

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ **ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »

ΚΟΥΤΣΟΝΑΚΟΥ Ν. ΣΩΤΗΡΙΑ

Γεωπόνος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ
ΧΥΜΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ**



ΛΑΡΙΣΑ 2019

«Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας σε χυμούς που παράγονται από ελληνικές εταιρείες»

«Assessment and comparison of antioxidant activity of greek commercial juices»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (Επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βασιλική Σκαμνάκη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας- Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά, τον επίκουρο καθηγητή Κο Στάγκο Δημήτριο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υπομονή που έκανε κατά την διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του στην επίλυση των θεμάτων που προέκυπταν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Κο Κουρέτα Δημήτριο που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του.

Ευχαριστώ, επίσης, την ομάδα του εργαστηρίου για την στήριξη τους, την συνεργασία τους και την καθοδήγηση τους καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που με προέτρεπαν στη γνώση και είχαν πάντοτε στόχο, εκτός από καλύτερο παιδί, να γίνω και καλύτερη επιστήμονας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον άντρα μου για την στήριξη και την τεράστια υπομονή του.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ενδιαφέρον για ένα διαφορετικό τρόπο ζωής και διατροφής με την επιλογή τροφών που συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της υγείας. Για παράδειγμα, τροφές που είναι πλούσιες σε αντιοξειδωτικά μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση της κατάστασης του οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια στις ασθένειες που σχετίζονται με αυτό όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρυνση και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Καθώς υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις από μελέτες ότι τα φρούτα εμπεριέχουν μεγάλα ποσοστά βιοδραστικών μορίων με έντονη αντιοξειδωτική δράση, το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης εστιάστηκε στην αντιοξειδωτική ικανότητα που μπορούν να εμφανίσουν χυμοί φρούτων που διατίθενται στην ελληνική αγορά. Για το σκοπό αυτό σε 26 φυσικούς χυμούς που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους της εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+}. Επίσης, προσδιορίστηκε στους χυμούς το ολικό πολυφαινόλικό τους περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην περιεκτικότητα των χυμών σε ολικές πολυφαινόλες και τα επίπεδα IC₅₀ στην εξουδετέρωση του DPPH[•] και ABTS^{•+} που δείχνει πως η παρουσία πολυφαινολών παίζει τον κύριο ρόλο στην αντιοξειδωτική τους δράση. Παράλληλα επιχειρήθηκε κατηγοριοποίηση των χυμών ανάλογα με τα φρούτα από τα οποία προέρχονται και τα αποτελέσματα κατέδειξαν την ισχυρή αντιοξειδωτική ισχύ των χυμών εκείνων που περιέχουν σε οποιαδήποτε αναλογία χυμό ροδιού με μεγάλη διαφορά από τους αντίστοιχους που περιέχουν πορτοκάλι ή άλλα φρούτα. Η παρούσα εργασία σε συνδυασμό με περαιτέρω μελέτες μπορεί να αποτελέσει σημαντικό οδηγό στην επιλογή των καταναλωτών για την εύρεση των κατάλληλων τροφίμων που θα συμβάλουν στη λήψη μιας ισορροπημένης διατροφής.

Abstract

Nowadays, many people have been interested for a different lifestyle by choosing the appropriate foods that have beneficial effects on human health. For example, foods rich in antioxidants compounds may play a key role in the treatment of oxidative stress and consequently in diseases associated with it such as cancer, atherosclerosis and neurodegenerative diseases. As there is a significant evidence from studies that fruits contain high levels of bioactive molecules with strong antioxidant activity, the aim of the present study was to examine the antioxidant capacity of Greek commercial fruit juices. For this purpose, 26 natural commercial juices were collected and their antioxidant capacity was evaluated by using two spectrophotometric methods, the DPPH • and ABTS•+. Moreover, the total polyphenolic content of the juices was assessed. The results showed a significant negative correlation between total polyphenolic content and IC₅₀ levels of DPPH• and ABTS•+ assays, indicating that the presence of polyphenols may play a significant role in the scavenging of free radicals. Moreover, the juices were separated according to the fruits that they contain. The results showed a higher antioxidant activity of those juices that contain any proportion of pomegranate juice than those containing orange or other fruits. The present study along with further ones may help the customers for choosing the appropriate foods that will help them to have a balanced diet which will be beneficial for their health.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
Περιεχόμενα	
1.Εισαγωγή	10
1.1 Γενικά	10
1.1.2 Φρούτα: Φυσιολογία και χημική σύσταση	11
1.1.3 Κατηγορίες εμπορικών χυμών	12
1.2 Ελεύθερες ρίζες	14
1.2.1 Δραστικές μορφές	14
1.3 Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών	16
1.4 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	17
1.4.1 Ενδοκυτταρικές πηγές	17
1.4.2 Εξωκυτταρικές πηγές	19
1.5 Αντιοξειδωτικά συστήματα	20
1.5.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων	21
1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση των χυμών φρούτων	23
1.5.3 Κατηγορίες πολυφαινόλων	24
1.5.4 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινόλων	26
1.6 Οξειδωτικό στρες	27
Σκοπός της μελέτης	28
2. Πειραματικό μέρος	29
2.1 Ανάλυση Δειγμάτων	29
2.2 Υλικά και μέθοδοι	30
2.3 Προεπεξεργασία δειγμάτων	30
2.3.1 Η μοριακή μέθοδος DPPH	30
2.3.2 Η μοριακή μέθοδος ABTS	32
2.3.3 Η μοριακή μέθοδος Folin-Ciocalteu	34
2.4 Στατιστική ανάλυση	35
3. Αποτελέσματα	36
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•	36
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•	51
3.3 Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας των χυμών σε ολικές φαινόλες και φλαβονοειδή με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	66
3.4 Στατιστική συσχέτιση	67
4. Συζήτηση	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

Περιεχόμενα Γραφημάτων

Γράφημα 1: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Goji Berry	36
Γράφημα 2: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Ρόδι	37
Γράφημα 3: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Αρώνια	37
Γράφημα 4: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Σταφύλι/Πορτοκάλι/Ρόδι.	38
Γράφημα 5: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Ακτινίδιο/Πράσινο μήλο/Σπιρουλίνα	38
Γράφημα 6: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό 9 Φρούτα (2)	39
Γράφημα 7: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο(1)	39
Γράφημα 8: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Πορτοκάλι (1)	40
Γράφημα 9: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Blueberry/Raspberry/Cranberry	40
Γράφημα 10: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Blueberry/Raspberry/Ρόδι	41
Γράφημα 11: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό 9 Φρούτα (4)	41
Γράφημα 12: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό 9 Φρούτα (3)	42
Γράφημα 13: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Βύσσινο	42
Γράφημα 14: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Δαμάσκηνο	43
Γράφημα 15: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο(2)	43
Γράφημα 16: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό 9 φρούτα (1)	44
Γράφημα 17: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Σαγκουίνι/Μανταρίνι	44
Γράφημα 18: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Πορτοκάλι/Παντζάρι/Καρότο	45
Γράφημα 19: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό 9 Φρούτα (5)	45
Γράφημα 20: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Πορτοκάλι. (3)	46
Γράφημα 21: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από το χυμό Μήλο/Αρώνια/Σταφύλι/Ρόδι.	46

Γράφημα 22: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Γκρεϊπφρουτ	47
Γράφημα 23: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ρόδι/Μήλο/Καρότο	47
Γράφημα 24: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ρόδι/Σταφύλι.	48
Γράφημα 25: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι (2)	48
Γράφημα 26: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι/Ρόδι	49
Γράφημα 27: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Goji Berry	51
Γράφημα 28: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι	52
Γράφημα 29: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Αρώνια	52
Γράφημα 30: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Σταφύλι/Πορτοκάλι/Ρόδι	53
Γράφημα 31: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ακτινίδιο/Πράσινο μήλο/Σπιρουλίνα	53
Γράφημα 32: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 Φρούτα(2)	54
Γράφημα 33: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο(1)	54
Γράφημα 34: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι(1)	55
Γράφημα 35: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Blueberry/Raspberry/Cranberry	55
Γράφημα 36: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Blueberry/Raspberry/Ρόδι	56
Γράφημα 37: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 Φρούτα (4)	56
Γράφημα 38: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 Φρούτα (3)	57
Γράφημα 39: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Βύσσινο	57
Γράφημα 40: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Δαμάσκηνο	58
Γράφημα 41: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο(2)	58
Γράφημα 42: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 φρούτα (1)	59
Γράφημα 43: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Σαγκουίνι/Μανταρίνι	59
Γράφημα 44: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι/Παντζάρι/Καρότο	60

Γράφημα 45: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Όλυμπος 9 Φρούτα (5)	60
Γράφημα 46: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι (3)	61
Γράφημα 47: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Αρώνια/Σταφύλι/Ρόδι	61
Γράφημα 48: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Γκρεϊπφρουτ	62
Γράφημα 49: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι/Μήλο/Καρότο	62
Γράφημα 50: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι/Σταφύλι	63
Γράφημα 51: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι (2)	63
Γράφημα 52: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι/Ρόδι	64
Γράφημα 53: Μέσος όρος τιμών IC ₅₀ της ρίζας του DPPH• των χυμών που περιέχουν ρόδι, πορτοκάλι αλλά και των υπόλοιπων εξετασθέντων χυμών	68
Γράφημα 54 : Μέσος όρος τιμών IC ₅₀ της ρίζας του ABTS• των χυμών που περιέχουν ρόδι, πορτοκάλι αλλά και των υπόλοιπων εξετασθέντων χυμών	69

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1 : Κατηγορίες χυμών φρούτων που μελετήθηκαν για τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες	29
Πίνακας 2: Συνολικά αποτελέσματα τις εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH σε όλους τους εξεταζόμενους χυμούς	50
Πίνακας 3: Συνολικά αποτελέσματα τις εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS• σε όλους τους εξεταζόμενους χυμούς	65
Πίνακας 4: Περιεκτικότητα (mg/ml) εξετασθέντων χυμών σε ολικές πολυφαινόλες , όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	66
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των μεθόδων στους εξεταζόμενους χυμούς	67
Πίνακας 6: Στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στην εξουδετέρωση των ριζών DPPH και ABTS• και στη περιεκτικότητα των χυμών σε πολυφαινόλες όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (F-C)	68

1. Εισαγωγή

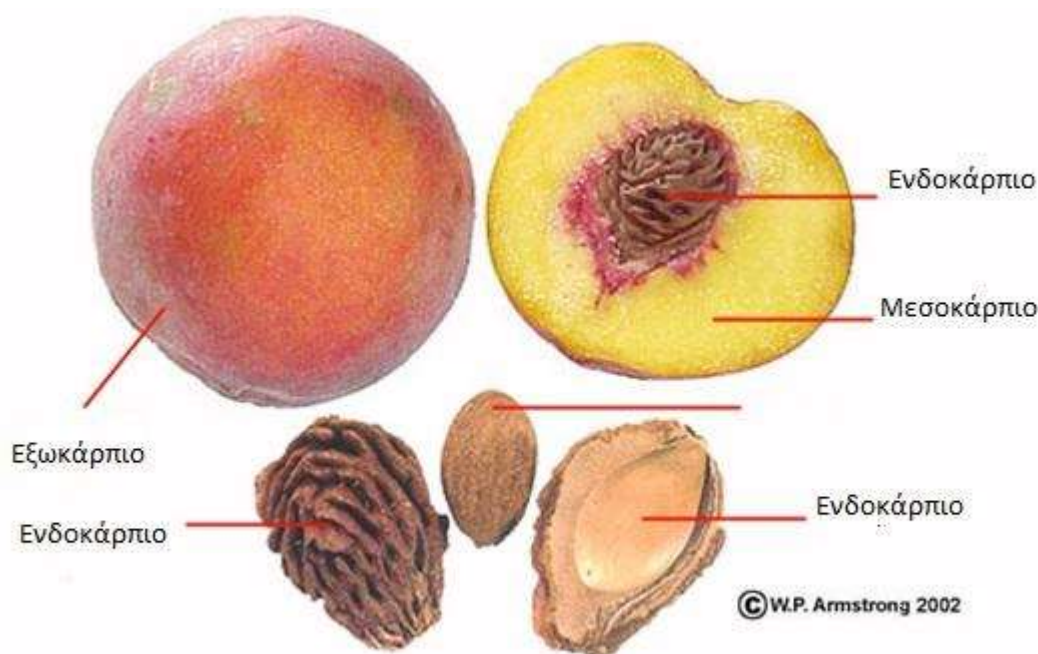
1.1 Γενικά

Την τελευταία δεκαετία, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε διεθνές επίπεδο επικεντρώνεται σε θέματα που αφορούν την ανθρώπινη υγεία, τη διατροφή και την πρόληψη των ασθενειών ενώ παράλληλα, έχει αυξηθεί και η ζήτηση του καταναλωτικού κοινού για “λειτουργικά τρόφιμα” (functional foods). Ο όρος “λειτουργικά τρόφιμα” αναφέρεται σε τρόφιμα όμοια σε εμφάνιση με τα συμβατικά που καταναλώνονται στα πλαίσια μιας συνήθους δίαιτας και περιέχουν ένα συστατικό το οποίο επιτρέπεται από τη νομοθεσία να χρησιμοποιηθεί και παρέχει κάποιο συγκεκριμένο ιατρικό ή φυσιολογικό όφελος, διαφορετικό από τα καθαρά διατροφικά οφέλη (1).

Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν φυτικές ίνες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, βιταμίνες και μέταλλα τα οποία έχουν ευεργετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία (2). Ιδιαίτερα οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων. Τα βασικότερα φαινολικά οξέα που συναντώνται σε τρόφιμα είναι: το γαλλικό οξύ, τα υδροξυ-κιναμωμικά όπως το κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά τους όπως τα χλωρογενικά οξέα (3) ενώ αντίστοιχα, τα κύρια φλαβονοειδή είναι οι φλαβανόνες, φλαβανόλες και φλαβόνες (3). Στη διεθνή βιβλιογραφία τεκμηριώνεται με σαφήνεια ότι η αυξημένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών μειώνει τη πιθανότητα εκδήλωσης διαφόρων χρόνιων εκφυλιστικών νόσων όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (4,5). Ακόμη, τονίζεται ότι φρούτα, λαχανικά και ροφήματα που είναι πλούσια σε φαινόλες όπως τα μήλα, τα κρεμμύδια και το τσάι μειώνουν την πιθανότητα ενός εγκεφαλικού ή καρδιακού επεισοδίου (3).

1.1.2 Φρούτα: Φυσιολογία και χημική σύσταση

Τα φρούτα είναι οι ώριμοι καρποί πολλών φυτών πλούσιοι σε σάκχαρα και φυτικές ίνες. Τα κυριότερα σάκχαρα είναι η ινουλίνη, η μαλτόζη, η σακχαρόζη, η φρουκτόζη και η γλυκόζη και περιέχουν επίσης υδατοδοδιαλυτές βιταμίνες κυρίως βιταμίνη C και A. Περιέχουν επίσης πηκτινικές ύλες (πηκτίνες) στην παρουσία των οποίων οφείλεται η πήξη κατά την παρασκευή της μαρμελάδας καθώς και δεσικές ύλες στην παρουσία των οποίων οφείλεται το μαύρισμα των τομών των φρούτων. Επίσης, περιέχονται ανόργανα άλατα (κυρίως καλίου). Η περιεκτικότητα σε νερό κυμαίνεται περίπου στο 80% (Ανδρικόπουλος, 2015).



Εικόνα 1: Δομή ενός φρούτου (τροποποίηση από: <https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/termfr4.htm>)

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η τομή ενός φρούτου, το οποίο αποτελείται από το εξωτερικό τμήμα του καρπού (εξωκάρπιο), το μεσαίο τμήμα (μεσοκάρπιο) και το εσωτερικό τμήμα του καρπού (ενδοκάρπιο) που περιβάλλει τον σπόρο. Το ενδοκάρπιο, μεσοκάρπιο και το εξωκάρπιο αποτελούν το περικάρπιο του φρούτου.

1.1.3 Κατηγορίες εμπορικών χυμών

Ως χυμοί φρούτων νοούνται οι χυμοί που λαμβάνονται με έκθλιψη υγιών και νωπών φρούτων και οι οποίοι μπορούν να διατίθενται στην κατανάλωση ως έχουν είτε μετά από επεξεργασία καθαρισμού. Οι χυμοί μπορεί να διατίθενται στην κατανάλωση είτε αυτούσιοι είτε ως μίγματα χυμών διαφόρων φρούτων (Ανδρικόπουλος, 2015). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τα φρούτα και τα λαχανικά είναι σημαντικά συστατικά μιας υγιεινής διατροφής. Μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο των μη μεταδοτικών ασθενειών (Non Communicable Diseases-NCDs). Οι τέσσερις κύριοι τύποι των NCDs είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (όπως η καρδιακή προσβολή και το εγκεφαλικό επεισόδιο), ο καρκίνος, οι χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες (όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το άσθμα) και ο διαβήτης. Το 2013 υπολογίζεται ότι 5,2 εκατομμύρια θάνατοι σε όλο τον κόσμο οφείλονταν σε ανεπαρκή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (6). Ως μέρος μιας υγιεινής διατροφής χαμηλής σε λιπαρά, σάκχαρα και νάτριο, ο WHO προτείνει ημερήσια κατανάλωση πέντε μερίδων φρούτων και λαχανικών (ισοδυναμούν με 400 γραμμάρια φρούτων και λαχανικών) για τη βελτίωση της γενικής υγείας και τη μείωση των NCDs (7). Προηγούμενες μελέτες έχουν αξιολογήσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φρέσκων φρούτων (8,9) αλλά περιορισμένες μελέτες έχουν διεξαχθεί για να συγκρίνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών κατηγοριών χυμών φρούτων σε συσχέτιση με τους χυμούς από την άμεση εκχύμωση των φρέσκων φρούτων.

Γενικότερα, οι επιτρεπόμενες μέθοδοι επεξεργασίας, προς παραλαβή του χυμού από τα φρούτα είναι οι ακόλουθες:

- (1) Εκχύμωση ή έκθλιψη: γίνεται με θραυστικά μηχανήματα ή με ατέρμονες κοχλίες.
- (2) Απαέρωση: γίνεται με διαβίβαση αέρα υπό πίεση
- (3) Διαύγαση: γίνεται με προσθήκη διαυγαστικών μέσων
- (4) Ψύξη: γίνεται με ψυκτικά μηχανήματα επί των δεξαμενών αποθήκευσης
- (5) Διήθηση: γίνεται με φιλτρόπρεσες

(6) Παστερίωση: γίνεται σε υδατόλουτρο συνεχούς ροής στους 76,7 °C, 15 sec

(7) Αποστείρωση: γίνεται σε δεξαμενές αποστείρωσης στους 101 °C, 5 sec

(8) Συμπύκνωση: γίνεται σε θερμαινόμενες δεξαμενές ή σε θερμαινόμενα

υδατόλουτρα, με εφαρμογή υψηλού κενού.

Οι επιτρεπόμενες ουσίες διαύγασης είναι οι ακόλουθες:

ζελατίνη, αποχρωστικές γαίες, λευκώματα (καζεΐνη), κυτταρίνη, ταννίνη, διαυγαστικά ένζυμα, ενεργός άνθρακας (ζωικός ή φυτικός).

Ως συντηρητικά μέσα, επιπλέον της παστερίωσης, χρησιμοποιούνται:

Το διοξείδιο του θείου, το sorβικό οξύ και τα άλατά του, το βενζοϊκό οξύ ή βενζοϊκό νάτριο και ο βενζοϊκός-αιθυλεστέρας (ή –προπυλεστέρας).

Σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής τους οι χυμοί κατηγοριοποιούνται ως εξής (ΟΔΗΓΙΑ 2001/112/EK) :

100% Φυσικούς χυμούς: Ο 100% φυσικός χυμός ή χυμός από μη συμπυκνωμένο χυμό είναι ο χυμός που στύβεται και συσκευάζεται χωρίς την προσθαφαίρεση άλλων στοιχείων. Το φρέσκο φρούτο αρχικά χυμοποιείται, εν συνεχεία παστεριώνεται και τέλος συσκευάζεται, περιέχοντας μόνο το δικό του φυσικό νερό.

100% Φυσικούς χυμούς από συμπυκνωμένο χυμό: Ο 100% φυσικός χυμός από συμπυκνωμένο χυμό είναι αυτός που λαμβάνεται με αντικατάσταση στον συμπυκνωμένο χυμό φρούτων, του νερού που είχε απομακρυνθεί από τον χυμό κατά την συμπύκνωση, καθώς και με την αποκατάσταση των αρωμάτων του, και εάν χρειάζεται, της πούλπας και των κυττάρων που χάνονται από τον χυμό, τα οποία όμως ανακτώνται κατά την διαδικασία παραγωγής του εν λόγω χυμού φρούτου ή χυμών φρούτων του ίδιου είδους.

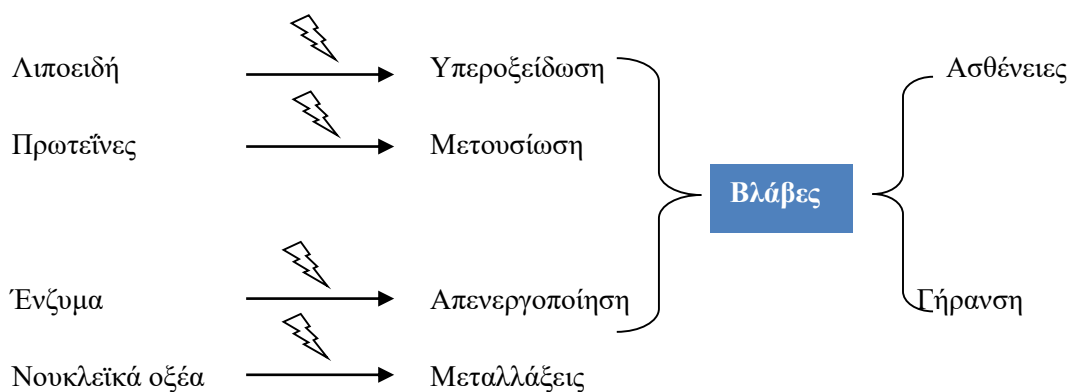
Νέκταρ: Ορίζεται το ζυμώσιμο αλλά μη ζυμωθέν προϊόν που λαμβάνεται με την προσθήκη νερού και σακχάρων ή/και μελιού στα προϊόντα που αναφέρθηκαν, σε πολτό φρούτων ή σε μίγμα αυτών των προϊόντων. Οι χυμοί φρούτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των νέκταρ πρέπει να είναι πλούσιοι σε πούλπα.

Φρουτοποτά: Τα φρουτοποτά παρασκευάζονται από αυτούσιους χυμούς φρούτων είτε με αραιώση χυμών με νερό, είτε με προσθήκη σακχάρων. Περιέχουν τουλάχιστον 20% χυμό φρούτων και τουλάχιστον 9% σακχάρων.

1.2 Ελεύθερες ρίζες

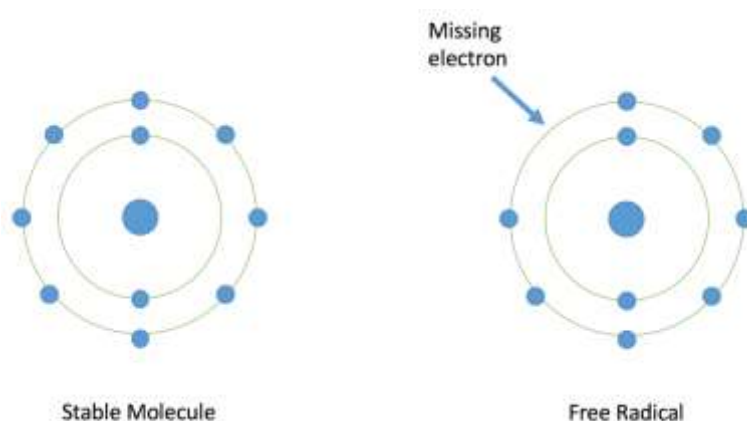
1.2.1 Δραστικές μορφές

Τα μόρια ή τα άτομα έχουν ηλεκτρόνια που είναι καταταγμένα σε ζεύγη κινούμενα σε συγκεκριμένες τροχιές (τροχιακά). Όταν ένα μόριο όμως έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα τότε συνιστά μια ελεύθερη ρίζα. Πρόκειται για μόρια πολύ δραστικά λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων που μπορούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια και να δημιουργήσουν νέες ρίζες (10–12). Ωστόσο, η δράση τους μπορεί να επηρεάσει και να βλάψει τα βιομόρια του οργανισμού όπως το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες (13).



Εικόνα SEQ Εικόνα * ARABIC 2 : Δράση ελευθέρων ριζών έναντι των βιομορίων του οργανισμού

Οι ελεύθερες ρίζες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη οξυγόνου ως κεντρικό μόριο ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS). Η ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) και η ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) είναι δυο εκ των πιο δραστικών ROS. Επίσης, μετά από αντίδραση με τις ROS μπορούν να προκύψουν επίσης θειούχες ρίζες ($RS^{\cdot}$) και δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) όπως το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) που δεν είναι ρίζες αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (14).



Εικόνα 3: Ελεύθερη ρίζα

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
RADICALS	NON RADICALS
• Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) • Ρίζα Υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) • Ρίζα Υπεροξειδίου ($RO_2^{\cdot}$) • Ρίζα Αλκοξειδίου ($RO^{\cdot}$) • Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ($HO_2^{\cdot}$)	• Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2) • Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$) • Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$) • Όζον (O_3) • Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

Εικόνα 4: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Παρομοίως, οι ελεύθερες ρίζες που έχουν το άζωτο ως κεντρικό μόριο ονομάζονται “Δραστικές Μορφές Αζώτου” (Reactive Nitrogen Species-RNS). Σε αυτή τη κατηγορία εντάσσονται ρίζες όπως όπως το μονοξειδίο του αζώτου $\text{NO}^\bullet$ και το διοξειδίο του αζώτου $\text{NO}_2^\bullet$ αλλά και ενώσεις που δεν συνιστούν ελεύθερες ρίζες, ωστόσο είτε είναι οξειδωτικοί παράγοντες είτε δύναται να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες (11,15).

