



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ – ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΡΟΔΙΟΥ (*Punica granatum*)



ΚΑΨΑΣΚΗ – ΚΑΝΕΛΛΗ Ι. ΒΑΣΙΛΙΚΗ – ΝΑΥΣΙΚΑ

ΑΘΗΝΑ 2014



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή με τίτλο:

«Μελέτη - αξιοποίηση των καλλιεργούμενων στην Ελλάδα ποικιλιών
ροδιού (*Punica granatum*)»

Βασιλική - Ναυσικά Ι. Καψάσκη – Κανελλή
Βιολόγος

Επιβλέπων:

Χαρουτουγιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Εξεταστική Επιτροπή:

Πολυσιού Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνου Βιολέττα, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Χαρουτουγιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία έλαβε χώρα κατά το χρονικό διάστημα 2012-2014 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουγιάν για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Ιδιαίτερος, ευχαριστώ την υποψήφια Διδάκτορα Άννα Αποστόλου για την καθοδήγηση και τη βοήθειά της κατά την διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Σοφία Κουλοχέρη για τις υποδείξεις και τις σημαντικές παρατηρήσεις της επάνω στην εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Χάρη Πρατσίνη για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του κατά την διεξαγωγή των βιολογικών προσδιορισμών στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο από το τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τους βιολογικούς προσδιορισμούς που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Σταμάτη Μερτύρη, από τα φυτώρια του οποίου έγινε η προμήθεια των καρπών ροδιού που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αφούς Χριστοδούλου (VITOM) για την προμήθεια των υποπροϊόντων χυμοποίησης του ροδιού που εξετάστηκαν. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Γιώργο Σταυρόπουλο και την κυρία Σοφία Ζησίμου από το τμήμα Έρευνας και Ανάπτυξης του Ομίλου ΚΟΡΡΕΣ για την πολύτιμη συνεργασία τους.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται ραγδαία αύξηση της καλλιέργειας της ροδιάς στην Ελλάδα. Η κύρια καλλιεργούμενη ποικιλία είναι η ξένης προέλευσης ‘Wonderful’, οι καρποί της οποίας προορίζονται αποκλειστικά για βιομηχανική επεξεργασία με σκοπό την παρασκευή χυμού. Παράλληλα, υπάρχουν μικρής κλίμακας προσπάθειες για την καλλιέργεια ορισμένων ελληνικών παραδοσιακών ποικιλιών, κυρίως στην Ερμιόνη της Αργολίδος. Έτσι, για την καλλιέργεια της ροδιάς στην Ελλάδα έχει διαμορφωθεί ένα πλαίσιο που περιλαμβάνει αφενός την ευρεία καλλιέργεια - βιομηχανική εφαρμογή της ποικιλίας ‘Wonderful’ και αφετέρου την αναζήτηση προς καλλιέργεια - εμπορία ελληνικών βρώσιμων ποικιλιών. Η διενέργεια της παρούσας διατριβής εντάσσεται στο πλαίσιο αυτό, έχοντας ως αντικείμενο αφενός τη μελέτη - αξιολόγηση του φυτοχημικού περιεχομένου και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των κυριότερων βρώσιμων ελληνικών ποικιλιών ροδιάς (‘Περσεφόνη’, ‘Πορφυρογέννητη’, ‘Πλούτων’ και ‘Ξινή’) και της ποικιλίας ‘Wonderful’ και αφετέρου τη μελέτη αξιοποίησης των υποπροϊόντων της βιομηχανικής χυμοποίησης της ποικιλίας Wonderful.

Στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής, τα δείγματα ροδιού εκχυλίστηκαν σε κατάλληλες συνθήκες δίνοντας εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες εκχυλίσματα των οποίων προσδιορίστηκε το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά, ολικά φλαβονοειδή καθώς και η ποσοτική τους σύσταση σε επιμέρους βιοδραστικές πολυφαινόλες. Παράλληλα, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση με τις μεθόδους DPPH και ABTS, αλλά και ενδοκυτταρικά (*in vitro*) με τη μέθοδο H₂DCF-DA. Τέλος, με στόχο την αξιοποίηση των υποπροϊόντων χυμοποίησης, αυτά εκχυλίστηκαν με ασφαλείς για την ανθρώπινη χρήση διαλύτες δίνοντας ένα εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική παρασκευή - ανάπτυξη καλλυντικής κρέμας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής, όλα τα δείγματα ροδιού παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο φυτοχημικό προφίλ με κυρίαρχη την παρουσία του ελλαγικού οξέος.

Επίσης, εμπεριέχουν σε σημαντικές ποσότητες γαλλικό οξύ, πουνικαλαγίνη και τις φλαβαν-3-όλες κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και προκυανιδίνη B2. Σε μικρότερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκε το μόριο της πολυδατίνης, ενός πρόδρομου μορίου της ρεσβερατρόλης, η παρουσία της οποίας δεν είχε έως σήμερα πιστοποιηθεί σε δείγματα ροδιού. Τα μη βρώσιμα τμήματα των καρπών καθώς και τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης εμφάνισαν, σε γενικές γραμμές, ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση η οποία αποδόθηκε στην υψηλότερη περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά, αλλά και ειδικότερα, στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε ελλαγικό οξύ. Τα βρώσιμα τμήματα των καρπών των ελληνικών παραδοσιακών ποικιλιών παρουσιάζουν συγκρίσιμο φυτοχημικό περιεχόμενο με αυτό της ξένης ποικιλίας ‘Wonderful’ και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε εξωκυτταρικό, αλλά και ενδοκυτταρικό (*in vitro*) επίπεδο.

Επομένως, πέρα από τη γευστική τους ιδιαιτερότητα οι ελληνικές ποικιλίες ενδείκνυνται για κατανάλωση καθώς αποτελούν μία σημαντική πηγή φαινολικών συστατικών με πολλαπλές, δυνητικά ωφέλιμες για την υγεία, βιολογικές δράσεις. Τέλος, τα υποπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας της ποικιλίας ‘Wonderful’ παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο όσο και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και θα μπορούσαν δυνητικά να αξιοποιηθούν παράγοντας ένα πλήθος παραπροϊόντων όπως καλλυντικές κρέμες και συμπληρώματα διατροφής.

SUMMARY

A large increase in the cultivation of pomegranate has been reported in Greece over the past decade. The foreign variety ‘Wonderful’ is the main cultivar, the fruits of which are exclusively utilized for the production of pomegranate juice. In the interval, smaller scale cultivation of traditional Greek varieties is attempted mainly in Ermioni, Argolida. Thus, the cultivation of pomegranate in Greece is constituted by the large-scale cultivation and industrial utilization of ‘Wonderful’ cultivar and the search for cultivation – marketing of Greek edible varieties. The aim of the current thesis was to evaluate the phytochemical content and antioxidant activity of the cultivars ‘Wonderful’, ‘Persefoni’, ‘Porfirogeniti’, ‘Plouto’ and ‘Xini’ and the by-products of the industrial processing of the cultivar ‘Wonderful’.

In this context, the fruits were processed and the polyphenolic content of the final extracts was estimated as total phenolic content, total flavonoids and individual bioactive polyphenols. Furthermore, the antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the DPPH and ABTS methods and *in vitro* by the H₂DCF-DA method. An additional extract of the industrial by-products of ‘Wonderful’ was prepared by using safe for human use solvents, which was used for the experimental development of a cosmetic cream.

According to the results, the pomegranate samples revealed a similar phytochemical profile with ellagic acid being the dominant content. Other major phenolic contents were gallic acid, punicalagin and the flavan-3-ols catechin, epicatechin, gallocatechin and procyanidin B2. Polydatine, a natural precursor of resveratrol, which has not been previously reported in pomegranate, was determined in lower concentrations. Generally, the non edible parts of the fruits and the industrial by-products were found to possess a higher antioxidant capacity in comparison to the edible parts, which was attributed to the higher total phenolic content in addition to the higher specific concentration of ellagic acid. The edible parts of the Greek cultivars had a similar

phytochemical profile to that of 'Wonderful' cultivar and they all showed to possess a high antioxidant capacity by both extracellular and *in vitro* methods.

In conclusion, apart from their fine taste, the Greek pomegranate cultivars that were examined consist a major source of bioactive phenolic compounds with potential health benefits. The industrial by-products of the 'Wonderful' cultivar are also a great source of phenolic compounds with high antioxidant capacity and could be utilized for the development of a range of products such as cosmetic creams and food supplements.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Η Ροδιά: Ιστορία, Μύθοι, Λαϊκή Παράδοση	11
1.2 Βοτανική Ταξινόμηση – Βοτανικά Χαρακτηριστικά της Ροδιάς	13
1.2.1 Βοτανική Ταξινόμηση	13
1.2.2 Βοτανικοί χαρακτήρες του είδους <i>Punica granatum</i>	13
1.2.3 Καρποφορία	15
1.2.4 Επικονίαση και γονιμοποίηση	15
1.2.5 Διάκριση ποικιλιών ροδιάς	15
1.2.6 Ποικιλίες ροδιάς	16
1.2.6.1 Κυριότερες ξένες ποικιλίες	16
1.2.6.2 Κυριότερες ελληνικές ποικιλίες	17
1.3 Εμπορική Διάσταση	19
1.3.1 Καλλιέργεια της Ροδιάς στον Κόσμο	19
1.3.2 Καλλιέργεια της Ροδιάς στην Ελλάδα	20
1.3.3 Ποικιλία ‘Wonderful’ – Χυμοποίηση	21
1.3.4 Οικονομική Σημασία – Χρήσεις του Ροδιού	22
1.3.5 Το Ρόδι ως Λειτουργικό Τρόφιμο	23
1.4 Χημική Σύσταση Ροδιού	24
1.4.1 Κατανομή Χημικών Συστατικών στο Ρόδι	24
1.4.2 Οι Πολυφαινόλες	26
1.4.2.1 Κατηγορίες Πολυφαινολών	26
1.4.2.2 Φλαβονοειδή	28
1.4.2.3 Φαινολικά οξέα	31
1.4.2.4 Ταννίνες	32
1.4.3 Βιοδιαθεσιμότητα των Χημικών Συστατικών του Ροδιού	34
1.5 Βιολογικές ιδιότητες ροδιού	36
1.5.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα	36
1.5.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες	38
1.5.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες	39
1.5.5 Αντιδιαβητικές ιδιότητες	41
1.5.6 Καρδιαγγειακή υγεία	42
1.5.7 Υγεία του δέρματος	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	45
2.1 Επιλογή και Προετοιμασία Δειγμάτων	45
2.1.1 Ποικιλίες που Μελετήθηκαν	45
2.1.2 Δείγματα που μελετήθηκαν	46
2.1.3 Προετοιμασία Δειγμάτων	47
2.2 Παραλαβή – Απομόνωση Πολυφαινολών	48
2.2.1 Εισαγωγή	48
2.2.2 Εκχύλιση	49
2.2.3 Αναλώσιμα – Συσκευές	50
2.2.4 Πειραματική Διαδικασία	51
2.3 Παρασκευή Καλλυντικής Κρέμας με Εκχύλισμα Ροδιού	53
2.3.1 Παρασκευή Κρέμας Βάσης	53
2.3.2 Προσθήκη Εκχυλίσματος	54
2.3.3 Ρύθμιση pH και Έλεγχος Σταθερότητας	54
2.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	55
2.4.1 Εισαγωγή	55
2.4.2 Επιλογή Μεθόδου	57
2.4.3 Εξοπλισμός	57
2.4.4 Αναλώσιμα	58
2.4.5 Προετοιμασία Διαλυμάτων	59
2.4.5.1 Παρασκευή Κινητής Φάσης	59
2.4.5.2 Διαλύματα Παρακαταθήκης Φαινολών	59
2.4.6 Συνθήκες Ανάλυσης	60
2.4.7 Προσδιορισμός Πολυφαινολών	62
2.5 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu	65
2.5.1 Αρχή της Μεθόδου	65
2.5.2 Αναλώσιμα - Συσκευές	66
2.5.3 Πειραματική Διαδικασία	67
2.6 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών	68
2.6.1 Αρχή της Μεθόδου	68
2.6.2 Αναλώσιμα – Συσκευές	69
2.6.3 Πειραματική Διαδικασία	70
2.7 Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο DPPH'	71
2.7.1 Αρχή της Μεθόδου	71
2.7.2 Αναλώσιμα – Συσκευές	71
2.7.3 Πειραματική Διαδικασία	72
2.8 Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο ABTS•+	73

2.8.1 Αρχή της Μεθόδου	73
2.8.2 Αναλώσιμα – Συσκευές	74
2.8.3 Πειραματική Διαδικασία	75
2.9 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας – Δοκιμασία MTT	76
2.9.1 Αρχή της Μεθόδου	76
2.9.2 Αναλώσιμα - Συσκευές	77
2.9.3 Πειραματική Διαδικασία	78
2.10 <i>In vitro</i> Αντιοξειδωτική Δράση – Μελέτη Ενδοκυτταρικών ROS	79
2.10.1 Αρχή της Μεθόδου	79
2.10.2 Αναλώσιμα – Συσκευές	79
2.10.3 Πειραματική Διαδικασία	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
3.1 Προδιορισμός Πολυφαινολών με HPLC	82
3.2 Ολικά Φαινολικά	84
3.3 Ολικά Φλαβονοειδή	85
3.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα - Μέθοδος DPPH'	87
3.5 Αντιοξειδωτική Ικανότητα - Μέθοδος ABTS•+	88
3.6 Κυτταροτοξικότητα – Δοκιμασία MTT	90
3.7 <i>In vitro</i> Αντιοξειδωτική Δράση – Μελέτη Ενδοκυτταρικών ROS	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
4.1 Πολυφαινολικό Περιεχόμενο	93
4.1.1 Ολικά Φαινολικά και Ολικά Φλαβονοειδή	93
4.1.1.1 Υποπροϊόντα Χυμοποίησης και Μη Βρώσιμα Τμήματα Καρπών	93
4.1.1.2 Βρώσιμα Τμήματα Καρπών	94
4.1.2 Φαινολικά συστατικά	96
4.1.2.1 Ελλαγικό οξύ και Πουνικαλαγίνη	96
4.1.2.2 Φλαβαν-3-όλες	97
4.1.2.3 Φαινολικά οξέα	98
4.1.2.3 Φλαβονόλες και Στιλβένια	99
4.2 Αντιοξειδωτική Δράση	100
4.2.1 Μέθοδοι DPPH και ABTS	100
4.2.1 Μελέτη ενδοκυτταρικών ROS	101
4.3 Συμπεράσματα	102
ΒΙΒΛΙΟΓΡΦΙΑ	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	118

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Ροδιά: Ιστορία, Μύθοι, Λαϊκή Παράδοση

Η ροδιά (*Punica granatum L.*) είναι ένα δέντρο γνωστό από την αρχαιότητα σε ποικίλους πολιτισμούς. Οι αναρίθμητοι μύθοι και ιστορικές αναφορές για το δέντρο και τον πορφυρό καρπό του ροδιού καταδεικνύουν την μεγάλη σημασία του για τον άνθρωπο από τα αρχαία χρόνια.

Η κοινή ονομασία της ροδιάς στην αγγλική γλώσσα (Pomegranate) προέρχεται από τις μεσαιωνικές λατινικές λέξεις “*pōmum*” «μήλο» και “*grānātum*” «το φέρον πολλά σπέρματα». Η βοτανική ονομασία της (*Punica granatum L.*) λέγεται ότι προέρχεται από την Φοινικική Καρχηδόνα, “*Punica*” στα ρωμαϊκά, από όπου και διαδόθηκε στην Ευρώπη κατά τον Πλίνιο. Στο τότε ονομαζόμενο «μήλο των Καρχηδονίων» “*Malum punicum*” έδωσε ο Λινναίος τον προσδιορισμό “*granatum*” καθιερώνοντας την επιστημονική ονομασία του δέντρου. Σύμφωνα, ωστόσο, με τον De Candolle, η ονομασία «*Punica*» δεν οφείλεται στην καταγωγή του δέντρου από την Καρχηδόνα, αλλά στο πορφυρό χρώμα των βλαστών, του άνθους και των καρπών του.

Η καταγωγή της ροδιάς τοποθετείται από τους περισσότερους ερευνητές στην ευρύτερη περιοχή της Περσίας. Ωστόσο, καλλιεργείται συστηματικά από την αρχαιότητα στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, με αποτέλεσμα να έχει πλέον «πολιτογραφηθεί» ως φυτό της περιοχής αυτής (Meerts et al., 2009). Στην Ελλάδα, η ροδιά λέγεται ότι διαδόθηκε από την Κύπρο (Jorgensen and Brennand, 2005; Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009) και η καλλιέργειά της θεωρείται σύγχρονη με αυτήν της ελιάς, του αμπελιού και της συκιάς (Στυλιανίδης κ.ά., 2009).

Η ροδιά στην Ελλάδα αναφέρεται με πολλά ονόματα, άλλα με πανάρχαια καταγωγή και άλλα νεώτερα, διαφοροποιημένα στις διάφορες περιοχές της χώρας. Οι ονομασίες

«Ροιά», «Ρόα», «Ροά», «Σίδη» και «Σίδα» είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Η ονομασία «Ροιά» φαίνεται ότι καθιερώθηκε από τον Όμηρο και γίνεται ευρεία χρήση αυτής στη μυθολογία. Με αυτή την ονομασία αναφέρεται ο Όμηρος στις ροδιές που στόλιζαν τους κήπους του Βασιλιά των Φαιάκων, Αλκίνοου, τους οποίους περιγράφει με τόσο ζωηρά χρώματα, ώστε να γίνουν παροιμιώδεις και μέτρο σύγκρισης για κάθε αξιόλογο κήπο ή εύχυμο καρπό (Λέτσας, 1949). Ο Αριστοτέλης αναφέρεται σε «απυρήνους ρόας» που, σύμφωνα με τον Γεννάδιο (1959), αποτελούν τις ονομαζόμενες στην Κύπρο «Κουφορωβκές». Πολλές είναι και οι αναφορές του Θεόφραστου περί «ροιάς» και «ρόας» (Γεννάδιος, 1959). Η ονομασία «Σίδη» ή «Σίδα» χρησιμοποιήθηκε από τους Βοιωτούς και τους Κρήτες της αρχαιότητας και η προέλευσή της ανάγεται στην εποχή που στην ευρύτερη Βαλκανική και Μικρά Ασία κατοικούσαν οι Πελασγοί, στα μέσα της 2ης π.Χ. χιλιετηρίδας (Καββαδάς, 1956). Την Πελασγική προέλευση της ονομασίας δέχονται οι Γεννάδιος (1959) και Λέτσας (1957), υποστηρίζοντας την ελληνική ιθαγένεια του δέντρου.

Πολλοί μύθοι αναφέρονται στον πορφυρό καρπό του ροδιού αποδίδοντάς του ιδιαίτερο συμβολισμό. Στην Αιγυπτιακή μυθολογία κόκκοι (καρπίδια) ροδιού συνόδευαν τους φαραώ μετά το θάνατό τους, αποτελώντας σύμβολο μετενσάρκωσης και αθανασίας. Γνωστός είναι ο μύθος της αρπαγής της Περσεφόνης από τον Πλούτωνα, κατά τον οποίο ο υποχθόνιος θεός, πριν επιστρέψει την Περσεφόνη στη μητέρα της, θεά Δήμητρα, της δίνει κρυφά να φάει 6 κόκκους ροδιάς, δεσμεύοντάς την, έτσι, να παραμένει στον Άδη 6 μήνες του χρόνου. Η επιστροφή της Περσεφόνης από τον Άδη συνδέεται με την άνθηση των φυτών και τη βλάστηση των σπόρων την άνοιξη. Η ροδιά θεωρείται από τους μυθολόγους ως το έμβλημα της ευφορίας και του γάμου και είναι δε κατ' αυτούς, όσον αφορά την Περσεφόνη, το ιερόν εχέγγυον της ενώσεως της νεαρής θεάς με τον υποχθόνιο σύζυγό της. Στην Κύπρο μυθολογείται ότι η ροδιά φυτεύτηκε από την Αφροδίτη, θεά του έρωτα και της ομορφιάς. Έτσι, το ρόδι αποτελεί μέχρι και σήμερα, σε πολλά μέρη της γης, σύμβολο της γονιμότητας, του έρωτα, της ευημερίας, της αφθονίας, της αθανασίας και της καλοτυχίας.

Από την αρχαιότητα, το ρόδι έχει καθιερωθεί και ως «θεραπευτική τροφή» με ευεργετικές δράσεις ενάντια σε ποικίλες δυσλειτουργίες του οργανισμού και ασθένειες. Στα πλαίσια αυτά, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στη λαϊκή ιατρική για την εξάλειψη εντερικών λοιμώξεων, διαφόρων τύπων έλκους, διάρροιας, οξέωσης,

αιμορραγίας, αλλά και ως αντιφλεγμονώδες, αντιπυρετικό και αφροδισιακό φάρμακο. Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι ευεργετικές ιδιότητες του ροδιού οφείλονται σε ένα πλήθος φυτοχημικών συστατικών με ποικίλες βιολογικές δράσεις και, έτσι, το ρόδι αποτελεί έναν καρπό του οποίου μελετάται το περιεχόμενο σε βιοδραστικά μόρια, γνωρίζοντας τεράστια ανάπτυξη και εφαρμογή.

1.2 Βοτανική Ταξινόμηση – Βοτανικά Χαρακτηριστικά της Ροδιάς

1.2.1 Βοτανική Ταξινόμηση

Η ροδιά (*Punica granatum L.*) είναι διπλοειδές φυτό ($2n=16$, $n=8$) και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*, στο γένος *Punica* και στο είδος *granatum*. Στο γένος *Punica* ανήκουν συνολικά τρία είδη: *P. granatum*, *P. protopunica* και *P. nana*.

1.2.2 Βοτανικοί χαρακτήρες του είδους *Punica granatum*

Η ροδιά αναπτύσσεται σε θάμνο ή μικρό δένδρο. Είναι φυλλοβόλο δέντρο με φύλλα αντίθετα, μικρά, λογχοειδή και λεία, χωρίς παράφυλλα.

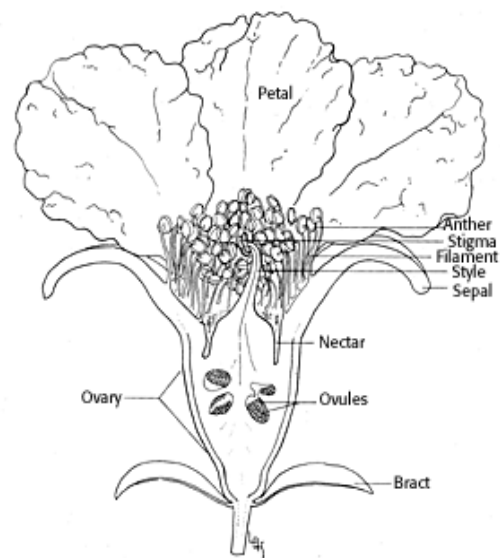
Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους και βρίσκονται ανά δύο σε κάθε κόμβο στα πλάγια των βλαστών. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί εκπύσσονται κατά την άνοιξη δίνοντας κανονική ή λογχοειδή βλάστηση, η οποία φέρει ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους οφθαλμούς. Οι μικτοί καρποφόροι οφθαλμοί εκπύσσονται κατά το Μάιο δίνοντας βραχεία βλάστηση συνήθως άφυλλη με άνθη στην άκρη. Αναφέρονται όμως εκπτώξεις μικτών και αργότερα το καλοκαίρι.

Τα άνθη φέρονται επάκρια της τρέχουσας βλάστησης (ένα επάκρια και τα άλλα ανά ένα πλάγια). Είναι μεγάλα, καμpanοειδή ή κυλινδρικά, κόκκινα (**Εικόνα 1.1**) ή και λευκοκίτρινα. Κάθε άνθος αποτελείται από πέντε ή περισσότερα σέπαλα, ισάριθμα πέταλα, πολυάριθμους κόκκινους στήμονες, με κίτρινους ανθήρες, ωοθήκη περίγυνη, πολύχωρη, με πολυάριθμες σπερματικές βλάστες, στύλο κιτρινοκόκκινο, περίπου 2,5 cm σε μήκος και στίγμα σφαιρικό ή κολοβό και κιτρινοπράσινο (**Εικόνα 1.2**). Τα άνθη

βασικά είναι δύο τύπων: τα καρποφόρα (μεγάλα, μακρόστυλα, μακροστήμονα, έγχρωμα, με τους ανθήρες και το στίγμα στο ίδιο ύψος) και τα άγονα (μικρότερα, βραχύστυλα, βραχυστήμονα, με στίγμα πολύ χαμηλότερα από τους ανθήρες). Σποραδικά απαντούν άνθη ενδιάμεσου τύπου (άνθη με στύλους του ίδιου μήκους με τα μακρόστυλα ή τόσο βραχείς όσο στα βραχύστυλα). Τα άνθη με τους μακρούς στύλους συνήθως γονιμοποιούνται, αλλά σπάνια οι καρποί αυτοί φθάνουν στην ωρίμανση, παραμορφώνονται και γίνονται ελαττωματικοί. Αντίθετα, τα βραχύστυλα άνθη δεν γονιμοποιούνται και γρήγορα πέφτουν. Τα πέταλα αυτών είναι ωχρορόδινα και η γύρη είναι άγονη (Hodgson, 1917). Τα μακρόστυλα άνθη συνήθως σχηματίζονται σε παλιό ξύλο, ενώ τα βραχύστυλα σε νέα βλάστηση. Το σχετικό ποσοστό του καθενός επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Ο καλύτερος καρπός παράγεται από τα πρώιμα άνθη, πιθανόν γιατί αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια πιο ευνοϊκών μετεωρολογικών συνθηκών (Evinoff, 1953).



Εικόνα 1.1 Άνθη ροδιάς



Εικόνα 1.2 Μέρη του άνθους της ροδιάς

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

1.2.3 Καρποφορία

Η ροδιά μπαίνει σε περίοδο καρποφορίας από τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο της ζωής της. Πλήρης παραγωγή σημειώνεται κατά τον πέμπτο ή έκτο χρόνο (Stover and Mercure, 2007; Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009). Η παραγωγική της ζωή υπολογίζεται από 40 έως 50 χρόνια, ενώ η απόδοση μπορεί να μειώνεται σταδιακά μετά τα 30 χρόνια (Ποντίκης, 1996; Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009).

1.2.4 Επικονίαση και γονιμοποίηση

Οι ποικιλίες της ροδιάς είναι αυτογόνιμες αλλά δεν αποκλείεται να υπάρχουν και ποικιλίες που σταυροεπικονιάζονται και αυτό γίνεται συνήθως με τα έντομα (Stover and Mercure, 2007). Τα άνθη της ροδιάς στερούνται νέκταρος και επομένως η μέλισσα φαίνεται να μην είναι αναγκαία για την αύξηση της παραγωγής. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η σταυροεπικονίαση ευνοεί την καρπόδεση της ροδιάς. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι τα έντομα των γένων *Cetonia* και *Trichodes* είναι πιθανό να ευνοούν την επικονίαση και γονιμοποίηση των ανθέων της ροδιάς, ως γυρεοσυλλέκτες, καθώς τα επισκέπτονται (Ποντίκης, 1996), ενώ ορισμένοι παραγωγοί στις ΗΠΑ πιστεύουν ότι η μέλισσα ευνοεί την καρπόδεση. Ο Kihara (1958) αναφέρει την ύπαρξη άσπερμης ποικιλίας, της οποίας, ενώ η γύρη είναι στείρα (άγονη), ο καρπός αναπτύσσεται κανονικά. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι το θέμα της επικονίασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και ότι πιθανόν χρειάζεται παραπέρα διερεύνηση για το αυτόστειρο ή αυτογόνιμο των διαφόρων ποικιλιών.

1.2.5 Διάκριση ποικιλιών ροδιάς

Οι ποικιλίες ροδιάς διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την περιεκτικότητα του χυμού τους σε οξέα,:

- **γλυκές ποικιλίες**, περιεκτικότητα του χυμού σε οξέα μικρότερη από 0,9%,
- **ημίγλυκες ποικιλίες**, περιεκτικότητα του χυμού σε οξέα μεταξύ 0,9 – 1,8%,
- **ξινές ποικιλίες**, περιεκτικότητα του χυμού σε οξέα μεγαλύτερη από 1,8%

(Δρογούδη κ.ά., 2007; Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009).

Για την κατηγοριοποίηση των Ισπανικών ποικιλιών χρησιμοποιείται, επίσης, ο λόγος των ολικών διαλυτών στερεών προς την ογκομετρούμενη οξύτητα. Σύμφωνα με τον Can και τους συνεργάτες του (2009) προκύπτουν τρεις κατηγορίες βάσει του παραπάνω λόγου:

- **ξινές ποικιλίες**, όταν ο λόγος παίρνει τιμές μεταξύ 5 – 7,
- **γλυκόξινες ποικιλίες**, όταν ο λόγος παίρνει τιμές μεταξύ 17 – 24,
- **γλυκές ποικιλίες**, όταν ο λόγος παίρνει τιμές μεταξύ 31 – 98.

Οι διάφορες ποικιλίες χαρακτηρίζονται συχνά με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρπών τους, όπως το μέγεθος του καρπού, το χρώμα και το πάχος του φλοιού, το χρώμα και το μέγεθος των καρπιδίων, καθώς και το μέγεθος και τη σκληρότητα των σπερμάτων. Οι ξινές ροδιές ξεχωρίζουν, επίσης, και από τα μονήρη, μεγάλα άνθη τους (Γάτσιος, 2010).

1.2.6 Ποικιλίες ροδιάς

1.2.6.1 Κυριότερες ξένες ποικιλίες

Έχουν πιστοποιηθεί περισσότερες από 500 ποικιλίες ροδιάς στα διάφορα κράτη (Stover and Mercure, 2007). Οι πιο εμπορικές ξένες ποικιλίες είναι:

- **‘Bedana’**. Ινδική ποικιλία με μεγάλους καρπούς. Ο φλοιός έχει καφέ χρώμα και τα ροζ / λευκά καρπίδια είναι γλυκά με μαλακά σπέρματα.
- **‘Kandhari’**. Ινδική υπόξινη ποικιλία με καρπούς με έντονο κόκκινο χρώμα. Τα καρπίδια είναι κόκκινα με σκληρά σπέρματα.
- **‘Acco’**. Είναι η κυριότερη πρώιμη ποικιλία που εξάγεται από το Ισραήλ. Είναι πρώιμη ποικιλία με μικρομεσαίο μέγεθος καρπού εντυπωσιακό κόκκινο χρώμα φλοιού και καρπιδίων, μαλακά σπέρματα και γλυκιά γεύση.
- **‘Dolce Nostrana’**. Ιταλική ποικιλία με μεγάλους καρπούς. Ο φλοιός είναι λεπτός με έντονο κόκκινο χρώμα και τα καρπίδια γλυκά.
- **‘Dolce a Dente di Cavallo’**. Ιταλική ποικιλία με γλυκά καρπίδια και επιμήκη σπέρματα.

- **‘Blanca’**. Ισπανική ποικιλία με καρπούς μετρίου μεγέθους. Ο φλοιός είναι λείος και τα καρπίδια κόκκινα, χυμώδη και με γλυκιά γεύση.
- **‘Mollar’**. Από τις πιο εμπορικές ισπανικές ποικιλίες. Καρπίδια με έντονο πορφυρό χρωματισμό και γλυκιά γεύση.
- **‘Dultse Colorada’**. Ισπανική ποικιλία που με καρπούς ογκώδεις, με λείο και λεπτό φλοιό. Τα καρπίδιά της είναι μεγάλα και κόκκινα με γλυκιά γεύση.
- **‘Spanish Ruby’**. Πρώιμη ποικιλία με λεπτό φλοιό, κόκκινα καρπίδια με γλυκιά γεύση και μαλακά σπέρματα.
- **‘Wonderful’**. Η κύρια ποικιλία καλλιέργειας στις Η.Π.Α, ενώ καλλιεργείται και στην Ευρώπη, το Ισραήλ και τη Χιλή. Έχει έντονο πορφυρό χρωματισμό τόσο στον φλοιό όσο και στο χυμό. Είναι ιδανική για χυμοποίηση και έχει καρπίδια με βαθύ κόκκινο χρώμα και μεσαίας σκληρότητας σπέρματα. Θεωρείται γλυκόξινη ή ξινή ποικιλία.
- **‘Angel Red’**. Ποικιλία που κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος στις Η.Π.Α.. Ωριμάζει τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου, νωρίτερα δηλαδή από τις υπόλοιπες ποικιλίες και παράγει περισσότερα ρόδια από τις άλλες ποικιλίες. Ο καρπός έχει ένα φωτεινό κόκκινο χρώμα και είναι πολύ ζουμερός, ιδανικός για χυμοποίηση. Ένα ακόμη πλεονέκτημα που έχει είναι ότι τα σπέρματα είναι μαλακά, έχουν γλυκιά γεύση και μπορούν να καταναλωθούν.
- **‘Grenada’**. Προήλθε από την Wonderful μέσω γενετικής επιλογής και ωριμάζει ένα μήνα νωρίτερα από αυτήν. Ο καρπός της έχει έντονο κόκκινο χρώμα και ο φλοιός είναι χονδρός και σκληρός. Τα καρπίδια έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα.

1.2.6.2 Κυριότερες ελληνικές ποικιλίες

Οι ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες έχουν προέλθει ως σπορόφυτα και στο εμπόριο φέρονται με το όνομα του τόπου προέλευσης.

Οι κυριότερες παραδοσιακές γλυκές ελληνικές ποικιλίες (πληθυσμοί) είναι οι:

- **‘Πολίτικη’**. Έχει καρπούς μετρίου μεγέθους με λεπτό πρασινωπό φλοιό. Τα καρπίδιά της είναι κόκκινα, σαρκώδη με γλυκιά γεύση.

- **‘Καράβελος’**. Έχει μεγάλους πρασινωπούς καρπούς. Τα καρπίδια είναι μεγάλα με ανοιχτό κόκκινο χρώμα, γλυκιά γεύση και μικρά σπέρματα. Η ποικιλία αυτή θεωρείται εκλεκτή και είναι κατάλληλη για νωπή κατανάλωση.
- **‘Γλυκιά Πατρών’**. Η ποικιλία αυτή ωριμάζει κατά τους μήνες Αύγουστο με Σεπτέμβριο. Ποικιλία με ογκώδεις καρπούς, με χρωματιστό περίβλημα και μικρά καρπίδια με γλυκιά γεύση.
- **‘Ερμιόνης’**. Μεγάλοι καρποί με έντονο κόκκινο χρωματισμό. Τα καρπίδια έχουν γλυκιά γεύση και τα σπέρματα είναι μαλακά. Από τους πληθυσμούς της ‘Ερμιόνης’ έχουν προκύψει οι ποικιλίες ‘Περσεφόνη’, ‘Πλούτων’, ‘Πορφυρογέννητη’ και ‘Ξινή’.

Παραδοσιακές ξινές ελληνικές ποικιλίες (πληθυσμοί) είναι οι:

- **‘Λειφάνια’**. Η ποικιλία αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλους καρπούς με λεπτό φλοιό, ρόδινο χρωματισμό και καρπίδια μετρίου μεγέθους.
- **‘Τσιπόροδα’**. Καρπός μέτριος έως ογκώδης με φλοιό λεπτό, βαθέως ερυθροπορφυρό. Τα καρπίδια είναι χονδρά, μάλλον ξανθά, υπόξινα, γλυκύτερα σε προχωρημένη ωρίμαση.
- **‘Χονδρόροδα’** (Καμπάτικα). Καρπός πολύ ογκώδης με χονδρό ερυθροπό φλοιό. Καρπίδια ερυθρορόδινα, γλυκόξινα.
- **‘Κρασόροδα’**. Καρπός μετρίου-μικρού μεγέθους, με λεπτό έντονα κόκκινο φλοιό. Καρπίδια υπόξινα. Ίσως κάποτε χρησιμοποιήθηκε για παρασκευή κρασιού.
- **‘Γούνες’**. Καρπός μικρός-μέτριος με χονδρό μαλακό φλοιό, ζοηρώς βυσσινόχρωμο στην ηλιαζόμενη πλευρά. Καρπίδια έντονα ερυθρά, πολύ όξινα.
- **‘Ξυνόροδα’** (Αγριοκαμπάτικα). Καρπός μάλλον μικρός, με φλοιό χονδρό εντόνως ερυθρό. Καρπίδια πολύ όξινα.

Επιπλέον, το Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων επέλεξε και μελέτησε μερικούς γενότυπους από τον εγχώριο πληθυσμό, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι οι: 11010, 11015, 11006 και 11041 (Δρογούδη κ.ά., 2007).

