



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ  
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ROSACEAE ΚΑΙ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ  
( PUNICA GRANATUM )



Δαχτάρης Απ. Αθανάσιος  
Αξιωματικός Πολεμικής Αεροπορίας  
Χημικός

ΛΑΡΙΣΑ 2014

***ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC  
EXTRACTS FROM ROSACEAE FAMILY AND POMEGRANATE (PUNICA  
GRANATUM) PLANTS***

***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ROSACEAE ΚΑΙ ΤΟΥ  
ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ (PUNICA GRANATUM)***

© 2014 ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΑΧΤΑΡΗΣ

Η έγκριση της μεταπτυχιακής εργασίας, από το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων):** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

**Άννα Μαρία Ψαρά:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στην γυναίκα μου Διαμαντούλα  
και στη νεογέννητη κόρη μου

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Λέκτορα κ Δημητρίου Στάγκου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την συνεχή παρουσία και υποστήριξή του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή και την κατανόησή του.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ Δημήτριο Κουρέτα που ενέκρινε την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριο που διευθύνει, μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον, καθώς και την επίκουρο καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησής μου.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την σύζυγό μου Διαμαντούλα για την κατανόησή της, τη στήριξη και τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς επίσης και τους γονείς μου, που από μικρή ηλικία με ενθάρρυναν και με στήριζαν να κινηθώ στους χώρους της γνώσης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί το ενδιαφέρον στην μελέτη των αντιοξειδωτικών μορίων. Πρόκειται για μόρια που βρίσκονται κυρίως σε τροφές φυτικής προέλευσης που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες. Αυξημένο οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια δίνεται όλο ένα και μεγαλύτερη σημασία στη χημειοπροφύλαξη η οποία βασίζεται στα φυσικά βιοδραστικά μόρια των φυτικών τροφών και των ιδιοτήτων τους.

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα 23 δειγμάτων από φυτά της οικογένειας Rosaceae και 10 δειγμάτων από το φυτό ροδιά (*Punica granatum*). Από τα εκχυλίσματα αυτά μελετήθηκε η ανασταλτική τους δράση σε σχέση με δυο ελεύθερες ρίζες, τη ρίζα DPPH και τη ρίζα ABTS. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του κάθε εκχυλίσματος που έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει το 50% της ρίζας (IC<sub>50</sub>). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μέσω της τιμής του IC<sub>50</sub> του κάθε εκχυλίσματος βρέθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με μεγαλύτερη αυτών που προέρχονταν από το φυτό Ροδιά γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών σε φυτικές πολυφαινόλες. Το ισχυρότερο εκχύλισμα από φυτά της οικογένειας Rosaceae ήταν το δείγμα *Potentilla speciosa* που παρουσίαζε IC<sub>50</sub> 7,5 μg/ml για τη ρίζα DPPH και IC<sub>50</sub> 3,5 μg/ml για τη ρίζα ABTS. Το ισχυρότερο εκχύλισμα από τα εκχυλίσματα ροδιού που προερχόταν από τον φλοιό του καρπού της ποικιλίας Περσεφόνη και παρουσίαζε IC<sub>50</sub> 2,7 μg/ml για τη ρίζα DPPH και IC<sub>50</sub> 1,6 μg/ml για τη ρίζα ABTS.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας προτείνεται η περαιτέρω μελέτη των εκχυλισμάτων που εμφάνισαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε κυτταρικές σειρές καθώς και *in vivo* σε ζωντανούς οργανισμούς με σκοπό να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί της δράσης τους έτσι ώστε να μπορέσουν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα ή ως πρόσθετα για την παρασκευή βιολειτουργικών τροφίμων.

## ABSTRACT

In recent years the interest has been focused on the study of antioxidant molecules. These molecules are found mainly in foods of plant origin that have the ability to interact with and neutralizing free radicals. Overproduction of free radicals results in the occurrence of oxidative stress. Increased oxidative stress is associated with the emergence of various degenerative diseases. In recent years there has been an increasingly greater importance in chemoprevention based on natural bioactive molecules in plant foods and their properties.

In this research work we studied 23 samples polyphenolic extracts from plants of the family Rosaceae and 10 samples from the plant pomegranate (*Punica granatum*). From these extracts studied their inhibitory activity with respect to two free radicals, the radical DPPH and the radical ABTS. The concentration of each extract having the ability to neutralize 50% of the ligand ( $IC_{50}$ ). Comparing the results by the value of the  $IC_{50}$  of each extract was found that all of the extracts had strong antioxidant activity greater than those from the plant Pomegranate which may be due to a greater concentration in vegetable polyphenols. The strongest extract from plants of the family Rosaceae was *Potentilla speciosa* showed  $IC_{50}$  7,5  $\mu\text{g/ml}$  for DPPH radical and  $IC_{50}$  3,5  $\mu\text{g/ml}$  for the radical ABTS. The strongest extract of *Punica granatum* extracts were P2 which exhibited  $IC_{50}$  2,7  $\mu\text{g/ml}$  for DPPH radical and  $IC_{50}$  1,6  $\mu\text{g/ml}$  for the radical ABTS.

According to the results of the present study suggested that further study of the extracts showed the strongest antioxidant activity in cell lines and in vivo in living organisms in order to clarify the molecular mechanisms of their action so that they can potentially be used as food supplements, or as additives to food preparation.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Περίληψη</b>	7
<b>Abstract</b>	8
Περιεχόμενα	9
Περιεχόμενα Πινάκων	10
Περιεχόμενα Εικόνων	10
<b>1. Εισαγωγή</b>	11
1.1. Ελεύθερες ρίζες	11
1.2. Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών	11
1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	13
1.4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	15
1.5. Οξειδωτικό στρες	16
1.6. Φυτικές πολυφαινόλες	18
1.6.1. Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών	20
1.6.2. Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών	22
1.6.2.1. Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση	22
1.6.2.2. Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών	25
1.6.2.3. Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών	26
1.7. Rosaceae	26
1.8. Ροδιά	27
1.8.1. Θρεπτικά συστατικά και φυτοχημικά	28
1.8.2. Πολυφαινολική σύσταση του χυμού Ροδιού	28
1.8.3. Πιθανά οφέλη για την υγεία	28
<b>2. Σκοπός</b>	30
<b>3. Υλικά και μέθοδοι</b>	31
3.1. Δείγματα	31
3.2. Χημικά αντιδραστήρια	32
3.3. Μέθοδοι	32
3.3.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	32
3.3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS	35
<b>4. Αποτελέσματα</b>	39
4.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH*	39
4.1.1. Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae	39
4.1.2. Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών Ροδιά	52
4.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS	58
4.2.1. Αποτελέσματα ABTS εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae	58
4.2.2. Αποτελέσματα ABTS εκχυλισμάτων φυτών της Ροδιάς	72
<b>5. Συζήτηση</b>	79
<b>6. Βιβλιογραφία</b>	84

