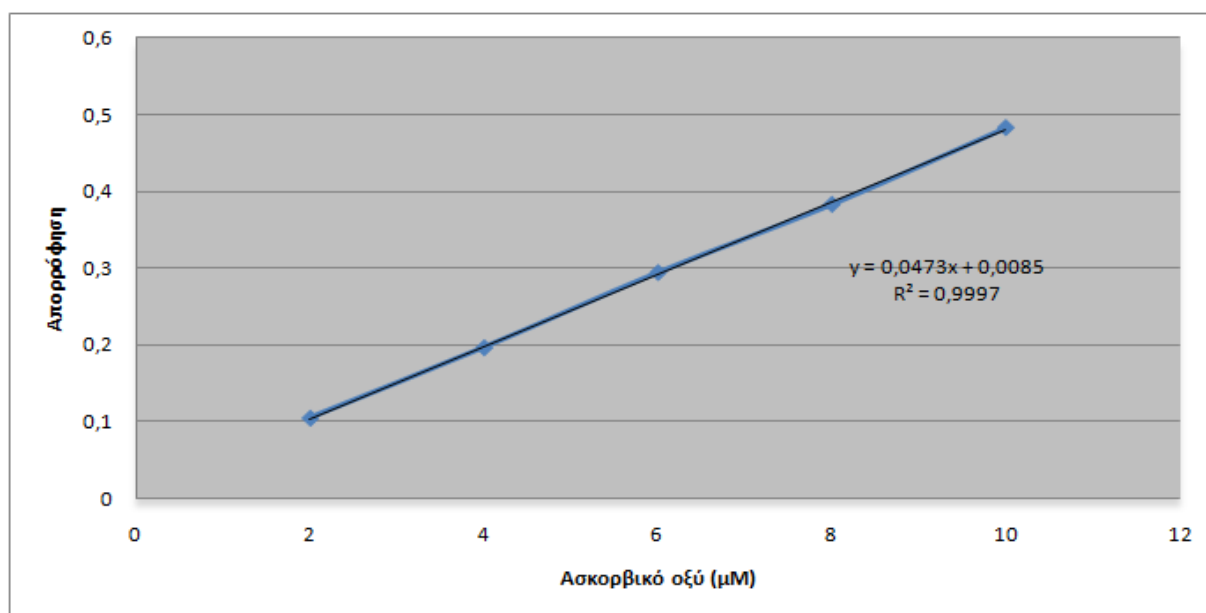
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ασκορβικό οξύ συγκέντρωσης 1M.

- Παρασκευάζεται διάλυμα και στην συνέχεια παίρνουμε τιμές απορρόφησης για 2 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 8 μM, 10 μM, 15 μM.
- Σε κυβελίδα των 1000 μL προστίθενται διαφορετικός όγκος ασκορβικού οξέος και μL διαλύματος FRAP μέχρι τελικού όγκου 1000 μL.
 - Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση στους 37°C για 4 λεπτά. Φωτομέτρηση στα 593nm.
 - Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 2.4.

Αναλυτικότερα οι τιμές FRAP του εκχυλίσματος του κάθε δείγματος υπολογίζονται σε μM , από την πρότυπη καμπύλη:

Πίνακας 2.4. Απορροφήσεις στα 593nm της αντίδρασης FRAP με διαφορετικές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος.

<i>Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος (μM)</i>	<i>Απορροφήσεις στα 593nm.</i>
2	0,104
4	0,196
6	0,294
8	0,383
10	0,483



Σχήμα 2.2. Σχεδιάγραμμα πρότυπης καμπύλης αναφοράς ασκορβικού οξέος

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,9997 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 0,0473x + 0,0085$, όπου y η απορρόφηση στα 593 nm και x η συγκέντρωση σε μM του ασκορβικού οξέος (Σχήμα 2.2).

2.3.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-ϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH[•])

Για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκαν:

- Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] το οποίο είναι φωτοευαίσθητο γι' αυτό φυλάσσεται στο σκοτάδι σε σκουρόχρωμο δοχείο (1000 μ L μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μ M ρίζας DPPH[•]).
- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο τη μεθανόλη, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Σε κυβελίδα των 1000 μ L τοποθετούνται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακας 2.5. Στη συνέχεια ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση για 10 min στο σκοτάδι. Μετά την επώαση γίνεται μέτρηση απορρόφησης στα 517nm. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τιμής $IC_{50} ABS = f(\mu L \text{ δείγματος})$.

Πίνακας 2.5. Διαλύματα για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Χωρίς αναστολή</i>	<i>Με αναστολή</i>					
<i>DPPH (μL)</i>	-	1000	95	90	85	80	70	50
<i>MeOH (μL)</i>	1000	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δείγμα (μL)</i>	-	-	5	10	15	20	30	50

2.3.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS

Για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο την αιθανόλη, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Παρασκευάζεται το διάλυμα ABTS (7mM) και το $K_2O_8S_2$ (2,45 mM). Αναμιγνύονται τα διαλύματα ABTS και $K_2O_8S_2$ σε αναλογία 1:1 και το χρώμα γίνεται σταδιακά σκούρο πράσινο (απορρόφηση ~1). Αυτό διατηρείται στο σκοτάδι για 12-16 ώρες.
- Ανάμειξη του παραπάνω διαλύματος (ABTS - $K_2O_8S_2$) με αιθανόλη σε αναλογία 0,87 mL_(ABTS - K2O8S2) : 44 mL_(EtOH) (v/v).
- Σε κυψελίδα των 1000μL προσθέτονται τα παρακάτω αντιδραστήρια (Πίνακας 2.6).
-

Πίνακας 2.6. Διαλύματα για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Χωρίς αναστολή</i>			<i>Με αναστολή</i>			
<i>ABTS - K₂O₈S₂ (μL)</i>	-	1000	995	990	985	980	970	950
<i>EtOH (μL)</i>	1000	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δείγμα (μL)</i>	-	-	5	10	15	20	30	50

- Ακολουθεί καλή ανάδευση των αντιδραστηρίων, επώαση για 10 min και στη συνέχεια λαμβάνεται απορρόφηση στα 734nm. Κατόπιν πραγματοποιείται υπολογισμός της τιμής $IC_{50} ABS = f(\mu L \text{ δείγματος})$.

2.3.5 Προσδιορισμός ανθοκυανινών

Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο ddH₂O, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου
- Σε κυψελίδα των 1000μL προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια (Πίνακας 2.7).

Πίνακας 2.7. Διαλύματα για τον προσδιορισμό ανθοκυανινών.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>1^η κυβέτα</i>	<i>2^η κυβέτα</i>
<i>A_{pH=1} (μL)</i>	995	-
<i>B_{pH=4,5} (μL)</i>	-	995
<i>Δείγμα (μL)</i>	5	5

- Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 15 min. Στη συνέχεια λαμβάνεται φάσμα στην περιοχή ορατού φωτός (400nm - 700nm), ενώ παίρνονται οι απορροφήσεις για ABS_{max} και ABS_{700nm}.
- Ο υπολογισμός συγκέντρωσης των ανθοκυανινών πραγματοποιείται με τις εξής σχέσεις:

$$A = (A_{\max} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1} - (A_{\max} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

$$\text{mg / L} = A * Mr * Df * 10^3 / \epsilon * d$$

Όπου: Mr (μοριακό βάρος Κυανιδίνης-3-γλυκοζίτης) = 449,2 g/mol

ϵ = 26900 συντελεστής μοριακής απόσβεσης σε L/mol* cm για
κυανιδίνη-3-γλυκοζίτης

d = μήκος κυψελίδας 1 cm

10³ = συντελεστής μετατροπής από g σε mg

Df = συντελεστής αραίωσης

2.3.6 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχείλιση του δείγματος με εκχυλιστικό μέσο MeOH:ddH₂O (4:1 v/v). Αναμιγνύουμε το δείγμα με το διάλυμα MeOH : ddH₂O και τα αφήνουμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες περίπου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Σε κυψελίδα 1mL προσθέτουμε τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 2.8.

Πίνακας 2.8. Διαλύματα για τον προσδιορισμό φλαβονοειδών.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>NaNO₂ (μL)</i>	30	30
<i>AlCl₃ (μL)</i>	60	60
<i>MeOH : ddH₂O (μL)</i>	300	-
<i>Δείγμα (μL)</i>	-	300

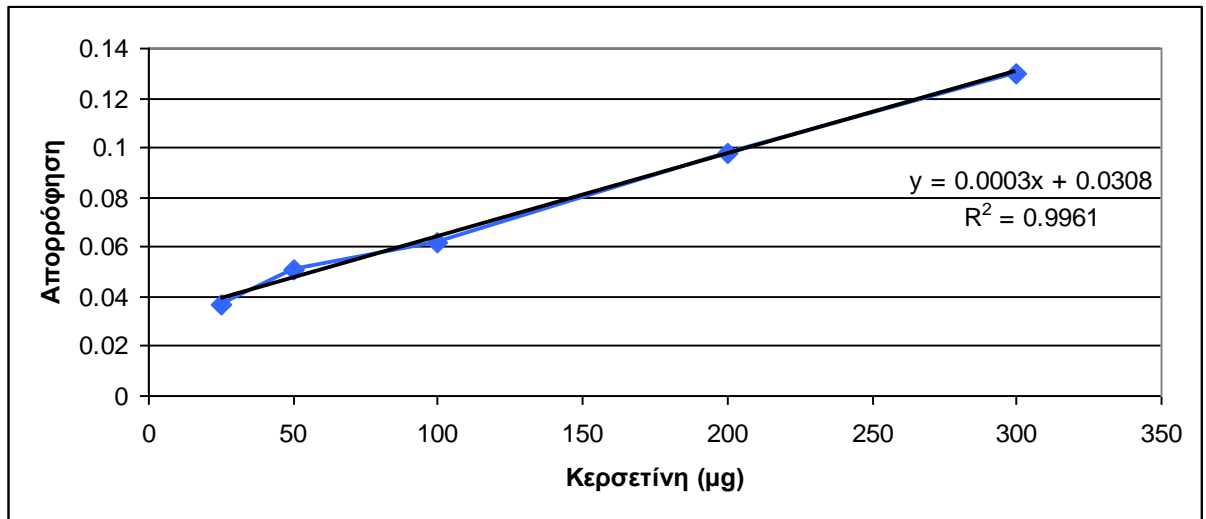
- Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 5 min
- Προσθήκη 200 μL NaOH και 410 μL MeOH:ddH₂O (1:1 v/v), ακολουθεί καλή ανάδευση και φωτομέτρηση στα 510 nm.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κερσετίνης

Από μητρικό διάλυμα κερσετίνης (2 mg/mL) σε MeOH:ddH₂O (1:1 v/v), παρασκευάζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις (25-300 μg/mL). Οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς κερσετίνης, όπου C= συγκέντρωση και A= απορρόφηση στα 510 nm (Σχήμα 2.3).

Πίνακας 2.9. Μετρήσεις απορρόφησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις κερσετίνης.

<i>Συγκέντρωση κερσετίνης ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Απορροφήσεις στα 510nm</i>
25	0,037
50	0,051
100	0,062
200	0,098
300	0,130



Σχήμα 2.3. Σχεδιάγραμμα πρότυπης καμπύλης αναφοράς κερσετίνης.

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,9961 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 0,0003x + 0,0308$, όπου y η απορρόφηση στα 510 nm και x τα $\mu\text{g/mL}$ της κερσετίνης.