1.3 Εμπορική Διάσταση

1.3.1 Καλλιέργεια της Ροδιάς στον Κόσμο

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται ετησίως στους 2.250.000 τόνους (**Πίνακας 1.1**) (Τζουραμάνη κ.ά., 2008). Η Ασία είναι η ήπειρος όπου κυριαρχεί η καλλιέργεια της ροδιάς με κυριότερες χώρες παραγωγής την Ινδία, το Ιράν, το Ισραήλ, το Πακιστάν, το Αφγανιστάν και το Ομάν. Η Ινδία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα ροδιών στον κόσμο (περίπου 1.200.000 τόνους), όπου οι μεγάλης έκτασης φυτεύσεις οπωρώνων ροδιάς έγιναν μόλις τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Στην Ευρώπη, η Ισπανία είναι η κύρια παραγωγός χώρα με παραγωγή περίπου 60.000 τόνους, εκ των οποίων περισσότερο από το 55% εξάγεται. Μεγάλη παραγωγή ροδιών στη Μεσόγειο εμφανίζουν, επίσης, η Ιταλία, η Αλγερία, η Τυνησία, η Τουρκία, το Μαρόκο και η Πορτογαλία. Οι ΗΠΑ παράγουν περισσότερο από 100.000 τόνους ετησίως, από τους οποίους ένα ποσοστό εξάγεται στην Ιαπωνία, τον Καναδά, το Μεξικό και την Αγγλία, ενώ το 80% της παραγωγής οδηγείται στη βιομηχανία για παραγωγή χυμού. Η κυριότερη εμπορική παραγωγή στις Η.Π.Α. βρίσκεται στην Καλιφόρνια (Jurenka, 2008). Μεγάλο ενδιαφέρον για την καλλιέργεια της ροδιάς έχουν δείξει, τελευταία, χώρες του νοτίου Ημισφαιρίου όπως η Αργεντινή, η Χιλή, το Περού, η Νότια Αφρική και η Αυστραλία.

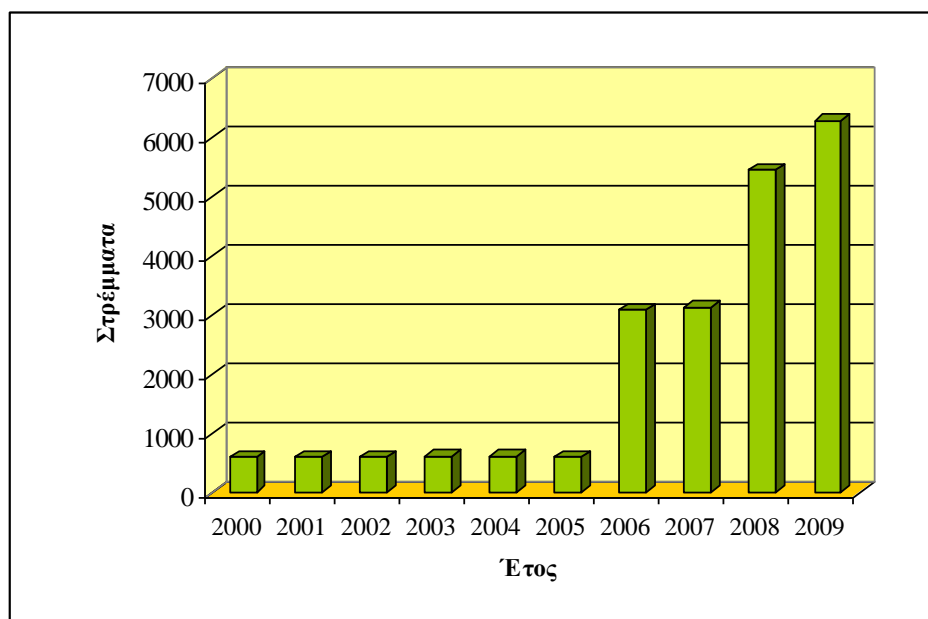
Πίνακας 1.1 Ετήσια παραγωγή ροδιών στις κυριότερες χώρες καλλιέργειας. (Πηγή: Τζουραμάνη κ.ά., 2008).

Χώρα	Παραγωγή (τόνοι)	Ποσοστό
Ινδία	1.200.000	53,33%
Ιράν	650.000	28,89%
Η.Π.Α	100.000	4,44%
Τουρκία	75.000	3,33%
Ισπανία	60.000	2,67%
Ισραήλ	20.000	0,89%
Λοιπές	145.000	6,44%
Σύνολο	2.250.000	100%

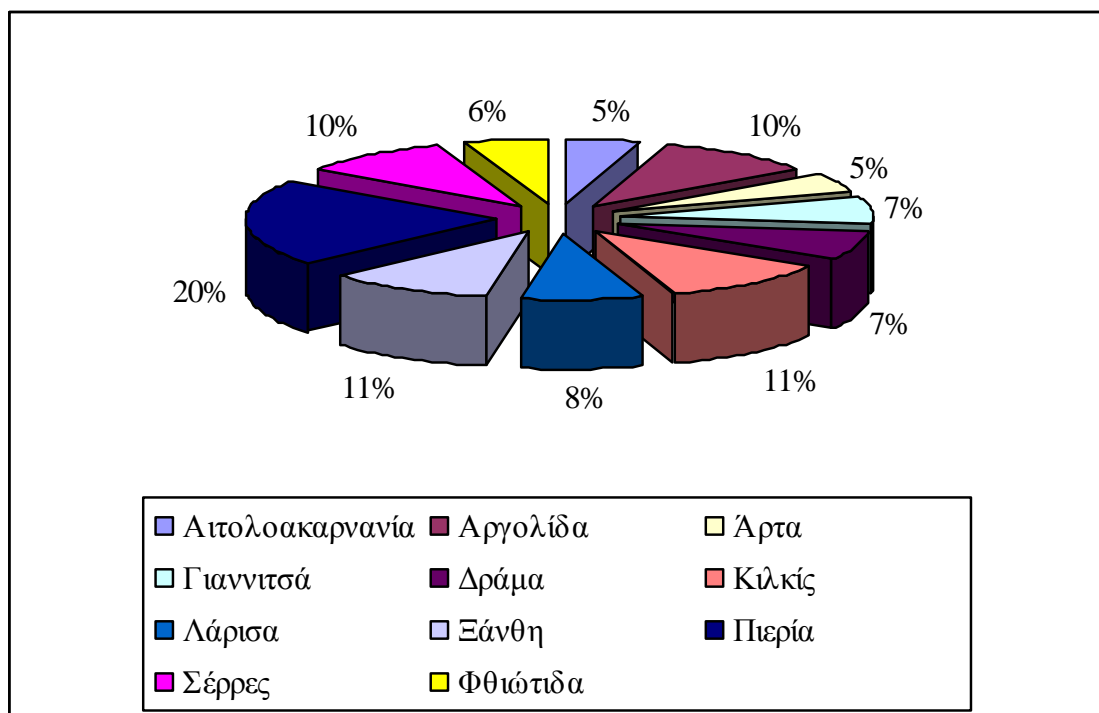
1.3.2 Καλλιέργεια της Ροδιάς στην Ελλάδα

Η καλλιέργεια της ροδιάς εμφανίζεται στην Ελλάδα από την αρχαιότητα και ήταν διάσπαρτη μέχρι πριν μερικά χρόνια (Τζουραμάνη κ.ά., 2008). Σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (1989), μόνο το 10% του συνόλου των δέντρων βρίσκονταν σε οργανωμένους οπωρώνες, ενώ η συνολική ετήσια παραγωγή, ανερχόταν σε 2.700 τόνους περίπου. Τη δεκαετία του '90 μειώθηκαν σημαντικά τόσο οι εκτάσεις των κανονικών οπωρώνων, όσο και η συνολική παραγωγή. Τα τελευταία χρόνια, όμως, υπήρξε ραγδαία και χωρίς προγραμματισμό αύξηση της καλλιέργειας της ροδιάς στη χώρα (Γράφημα 1.1).

Ο κύριος όγκος ροδιών στην Ελλάδα παραγόταν ανέκαθεν στην περιοχή της Ερμιόνης (300-400 τόνοι), όπου η ροδιά αποτελεί παραδοσιακή και συστηματική καλλιέργεια (Τζουραμάνη κ.ά., 2008). Η παραγωγή στην Ερμιόνη αποσκοπεί στη διάθεση νωπού προϊόντος για επιτραπέζια χρήση. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, πολλοί παραγωγοί έχουν προβεί σε νέες φυτεύσεις δέντρων ροδιάς κυρίως της ποικιλίας 'Wonderful', οι καρποί της οποίας προορίζονται για χυμοποίηση. Μεγαλύτερη παραγωγή, σήμερα, εμφανίζεται στους νομούς Πιερίας, Κιλκίς, Ξάνθης, Αργολίδας Σέρρων και Λάρισας (Γράφημα 1.2).



Γράφημα 1.1 Καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς στην Ελλάδα από το 2000 έως το 2009 (τιμές σε στρέμματα). (Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).



Γράφημα 1.2 Ποσοστιαία κατανομή καλλιεργούμενων εκτάσεων ροδιάς ανά νομό, το έτος 2009. (Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).

1.3.3 Ποικιλία ‘Wonderful’ – Χυμοποίηση

Η ποικιλία Wonderful κατάγεται από τη Φλόριντα των ΗΠΑ. Ο καρπός της είναι μεγάλος, με χρώμα βαθύ μωβ έως κόκκινο (**Εικόνα 1.3 Α**). Ο φλοιός του καρπού έχει μέτριο πάχος (**Εικόνα 1.3 Β**), τα καρπίδια έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα και στυφή γεύση (**Εικόνα 1.3 Γ**) και τα σπέρματα είναι μικρά και μαλακά (**Εικόνα 1.3 Δ**). Οι καρποί της προσφέρονται περισσότερο για την παρασκευή χυμών παρά για νοπή κατανάλωση. Σήμερα, αποτελεί την πιο εμπορική ποικιλία που χρησιμοποιείται παγκοσμίως για την παρασκευή χυμών ροδιού.

Κατά την βιομηχανική επεξεργασία της ποικιλίας ‘Wonderful’ για την παρασκευή χυμού, προκύπτει ένα πλήθος υποπροϊόντων μεταξύ των διαφορετικών σταδίων επεξεργασίας των καρπών της, που περιλαμβάνουν τμήματα φλοιού, εσωτερικών λευκών τοιχωμάτων και σπερμάτων. Στα πλαίσια της πράσινης ανάπτυξης και των σύγχρονων μεθόδων διαχείρισης του περιβάλλοντος, τα γεωργικά υποπροϊόντα

μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια πλούσια πηγή πρώτων υλών για την παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Έτσι, είναι δυνατόν να αποτελέσουν ένα πρόσθετο οικονομικό πόρο στις βιομηχανίες επεξεργασίας, μειώνοντας το κόστος παραγωγής ανά μονάδα και δημιουργώντας ταυτόχρονα νέες θέσεις εργασίας.

A



B



Γ



Δ



Εικόνα 1.3 Τμήματα του καρπού της ποικιλίας ‘Wonderful’. **A:** Ολόκληρος καρπός, **B:** Φλοιός, **Γ:** Καρπίδια (σπέρματα με επισπέρμια), **Δ:** Σπέρματα.

1.3.4 Οικονομική Σημασία – Χρήσεις του Ροδιού

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

ποσότητες ροδιών δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής πώλησης (Τζουραμάνη κ.ά., 2008; Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009).

Στην Ελλάδα, για να καλυφθούν οι ανάγκες της αγοράς, εισάγονται ετησίως μεγάλες ποσότητες ροδιών (κυρίως από Τουρκία, Ιράν, Ινδία, Αίγυπτο και Ισραήλ). Σύμφωνα με τα επίσημα στατιστικά στοιχεία η ελληνική αγορά απορροφά 1.000-1.200 τόνους ροδιών ετησίως, εκ των οποίων οι 800 τόνοι εισάγονται (Τζουραμάνη κ.ά., 2008). Επίσης, τα τελευταία χρόνια προωθούνται στην αγορά ολοένα και περισσότερα επώνυμα προϊόντα που περιέχουν ρόδι. Η ποικιλία των προϊόντων αυτών δεν περιορίζεται μόνο σε προϊόντα διατροφής (χυμοί, ποτά, αναψυκτικά, γιαούρτια, παγωτά, μαρμελάδες, καφές) αλλά συμπεριλαμβάνει καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής.

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

1.3.5 Το Ρόδι ως Λειτουργικό Τρόφιμο

Παρότι ο όρος «λειτουργικό τρόφιμο» έχει καθοριστεί αρκετές φορές, δεν υπάρχει ακόμη ένας ενιαία αποδεκτός ορισμός για την ομάδα αυτή των τροφίμων (Alzamora et al. 2005). Σε πρόσφατη έκθεση του Ινστιτούτου Τεχνολόγων Τροφίμων (I.F.T., 2009) ως λειτουργικά ορίζονται τα «τρόφιμα που παρέχουν οφέλη για την υγεία πέρα από τη βασική διατροφή, παρέχοντας βασικές θρεπτικές ουσίες συχνά πέρα από τις ποσότητες που απαιτούνται για την κανονική συντήρηση-ανάπτυξη ή/και άλλα βιοδραστικά συστατικά που προσδίδουν οφέλη στην υγεία ή επιθυμητά φυσιολογικά αποτελέσματα». Η Συντονισμένη Δράση της ΕΕ για τα Λειτουργικά Τρόφιμα χαρακτηρίζει ένα τρόφιμο ως λειτουργικό *«όταν αποδεικνύεται σε ικανοποιητικό βαθμό ότι μπορεί να επηρεάσει ευεργετικά μία ή περισσότερες λειτουργίες-στόχους στο*

σώμα (πέρα από την επαρκή θρέψη) με έναν τρόπο που σχετίζεται είτε σε μια βελτιωμένη κατάσταση της υγείας και ευεξίας ή/και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου». Στο πλαίσιο αυτό, τα λειτουργικά τρόφιμα δεν κυκλοφορούν σε χάπια ή κάψουλες, αλλά θα πρέπει να παραμένουν τρόφιμα και η αποτελεσματικότητά τους να αποδεικνύεται σε ποσότητες που καταναλώνονται στη διατροφή (E.C., 1999).

Το ρόδι μπορεί να θεωρηθεί ως «λειτουργικό τρόφιμο», καθώς είναι σύμφωνο με τους παραπάνω ορισμούς με διάφορους τρόπους που αναλύονται παρακάτω. Ωστόσο, απαιτείται εκτενέστερη μελέτη αφενός της χημείας και αφετέρου της βιολογίας του συνόλου των συστατικών του για την αξιολόγηση των δυνητικών οφελών του στην υγεία του ανθρώπου.

1.4 Χημική Σύσταση Ροδιού

1.4.1 Κατανομή Χημικών Συστατικών στο Ρόδι

Το ρόδι, ως καρπός, έχει πολύτιμα συστατικά στα διάφορα μέρη του που περιλαμβάνουν αφενός το βρώσιμο τμήμα του, επισπέρμια και σπέρματα, και αφετέρου το μη βρώσιμο, φλοιός και λευκά εσωτερικά τοιχώματα. Ένα πολύ σημαντικό προϊόν που παράγεται από το ρόδι, και χρήζει εξέτασης ως προς το χημικό του περιεχόμενο, είναι ο χυμός, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τα επισπέρμια ή και από ολόκληρο τον καρπό.

Περίπου το 50% του βάρους του καρπού αντιστοιχεί στο φλοιό, ο οποίος αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή βιοδραστικών συστατικών. Στον φλοιό κυριαρχούν φλαβονοειδή, κυρίως φλαβονόλες, όπως λουτεολίνη, κερκετίνη και καμφερόλη, υδρολυόμενες ταννίνες, κυρίως ελλαγιταννίνες (ETs), και προανθοκυανιδίνες (Seeram et al, 2005; Li et al., 2006). Επίσης, περιέχονται μεταλλικά στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, άζωτο, φώσφορο, μαγνήσιο και νάτριο (Mirdehghan and Rahemi, 2007), καθώς και πολυσακχαρίτες (Jahfar et al., 2003).

Το εδώδιμο τμήμα του ροδιού (50%) αποτελείται κατά 40% από επισπέρμια και κατά 10% από σπέρματα. Τα επισπέρμια περιέχουν κατά 85% νερό, 10% σάκχαρα (κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη), ενώ το υπόλοιπο 5% αποτελείται από πηκτίνες, οργανικά οξέα (πχ ασκορβικό, κιτρικό και μαλικό οξύ) και πολυφαινόλες. Οι κατηγορία πολυφαινολών που κυριαρχεί στα επισπέρμια του ροδιού είναι τα φλαβονοειδή, κυρίως οι ανθοκυανίνες (Aviram et al. 2000; Tezcan et al. 2009). Τα σπέρματα του ροδιού είναι πλούσια σε συνολικά λιπίδια τα οποία αποτελούν το 12% του συνολικού βάρους τους. Τα λιπίδια αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα (n-3) λιπαρά οξέα, κυρίως λινολενικό, λινελαϊκό, πουνικό, ελαϊκό, στεατικό και παλμιτικό οξύ (Ozgul-Yucel, 2005; Fadavi et al., 2006). Επίσης, τα σπέρματα περιέχουν πρωτεΐνες, ακατέργαστες ίνες, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, πηκτίνες, σάκχαρα, πολυφαινόλες, αλλά και τα φυτοοιστρογόνα γενιστεΐνη και κουμεστρόλη και το στεροειδές οιστρόνη (El-Nemr et al., 2006; Syed et al., 2007).

Οι εμπορικοί χυμοί ροδιού προκύπτουν, κυρίως, μέσω της συμπίεσης ολόκληρων καρπών, με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται τόσο τα φλαβονοειδή (ανθοκυανίνες), που περιέχονται στα επισπέρμια του ροδιού, όσο και τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες), αλλά και οι υδρολύμενες ταννίνες που περιέχονται στο φλοιό. Οι χυμοί που προκύπτουν από ολόκληρο τον καρπό ή μετά από εμποτισμό του φλοιού σε αυτόν για ένα χρονικό διάστημα εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιοδραστικά μόρια καθώς έχει φανεί ότι οι υδρολύμενες ταννίνες που κυριαρχούν στο φλοιό του ροδιού είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού κατά 92% (Gil et al., 2000).

Ωστόσο, η χημική σύσταση του καρπού του ροδιού παρουσιάζει διακυμάνσεις και εξαρτάται από την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, το μικροκλίμα, την ωριμότητα συλλογής, τις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης (Poyrazoglu et al. 2002; Barzegar et al. 2004; Fadavi et al. 2005). Σημαντικές διάφορες έχουν αναφερθεί στο περιεχόμενό τους σε οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά, σάκχαρα, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και μεταλλικά ιχνοστοιχεία ανάλογα με το έτος και τον τόπο παραγωγής (Mirdehghan and Rahemi, 2007; Çam et al. 2009; Tezcan et al., 2009).

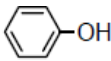
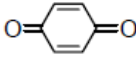
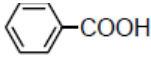
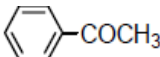
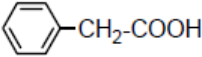
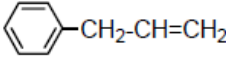
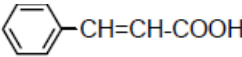
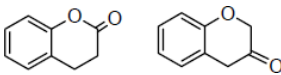

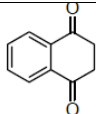
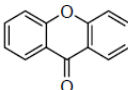
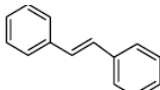
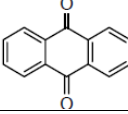
1.4.2 Οι Πολυφαινόλες

1.4.2.1 Κατηγορίες Πολυφαινολών

Η κυριότερη ομάδα χημικών ενώσεων που είναι υπεύθυνη για τις λειτουργικές ιδιότητες του καρπού του ροδιού είναι οι πολυφαινόλες σε οποιαδήποτε από τις μορφές τους. Οι πολυφαινόλες (φαινολικές ενώσεις) είναι αρκετά διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 (Harborne, 1993). Αυτές προκύπτουν ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Με τον όρο «πολυφαινόλες» στη διεθνή βιβλιογραφία νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απευθείας με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Οι φυσικές πολυφαινόλες περιλαμβάνουν απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φαινυλοπροπανοειδή, τα φλαβονοειδή και τα στυλβένια, ή / και υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες, οι λιγνάνες και οι μελανίνες. Βρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες, είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τους τμήμα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτης, δισακχαρίτης ή ολιγοσακχαρίτης. Επίσης, μπορεί να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

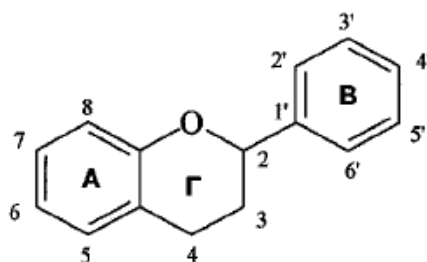
Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε τουλάχιστον 10 κατηγορίες, ανάλογα με τη βασική τους χημική δομή (Harborne, 1989). Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες είναι αυτή των φλαβονοειδών, η οποία διακρίνεται σε παραπάνω από 13 υποκατηγορίες διαθέτοντας επί συνόλου περισσότερα από 5000 μέλη. Στον **Πίνακα 1.2** παρατίθενται οι σημαντικότερες κατηγορίες πολυφαινολών.

Πίνακας 1.2 Σημαντικότερες κατηγορίες πολυφαινολών

Απλές φαινόλες	
Βενζοκινόνες	
Φαινολικά οξέα	
Ακετοφαινόλες	
Φαινυλοξικά οξέα	
Φαινυλοπροπανοειδή	
(Υδροξυ)κινναμωμικά οξέα	
Κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες	
Χρωμόνες	
Ναφθοκινόνες	
Ξανθόνες	
Στιλβένια	
Ανθρακινόνες	
Φλαβονοειδή	
Ταννίνες, λιγνάνες, μελανίνες	

1.4.2.2 Φλαβονοειδή

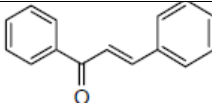
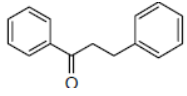
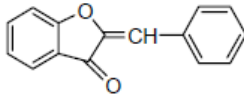
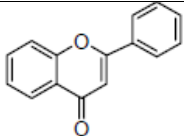
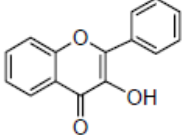
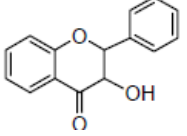
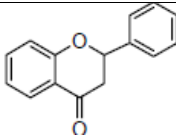
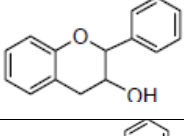
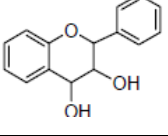
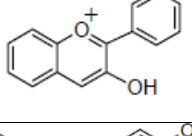
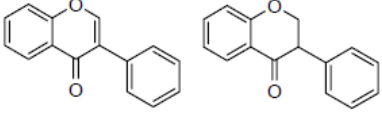
Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες (κατεχίνες) και χαλκόνες. Τα φλαβονοειδή είναι σχετικά μικρού μοριακού βάρους μόρια, γενικά ευδιάλυτα ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (βαθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης κ.α.). Οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίσταται στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτύλιους Α και Β (Vinson, 1998) και στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3- υδροξυ ή 2-οξο ομάδων) (Σχήμα 1.1). Στον Πίνακα 1.3 φαίνεται η γενική δομή των φλαβονοειδών και η κατάταξη τους βάσει Harborne (1989).

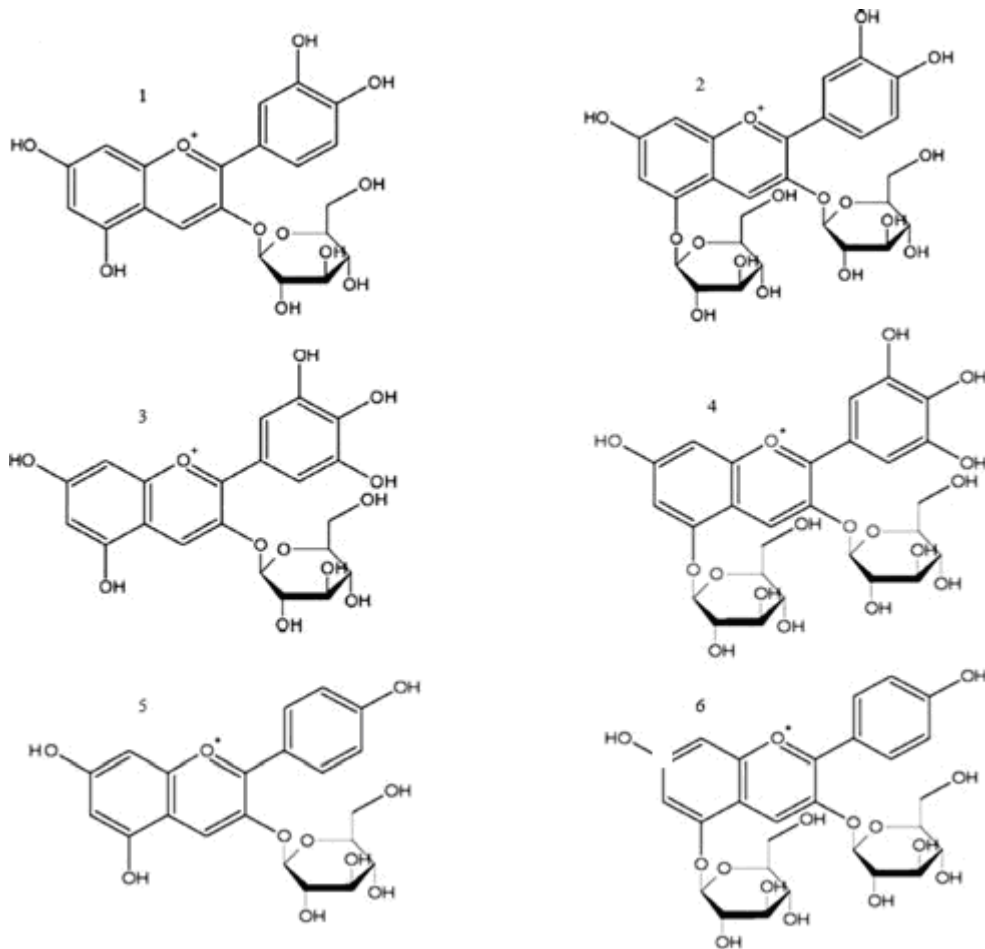


Σχήμα 1.1 Βασική δομή φλαβονοειδών

Οι ανθοκυανίνες (γλυκοζυλιωμένες ανθοκυανιδίνες) είναι η μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών που περιέχονται στα επισπέρμια του ροδιού, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χυμού. Αυτές οι χρωστικές ουσίες δίνουν στο καρπό και στο χυμό του ροδιού το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα (Afaq et al., 2005). Στο χυμό του ροδιού παρουσιάζεται μια μεγάλη ποικιλία ανθοκυανινών, κυρίως κυανιδίνη-3-*O*-γλυκοζίτης, κυανιδίνη-3,5-δι-*O*-γλυκοζίτης, δελφινιδίνη-3-*O*-γλυκοζίτης, δελφινιδίνη-3,5-δι-*O*-γλυκοζίτης, πελαργονιδίνη -3-*O*-γλυκοζίτης και πελαργονιδίνη-3 ,5-δι- *O*-γλυκοζίτης (Σχήμα 1.2), (Lansky and Newman, 2007; Jaiswal et al., 2010). Οι κύριες διαφορές μεταξύ τους είναι ο αριθμός των υδροξυλιομένων ομάδων, η φύση και ο αριθμός των συνδεδεμένων σακχάρων με τη δομή τους, οι αλειφατικές ή αρωματικές καρβοξυλομάδες που είναι συνδεδεμένες με το σάκχαρο στο μόριο, και η θέση αυτών των ομολόγων.

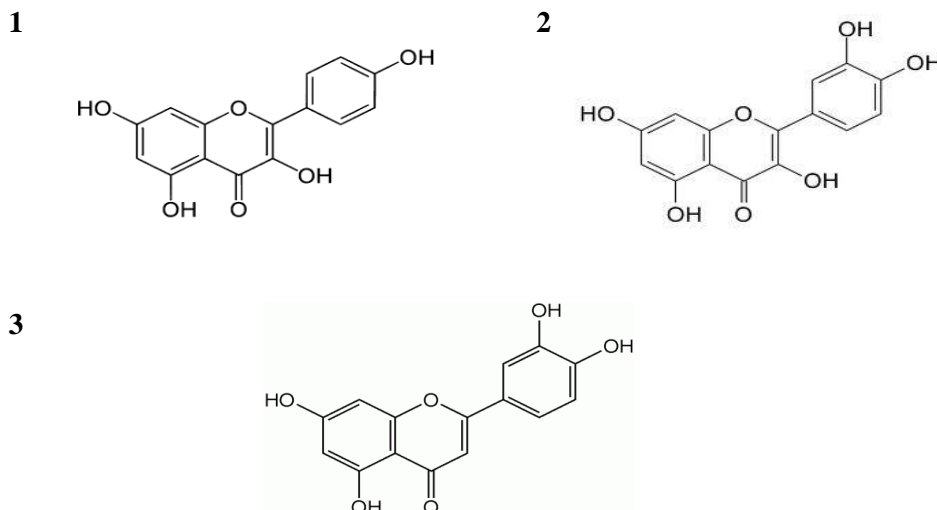
Πίνακας 1.3 Σημαντικότερες κατηγορίες φλαβονοειδών

Χαλκόνες	
Διυδρόχαλκονες	
Χρυσόνες	
Φλαβόνες	
Φλαβονόλες	
Διυδρόφλαβονόλες	
Φλαβανόνες	
Φλαβονόλες	
Φλαβονοδιόλες	
Ανθοκυανιδίνες	
Ισοφλαβονοειδή	
Διφλαβονοειδή, Προανθοκυανιδίνες (ή συμπυκνωμένες ταννίνες)	

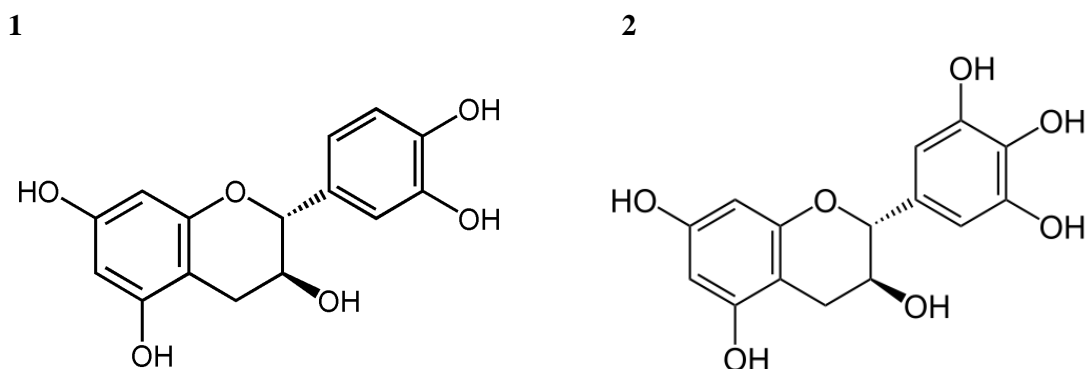


Σχήμα 1.2 Σημαντικότερες ανθοκυανίνες που περιέχονται στο χυμό του ροδιού **1:** κυανιδίνη-3-O-γλυκοζίτης, **2:** κυανιδίνη-3,5-δι-O-γλυκοζίτης, **3:** δελφινίνη-3-O-γλυκοζίτης, **4:** δελφινίνη-3,5-δι-O-γλυκοζίτης, **5:** πελαργονιδίνη-3-O-γλυκοζίτης, **6:** πελαργονιδίνη-3,5-δι-O-γλυκοζίτης.

Οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες (κατεχίνες) είναι, επίσης, ομάδες φλαβονοειδών που παρουσιάζονται στον καρπό του ροδιού σε μεγάλη αφθονία. Οι πιο γνωστές φλαβονόλες στο ρόδι είναι η καμφερόλη, η κερκετίνη και η λουτεολίνη (**Σχήμα 1.3**) (van Elswijk et al., 2004), ενώ από τις φλαβανόνες κυριαρχούν η κατεχίνη και η γαλλοκατεχίνη (**Σχήμα 1.4**) (Artik et al., 1998; Plumb et al., 2002).



Σχήμα 1.3 Σημαντικότερες φλαβονόλες που περιέχονται στον καρπό του ροδιού. **1:**καμφερόλη, **2:** κερκετίνη, **3:** λουτεολίνη.



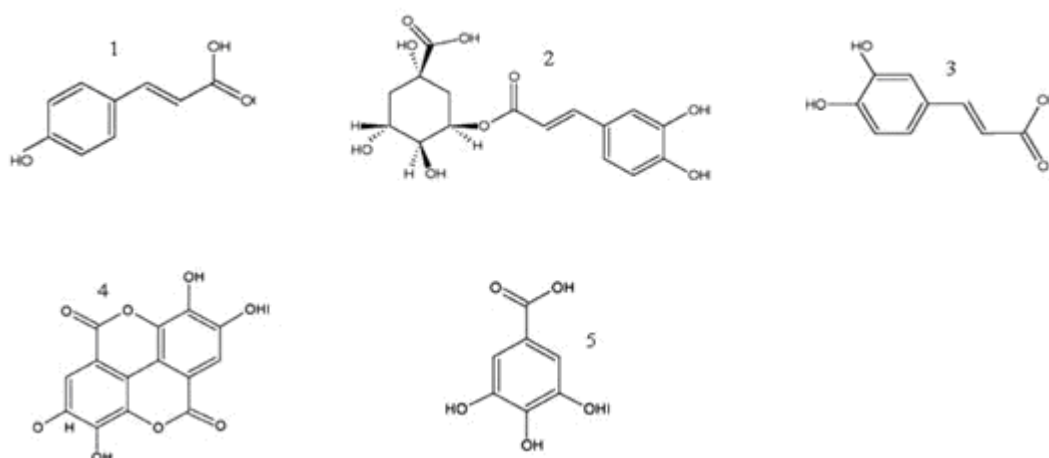
Σχήμα 1.4 Σημαντικότερες φλαβανόνες που περιέχονται στον καρπό του ροδιού. **1:** κατεχίνη, **2:** γαλλοκατεχίνη.

1.4.2.3 Φαινολικά οξέα

Ως φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται τα μόρια που διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο δεσμευμένο σε έναν ή περισσότερους υδρογονωμένους υποκατάστατες, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών τους παραγώγων. Τα φαινολικά οξέα που υπάρχουν στο χυμό του ροδιού μπορούν να χωριστούν στα υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκιναμικά οξέα. Τα κυρίαρχα υδροξυβενζοϊκά οξέα στο ρόδι είναι το γαλλικό

οξύ και το ελλαγικό οξύ (EA), καθώς και τα παράγωγά του (Amakura et al., 2000), ενώ τα πιο άφθονα υδροξυκιναμικά οξέα είναι το καφεϊκό, το χλωρογενικό και το π-κουμαρικό οξύ (Artik et al., 1998; Poyrazoglu et al., 2002) (**Σχήμα 1.5**).

Το ελλαγικό οξύ παράγεται στα φυτά με την υδρόλυση των ελλαγιταννινών. Στο ρόδι, αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα συστατικά που θεωρείται υπεύθυνο για ένα μεγάλο μέρος της αντιοξειδωτικής, αντιπολλαπλασιαστικής, αλλά και άλλων σημαντικών βιολογικών δράσεων του καρπού (Seeram et al., 2005a).

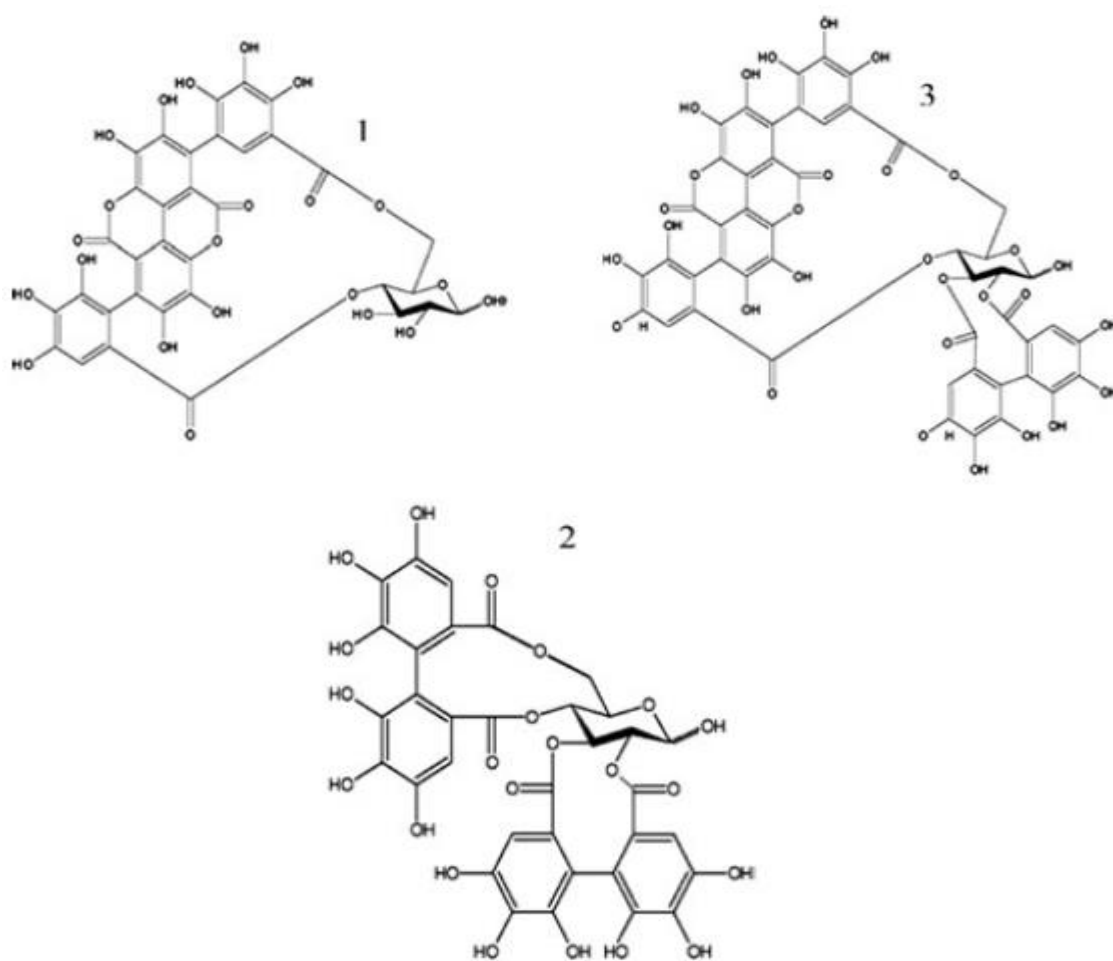


Σχήμα 1.5 Σημαντικότερα φαινολικά οξέα που περιέχονται στο χυμό του ροδιού: **1:** π-κουμαρικό οξύ, **2:** χλωρογενικό οξύ, **3:** καφεϊκό οξύ, **4:** ελλαγικό οξύ (EA), **5:** γαλλικό οξύ.