## Περιεχόμενα Πινάκων

<b>Πίνακας 1</b> Δείγματα εκχυλισμάτων Rocaseae .....	31
<b>Πίνακας 2</b> Δείγματα εκχυλισμάτων Ροδιού .....	32
<b>Πίνακας 3</b> Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων .....	34
<b>Πίνακας 4</b> Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη .....	34
<b>Πίνακας 5</b> Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων .....	37
<b>Πίνακας 6</b> Προσθήκη εκχυλίσματος .....	37
<b>Πίνακας 7</b> Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη...37	

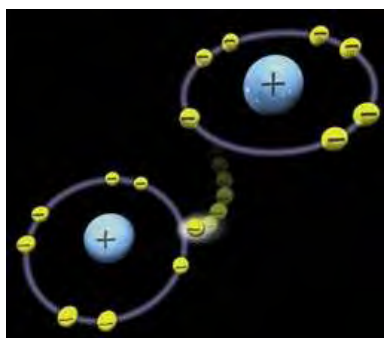
## Περιεχόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1</b> Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας.....	11
<b>Εικόνα 2</b> Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS). .....	12
<b>Εικόνα 3</b> Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	13
<b>Εικόνα 4</b> Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού .....	15
<b>Εικόνα 5</b> Οξειδωτικό στρες.....	16
<b>Εικόνα 6</b> Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών.17	
<b>Εικόνα 7</b> Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS.....	18
<b>Εικόνα 8</b> Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> 25

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ελεύθερες ρίζες

Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστηριότητα (Εικόνα 2). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).

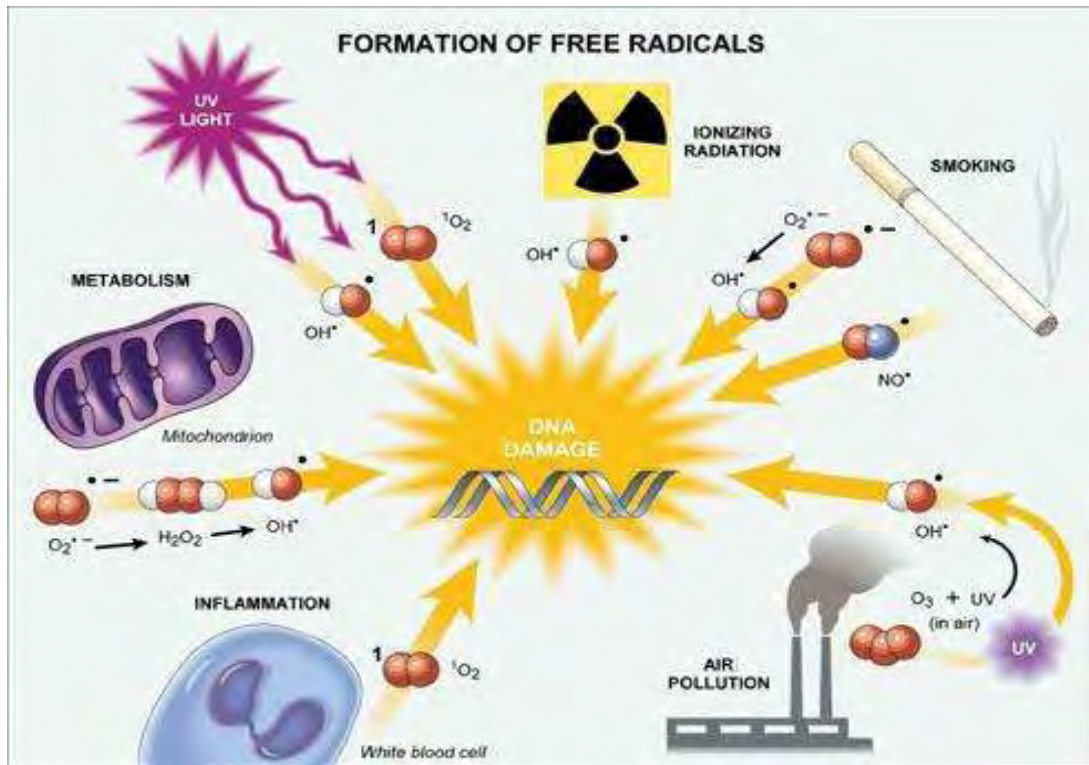


**Εικόνα 1** Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

### 1.2. Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε βιολογικά συστήματα κατά τις αντιδράσεις στην αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα. , (Halliwell B, 2001) (Εικόνα 3). Οι

ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

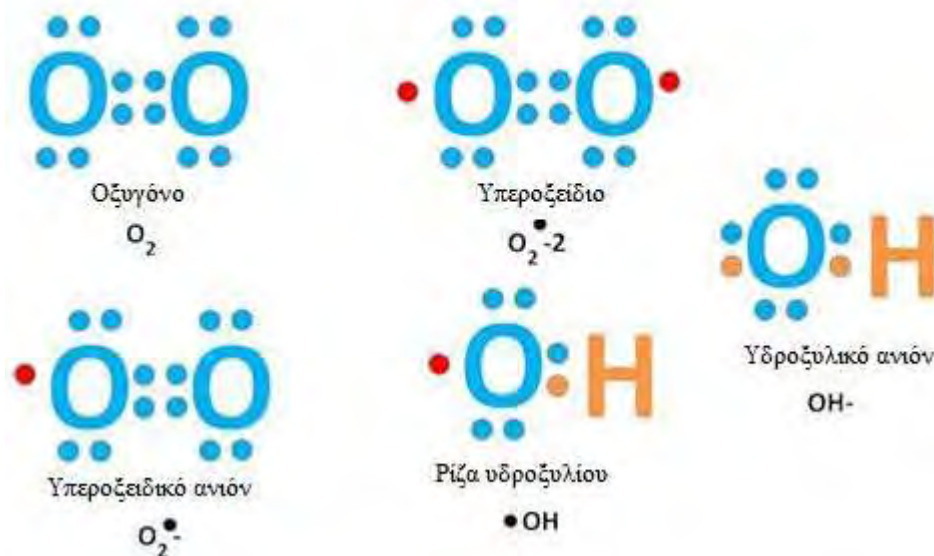


Εικόνα 2: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^\bullet$ ), του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^\bullet$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^\bullet$ ), του υδροπεροξυλίου ( $HO_2^\bullet$ ), του τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3^\bullet$ ) και οι θειούχες ρίζες ( $RS^\bullet$ ). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις (εικόνα 4), που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ) (Halliwell, 2001)

## ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

● = Μονήρη ηλεκτρόνια



Εικόνα 3: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

### 1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

#### Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Jenkins, 1988). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Malm, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

## Αρνητικές

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Bettters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

## Λιπίδια

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου  $ROO^*$ , συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεύδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

## Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002).

## DNA

Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

### 1.4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικό μόριο θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell B, 2001) (Εικόνα 5).



Εικόνα 4: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

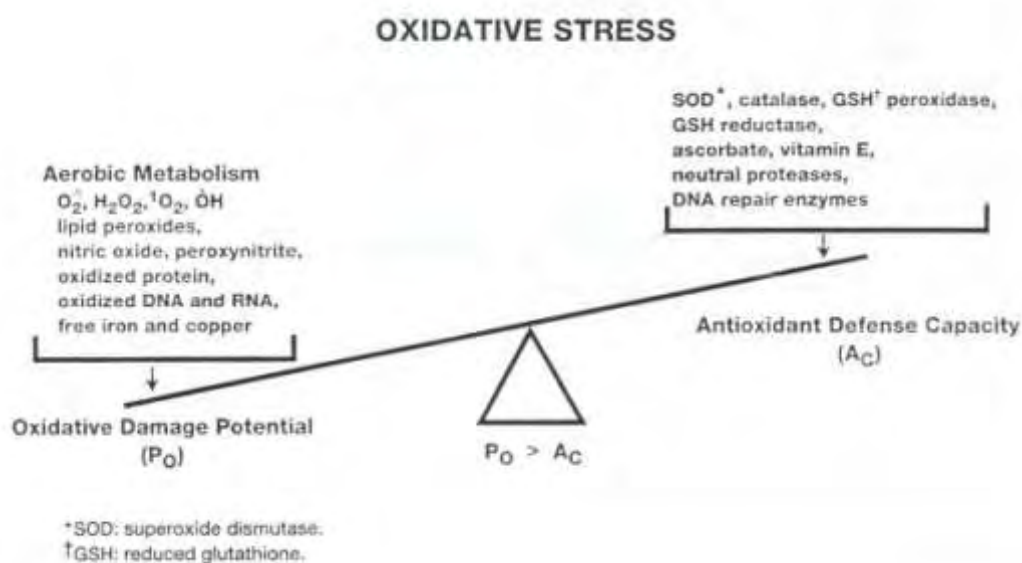
Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή

μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q<sub>10</sub>.

### 1.5. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991).



Εικόνα 5: Οξειδωτικό στρες

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

A) Εξωγενείς παράγοντες:

- Ξενοβιοτικές ουσίες

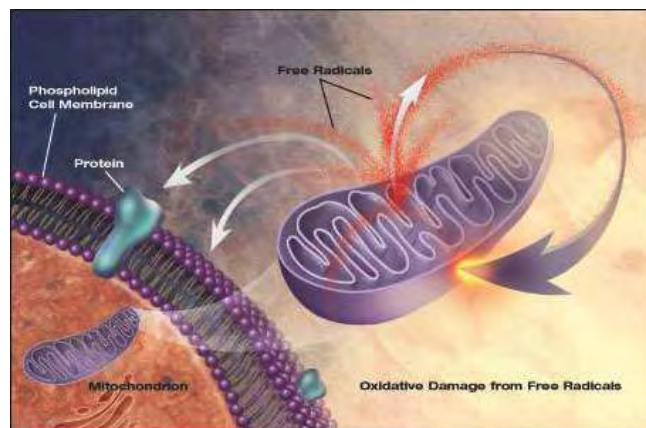


- Παθογόνα βακτήρια και ιοί
- Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
- Ακτινοβολία
- Διατροφή
- Κάπνισμα
- Φάρμακα

B) Ενδογενείς παράγοντες:

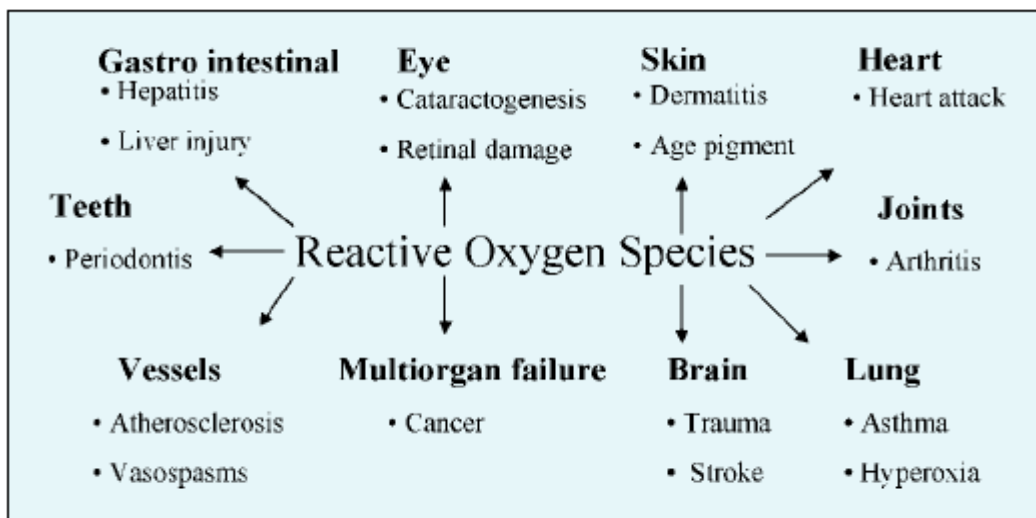
- Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
- Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχονδρίων
- Λευκοκύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.