2.3.7 Μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου τυροσινάσης

Για την μελέτη της αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου τυροσινάσης πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο ddH₂O, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Φτιάχνουμε μίγμα αντιδραστηρίων (pH=6,5) το οποίο περιέχει: 9 mL ddH₂O, 10 mL διάλυμα KH₂PO₄ και 10 mL L-τυροσίνη (1 mM) και το οποίο αποτελεί τον μάρτυρα.
- Σε κυψελίδα 1mL τοποθετούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια του Πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10. Διαλύματα για την μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου τυροσινάσης.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Χωρίς αναστολή</i>	<i>Με αναστολή</i>
<i>Μίγμα αντιδραστηρίων (μL)</i>	1000	970	900
<i>Τυροσινάση (μL)</i>	-	30	30
<i>Δείγμα (μL)</i>	-	-	70

- Ακολουθεί καλή ανάδευση και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας για 5 min στα 475 nm.
- Ακολουθεί λυοφιλίωση στα δείγματα για τον προσδιορισμό των mg δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν.

Για τον υπολογισμό της % αναστολής/mg δείγματος υπολογίζω τα πιο κάτω:

$$\% \text{ ταχύτητα αντίδρασης} = \left(\frac{D/\text{min δείγματος}}{D/\text{min μάρτυρα}} \right) * 100$$

$$\% \text{ αναστολή ενζύμου} = 100 - (\% \text{ ταχύτητα αντίδρασης})$$

$$\% \text{ αναστολής / mg δείγματος} = (\% \text{ αναστολή ενζύμου})/\text{mg δείγματος μετά την λυοφιλίωση}$$

Επιλέχθηκε εκείνο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναστολή για να υπολογιστεί η τιμή IC₅₀ (Πίνακας 2.11).

Πίνακας 2.11. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και δείγματος για τον υπολογισμό της τιμής ανασταλτικής ισχύος IC₅₀.

<i>Συγκέντρωση Δείγματος (mg/mL)</i>	<i>0</i>	<i>0,09</i>	<i>0,18</i>	<i>0,27</i>	<i>0,45</i>	<i>0,54</i>	<i>0,72</i>	<i>0,81</i>	<i>0,9</i>	<i>1,08</i>
<i>Μίγμα αντιδραστηρίων (μL)</i>	970	960	950	940	920	910	890	880	870	850
<i>Τυροσινάση (μL)</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

2.3.8 Μελέτη αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ελαστάση

Για την μελέτη της αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ελαστάση πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχέλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο ddH₂O, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Σε κυψελίδα 1mL προσθέτουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 2.12.

Πίνακας 2.12. Διαλύματα για την μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου ελαστάσης.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Χωρίς Αναστολή</i>	<i>Με αναστολή</i>
Tris-HCl (μL)	560	540	540-x
SucAla₃-PNA (μL)	40	40	40
Ελαστάση (μL)	-	20	20
Δείγμα (μL)	-	-	x (30 ή 50)

- Καλή ανάδευση

- Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας για 4 λεπτά στα 410 nm
- Ακολουθεί λυοφιλίωση στα δείγματα για τον προσδιορισμό των mg δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν.

Για τον υπολογισμό της % αναστολής/mg δείγματος προσδιορίζονται:

$$\% \text{ ταχύτητα αντίδρασης} = \left(\frac{D/\text{min δείγματος}}{D/\text{min μάρτυρα}} \right) * 100$$

$$\% \text{ αναστολή ενζύμου} = 100 - \% \text{ ταχύτητα αντίδρασης}$$

$$\% \text{ αναστολής / mg δείγματος} = \% \text{ αναστολή ενζύμου / mg δείγματος μετά την λυοφιλίωση}$$

- Στη συνέχεια επιλέγεται το δείγμα με τη μεγαλύτερη αναστολή για τον προσδιορισμό της τιμής IC₅₀.

➤ Σε κυψελίδα 1mL προσθέτουμε τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 2.13.

Πίνακας 2.13. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και δείγματος για τον υπολογισμό της τιμής ανασταλτικής ισχύος IC₅₀.

<i>Συγκέντρωση Δείγματος (mg/mL)</i>	0	0,014	0,028	0,056	0,083	0,111	0,140	0,167	0,194
Tris-HCl (μL)	540	535	530	520	510	500	490	480	470
SucAla₃-PNA (μL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Ελασάση (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

2.3.9 Μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης

Για την μελέτη της αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχείλιση του δείγματος σε γουδί με εκχυλιστικό μέσο ddH₂O, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου.
- Σε κυψελίδα 1mL προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια του Πίνακα 2.14

Πίνακας 2.14. Διαλύματα για την μελέτη αναστολής δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Μάρτυρας</i>	<i>Χωρίς Αναστολή</i>	<i>Με Αναστολή</i>
Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικό Διάλυμα pH=8 (μL)	962	946	896
Υπόστρωμα Ιωδιούχος ακετυλοθειοχολίνη (μL)	6	6	6
DTNB (μL)	32	32	32
βουτυρυλοχολινεστεράσης (μL)	-	16	16
Δείγμα (μL)	-	-	50

- Καλή ανάδευση
- Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας για 2 min στα 412 nm.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 2.15), παρουσιάζονται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες ανάπτυξης τους.

Πίνακας 2.15. Ποικιλίες και συνθήκες καλλιέργειας στα δείγματα *Rubus* sp.

ΕΙΔΟΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΦΩΤΙΣΜΟΥ - Πλήρης ηλιακό φως (HL) - 25% ηλιακό φως (LL)	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΑΦΟΥΣ - χόμα (S) - χόμα / μίγμα τύρφης (S/P)	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΡΔΕΥΣΗΣ - Πλήρης άρδευση (μάρτυρας) - Μη αρδευόμενες (καταπόνηση)
ΚΑΡΠΟΙ Blackberry	1	<i>Thornfree</i>	HL	S	Καταπόνηση
	2		HL	S	Μάρτυρας
	3		HL	S/P	Μάρτυρας
	4		LL	S	Μάρτυρας
	5		LL	S/P	Μάρτυρας
	6	<i>Lochness</i>	HL	S/P	Μάρτυρας
	7		HL	S/P	καταπόνηση
	8		HL	S	Μάρτυρας
	9		HL	S	Καταπόνηση
ΚΑΡΠΟΙ Raspberry	10	<i>Ruvi</i>	HL	S/P	Μάρτυρας
	11		LL	S/P	Μάρτυρας
	12		HL	S	Μάρτυρας
	13		LL	S	Μάρτυρας
	14		LL	S/P	Καταπόνηση
	15		LL	S	Καταπόνηση
	16	<i>Cayuga</i>	HL	S	Μάρτυρας
	17		LL	S	Μάρτυρας
	18		HL	S/P	Μάρτυρας
	19		LL	S/P	Μάρτυρας
	20		HL	S	Καταπόνηση
	21		LL	S	Καταπόνηση
	22		LL	S/P	Καταπόνηση

Κεφάλαιο 3 : Αποτελέσματα

3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

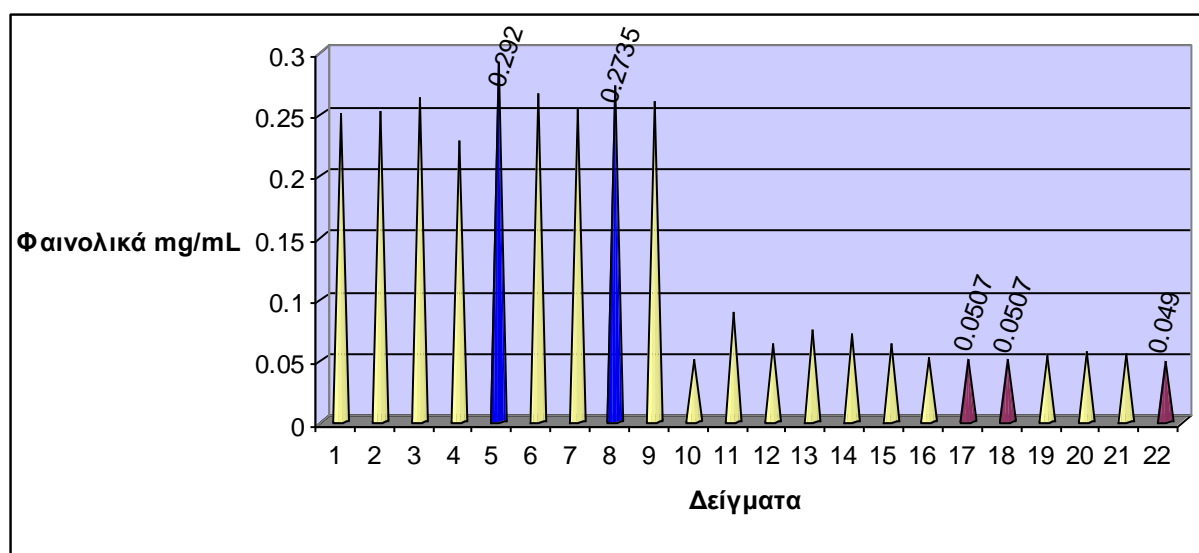
Όπως αναφέρεται και πιο πάνω εκχυλίστηκαν και αξιολογήθηκαν 22 διαφορετικά δείγματα *Rubus sp.* και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 765 nm για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Πίνακας 3.1). Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 2.1). Η αναγωγή των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $y = 0,1102x + 0,0378$. Κατόπιν έγινε μετατροπή των τιμών σε mg γαλλικού οξέος ανά g δείγματος (Πίνακας 3.2) και τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.1.

Πίνακας 3.1. Απορρόφηση δειγμάτων στα 765nm για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου.

<i>ΔΕΙΓΜΑ (5μL)</i>	<i>Απορρόφηση 765nm</i>	
1	0,578	0,602
2	0,626	0,621
3	0,614	0,625
4	0,539	0,539
5	0,665	0,696
6	0,622	0,631
7	0,589	0,600
8	0,641	0,641
9	0,604	0,619
10	0,595	0,600
11	0,553	0,551
12	0,734	0,754
13	0,839	0,875
14	0,794	0,866
15	0,720	0,765
16	0,574	0,648
17	0,598	0,593
18	0,626	0,565
19	0,647	0,620
20	0,688	0,648
21	0,675	0,628
22	0,567	0,589

Πίνακας 3.2. Αναγωγή αποτελεσμάτων βάσει της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος.

<i>Δείγμα</i>	<i>Αρχικό βάρος σε mg</i>	<i>mg φαινολικού περιεχομένου / mL</i>	<i>mg φαινολικού περιεχομένου / g ξηράς ουσίας</i>
1	44,08	0,2505	7,52
2	40,34	0,2515	7,55
3	43,43	0,2640	7,92
4	47,12	0,2275	6,83
5	42,99	0,2920	8,76
6	49,86	0,2670	8,01
7	50,52	0,2530	7,59
8	41,22	0,2735	8,20
9	51,20	0,2605	7,81
10	48,30	0,0508	1,52
11	46,16	0,090	2,70
12	45,65	0,0641	1,92
13	46,16	0,0743	2,23
14	46,01	0,0719	2,16
15	45,25	0,0640	1,92
16	49,84	0,0520	1,56
17	47,03	0,0507	1,52
18	47,67	0,0507	1,52
19	42,78	0,0541	1,62
20	47,97	0,0572	1,72
21	44,43	0,0557	1,67
22	41,72	0,0490	1,47



Σχήμα 3.1. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων. Τα δείγματα που απεικονίζονται με μωβ χρώμα είναι αυτά με τις υψηλότερες τιμές ενώ τα δείγματα που απεικονίζονται με μπλε χρώμα είναι αυτά με τις χαμηλότερες τιμές.

