



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα από ελληνικά
ενδημικά φυτά**



Θεοφάνης Ι. Μουστάκας

ΛΑΡΙΣΑ 2025

**Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα από ελληνικά
ενδημικά φυτά**

Determination of antioxidant activity in extracts from Greek endemic plants

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μόσιαλος Δημήτριος : Αναπληρωτής καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τραχανά Βαρβάρα : Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημητρίου , Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Τραχανά Βαρβάρα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα, το οποίο μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχθηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος και από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα Ουτσκούνη Ζωζώ για την πολύτιμη γνώση, βοήθεια, κατανόηση, ενθάρρυνση και συμπαράστασή που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου , για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

Θα ήταν μεγάλη παράληψη να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εδώ και αρκετές δεκαετίες υπάρχει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τις ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, καθώς συμμετέχουν σε μία σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α. Τα αντιοξειδωτικά, από την άλλη πλευρά, είναι ο μηχανισμός άμυνας του οργανισμού μας έναντι βλαβερών επιδράσεων των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες. Αρκετά από τα αντιοξειδωτικά μόρια προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής γιατί βρίσκονται σε αφθονία σε πολλά τρόφιμα, κυρίως φυτικής προέλευσης. Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών είναι οι φυτικές πολυφαινόλες, φυτοχημικές ουσίες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τα φυτά *Salvia officinalis* της οικογένειας Lamiaceae (Labiatae), *Centaurea pelia* της οικογένειας Asteraceae και *Hypericum perforatum* της οικογένειας Hypericaceae. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε in vitro η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH με ισχυρότερο το εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* ($IC_{50}=11,5\mu g/ml$), ABTS με ισχυρότερο το εκχύλισμα του *Salvia officinalis* ($IC_{50}=2,9\mu g/ml$), αναστολή της ρίζας $OH\cdot$ με ισχυρότερο το εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* ($IC_{50}=76\mu g/ml$), αναστολή της ρίζας $O_2\cdot^-$ με ισχυρότερο το εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* ($IC_{50}=76\mu g/ml$), αναγωγικής δύναμης με ισχυρότερο το εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* ($RP_{0.5AU}=74\mu g/ml$). Επίσης εξετάστηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά την οποία περισσότερες πολυφαινόλες περιέχονταν στο εκχύλισμα του *Salvia officinalis* (187.48 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας).

ABSTRACT

Last several decades, there has been significant research interest for the free radicals and the oxidative stress, since they are involved in a series of pathological situations such as cancer, cardiovascular diseases and others. The antioxidants, on the other side, consist a defense mechanism of our organism against harmful effects of the free radicals and the oxidative stress. Quite enough of the antioxidants molecules are received through nutrition, because they are found in abundance in many foods, especially of plant origin. One of the most important categories of antioxidants are the plant polyphenols, phytochemical substances with strong antioxidant activity.

In the present study, extracts from the plants *Salvia officinalis* of the Lamiaceae family, *Centaurea pelia* of the Asteraceae family and *Hypericum perforatum* of Hypericaceae family were examined. The antioxidant activity of the extracts was tested in vitro using DPPH assay, exhibited as the most potent the *Hypericum perforatum* extract ($IC_{50}=11,5\mu\text{g/ml}$), ABTS assay exhibited as the most potent the *Salvia officinalis* extract ($IC_{50}=2,9\mu\text{g/ml}$), $OH\cdot$ radical scavenging exhibited as the most potent the *Hypericum perforatum* extract ($IC_{50}=76\mu\text{g/ml}$), $O_2^{\cdot-}$ radical scavenging assay exhibited as the most potent the *Hypericum perforatum* extract ($IC_{50}=76\mu\text{g/ml}$), Reducing power assay exhibited as the most potent the *Hypericum perforatum* extract ($RP_{0.5AU}=74\mu\text{g/ml}$). Also, the Total Phenolic Content was examined by Folin-Ciocalteu assay according to which more polyphenols are contained in the extract of *Salvia officinalis* (187,48 mg TPC/g dry extract).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	9
1.1 Ελεύθερες Ρίζες – Free Radicals	9
1.1.2 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών	10
1.1.3 Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου	10
1.1.4 Βιολογική δράση των ελεύθερων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου	11
1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – Reactive Oxygen Species	12
1.3 Οξειδωτικό Στρες – Oxidative Stress	13
1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	14
1.4.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	14
1.4.2 Καταλάση (CAT).....	15
1.4.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	15
1.4.4 Περοξυρεδοξίνες(Prx).....	16
1.4.5 Γλουταθειόνη (GSH)	16
1.4.6 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)	17
1.4.7 Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	17
1.4.8 Ουρικό οξύ	17
1.4.9 Μέταλλα και Μεταλλοθειονίνες.....	17
1.5 Φυτικές Πολυφαινόλες – Polyphenols.....	18
1.5.1 Φλαβονοειδή.....	19
1.5.2 Στιλβένια	19
1.5.3 Λιγνάνες.....	20
1.5.4 Φαινολικά Οξέα.....	20
1.6 Φυτική βιοποικιλότητα του Πηλίου.....	21
1.7 Φασκόμηλο – <i>Salvia Officinalis</i>	22
1.8 Βαλσαμόχορτο - <i>Hypericum perforatum</i>	23
1.9 Κενταύρια Πηλίου – <i>Centaurea Pelia</i>	25
2. Σκοπός Μελέτης.....	26
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3.1 Αντιδραστήρια.....	27
3.2 Εκχυλίσματα	27
3.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (Total Polyphenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	27

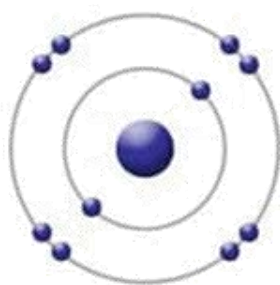
3.3.1 Πειραματική διαδικασία.....	28
3.4 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•	29
3.4.1 Πειραματική διαδικασία.....	29
3.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση	30
3.5 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+}	31
3.5.1 Πειραματική διαδικασία.....	31
3.5.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση	33
3.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• 33	
3.6.1 Πειραματική διαδικασία.....	35
3.7 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ •-	36
3.7.1 Πειραματική διαδικασία.....	37
3.8 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	37
3.8.1 Πειραματική διαδικασία.....	39
4. Αποτελέσματα Μετρήσεων	41
4.1 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	41
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•.....	41
4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{•+}	43
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• 45	
4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ •- 47	
4.6 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	49
4.7 Συνολικά αποτελέσματα	50
5. Συζήτηση	52
6. Βιβλιογραφία	56

1. Εισαγωγή

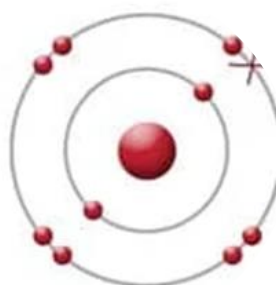
1.1 Ελεύθερες Ρίζες – Free Radicals

Τα τελευταία χρόνια οι κλάδοι των επιστημών της βιολογίας και της ιατρικής έχουν δώσει μεγάλη σημασία στην ερμηνεία των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, καθώς αυτές διαπιστώθηκε πως συμμετέχουν σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων. Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών μέσα στα κύτταρα είναι συνεχής αλλά εξουδετερώνονται μέσω των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων προκαλώντας έτσι μία ισορροπία.

Ελεύθερη ρίζα (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα τα οποία έχουν παράλληλο spin που συμβολίζεται '↑↑'. Μία ελεύθερη ρίζα συνήθως συμβολίζεται με μία τελεία επάνω δεξιά από το όνομα του χημικού τύπου, δηλώνοντας έτσι και την ύπαρξη ασύζευκτου ηλεκτρονίου (Γαλάρης, 2015). Παράδειγμα αποτελεί η ρίζα του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$.



Άτομο



**Ελεύθερη
ρίζα**

Εικόνα 1 : Σχηματική απεικόνιση Ατόμου και Ελεύθερης Ρίζας

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή και πολύ δραστικά μόρια, λόγω της ισχυρής τάσης να ζευγαρώσουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, έτσι αντιδρούν με χημικά μόρια προκαλώντας αντιδράσεις στα βιολογικά συστήματα (Βαλαβανίδης, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια που σχηματίζονται πολύ γρήγορα με μικρό χρόνο ζωής. Οι ελεύθερες ρίζες λόγω της υψηλής δραστικότητάς τους μπορούν: α) να δεχτούν ή να δώσουν ηλεκτρόνιο, β) να αφαιρέσουν υδρογόνο, γ) να επιδράσουν μεταξύ τους και δ) να προκαλέσουν αντιδράσεις προσθήκης (Παπαγεωργίου, 2005). Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με

βιολογικά μακρομόρια προκαλούν βλάβες όπως στο DNA με θραύση των κλώνων, στις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λίπη (Lobo et. al, 2010).

1.1.2 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν: α) είτε με ομολυτική διάσπαση, β) είτε με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Στην ομολυτική διάσπαση μπορεί να προκύψουν: α) δύο ελεύθερες ρίζες, β) σχηματισμό ιόντων (Γαλάρης, 2015). Ωστόσο, ο τρόπος αυτός δημιουργίας ελεύθερων ριζών απαιτεί τεράστια ποσά ενέργειας, όπως για παράδειγμα ακτινοβολίες UV. Από την άλλη πλευρά, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από α) την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου (αναγωγή), β) την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου (οξείδωση) (Παπαγεωργίου, 2005). Στη φύση ο συνηθέστερος τρόπος σχηματισμού είναι με τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, καθώς αυτές απαιτούν μικρά ποσά ενέργειας.

1.1.3 Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να παραχθούν από ενδογενείς φυσιολογικούς μηχανισμούς στον ανθρώπινο οργανισμό ή από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων (Βαλαβανίδης, 2006).

Οι κυριότεροι ενδογενείς παράγοντες περιλαμβάνουν τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα και τον μεταβολισμό του κυτοχρώματος P450 (Valko et al., 2006). Τα μιτοχόνδρια είναι η σημαντικότερη πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών, κυρίως της ρίζας του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$. Τα υπεροξειδισώματα μέσω της αναπνευστικής οδού οδηγούν στον σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 . Τα μόρια του κυτοχρώματος P450 χρησιμοποιούν το οξυγόνο O_2 με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών ποσοτήτων ελεύθερων ριζών. Υπάρχουν, σαφώς, και άλλες πηγές παραγωγής όπως είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο, οι ενζυμικές διεργασίες, διάφορα μέταλλα και τα φαγοκύτταρα (Martemucci et al., 2022).

Από την άλλη πλευρά, οι εξωγενείς παράγοντες προκαλούν αρκετές βλάβες σε βιομόρια, οξειδωτικό στρες και πολλές παθολογικές παθήσεις (Βαλαβανίδης, 2006). Χαρακτηριστικές πηγές είναι: α) το μολυσμένο νερό και ο αέρας, β) τα φάρμακα και τα φυτοφάρμακα, γ) ο καπνός του τσιγάρου, δ) οι υπεριώδεις και ιονίζουσες

ακτινοβολίες, δ) το αλκοόλ και το μαγείρεμα και τέλος τα βαρέα μέταλλα κ.ά. (Phaniendra et al., 2014).

SOURCE OF FREE RADICALS	
Exogenous	Endogenous
• Air and water pollution • Tobacco smoke • Heavy metals • Transition metals • Pesticides • High temperature • UV irradiation • γ irradiation • Drugs • Cooking (<i>smoked meat, used oil</i>)	• Cells (<i>neutrophils, eosinophils, ...</i>) • Enzymes (<i>NO synthase, xanthin oxidase, NADPH oxidase, lipo-oxygenase, ...</i>) • Mitochondrial chain • Endoplasmatic reticulum oxidation • Cytochrome P450 • Diseases

FREE RADICALS ROS: $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, $HO_2^{\cdot}$, H_2O_2, RO_2, $HOCl$... RNS: $NO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot}$, HNO_2, $RONOO$, N_2O_3 ...
--

Πίνακας 1 : Ελεύθερες ρίζες και πηγές παραγωγής (Martemucci et al., 2022).

1.1.4 Βιολογική δράση των ελεύθερων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ενζυμικές και μη ενζυμικές διεργασίες του οργανισμού. Σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού έναντι μολυσματικών παραγόντων (Valko et al., 2006) και στην επαγωγή μιτοχόνδριου σηματοδότησης (Pham-Huy et al., 2008). Επίσης, είναι υπεύθυνες για την μεταγωγή σήματος σε μοριακά μονοπάτια και συμμετέχουν σε μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής μεταγραφής (Fang et al., 2002). Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες σηματοδοτούν την κυτταρική απόπτωση με αποτέλεσμα την ρύθμιση της κυτταρικής

ανάπτυξης και ομοιόστασης, ενώ οι δραστικές μορφές οξυγόνου (κυρίως το H_2O_2) ενεργοποιούν τον υποδοχέα της ινσουλίνης, (Βαλαβανίδης, 2006).

Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες. Για παράδειγμα, η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου οδηγεί στην λιπιδική υπεροξειδωση. Είναι η πιο καλά μελετημένη δράση των ελεύθερων ριζών. Η συνεχής λιπιδική υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων οδηγεί στον σχηματισμό πολλών υπεροξειδικών ριζών λιπιδίων (De Zwart et al., 1998). Επιπρόσθετα, η υδροξυλική ρίζα $OH^\bullet$ έχει τη δυνατότητα να αντιδράει και να καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα, κυρίως το DNA. Η ρίζα αυτήν αντιδράει με την δεοξυριβόζη με αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων (Διαμαντίδης, 2007). Τέλος, η οξειδωση των πρωτεϊνών από τις δραστικές μορφές του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Οι αλλαγές αυτές, συνήθως, περιλαμβάνουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών, την αλλαγή στην δομή τους και την ευαισθησία τους στην πρωτεόλυση (Zhang et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί πως ακόμα δεν υπάρχει σαφής ορισμός για το ποιες συγκεντρώσεις των ελεύθερων ριζών θεωρούνται υψηλές και ποιες χαμηλές.

1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – Reactive Oxygen Species

Ο όρος για τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) διατυπώθηκε για να μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε μια συγκεκριμένη ομάδα μορίων με ‘κεντρικό πρωταγωνιστή’ το μοριακό οξυγόνο. Επομένως, ως ενεργές μορφές οξυγόνου ονομάζουμε τα παράγωγα του μοριακού οξυγόνου στα οποία έχει γίνει μερική αναγωγή (Διαμαντίδης, 2007). Εκτός από τις δραστικές μορφές του οξυγόνου εξίσου σημαντικές είναι : α) οι δραστικές μορφές του αζώτου (RNS), β) οι δραστικές μορφές του θείου και γ) οι δραστικές μορφές του χλωρίου. Τα ROS είναι κυρίως μόρια σηματοδότησης με υψηλή τοξικότητα (Jakubczyk et al., 2020). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως αν και όλες οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές μορφές οξυγόνου, αυτό δεν συνεπάγεται και το αντίθετο πως όλες οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι και ελεύθερες ρίζες (Βεσκούκης, 2022).