**Εικόνα 6** Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) , για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 8) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Toyokuni1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του 'πολυσταδιακού μοντέλου', οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression) (Κουρέτας 2003).



Εικόνα 7 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).

## 1.6. Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Ως σήμερα έχουν αναγνωριστεί χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδώδιμα φυτά, προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα σταφύλια, το κρασί, στα δημητριακά, ο καφές και το τσάι.

Το κοινό χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μίας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, και τα λιγνάνια. Η ποσότητα και η σύνθεση των βιολογικά ενεργών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια και τα προϊόντα τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, την

ωριμότητα, της συνθήκης της εποχής, την περιοχή παραγωγής και την απόδοση του φρούτου.

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού οξέος.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκιναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

Τα λιγνάνια ανήκουν στην ομάδα των φυτοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμεστάνες. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Απομονώνονται από τα ξυλώδη μέρη των φυτών, τα επικαλύμματα των σπόρων και τους αλεσμένους κόκκους. Φυτικά λιγνάνια είναι η ματαιρεσινόλη (matairesinol) και η σεκοϊσολαρισρεσινόλη (secoisolariciresinol) ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη (enterodiol) και η εντερολακτόνη (enterolactone). Βρίσκονται κυρίως στους φυτικούς κόκκους, στα φρούτα και τα λαχανικά. Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνη καρκινογένεσης αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb και Cullough, 2005).

### 1.6.1 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα (Kuhnau 1976; Radtke, 1998; Santos-Buelga και Scalbert 2000). Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα (Scalbert και Williamson 2000). Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert και Williamson 2000). Οι αγλυκόνες (δηλαδή οι πολυφαινόλες που δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα) απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές με τη μορφή γλυκοσιδίων ή πολυμερών είναι αρκετά υδρόφιλες για να απορροφηθούν με παθητική διάχυση από το έντερο και έτσι πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο (Hollman και Katan 1997). Όταν η υδρόλυση γίνεται από τα βακτήρια του εντέρου τότε συνήθως μειώνεται η απορρόφηση των πολυφαινολών γιατί οι αγλυκονικές μορφές που σχηματίζονται αποικοδομούνται περαιτέρω σε διάφορα αρωματικά οξέα (Scheline 1991). Επιπλέον, έχει προταθεί (Hollman, 1995) ότι κάποια γλυκοσίδια μεταφέρονται στα εντεροκύτταρα από τη μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης που εξαρτάται από νάτριο (SGLT1) και στη συνέχεια υδρολύονται από την κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση ή από την υδρολάση της φλοριζινικής λακτάσης (LPH). Οι ανθοκυανιδίνες (κατηγορία φλαβονοειδών) πρέπει να απορροφώνται και να μεταβολίζονται με διαφορετικό μηχανισμό από τις άλλες πολυφαινόλες γιατί βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος με τις γλυκοσιδικές τους μορφές (Passamonti, 2002). Οι πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών όπως οι προκυανιδίνες (ανήκουν στα φλαβονοειδή) πιστεύεται ότι απορροφώνται σε μικρό βαθμό και ότι η όποια βιολογική δράση τους περιορίζεται στην περιοχή του εντέρου (Deprez., 2001).

Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θειϊκές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το

λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ (οι κυριότεροι όμως μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος είναι τα γλυκουρονίδια) και η προσθήκη αυτών των ομάδων καταλύεται από θειοτρανσφεράσες, μεθυλτρανσφεράσες, και από γλυκουρονικές τρανσφεράσες αντίστοιχα (Manach, 2004). Η προσθήκη αυτή συμβαίνει σε όλες τις ξενοβιοτικές ουσίες με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η απέκκριση τους είτε μέσω της χολής είτε με τα ούρα. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή ένα σημαντικό ποσοστό των γλυκουρονιδίων που σχηματίζονται στο βλεννογόνο του εντέρου εκκρίνεται πίσω στον εντερικό αυλό και έτσι μειώνεται η καθαρή απορρόφησή τους (Crespy, 1999). Οι μεταβολίτες των πολυφαινολών δεν βρίσκονται στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή αλλά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη (Boulton, 1998). Η επίδραση της σύνδεσης των πολυφαινολών με την αλβουμίνη στις βιολογικές τους δράσεις δεν είναι γνωστή, αν και μία μελέτη (Dangles, 1999) έδειξε ότι η κερκετίνη (μία από τις πιο κοινές πολυφαινόλες) διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση μετά τη σύνδεσή της με την αλβουμίνη. Αν και μέχρι σήμερα οι μεταβολίτες λίγων πολυφαινολών είναι γνωστοί, η αναγνώρισή τους είναι σημαντική γιατί μπορεί να έχουν διαφορετική δράση από τις αρχικές πολυφαινόλες.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των πολυφαινολών στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και 10μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Bell, 2000; Graefe, 2001; Lee, 1995; Rein, 2000; Manach, 2004). Μία μελέτη (Duthie, 1998) έδειξε ότι μετά από κατανάλωση 100ml κόκκινου κρασιού (που περιέχει περίπου 500mg πολυφαινολών), η συνολική ποσότητα των πολυφαινολών στο πλάσμα ήταν 15μM. Ήταν όμως ενδιαφέρον ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης στο πλάσμα αντιστοιχούσε σε 50μM πολυφαινολών, γεγονός που δείχνει ότι είχαν σχηματιστεί μη γνωστοί μεταβολίτες που δεν υπολογίστηκαν στο συνολικό ποσό των πολυφαινολών και οι οποίοι όμως είχαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η διάρκεια ημιζωής των πολυφαινολών στο πλάσμα έχει υπολογιστεί από 2 έως 11 ώρες ανάλογα με τον τύπο της πολυφαινόλης, γεγονός που δείχνει ότι στο πλάσμα θα μπορούσαν να διατηρηθούν οι πολυφαινόλες σε σημαντικές συγκεντρώσεις μετά από τακτική κατανάλωση φυτικών τροφών (Cao, 2001; Bell, 2000; Graefe, 2001). Η απέκκριση των πολυφαινολών γίνεται είτε μέσω