3.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

Αφού εκχυλίστηκαν και προετοιμάστηκαν κατάλληλα τα 22 διαφορετικά δείγματα *Rubus sp.*, έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 593 nm για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων (Πίνακας 3.3). Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές.

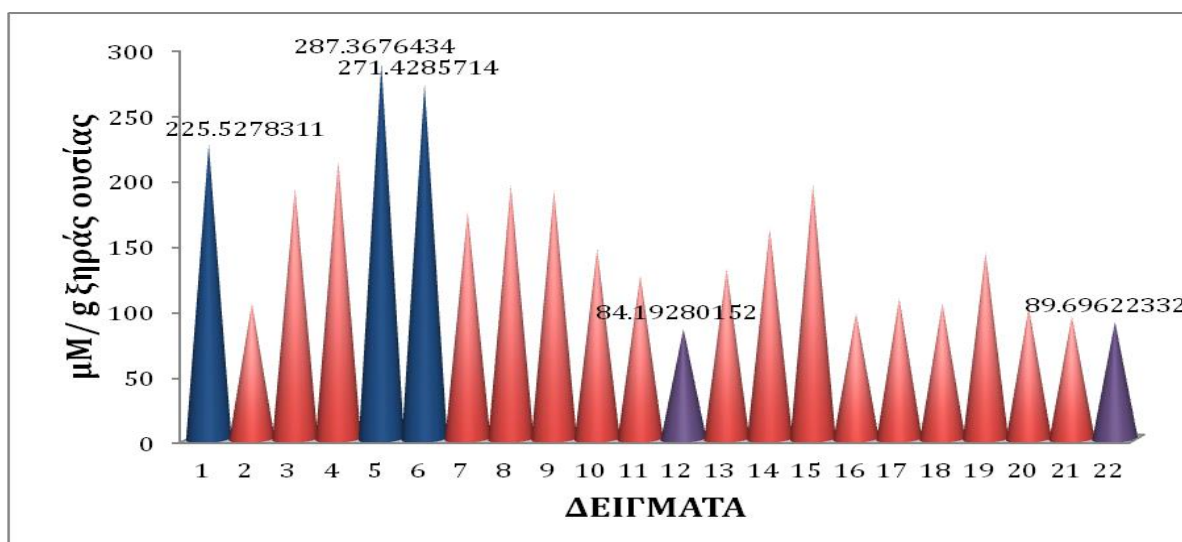
Πίνακας 3.3. Απορροφήσεις δειγμάτων στα 593 nm για προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

<i>Δείγμα</i>	<i>Απορρόφηση</i> _{593nm}	
1	0,448	0,452
2	0,273	0,294
3	0,418	0,419
4	0,561	0,550
5	0,559	0,562
6	0,588	0,615
7	0,331	0,412
8	0,579	0,438
9	0,511	0,448
10	0,286	0,309
11	0,244	0,246
12	0,193	0,202
13	0,250	0,280
14	0,383	0,366
15	0,371	0,391
16	0,216	0,299
17	0,238	0,232
18	0,218	0,263
19	0,273	0,266
20	0,233	0,184
21	0,183	0,272
22	0,208	0,222

Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 2.2) υπολογίζουμε τις τελικές τιμές FRAP σε μM . Κατόπιν έγινε μετατροπή των τιμών σε $\mu\text{M/g}$ ξηράς ουσίας δείγματος (Πίνακας 3.4). Τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.

Πίνακας 3.4. Τελικά αποτελέσματα αναλύσεων FRAP σε μM και $\mu\text{M/g}$.

<i>Δείγμα</i>	<i>Αρχικό βάρος (mg)</i>	<i>FRAP μM</i>	<i>$\mu\text{M/g}$ ξηράς ουσίας</i>
1	41,68	9,33	225,53
2	55,93	5,81	103,88
3	45,15	8,67	192,03
4	54,32	11,56	212,81
5	40,61	11,67	287,37
6	46,20	12,54	271,43
7	44,08	7,67	174,00
8	54,42	10,57	194,23
9	52,29	9,96	190,48
10	42,01	6,11	145,44
11	39,90	5	125,31
12	47,51	4	84,19
13	41,68	5,42	130,04
14	48,10	7,74	160,91
15	40,44	7,88	194,86
16	54,50	5,26	96,51
17	44,43	4,79	107,81
18	47,18	4,90	103,86
19	38,67	5,52	142,75
20	42,13	4,23	100,40
21	49,22	4,63	94,067
22	48,72	4,37	89,70

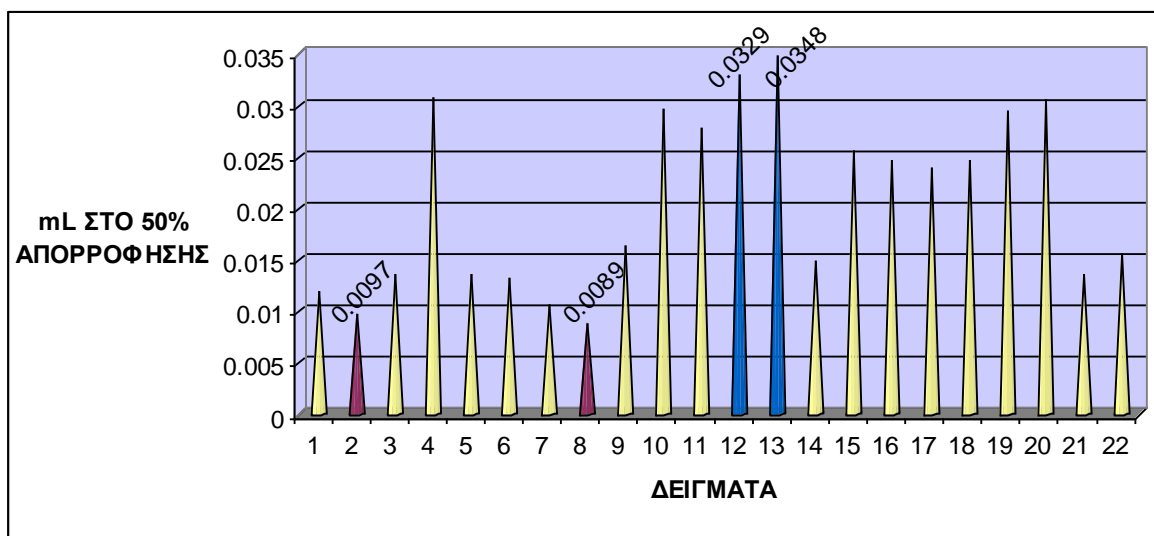


Σχήμα 3.2. Τελικά αποτελέσματα FRAP σε $\mu\text{M/g}$ ξηράς ουσίας δείγματος. Με μπλε και μωβ χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα με τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές, αντίστοιχα.

Οι τιμές FRAP κυμαίνονται από 84,19 $\mu\text{M/g}$ μέχρι 287,34 $\mu\text{M/g}$. Υψηλότερη τιμή παρουσιάζει το δείγμα 5, ενώ χαμηλότερη το δείγμα 12.

3.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-ϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH[•])

Όπως και στις προηγούμενες διαδικασίες εκχυλίζουμε και προετοιμάζουμε κατάλληλα τα δείγματα *Rubus sp* και μετά από δεκάλεπτη επώαση στο σκοτάδι μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 517 nm για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος $IC_{50} ABS=f(mL \text{ δείγματος})$ (Πίνακας 3.5). Τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.3.

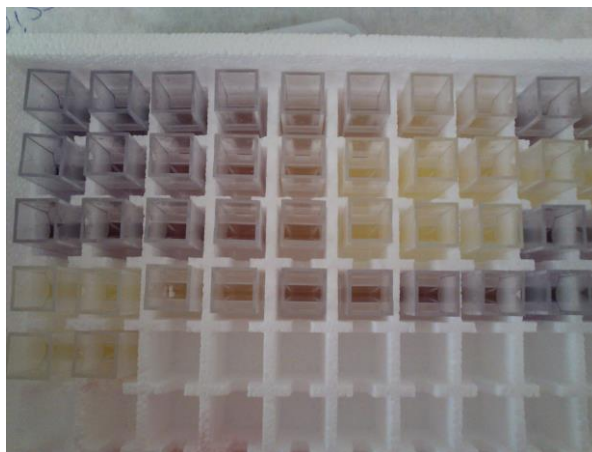


Σχήμα 3.3. Τελικά αποτελέσματα DPPH. Τα δείγματα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση είναι τα μωβ και με την χαμηλότερη είναι τα μπλε.

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα αναλύσεων DPPH, $IC_{50} \text{ ABS} = f(\text{mL δείγματος})$.

<i>Δείγμα</i>	<i>Αρχικό Βάρος (mg)</i>	<i>μL (50% της απορρόφησης)</i>	<i>mL (50% απορρόφησης)</i>
1	47,46	12,03	0,0120
2	48,27	9,73	0,0097
3	46,58	13,65	0,0137
4	40,18	30,84	0,0308
5	51,25	13,66	0,0137
6	41,66	13,21	0,0132
7	53,46	10,73	0,0107
8	50,44	8,88	0,0089
9	49,47	16,37	0,0164
10	44,52	29,66	0,0297
11	41,13	27,81	0,0278
12	40,56	32,94	0,0329
13	49,83	34,78	0,0348
14	51,05	14,97	0,0150
15	46,62	25,59	0,0256
16	50,03	24,58	0,0246
17	41,86	23,92	0,0239
18	44,46	24,58	0,0246
19	44,66	29,54	0,0295
20	46,94	30,47	0,0305
21	42,16	13,58	0,0136
22	48,93	15,73	0,0157

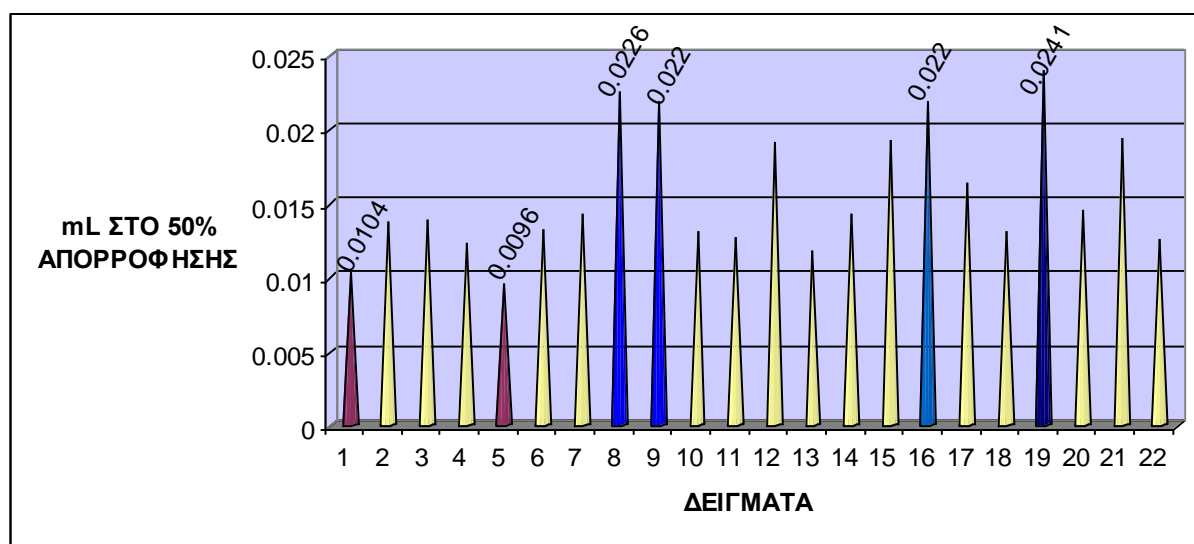
Οι τιμές κυμαίνονται από 0,009 mL μέχρι 0,035 mL. Τα δείγματα που παρουσίασαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι το δείγμα 8, το οποίο είχε επίσης υψηλή συγκέντρωση φαινολικών στοιχείων και φλαβονοειδών και το δείγμα 2, το οποίο είχε υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών. Τα ανήκουν σε δύο διαφορετικές ποικιλίες, αλλά καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα 8 και 2 ανήκουν στην ποικιλία *Lochness* και *Thornfree* και καλλιεργήθηκαν με πλήρες ηλιακό φως και άρδευση σε χώμα.