Ένωση	Όνομα
Ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\cdot -}$	ανιόν σουπεροξειδίου
$HO_2^{\cdot}$	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
$RO^{\cdot}$	ρίζα αλκοξειδίου
$ROO^{\cdot}$	ρίζα υπεροξειδίου
$NO_2^{\cdot}$ και $NO^{\cdot}$	διοξειδίο και μονοξειδίο του αζώτου
Μη-ελεύθερες ρίζες	
H_2O_2	υπεροξειδίο του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υδροπεροξειδία
$^1O_2$	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ
$ONOO^-$	περοξυνιτρικό

Πίνακας 2 : Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (Γαλάρης, 2015).

1.3 Οξειδωτικό Στρες – Oxidative Stress

Η πρώτη αναφορά του οξειδωτικού στρες περιεγράφηκε από τους Sies και Cadenas και τους συνεργάτες τους στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Στους οργανισμούς όταν υπάρχει υπέρμετρη παραγωγή δραστικών μορφών σε αντίθεση με την ανεπάρκεια των ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Γιαννακοπούλου, 2007). Έχουν γίνει πολλές μελέτες αποδεικνύοντας πως το οξειδωτικό στρες συνδέεται με αλλοιώσεις και βλάβες σε μακρομόρια καθώς επίσης και παθολογικές ασθένειες (Βαλαβανίδης, 2006). Οι πιο σοβαρές ασθένειες που προκαλούνται περιλαμβάνουν τον καρκίνο και τις βλάβες του DNA, τις νευροεκφυλιστικές νόσους, τις νεφρικές παθήσεις (Pizzino et al., 2017) καθώς επίσης την υπέρταση και την αθηροσκλήρυνση (Γιαννακοπούλου, 2007).



Εικόνα 2 : Ισοζύγιο οξειδωτικού στρες

1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

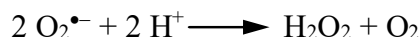
Με τον όρο αντιοξειδωτικό νοείται κάθε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα καθυστερεί ή προλαμβάνει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος. Τον ορισμό αυτό τον έδωσαν ο Barry Halliwell και ο John Gutteridge. Σύμφωνα, επομένως, με τον ορισμό τα αντιοξειδωτικά δρουν ως συναγωνιστές στην δέσμευση οξυγόνου και μετάλλων, στα στάδια έναρξης της οξείδωσης, στην καταστροφή των ελεύθερων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου, στην καταστολή δημιουργίας ελεύθερων ριζών και την ενεργοποίηση επιδιορθωτικών ενζύμων (Παπαγεωργίου, 2005; Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, 2003). Τέλος, να σημειωθεί πως τα αντιοξειδωτικά δεν δρουν όλα με τον ίδιο τρόπο ως προς την οξείδωση και πως δεν υπάρχει ένα αντιοξειδωτικό που να προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό από όλες τις προσβολές των ελεύθερων ριζών.

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και β) τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν: α) την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), β) την καταλάση (CAT), γ) την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και δ) τις περοξυρεδοξίνες (Prx). Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν: α) την γλουταθειόνη, β) τις βιταμίνες C και E, γ) το ουρικό οξύ, δ) τα μέταλλα και τις μεταλλοθειονίνες.

1.4.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η ανακάλυψη των ενζύμων SOD είναι μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στον κλάδο της Βιοχημείας. Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν το 1969 όταν ο McCord και ο

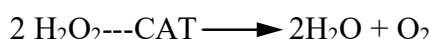
Fridovich απομόνωσαν μία πρωτεΐνη από τα ερυθρά κύτταρα η οποία καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 (Παπαγεωργίου, 2005).



Οι SODs είναι πρωτεϊνικής φύσης και ανάλογα με το μέταλλο που χρειάζονται για να εκδηλώσουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα χωρίζονται σε τρεις τάξεις: α) SODs χαλκού-ψευδαργύρου (CuZnSOD), β) SODs μαγγανίου (MnSOD) και γ) SODs σιδήρου (FeSOD) (Βαλαβανίδης, 2006).

1.4.2 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα από τα κυρίαρχα ένζυμα για την ρύθμιση των επιπέδων του H_2O_2 στον άνθρωπο. Το ένζυμο περιέχει αίμη και η αντίδραση πραγματοποιείται με την αναγωγή ενός μορίου H_2O_2 σε H_2O με ταυτόχρονη οξείδωση ενός άλλου μορίου H_2O_2 σε O_2 .



Το ένζυμο το συναντάμε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στους μύες. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξεισώματα και η έλλειψη του ενζύμου δεν έχει παρατηρηθεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στους οργανισμούς (Γαλάρης, 2015).

1.4.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Mills το 1957. Το ένζυμο καταλύει τις αντιδράσεις αναγωγής του H_2O_2 , με δότη ηλεκτρονίων από την οξείδωση της γλουταθειόνης ως υπόστρωμα, σε H_2O .



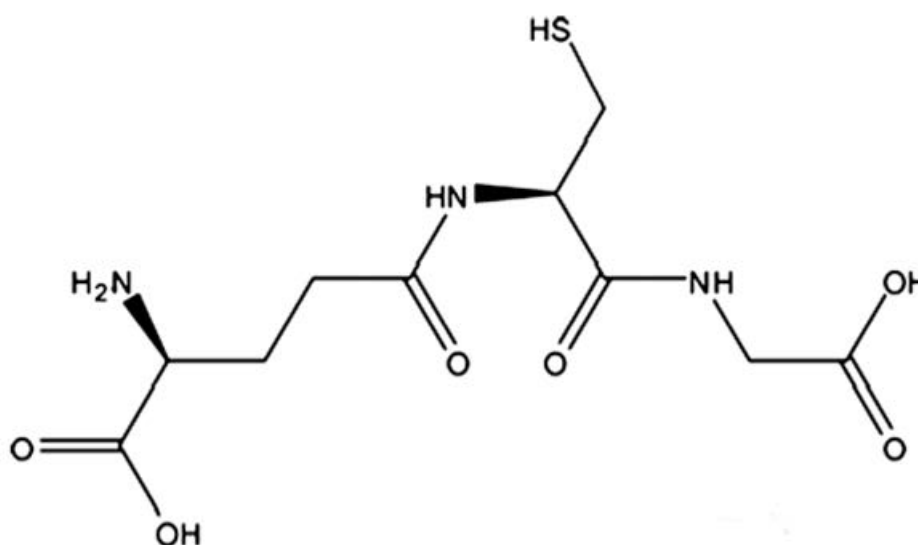
Εκτός από την ικανότητα αναγωγής του H_2O_2 τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας μπορούν να ανάγουν έναν μεγάλο αριθμό από άλλα υπεροξείδια όπως είναι για παράδειγμα τα υπεροξείδια της χοληστερόλης (Γαλάρης, 2015). Οι GPx βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς και προσφέρουν προστασία στις κυτταρικές μεμβράνες αλλά και σε ολόκληρο τον οργανισμό έναντι των ελεύθερων ριζών (Διαμαντίδης, 2007).

1.4.4 Περοξυρεδοξίνες(Prx)

Η οικογένεια των περοξυρεδοξινών είναι ένζυμα με μεγάλη προστασία έναντι των υψηλών συγκεντρώσεων των δραστικών μορφών του οξυγόνου. Βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα κύτταρα, αποτελώντας περίπου το 1% του κυτταρικού περιεχομένου. Η βασική λειτουργία των ενζύμων αυτών ότι καταλύουν την αναγωγή του H_2O_2 και των διάφορων υδροϋρεποξειδίων ($ROOH$) σε H_2O και αλκοόλες (ROH) (Γαλάρης, 2015; Forshaw et al., 2019).

1.4.5 Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι μία από τις πλέον σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους στο ζωικό βασίλειο. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γ-γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ -Glu-Cys-Gly) και έχει τόσο αναγωγικές όσο και πυρηνόφιλες ιδιότητες. Βρίσκεται είτε ως αναχθείσα είτε ως οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH-GSSG). Ο λόγος ανάμεσα στις δύο μορφές της είναι σημαντικός δείκτης του οξειδωτικού στρες (Γιαννακοπούλου, 2007).



Εικόνα 3 : Βιοχημική απεικόνιση της γλουταθειόνης (Forman et al., 2009).

Δραστική ομάδα της GSH είναι η σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) της κυστεΐνης η οποία συμμετέχει στις αντιδράσεις αναγωγής και σύζευξης. Κυρίαρχος ρόλος της GSH είναι α) η προστασία των βιομορίων από τις ελεύθερες ρίζες και ROS, β) η αποτοξικοποίηση του ανθρώπινου οργανισμού και η αποβολή τοξικών ουσιών και γ) η αποτροπή οξείδωσης των σουλφυδρυλικών ομάδων (Διαμαντίδης, 2007).

1.4.6 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Η Βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ, είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη στα τρόφιμα. Σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί είτε να προστίθεται σε αυτά είτε να υπάρχει ως συμπλήρωμα μίας ισορροπημένης διατροφής. Ο άνθρωπος, όπως και πολλά ζώα, δεν μπορούν να τη συνθέσουν και αναγκαστικά η πρόσληψη πρέπει να γίνεται μέσω της διατροφής. Η βιταμίνη αυτή παράγεται από την γλυκόζη και είναι ουσιαστικά μία λακτόνη με 6 άτομα άνθρακα. Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στην ικανότητά της να δρα ως αναγωγική ουσία, δηλαδή, γίνεται δότης δύο ηλεκτρονίων από έναν διπλό δεσμό, και πιο συγκεκριμένα μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} ατόμου άνθρακα (Padayatty et al., 2003). Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη είναι τα εσπεριδοειδή, τα πράσινα λαχανικά, οι πατάτες και οι ντομάτες.

1.4.7 Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

Η Βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη και βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα και έλαια. Τα φυτικά έλαια, οι σπόροι, οι ξηροί καρποί και τα δημητριακά είναι σημαντικές πηγές για την πρόσληψη της βιταμίνης. Ανακαλύφθηκε από τους Evans και Bishop το 1922. Βασική λειτουργία της βιταμίνης είναι η επιδιόρθωση των μεμβρανών αποτρέποντας την οξείδωση των φωσφολιπιδικών ομάδων. Επίσης, εξαιτίας της αντιοξειδωτικής της δράση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, το οξειδωτικό στρες, το Alzheimer κ.ά. (Rizvi et al., 2014).

1.4.8 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί ένα τελικό προϊόν από την αποδόμηση των πουρινών. Είναι δυσδιάλυτο στο νερό και απομακρύνεται από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω των υγρών του σώματος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα που έχει το ουρικό οξύ είναι η απομάκρυνση των ROS και η προστασία των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων από οξείδωση (Sautin & Johnson, 2008).

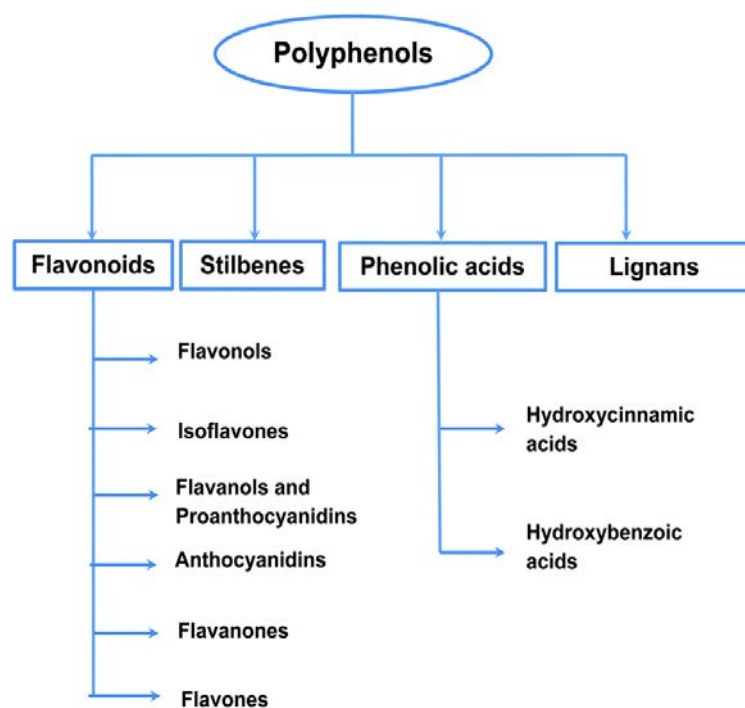
1.4.9 Μέταλλα και Μεταλλοθειονίνες

Στην κατηγορία των μετάλλων βρίσκονται το σελήνιο, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος. Οι μεταλλοθειονίνες είναι υπεύθυνες για την δέσμευση αναγκαίων αλλά και τοξικών

μετάλλων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια (Klaassen & Watkins, 2015) και στην απορρόφηση του χαλκού και του ψευδάργυρου από το έντερο (Βαλαβανίδης, 2006).

1.5 Φυτικές Πολυφαινόλες – Polyphenols

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος και αποτελούν ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου που συνδέονται με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους (Zagoskina et al., 2023). Οι πολυφαινόλες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα με φυτοχημικά χαρακτηριστικά και ο αριθμός τους υπολογίζεται περίπου στις 10.000 ενώσεις. Οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες α) τα φλαβονοειδή και β) τα μη φλαβονοειδή. Στα φλαβονοειδή ανήκουν οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες, οι ανθοκυανιδίνες και οι χαλκόνες. Στα μη φλαβονοειδή ανήκουν τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες, τα στυλβένια, οι ταννίνες και οι σαπωνίνες (Stagos, 2019).



Εικόνα 4 : Κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων (Susan, 2018).

Οι φαινολικές ή πολυφαινολικές ενώσεις έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία και την καταπολέμηση χρόνιων παθήσεων και ασθενειών που έχουν άμεση σχέση με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες και των ελεύθερων ριζών (Tsao, 2010).

Για αυτό η λήψη τροφών πλούσιες σε πολυφαινόλες κρίνεται απαραίτητη. Τέτοιες τροφές είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, το τσάι, τα δημητριακά, τα προϊόντα ολικής άλεσης, το κόκκινο κρασί, ο καφές και η σοκολάτα (Pandlely & Rizvi, 2009). Επίσης, εξαιτίας της μεγάλης βιολογικής αξίας που έχουν βρίσκουν ευρεία χρήση σε φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής. Τέλος, η κατανάλωση τροφών πλούσιες σε πολυφαινόλες θα πρέπει να γίνεται στα πλαίσια μιας ισορροπημένης διατροφής για την αποφυγή σωματικών διαταραχών (Zagoskina et al., 2023).

1.5.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ομάδα ενώσεων με παρουσία σε όλα τα φυτά και αποτελούνται από τρεις δακτυλίους. Τα φλαβονοειδή προστατεύουν την ανθρώπινη υγεία από διάφορες παθήσεις και δεν είναι τοξικά. Ανάλογα με την θέση του δακτυλίου τα φλαβονοειδή χωρίζονται στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Hano & Tungmunthum, 2020).

- Φλαβανόλες: Βρίσκονται στο πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί και την σοκολάτα.
- Φλαβόνες: Λιγότερο γνωστές στη φύση και βρίσκονται στο πιπέρι, στο σέλινο και στη φλούδα από τα λεμόνια.
- Φλαβονόλες: Βρίσκονται σε πολλά φρούτα και λαχανικά και στο κόκκινο κρασί.
- Φλαβονόνες: Κυριότερη πηγή τους είναι τα εσπεριδοειδή.
- Ισοφλαβόνες: Βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στην σόγια.
- Ανθοκυανιδίνες: Κυρίως στα φρούτα με κόκκινες χρωστικές όπως τα κεράσια, τα κόκκινα σταφύλια, οι φράουλες κ.ά. (Γαλάρης, 2015; Παπαγεωργίου, 2005).
- Χαλκόνες: Πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των φλαβονοειδών (Διαμαντίδης, 2007).