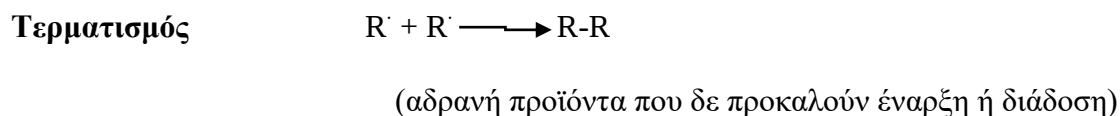
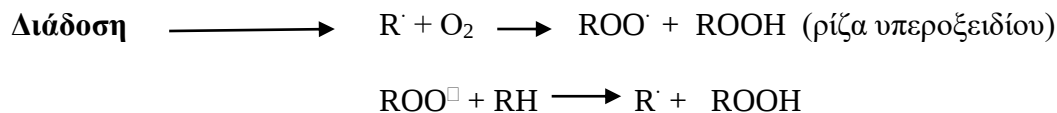


Εικόνα 5: Δραστικές Μορφές Αζώτου

1.3 Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών

Η δράση μιας ελεύθερης ρίζας αφορά το μηχανισμό τριών σταδίων. Το πρώτο στάδιο δράσης αφορά την έναρξη, το δεύτερο στάδιο τη διάδοση και το τρίτο και τελευταίο τον τερματισμό. Αξίζει να αναφερθεί πως η διαδικασία μεταφοράς του ηλεκτρονίου μέσω της οποίας προκύπτουν οι ελεύθερες ρίζες είναι μια υψηλά ενεργοβόρος διαδικασία. Στη συνέχεια στο στάδιο της διάδοσης οι ρίζες που προκύπτουν αλληλεπιδρούν με άλλα, ουδέτερα μόρια δίνοντας νέες ρίζες προάγοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τέλος στο στάδιο του τερματισμού οι παραγόμενες ρίζες αντιδρούν με μόρια που δεν θα δώσουν νέες ρίζες. Συνοπτικά ο αναφερθείς μηχανισμός παρίσταται παρακάτω.

Έναρξη ενέργεια $R^{\cdot}$ (ελεύθερη ρίζα)



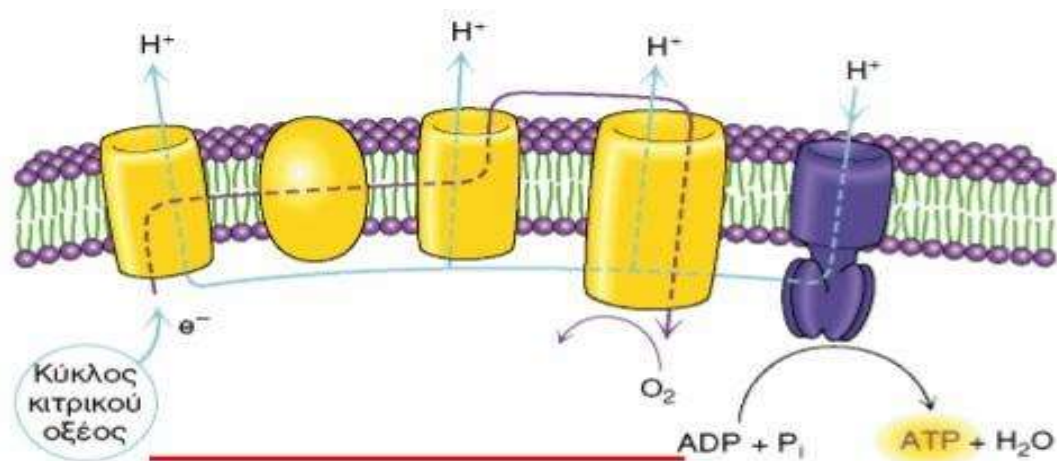
1.4 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν μέσω ενός ευρύτατου φάσματος διεργασιών τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών. Η πρώτη περίπτωση αφορά φυσιολογικές διεργασίες του μεταβολισμού του κυττάρου που μπορούν να καταλήξουν μεταξύ άλλων στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Κατά τη δεύτερη περίπτωση οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μετά από έκθεση του οργανισμού σε τοξικό περιβάλλον.

1.4.1 Ενδοκυτταρικές πηγές

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Αρχικά, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν ως παραπροϊόν (σε ποσοστό 0,1-1%) της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Λόγω της ατελούς ροής e^- προς το μοριακό οξυγόνο παράγεται ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) που στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί προς H_2O_2 με τη δράση της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (Mn-SOD) (16).



Εικόνα 6: Αναπνευστική αλυσίδα

Ενζυμικό σύστημα P450

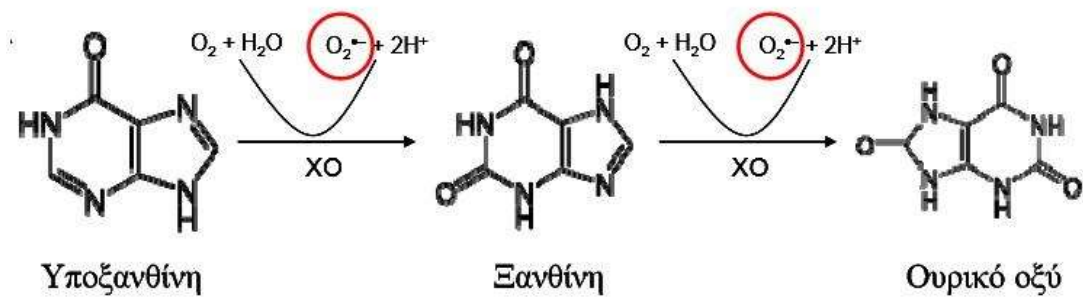
Στο ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 εντάσσονται πολλές οικογένειες ενζύμων που βρίσκονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Η δράση των ενζύμων αφορά την φάση I του μεταβολισμού όσο και το μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών.

Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που μεταφέρει O_2 σε ερυθροκύτταρα. Η δράση της στο αίμα αφορά τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς απελευθερώνοντας οξυγόνο και τροφοδοτώντας τον μεταβολισμό.

Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που προωθούνται με κατάλυση από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν μια σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (17). Φυσιολογικά η αφυδρογονάση της ξανθίνης καταλύει τη μετατροπή της ξανθίνης σε υποξανθίνη και τελικώς σε ουρικό οξύ. Ωστόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας, πρωτεολύεται και μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης που καταλύει τη μετατροπή αυτή χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το μοριακό O_2 και δίνοντας ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$).

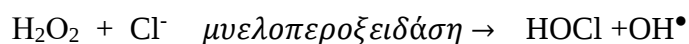


Εικόνα 7: Δράση οξειδάσης ξανθίνης

Ουδετερόφιλα - "Αναπνευστική έκρηξη"

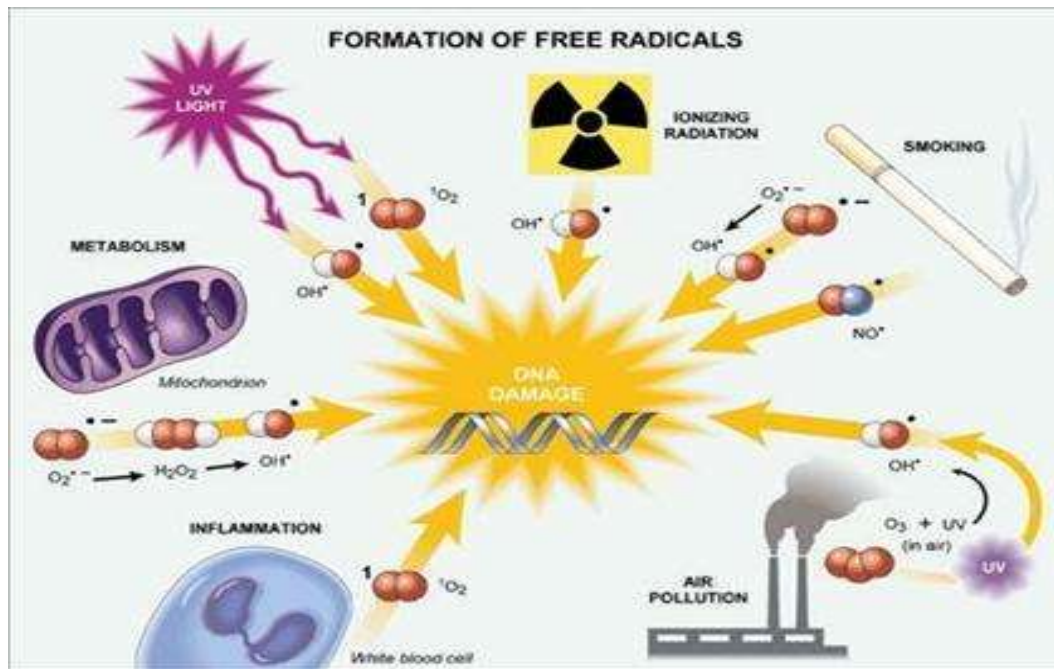
Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) συνιστούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση βακτηρίων και ιών που προσβάλλουν τον οργανισμό. Σε περιπτώσεις πρόκλησης φλεγμονής, τα PMN μεταναστεύουν στο σημείο της φλεγμονής καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τα τραυματισμένα κύτταρα. Κατά την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, το ένζυμο NADPH οξειδάση στα PMN χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το O_2 και παράγει ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (18).

Η ρίζα $\text{O}_2^{\bullet-}$ μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 , που κατόπιν μπορεί να δώσει την ιδιαίτερα δραστική ρίζα $\text{OH}^{\bullet}$.



1.4.2 Εξωκυτταρικές πηγές

Εκτός από τις ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών, η διαδικασία αυτή μπορεί να υποκινηθεί επίσης μετά από έκθεση του οργανισμού σε τοξικό περιβάλλον. Παράγοντες που μπορούν να επάγουν τη διαδικασία αυτή είναι το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ηλεκτρική και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, τα ξενοδοιοτικά όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και η κατανάλωση αλκοόλ (19–21).



Εικόνα 8: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.5 Αντιοξειδωτικά συστήματα

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται: «κάθε ουσία που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τη συγκέντρωση ενός οξειδώσιμου υποστρώματος και ενδέχεται να καθυστερεί σημαντικά ή να αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως υποδηλώνεται και από τον παραπάνω ορισμό, είναι να αποτρέπουν την πρόκληση βλαβών στα συστατικά του κυττάρου οι οποίες δύναται να προκληθούν από τις χημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες (13).

Σύμφωνα με τον Halliwell (1994) σε έναν αερόβιο οργανισμό, η παραγωγή των ελεύθερων ριζών ελέγχεται από το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας. Υποστηρίζει επίσης ότι στους αερόβιους οργανισμούς υπάρχει ένα πολυ-επίπεδο δίκτυο άμυνας που ελέγχει την παραγωγή των ελεύθερων ριζών, με τη χρήση ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών (22). Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν την πρωταρχική άμυνα ως προς τις ελεύθερες ρίζες (ROS), ενώ τα μη ενζυμικά έχουν δευτερογενή ρόλο (23).

1.5.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων

Σύμφωνα με τον Fridovich (1983) ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει μηχανισμούς αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες παράγοντας αντιοξειδωτικά, είτε με φυσικό τρόπο, είτε μέσω λήψης τροφίμων. Τα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται άμεσα στην εξουδετέρωση των ριζών ROS και RNS είναι τα εξής:

- Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) η οποία βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ελεύθερων ριζών και καταλύει τη μετατροπή των ανιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), με αναγωγή. Οι κύριες προσθετικές ομάδες της δισμουτάσης του υπεροξειδίου στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος (CuZnSOD). Εκτός από την κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου, η ευκαρυωτική μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου είναι παρούσα και περιέχει το μαγγάνιο ως προσθετική ομάδα (MnSOD) (24).
- Άλλο ένζυμο είναι η καταλάση (CAT), η οποία καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε ύδωρ και οξυγόνο, προστατεύοντας το κύτταρο έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το H_2O_2 ή κατά συνέπεια από το σχηματισμό της ρίζας $OH^{\bullet}$ (25). Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα αλλά και στα μικρο-υπεροξειδισώματα (26).
- Η γλουταθειόνη του υπεροξειδίου (GPx) είναι ένα σεληνοένζυμο του κυτταροπλάσματος το οποίο προσβάλλει τα υδρο-υπεροξείδια με τη βοήθεια της αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH), για να σχηματίσει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και ύδωρ (27).

Στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι τα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε μεταβολικά αντιοξειδωτικά και σε θρεπτικά αντιοξειδωτικά. Τα μεταβολικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στα ενδογενή αντιοξειδωτικά και παράγονται από το μεταβολισμό του οργανισμού μας, όπως το λιποϊκό οξύ, η αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH), η μελατονίνη, η L-αργινίνη, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η τρανσφερρίνη κ.α. (28). Τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στα εξωγενή αντιοξειδωτικά και είναι ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να παραχθούν από τον οργανισμό του ανθρώπου και πρέπει να παρέχονται μέσω της τροφής ή συμπληρωμάτων διατροφής, όπως είναι η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), η βιταμίνη C,

τα καροτενοειδή, τα ιχνοστοιχεία (Mn, Zn, Se), τα φλαβονοειδή, τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα, κ.α. Μία από τις αιτίες των πολυάριθμων χρόνιων και εκφυλιστικών παθολογιών είναι η ανεπάρκεια των θρεπτικών αντιοξειδωτικών. Το κάθε θρεπτικό αντιοξειδωτικό είναι μοναδικό όσον αφορά τη δομή και την αντιοξειδωτική λειτουργία του. Το αμυντικό σύστημα των μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες. Η δευτερογενής άμυνα έναντι των ROS προκαλείται από μικρά μόρια τα οποία αντιδρούν με τις ρίζες για να παράγουν ένα λιγότερο επιβλαβές μόριο ρίζας. Το κλασικό παράδειγμα μιας αλυσιδωτής αντίδρασης είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, και η αντίδραση αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου να ενωθούν οι δύο ρίζες για να σχηματίσουν ένα σταθερό προϊόν ή μέχρις ότου να εξουδετερωθούν οι ρίζες από ένα αντιοξειδωτικό το οποίο θα διακόψει την αντίδραση (29). Αυτά τα αντιοξειδωτικά είναι μικρά μόρια τα οποία μπορούν να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο σε μια ρίζα με το σχηματισμό σταθερών υποπροϊόντων.

Αναφορικά με τη βιταμίνη C, γνωστή ως ασκορβικό οξύ τονίζεται πως είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του κολλαγόνου, της καρνιτίνης και των νευροδιαβιβαστών (30). Τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου της βιταμίνης C είναι η αντιοξειδωτική, αντιαθηρογόνος, αντικαρκινική, και ανοσορρυθμιστική δράση. Η θετική δράση της έγκειται στη μείωση της συχνότητας του καρκίνου στομάχου, και στην πρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Η βιταμίνη C έχει συνέργεια με τη βιταμίνη E για να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες και να αναπαράγει την αναχθείσα μορφή της βιταμίνης E. Ωστόσο, η πρόσληψη υψηλών δόσεων βιταμίνης C (2000 mg ή περισσότερο/ημερησίως), έχει γίνει θέμα συζήτησης για ενδεχόμενη προ-οξειδωτική ή καρκινογόνο δράση. Οι φυσικές πηγές της βιταμίνης C είναι τα όξινα φρούτα, τα πράσινα λαχανικά, οι ντομάτες. Το ασκορβικό οξύ είναι ένα ασταθές μόριο, ως εκ τούτου μπορεί να χάσει τις ιδιότητές του κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος (31).

Το λυκοπένιο είναι ένα καροτενοειδές το οποίο κατέχει αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες σε μελέτες που έγιναν σε ζώα και σε μελέτες *in vitro* όσον αφορά το μαστό, τον προστάτη και τον πνεύμονα, (32). Η κύρια διατροφική πηγή του λυκοπενίου βρίσκεται στις ντομάτες, όπου το λυκοπένιο στις μαγειρεμένες ντομάτες είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμο σε σχέση με τις ωμές ντομάτες (33). Το σελήνιο (Se) είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό, στα λαχανικά (κρεμμύδι, σκόρδο), στη σόγια, στα σιτηρά, στους ξηρούς καρπούς, στα θαλασσινά,

στο κρέας, στο συκώτι και στη μαγιά (52). Σχηματίζει το ενεργό κέντρο αρκετών ενζύμων συμπεριλαμβάνοντας την περοξειδάση της γλουταθειόνης. Σε χαμηλές δόσεις, τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου είναι πολλαπλά, διότι το Se είναι αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό και ανοσορρυθμιστικό (34).

1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση των χυμών φρούτων

Όπως έχει αποδειχτεί στη διεθνή βιβλιογραφία οι ελεύθερες ρίζες δύναται να βλάψουν τα ανθρώπινα κύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση καρδιακών παθήσεων, τον καρκίνο και άλλες ασθένειες. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες μπορούν να προστατέψουν τα ανθρώπινα κύτταρα από τις επιδράσεις των ελεύθερων ριζών (35). Ως εκ τούτου οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών (36). Τα φρούτα και οι χυμοί φρούτων αποτελούν σημαντικές πηγές φαινολικών ενώσεων όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυάνες (37), οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* αλλά το σημαντικότερο είναι η μείωση του ρυθμού μεταλλαξιγένεσης που προκύπτει από το οξειδωτικό στρες στους ανθρώπους (38).

Μελέτες διερεύνησαν την επίδραση των αντιοξειδωτικών του χυμού πορτοκαλιού και την βιοδιαθεσιμότητα τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκε χυμός πορτοκαλιού καθημερινά για τρεις συνεχόμενες εβδομάδες σε δύο υπό μελέτη ομάδες, η πρώτη αποτελούνταν από 7 γυναίκες και η δεύτερη από 6 άνδρες και στην συνέχεια συλλέγονταν εβδομαδιαίως αίμα και ούρα προκειμένου να προσδιοριστούν αλλαγές στη συγκέντρωση της βιταμίνης C, του φολικού οξέος, των καροτενοειδών και της φλαβονόνης (39). Συμπερασματικά, έπειτα από συνεχόμενη κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού η συγκέντρωση της βιταμίνης C αυξήθηκε κατά 59%, του φολικού οξέος κατά 46%, των καροτενοειδών κατά 22% και της φλαβονόνης κατά 8%. Συνοψίζοντας, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι ο χυμός πορτοκαλιού αυξάνει τη συγκέντρωση των πολύτιμων υδρόφιλων και λιπόφιλων φυτοχημικών ουσιών στο αίμα (39).

1.5.3 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης και συμβάλουν στο χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα των φρούτων και των λαχανικών. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού και τον προστατεύουν από παθογόνους μικροοργανισμούς και εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (40). Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την επωφελή δράση των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικών στην ανθρώπινη υγεία. Επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μακροχρόνια κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυτικές πολυφαινόλες μειώνει την εκδήλωση καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη, οστεοπόρωσης και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (40). Οι πολυφαινόλες βρίσκονται κυρίως στα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και σε διάφορα ροφήματα. Φρούτα όπως σταφύλια, μήλα, αχλάδια, κεράσια και μούρα περιέχουν έως και 200-300 mg πολυφαινόλες ανά 100 γραμμάρια νωπού βάρους. Τα προϊόντα που παράγονται από τα παραπάνω φρούτα περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυφαινολών. Συνήθως ένα ποτήρι κόκκινο κρασί ή ένα φλιτζάνι τσάι ή καφέ περιέχει περίπου 100 mg πολυφαινολών (41).

Δομή και κατηγορίες πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης έχουν ως βάση την φαινυλαλανίνη και την πρόδρομη ένωση της, το σικιμικό οξύ.

Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες ως συνάρτηση του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων που δεσμεύουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνάνες.

Φαινολικά Οξέα

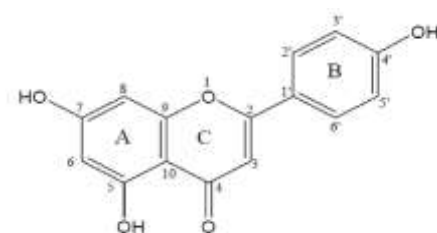
Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε αφθονία σε διάφορα τρόφιμα και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κινναμικού οξέος. Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι πιο κοινά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και συνίστανται κυρίως από τα ρ-κουμαρικά, τα καφεϊκά, τα φερουλικά και τα σιναιπικά

οξέα. Το υδροξυβενζοϊκό οξύ βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε διάφορα λαχανικά, με εξαίρεση ορισμένα κόκκινα φρούτα, ραπανάκια και κρεμμύδια.

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο καλά μελετημένη ομάδα πολυφαινόλων. Αυτή η ομάδα έχει μια κοινή βασική δομή που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μαζί με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό μόριο. Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 4.000 ποικιλίες φλαβονοειδών, πολλές από τις οποίες ευθύνονται για τα ελκυστικά χρώματα των λουλουδιών, των καρπών και των φύλλων (42). Με βάση την ποικιλία του εμπλεκόμενου ετερόκυκλου, τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε έξι υποκατηγορίες: φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες (43). Η κερσετίνη, μυριστίνη και οι κατεχίνες είναι τα πιο κοινά φλαβονοειδή.

Τα στιλβένια περιέχουν δύο φαινύλια που συνδέονται με γέφυρα μεθυλενίου δύο ανθράκων. Τα περισσότερα στιλβένια στα φυτά λειτουργούν ως αντιμυκητιακές φυτοαλεξίνες, ενώσεις που συντίθενται μόνο ως αντίδραση σε λοίμωξη ή τραυματισμό. Το κοινότερο στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη και βρίσκεται στα σταφύλια.

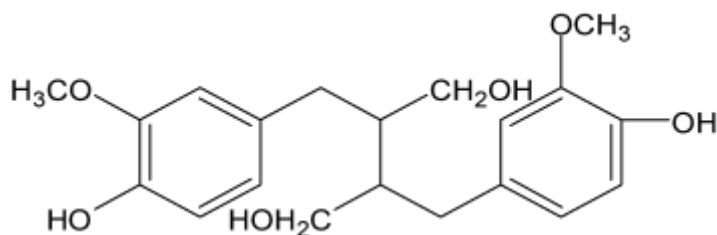


Εικόνα SEQ Εικόνα *
ARABIC 3: Λουή

Λιγνάνια

Τα λιγνάνια είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου. Τα κυριότερα φυτικά λιγνάνια είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, τα οποία μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα των θηλαστικών στα αντίστοιχα ζωικά παράγωγα την εντεροδιόλη και την εντερολακτόνη

Αρκετά λιγνάκια, όπως η σεκοϊσολαρσιριζίνη, θεωρούνται φυτοοιστρογόνα. Η πλουσιότερη πηγή σε λιγνάκια είναι ο λιναρόσπορος, ο οποίος περιέχει σεκοσολαρσιριζίνη (και χαμηλές ποσότητες ματαμρεσίνης) (44).



Εικόνα 10: Χημική δομή λιγνανίου

1.5.4 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

Η αντιοξειδωτική ιδιότητα των πολυφαινολών θεωρείται ως η πιο σημαντική τους επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δεσμευτές ελευθέρων ριζών αλλά και χηλικών μετάλλων (45). Προκειμένου να μπορέσει μία πολυφαινόλη να δράσει ως αντιοξειδωτικό μόριο θα πρέπει αφενός να βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με μια άλλη ουσία ώστε να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωσή της και επιπλέον η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει να είναι σταθερή. Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών τους υδρογόνων.

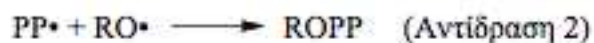


RO• : ελεύθερη ρίζα

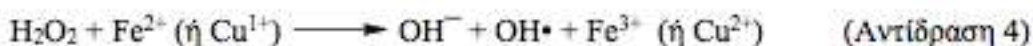
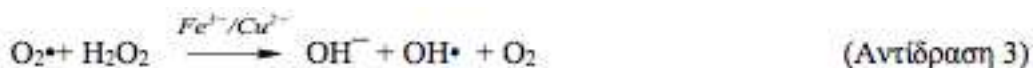
PPH : πολυφαινολική ένωση

PP• : φαινολική ρίζα

Οι φαινολικές ομάδες δρουν ως ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων και σχηματίζουν φαινολικές ρίζες. Ως εκ τούτου οι ελεύθερες ρίζες που αλληλεπιδρούν με αυτές δίνουν το ηλεκτρόνιό τους και αδρανοποιούνται. Έτσι λοιπόν αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα να αποδίδεται η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών. Παράλληλα η φαινολική ρίζα μπορεί να αδρανοποιήσει την αρχική ρίζα οδηγώντας στη δημιουργία μη δραστικού μορίου (46).



Μία ακόμα σημαντική αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα χαλκού και να εμποδίζουν την προώθηση των αντιδράσεων Haber Weiss και Fenton, που μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή της ιδιαίτερα δραστηκής ρίζας του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντιδράσεις 3,4).



Οι πολυφαινόλες, ωστόσο, εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι πιθανό να εμφανίσουν προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή να προκαλέσουν το σχηματισμό ROS. Αυτό συμβαίνει κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως είναι του Fe και του Cu (46). Συγκεκριμένα μπορεί να αναχθεί ο Fe^{3+} ή ο Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα και να προάγουν τις αντιδράσεις Haber Weiss και Fenton που θα οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικών ριζών όπως είδαμε και παραπάνω.

1.6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η κατάσταση διαταραγμένης ισορροπίας ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και το αντιοξειδωτικό απόθεμα του οργανισμού υπέρ των πρώτων που μπορεί να οδηγήσει σε μοριακή βλάβη ή/και σε διαταραχή της σηματοδότησης (47). Πρώτη φορά αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1985, τονίζοντας τις βλάβες που μπορεί να προκαλέσει έπειτα από οξείδωση στα βιομόρια του οργανισμού (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) μετά από οξείδωσή τους (48). Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να βλάψουν τις βάσεις (πυριμιδίνες, πουρίνες) και τη D-ριβόζη ενός μορίου DNA ενώ στα λιπίδια μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση (22). Αναφορικά με τις πρωτεΐνες οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οξειδώσουν αμινοξέα όπως η αργινίνη, η προλίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη που είναι ευαίσθητα σε οξείδωση, αλλάζοντας έτσι τη δομή και τη δράση τους (49).

Σε περίπτωση εκτεταμένης οξειδωτικής βλάβης, επέρχεται κυτταρικός θάνατος του κυττάρου με απόπτωση ή άμεση κυτταρική νέκρωση. Ως εκ τούτου το οξειδωτικό

στρες σχετίζεται με μια σειρά ασθενειών όπως η αθηροσκλήρυνση, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (30). Ωστόσο, νεότερες εργασίες τονίζουν ότι χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητα για θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες όπως η μεταγωγή σήματος, και συνεπώς ένας σύγχρονος και περισσότερο αποδεκτός ορισμός που διατυπώθηκε από τον Jones το 2006, ορίζει το οξειδωτικό στρες ως "τη διακοπή της σηματοδότησης και του οξειδοαναγωγικού ελέγχου" (50).



