

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΡΠΩΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥΣ ΣΠΟΡΟΥΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY IN FRUIT AND VEGETABLES FROM TRADITIONAL SEEDS OF ORGANIC FARMING

Ζαχόπουλος Δημήτριος του Νικολάου

Λάρισα, 2024-2025

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας (Επιβλέπων)

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριστείδης Βεσκούκης

Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περσεφόνη Γιαννούλη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το εαρινό εξάμηνο του 2025.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Κουρέτα, ο οποίος αποτέλεσε τον επιβλέποντα καθηγητή μου και μου έδωσε την ευκαιρία να εισαχθώ στον χώρο του συγκεκριμένου εργαστηρίου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Αριστείδη Βεσκούκη και την κυρία Περσεφόνη Γιαννούλη που συμφώνησαν να συμπληρώσουν την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα επιθυμούσα να δώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο κυρία Αναστασία Πατούνα που με εμπιστεύτηκε από την πρώτη στιγμή, δίνοντάς μου παράλληλα τις απαραίτητες γνώσεις που χρειάστηκα και λύνοντας όλες μου τις απορίες. Της οφείλω πολλά και της είμαι ευγνώμων.

Θερμές ευχαριστίες αξίζουν και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου ξεχωριστά. Το κλίμα ήταν εξαιρετικό και όλοι με βοήθησαν από την πρώτη στιγμή.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην μητέρα και τον αδερφό μου που με στηρίζουν πάντα και αποτελούν τους ήρωές μου, δίνοντάς μου δύναμη να συνεχίζω.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή.....	2
Ευχαριστίες.....	3
Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Ελεύθερες Ρίζες.....	8
1.1.1. Κατηγοριοποίηση ελεύθερων ριζών.....	9
1.1.2. Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών.....	12
1.1.3. Φυσιολογικός Ρόλος Ελεύθερων Ριζών.....	17
1.1.4. Αρνητικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών.....	18
1.2. Αντιοξειδωτικά.....	20
1.2.1. Ενδογενή Αντιοξειδωτικά.....	20
1.2.2. Εξωγενή Αντιοξειδωτικά.....	22
1.3. Οξειδωτικό Στρες.....	22
1.3.1. Οξειδωτικό Στρες και Ασθένειες.....	23
1.4. Δείγματα.....	23
1.4.1. Ι. Μ. Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγίας.....	24
1.4.2. Παραδοσιακοί Σπόροι.....	24
1.4.3. Βιολογική Καλλιέργεια.....	25
1.4.4. Οπωροκηπευτικά.....	26
2. Σκοπός.....	34
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	35
3.1. Γενικά.....	35
3.2. Επεξεργασία Δειγμάτων και Συνθήκες Αποθήκευσης.....	35
3.3. Δοκιμασία Εκτίμησης Αναγωγικής Ισχύος (Reducing Power Assay).....	36
3.4. Δοκιμασία Προσδιορισμού Αναγωγικής Ικανότητας έναντι του Χαλκού (CUPRAC Assay).....	40
3.5. Δοκιμασία Εκτίμησης Ικανότητας Εξουδετέρωσης της Ρίζας Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).....	42

3.6. Προσδιορισμός του Συνολικού Πολυφαινολικού Περιεχομένου Μέσω του Αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu	46
4. Αποτελέσματα	49
4.1. Γενικά	49
4.2. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Εκτίμησης Αναγωγικής Ισχύος (Reducing Power Assay).....	50
4.3. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Προσδιορισμού Αναγωγικής Ικανότητας έναντι του Χαλκού (CUPRAC Assay).....	51
4.4. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Εκτίμησης Ικανότητας Εξουδετέρωσης της Ρίζας Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).....	52
4.5. Αποτελέσματα Προσδιορισμού Συνολικού Πολυφαινολικού Περιεχομένου μέσω του Αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.....	53
5. Συζήτηση	54
6. Βιβλιογραφία	60

Περίληψη

Η διεξαγωγή τεχνικών βιολογικής γεωργίας και οι παραδοσιακοί σπόροι έχουν περιοριστεί μόνο σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Στις βιολογικές καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται σύνθετες χημικές ουσίες, ούτε γενετικά τροποποιημένοι σπόροι, κάτι που αποσκοπεί στην προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος. Οι μεγάλης έκτασης καλλιέργειες ακολουθούν συμβατικές τεχνικές, εστιάζοντας στην αποδοτικότερη παραγωγή. Ωστόσο πολλοί είναι αυτοί που αναφέρουν πως τα βιολογικά καλλιεργούμενα προϊόντα εμφανίζουν ανώτερη θρεπτική αξία. Η θρεπτική αξία ενός προϊόντος περιλαμβάνει και την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της βιολογικής δράσης και αντιοξειδωτικής ικανότητας δεκατριών οπωροκηπευτικών προερχόμενων από την Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς. Τα οπωροκηπευτικά αυτά προήλθαν από παραδοσιακούς σπόρους και αναπτύχθηκαν με βιολογική καλλιέργεια. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των προϊόντων εκτιμήθηκε με την Δοκιμασία Εκτίμησης Αναγωγικής Ισχύος και την Δοκιμασία Προσδιορισμού Αναγωγικής Ικανότητας έναντι του Χαλκού. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου, ενώ προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα έδειξαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ άλλων, διαφορετικές ποικιλίες του ίδιου είδους (πιπεριές, *Capsicum annuum*) να εμφανίζουν διαφορές στην αναγωγική τους ικανότητα και το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αρχή για νέες μελέτες, όπως η μελέτη του αντιοξειδωτικού προφίλ σοδειών που έχουν προκύψει από συμβατικές καλλιέργειες.

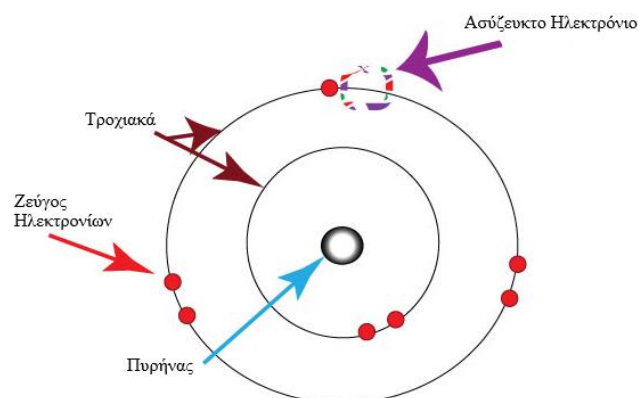
Abstract

Organic farming methods and the usage of traditional seeds have been limited and are only seen in low-scale cultivations. Organic farming avoids the usage of synthetic chemical substances and genetically modified seeds, which aims to the protection of human health and the environment. Larger-scale cultivations follow conventional methods, focusing on more efficient production. However, a lot of people claim that organic crops dispose superior nutritional value. This also includes the antioxidant capacity of a product. The aim of this thesis was the assessment of the biological activity and the antioxidant capacity of thirteen fruit and vegetables from the Holy Monastery of the Honorable Forerunner from Anatoli, Agia. These crops originate from traditional seeds and organic farming. The antioxidant capacity of these products was tested with the Reducing Power Assay and the Cupric Reducing Antioxidant Capacity Assay (CUPRAC). Moreover, the scavenging activity of the superoxide radical was assessed. Furthermore, the total polyphenolic content was determined for each sample through the Folin-Ciocalteu reagent. The results were particularly interesting. Among other results, different varieties of crops from the same species (peppers, *Capsicum annuum*) showed differences in their reducing capacity and polyphenolic content. This thesis can be the beginning for new studies, like the study of the antioxidant profile of crops grown in conventional cultivations.

1. Εισαγωγή

1.1. Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται «ένα άτομο ή μόριο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα και είναι ικανό να υφίσταται ως ανεξάρτητο στοιχείο μέσα σε ένα κύτταρο». Εξαιτίας της ύπαρξης ασύζευκτων ηλεκτρονίων σθένους, οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από αστάθεια, μικρό χρόνο ημιζωής και υψηλή δραστηριότητα. Για να αποκτήσουν σταθερότητα, μπορούν να προσλάβουν ηλεκτρόνια από άλλα άτομα ή μόρια μέσα στο κύτταρο. Με αυτό τον τρόπο, το άτομο ή μόριο που προσδίδει ηλεκτρόνια καθίσταται ελεύθερη ρίζα, ξεκινώντας μία αλυσιδωτή αντίδραση δημιουργίας ελεύθερων ριζών (Phaniendra et al., 2015).



Εικόνα 1: Δομή Ελεύθερης Ρίζας

Ο όρος «ρίζα» πρωτοαναφέρθηκε από τον Guyton de Morveau το 1786 και χρησιμοποιήθηκε αργότερα από τους Gay-Lussac, Liebig και Berzelius για να περιγράψει ομάδες ατόμων που παρέμεναν αμετάβλητες σε πολλές ουσίες. Συνεπώς, ο όρος αυτός δεν αναφερόταν σε άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όπως ο σύγχρονος ορισμός των ελεύθερων ριζών (Di Meo & Venditti, 2020).

Το 1900 ο καθηγητής Moses Gomberg αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην ύπαρξη ελεύθερων ριζών επισημαίνοντας την ύπαρξη της οργανικής ελεύθερης ρίζας του τριφαινυλομεθυλίου ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$). Το 1954 ο Gershman πρότεινε μία θεωρία σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου αποδίδεται στην ικανότητά του να σχηματίζει ελεύθερες ρίζες. Την ίδια χρονιά ο Cromoner επιβεβαίωσε την παρουσία ελεύθερων ριζών σε βιολογικά υλικά. Το 1956 ο Harman μίλησε για τον κομβικό ρόλο των ελεύθερων ριζών στην γήρανση, ενώ το 1971

διαπιστώθηκε πως πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών αποτελεί η αναπνευστική αλυσίδα, μία μεταβολική διεργασία παραγωγής ενέργειας στα κύτταρα (Phaniendra et al., 2015).

1.1.1. Κατηγοριοποίηση ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν υποκατηγορία μίας ευρύτερης ομάδας, των δραστικών μορφών. Οι δραστικές μορφές διακρίνονται στις ελεύθερες ρίζες και τις μη ρίζες. Ο διαχωρισμός μεταξύ ελεύθερων ριζών και μη ριζών εξαρτάται από την ύπαρξη ή μη ασύζευκτων ηλεκτρονίων στο άτομο ή μόριο. Οι μη ρίζες δεν διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα τροχιακά τους (Brieger et al., 2012).

Ανάλογα με το κεντρικό άτομό τους, οι δραστικές μορφές κατανέμονται στις εξής κατηγορίες:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)
- Δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)
- Δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS)
- Δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RClS)

Οι πιο διαδεδομένες δραστικές μορφές είναι αυτές του οξυγόνου (ROS) και του αζώτου (RNS). (Jomova et al, 2023)

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Η συγκεκριμένη κατηγορία αποτελείται από δραστικές μορφές οι οποίες έχουν το οξυγόνο ως κεντρικό άτομο. Παράγονται κυρίως μέσω μεταβολικών διαδικασιών και αποτελούν την πιο συχνά εμφανιζόμενη ομάδα δραστικών μορφών (Phaniendra et al, 2015). Οι κυριότερες από αυτές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (*Πίνακας 1*).

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)			
Ελεύθερες Ρίζες		Μη Ρίζες	
Ονομασία	Χημικός Τύπος	Ονομασία	Χημικός Τύπος
Ρίζα Ανιόντος Σουπεροξειδίου	$O_2^{\bullet-}$	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	H_2O_2
Ρίζα Υδροξυλίου	$OH^{\bullet}$	Μονήρες Οξυγόνο	1O_2
Ρίζα Αλκοξυλίου	$RO^{\bullet}$	Όζον	O_3
Ρίζα Περοξυλίου	$ROO^{\bullet}$	Οργανικό Υπεροξειδίο	$ROOH$

		Υποχλωριώδες Οξύ	HOCl
		Υποβρωμιώδες Οξύ	HOBr

Πίνακας 1: Ονομασίες και χημικοί τύποι των κυριότερων δραστικών μορφών οξυγόνου (Phaniendra et al, 2015)

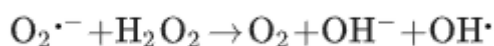
Μερικές από τις δραστικές μορφές που περιέχονται στον Πίνακα 1 περιγράφονται πιο εκτενώς στην συνέχεια.

Ρίζα Ανιόντος Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

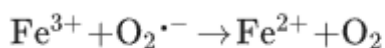
Η πιο διαδεδομένη μορφή ROS είναι η ρίζα του ανιόντος σουπεροξειδίου. Αποτελεί πρόδρομο της παραγωγής των περισσότερων μορίων που ανήκουν στην κατηγορία των δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ η ίδια παράγεται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων ή μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο (O_2). Η ρίζα αυτή μπορεί να αλλάζει μορφή από $O_2^{\bullet-}$ σε HO_2 σε συνθήκες χαμηλού pH (Phaniendra et al, 2015).

Ρίζα Υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$)

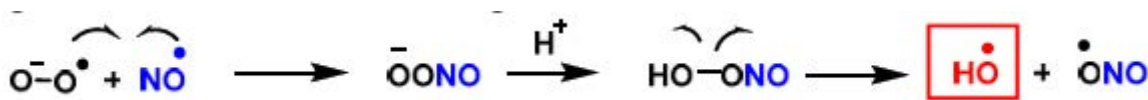
Η ρίζα υδροξυλίου είναι από τις πιο ισχυρές ελεύθερες ρίζες εμφανίζοντας πολύ υψηλή δραστικότητα και μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 10^{-9} s). Παράγεται μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss, της αντίδρασης Fenton ή της αποικοδόμησης του υπεροξυνιτρίτη. Οι αντιδράσεις αυτές απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 1, 2 & 3). Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με οργανικά ή ανόργανα μόρια και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες σε βιομόρια και συνεπώς σε κύτταρα (Juan et al, 2021, Phaniendra et al, 2015).



Εικόνα 2: Η αντίδραση Haber-Weiss (Kehrer, 2020)



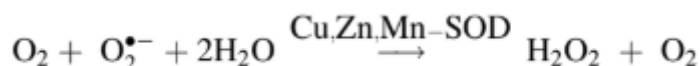
Εικόνα 3: Η αντίδραση Fenton (Kehrer, 2000)



Εικόνα 4: Η αποικοδόμηση του υπεροξυνιτρίτη (Juan et al, 2021)

Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (H₂O₂)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, ωστόσο μπορεί να βλάψει τα κύτταρα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (10 μM). Επιπρόσθετα, μπορεί να διασπαστεί και να σχηματίσει ρίζες υδροξυλίου (OH•), μέσω μίας αντίδρασης που απαιτεί την παρουσία συγκεκριμένων ιόντων μετάλλου. Το μόριο αυτό σχηματίζεται μέσω μίας ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD) (Phaniendra et al, 2015).



Εικόνα 5: Η αντίδραση σχηματισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Phaniendra et al, 2015)

Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Αυτή η κατηγορία αποτελείται από δραστικές μορφές που περιέχουν ως κεντρικό άτομο το άζωτο. Δεν είναι τόσο διαδεδομένες όσο οι δραστικές μορφές οξυγόνου, παρόλα αυτά έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους στον οργανισμό και η λειτουργία τους είναι παρόμοια με αυτή των ROS (Jomona et al, 2023). Οι πιο σημαντικές δραστικές μορφές αζώτου απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)			
Ελεύθερες Ρίζες		Μη Ρίζες	
Ονομασία	Χημικός Τύπος	Ονομασία	Χημικός Τύπος
Ρίζα Μονοξειδίου του Αζώτου	NO•	Υπεροξυνιτρίτης	ONOO ⁻
Ρίζα Διοξειδίου του Αζώτου	NO ₂ •	Κατιόν Νιτροξυλίου	NO ⁺
		Ανιόν Νιτροξυλίου	NO ⁻
		Τριοξείδιο του Αζώτου	N ₂ O ₃
		Τετροξείδιο του Αζώτου	N ₂ O ₄
		Νιτρώδες Οξύ	HNO ₂

Πίνακας 2: Ονομασίες και χημικοί τύποι των κυριότερων δραστικών μορφών αζώτου (Phaniendra et al, 2015)

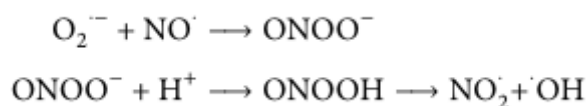
Οι πιο σημαντικές από τις δραστικές μορφές που βρίσκονται στον Πίνακα 2 περιγράφονται εκτενέστερα στην συνέχεια.

Ρίζα μονοξειδίου του Αζώτου (NO•)

Το μόριο του μονοξειδίου του αζώτου, που χαρακτηρίστηκε ως το μόριο της χρονιάς το 1922, είναι μικρό, παραμαγνητικό και ιδιαίτερα λιποδιαλυτό. Η συγκεκριμένη ρίζα συντίθεται μέσω της δράσης ενός ενζύμου που ονομάζεται συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase, NOS). Το μονοξείδιο του αζώτου δρα, μεταξύ άλλων, ως σηματοδοτικό μόριο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Jomova et al, 2023).

Υπεροξυνιτρίτης (ONOO•)

Το ανιόν του υπεροξυνιτρίτη δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, είναι δυνατόν όμως να διασπαστεί έχοντας ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό των ριζών του διοξειδίου του αζώτου και του υδροξυλίου. Ο σχηματισμός του υπεροξυνιτρίτη πραγματοποιείται με την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με ρίζες σουπεροξειδίου (Jomova et al, 2023, Di Meo & Venditti, 2020). Η αντίδραση αυτή, καθώς και η διάσπαση του υπεροξυνιτρίτη περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6: Η αντίδραση σχηματισμού του υπεροξυνιτρίτη (επάνω) και η διάσπαση του υπεροξυνιτρίτη (κάτω) (Di Meo & Venditti, 2020)

1.1.2. Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι απότοκο της δράσης είτε ενδογενών, είτε εξωγενών παραγόντων. Όσον αφορά τους ενδογενείς παράγοντες, ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται συνεχώς μέσα στα κύτταρα ως αποτέλεσμα κατά πλειοψηφία ενζυμικών αντιδράσεων. Από την άλλη, οι εξωγενείς παράγοντες δεν περιλαμβάνουν ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά σχετίζονται με άλλους τρόπους παραγωγής ελεύθερων ριζών (Lobo et al, 2010).