1.5.2 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι μία από τις σημαντικότερες φυτικές πολυφαινόλες με πολλές βιολογικές δράσεις. Τα στιλβένια βρίσκονται σε τρόφιμα όπως τα σταφύλια, τα φιστίκια, τα μούρα, το κόκκινο κρασί και σε διάφορα φαρμακευτικά φυτά. Επιπλέον, η πιο καλά μελετημένη ένωση των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία έχει

αποδειχθεί ότι μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες και να καταπολεμήσει τις ελεύθερες ρίζες (Xin et al., 2022). Η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί σε περίπου 100 είδη φυτών με την περιεκτικότητά της να ποικίλλει ανάλογα με το φυτό. Σημαντικές χρήσεις των στυλβενίων αφορούν την αντιμετώπιση του καρκίνου, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως το Alzheimer, τη μείωση του σακχάρου στο αίμα κ.ά.. Το βασικό μειονέκτημα των ενώσεων, ειδικά της ρεσβερατρόλης, αυτών είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά τους εξαιτίας του υψηλού ρυθμού μεταβολισμού των ενζύμων της φάσης II (Teka et al., 2022).

1.5.3 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι άλλη μία σημαντική κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Όπως και οι άλλες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών, έτσι και οι λιγνάνες παρουσιάζουν αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Schmidt et al., 2012). Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ύπαρξη των λιγνάνων στα τρόφιμα με τις κυριότερες πηγές να είναι τα φρούτα, τα όσπρια, τα δημητριακά και οι σπόροι του λιναριού και του σουσαμιού (Rodríguez-García et al., 2019). Οι σπόροι του σουσαμιού και του λιναριού παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνάνες. Οι κυριότερες φυτικές λιγνάνες είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, ενώ στο ζωικό βασίλειο είναι η εντεροδιόλη και η εντερολακτόνη (Zitterman, 2003).

1.5.4 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι η σημαντικότερη κατηγορία των φυτικών πολυφαινολών, παρουσιάζοντας μεγάλη αντιοξειδωτική δράση και πολλά οφέλη στην υγεία. Είναι ενώσεις οι οποίες παράγονται από το βενζοϊκό οξύ, το φαινυλοξικό οξύ και το κινναμωμικό οξύ, έχοντας μία ομάδα καρβοξυλίου συνδεδεμένη σε έναν δακτύλιο βενζολίου (Kato et al., 2023). Τα οξέα αυτά βρίσκονται αρκετά σπάνια σε ελεύθερη μορφή, με εξαίρεση τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως κατάψυξη, αποστείρωση ή παστερίωση και ζύμωση. Τα φαινολικά οξέα, επίσης, χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες α) το υδροξυβενζοϊκό και β) το υδροξυκινναμικό οξύ. Τροφές πλούσιες σε φαινολικά οξέα είναι τα φρούτα και τα λαχανικά και τα φύλλα τσαγιού (Kumar & Goel, 2019).

1.6 Φυτική βιοποικιλότητα του Πηλίου

Η ιδιόμορφη τοπογραφία του Πηλίου με τις πολυάριθμες γεωμορφολογικές εξάρσεις και υφέσεις, σε συνδυασμό με την επιρροή του παράκτιου ήπιου κλίματος έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη ποικιλότητα της βλάστησης. Η παρουσία τοπικών μικροκλιμάτων σε θέσεις διαφορετικού προσανατολισμού και συνθηκών υγρασίας, θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, ευνοεί την ανάπτυξη πολυάριθμων φυτικών ειδών σε σχέση με τον περιορισμένο γεωγραφικά τόπο. Από την πλευρά της βοτανικής επιστήμης, η σύνθεση των μέχρι τώρα γνωστών στοιχείων ανεβάζει την ποικιλία της χλωρίδας του συγκροτήματος στα 620 είδη και υποείδη φυτών, με την έλλειψη μεγάλων ασβεστολιθικών σχηματισμών και την απουσία ανώτερης υψομετρικά ζώνης, που συνεισφέρει στην βιοποικιλότητα των μεγάλων ορεινών βουνών, να εξηγούν τον συγκρατημένο αυτόν αριθμό. Μεταξύ των στοιχείων που είναι γνωστά μέχρι σήμερα στο Πήλιο, υπάρχουν 23 Ελληνικά ενδημικά, 26 Βαλκανικά ενδημικά και 29 υποβαλκανικά ενδημικά, δηλαδή είδη και υποείδη που εμφανίζονται στα Βαλκάνια και σε μία ακόμα γειτονική περιοχή.

Η τυπική ζωνοποίηση της βλάστησης της βιογεωγραφικής ζώνης διαιρείται σε ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης και παραμεσογειακή ζώνη βλάστησης. Η ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης καταλαμβάνει τα χαμηλότερα επίπεδα της περιοχής, ξεκινώντας από το επίπεδο της θάλασσας. Περιλαμβάνει ξηρανθεκτικά και φωτόφιλα είδη, με κυριότερα το πουρνάρι, την αριά και το κέδρο που σχηματίζουν αμιγείς ή μικτούς θαμνώνες φρυγανικής μορφής. Επιπλέον, σε αυτήν την ζώνη συναντάμε την κουμαριά, το σπάρτο, την αγριελιά, την κοκκορεβυθιά, το φιλλύκι, τη δάφνη, τη μυρτιά, το θυμάρι, το θρούμπι και άλλους αρωματικούς θάμνους. Πολύ συχνά εμφανίζονται εδώδιμα φυτά, δέντρα ή θάμνοι με βρώσιμους καρπούς όπως η καστανιά, η καρυδιά, η κουμαριά, η βατομουριά, το μύρτιλο, η κρανιά και οι εκτενείς οπωρώνες. Σε μεγαλύτερα υψόμετρα εντοπίζουμε την παραμεσογειακή ζώνη βλάστησης, η οποία περιλαμβάνει δάση πλατύφυλλης και χνοώδους δρυός και δάση καστανιάς. Σε θέσεις με περισσότερη υγρασία συναντάμε συστάδες περισσότερο ψυχρόβιων ειδών όπως της οξιάς, ενώ μεγάλο τμήμα της φυσικής βλάστησης στην ζώνη αυτή καταλαμβάνουν εκτεταμένες δεντροκαλλιέργειες μηλιάς και καστανεώνες. Μέσα στην ζώνη της οξιάς, εμφανίζονται συστάδες με αγριόλευκες και αιγοϊτιές και αναδασώσεις με μαύρη πεύκη.

1.7 Φασκόμηλο – *Salvia Officinalis*

Το βοτανικό όνομα της φασκομηλιάς ή απλώς του φασκόμηλου είναι το *Salvia*, λέξη που προέρχεται από το λατινικό ‘salvere’ το οποίο σημαίνει σώζω ή θεραπεύω. Το όνομα του φυτού ταυτίζεται με τις θεραπευτικές του ιδιότητες, το οποίο στην αρχαιότητα είχε χρήση ως φαρμακευτικό βότανο (Kintzios, 2000).

Το φασκόμηλο είναι ένα από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά φυτά με παρουσία ήδη από τα αρχαία χρόνια. Η καταγωγή του φυτού είναι στη Μέση Ανατολή και τη Μεσογειακή λεκάνη, αλλά πλέον το φυτό απαντάται σε όλο τον κόσμο. Από ένα μεγάλο πλήθος μελετών έχει αποδειχθεί πως έχει θεραπευτικές ιδιότητες έναντι της ζάλης, του έλκους, της διάρροιας, των επιληπτικών κρίσεων κ.ά. (Ghorbani & Esmaeilizadeh, 2017). Στον κλάδο της Ιατρικής έχει θεραπευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου, του διαβήτη και της παχυσαρκίας. Είναι, επίσης, ισχυρό αντιφλεγμονώδες, αντιμικροβιακό και αντιμεταλλαξιγόνο φυτό. Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, το φασκόμηλο απαρτίζεται από πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και των ROS (Hamidpour et al., 2014). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί και στην μαγειρική ως μπαχαρικό.

Ανήκει στην Οικογένεια των Lamiales (Lamiaceae) που απαριθμεί συνολικά 6500-7200 είδη. Τα Lamiales έχουν παγκόσμια εξάπλωση με μεγάλη οικονομική σημασία λόγω των πολλών φαρμακευτικών, αρωματικών και καλλωπιστικών φυτών που ανήκουν σε αυτά (Simpson, 2017). Συγκεκριμένα το φασκόμηλο απαριθμεί 900 είδη. Είναι ένας πολυετής θάμνος με το ύψος να κυμαίνεται περίπου στα 60 εκατοστά, με φύλλα απλά και επιμήκη με λευκοπράσινο χρώμα και με βλαστούς όρθιους. Η ανθοφορία τους αρχίζει τον Απρίλιο και τελειώνει το πρώτο δεκαήμερο του Μαΐου. Στην Ελλάδα, ωστόσο, το μέσο ύψος κυμαίνεται από 30-50 εκατοστά και απαριθμεί συνολικά 20 είδη. Από αυτά μόνο τα 3 έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον με μεγάλη υγειονομική σημασία. Αναπτύσσεται τόσο σε θερμές όσο και σε ψυχρές περιοχές χωρίς μεγάλες απαιτήσεις και σε χωράφια μέσης γονιμότητας ή άγονα (Skoufogianni et al., 2017).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το φασκόμηλο καλλιεργείται κυρίως για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες και την αντιμετώπιση ασθενειών στους οργανισμούς. Τα κύρια βιοδραστικά του συστατικά με θεραπευτικές ιδιότητες είναι τα φλαβονοειδή, τα τερπένια και τα τερπενοειδή και οι πολυφαινολικές ενώσεις. Άλλες ενώσεις με

σημαντική παρουσία στα συστατικά του φυτού είναι οι υδατάνθρακες, τα αλκαλοειδή και τα λιπαρά οξέα (Ghorbani & Esmailizabeh, 2017).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του φασκόμηλου είναι το επίκεντρο πολλών επιστημονικών ερευνών τα τελευταία χρόνια. Οι ουσίες του με υψηλή αντιοξειδωτική δράση είναι η 1,8-κινεόλη, η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ, το ουρσολικό οξύ και η α- και β- θουγιόνη. Ωστόσο, η χημική σύνθεση των συστατικών και η ποσότητα τους ποικίλλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τη διαθεσιμότητα του νερού και του υψομέτρου ανάπτυξης του φυτού (Ghorbani & Esmailizabeh, 2017).

Τα εκχυλίσματα του φυτού, τα αιθέρια έλαια και το τσάι έχει αποδειχθεί πως έχουν αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιμεταλλαξιογόνες επιδράσεις. Μελέτες με το φασκόμηλο που έγιναν σε διάφορους μικροοργανισμούς και πειραματόζωα έδειξαν θετικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων. Τέλος, και σύμφωνα με την βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν καταγεγραμμένες αρνητικές επιδράσεις του φασκόμηλου στον άνθρωπο, σύμφωνα με την συνιστώμενη χρήση ή κατανάλωσή του (Hamidpour et al., 2014).

1.8 Βαλσαμόχορτο - *Hypericum perforatum*

Το *Hypericum perforatum* ή βαλσαμόχορτο είναι ένα κοσμοπολίτικο ποώδες φυτό, αρκετά διαδεδομένο στην Ευρώπη, την Δυτική Ασία αλλά και την Βόρεια Αφρική. Είναι, επίσης, γνωστό και με το όνομα St John's wort (SJW), καθώς το φυτό ανθίζει την ημέρα του Αγίου Ιωάννη του Βαπτιστή στα τέλη του Ιουνίου (Nobakht et al., 2022). Είναι ένα από τα πολυτιμότερα παραδοσιακά φυτά με πληθώρα από φαρμακευτικές ιδιότητες οι οποίες είναι ήδη από τα αρχαία χρόνια.

Το βαλσαμόχορτο έχει τεράστια οικονομική σημασία βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων καθώς κάθε χρόνο τα ετήσια έσοδα ανέρχονται σε αρκετά δισεκατομμύρια. Αρκετοί λαοί το έχουν χρησιμοποιήσει από παλιά στην παραδοσιακή ιατρική τους (Έλληνες, Κινέζοι κ.α.) (Nobakht et al., 2022). Η δημοτικότητα του φυτού οφείλεται κυρίως στη χρήση του για τη θεραπεία της ήπιας έως μέτριας κατάθλιψης. Έχει, ωστόσο, μελετηθεί για την αντιμετώπιση του άγχους, εγκαυμάτων, πόνων από ημικρανίες, πονοκέφαλου και κρυολογήματος (Nobakht et al., 2022; Klemow et al., 2011). Επιπλέον, οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν το φυτό για την θεραπεία από

δαγκώματα φιδιών αλλά και ερπετών και για γαστρεντερικές διαταραχές. Το έλαιο του, το οποίο το συλλέγαν από τις ανθισμένες κορυφές του φυτού, το χρησιμοποιούσαν για την επούλωση των πληγών και των μολώπων (Nobakht et al., 2022).

Ανήκει στην οικογένεια των Hypericeae ή αλλιώς οικογένεια του υπερικού. Το όνομα προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις ‘υπέρ’ και ‘εικών’. Η οικογένεια αποτελείται, γενικά, από δένδρα, θάμνους και πόες. Υπάρχουν περίπου 8-9 γένη και συνολικά 560 είδη της οικογένειας Hypericeae (Simpson, 2017). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το βαλσαμόχορτο είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό το οποίο αναπτύσσεται σε χέρσες περιοχές. Το ύψος φτάνει έως το 1 μέτρο και τα άνθη έχουν ένα κίτρινο χρώμα με μαύρες κουκίδες. Ο καρπός του, όπως και στα περισσότερα είδη της οικογένειας Hypericeae, είναι κάψα. Ο βέλτιστος χρόνος άνθισης είναι μεταξύ Ιουνίου και Αυγούστου. Τέλος, οι απαιτήσεις σε νερό είναι μέτριες (missouribotanicalgarden.org).

Το φυτό είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες, έχει νευροπροστατευτική δράση και σύμφωνα με νέες μελέτες έχει δράσεις έναντι του καρκίνου και της φλεγμονής (Klemow et al., 2011). Οι ενώσεις του με αντιοξειδωτική δράση είναι κυρίως πολυφαινόλες (π.χ. φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα), ταννίνες, πτητικά έλαια κ.ά. Από τις πολυάριθμες ουσίες που περιέχει το φυτό, οι δύο με την σημαντικότερη συνεισφορά σε αντιοξειδωτική δράση είναι η υπερικίνη και η υπερφορίνη. Η υπερικίνη είναι αρκετά αποτελεσματική βιοδραστική ένωση και έτσι έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας εξαιτίας της υψηλής θεραπευτικής δράσης και του κυτταροτοξικού δυναμικού της. Επιπλέον, η υπερικίνη έχει δράση έναντι νεοπλασιών και του καρκίνου και αποτελεί ένα αρκετό ευεργετικό φάρμακο έναντι της ηπατίτιδας C (Karoor et al., 2023). Η υπερφορίνη έχει πολλαπλές θετικές ιδιότητες έναντι της κατάθλιψης, του καρκίνου και πολλών παθογόνων βακτηρίων (Brankiewics et al., 2023). Η υπερφορίνη συλλέγεται από τα φύλλα και τα άνθη του φυτού. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα της υπερφορίνης είναι η μεγάλη ευαισθησία της στην θερμότητα και το φως (Karoor et al., 2023). Τέλος, σύμφωνα με νέες έρευνες το αιθέριο έλαιο από το είδος *Hypericum perforatum* έχει βιο-παρασιτοκτόνο δράση έναντι παρασίτων και φυτοπαθογόνων.