της χολής (κυρίως των πολυμερισμένων μορφών) είτε με τα ούρα. Ένα ποσοστό των αγλυκονικών μορφών που αποβάλλεται με τη χολή μπορεί να επαναπορροφηθεί μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας (Coldham και Sauer 2000).

Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωοθήκες) (Fritz, 1998; Chang, 2000; Wang, 2002). Επιπλέον, μπορεί στο πλάσμα να υπερτερούν οι αγλυκονικές μορφές των πολυφαινολών και στους ιστούς οι γλυκοσιδικές ή το αντίστροφο ενώ μπορεί να εμφανίζονται στους ιστούς και διαφορετικοί μεταβολίτες λόγω του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού (Hong, 2002; Maubach, 2003).

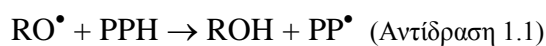
### **1.6.2 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών**

Η μεγάλη εξάπλωση των πολυφαινολών στα φυτά οφείλεται στις πολλές και ποικίλες ιδιότητές τους. Συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα. Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach, 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύνοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach, 2004; Di Carlo, 1999; Harborne 1986).

#### **1.6.2.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση**

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινολών που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blocina, 2003; Ferguson, 2001).

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες (αντίδραση 1.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 1.2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson, 2001).



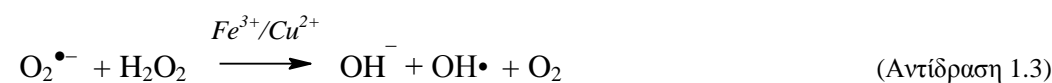
Όπου :  $RO^{\bullet}$ : η ελεύθερη ρίζα

PPH: η πολυφαινόλη

$PP^{\bullet}$ : η φαινολική ρίζα



Η ικανότητα των πολυφαινολών, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν, πιθανότατα στοχευμένα, ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (αντίδραση 1.3) και της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 1.4) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών (Nijveldt, 2001). Η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες καθιστώντας τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά αφού έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας τις ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim, 2002).

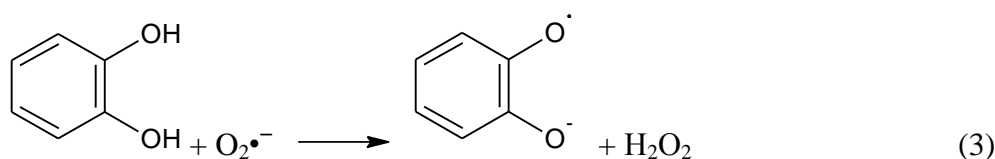
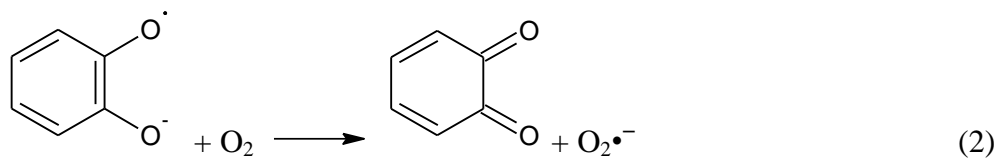
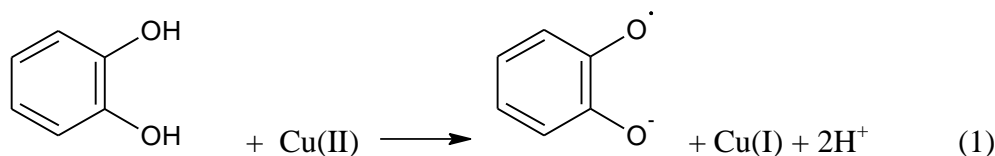


Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans, 1996).

Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, όπως είναι η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση (Robak, 1988) και η οξειδάση της ξανθίνης (Chang, 1993). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, όπως είναι η καταλάση, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Breinhold, 1999). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να γίνεται με άμεση ή έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element ή ARE) (Yu, 1997). Το ARE βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους.

Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman, 1989). Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το  $Fe^{3+}$  ή το  $Cu^{2+}$  σε  $Fe^{2+}$  και  $Cu^{1+}$  αντίστοιχα (Yoshino, 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό  $OH\cdot$ . Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των πολυφαινολών με το  $Fe^{3+}$  ή το  $Cu^{2+}$  μπορεί να προκαλέσει μέσω μιας σειράς αντιδράσεων (Σχήμα 1.1) και το σχηματισμό  $H_2O_2$ , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton (Sakihama, 2002). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino, 1999) και άρα έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto, 2003, Fukumoto και Mazza 2000).





**Εικόνα 8** Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Η οξείδωση της πολυφαινόλης από το Cu(II) οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικιμόνης (αντίδραση 1), η οποία μπορεί να αντιδράσει με O<sub>2</sub> και να σχηματίσει τη ρίζα του O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (αντίδραση 2). Η αντίδραση αυτή έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα, αφού το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> μπορεί να αντιδράσει με την αρχική πολυφαινόλη και να ξανασηματιστεί η ημικιμόνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (αντίδραση 3). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να σχηματιστεί και από την αντίδραση του O<sub>2</sub><sup>•-</sup> με H<sup>+</sup> (αντίδραση 4). Τέλος ο Cu(I) μπορεί να αντιδράσει με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσω της αντίδρασης Fenton και να οδηγήσει στην παραγωγή OH<sup>•</sup> (αντίδραση 5).