Εικόνα 3.1: Αλλαγή στο χρώμα των δειγμάτων μετά την προσθήκη της ρίζα DPPH

3.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS

Αφού προηγηθεί η εκχύλιση και η προετοιμασία των δειγμάτων *Rubus sp* και μετά από δεκάλεπτη επώαση στο σκοτάδι μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 734 nm για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος IC_{50} , $ABS=f(mL \text{ δείγματος})$ (Πίνακας 3.6). Τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.4. Τελικά αποτελέσματα ABTS. Το μωβ χρώμα αντιπροσωπεύει τα δείγματα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και το μπλε αυτά με την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα αναλύσεων ABTS, $IC_{50} \text{ ABS} = f(\text{ mL δείγματος})$.

<i>ABTS</i>		
Δείγμα	μL στο 50% Απορρόφησης	mL στο 50% Απορρόφησης
1	10,41	0,0104
2	13,75	0,0138
3	13,92	0,0139
4	12,43	0,0124
5	9,63	0,0096
6	13,29	0,0133
7	14,33	0,0143
8	22,62	0,0226
9	22,06	0,0220
10	13,22	0,0132
11	12,70	0,0127
12	19,21	0,0192
13	11,75	0,0118
14	14,27	0,0143
15	19,30	0,0193
16	21,95	0,0220
17	16,45	0,0165
18	13,13	0,0131
19	24,12	0,0241
20	14,59	0,0146
21	19,50	0,0195
22	12,64	0,0126

Σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμαι ότι πολλά δείγματα παρουσιάζουν τις ίδιες τιμές ABTS. Τα δείγματα που παρουσίασαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι πρωτίστως το δείγμα 5, το οποίο είχε επίσης την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και σε φαινολικό περιεχόμενο. Υψηλές τιμές επίσης παρουσίασε και στα φλαβονοειδή αλλά και στην μέθοδο FRAP. Ακολουθεί το δείγμα 1 το οποίο παρουσίασε επίσης σχετικά υψηλές τιμές στα φλαβονοειδή αλλά και στην μέθοδο FRAP. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα δυο αυτά δείγματα, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Thornfree*, δεν έχουν καμία απολύτως ομοιότητα στο τρόπο και τις συνθήκες στα οποία καλλιεργήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα 5 καλλιεργήθηκε σε 25% ηλιακό φως, σε μίγμα από τύρφη και χώμα και αρδεύταν κανονικά. ενώ το δείγμα 1 καλλιεργήθηκε σε πλήρες ηλιακό φως, σε χώμα και χωρίς άρδευση.

3.5 Προσδιορισμός Ανθοκυανινών

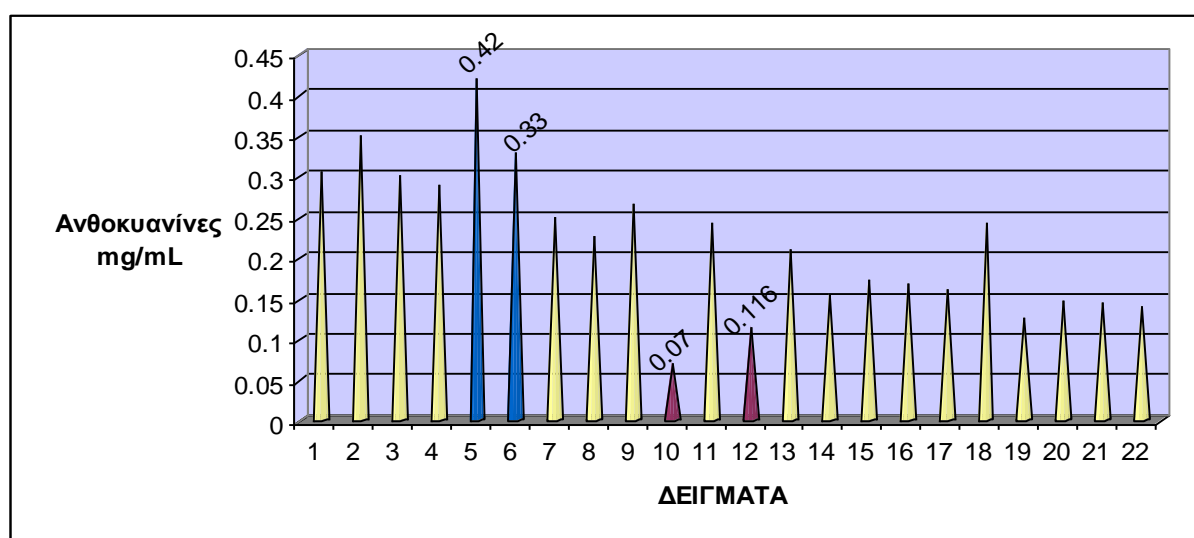
Αφού έγινε η εκχύλιση των δειγμάτων και η προετοιμασία τους, προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 700nm. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε ένα διάλυμα με pH=1 και ένα με pH=4,5. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα 2 φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των απορροφήσεων (Πίνακας 3.7). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ανθοκυανινών σε mg/L και τελικά σε (mg/L)/αρχικό βάρος (Πίνακας 3.8), σύμφωνα με την παράγραφο 2.3.5. Τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.5.

Πίνακας 3.7. Απορροφήσεις δειγμάτων στα 700nm για τον προσδιορισμό των ανθοκυανινών.

<i>Δείγμα 5μL</i>	<i>A_{max} (nm)</i>	<i>A_{max} (PH=1)</i>	<i>A_{max} (PH=4,5)</i>
1	514	0,110	0,018
2	515	0,107	0,002
3	514	0,093	0,002
4	511	0,101	0,014
5	510	0,141	0,015
6	511	0,110	0,017
7	515	0,090	0,015
8	510	0,085	0,017
9	507	0,094	0,014
10	520	0,028	0,007
11	513	0,068	-0,005
12	513	0,037	0,002
13	512	0,077	0,014
14	508	0,057	0,010
15	512	0,064	0,012
16	513	0,065	0,014
17	515	0,060	0,011
18	512	0,082	0,009
19	513	0,049	0,011
20	515	0,046	0,0012
21	515	0,052	0,008
22	513	0,057	0,015

Πίνακας 3.8. Τελικές συγκεντρώσεις ανθοκυανινών σε mg/mL και (mg/L) /αρχικό βάρος.

<i>Δείγμα 5μL</i>	<i>Αρχικό βάρος (mg)</i>	<i>A</i>	<i>Ανθοκυανίνες mg/mL</i>	<i>(mg/L) / αρχικό βάρος</i>
1	39,80	0,092	0,307	7,72
2	53,75	0,105	0,350	6,52
3	49,22	0,091	0,303	6,17
4	44,50	0,087	0,290	6,53
5	52,97	0,126	0,420	7,94
6	51,73	0,099	0,330	6,39
7	50,46	0,075	0,250	4,96
8	43,26	0,068	0,227	5,25
9	40,69	0,080	0,267	6,56
10	46,30	0,021	0,070	1,51
11	46,12	0,073	0,243	5,28
12	44,09	0,035	0,116	2,65
13	40,95	0,063	0,210	5,14
14	50,86	0,047	0,156	3,08
15	47,72	0,052	0,173	3,64
16	42,40	0,051	0,170	4,02
17	54,08	0,049	0,163	3,02
18	53,36	0,073	0,243	4,57
19	42,71	0,038	0,126	2,97
20	51,93	0,045	0,149	2,88
21	49,80	0,044	0,146	2,95
22	45,64	0,042	0,140	3,07



Σχήμα 3.5. Τελικά αποτελέσματα προσδιορισμού ανθοκυανινών. Οι ψηλότερες τιμές ανθοκυανινών αντιστοιχούν στα δείγματα με το μπλε χρώμα, ενώ οι χαμηλότερες σε αυτά με το μωβ χρώμα.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ανθοκυανίνες κυμαίνεται από 0,07 mg/mL μέχρι 0,42 mg/mL. Οι τιμές αυτές ανήκουν στα δείγματα 10 και 5 αντίστοιχα.

3.6 Προσδιορισμός φλαβονοειδών

Εκχυλίστηκαν και προετοιμάστηκαν κατάλληλα τα 22 διαφορετικά δείγματα *Rubus* *sp.* Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης των φλαβονοειδών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα 2 φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος (Πίνακας 3.9.)

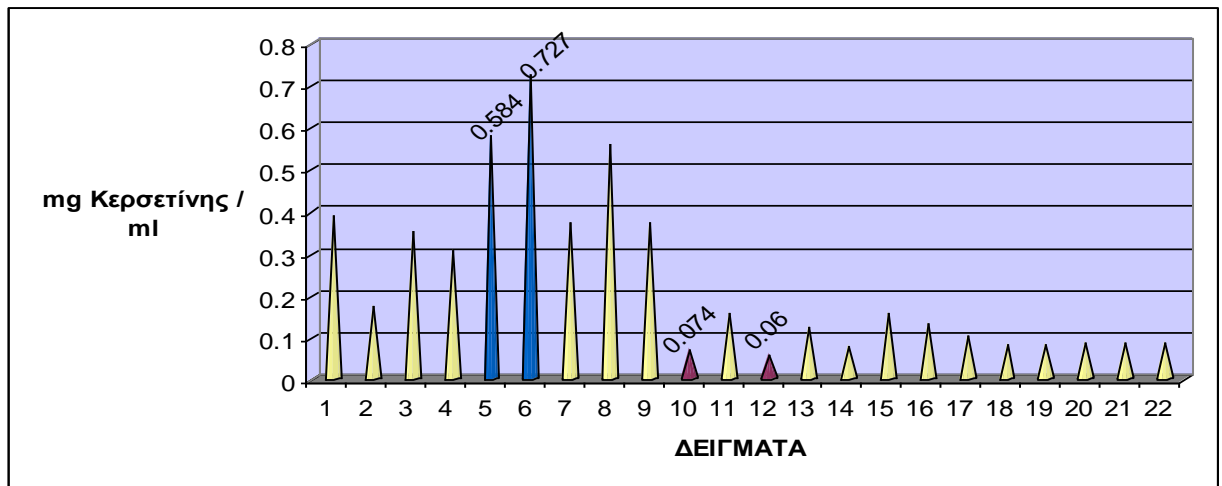
Πίνακας 3.9. Απορροφήσεις δειγμάτων στα 510nm για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών.