Εικόνα 11: Οξειδωτικό στρες

Σκοπός της μελέτης

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία το ενδιαφέρον για την ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στους εμπορικούς χυμούς ολοένα και αυξάνεται. Συνεπώς, προκειμένου να απαντηθούν κρίσιμα και καίρια ερωτήματα σχετικά με την ποιότητα χυμών της ελληνικής αγοράς με βάση την αντιοξειδωτική τους ικανότητα έγιναν τα εξής:

1. Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε 26 χυμούς που προέρχονταν από διάφορα φρούτα.
2. Προσδιορίστηκε το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο και εξετάστηκε πως αυτό συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των χυμών του εμπορίου και η κατηγοριοποίησή τους με βάση τα συστατικά που την ενισχύουν, θα συμβάλει στην ενημέρωση του καταναλωτή και τη διαλεύκανση του θολού τοπίου αναφορικά με την προβεβλημένη και λανθασμένη πολλές φορές ενημέρωση σχετικά με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Ανάλυση Δειγμάτων

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής αναλύθηκαν 26 διαφορετικοί χυμοί του εμπορίου. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) εμφανίζονται οι διαφορετικοί χυμοί, διαφορετικής προέλευσης.

Πίνακας 1 : Κατηγορίες χυμών φρούτων που μελετήθηκαν για τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες.

<u>Χυμοί</u>	
1	ΡΟΔΙ
2	ΑΡΩΝΙΑ
3	ΜΗΛΟ-ΑΡΩΝΙΑ-ΡΟΔΙ
4	ΡΟΔΙ-ΣΤΑΦΥΛΙ
5	BLUEBERRY-RASBERRY-ΡΟΔΙ
6	ΣΤΑΦΥΛΙ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ
7	ΜΗΛΟ-ΡΟΔΙ-ΚΑΡΟΤΟ
8	9 ΦΡΟΥΤΑ (1) [ΜΗΛΟ,ΣΤΑΦΥΛΙ,ΡΟΔΑΚΙΝΟ,ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ,ΑΝΑΝΑΣ,ΓΚΕΙΠΦΡΟΥΤ,ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ,PAS SION FRUIT,ΜΑΝΓΚΟ]
9	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΠΑΝΤΖΑΡΙ-ΚΑΡΟΤΟ
10	ΓΡΕΪΠΦΡΟΥΤ
11	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (1)
12	ΔΑΜΑΣΚΗΝΟ
13	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ
14	ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (1)
15	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (2)
16	9 ΦΡΟΥΤΑ (2) [ΜΗΛΟ,ΣΤΑΦΥΛΙ,ΡΟΔΑΚΙΝΟ,ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ,ΑΝΑΝΑΣ,ΓΚΕΙΠΦΡΟΥΤ,ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ,PAS SION FRUIT,ΜΑΝΓΚΟ]
17	9 ΦΡΟΥΤΑ (3) [ΜΗΛΟ,ΣΤΑΦΥΛΙ,ΡΟΔΑΚΙΝΟ,ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ,ΑΝΑΝΑΣ,ΓΚΕΙΠΦΡΟΥΤ,ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ,PAS SION FRUIT,ΜΑΝΓΚΟ]
18	ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (2)
19	ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (3)
20	9 ΦΡΟΥΤΑ (4) [ΜΗΛΟ,ΣΤΑΦΥΛΙ,ΡΟΔΑΚΙΝΟ,ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ,ΑΝΑΝΑΣ,ΓΚΕΙΠΦΡΟΥΤ,ΒΕΡΙΚΟΚΟ,PAS SION FRUIT,ΜΑΝΓΚΟ]
21	GOJI BERRY
22	9 ΦΡΟΥΤΑ (5) [ΜΗΛΟ,ΣΤΑΦΥΛΙ,ΡΟΔΑΚΙΝΟ,ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ,ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ,ΓΚΕΙΠΦΡΟΥΤ,ΛΕΜΟΝΙ,ΡΟ ΔΙ,ΜΑΝΓΚΟ]
23	BLUEBERRY-RASBERRY-CRANBERRY
24	ΒΥΣΣΙΝΟ
25	ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ-ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΗΛΟ
26	ΣΑΓΚΟΥΪΝΙ-ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ

2.2 Υλικά και μέθοδοι

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις τρεις χρησιμοποιούμενες μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω είναι:

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλδραζύλιο))
- ABTS (3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικόξύ)
- Μεθανόλη (CH_3OH)
- H_2O_2 (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου)
- Na_2CO_3 (Ανθρακικό νάτριο)

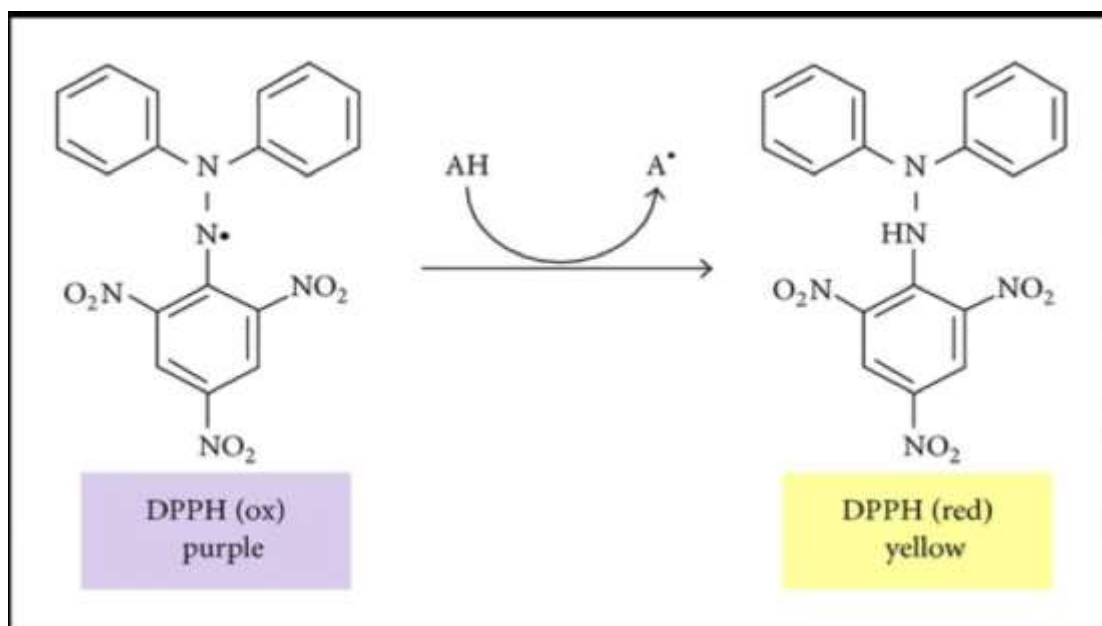
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με τις εξής αναλυτικές μεθόδους: "Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας της ρίζας DPPH•", "Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας της ρίζας ABTS•+", "Μέθοδος Folin-Ciocalteu".

2.3 Προεπεξεργασία δειγμάτων

Σε κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρου (**ependorf tube**) όγκου 2 ml προστέθηκε χυμός και έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στους 10 °C για 3 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί τυχόν ίζημα.

2.3.1 Μέθοδος DPPH

Η οργανική ρίζα του αζώτου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές εμπορικά διαθέσιμες ρίζες. Η αντίδραση της ρίζας με τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του πορφυρού διαλύματος της ρίζας, εξαιτίας της κατανάλωσης αυτής από τα αντιοξειδωτικά. Ο βαθμός του αποχρωματισμού μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.



Εικόνα 12: Αντίδραση της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό μόριο

Πειραματική διαδικασία

Την ημέρα πραγματοποίησης του πειράματος ετοιμάζουμε το διάλυμα DPPH• (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH•) και το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Ετοιμάζουμε τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Τα δείγματα και επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φωτομετρούνται στα 517nm σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Το διάλυμα της ρίζας DPPH• σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και η τυπική απόκλιση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος υπολογίζεται ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH• σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο

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

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

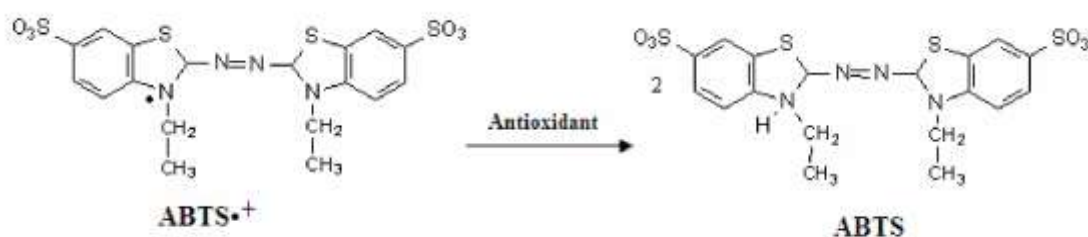
A_d : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε σχέση με το IC_{50} (1). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.3.2 Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miler και Rice-Evans (2) και στηρίζεται στον αποχρωματισμό της μπλε/πράσινης $ABTS^{\bullet+}$ ρίζας, μέσω της προσθήκης αντιοξειδωτικών ενώσεων. Αρχικά πραγματοποιείται ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια με την προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας εξετάζεται η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών μορίων ως προς την αναστολή της ρίζας, κάτι που γίνεται αντιληπτό από τον αποχρωματισμό του διαλύματος και συνεπώς τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (3).

Η μέθοδος ABTS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολλών δειγμάτων ποτών, φρούτων εκχυλισμάτων κ.α.



Εικόνα 13: Αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

Πειραματική διαδικασία

Στη μέθοδο αυτή, πρώτο βήμα αποτελεί η παρασκευή των διαλυμάτων τη μέρα εκτέλεσης του πειράματος και στη συνέχεια τα διατηρούμε σε σκιερό μέρος καθώς είναι φωτοευαίσθητα. Παράλληλα είναι θεμιτό να διατηρούνται σε πάγο.

- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα ABTS (1mM) σε τελικό όγκο αντίδρασης 10mL ζυγίζουμε 10,97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H₂O.
- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα H₂O₂ τελικής συγκέντρωσης 30μM σε όγκο αντίδρασης 1mL φτιάχνουμε διάλυμα 600μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8M αραιώνουμε με H₂O₂ ώστε να ετοιμαστεί το διάλυμα των 600μM.
- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα HRP 6μM, διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10mL αποστειρωμένου H₂O και στη συνέχεια κάνουμε αραίωση 1/20.

Τα διαλύματα προστίθενται με την εξής σειρά: 1) Διάλυμα ABTS, 2) Διάλυμα H₂O₂, 3) Διάλυμα ενζύμου περοξειδάσης. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050μl. Γίνεται ανάδευση των δειγμάτων και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων τα οποία εξετάζονται εις τριπλούν φωτομετρικά, με μέτρηση της απορρόφησης στα 730nm. Το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και η τυπική απόκλιση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος υπολογίζεται ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH[•] σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο

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

όπου:

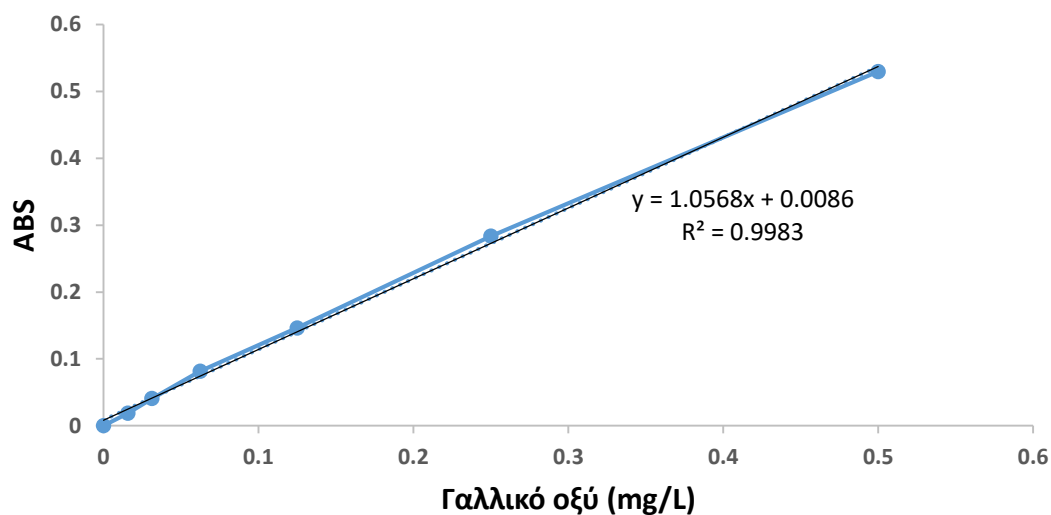
*A*₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου στα 730nm.

*A*_s: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος στα 730nm.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε σχέση με το IC_{50} (1). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.3.3 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC), η οποία περιγράφει τη μέτρηση των ολικών φαινολών (4). Η μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο του Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με μια διαδικασία που περιγράφεται από τους Singleton και Rossi κάνοντας την ακόλουθη τροποποίηση ώστε να μειωθεί ο όγκος του διαλύματος (5). Εν συντομία, προστέθηκε σε σωληνάκι erppendorf 2ml, 1 ml H_2O και 20 μ l δείγματος, έπειτα 0,1 ml (250 μ l αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu σε 750 μ l H_2O) Folin-Ciocalteu μίγμα αντιδραστηρίου. Μετά από 3 λεπτά, προστέθηκε 280 μ l κορεσμένου Na_2CO_3 20% w/v. Μετά από έντονο vortex, το τελικό διάλυμα έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Η οπτική απορρόφηση πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο στα 725 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά λίτρο δείγματος (GAEs/l), με τη χρήση μιας καμπύλης βαθμονόμησης (Διάγραμμα 1) έναντι προτύπων γαλλικού οξέος (50-500 mg/l).



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό ολικών φαινολών

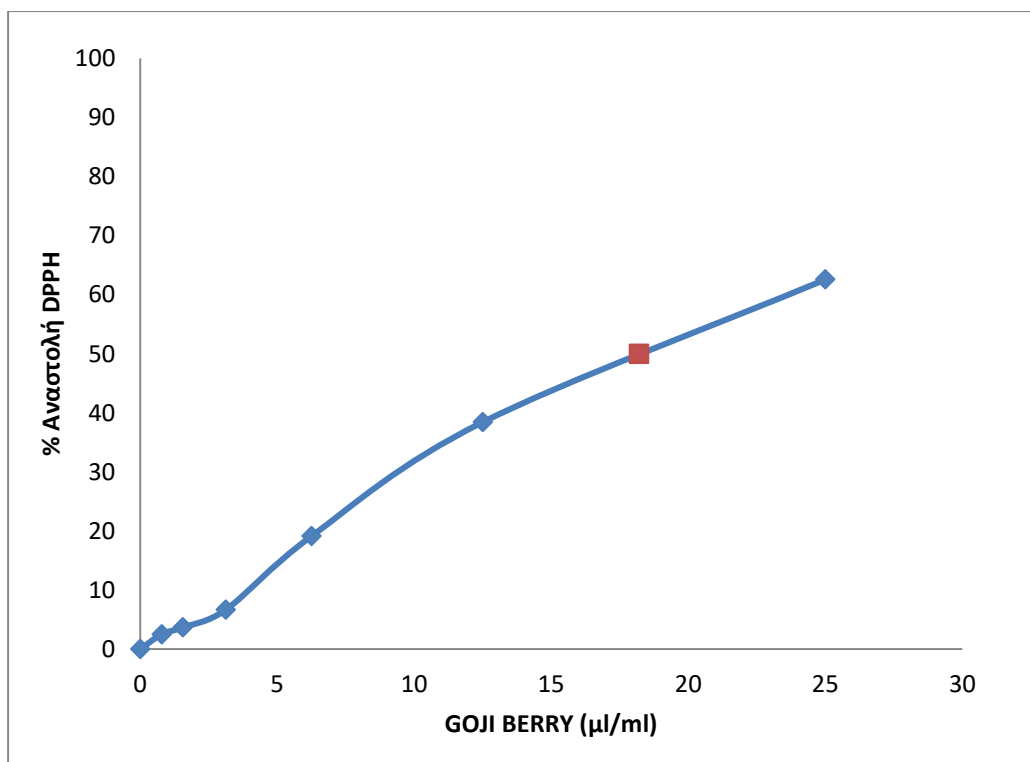
2.4 Στατιστική ανάλυση

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές 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 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] και του ABTS[•] που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

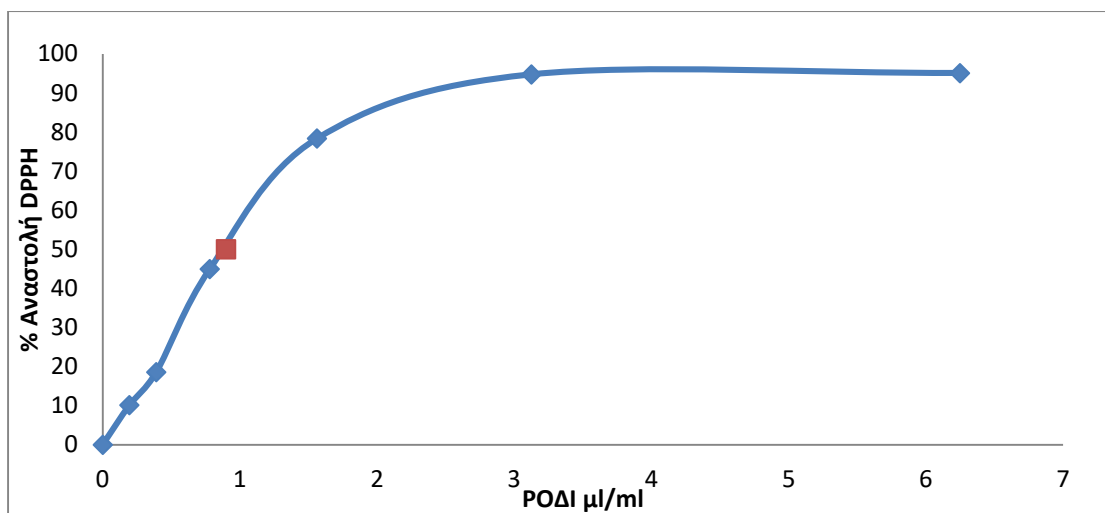
3. Αποτελέσματα

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλίσμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

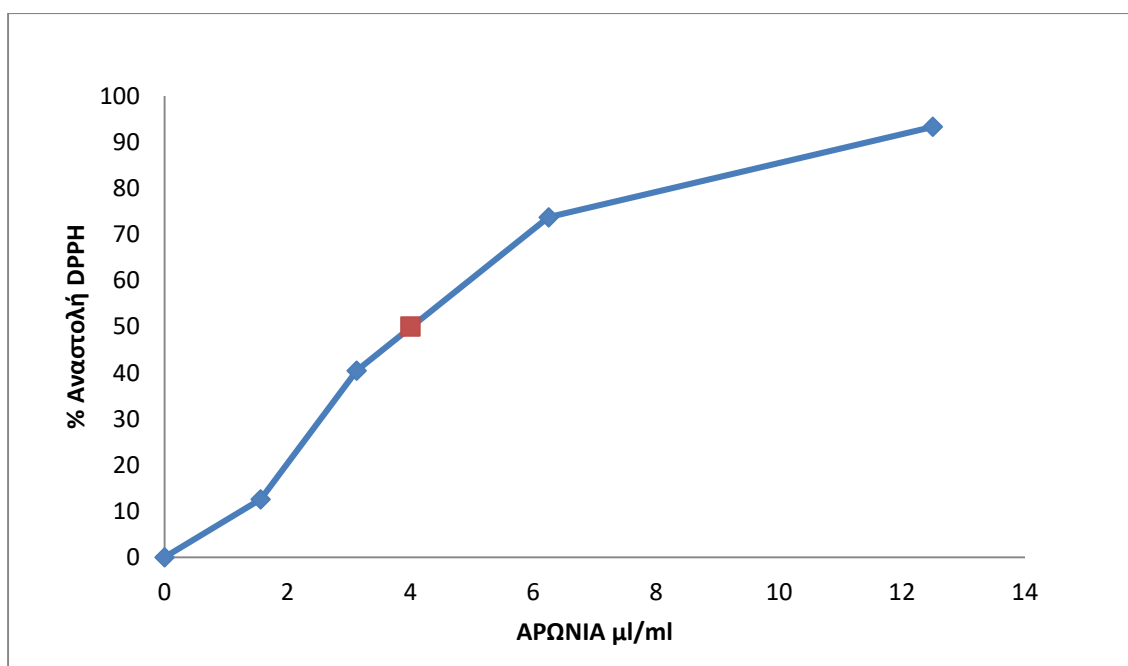
Μελετήθηκαν 26 δείγματα χυμών στις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56 , 3,13 , 6,25 , 12,50, 25,00 $\mu\text{l/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•. Παρατίθενται τα γραφήματα που παρουσιάζουν την % αναστολή της ρίζας DPPH• από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Οι χαμηλότερες τιμές IC50 στα δείγματα αυτά βρέθηκαν στα 0,32 για τον χυμό Ρόδι-Σταφύλι , 0,90 για τον χυμό Ρόδι και 3,0 $\mu\text{l/ml}$ για τον χυμό Blueberry-Raspberry-Ρόδι.



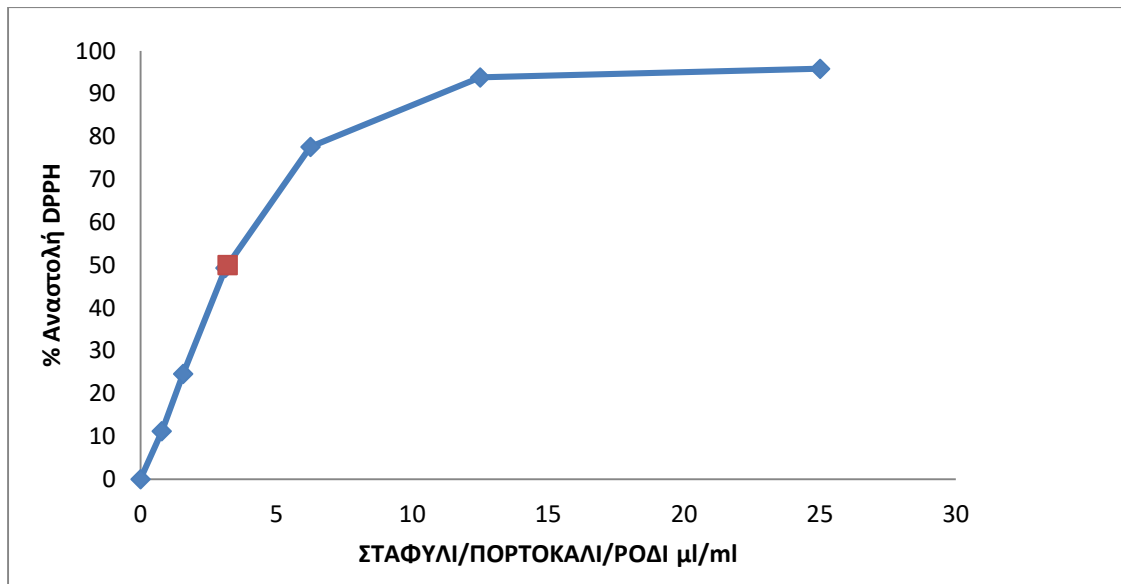
Γράφημα 1: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Goji berry



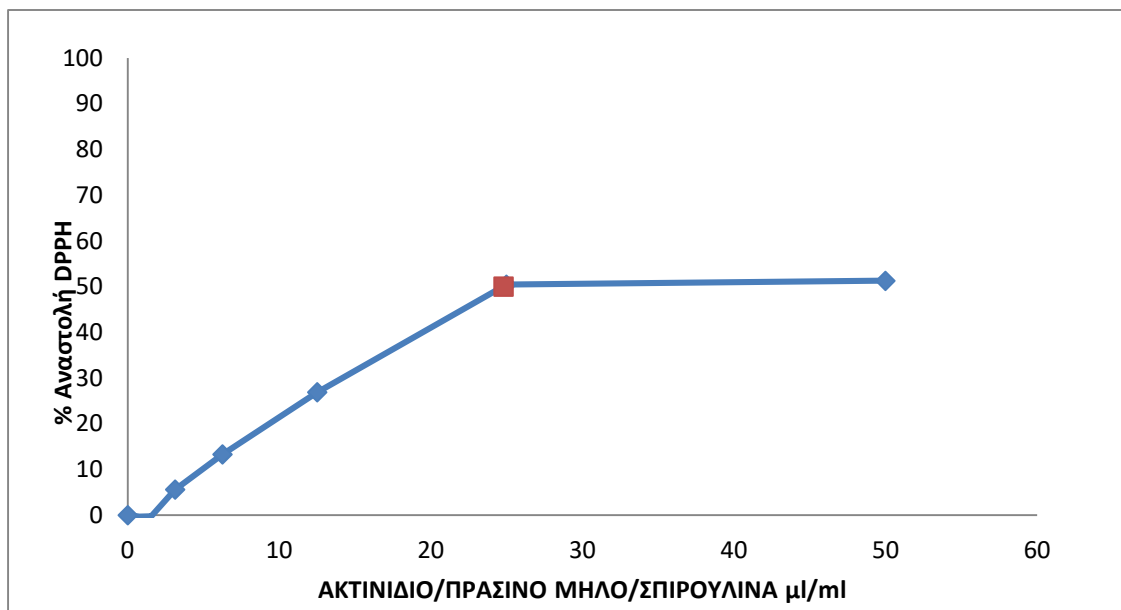
Γράφημα 2: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ρόδι



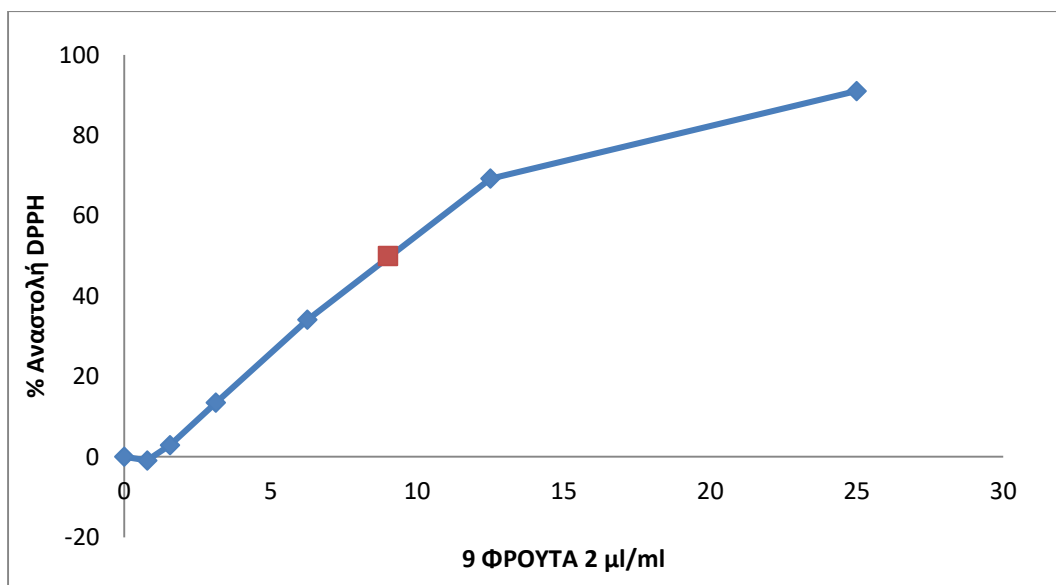
Γράφημα 3: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Αρώνια