### 1.6.2.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικά ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως αντιμεταλλαξιγόνου εξαρτάται από την ακριβή χημική δομή της και από το αν η ουσία αυτή ήταν παρούσα πριν ή κατά την διάρκεια της έκθεσης σε κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι διάφορες αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες έχουν προκύψει από παρατήρηση της δράσης τους παρουσία κάποιων μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές είναι μη εξειδικευμένες

όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιόνων μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001).

Γενικά οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις πολυφαινόλες είναι οι ακόλουθοι: επίδραση στην σύνθεση και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, επίδραση στην δέσμευση των μεταλλαξιόνων, όπως το διβενζοπυρένιο, στο DNA, αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II και τέλος επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών (Ferguson, 2001).

### **1.6.2.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών**

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog, 1993; Knekt, 1996) και προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt, 2002), του στήθους (Dai, 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas, 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand, 2000). Η προστατευτική αυτή δράση παρέχεται μέσα από ποικίλους αντικαρκινικούς μηχανισμούς. Ακόμη, η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής παρέχει κάποιου είδους προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans, 1994) και του έλκους (Alarcon, 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιϊκές (Chu, 1992) αντιαλλεργικές (Di Carlo, 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia, 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach, 2004).

## **1.7. Rosaceae**

Η Rosaceae είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια (η οικογένεια των ρόδων) ανθοφόρων φυτών, που συμπεριλαμβάνει περίπου 2830 είδη σε 95 γένη (Steves, 2001). Το όνομα προέρχεται από το είδος του γένους *Rosa*. Μεταξύ των γενών με τα περισσότερα είδη γένη *αλχεμίλλα* (270), *Sorbus* (260), *Crataegus* (260), *Cotoneaster* (260), και *Rubus* (250) (Steves, 2001), αλλά το μεγαλύτερο γένος είναι το γένος *Prunus* (δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βερίκοκα και αμύγδαλα) με περίπου 430

είδη. Ωστόσο, αυτοί οι αριθμοί θα πρέπει να θεωρηθούν μικροί καθώς υπάρχουν αρκετά φυτικά είδη που δεν έχουν ταξινομηθεί.

Τα Rosaceae μπορεί να είναι βότανα, θάμνοι ή δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, αλλά μερικά είναι αειθαλή (Watson and Dallwitz, 1992). Παρουσιάζουν παγκόσμια εξάπλωση, αλλά μεγαλύτερη ποικιλία υπάρχει στο βόρειο ημισφαίριο.

Πολλά οικονομικά σημαντικά προϊόντα προέρχονται από τα φυτά της οικογένειας Rosaceae, συμπεριλαμβανομένων πολλών βρώσιμων φρούτων (όπως μήλα, αχλάδια, κυδώνια, βερίκοκα, δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βατόμουρα, μούσμουλα, και φράουλες), τα αμύγδαλα, και καλλωπιστικά δέντρων και θάμνοι (όπως τριαντάφυλλα και σορβιές) (Watson and Dallwitz, 1992). Επίσης, είδη των γενών *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Kerria*, *Photinia*, *Potentilla*, *Prunus*, *Pyracantha*, *Rhodotypos*, *Rosa*, *Sorbus* και *Spiraea* χρησιμοποιούνται κυρίως ως καλλωπιστικοί θάμνοι.

Από την άλλη πλευρά, κάποια από τα γένη αποτελούν επιβλαβή ζιζάνια σε ορισμένα μέρη του κόσμου, και για αυτό πρέπει να ελέγχονται. Αυτά τα φυτά μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποικιλομορφία των τοπικών οικοσυστημάτων μετά την καθιέρωσή τους. Τέτοια παρασιτικά είδη περιλαμβάνουν τα γένη *Acaena*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, και *Rosa*.

### **1.8. Ροδιά**

Το ρόδι με τη βοτανική ονομασία *Punica granatum*, είναι ένα φρούτο που προέρχεται από φυλλοβόλους θάμνους ή από μικρό δέντρο που έχει ύψος μεταξύ 5 και 8 μέτρων. Στο Βόρειο Ημισφαίριο, ο καρπός παράγεται συνήθως την περίοδο από τον Σεπτέμβριο μέχρι τον Φεβρουάριο (LaRue and James H, 1980) και στο νότιο ημισφαίριο από Μάρτιο έως Μάιο.

Το ρόδι θεωρείται ότι προέρχεται από την περιοχή του Ιράν και τη βόρεια Ινδία, και έχει καλλιεργηθεί από τους αρχαίους χρόνους. Αναφέρεται σε πολλά αρχαία κείμενα, κυρίως σε βαβυλώνια κείμενα και στη Βιβλία της Εξόδου. Εισήχθη στην Λατινική Αμερική και την Καλιφόρνια από τους Ισπανούς αποίκους στο 1769.

Σήμερα, καλλιεργείται ευρέως σε όλη την περιοχή της Μεσογείου, της νότιας Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και της περιοχής του Καυκάσου, τη Βόρεια Αφρική και την τροπική Αφρική, την Ινδική Χερσόνησο, την Κεντρική Ασία, και τα ξηρότερα

μέρη της νοτιοανατολικής Ασίας (Morton JF, 1987). Καλλιεργείται επίσης σε τμήματα της Καλιφόρνιας και την Αριζόνα. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει πιο κοινή στις εμπορικές αγορές της Ευρώπης και του δυτικού κόσμου.