1.4.2.4 Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι υδροξυλιωμένα μόρια όπου είναι ικανά να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάθρακες και πρωτεΐνες. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα βασίζεται και η στυφή γεύση τροφών που είναι πλούσια σε ταννίνες, καθώς σχηματίζονται ιζήματα με πρωτεΐνες του σιέλου. Είναι υψηλού μοριακού βάρους πολυφαινόλες που διαίρονται σε 3 διακριτές χημικές κατηγορίες: συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες, υδρολύμενες ταννίνες, κυρίως ελλαγιταννίνες (ETs), και γαλλοταννίνες (GTs) (Seeram et al., 2005a).

Οι ETs είναι εστέρες από εξαϋδροξυδιφενικό οξύ και μια πολυόλη, συνήθως γλυκόζη ή κουινικό οξύ (Clifford and Scalbert, 2000). Ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε ETs, κυρίως πουνικαλίνη, πεντονκαλαγίνη και πουνικαλαγίνη (Seeram et al., 2005a) (Σχήμα 1.6). Η πουνικαλαγίνη αποτελεί την κυρίαρχη ET που απαντάται στο ρόδι και θεωρείται υπεύθυνη για σχεδόν το 50 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του χυμού του.



Σχήμα 1.6 Οι σημαντικότερες ETs που περιέχονται στο φλοιό του ροδιού. **1:** πουνικαλίνη; **2:** πεντονκαλαγίνη; **3:** πουνικαλαγίνη.

1.4.3 Βιοδιαθεσιμότητα των Χημικών Συστατικών του Ροδιού

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

Γενικά, τα άγλυκα μέρη, δηλαδή οι μη συζευγμένες μορφές, έχει φανεί ότι απορροφώνται ανέπαφα από το πεπτικό σύστημα, ενώ οι εστέρες, οι γλυκοζίτες ή τα πολυμερή, υδρολύονται προτού απορροφηθούν (Petti and Scully, 2009). Οι μικροοργανισμοί του στόματος και του εντέρου έχουν θεωρηθεί ως υπεύθυνοι για την υποβάθμιση των πολυφαινολών και των ταννινών σε άγλυκα μέρη (Petti and Scully, 2009). Στον άνθρωπο, έχουν πραγματοποιηθεί δύο ειδών πειράματα: μελέτες φαρμακοκινητικής, κατά τις οποίες προσδιορίζεται η απορρόφηση των πολυφαινολών ώρες μετά την κατανάλωση και μελέτες βιοδιαθεσιμότητας και μεταβολισμού, κατά τις οποίες οι μεταβολίτες προσδιορίζονται στο αίμα και τα ούρα μετά από μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Μελέτη φαρμακοκινητικής του Seeram και των συνεργατών του (2004) έδειξε ότι με την κατανάλωση χυμού ροδιού (180 mL), τα επίπεδα ΕΑ ανιχνεύονται στο ανθρώπινο πλάσμα σε μέγιστη συγκέντρωση (31,9 ng / mL) μετά από 1 h, αλλά απομακρύνονται γρήγορα, μετά από 4 ώρες. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η μελέτη του Mertens-Talcott και των συνεργατών του (2006), κατά την οποία με την κατανάλωση 800 mg στερεού εκχυλίσματος ροδιού, η μέγιστη συγκέντρωση ΕΑ στο πλάσμα του αίματος (33 ng / mL) παρατηρήθηκε μετά από 1 h. Μελέτη που σύγκρινε την βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στο ανθρώπινο πλάσμα μετά την κατανάλωση χυμού ροδιού, υγρού και στερεού πολυφαινολικού εκχυλίσματος, έδειξε ότι τα επίπεδα ΕΑ, 6 h μετά την κατανάλωση, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στις τρεις περιπτώσεις, ενώ ο χρόνος της μέγιστης συγκέντρωσης ήταν καθυστερημένος στην περίπτωση της κατανάλωσης του στερεού εκχυλίσματος (Seeram et al., 2008).

Όσον αφορά τις ETs, σε μελέτη που εξέτασε τη βιοδιαθεσιμότητα των ETs μετά από κατανάλωση 1L χυμού ροδιού για 5 μέρες από μία ομάδα εθελοντών, δεν ανιχνεύτηκε πουνικαλλαγίνη ή ελλαγικό οξύ στα ούρα ή στο αίμα, ενώ ανιχνεύτηκαν ουρολιθίνες, παράγωγα ETs, που αποτελούν μικροβιακούς μεταβολίτες (Cerda et al., 2004). Οι τιμές, ωστόσο, που ανιχνεύτηκαν στα ούρα, αλλά και το αίμα εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ατόμων (Cerda et al., 2004). Μελέτη βιοδιαθεσιμότητας και μεταβολισμού ETs προερχόμενων από άλλα φρούτα, έχει δείξει ότι ο ίδιος μεταβολίτης, ουρολιθίνη A, ανιχνεύτηκε στο σύνολο των εξεταζόμενων ατόμων (Cerda et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην πρόταση ότι ο μικροβιακός μεταβολίτης ουρολιθίνη A μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης της έκθεσης του ανθρώπου σε τροφές με περιεχόμενες ETs (Cerda et al., 2005).

Σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση των ανθοκυανινών του ροδιού, δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες σε ανθρώπους. Ωστόσο, βάσει μελετών βιοδιαθεσιμότητας ανθοκυανινών που έχουν γίνει χρησιμοποιώντας ως πηγή άλλα φρούτα, όπως μούρα ή φράουλες έχει φανεί ότι οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν χαμηλή απορρόφηση από τον ανθρώπινο οργανισμό (Wu et al., 2002). Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην *in vivo* μεθυλίωση της κυανιδίνης σε πεονιδίνη και σε συζευγμένη γλυκουρονική μορφή (Wu et al., 2003). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, είναι και τα αποτελέσματα άλλων μελετών, στις οποίες παρατηρήθηκε έκκριση του μεγαλύτερου ποσοστού των μορίων στην αρχική τους γλυκοζυλιωμένη μορφή μέσω των ούρων τις ώρες μετά την πρόσληψη (Felgines et al., 2003; Milbury et al., 2002). Βάσει αυτών των μελετών, οι ανθοκυανίνες φαίνεται πως δεν απορροφώνται σημαντικά από τον ανθρώπινο οργανισμό στην ανέπαφη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή.

Έτσι, βάσει των περιορισμένων μελετών που έχουν γίνει στον ανθρώπινο οργανισμό, φαίνεται ότι η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινόλων του ροδιού, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της ατομικής μεταβλητότητας, της διαφορετικής επεξεργασίας του ροδιού και των αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται, οι οποίες θα πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητες για την ανίχνευση των χαμηλών μεταγευματικών συγκεντρώσεων αυτών των μεταβολιτών (Basu and Penugonda, 2009).

1.5 Βιολογικές ιδιότητες ροδιού

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ευεργετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου που αναφέρονται στη πρόληψη νοσημάτων, προέρχονται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και οφείλουν τη δράση τους στο περιεχόμενό τους στα βιοδραστικά τους συστατικά (Galaverna et al. 2008). Στα πλαίσια αυτά, το περιεχόμενο των καρπών του ροδιού σε συστατικά όπως φαινόλες, οξέα, φλαβονοειδή και ταννίνες προσδιορίζει εν πολλοίς τη βιολογική τους αξία (Anirgam et al. 2000). Μερικές από τις κυριότερες βιολειτουργικές ιδιότητες του ροδιού αποτελούν η αντιοξειδωτική ικανότητα, οι αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες, ενώ έχειδειχθεί ότι μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση την καρδιαγγειακή υγεία, αλλά και την υγεία του δέρματος. Ωστόσο, απαιτείται βαθύτερη έρευνα σε αυτό το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο, ώστε να εκτιμηθεί η συνολική αξία και ασφάλεια του ροδιού ως ανέπαφος καρπός ή των επιμέρους βιοδραστικών του συστατικών (Lansky and Newman, 2007). Παρακάτω αναφέρονται πιο αναλυτικά οι κυριότερες βιολογικές ιδιότητες του ροδιού.

1.5.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών πρόσφατων μελετών και έχει αποδοθεί στο περιεχόμενό του σε αντιοξειδωτικά μόρια. Για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ως αντιοξειδωτικό πρέπει να συμφωνεί με δύο βασικά κριτήρια:

1. Να μπορεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το υπόστρωμα που πρόκειται να οξειδωθεί, να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξείδωση ή την προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση του υποστρώματος.
2. Η ρίζα που προκύπτει να είναι σταθερή προκειμένου να διακοπεί η αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης.

Ο χυμός του ροδιού έχει καταγραφεί πως παρουσιάζει τρεις φορές πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από το πράσινο τσάι (Gil et al., 2000). Η σύγκριση της αντιοξειδωτικής του δράσης με αυτήν άλλων χυμών έχει δείξει ότι ο χυμός του

ροδιού εμφανίζει την πιο ισχυρή δράση. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητά του σε φλαβονοειδή, αλλά και στην ειδική περιεκτικότητά του σε δραστικές πολυφαινόλες.

Τα φαινορικά συστατικά του ροδιού που έχει φανεί πως παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση είναι οι ταννίνες, κυρίως η πουνικαλλαγίνη και η πελαργονιδίνη, το EA και οι ανθοκυανίνες (δελφινίνη, κυανιδίνη, πελαργονιδίνη και γλυκοζίτες). Οι ενώσεις αυτές έχει δειχθεί πως καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιπιδίων (LDL) *in vitro* (Gil et al., 2000; Noda et al., 2002). Οι ανθοκυανίνες του ροδιού έχουν παρουσιάσει ισχυρή δράση έναντι των ριζών H₂O₂, με ισχυρότερη αυτή της πελαργονιδίνης (Noda et al., 2002).

Σε μελέτη που σύγκρινε την αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων του καρπού, φάνηκε ότι το υγρό εκχύλισμα του φλοιού παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές IC₅₀, και συνεπώς ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, από τον χυμό των καρπιδίων (Seeram et al., 2006). Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα του φλοιού σε δραστικές πολυφαινόλες. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και σε μελέτη που σύγκρινε τα εκχυλίσματα φλοιού και χυμού ροδιού με εκχυλίσματα από άλλα φυτά, στην οποία το εκχύλισμα του φλοιού ροδιού εμφάνισε την ισχυρότερη δράση (Kelawala and Ananthanrayan, 2004). Ο Tzulker και οι συνεργάτες του (2007) αναφέρουν ότι οι η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του καρπού του ροδιού σχετίζεται σημαντικά με τις ETs, με κυρίαρχη την πουνικαλλαγίνη, που περιέχονται στο φλοιό. Τα υγρά και μεθανολικά εκχυλίσματα των σπερμάτων του ροδιού δεν έχουν εμφανίσει σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Singh et al., 2002), ενώ το έλαιο που προέκυψε από υγρή απόσταξη των σπερμάτων εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με αυτήν του πράσινου τσαγιού και σημαντικά υψηλότερη από αυτήν του κόκκινου κρασιού (Schubert et al., 1999).

Συμπερασματικά, τόσο τα διαφορετικά τμήματα του καρπού του ροδιού όσο και ο χυμός που παράγεται από αυτόν, παρουσιάζουν μία ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πολυφαινόλες. Ο φλοιός του ροδιού

εμφανίζει την ισχυρότερη δράση που αποδίδεται στην ειδική περιεκτικότητά του σε δραστικές ταννίνες.

1.5.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η αντιμικροβιακή δράση των κοινών ποικιλιών ροδιού έχει μελετηθεί εκτεταμένα, σε αρκετές *in vitro* μελέτες, αποδεικνύοντας την βακτηριοκτόνο δράση τους ενάντια σε πολλούς παθογόνους και μερικές φορές σε ανθεκτικούς σε αντιβιοτικά μικροοργανισμούς (Reddy et al., 2007; McCarrell et al., 2008; Al-Zoreky, 2009; Choi et al., 2009; Gould et al., 2009).

Ο Braga και οι συνεργάτες του (2005) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ροδιού μπορούν να εμποδίσουν ή να καθυστερήσουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και, κατά συνέπεια, την παραγωγή της εντεροτοξίνης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,01 % v/v), το εκχύλισμα ροδιού καθυστέρησε την ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 % και 1 % v/v) παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης. Το μεθανολικό εκχύλισμα φλοιών του ροδιού έχει δείχθει ότι αναστέλλει την αύξηση των *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, και *Salmonella typhi* (Prashanth et al., 2001). Δράση ενάντια των στελεχών της *E. coli* O157 : H7, όσον αφορά την αναστολή παραγωγής της *verocytotoxin*, έχουν εμφανίσει το χλωροφορμικό, το αιθανολικό και το υγρό εκχύλισμα του ροδιού (Voravuthikunchai et al., 2005).

Γενικά, οι αντιμικροβιακές ουσίες έχουν διαφορετική συγκέντρωση αναστολής ή κατώτατα όρια αδρανοποίησης. Τα όρια αυτά εξαρτώνται από τους ειδικούς στόχους των αντιμικροβιακών ουσιών, που περιλαμβάνουν τα κυτταρικά τοιχώματα, την κυτταρική μεμβράνη, τα μεταλλικά ένζυμα, την πρωτεϊνική σύνθεση και το γονιδιακό σύστημα (Raybaudi-Massilia et al., 2009). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ακριβής μηχανισμός ή στόχος για τα αντιμικροβιακά τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του ροδιού, δεν είναι γνωστός ή σαφώς καθορισμένος.

1.5.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Πολλά χημικά συστατικά των φρούτων και των λαχανικών παρουσιάζουν δυνητική δραστηριότητα ως παράγοντες χημειοπραστασίας κατά του καρκίνου. Στα πλαίσια αυτά, έχουν διερευνηθεί οι πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες του ροδιού και των διαφόρων συστατικών του.

Τα διάφορα τμήματα του καρπού του ροδιού έχουν εμφανίσει ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων. Οι πολυφαινόλες χυμού ροδιού που έχει υποστεί ζύμωση έχουν εμφανίσει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Kim et al., 2002; Mehta and Lansky, 2004), ενώ ακόμα πιο ισχυρή δράση έχει εμφανίσει το έλαιο των σπερμάτων του ροδιού (Kim et al., 2002; Mehta and Lansky, 2004). Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης έχει παρατηρηθεί και μετά από προσθήκη εκχυλίσματος ροδιού σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη *in vitro* (Albrecht et al., 2004; Malic et al., 2005; Koyama et al., 2010). Ο χυμός, το EA, η πουνικαλλαγίνη και οι ολικές ταννίνες του ροδιού έχει φανεί ότι επάγουν την απόπτωση και σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου *in vitro* (Seeram et al., 2005). Οι ανθοκανιδίνες και οι υδρολυόμενες ταννίνες του ροδιού έχουν, επίσης, εμφανίσει ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης καρκινωμάτων του δέρματος, γεγονός που αποδίδεται στην ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους (Hora et al., 2003; Afaq et al., 2005). Μελέτη που σύγκρινε τη δράση των διαφορετικών τμημάτων του ροδιού, αλλά και του συνδυασμού τους έναντι του πολλαπλασιασμού, της μεταστατικής ικανότητας και της έκφρασης της φωσφολιπάσης A2 καρκινικών κυττάρων του προστάτη *in vitro*, έδειξε ότι τα διάφορα τμήματα εμφανίζουν συμπληρωματική και συνεργηστική δράση (Settheetham and Ishida, 1995).

Το ρόδι και τα συστατικά του έχουν εξεταστεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες μέσω διαφόρων μηχανισμών δράσης. Μεταξύ αυτών, έχει εξεταστεί η επίδρασή του στον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB ο οποίος συμμετέχει στην ενεργοποίηση της έκφρασης μιας ομάδας γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, το μετασχηματισμό, την αντι-απόπτωση, την αγγειογένεση και

μετάσταση των κυττάρων. Τα εκχυλίσματα ροδιού έχει δειχθεί πως αναστέλλουν τη δράση του NF-κΒ, αποτρέποντας έτσι τις διάφορες λειτουργίες του (Afaq et al., 2005). Το ένζυμο COX-2, διεγείρει τη σύνθεση των προσταγλανδινών σε φλεγμονικούς και νεοπλαστικούς ιστούς, ενώ συνδέεται συχνά με τη ρύθμιση διαφόρων μονοπατιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Το εκχύλισμα του καρπού, ο ζυμωμένος χυμός, αλλά και τα φλαβονοειδή του ελαίου των σπερμάτων έχει φανεί πως αναστέλλουν τη δράση του COX-2 (Schubert et al., 1999; Afaq et al., 2005; Adams et al., 2006). Τα διάφορα τμήματα του ροδιού έχουν εμφανίσει ισχυρή ικανότητα μείωσης της αγγειογένεσης μέσω της αρνητικής ρύθμισης διαφόρων αναπτυξιακών παραγόντων (Loch et al., 2001; Toi et al., 2003). Η δράση πρωτεϊνών και ειδικότερα μεταλλοπρωτεϊνών, που συνδέεται σε έναν μεγάλο βαθμό με την ικανότητα εισβολής των καρκινωμάτων σε γειτονικούς ιστούς, έχει φανεί πως αναστέλλεται από εκχυλίσματα ροδιού και τα επιμέρους συστατικά του (Albrecht et al., 2004; Ahmed et al., 2005; Lansky et al., 2005). Σε μελέτη που εξέταζε την ικανότητα αναστολή της in vitro εισβολής καρκινικών κυττάρων του προστάτη συστατικών του ροδιού όπως EA, καφεϊκό οξύ, λουτεολίνη και πουνικικό οξύ, φάνηκε ότι ενώ κάθε επιμέρους συστατικό εμφάνιζε σημαντική δράση, ο συνδυασμός τους είχε υπερ-προσθετική, συνεργηστική δράση (Lansky et al., 2005).

Συμπερασματικά, τα συστατικά του ροδιού έχει αποδειχθεί πως στοχεύουν σε ένα πλήθος βιολογικών μονοπατιών που ευθύνονται για την γένεση και εξάπλωση του καρκίνου, και συνεπώς εμφανίζουν δράση ενάντια σε πολλούς διαφορετικούς καρκινικούς τύπους. Παρότι ο σύγχρονος σχεδιασμός φαρμάκων επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μεμονωμένων παραγόντων με ειδικούς στόχους, το γεγονός ότι το συνολικό εκχύλισμα του ροδιού έχει αποδειχθεί περισσότερο δραστικό από ότι τα μεμονωμένα συστατικά του (φυτική συνέργεια) θέτει όρια σε αυτή την προσέγγιση. Τέλος, το εκχύλισμα του ροδιού έχει παρουσιάσει αρκετά ισχυρή αντικαρκινική δράση σε πλήθος προ-κλινικών μελετών, ώστε να κρίνεται δυνατή η εφαρμογή του και σε κλινικές μελέτες.

1.5.5 Αντιδιαβητικές ιδιότητες

Ο διαβήτης είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές νόσους στον κόσμο, της οποίας η συχνότητα αυξάνεται ραγδαία τα τελευταία έτη. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, είναι η τρίτη πιο διαδεδομένη ασθένεια μετά τις καρδιαγγειακές και ογκολογικές παθήσεις. Ένας από τους τρόπους ελέγχου του σακχαρώδη διαβήτη είναι μέσω της διατροφής και έτσι πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στις αντιδιαβητικές ιδιότητες διαφόρων φυτικών τροφών, συμπεριλαμβανομένου του ροδιού (Huang et al., 2005; Li et al., 2005; Katz et al., 2007; Parmar and Kar, 2007; Li and et al., 2008; Bagri et al., 2009).

Οι αντιδιαβητικές ιδιότητες του ροδιού έχουν αποδοθεί στην περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάζουν τη γλυκαιμία μέσω διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούν στη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα ή/και στην αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν σχετιστεί με την αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς (Scalbert et al., 2005), την αναστολή της γλυκογένεσης (Waltner-Law et al., 2002) και τη διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος (Ohno et al., 1993).

Σε σχετική *in vivo* μελέτη που έχει διενεργηθεί, οι διακετυλιωμένες ανθοκυανίνες σε δοσολογία 10 mg/kg διατροφής εμφάνισαν σημαντικές υπογλυκαιμικές επιπτώσεις όταν χρησιμοποιήθηκε μαλτόζη ως πηγή γλυκόζης, ενώ τα αποτελέσματα δεν ήταν σημαντικά στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή σακχαρόζη ή γλυκόζη (Matsui et al., 2002). Αυτό υποδηλώνει, ότι οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στην αναστολή της α-γλυκοσιδάσης στο βλεννογόνο του εντέρου. Ο Das και οι συνεργάτες του (2001) ερεύνησαν την υπογλυκαιμική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων των σπερμάτων του ροδιού σε διαβητικούς αρουραίους (έλλειψη στρεπτοζοτοκίνης). Η πρόσληψη του εκχυλίσματος (300 και 600 mg/kg, από το στόμα) προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα κατά 47% και 52%, αντίστοιχα, μετά από 12 ώρες.

Λόγω των περιορισμένων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, η κατανάλωση του

ροδιού ως παράγοντα προστασίας έναντι του διαβήτη απαιτεί περαιτέρω μελέτη σε *in vivo* συστήματα, παρότι τα διάφορα συστατικά του έχουν εμφανίσει ισχυρές αντιδιαβητικές ιδιότητες.

1.5.6 Καρδιαγγειακή υγεία

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πιο συχνή αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο. Η αθηροσκλήρωση είναι η πιο διαδεδομένη καρδιαγγειακή διαταραχή, η οποία σχετίζεται με πολλούς αλληλένδετους παράγοντες κινδύνου όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και το οξειδωτικό στρες.

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της στεφανιαίας καρδιακής νόσου είναι η δυσλιπιδαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και χαμηλά επίπεδα της υψηλής - πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL-C) (Esmailzadeh and Azadbakht, 2008). Η οξείδωση των LDL πιστεύεται ότι συντελεί στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο (Heinecke, 2006). Ο χυμός του ροδιού έχει εμφανίσει ισχυρή δράση ενάντια στην οξείδωση των LDL, συντελώντας στην αναστολή της αθηροσκλήρωσης σε ποντίκια αλλά και στον άνθρωπο (Aviram and Dornfeld, 2001; Aviram et al., 2004; Davidson et al., 2009; Fuhrman et al., 2010).

Η υψηλή αρτηριακή πίεση ή υπέρταση είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους παράγοντες κινδύνου και η μεγαλύτερη ενιαία συμβολή για την καρδιαγγειακή νόσο σε όλο τον κόσμο (López et al. 2006). Η επίδραση της κατανάλωσης ροδιού στη μείωση της αρτηριακής πίεσης έχει εξεταστεί από πλήθος μελετητών. Μετά από κατανάλωση χυμού ροδιού για διάστημα ενός έτους, η συστολική πίεση σε υπερτασικά άτομα μειώθηκε κατά 18%, γεγονός που στηρίχθηκε στην ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών του ροδιού (Aviram και οι συνεργάτες του το 2004). Σε παρόμοια μελέτη, η κατανάλωση χυμού ροδιού (50 mL), για 2 εβδομάδες, από υπερτασικά άτομα οδήγησε στην αναστολή κατά 36% της δραστηριότητας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ACE) στον ορό του αίματος και στη μείωση κατά 5% της συστολικής αρτηριακής πίεσης (Aviram and Dornfeld, 2001).

Η δράση του ροδιού ενάντια στο οξειδωτικό στρες έχει εξεταστεί εκτεταμένα στα πλαίσια της καταπολέμησης της αθηροσκλήρωσης. Θεραπείες με χυμό ροδιού έχουν οδηγήσει στην μείωση των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων που επιδεινώνουν την αθηροσκλήρωση, η δημιουργία των οποίων θεωρείται ότι σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (Aviram et al., 2000; Polagruto et al., 2003). Με την κατανάλωση χυμού ροδιού έχει, επίσης, παρατηρηθεί μείωση της ευαισθησίας του πλάσματος στη δράση των περοξειδασών (Aviram et al., 2000; Seeram et al., 2005). Πρόσληψη στερεού μεθανολικού εκχυλίσματος φλοιού ροδιού από ποντίκια έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, διατηρώντας χαμηλά τα επίπεδα της καταλάσης, της περοξειδάσης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και μειώνοντας έως και 54 % την οξείδωση των λιπιδίων στο πλάσμα (Chidambara et al., 2002). Ένας άλλος παράγοντας που εξετάζεται είναι η οξείδωση των LDL μέσω της δράσης των μακροφάγων, που θεωρείται σήμερα ως η απαρχή της αθηρογένεσης. Η κατανάλωση χυμού ροδιού έχει φανεί ότι αναστέλλει την οξειδωτική δράση των μακροφάγων μέσω διαφόρων μηχανισμών δράσης (Aviram et al., 2000; Schubert et al., 2002).

Έτσι, ο καρπός του ροδιού και ο χυμός που παράγεται από αυτόν, μέσω της αντιοξειδωτικής ικανότητας των περιεχόμενων πολυφαινόλων, έχουν εμφανίσει σημαντικές αντιαθηρογενετικές ιδιότητες που μπορεί να αποτρέψουν την εμφάνιση διαφόρων καρδιαγγειακών νόσων. Αφού ο συνδυασμός διαφορετικών ομάδων αντιοξειδωτικών προσφέρει μεγαλύτερο εύρος δέσμευσης ελευθέρων ριζών, οι κλινικές και διατροφικές μελέτες προτείνεται να κατευθύνονται προς τη χρήση συνδυασμού διαιτητικών αντιοξειδωτικών. Στα πλαίσια αυτά, το ρόδι αποτελεί έναν καρπό με ιδιαίτερο κλινικό και διαιτητικό ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης ως προς τις ειδικές βιολογικές του δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό.

1.5.7 Υγεία του δέρματος

Οι βλάβες στο δέρμα εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της φυσικής διαδικασίας της γήρανσης, ενώ η ζημιά επιδεινώνεται με τη χρόνια έκθεση του δέρματος στον ήλιο (φωτογήρανση) και τους περιβαλλοντικούς ρύπους (Lavker, 1995). Η παρατεταμένη

έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) έχει εντοπιστεί ως η κύρια αιτία των σοβαρών νόσων του ανθρώπινου δέρματος όπως η πρόωρη γήρανση του δέρματος, τα ηλιακά εγκαύματα, η ανοσοκαταστολή και ο καρκίνος του δέρματος (Widmer et al., 2006).

Οι παραπάνω βλάβες εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της απελευθέρωσης αντιδραστικών μορφών οξυγόνου που οδηγούν σε καταστροφή λειτουργικών συστατικών των κυττάρων και του DNA. Τα συστατικά του καρπού του ροδιού μπορούν να λειτουργήσουν προστατευτικά ενάντια στο οξειδωτικό στρες δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στο κύτταρο. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών του ροδιού έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών πρόσφατων μελετών (βλ. **1.5.1**).

Ο Aslam και οι συνεργάτες του (2006) αναφέρουν ότι το έλαιο των σπερμάτων του ροδιού υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, ενώ το εκχυλίσμα φλοιού ροδιού τονώνει τη σύνθεση προκολλαγόνου τύπου I και αναστέλλει την παραγωγή της μεταλλοπρωτεΐνάσης της μήτρας (MMP-1) στους δερμικούς ινοβλάστες. Επομένως, προτείνεται πως η γήρανση του δέρματος που προκαλείται από καταστροφή του συνδετικού ιστού (κολλαγόνου) του δέρματος από την MMP-1 και ακολουθείται από λέπτυνση της επιδερμίδας, μπορεί ως έναν βαθμό να αποκατασταθεί εφαρμόζοντας κατάλληλα μίγματα τέτοιων αποσταγμάτων.

Πολλές είναι οι μελέτες που εξετάζουν την φωτοπροστατευτική, αλλά και ενυδατική δράση καλλυντικών κρεμών με την προσθήκη φυτικών εκχυλισμάτων συμπεριλαμβανομένου του ροδιού (Ashawat et al., 2007, Ashawat et al., 2008; Kaur & Saraf, 2012). Σε μελέτη που σύγκρινε την αποτελεσματικότητα κρεμών με διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα, βρέθηκε ότι η προσθήκη εκχυλίσματος ροδιού προσφέρει μεγαλύτερη προστασία (Kaur & Saraf, 2012). Φυτοχημικά συστατικά όπως τριγλυκερίδια, στεροειδή, πολυφαινόλες και λιπαρά οξέα, που περιέχονται στον καρπό του ροδιού, θεωρείται πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση του κυτταροσκελετού του δέρματος, επιτρέποντας την ροή του νερού μέσα από αυτό και ελατώνοντας την εξάτμισή του. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η αποτελεσματική ενυδάτωση του δέρματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 Επιλογή και Προετοιμασία Δειγμάτων

2.1.1 Ποικιλίες που Μελετήθηκαν

Από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες ροδιάς, στο πλαίσιο διενέργειας της παρούσας διατριβής, μελετήθηκαν η ποικιλία ‘Wonderful’, που αποτελεί διεθνώς την βασική ποικιλία που καλλιεργείται για χυμοποίηση και οι ελληνικές ποικιλίες ‘Περσεφόνη’, ‘Πλούτο’ και ‘Πορφυρογέννητη’ που προέρχονται από τη βελτίωση των πληθυσμών ροδιάς της τοπωνυμίας ‘Ερμιόνης’. Τέλος, η ‘Ξινή’ είναι μια ποικιλία που απαντάται σε μικρό πληθυσμό στην Ερμιόνη της Αργολίδος.

‘Wonderful’. Προέρχεται από τη Φλόριντα των ΗΠΑ και αποτελεί την πλέον διαδεδομένη-καλλιεργούμενη διεθνώς ποικιλία, με εστίαση τις ΗΠΑ, Ευρώπη, Ισραήλ και Χιλή. Διαθέτει έναν έντονο χρωματισμό σε φλοιό και χυμό. Παρότι κατατάσσεται στην κατηγορία της γλυκόξινης ή ξινής ποικιλίας, θεωρείται ως η πλέον εύγευστη (Stover and Mercure, 2007). Έχει καρπίδια με βαθύ κόκκινο χρώμα και μεσαίας σκληρότητας σπέρματα. Είναι ιδανική για χυμοποίηση και ιδιαίτερα ανθεκτική στο σχίσιμο μετά από έντονη βροχόπτωση.

‘Περσεφόνη’. Είναι ποικιλία που καλλιεργείται στην Ερμιόνη Αργολίδος, με καρπούς μεσαίου μεγέθους και φλοιό κόκκινου χρώματος. Αποτελεί μεσοπρώιμη ποικιλία και η συγκομιδή της γίνεται από τις αρχές έως τα τέλη του Οκτωβρίου. Ο καρπός της είναι γλυκός και εύγευστος με περιεκτικότητα χυμού 63%.

‘Πλούτων’. Καλλιεργείται στην Ερμιόνη Αργολίδος και προέρχεται από την ‘Περσεφόνη’. Είναι μεγαλόκαρπη ποικιλία με καρπίδια ρόζ ή κόκκινου χρώματος και μαλακά σπέρματα. Ο ‘Πλούτωνας’ αποτελεί μία όψιμη ποικιλία της οποίας η

συγκομιδή γίνεται από 15 Νοεμβρίου έως 15 Δεκεμβρίου. Ο καρπός της είναι γλυκός και εύγευστος με περιεκτικότητα χυμού 63%.

‘Πορφυρογέννητη’. Επίσης καλλιεργείται στην Ερμιόνη Αργολίδος και έχει λάβει το όνομά της από το έντονο πορφυρό της χρώμα. Είναι υπερπρώμη ποικιλία της οποίας η συγκομιδή της πραγματοποιείται από 15 Αυγούστου έως 15 Σεπτεμβρίου. Ο καρπός της είναι γλυκός και εύγευστος με περιεκτικότητα χυμού 63%.

‘Ξινή Ερμιόνης’. Αποτελεί γλυκόξινη ποικιλία που καλλιεργείται στην Ερμιόνη Αργολίδος. Έχει μεγάλους καρπούς και έντονο χαρακτηριστικό χρώμα.

2.1.2 Δείγματα που μελετήθηκαν

Η προμήθεια των καρπών ροδιού από τις παραπάνω ποικιλίες έγινε από τα φυτώρια ροδιάς του Σταμάτη Μερτύρη της Ερμιόνης Αργολίδος. Από τη συγκομιδή του 2012 επιλέχθηκαν ρόδια των ποικιλιών ‘Wonderful’, ‘Περσεφόνη’ και ‘Ξινή’, στα οποία μελετήθηκε αφενός το βρώσιμο τμήμα του καρπού (σπέρματα, επισπέρμια) και αφετέρου το μη βρώσιμο τμήμα του (φλοιός, άσπρα τοιχώματα). Από τη συγκομιδή του 2013 μελετήθηκε το βρώσιμο τμήμα των ροδιών των ποικιλιών ‘Περσεφόνη’, ‘Ξινή’ καθώς και ‘Πλούτος’, ‘Πορφυρογέννητη’. Επιπλέον, μελετήθηκε δείγμα των υποπροϊόντων της χυμοποίησης της ποικιλίας ‘Wonderful’ (σπέρματα, φλοιοί και υπολείμματα άσπρων τοιχωμάτων) που διατέθηκαν από την εταιρεία VITOM (αφοί Χριστοδούλου). Στον **Πίνακα 2.1** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα στοιχεία των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και ο κωδικός που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε δείγμα.

Πίνακας 2.1 Δείγματα που μελετήθηκαν

Κ.Δ.	Ποικιλία	Τμήμα Καρπού	Συγκομιδή
WO1	Wonderful	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2012
WO2	Wonderful	Μη βρώσιμο (Φλοιός, άσπρα τοιχώματα)	2012
ΠΕ1	Περσεφόνη	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2012
ΠΕ2	Περσεφόνη	Μη βρώσιμο (Φλοιός, άσπρα τοιχώματα)	2012
ΞΙ1	ΞινήΕρμιόνης	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2012
ΞΙ3	Ξινή Ερμιόνης	Ολόκληρος καρπός	2012
ΠΕ1'	Περσεφόνη	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2013
ΠΛ1'	Πλούτο	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2013
ΠΟ1'	Πορφυρογέννητη	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2013
ΞΙ1'	Ξινή Ερμιόνης	Βρώσιμο (σπέρματα, επισπέρμια)	2013
ΥΠ	Wonderful	Υποπροϊόντα χυμοποίησης (φλοιός, τοιχώματα, σπέρματα)	2013

2.1.3 Προετοιμασία Δειγμάτων

Μετά τη συλλογή των καρπών του ροδιού ακολούθησε ο διαχωρισμός του βρώσιμου τμήματός τους από τον φλοιό και τα εσωτερικά τοιχώματα. Στη συνέχεια, τα δύο τμήματα κονιορτοποιήθηκαν ξεχωριστά, λυοφιλοποιήθηκαν και το στερεό κολλώδες υπόλειμμα που προέκυψε ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί το βάρος επί ξηρού. Τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης της ποικιλίας 'Wonderful' ξηράθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα, στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν για να προσδιοριστεί το επί ξηρού βάρος τους. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4° C απουσία φωτός μέχρι την επεξεργασία τους.

2.2 Παραλαβή – Απομόνωση Πολυφαινολών

2.2.1 Εισαγωγή

Τα φαινολικά παράγωγα κατανέμονται στα φυτικά κύτταρα ανάλογα με τη δομή τους. Έτσι, οι χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτές πολυφαινόλες βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων, ενώ τα αδιάλυτα φαινολικά παράγωγα, όπως οι πολυμερείς λιγνίνες, αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τέλος, τα φαινολικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ, βρίσκονται συνήθως ως μη υδατοδιαλυτοί εστέρες, όπως οι πηκτίνες και οι αραβινοξυλάνες και παρεμβάλλονται ως ενδιάμεσα μόρια στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων με τη μορφή διμερών όπως το δεϋδροφερουλικό και το τρουξιλικό οξύ (Naczka and Shahidi, 2004).

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών παραγώγων απαιτεί την απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα και τους ιστούς των φυτών. Η συνήθης διαδικασία που ακολουθείται αναφέρεται στη χρήση ενός ομογενοποιητή για τη ρήξη των κυτταρικών ιστών και τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Στη συνέχεια, με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη τα φαινολικά παράγωγα παραλαμβάνονται μέσω διάχυσης (Santos-Buelga, 2003).