Λόγω του ότι το *Hypericum perforatum* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τις βιοδραστικές ουσίες που περιέχει, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων

καινοτόμων προϊόντων διατροφής αλλά και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Karoor et al., 2023).

1.9 Κενταύρια Πηλίου – *Centaurea Pelia*

Η Κενταύρια του Πηλίου αποτελεί ένα ενδημικό φυτό της Ελλάδας. Αναπτύσσεται, κυρίως, στην περιοχή που δηλώνει και το όνομά του. Είναι ένα φυτό με μεγάλο ενδιαφέρον στη βιομηχανία των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών (greekflora.gr).

Το φυτό της Κενταύριας αποτελεί ένα είδος το οποίο απαντάται ευρέως στην Μεσογειακή λεκάνη και τη Νοτιοδυτική Ασία. Η Ελλάδα λόγω του τεράστιου ηπειρωτικού πεδίου της και της μεγάλης βιοποικιλότητας που εμφανίζει, ‘φιλοξενεί’ πολλά ενδημικά είδη. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν περίπου 1300 ενδημικά είδη φυτών και 76 ενδημικά είδη του γένους της Κενταύριας στην Ελλάδα (López-Vinyallonga et al., 2015). Η Κενταύρια του Πηλίου είναι ένα αρκετά διαδεδομένο φυτό με κύρια παρουσία στο βουνό του Πηλίου (greekflora.gr). Είναι ένα φυτό το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά και στην παραδοσιακή ιατρική. Λαοί της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής το χρησιμοποιούν για την αντιμετώπιση παθήσεων όπως η διάρροια, ο πυρετός και οι πόνοι στο στομάχι (Reda et al., 2021). Τέλος, οι επιστήμονες έχουν βρει χρήσεις του φυτού σε διάφορους κλάδους με την πληθώρα των αντιοξειδωτικών, και όχι μόνο, ενώσεων που περιέχει.

Ανήκει στην Οικογένεια των Asteraceae που απαριθμεί περισσότερα από 23.000 είδη. Τα φυτά της οικογένειας αυτής έχουν παγκόσμια εξάπλωση και ορισμένα εδάφη φυτά της έχουν τεράστια οικονομική σημασία (Simpson, 2017). Πιο συγκεκριμένα, το γένος της Κενταύριας οεριλαμβάνει σχεδόν 700 είδη. Επίσης, η Κενταύρια του Πηλίου είναι ένα θαμνώδες φυτό με επιμήκη φύλλα και τα άνθη με κίτρινο χρώμα. Η περίοδος άνθισης του φυτού είναι από τον Μάιο μέχρι τον Ιούνιο, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες. Το ύψος του κυμαίνεται έως τα 60 εκατοστά και αναπτύσσεται, κυρίως, σε πετρώδη εδάφη σε υψόμετρο από αρκετά χαμηλά έως και τα 1800 μέτρα (greekflora.gr).

Οι επιστήμονες τα τελευταία χρόνια αρχίζουν να μελετούν το φυτό της Κενταύριας του Πηλίου λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε βιοδραστικές ουσίες. Τα περισσότερα

είδη Κενταύριας είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον.

Η Κενταύρια του Πηλίου, όπως και πολλά άλλα φυτά, είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, κυρίως φλαβονοειδή και λιγνάνες, τριτερπένια ελεύθερα αμινοξέα και σесκιτερπενικές λακτόνες. Το πλήθος των ελεύθερων αμινοξέων σε ένα φυτικό εκχύλισμα αποτελεί δείκτη αντιοξειδωτικής κατάστασης (Salachna et al., 2021). Οι σесκιτερπενικές λακτόνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες αρκετών φυτικών φυτών. Οι ουσίες αυτές έχουν σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η σύσταση όλων των ευεργετικών αυτών ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με την εποχή και το μέρος συλλογής του φυτού (Hohmann et al., 2016; Bouafia et al., 2023).

Το εκχύλισμα του φυτού αλλά και τα αιθέρια έλαιά του είναι παρουσιάζουν αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Lazari et al., 2000).

2. Σκοπός Μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από τα είδη των φυτών *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* που συλλέχθηκαν από το όρος Πήλιο του Νομού Μαγνησίας. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε *in vitro* με φασματοφωτομετρικές μεθόδους εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών DPPH, ABTS, υδροξυλίου και σουπεροξειδίου. Επίσης, προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά η αναγωγική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Reducing Power. Επιπλέον, στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών: τα Tris-HCl, Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), H_2O_2 (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου), PMS (phenazinemethosulfate), 2-δεοξυριβόζη, αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ρίζα DPPH και το ένζυμο HRP ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία), το καυστικό νάτριο (NaOH), το γαλλικό οξύ (gallic acid), το άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), ο θειικός σίδηρος (FeSO_4), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το EDTA ήταν της εταιρίας Panreac (Ισπανία), το NBT (nitrobluetetrazolium) και το ABTS ήταν της εταιρείας AlphaAesar (Γερμανία), το TCA ήταν της εταιρείας Chem-Lab (Βέλγιο), το TBA ήταν της εταιρείας J&K Scientific (Γερμανία).

3.2 Εκχυλίσματα

Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε από την ερευνητική ομάδα της Καθηγήτριας Όλγας Γκορτζή στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν, απομονώθηκαν από τα φυτά *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia*. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν νερό και Phosphate buffer.

3.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (Total Polyphenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3), αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης. Για κάθε μέτρηση έγιναν 3 επαναλήψεις.

3.3.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) την ημέρα του πειράματος. Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το εκχύλισμα.

Διάλυμά ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) (25% w/v) :

2,5gr Na_2CO_3 σε 10ml H_2O (μπορεί να χρειάζεται θέρμανση για τη διάλυση)

	Συγκεντρώσεις	Τυφλό/Blank	Αρνητικά
H_2O	1ml	1ml	1,1ml
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	100μ	100μl	-
Δείγμα	20μl	-	20μl

Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

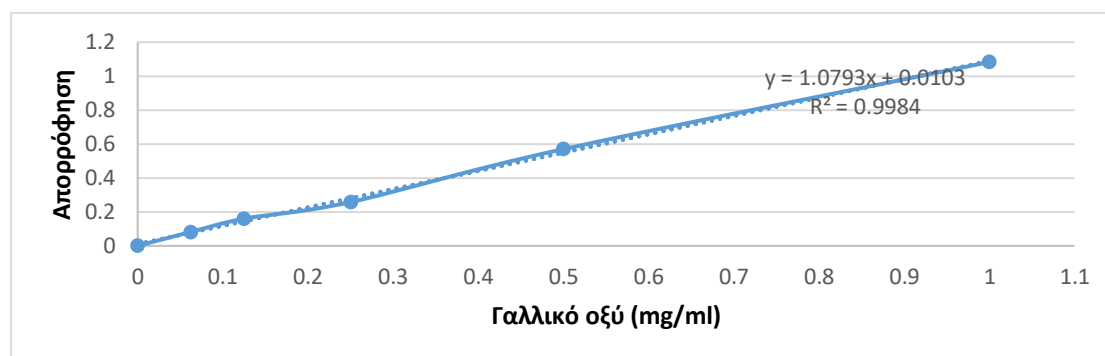
Έπειτα προσθέτουμε τα επόμενα διαλύματα :

	Συγκεντρώσεις	Τυφλό/Blank	Αρνητικά
Na_2CO_3	280μl	280μl	280μl
H_2O	600μl	600μl	600μl

Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 765nm.

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος

κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,0793x + 0,0103$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,9984$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 3.3.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

3.4 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•

Η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του. Είναι η πιο δημοφιλής και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η πειραματική διαδικασία είναι αρκετά απλή όπου τα δείγματα αναμιγνύονται με την ελεύθερη ρίζα και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Αποτελεί μια σταθερή συνθετική ρίζα μωβ χρώματος με απορρόφηση στα 517 nm. Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε με την προσθήκη υδρογόνου είτε με την προσθήκη ηλεκτρονίου. Τέλος, η προσθήκη εκχυλίσματος με αντιοξειδωτική δράση ανάγει την ρίζα DPPH• και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) (Prior et. al, 2005; Gulcin & Alwasel, 2023).

3.4.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στα οποία εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH•) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας,

στη συνέχεια η μεθανόλη και το H₂O και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Μεθανόλη	1ml	950μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl
DPPH	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας των 20 λεπτών ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με το τυφλό. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (100μl ρίζας σε 900μl μεθανόλη). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον τρία πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

3.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση

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

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

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

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

3.5 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonicacid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005; Miller et al., 1993).

3.5.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

- **Διάλυμα ABTS (1mM):** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο

αντίδρασης 1 mL (500 μ I) παρασκευάζεται διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζονται 10.97 mg ABTS και διαλύονται σε H_2O .

- **Διάλυμα H_2O_2 (30 μ M):** Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μ M σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μ I) παρασκευάζεται διάλυμα 600 μ M. Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M πραγματοποιείται αραίωση με H_2O_2 , ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μ M.
- **Διάλυμα HRP (6 μ M):** Διαλύεται 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια αραίωση 1/10 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μ l στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	Τυφλό	Control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
H₂O	450 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
ABTS	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
H₂O₂	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
HRP	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Τελικός Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Εκχύλισμα	-	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
H₂O μετά την επώαση	-	100 μ l	-	-	-	-	-	-

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον τρία πειράματα για κάθε εκχύλισμα. Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

3.5.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση

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

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

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

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

3.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH[•]

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Για παράδειγμα, η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα της. Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton.

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Διάλυμα Sodium phosphate buffer(0.2M, pH 7.4)

A) 0,2M Monobasic stock

Διαλύουμε 13,90gr sodium phosphate monobasic(NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού.

B) 0,2M Dibasic stock

Διαλύουμε 26,825gr sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,50ml 0.2M monobasic stock και 37,50ml 0,2M dibasic stock σε 200ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7,4.

Διάλυμα 2-deoxyribose(10mM) MW=134,13g/mol

Για να φτιάξουμε 10ml διαλύματος ζυγίζουμε 13,413mg ουσίας

FeSO_4 (MW=278.01) – EDTA (MW=372.24) (10mM)

Φτιάχνουμε 450ml από το κάθε διάλυμα. Για το FeSO_4 ζυγίζουμε 1,251gr και το διαλύουμε σε 450ml H_2O . Για το EDTA ζυγίζουμε 1,6751gr και το διαλύουμε σε 450ml H_2O . Θερμαίνουμε το EDTA μέχρι να βράσει και στη συνέχεια το ρίχνουμε στο FeSO_4 και τα βράζουμε μαζί για 1 ώρα. Στη συνέχεια το κρύνουμε πλήρως και το βάζουμε στους 4°C.

H_2O_2 (10mM) MW=34,01g/mol

Από stock 8,82M παίρνουμε 28μl και το προσθέτουμε σε 20ml H_2O

TCA 2,8%

TBA 1%

Ζυγίζουμε 0,3gr TBA και τα διαλύουμε σε 30ml NaOH . Θερμαίνουμε για καλύτερο αποτέλεσμα το διάλυμα.

3.6.1 Πειραματική διαδικασία

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	Blank	Control	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
Buffer	225μl	225μl	225μl	225μl
2-deoxyribose	75μl	75μl	75μl	75μl
FeSO₄-EDTA	75μl	75μl	75μl	75μl
H₂O₂	-	75μl	75μl	-
H₂O	375μl	300μl	225μl	300μl
Δείγμα	-	-	75μl	75μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 1 ώρα στους 37°C

Στη συνέχεια προστίθενται :

	Blank	Control	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
TCA 2.8%	375μl	375μl	375μl	375μl
TBA 1%	375μl	375μl	375μl	375μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και βράσιμο για 10 λεπτά. Κρυώνουμε σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_\delta) / A_o \times 100$$

όπου:

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520nm

Αδ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520nm

3.7 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$

Η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων προς οξείδωση μορίων. Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από Gulcin et al. (Gulcin et al., 2004). Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\bullet-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του NBT.

Διάλυμα Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0)

NBT (nitroblue tetrazolium) (300μM), MW=817.7

Ζυγίζουμε 20mg NBT σε 20ml H_2O

NADH(468μM), MW=709.4

Ζυγίζουμε 13,28mg NADH σε 40ml H_2O

PMS (phenazine methosulfate) (60μM), MW=306,34

Ζυγίζουμε 0,368mg PMS σε 20ml H_2O

3.7.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 560nm. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ανιόντων σουπεροξειδίου. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(A_o - A_d) / A_o] \times 100$$

όπου:

A_o : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560nm

A_d : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560nm

	Blank	Control	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
Δείγμα	-	-	100μl	100μl
H₂O	-	100μl	-	-
Tris-HCl	650μl	450μl	450μl	550μl
NBT	100μl	100μl	100μl	100μl
NADH	100μl	100μl	100μl	100μl
PMS	-	100μl	100μl	-

3.8 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξείδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές

ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Διάλυμα 0,2M Phosphate buffer pH 6,6

A) 0,2M Monobasic stock

Διαλύουμε 1,74gr sodium phosphate monobasic(NaH_2PO_4) σε 62,5ml απιονισμένου νερού.

B) Διαλύουμε 2,01gr sodium phosphate dibasic heptahydrate(Na_2HPO_4) σε 37,5ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια προσθέτουμε τα δυο stock σε αρχική ποσότητα 150ml απιονισμένου νερού και μετράμε ώστε το pH να είναι 6,6. Έπειτα προσθέτουμε απιονισμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 300ml. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται ξανά στα 6,6 και το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί για 1 μήνα.

Potassium ferricyanide (1% w/v)

Διαλύουμε 0,1gr σε 10ml απιονισμένου νερού. Τυλίζουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο. Το φτιάχνουμε την ημέρα του πειράματος.

Ferric chloride (0,1% w/v)

Διαλύουμε 0,01gr σε 10ml απιονισμένου νερού. Τυλίζουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο. Το φτιάχνουμε την ημέρα του πειράματος.

Trichloroacetic acid (10% w/v)

Διαλύουμε 50gr TCA σε 500ml απιονισμένου νερού.

3.8.1 Πειραματική διαδικασία

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	Blank	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
Buffer σκέτο	250μl	-	-
Buffer με δείγμα	-	250μl	250μl
Potassium Ferricyanide	-	250μl	-
H₂O	250μl	-	250μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.

Κρυώνουμε τα δείγματα και προσθέτουμε TCA .

	Blank	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
TCA 10%	250μl	250μl	250μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 10 λεπτά.