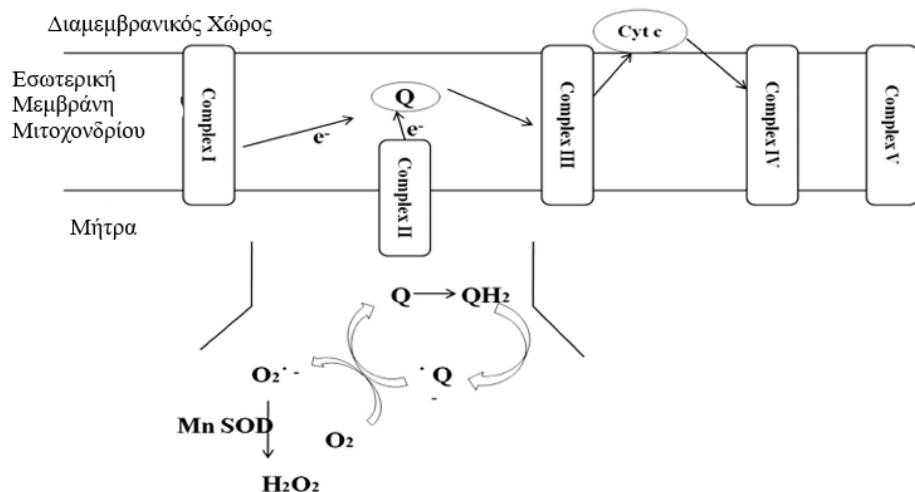
Ενδογενείς Πηγές

Το αποτέλεσμα μερικών μεταβολικών διαδικασιών ή ενζυμικών αντιδράσεων είναι η δημιουργία ελεύθερων ριζών. Αυτές οι διαδικασίες ή οι δράσεις ενζύμων αποτελούν τις ενδογενείς πηγές παραγωγής. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες από αυτές τις πηγές.

Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί μία κυτταρική διεργασία που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία της μεγαλύτερης ποσότητας τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που είναι δυνατό να συντεθεί από μία μεταβολική διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, η διεργασία αυτή απαρτίζεται από μία σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από μόρια-φορείς όπως τα μόρια NADH και FADH₂ στο O₂ μέσω των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων (Desphande & Mohiuddin, 2023).

Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη το O₂ έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του σε H₂O. Εκτός αυτού, προϊόντα αυτής της διεργασίας είναι και δραστικές μορφές οξυγόνου. Αναλυτικότερα, ROS παράγονται κυρίως στο σύμπλεγμα I (αφυδρογονάση του NADH) και στο σύμπλεγμα III (αναγωγή του κυτοχρώματος c). Στο σύμπλεγμα I πραγματοποιείται η αναγωγή της ουβικουινόνης (Q) σε ουβικουινόλη (QH₂). Αυτή η ανηγμένη μορφή μπορεί να ξαναμετατραπεί σε ουβικουινόνη, κάτι που συμβαίνει μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος (•Q⁻). Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το συγκεκριμένο ανιόν στο O₂ οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας O₂•⁻. Η ρίζα αυτή, μέσω της δράσης της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Mitochondrial Superoxide Dismutase, MnSOD) μετατρέπεται σε H₂O₂. Παρομοίως, ρίζες O₂•⁻ παράγονται και στο σύμπλεγμα III και προκύπτουν από το ασταθές ανιόν •Q⁻. Από τις συγκεκριμένες δραστικές μορφές που προκύπτουν μπορεί να παραχθεί και OH• μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton, όπως έχει προαναφερθεί (Nolfi-Donagan et al, 2020, Phaniendra et al, 2015).



Εικόνα 7: Η παραγωγή ROS κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση (Phaniendra et al, 2015)

Οξείδωση της Ξανθίνης (XO)

Η οξείδωση της ξανθίνης αποτελεί ένα ένζυμο που δρα κατά το τελικό στάδιο του καταβολισμού των πουρινών. Ειδικότερα, συμμετέχει στην οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στην συνέχεια στην περαιτέρω οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Κατά την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αντιδράσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο αυτό προσδίδει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο (O_2), κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή $O_2^{\bullet -}$ και H_2O_2 μέσω μίας μονοσθενούς ή δισθενούς αναγωγής αντίστοιχα (Schmidt et al, 2018).

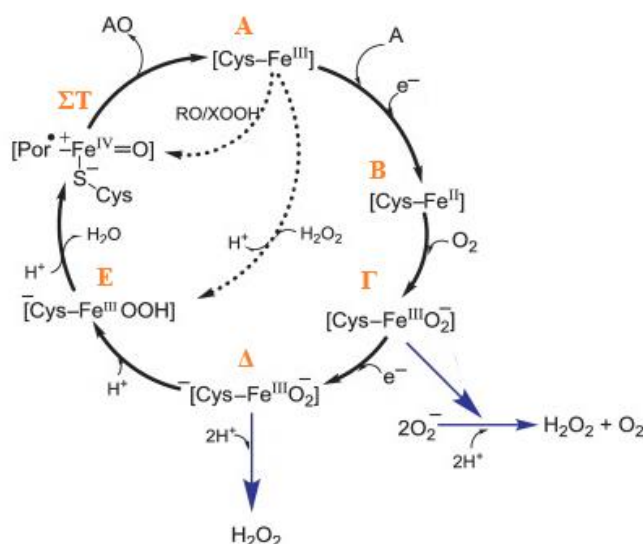
Το συγκεκριμένο ένζυμο φυσιολογικά εμφανίζεται υπό την μορφή μίας αφυδρογονάσης (XDH), η οποία καταλύει τις ίδιες αντιδράσεις χωρίς να παράγει ROS. Αυτή η μορφή ενζύμου για να δράσει απαιτεί την παρουσία NAD^+ ως συμπαραγοντα και κατά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων το NAD^+ ανάγεται σε NADH. Η μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης προς την μορφή οξείδωσης πραγματοποιείται μέσω οξείδωσης θειολικών ομάδων καταλοίπων κυστεΐνης του ενζύμου ή μερικής πρωτεόλυσης. Η μετατροπή του ενζύμου από την μία μορφή στην άλλη συμβαίνει σε περιπτώσεις τραυματισμού ιστών (Battelli et al, 2016).

Αντιδράσεις στα Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι κυτταρικά οργανίδια τα οποία αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ROS μέσω διαφορετικών διεργασιών, όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και

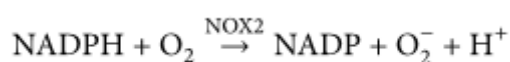
Ο σχηματισμός ROS στα υπεροξειδισώματα επιτυγχάνεται με την μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, με πλήθος διαφορετικών δραστικών μορφών οξυγόνου να παράγονται. Δυσλειτουργικά υπεροξειδισώματα που δεν μπορούν να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά ελεύθερες ρίζες αποικοδομούνται μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται πεξοφαγία (Wei et al, 2025).

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 βρίσκονται κυρίως στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο κυττάρων του ήπατος και συμμετέχουν στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών κυρίως ενώσεων. Κατά την διάρκεια της φάσης I του μεταβολισμού, οι ενώσεις υφίστανται οξείδωση έτσι ώστε να αδρανοποιηθούν από τα ένζυμα αυτά, με το O₂ να ανάγεται. Η αναγωγή αυτή προκαλείται από την μεταφορά ηλεκτρονίων, συνήθως από φορείς όπως το NADH ή το NADPH. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων αποτελεί τον κύκλο της μονοοξυγενάσης του CYP (Κυτοχρώματος P450). Η αναγωγή του οξυγόνου έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα την δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (Hrycay & Bandiera, 2015).



Φαγοκυττάρωση

Μερικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα επιτελούν μία διαδικασία εξουδετέρωσης παθογόνων που ονομάζεται φαγοκυττάρωση. Κατά την διάρκεια αυτής της διεργασίας παράγονται δραστικές μορφές τόσο οξυγόνου, όσο και αζώτου. Ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου προκύπτει από την παράδοση ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο από τον δότη NADPH. Αυτή η μετατροπή του O₂ σε ROS οφείλεται στην δράση μίας ομάδας ενζύμων, των NADPH οξειδασών (NOX). Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν όταν τα φαγοκύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα που πρόκειται να εκτελέσουν φαγοκυττάρωση, διεγερθούν, κάτι που συμβαίνει με την πρόσδεση ενός κατάλληλου προσδέτη στους υποδοχείς Toll-Like (TLRs) των φαγοκυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες (κυρίως παράγεται O₂^{•-}) σχηματίζονται με σκοπό την συμβολή στην εξουδετέρωση των παθογόνων (Robinson, 2008, Wakasugi-Onogi et al, 2023).



Εικόνα 9: Η αντίδραση σχηματισμού O₂^{•-} από την δράση του ενζύμου NOX2 (Di Meo & Venditti, 2020)

Εξωγενείς Πηγές

Εκτός από τις ενδογενείς πηγές που προαναφέρθηκαν, ROS μπορούν να σχηματιστούν και εξαιτίας της επίδρασης ορισμένων εξωγενών παραγόντων. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς αναφέρονται στην συνέχεια.

Ακτινοβολία

Η επίδραση της ακτινοβολίας στην παραγωγή ROS είναι εξακριβωμένη. Επιπρόσθετα, βλάβες στο DNA μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια μέσων αντιμετώπισης των ROS ή και στην αυξημένη λειτουργία των ενζύμων που τις συνθέτουν. Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να υδρολύει το νερό (H₂O), μετατρέποντας το σε διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου (Jomona et al, 2023).

Ξενοβιοτικές Ενώσεις

Διάφορες ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως φάρμακα, ναρκωτικές ουσίες ή περιβαλλοντικοί ρύποι έχει διαπιστωθεί πως οδηγούν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Αυτό μπορεί να συμβεί,

μεταξύ άλλων, μέσω της αυξημένης οξειδωσης λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε αναγωγή του μοριακού οξυγόνου ή της μείωσης των επιπέδων αντιοξειδωτικών (Jomona et al, 2023).

Τρόπος Ζωής (Κάπνισμα & Αλκοόλ)

Οι συνήθειες ενός ατόμου ενδέχεται να αυξήσουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών στον οργανισμό του. Ο καπνός του τσιγάρου, εκτός από την επαγωγή της παραγωγής δραστικών μορφών, περιέχει ο ίδιος ελεύθερες ρίζες οι οποίες εισάγονται στον οργανισμό. Επιπλέον, η αυξημένη ποσότητα αιθανόλης που μπορεί να καταναλώνει κανείς οδηγεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών, κυρίως μέσω της αντίδρασης Fenton ή της μετατροπής της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη και στην συνέχεια σε διάφορες μορφές ROS (Jomona et al, 2023).

1.1.3. Φυσιολογικός Ρόλος Ελεύθερων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες ως έννοια είναι συνυφασμένες με τις αρνητικές τους επιπτώσεις. Παρόλα αυτά, οι ελεύθερες ρίζες επιφέρουν αρκετά ωφέλιμα αποτελέσματα στον οργανισμό, ιδιαίτερα όταν βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Τα πιο σημαντικά από αυτά τα αποτελέσματα αναφέρονται παρακάτω (Di Meo & Venditti, 2020).

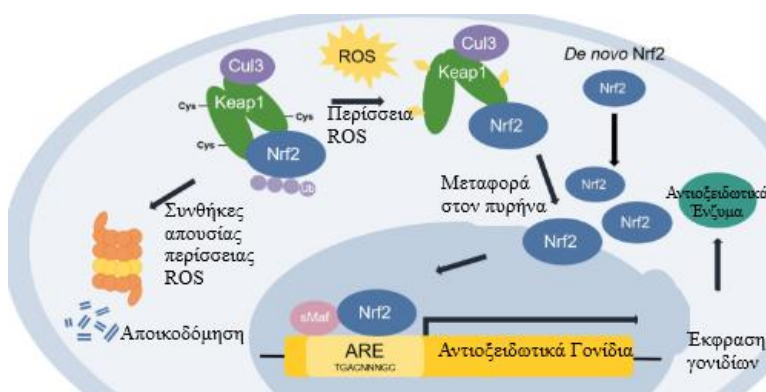
Φαγοκυττάρωση

Μία από τις επωφελείς λειτουργίες των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό είναι η συμμετοχή τους στην φαγοκυττάρωση. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η φαγοκυττάρωση είναι μία διεργασία που επιτελείται από κύτταρα του ανοσοποιητικού με σκοπό την εξουδετέρωση παθογόνων που έχουν εισβάλει στον οργανισμό. Η συμμετοχή των ROS στην συγκεκριμένη διεργασία επιβεβαιώνεται και από το φαινόμενο της εγκόλπωσης μεγάλης ποσότητας οξυγόνου από μακροφάγα και πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (Extra Respiration of Phagocytosis). Το μοριακό οξυγόνο που εγκολπώνεται μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, με την δράση των ενζύμων NOX. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες βλάπτουν το παθογόνο που πρόκειται να αντιμετωπιστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, καταστρέφοντας τις δομές του και συμβάλλοντας έτσι στην προσπάθεια των φαγοκυττάρων (Di Meo & Venditti, 2020).

Κυτταρική Σηματοδότηση

Εκτός από την άμυνα του οργανισμού, οι ελεύθερες ρίζες έχει διαπιστωθεί πως συμβάλλουν και στην κυτταρική σηματοδότηση. Αναλυτικότερα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποτελέσουν δευτερογενείς διαβιβαστές σήματος και να συμμετάσχουν σε πληθώρα φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, επηρεάζοντας την έκφραση διάφορων γονιδίων. Μερικά από αυτά είναι γονίδια η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον παράγοντα Nf-κB. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διάφορες ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως η φλεγμονή.

Εκτός αυτών, οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν και στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ρύθμιση της δράσης του παράγοντα Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2), η οποία εξαρτάται από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ελεύθερων ριζών. Σε συνθήκες απουσίας περίσσειας ελεύθερων ριζών, ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός ουβικουιτινυλιώνεται, ενώ σε περιπτώσεις περίσσειας ελεύθερων ριζών εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται επάνω στο DNA με τα στοιχεία ARE (Antioxidant Response Elements) και τις πρωτεΐνες Maf (Musculoaponeurotic fibrosarcoma). Ως απότοκο αυτής της αλληλεπίδρασης παράγονται αντιοξειδωτικά ένζυμα (Di Meo & Venditti, 2020).



Εικόνα 10: Η επίδραση των ROS στον παράγοντα Nrf2 για την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Ngo & Duennwald, 2022)

1.1.4. Αρνητικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Είναι διαπιστωμένο πως οι ελεύθερες ρίζες έχουν έναν διττό ρόλο στον οργανισμό. Από την μία συμβάλλουν στην άμυνα και την ομοιόσταση με διάφορους τρόπους, μερικοί από τους οποίους αναφέρθηκαν παραπάνω. Από την άλλη όμως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να βλάψουν τον οργανισμό, κάτι που συμβαίνει μέσω των αντιδράσεών τους με σημαντικά μακρομόρια. Οι αντιδράσεις αυτές συνήθως προκαλούν δομικές αλλαγές και απώλεια της φυσιολογικής δράσης (Pizzino et al, 2017).

Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών στα Λιπίδια

Τα κατάλοιπα λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών μπορούν να υποστούν οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες. Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στην διαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που με την σειρά του οδηγεί σε μειωμένη μεμβρανική ρευστότητα και αδρανοποίηση μεμβρανικών ενζύμων και υποδοχέων. Ως τελικό απότοκο της λιπιδικής υπεροξείδωσης, παράγεται μαλοναλδεΐδη (MDA) και συζευγμένα κατάλοιπα διενίων, μόρια τα οποία είναι τοξικά για το DNA και τις πρωτεΐνες (Pizzino et al, 2017, Phaniendra et al, 2015).

Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών στις Πρωτεΐνες

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν την οξείδωση καταλοίπων αμινοξέων των πρωτεϊνών. Η αντίδραση αυτή μπορεί να έχει καταστρεπτικές συνέπειες για την λειτουργικότητα μίας πρωτεΐνης, μειώνοντας την σημαντικά ή και εντελώς, καθώς μέσω της οξείδωσής της υφίσταται αλλαγές στην διαμόρφωσή της. Πιο ευάλωτα σε οξείδωση είναι τα αμινοξέα που περιέχουν θείο στην πλευρική τους αλυσίδα, δηλαδή η κυστεΐνη και η μεθειονίνη (Phaniendra et al, 2015).

Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών στα Νουκλεϊκά Οξέα

Σχετικά με το DNA, η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) αποτελεί τον τύπο ROS που προσβάλλει συνηθέστερα τα αμινοξέα, είτε αλληλεπιδρώντας με τις αζωτούχες βάσεις, είτε προκαλώντας ρήξεις στην διπλή έλικα του DNA (κυρίως μονόκλωνες αλλά και δίκλωνες). Ένα από τα προϊόντα που σχηματίζονται από την αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου με αζωτούχες βάσεις είναι η 8-οξο-2' δεοξυγουανίνη, η οποία οδηγεί στην ύπαρξη αβασικών θέσεων κατά την αντιγραφή. Εκτός από τις ROS, και οι RNS επιδρούν στο DNA, με τον σχηματισμό της 8-νιτρογουανίνης από την ρίζα υπεροξυνιτρίτη να αποτελεί ένα παράδειγμα βλάβης από αυτές. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν και επιγενετικές τροποποιήσεις, μεταβάλλοντας τα μοτίβα μεθυλιώσεων σε νησίδες CpG επάνω στο DNA (Phaniendra et al, 2015, Pizzino et al, 2017).