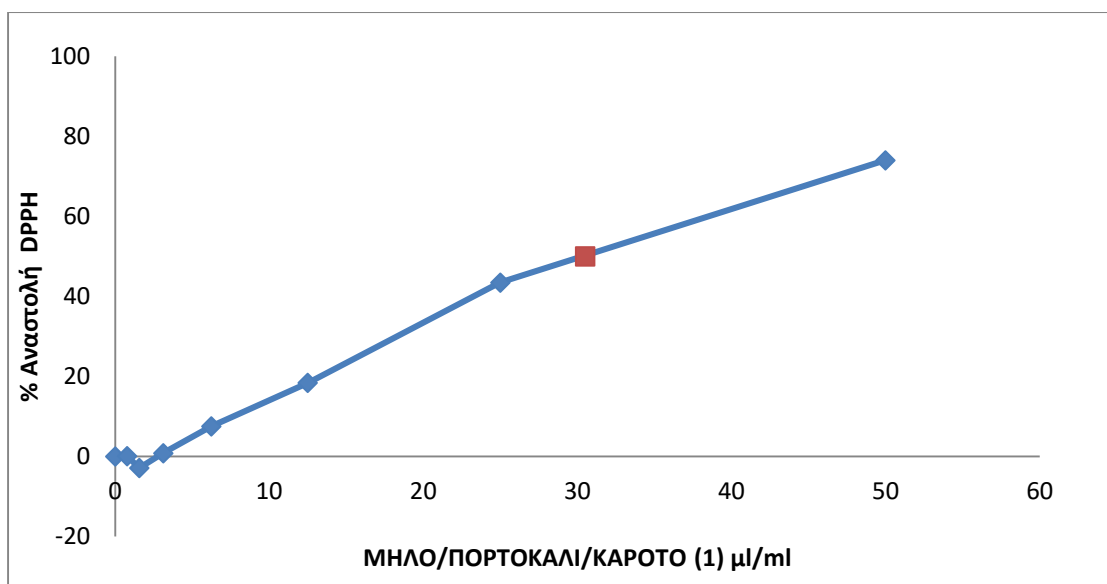
Γράφημα 4: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Σταφύλι/Πορτοκάλι/Ρόδι



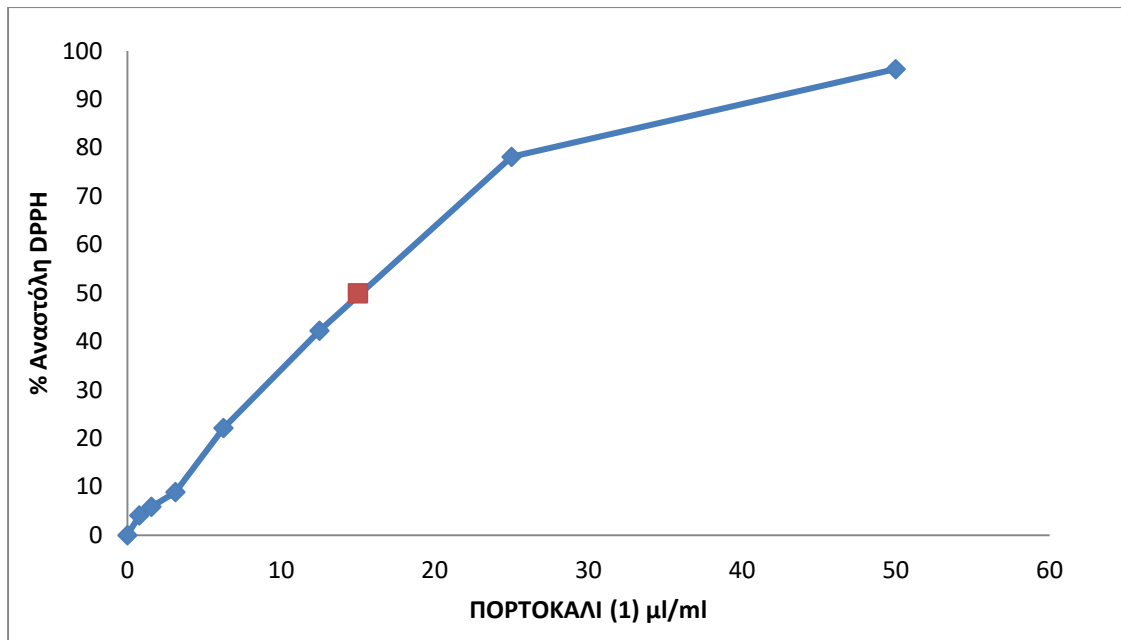
Γράφημα 5: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ακτινίδιο/Πράσινο μήλο/Σπιρουλίνα



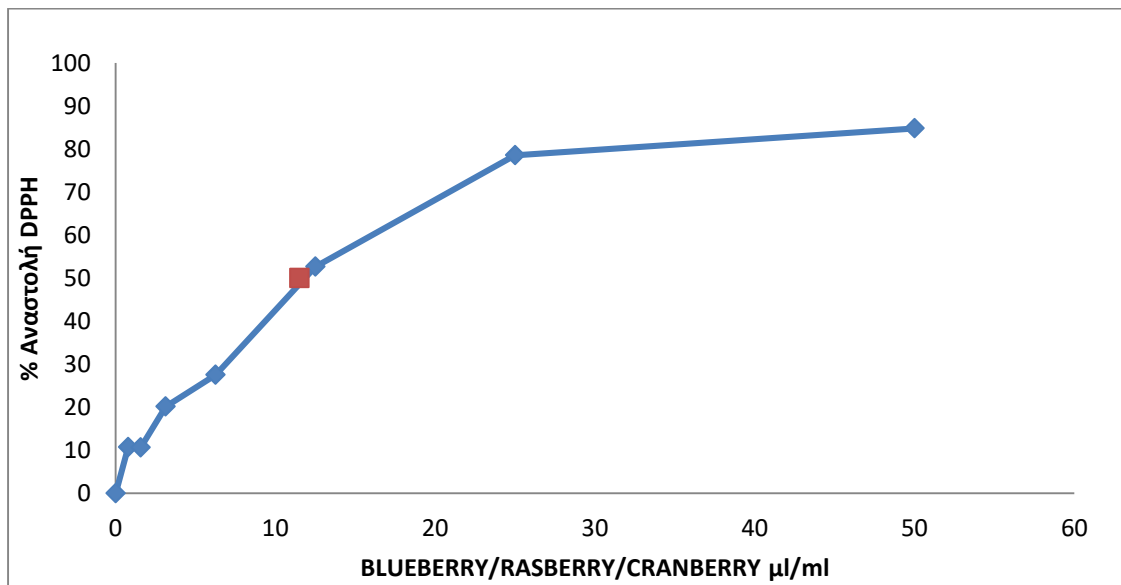
Γράφημα 6: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό 9 Φρούτα (2)



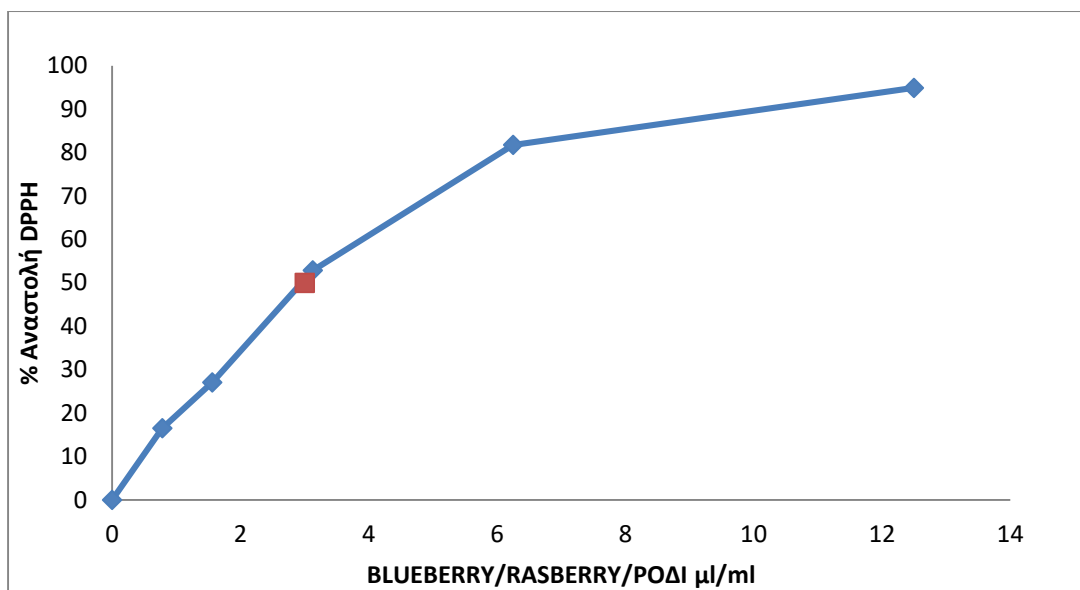
Γράφημα 7: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο (1)



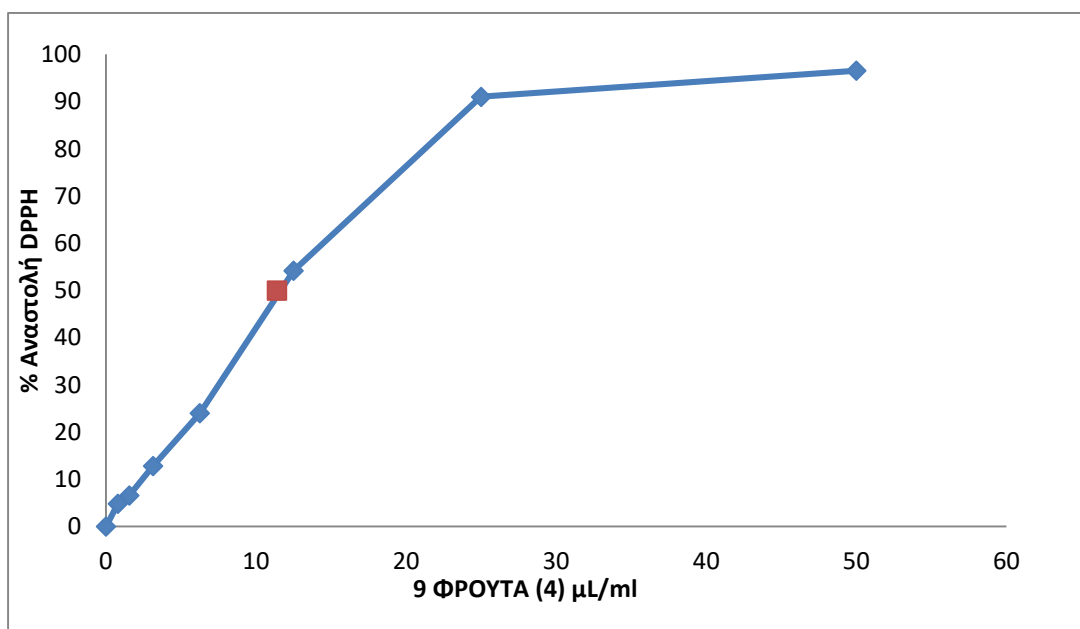
Γράφημα 8: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι (1)



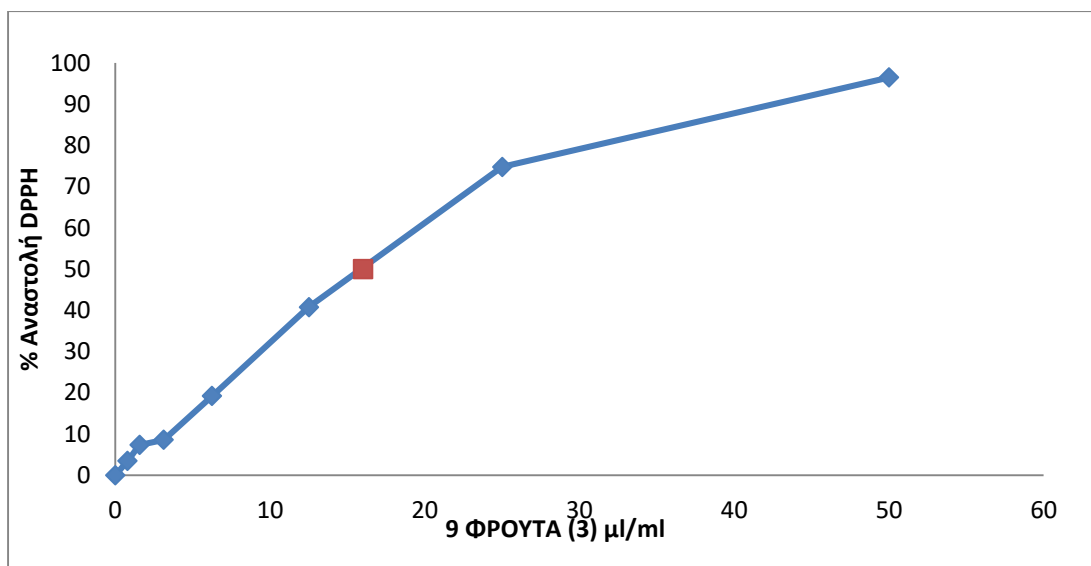
Γράφημα 9: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Blueberry/Raspberry/Cranberry



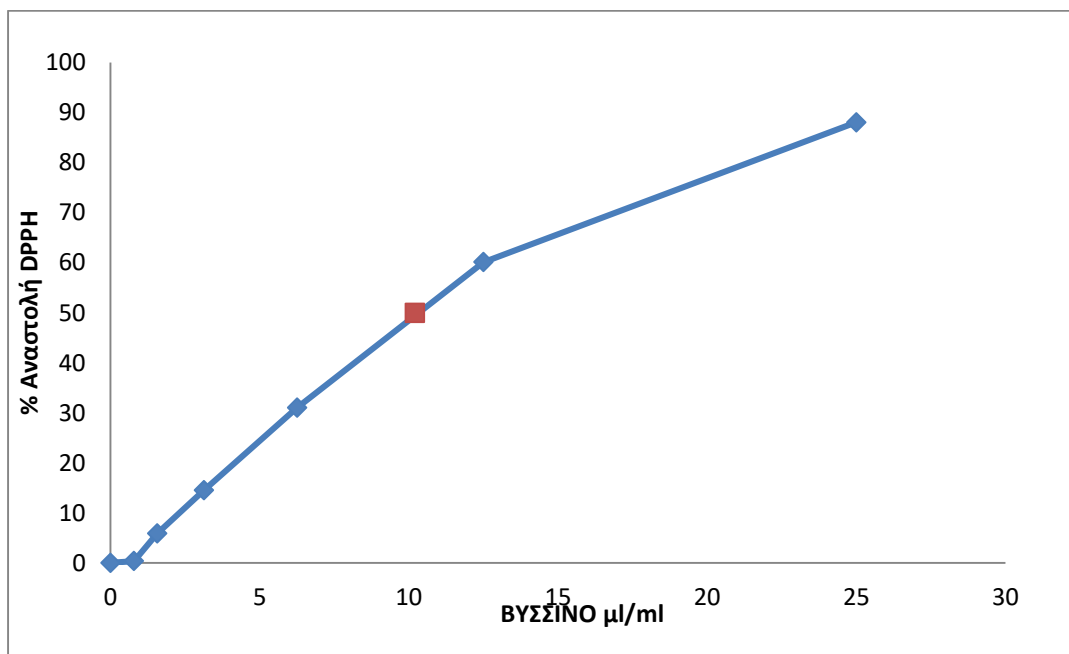
Γράφημα 10: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Blueberry/Raspberry/Ρόδι



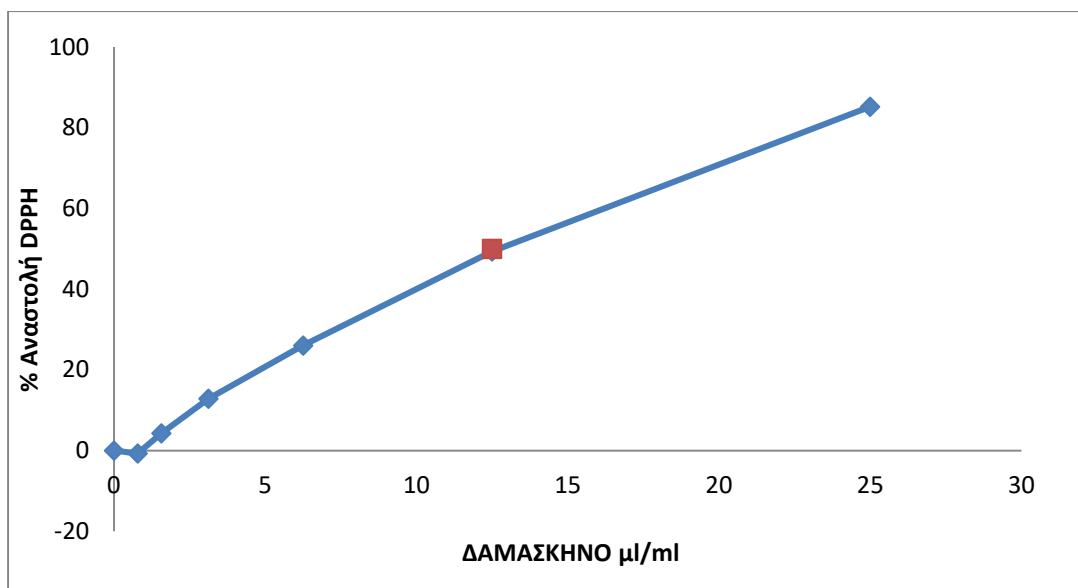
Γράφημα 11: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό 9 φρούτα(4)



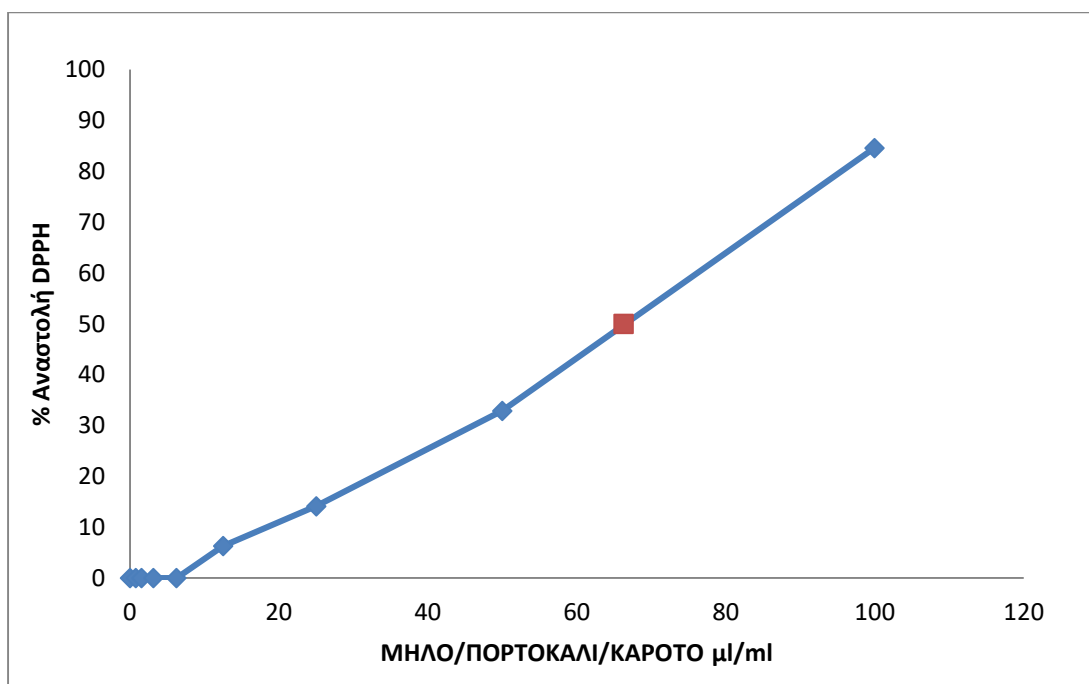
Γράφημα 12: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό 9 φρούτα (3)



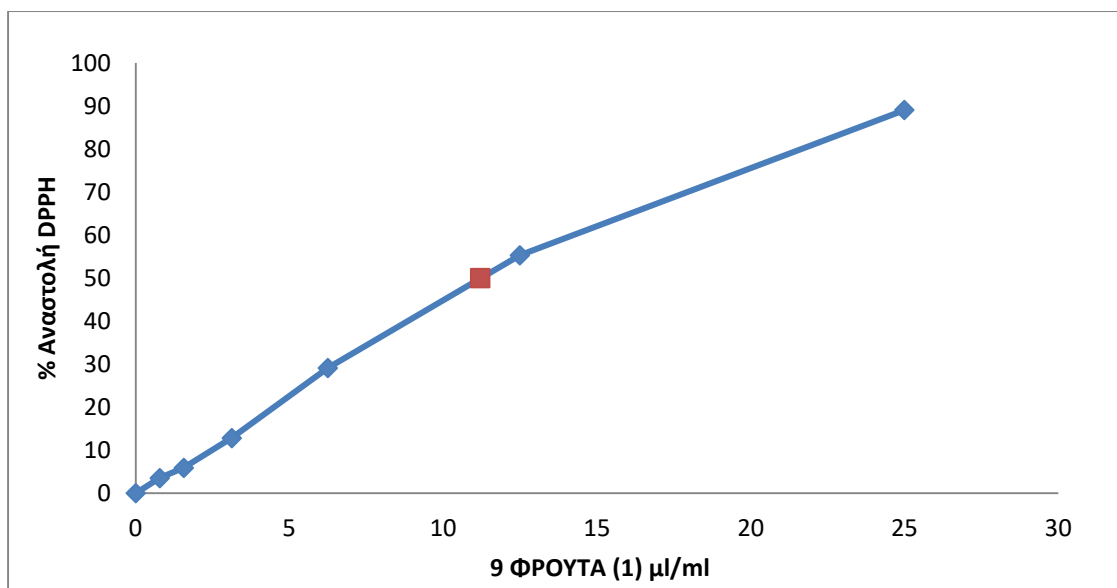
Γράφημα 13: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Βύσσινο



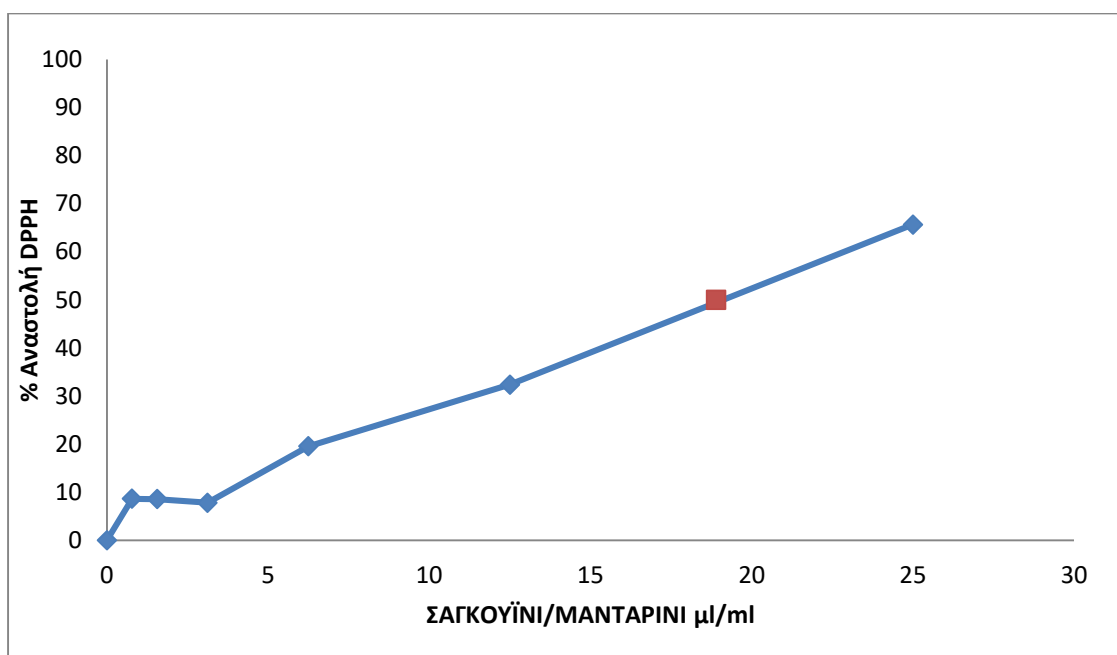
Γράφημα 14: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Δαμάσκηνο



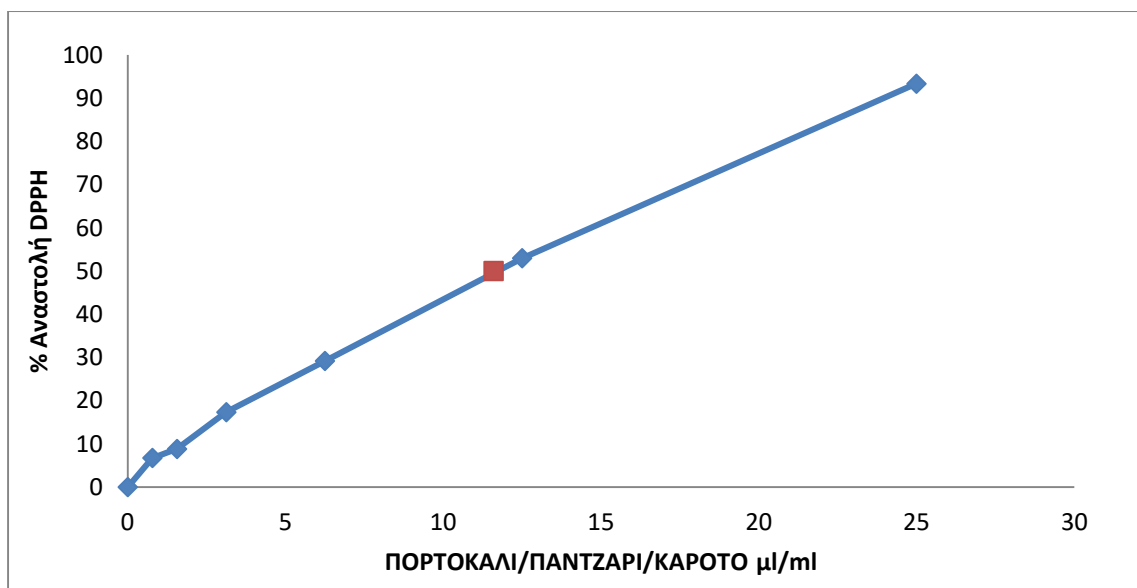
Γράφημα 15: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο (2)