<i>V</i> (50μL)	<i>Απορρόφηση</i> _{510 nm}	
1	0,191	0,105
2	0,095	0,071
3	0,132	0,142
4	0,114	0,133
5	0,197	0,215
6	0,189	0,308
7	0,096	0,191
8	0,239	0,158
9	0,141	0,146
10	0,057	0,049
11	0,094	0,064
12	0,052	0,045
13	0,059	0,079
14	0,059	0,050
15	0,079	0,079
16	0,065	0,076
17	0,055	0,069
18	0,064	0,048
19	0,053	0,059
20	0,049	0,049
21	0,058	0,058
22	0,057	0,057

Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 2.3). Η αναγωγή των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $y = 0,0003x + 0,0308$. Κατόπιν έγινε μετατροπή των τιμών από mg κερσετίνης/mL δείγματος σε mg κερσετίνης/g δείγματος (Πίνακας 3.10) και τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.6.

Πίνακας 3.10. Τελικά αποτελέσματα προσδιορισμού φλαβονοειδών.

<i>Δείγματα</i>	<i>mg / mL</i>	<i>(mg/mL) /g αρχικού βάρους</i>
1	0,390	11,69
2	0,174	5,20
3	0,354	10,60
4	0,310	9,29
5	0,584	17,51
6	0,727	21,81
7	0,377	11,31
8	0,560	16,79
9	0,377	11,31
10	0,074	2,22
11	0,160	4,80
12	0,060	1,79
13	0,127	3,81
14	0,080	2,39
15	0,160	4,79
16	0,134	4,02
17	0,104	3,12
18	0,084	2,51
19	0,084	2,52
20	0,090	2,69
21	0,087	2,60
22	0,087	2,61



Σχήμα 3.6. Τελικά αποτελέσματα προσδιορισμού φλαβονοειδών. Τα μπλε δείγματα είναι αυτά με την υψηλότερη περιεκτικότητα φλαβονοειδών. Αντίθετα τα μωβ δείγματα είναι αυτά με την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή.

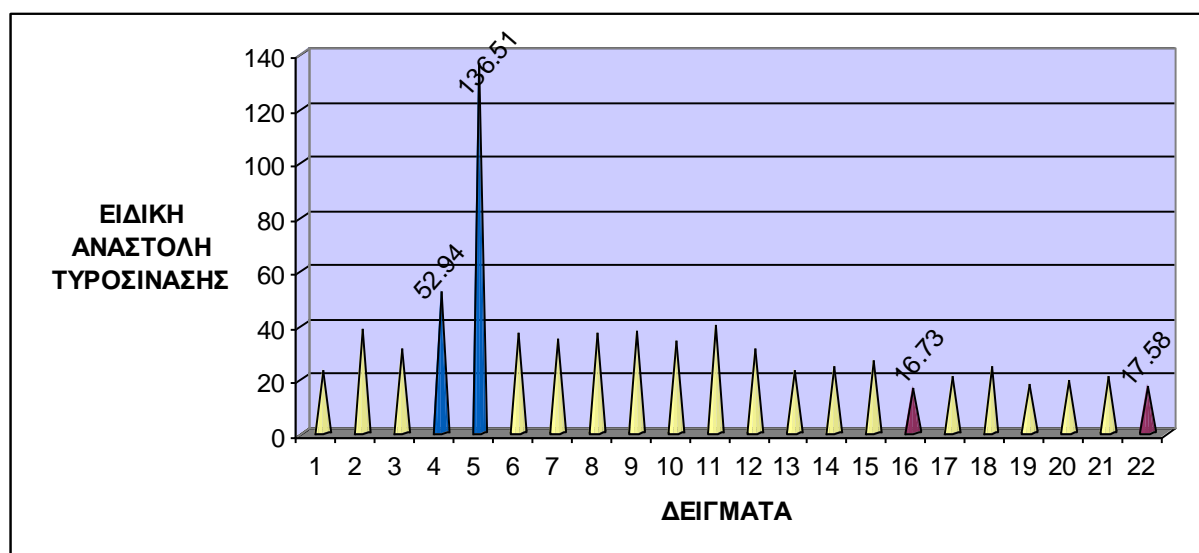
Οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών κυμαίνονται από 0,06 mg/mL που αντιστοιχεί στο δείγμα 12, μέχρι 0,727 mg/ mL που αντιστοιχεί στο δείγμα 6.

3.7 Μελέτη Αναστολής Δραστηριότητας Τυροσινάσης

Αφού εκχυλίστηκαν και προετοιμάστηκαν τα 22 διαφορετικά δείγματα ακολούθησε προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας για διάστημα 5 min στα 475 nm. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση στα δείγματα για τον προσδιορισμό του βάρους (mg) του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν και στο τέλος την αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου (Πίνακας 3.11). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.7. Επιλέχθηκε εκείνο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναστολή για να υπολογιστεί η τιμή ανασταλτικής ισχύος IC₅₀ (Πίνακας 3.12) και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.8.

Πίνακας 3.11. Αναστολή δραστηριότητας τυροσινάσης.

<i>Δείγμα</i>	<i>mg ξηράς ουσίας/mL</i>	<i>D/min</i>	<i>ταχύτητα αναστολής</i> <i>D/min(sample) / D/min(control)</i>	<i>% αναστολή</i>	<i>Ειδική αναστολή</i> <i>(% αναστολή/mg ξηράς ουσίας δείγματος που χρησιμοποιήθηκε)</i>
1	33,9	0,028	0,44	56	23,60
2	22,6	0,025	0,39	61	38,56
3	18,5	0,037	0,59	41	31,66
4	19,7	0,017	0,27	73	52,94
5	9,0	0,009	0,14	86	136,51
6	20,8	0,025	0,46	54	37,01
7	9,7	0,027	0,50	50	35,36
8	7,8	0,032	0,56	44	37,01
9	18,0	0,030	0,52	48	38,10
10	4,3	0,037	0,65	35	34,31
11	12,1	0,038	0,66	34	40,14
12	9,3	0,037	0,68	32	31,47
13	24,6	0,032	0,59	41	23,81
14	10,6	0,039	0,72	28	24,91
15	20,5	0,033	0,61	39	27,17
16	22,2	0,040	0,74	26	16,73
17	8,2	0,044	0,81	19	21,51
18	12,1	0,041	0,66	34	24,89
19	22,2	0,044	0,71	29	18,66
20	20,4	0,045	0,72	28	19,61
21	20,6	0,043	0,69	31	21,50
22	19,5	0,047	0,76	24	17,58



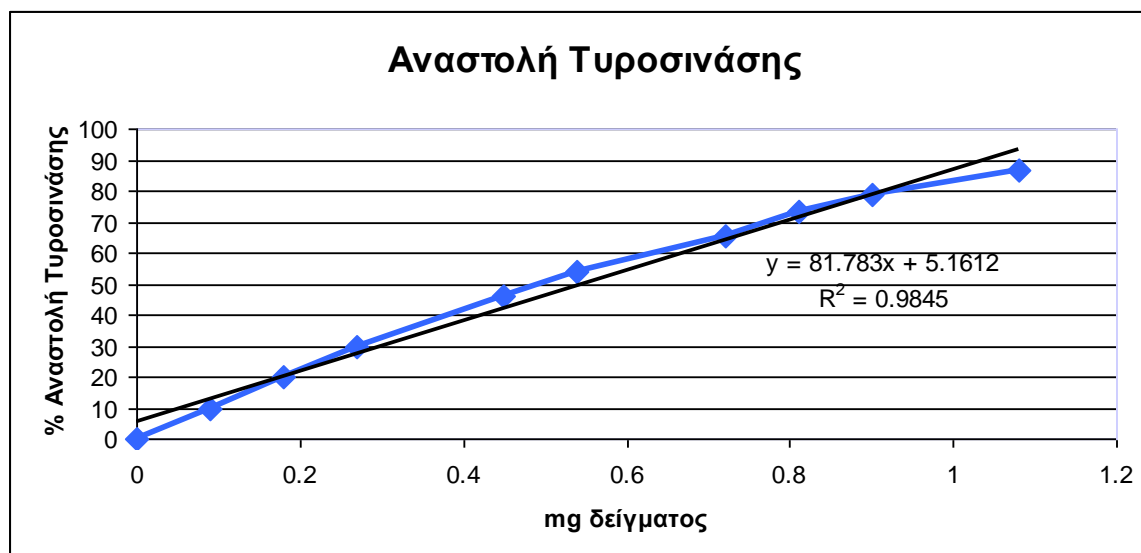
Σχήμα 3.7. Ειδική αναστολή (%) δραστηριότητας τυροσινάσης. Τα μπλε δείγματα είναι αυτά που προκάλεσαν μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του ενζύμου, και τα μωβ δείγματα αυτά που προκάλεσαν το μικρότερο ποσοστό αναστολής του ενζύμου.

Το δείγμα που προκάλεσε μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής στην τυροσινάση είναι το δείγμα 5 με ειδική αναστολή 136,52, ενώ αυτό που προκάλεσε το μικρότερο ποσοστό αναστολής είναι το 16 με ειδική αναστολή 16,73. Ακολούθως έγινε ο υπολογισμός IC_{50} του δείγματος 5 (Πίνακας 3.12 και Σχήμα 3.8) για τον προσδιορισμό της τιμής ανασταλτικής ισχύος IC_{50} , η οποία βρέθηκε ίση με $0,49 \pm 0,04$ mg.

Προσδιορισμός IC_{50} - Δείγμα 5

Πίνακας 3.12. Μετρήσεις για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} στο δείγμα 5.

<i>Βάρος Δείγματος (mg)</i>	<i>D/min</i>	<i>αναστολή ενζύμου (%)</i>
0	0,0472	0
0,09	0,0425	10
0,18	0,0377	20,1
0,27	0,0333	29,4
0,45	0,0255	46
0,54	0,0216	54,2
0,72	0,0164	65,3
0,81	0,0127	73,1
0,90	0,0099	79
1,08	0,0063	86,7



Σχήμα 3.8. Απεικόνιση ανασταλτικής δράσης του δείγματος 5 ως προς την τυροσινάση.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα 0,548 mg δείγματος 5 επιφέρουν αναστολή 50% της τυροσινάσης.