Όσον αφορά το RNA, είναι πιο εκτεθειμένο σε ελεύθερες ρίζες εφόσον βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και δεν προστατεύεται από πρωτεΐνες (όπως π.χ. το DNA από ιστόνες), γεγονός που το καθιστά πιο επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες. Κύριος δείκτης βλάβης είναι το οξειδωμένο προϊόν 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνη (8-oxoGuo), το οποίο προέρχεται από την επίδραση των ελεύθερων ριζών στο ριβονουκλεοτίδιο της γουανίνης. Οξειδωτικές βλάβες στο RNA επηρεάζουν πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών, όπως και η αντίστροφη μεταγραφή, ενώ

μακροπρόθεσμα οδηγούν και στην επιδείνωση ασθενειών όπως ο διαβήτης (Phaniendra et al, 2015, Chen et al, 2022).

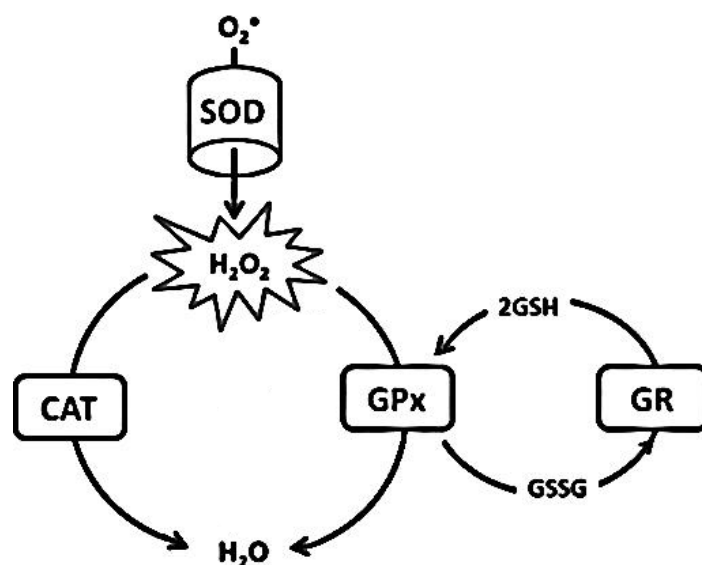
1.2. Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιαδήποτε ουσία, μπορεί να προλάβει να καθυστερήσει ή να αναστείλει οξειδωτική βλάβη προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες (Halliwell & Gutteridge, 2015, Oliverio et al, 2022). Τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν διάφορα μόρια-στόχους, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα βιομόρια από οξειδωτική βλάβη. Διαφορετικά αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν διαφορετικούς τύπους ROS και το καθένα εμφανίζει ξεχωριστό μηχανισμό δράσης. Ως τελικό αποτέλεσμα της δράσης ενός αντιοξειδωτικού, παραδίδεται ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα και αυτή εξουδετερώνεται, εφόσον δεν διαθέτει πλέον ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική της στιβάδα (Averill-Bates, 2023).

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενδογενή και εξωγενή, ανάλογα με την προέλευσή τους. Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις με την σειρά τους διακρίνονται σε ενζυμικές και μη ενζυμικές. Η διάκριση αυτή εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν (Gulcin, 2025).

1.2.1. Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν ως ένζυμα, με τα σημαντικότερα από αυτά να είναι η καταλάση (Catalase, CAT), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glytathione Reductase, GRx) (Gulcin, 2025). Τα ένζυμα αυτά δρουν όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10).



Εικόνα 11: Λειτουργία και αλληλεπίδραση ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Ohiagu et al, 2025)

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10, η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) ανάγεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) από την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Στην συνέχεια το H_2O_2 ανάγεται από την καταλάση (CAT), με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού, ενώ μπορεί να αναχθεί και να δώσει ως προϊόν νερό κατά την οξείδωση της γλουταθειόνης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Η καταλάση ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε περιπτώσεις που η συγκέντρωσή του είναι αρκετά αυξημένη, ενώ η δράση της GPx είναι πιο ειδική. Το ένζυμο δρα σε περιπτώσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης, εμφανίζοντας πιο αργή δράση συγκριτικά με την καταλάση, ενώ είναι αποδοτικότερο όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 βρίσκεται σε μεσαία επίπεδα. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GRx) ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη επαναφέροντάς την στην ανηγμένη της μορφή (Ohiagu et al, 2025, Jomova et al, 2024).

Η γλουταθειόνη είναι ένα μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό που μπορεί να βρεθεί σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη μορφή (GSSG). Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά. Όσον αφορά την δομή της, είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμικό οξύ. Στην οξειδωμένη της μορφή, σχηματίζει δισουλφιδικές γέφυρες με άλλο μόριο γλουταθειόνης μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης. Η δραστική μορφή της είναι η ανηγμένη, η οποία φυσιολογικά υπάρχει σε μεγαλύτερα επίπεδα μέσα στο κύτταρο (Averill-Bates, 2023).

1.2.2. Εξωγενή Αντιοξειδωτικά

Η συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνει αντιοξειδωτικές ενώσεις οι οποίες δεν συντίθενται από τον οργανισμό, αλλά εισέρχονται σε αυτόν μέσω της διατροφής. Τέτοιες ενώσεις είναι διάφορες βιταμίνες, όπως η βιταμίνη C και η E, οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή (Gulcin et al, 2025).

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μία υδατοδιαλυτή ένωση με αντιοξειδωτική δράση. Σε συνεργασία με την γλουταθειόνη μπορεί να ανακτά την ανηγμένη της μορφή ώστε να είναι σε θέση να εξουδετερώνει ξανά ελεύθερες ρίζες, ενώ μπορεί η ίδια να επαναφέρει την λιποδιαλυτή βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) στην ανηγμένη της λειτουργική μορφή (Gulcin et al, 2025).

Οι πολυφαινόλες έχουν φυτική προέλευση και ταξινομούνται σε ορισμένες κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή. Οι κύριες ομάδες πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, τα φαινολικά οξέα και οι λιγνάνες. Αυτή η μεγάλη οικογένεια ενώσεων εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που επάγουν φλεγμονή. Παράλληλα, μπορούν να ρυθμίζουν και την έκφραση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων (Rana et al, 2022, Veskoukis et al, 2019).

1.3. Οξειδωτικό Στρες

Αρχικά ο όρος οξειδωτικό στρες αναφερόταν στην διαταραγμένη κατάσταση της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών στον οργανισμό, με τα πρώτα να υπερισχύουν. Ο προγενέστερος αυτός ορισμός αυτός είχε δοθεί από τον Helmut Sies το 1985. Ο ίδιος βέβαια αναδιατύπωσε τον ορισμό του, δίνοντας μία πιο εμπεριστατωμένη επεξήγηση για το οξειδωτικό στρες (Ji & Yeo, 2021).

Σήμερα το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως εξής: «Οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και ρύθμιση των κυττάρων» (Sies, 2015). Αυτός ο ανανεωμένος ορισμός εστιάζει και στις ευεργετικές δράσεις των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό, όπως η κυτταρική σηματοδότηση και η άμυνα (Veskoukis et al, 2019).

Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες μπορεί να ερμηνευτεί αρχικά από την αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση ROS και RNS μέσα στα κύτταρα. Αυτή η συσσώρευση, σε συνδυασμό με μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενώσεων ή εμφάνισή τους σε μη λειτουργικές μορφές (αλλαγή αναλογίας GSH/GSSG) αποτελεί σαφή ένδειξη οξειδωτικού στρες. Οξειδωτικό στρες βέβαια παρατηρείται όταν τα επίπεδα ROS και RNS σε ένα κύτταρο είναι υπερβολικά χαμηλά. Στην προκειμένη περίπτωση δεν συμβαίνει σωστά η σηματοδότηση που σχετίζεται με ελεύθερες ρίζες (Ji & Yeo, 2021).

1.3.1. Οξειδωτικό Στρες και Ασθένειες

Οι συσσωρευμένες ελεύθερες ρίζες, εφόσον δεν εξουδετερώνονται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, αντιδρούν με τα βιομόρια του κυττάρου οξειδώνοντάς τα, όπως έχει προαναφερθεί στην υποενότητα 1.1.4. Αυτές οι αντιδράσεις έχουν καταστρεπτικές επιπτώσεις για τα κύτταρα, ενώ σε μεγαλύτερη κλίμακα επιδεινώνουν διάφορους τύπους χρόνιων ασθενειών (Phaniendra et al, 2015).

Το οξειδωτικό στρες έχει συνδυαστεί με την εμφάνιση και επιδείνωση διάφορων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson. Το κεντρικό νευρικό σύστημα, εξαιτίας της υψηλής λιπιδικής σύστασής του, αλλά και της μεγάλης O_2 που καταναλώνεται, είναι ευαίσθητο σε βλάβες από ROS. Η λιπιδική υπεροξείδωση λόγω των ROS βλάπτει τα νευρικά κύτταρα διαταράσσοντας το δυναμικό της μεμβράνης τους, με αποτέλεσμα την πρόκληση και επιδείνωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Phaniendra et al, 2015).

Επιπρόσθετα, η ύπαρξη οξειδωτικού στρες επιδεινώνει και την νόσο του καρκίνου. Λόγω της βλάβης που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA, αυξάνουν την μεταλλαξιγένεση. Περισσότερες μεταλλάξεις σημαίνει μεγαλύτερη ετερογένεια στον όγκο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την πιο δύσκολη αντιμετώπισή του αλλά και την αυξημένη ανθεκτικότητα του. Συνεπώς οι ελεύθερες ρίζες, ενώ αρχικά θεωρήθηκε πως βοηθούν στην αντιμετώπιση των όγκων, εν τέλει αυξάνοντας την ποικιλομορφία και την ετερογένειά τους τους καθιστούν πιο ισχυρούς.

Άλλες ασθένειες τις οποίες ενδέχεται να επιδεινώνει η συσσώρευση ROS είναι ο διαβήτης, ο καταρράκτης και διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις (Phaniendra et al, 2015).

1.4. Δείγματα

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας προήλθαν από την Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς. Πιο συγκεκριμένα, ήταν

13 οπωροκηπευτικά προϊόντα, τα οποία αναπτύχθηκαν από παραδοσιακούς σπόρους μέσω μεθόδων βιολογικής καλλιέργειας.

1.4.1. I. Μ. Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς

Η Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς ιδρύθηκε από τον οσιομάρτυρα Άγιο Δαμιανό τον εν Κισσάβω κοντά στο 1550 μ.Χ.. Ο Άγιος ζούσε ως ασκητής σε ορεινές περιοχές του Κισσάβου και γύρω του άρχισαν να συγκροτούνται μερικοί μοναχοί. Μετά την συγκρότηση αυτή πραγματοποιήθηκε η ίδρυση της μονής, η οποία λειτούργησε μέχρι το 1897. Εκείνη την χρονιά, διαλύθηκε από τους Οθωμανούς, και τα χρόνια που ακολούθησαν καταβλήθηκαν μερικές αποτυχημένες προσπάθειες αναστήλωσης της μονής. Τελικά το 2000 η μονή ανασυγκροτήθηκε και σήμερα αποτελεί πλέον γυναικεία μονή. Η συγκεκριμένη μονή ανήκει στην Ιερά Μητρόπολη Δημητριάδος και Αγιάς (Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής).

1.4.2. Παραδοσιακοί Σπόροι

Παραδοσιακοί είναι οι σπόροι οι οποίοι δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία και καμία γενετική τροποποίηση ή υβριδική παρέμβαση. Χάρη στην πρόοδο της επιστήμης, η πλειοψηφία των αγροτικών προϊόντων προκύπτουν από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και σπόρους που έχουν υποστεί κάποια τροποποίηση. Παρόλα αυτά, δεν είναι λίγοι οι καλλιεργητές που χρησιμοποιούν παραδοσιακούς σπόρους (Bai et al, 2024).

Η χρήση παραδοσιακών σπόρων έχει ορισμένα πλεονεκτήματα. Οι σπόροι που εμφανίζονται στους καρπούς των προϊόντων είναι σε θέση να αναπαραχθούν, κάτι που δεν συμβαίνει τόσο αποτελεσματικά σε σπόρους που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση. Έτσι προσφέρεται μία δυνατότητα «ανανέωσης» τους. Επιπλέον, οι παραδοσιακοί σπόροι εμφανίζουν υψηλή γενετική ποικιλότητα, γεγονός που καθιστά τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτούς ανθεκτικότερα και πιο προσαρμόσιμα στις τοπικές συνθήκες καλλιέργειας. Αρκετοί ισχυρίζονται πως για αυτό τον λόγο τα προϊόντα που προέρχονται από τέτοιους σπόρους είναι ανώτερα σε γεύση και θρεπτική αξία. Αξίζει να αναφερθεί και η διατήρηση και μετάδοση παραδοσιακών γνώσεων σχετικών με την γεωργία ως ένα σημαντικό πολιτιστικό πλεονέκτημα που χαρακτηρίζει την ύπαρξη παραδοσιακών σπόρων (Mudigere Sannegowda & Garkoti, 2022).

Το κυριότερο μειονέκτημα των παραδοσιακών σπόρων είναι η μειωμένη απόδοση συγκριτικά με τους συμβατικούς σπόρους. Άλλωστε, η αύξηση της απόδοσης της σοδειάς

αποτελέσει ένα από τα κυριότερα κίνητρα δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων σπόρων και για αυτό οι σπόροι αυτοί επιλέγονται σε καλλιέργειες μεγαλύτερης κλίμακας (Bai et al, 2024).

1.4.3. Βιολογική Καλλιέργεια

Τα δείγματα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες βιολογικών και όχι συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας. Η βιολογική (ή οργανική) καλλιέργεια αποτελεί τρόπο καλλιέργειας που βασίζεται στην φυσική ισορροπία και την διατήρηση της βιοποικιλότητας του εδάφους, ενώ αποφεύγει την χρήση χημικών συνθετικών ουσιών. Κάτι τέτοιο αποδεικνύει πως οι βιολογικές καλλιέργειες εστιάζουν στην προστασία του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας (De la Cruz et al, 2023, Azarbad, 2022).

Σε μία βιολογική καλλιέργεια παρατηρούνται διάφορες τεχνικές. Μία από αυτές είναι η αμειψισπορά (crop rotation). Η αμειψισπορά είναι η διαδοχική καλλιέργεια διαφορετικών φυτών στο ίδιο χωράφι. Ανάμεσα σε δύο διαδοχικές καλλιέργειες ενδέχεται να παρεμβάλλεται και μία περίοδος αγρανάπαυσης. Σκοπός αυτής της τεχνικής είναι ο εμπλουτισμός του εδάφους με θρεπτικά συστατικά. Αντίστοιχα η καλλιέργεια ενός μόνο φυτού ονομάζεται μονοκαλλιέργεια (De la Cruz et al, 2023).

Εκτός από την αμειψισπορά, μπορεί να παρατηρηθεί συγκαλλιέργεια δύο ή περισσότερων φυτικών ειδών ταυτόχρονα στο ίδιο χωράφι. Αυτή η τεχνική αποσκοπεί στην αναβάθμιση της βιοποικιλότητας του εδάφους, ενώ αυξάνεται και η ανθεκτικότητα σε παθογόνα (De la Cruz et al, 2023).

Εφόσον αποφεύγεται η χρήση χημικών συνθετικών ενώσεων, για την βελτίωση των επιπέδων περιεκτικότητας θρεπτικών του εδάφους πραγματοποιούνται κομποστοποιήσεις (composting). Με την διαδικασία αυτή, διάφορα οργανικά φυτικά υπολείμματα, όπως φύλλα ή υπολείμματα καλλιεργειών μετατρέπονται σε ένα βιολογικό λίπασμα το οποίο εμπλουτίζει το έδαφος με οργανική ύλη αλλά και ωφέλιμους μικροοργανισμούς (De la Cruz et al, 2023).

Για την πρόληψη των ζιζανίων μπορούν να πραγματοποιηθούν καλλιέργειας κάλυψης ανάμεσα στα καλλιεργούμενα προϊόντα. Καλλιέργειες φυτών όπως το τριφύλλι εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο ενώ παράλληλα καταλαμβάνουν τον δυνητικά διαθέσιμο χώρο ανάπτυξης για ζιζάνια. Σε περίπτωση ανάπτυξης ζιζανίων, αυτά απομακρύνονται χειρονακτικά ή αντιμετωπίζονται με σκευάσματα που περιέχουν ουσίες φυσικής προέλευσης (π.χ. αιθέρια έλαια, οξικό οξύ), εφόσον απαγορεύεται η χρήση συνθετικών χημικών ζιζανιοκτόνων στην βιολογική καλλιέργεια (Azarbad, 2022).

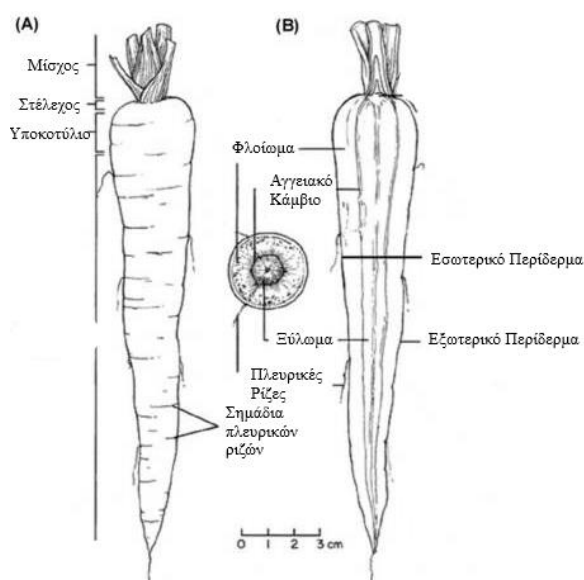
Οι συμβατικές καλλιέργειες εμφανίζονται πιο αποδοτικές από άποψη σοδειάς, ωστόσο το κόστος τους για τους αγρότες είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με μία βιολογική καλλιέργεια. Επιπρόσθετα τα προϊόντα βιολογικής καλλιέργειας κοστολογούνται με υψηλότερες τιμές έναντι προϊόντων προερχόμενων από συμβατική καλλιέργεια (Mondelaers et al, 2009).