Από τα δείγματα παίρνουμε το υπερκείμενο όγκου 250μl το καθένα και προσθέτουμε ferric chloride σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Blank	Συγκεντρώσεις	Αρνητικά
H₂O	250μl	250μl	250μl
Ferric Chloride	50μl	50μl	50μl

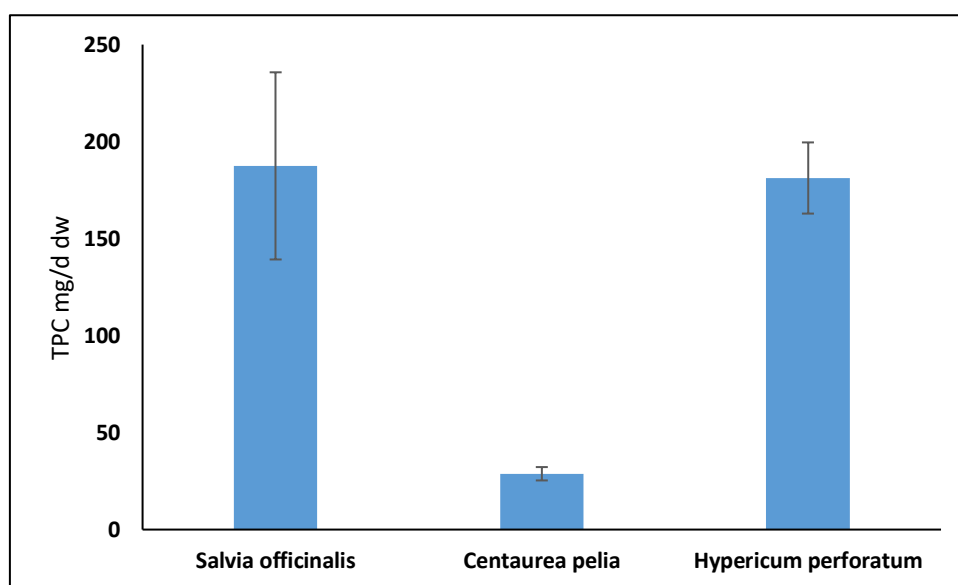
Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 10 λεπτά. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 700nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία πειράματα.

Από διάγραμμα συσχέτισης της απορρόφησης με τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος υπολογίζεται το $RP_{0.5AU}$, δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί απορρόφηση 0,5. Όσο μικρότερη η τιμή $RP_{0.5AU}$, τόσο ισχυρότερη η αναγωγική δύναμη.

4. Αποτελέσματα Μετρήσεων

4.1 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Συνολικά μετρήθηκαν 3 εκχυλίσματα για την ποσοτικοποίηση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (Total Polyphenolic Content, TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Υψηλότερες τιμές παρουσιάζει το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis* (187,48 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος), ακολουθεί το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum* (181,23 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και τέλος το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia* (28,78 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος).

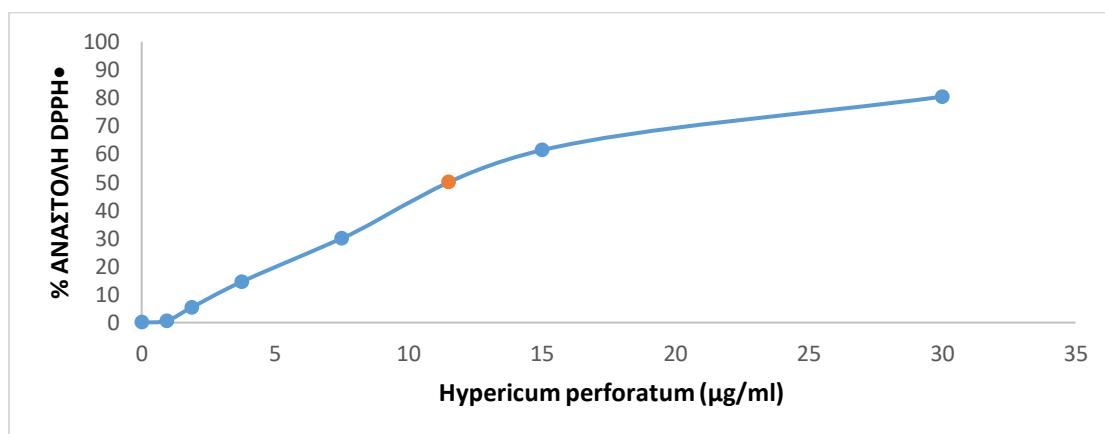


Διάγραμμα 4.1.1: Το διάγραμμα απεικονίζει τις τιμές TPC (mg πολυφαινόλων /g ξηρού βάρους ουσίας) των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

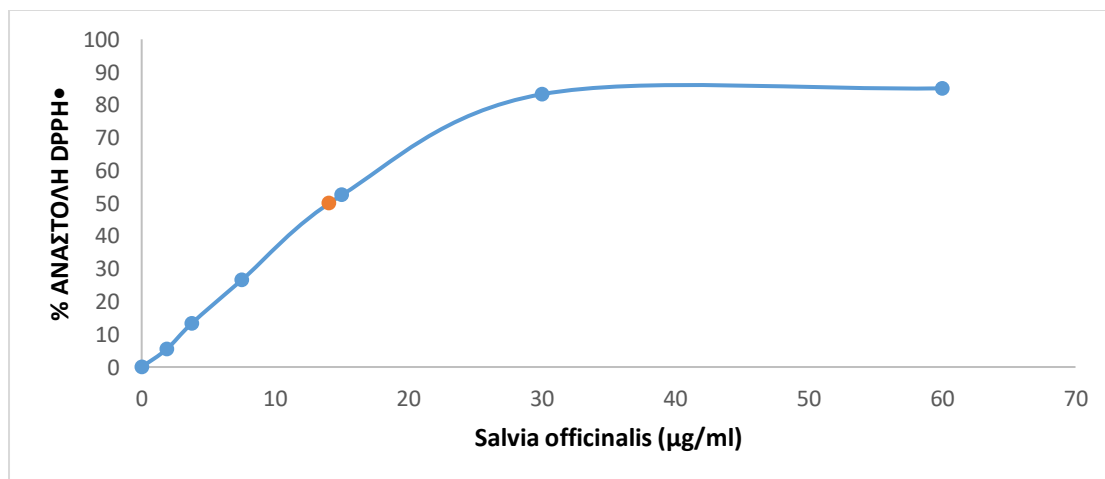
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φυτά των *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1,88-1000μg/ml. Τα εκχυλίσματα εξουδετέρωσαν

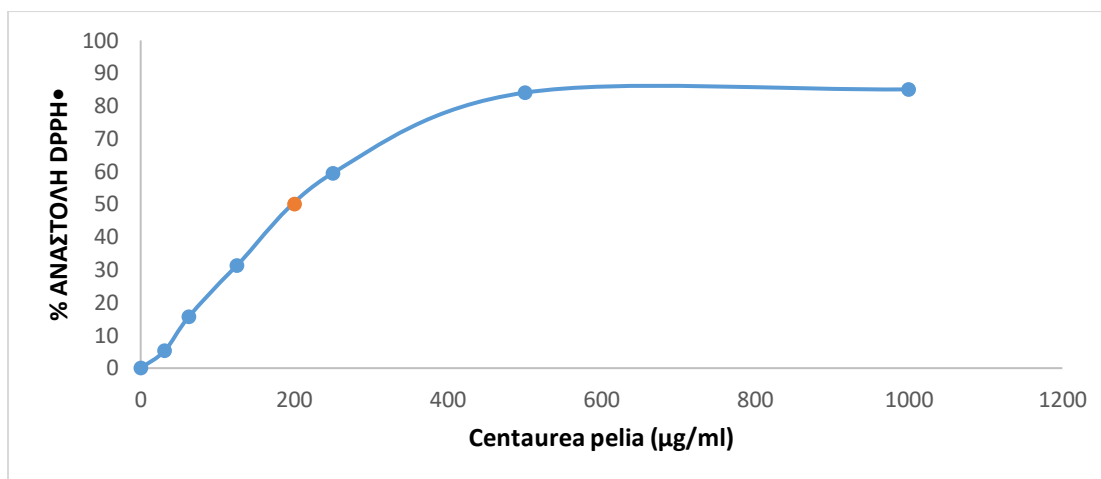
δοσοεξαρτώμενα την ελεύθερη ρίζα DPPH• στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους, όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από **11,5μg/ml** έως **200μg/ml**. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: *Hypericum perforatum* (IC₅₀=11,5μg/ml) > *Salvia officinalis* (IC₅₀=14μg/ml) > *Centaurea pelia* (IC₅₀=200μg/ml).



Διάγραμμα 4.2.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum*.



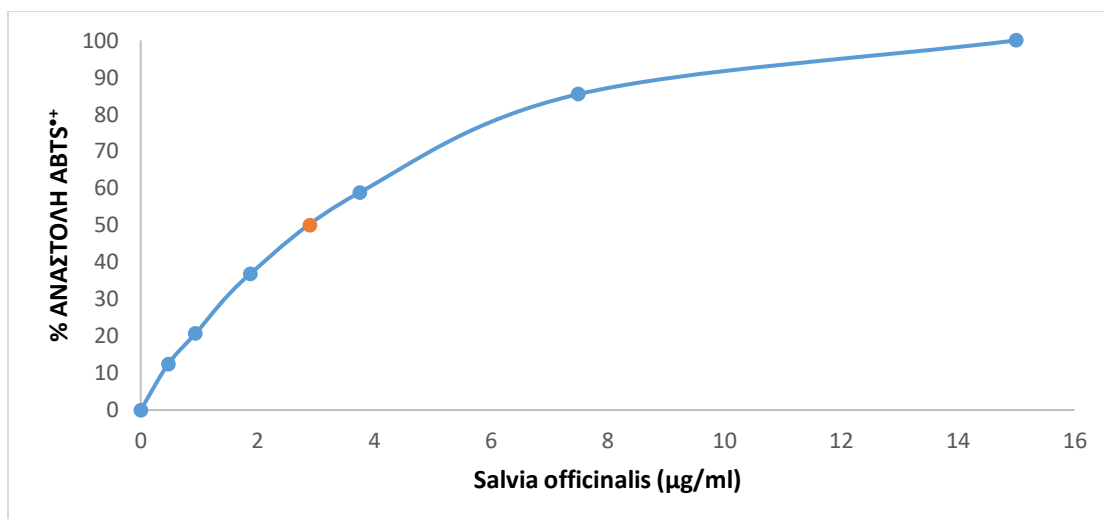
Διάγραμμα 4.2.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis*.



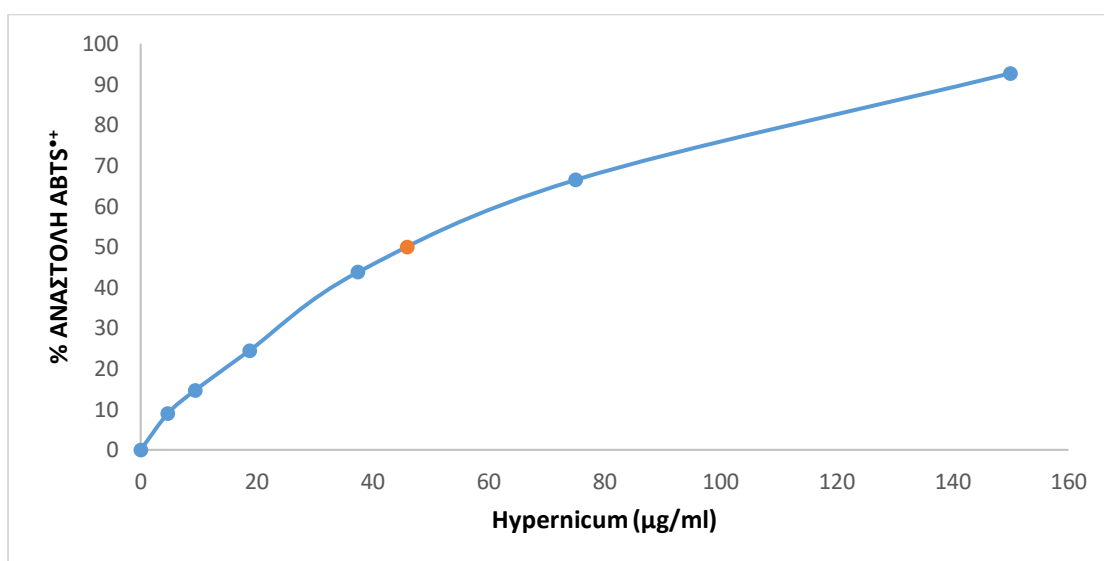
Διάγραμμα 4.2.3: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia*.

4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+

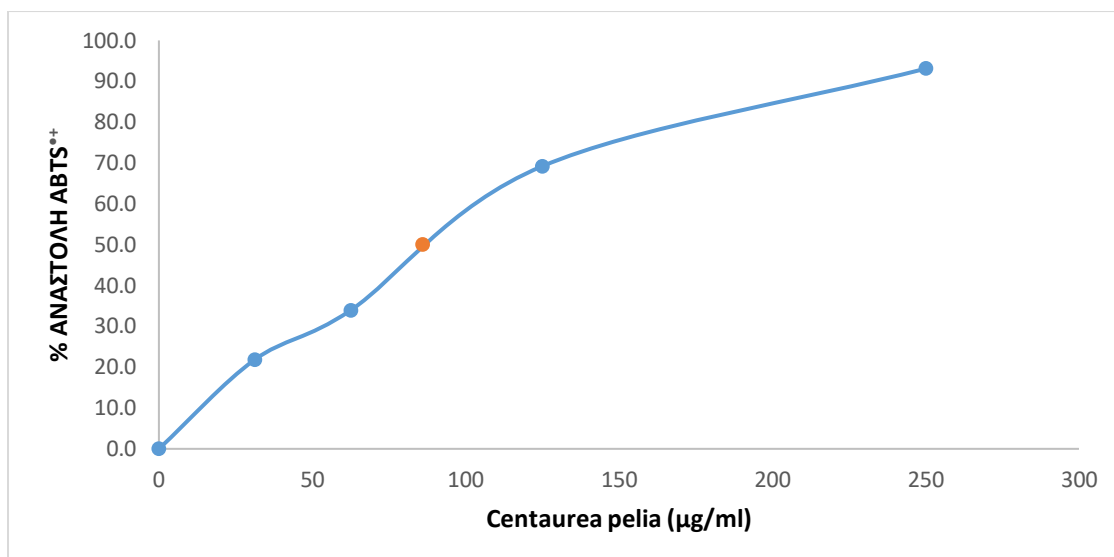
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φυτά των *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,47-1000µg/ml. Τα εκχυλίσματα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα την ελεύθερη ρίζα ABTS στα 730nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους, όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από 2,9µg/ml έως 86µg/ml. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: *Salvia officinalis* (IC₅₀=2,9µg/ml) > *Hypericum perforatum* (IC₅₀=46µg/ml) > *Centaurea pelia* (IC₅₀=86µg/ml).



Διάγραμμα 4.3.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis*.