Η απομόνωση των πολυφαινολών από το φυτικό υλικό επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων, όπως η χημική σύσταση, η εφαρμοζόμενη διαδικασία εκχύλισης, οι συνθήκες και ο χρόνος αποθήκευσης, το μέγεθος των ιστών και η παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών. Συνήθως, τα εκχυλίσματα εκτός των πολυφαινολών περιέχουν και ανεπιθύμητα μόρια, όπως λίπη, κηροί, τερπένια και χλωροφύλλες, που είναι επίσης διαλυτά στο χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών. Για την απομάκρυνση των τελευταίων συχνά απαιτούνται επιπλέον διαδικασίες, όπως η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) ή η κλασματοποίηση με βάση την πολικότητα των ουσιών (Robbins, 2003). Η διαλυτότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από την πολικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, τον βαθμό πολυμερισμού καθώς και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια, όπως πχ οι πρωτεΐνες, προς σχηματισμό αδιάλυτων προϊόντων. Για τους παραπάνω λόγους δεν υπάρχει μια ενιαία διαδικασία παραλαβής όλων των φαινολικών παραγώγων ή μιας

μόνο κατηγορίας φαινολών από ένα φυτικό δείγμα. Η εκχύλιση αποτελεί την πλέον συνηθισμένη τεχνική που εφαρμόζεται για την παραλαβή των φαινολικών παραγώγων από τα φυτά (Naczk and Shahidi, 2004).

2.2.2 Εκχύλιση

Η προκατεργασία του δείγματος πριν από την εκχύλιση επηρεάζει σημαντικά τον βαθμό παραλαβής των συστατικών του. Για δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό συνιστάται η κατάψυξη τους πριν από τη διαδικασία της εκχύλισης, προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι ενζυμικές λειτουργίες και να προστατευθούν οι ασταθείς πολυφαινόλες. Η κατάψυξη των δειγμάτων διευκολύνει την εκχύλιση των πολυφαινολών, καθώς οι κρύσταλλοι του νερού που σχηματίζονται καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα ευνοώντας την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου υλικού. Τέλος, μια άλλη πρακτική που λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αφήνει ανέπαφες τις πολυφαινόλες είναι η λυοφυλίωση.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την εκχύλιση των πολυφαινολών είναι η μεθανόλη, μίγματα μεθανόλης-νερού και σπανιότερα αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας ή και μίγματά τους. Οι συνηθέστεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης των πολυφαινολών είναι:

- **Το pH του εκχυλιστικού μέσου.** Επιδρά στη διαλυτότητα των ευδιάλυτων συστατικών και επηρεάζει τη διαλυτοποίηση των υδρολυόμενων φαινολικών παραγώγων. Η χρησιμοποίηση όξινων συνθηκών στην εκχύλιση αποσκοπεί στην υδρόλυση των γλυκοζιτών των φαινολών, ενώ η εκχύλιση σε αλκαλικό περιβάλλον αποσκοπεί στην υδρόλυση των φαινολικών εστέρων και την παράλληλη απελευθέρωση των πολυφαινολών που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα (Naczk and Shahidi, 2004).
- **Η θερμοκρασία.** Είναι γενικά αποδεκτό ότι η εκχύλιση σε υψηλές

θερμοκρασίες εξασφαλίζει καλύτερες αποδόσεις. Όμως επειδή οι πολυφαινόλες είναι θερμοευαίσθητα μόρια που διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως η θερμοκρασία της εκχύλισης δεν πρέπει να ξεπερνά τους 25-30° C.

- **Ο αριθμός των διαδοχικών εκχυλίσεων και ο όγκος του διαλύτη.** Η απόδοση μιας εκχύλισης αυξάνει με τον αριθμό των διαδοχικών εκχυλίσεων. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι για συγκεκριμένο όγκο διαλύτη είναι προτιμότερη η πραγματοποίηση πολλαπλών εκχυλίσεων, χρησιμοποιώντας μικρότερους όγκους διαλύτη, σε σύγκριση με μία μόνο εκχύλιση που χρησιμοποιεί το σύνολο του διαλύτη. Γενικά, η ποσοτική παραλαβή των φαινολικών παραγώγων απαιτεί 3-5 διαδοχικές εκχυλίσεις.

Η εκχύλιση των πολυφαινολών υποβοηθείται συχνά με τη χρήση υπερήχων η οποία εξασφαλίζει μεγαλύτερες αποδόσεις και μικρότερο συνολικό χρόνο εκχύλισης. Η διαδικασία αυτή είναι αποδοτικότερη σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές, οι οποίες στηρίζονται στην απλή διάχυση των συστατικών, αφού η επιφάνεια επαφής μεταξύ της υγρής και της στερεής φάσης αυξάνει σημαντικά λόγω της διάσπασης των σωματιδίων που συνεπάγεται η χρήση τους. Επίσης, η χρήση των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη καλύτερων αποδόσεων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, γεγονός πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της σταθερότητας των πολυφαινολών (Vinatoru et al., 1997). Η υψηλή ένταση και η παλμική εκπομπή των μικροκυμάτων στην υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση περικάρπιων ροδιού έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε αντιοξειδωτικά συστατικά (Pan et al., 2012).

2.2.3 Αναλώσιμα – Συσκευές

Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια και διαλύτες:

- Αιθανόλη (EtOH)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Απιονισμένο ύδωρ
- HCl (1 N)
- Εξάνιο
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl
- NaSO₄

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις των δειγμάτων ήταν αναλυτικής καθαρότητας και η προμήθειά τους έγινε από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η συσκευή του λουτρού υπερήχων ήταν της εταιρείας Bandelin, μοντέλο Sonorex RK100SH. Η ψηφιακή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του pH των δειγμάτων ήταν της εταιρείας HACH, μοντέλο session 3. Για την διήθηση των εκχυλισμάτων πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα σύριγγος PVDF 0,45 μm.

2.2.4 Πειραματική Διαδικασία

Δείγμα 50 g τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εκχυλίστηκε με 200 mL μίγματος MeOH-H₂O-HCl (90:9,5:0,5) σε λουτρό υπερήχων (**Εικόνα 2.1**), λαμβάνοντας μέριμνα ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 25-30° C. Έκαστο δείγμα εκχυλίστηκε διαδοχικά τρεις φορές, για 10 min τη φορά. Την κάθε εκχύλιση ακολούθησε διήθηση σε χωνί Buchner (**Εικόνα 2.2**) με χάρτινο ηθμό. Το συνολικό συμπυκνώθηκε σε φυγοκεντρικό εξατμιστήρα υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35° C. Το συμπύκνωμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης, φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm για 15 - 30 min, για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα.



Εικόνα 2.1 Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων



Εικόνα 2.2 Διήθηση σε χωνί Buchner

Το μεθανολικό διάλυμα που προέκυψε από την παραπάνω περιγραφείσα διαδικασία εκχυλίστηκε σε χοάνη με εξάνιο τρεις διαδοχικές φορές, για να απομακρυνθούν τα λίπη και οι χλωροφύλλες. Η μεθανολική φάση που διαχωρίστηκε εξατμίστηκε υπό κενό χρησιμοποιώντας την περιγραφείσα προηγουμένως πειραματική διαδικασία-συσκευή. Στο υπόλειμμα της εξάτμισης προστέθηκε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και εκχυλίστηκε τρεις φορές διαδοχικά με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές στοιβάδες ενώθηκαν και προστέθηκε NaSO_4 για να προσροφήσει τα υπολείμματα υγρασίας. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση με χωνί Buchner και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C παράγοντας ως τελικό προϊόν εκχύλισης ένα στερεό υπόλειμμα. Αυτό ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί η τελική απόδοση και αποθηκεύτηκε στους -25°C . Πριν την ανάλυση, τα στερεά αυτά δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και διηθήθηκαν από φίλτρα σύριγγας PVDF $0,45 \mu\text{m}$ και αναλύθηκαν με HPLC.

Τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης της ποικιλίας 'Wonderful' που μελετήθηκαν εκχυλίστηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους. Η πρώτη είναι ταυτόσημη με των υπόλοιπων δειγμάτων και περιγράφηκε παραπάνω, ενώ στη δεύτερη

χρησιμοποιήθηκαν λιγότερο τοξικοί διαλύτες, για να είναι δυνατή η εφαρμογή του εκχυλίσματος σε καλλυντική κρέμα. Συγκεκριμένα, στη δεύτερη περίπτωση τα 50 g δείγματος εκχυλίστηκαν διαδοχικά τρεις φορές με 200 mL μίγματος EtOH / H₂O (85:15). Το συνολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού σε θερμοκρασία μικρότερη των 35° C. Το συμπύκνωμα που προέκυψε ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί η τελική απόδοση, αποθηκεύτηκε στους -25° C και θα αναφέρεται παρακάτω με τον κωδικό 'ΑΠEtOH'.

Όλες οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν απουσία φωτός.

2.3 Παρασκευή Καλλυντικής Κρέμας με Εκχύλισμα Ροδιού

2.3.1 Παρασκευή Κρέμας Βάσης

Η παρασκευή της καλλυντικής κρέμας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Έρευνας και Ανάπτυξης του ομίλου ΚΟΡΡΕΣ. Για την παρασκευή 500 g κρέμας βάσης χρησιμοποιήθηκαν:

Υδατική φάση

Απιονισμένο ύδωρ	345,0 g
Γλυκερόλη	25,0 g
Dissolvine GL-38 (0,1%)	0,5 g

Λιπαρή Φάση

Cetyl Alcohol (γαλακτοματοποιητής)	4,0 g
Xalifin – IS	62,5 g
SF 96/100 (dimethylpolysiloxane)	2,25 g
Sabowax FL65 – K (γαλακτοματοποιητής)	12,5 g
Phenonip	5,0 g
Syntesqual	18,0 g

rBHT	0,25 g
Sweet almond oil	25,0 g

Αφού παρασκευάστηκαν οι δύο φάσεις, θερμάνθηκαν για λίγα λεπτά η υδατική φάση στους 70° C και η λιπαρή στους 75° C. Στη συνέχεια, οι δυο φάσεις ομογενοποιήθηκαν αρχικά σε ομογενοποιητή για 10 min στις 2.800 στροφές / min και μετά υπό ψύξη με την τοποθέτηση της φιάλης σε κρύο νερό. Τέλος, το παρασκεύασμα-κρέμα τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοχείο και αποθηκεύτηκε σε σκιερό μέρος.

2.3.2 Προσθήκη Εκχυλίσματος

Στην κρέμα βάσης προστέθηκε το αιθανολικό εκχύλισμα των υποπροϊόντων της χυμοποίησης της ποικιλίας 'Wonderful'. Συγκεκριμένα, σε 500 g κρέμας βάσης προστέθηκαν 15 g εκχυλίσματος (3%), αραιωμένο με νερό σε συγκέντρωση 1/10 (w/w). Λόγω αδυναμίας της εξάτμισης του συνόλου του νερού που περιείχε το εκχυλιστικό μέσο σε χαμηλή θερμοκρασία, υπολογίστηκε το ποσοστό της υγρασίας του δείγματος με χρήση της συσκευής Karl Fisher, ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του. Μαζί με το αραιωμένο εκχύλισμα, προστέθηκαν στην κρέμα 1,5 g Germal (συντηρητικό) και τέλος ακολούθησαν ομογενοποίηση και ψύξη.

2.3.3 Ρύθμιση pH και Έλεγχος Σταθερότητας

Το pH της κρέμας ρυθμίστηκε σε 5-5,5. Για τον έλεγχο της σταθερότητας της κρέμας πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 10 min στα 5000 rpm και για άλλα 10 min στα 7400 rpm. Στη συνέχεια, ποσότητα 200 g της κρέμας παρέμεινε για διάστημα ενός μήνα σε ελεγχόμενες συνθήκες, στους 40° C. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αποσταθεροποίηση της κρέμας.

2.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

2.4.1 Εισαγωγή

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί σήμερα την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών, προσφέροντας ακρίβεια, ευκολία και εξοικονόμηση χρόνου, αφού η ανάλυση είναι αρκετά σύντομη και δεν προαπαιτείται ιδιαίτερη κατεργασία των δειγμάτων.

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση αποτελείται από ένα στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή. Στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2004). Ένας Υγρός Χρωματογράφος Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελείται συνήθως από τα παρακάτω τμήματα:

- **Αντλία.** Η αντλία είναι η καρδιά ενός συστήματος HPLC. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλυση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλυση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής, η χωρητικότητά της κυμαίνεται από 1-500μL. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη.
- **Στήλη.** Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3

mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100 cm. Η αποτελεσματικότητα μίας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της διαμέτρου των κόκκων του πληρωτικού υλικού. Επίσης, σημαντικός παράγοντας είναι η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Μια λεπτή στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και λιγότερο διαλύτη, επιτρέποντας εξοικονόμηση διαλύτη έως 80 %. Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι: α) πορώδες, με βάση τη πυριτική γη (silica), β) μη πορώδες (pellicular), γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστορόλιο. Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και κινητής φάσης διακρίνεται σε: α) **κανονικής φάσης** (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη και β) **ανεστραμμένης φάσης** (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

- **Ανιχνευτής.** Ο πλέον συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή για την HPLC είναι ένα Φωτόμετρο UV-Vis. Οι ουσίες που μπορούν να αναλυθούν με αυτόν πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, δηλαδή μεταξύ 190-600nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή αυτού: 1) ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος, 2) ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μήκων κύματος και 3) ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Ο τελευταίος βοηθά στη διαπίστωση της «καθαρότητας» μιας χρωματογραφικής κορυφής (εάν δηλαδή αυτή οφείλεται σε μια μόνο ουσία), αφού μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες από μία πλήρη σάρωση μιας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.
- **Καταγραφέας ή Ηλεκτρονικός Υπολογιστής.** Ο καταγραφέας καταγράφει το σήμα του ανιχνευτή με τη μορφή χρωματογραφήματος. Σήμερα, η καταγραφή γίνεται μέσω Η/Υ.

2.4.2 Επιλογή Μεθόδου

Για το διαχωρισμό μίγματος φαινολικών ουσιών από φυτικούς ιστούς χρησιμοποιείται κυρίως η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), καθώς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την αντίστοιχη κανονικής φάσης. Η χρησιμότητα της RP-HPLC έχει γίνει φανερή στο διαχωρισμό ποικίλων φαινολικών, αλλά κυρίως των ανθοκυανών οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολικές και ο διαχωρισμός τους δεν είναι δυνατός με χρωματογραφία κανονικής φάσης (Robards and Antonovich, 1997).

Στην RP-HPLC οι περισσότερες πολικές ουσίες εκκλύονται πρώτες. Επομένως, οι γλυκοζίτες με τις περισσότερες μονάδες σακχάρων εκκλύονται πρώτες, ακολουθούν οι μονογλυκοζίτες και τέλος τα άγλυκα συστατικά. Επίσης, η σειρά έκλυσης των φλαβονοειδών είναι φλαβονόνες<φλαβονόλες<φλαβόνες. Τέλος, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα ως περισσότερο πολικά από τα υδροξυκιναμωμικά οξέα εκκλύονται πριν από αυτά.

Η συνηθέστερη μέθοδος ανίχνευσης των φαινολικών στην HPLC βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησής τους στο UV-Vis σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Για παράδειγμα, οι ανθοκυανίνες απορροφούν στα 515-520 nm και οι φλαβανόλες στα 280 nm, ενώ η αναγνώρισή τους γίνεται με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος απορρόφησής τους με πρότυπα δείγματα.

2.4.3 Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Hewlet Packard HP1100 με αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P4000), απαερωτή, ανιχνευτή UV-Vis και θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας. Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο Chemstation. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Macherey-Nagel τύπου Nucleosil C₁₈ με 250 mm x 4,6 mm εσωτερική διάμετρο και διάμετρο σωματιδίων 5 μm. Επίσης χρησιμοποιήθηκε προστήλη με τα ίδια χαρακτηριστικά.

Η παραγωγή υπερκάθαρου ύδατος για την HPLC έγινε με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus, ενώ η διήθηση των διαλυτών πριν από τη χρήση τους για την παρασκευή της κινητής φάσης έγινε με σύστημα διήθησης υπό κενό σε συσκευή Millipore. Η ψηφιακή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH της κινητής φάσης ήταν της εταιρείας HACH, μοντέλο Session 3.

2.4.4 Αναλώσιμα

Οι πρότυπες φαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν για τους προσδιορισμούς αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich:

- ✓ γαλλικό οξύ
- ✓ γαλλοκατεχίνη
- ✓ ελλαγικό οξύ
- ✓ επικατεχίνη
- ✓ καμφερόλη
- ✓ καφεϊκό οξύ
- ✓ (+)-κατεχίνη
- ✓ κερκετίνη
- ✓ *trans*-κινναμικό οξύ
- ✓ π-κουμαρικό οξύ
- ✓ πολυδατίνη
- ✓ πουνικαλλαγίνη
- ✓ προκυανιδίνη B2
- ✓ ρουτίνη
- ✓ *trans*-ρεσβερατρόλη
- ✓ συριγγικό οξύ
- ✓ φερουλικό οξύ
- ✓ χλωρογενικό οξύ

Για τη διαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων και την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- Μεθανόλη (MeOH)
- Ακετονιτρίλιο (AcCN)
- Οξικό οξύ (CH_3COOH)
- Οξικό Νάτριο (CH_3COONa)
- Υπερκάθαρο ύδωρ

Οι διαλύτες αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich σε βαθμό καθαρότητας HPLC. Το υπερκάθαρο ύδωρ παρήχθη με συσκευή Milli-Q Plus.

2.4.5 Προετοιμασία Διαλυμάτων

2.4.5.1 Παρασκευή Κινητής Φάσης

Διαλύτης A: Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COONa 20 mM με pH 2,7.

Το διάλυμα παρασκευάστηκε με διάλυση 0,164 g CH_3COONa σε 970 mL ύδατος καθαρότητας nanopure. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στα 2,7 με προσθήκη CH_3COOH (περίπου 30 mL).

Διαλύτης B: AcCN HPLC.

Πριν από τη χρήση του στη χρωματογραφική ανάλυση, ο διαλύτης διηθήθηκε υπό κενό με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus.

2.4.5.2 Διαλύματα Παρακαταθήκης Φαινολών

Για κάθε μία από τις πρότυπες ενώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) σε μεθανόλη συγκέντρωσης 1000 ppm, τα οποία αποθηκεύτηκαν

στους -25° C απουσία φωτός. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις πέντε πολυπρότυπα διαλύματα φαινολών σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5-40 mg/L (ppm) προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2 Πρότυπα διαλύματα φαινολών

Πρότυπη Ένωση	1° πρότυπο συγκέντρωση (mg/L)	2° πρότυπο συγκέντρωση (mg/L)	3° πρότυπο συγκέντρωση (mg/L)	4° πρότυπο συγκέντρωση (mg/L)	5° πρότυπο συγκέντρωση (mg/L)
γαλλικό οξύ	40	20	10	5	2,5
γαλλοκατεχίνη	40	20	10	5	2,5
ελλαγικό οξύ	40	20	10	5	2,5
επικατεχίνη	40	20	10	5	2,5
καμφερόλη	40	20	10	5	2,5
(+)-κατεχίνη	40	20	10	5	2,5
καφεϊκό οξύ	40	20	10	5	2,5
κερκετίνη	40	20	10	5	2,5
<i>trans</i> -κινναμικό οξύ	40	20	10	5	2,5
<i>π</i> -κουμαρικό οξύ	40	20	10	5	2,5
πολυδατινη	40	20	10	5	2,5
πουνικαλαγίνη	40	20	10	5	2,5
προκυανιδίνη B2	40	20	10	5	2,5
ρουτίνη	40	20	10	5	2,5
<i>trans</i> - ρεσβερατρόλη	40	20	10	5	2,5
συριγγικό οξύ	40	20	10	5	2,5
φερουλικό οξύ	40	20	10	5	2,5
χλωρογενικό οξύ	40	20	10	5	2,5

2.4.6 Συνθήκες Ανάλυσης

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα των

δειγμάτων ροδιών της διατριβής πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλυση που διήρκεσε 90 min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των Tsao and Yang (2003) με ορισμένες τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των μορίων (Anastasiadi et al., 2010). Το αναλυτικό χρονοδιάγραμμα της ανάλυσης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.3**.

Πίνακας 2.3 Χρονοδιάγραμμα ανάλυσης HPLC, όπου **Διαλύτης A:** Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa, **Διαλύτης B:** AcCN.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ροή mL/min
0	95	5	1,0
45	85	15	1,0
60	65	35	1,0
65	50	50	1,0
70	0	100	1,0

Πριν από την ανάλυση προηγήθηκε έκπλυση των καναλιών του οργάνου με διαλύτη, με ροή 5 mL/min, για να απομακρυνθούν από το σύστημα υπολείμματα προηγούμενων διαλυτών και φυσαλίδων. Ακολούθησε η εξισορρόπηση της στήλης με τη διέλευση των διαλυτών στην αρχική τους αναλογία (95% A και 5% B) για τουλάχιστον 60 min. Ο όγκος του δείγματος που σε κάθε ανάλυση τροφοδότησε τη στήλη, μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, ήταν 20 μL, ενώ η ροή του διαλύτη ήταν σε όλες τις εργασίες πάντοτε σταθερή σε 1,0 mL/min. Η απορρόφηση των επιμέρους συστατικών παρακολούθηθηκε σε τέσσερα μήκη κύματος, 280 nm, 320 nm και 360 nm.

Ο καθαρός χρόνος ανάλυσης έκαστου δείγματος ήταν 70 min. Μετά το πέρας της ανάλυσης μεσολάβησε ένα διάστημα 25 min κατά το οποίο αφέθηκε να διέλθει από τη στήλη αρχικά AcCN (100% για 5 min) και στη συνέχεια προστέθηκε βαθμιδωτά H₂O για να φτάσει στο τέλος το 100% για 5 min. Έτσι, έγινε δυνατό να απομακρυνθούν όλες οι εναπομείνουσες ουσίες. Τέλος, επανήλθε η αρχική αναλογία

διαλυτών (95% A και 5% B) για 15 min προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση της στήλης πριν από την επόμενη ανάλυση. Η διοχέτευση του H₂O αποσκοπεί, εκτός από τον καθαρισμό της στήλης, και στην απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, αφού η απότομη αλλαγή από 100% AcCN σε 95% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, πιθανότατα θα προκαλούσε την κατακράτηση αλάτων μέσα στη στήλη με αρνητικές συνέπειες για τη στήλη και την ποιότητα της ανάλυσης. Μετά το πέρας των αναλύσεων ακολούθησε πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με H₂O / AcCN και έκπλυση των καναλιών των διαλυτών με H₂O για 10 min τουλάχιστον για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα οξέων και αλάτων.

2.4.7 Προσδιορισμός Πολυφαινολών

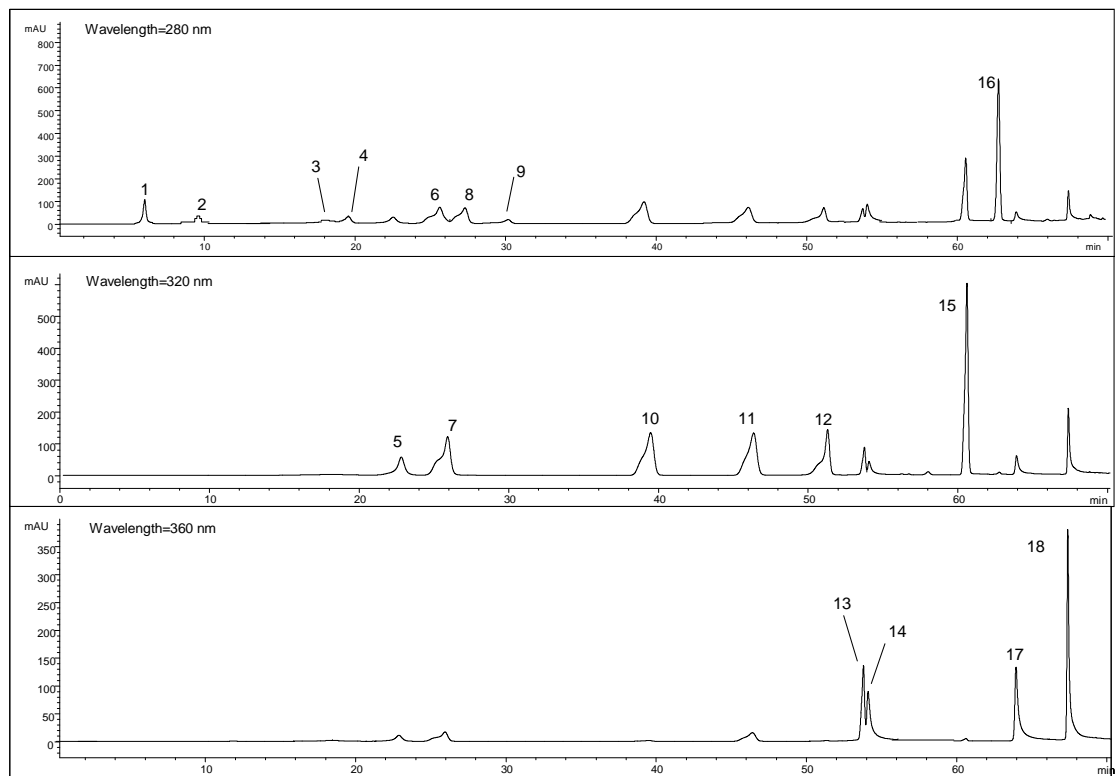
Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησής τους (Retention time) και του φάσματος απορρόφησης των πρότυπων ουσιών. Οι φαινόλες ανάλογα με τη δομή τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis, με αποτέλεσμα η ανάλυσή τους να απαιτεί τη χρήση διαφορετικών μηκών κύματος. Συγκεκριμένα, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι φλαβονόλες και οι προκυανιδίνες απορροφούν στα 280 nm, τα στιλβένια, τα υδρόξυκιναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους, στα 320 nm, ενώ οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους στα 360 nm. Στον **Πίνακα 2.4** παρουσιάζονται τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στις πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων ροδιού κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των πρότυπων ουσιών για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις, μέσω των οποίων προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα δείγματα (**Πίνακας 2.4**). Στην **Εικόνα 2.3** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των πρότυπων ουσιών στα τρία μήκη κύματος (280nm, 320nm και 360nm).

Πίνακας 2.4 Στοιχεία της μεθόδου ανάλυσης φαινολικών ουσιών με HPLC

Πρότυπη Ένωση	RT*	λ (nm)	Εύρος Συγκεντρώσεων (mg/L)	Εξίσωση Καμπύλης	R ²
γαλλικό οξύ	6,04	280	2,5 - 40	y=40,978x-27,885	0,9974
γαλλοκατεχίνη	9,61	280	2,5 - 40	y=2,465x+5,4577	0,9836
ελλαγικό οξύ	54,10	360	2,5 - 40	y=25,589x-51,086	0,9932
επικατεχίνη	30,17	280	2,5 - 40	y=16,092x+8,8885	0,9972
καμφερόλη	67,39	360	2,5 - 40	y=109,43x-152,27	0,9949
(+)-κατεχίνη	19,56	280	2,5 - 40	y=10,354x+15,706	0,9925
καφεϊκό οξύ	25,92	320	2,5 - 40	y=136,22x+98,261	0,9987
κερκετίνη	63,95	360	2,5 - 40	y=65,718x-105,17	0,9934
<i>trans</i> -κινναμικό οξύ	62,74	280	2,5 - 40	y=212,65x+123,14	0,9985
π-κουμαρικό οξύ	39,48	320	2,5 - 40	y=149,88x+63,449	0,9993
πολυδατινη	51,31	320	2,5 - 40	y=115,2x+48,818	0,9995
πουνικαλαγίνη	18,00	280	2,5 - 40	y=7,2709x-69822	0,9976
προκυανιδίνη B2	25,60	280	2,5 - 40	y=76,838x-74,817	0,9953
ρουτίνη	53,79	360	2,5 - 40	y=36,758x+6,1837	0,9957
<i>trans</i> - ρεσβερατρόλη	60,61	320	2,5 - 40	y=224,45x+40,542	0,9992
συριγγικό οξύ	27,32	280	2,5 - 40	y=65,746x+20,498	0,9983
φερουλικό οξύ	46,36	320	2,5 - 40	y=148,23x+20,057	0,9991
χλωρογενικό οξύ	22,56	320	2,5 - 40	y=52,134x+49,262	0,9979

* Χρόνος Κατακράτησης (Retention time) της ουσίας



Εικόνα 2.3 Χρωματογραφήματα πρότυπων ουσιών στα 280nm, 320nm και 360nm. 1: γαλλικό οξύ, 2: γαλλοκατεχίνη, 3: πουνικαλλαγίνη, 4: (+)-κατεχίνη, 5: χλωρογενικό οξύ, 6: προκυανιδίνη B2, 7: καφεϊκό οξύ, 8: συριγγικό οξύ, 9: επικατεχίνη, 10: π-κουμαρικό οξύ, 11: φερουλικό οξύ, 12: πολυδατίνη, 13: ρουτίνη, 14: ελλαγικό οξύ, 15: trans-ρεσβερατρόλη, 16: trans-κινναμικό οξύ, 17: κερκετίνη, 18: καμφερόλη.

2.5 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu

2.5.1 Αρχή της Μεθόδου

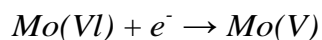
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C), για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, είναι μια φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών. Εκμεταλλεύεται δε το γεγονός ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης, σχηματίζοντας ένα έγχρωμο παράγωγο. Στη συνέχεια, οι Singleton και Rossi (1965) βελτίωσαν τη μέθοδο και τη χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών στο κρασί. Η μέθοδος έγινε πολύ δημοφιλής και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου διαφόρων φυσικών προϊόντων.

Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος F-C χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών, στην πραγματικότητα υπολογίζει ταυτόχρονα και την αναγωγική ικανότητα του δείγματος, αφού η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μια οξειδοαναγωγή. Ως εκ τούτου η παραπάνω μέθοδος έχει γίνει ευρέως αποδεκτή και ως μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ανήκει στην κατηγορία της μεταφοράς ηλεκτρονίων, γι' αυτό δεν πρέπει να ξαφνιάζει το γεγονός ότι το «πολυφαινολικό προφίλ» που προσδιορίζεται με αυτή τη μέθοδο παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα η μέθοδος FRAP.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu παρασκευάζεται με ανάμιξη $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, HCl , $85\% \text{H}_3\text{PO}_4$ σε νερό και βράσιμο για 10 h. Κατόπιν προστίθεται $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, το οποίο δίνει στο αντιδραστήριο ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα.

Η ακριβής χημική σύσταση του αντιδραστηρίου δεν είναι γνωστή, η αντίδραση όμως που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου.



Προφανώς η παραπάνω αντίδραση δεν είναι επιλεκτική μόνο για τις φαινόλες, αφού μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την παρουσία και άλλων αναγωγικών παραγόντων (βιταμίνη C, Cu(I), κ.τ.λ.). Οι φαινόλες αντιδρούν με το αντιδραστήριο F-C μόνο σε βασικό περιβάλλον. Έτσι, πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου F-C το pH του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό ($pH \approx 10$) με την προσθήκη διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3). Η απόσπαση ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαινολικού ανιόντος που ανάγει το αντιδραστήριο F-C σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο χρώματος βαθέως κυανού, το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 745-750 nm.

Η πειραματική διαδικασία που αναπτύχθηκε από τους Singleton και Rossi (1965) είναι η εξής: 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, αναμειγνύεται με 60 mL ύδατος και 5mL αντιδραστηρίου F-C. Στη συνέχεια προστίθενται 15 mL διαλύματος Na_2CO_3 και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 mL με προσθήκη ύδατος. Μετά από επώαση για 2 h απουσία φωτός, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ ως πρότυπο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος F-C είναι απλή, επαναλήψιμη και εύκολη. Έτσι έχει εξελιχθεί σε μια μέθοδο ρουτίνας τόσο για την μέτρηση των ολικών φαινολικών, όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

2.5.2 Αναλώσιμα - Συσκευές

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)

- Κορεσμένο διάλυμα Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3) 20% w/v
- Αιθανόλη (EtOH)
- Γαλλικό οξύ
- Απιονισμένο ύδωρ
- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL

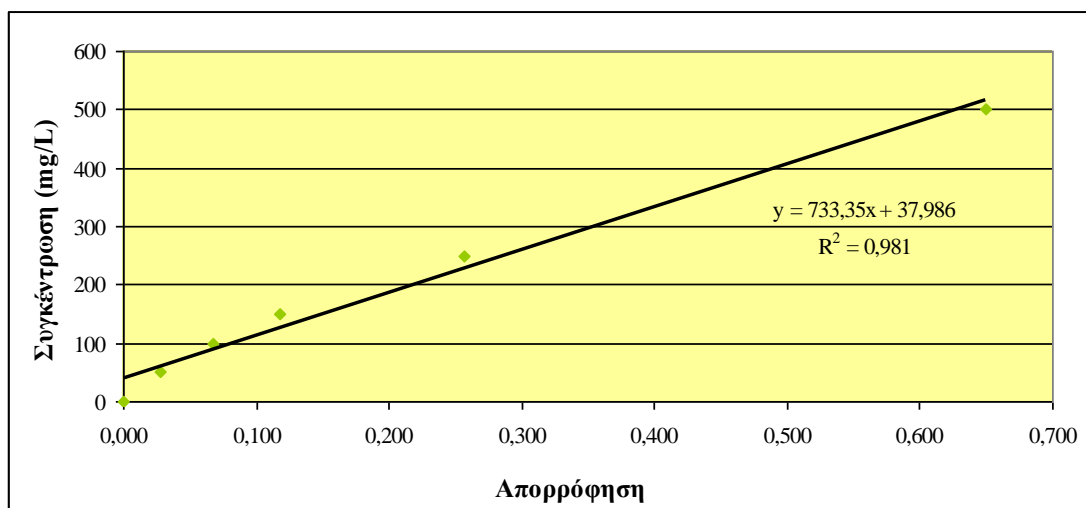
Οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας και η προμήθειά τους, μαζί με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το γαλλικό οξύ, έγινε από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η απορρόφηση μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης Hitachi U-1500.

2.5.3 Πειραματική Διαδικασία

Τα στερεά δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν με μίγμα H_2O / EtOH (85:15) σε συγκέντρωση 1 mg/mL. Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) του γαλλικού οξέος, ζυγίστηκαν 0,125 g πρότυπης ουσίας σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL που στη συνέχεια συμπληρώθηκε με μίγμα H_2O / EtOH (90:10). Από το διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις πέντε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 50-500 mg/L προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς (**Γράφημα 2.1**). Οι αραιώσεις έγιναν προκειμένου η απορρόφηση να είναι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου και παράλληλα να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert.

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος (ή προτύπου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6 mL απεσταγμένου ύδατος και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (2N). Ακολούθησε ανάδευση και μετά από 3 min προστέθηκαν 1,5 mL διαλύματος Na_2CO_3 . Μετά προστέθηκε ύδωρ στις φιάλες για να επιτευχθεί όγκος 10 mL. Όλες οι ογκομετρικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Η απορρόφηση των δειγμάτων καταγράφηκε στα 725 nm και η συγκέντρωση των

ολικών φαινολικών προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.



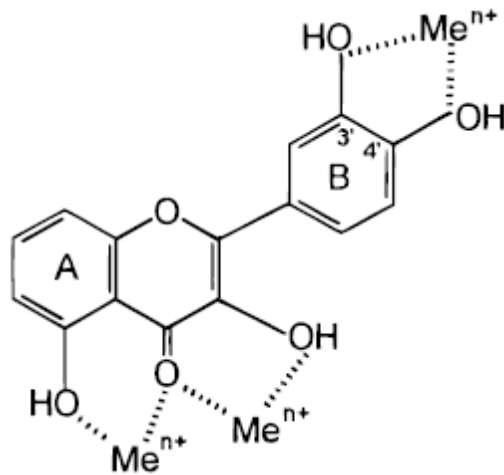
Γράφημα 2.1 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με εξίσωση $y = 733,35x + 37,986$ και $R^2 = 0,981$

2.6 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών

2.6.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδοι προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών που εμπεριέχονται σε ένα φυτικό εκχύλισμα περιλαμβάνουν πρωτόκολλα με αντιδράσεις συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών με μέταλλα, οι οποίες δίνουν έγχρωμα προϊόντα που μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Gunes et al. 2002; Naczki and Shahidi, 2004; Malešev and Kuntić, 2007). Όμως η εκλεκτικότητα των χρωματομετρικών αυτών προσδιορισμών στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα συχνά αμφισβητείται (Malešev and Kuntić, 2007).

Σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχόλες του δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξυ 4-καρβονυλο ομάδες των δακτυλίων A και C (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1 Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών - μετάλλων

Σε δείγματα που εμπεριέχουν φλαβονοειδή και ενώσεις με παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά (πχ κατεχόλες), πάντοτε υπάρχει ο κίνδυνος λανθασμένων εκτιμήσεων (συμπροσδιορισμός). Με βάση τη βιβλιογραφία, η εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών ενός φυτικού υλικού πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο μεθόδων συμπλοκοποίησης μετάλλων-φλαβονοειδών (Naczka and Shahidi, 2006). Η διαφοροποίηση των μεθόδων έγκειται στην απουσία ή παρουσία του Νιτρώδους Νατρίου (NaNO_2) και την παρουσία (ή απουσία) οξέος. Στην παρούσα διατριβή, ο προσδιορισμός της παρουσίας των ολικών φλαβονοειδών έγινε παρουσία NaNO_2 , με κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου των Gunes et al. (2002).