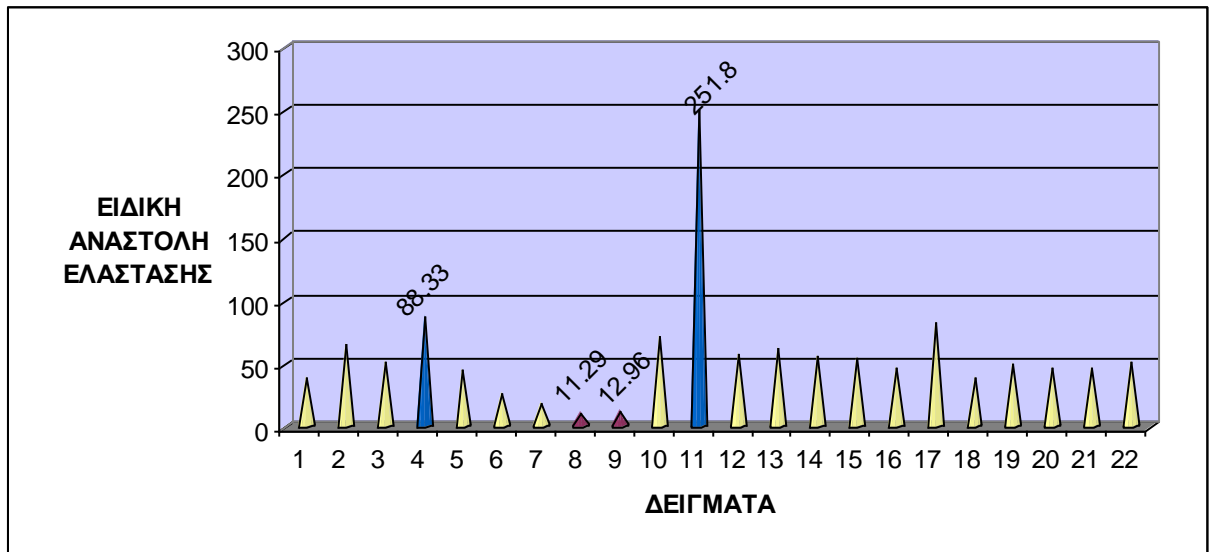
3.8 Μελέτη αναστολής δραστηριότητας ελαστάσης

Αφού εκχυλίστηκαν και προετοιμάστηκαν τα 22 διαφορετικά δείγματα ακολούθησε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας για διάστημα 4 λεπτών στα 410 nm.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση στα δείγματα για να προσδιοριστεί το βάρος (mg) των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και στο τέλος η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου (Πίνακας 3.13). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.9. Επιλέχθηκε εκείνο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναστολή για να υπολογιστεί η τιμή ανασταλτικής ισχύος IC₅₀ (Πίνακας 3.14). Στην περίπτωση αυτή το δείγμα με την μεγαλύτερη αναστολή είναι το 11. Τα αποτελέσματα του IC₅₀ φαίνονται στο Σχήμα 3.10.

Πίνακας 3.13. Υπολογισμός % αναστολής ελαστάσης από τα δείγματα.

<i>Δείγμα</i>	<i>mg ξηράς ουσίας/m L</i>	<i>D/min</i>	<i>ταχύτητα αναστολής</i>	<i>% αναστολή ενζύμου</i>	<i>Ειδική αναστολή (% αναστολή/mg δείγματος που χρησιμοποιήσαμε)</i>
1	21,11	0,042	0,58	42	39,62
2	23,88	0,015	0,21	79	66,39
3	18,58	0,038	0,52	48	51,61
4	19,92	0,034	0,47	53	88,33
5	34,89	0,038	0,52	48	45,71
6	17,74	0,060	0,82	18	26,87
7	16,58	0,065	0,89	11	20,00
8	20,55	0,068	0,93	7	11,29
9	18,13	0,068	0,93	7	12,96
10	21,51	0,039	0,53	47	72,31
11	2,78	0,058	0,79	21	251,80
12	16,77	0,049	0,67	33	58,93
13	17,04	0,063	0,68	32	62,75
14	16,78	0,057	0,62	38	56,72
15	20,86	0,061	0,66	34	54,39
16	19,46	0,067	0,73	27	46,55
17	8,38	0,068	0,74	26	83,87
18	11,35	0,071	0,77	23	39,66
19	15,16	0,068	0,74	26	50,98
20	19,01	0,067	0,73	27	47,37
21	15,96	0,071	0,77	23	47,92
22	20,72	0,063	0,68	32	51,61



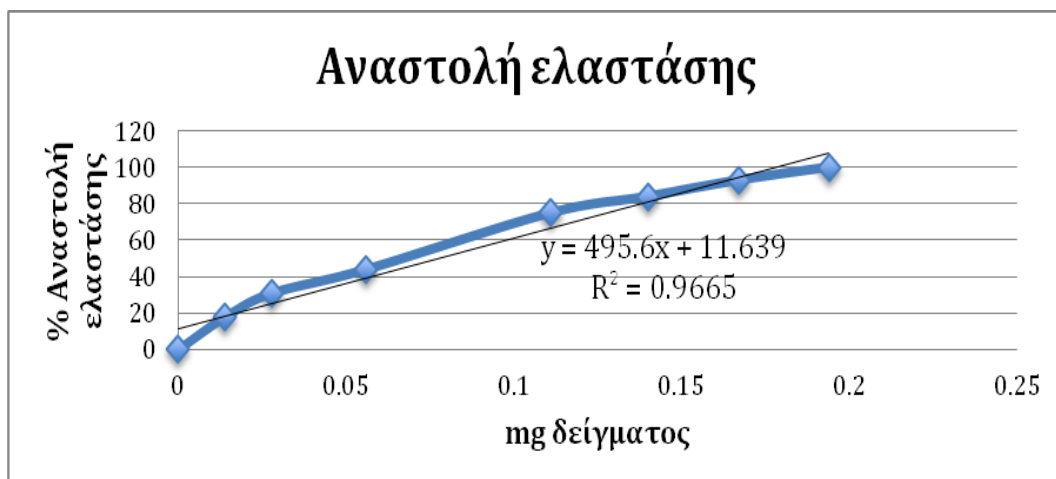
Σχήμα 3.9. Ειδική αναστολή (%) ελαστάσης από τα δείγματα. Τα μπλε δείγματα είναι αυτά που προκάλεσαν μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του ενζύμου, και τα μωβ δείγματα αυτά που προκάλεσαν το μικρότερο ποσοστό αναστολής του ενζύμου.

Μεγαλύτερη ειδική αναστολή εμφάνισε το δείγμα 11 με 251,8 ενώ μικρότερη το δείγμα 7 με ποσοστό 11,29. Ακολούθησε ο υπολογισμός IC_{50} του δείγματος 11 (Πίνακας 3.14 και Σχήμα 3.9).

Προσδιορισμός IC_{50} -Δείγμα 11

Πίνακας 3.14. Μετρήσεις για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} στο δείγμα 11.

<i>Βάρος Δείγματος (mg)</i>	<i>D/min</i>	<i>%αναστολή ενζύμου</i>
0	0,055	0
0,014	0,045	18
0,028	0,038	31
0,056	0,031	44
0,111	0,014	75
0,140	0,009	84
0,167	0,004	93
0,194	0,0004	99,99



Σχήμα 3.10. Γραμμική απεικόνιση ανασταλτικής δράσης του δείγματος 11 ως προς την ελαστάση.

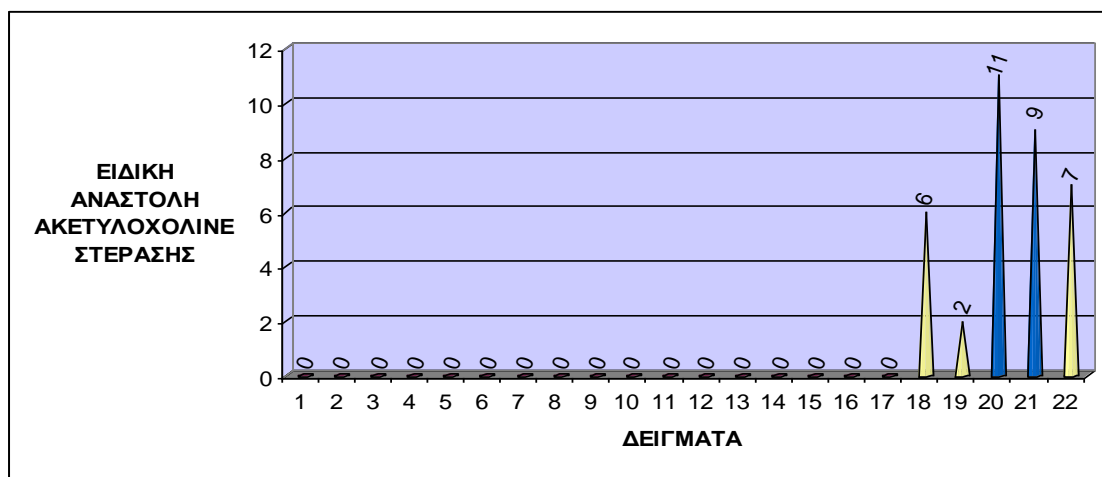
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα 0,077 mg δείγματος 11 επιφέρουν αναστολή 50% της ελαστάσης.

3.9 Μελέτη αναστολής δραστηριότητας ακετυλοχολινεστεράσης

Προηγούνται οι ίδιες διαδικασίες εκχέλισης και προετοιμασίας στα 22 διαφορετικά δείγματα ακολουθεί προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας για διάστημα 2 λεπτών σε απορρόφηση 412 nm για τον υπολογισμό της αναστολής (%) του ενζύμου (Πίνακας 3.15). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.11. Σε αυτή την περίπτωση τα δείγματα δεν προκάλεσαν αναστολή στην λειτουργία του ενζύμου και γι' αυτό δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Πίνακας 3.15. Υπολογισμός αναστολής (%) ακετυλοχολινεστεράσης από τα δείγματα.

<i>Δείγμα</i>	<i>D/min</i>	<i>ταχύτητα</i>	<i>% αναστολή</i>
1	0,079	1,11	0
2	0,075	1,06	0
3	0,087	1,23	0
4	0,075	1,06	0
5	0,073	1,03	0
6	0,123	1,54	0
7	0,136	1,70	0
8	0,148	1,85	0
9	0,144	1,80	0
10	0,125	1,56	0
11	0,131	1,64	0
12	0,125	1,56	0
13	0,127	1,59	0
14	0,122	1,53	0
15	0,124	1,55	0
16	0,152	1,10	0
17	0,149	1,08	0
18	0,130	0,94	6
19	0,136	0,98	2
20	0,124	0,89	11
21	0,126	0,91	9
22	0,129	0,93	7



Σχήμα 3.11. Αναστολή (%) ακετυλοχολινεστεράσης από τα δείγματα. Με μπλε αναπαριστώνται τα δείγματα που προκάλεσαν μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής στην ακετυλοχολινεστεραση και με μωβ αυτά που προκάλεσαν το μικρότερο ποσοστό αναστολής.

Τα δείγματα 18, 19, 20, 21 και 22 ήταν αυτά τα οποία προκάλεσαν αναστολή σε πολύ μικρό ποσοστό με μικρότερο το 2% που αντιστοιχεί στο δείγμα 19.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

4.1. Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου, των φλαβονοειδών και ανθοκυανινών, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, σε καρπούς του γένους *Rubus spp.*, οι οποίοι προέρχονται από τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες, με διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας (φωτισμός, θερμοκρασία και έδαφος). Παράλληλα μελετήθηκε στους ίδιους καρπούς η ύπαρξη αναστολέων συγκεκριμένων ενζύμων (τυροσινάσης, ελαστάσης και ακετυλοχολινεστεράσης) και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα.