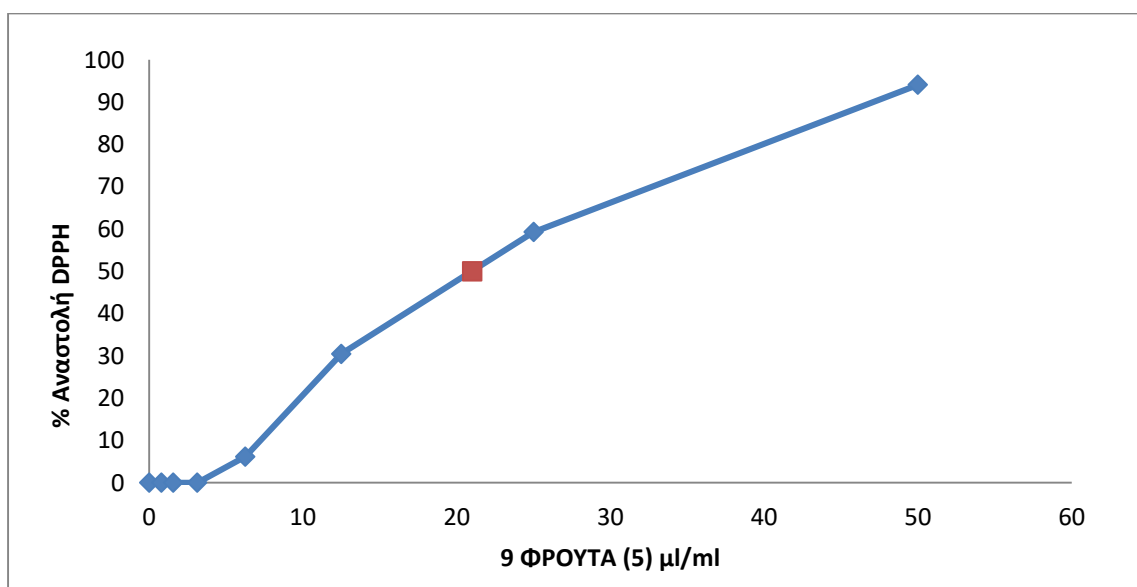
Γράφημα 16: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό 9 φρούτα (1)



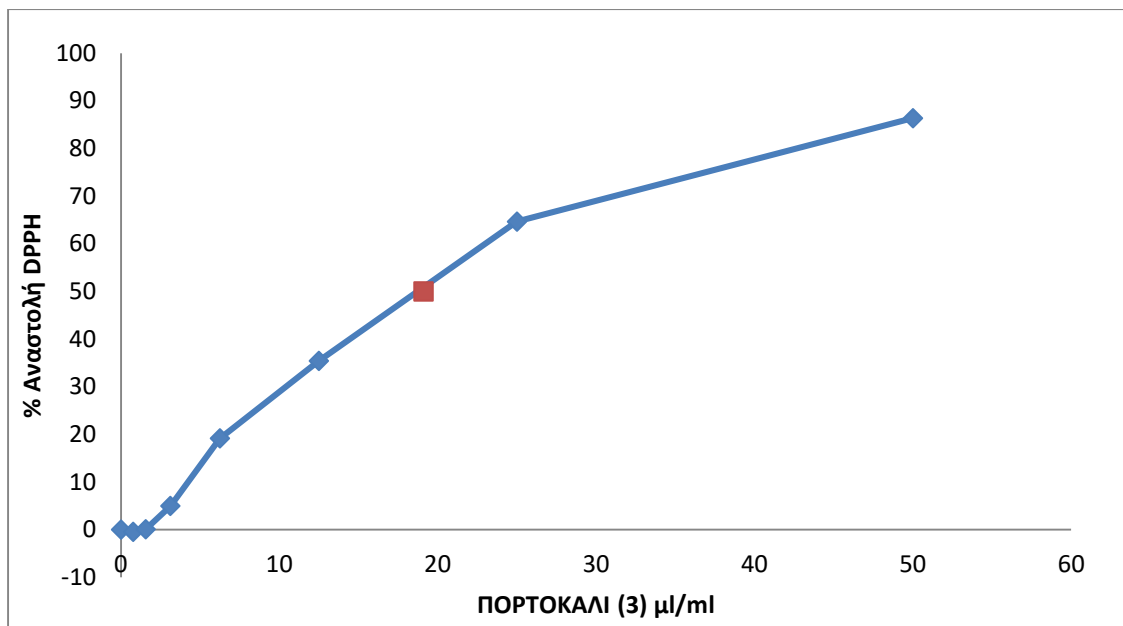
Γράφημα 17: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Σαγκουϊνι-Μανταρίνι



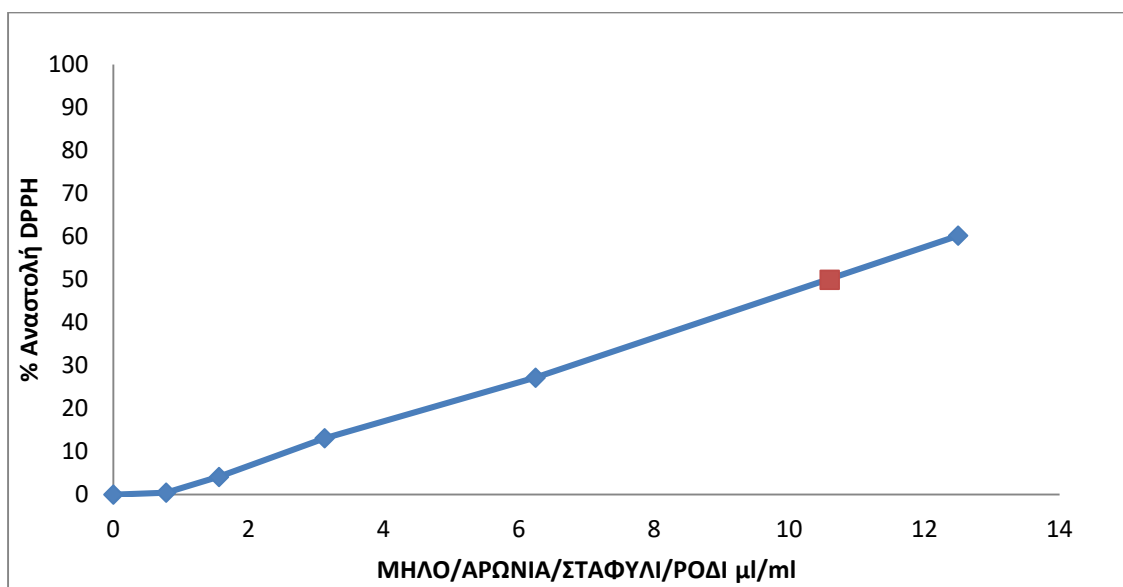
Γράφημα 18: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι/Παντζάρι/Καρότο



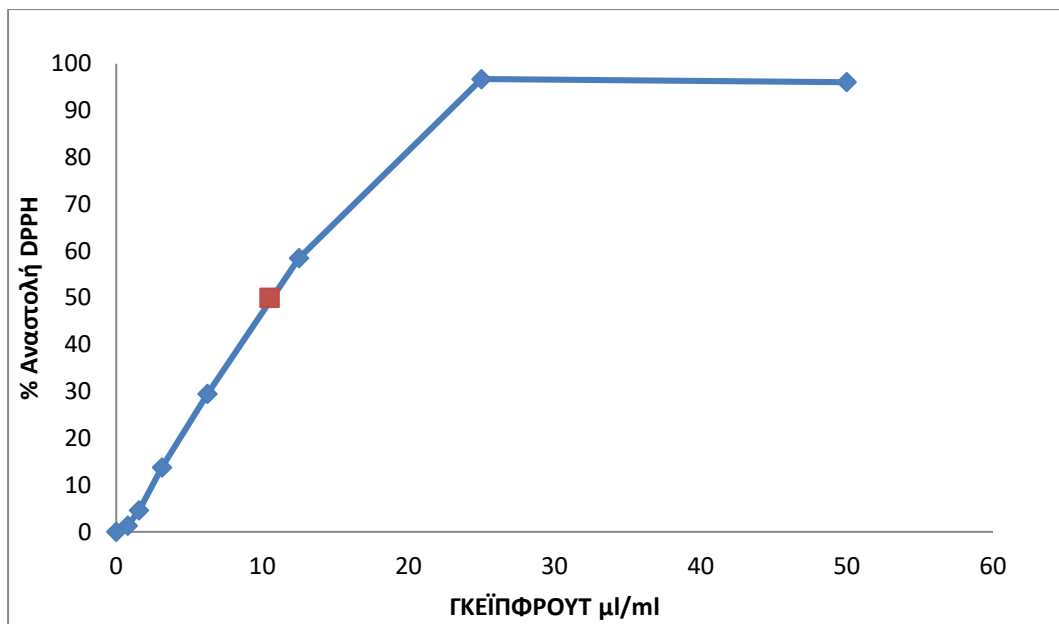
Γράφημα 19: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό 9 φρούτα (5)



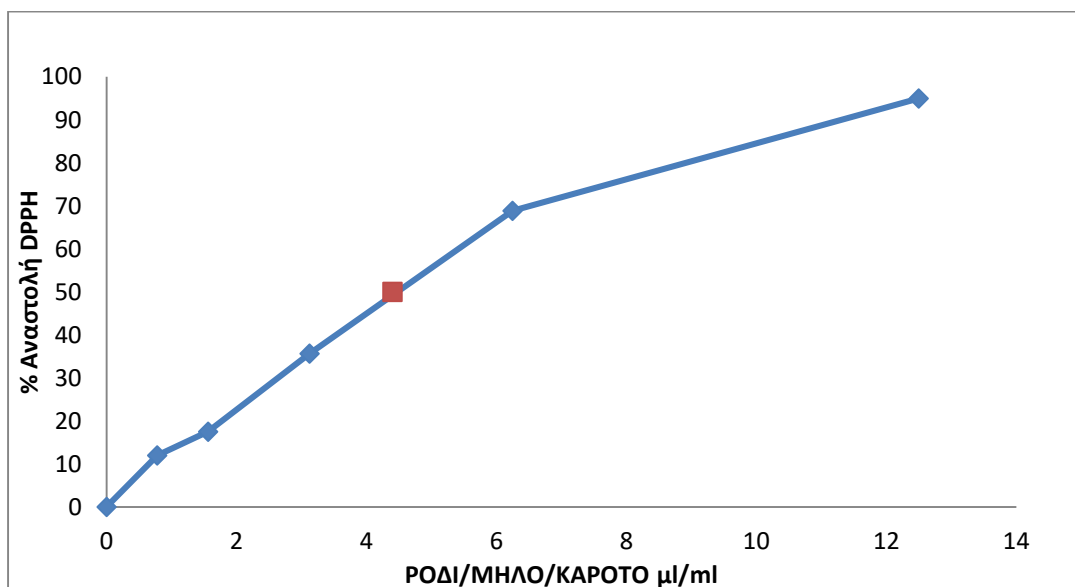
Γράφημα 20: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι (3)



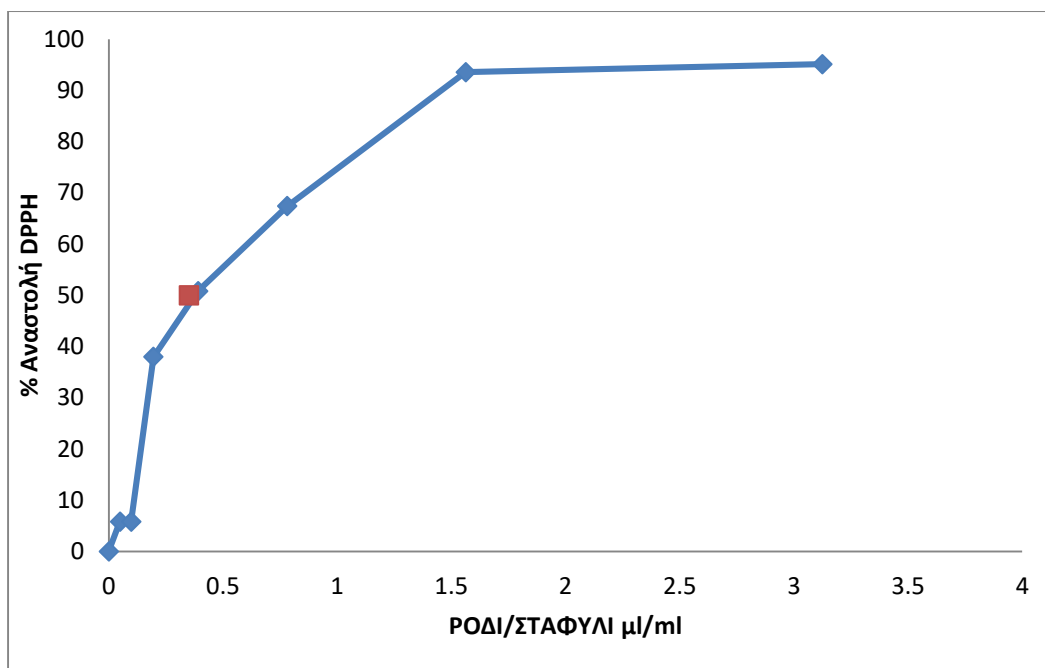
Γράφημα 21: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Μήλο/Αρώνια/Σταφύλι/Ρόδι



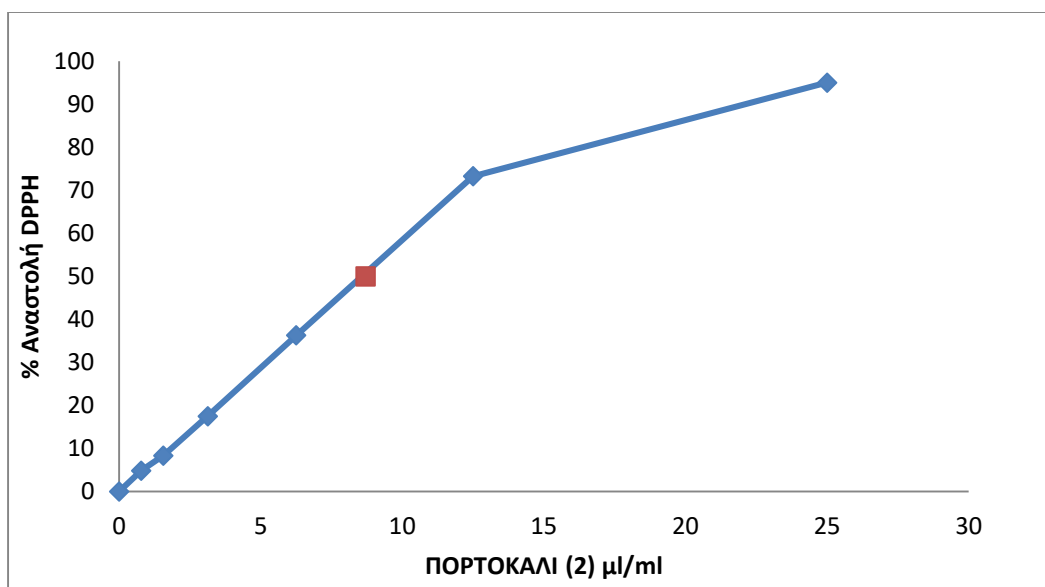
Γράφημα 22: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Γκρέϊπφρουτ



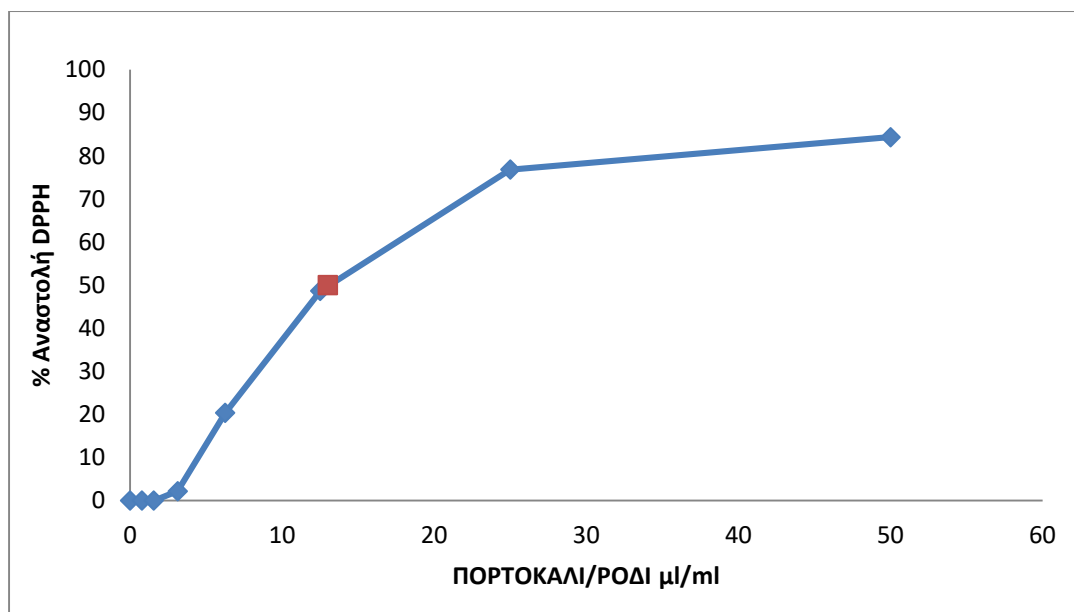
Γράφημα 23: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ρόδι/Μήλο/Καρότο



Γράφημα 24: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Ρόδι/Σταφύλι



Γράφημα 25: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι (2)



Γράφημα 26: Η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από το χυμό Πορτοκάλι/Ρόδι

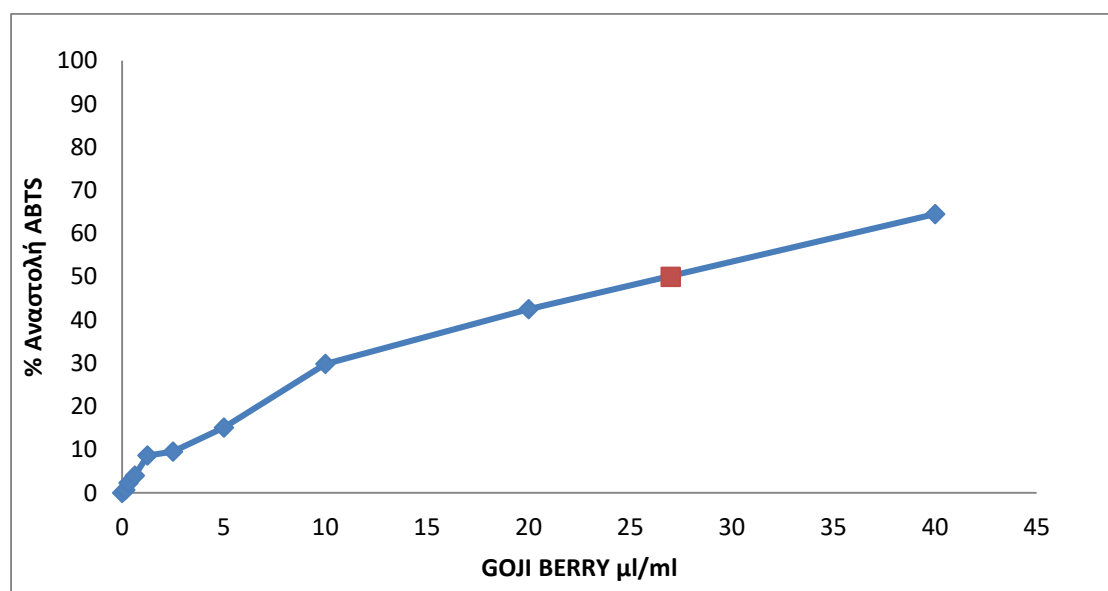
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH• με βάση τις τιμές IC₅₀ παίρνουμε την παρακάτω εικόνα στον πίνακα παρακάτω.

Πίνακας 2: Συνολικά αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH• σε όλους τους εξεταζόμενους χυμούς

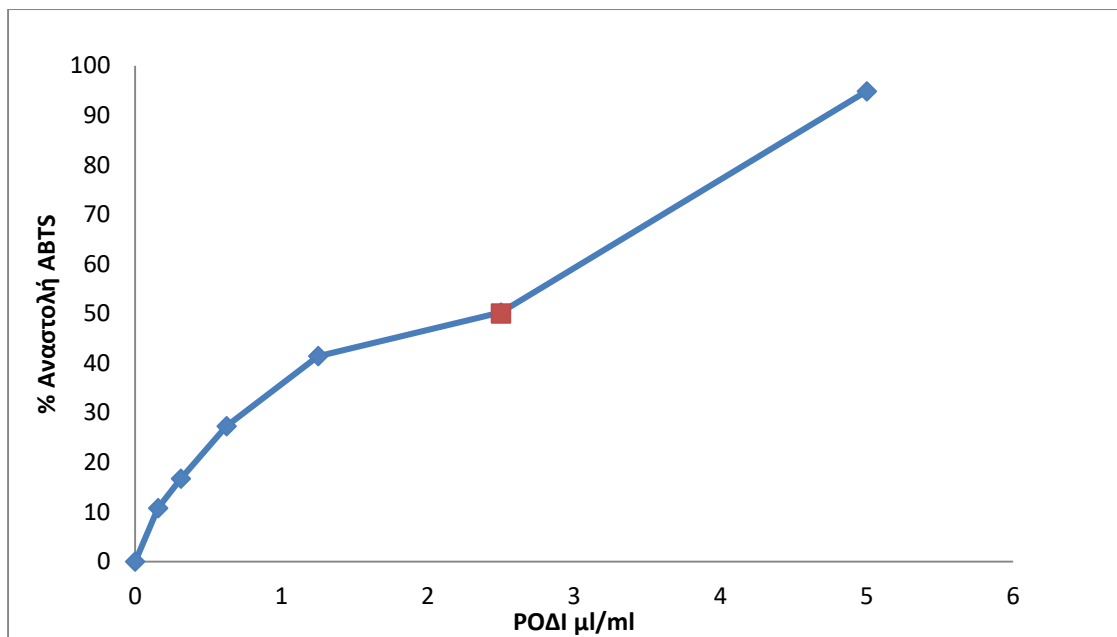
Χυμοί	IC ₅₀ (μl/ml)
1. ΡΟΔΙ-ΣΤΑΦΥΛΙ	0,32±0,05
2. ΡΟΔΙ	0,9±0,14
3. BLUEBERRY-RASBERRY-ΡΟΔΙ	3,0±0,45
4. ΣΤΑΦΥΛΙ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	3,2±0,48
5. ΜΗΛΟ-ΡΟΔΙ-ΚΑΡΟΤΟ	4,7±0,71
6. ΑΡΩΝΙΑ	8,0±1,2
7. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (2)	8,7±1,31
8. 9 ΦΡΟΥΤΑ (2)	9,0±1,35
9. ΒΥΣΣΙΝΟ	10,2±1,53
10. ΓΡΕΪΠΦΡΟΥΤ	10,5±1,58
11. ΜΗΛΟ-ΑΡΩΝΙΑ-ΡΟΔΙ	10,6±1,59
12. 9 ΦΡΟΥΤΑ (1)	11,2±1,68
13. 9 ΦΡΟΥΤΑ (4)	11,4±1,71
14. BLUEBERRY-RASBERRY-CRANBERRY	11,5±1,73
15. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΠΑΝΤΖΑΡΙ-ΚΑΡΟΤΟ	11,6±1,74
16. ΔΑΜΑΣΚΗΝΟ	12,5±1,88
17. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	13,0±1,95
18. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (1)	15,0±2,25
19. 9 ΦΡΟΥΤΑ (3)	16,0±2,40
20. GOJI BERRY	18,2±2,73
21. ΣΑΓΚΟΥΪΝΙ-MANTAPINI	18,9±2,84
22. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (3)	19,1±2,87
23. 9 ΦΡΟΥΤΑ (5)	21,2±3,18
24. ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΗΛΟ	24,8±3,72
25. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (1)	30,5±4,58
26. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (2)	66,3±9,95

3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•

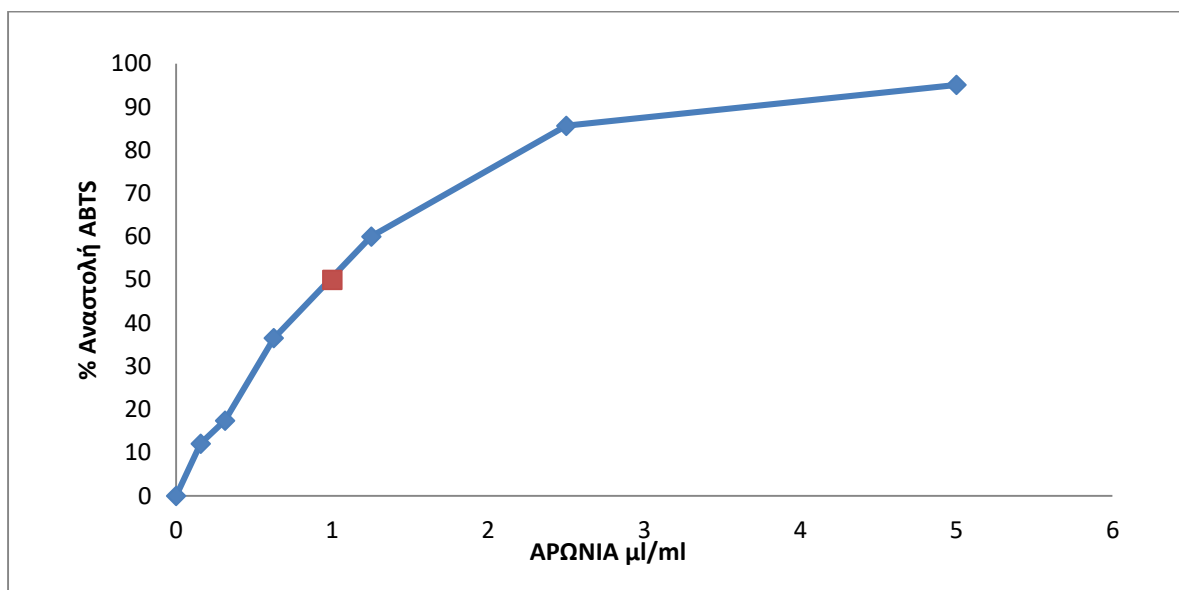
Μελετήθηκαν 26 δείγματα χυμών στις συγκεντρώσεις 0,78 , 1,56 , 3,13 , 6,25 , 12,50, 25,00 $\mu\text{l/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•. Παρατίθενται τα γραφήματα που παρουσιάζουν την % αναστολή της ρίζας ABTS• από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Οι χυμοί αρώνια, ρόδι-σταφύλι και μήλο-αρώνια-ρόδι εμφάνισαν τις πιο χαμηλές τιμές IC50 με τη μέθοδο αυτή με τιμές 1 , 1,1 και 1,7 $\mu\text{l/ml}$ αντίστοιχα υποδεικνύοντας την ισχυρότερη αντιμετώπιση της ρίζας του ABTS•.