1.4.4. Οπωροκηπευτικά

Στην συγκεκριμένη υποενότητα ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή των οπωροκηπευτικών που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Καρότο (*Daucus carota*)

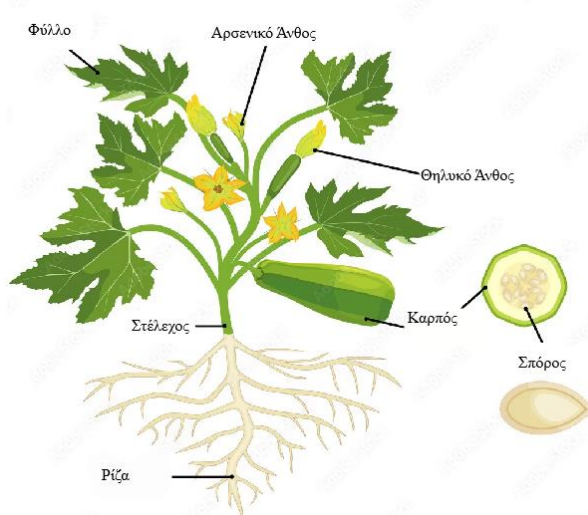
Το καρότο (*Daucus carota*) είναι ένα ριζώδες λαχανικό με υψηλή θρεπτική αξία που ανήκει στην οικογένεια των Apiaceae. Έχει μακρόστενο κυλινδρικό ή κωνικό σχήμα και καλλιεργείται σε συνθήκες δροσερού και εύκρατου κλίματος, ενώ απαιτεί σταθερή υγρασία. Το χρώμα της ρίζας του (η οποία αποτελεί και το βρώσιμο τμήμα του φυτού) είναι συνήθως πορτοκαλί, ωστόσο υπάρχουν και μωβ, κόκκινα, κίτρινα και λευκά καρότα. Το χρώμα ενός καρότου σχετίζεται με το περιεχόμενό του σε βιοδραστικές ενώσεις. Ανάμεσα στις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στα καρότα είναι πολυφαινόλες, καροτενοειδή, ανθοκυανίνες, βιταμίνες και μέταλλα. Πολλές από τις ενώσεις που περιέχονται στο καρότο εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, όπως οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή και η βιταμίνη C (Ahmad et al, 2019).



Εικόνα 12: Α) Η ανατομία της ρίζας του *Daucus carota* Β) Εγκάρσια και κάθετη τομή με το εσωτερικό της ρίζας του *Daucus carota* (Ahmad et al, 2019)

Κολοκυθάκι (*Cucurbita pepo*)

Τα κολοκυθάκια (*Cucurbita pepo*) είναι καρποί φυτών που ανήκουν στην οικογένεια Cucurbitaceae. Ο καρπός αυτός έχει κυλινδρικό σχήμα, ενώ τα κολοκυθάκια καλλιεργούνται ευρέως στην Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Αυτό δικαιολογείται και από το γεγονός πως το συγκεκριμένο λαχανικό ευδοκιμεί σε θερμές περιοχές με ιδανικές θερμοκρασίες. Συνήθως έχουν πράσινη απόχρωση (ανοικτό ή σκούρο πράσινο, ανάλογα με την ποικιλία) και μεγάλο μέρος τους αποτελείται από νερό. Ταυτόχρονα, είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, βιταμίνες και φαινολικές ενώσεις, ενώ περιέχουν και καροτενοειδή. Το κολοκυθάκι εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, κυρίως χάρη στις φαινολικές ενώσεις (κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή) που περιέχει (Savvas et al, 2024).

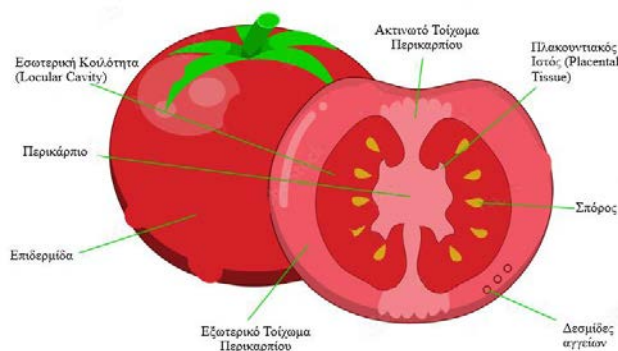


Εικόνα 13: Ανατομία του φυτού *Cucurbita pepo* και εγκάρσια τομή του καρπού του (Kazakova, M.)

Τομάτα (*Solanum lycopersicum*)

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*, αναφέρεται και ως *Lycopersicon esculentum*) αποτελεί ένα οπωροκηπευτικό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και ευδοκιμεί σε αυξημένες θερμοκρασίες και ηλιόλουστα κλίματα, ενώ απαιτεί και τακτική και ομοιόμορφη άρδευση. Οι καρποί του συγκεκριμένου φυτού ποικίλλουν σε μέγεθος σχήμα και χρώμα, ανάλογα με την ποικιλία. Το χρώμα του καρπού συνηθέστερα είναι κόκκινο, ενώ μπορεί να είναι πορτοκαλί ή και κίτρινο. Η τομάτα περιέχει πολλές αντιοξειδωτικές από αυτές, με μία

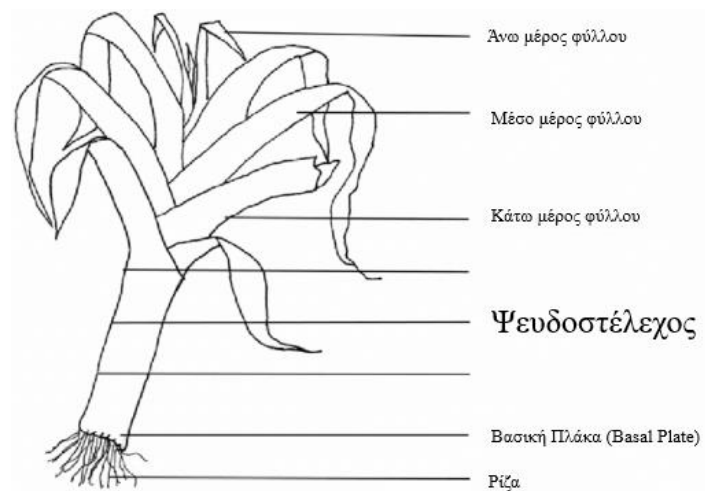
από τις πιο σημαντικές να είναι το λυκοπένιο. Το συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό είναι ένα καροτενοειδές στο οποίο οφείλει η ντομάτα το κόκκινο χρώμα της. Επιπλέον περιέχει βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη C), ενώ αποτελεί και πηγή φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών, ουσίες οι οποίες συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Bianchi et al, 2023, Sahlin et al, 2004).



Εικόνα 14: Ανατομία του καρπού του φυτού *Solanum lycopersicum*

Πράσο (*Allium ampeloprasum*)

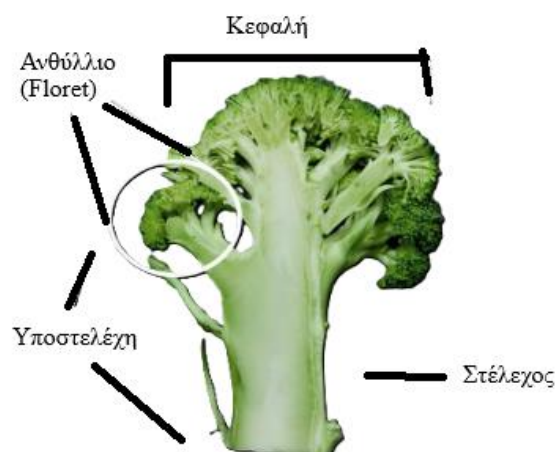
Το πράσο (*Allium ampeloprasum*) είναι ένα φυτό το οποίο ευδοκίμει σε εύκρατο κλίμα και είναι πιο ανθεκτικό στο ψύχος συγκριτικά με άλλα καλλιεργούμενα φυτά. Απαιτεί τακτική άρδευση και διαθέτει ένα μακρύ ψευδοστέλεχος σε σχήμα κυλίνδρου, το οποίο καταλήγει σε μορφολογίες που μοιάζουν με φύλλα. Το φυτό αυτό ανήκει στην οικογένεια Amaryllidaceae. Είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες και βιταμίνες, ενώ περιέχει και φλαβονοειδή αλλά και θειούχες ενώσεις οι οποίες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Οι τρόποι αποθήκευσης και επεξεργασίας του πράσου μπορούν να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική ικανότητά του (Shahrajabian et al, 2023).



Εικόνα 15: Ανατομία του φυτού *Allium ampeloprasum* (Smith et al, 2006)

Μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *italica*)

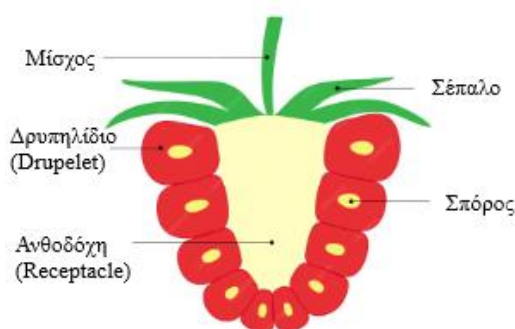
Το μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *italica*) είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Brassicaceae και καλλιεργείται σε δροσερά κλίματα, όντας ευαίσθητο σε υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία. Για αυτό τον λόγο απαιτεί ιδιαίτερα τακτική άρδευση. Το φυτό αυτό διαθέτει μεγάλα άνθη που ονομάζονται κεφαλές και βρίσκονται πάνω από ένα παχύ στέλεχος. Είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, μέταλλα, βιταμίνες (ιδιαίτερα Α, C και Κ), ενώ περιέχουν και αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή. Το μπρόκολο επίσης εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Syed et al, 2023).



Εικόνα 16: Η ανατομία του φυτού *Brassica oleracea* var. *italica* (Lyon E.)

Σμέουρο (*Rubus ideaus*)

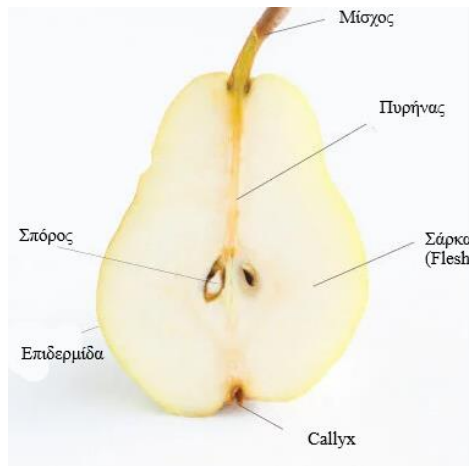
Το σμέουρο (*Rubus ideaus*) είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Rosaceae και ευδοκίμει σε εύκρατα κλίματα. Χρειάζεται συχνή άρδευση, χωρίς ωστόσο να συσσωρεύεται το νερό γύρω από τις ρίζες του. Το φυτό αυτό είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος που αναπτύσσεται μέχρι 1,5 έως 2 μέτρα ύψος. Οι καρποί του φυτού αυτού είναι μικροί και κόκκινοι, ενώ είναι γνωστοί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά, όπως οι ελλαγιταννίνες, οι ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα, ενώ αποτελεί και πηγή βιταμινών (Plasencia et al, 2025).



Εικόνα 17: Ανατομία καρπού του φυτού *Rubus ideaus*

Αχλάδι (*Pyrus comunis*)

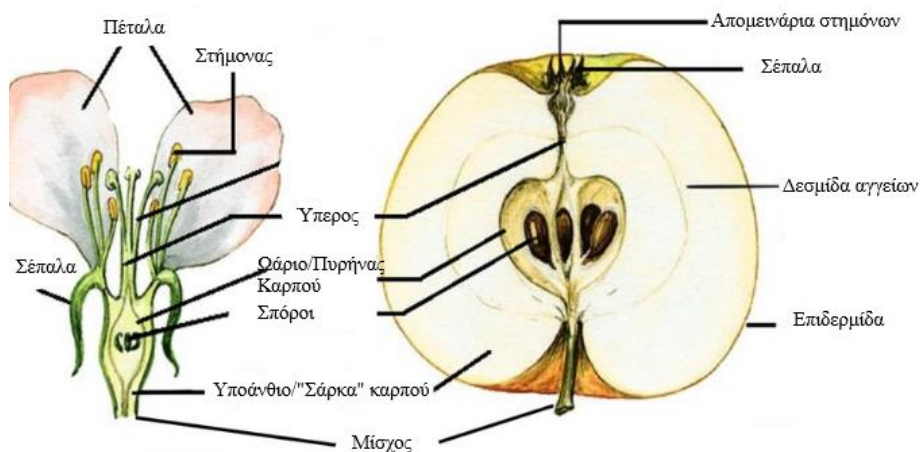
Το αχλάδι (*Pyrus comunis*) είναι ένα φυλλοβόλο δέντρο που ανήκει στην οικογένεια των Rosaceae. Το φυτό αυτό επικρατεί σε εύκρατα κλίματα, ενώ χρειάζεται μία περίοδο ψύχους για να προκύψει άνθιση και εμφάνιση καρπών. Απαιτείται τακτική άρδευση, χωρίς να συνιστάται η υπερβολική υγρασία. Ο καρπός του έχει συνήθως πράσινο χρώμα και είναι πλούσιος σε φυτικές ίνες, βιταμίνες και μέταλλα. Παράλληλα, περιέχει αρκετές αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, κατεχίνες), τα τριτερπένια και τα καροτενοειδή. Η πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται στον φλοιό του καρπού (Adhikary & Mondal, 2022).



Εικόνα 18: Ανατομία του καρπού του φυτού *Pyrus communis*

Μήλο (*Malus domestica*)

Η μηλιά (*Malus domestica*) είναι ένα φυλλοβόλο δέντρο που ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Ευδοκίμει σε περιοχές με ψυχρούς χειμώνες, ενώ χρειάζεται περίοδο ψύχους για να δημιουργήσει άνθη και καρπούς. Ο καρπός του φυτού αυτού, το μήλο, εμφανίζεται σε διάφορες αποχρώσεις ανάλογα με την ποικιλία. Οι καρποί αυτοί είναι πλούσιες σε φυτικές ίνες, βιταμίνες (ιδιαίτερα βιταμίνη C) και μέταλλα. Εκτός αυτών, τα μήλα περιέχουν και φλαβονοειδή, τα οποία μαζί με την βιταμίνη C τους προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ η υψηλή σύστασή τους σε πηκτίνη βοηθά στην ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης και σακχάρου στο αίμα (Asma et al, 2023).



Εικόνα 19: Συγκριτική ανατομία του άνθους και του καρπού του φυτού *Malus domestica* (Bürgy et al, 2021)

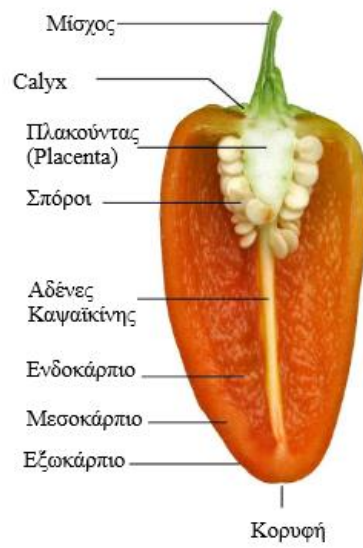
Πιπεριά (*Capsicum annuum*)

Πέντε από τα οπωροκηπευτικά που μελετήθηκαν αποτελούσαν διαφορετικές ποικιλίες πιπεριάς. Όλες αυτές οι πιπεριές ανήκουν στο ίδιο είδος (*Capsicum annuum*). Το φυτό της πιπεριάς ευδοκίμει σε θερμά κλίματα με άφθονο ηλιακό φως και ο καρπός της μπορεί να έχει κωνικό ή στρογγυλό σχήμα. Το χρώμα του καρπού ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία. Στο εσωτερικό τους οι καρποί περιέχουν κοιλότητες, μέσα στις οποίες είναι αποθηκευμένοι οι σπόροι. Οι πιπεριές περιέχουν βιταμίνη C, καροτενοειδή, πολυφαινόλες και καψαϊκίνοειδή. Αυτές αποτελούν ουσίες που προσδίδουν στις πιπεριές υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Όσο πιο ώριμος (συνήθως πορτοκαλί και κόκκινες αποχρώσεις) είναι ο καρπός της πιπεριάς, τόσο πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει (Palma et al, 2020).

Οι 3 από τις πιπεριές που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούσαν πιπεριές Φλωρίνης, με τις δύο να έχουν συλλεχθεί σε διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης (κόκκινος καρπός πιο ώριμη εκδοχή από τον πράσινο), ενώ η μικρή κόκκινη πιπεριά Φλωρίνης αποτελεί μία συγκεκριμένη υποποικιλία. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε και μία πράσινη “bell pepper” (αναφέρεται ως πράσινη πιπεριά). Η συγκεκριμένη πιπεριά ανήκει στην τοπική ποικιλία Καρατζόβας. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και μία μακριά πράσινη πιπεριά (αποκαλείται συνήθως «κέρατο» ή κατσίκα). Η πιπεριά αυτή ανήκει στην ποικιλία Μακεδονική μυτερή (Mougiou et al, 2021, Papathanasiou et al, 2021).