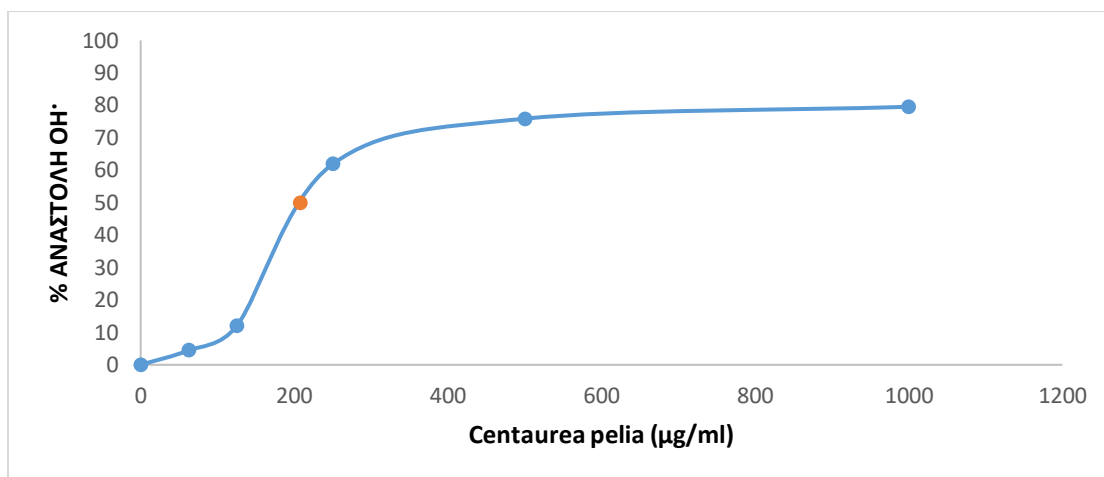
Διάγραμμα 4.3.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum*.



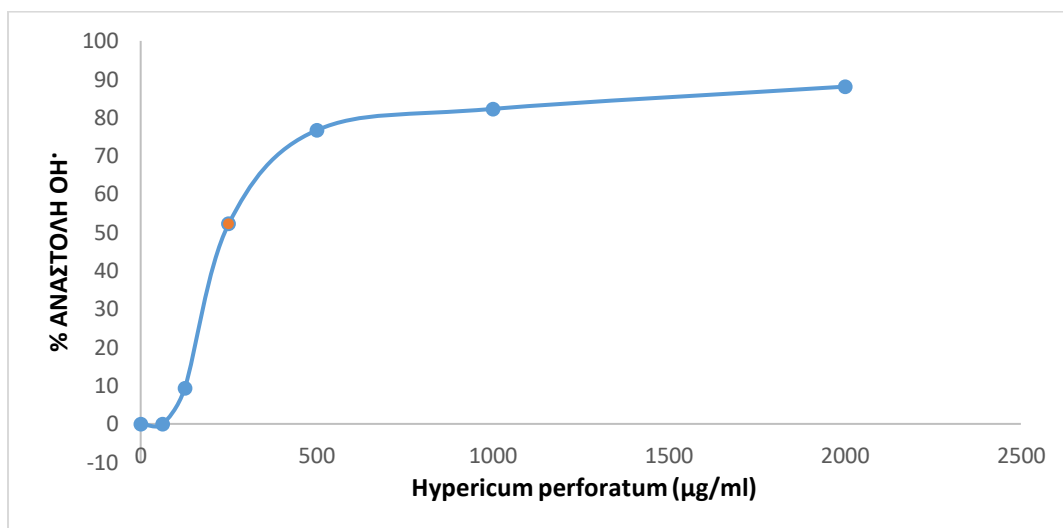
Διάγραμμα 4.3.3: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia*.

4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH[•]

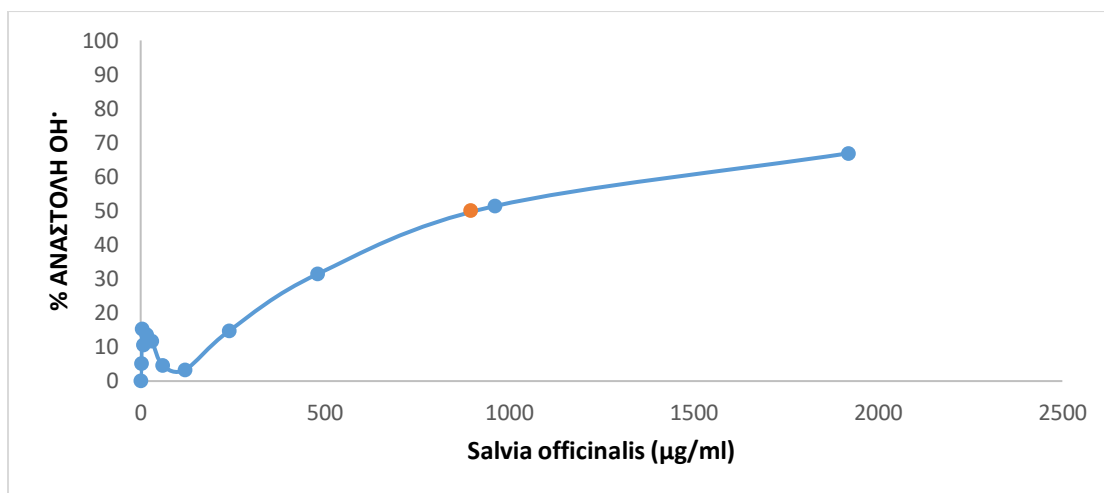
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φυτά των *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1,88-2000μg/ml. Τα εκχυλίσματα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα την ελεύθερη ρίζα OH[•] στα 520nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH[•], δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από **208μg/ml** έως **895μg/ml**. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: *Centaurea pelia* (IC₅₀=208μg/ml) > *Hypericum perforatum* (IC₅₀=250μg/ml) *Salvia officinalis* (IC₅₀=895μg/ml).



Διάγραμμα 4.4.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia*.



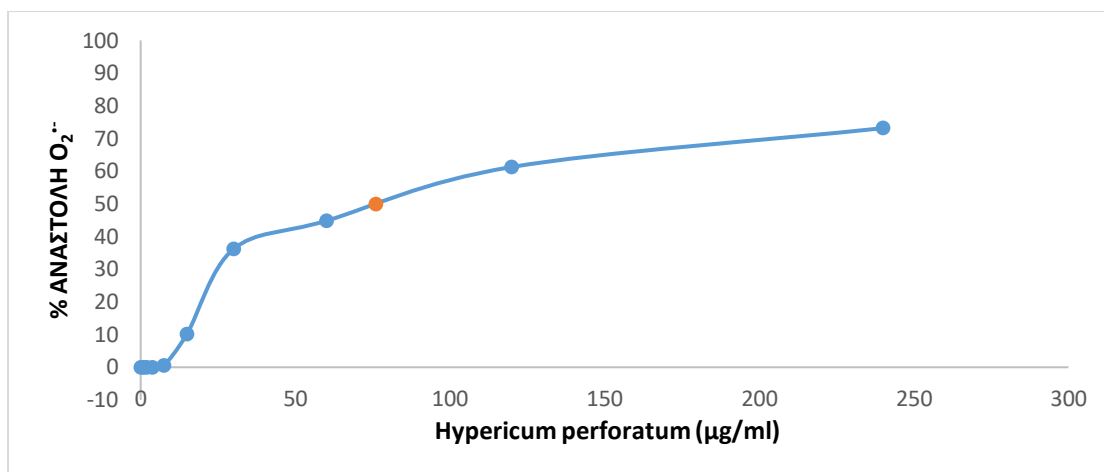
Διάγραμμα 4.4.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum*.



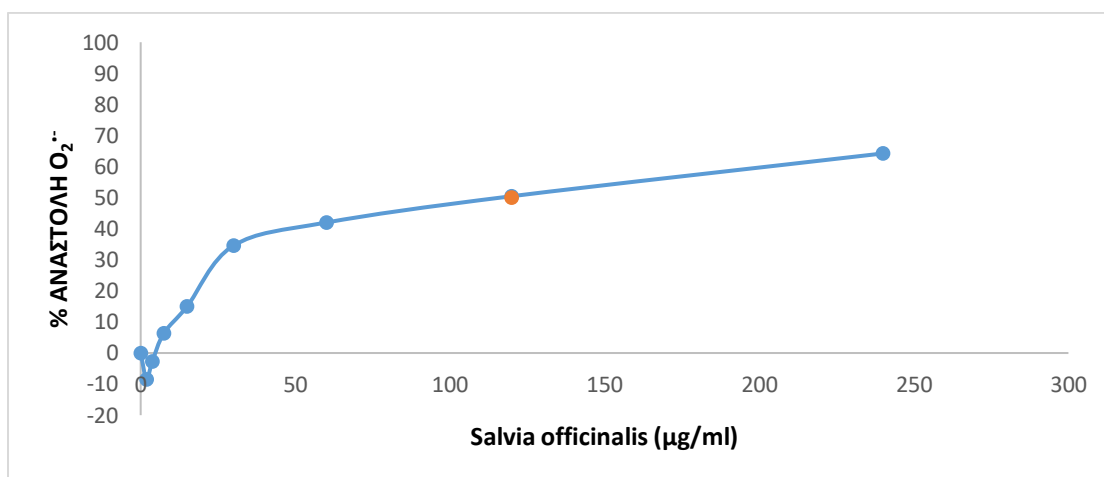
Διάγραμμα 4.4.3: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis*.

4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O₂·-

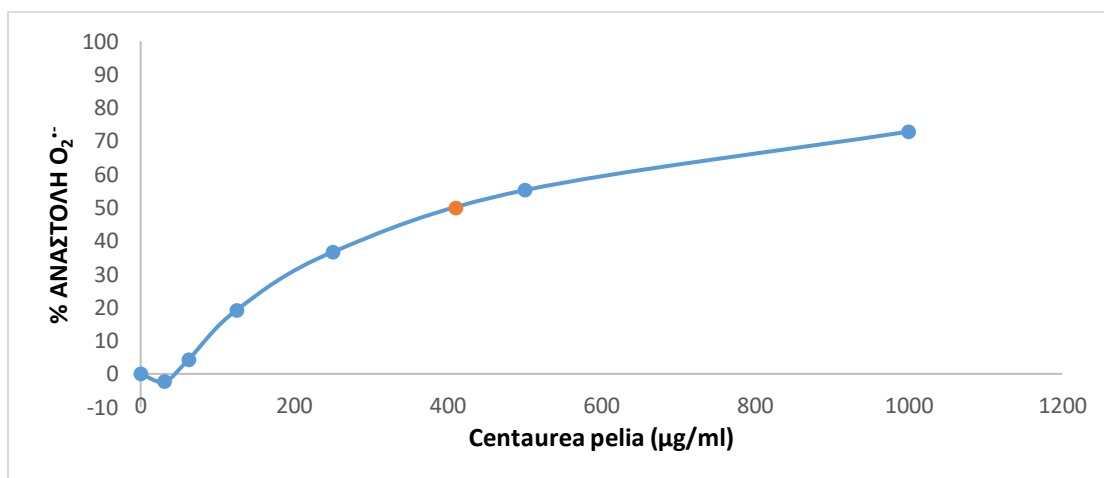
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φυτά των *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1,88-1000μg/ml. Τα εκχυλίσματα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα την ελεύθερη ρίζα O₂· στα 560nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O₂·, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από **76μg/ml** έως **410μg/ml**. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: *Hypericum perforatum* (IC₅₀=76μg/ml) > *Salvia officinalis* (IC₅₀=120μg/ml) > *Centaurea pelia* (IC₅₀=410μg/ml).



Διάγραμμα 4.5.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂·⁻ από το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum*.



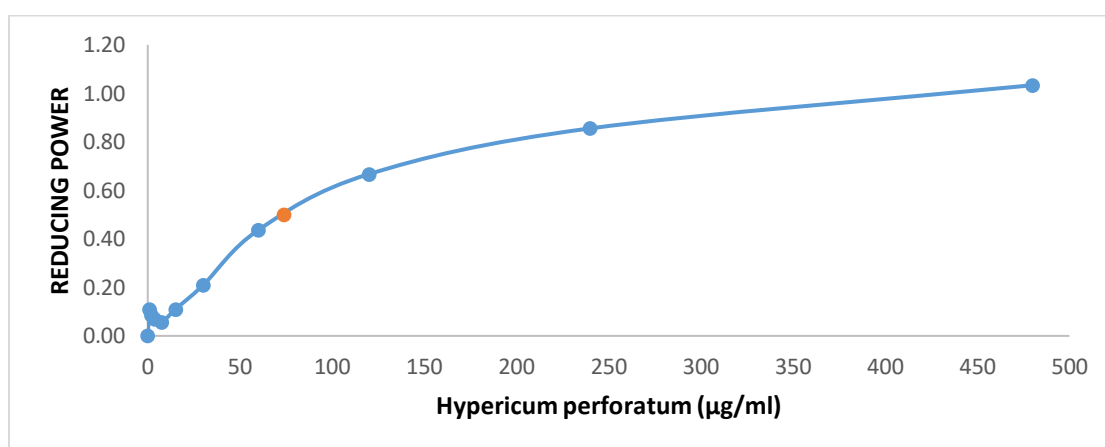
Διάγραμμα 4.5.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂·⁻ από το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis*.



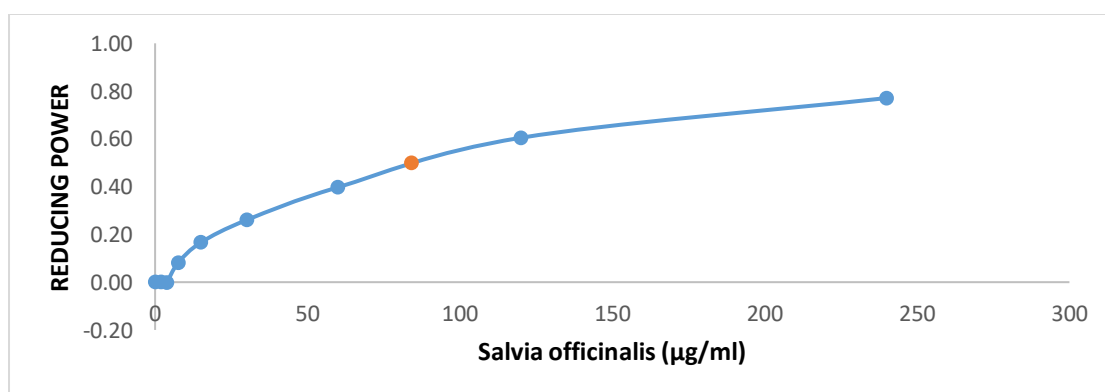
Διάγραμμα 4.5.3: Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂·⁻ από το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia*.

4.6 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

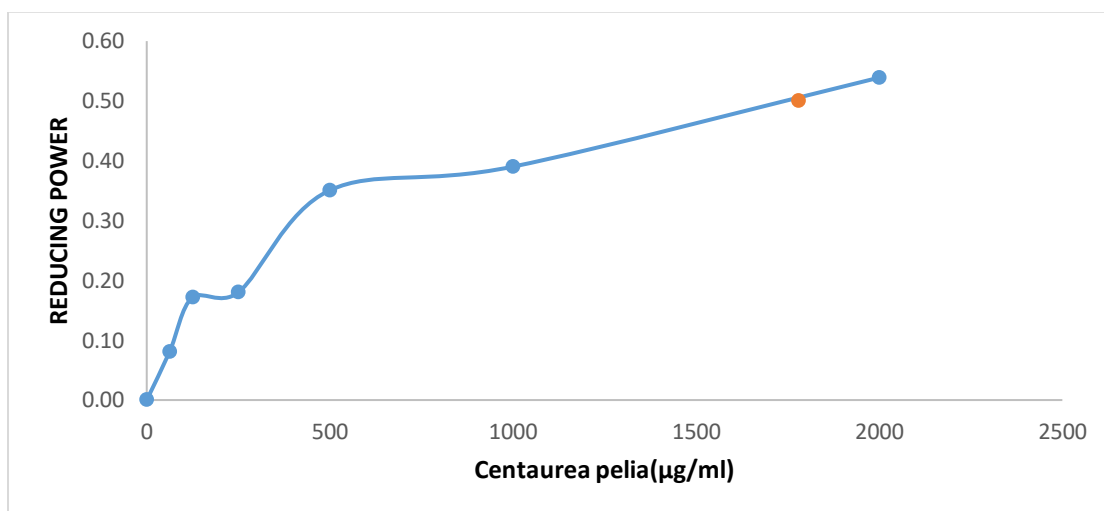
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φυτά των *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* και εξετάστηκε η αναγωγική τους δράση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1,875-2000μg/ml. Προσδιορίστηκε η τιμή $RP_{0.5AU}$, η συγκέντρωση στην οποία η απορρόφηση είναι 0,5 στα 700 nm. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: *Hypericum perforatum* ($RP_{0.5AU} = 74\mu\text{g/ml}$) > *Salvia officinalis* ($RP_{0.5AU} = 84\mu\text{g/ml}$) > *Centaurea pelia* ($RP_{0.5AU} = 1780\mu\text{g/ml}$).