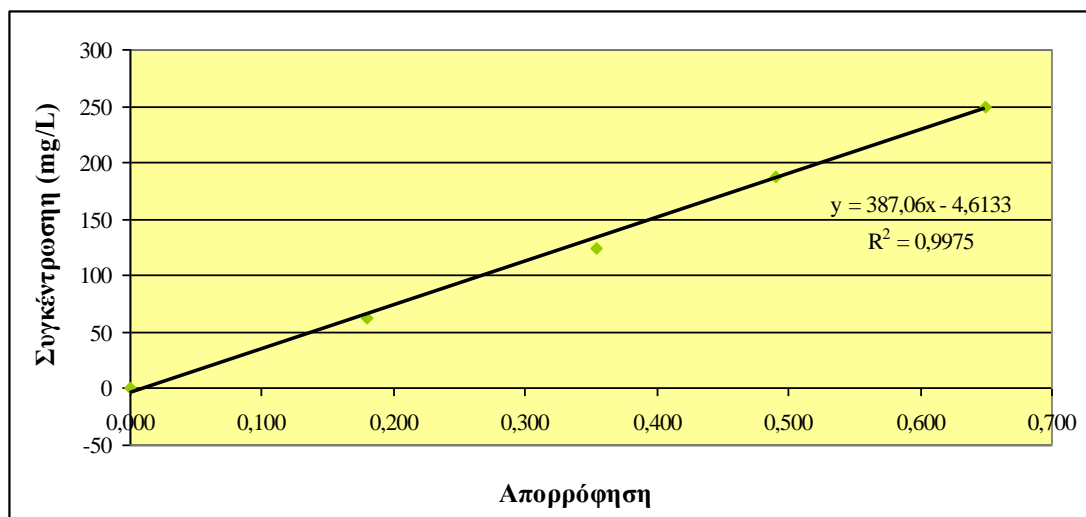
2.6.2 Αναλώσιμα - Συσκευές

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα NaNO_2 , 5% w/v
- Διάλυμα $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10% w/v
- Διάλυμα NaOH , 1M
- (+)-κατεχίνη
- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και της πρότυπης ουσίας κατεχίνης έγινε από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500.

2.6.3 Πειραματική Διαδικασία

Τα στερεά δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν με MeOH σε συγκέντρωση 0,5 mg/mL. Ποσότητα δείγματος 1 mL τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και αναμειχθηκε με 4 mL διπλά απεσταγμένου ύδατος και 0,3 mL διαλύματος NaNO₂, 5%. Μετά από 5 min προστέθηκαν 0,3 mL διαλύματος AlCl₃, 10% και μετά από 1min, προστέθηκαν 2mL διαλύματος NaOH 1M. Στη συνέχεια προστέθηκε απεσταγμένο ύδωρ έως τα 10 mL. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (Γράφημα 2.2) παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα κατεχίνης εύρους συγκεντρώσεων 62,5-250 mg/L. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανα g ξηρού βάρους.

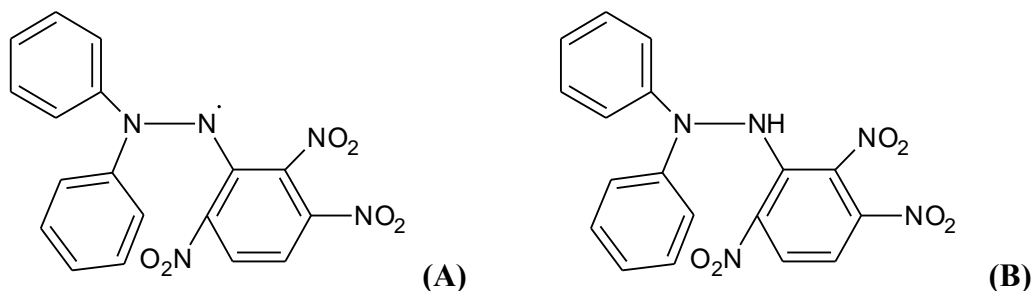


Γράφημα 2.2 Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης με εξίσωση $y = 387,06x - 4,613$ και $R^2 = 0,997$

2.7 Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο DPPH'

2.7.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995) και στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') (Σχήμα 2.2 A). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα της DPPH' προστεθεί ένα μόριο με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα DPPH' ανάγεται με την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 2.2 B), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική του απορρόφηση (Brand – Williams et al., 1995).



Σχήμα 2.2 (A) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') (B) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης

3.7.2 Αναλώσιμα – Συσκευές

- Διάλυμα DPPH' (1,1 διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Μεθανόλη (MeOH)

Οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας της εταιρείας Sigma Aldrich. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε σε συσκευή Hitachi U-1500.

2.7.3 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, ετοιμάστηκε το διάλυμα της ρίζας DPPH[•]. Σε 950 μL MeOH προστέθηκαν 50 μL διαλύματος DPPH[•] έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της ρίζας στην αντίδραση να είναι 100 μM. Ακολούθησε η παρασκευή των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων με DMSO.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μL. Διαδοχικά, προστέθηκαν 50 μL εκχυλίσματος, 950 μL MeOH και τέλος, 50 μL διαλύματος DPPH[•] (100 μM ρίζας DPPH[•]) με σταθερό γρήγορο ρυθμό. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm. Τα δείγματα που περιείχαν μεθανόλη και DPPH[•] αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες, ενώ τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Επειδή υπάρχει πιθανότητα το ίδιο το εκχύλισμα να απορροφά στα 517nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε συγκέντρωσης σε μεθανόλη, χωρίς την προσθήκη της ρίζας DPPH[•], στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκφράστηκε σαν το ποσοστό αναστολής σχηματισμού (εξουδετέρωσης) της ρίζας DPPH[•] σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left[(A_0 - A_s) / A_0 \right] \times 100 \quad (\text{Σχέση 2.3})$$

όπου, A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

A_δ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

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

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀ (Inhibitory Concentration), δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων η οποία προκαλεί μείωση των ριζών του DPPH[•] κατά 50%, βάσει των εξισώσεων της % αναστολής της DPPH[•] σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

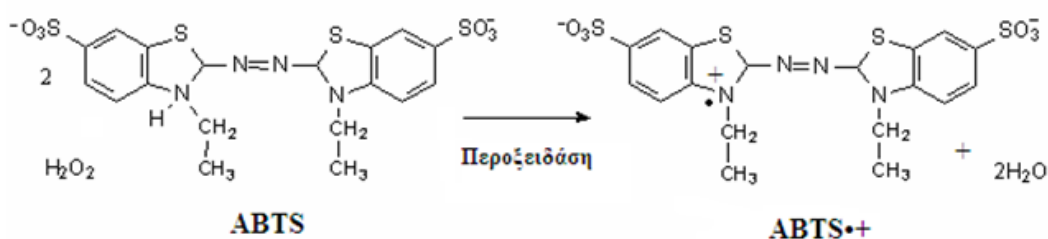
2.8 Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο ABTS^{•+}

2.8.1 Αρχή της Μεθόδου

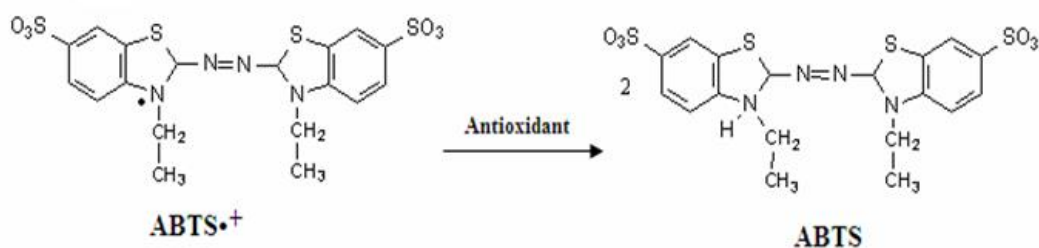
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τον Miller και τους συνεργάτες του (1993) και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)] παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) (**Σχήμα 2.3**). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η πρόσληψη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους

οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ ανάγεται είτε μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), είτε μέσω πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Σχήμα 2.4) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).



Σχήμα 2.3 Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Σχήμα 2.4 Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

2.8.2 Αναλώσιμα – Συσκευές

- Μεθανόλη (MeOH)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Διάλυμα ABTS [2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ)]

2 mM

- Διάλυμα Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) 600 μM
- Διάλυμα ενζύμου περοξειδάσης (HRP) 100 mg/L

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500.

2.8.3 Πειραματική Διαδικασία

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάστηκαν την ημέρα του πειράματος και καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρήθηκαν σε πάγο κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι αραιώσεις των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν με DMSO.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μL. Προστέθηκαν κατά σειρά 400 μL H₂O, 500 μL διαλύματος ABTS, 50 μL διαλύματος H₂O₂ και 50 μL διαλύματος του ενζύμου HRP. Το διάλυμα αναδεύτηκε και επώαστηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 50 μL εκχυλίσματος, ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας (control). Επειδή υπάρχει πιθανότητα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα να απορροφούν στα 730 nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε συγκέντρωσης σε H₂O χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 730 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκφράστηκε ως το ποσοστό αναστολής σχηματισμού (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS•+ σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100 \quad (\text{Σχέση 2.4})$$

όπου: A₀: η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα
A_δ: η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος

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

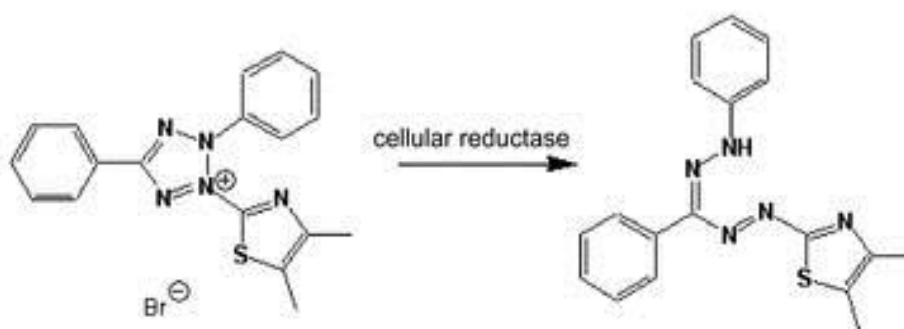
Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀ (Inhibitory Concentration), δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων που προκαλεί μείωση των ριζών ABTS κατά 50%, βάσει των εξισώσεων της % αναστολής της ABTS•+ σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.9 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας – Δοκιμασία MTT

2.9.1 Αρχή της Μεθόδου

Η δοκιμασία MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων που χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού, είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983. Το MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] είναι μια ουσία που διασπάται από τα μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων για να παραγάγει αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης. Συγκεκριμένα ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από τη δραστηριότητα διαφόρων αφυδρογονασών και το απαλό κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους, οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους με ισοπροπανόλη δίνουν ένα σκούρο μπλε / μωβ χρώμα (**Σχήμα 2.5**). Η συγκέντρωση των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας

των κυττάρων, η δε τελική απορρόφηση εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια.



Σχήμα 2.5 Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου (MTT) σε μπλε / μωβ φορμαζάνη από το ένζυμο ρεδουκτάση

2.9.2 Αναλώσιμα - Συσκευές

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum)
- PBS (phosphate buffered saline)
- Ισοπροπανόλη
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
- Θρυψίνη

Για τη διαξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες, ένα εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος από νεογνό (AG01523, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA) και ένα στέλεχος από δότη 85 ετών που αναπτύχθηκε ως πρωτογενής καλλιέργεια στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Η απορρόφηση μετρήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση αναλυτή μικροπλακών TECAN (Infinite M200) με τη βοήθεια του λογισμικού MagellanTM της ίδιας εταιρείας.

2.9.3 Πειραματική Διαδικασία

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 37° C σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), εμπλουτισμένο με 10 % ορρό FBS (Fetal Bovine Serum). Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε με τη δοκιμασία τετραζολίου (MTT) για μικροκαλλιέργειες.

Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης-κιτρικών (0,25% -0,3% αντίστοιχα) και ενοφθαλμίσθηκαν σε πλάκες (microplates) των 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα, σε συγκέντρωση 10,000 κύτταρα / οπή. Όταν η καλλιέργεια έγινε πλήρης (confluent) το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με νέο χωρίς ορρό και δείκτη pH και ακολούθησε επώαση, για 18 h, ώστε τα κύτταρα να προσαρμοστούν στις συνθήκες αυτές. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν οι αραιώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) των εκχυλισμάτων σε DMSO, συγκέντρωσης 10 mg/ml, παρασκευάστηκαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις στο μέσο της καλλιέργειας (DMEM) με εύρος συγκεντρώσεων 500 - 0,8 μg/mL. Από κάθε αραιώση τοποθετήθηκαν 25 μL στις οπές των microplates, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων να είναι 100, 20, 4, 0.8 και 0.16 μg/mL. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με αντίστοιχη ποσότητα DMSO με αυτήν που περιείχε η κάθε αραιώση. Τα κύτταρα επώασθηκαν για 72 h στους 37° C. Στη συνέχεια, το επωαστικό μέσο αντικαταστάθηκε από διάλυμα MTT σε DMEM, συγκέντρωσης 1 mg/mL, και συνεχίστηκε η επώαση για 4 h. Μετά την επώαση το διάλυμα απομακρύνθηκε με απόχυση και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ισοπροπανόλη ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν για περίπου 10 min και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 550 nm (μήκος κύματος αναφοράς 690 nm).

Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε με βάση τον λόγο της απορρόφησης για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος προς την απορρόφηση του αντίστοιχου μάρτυρα.

$$\% \text{Κυτταροτοξικότητα} = (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100 \quad (\text{Σχέση 3.5})$$

όπου: A_{sample} = η τιμή απορρόφησης του δείγματος

A_{control} = η τιμή απορρόφησης του μάρτυρα

2.10 *In vitro* Αντιοξειδωτική Δράση – Μελέτη Ενδοκυτταρικών ROS

2.10.1 Αρχή της Μεθόδου

Οι περισσότερες τεχνικές μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας εφαρμόζονται σε ελεύθερα κυττάρων συστήματα, με συνέπεια να μην λαμβάνονται υπόψη τόσο η δυνατότητα ενδοκύτωσης των υπό μελέτη αντιοξειδωτικών, όσο και μηχανισμοί που επηρεάζουν την απόκριση των κυττάρων. Επομένως, για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός προϊόντος με όρους πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες (*in vivo*), είναι σημαντική και η διεξαγωγή πειραμάτων σε ενδοκυτταρικό επίπεδο.

Η ουσία Dichlorodihydrofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών ROS (Reactive Oxygen Species). Πρόκειται για μη πολική ουσία η οποία διαχέεται γρήγορα στον ενδοκυτταρικό χώρο. Οι εστεράσες των κυττάρων υδρολύουν την $H_2DCF-DA$ στη μη φθορίζουσα ουσία H_2DCF , η οποία είναι πολική με αποτέλεσμα να παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατά την οξείδωση της H_2DCF παράγεται το DCF που φθορίζει ισχυρά. Η H_2DCF μπορεί να οξειδωθεί από ένα πλήθος προοξειδωτικών παραγόντων όπως περοξειδάσες και συμπαραγόντες (σίδηρος, οξειδάση της ξανθίνης και κυτοχρώματα) (Athanasas et al., 2004). Περαιτέρω, η διάσπαση της H_2DCF από τις εστεράσες μπορεί να απελευθερώσει H_2O_2 που προκαλεί την αυτοοξείδωσή της, με αποτέλεσμα να ενισχύεται το σήμα της DCF. Επομένως, η $H_2DCF-DA$ είναι μία ουσία κατάλληλη για την ανίχνευση ενός μεγάλου εύρους οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα όταν τα κύτταρα τελούν υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Mayer et al., 2001).

2.10.2 Αναλώσιμα – Συσκευές

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum)

- Trolox [(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid]
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Διάλυμα H₂DCF-DA, 10μM
- Θρυψίνη

Για τη διαξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες, ένα εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος από νεογνό (AG01523, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA) και ένα στέλεχος από δότη 85 ετών που αναπτύχθηκε ως πρωτογενής καλλιέργεια στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Η απορρόφηση μετρήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση αναλυτή μικροπλάκων TECAN (Infinite M200) με τη βοήθεια του λογισμικού MagellanTM της ίδιας εταιρείας.

2.10.3 Πειραματική Διαδικασία

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 37° C σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), εμπλουτισμένο με 10 % ορρό FBS (Fetal Bovine Serum). Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης-κιτρικών (0,25% -0,3% αντίστοιχα) και ενοφθαλμίσθηκαν σε πλάκες (microplates) των 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα, σε συγκέντρωση 10,000 κύτταρα / οπή. Όταν η καλλιέργεια έγινε πλήρης (confluent) το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με νέο χωρίς ορρό και δείκτη pH και ακολούθησε επώαση, για 18 h, ώστε τα κύτταρα να προσαρμοστούν στις συνθήκες αυτές. Το επίπεδο των ενδοκυτταρικών ROS, υπολογίστηκε με τη μέθοδο των Athanasas και συνεργατών (2004) όπως αναφέρεται παρακάτω.

Αρχικά, προετοιμάστηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις των εκχυλισμάτων. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή κυτταροτοξικότητας MTT χωρίς να εμφανίσουν σημαντική τοξικότητα (βλ. 2.9.3). Από κάθε αραιώση, τοποθετήθηκαν 25 μL στις οπές των microplates και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με αντίστοιχη

ποσότητα DMSO που περιείχαν οι διαφορετικές αραιώσεις των εκχυλισμάτων. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε Trolox σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις με αυτές των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (10 μM) σε κάθε οπή και τα κύτταρα επώαστηκαν για περίπου 1 h στους 37°C . Ακολούθησε απόχυση του διαλύματος (το DCF βρίσκεται εγκλωβισμένο στο εσωτερικό των κυττάρων) και ξέπλυμα των κυττάρων με PBS (phosphate buffered saline). Μετά από επώαση στους 37°C για 3 h, μετρήθηκε ο φθορισμός με χρήση του φθορισμομέτρου TECAN (Infinite M200) με αναλυτή μικροπλακών, για τιμές διέγερσης στα 485 nm και τιμές εκπομπής στα 520 nm.

Η αξιολόγηση της μεταβολής των ενδοκυτταρικών ROS πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με τις τιμές φθορισμού του μάρτυρα για κάθε συγκέντρωση με βάση την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{ ROS} = (F_{\text{sample}} / F_{\text{control}}) \times 100 \quad (\text{Σχέση 3.6})$$

όπου: F_{sample} = η τιμή φθορισμού του δείγματος

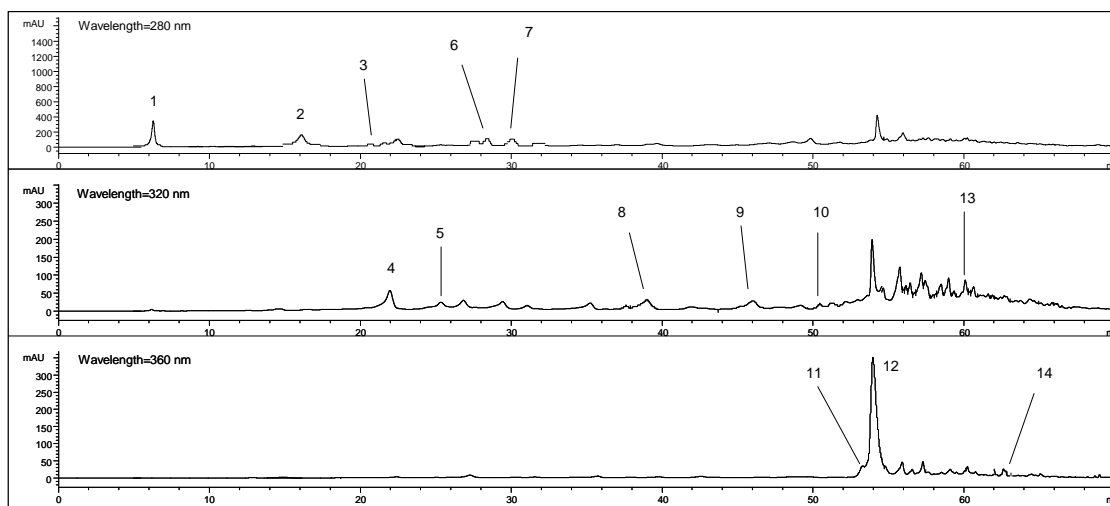
F_{control} = η τιμή φθορισμού του μάρτυρα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προδιορισμός Πολυφαινολών με HPLC

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με τον χρόνο κατακράτησης (Retention time) και το φάσμα απορρόφησης των πρότυπων ουσιών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων ουσιών (βλ. Πίνακα 2.4 και Παράρτημα 1). Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών εκφράστηκαν σε mg ανά g ξηρού εκχυλίσματος (Πίνακας 3.1). Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του εκχυλίσματος ΠΕ1' στα τρία εξεταζόμενα μήκη κύματος (280nm, 320nm και 360nm).



Εικόνα 2.3 Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος ΠΕ1' στα 280nm, 320nm και 360nm. 1: γαλλικό οξύ, 2: πουνικαλαγίνη, 3: (+)-κατεχίνη, 4: χλωρογενικό οξύ, 5: καφεϊκό οξύ, 6: συριγγικό οξύ, 7: επικατεχίνη, 8: π-κουμαρικό οξύ, 9: φερουλικό οξύ, 10: πολυδατίνη, 11: ρουτίνη, 12: ελλαγικό οξύ, 13: trans-ρεσβερατρόλη,

Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός πολυφαινολών στα υπό μελέτη δείγματα ροδιού με HPLC

Φαινολική ουσία	λ (nm)	mg / g ξηρού εκχυλίσματος											
		WO1	WO2	ΠΕ1	ΠΕ2	ΞΙ1	ΞΙ3	ΞΙ1'	ΠΕ1'	ΠΛ1'	ΠΟ1'	ΥΠ	ΥΠ(ΕtOH)
Γαλλικό οξύ	280	23,26	7,61	27,86	32,84	9,22	14,85	5,91	13,51	44,96	11,64	43,61	1,16
Γαλλοκατεχίνη	280	10,07	7,14	13,88	19,79	13,66	29,40	15,95	12,55	55,29	87,98	104,90	1,55
Πουνικαλλαγίνη	280	23,82	39,42	13,04	13,89	3,71	33,76	6,13	24,73	26,94	49,68	27,05	0,55
Κατεχίνη	280	5,64	12,81	1,93	13,54	41,10	10,13	6,25	8,29	40,14	35,46	4,65	0,51
Χλωρογενικό οξύ	320	3,98	0,15	3,30	0,00	3,58	1,71	16,80	7,36	6,77	0,48	0,55	*
Προκυανιδίνη Β2	280	1,15	0,86	0,93	1,26	3,30	11,07	4,06	2,08	0,88	0,77	1,31	0,30
Καφεϊκό οξύ	320	0,50	*	1,18	*	1,00	0,18	2,40	1,22	1,38	0,37	0,14	0,06
Συριγγικό οξύ	280	4,61	9,34	1,25	1,55	0,70	1,70	1,27	2,80	0,99	1,61	1,98	0,16
Επικατεχίνη	280	9,22	5,34	9,70	62,15	10,31	17,48	1,17	10,85	5,73	5,08	16,26	0,44
π - κουμαρικό οξύ	320	1,54	1,38	1,55	0,11	0,12	0,15	0,11	0,90	0,69	0,09	1,70	0,14
φερουλικό οξύ	320	0,99	1,32	1,46	1,45	0,31	1,38	0,10	0,93	0,74	4,56	3,55	0,09
πολυδατίνη	320	0,37	0,13	0,37	0,01	0,74	0,26	0,19	0,14	*	5,04	1,16	0,05
Ρουτίνη	360	3,33	2,13	1,65	0,23	0,75	0,76	1,15	2,73	2,50	2,45	1,63	0,44
Ελλαγικό οξύ	360	41,92	63,63	72,81	74,48	74,04	104,88	63,66	49,97	94,44	11,87	198,37	4,18
trans -ρεσβερατρόλη	320	0,03	0,14	0,71	0,12	0,25	0,41	0,14	0,41	0,32	0,45	0,15	0,02
trans - κινναμικό οξύ	280	0,04	0,01	0,17	0,23	0,07	0,11	0,02	0,07	0,04	0,27	0,59	0,53
Κερκετίνη	360	0,89	0,62	1,41	1,92	1,15	1,12	0,46	0,53	0,53	0,67	0,87	0,19
Καμφερόλη	360	0,34	0,29	0,64	3,98	0,51	0,38	0,34	0,32	0,36	0,40	0,71	0,15

* Δεν ανιχνεύτηκε

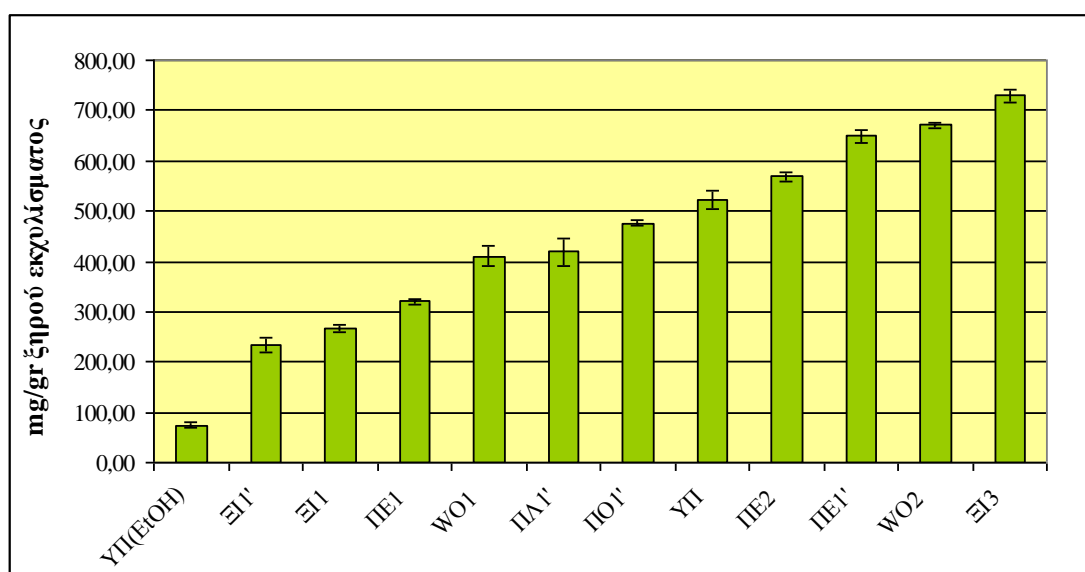
3.2 Ολικά Φαινολικά

Τα ολικά φαινολικά προσδιορίστηκαν στα διαφορετικά εκχυλίσματα ροδιού με τη μέθοδο των Folin-Ciocalteu. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος (**Γράφημα 2.1**) και εκφράστηκε σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g ξηρού εκχυλίσματος. Στον **Πίνακα 3.2** παρατίθενται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού.

Πίνακας 3.2 Περικτικότητα ολικών φαινολικών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού.

Δείγμα	Συγκέντρωση (mg γαλλικού οξέος / g ξηρού εκχυλίσματος)	% Περικτικότητα
WO1	410,64 ± 19,07	41,1 ± 1,9
WO2	670,87 ± 6,67	67,1 ± 0,7
ΠΕ1	319,96 ± 4,77	32,0 ± 0,5
ΠΕ2	568,76 ± 9,90	56,9 ± 1,0
ΞΙ1	266,06 ± 6,60	26,6 ± 0,7
ΞΙ3	728,80 ± 11,73	72,9 ± 1,2
ΠΕ1'	649,21 ± 13,20	64,9 ± 1,3
ΞΙ1'	234,89 ± 15,03	23,5 ± 1,5
ΠΛ1'	418,96 ± 26,77	41,9 ± 2,7
ΠΟ1'	476,28 ± 5,23	47,6 ± 0,5
ΥΠ	522,36 ± 17,97	52,2 ± 1,8
ΥΠ(EtOH)	73,92 ± 5,87	7,4 ± 0,6

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών κυμαίνονται μεταξύ $73,92 \pm 5,87$ και $728,80 \pm 11,73$ mg γαλλικού οξέος / g ξηρού εκχυλίσματος, με το εκχύλισμα ΥΠ(EtOH) να εμφανίζει την χαμηλότερη και το ΞΙ3 την υψηλότερη συγκέντρωση (**Πίνακας 1.1**). Στο **Γράφημα 3.1** παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα του προσδιορισμού ολικών φαινολικών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού.



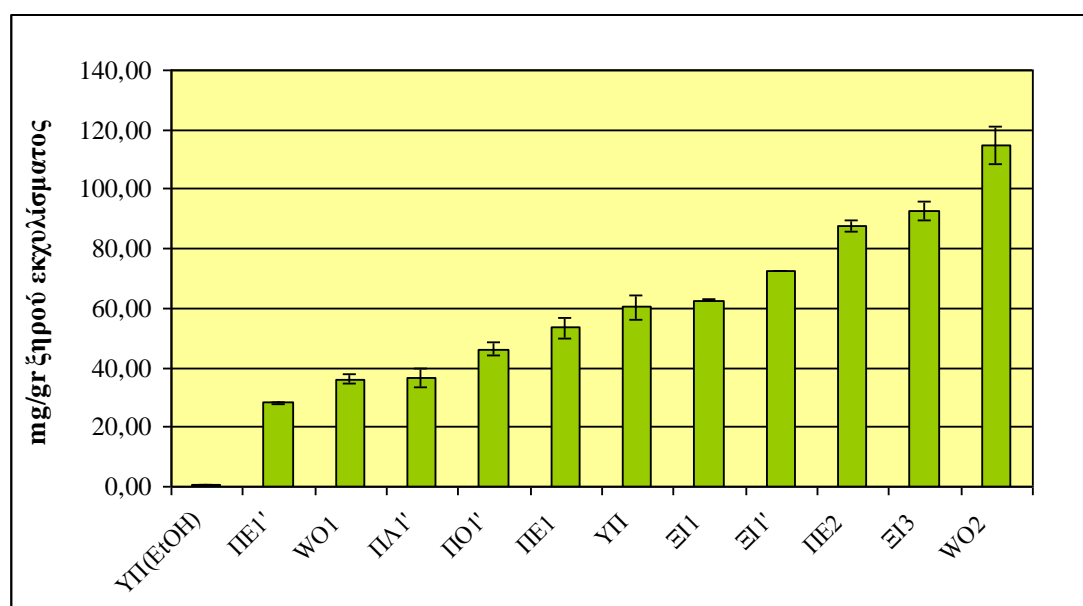
Γράφημα 3.1 Συγκριτική απεικόνιση των ολικών φαινολικών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

3.3 Ολικά Φλαβονοειδή

Τα ολικά φλαβονοειδή προσδιορίστηκαν με κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου των Gunes et al. (2002). Η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στα δείγματα ροδιού προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης (Γράφημα 2.2) και εκφράστηκε σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανά g ξηρού εκχυλίσματος. Στον Πίνακα 3.3 παρατίθενται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών για κάθε εκχύλιση ροδιού. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών κυμαίνονται μεταξύ $0,81 \pm 0,01$ και $114,79 \pm 6,39$ mg γαλλικού οξέος / g ξηρού εκχυλίσματος, με το εκχύλιση ΥΠ(EtOH) να εμφανίζει τη χαμηλότερη και το WO2 την υψηλότερη συγκέντρωση (Πίνακας 3.3). Στο Γράφημα 3.2 παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα των ολικών φλαβονοειδών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού.

Πίνακας 3.3 Περιεκτικότητα ολικών φλαβονοειδών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού.

Δείγμα	Συγκέντρωση (mg κατεχίνης / g ξηρού εκχυλίσματος)	% Περιεκτικότητα
WO1	36,16 ± 1,49	3,6 ± 0,1
WO2	114,79 ± 6,39	11,5 ± 0,6
ΠΕ1	53,32 ± 3,74	5,3 ± 0,4
ΠΕ2	87,67 ± 2,07	8,8 ± 0,2
ΞΙ1	62,74 ± 0,39	6,3 ± 0,0
ΞΙ3	92,54 ± 3,11	9,3 ± 0,3
ΞΙ1'	72,41 ± 0,00	7,2 ± 0,0
ΠΕ1'	28,29 ± 0,39	2,8 ± 0,0
ΠΛ1'	36,54 ± 3,32	3,7 ± 0,3
ΠΟ1'	46,35 ± 2,22	4,6 ± 0,2
ΥΠ	60,41 ± 4,13	6,0 ± 0,4
ΥΠ(EthOH)	0,81 ± 0,01	0,1 ± 0,0



Γράφημα 3.2 Συγκριτική απεικόνιση των ολικών φλαβονοειδών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα ροδιού. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

3.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα - Μέθοδος DPPH^{*}

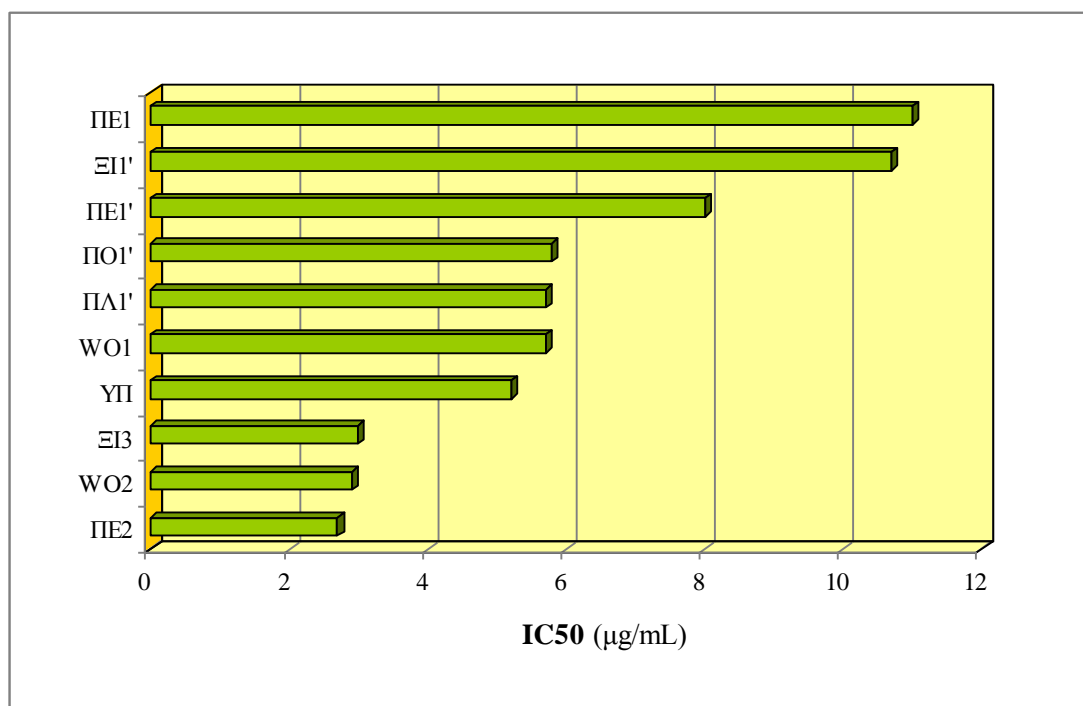
Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων ροδιού μέσω της απορρόφησης της ρίζας DPPH^{*} έγινε με παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995). Τα διαγράμματα της % αναστολής σχηματισμού της ρίζας DPPH^{*} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων παρατίθενται στο **Παράρτημα 2**. Οι τιμές IC₅₀, δηλαδή οι συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων που προκαλούν μείωση των ριζών DPPH^{*} κατά 50% φαίνονται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4 Τιμές IC₅₀ των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της ρίζας DPPH^{*}.

Δείγμα	IC ₅₀ (μg/mL)
WO1	5,7
WO2	2,9
ΠΕ1	11
ΠΕ2	2,7
ΞΙ1*	-
ΞΙ3	3
ΠΕ1'	8
ΞΙ1'	10,7
ΠΛ1'	5,7
ΠΟ1'	5,8
ΥΠ	5,2
ΥΠ(EtOH)*	-

* Λόγω έλλειψης επαρκούς ποσότητας δεν πραγματοποιήθηκαν οι προσδιορισμοί.

Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Επομένως, ισχυρότερη δράση έναντι της ρίζας DPPH^{*} εμφανίζει το εκχύλισμα ΠΕ2 (IC₅₀: 2,7 μg/mL) και λιγότερο ισχυρή το ΠΕ1 (IC₅₀: 11 μg/mL) (**Πίνακας 3.4**). Στο **Γράφημα 3.3** παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα της δράσης των εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της ρίζας DPPH^{*}.



Γράφημα 3.3 Συγκριτική απεικόνιση της δράσης των εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της ρίζας DPPH'.