Συνοπτικά οι 5 πιπεριές των οποίων διερευνήθηκε η βιολογική δράση είναι οι εξής:

- Πιπεριά Φλωρίνης Πράσινη
- Πιπεριά Φλωρίνης Κόκκινη
- Μικρή Πιπεριά Φλωρίνης Κόκκινη
- Πιπεριά Πράσινη (ποικιλίας Καρατζόβα)
- Πιπεριά Πράσινη Μακριά (Ποικιλία Κέρατο/Μακεδονική μυτερή)



Εικόνα 20: Ανατομία του καρπού μίας ποικιλίας του φυτού *Capsicum annuum*

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής αντιοξειδωτικής και αναγωγικής δράσης δειγμάτων φρούτων και λαχανικών που προέρχονται από παραδοσιακούς σπόρους. Πρόκειται για καρπούς που έχουν καλλιεργηθεί με τα πρότυπα βιολογικής καλλιέργειας.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Γενικά

Στην συγκεκριμένη ενότητα περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, μαζί με τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν. Οι μέθοδοι αυτοί πραγματοποιήθηκαν με στόχο την εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού προφίλ δειγμάτων προϊόντων προερχόμενων από βιολογική καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, οι δείκτες οξειδοαναγωγικής ικανότητας που εκτιμήθηκαν είναι οι εξής:

- i. Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power)
- ii. Αναγωγική Ικανότητα έναντι του Χαλκού (CUPRAC Assay)
- iii. Ικανότητα Εξουδετέρωσης της Ρίζας Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)
- iv. Συνολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο (Προσδιορισμός μέσω του Αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu)

3.2. Επεξεργασία Δειγμάτων και Συνθήκες Αποθήκευσης

Όπως προαναφέρθηκε, τα δείγματα που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία προέρχονται από την Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς. Αποτελούν οπωροκηπευτικά που αναπτύχθηκαν μέσω βιολογικής καλλιέργειας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε τεμαχισμός μέσω μαχαιριού και ομογενοποίηση των δειγμάτων με την χρήση πολυκόπτη. Στην συνέχεια τα ομογενοποιημένα καθενός από τα δεκατρία δείγματα αποθηκεύονταν σε σωλήνες τύπου falcon και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -20°C . Αξίζει να σημειωθεί πως στα ομογενοποιημένα περιέχονταν τόσο τμήματα από τον φλοιό, όσο και από την σάρκα και τους σπόρους του κάθε οπωροκηπευτικού.

Κάθε φορά που κάποιο από τα δείγματα επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για ένα πείραμα, μία ακόμη επεξεργασία ήταν απαραίτητη ώστε να ομογενοποιηθεί περαιτέρω. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά το κάθε δείγμα θα έπρεπε να αποψυχθεί, εφόσον ήταν αποθηκευμένο σε θερμοκρασία -20°C . Στην συνέχεια, πραγματοποιούνταν ζύγιση του δείγματος και ομογενοποίηση με την χρήση ενός ηλεκτρικού αναμεικτήρα χειρός. Για την συγκεκριμένη διαδικασία τοποθετούνταν απιονισμένο νερό και η ζυγισμένη ποσότητα του δείγματος μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα σε αναλογία 1:1. Ακολούθως, μέσω του ηλεκτρικού αναμεικτήρα, πραγματοποιούνταν η ομογενοποίηση. Έπειτα από αυτό, τα δείγματα ήταν έτοιμα για την διεξαγωγή της κάθε πειραματικής διαδικασίας.

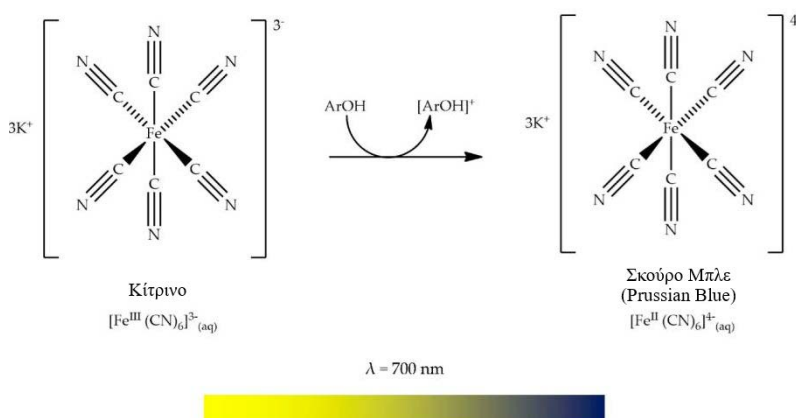
3.3. Δοκιμασία Εκτίμησης Αναγωγικής Ισχύος (Reducing Power Assay)

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η αναγωγική ισχύς είναι συσχετισμένη με την αντιοξειδωτική ικανότητα μίας ουσίας. Το γεγονός αυτό καθιστά την εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος ως έναν αξιόπιστο δείκτη της οξειδοαναγωγικής ικανότητας. Ενώσεις που διαθέτουν αναγωγική ισχύ αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και είναι ικανές να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα προϊόντα αντιδράσεων υπεροξειδίου των λιπιδίων. Με αυτό τον τρόπο, δρουν ως πρωτογενείς ή δευτερογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να υποδείξει την αναγωγική ικανότητα μίας ουσίας από την αντίδρασή της με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}), ο οποίος όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο, η αντίδραση έχει ως προϊόν ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 700 nm. Το αρχικό χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος είναι κίτρινο και στην πορεία της δοκιμασίας αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε. Η τελική απόχρωση σχετίζεται με την αναγωγική ισχύ της ουσίας που υφίσταται την συγκεκριμένη δοκιμασία. Όσο πιο κοντά στο μπλε βρίσκεται η απόχρωση, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση της εξεταζόμενης ουσίας στα 700 nm και, συνεπώς, τόσο μεγαλύτερη είναι η αναγωγική της ισχύς. Στην δοκιμασία αυτή ο τρισθενής σίδηρος βρίσκεται υπό την μορφή σιδηροκυανιούχου σιδήρου (Bibi Sadeer et al, 2020).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης που περιεγράφηκε, καθώς και η αλλαγή της απόχρωσης απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 21: Ο μηχανισμός αντίδρασης και η αλλαγή χρώματος στην δοκιμασία εκτίμησης αναγωγικής ισχύος (Bibi Sadeer et al, 2020)

Πειραματική Διαδικασία

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, πέρα από την επεξεργασία που συνέβαινε στα δείγματα, πραγματοποιούνταν περαιτέρω αραιώσεις στα εκχυλίσματα των οπωροκηπευτικών. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν συγκεκριμένες αραιώσεις με αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός εύρους 5 συγκεντρώσεων. Οι τιμές συγκέντρωσης για τα δείγματα κυμαίνονταν από 0,78125 έως 200 mg δείγματος ανά ml dH₂O (mg/ml). Το εύρος αυτό αυξάνει την ακρίβεια του εντοπισμού της τιμής AU_{0.5}. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του δείγματος που απαιτείται έτσι ώστε η απορρόφηση να έχει τιμή ίση με 0.5.

Οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν με διάλυμα phosphate buffer (0.2 M, pH=6.6) σε αναλογία 1:1 κάθε φορά. Μετά την ολοκλήρωση των αραιώσεων, σε σωλήνες τύπου eppendorf προστίθενται τα παρακάτω συστατικά, με την σειρά από πάνω προς τα κάτω.

	Τυφλό	Control	Δείγμα + (2 φορές)	Δείγμα -
Δείγμα	-	-	50 μl	50 μl
Phosphate Buffer (0.2 M, pH=6.6)	500 μl	250 μl	200 μl	450 μl
Σιδηροκυανιούχο Κάλιο (1% w/v dH₂O)	-	250 μl	250 μl	-
Επώαση στους 50°C για 20 λεπτά				
TCA (10% w/v dH₂O)	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 3 λεπτά και Μεταφορά του υπερκλειμένου σε άλλους σωλήνες eppendorf				

dH₂O	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Χλωριούχος Σίδηρος (0.1% w/v dH₂O)	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες προσθήκης για την εκτέλεση του πειράματος.

Μετά την προσθήκη και των τελευταίων αντιδραστηρίων, ακολουθεί δεκάλεπτη επώαση στο σκοτάδι και έπειτα φωτομέτρηση στα 700 nm. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 επαναλήψεις της συγκεκριμένης δοκιμασίας.

Υπολογισμοί

Για κάθε συγκέντρωση δείγματος (αραίωση) που μελετάται πραγματοποιούνται κάθε φορά 2 επαναλήψεις. Αρχικά, υπολογίζεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων που προκύπτουν από αυτές τις αντιδράσεις. Στην συνέχεια, από τον αριθμό αυτό αφαιρείται η απορρόφηση του αρνητικού control (δείγμα -) και από τον αριθμό που προκύπτει αφαιρείται ο μέσος όρος της απορρόφησης των control της δοκιμασίας. Με λίγα λόγια:

$$1. \text{ mean ABS sample} - \text{ABS negative control} = (\text{I})$$

$$2. (\text{I}) - \text{mean ABS control} = (\text{II})$$

Από τους αριθμούς (II) που προκύπτουν για κάθε συγκέντρωση δημιουργείται μία πρότυπη καμπύλη. Στον άξονα x'x περιέχονται οι διάφορες τελικές συγκεντρώσεις, οι οποίες υπολογίζονται μέσω του νόμου της αραίωσης ($C_{\text{Αρχική}} \cdot V_{\text{Αρχικό}} = C_{\text{Τελική}} \cdot V_{\text{Τελικό}}$, όπου $C_{\text{Αρχική}}$ η αρχική συγκέντρωση που προκύπτει από κάθε αραίωση, $V_{\text{Αρχικό}}$ ο όγκος δείγματος που προστίθεται για την αντίδραση και $V_{\text{Τελικό}}$ ο τελικός όγκος της αντίδρασης).

Στον άξονα y'y τοποθετούνται οι αριθμοί (II) που προκύπτουν από τους υπολογισμούς που προαναφέρθηκαν. Τελικά, από την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η τιμή $AU_{0.5}$ για κάθε δείγμα. Η εξίσωση αυτή είναι της μορφής $y = ax+b$ και η τιμή $AU_{0.5}$ υπολογίζεται ως εξής:

$$AU_{0.5} = (0.5-b)/a$$

Στο τέλος υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών $AU_{0.5}$ που έχουν προκύψει από τις 3 επαναλήψεις της δοκιμασίας για κάθε δείγμα και έτσι προκύπτει η τελική τιμή $AU_{0.5}$.

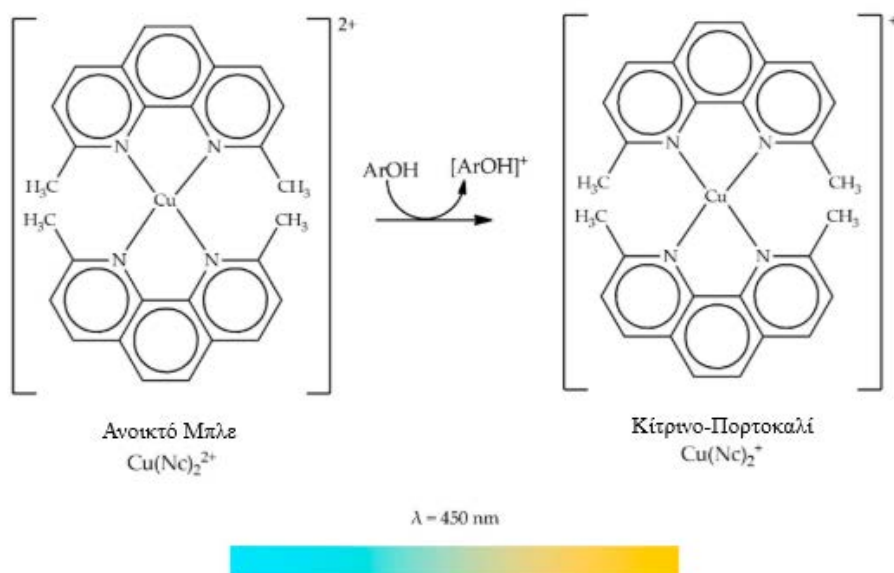
Για την συγκεκριμένη δοκιμασία, οι αποδεκτές τιμές απορρόφησης του τυφλού διαλύματος κυμαίνονται στο διάστημα 0.03 ± 0.01 . Αντίστοιχα, οι αποδεκτές τιμές απορρόφησης για τα control της μεθόδου ισούνται με 0.05 ± 0.02 .

3.4. Δοκιμασία Προσδιορισμού Αναγωγικής Ικανότητας έναντι του Χαλκού (CUPRAC Assay)

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η δοκιμασία προσδιορισμού αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού (Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC) εξετάζει την δυνατότητα αναγωγής του δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}) σε μονοσθενή (Cu^{1+}) από το δείγμα, παρουσία ενός χηλικού παράγοντα. Μερικοί χηλικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τον συγκεκριμένο σκοπό είναι η νεοκουπροΐνη (neocuproine) και η μπαθοκουπροΐνη (bathocuproine). Στις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε νεοκουπροΐνη ως χηλικός παράγοντας. Η δοκιμασία αυτή διεξάγεται τόσο για ορό ανθρώπου, όσο και για εκχυλίσματα φυτών και τρόφιμα. Παρουσία ενός αντιοξειδωτικού, το αντιδραστήριο CUPRAC ($\text{CuCl}_2 + \text{Nc} + \text{NH}_4\text{Ac}$) ανάγεται σε ένα προϊόν με κίτρινη προς πορτοκαλί απόχρωση. Η απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης μετράται στα 450 nm. Όσο πιο πορτοκαλί-κίτρινη είναι η απόχρωση του τελικού προϊόντος, τόσο πιο ισχυρή θεωρείται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος (Bibi Sadeer et al, 2020).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς και η αλλαγή της απόχρωσης απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 22: Ο μηχανισμός αντίδρασης και η αλλαγή χρώματος στην δοκιμασία προσδιορισμού αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού (Bibi Sadeer et al, 2020)

Πειραματική Διαδικασία

Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες υποενότητες, τα δείγματα πριν την έναρξη κάθε πειράματος έπρεπε να υποστούν μία επεξεργασία και μερικές αραιώσεις. Αντίστοιχα και για αυτή την μέθοδο, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις. Οι αραιώσεις έγιναν με οξικό αμμώνιο (NH_4Ac), το οποίο λειτουργεί ως διάλυμα Buffer για την συγκεκριμένη δοκιμασία σε αναλογία 1:1. Με την δημιουργία των αραιώσεων προκύπτει ένα εύρος συγκεντρώσεων το οποίο καθιστά τον υπολογισμό της τιμής $\text{AU}_{0.5}$ ακριβέστερο. Οι τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων κυμαίνονται από 0.3811 έως 195.122 mg/ml.

Αφού παρασκευαστούν οι αραιώσεις, σε σωλήνες τύπου eppendorf τοποθετούνται τα αντιδραστήρια που περιέχονται στον παρακάτω πίνακα, με την σειρά από πάνω προς τα κάτω.

	Τυφλό	Control	Δείγμα +	Δείγμα -
Χλωριούχος Χαλκός (II) (10^{-2}M)	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Νεοκουπροΐνη ($7.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$)	-	250 μl	250 μl	-
Οξικό Αμμώνιο ($\text{pH} = 7$)	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Δείγμα	-	-	50 μl	50 μl
dH₂O	525 μl	275 μl	225 μl	475 μl
Ανάδευση με Vortex, φυγοκέντρωση για 3 λεπτά σε 3.000 rpm και επώαση 30 λεπτών σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου				

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες προσθήκης για την εκτέλεση του πειράματος.

Μετά το πέρας της τριαντάλεπτης επώασης, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 450 nm.

Υπολογισμοί

Όπως και στην μέθοδο εκτίμησης αναγωγικής ισχύος, για κάθε αραίωση που προκύπτει πραγματοποιούνται κάθε φορά 2 επαναλήψεις. Αρχικά υπολογίζεται ο μέσος όρος της απορρόφησης αυτών των επαναλήψεων και έπειτα από την τιμή που προκύπτει αφαιρείται η απορρόφηση του αρνητικού control (δείγμα -). Ακολούθως, αφαιρείται ο μέσος όρος των απορροφήσεων των control της μεθόδου και από τις τιμές που προκύπτουν, καθώς και από τις τελικές συγκεντρώσεις για κάθε αραίωση που υπολογίζονται από τον νόμο της αραίωσης κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη. Δηλαδή, όπως και προηγουμένως:

$$1. \text{ mean ABS sample} - \text{ABS negative control} = (\text{I})$$

$$2. (\text{I}) - \text{mean ABS control} = (\text{II})$$

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($y = ax+b$) υπολογίζεται η τιμή $AU_{0.5}$ ως εξής:

$$AU_{0.5} = (0.5-b)/a$$

Ο μέσος όρος των τιμών $AU_{0.5}$ για κάθε δείγμα όπως αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα υπολογίζεται και έτσι προκύπτει η τελική τιμή $AU_{0.5}$.