Διάγραμμα 4.6.1: Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του φυτού *Hypericum perforatum*.



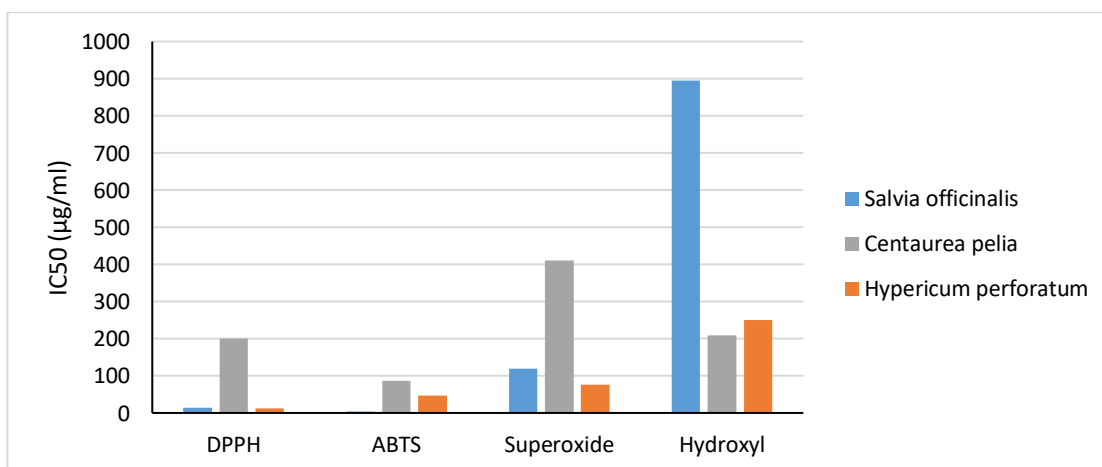
Διάγραμμα 4.6.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του φυτού *Salvia officinalis*.



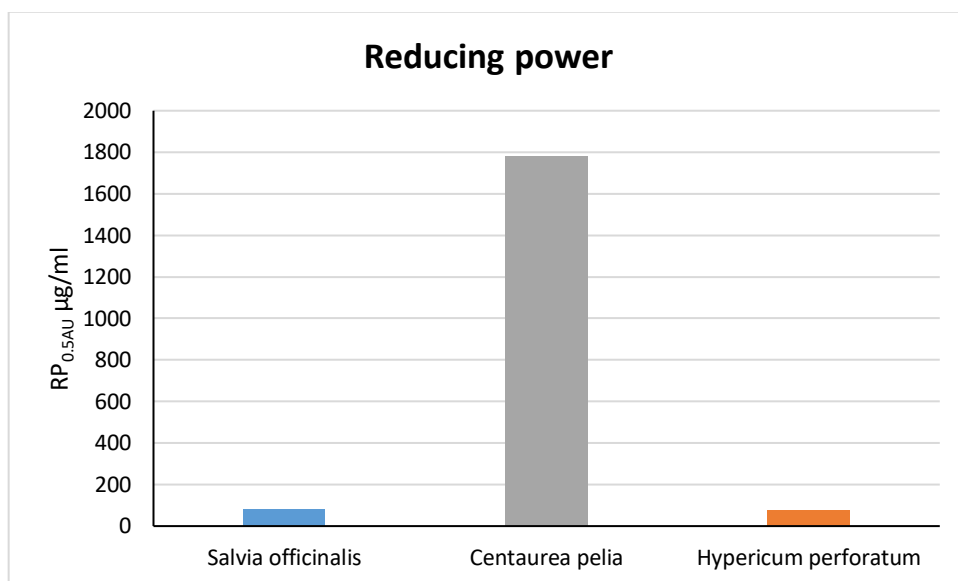
Διάγραμμα 4.6.2: Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του φυτού *Centaurea pelia*.

4.7 Συνολικά αποτελέσματα

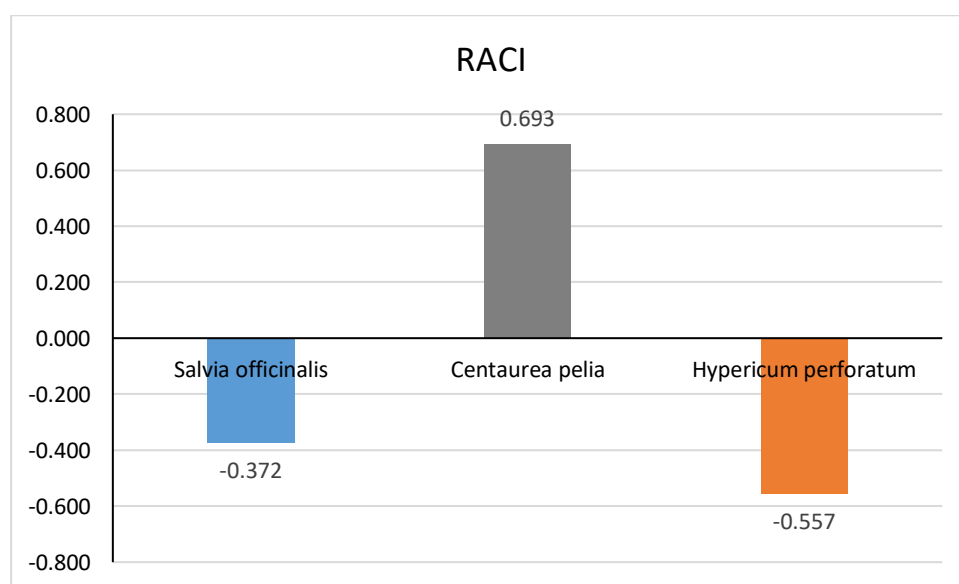
Παρακάτω παρατίθενται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την κάθε μέθοδο καθώς και οι τιμές του δείκτη RACI. Ο δείκτης RACI δείχνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων συνυπολογίζοντας τη δραστηρότητά τους σε όλες τις εξεταζόμενες μεθόδους. Επειδή, στη μελέτη μας ο δείκτης RACI βασίζεται σε τιμές IC₅₀, όσο μικρότερη τιμή έχει τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Σύμφωνα με το δείκτη RACI, πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση είχε το εκχύλισμα *Hypericum perforatum* (-0,557) ακολουθούμενο από το *Salvia officinalis* (-0,372) και το *Centaurea pelia* (0,693).



Διάγραμμα 4.7.1: Απεικόνιση των τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν με τις μεθόδους DPPH, ABTS, O₂^{•-} και OH[•].



Διάγραμμα 4.7.2: Απεικόνιση των τιμών $RP_{0.5AU}$ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν με την μέθοδο Reducing Power Assay.



Διάγραμμα 4.7.3: Απεικόνιση των τιμών RACI των εκχυλισμάτων.

5. Συζήτηση

Οι ελεύθερες ρίζες, οι δραστικές μορφές οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες παίζουν σημαντικό ρόλο στους αερόβιους οργανισμούς, αλλά είναι και υπεύθυνα για την πρόκληση σοβαρών ασθενειών. Οι αερόβιοι οργανισμοί αντιμετωπίζουν τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες, με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας. Η αντιοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Για αυτό συστήνεται και η κατανάλωση τροφών ή σκευασμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες (Διαμαντίδης, 2007). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από τα είδη των φυτών *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* που συλλέχθηκαν από το όρος Πήλιο.

Από την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών των φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu το εκχύλισμα με τις περισσότερες πολυφαινόλες ήταν το *Salvia officinalis* με τιμή 187,48 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα *Hypericum perforatum* είχε 181,23 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος, ενώ το εκχύλισμα *Centaurea pelia* είχε 28,78 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

Με βάση τις τιμές των IC_{50} και τα 3 εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•]. Το εύρος των τιμών IC_{50} για τα 3 εκχυλίσματα κυμάνθηκε από 11,5 $\mu\text{g/ml}$ έως 200 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Hypericum perforatum* με IC_{50} 11,5 $\mu\text{g/ml}$ και το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα *Centaurea pelia* με IC_{50} 200 $\mu\text{g/ml}$.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS^{•+} έδειξε, όπως και η μέθοδος με το DPPH, ότι και τα 3 εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης αυτής της ρίζας. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 2,9 $\mu\text{g/ml}$ έως 86 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Salvia officinalis* με IC_{50} 2,9 $\mu\text{g/ml}$ και το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα *Centaurea pelia* με IC_{50} 86 $\mu\text{g/ml}$. Στη μέθοδο ABTS το εκχύλισμα *Hypericum perforatum* είχε αρκετά μικρότερη δραστικότητα (περίπου 4 φορές μικρότερη) σε σχέση με τη μέθοδο DPPH. Αυτό δείχνει πως τα αντιοξειδωτικά του μόρια είναι κυρίως λιπόφιλα, αφού ο διαλύτης στη μέθοδο DPPH είναι η μεθανόλη,

ενώ στη μέθοδο ABTS ο διαλύτης είναι το νερό. Ενώ για τα εκχυλίσματα *Salvia officinalis* και *Centaurea pelia* ισχύει το αντίθετο.

Στην συνέχεια, η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζα $\text{OH}^\cdot$, έδειξε ότι και τα 3 εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαίνονται από 208 $\mu\text{g/ml}$ έως 895 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Centaurea pelia* με IC_{50} 208 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το πιο ασθενές ήταν το *Salvia officinalis* με IC_{50} 895 $\mu\text{g/ml}$. Αυτή η μέθοδος ήταν η μοναδική στην οποία το εκχύλισμα *Centaurea pelia* είχε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Πιθανώς, το εκχύλισμα *Centaurea pelia* διαθέτει αντιοξειδωτικά συστατικά που λόγω της δομής τους μπορούν και αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη ρίζα $\text{OH}^\cdot$.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με τη ρίζα $\text{O}_2^{\cdot-}$ έδειξε ότι και τα 3 εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας της. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαίνονται από 76 $\mu\text{g/ml}$ έως 410 $\mu\text{g/ml}$. Σε αυτήν την περίπτωση, το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Hypericum perforatum* με IC_{50} 76 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το πιο ασθενές ήταν το *Centaurea pelia* με IC_{50} 410 $\mu\text{g/ml}$.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με τον προσδιορισμό της αναγωγικής δύναμης μας έδωσε εύρος τιμών $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ που κυμαίνονται από 74 $\mu\text{g/ml}$ έως 1780 $\mu\text{g/ml}$. Σε συμφωνία με τις περισσότερες μεθόδους, το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Hypericum perforatum* με $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ 74 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το πιο ασθενές ήταν το *Centaurea pelia* με $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ 1780 $\mu\text{g/ml}$.

Ο δείκτης RACI που δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων συνυπολογίζοντας τη δραστητικότητά τους σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους, έδειξε ότι η σειρά δραστητικότητας των εκχυλισμάτων ήταν: *Hypericum perforatum* (-0,557) > *Salvia officinalis* (-0,372) > *Centaurea pelia* (0,693). Λόγω του ότι για τον υπολογισμό του δείκτη RACI χρησιμοποιήθηκαν τιμές IC_{50} των αντιοξειδωτικών μεθόδων, όσο πιο μικρή τιμή έχει αυτός ο δείκτης τόσο πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχει το εκχύλισμα. Ήταν αξιοσημείωτο ότι τα εκχυλίσματα *Hypericum perforatum* και *Salvia officinalis* που είχαν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (181,23 και 187,48 48 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος, αντίστοιχα) από το εκχύλισμα *Centaurea pelia* (28,78 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους

εκχυλίσματος), είχαν και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Αυτό δείχνει ότι οι πολυφαινόλες έχουν σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

Σε προηγούμενες μελέτες οι Khiya et al., (2021) οι οποίοι αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού *Salvia officinalis*, που συλλέχθηκε από δύο περιοχές του Μαρόκου. Το υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia officinalis* έδειξε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, 176 mg/g εκχυλίσματος ενώ η εξέταση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH, έδειξε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης αυτής της ρίζας, με τιμές IC_{50} 2 $\mu\text{g/ml}$, παρουσιάζοντας ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Khiya et al., 2021). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, αιθέρια έλαια φυτών από την επικράτεια του Abruzzo (Ιταλία), συμπεριλαμβανομένου του *Salvia officinalis*, αξιολογήθηκαν για το αντιοξειδωτικό τους δυναμικό. Η ολική περιεκτικότητα και η αντιοξειδωτική ικανότητα αξιολογήθηκαν μέσω της μεθόδου FC και των μεθόδων ABTS και DPPH. Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες βρέθηκε να είναι $0,178 \pm 0,008$ mg/g, ενώ η εξέταση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH και ABTS έδειξε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και $ABTS^{*+}$, 8.709 ± 0.885 $\mu\text{g/mL}$ και 0.098 ± 0.005 mmol/g, αντίστοιχα (Pellegrini et al., 2018). Σε παρόμοια μελέτη, εκχυλίσματα από το φυτό *Salvia officinalis* από την Τυνησία αναλύθηκαν για το αντιοξειδωτικό τους δυναμικό με την μέθοδο DPPH και βρέθηκε ικανότητα εξουδετέρωσης αυτής της ρίζας, με τιμές IC_{50} 67 $\mu\text{g/mL}$ (Kheder et al., 2017).