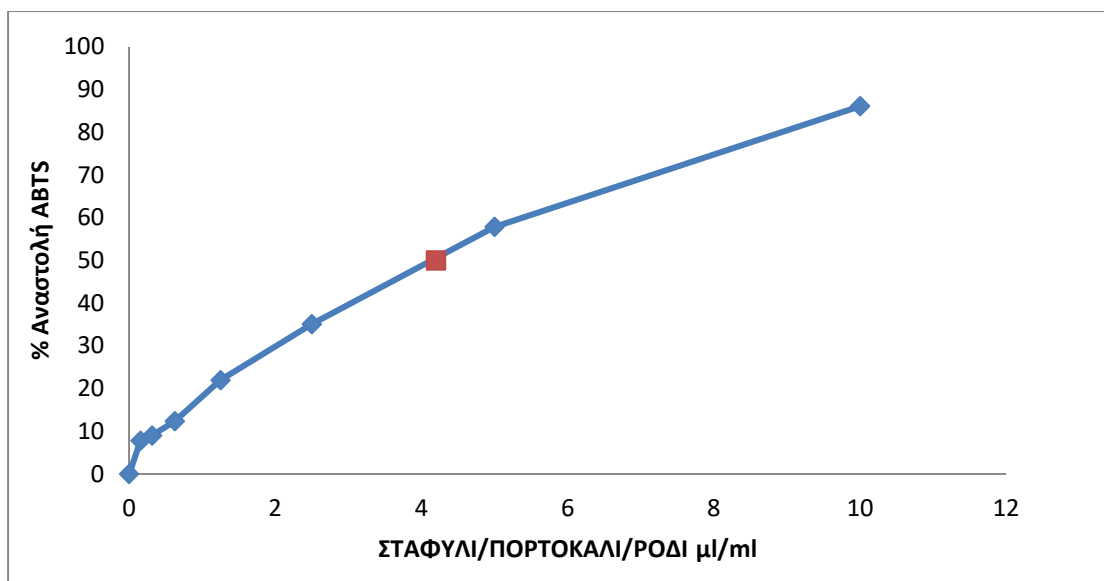
Γράφημα 27: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Goji Berry



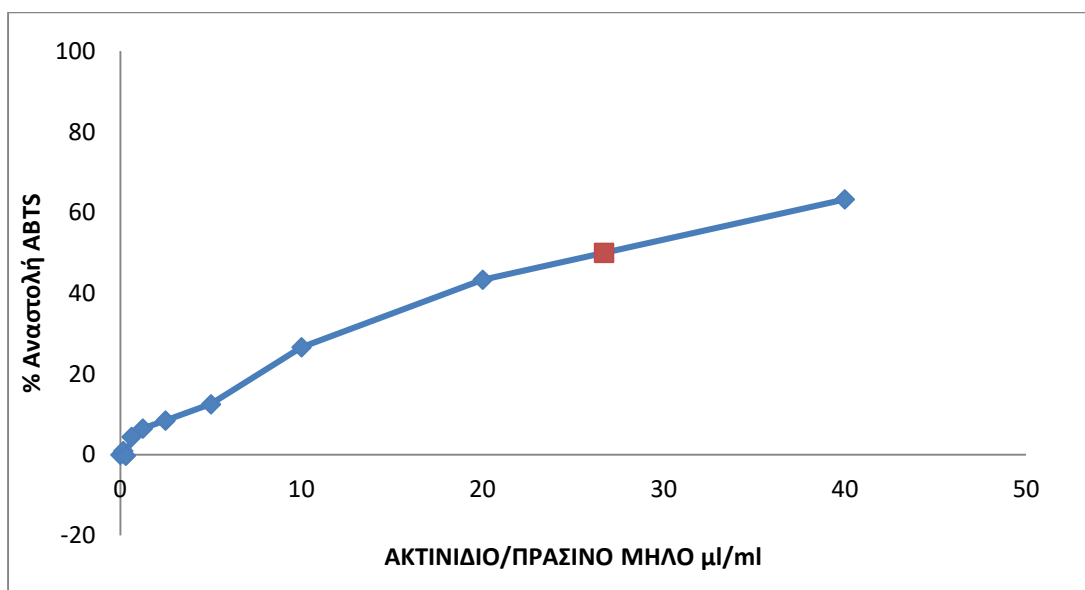
Γράφημα 28: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι



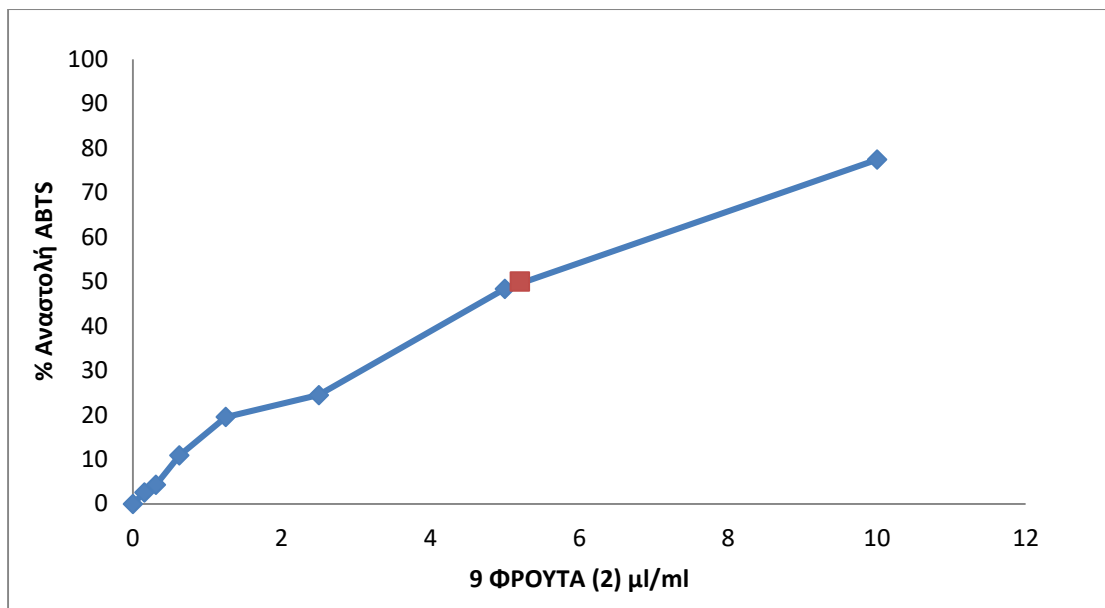
Γράφημα 29: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Αρώνια



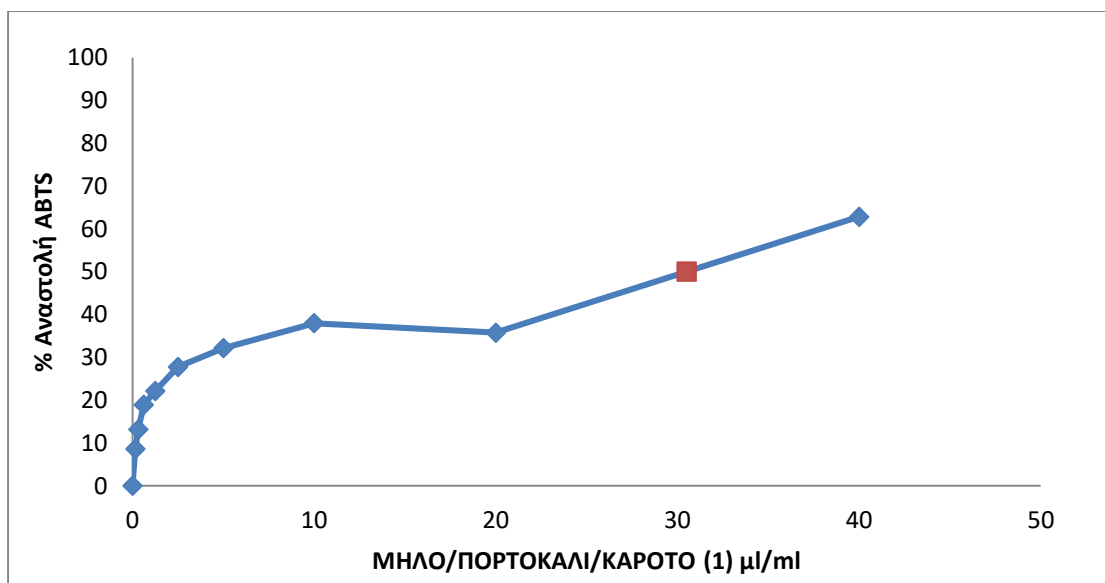
Γράφημα 30: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Σταφύλι/Πορτοκάλι/Ρόδι



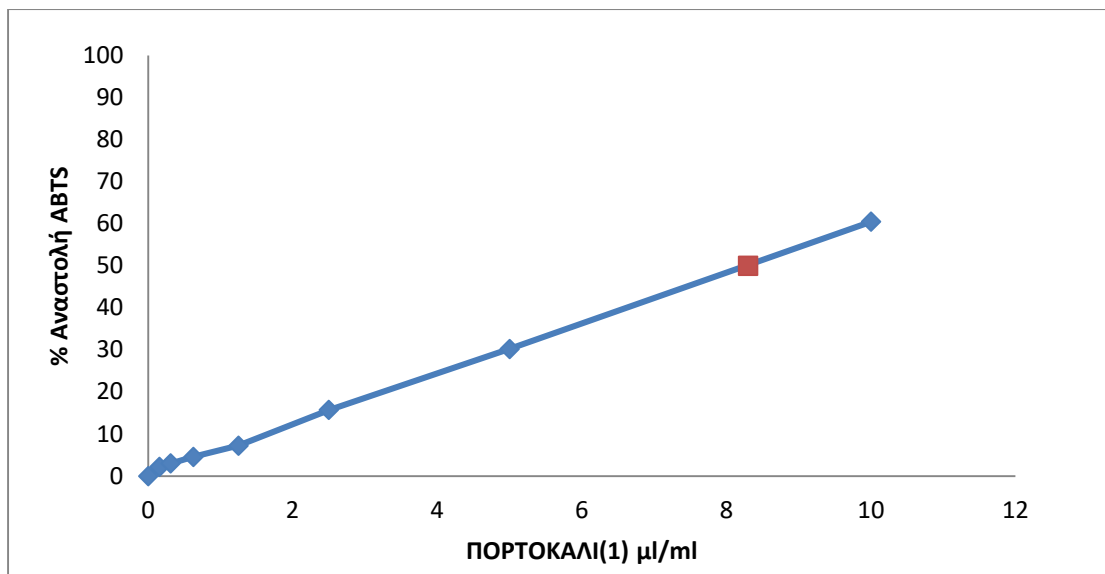
Γράφημα 31: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ακτινίδιο/πράσινο μήλο



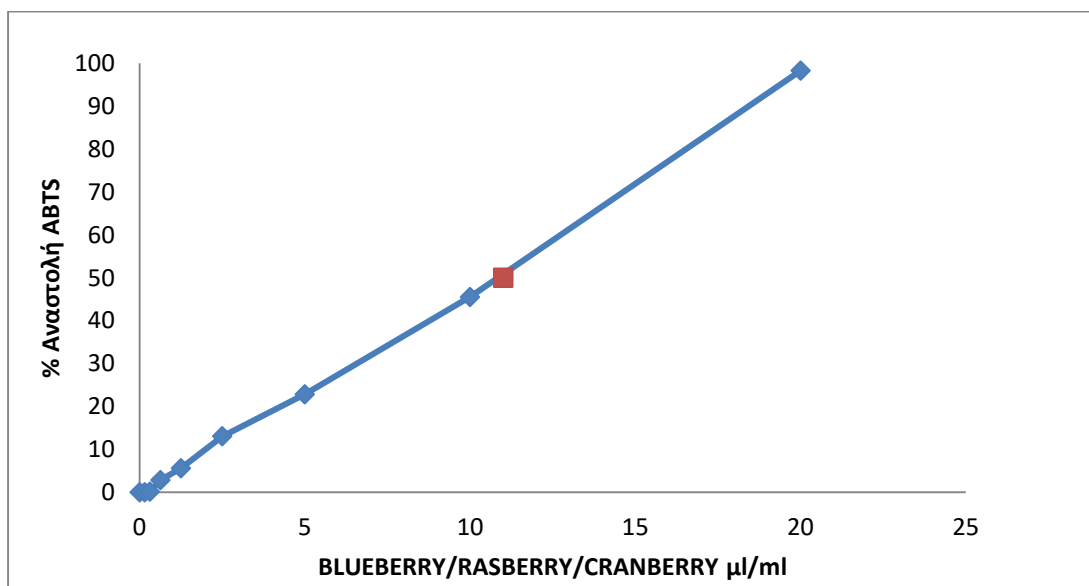
Γράφημα 32: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 Φρούτα (2)



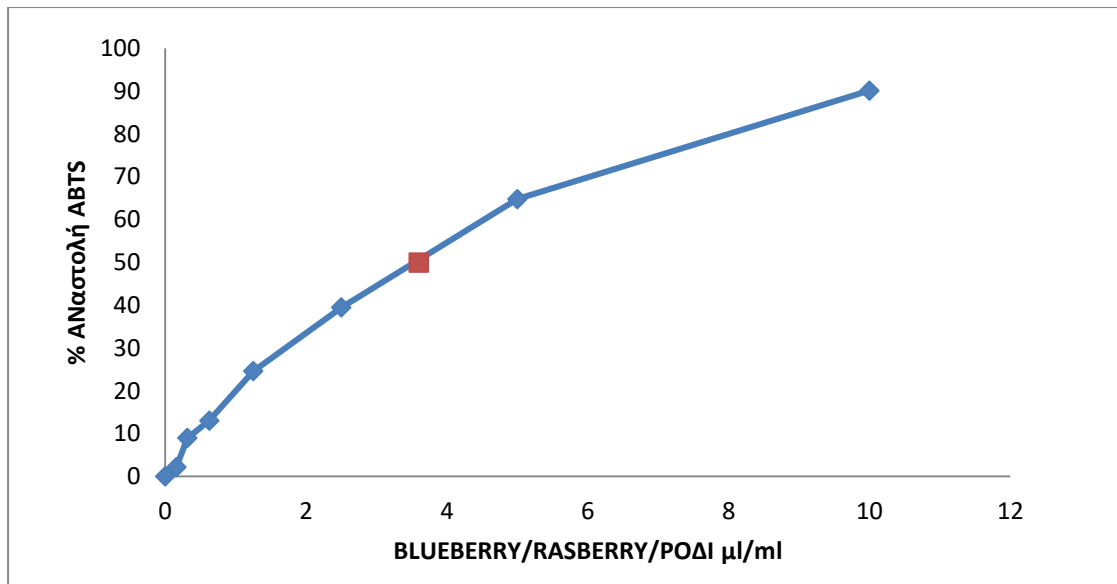
Γράφημα 33: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο (1)



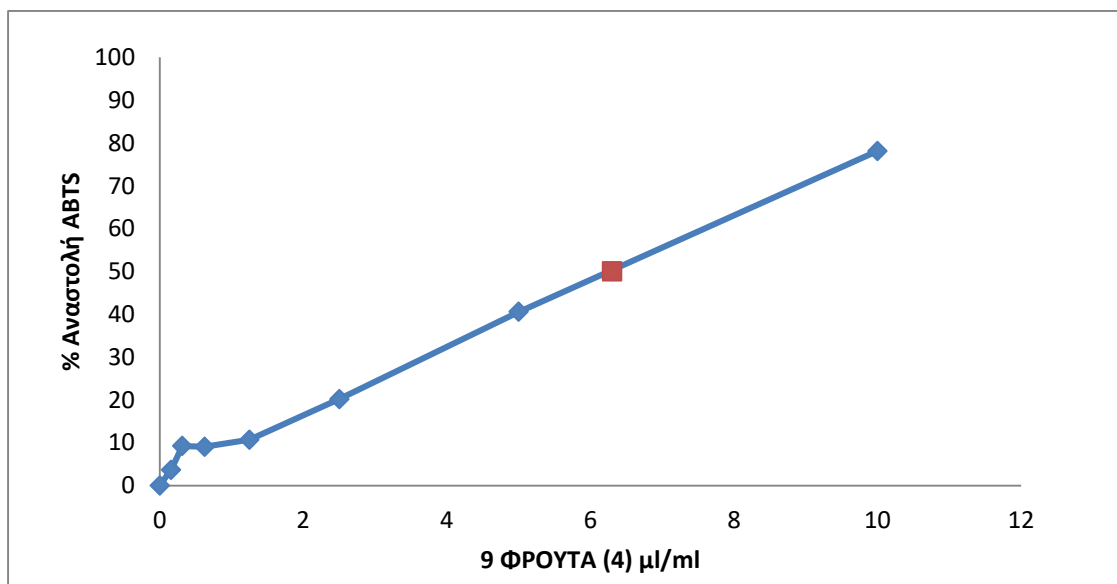
Γράφημα 34: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι (1)



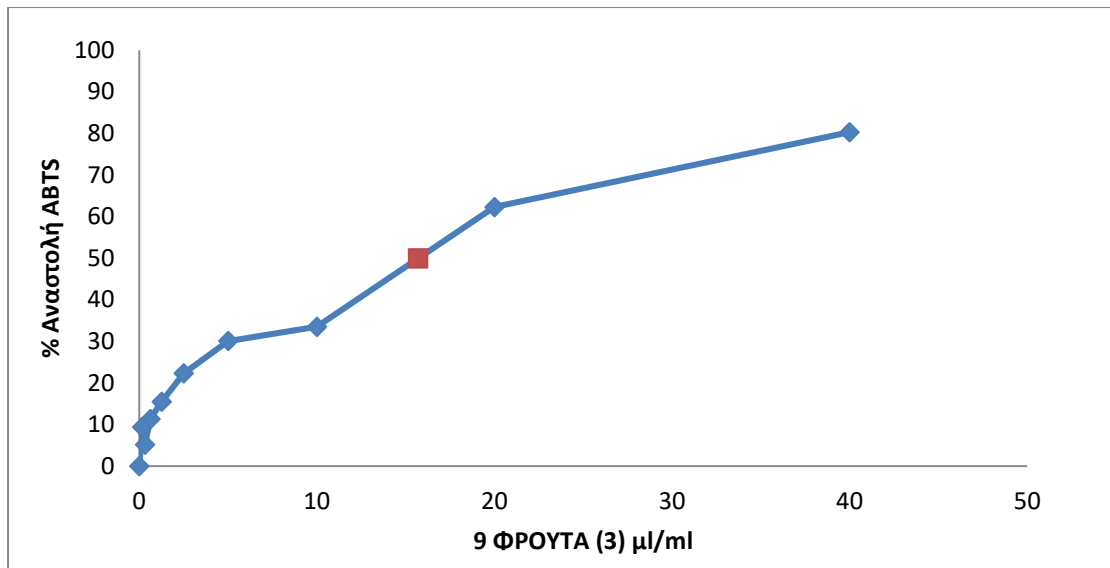
Γράφημα 35: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Blueberry/ Raspberry /Cranberry



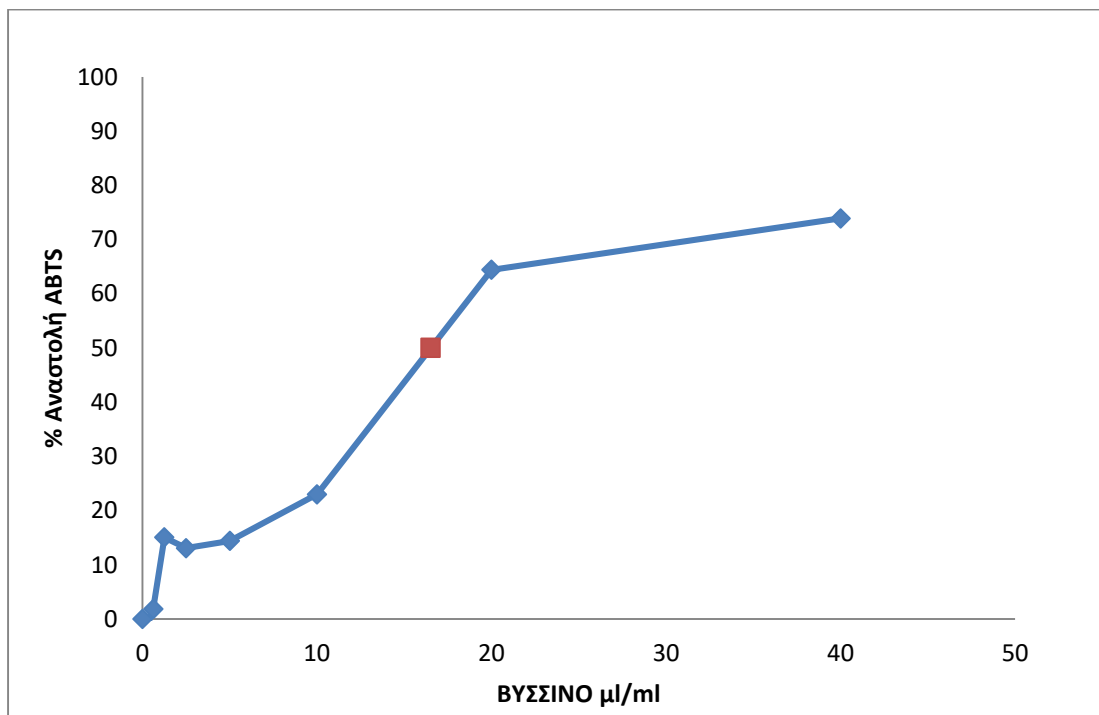
Γράφημα 36: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Blueberry/raspberry /ρόδι



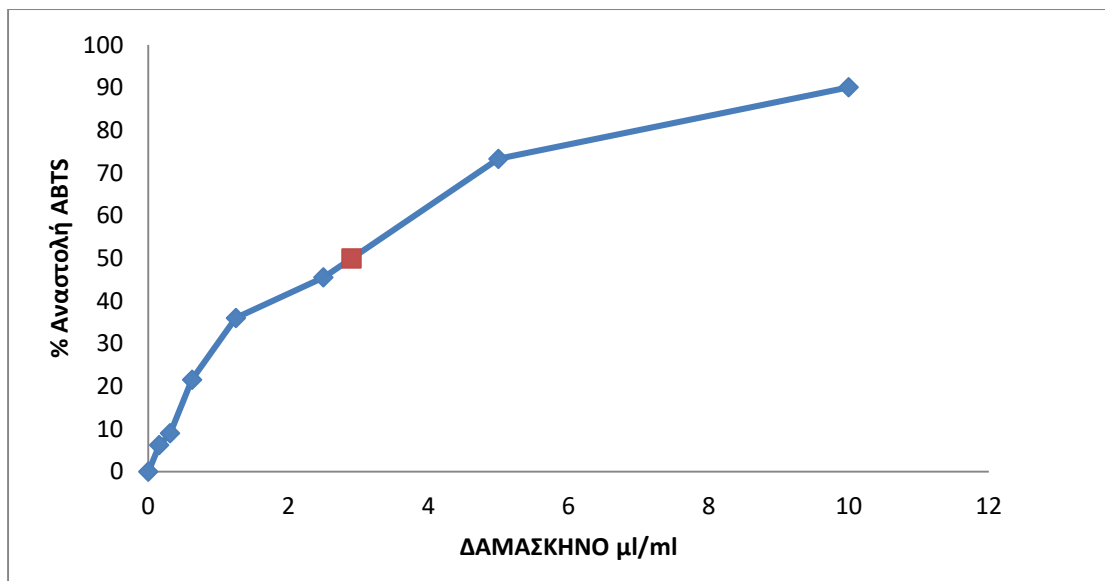
Γράφημα 37: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 φρούτα (4)



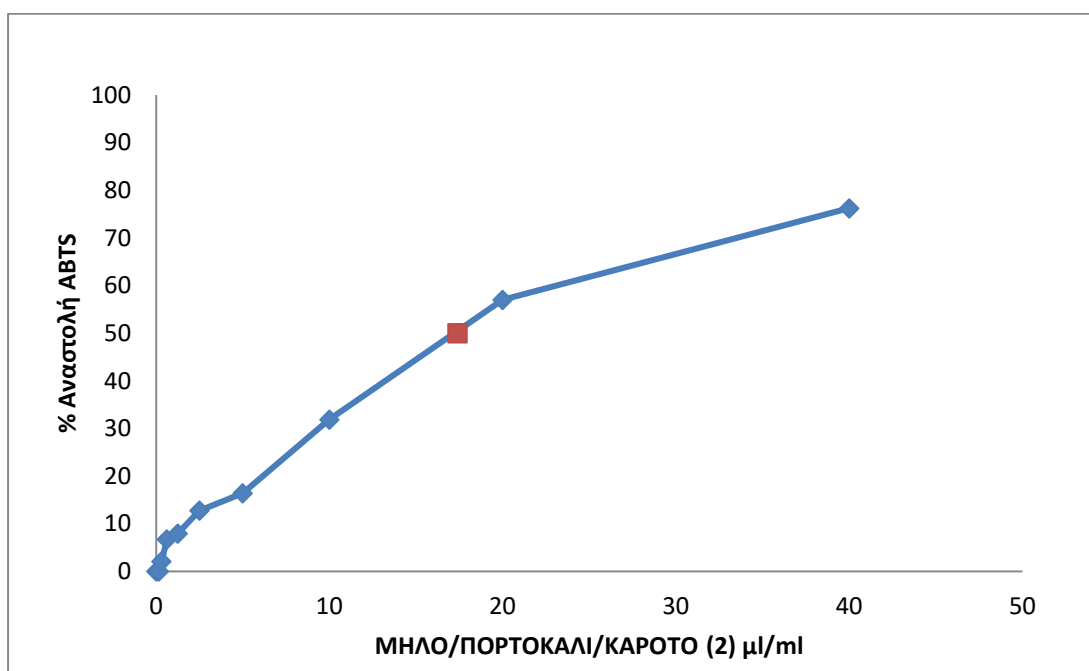
Γράφημα 38: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 φρούτα (3)