3.5. Δοκιμασία Εκτίμησης Ικανότητας Εξουδετέρωσης της Ρίζας Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

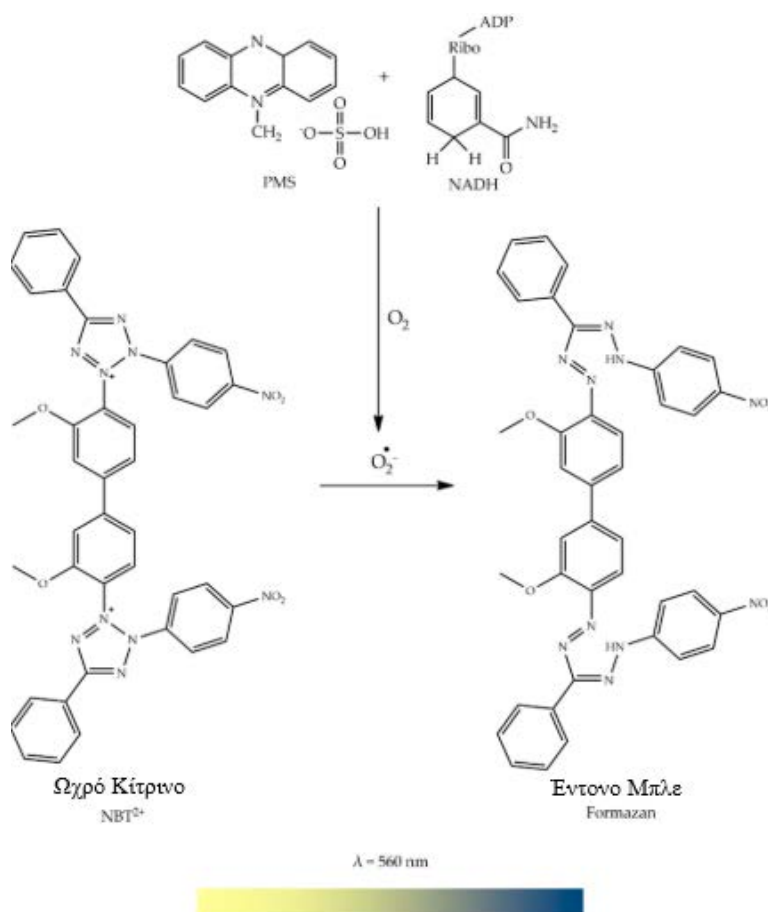
Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή ROS και είναι πρόδρομος για την παραγωγή πολλών διαφορετικών ελεύθερων ριζών. Μέσω της αντίδρασής της με μακρομόρια προκαλεί, μεταξύ άλλων, βλάβες στις λιπιδικές μεμβράνες, απενεργοποίηση ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών και αποικοδόμηση του DNA. Το αντιοξειδωτικό ένζυμο που εξουδετερώνει την συγκεκριμένη ελεύθερη ρίζα είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), μετατρέποντάς την σε H_2O_2 . (Phaniendra et al, 2015)

Ένας τρόπος παραγωγής των συγκεκριμένων ριζών είναι μέσω του μη ενζυμικού συστήματος που περιλαμβάνει την μεθοθειική φαιναζίνη (phenazine methosulphate, PMS), το

νικοτιναμίδιο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADH) και το nitroblue tetrazolium (NBT). Πιο συγκεκριμένα το NADH οξειδώνεται από το PMS, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό των ριζών σουπεροξειδίου. Το επίπεδο των ριζών μπορεί να προσεγγιστεί από την απόχρωση του διαλύματος, καθώς οι ρίζες μειώνουν τα επίπεδα NBT^{2+} , μία ουσία με ωχρό κίτρινο χρώμα, και το μετατρέπουν σε φορμαζάνη η οποία έχει έντονο μπλε χρώμα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας από τα εξεταζόμενα δείγματα φαίνεται από την αναστολή του σχηματισμού της μπλε ουσίας. Το μπλε χρώμα μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή της απορρόφησης, τόσο πιο ικανό είναι το δείγμα να εξουδετερώνει την συγκεκριμένη ρίζα (Bibi Sadeer et al, 2020).

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ο μηχανισμός των αντιδράσεων που αναφέρθηκαν, καθώς και η αλλαγή στην απόχρωση.



Εικόνα 23: Ο μηχανισμός αντίδρασης και η αλλαγή χρώματος στην δοκιμασία εκτίμησης ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου (Bibi Sadeer et al, 2020)

Πειραματική Διαδικασία

Όπως και στις προηγούμενες 2 δοκιμασίες για τις οποίες έγινε περιγραφή παραπάνω, αντίστοιχα και για την συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις. Οι αραιώσεις αυτές έγιναν με dH₂O σε αναλογία 1:1 με το εκχύλισμα του δείγματος. Στην προκειμένη περίπτωση, η δημιουργία αραιώσεων μας δίνει ένα μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων έτσι ώστε να υπολογιστεί η τιμή IC₅₀ με μεγαλύτερη ακρίβεια. Ως IC₅₀ ορίζεται «η συγκέντρωση μίας ουσίας που απαιτείται για να αναστείλει μία βιολογική ή βιολογική λειτουργία κατά το 50%» (Caldwell et al, 2012). Στην μέθοδο αυτή η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του δείγματος που απαιτείται έτσι ώστε η ρίζα του σουπεροξειδίου να εξουδετερωθεί κατά 50% της αρχικής της ποσότητας.

Μετά την ολοκλήρωση των αραιώσεων, ακολουθεί η προσθήκη των αντιδραστηρίων σε σωλήνες τύπου Eppendorf. Το εύρος συγκεντρώσεων που προκύπτει από τις αραιώσεις κυμαίνεται από 0.372024 έως 23.80952 mg/ml δείγματος. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται με την σειρά, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, από πάνω ως κάτω.

	Τυφλό	Control	Δείγμα +	Δείγμα -
Δείγμα	-	-	50 μM	50 μM
dH ₂ O	-	50 μM	-	-
Tris-HCl Buffer (16 mM, pH = 8)	800 μM	625 μM	625 μM	750 μM
NBT (300 μM)	125 μM	125 μM	125 μM	125 μM
NADH (468 μM)	125 μM	125 μM	125 μM	125 μM
PMS (60 μM)	-	125 μM	125 μM	-

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες προσθήκης για την εκτέλεση του πειράματος.

Αφού προστεθούν τα αντιδραστήρια, ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση 5 λεπτών στο σκοτάδι. Μετά από αυτό μετريέται η απορρόφηση στα 560 nm για κάθε συγκέντρωση.

Υπολογισμοί

Αρχικά, υπολογίζεται ο μέσος όρος απορρόφησης για καθεμιά από τις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιείται για κάθε αραιώση. Έπειτα αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του αρνητικού control (δείγμα -). Στην συνέχεια ακολουθούν κάποιοι υπολογισμοί ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό% εξουδετέρωσης της ρίζας για κάθε αραιώση. Πιο αναλυτικά:

1. mean ABS sample – ABS negative control = (I)
2. %Εξουδετέρωσης Ρίζας = [mean ABS control – (I)]/mean ABS control *100%

Από τα ποσοστά εξουδετέρωσης που προκύπτουν και τις αντίστοιχες τελικές συγκεντρώσεις που υπολογίζονται από τον νόμο της αραιώσης, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη. Η καμπύλη αυτή έχει μία εξίσωση της μορφής $y = ax+b$. Η τιμή IC₅₀ υπολογίζεται ως εξής:

$$IC_{50} = (50-b)/a$$

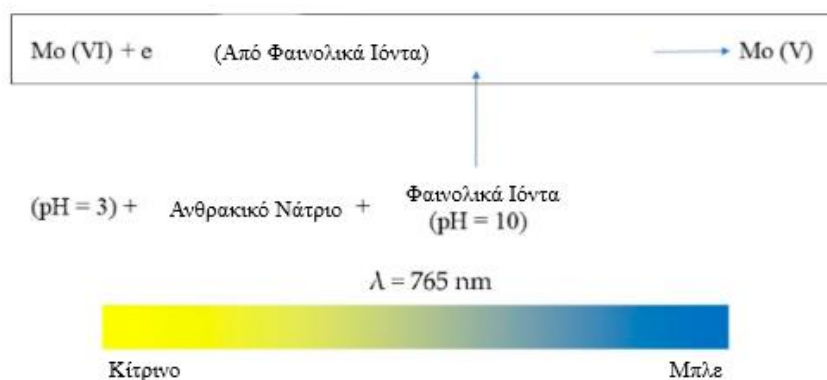
Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών IC₅₀ που προκύπτουν από 3 ανεξάρτητα πειράματα για κάθε επανάληψη και με αυτό τον τρόπο προκύπτει η τελική τιμή IC₅₀.

3.6. Προσδιορισμός του Συνολικού Πολυφαινολικού Περιεχομένου Μέσω του Αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο ενός δείγματος. Μάλιστα αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Οι ενώσεις που περιέχονται σε οπωροκηπευτικά και παίζουν μεγάλο ρόλο στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι οι φαινολικές ενώσεις. Ο προσδιορισμός τους αυτός επιτυγχάνεται μέσω μίας χρωματογραφικής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, στην οποία συμμετέχει το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων τα οποία προκύπτουν από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Κατά την αντίδραση τα οξέα αυτά ανάγονται, με τα φαινολικά ιόντα να οξειδώνονται. Το τελικό προϊόν είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W). Το σύμπλεγμα αυτό έχει μπλε χρώμα και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm. Στην αντίδραση απαιτείται και η προσθήκη ενός κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) για την σταθερή παρουσία των φαινολικών ιόντων και την διασφάλιση της σταθερότητας του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu αλλά και του τελικού προϊόντος (Bibi Sadeer et al, 2020).

Η αντίδραση που αναφέρθηκε και η αλλαγή του χρώματος περιγράφονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 24: Ο μηχανισμός αντίδρασης και η αλλαγή χρώματος στον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Bibi Sadeer et al, 2020)

Πειραματική Διαδικασία

Μετά την ομογενοποίηση του κάθε δείγματος, σε σωλήνες erpendorf προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, με την σειρά που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα από πάνω προς τα κάτω.

	Τυφλό	Δείγμα +	Δείγμα -
dH₂O	1020 μl	1000 μl	1100 μl
Folin-Ciocalteu	100 μl	100 μl	-
Δείγμα	-	20 μl	20 μl
Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι			
Ανθρακικό Νάτριο (25% w/v dH₂O)	280 μl	280 μl	280 μl
dH₂O	600 μl	600 μl	600 μl

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες προσθήκης για την εκτέλεση του πειράματος.

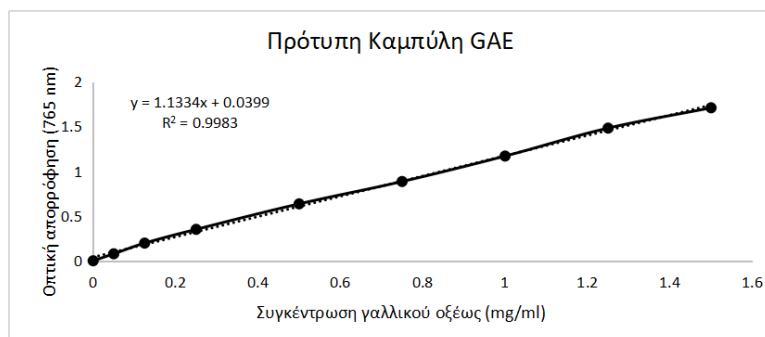
Μετά την προσθήκη των τελευταίων αντιδραστηρίων το μείγμα ανακινείται και επώάζεται για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα που εξετάζεται πραγματοποιούμε τρεις επαναλήψεις. Με την ολοκλήρωση της επώασης φωτομετρούμε στα 765 nm.

Υπολογισμοί

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται αρχικά ο μέσος όρος απορρόφησης των τριών επαναλήψεων. Από την τιμή που προκύπτει αφαιρείται η τιμή της απορρόφησης του αρνητικού control (δείγμα -). Ο υπολογισμός της συνολικής ποσότητας πολυφαινολικού περιεχομένου κάθε δείγματος επιτυγχάνεται με την βοήθεια μίας πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Η καμπύλη αυτή κατασκευάζεται περιέχοντας τις συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 και 1500 μg/ml γαλλικού οξέος. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (Total Polyphenolic Content, TPC) εκφράζεται σε μονάδες mgGAE (Gallic Acid Equivalents)/g εκχυλίσματος (mg_{GAE}/g_{εκχ.}). Πιο αναλυτικά:

1. mean ABS sample – ABS negative control = (I)
2. TPC = [(I)-0.0399/1.1334]*2, όπου

Οι τιμές «0.0399» και «1.1334» έχουν προκύψει από την πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος και ο συντελεστής «*2» αντιστοιχεί στον συντελεστή αραίωσης.



Εικόνα 25: Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

4. Αποτελέσματα

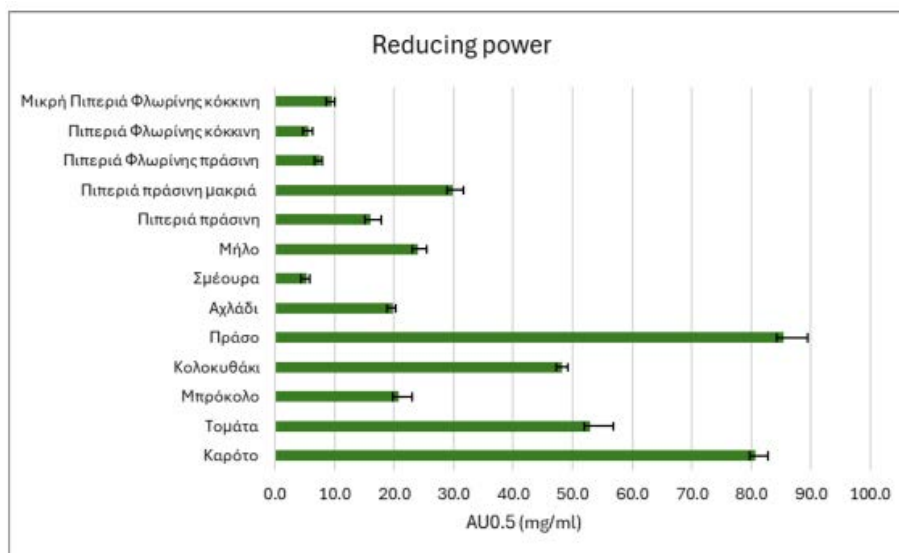
4.1. Γενικά

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε εκτιμήθηκαν οι βιοδείκτες της αναγωγικής ισχύος, της αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού, της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε δείγμα. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν τα τελικά αποτελέσματα για κάθε μέθοδο.

Τα αποτελέσματα αφορούν 13 οπωροκηπευτικά προϊόντα που προήλθαν από παραδοσιακούς σπόρους και αναπτύχθηκαν με μεθόδους βιολογικής καλλιέργειας στην Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς.

4.2. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Εκτίμησης Αναγωγικής Ισχύος (Reducing Power Assay)

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) απεικονίζονται οι τιμές $AU_{0.5}$ που προέκυψαν από την δοκιμασία εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στον άξονα y βρίσκονται τα 13 οπωροκηπευτικά που μελετήθηκαν, ενώ στον άξονα x οι τιμές $AU_{0.5}$, σε μονάδες mg/ml.

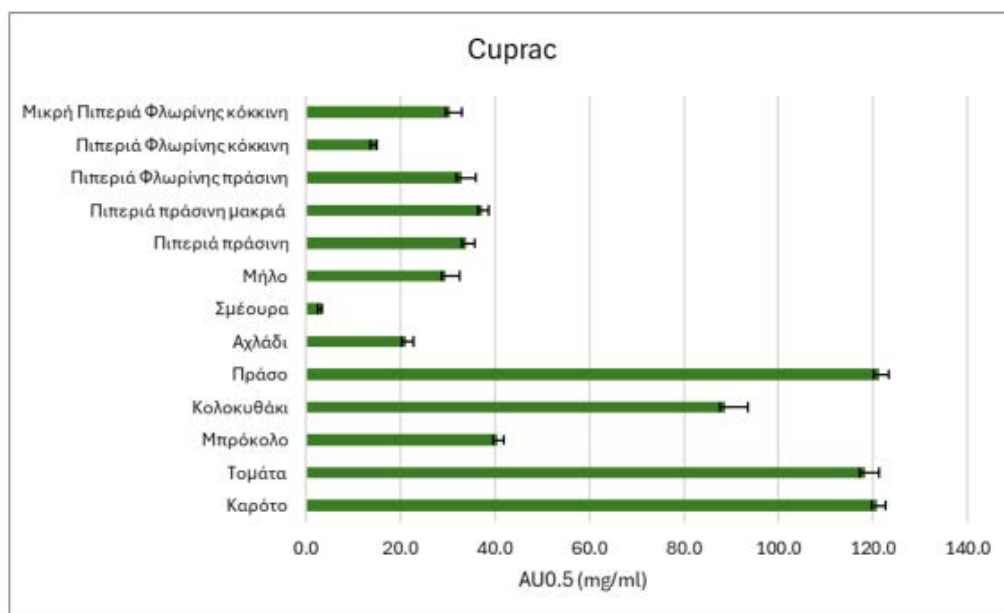


Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα δοκιμασίας εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας

Μεγαλύτερη τιμή $AU_{0.5}$, άρα και μικρότερη δραστηριότητα, παρατηρείται στο πράσο, το καρότο, την τομάτα και το κολοκυθάκι, ενώ μικρότερη τιμή $AU_{0.5}$, άρα και μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα στο σμέουρο και τις πιπεριές Φλωρίνης. Οι τιμές για τις πιπεριές, που ανήκουν στο ίδιο είδος, εμφανίζουν διαφορές μεταξύ τους. Η αναγωγική ικανότητα του μήλου, του αχλαδιού και του μπρόκολου βρίσκεται σε μεσαία επίπεδα συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

4.3. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Προσδιορισμού Αναγωγικής Ικανότητας έναντι του Χαλκού (CUPRAC Assay)

Όπως προηγουμένως, στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2) απεικονίζονται οι τιμές $AU_{0.5}$ που υπολογίστηκαν από την δοκιμασία CUPRAC. Στον άξονα y'y είναι τοποθετημένα τα 13 δείγματα που διερευνήθηκαν, ενώ στον x'x βρίσκονται οι τιμές $AU_{0.5}$ σε μονάδες mg/ml.