3.5 Αντιοξειδωτική Ικανότητα - Μέθοδος ABTS^{•+}

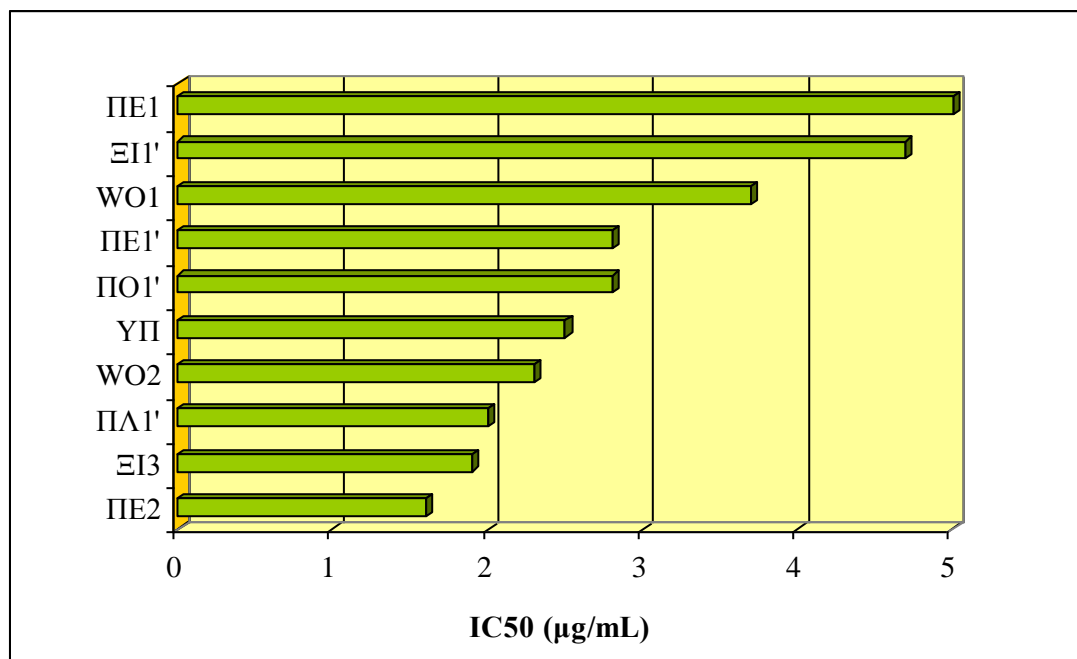
Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων ροδιού μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+} έγινε με την μέθοδο των Miller και Rice-Evans (1993). Τα διαγράμματα της % αναστολής σχηματισμού (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS^{•+} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων ροδιού παρατίθενται στο **Παράρτημα 3**.

Οι τιμές IC₅₀, δηλαδή οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων που προκαλούν μείωση των ριζών ABTS^{•+} κατά 50%, φαίνονται στον **Πίνακα 3.5**. Ισχυρότερη δράση έναντι της ρίζας ABTS^{•+} εμφανίζει το εκχύλισμα ΠΕ2 (IC₅₀: 1,6 μg/mL) και λιγότερο ισχυρή το ΠΕ1 (IC₅₀: 5 μg/mL) (**Πίνακας 3.5**). Στο **Γράφημα 3.4** παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα της δράσης έναντι της ρίζας ABTS^{•+} των διαφορετικών εκχυλισμάτων ροδιού, εκφρασμένα σε τιμές IC₅₀ (μg/mL).

Πίνακας 3.5 Τιμές IC₅₀ των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της ρίζας ABTS^{•+}.

Δείγμα	IC ₅₀ (μg/mL)
WO1	3,7
WO2	2,3
ΠΕ1	5,0
ΠΕ2	1,6
ΞΙ1*	-
ΞΙ3	1,9
ΠΕ1'	5,0
ΞΙ1'	4,7
ΠΛ1'	2,0
ΠΟ1'	2,8
ΥΠ	2,5
ΥΠ(EtOH)*	-

* Λόγω έλλειψης επαρκούς ποσότητας δεν πραγματοποιήθηκαν οι προσδιορισμοί.



Γράφημα 3.4 Συγκριτική απεικόνιση της δράσης των εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της ρίζας ABTS^{•+}.

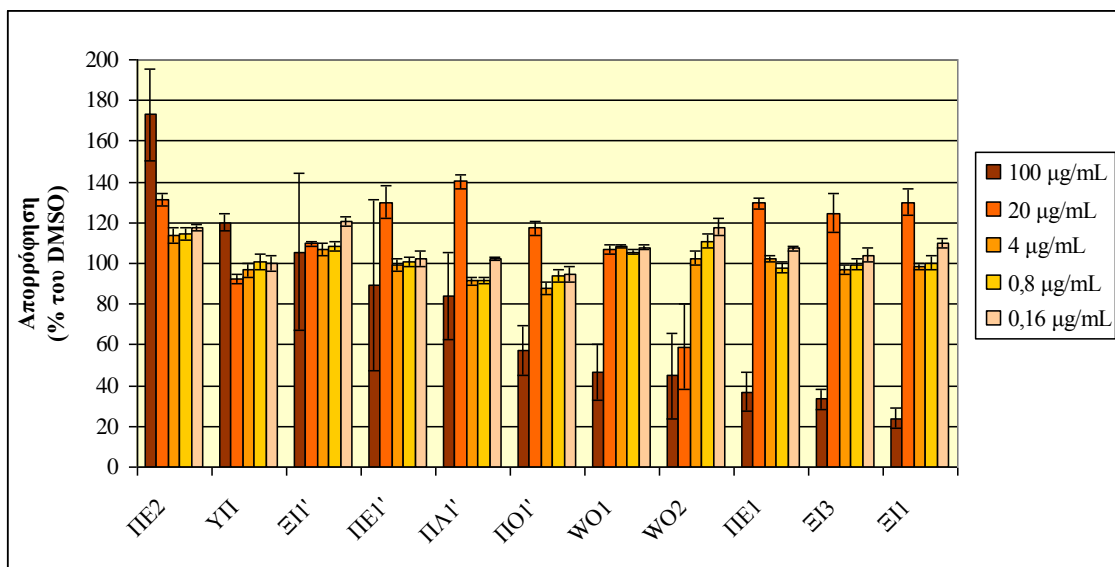
3.6 Κυτταροτοξικότητα – Δοκιμασία MTT

Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε με τη δοκιμασία τετραζολίου (MTT) για μικροκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % απορρόφηση σε σχέση με τον αντίστοιχο για κάθε συγκέντρωση μάρτυρα, δηλαδή την αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO. Η απορρόφηση εξαρτήθηκε από τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων και είναι ανάλογη της μεταβολικής τους δραστηριότητας. Στον Πίνακα 3.6 γίνεται παράθεση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων.

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT.

Δείγμα	Απορρόφηση (% της αντίστοιχης συγκέντρωσης DMSO)				
	100 µg/mL	20 µg/mL	4 µg/mL	0,8 µg/mL	0,16 µg/mL
WO1	47 ± 14	107 ± 2	108 ± 1	106 ± 1	108 ± 1
WO2	45 ± 21	59 ± 21	102 ± 3	111 ± 4	118 ± 4
ΠΕ1	37 ± 9	130 ± 3	102 ± 1	98 ± 3	107 ± 1
ΠΕ2	173 ± 23	131 ± 3	114 ± 4	114 ± 3	118 ± 2
ΞΙ1	24 ± 5	130 ± 6	98 ± 1	100 ± 4	110 ± 2
ΞΙ3	33 ± 5	125 ± 10	97 ± 3	99 ± 3	104 ± 4
ΞΠ'	106 ± 38	110 ± 1	107 ± 3	109 ± 2	121 ± 2
ΠΕ1'	89 ± 42	130 ± 8	99 ± 3	101 ± 2	102 ± 4
ΠΛ1'	84 ± 21	140 ± 3	91 ± 2	92 ± 1	102 ± 1
ΠΟ1'	58 ± 12	117 ± 3	88 ± 3	94 ± 3	95 ± 4
ΥΠ	120 ± 4	92 ± 2	97 ± 4	101 ± 3	100 ± 4

Στο Γράφημα 3.5 απεικονίζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την μελέτη των ενδοκυτταρικών ROS. Έτσι, λόγω εμφάνισης υψηλής κυτταροτοξικότητας, δεν εξετάστηκαν οι υψηλές συγκεντρώσεις (100 µg/mL) των δειγμάτων ΞΙ1, ΞΙ3, ΠΕ1, WO2, WO1, ΠΟ1' και ΠΛ1', καθώς και η συγκέντρωση 20 µg/mL του δείγματος WO2 (Πίνακας 3.6).



Γράφημα 3.5 Συγκριτική απεικόνιση αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

3.7 *In vitro* Αντιοξειδωτική Δράση – Μελέτη Ενδοκυτταρικών ROS

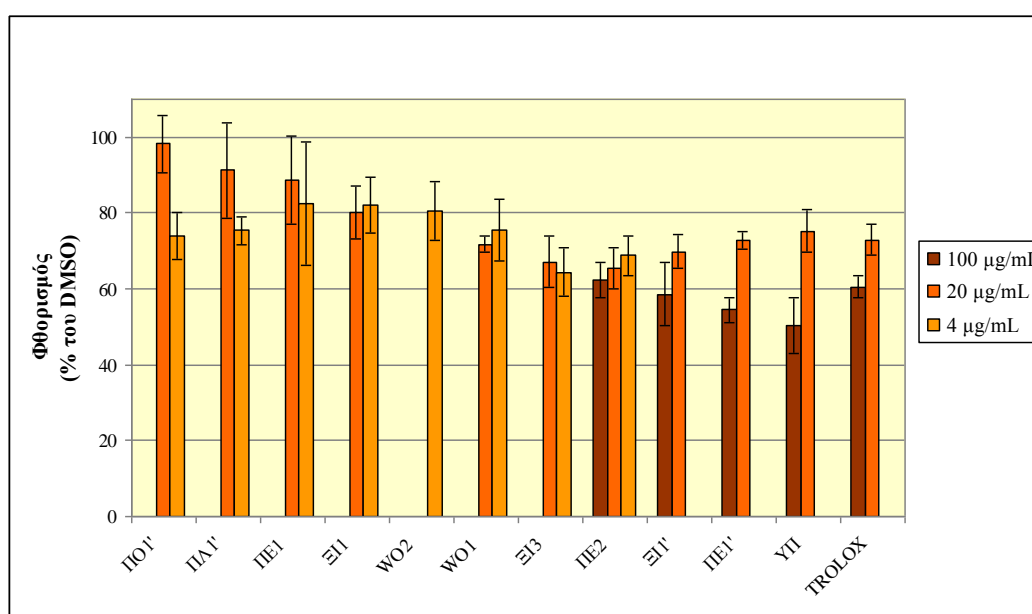
Το επίπεδο των ενδοκυτταρικών ROS, υπολογίστηκε με τη μέθοδο H₂DCF-DA, όπως περιγράφεται από τους Athanasas και συνεργάτες (2004). Η αξιολόγηση της % μεταβολής των ενδοκυτταρικών ROS πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με τις τιμές φθορισμού του μάρτυρα (DMSO) για κάθε συγκέντρωση. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Από κάθε εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που δεν εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξικότητα, όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία MTT (βλ. ανωτέρω, Πίνακας 3.6). Στο **Γράφημα 3.6** απεικονίζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας H₂DCF-DA.

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα μεταβολής ενδοκυτταρικών ROS.

Δείγμα	Φθορισμός (% της αντίστοιχης συγκέντρωσης DMSO)		
	100 µg/mL	20 µg/mL	4 µg/mL
WO1	*	72 ± 2	75 ± 8
WO2	*	*	81 ± 8
ΠΕ1	*	89 ± 12	82 ± 16
ΠΕ2	62 ± 5	65 ± 5	69 ± 5
ΞΙ1	*	80 ± 7	82 ± 7
ΞΙ3	*	67 ± 7	64 ± 6
ΞΙ1'	59 ± 8	70 ± 4	
ΠΕ1'	54 ± 3	73 ± 2	
ΠΑ1'	*	91 ± 12	75 ± 4
ΠΟ1'	*	98 ± 7	74 ± 6
ΥΠ	50 ± 7	75 ± 6	
TROLOX**	61 ± 3	73 ± 4	

* Δεν εξετάστηκαν λόγω εμφάνισης υψηλής κυτταροτοξικότητας.

** Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.



Γράφημα 3.6 Συγκριτική απεικόνιση αποτελεσμάτων της μελέτης ενδοκυτταρικών ROS. Το TROLOX χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Πολυφαινολικό Περιεχόμενο

4.1.1 Ολικά Φαινολικά και Ολικά Φλαβονοειδή

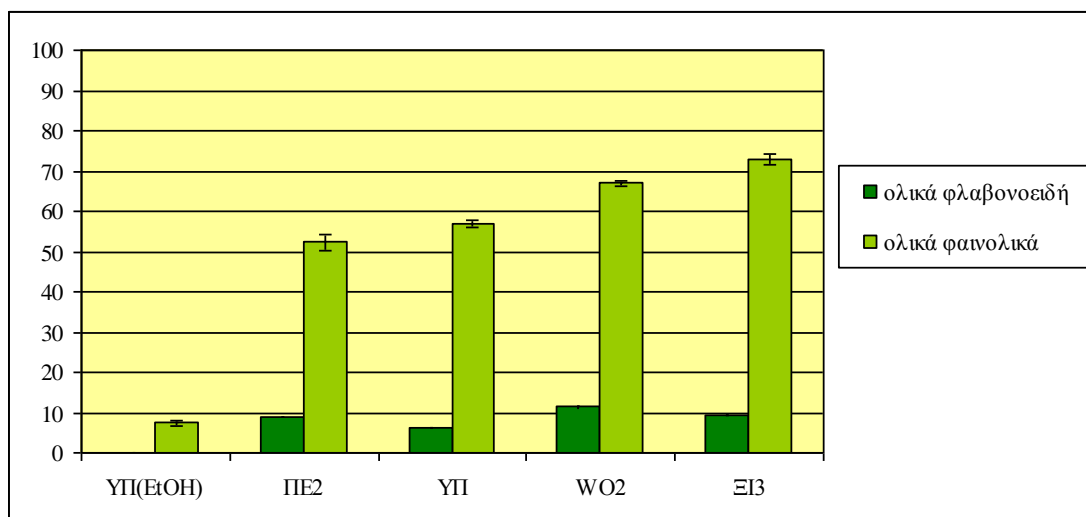
Το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και ολικά φλαβονοειδή προσδιορίστηκε στα διάφορα εκχυλίσματα ροδιού εμφανίζοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα (Πίνακας 3.2 και Πίνακας 3.3 αντίστοιχα).

4.1.1.1 Υποπροϊόντα Χυμοποίησης και Μη Βρώσιμα Τμήματα Καρπών

Στο **Γράφημα 4.1** απεικονίζεται η ποσοστιαία κατανομή των ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα των υποπροϊόντων χυμοποίησης και των δειγμάτων που περιέχουν μη βρώσιμα τμήματα καρπού. Το εκχύλισμα των υποπροϊόντων της χυμοποίησης (ΥΠ), του μη βρώσιμου τμήματος της ποικιλίας ‘Wonderful’ (WO2) και ‘Περσεφόνη’ (ΠΕ2) καθώς και το εκχύλισμα από ολόκληρο καρπό της ποικιλίας ‘Ξινή’ (ΞΙ3) εμφάνισαν την μέγιστη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά ($52,2 \pm 1,8$ %, $67,1 \pm 0,7$ %, $56,9 \pm 1,0$ % και $72,9 \pm 1,2$ % αντίστοιχα), αλλά και σε ολικά φλαβονοειδή ($6,0 \pm 0,4$ %, $11,5 \pm 0,6$ %, $8,8 \pm 0,2$ % και $9,3 \pm 0,3$ % αντίστοιχα). Τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα μη βρώσιμα τμήματα των καρπών (φλοιό) ή από ολόκληρο τον καρπό του ροδιού εμφάνισαν, γενικά, υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από τα εκχυλίσματα των βρώσιμων τμημάτων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες (Seeram et al, 2005; Li et al., 2006; Ορφανουδάκη, 2012).

Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των υποπροϊόντων (ΥΠEtOH) εμφάνισε την χαμηλότερη περιεκτικότητα τόσο σε ολικά

φαινολικά, όσο και σε ολικά φλαβονοειδή ($7,4 \pm 0,6$ % και $0,1 \pm 0,0$ % αντίστοιχα). Μελέτες που συγκρίνουν διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης έχουν δείξει ότι η εκχύλιση με αιθανόλη εμφανίζει χαμηλότερες αποδόσεις σε πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με την εκχύλιση με μεθανόλη (Singh et al., 2002; Li et al., 2006).



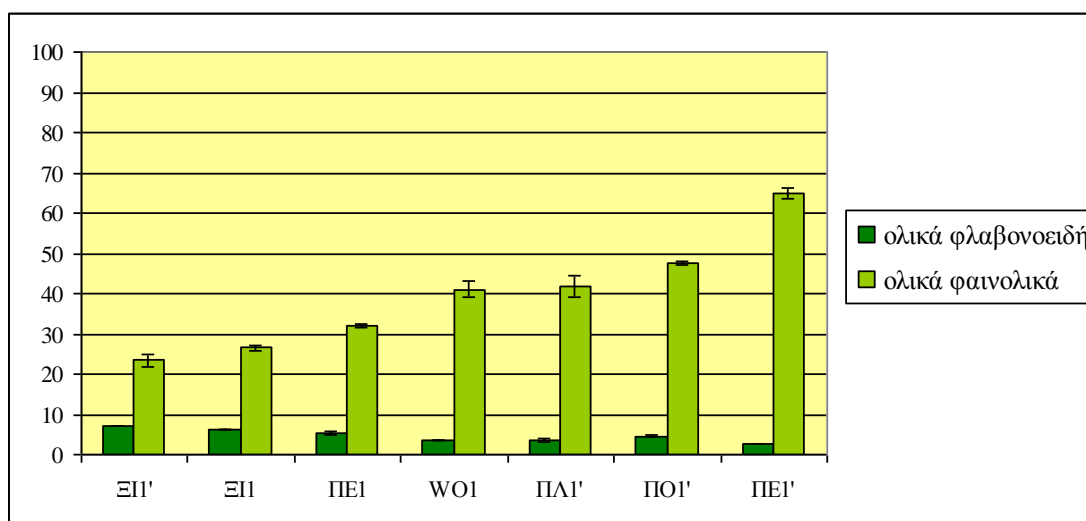
Γράφημα 4.1 Ποσοστιαία κατανομή ολικών φλαβονοειδών και ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα των υποπροϊόντων χυμοποίησης και των μη βρώσιμων τμημάτων καρπού. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

4.1.1.2 Βρώσιμα Τμήματα Καρπών

Τα εκχυλίσματα των βρώσιμων τμημάτων των καρπών εμφάνισαν όλα ικανοποιητικές αποδόσεις τόσο σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο όσο και σε περιεχόμενο σε ολικά φλαβονοειδή. Το δείγμα της ποικιλίας ‘Περσεφόνη’ από τη συγκομιδή του 2013 (ΠΕ1’) εμφάνισε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ($64,9 \pm 1,3$ %), αλλά την χαμηλότερη σε ολικά φλαβονοειδή ($2,8 \pm 0,0$ %), ενώ η το δείγμα της ‘Ξινής’ από την ίδια συγκομιδή εμφάνισε την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ($23,5 \pm 1,5$ %), και την υψηλότερη σε ολικά φλαβονοειδή ($7,2 \pm 0,0$ %). Οι ελληνικές παραδοσιακές ποικιλίες ροδιάς εμφανίζουν όμοια ή και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και ολικά φλαβονοειδή σε σύγκριση με την ξένη ποικιλία ‘Wonderful’ (Γράφημα 4.2). Επίσης, οι ελληνικές

γλυκές ποικιλίες εμφανίζουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή από την ‘Ξινή’ ποικιλία.

Όσον αφορά τη διακύμανση που παρουσιάζει το φαινολικό περιεχόμενο ως προς το έτος συγκομιδής, στην περίπτωση της ποικιλίας ‘Ξινή’ είναι μηδαμινή, ενώ στην περίπτωση της ποικιλίας ‘Περσεφόνη’ είναι σημαντική. Το εκχύλισμα ΠΕ1’ (συγκομιδή του 2013) εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή σε σύγκριση με το εκχύλισμα ΠΕ1 (συγκομιδή του 2012). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε ένα πλήθος παραγόντων όπως τις συνθήκες παραγωγής, την ωριμότητα της συλλογής και τις συνθήκες αποθήκευσης. Σημαντικές διαφορές έχουν αναφερθεί ως προς το πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάλογα με το έτος παραγωγής και από άλλους ερευνητές (Poyrazoglu et al. 2002; Mirdehghan and Rahemi, 2007).



Γράφημα 4.2 Ποσοστιαία κατανομή ολικών φλαβονοειδών και ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα των βρώσιμων τμημάτων των καρπών. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

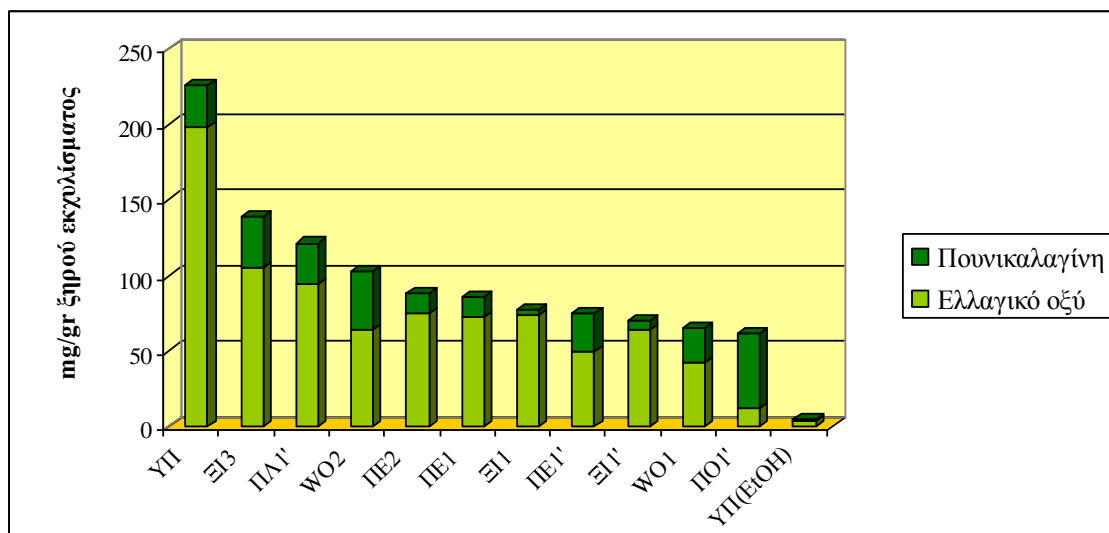
4.1.2 Φαινολικά συστατικά

Οι κυριότερες πολυφαινόλες που ανιχνεύτηκαν στα διάφορα εκχυλίσματα ροδιού ήταν η ελλαγιτανίνη πουνικαλαγίνη και το παράγωγό της ελλαγικό οξύ, οι φλαβαν-3-όλες (+)-κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και προκυανιδίνη B2 και τα φαινολικά οξέα γαλλικό, συριγγικό και χλωρογενικό οξύ.

4.1.2.1 Ελλαγικό οξύ και Πουνικαλαγίνη

Το ελλαγικό οξύ και η πουνικαλαγίνη αποτελούν βάσει της βιβλιογραφίας τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά του ροδιού με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα να εμφανίζεται στον φλοιό (Amakura et al., 2000; Seeram et al., 2005a; Ulrike et al., 2011). Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των πολυφαινολών στην παρούσα μελέτη έρχονται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς το ελλαγικό οξύ αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό στην πλειοψηφία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού (4,2-198 mg/g εκχυλίσματος), ενώ η πουνικαλαγίνη εμφανίζεται επίσης στα αφθονότερα συστατικά (0,5-49,7 mg/g εκχυλίσματος).

Το εκχύλισμα των υποπροϊόντων της χυμοποίησης (ΥΠ), του μη βρώσιμου τμήματος της ποικιλίας ‘Wonderful’ (WO2) και ‘Περσεφόνη’ (ΠΕ2), καθώς και το εκχύλισμα ολόκληρου του καρπού της ποικιλίας ‘Ξινή’ (ΞΙ3) εμφάνισαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη σε σύγκριση με τα βρώσιμα μέρη των καρπών. Όσον αφορά τα βρώσιμα τμήματα των καρπών, την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη εμφάνισε το εκχύλισμα της ποικιλίας ‘Πλούτων’ (ΠΛ1’). Γενικά, η περιεκτικότητα των διαφορετικών εκχυλισμάτων σε ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο με την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά συστατικά (βλ. ανωτέρω **Γράφημα 4.1** και **Γράφημα 4.2**). Στο **Γράφημα 4.3** παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού σε ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη.



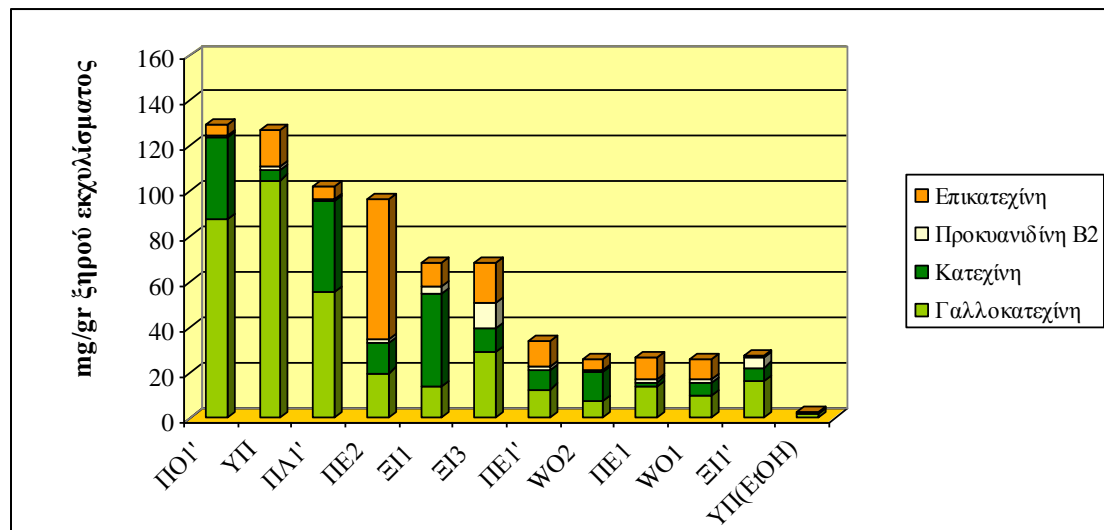
Γράφημα 4.3 Περιεκτικότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού σε ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη.

4.1.2.2 Φλαβαν-3-όλες

Μία ακόμα κυρίαρχη ομάδα συστατικών στα εκχυλίσματα ροδιού αποτέλεσαν οι φλαβαν-3-όλες. Η κατεχίνη και το ισομερές της, επικατεχίνη, ανιχνεύτηκαν στα διαφορετικά εκχυλίσματα σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις (0,5-41,1 και 0,4-62,2 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα). Αξιοσημείωτη ήταν και η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε γαλλοκατεχίνη (1,5-104,9 mg/g εκχυλίσματος), ενώ σε χαμηλότερες αλλά σημαντικές συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκε το διμερές προκυανιδίνη B2 (0,3-11 mg/g εκχυλίσματος). Γενικά, η γαλλοκατεχίνη κυριαρχεί στα εκχυλίσματα των μη βρώσιμων τμημάτων των καρπών (φλοιό), ενώ η προκυανιδίνη B2 στα εκχυλίσματα των βρώσιμων τμημάτων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών που έχουν ανιχνεύσει τις ουσίες αυτές σε φλοιό και χυμό ροδιού αντίστοιχα (Artik et al., 1998; Plumb et al., 2002).

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων ροδιού σε φλαβαν-3-όλες απεικονίζεται στο **Γράφημα 4.4**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβαν-3-όλες εμφανίζεται αυξημένη στο εκχύλισμα ΠΟ1' που εμφάνισε χαμηλή περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ (**Γράφημα 4.3**). Όσον αφορά τα εκχυλίσματα των βρώσιμων τμημάτων των καρπών, μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο σύνολο των

φλαβαν-3-ολών από εμφάνισαν οι ποικιλίες ‘Πορφυρογέννητη’ (ΠΟ1’) και ‘Πλούτων’ (ΠΛ1’).

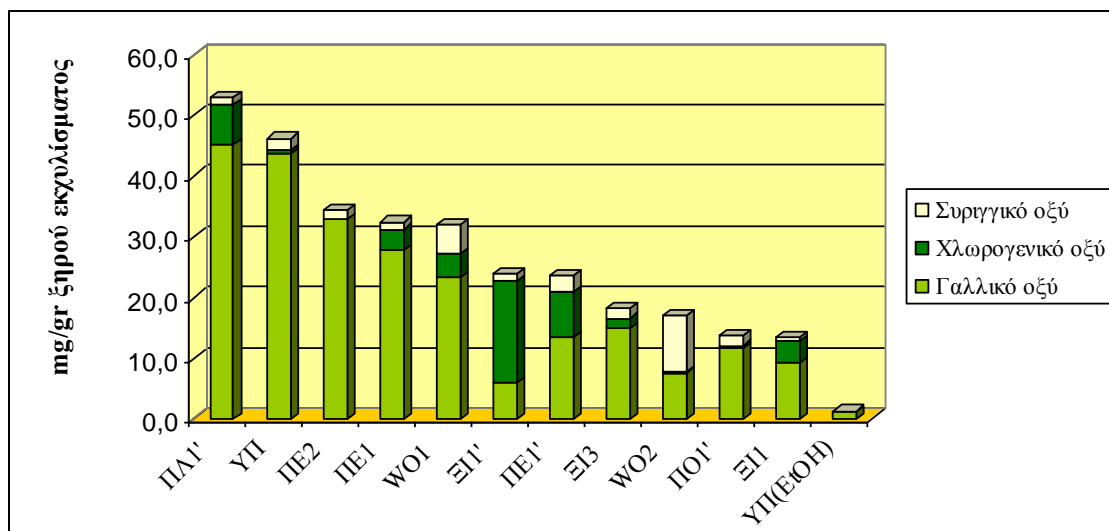


Γράφημα 4.4 Περιεκτικότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού στις φλαβαν-3-όλες κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και προκυανιδίνη Β2.

4.1.2.3 Φαινολικά οξέα

Εκτός από το ελλαγικό οξύ, κυρίαρχο φαινολικό οξύ στο σύνολο των εκχυλισμάτων ροδιού ήταν το γαλλικό οξύ (1,2-45 mg/g εκχυλίσματος). Σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν, επίσης, το συριγγικό και χλωρογενικό οξύ (0,2-9,3 και 0,2-16,8 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα). Η μεγάλη αφθονία του γαλλικού οξέος καθώς και η παρουσία των φαινολικών οξέων συριγγικό και χλωρογενικό σε δείγματα ροδιού έχει αναφερθεί και από άλλους μελετητές (Artik et al., 1998; Amakura et al., 2000; Royrazoglu et al., 2002; Pande and Akoh, 2009). Τα υδροξυκινναμικά οξέα καφεϊκό, π-κουμαρικό, φερουλικό και trans-κινναμικό οξύ ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα δείγματα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Στο **Γράφημα 4.4** απεικονίζεται η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων ροδιού στα τρία κυρίαρχα φαινολικά οξέα (γαλλικό, χλωρογενικό και συριγγικό οξύ). Υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα στα τρία φαινολικά οξέα εμφανίζουν τα εκχυλίσματα ΠΛ1', ΥΠ και ΠΕ2.



Γράφημα 4.4 Περιεκτικότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού στα φαινολικά οξέα γαλλικόοξύ, χλωρογενικό οξύ και συριγγικό οξύ.

4.1.2.3 Φλαβονόλες και Στιλβένια

Οι φλαβονόλες κερκετίνη και καμφερόλη ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα εκχυλίσματα ροδιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,2-1,9 και 0,3-4 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα). Αρκετές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές για την παρουσία των φλαβονολών κερκετίνη και καμφερόλη στο ρόδι (van Elswijk et al., 2004; Pande and Akoh, 2009; Ορφανουδάκη, 2012). Το στιλβένιο *trans*-ρεσβερατρόλη ανιχνεύτηκε στα υπό μελέτη εκχυλίσματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,03-0,71 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα), ενώ επίσης ανιχνεύτηκε σε χαμηλές αλλά αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις το πρόδρομο μόριο της ρεσβερατρόλης, πολυδατίνη (0,01-5 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα). Η πολυδατίνη (ρεσβερατρόλη-3-*O*-β-μονο-*D*-γλυκοζίτης) βρέθηκε πως περιέχεται σε χυμούς σταφυλιού σε συγκεντρώσεις 7 φορές μεγαλύτερες από την ρεσβερατρόλη (Romero-Perez et al., 1999) και θεωρείται πως αποτελεί την πιο άφθονη μορφή της ρεσβερατρόλης στη φύση (Regev-Shoshani et al., 2003). Ενώ η παρουσία της *trans*-ρεσβερατρόλης έχει καταγραφεί στο ρόδι από άλλους μελετητές (Ορφανουδάκη, 2012), δεν υπάρχουν αναφορές όσον αφορά την παρουσία της πολυδατίνης.

4.2 Αντιοξειδωτική Δράση

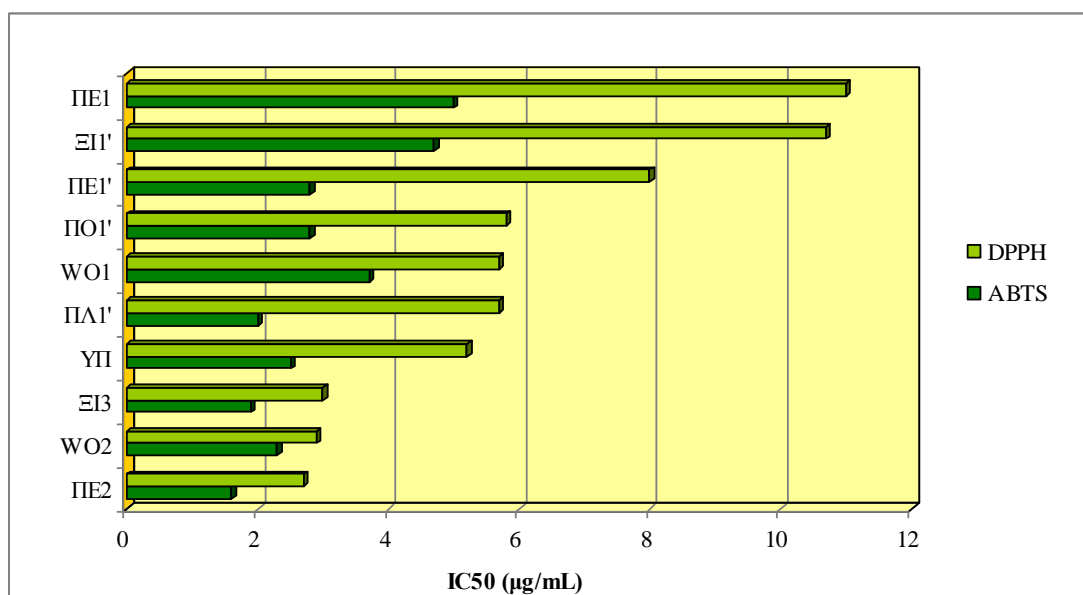
4.2.1 Μέθοδοι DPPH και ABTS

Το σύνολο των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού έδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενάντια στις ρίζες DPPH και ABTS. Την ισχυρότερη δράση και στις δύο περιπτώσεις εμφάνισαν τα εκχυλίσματα που περιείχαν μη βρώσιμα τμήματα καρπού (ΠΕ2:, WO2, ΞΙ3, ΥΠ) (Γράφημα 4.5). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές, κατά τις οποίες ο φλοιός του ροδιού εμφανίζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τον χυμό (Kelawala and Ananthanrayan, 2004; Seeram et al., 2006; Tzulker et al., 2007). Η αντιοξειδωτική δράση των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με την σύστασή τους σε ολικά φαινολικά, αλλά μπορεί να συνδεθεί και με την ειδική τους περιεκτικότητα σε δραστικές πολυφαινόλες όπως ελλαγικό οξύ, πουνικαλλαγίνη, γαλλικό οξύ και φλαβαν-3-όλες.

Η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού έχει συνδεθεί με την παρουσία φαινολικών συστατικών και ιδιαίτερα με την υψηλή περιεκτικότητα σε υδρολυόμενες ταννίνες και ελλαγικό οξύ (Gil et al., 2000; Seeram et al., 2005a ; Tzulker et al., 2007). Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ΠΟ' και ΠΕ1' έρχεται σε αντίθεση με τη χαμηλή περιεκτικότητά τους σε ελλαγικό οξύ. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συνέργεια μεταξύ των διαφορετικών ομάδων φυτοχημικών του ροδιού αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα καθορισμού της βιολογικής του δράσης και όχι μεμονωμένα η περιεκτικότητά του σε ελλαγικό οξύ (Lansky et al., 2005; Lansky, 2006). Έτσι, η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των υπό μελέτη εκχυλισμάτων φαίνεται πως οφείλεται στο σύνολο των φυτοχημικών συστατικών τους και στις πιθανές συνεργηστικές δράσεις τους.

Όσον αφορά τα βρώσιμα τμήματα των καρπών, η ποικιλία 'Πλούτων' εμφάνισε την ισχυρότερη δράση. Γενικά, οι γλυκές ελληνικές παραδοσιακές ποικιλίες (ΠΕ1', ΠΟ1', ΠΛ1') εμφάνισαν όμοια ή και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την ξένη ποικιλία 'Wonderful'. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες μελέτες σε ελληνικές παραδοσιακές ποικιλίες ροδιού.

Στο **Γράφημα 4.5** απεικονίζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Η διαφορά που παρατηρείται στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μεταξύ των δύο εξεταζόμενων μεθόδων οφείλεται στη διαφορετική χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Επιπρόσθετα, το γεγονός αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.



Γράφημα 4.5 Συγκριτική απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού έναντι των ριζών DPPH και ABTS.