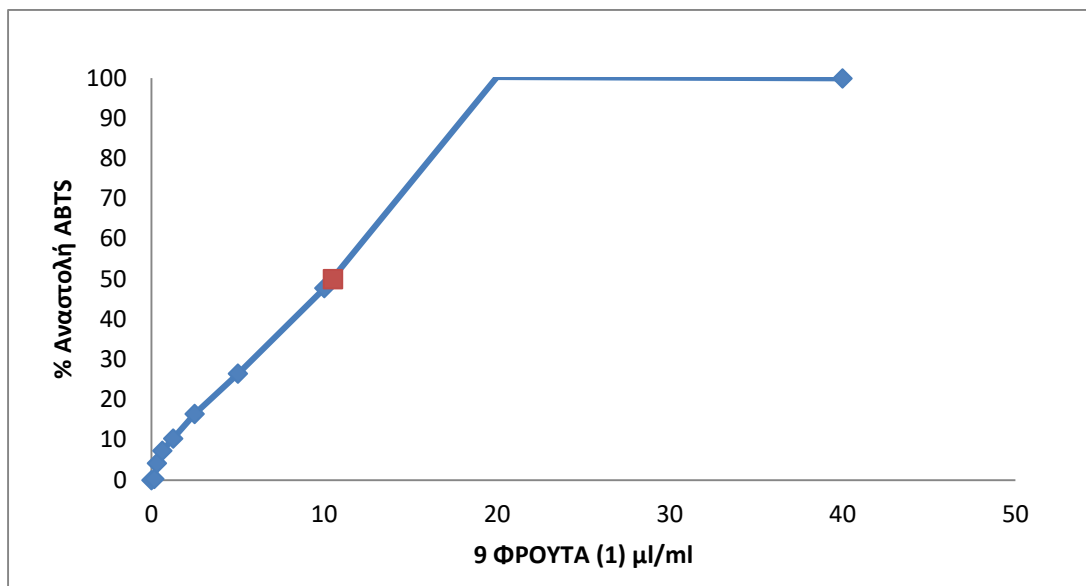
Γράφημα 39: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Βύσσινο



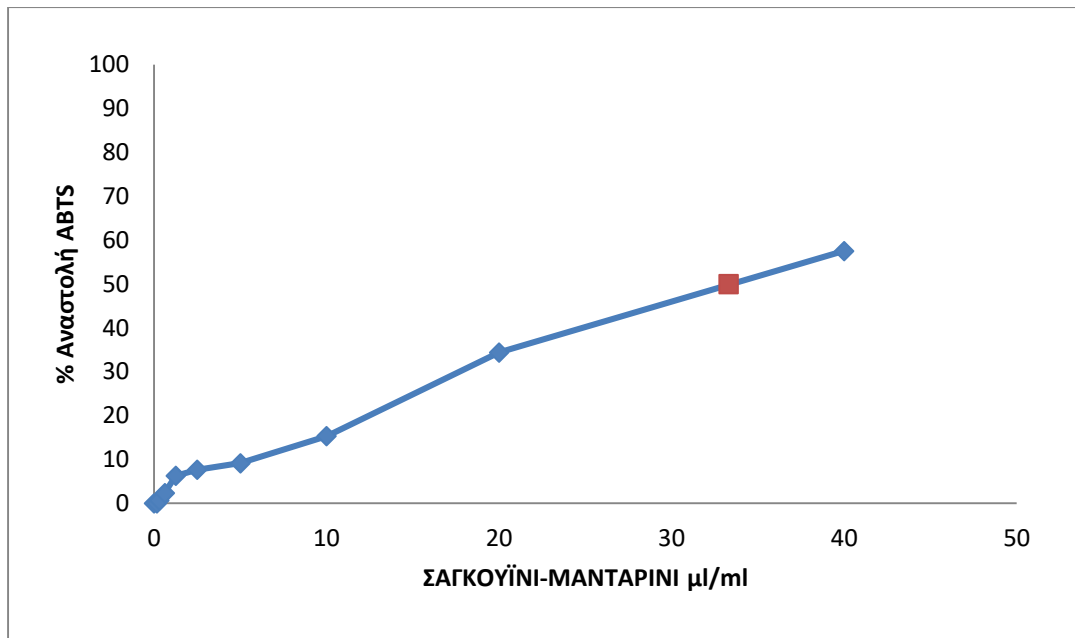
Γράφημα 40: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Λαμάσκηνο



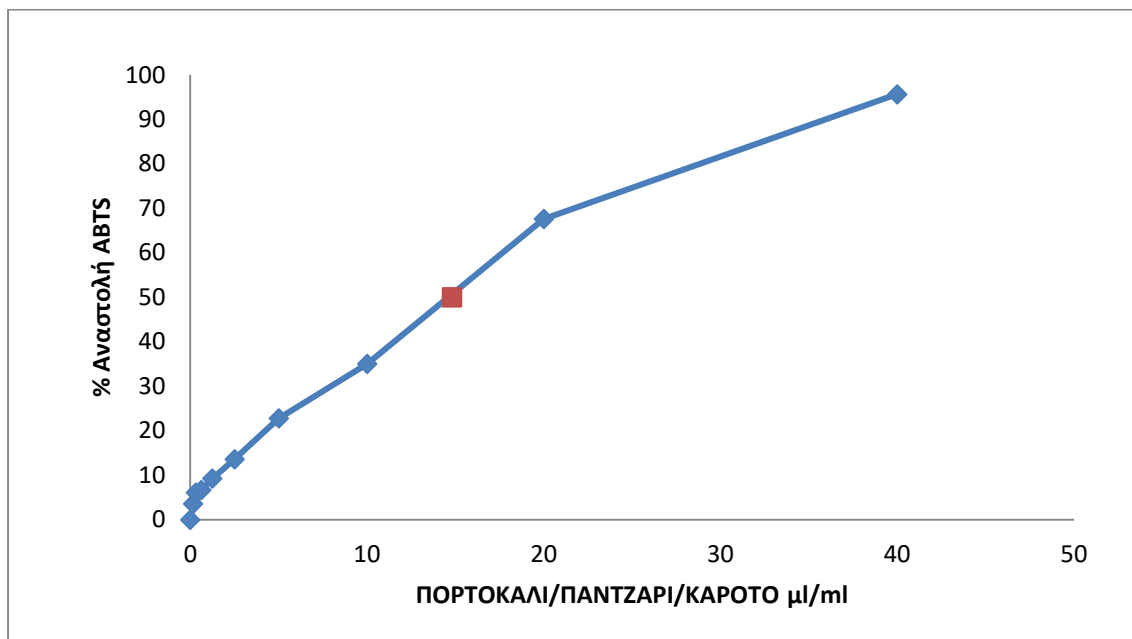
Γράφημα 41: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Πορτοκάλι/Καρότο (2)



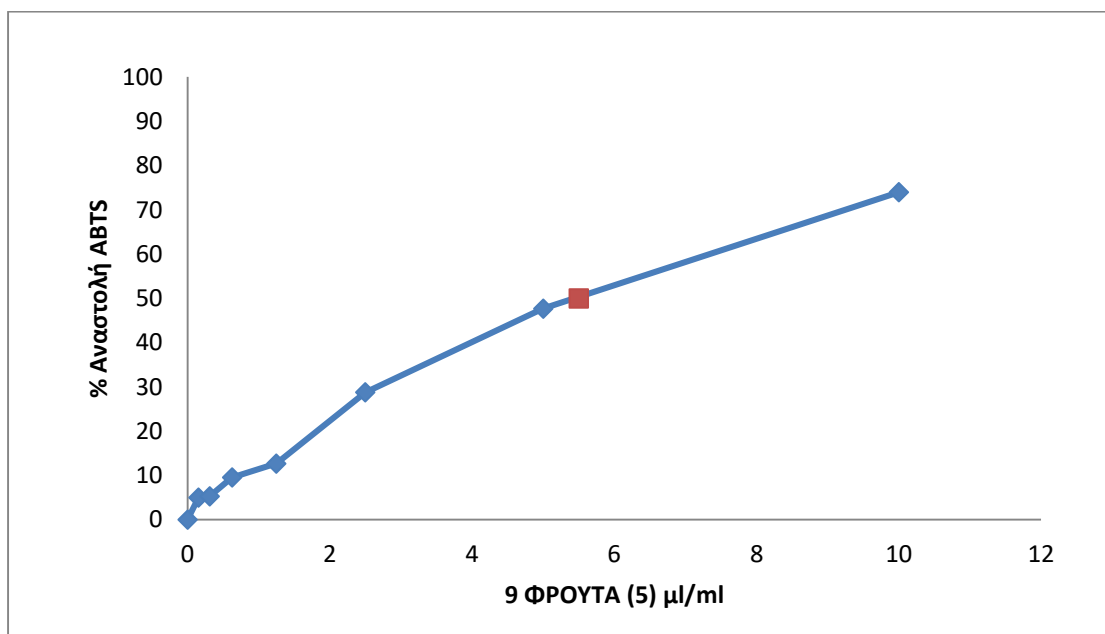
Γράφημα 42: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 φρούτα (1)



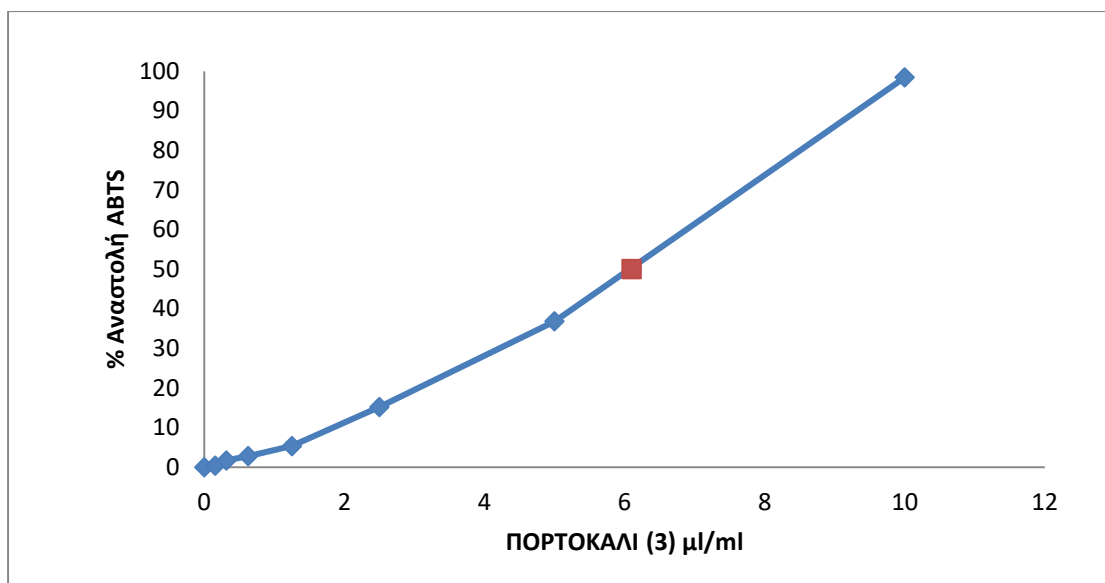
Γράφημα 43: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Σαγκουίνι-Μανταρίνι



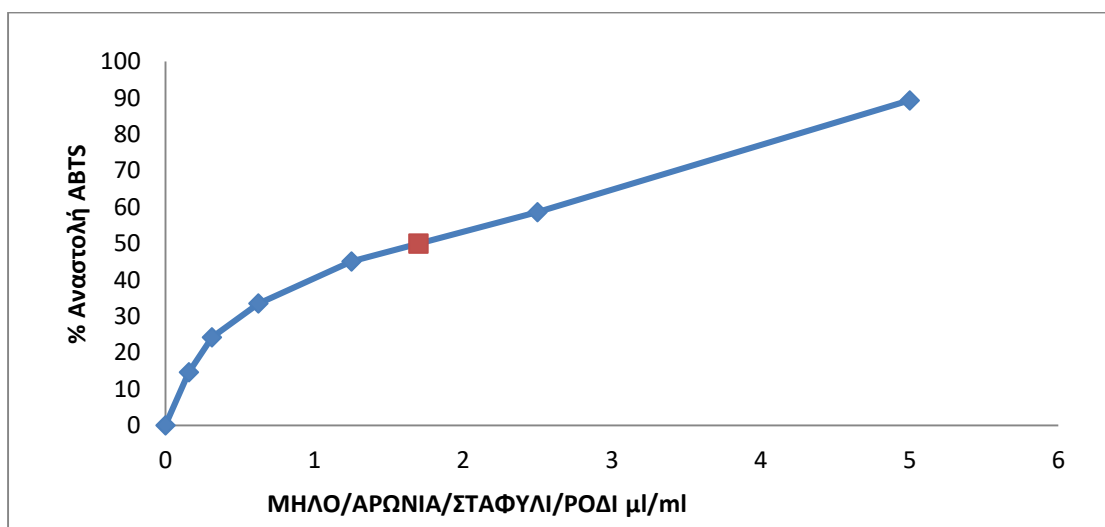
Γράφημα 44: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι/Παντζάρι/Καρότο



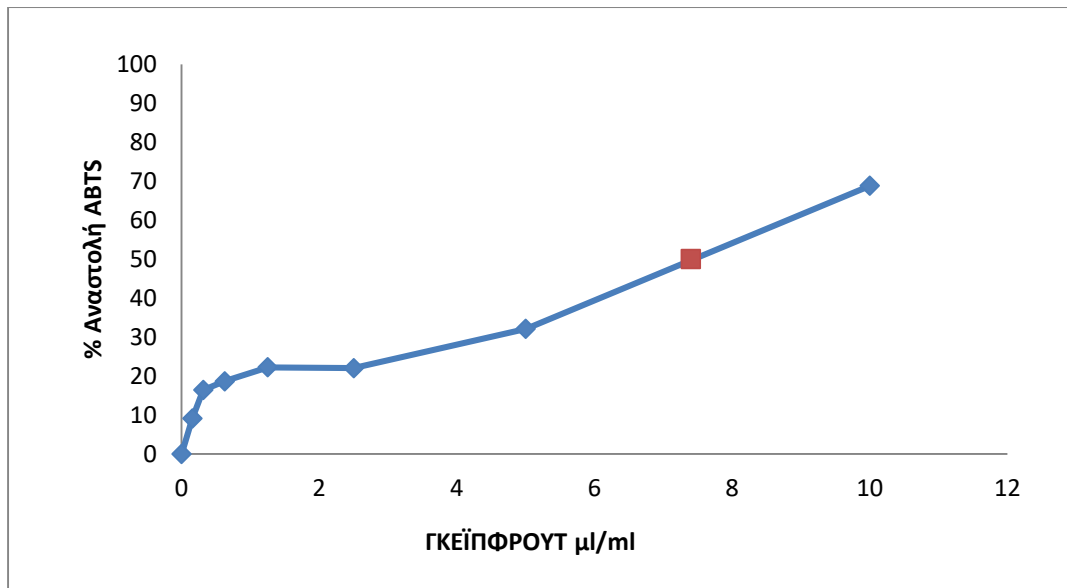
Γράφημα 45: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό 9 φρούτα (5)



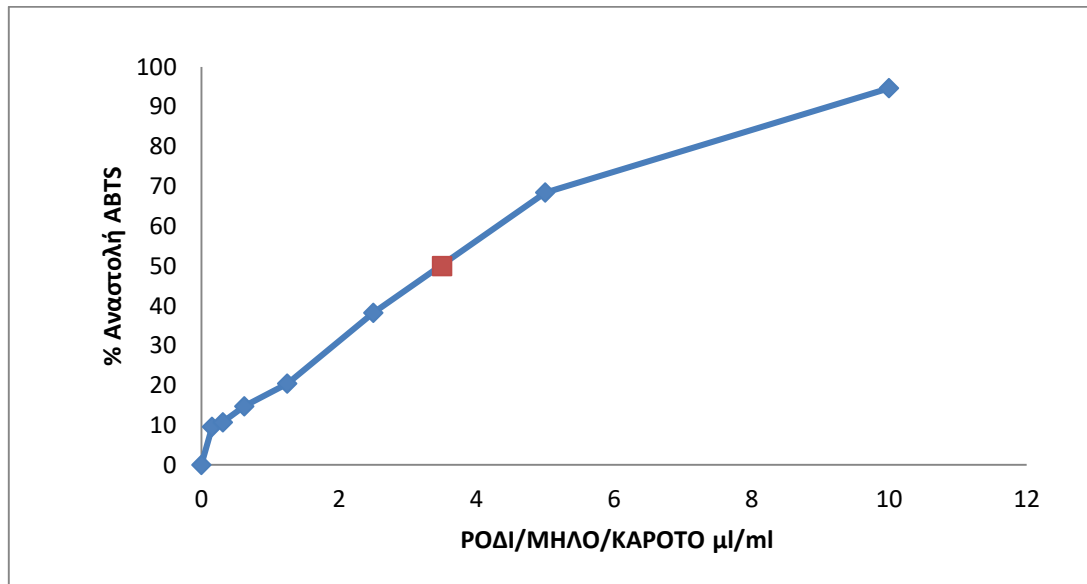
Γράφημα 46: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι (3)



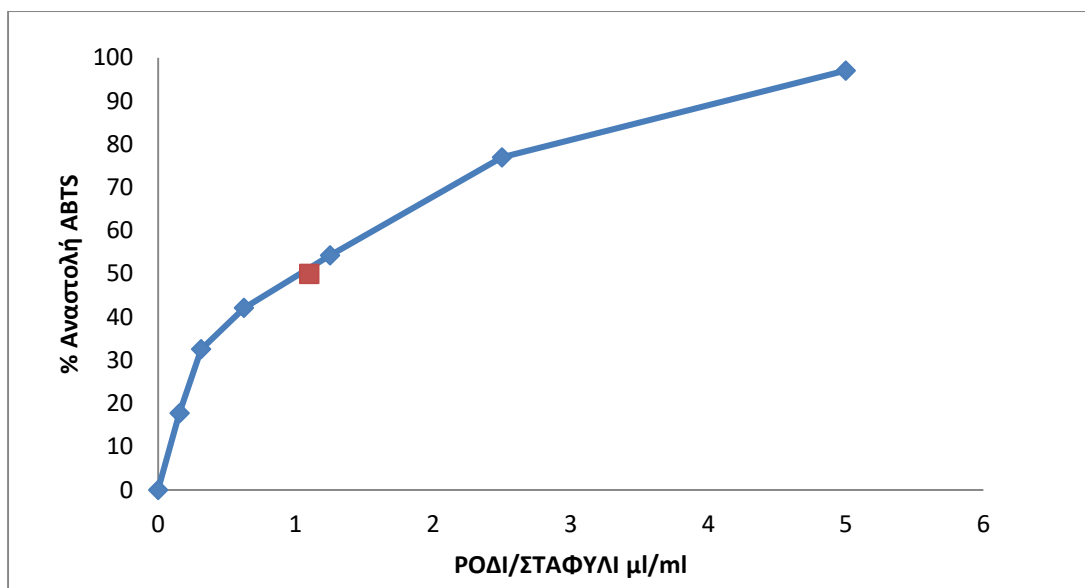
Γράφημα 47: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Μήλο/Αρώνια/Σταφύλι/Ρόδι



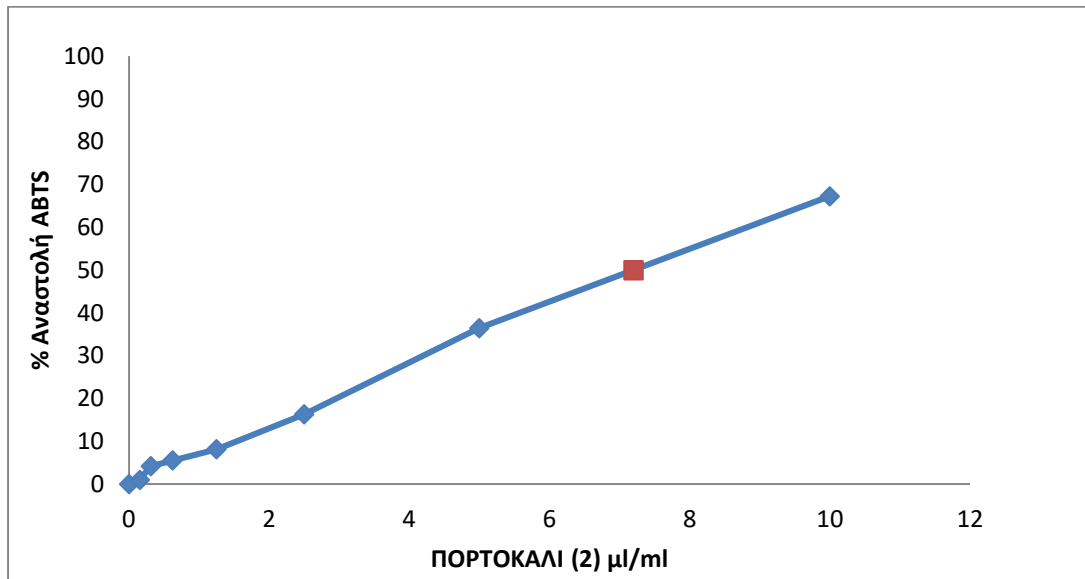
Γράφημα 48: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Γκρέιπφρουτ



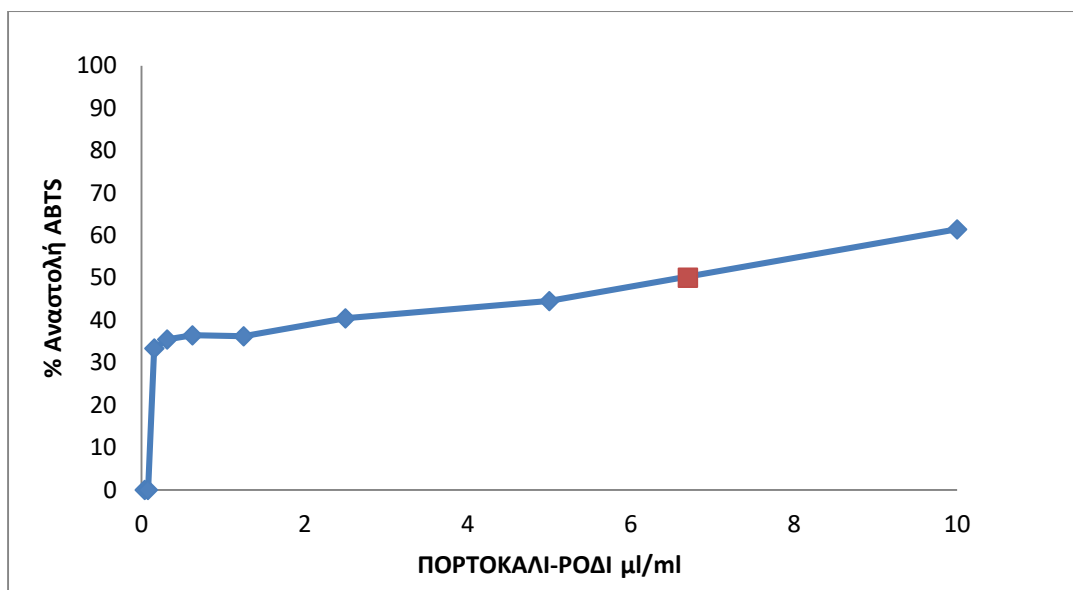
Γράφημα 49: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι/Μήλο/Καρότο



Γράφημα 50: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Ρόδι/Σταφύλι



Γράφημα 51: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι (2)



Γράφημα 52: Η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• από το χυμό Πορτοκάλι-ρόδι

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS• με βάση τις τιμές IC₅₀ παίρνουμε την παρακάτω εικόνα στον πίνακα παρακάτω.