### **1.8.1. Θρεπτικά συστατικά και φυτοχημικά**

Μια μερίδα 100g των καρπών ροδιού παρέχουν 12% της προτεινόμενης ημερήσιας πρόσληψης (DV) για τη βιταμίνη C και 16% της προτεινόμενης ημερήσιας πρόσληψης (DV) για τη βιταμίνη K. Περιέχει πολυφαινόλες, όπως ελλαγιτανίνες και φλαβονοειδή. Οι καρποί ροδιού είναι εξαιρετικές πηγές διαιτητικών ινών, που περιέχονται εξ ολοκλήρου στους βρώσιμους σπόρους. Οι άνθρωποι που επιλέγουν να απορρίψουν τους σπόρους χάνουν θρεπτικά οφέλη από τις ίνες των σπόρων και ιχνοστοιχεία. Τα λίπη του ροδιού περιέχουν πουνινικό οξύ (65.3%), παλμιτικό οξύ (4,8%), στεατικό οξύ (2,3%), ελαϊκό οξύ (6,3%), και το λινελαϊκό οξύ (6,6%) (Schubert , 1999).

### **1.8.2. Πολυφαινολική σύσταση του χυμού Ροδιού**

Η μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολών που απαντώνται στον χυμό του ροδιού είναι οι υδρολύσιμες ταννίνες που ονομάζεται ellagitannins και σχηματίζονται όταν το ελλαγικό οξύ συνδέεται με υδατάνθρακες. Οι διαφορετικές ελλαγιτανίνες του ροδιού (επίσης γνωστή ως πουνικαλαγίνες) είναι οι granatin A και B, punicalcorlein A, B, Γ και Δ, 5-O-galloylpunicalcorlein D, punicalfolin, punigluconin, πουνικαλαγίνη, 1-αλφα-O-galloylpunicalagin, πουνικαλίνη και 2- O-galloyl-πουνικαλίνης.

Το κόκκινο χρώμα του χυμού μπορεί να αποδοθεί στις ανθοκυανίνες, όπως δελφινιδίνη, κυανιδίνη και οι γλυκοζίτες πελαργονιδίνης. Γενικά, μια αύξηση της μελάγχρωσης του χυμού συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού (Hernández, 1999). Το φαινολικό περιεχόμενο του χυμού ροδιού επηρεάζεται αρνητικά από τις τεχνικές επεξεργασίας και παστερίωσης (Alper, 2005).

### **1.8.3. Πιθανά οφέλη για την υγεία**

Οι ελλαγιτανίνες του ροδιού, που ονομάζεται επίσης πουνικαλαγίνες, έχει δειχθεί ότι έχουν ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών (Kulkarni, 2007) και

έχουν πιθανές επιπτώσεις στον άνθρωπο (Heber, 2008). Οι πουνικαλαγίνες απορροφούνται από το ανθρώπινο σώμα και μπορεί να έχουν την διατροφική της αξία, όπως τα αντιοξειδωτικά, αλλά οριστική απόδειξη της αποτελεσματικότητας σε ανθρώπους δεν έχει αποδειχθεί (Seeram, 2006). Κατά τη διάρκεια του εντερικού μεταβολισμού από βακτήρια, οι ελλαγιτανίνες και πουνικαλαγίνες μετατρέπονται σε ουρολιθίνες, οι οποίες έχουν άγνωστη βιολογική δράση in vivo (Bialonska, 2009).

Σε προκαταρκτική εργαστηριακή έρευνα και κλινικές δοκιμές, ο χυμός του ροδιού μπορεί να είναι αποτελεσματικός στη μείωση των παραγόντων κινδύνου καρδιακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης της LDL, την παραγωγή ελευθέρων ριζών από μακροφάγα, και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Aviram, Esmailzadeh, 2004). Σε μια μελέτη υπερτασικών ασθενών, η κατανάλωση χυμού ροδιού για δύο εβδομάδες κατάφερε να μειώσει τη συστολική πίεση του αίματος (Aviram, 2001).

Πολλοί κατασκευαστές τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής χρησιμοποιούν τα φαινολικά εκχυλίσματα ροδιού ως πρόσθετα συστατικά στα προϊόντα τους, αντί του χυμού.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, φυτικών εκχυλισμάτων της οικογενείας Rosaceae και από το φυτό ροδιά (*Punica granatum*). Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Πρόκειται για δύο ελεύθερες ρίζες οι οποίες εξουδετερώνονται από ουσίες με αντιοξειδωτική δράση όπως τα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Δείγματα

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 23 δείγματα εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae και 10 δείγματα του φυτού ροδιά (*punica granatum*). Τα δείγματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Κ.Δ.	Ποικιλία
Δείγμα 1	<i>Pyracantha coccinea</i>
Δείγμα 2	<i>Pyrus spinosa</i>
Δείγμα 3	<i>Rosa canina</i>
Δείγμα 4	<i>Crataegus orientalis</i>
Δείγμα 5	<i>Rubus sanctus</i>
Δείγμα 6	<i>Prunus webii</i>
Δείγμα 7	<i>Rosa sempervirens</i>
Δείγμα 8	<i>Rosa pulverulenta</i>
Δείγμα 9	<i>Prunus mahaleb</i>
Δείγμα 10	<i>Potentilla recta</i>
Δείγμα 11	<i>Sorbus umbellata</i>
Δείγμα 12	<i>Aremonia agrimonoides</i>
Δείγμα 13	<i>Geum urbanum</i>
Δείγμα 14	<i>Potentilla pedata</i>
Δείγμα 15	<i>Alchemilla bulgarica</i>
Δείγμα 16	<i>Alchemilla xanthochlora</i>
Δείγμα 17	<i>Potentilla speciosa</i>
Δείγμα 18	<i>Fragaria vesca</i>
Δείγμα 19	<i>Rubus idaeus</i>
Δείγμα 20	<i>Prunus prostrata</i>
Δείγμα 21	<i>Rosa arvensis</i>
Δείγμα 22	<i>Sanguisorba officinalis</i>
Δείγμα 23	<i>Potentilla hiyraldiana</i>