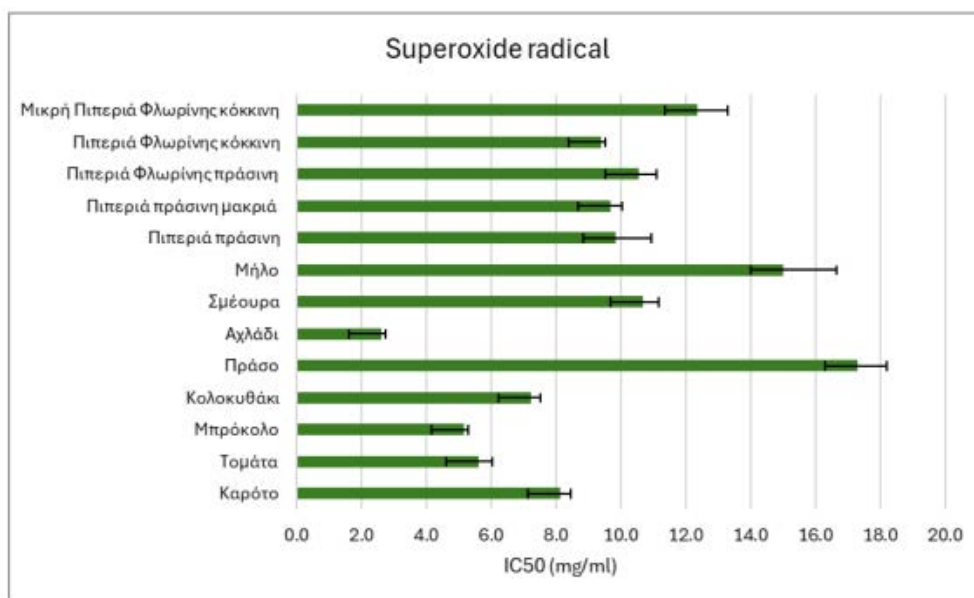


Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC

Μικρότερη τιμή $AU_{0.5}$, άρα και μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα έναντι του χαλκού παρατηρείται στο σμέουρο, την κόκκινη πιπεριά Φλωρίνης και το αχλάδι, ενώ μεγαλύτερη τιμή $AU_{0.5}$ έχει το πράσο, η τομάτα, το καρότο και το κολοκυθάκι. Συνεπώς αυτά τα δείγματα εμφανίζουν την χαμηλότερη αναγωγική ικανότητα έναντι του χαλκού. Εκτός της κόκκινης πιπεριάς Φλωρίνης, οι τιμές για τις υπόλοιπες ποικιλίες πιπεριάς βρίσκονται κοντά μεταξύ τους σε μεσαία προς χαμηλά επίπεδα. Το μήλο και το κολοκυθάκι εμφανίζουν επίσης μεσαία προς χαμηλή τιμή $AU_{0.5}$.

4.4. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Εκτίμησης Ικανότητας Εξουδετέρωσης της Ρίζας Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3) φαίνονται οι τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν κατά την δοκιμασία εκτίμησης ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου. Στον άξονα y'y βρίσκονται τα 13 δείγματα, ενώ στον άξονα x'x η τιμή IC_{50} με μονάδες mg/ml.



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα εκτίμησης ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου

Μεγαλύτερη τιμή IC_{50} , άρα και χαμηλότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας παρατηρείται στο πράσο και το μήλο, ενώ υψηλή τιμή εμφανίζουν και οι ποικιλίες πιπεριάς και το σμέουρο. Μικρότερη τιμή IC_{50} , άρα και μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι της ρίζας σουπεροξειδίου εμφανίζει το αχλάδι.

4.5. Αποτελέσματα Προσδιορισμού Συνολικού Πολυφαινολικού Περιεχομένου μέσω του Αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) φαίνονται οι τιμές του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC), οι οποίες εκφράζονται σε μονάδες mg GAE/g δείγματος, για το καθένα από τα 13 δείγματα. Οι τιμές αυτές προέκυψαν με την βοήθεια μίας πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, όπως έχει ήδη επεξηγηθεί.

Δείγματα	TPC (mgGAE/g _{δείγματος})
Μικρή Πιπεριά Φλωρίνης Κόκκινη	1,456
Πιπεριά Φλωρίνης Κόκκινη	1,573
Πιπεριά Φλωρίνης Πράσινη	1,259
Πιπεριά Πράσινη Μακριά	0,791
Πιπεριά Πράσινη	1,192
Μήλο	0,594
Σμέουρο	1,836
Αχλάδι	0,696
Πράσο	0,290
Κολοκυθάκι	0,662
Μπρόκολο	0,790
Τομάτα	0,261
Καρότο	0,240

Πίνακας 7: Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων

Μεγαλύτερη τιμή πολυφαινολικού περιεχομένου παρατηρείται στις πιπεριές Φλωρίνης και το σμέουρο, ενώ υψηλή τιμή εμφανίζει και η πράσινη πιπεριά. Οι χαμηλότερες τιμές αντιστοιχούν στο καρότο, την τομάτα και το πράσο, ενώ σε μεσαία επίπεδα κυμαίνεται το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο στο μήλο, το αχλάδι, το κολοκυθάκι, το μπρόκολο και την μακριά πράσινη πιπεριά.

5. Συζήτηση

Τόσο η εφαρμογή τεχνικών βιολογικής καλλιέργειας όσο και η χρήση παραδοσιακών σπόρων είναι περιορισμένες και παρατηρούνται κυρίως σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Παρά την περιορισμένη χρήση της, αρκετοί είναι οι άνθρωποι που ισχυρίζονται πως τα προϊόντα που προέρχονται από παραδοσιακούς σπόρους και αναπτύσσονται μέσω βιολογικής καλλιέργειας εμφανίζουν ανωτερότητα σε γευστικό και θρεπτικό επίπεδο (Azarbad et al, 2022).

Μία σκοπιά υπό την οποία θα υπήρχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί αυτός ο ισχυρισμός είναι η αντιοξειδωτική δράση. Είναι γεγονός πως το οξειδωτικό στρες και η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού αποτελούν τομείς που μελετώνται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Η καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να αποτελέσει πρόδρομο για την θεραπεία διάφορων χρόνιων νοσημάτων.

Η παρούσα διπλωματική εργασία διερευνά την αντιοξειδωτική δράση δεκατριών οπωροκηπευτικών προϊόντων τα οποία προέρχονται από παραδοσιακούς σπόρους και καλλιεργήθηκαν με βιολογικά πρότυπα. Τα δείγματα προς εξέταση καλλιεργήθηκαν από μοναχές της Ιεράς Μονής Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγιάς, μία μονή ιδιαίτερα γνωστή στην τοπική κοινωνία για τα παραδοσιακά της προϊόντα.

Ο πρώτος δείκτης που εξετάστηκε ήταν η αναγωγική ικανότητα έναντι ιόντων σιδήρου (Reducing Power Assay). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα αποτελέσματα που προέκυψαν υπάρχει στο γεγονός πως οι ποικιλίες πιπεριάς, που ανήκουν στο ίδιο είδος, εμφάνισαν σημαντικές διαφορές, με τις πιπεριές Φλωρίνης να είναι πιο δραστικές και να μην εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις πιπεριές Φλωρίνης στην δοκιμασία προσδιορισμού αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού (CUPRAC), με τις κόκκινες πιπεριές Φλωρίνης να είναι πιο δραστικές από τις πιπεριές των υπόλοιπων ποικιλιών. Μία απόκλιση ανάμεσα στις τιμές των αποτελεσμάτων των ποικιλιών πιπεριάς παρουσιάζεται και στην δοκιμασία εκτίμησης εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου, αλλά και στο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Το γεγονός πως οι κόκκινες πιπεριές Φλωρίνης εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και τις υψηλότερες τιμές συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου υποδεικνύει πως η ωρίμανση του καρπού της πιπεριάς αλλάζει την σύστασή του σε πολυφαινόλες, κάτι που ενδεχομένως αυξάνει την αντιοξειδωτική του δράση. Η παρατήρηση αυτή επαληθεύεται και από σχετικές μελέτες (Mougiou et al, 2021, Papathanasiou et al, 2021),

όπου παρατηρείται πως οι πιο ώριμες εκδοχές του καρπού της ποικιλίας Φλωρίνης εμφανίζουν αυξημένο πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σύγκριση με τις λιγότερο ώριμες (πράσινες) εκδοχές, ενώ η υψηλή αυτή σύσταση σε πολυφαινόλες αυξάνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις πιπεριές Φλωρίνης και τις άλλες δύο ποικιλίες (Καρατζόβα και Μακεδονική μυτερή) ενδέχεται να εξηγούνται από διαφορετικές συστάσεις αντιοξειδωτικών ουσιών που παρατηρούνται σε κάθε ποικιλία.

Ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει το σμέουρο. Ειδικότερα, εμφάνισε την μεγαλύτερη ικανότητα αναγωγής τόσο ιόντων σιδήρου όσο και ιόντων χαλκού στις δοκιμασίες που διεξήχθησαν, ενώ ιδιαίτερα ικανοποιητική ήταν και η αποδοτικότητά του στην εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου. Συγκριτικά με όλα τα οπωροκηπευτικά προϊόντα, των οποίων η αντιοξειδωτική ικανότητα εξετάστηκε, το σμέουρο είναι ένα από τα διεξοδικότερα διερευνημένα. Αρκετές είναι οι επιστημονικές μελέτες γύρω από το συγκεκριμένο φρούτο και την αντιοξειδωτική του δράση. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνες στις οποίες εξετάζεται η αντιοξειδωτική ισχύς διαφορετικών ποικιλιών σμέουρου. Παράλληλα, υπολογίζεται και το συνολικό περιεχόμενο αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχουν. Η ποσότητα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου αλλά και η συνολική ποσότητα ανθοκυανινών έχει συσχετιστεί με την ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών, με τις ποικιλίες που εμφανίζουν μεγαλύτερες ποσότητες ανθοκυανινών να είναι δραστικότερες (Farajpour et al, 2025, Chen et al, 2013, Veljković et al, 2019).

Αξίζει να σημειωθεί πως πέρα από δοκιμασίες εκτίμησης της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών και αναγωγής ιόντων, εκχυλίσματα σμέουρου έχουν χρησιμοποιηθεί και για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης και κυτταροτοξικότητας των ουσιών που περιέχονται σε αυτά. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, αλλά και σε οργανισμούς μέσω πειραμάτων *in vivo* έχει διαπιστωθεί πως εκχυλίσματα από τον καρπό, τους σπόρους ή τα φύλλα του σμέουρου μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη όγκων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Συνεπώς, οι δραστικές ουσίες που περιέχονται στο σμέουρο, πέρα από αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, μπορούν να συμβάλλουν και στην αντιμετώπιση του καρκίνου (Lopez-Corona et al, 2022). Θα εμφάνιζε σίγουρα ενδιαφέροντα ευρήματα η διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης σμέουρων προερχόμενων από παραδοσιακούς σπόρους καλλιεργημένους με βιολογικές μεθόδους. Αυτή η διερεύνηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει πειράματα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ή σε οργανισμούς-μοντέλα *in vivo*.

Είναι γεγονός πως τα οπωροκηπευτικά προϊόντα οφείλουν το χρώμα τους σε συγκεκριμένες ουσίες που περιέχονται σε αυτά. Οι ανθοκυανίνες, οι οποίες περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στο σμέουρο και εμφανίζουν διαπιστωμένα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, προσδίδουν στους καρπούς έντονο σκούρο κόκκινο ή μωβ χρώμα. Η παρατήρηση πως οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση επαληθεύεται από μελέτες όπου πραγματοποιήθηκε συσχετισμός του χρώματος και της αντιοξειδωτικής δράσης σε διάφορα οπωροκηπευτικά προϊόντα. Οι ουσίες που εμφάνιζαν εντονότερο σκούρο κόκκινο χρώμα διαπιστώθηκε πως διέθεταν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Εξαίρεση αποτελούν οπωροκηπευτικά που περιέχουν μεγάλες ποσότητες καροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο (π.χ. τομάτα), καθώς όπως και οι ανθοκυανίνες προσδίδει κόκκινο χρώμα στον καρπό. Σε αντίθεση όμως με τις δραστικότητες αυτές ουσίες, το λυκοπένιο δεν προσδίδει τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (Cömert et al, 2019).

Η συσχέτιση φλαβονοειδών με το χρώμα και την αντιοξειδωτική ικανότητα επαληθεύεται και σε μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη όπου άνθη του είδους *Hibiscus rosa-sinensis* με διαφορετικά χρώματα εξετάστηκαν όσον αφορά την πολυφαινολική τους σύσταση και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα άνθη με εντονότερο σκούρο κόκκινο ή μωβ χρώμα εμφάνιζαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και παράλληλα την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Mejía et al, 2023).

Όσον αφορά την συγκεκριμένη μελέτη, υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ χρώματος και αντιοξειδωτικής ικανότητας, με την τομάτα και το μήλο να αποτελούν εξαίρεση όσον αφορά το κόκκινο χρώμα και την αντιοξειδωτική δράση. Το μήλο, ενώ οφείλει το κόκκινο χρώμα του σε ανθοκυανίνες (Asma et al, 2023), δεν διαθέτει τόσο μεγάλη περιεκτικότητα σε αυτές όσο το σμέουρο. Οι καρποί της πιπεριάς, όσο βρίσκονται σε όχι τόσο ώριμο στάδιο και άρα έχουν πράσινο χρώμα, το οφείλουν στην ύπαρξη χλωροφύλλης. Όσο ωριμάζει ο καρπός, υποβαθμίζεται η χλωροφύλλη συγκριτικά με άλλα δραστικά καροτενοειδή, όπως η καψανθίνη. Συνεπώς, σε πιο ώριμα στάδια ο καρπός αποκτά μία κόκκινη απόχρωση που οφείλεται στην αλλαγή της σύστασης αντιοξειδωτικών. Αυτή η αλλαγή της σύστασης που έχει ήδη προαναφερθεί μπορεί να εξηγήσει τις αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν όσον αφορά τις πιπεριές ίδιας ποικιλίας (Φλωρίνης), ενώ η απόκλιση που παρατηρήθηκε με την υποποικιλία της μικρής κόκκινης πιπεριάς Φλωρίνης μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στην σύσταση της σε αντιοξειδωτικά συγκριτικά με τις άλλες δύο.

Το αχλάδι παρουσιάζεται πολύ αποτελεσματικό όσον αφορά την εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου. Ενώ το συνολικό πολυφαινολικό του περιεχόμενο δεν υπολογίζεται τόσο υψηλό όσο άλλων οπωροκηπευτικών στην συγκεκριμένη μελέτη. Η τιμή συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου υπολογίζεται χαμηλότερη από κάποιες μελέτες (Kolniak-Ostek, 2020), ενώ είναι γνωστό πως το αχλάδι περιέχει και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες εκτός των πολυφαινολών, όπως τα καροτενοειδή και τα τριτερπένια. Συνεπώς, η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου μπορεί να αποδοθεί στην δράση αυτών των ομάδων αντιοξειδωτικών μορίων.

Το μπρόκολο εμφανίζει αρκετά υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν δείξει τόσο υψηλές τιμές (AlJuhaimi et al, 2024). Η παρατήρηση αυτή ίσως επηρεάζεται από τον τρόπο επεξεργασίας των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, στην πλειοψηφία σχετικών πειραμάτων λαμβάνονται δείγματα από ορισμένα μέρη του φυτού, ενώ στην συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα μέρη του φυτού.

Το καρότο, η τομάτα και το πράσο εμφάνισαν συνολικά την χαμηλότερη δράση, μια παρατήρηση που βασίζεται στις χαμηλότερες τιμές κατά τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού τους περιεχομένου αλλά και με την χαμηλή αναγωγική ικανότητα που εμφανίζουν στις δοκιμασίες CUPRAC και Reducing Power. Ενώ περιέχουν και άλλες ομάδες αντιοξειδωτικών ουσιών εκτός των πολυφαινολών (καροτενοειδή, βιταμίνες, θειούχες ενώσεις), ίσως οι ενώσεις που περιέχουν δεν είναι τόσο αποδοτικές στην αναγωγή ιόντων σιδήρου και χαλκού συγκριτικά με ουσίες που περιέχονται στα υπόλοιπα οπωροκηπευτικά (Shahrajabian et al, 2023, Bianchi et al, 2023, Ahmad et al, 2019).

Το κολοκυθάκι εμφανίζει σχετικά υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου παρά τα μέτρια επίπεδα πολυφαινολικού περιεχομένου συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Παρόλα αυτά, δεν εμφανίστηκε ιδιαίτερα αποδοτικό στην αναγωγή των ιόντων σιδήρου και χαλκού. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αποδίδεται, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, στο περιεχόμενο αντιοξειδωτικών ουσιών που διαθέτει, οι οποίες ίσως δεν είναι αποτελεσματικές στην αναγωγή των συγκεκριμένων ιόντων.

Εκτός των προαναφερθέντων, αξίζει να γίνει και μία σύγκριση αποτελεσμάτων των μεθόδων CUPRAC και Reducing Power Assay. Με εξαίρεση το σμέουρο και το αχλάδι, τα οπωροκηπευτικά που διερευνήθηκαν εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές $AU_{0.5}$ στην δοκιμασία αναγωγής των ιόντων σιδήρου. Γενικότερα, αρκετές είναι οι μελέτες στις οποίες οι δύο αυτές μέθοδοι διεξάγονται συμπληρωματικά ή μία με την άλλη, παρέχοντας μία πιο

εμπεριστατωμένη εικόνα όσον αφορά την ικανότητα αναγωγής ιόντων. Οι δύο αυτές δοκιμασίες πραγματοποιούνται συμπληρωματικά καθώς εμφανίζονται διαφορές στα οξειδοαναγωγικά χαρακτηριστικά και το pH στις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την διεξαγωγή τους. (Ganugi et al, 2023, Bryshten et al, 2024). Ίσως οι μέθοδοι βιολογικής καλλιέργειας ή ο τρόπος αρχικής επεξεργασίας μετά την παραλαβή των δειγμάτων επηρεάζουν την σύσταση σε αντιοξειδωτικά τα οποία είναι αποτελεσματικότερα στην αναγωγή ιόντων σιδήρου συγκριτικά με τα ιόντα χαλκού.