Πίνακας 3: Συνολικά αποτελέσματα τις εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS• σε όλους τους εξεταζόμενους χυμούς

Χυμός	IC ₅₀ (μl/ml)
1. ΑΡΩΝΙΑ	1±0,2
2. ΡΟΔΙ-ΣΤΑΦΥΛΙ	1,1±0,2
3. ΜΗΛΟ-ΑΡΩΝΙΑ-ΡΟΔΙ	1,7±0,3
4. ΡΟΔΙ	2,5±0,4
5. ΔΑΜΑΣΚΗΝΟ	2,9±0,4
6. ΜΗΛΟ-ΡΟΔΙ-ΚΑΡΟΤΟ	3,5±0,5
7. BLUEBERRY-RASBERRY-ΡΟΔΙ	3,6±0,5
8. ΣΤΑΦΥΛΙ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	4,2±0,6
9. 9 ΦΡΟΥΤΑ (2)	5,2±0,8
10. 9 ΦΡΟΥΤΑ (5)	5,5±0,8
11. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (3)	6,1±0,9
12. 9 ΦΡΟΥΤΑ (4)	6,3±0,9
13. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	6,7±1
14. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (2)	7,2±1,1
15. ΓΡΕΪΠΦΡΟΥΤ	7,4±1,1
16. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (1)	8,3±1,2
17. 9 ΦΡΟΥΤΑ (1)	10,5±1,6
18. BLUEBERRY-RASPBERRY-CRANBERRY	11±1,7
19. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΠΑΝΤΖΑΡΙ-ΚΑΡΟΤΟ	14,8±2,2
20. 9 ΦΡΟΥΤΑ (3)	15,7±2,4
21. ΒΥΣΣΙΝΟ	16,2±2,4
22. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (2)	17,5±2,6
23. ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΗΛΟ	26,7±4
24. GOJI BERRY	27,2±4,1
25. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (1)	30,5±4,6
26. ΣΑΓΚΟΥΪΝΙ-MANTAPINI	33,3±5

3.3 Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας των χυμών σε ολικές φαινόλες και φλαβονοειδή με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu μετρήσαμε τη περιεκτικότητα των χυμών σε ολικές πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά λίτρο δείγματος (GAEs/l), με τη χρήση μιας καμπύλης βαθμονόμησης (Διάγραμμα 1) έναντι προτύπων γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 4: Περιεκτικότητα (mg/ml) εξετασθέντων χυμών σε ολικές πολυφαινόλες, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Χυμός	GAE (mg/ml)
1. ΡΟΔΙ	3,504
2. ΑΡΩΝΙΑ	3,227
3. ΜΗΛΟ-ΑΡΩΝΙΑ-ΡΟΔΙ	2,588
4. ΡΟΔΙ-ΣΤΑΦΥΛΙ	2,328
5. BLUEBERRY-RASBERRY-ΡΟΔΙ	2,162
6. ΣΤΑΦΥΛΙ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	2,042
7. ΜΗΛΟ-ΡΟΔΙ-ΚΑΡΟΤΟ	1,651
8. 9 ΦΡΟΥΤΑ (1)	1,357
9. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΠΑΝΤΖΑΡΙ-ΚΑΡΟΤΟ	1,017
10. ΓΡΕΪΠΦΡΟΥΤ	0,995
11. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (1)	0,949
12. ΔΑΜΑΣΚΗΝΟ	0,895
13. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	0,823
14. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (1)	0,744
15. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (2)	0,741
16. 9 ΦΡΟΥΤΑ (2)	0,697
17. 9 ΦΡΟΥΤΑ (3)	0,677
18. ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ (2)	0,652
19. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (3)	0,636
20. 9 ΦΡΟΥΤΑ (4)	0,599
21. GOJI BERRY	0,585
22. 9 ΦΡΟΥΤΑ (5)	0,571
23. BLUEBERRY-RASBERRY-CRANBERRY	0,567
24. ΒΥΣΣΙΝΟ	0,509
25. ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΗΛΟ	0,508
26. ΣΑΓΚΟΥΪΝΙ-MANTAPINI	0,221

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων στους εξετασθέντες χυμούς

Χυμός	DPPH	ABTS	F-C
GOJI BERRY	18,2	27,2	0,585
ΡΟΔΙ	0,9	2,5	3,504
ΑΡΩΝΙΑ	8,0	1	3,227
ΣΤΑΦΥΛΙ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	3,2	4,2	2,042
ΑΚΤΙΝΙΔΙΟ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΗΛΟ	24,8	26,7	0,508
MOTION	9,0	5,2	0,697
ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ	30,5	30,5	0,744
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (1)	15	8,3	0,949
BLUEBERRY-RASBERRY-CRANBERRY	11,5	11	0,567
BLUEBERRY-RASBERRY-ΡΟΔΙ	3,0	3,6	2,162
9 ΦΡΟΥΤΑ (4)	11,4	6,3	0,599
9 ΦΡΟΥΤΑ (3)	16,0	15,7	0,677
ΒΥΣΣΙΝΟ	10,2	16,2	0,509
ΔΑΜΑΣΚΗΝΟ	12,5	2,9	0,895
ΜΗΛΟ-ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΚΑΡΟΤΟ	66,3	17,5	0,652
9 ΦΡΟΥΤΑ (1)	11,2	10,5	1,357
ΣΑΓΚΟΥΪΝΙ-MANTAPINI	18,9	33,3	0,221
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΠΑΝΤΖΑΡΙ-ΚΑΡΟΤΟ	11,6	14,8	1,017
9 ΦΡΟΥΤΑ (5)	21,2	5,5	0,571
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (3)	19,1	6,1	0,636
ΜΗΛΟ-ΑΡΩΝΙΑ-ΡΟΔΙ	10,6	1,7	2,588
ΓΡΕΪΠΦΟΥΤ	10,5	7,4	0,995
ΜΗΛΟ-ΡΟΔΙ-ΚΑΡΟΤΟ	4,7	3,5	1,651
ΡΟΔΙ-ΣΤΑΦΥΛΙ	0,32	1,1	2,328
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ (2)	8,7	7,2	0,741
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΡΟΔΙ	13,0	6,7	0,823

3.4 Στατιστική συσχέτιση

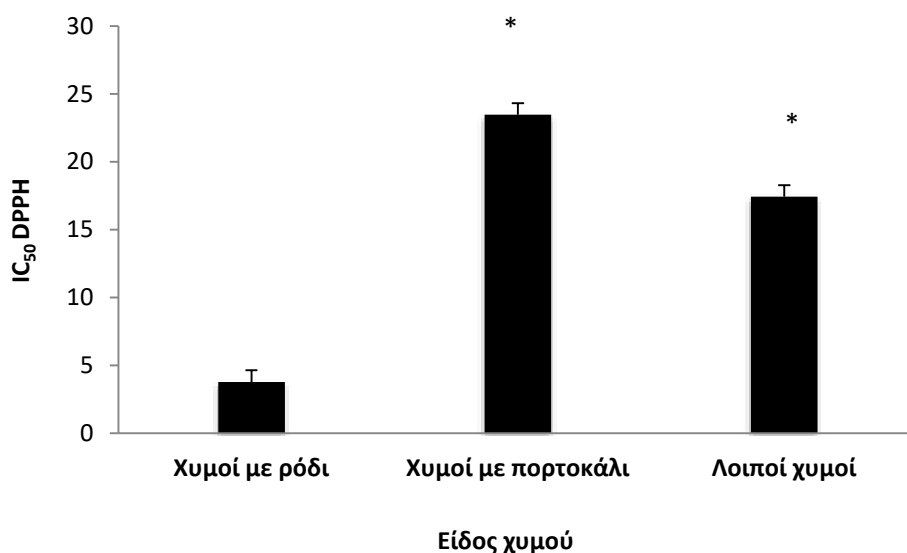
Κάνοντας στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης των ριζών DPPH• και ABTS• με την περιεκτικότητα των χυμών σε πολυφαινόλες όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, προέκυψαν σημαντικά αρνητικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα πολυφαινολών και στην εξουδετέρωση των δυο αυτών ριζών. Το αποτέλεσμα (Πίνακας 5) επιβεβαιώνει την υπόθεση πως η μεγάλη παρουσία πολυφαινολών σε ένα δείγμα, παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών.

Πίνακας 6: Στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στην εξουδετέρωση των ριζών DPPH• και ABTS• και στη περιεκτικότητα των χυμών σε πολυφαινόλες όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (F-C).

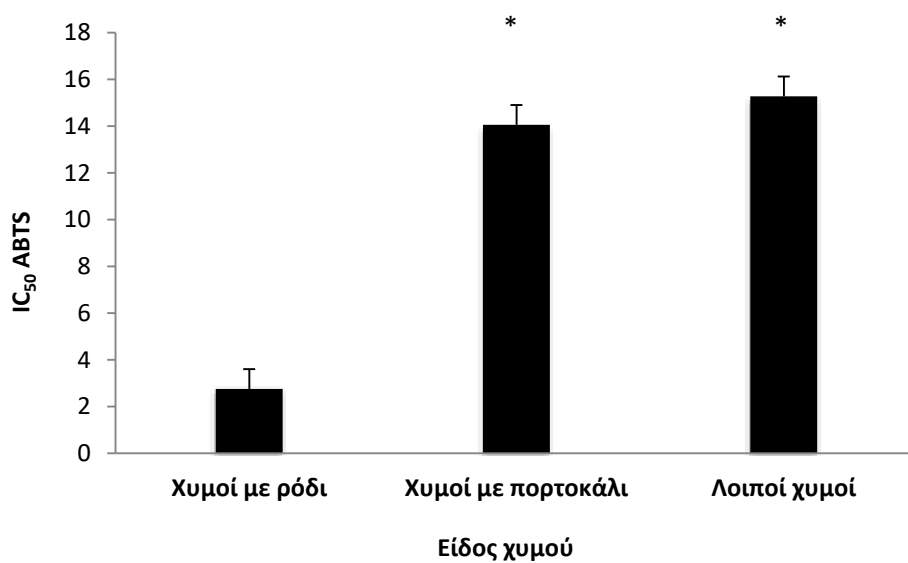
	DPPH•	ABTS•	F-C
DPPH•	-	0,694**	-0,677**
ABTS•	0,694**	-	-0,720**
F-C	-0,677**	-0,720**	-

**** (p<0,01)**

Επίσης, σε μια προσπάθεια κατηγοριοποίησης των χυμών ανάλογα με το χυμό φρούτων που περιέχουν, οι 26 χυμοί χωρίστηκαν σε τρεις επιμέρους κατηγορίες: Α) τους χυμούς εκείνους που περιέχουν ρόδι, Β) τους χυμούς που περιέχουν πορτοκάλι και Γ) τους υπόλοιπους χυμούς. Η εικόνα που λάβαμε τόσο στην εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH• όσο και του ABTS• δείχνει πως οι χυμοί που περιέχουν ρόδι σε οποιαδήποτε αναλογία, έχουν σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτούς που περιέχουν πορτοκάλι αλλά και τους υπόλοιπους χυμούς του εμπορίου (Γραφήματα 27,28)



Γράφημα 53 : Μέσος όρος τιμών IC₅₀ της ρίζας του DPPH• των χυμών που περιέχουν ρόδι, πορτοκάλι αλλά και των υπόλοιπων εξεταζόμενων χυμών. * Σημαντική διαφορά (p<0,05)



Γράφημα 54 : Μέσος όρος τιμών IC₅₀ της ρίζας του ABTS•- των χυμών που περιέχουν ρόδι, πορτοκάλι αλλά και των υπόλοιπων εξεταζόμενων χυμών. *
Σημαντική διαφορά (p<0,05)

4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τροφές πλούσιες σε φυτικές πολυφαινόλες και βιοδραστικές ενώσεις στις οποίες αποδίδονται αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στη πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ανάμεσα στις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αθηροσκλήρυνση, ο καρκίνος και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (6,7).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, εξετάστηκε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας χυμών του ελληνικού εμπορίου. Σκοπός πραγματοποίησης της μελέτης ήταν η απουσία αντίστοιχης έρευνας που θα έδινε συγκεκριμένες απαντήσεις σχετικά με τη συνολική αντιοξειδωτική δράση προϊόντων παρά τη πληθώρα εργασιών που επικεντρώνονταν στην ανάλυση των αντιοξειδωτικών συστατικών. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν είκοσι έξι (26) χυμοί φρούτων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά, χρησιμοποιώντας δύο φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορισμού, την εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH· και του ABTS· από αντιοξειδωτικές ενώσεις που βρίσκονται στους χυμούς του εμπορίου. Χρησιμοποιήθηκαν αυτές οι δύο μέθοδοι γιατί στη μέθοδο DPPH ο διαλύτης είναι η μεθανόλη και άρα έχουν δράση κυρίως μη πολικές ενώσεις, ενώ στη μέθοδο ABTS⁺ ο διαλύτης είναι το νερό και άρα εμφανίζουν δράση κυρίως υδρόφιλες ενώσεις. Παράλληλα μελετήθηκε η περιεκτικότητα των χυμών σε ολικές πολυφαινόλες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Πρόσφατη εργασία που δημοσιεύτηκε το 2014 έδειξε πως τόσο οι χυμοί φρούτων όσο και οι χυμοί νέκταρ παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, σύγκρισή τους έδειξε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ισχύ στους χυμούς φρούτων εξαιτίας της μεγαλύτερης (%) περιεκτικότητας σε χυμό (8). Παράλληλα αρκετές μελέτες έχουν παρουσιάσει την υψηλή συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των χυμών, λόγω της μεγάλης παρουσίας πολυφαινολικών ενώσεων (9). Το προαναφερθέν συμπέρασμα ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της στατιστικής συσχέτισης ανάμεσα στις τρεις εξεταζόμενες μεθόδους που έδειξαν πως σε χυμούς με υψηλά ποσοστά πολυφαινολικών ενώσεων, υπήρξε καλύτερη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Συγκεκριμένα, σε χυμούς όπου διαπιστώθηκε μεγάλη παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων, μέσω της μεθόδου, εν συνεχεία υπήρξε

μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στις μεθόδους DPPH· και ABTS⁺. Φαίνεται λοιπόν πως η μεγάλη παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, σε ορισμένους χυμούς, παρότι υπήρχε υψηλό επίπεδο πολυφαινολικού περιεχομένου, δεν υπήρχαν αντίστοιχα υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης. Τέτοιοι χυμοί ήταν μεταξύ άλλων ο χυμός πορτοκάλι (1), 9 φρούτα (1), πορτοκάλι-παντζάρι-καρότο και πορτοκάλι-ρόδι. Επομένως, αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα πως και η ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική ικανότητα και όχι μόνο η ποσοτική, όπως άλλωστε έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία.

Ένα ιδιαίτερα χρήσιμο συμπέρασμα της μελέτης αυτής, είναι πως βρέθηκε σημαντική συσχέτιση στην αντιμετώπιση των δυο αυτών ελευθέρων ριζών από τους χυμούς που εξετάσαμε. Αυτό σημαίνει πως μάλλον οι ίδιες αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στους χυμούς είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση και των δύο ελευθέρων ριζών. Υπήρχαν όμως και περιπτώσεις όπου ορισμένοι χυμοί ήταν πολύ πιο δραστικοί στη μία μέθοδο σε σύγκριση με την άλλη. Για παράδειγμα, ο χυμός δαμάσκηνο στη μέθοδο ABTS έχει αρκετά μικρότερο IC₅₀ σε σύγκριση με τη μέθοδο DPPH. Κάτι παρόμοιο παρατηρείται και στο χυμό αρώνια κάτι που ενδεχομένως αντικατοπτρίζει τον υδρόφιλο χαρακτήρα των δραστικών μορίων αυτών των χυμών.

Παράλληλα επιχειρήθηκε η διάκριση των χυμών του εμπορίου ανάλογα με το χυμό φρούτων που περιέχουν. Η διάκριση αυτή, έγινε αρχικά ανάμεσα σε χυμούς που περιέχουν χυμό ροδιού, πορτοκαλιού και τους υπόλοιπους χυμούς, καθώς όπως προαναφέρθηκε το ρόδι αλλά και το πορτοκάλι είναι φρούτα με ευρέως γνωστές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (11). Έπειτα, έγινε προσπάθεια διάκρισης τους σε χυμούς που περιείχαν έστω και σε ένα ποσοστό τους, χυμό ή πολτό, των δύο αυτών φρούτων αλλά επίσης και των φρούτων σταφυλιού, blackberry, που σύμφωνα με την βιβλιογραφία παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και ροδάκινου, φρούτου με χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας επιβεβαίωσαν σε απόλυτο βαθμό την αντιοξειδωτική ισχύ που προσδίδει το ρόδι στους χυμούς του εμπορίου καθώς τα επίπεδα IC₅₀ στις δύο εξεταζόμενες μεθόδους ήταν σημαντικά μειωμένα στους χυμούς που ερείχαν χυμό ροδιού σε οποιαδήποτε αναλογία, έναντι αυτών που

περιέχουν πορτοκάλι ή οποιοδήποτε άλλο φρούτο. Ειδικότερα για το ρόδι, έχει αναφερθεί πως τα κυριότερα αντιοξειδωτικά συστατικά στον καρπό του φυτού *Punica Granatum* (ροδιά) είναι τα φλαβονοειδή και οι πουνικαλαγίνες στους σπόρους, και στο έλαιο οι τοκοφερόλες και το πουνικικό οξύ, που μπορούν να προσδώσουν ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα στους αντίστοιχους χυμούς (9,12). Ταυτόχρονα, η έρευνα σε ζώα και ανθρώπους δείχνει ότι η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του χυμού ροδιού οφείλεται και στις ελλαγιτανίνες, στις γαλαλαννίνες, στο ελλαγικό οξύ και στα φλαβονοειδή, όπως οι ανθοκυανίνες (13). Επιπλέον, υπάρχει εκτενής απόδειξη των ευεργετικών ιδιοτήτων του χυμού ροδιού στους ανθρώπους. Για παράδειγμα έχει δείχτει ότι βελτιώνει την καρδιακή ροή του αίματος και δρα προληπτικά έναντι του καρκίνου του προστάτη και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Όλα αυτά μπορούν να συσχετιστούν με την προστασία από ROS ή με στενά σχετιζόμενα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών φυτοχημικών που υπάρχουν στο ρόδι (14–16). Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων και των ενεργών μεταβολιτών του ροδιού έχει επίσης μελετηθεί εκτεταμένα και υποστηρίζει τις προαναφερόμενες ιδιότητές του στους ανθρώπους. Στο ίδιο μήκος κύματος, εργασία που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας έδειξε πως η κατανάλωση χυμού ροδιού από ανθρώπους οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης που θεωρείται το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό και σε μείωση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στην ίδια εργασία, αποδείχθηκε ότι ακόμη και μια εβδομάδα μετά τη διακοπή της κατανάλωσης του χυμού ροδιού, ορισμένες από τις ευεργετικές του επιδράσεις στην αντιοξειδωτική κατάσταση παρέμειναν στον οργανισμό (6).

Αναφορικά με το πορτοκάλι, οι μη αναμενόμενες χαμηλές τιμές έχουν μια πιθανή εξήγηση. Το πρόβλημα είναι ότι το στερεό κλάσμα (η ίνα) δεν περιλαμβάνεται σε πολλούς χυμούς. Εντούτοις, αυτό το αδιάλυτο κλάσμα παρουσιάζει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς φθάνει στο παχύ έντερο και η εντερική μικροχλωρίδα μπορεί επίσης να τη ζυμώσει και να εκχυλίσει ακόμα περισσότερες αντιοξειδωτικές ουσίες, τις οποίες μπορούμε να αξιολογήσουμε (17). Στους χυμούς που περιείχαν σταφύλι, φρούτο πλούσιο σε ανθοκυανίνες, φλαβόνες και τανίνες γνώστες για την αντιοξειδωτική τους δράση, παρατηρήθηκαν επίσης, ιδιαίτερα χαμηλές τιμές IC₅₀, αν και λαμβάνοντας υπ' όψιν την παρουσία χυμού ροδιού σε χαμηλή ή υψηλή περιεκτικότητα σε ορισμένους από αυτούς, μπορούμε να υποθέσουμε πως ο χυμός ροδιού ίσως και πάλι να επηρέασε την εξουδετέρωση των

ρίζων. Παρατηρώντας δε έπειτα, πως και στους εξεταζόμενους χυμούς που περιείχαν χυμό blackberry και ροδάκινο η παρουσία του ροδιού σε ορισμένους, οδηγούσε σε ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και χαμηλότερες τιμές IC50 , η υπόθεση αυτή γίνεται ακόμη πιο ισχυρή. Στα αποτελέσματα μας φαίνεται επίσης πως, παρόλο που ο καρπός Goji Berry είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε φλαβονοειδή και έχει χαρακτηριστεί ως υπερτροφή, ο χυμός του είχε πολύ περιορισμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ίδιο παρατηρήθηκε επίσης στο χυμό βύσσινου, φρούτου πλούσιου σε βιταμίνη Α, ,ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή και καροτενοειδή όπως και στο χυμό γκρέιπφρουτ, αν και προήλθε από καρπό με σημαντικές ποσότητες βιταμίνης C και καροτενοειδών..

Επίσης στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα εξεταζόμενων χυμών ίδιων φρούτων διαφορετικών όμως εταιρειών, κάτι που προφανώς υποδεικνύει πως η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι πιθανόν θέμα της ποιότητας του κάθε χυμού και πιο συγκεκριμένα ίσως η εξήγηση να βρίσκεται και στον τρόπο παρασκευής κάθε χυμού. Σύμφωνα επίσης με δημοσιευμένα στοιχεία, για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις και την ολική αντιοξειδωτική δράση, η μείωση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου σχετίζεται άμεσα με την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση αυτής. Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία, σε χυμούς που προστέθηκαν μεταδιθειώδες νάτριο και μεταδιθειώδες με βενζοϊκό νάτριο έδειξαν, μετά από 90 ημέρες αποθήκευσης, μείωση των συνολικών εκχυλίσμων πολυφαινολών και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C. Πρέπει να λάβουμε υπόψιν, πως σύμφωνα με τις αποφάσεις του Γενικού Χημείου του κράτους, του Ανώτατου χημικού συμβουλίου καθώς επίσης και τις οδηγίες του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου (EEL 115/27.04.2012), ισχύουν ειδικές διατάξεις για το μέρος των φρούτων που χρησιμοποιούνται για χυμοποίηση, την περιεκτικότητα του νέκταρ φρούτων σε χυμό ή πολτό καθώς και τις ελάχιστες τιμές brix φρούτων για χυμό και πολτό και οφείλουμε να αναρωτηθούμε εάν η κάθε εταιρεία χυμοποίησης διατηρεί πιστά αυτές τις διατάξεις όπως επίσης και όλα τα προγράμματα διασφάλισης ποιότητας που απαιτούνται.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης ενός μεγάλου αριθμού από χυμούς φρούτων που υπάρχουν στην ελληνική αγορά. Αυτή η μελέτη κάνοντας δοκιμές εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δυο διαφορετικές ελεύθερες ρίζες καταδεικνύει ότι αν και μεγάλος αριθμός χυμών εμπορίου έχει ενδείξεις αντιοξειδωτικής δράσης, υπάρχουν σαφείς

διαφορές μεταξύ τους. Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός πως χυμοί του ίδιου φρούτου από διαφορετικές όμως εταιρείες έχουν σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική τους δράση. Θα πρέπει κατά συνέπεια να γίνει περαιτέρω έρευνα για να βρεθούν οι παράγοντες στους οποίους οφείλονται αυτές οι διαφορές. Για παράδειγμα, τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι οι περιοχές από τις οποίες προέρχονται τα φρούτα και ποιες είναι οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες και οι τρόποι καλλιέργειας σε αυτές. Επίσης, μπορεί να παίζει ρόλο η ποιότητα των φρούτων που χρησιμοποιούνται και ο τρόπος παραγωγής του χυμού. Η διερεύνηση αυτών των παραγόντων θα έχει ενδιαφέρον για τους παραγωγούς φρούτων, τις εταιρείες παραγωγής χυμών και για τους καταναλωτές. Ιδιαίτερα, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας θα μπορούσε να αποτελέσει και ένα επιπλέον παράγοντα εξέτασης της ποιότητας των χυμών. Βέβαια, θα πρέπει να έχουμε υπόψιν μας ότι η *in vitro* εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μίας ουσίας δεν αντιστοιχεί πάντα στην αντιοξειδωτική της ικανότητα *in vivo*, γιατί αυτή μπορεί να επηρεάζεται από παράγοντες όπως η βιοδιαθεσιμότητά της και ο μεταβολισμός της στον ανθρώπινο οργανισμό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hasler CM. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr.* 2002 Dec 1;132(12):3772–81.
2. Mullen W, Marks SC, Crozier A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *J Agric Food Chem.* United States; 2007 Apr;55(8):3148–57.
3. Crozier A, Yokota T, Jaganath IB, Marks S, Saltmarsh M, Clifford MN. Secondary Metabolites in Fruits, Vegetables, Beverages and Other Plant-based Dietary Components. *Plant Secondary Metabolites.* 2006. p. 208–302.
4. Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyer JT, Gebhardt SE, Haytowitz DB, et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compos Anal.* 2006;19:S74–80.
5. Xu G, Liu D, Chen J, Ye X, Ma Y, Shi J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chem.* 2008;106(2):545–51.
6. Du H, Li L, Bennett D, Yang L, Guo Y, Key TJ, et al. Fresh fruit consumption and all-cause and cause-specific mortality: findings from the China Kadoorie Biobank. *Int J Epidemiol.* 2017/04/24 ed. Oxford University Press; 2017 Oct;46(5):1444–55.
7. Gregori D, Vecchio MG, Minto C, Zec S, Lamprecht M. The Role of Fruit and Vegetable Concentrates in Alleviating the Growing Burden of Cardiovascular Diseases in USA: Evidence from a Simulation Study. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology;* 2017 Apr 1;31(1_supplement):lb442–lb442.
8. Imeh U, Khokhar S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J Agric Food Chem.* ACS Publications; 2002;50(22):6301–6.
9. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* ACS Publications; 1998;46(10):4113–7.
10. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* American Society of Plant Biologists; 2006 Jun 12;141(2):312–22.
11. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo.* GREECE; 1999;13(3):295–309.

12. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci.* UNITED STATES; 2000;899:1–14.
13. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* United States; 2002 Oct;18(10):872–9.
14. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* United States; 2009 Mar;46(5):531–42.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA; 2015.
16. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* United States; 2002 Nov;277(47):44784–90.
17. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab.* Canada; 2008 Dec;33(6):1140–54.
18. Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.* NEW ZEALAND; 1994 Apr;17(4):245–58.
19. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* UNITED STATES; 2000 Feb;28(4):625–35.
20. Koren HS. Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect.* 1995 Sep;103(Suppl 6):235–42.
21. Ray RS, Mehrotra S, Shankar U, Babu GS, Joshi PC, Hans RK. Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol.* United States; 2001 May;24(2):191–200.
22. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* UNITED STATES; 1994 Aug;52(8 Pt 1):253–65.
23. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189(1):41–54.
24. Fridovich I. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Annual Reviews; 1983 Apr 1;23(1):239–57.
25. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* United States; 1970 Jul;50(3):319–75.

26. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev. UNITED STATES*; 1979 Jul;59(3):527–605.
27. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* . 2004 Mar 1;134 (3):489–92.
28. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr. United States*; 2004;44(4):275–95.
29. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med. United States*; 1999 Jan;26(1-2):202–26.
30. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med. United States*; 2001 Sep;31(6):745–53.
31. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J. England*; 2003 Aug;2:7.
32. Seren S, Lieberman R, Bayraktar UD, Heath E, Sahin K, Andic F, et al. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther. United States*; 2008;15(1):66–81.
33. Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J. England*; 2004 Oct;3:19.
34. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci. United States*; 2008 Jun;4(2):89–96.
35. Iqbal S, Haleem S, Akhtar M, Zia-ul-Haq M, Akbar J. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Res Int. 2008*;41(2):194–200.
36. Şahin S. Evaluation of Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Fruit Tea Infusions. *Antioxidants. 2013*. 206-215 p.
37. Sariburun E, Sahin S, Demir C, Turkben C, Uylaser V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J Food Sci. United States*; 2010 May;75(4):C328–35.
38. Işık E, Şahin S, Demir C, Türkben C. Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. *J Food Compos Anal. 2011*;24(7):944–9.

39. Franke AA, Cooney R V, Henning SM, Custer LJ. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem. United States*; 2005 Jun;53(13):5170–8.
40. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev. England*; 2012 Apr;11(2):329–45.
41. Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, et al. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol Med Rep. Greece*; 2015 Oct;12(4):5846–56.
42. Iwashina T. Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Nat Prod Commun. United States*; 2015 Mar;10(3):529–44.
43. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010/12/10 ed. MDPI; 2010 Dec;2(12):1231–46.
44. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr. United States*; 2004 May;79(5):727–47.
45. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot. England*; 2003 Jan;91 Spec No:179–94.
46. Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res. Netherlands*; 2001 Apr;475(1-2):89–111.
47. Sies H, Jones D. Oxidative Stress. *Encyclopedia of Stress*. 2007. p. 45–8.
48. Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules. Switzerland*; 2015 Apr;5(2):356–77.
49. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci. UNITED STATES*; 2000;899:191–208.
50. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal. United States*; 2006;8(9-10):1865–79.
51. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res. England*; 1997 Mar;26(3):195–9.
52. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med. United States*; 1999 May;26(9-10):1231–7.
53. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein

measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* United States; 1951 Nov;193(1):265–75.

54. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965 Jan 1;16(3):144 LP – 158.

55. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* England; 2007;39(1):44–84.

56. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* United States; 1999 Nov;32(8):595–603.

57. Stella SP, Ferrarezi AC, dos Santos KO, Monteiro M. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. *J Food Sci.* United States; 2011 Apr;76(3):C392–7.

58. Ryan L, Prescott SL. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *Int J Food Sci Technol.* 2010;45(6):1191–7.

59. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* American Chemical Society; 2000 Aug 1;48(8):3597–604.

60. Orak H, Yagar H, selen isbilir S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Sci Biotechnol.* 2012 Apr 1;21.

61. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr.* United States; 2006 Oct;136(10):2481–5.

62. Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol.* United States; 2005 Sep;96(6):810–4.

63. Forest CP, Padma-Nathan H, Liker HR. Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Int J Impot Res.* England; 2007;19(6):564–7.

64. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* Ireland; 2006 Aug;187(2):363–71.