4.2.1 Μελέτη ενδοκυτταρικών ROS

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι αρκετές από τις υψηλές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού δεν εξετάστηκαν ως προς την μεταβολή των ενδοκυτταρικών ROS λόγω εμφάνισης υψηλής κυτταροτοξικότητας (βλ. ανωτέρω **Πίνακας 3.7**). Οι εξεταζόμενες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων εμφάνισαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση, συγκρίσιμη με αυτήν του Trolox που χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (βλ. ανωτέρω **Γράφημα 3.6**). Ισχυρότερη δράση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις εμφάνισαν τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης

(ΥΠ), το μη βρώσιμο τμήμα της ποικιλίας ‘Περσεφόνη’ (ΠΕ2), αλλά και τα βρώσιμα τμήματα των ποικιλιών ‘Ξινή’ (ΞΙ’) και Περσεφόνη (ΠΕ1’).

Ωστόσο καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων δεν μείωσε τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών ROS πάνω από 50%. Η χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε ενδοκυτταρικό επίπεδο σε σύγκριση με τους προσδιορισμούς με τις μεθόδους DPPH και ABTS ερμηνεύεται από παράγοντες όπως η μειωμένη δυνατότητα ενδοκύτωσης των υπό μελέτη αντιοξειδωτικών και τους μηχανισμούς που επηρεάζουν την απόκριση των κυττάρων. Επομένως, για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός προϊόντος με όρους πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες (in vivo), είναι σημαντική και η διεξαγωγή πειραμάτων σε ενδοκυτταρικό επίπεδο.

4.3 Συμπεράσματα

Όλα τα εξεταζόμενα δείγματα ροδιού εμφάνισαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς το φυτοχημικό περιεχόμενο αλλά και την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση.

Το σύνολο των υπό μελέτη εκχυλισμάτων εμφάνισε σημαντικές αποδόσεις σε ολικά φαινολικά συστατικά, ενώ υψηλότερη απόδοση παρουσίασαν τα δείγματα που προήλθαν από τα μη βρώσιμα τμήματα των καρπών (φλοιό, λευκά τοιχώματα), αλλά και τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης της ποικιλίας ‘Wonderful’. Τα βρώσιμα τμήματα των ελληνικών παραδοσιακών ποικιλιών εμφάνισαν παρόμοια ή και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με την ξένη ποικιλία ‘Wonderful’.

Τα δείγματα ροδιού παρουσίασαν ένα ιδιαίτερο φυτοχημικό προφίλ με κυρίαρχο το ελλαγικό οξύ. Σε υψηλή αφθονία ανιχνεύτηκαν, επίσης, το γαλλικό οξύ, η πουνικαλαγίνη και οι φλαβαν-3-όλες κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και προκυανιδίνη B2. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκε η πολυδατίνη, μία ουσία που δεν έχει μέχρι στιγμής καταγραφεί στο ρόδι. Το ελλαγικό οξύ εμφανίστηκε

σε μεγαλύτερη αφθονία στα μη βρώσιμα τμήματα των καρπών, αλλά και τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης της ποικιλίας ‘Wonderful’.

Σημαντική ήταν η αντιοξειδωτική δράση που εμφάνισαν όλα τα εξεταζόμενα δείγματα ροδιού, τόσο σε εξωκυτταρικό όσο και σε ενδοκυτταρικό (*in vitro*) επίπεδο, με τα μη βρώσιμα τμήματα των καρπών, αλλά και τα υποπροϊόντα της χυμοποίησης της ποικιλίας ‘Wonderful’ να παρουσιάζουν την ισχυρότερη δράση. Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων και στις περισσότερες περιπτώσεις με την περιεκτικότητά τους σε ελλαγικό οξύ. Ωστόσο, λόγω της εμφάνισης υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ, προτείνεται ότι η συνεργηστική δράση του συνόλου των φυτοχημικών συστατικών συμβάλλει αποτελεσματικότερα στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών.

Συμπερασματικά, τα βρώσιμα τμήματα των καρπών των ελληνικών ποικιλιών εμφανίζουν παρόμοιο φυτοχημικό περιεχόμενο με αυτό της ξένης ποικιλίας ‘Wonderful’ και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επομένως, πέρα από τη γευστική τους ιδιαιτερότητα οι ποικιλίες αυτές ενδείκνυνται για κατανάλωση καθώς αποτελούν μία σημαντική πηγή φαινολικών συστατικών με πολλαπλές, δυνητικά ωφέλιμες για την υγεία, βιολογικές δράσεις. Τέλος, τα υποπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας της ποικιλίας ‘Wonderful’ παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο όσο και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν παράγοντας ένα πλήθος παραπροϊόντων όπως καλλυντικές κρέμες. Ωστόσο, η περαιτέρω και πιο εμπειριστατωμένη διερεύνηση του συνόλου των συστατικών του ροδιού κρίνεται απαραίτητη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά τη βιολογική του δράση, αλλά και την αποτελεσματική αξιοποίησή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Πολυσίου, Μ. και Ταραντίλης, Π. (2004). Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα Ενόργανη ανάλυση.

Βαχαμίδης Π. και Βέμμος Σ. (2009). Η ροδιά και η καλλιέργειά της. *Γεωργία - Κτηνοτροφία*, 2, 30-39.

Γάτσιος Κ. (2010). Η ροδιά (καλλιέργεια- χρήσεις- φαρμακευτικές ιδιότητες). *Εκδόσεις Αγρότυπος*, Αθήνα, 20-85.

Γεννάδιος Π.Γ. (1959). Λεξικόν Φυτολογικόν. Β' έκδοσις μετά συμπληρώσεων. Τόμος ΙΙ.

Δρογουδή Π., Τσιπουρίδης Κ. και Πανταζής Σ. (2007). Η καλλιέργεια της ροδιάς. *Γεωργία - Κτηνοτροφία*, 1, 24-29.

Δρογουδή Π. (2009). Ροδιά (*Punica granatum* L): Ο 'κόκκινος χρυσός' της διατροφικής αξίας - μια εναλλακτική καλλιέργεια για την ελληνική ύπαιθρο. *ΕΘΙΑΓΕ*, 38, 4-6.

Καββαδάς Δ. (1956). Εικονογραφημένον Βοτανικόν Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμοι Α-Η, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα.

Λέτσας Α. (1949). Μυθολογία της Γεωργίας. Τόμοι Ι –ΙΙΙ. Θεσσαλονίκη.

Ορφανουδάκη Α. (2012). Προσδιορισμός του φυτοχημικού περιεχομένου και της βιοδραστικότητας των καρπών και προϊόντων (χυμοί) που παράγονται από το ρόδι (*Punica granatum*). Μεταπτυχιακή Διατριβή Γ.Π.Α., Αθήνα.

Ποντίκης Α.Κ. (1996). Ειδική Δεντροκομία. Ακρόδρυα, Πυρηνόκαρπα, Λοιπά Καρποφόρα, *Εκδόσεις Σταμούλη*, Αθήνα, 433-438.

Στυλιανίδης Δ., Σιμώνης Α., Σωτηρόπουλος Θ. και Κουκουρίκου – Πετρίδου Μ. (2009). Το δέντρο της ροδιάς: Ιστορία, Μύθοι, Λαϊκή Παράδοση. *Γεωργία – Κτηνοτροφία*, 3, 30-34.

Τζουραμάνη Ε., Λιοντάκης Α., Σιντόρη Α., Ναβρούζογλου Π., Παπαευθυμίου Μ., Καρανικόλας Π. και Αλεξόπουλος Γ. (2008). Ροδιά. Ινστιτούτο Γεωργοοικονομικών και Κοινωνιολογικών Ερευνών. *ΕΘΙΑΓΕ*.

Ξένη Βιβλιογραφία

Adams L. S., Seeram N. P., Aggarwal B. B., Takada Y., Sand D. and Heber D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate tannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 980–5.

Afaq F., Saleem M., Krueger C. G., Reed J. D. and Mukhtar H. (2005). Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer*, 113, 423–33.

Ahmed S., Wang N., Hafeez B. B., Cheruvu V. K. and Haqqi T. M. (2005). *Punica granatum* L., Extract inhibitors IL-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappa B in human chondrocytes *in vitro*. *J. Nutr.*, 135, 2096–2102.

Albrecht M., Jiang W., Kumi-Diaka J., Lansky E. P. and Gommersall L. (2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J. Med. Food*, 7, 274–83.

Alzamora S. M., Salvatori D., Tapia S. M., López-Malo A., Welti-Chanes J. and Fito P. (2005). Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J Food Eng.*, 67, 205–14.

Al-Zoreky N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.*, 134, 244–8.

Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. Chromatog. A*, 896, 87–93.

Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A. L. and Harotounian S. (2010). Bioactive non coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products:

Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43, 805-813.

Artik N., Murakami H. and Mori T. (1998). Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*, 12, 492-499

Ashawat M.S., Shailendra S. and Swarnlata S. (2007). Biochemical and histopathological studies of herbal cream against Uv radiation induced damage. *Trends Med. Res.*, 2, 135-141.

Ashawat M.S., Saraf S. and Saraf S. (2008). Preparation and characterisation of herbal creams for improvement of skin viscoelastic properties. *Int. J. Cosmetic Sci.*, 30, 183-193.

Aslam M. N., Lansky E. P. and Varani J. (2006). Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J. Ethnopharmacol.*, 103, 311-8.

Athanasas K., Magiatis P., Fokialakis N., Skaltsounis A. L., Pratsinis H. and Kletsas D. (2004). Hyperjovins A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 67, 973-977.

Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., Hayek T., Presser D. and Fuhrman B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062-1076.

Aviram M. and Dornfeld L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin-converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158(1), 195-8.

Aviram M., Rosenblat M., Gaitini D., Nitecki S., Hoffman A., Dornfeld L., Volkova N., Presser D., Attias J., Liker H. and Hayek T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin. Nutr.*, 23(3), 423-33.

- Bagri P., Ali M., Aeri V., Bhowmik M. and Sultana S. (2009). Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 50–4.
- Barzegar M., Fadavi A. and Azizi M. H. (2004). An investigation on the physico-chemical composition of various pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Yazd. *Iranian J. Food Sci. Technol.*, 2, 9–14.
- Basu A. and Penugonda K. (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr. Rev.*, 67(1), 49–56.
- Braga L. C., Shupp J. W., Cummings C., Jett M., Takahaski J. A., Carmo L. S., Chartone-Souza E. and Nascimento A. M. A. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J. Ethnopharmacol.*, 96, 335–9.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Çam M., Hisil Y. and Durmaz G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food. Chem.*, 112, 721–6.
- Can M., Hisil Y. and Gokhan Durmaz G. (2009). Characterization of Pomegranate juices from ten cultivars grown in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 12, 388-395.
- Cerdá B., Espin J. C., Parra S., Martinez P. and Tomas-Barberan F.A. (2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur. J. Nutr.*, 43, 205–20.
- Cerdá B., Periago P., Espín J. C. and Tomás-Barberán F.A. (2005). Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 53(14), 5571-6.
- Chidambara Murthy K. N., Jayaprakasha G. K. and Singh R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4791.

Choi J. G., Kang O. H., Lee Y. S., Chae H. S., Oh Y. C., Brice O. O., Kim M. S., Sohn D. H., Kim H. S., Park H., Shin D. W., Rho J. R. and Kwon D. Y. (2009). In vitro and in vivo antibacterial activity of Punica granatum peels ethanol extract against salmonella. *Evid. Based Compl. Alter. Med.*, 17, 1–8.

Clifford M. N. and Scalbert A. (2000). Review: ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.*, 80, 1118–25.

Das A. K., Mandal S. C., Banerjee S. K., Sinha S., Saha B. P. and Pal M. (2001). Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother. Res.*, 15(7), 628–9.

Davidson M. H., Maki K. C., Dicklin M. R., Feinstein S. B., Witchger M. S., Bell M., McGuire D. K., Provos J. C., Liker H. and Aviram M. (2009). Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame. J. Cardiol.*, 104(7), 936–42.

E.C. (European Commission). (1999). European Commission concerted action on functional food science in Europe: Scientific concepts of functional foods in Europe. *Br. J. Nutr.* 81(1), 1–27.

El-Nemr S. E., Ismail I. A. and Ragab M. (2006). Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Die Nahrung*, 34(7), 601–6.

Esmailzadeh A. and Azadbakht L. (2008). Food intake patterns may explain the high prevalence of cardiovascular risk factors among Iranian women. *J. Nutr.*, 138(8), 1469–75.

Evreinoff V. A. (1953). Pomological studies of the pomegranate. *Ecol. Nat. Super. Agron*, 1, 141-154.

Fadavi A., Barzegar M., Azizi M.H. and Bayat M. (2005). Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci. Technol. Int.*, 11, 113–9.

Fadavi A., Barzegar M. and Azizi, H. M. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oil seed of 25 pomegranates varieties grown n Iran. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 676-80.

Felgines C., Talavéra S., Gonthier M. P., Texier O., Scalbert A., Lamaison J. L., Rémésy C. (2003). Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J. Nutr.*, 133(5), 1296-301.

Fuhrman B., Volkova N. and Aviran M. (2005). Pomegranate juice oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J. Nutr. Biochem.*, 16, 570–6.

Galaverna G., Di Silvestro G., Cassano A., Sforza S., Docena A., Drioli E. and Marchelli R. (2008). A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chem.*, 106, 1021–30.

Pande G. and Akoh.C. C. (2009). Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9427–9436

Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. and Kader A. A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48(10), 4581-9.

Gould S. W. J., Fielder M. D., Kelly A. F. and Naughton D. P. (2009). Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. *BMC Comple. Alter. Med.*, 9, 23.

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

Harborne J. B. (1989) *Methods in plant biochemistry, I: Plant phenolics*. Academic Press, London.

Harborne J. B. (1993). *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London.

Heinecke J. W. (2006). Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander. *J. Exp. Med.*, 203(4), 813–6.

Hodgson, R.W. (1917). The pomegranate. *Calif. Agr. Expt. Sta. Bul.*, 276, 162-163.

Huang T. H. W., Peng G., Kota B. P., Li G. Q., Yamahara J., Roufogalis B. D. and Li Y. (2005). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 207, 160–9.

I.F.I.C. (International Food Information Council). (2009). Functional foods: attitudinal research. (<http://www.ific.org/research/funcfoodsres02.cfm>).

I.F.T. (Institute of Food Technologists). (2009). Functional foods: opportunities and challenges. Institute of Food Technologists web site. (http://members.ift.org/IFT/Research/IFTExpertReports/functionalfoods_report.htm).

Jahfar M., Vijayan K. K. and Azadi P. (2003). Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res. J. Chem. Environ.*, 7, 43–50.

Jaiswal V., DerMarderosian A. and Porter J. R (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem.*, 118, 11-16.

Jorgensen S. and Brennan C. (2005). Pomegranates. Preserve the harvest, 7, 1-4.

Jurenka J. (2008). Therapeutic application of Pomegranate (*Punica granatum* L.). A review. *Alternative Medicine Review*, 13, 128-144.

Kaur C. D. and Saraf S. (2012). Development of Photoprotective Creams with Antioxidant Polyphenolic Herbal Extracts. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(7), 83.

Katz S. R., Newman R. A. and Lansky E. P. (2007). *Punica granatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *J. Med. Food*, 10(2), 213–7.

Kelawala N. S. and Ananthanrayan L. (2004). Antioxidant activity of selected foodstuffs. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 55(4), 511-516.

Kihara H. (1958). Breeding of seedless fruit. *Seiken Ziho*, 9, 1-7.

Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. and Lansky E.

(2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 71(3), 203-17.

Koyama S., Cobb L. J., Mehta H. H., Seeram N. P., Heber D., Pantuck A. J., Cohen P. (2010). Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm. IGF Res.*, 20(1), 55–62.

Lansky E. P., Harrison G., Froom P. and Jiang W. G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest. New Drugs.*, 23(2), 121-2.

Lansky E. P. (2006). Beware of pomegranates bearing 40% ellagic Acid. *J. Med. Food.*, 9(1), 119-22.

Lansky E.P. and Newman R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for the prevention and treatment of cancer and inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177-206.

Lavker R. M. (1995). Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: Gilchrest BA, editor. Photodamage. Cambridge, Mass.: *Blackwell Science*, 123–35.

Li Y., Wen S., Kota B. P., Peng G., Li G. Q., Yamahara J. and Roufogalis B. D. (2005). *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.*, 99, 239–44.

Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. and Cheng S. (2006). Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.

Li Y., Qi Y., Huang T. H. W., Yamahara J. and Roufogalis B. D. (2008). Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α / γ activator properties. *Diab. Obes. Meta.*, 10(1), 10–7.

Loch T., Michalski B., Mazurek U. and Graniczka M. (2001). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in neoplastic process. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, 55, 257–274.

López A. D., Mathers C. D., Ezzati M., Jamison D. T. and Murray C. J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet.*, 367, 1747–57.

Malešev D. and Kuntić V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72, 921-939.

Matsui T., Ebuchi S., Kobayashi M., Fukui K., Sugita K., Terahara N. and Matsumoto K. (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7244–8.

Mayer D., Muhlhofer A., Biesalski H. K. (2001). A modified system to evaluate the potency of anti-oxidative compounds in different cell types in vitro. *Eur. J. Med. Res.*, 6, 201-208.

McCarrell E. M., Gould S. W. J., Fielder M. D., Kelly A. F., El-Sankary W., Naughton D.P. (2008). Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Comple. Alter Med* 8:64.

Meerts, I.A.T.M., Verspeek - Ripa, C.M., Buskensa, C.A.F., Keizerb, H.G., Bassaganya - Rierac, J., Jounid, Z.E., van Huygevoorte, A.H.B.M., van Otterdijke, F.M. & van de Waart E.J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1085–1092.

Mehta R. and Lansky E. P. (2004). Breast cancer chemopreventive properties of Pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *Eur. J. Cancer Prev.*, 13, 345.

Milbury P. E., Cao G., Prior R. L. and Blumberg J. (2002). Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Develop.*, 123, 997.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V. and Milner A. (1993). A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84, 407-12.

Mirdehghan S.H. and Rahemi M., (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit. *Sci. Hort.*, 111(2), 120–7.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55-63.

Nacz M. and Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.*, 1054, 95-111.

Nacz, M. and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables, occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1523–1542.

Noda Y., Kaneyuka T., Mori A. and Packer L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 166–71.

Ohno T., Kato N., Ishii C., Shimizu M., Ito Y., Tomono S. and Kawazu S. (1993). Genistein augments cyclic adenosine 3'5'-monophosphate (CAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr. Res.*, 19, 273–85.

Ozgul-Yucel S. (2005). Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 82(12), 893–7.

Pan Z., Qu W., Ma H., Atungulu G.G. and McHugh, T.H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365–372.

Pande G. and Akoh.C. C. (2009). Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9427–9436

Parmar H. S. and Kar A. (2007). Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan-treated male mice. *Bio.Fac.*, 31(1), 17–24.

Petti S. and Scully C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: a review. *J. Dent.* 37, 413–23.

Plumb G. W., de Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C. and Williamson G. (2002). Antioxidant properties of gallocatechin and prodelpinidins from pomegranate peel. *Redox Rep.*, 7, 41–46.

Polagruto J. A., Schramm D. D., Wang-Polagruto J. F., Lee L. and Keen C. L. (2003). Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. *J. Med. Food.*, 6(4), 301-308.

Poyrazoglu E., Gokmen V. and Artik N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 567-575.

Prashanth D. J., Asha M. K. and Amit A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72, 171–3.

Prior R., Xianli W. and Schaich K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 1841-1856.

Raybaudi-Massilia R. M., Mosqueda-Melgar J., Soliva-Fortuny R. and Martín-Belloso O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 8, 157–80.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannal A., Yan M. and Rice - Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicle Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Reddy M. K., Gupta S. K., Jacob M. R., Khan S. I. and Ferreira D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.*, 73, 461–7.

Regev-Shoshani G., Shoseyov O., Bilkis I. and Kerem Z. (2003). Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.*, 374(1), 157-63.

Robards K. and Antonovich M. (1997). Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, A Review. *Analyst.*, 122, 11R-34R.

- Robbins R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866-2887.
- Romero-Perez A. I., Ibern-Gomez M., Lamuela-Raventós R. M. and Carmen de la Torre-Boronat M. (1999). Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1533–1536.
- Santos-Buelga C. (2003). Methods in polyphenol analysis. Universidad de Salamanca, Spain.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 45, 287–306.
- Schubert S. Y., Lansky E. P. and Neeman I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J. Ethnopharmacol.*, 66, 11.
- Seeram N. P., Lee R. and Heber D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin. Chim. Acta.* 348, 63–8.
- Seeram N. P., Lee R., Hardy M. and Heber D. (2005a). Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep. Purif. Technol.* 41, 49–55.
- Seeram N. P., Adams L. S. and Henning S.M. (2005b). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.*, 16 (6), 360–7.
- Seeram N. P., Schulman R. N. and Heber D. (2006). Pomegranates. Ancient Roots to Modern Medicine. *CRC Press, Taylor and Francis Group.*
- Seeram N. P., Zhang Y., McKeever R., Henning S. M., Lee R. P., Suchard M. A., Li Z., Chen S., Thames G., Zerlin A., Nguyen M., Wang D., Dreher M. and Heber D. (2008). Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J. Med. Food*, 11(2), 390–4.

Settheetham W. and Ishida T. (1995). Study of genotoxic effects of antidiarrheal medicinal herbs on human cells *in vitro*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 26(1), 306.

Singleton V. L. and Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158

Stover E. and Mercure E. W. (2007). The Pomegranate: A new look at the fruit of Paradise. *HortScience*, 42, 1088-1092.

Syed D. N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Afaq F. and Mukhtar H. (2006). Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, 82(2), 398-405.

Syed D. N., Afaq F. and Mukhtar H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem. Cancer Biol.*, 17, 377-85.

Tezcan F., Gültekin-Özguven M., Diken T., Özcelik B. and Erim, F.B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid, and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem.*, 115, 873-877.

Toi M., Bando H., Ramachandran C., Melnick S. J., Imai A., Fife R. S., Carr R. E., Oikawa T. and Lansky E. P. (2003). Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions *in vitro* and *in vivo*. *Angiogenesis*. 6(2), 121-8.

Tsao R. and Yang R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1018, 29-40.

Tzulker R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M. and Amir R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9559-70.

Ulrike A.F., Reinhold C., Dietmar R. K. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from Pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 807-821.

van Elswijk D. A., Schobel U. P., Lansky E. P., Irth H. and van der Greef J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65, 233-41.

Vinson A. J. (1998). Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Flavonoids in the living system*. Plenum Press, New York, 151-164.

Voravuthikunchai S. P., Sririrak T., Limsuwan S., Supawita T., Iida T. and Honda T. (2005). Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Health Sci.*, 51(5), 590–6.

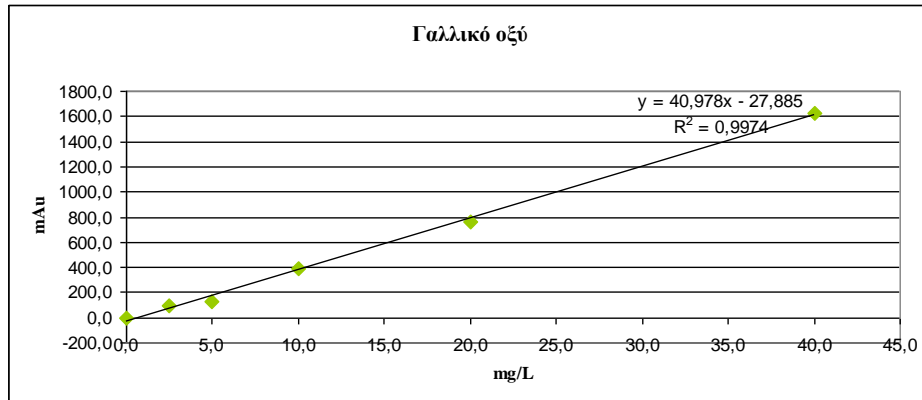
Waltner-Law M. E., Wang X. L., Law B. K., Hall R. K., Nawano M. and Granner D. K. (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.*, 277, 34933–40.

Widmer R., Ziaja I. and Grune T. (2006). Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radical Res.*, 40(12), 1259–68.

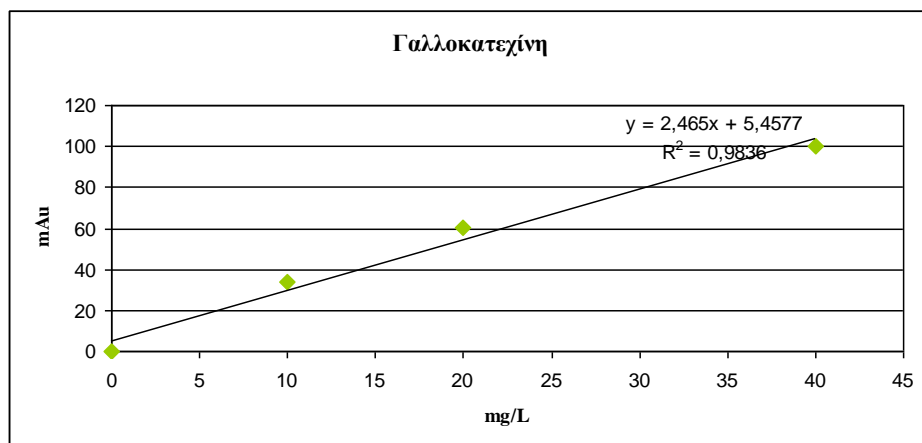
Wu X., Cao G. and Prior R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.*, 132, 1865.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

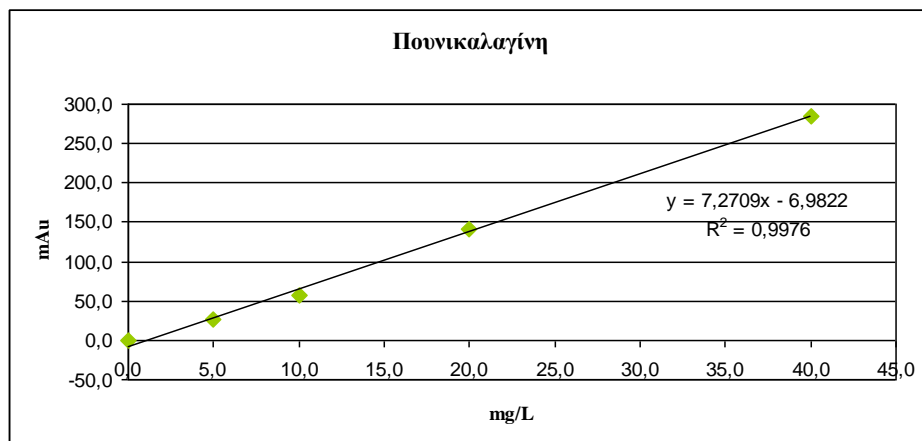
Παράρτημα 1. Καμπύλες αναφοράς πρότυπων ουσιών