Στην μελέτη των Kakouri et al., (2023) διερευνήθηκε το ποιοτικό και ποσοτικό φυτοχημικό προφίλ και η αντιοξειδωτική δράση εννέα ειδών του γένους *Hypericum* που συλλέχθηκαν στην Ελλάδα. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης εκφράστηκαν ως mg ξηρού εκχυλίσματος/g ξηρού υλικού. Η παρουσία υπερφορίνης στο εκχύλισμα *H. perforatum* βρέθηκε αξιοσημείωτα υψηλή (608,39 mg/g ξηρού υλικού), ενώ η συνολική περιεκτικότητα υπερφορίνης στα εκχυλίσματα *H. perforatum* και *H. fragile* ήταν πολύ χαμηλή. Η εξέταση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH και ABTS έδειξε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και $ABTS^{*+}$, με τιμές IC_{50} για το *H. perforatum* να είναι $10,45 \pm 0,61$ $\mu\text{g/mL}$ και $6,06 \pm 0,93$ $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα, παρουσιάζοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε

σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Kakouri et al., 2023). Επιπλέον, στην μελέτη των Seyrekoglu et al., (2021) αξιολογήθηκε η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση σε τρία είδη του γένους *Hypericum*, *H. perforatum*, *H. scabrum* και *H. origanifolium*, που συλλέχθηκαν στην Τουρκία. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες βρέθηκε στο εκχύλισμα του φυτού *H. scabrum* ενώ το εκχύλισμα *H. perforatum* είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υπερικίνη ($9,57 \pm 0,07$ mg/mL) και ψευδοϋπερικίνη ($7,82 \pm 0,05$ mg/mL). Όλα τα είδη *Hypericum* παρουσίασαν ισχυρή αναστολή της ρίζας DPPH• με τιμές $IC_{50} < 3,8$ mg/mL (Seyrekoglu et al., 2021). Τέλος, στην μελέτη των Orđić et al., (2011) αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων του φυτού *Hypericum perforatum*, και βρέθηκε ότι όλα τα δείγματα εμφάνισαν ικανότητα αναστολής των ριζών DPPH•, με τιμές IC_{50} στο εύρος 0,520-6,66 μ g/mL, τιμές μικρότερες από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά BHT και BHA. Παρατηρήθηκε επίσης εξουδετέρωση ανιόντων σουπεροξειδίου, με τιμές IC_{50} που κυμαίνονταν μεταξύ 1,86-32,4 μ g/mL (Orđić et al., 2011).

Συμπερασματικά, σε συμφωνία με πληθώρα μελετών, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από τα φυτά *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum* και *Centaurea pelia* που συλλέχθηκαν από το όρος Πήλιο παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Ισχυρότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση είχε το εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* ακολουθούμενο από το *Salvia officinalis* και το *Centaurea pelia*. Θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα βιοδραστικά συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για αυτά στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική τους δράση. Τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων όπως βιολειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτική δράση.

6. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Brankiewicz., A., Trzos., S., Mrozek., M., Opydo., M., Szostak., E., Dziurka., M., Tuleja., M., Łoboda., A., Pocheć., E., 2023. *Cytotoxic and Antioxidant Activity of Hypericum perforatum L. Extracts against Human Melanoma Cells from Different Stages of Cancer Progression, Cultured under Normoxia and Hypoxia*. Molecules, 28(3), 1509. <https://doi.org/10.3390/molecules28031509>
- Bouafia., M., Colak., N., Ayaz., F.A., Gourine., N., Yousfi., M., 2023. *The chemical profile and seasonal variation of the composition of the phenolic acids in different plant parts of Centaurea sp.* J Pharm Biomed Anal. 30;236:115686. doi: 10.1016/j.jpba.2023.115686. Epub 2023 Aug 26. PMID: 37690189.
- De Zwart., L. L., Meerman., J. H. ., Commandeur., J. N. ., & Vermeulen., N. P., 1999. *Biomarkers of free radical damage*. Free Radical Biology and Medicine, 26(1-2), 202–226. doi:10.1016/s0891-5849(98)00196-8
- Fang., Y.-Z., Yang., S., & Wu., G., 2002. *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition, 18(10), 872–879. doi:10.1016/s0899-9007(02)00916-4
- Forman., H.J., Zhang., H., Rinna., A., 2009. *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Mol Aspects Med. 30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.
- Forshaw., T., Holmila., R., Nelson., K., Lewis., J., Kemp., M., Tsang., A., Furdui., C., 2019. *Peroxiredoxins in Cancer and Response to Radiation Therapies*. Antioxidants, 8(1), 11. doi:10.3390/antiox8010011
- Ghorbani., A., Esmaeilizadeh., M., 2017. *Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components*. J Tradit Complement 13;7(4):433-440. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014. PMID: 29034191; PMCID: PMC5634728.
- Gulcin., İ., & Alwasel., S. H., 2023. *DPPH Radical Scavenging Assay*. Processes, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Hamidpour., M., Hamidpour., R., Hamidpour., S., Shahlari., M., 2014. *Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (Salvia) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart*

Disease, and Cancer. J Tradit Complement Med. 4(2):82-8. doi: 10.4103/2225-4110.130373. PMID: 24860730; PMCID: PMC4003706.

- Hano. C., Tungmunthum., D., 2020. *Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases*. Medicines (Basel). 9;7(5):26. doi: 10.3390/medicines7050026. PMID: 32397520; PMCID: PMC7281114.
- Hohmann., M. S. N., Longhi-Balbinot., D. T., Guazelli., C. F. S., Navarro., S. A., Zarpelon., A. C., Casagrande, R., Verri, W. A., 2016. *Sesquiterpene Lactones. Studies in Natural Products Chemistry*, 243–264. doi:10.1016/b978-0-444-63601-0.00007-7
- Jakubczyk., K., Dec., K., Kałduńska., J., Kawczuga., D., Kochman., J., Janda., K., 2020. *Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage*. Pol Merkur Lekarski. 22;48(284):124-127. PMID: 32352946.
- Kakouri, E.; Trigas, P.; Daferera, D.; Skotti, E.; Tarantilis, P.A.; Kanakis, C. Chemical Characterization and Antioxidant Activity of Nine Hypericum Species from Greece. *Antioxidants* 2023, 12, 899. <https://doi.org/10.3390/antiox12040899>
- Kapoor., S., Chandel., R., Kaur., R., Kumar., S., Kumar., R., Janghu., S., Kaur., A., Kumar., V., 2023. *The flower of Hypericum perforatum L.: A traditional source of bioactives for new food and pharmaceutical applications. Biochemical Systematics and Ecology, Volume 110*, 104702
- Kato., L.S, Lelis., C.A., da Silva., B.D., Galvan., B., Conte-Junior., C.A., 2023. *Chapter Three - Micro- and nanoencapsulation of natural phytochemicals: Challenges and recent perspectives for the food and nutraceuticals industry applications*, Editor(s): Fidel Toldrá, *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, Volume 104, Pages 77-137, ISSN 1043-4526, ISBN 9780443193026
- Khedher MRB, Khedher SB, Chaieb I, Tounsi S, Hammami M. Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI J* 2017; 16: 160–173
- Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Berrekhis, F., Zair, T., Hilali, F.E., 2021. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant activity of

hydromethanolic extract and their fractions of the *Salvia officinalis* leaves from different regions of Morocco. J. Chem. 2021, e8585313

- Klemow., K.M., Bartlow., A., Crawford., J., Kocher., N., Shah., J., Ritsick., M., 2011. *Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum)*. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 11. PMID: 22593920.
- Kowalczyk A, Biskup I, Fecka I. Total phenolic content and antioxidative properties of commercial tinctures obtained from some Lamiaceae plants. *Nat Prod Commun* 2012; 7: 1631–1634
- Kumar., N., Goel., N., 2019. *Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications*. *Biotechnol Rep (Amst)*. 20;24:e00370. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370. PMID: 31516850; PMCID: PMC6734135.
- Lazari., D.M., Skaltsa., H.D., Constantinidis., D., 2000. *Volatile constituents of Centaurea pelia DC., C. thessala Hausskn. subsp. drakiensis (Freyn & Sint.) Georg. and C. zuccariniana DC. from Greece*. *Flavour Fragr. J.* 15: 7-11
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra N., 2010. *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. *Pharmacogn Rev.* 4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902. PMID: 22228951; PMCID: PMC3249911.
- López-Vinyallonga., S., López-Pujol., J., Constantinidis., T., Susanna., A., & Garcia-Jacas., N., 2015. *Mountains and refuges: Genetic structure and evolutionary history in closely related, endemic Centaurea in continental Greece*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 243–254. doi:10.1016/j.ympev.2015.06.018
- Martemucci., G., Costagliola., C., Mariano., M., D'andrea., L., Napolitano., P., & D'Alessandro., A. G., 2022. *Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health*. *Oxygen*, 2(2), 48-78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Miller., N.J., Rice-Evans., C., Davies., M.J., Gopinathan., V., Milner., A., 1993. *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clin Sci (Lond)*. 84(4):407-12. doi: 10.1042/cs0840407. PMID: 8482045.

- Nobakht., S.Z., Akaberi., M., Mohammadpour., A.H., Tafazoli Moghadam., A., Emami., S.A., 2022. Hypericum perforatum: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. Iran J Basic Med Sci. 25(9):1045-1058. doi: 10.22038/IJBMS.2022.65112.14338. PMID: 36246064; PMCID: PMC9526892.
- Orčić, D.Z.; Mimica-Dukić, N.M.; Francišković, M.M.; Petrović, S.S.; Jovin, E.Đ. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in Hypericum perforatum L. Chem. Cent. J. 2011, 5, 34.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Levine, M., 2003. *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*. Journal of the American College of Nutrition, 22(1), 18–35. doi:10.1080/07315724.2003.107192
- Pandey., K.B., Rizvi, S.I., 2009. *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxid Med Cell Longev. 2(5):270-8. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498. PMID: 20716914; PMCID: PMC2835915.
- Pellegrini M, Ricci A, Serio A, Chaves-López C, Mazzarrino G, D'Amato S, Lo Sterzo C, Paparella A. Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application. Foods 2018; 7: E19
- Pham-Huy., L.A., He., H., Pham-Huy., C., 2008. *Free radicals, antioxidants in disease and health*. Int J Biomed Sci. 4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.
- Phaniendra., A., Jestadi., D.B., Periyasamy., L.. 2015. *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. Indian J Clin Biochem. 30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25646037; PMCID: PMC4310837.
- Pizzino., G., Irrera., N., Cucinotta., M., Pallio., G., Mannino., F., Arcoraci., V., Squadrito., F., Altavilla., D., Bitto., A., 2017. *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. Oxid Med Cell Longev. doi: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.
- Prior., R. L., Wu., X., & Schaich., K., 2005. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698

- Reda., E.H., Shakour., Z.T.A., El-Halawany., A.M., El-Kashoury., E.A., Shams., K.A., Mohamed., T.A., Saleh., I., Elshamy., A.I., Atia., M.A.M., El-Beih., A.A., Abdel-Azim., N.S., El-Seedi., H.R., Hegazy., M.F., 2021. *Comparative Study on the Essential Oils from Five Wild Egyptian Centaurea Species: Effective Extraction Techniques, Antimicrobial Activity and In-Silico Analyses*. Antibiotics (Basel). 3;10(3):252. doi: 10.3390/antibiotics10030252. PMID: 33802470; PMCID: PMC8000757.
- Remigante., A., Morabito., R., 2023. *Cellular and Molecular Mechanisms in Oxidative Stress-Related Diseases 2.0/3.0*. Int J Mol Sci. 6;24(21):16018. doi: 10.3390/ijms242116018. PMID: 37959000; PMCID: PMC10647755.
- Rice-Evans., C., & Burdon., R., 1993. *Free radical-lipid interactions and their pathological consequences*. Progress in Lipid Research, 32(1), 71–110. doi:10.1016/0163-7827(93)90006-i
- Rizvi., S., Raza., S.T., Ahmed., F., Ahmad., A., Abbas., S., Mahdi., F., 2014. *The role of vitamin e in human health and some diseases*. Sultan Qaboos Univ Med J. 14(2):e157-65. PMID: 24790736; PMCID: PMC3997530.
- Rodríguez-García. C., Sánchez-Quesada. C., Toledo. E., Delgado-Rodríguez. M., Gaforio., J.J., 2019. *Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion?* Molecules. 6;24(5):917. doi: 10.3390/molecules24050917. PMID: 30845651; PMCID: PMC6429205.
- Salachna., P., Pietrak., A., Łopusiewicz., Ł., 2021. *Antioxidant Potential of Flower Extracts from Centaurea spp. Depends on Their Content of Phenolics, Flavonoids and Free Amino Acids*. Molecules. 9;26(24):7465. doi: 10.3390/molecules26247465. PMID: 34946551; PMCID: PMC8705284.
- Sautin., Y.Y., Johnson., R.J., 2008. *Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 27(6):608-19. doi: 10.1080/15257770802138558. PMID: 18600514; PMCID: PMC2895915.
- Schmidt., T.J., Klaes., M., Sendker., J., 2012. *Lignans in seeds of Linum species*. Phytochemistry. 82:89-99. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.004. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22854497.
- Seyrekoglu F, Temiz H, Eser F, Yildirim C. Comparison of the antioxidant activities and major constituents of three Hypericum species (H. perforatum, H. scabrum and H. organifolium) from Turkey. S Afr J Bot. 2022;146: 723-7.

- Skoufogianni., E., Solomou A.D., Kamperllari., F., Danalatos., N.G., 2017. *Ecology, Cultivation, Composition and Utilization Of Salvia Officinalis L. In Greece: A Review*. Global Advanced Research Journal of Agricultural Science (ISSN: 2315-5094) Vol. 6(12) pp. 449-455
- Stagos., D., 2020. *Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts*. Antioxidants, 9, 19; doi:10.3390/antiox9010019
- Susan., O., Enhancing the therapeutic effect of polyphenols with macromolecules, <https://doi.org/10.26190/unsworks/20630>
- Teka., T., Zhang., L., Ge., X., Li., Y., Han., L., Yan., X., 2022. *Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review*. Phytochemistry. 197:113128. doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113128. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35183567.
- Tsao, R., 2010. *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. Nutrients, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko., M., Rhodes., C. J., Moncol., J., Izakovic., M., & Mazur., M. 2006. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemo-Biological Interactions, 160(1), 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.00
- Xin., S., Zhou., D., Ning., L., 2022. *Chapter 8 - Bioactive stilbenes from plants*. Studies in Natural Products Chemistry, Volume 73, Pages 265-403
- Zagorskina., N. V., Zubova., M. Y., Nechaeva., T. L., Kazantseva., V. V., Goncharuk., E. A., Katanskaya., V. M., Baranova., E. N., & Aksenova., M. A., 2023. *Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review)*. International Journal of Molecular Sciences, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- Zhang., W., Xiao., S., & Ahn., D. U., 2013. *Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53(11), 1191–1201. doi:10.1080/10408398.2011.577540
- Zitterman., A., 2003. *DIETARY FIBER*. Bran. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 1844–1850. doi:10.1016/b0-12-227055-x/00346-1

Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία

- Βαλαβανίδης Α., 2006. Ελεύθερες ρίζες και ο ρόλος στα βιολογικά συστήματα, Εκδόσεις ΒΗΤΑ.
- Βαφοπούλου - Μαστρογιαννάκη Α., 2003. Βιοχημεία τροφίμων, Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- Βεσκούκης Α., 2022. *Η θεωρία των ελευθέρων ριζών στην τοξικολογία και ο ρόλος της διατροφής*. Κεφάλαιο στο βιβλίο: Τοξικολογία στον σύγχρονο κόσμο, Αρχισυντάκτης: Αριστείδης Τσατσάκης, Εκδόσεις Νέον.
- Γαλάρης Δ., 2015. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες, ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ.
- Γιαννακοπούλου Ε., 2009. Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Κλινική σημασία, Archives of Hellenic Medicine, 26 (1): 23-35.
- Διαμαντίδης Γ., 2007. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 3η έκδοση, University Studio Press.
- Παπαγεωργίου Γ.Ε., 2005. Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξείδωση, University Studio Press.
- Klaassen C.D. & Watkins III J.B., 2015. Βασική Τοξικολογία, Casarett & Doull, Δεύτερη έκδοση. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Simpson M.G., 2017. Συστηματική των φυτών, Εκδόσεις ΥΤΟΡΙΑ.