Μελετώντας λοιπόν κάποιες από τις βιοχημικές ιδιότητες των καρπών αυτών, μπορούμε να πούμε ότι αποτελούν μια πολύ καλή πηγή τόσο αντιοξειδωτικών όσο και αντιγηραντικών συστατικών με σκοπό την ενίσχυση και την τόνωση του οργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ιδιότητες αυτές των καρπών *Rubus spp.* επηρεάζονται σημαντικά από περιβαλλοντικούς και καλλιεργητικούς παράγοντες, όπως είναι ο φωτισμός, το έδαφος και η άρδευση. Επίσης είναι φανερό ότι η ποικιλία των δειγμάτων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αντιοξειδωτική τους δράση και σε συνδυασμό με συγκεκριμένες καλλιεργητικές συνθήκες μπορούν να παρουσιάσουν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Αναλύοντας τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σημαντικά στοιχεία τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

Τα ολικά φαινολικά κυμάνθηκαν από 0,048 mg/mL έως 0,292 mg/mL δείγματος, ανάλογα με την ποικιλία στην οποία ανήκει το δείγμα και τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι ποικιλίες *Thornfree* και *Lochness* υπερέιχαν σε φαινολικό περιεχόμενο. Ξεχώρισαν τα δείγματα 5 και 8 τα οποία είχαν τις υψηλότερες τιμές και μόνο κοινό στοιχείο την καλλιέργειά τους με πλήρη άρδευση. Τα δείγματα που ανήκουν στις ποικιλίες *Runi* και *Cayuga* παρουσίασαν πολύ χαμηλές τιμές παρόλο που πολλά από αυτά καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες με δείγματα που παρουσίασαν πολύ υψηλό φαινολικό περιεχόμενο.

Οι ανθοκυανίνες κυμάνθηκαν από 0,070 μέχρι 0,420 mg/mL. Η ποικιλία με την υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανινών είναι η *Thornfree* και ακολούθως η *Lochness*. Δείγματα τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, αλλά ανήκουν σε διαφορετική ποικιλία παρουσίασαν μεγάλη διαφορά στην συγκέντρωση των ανθοκυανινών, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η ποικιλία να έχει πρωτεύοντα ρόλο στην παραγωγή ανθοκυανινών στα φυτά. Για παράδειγμα το δείγμα 5 (*Thornfree*) και το δείγμα 19 (*Cayuga*) καλλιεργήθηκαν σε μίγμα από χώμα και τύρφη, σε 25% ηλιακού φωτός και με

πλήρη άρδευση. Το δείγμα 5 ήταν το δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανινών, ενώ το δείγμα 19 είχε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελούν τα δείγματα 2 (*Thornfree*) και 12 (*Ruvi*) τα οποία καλλιεργήθηκαν σε χώμα με πλήρη άρδευση και ηλιακό φωτισμό. Το δείγμα 2 είναι το δεύτερο δείγμα, μετά το 5, με την υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανινών, ενώ το 12 είναι το δείγμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση.

Οι συγκεντρώσεις στα φλαβονοειδή, μπορούμε να πούμε ότι συμφωνούν με τις συγκεντρώσεις των φαινολικών και των ανθοκυανινών, αν βασιστούμε στην ποικιλία. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 0,060 έως 0,727 mg/mL, όπου τα δείγματα με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανήκουν στις ποικιλίες *Thornfree* και *Lochness* και αυτά με τις μικρότερες ανήκουν στις ποικιλίες *Ruvi* και *Cayuga*. Το δείγμα 6 είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών και τα δείγματα 12 και 20 την μικρότερη. Ομοίως με τις προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι και εδώ υπάρχουν δείγματα τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, αλλά λόγω της διαφορετικής ποικιλίας στην οποία ανήκουν παρουσίασαν μεγάλη διαφορά στην συγκέντρωση φλαβονοειδών. Για παράδειγμα το δείγμα 6 (*Lochness*) και το δείγμα 10, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε μίγμα χώματος και τύρφης με πλήρη φωτισμό και άρδευση, αλλά ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες. Το δείγμα 6 ήταν το δείγμα το οποίο είχε υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονοειδών, ενώ το δείγμα 10 ανήκει στα δείγματα με την χαμηλότερη συγκέντρωση. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελούν και τα δείγματα 8 και 12.

Διαφορετικά αποτελέσματα έχουμε και μεταξύ των μεθόδων που αποσκοπούν στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Στην μέθοδο ABTS οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,0096 μέχρι 0,0241 mL δείγματος στο 50% της απορρόφησης. Το δείγμα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το δείγμα 5 της ποικιλίας *Thornfree* και με την χαμηλότερη είναι το δείγμα 19 της ποικιλίας *Cayuga*. Τα δείγματα αυτά, όπως προαναφέρθηκε, καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες και πιο συγκεκριμένα καλλιεργήθηκαν σε μίγμα από τύρφη και χώμα, σε 25% ηλιακό φωτισμό και με πλήρη άρδευση.

Στην περίπτωση της μεθόδου DPPH, οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,0089 έως 0,0348 mL δείγματος στο 50% της απορρόφησης. Το δείγμα 8 της ποικιλίας *Lochness* παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ακολουθεί το δείγμα 2 της ποικιλίας *Thornfree*. Τα δείγματα αυτά καλλιεργήθηκαν σε χώμα, με πλήρες ηλιακό φως και άρδευση

και ανήκουν στα δείγματα με τις υψηλότερες τιμές, στις περιπτώσεις προσδιορισμού των φλαβονοειδών και των ανθοκυανινών, αντίστοιχα. Το δείγμα 13 της ποικιλίας *Ruvi* το οποίο καλλιεργήθηκε σε χώμα, σε 25% ηλιακό φώς και με πλήρη άρδευση, παρουσιάζει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Κάτω από τις ίδιες ακριβώς περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιεργήθηκε και το δείγμα 4 της ποικιλίας *Thornfree*, το οποίο είναι το μοναδικό δείγμα από τις ποικιλίες *Lochness* και *Thornfree* που παρουσίασε τόσο χαμηλή αντιοξειδωτική δράση .

Οι τιμές FRAP κυμάνθηκαν από 84,19 $\mu\text{M/g}$ έως 287,34 $\mu\text{M/g}$. Η μεγαλύτερη τιμή αντιστοιχεί και πάλι στο δείγμα 5 της ποικιλίας *Thornfree* που καλλιεργήθηκε σε μίγμα από χώμα και τύρφη με πλήρη άρδευση και 25% ηλιακό φώς. Στο δείγμα 5 αντιστοιχούν επίσης υψηλές τιμές τόσο στην περίπτωση του φαινολικού περιεχομένου, των ανθοκυανινών και των φλαβονοειδών όσο στην περίπτωση μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS. Επίσης το δείγμα 5 προκάλεσε μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής στην δράση της τυροσινάσης, αλλά είναι και ένα από τα δείγματα που δεν επηρεάζουν καθόλου δραστηριότητα της ακετυλοχολιστεράσης. Ακολουθεί το δείγμα 6 της ποικιλίας *Lochness*, το οποίο επίσης ανήκει στα δείγματα τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικά στοιχεία, ανθοκυανίνες και ιδιαίτερα φλαβονοειδή.

Στην παρούσα εργασία εκτός από τα πιο πάνω φυτοχημικά μελετήθηκε και η ύπαρξη αναστολέων συγκεκριμένων ενζύμων. Στην περίπτωση της τυροσινάσης τα δυο πρώτα δείγματα που προκάλεσαν υψηλό ποσοστό αναστολής του ενζύμου καλλιεργήθηκαν με πλήρη άρδευση και 25% ηλιακό φωτισμό. Οι μοναδικές διαφορές που είχαν μεταξύ τους ήταν στην ποικιλία και στο έδαφος. Το δείγμα λοιπόν που προκάλεσε μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής είναι το δείγμα 5 της ποικιλίας *Thornfree* το οποίο καλλιεργήθηκε σε μίγμα από χώμα και τύρφη και προκάλεσε 86% αναστολή στην τυροσινάση. Ακολουθεί το δείγμα 4 της ποικιλίας *Thornfree* το οποίο καλλιεργήθηκε σε χώμα και προκάλεσε 73% αναστολή και το δείγμα 2 που προκάλεσε 61% αναστολή. Μικρότερο ποσοστό αναστολής (19%) στην τυροσινάση προκάλεσε το δείγμα 17 της ποικιλίας *Cayuga*, το οποίο καλλιεργήθηκε σε χώμα με πλήρη άρδευση και 25% ηλιακού φωτισμού. Ελάχιστα μεγαλύτερη αναστολή προκάλεσε το δείγμα 22 της ποικιλίας *Cayuga* που καλλιεργήθηκε σε μίγμα από χώμα και τύρφη χωρίς άρδευση και σε 25% ηλιακό φώς. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω το δείγμα 5 παρουσίασε και υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών. Αυτό οφείλετε στο γεγονός ότι κάποιες φλαβόνες μπορεί να παρουσιάσουν καλή «συγγένεια» με την τυροσινάση. Πιο

συγκεκριμένα, οι ενώσεις που περιλαμβάνουν 3-υδροξυ-4-κετο, 5-υδροξυ-4-κετο και / ή δι-υδροξυλ-ομάδα επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό μελανοχρώματος, με ανταγωνιστικό τρόπο (Souza et al., 2012).

Στην περίπτωση της ελαστάσης παρατηρήθηκαν πολύ υψηλά ποσοστά αναστολής. Τα 3 πρώτα σε σειρά δείγματα που προκάλεσαν μεγάλα ποσοστά αναστολής καλλιεργήθηκαν σε 25% ηλιακό φως και σε πλήρη άρδευση, παρουσιάζοντας διαφορές μονάχα στην ποικιλία και στο είδος του εδάφους, όπως και στη περίπτωση της τυροσινάσης. Αναλυτικότερα, το δείγμα 11 της ποικιλίας *Ruvi*, καλλιεργήθηκε σε μίγμα από χώμα και τύρφη και προκάλεσε ποσοστό αναστολής 251,80%, δηλαδή προκάλεσε πλήρη αναστολή στην ελαστάση. Ακολουθούν τα δείγματα 4 και 17 των ποικιλιών *Thornfree* και *Cayuga*, που καλλιεργήθηκαν σε χώμα και προκάλεσαν ποσοστό αναστολής 88,33% και 83,87%, αντίστοιχα. Τα χαμηλότερα ποσοστά αναστολής προκάλεσαν 2 δείγματα της ποικιλίας *Lochness*, το δείγμα 8 με τιμή 11,29%, το οποίο καλλιεργήθηκε σε πλήρη φωτισμό και άρδευση και σε μίγμα από χώμα και τύρφη και το δείγμα 9 που καλλιεργήθηκε στις ίδιες συνθήκες αλλά χωρίς άρδευση προκάλεσε 12,96% αναστολή.