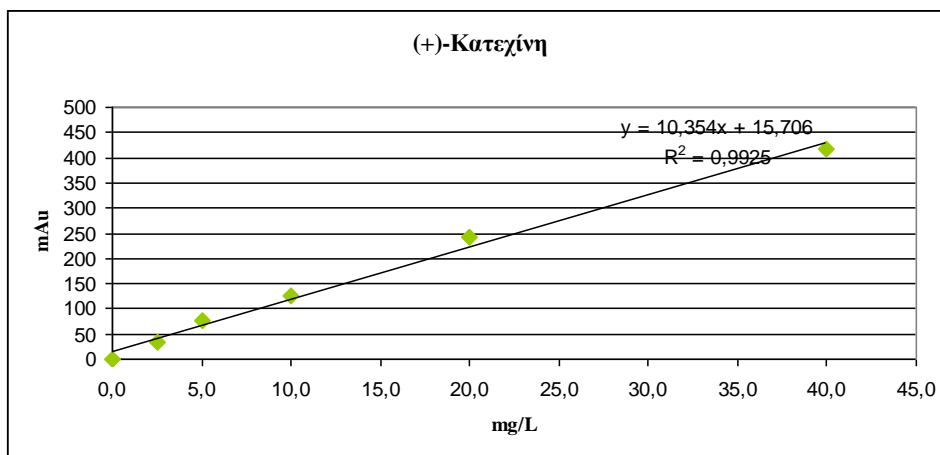
Διάγραμμα 1.1



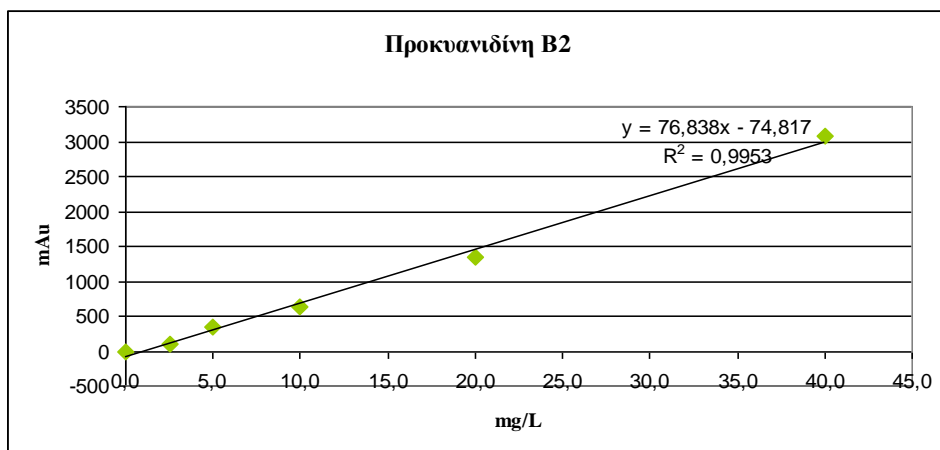
Διάγραμμα 1.2



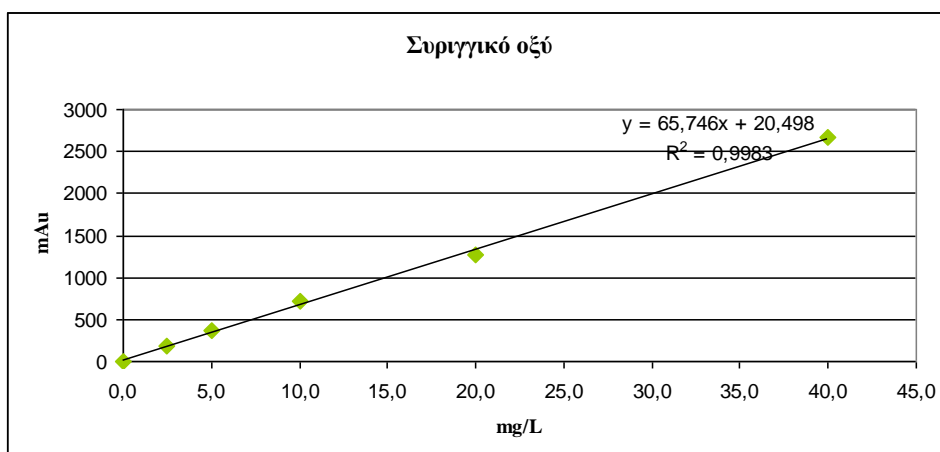
Διάγραμμα 1.3



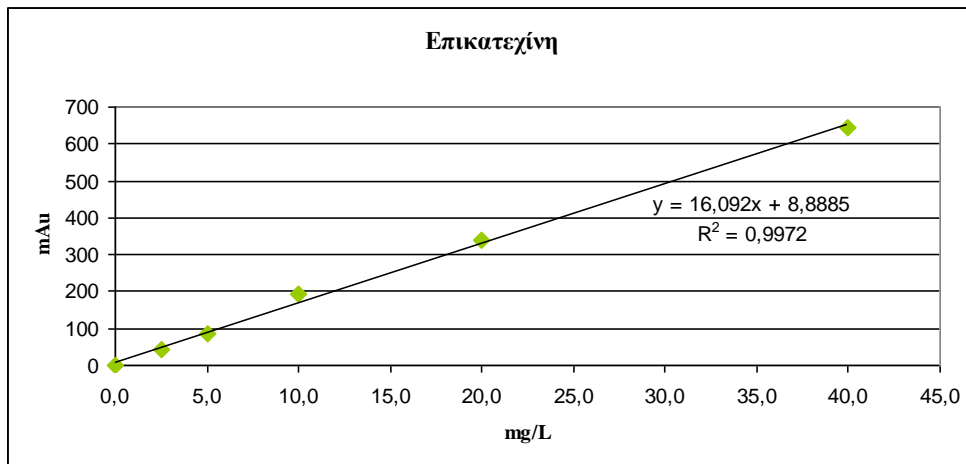
Διάγραμμα 1.4



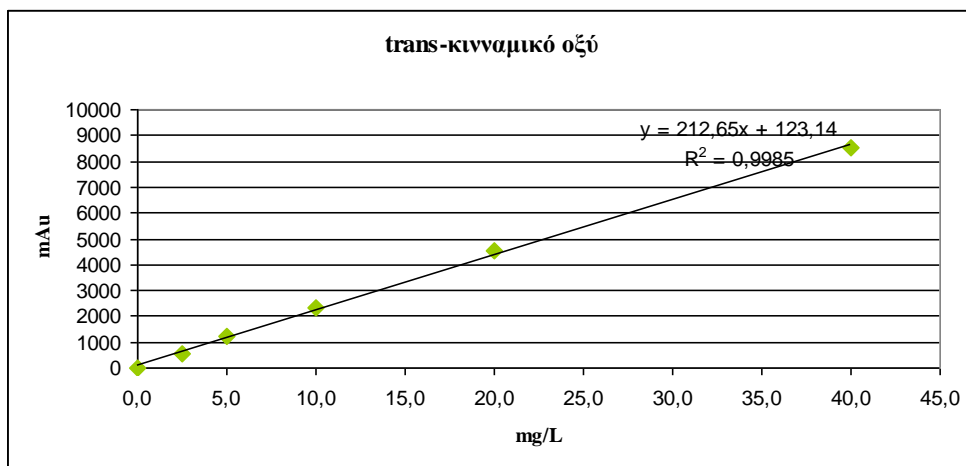
Διάγραμμα 1.5



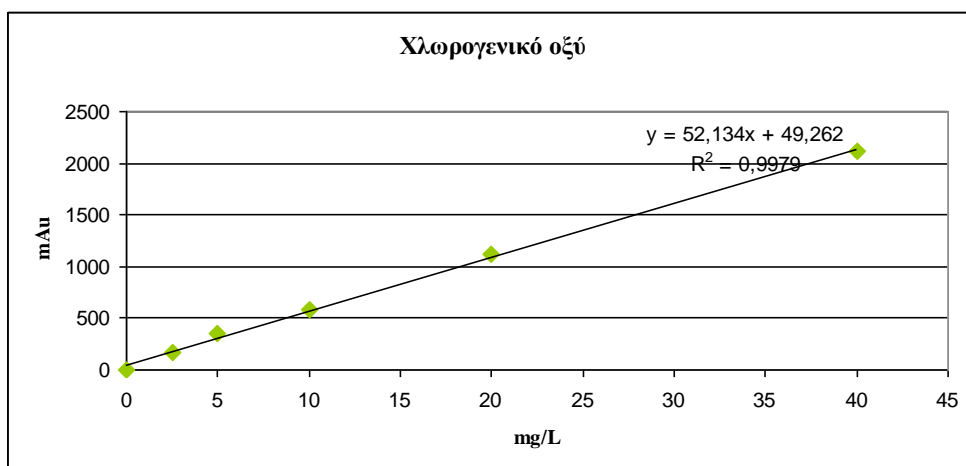
Διάγραμμα 1.6



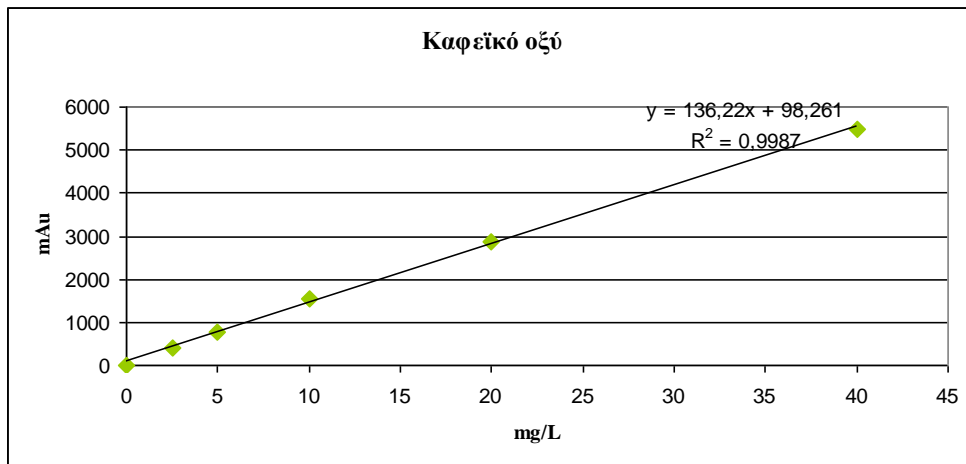
Διάγραμμα 1.7



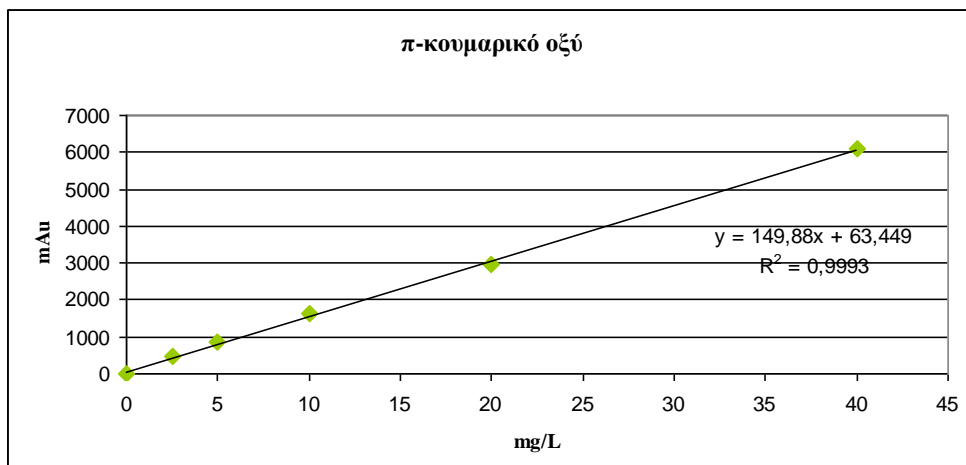
Διάγραμμα 1.8



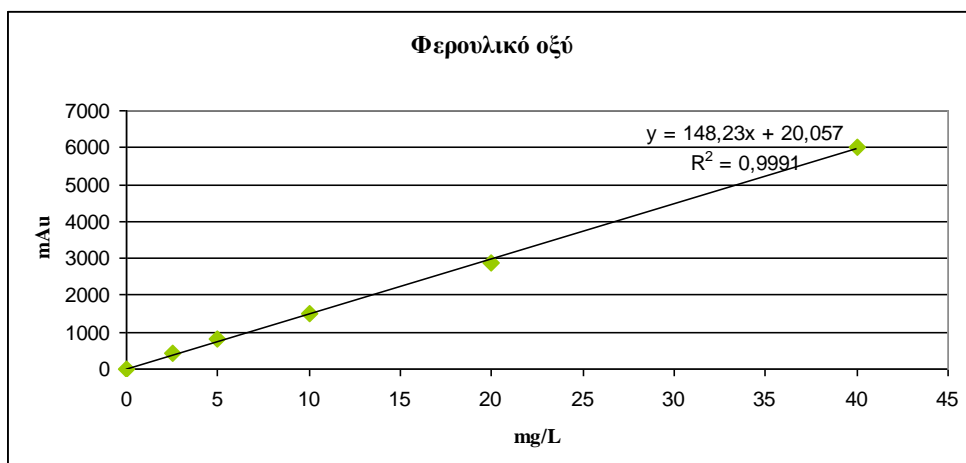
Διάγραμμα 1.9



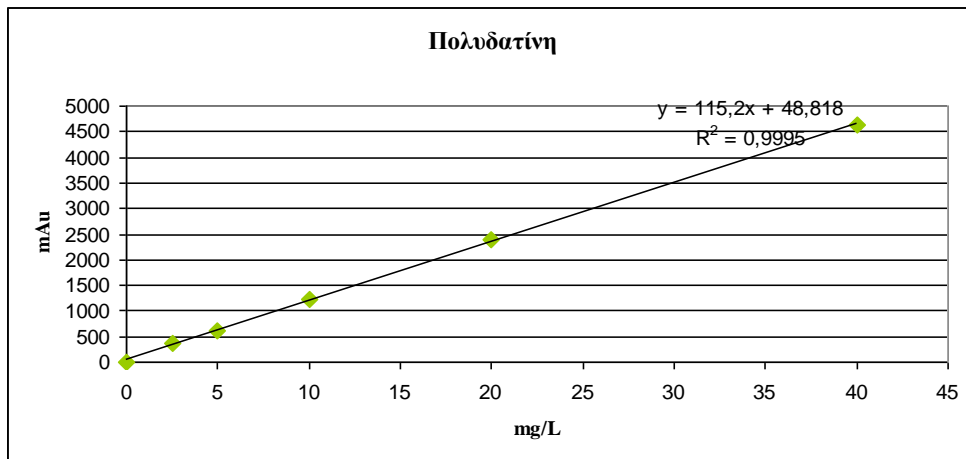
Διάγραμμα 1.10



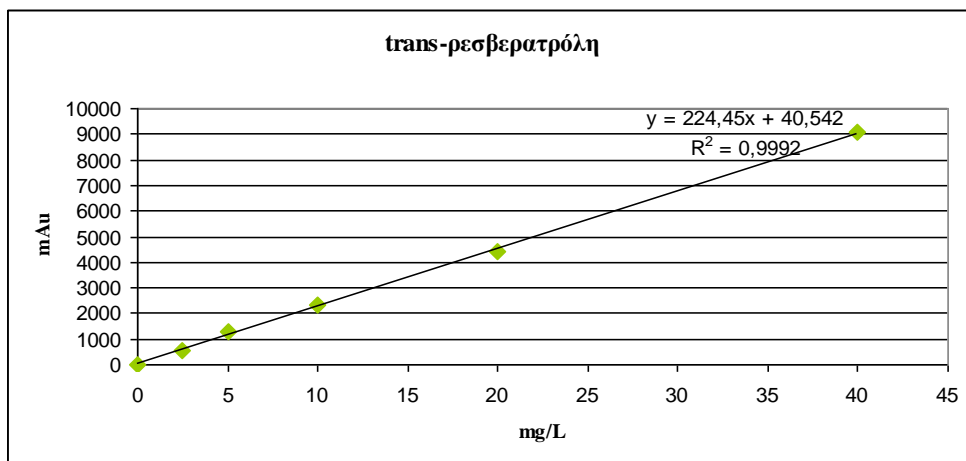
Διάγραμμα 1.11



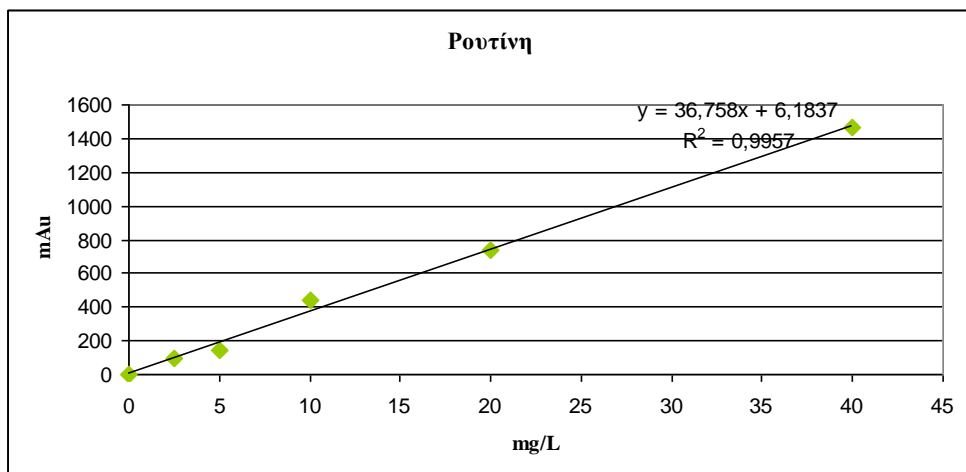
Διάγραμμα 1.12



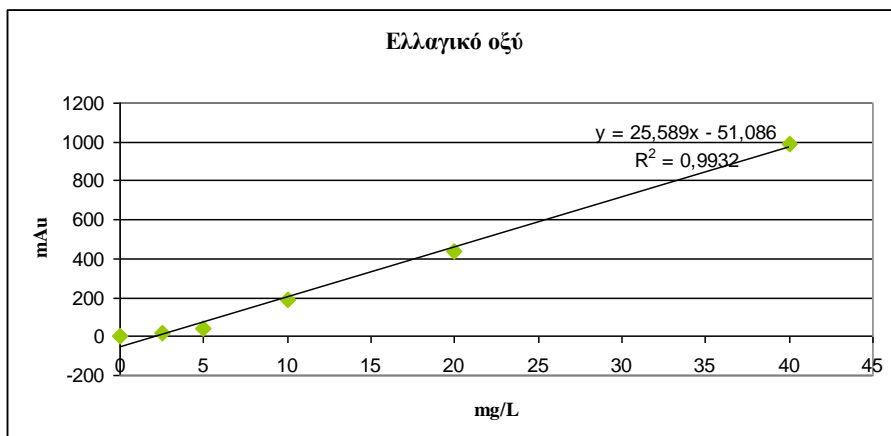
Διάγραμμα 1.13



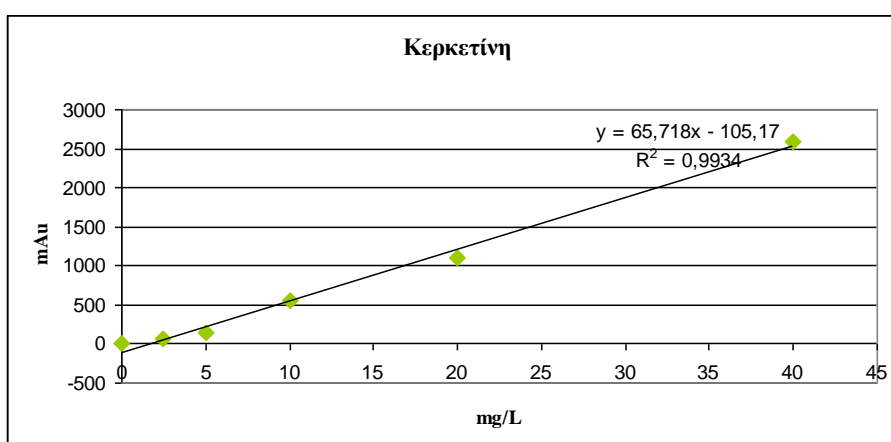
Διάγραμμα 1.14



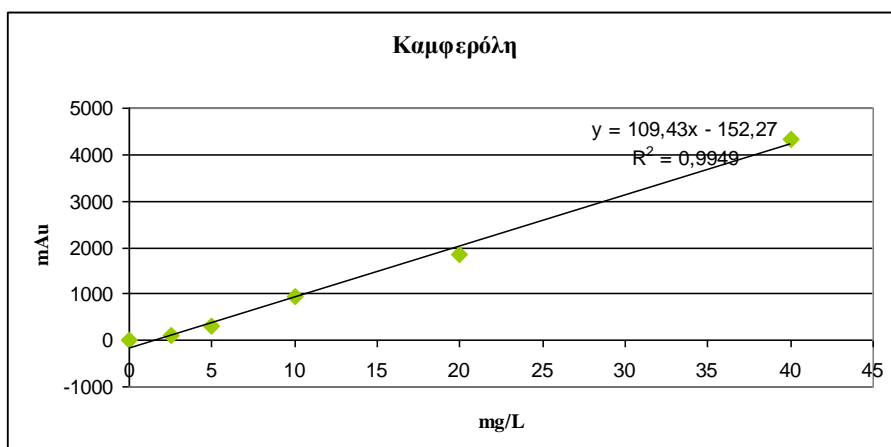
Διάγραμμα 1.15



Διάγραμμα 1.16

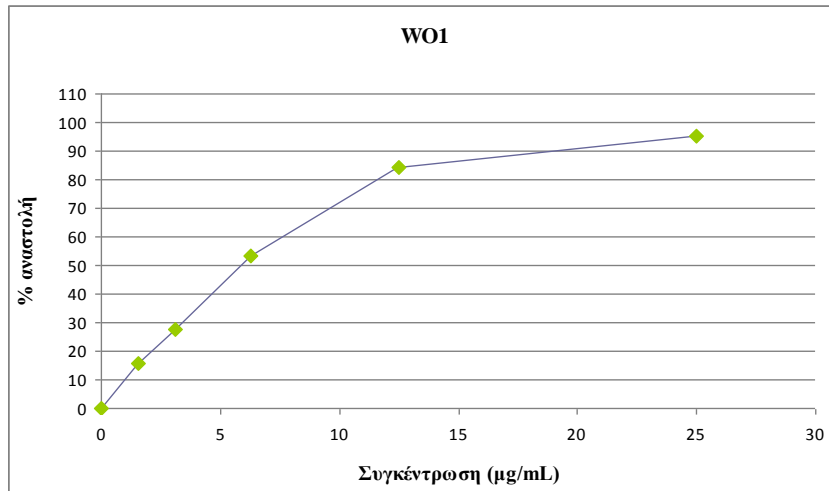


Διάγραμμα 1.17

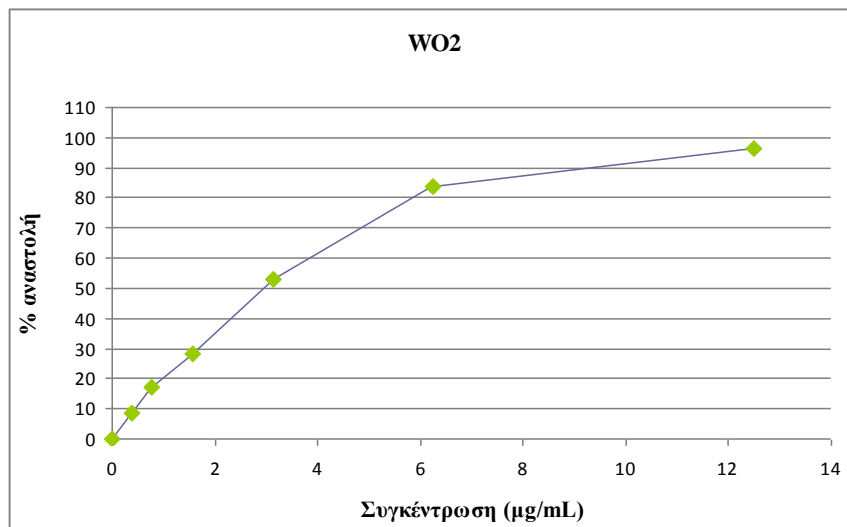


Διάγραμμα 1.18

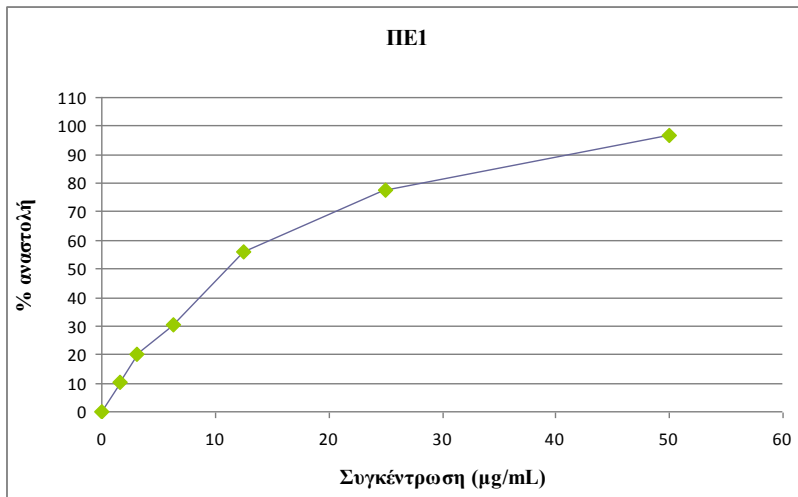
Παράρτημα 2. % Αναστολή της ρίζας DPPH



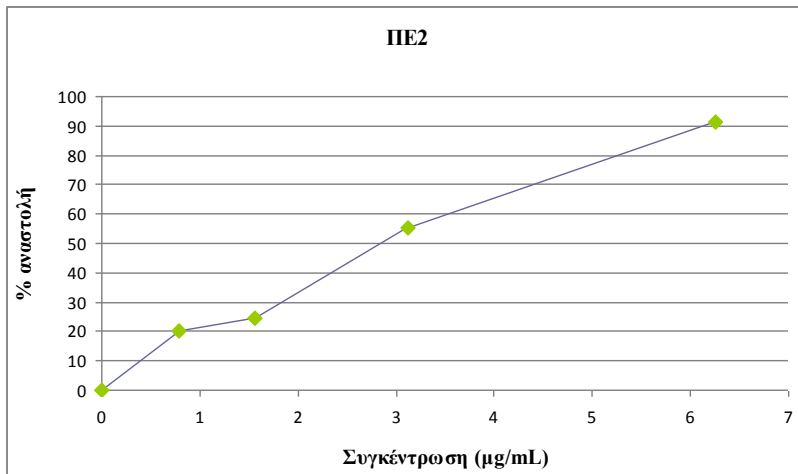
Διάγραμμα 2.1



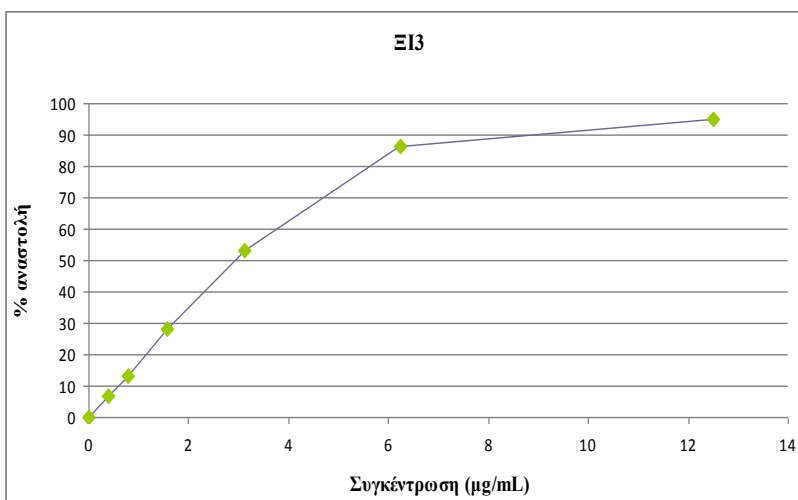
Διάγραμμα 2.2



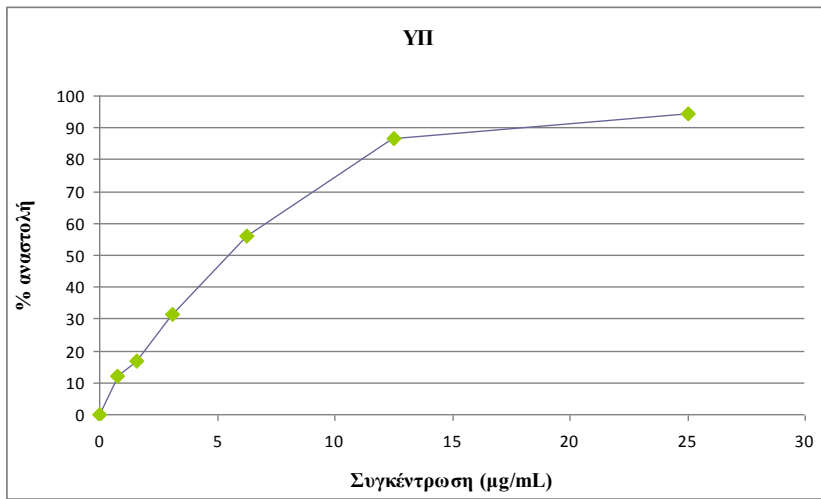
Διάγραμμα 2.3



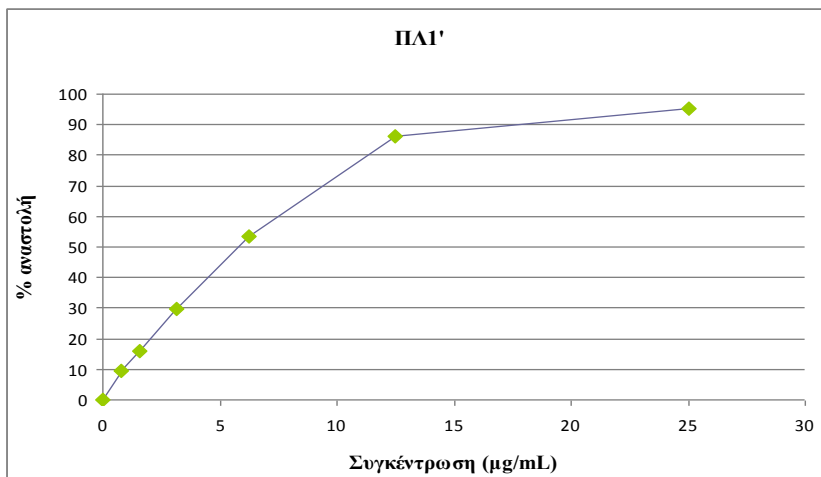
Διάγραμμα 2.4



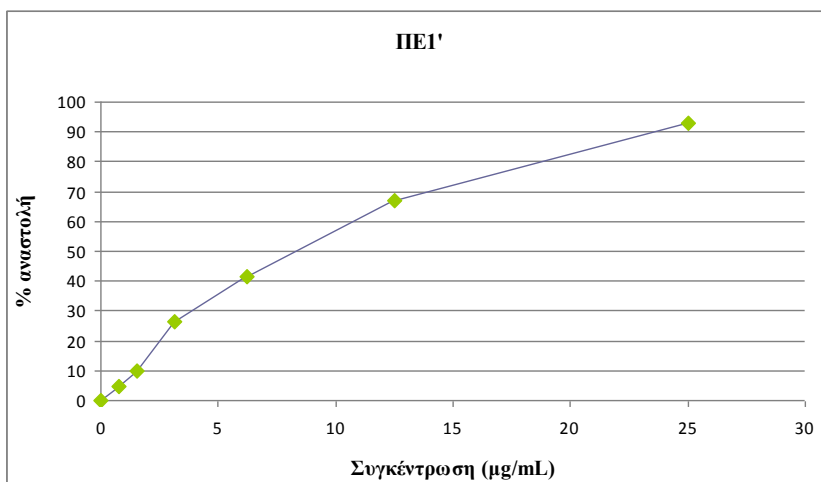
Διάγραμμα 2.5



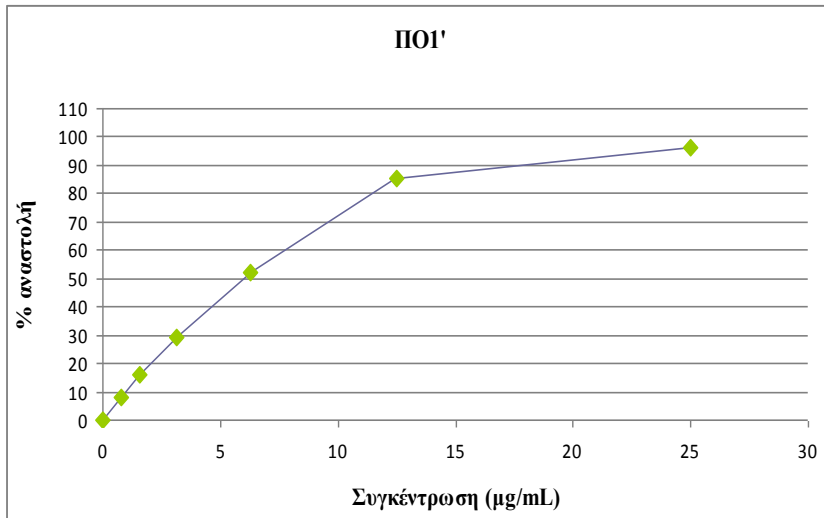
Διάγραμμα 2.6



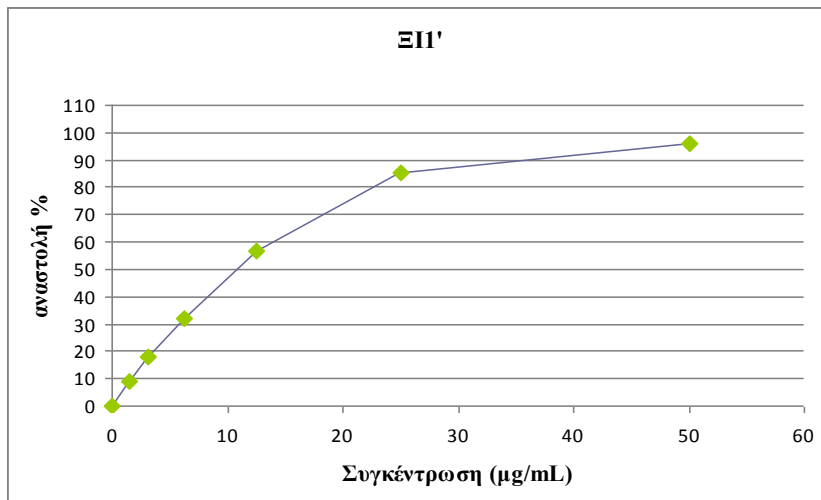
Διάγραμμα 2.7



Διάγραμμα 2.8

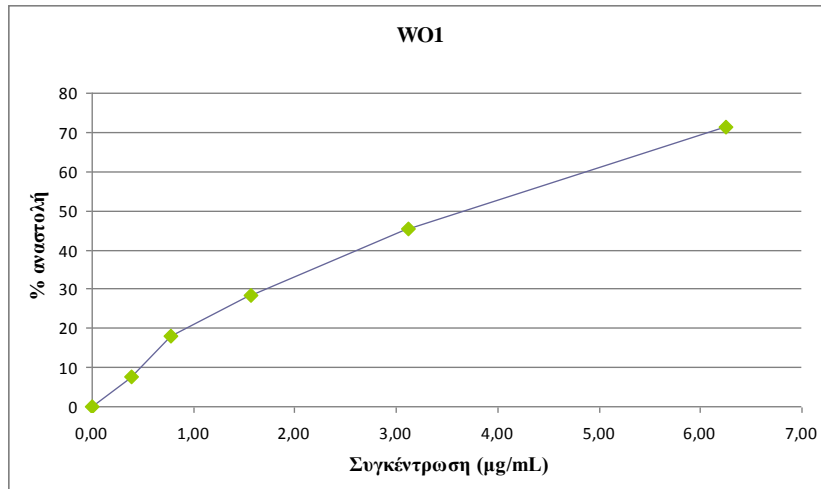


Διάγραμμα 2.9

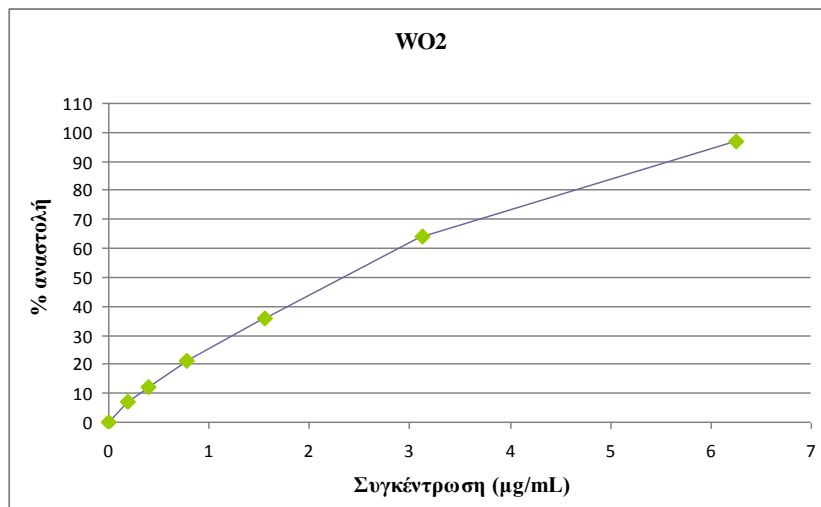


Διάγραμμα 2.10

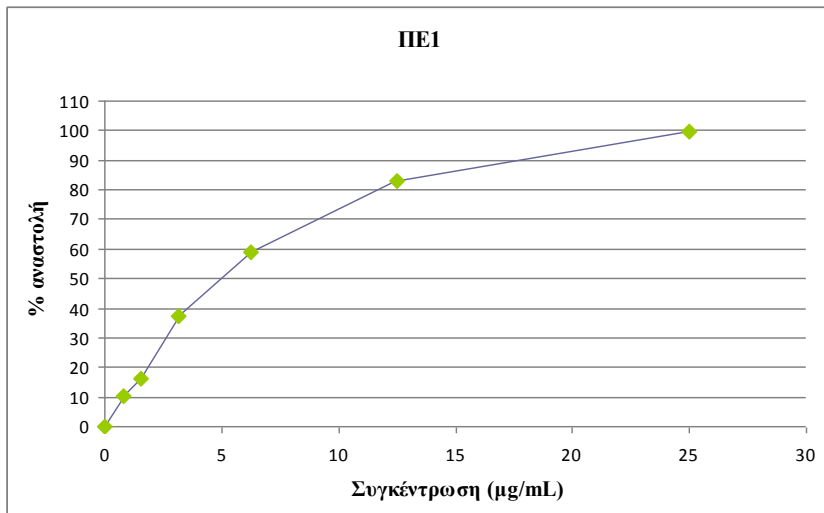
Παράρτημα 3. % Αναστολή της ρίζας ABTS



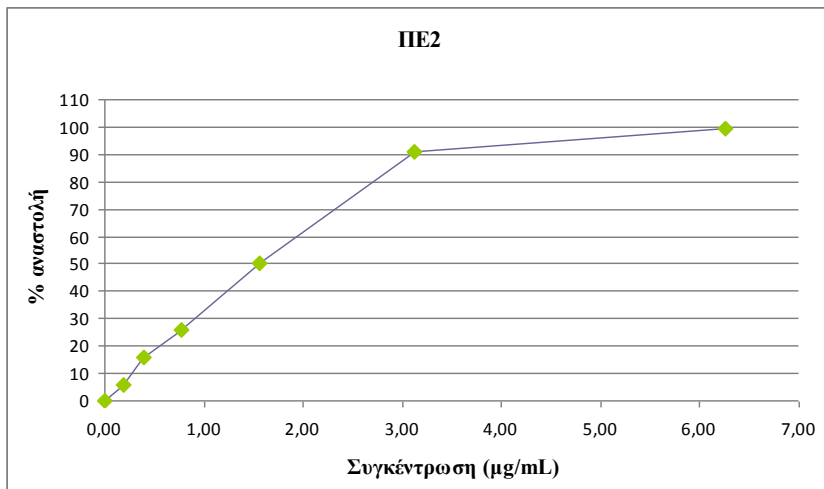
Διάγραμμα 3.1



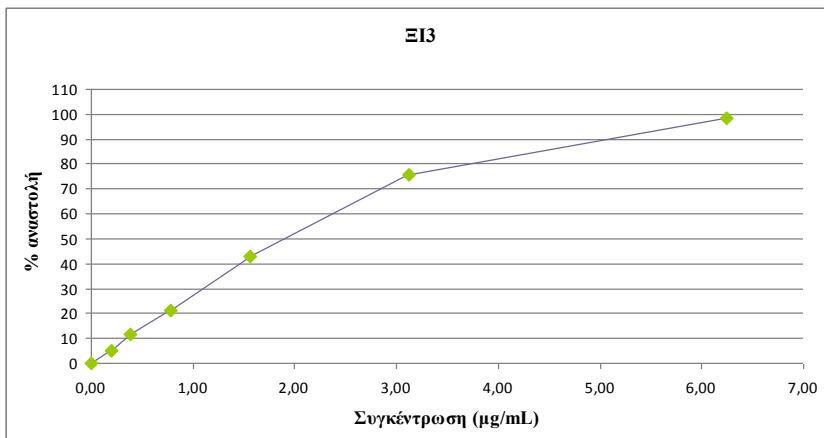
Διάγραμμα 3.2



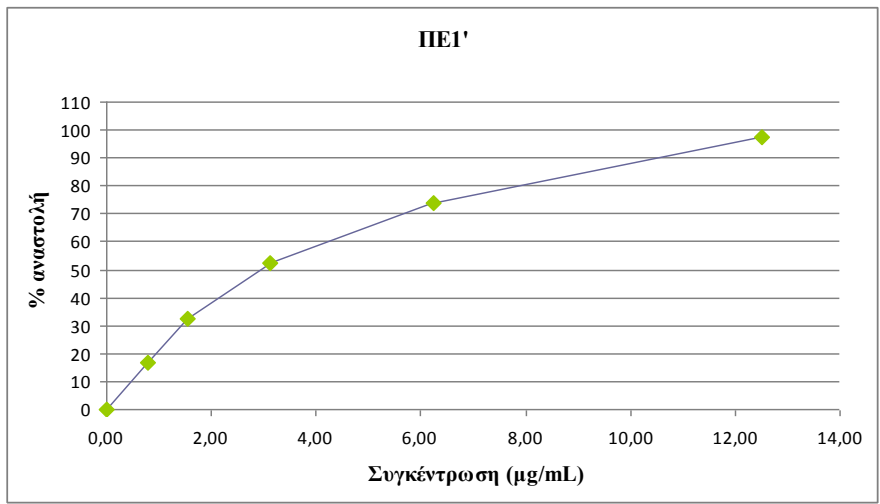
Διάγραμμα 3.3



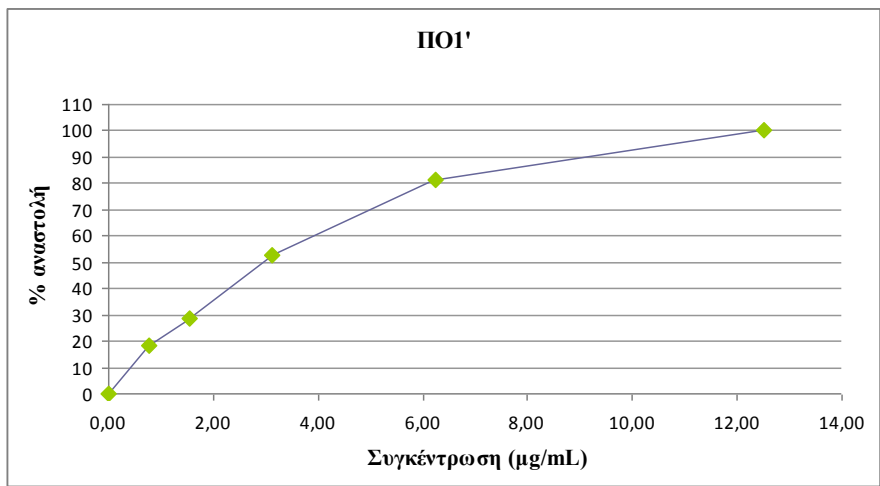
Διάγραμμα 3.4



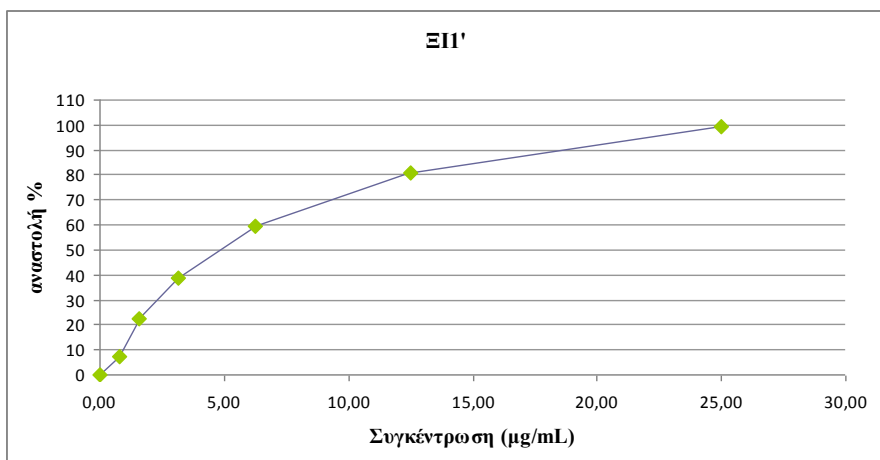
Διάγραμμα 3.5



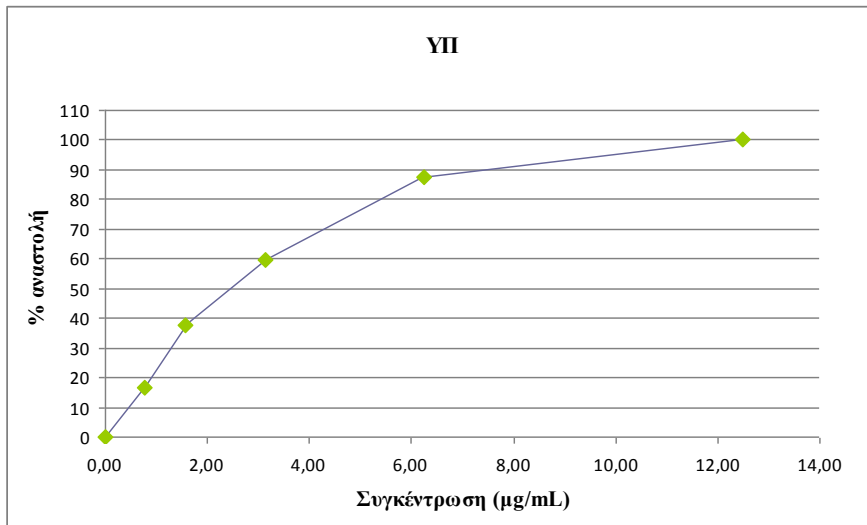
Διάγραμμα 3.6



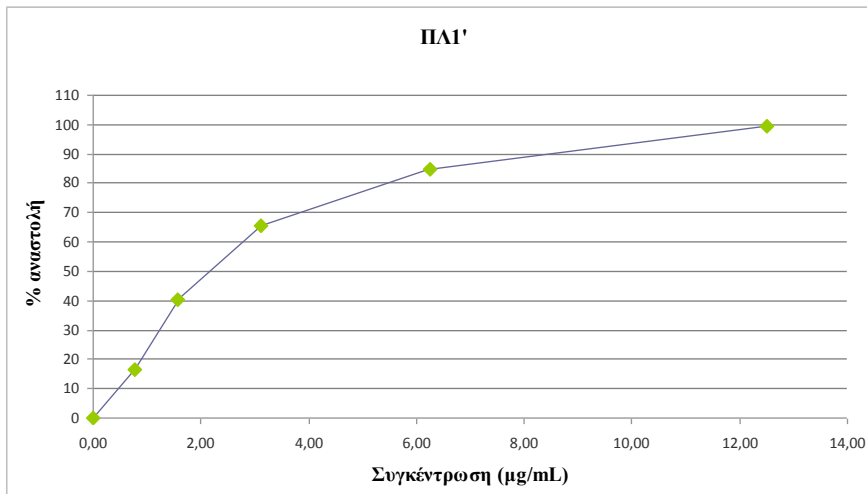
Διάγραμμα 3.7



Διάγραμμα 3.8



Διάγραμμα 3.9



Διάγραμμα 3.10