Η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αρχή για την πραγματοποίηση άλλων αντίστοιχων μελετών. Θα μπορούσε να εξεταστεί περαιτέρω η μικρή απόκλιση που εμφανίζουν οι πιπεριές διαφορετικών αλλά και των ίδιων ποικιλιών (πιπεριές Φλωρίνης) όσον αφορά την αναγωγική τους ισχύ, αλλά και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Εκτός αυτού, ίσως αξίζει να διερευνηθεί και η υψηλή ικανότητα των οπωροκηπευτικών, και κυρίως του αχλαδιού, στην εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου. Ίσως η εκτίμηση της ικανότητας εξουδετέρωσης και άλλων ριζών προσφέρει ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Μία μελέτη που θα σύγκρινε οπωροκηπευτικά που έχουν προκύψει από συμβατικές καλλιέργειες με αντίστοιχα βιολογικής προέλευσης θα προσέδιδε χρήσιμες παρατηρήσεις και συμπεράσματα. Αντίστοιχες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και έδειξαν πως υπάρχει αυξημένο πολυφαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση σε οπωροκηπευτικά προερχόμενα από βιολογική καλλιέργεια, ωστόσο ο τρόπος επεξεργασίας των καρπών δεν ήταν ο ίδιος και δεν εξετάστηκε η περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών σε ολόκληρο τον καρπό συνολικά (όπως στην συγκεκριμένη μελέτη), αλλά υπήρχε διαχωρισμός σε τμήματα όπως φλοιός, σάρκα, φύλλα κ.ά. (Faller & Fialho, 2010, Barański et al, 2014). Θα μπορούσε λοιπόν να εξεταστεί η αντιοξειδωτική δράση συμβατικά καλλιεργημένων ολόκληρων καρπών και να συγκριθεί με αυτή των αντίστοιχων καρπών προερχόμενων από βιολογική καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση της χρήσης συγκεκριμένων συνθετικών χημικών στην αντιοξειδωτική δράση οπωροκηπευτικών.

Εκτός από την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω πειραμάτων *in vitro*, θα μπορούσε να διερευνηθεί η αντικαρκινική ικανότητα των συγκεκριμένων οπωροκηπευτικών, μέσω πειραμάτων είτε σε οργανισμούς *in vivo*, είτε σε κυτταρικές σειρές. Η δράση κατά της ανάπτυξης των όγκων αποτελεί ισχυρό πειστήριο για την ποιοτική ανωτερότητα μίας ουσίας, συνεπώς μία σύγκριση ανάμεσα σε προϊόντα συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας θα μπορούσε να επιφέρει χρήσιμες παρατηρήσεις σχετικά και με αυτό το κομμάτι.

6. Βιβλιογραφία

- Adhikary, T. & Mondal, T. (2022). Antioxidant Properties and Health Benefits of Pear. *ANTIOXIDANT PROPERTIES AND HEALTH BENEFITS OF HORTICULTURAL CROPS Part 1: Antioxidant Properties and Health Benefits of Fruits*, 229-252, Brillion Publishing
- Ahmad, T., Cawood, M., Iqbal, Q, Ariño, A., Batool, A., Tariq, R. M. S., Azam, M. & Akhtar, S. (2019). Phytochemicals in *Daucus carota* and Their Health Benefits—Review Article. *Foods*. 2019 Sep 19;8(9):424. <https://doi.org/10.3390/foods8090424>
- AlJuhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Ozcan, M. M., Uslu, N. & Albakry, Z. (2024). Contents and Phytochemicals of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Cooked Using Different Techniques. *Plants*. 2024, 13(10), 1283. <https://doi.org/10.3390/plants13101283>
- Anaya-Esparza, L. M., Mora, Z., V., Vásquez-Paulino, O., Ascencio, F. & Villarruel-López, A. (2021). Bell Peppers (*Capsicum annum* L.) Losses and Wastes: Source for Food and Pharmaceutical Applications. *Molecules* 2021 Sep2;26(17):5341. <https://doi.org/10.3390/molecules26175341>
- Asma, U., Morozova, K., Ferrentino, G & Scampicchio, M. (2023). Apples and Apple By-Products: Antioxidant Properties and Food Applications. *Antioxidants* 2023, 12(7), 1456 <https://doi.org/10.3390/antiox12071456>
- Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones* 121, 2023, 109-141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>
- Azarbad, H. (2022). Conventional vs. Organic Agriculture—Which One Promotes Better Yields and Microbial Resilience in Rapidly Changing Climates? *Frontiers in Microbiology* 2022 Jun 9;13:903500 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.903500>
- Bai, Y., Li, X., Feng, Y., Liu, M. & Chen, C. (2024). Preserving traditional systems: Identification of agricultural heritage areas based on agro-biodiversity. *Plants, People, Planet* 6, 3, 670-682. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10479>
- Barański, M., Srednicka-Tober, D., Volakakis, N., Seal, C., Sanderson, R., Stewart, G. B., Benbrook, C., Biavati, B., Markellou, E., Giotis, C., Gromadzka-Ostrowska, J., Rembiałkowska, E., Skwarło-Sońta, K., Tahvonon, R., Janovská, D., Niggli, U., Nicot, P., Leifert, C. (2014) Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review

- and meta-analyses. *The Journal of Nutrition* 2014 Jul 15;112(5):794-811. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001366>
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M. & Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:3527579. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>
- Bianchi, A. R., Vitale, E., Guerretti, V., Palumbo, G., De Clemente, I. M., Vitale, L., Arena, C. & De Maio, A. (2023). Antioxidant Characterization of Six Tomato Cultivars and Derived Products Destined for Human Consumption. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Mar 21;12(3):761. <https://doi.org/10.3390/antiox12030761>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G. & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 5;9(8):709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr., F. J. & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 2012;142. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Bryshten, I., Paprotny, L., Olszowy-Tomczyk, M. & Wianowska, D. (2024). Antioxidant Properties of Green Plants with Different Vitamin K Contents. *Molecules*. 2024 Aug 1;29(15):3655. <https://doi.org/10.3390/molecules29153655>
- Bürgy, A. (2021). Modulation of the texture and tissue fragmentation of fruits during thermal treatments by the methods of cultivation and maturation : impact on the texture of the purees.
- Caldwell, G. W., Zhengyin, Y., Lang, W. & Masucci, J. A. (2012). The IC₅₀ Concept Revisited. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12, 1282-1290. <https://doi.org/10.2174/156802612800672844>
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., Park, S. I. & Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov*. **11**, 19. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8>
- Chen, L., Xin, X., Zhang, H. & Yuan, Q. (2013). Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of Functional Foods* Jan 2013, 5(1):508-515. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.009>

- Chen, X., Yu, H., Li, Z., Ye, W., Liu, Z., Gao, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, L., Alenina, N., Bader, M., Ding, H., Li, P. & Htet Aung, L. H. (2022). Oxidative RNA Damage in the Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Physiology* 2022, 13:725919. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.725919>
- Cömert, E. D., Mogol, B. A., Gökmen, V. (2019) Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. *Currenr Research in Food Science*. 2019 Nov 21;2:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.11.001>
- De la Cruz, V. Y. V., Tantriani, Cheng, W. & Tawaraya, K. (2023). Yield gap between organic and conventional farming systems across climate types and sub-types: A meta-analysis. *Agricultural Systems*. Oct 211, 103732 <https://doi.org/10.16/j.agsy.2023.103732>
- Desphande, O. A. & Mohiuddin, S. S. (2023). Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Faller, A. L. K. & Fialho, E. (2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. Sep 2010, 23(6):561-568. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.01.003>
- Farajpour, M., Ahmadi, S. R. Z., Aouei, M. T., Ramezanpour, M. R., Sadat-Hosseini, M. & Hajivand, S. (2025). Nutritional and antioxidant profiles of blackberry and raspberry genotypes. *BMC Plant Biology* 2025, 25, 380. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06427-8>
- Flores, P., Hellín, P., Lacasa, A., López, A. & Fenoll, J. (2009). Pepper antioxidant composition as affected by organic, low-input and soilless cultivation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3719>
- Ganugi, P., Fiorini, A., Tabaglio, V., Capra, F., Zengin, G., Bonini, P., Caffi, T., Puglisi, E., Trevisan, M., & Lucini, L. (2023). The Functional Profile and Antioxidant Capacity of Tomato Fruits Are Modulated by the Interaction between Microbial Biostimulants, Soil Properties, and Soil Nitrogen Status. *Antioxidants*, 12(2), 520. <https://doi.org/10.3390/antiox12020520>

- Gulcin, İ. (2025). Antioxidants: a comprehensive review. *Archives of Toxicology* 99, 1893-1997. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-03997-2>
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hrycay, E. G. & Bandiera, S. M. (2015). Chapter Two - Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in Pharmacology*, 2015, 74, 35-84 <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>
- Ji, L. L. & Yeo, D. (2021). Oxidative stress: an evolving definition. *Faculty Reviews*, 2021 Feb 9;10:13. <https://doi.org/10.12703/r/10-13>
- Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K. & Valko, M. (2024). Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*, 2024 98, 1323-1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwassel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K. & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 2023 Oct;97(10):2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 1, 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)
- Kolniak-Ostek, J., Klopotoska, D., Rutkowski, K. P., Skorupinska, A. & Kruczynska, D. E. (2020). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Pear (*Pyrus communis* L.) Fruits. *Molecules (Basel)*. 2020, 25(19):E4444. <https://doi.org/10.3390/molecules25194444>
- Lahbib, K., Bnejdi, F., Pandino, G., Lombardo, S., El-Gazzah, M., El-Bok, S. & Dabbou, S. (2023). Changes in Yield-Related Traits, Phytochemical Composition, and Antioxidant

- Activity of Pepper (*Capsicum annuum*) Depending on Its Variety, Fruit Position, and Ripening Stage. *Foods* 2023, 12(21), 3948. <https://doi.org/10.3390/foods12213948>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 2010 Jul;4(8):118-26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lopez-Corona, A. V., Valencia-Espinosa, I., González-Sánchez, F. A., Sánchez-López, A. L., Garcia-Amezquita, L. E. & Garcia-Varela, R. (2022) Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants (Basel)* 2022 Jun 17;11(6):1192. <https://doi.org/10.3390/antiox11061192>
- Mejía, J. J., Sierra, L. J., Ceballos, J. G., Martínez, J. R. & Stashenko, E. E. (2023). Color, Antioxidant Capacity and Flavonoid Composition in *Hibiscus rosa-sinensis* Cultures. *Molecules* 2023, 28(4), 1779. <https://doi.org/10.3390/molecules28041779>
- Mondelaers, K., Aertsens, J & Van Huylenbroeck. (2009). A meta-analysis of the differences in environmental impacts between organic and conventional farming. *British Food Journal* 111(10):1098-1119. <https://doi.org/10.1108/00070700910992925>
- Mougiou, N., Trika, F., Michailidou, S., Pantoura, M & Argiriou, A. (2021). Molecular and Biochemical Characterization of the Greek Pepper (*Capsicum annuum*) Cultivars ‘Florinis’ and ‘Karatzova’. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2021, 71(1), 89-96. <https://doi.org/10.31883/pjfn/133690>
- Mudigere Sannegowda, U. B. & Garkoti, S. C. (2022). Traditional community-led seed system for maintaining crop vigour, diversity and socio-cultural network in view of the changing climate: a case study from western Himalaya, India. *Climate Action* 1, 19. <https://doi.org/10.1007/s44168-022-00020-7>
- Munteanu, I. G. & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 25;22(7):3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Ngo, V. & Duennwald, M. L. (2022). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants* 2022, 11(12), 2345. <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>

- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A. & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Ohiagu, F. O., Chikezie, P. C., Maduka, T. O., Chikezie, C. M., Nwaiwu, O., & Paudel, K. R. (2025). Antioxidants, Radical Scavengers, and Their Impact on Oxidative Stress. *Free Radicals and Antioxidants*, 14(2), 62–85. <https://doi.org/10.5530/fra.2024.2.7>
- Oliverio, M., Bulotta, S. & Duarte, N. (2022). Editorial: Nature Inspired Protective Agents Against Oxidative Stress. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, 13:859549. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.859549>
- Palma, J. M., Terán, F., Contreras-Ruiz, A., Rodríguez-Ruiz, M. & Corpas, F. J. (2020). Antioxidant Profile of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fruits Containing Diverse Levels of Capsaicinoids. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 17;9(9):878. <https://doi.org/10.3390/antiox9090878>
- Papathanasiou, T., Gougoulas, N., Karayannis, V. G. & Kamvoukou, C.-A. (2021). Investigation of the Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Three Sweet Pepper Cultivars (*Capsicum annuum* L.) at Different Development and Maturation Stages. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2021, 65(2). <https://doi.org/10.3311/PPch.15553>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- 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.* 2017 Jul 27; 2017:8416763 <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plasencia, P., Finimundy, T.C., Carocho, M, Calhelha, R. C., Añibarro-Ortega, M., Pires, T. C. S. P., Barreiro, F., Garcia, P. A., Barros, L. & Heleno, S. A. (2025). Extraction of Bioactive Compounds from *Rubus Idaeus* Bioresidues: A Full Screening on Phenolic Composition and Bioactive Potential. *Waste Biomass Valor* **16**, 737–747 (2025). <https://doi.org/10.1007/s12649-024-02696-w>

- Purkiewicz, A., Ciborska, J., Tanska, M., Narwojsz, A., Starowicz, M., Przybylowicz, K. E. & Sawicki, T. (2020). The Impact of the Method Extraction and Different Carrot Variety on the Carotenoid Profile, Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Juices. *Plants* 2020, 9(12), 1759. <https://doi.org/10.3390/plants9121759>
- Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V. & Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 2022 Oct; 46(10):e14264 <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>
- Robinson, J. M. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jul 3; 130(2):281-297. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0461-4>
- Sahlin, E., Savage, G. P. & Lister, C. E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004 Oct 17(5):635-647. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.003>
- Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C. & del Río, L. A. (2013). Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *Subcell Biochem.* 2013; 69:231-55. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_13
- Savvas, D., Magkana, P., Yfantopoulos, D., Kalozoumis, P. & Ntatsi, G. (2024). Growth and Nutritional Responses of Zucchini Squash to a Novel Consortium of Six *Bacillus* sp. Strains Used as a Biostimulant. *Agronomy* 2024, 14(2), 362. <https://doi.org/10.3390/agronomy14020362>
- Schmidt, H. M., Kelley, E. E. & Straub, A. C. (2019). The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biol.* 2019 Feb; 21:101072. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101072>
- Shahrajabian, M. H., Shahrajabian, N. & Sun, W. (2023). The Health Benefits and Edible Properties of Leek. 2023 Oct. <https://doi.org/10.3390/Foods2023-15063>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Smith, T. N., Wylie, S. J., Coutts, B. A. & Jones, R. A. C. (2006). Localized Distribution of Iris yellow spot virus Within Leeks and Its Reliable Large-Scale Detection. *Plant Disease* 2006 Jun. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0729>

- Syed, R. U., Moni, S. S., Break, M. K. B., Khojali, W. M. A., Jafar, M., Alshammari, M. D., Abdelsalam, K., Taymour, S., Alreshidi, K. S. M., Elhassan Taha, M. M. & Mohan, S. (2023) Broccoli: A Multi-Faceted Vegetable for Health: An In-Depth Review of Its Nutritional Attributes, Antimicrobial Abilities, and Anti-inflammatory Properties. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jul 7;12(7):1157. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071157>
- Veljković, B., Jakovljević, V., Stanković, M. & Dajić-Stevanović, Z. (2019). Phytochemical and Antioxidant Properties of Fresh Fruits and Some Traditional Products of Wild Grown Raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2019, 47(3):565-573. <https://doi.org/10.15835/nbha47311465>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S. & Kouretas D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the *in vitro* and *in vivo* antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
- Wakasugi-Onogi, S., Ma, S., Ruhee, R. T., Tong, Y., Seki, Y. & Suzuki, K. (2023) Sulforaphane Attenuates Neutrophil ROS Production, MPO Degranulation and Phagocytosis, but Does Not Affect NET Formation Ex Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2023 May 9;24(10):8479. <https://doi.org/10.3390/ijms24108479>
- Wei, X., Manandhar, L., Kim, H., Chhetri, A., Hwang, J., Jang, G., Park, C. & Park, R. (2025). Pexophagy and Oxidative Stress: Focus on Peroxisomal Proteins and Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Pathways. *Antioxidants* 2025, 14(2), 126. <https://doi.org/10.3390/antiox14020126>
- Ιερά Μονή Τιμίου Προδρόμου Ανατολής Αγίας. <https://saintjohns-monastery.gr/>

Βιβλιογραφία Εικόνων

- Εικόνα 1: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Free-radicals-oxygen.jpg?uselang=el>
- Εικόνα 12: https://stock.adobe.com/gr_en/images/parts-of-plant (Kazakova M.)
- Εικόνα 13: https://stock.adobe.com/search?k=%22tomato+anatomy%22&asset_id=119021929

Εικόνα 15: *Photo and art by Erika Lyon, Ohio State University Extension*
<https://ohioline.osu.edu/factsheet/hyg-1605> (Lyon E.)

Εικόνα 16: https://www.freepik.com/premium-vector/raspberry-fruit-rubus-idaeus_69841572.htm

Εικόνα 17: https://www.huffpost.com/archive/ca/entry/step-aside-strawberries-its-pear-season_b_1950814

Εικόνα 19: <https://www.cayennediane.com/anatomy-of-a-chile-pepper/>