Τέλος στην μελέτη ύπαρξης αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης τα δείγματα 1 μέχρι 17 προκάλεσαν 0% αναστολή του ενζύμου σε αντίθεση με τα δείγματα 18 μέχρι 22 που προκάλεσαν πάρα πολύ χαμηλό ποσοστό αναστολής. Στην συγκεκριμένη περίπτωση δύσκολα μπορούμε να προσδιορίσουμε τους ακριβείς παράγοντες που επηρεάζουν τις αποδόσεις των δειγμάτων στην αναστολή του ενζύμου, αφού τα δείγματα που προκάλεσαν 0% αναστολή ανήκουν και στις 4 ποικιλίες και καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα δείγματα 16 και 17 είναι τα μοναδικά δείγματα της ποικιλίας *Cayuga* που δεν επηρέασαν καθόλου την λειτουργία του ενζύμου, ενώ τα υπόλοιπα 18 μέχρι 22 προκάλεσαν ελάχιστη αναστολή. Το δείγμα 16 καλλιεργήθηκε σε πλήρη ηλιακό φως και άρδευση και σε χώμα, στις ίδιες συνθήκες καλλιεργήθηκε και το δείγμα 17 αλλά σε 25% ηλιακό φως. Οι παραπάνω «συνδυασμοί» περιβαλλοντικών συνθηκών δεν εφαρμόστηκαν σε κανένα άλλο δείγμα της ποικιλίας αυτής. Ίσως λοιπόν αυτός να είναι και ο λόγος που μόνο αυτά τα δυο δείγματα από αυτήν την ποικιλία δεν ανέστειλαν την ακετυλοχολινεστεράση.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι πρωτεύοντα ρόλο στην ικανότητα των δειγμάτων να αναστέλλουν συγκεκριμένα ένζυμα και στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες έχει η ποικιλία. Ένας σωστός συνδυασμός, όμως, ποικιλίας και περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την

καλλιέργειά τους, μπορεί να αυξήσει τις βιοδραστικές ικανότητες των καρπών. Τα περισσότερα δείγματα που είναι πιο πλούσια σε φαινολικά στοιχεία, ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή και έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καλλιεργήθηκαν με πλήρη άρδευση. Υπήρχαν όμως και ορισμένα δείγματα που καλλιεργήθηκαν υπό έλλειψη νερού και έδωσαν εξίσου υψηλές τιμές. Σε γενικές γραμμές οι ποικιλίες *Thornfree* και *Lochness* παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε φαινολικό περιεχόμενο ανθοκυανίνες και φλαβονοειδη. Το δείγμα με το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο (5), είχε επίσης υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών και ανθοκυανινών, παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην μέθοδο ABTS και FRAP και προκάλεσε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής της τυροσινάσης. Επίσης το δείγμα 8 που είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην μέθοδο DPPH, είναι επίσης πλούσιο σε φαινολικό περιεχόμενο και φλαβονοειδή.

Σε όλες τις μεθόδους, που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, η ποικιλία *Cayuga* και η ποικιλία *Ruvi* ήταν αυτές που είχαν χαμηλές τιμές. Πιθανόν λόγω το ότι σε αυτές τις ποικιλίες ανήκουν τα raspberries (πιο ανοιχτόχρωμοι καρποί). Συνολικά, τα μαύρα μούρα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Μούρα με ένα ισχυρό πορφυρό χρώμα έχουν σαφώς υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους πιο ανοιχτόχρωμους καρπούς, καθώς είναι πλούσια σε ανθοκυανίνες (Tamura & Yamagami, 1994; Rice-Evans et al., 1995; Satue-Gracia et al., 1997; Wang et al., 1997; Hannum, 2004).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η μεγάλη διαιτητική αξία τουλάχιστον των έγχρωμων μούρων. Οι καρποί *Rubus spp.* παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, σε ανθοκυανίνες και φλαβονοειδή. Με βάση τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την τυροσινάση και την ελαστάση, συγκεκριμένα εκχυλίσματα *Rubus spp.* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την λεύκανση και την αντιγήρανση του δέρματος ή στην προετοιμασία καλλυντικών ή ακόμα και για θεραπευτικούς σκοπούς, σε περιπτώσεις δημιουργίας μελανώματος στο δέρμα. Επίσης η πλειοψηφία των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν επηρεάζει καθόλου την λειτουργία του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, πράγμα θετικό για την υγεία του οργανισμού, αφού τυχόν αναστολή του ενζύμου αυτού προκαλεί προβλήματα στην ορθή μετάδοση μηνυμάτων στο νευρικό σύστημα, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τον θάνατο του οργανισμού.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

5.1. Βιβλιογραφία

- **Καραμπουρνιώτης Γ.** (2011). Φυσιολογία Καταπονήσεων Φυτών. Κεφάλαιο 12-13.
- **Κλώνης Ι.** (1997). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, Κεφ. 1.
- **Μπόσκου Δ.** (2004). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 5η Έκδοση.
- **Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M.,** (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:7915–22.
- **Arak R., Guclu K., Demirata B., Özyurek, M., Esin, Ç. S., Bektasoglou, Aramwit, P., Bang, N. & Srichana T.** (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International*, 43, 1093-1097.
- **Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Panagiotis K.** (2005). Tea and herbal infusions Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*89: 27-36.
- **Awika J. M., Rooney L. W., Wu X., Prior R. L., Cisneros-Zevallos L.** (2003). Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6657-6662 6657
- **Balentine D. A., Wiseman S. A. and Bouwens L. C. M.** (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37, 693-704.
- **Benzie I. F. F. and Strain J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
- **Berlett B. S. and Stadtman E. R.** (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313–6.
- **Bonnart C., Deraison C., Lacroix M., Uchida Y., Besson C., Robin A., Briot A., Gonthier M., Lamant L., Dubus P., Monsarrat B. and Hovnanian A.** (2010), Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing. *J Invest Dermatol* 120(3): 871–882.
- **Brand M. D., Affoyrtit C., Esteves, T. C., Green C., Lambert A. J., Miwa S., Pakay J. L., Parker N.** (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biological Medicine*, 37, 755- 67

- **Cano A., Alcaraz O., Acosta M. and Arnao M. K. B.** (2002). On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. Department of Plant Biology (Plant Physiology), University of Murcia, Murcia, Spain.
- **Choe E. and Min D. B.** (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comp Rev Food Sci Food Safety*. **8**: 345–358
- **Cicco N., Lanorte M. T., Paraggio M., Viggiano M. and Lattanzi V.** (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91. 107–110
- **Corbett J. R., Hartley G. S. and Baillie A. C.** (1984). *The Biochemical Mode of Action of Pesticides* 2nd edn. Academic Press, Inc, NY, USA
- **Crozier A., Jaganath I.B. and Clifford M.N.** (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.
- **Cushnie T.P.T. and Lamb A. J.** (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356
- **Djuric Z., Depper J. B., Uhley, B., Smith D., Lababidi, S., Martino S., and Heilbrun L. K.** (1998). Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. *J. Am. Diet Assoc.* **98**: 524-528.
- **Faria R. O., Moure V. R., Amazonas MALA, Krieger N. and Mitchell D. A.** (2007) The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *Food Technol Biotechnol* 45: 287–294.
- **Frankel E. N. and Meyer A. S.** (2000). Review: The Problems of using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941
- **Fridovich I.** (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 247: 1–11.
- **Gomes S.M., Souza P.M., Elias S.T., Simeoni L.A., de Paula J. E., Neves E., Guerra S., Fonseca Y. M., Silva E. C., Silveira D. and Magalhaes P. O.** (2012) Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity
- **Harman D.** (2000). Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 928:1–21.
- **Hannum S. M., MS. RD.** (2004). Potential Impact of Strawberries on Human Health:

A Review of the Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:1–17.

- **Halvorsen B., Holte K., Myhrstad M., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S., Wold A.** (2011). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *the journal of nutrition*.
- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- **Huang D., Ou B. and Prior R. L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- **John McMurry:** *Οργανική Χημεία, πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτη.*
- **Kahkonen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T. S., and Heinonen M.** (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962
- **Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M.** (1995). *Essentials of Neural Science and Behavior*
- **Khan S. B., Azhar U. I. H., Afza N., Malik A., Khan M. T.,** (2005) Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from *Amberboa ramosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 53: 86–89. doi: 10.1248/cpb.53.86
- **Kim Y.J. and Uyama H.** (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 1707–1723. doi: 10.1007/s00018-005-5054-y
- **Klein, Carol** (2009). *Grow your own fruit*. United Kingdom: Mitchell Beazley. 224.
- **Kraut D., Goff H., Pai R. K., Hosea N. A., Silman I., Sussman J. L., Taylor P. and Voet J. G.** (2000). Inactivation Studies of Acetylcholinesterase with Phenylmethylsulfonyl Fluoride. *Molecular Pharmacology*. vol. 57 no. 61243-1248.
- **Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Bono, A.** (2007). Phytochemical antioxidants for Health and Medicine-A move towards nature. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(4), 97-104.
- **Landete J. M.** (2012): Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:10, 936-948
- **Lee, J., Koo, N., and Min, D. B.** (2004). Reactive oxygen species, aging, and

antioxidative nutraceuticals. *Comp Rev Food Sci Food Safety*. **3**: 21–33

- **Lee J., Robert W. D. and Wrolstad R. E.** (2005), Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the Ph. Differential Method: Collaborative Study, *Journal of AOAC International* VOL. 88, No. 5, **1269**
- **Linnaeus C.** (2007) Germplasm Resources Information Network. United States Department of Agriculture.
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5), 727-747.
- **Miller N. J. and Rice-Evans C. A** (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radical Res*, 26, 195-199.
- **Ndlovu G., Fouche G., Tselanyane M., Cordier W. and Steenkamp V.** (2013). In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* , 13:304.
- **Nerya O., Musa R., Khatib S., Tamir S. and Vaya J.,** (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, Volume 65, 1389-1395
- **Ozelik B., Lee J. H. and Min D. B.** (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68,487–490.
- **Patil R. P., Pai S. R., Pawar N. V., Shimpale V. B., Patil R. M. and Nimbalkar M. S.,** (2012): Chemical Characterization, Mineral Analysis, and Antioxidant Potential of Two Underutilized Berries (*Carissa carandus* and *Eleagnus conferta*) from the Western Ghats of India, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:4, 312-320
- **Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. and Brighenti F.** (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The American Society for Nutritional Sciences*.
- **Pietta P. G.** (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- **Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon M.** (2001). *Antioxidants in Food Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited.
- **Qin C., Li Y., Niu, W. Ding, Y. Zhang, R. and Shang X.** (2010). *Analysis and*

Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(2), 117–126.

- **Rice-Evans C.-A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M. and Pridham, J. B.** (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22, 375-383
- **Rommel A. and Wrolstad R. E.** (1993). Ellagic acid content of red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors. *Agric. Food Chem.*, 41 (11), 1951–1960
- **Satue-Gracia M. T., Heinonen M. and Frankel E. N.** (1997). Antioxidant activity of anthocyanins in LDL and lecithin liposome systems. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3362-3367.
- **Schlesier K., Harwat M., Bohm V. and Bitsch R.** (2002). Assessment of Antioxidants Activity by using Different Vitro Methods, *Free Radical Research*, 36 (2) :177-187.
- **Sharma O. P. and Bhat T. K.** (2008). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113 1202–1205
- **Shigenaga K.K., Tory M.H. and Bruce N.A.** (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proceedings of National Science Academy.*91: 10771-10778.
- **Singleton V. L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- **Somogyi A., Rosta K., Pusztai P. Tulassay Z. and Nagy G.** (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28, R41-R55.
- **Tamura H. and Yamagami A.** (1994). Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (8), pp 1612–1615
- **Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L. and Oomah B. D.** (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- **Wang H., Cao, G. and Prior R. L.** (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 304-309.

- **Willett W. C.** (2002). Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*. **296**:695–698
- **Wong S. P., Leong L. P. and Koh J.H.W.** (2004). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. Volume 99, 775–783
- **Wu X., Beecher G.R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., and Prior R. L.** (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *J. Agric. Food Chem.* , 54, 4069-4075 4069
- **Xiaonan L. and Barbara A. Rasco** (2012): Determination of Antioxidant Content and Antioxidant Activity in Foods using Infrared Spectroscopy and Chemometrics: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:10, 853-875.

Διαδίκτυο

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

www.wikipedia.com

<http://www.onlinelibrary.wiley.com>

<http://bioweb.wku.edu/Rubus/default.asp>

<http://www.respi-gam.net/node/3087>