Πίνακας 1: Δείγματα εκχυλισμάτων Rosaceae

Κ.Δ.	Ποικιλία	Τμήμα Καρπού
W1	Wonderful	Βρώσιμο
W2	Wonderful	Φλοιός
Π1	Περσεφόνη	Βρώσιμο
Π2	Περσεφόνη	Φλοιός
Ξ3	Ξινή Ερμιόνης	Βρώσιμο
A1	Wonderful	Υποπροϊόντα χυμοποίησης
ΠΕ	Περσεφόνη	Βρώσιμο
ΠΛ	Πλούτο	Βρώσιμο
ΠΟ	Πορφυρογέννητη	Βρώσιμο
ΞΙΝΗ	Ξινή Ερμιόνης	Βρώσιμο

Πίνακας 2: Δείγματα εκχυλισμάτων ροδιού

### 3.2. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τις δυο μεθόδους ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma-Germany)
- Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH) (Merck- Germany)
- DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο) [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] (Merck-Γερμανία)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

### 3.3. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των εκχυλισμάτων και της σκόνης χρησιμοποιήθηκαν δύο in vitro μέθοδοι.

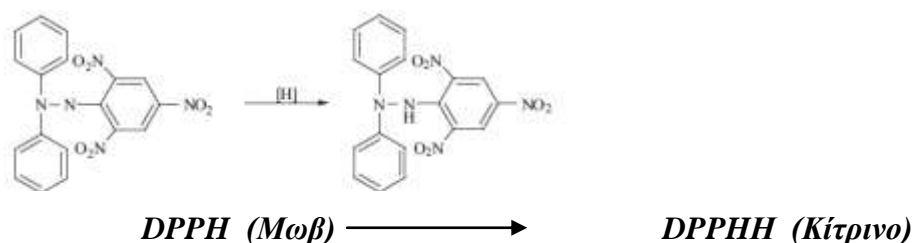
#### 3.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

##### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα



ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH<sup>•</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντίδραση 5). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



**Αντίδραση 1:** Η οξείδωση του DPPH σε δραστική ρίζα

### **Πειραματική διαδικασία**

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH<sup>•</sup> την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH<sup>•</sup>) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε

εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 7). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον σε δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα της ρίζας DPPH\* σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>Μεθανόλη</b>	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
<b>DPPH*</b>	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>V τελ</b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

**Πίνακας 3:** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>Μεθανόλη</b>	1000μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
<b>V τελ</b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

**Πίνακας 4:** Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

### *Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση*

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 517nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_8) / A_0 \times 100$$

$A_0$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

$A_8$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

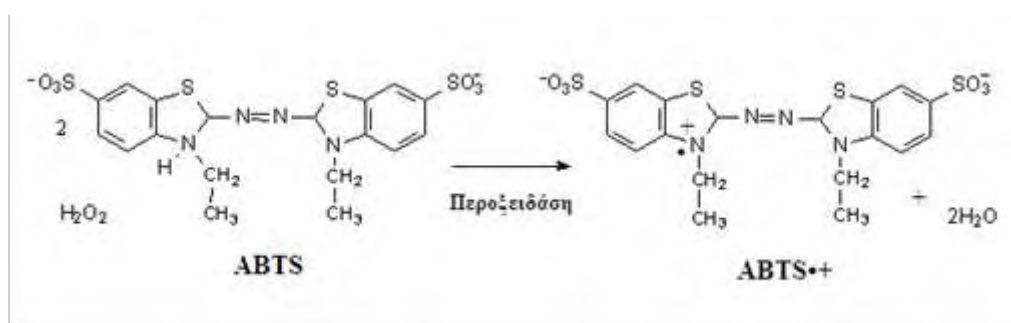
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το  $IC_{50}$ , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές

παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

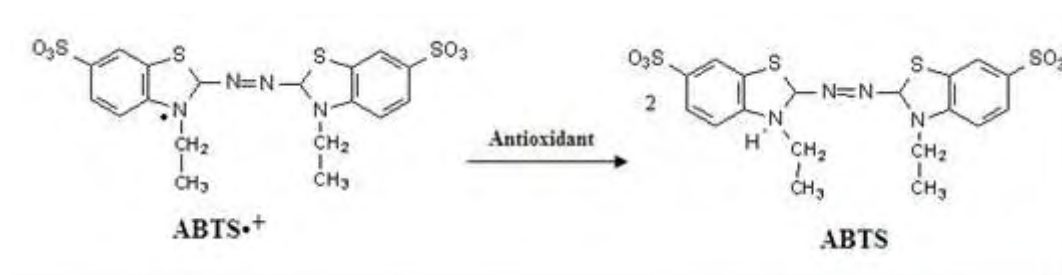
### 3.3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice-Evans, 1993), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του (ABTS) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος ABTS<sup>•+</sup> (Αντίδραση 6). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Αντίδραση 7) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



#### Αντίδραση 2: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



### **Αντίδραση 3:** Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

#### ***Πειραματική διαδικασία***

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 80  $\mu\text{g/ml}$ ).

**Διάλυμα ABTS (1mM):** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ):** Για τελική συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$  30  $\mu\text{M}$  σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα 600  $\mu\text{M}$ . Από το stock διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% 8,8 M αραιώνουμε με  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600  $\mu\text{M}$ .

**Διάλυμα HRP (6  $\mu\text{M}$ ):** Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 $\mu\text{l}$  στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου  $\text{H}_2\text{O}_2$  και το ένζυμο περοξειδάση. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 8). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 10).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
<b>ABTS</b>	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
<b>HRP</b>	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
<b>V τελ</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL

**Πίνακας 5:** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

#### Επώαση 45 min

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
<b>Μεθανόλη</b>	50μl	50μl	-	-	-	-	-
<b>V τελ</b>	1050μl	1050μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl

**Πίνακας 6:** προσθήκη εκχυλίσματος

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
<b>ABTS</b>	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
<b>V τελ</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
<b>Εκχύλισμα</b>	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
<b>Μεθανόλη</b>	50 μL	-	-	-	-	-

**Πίνακας 7:** Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

#### Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 730nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$$

$A_0$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730nm

$A_\delta$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup> που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

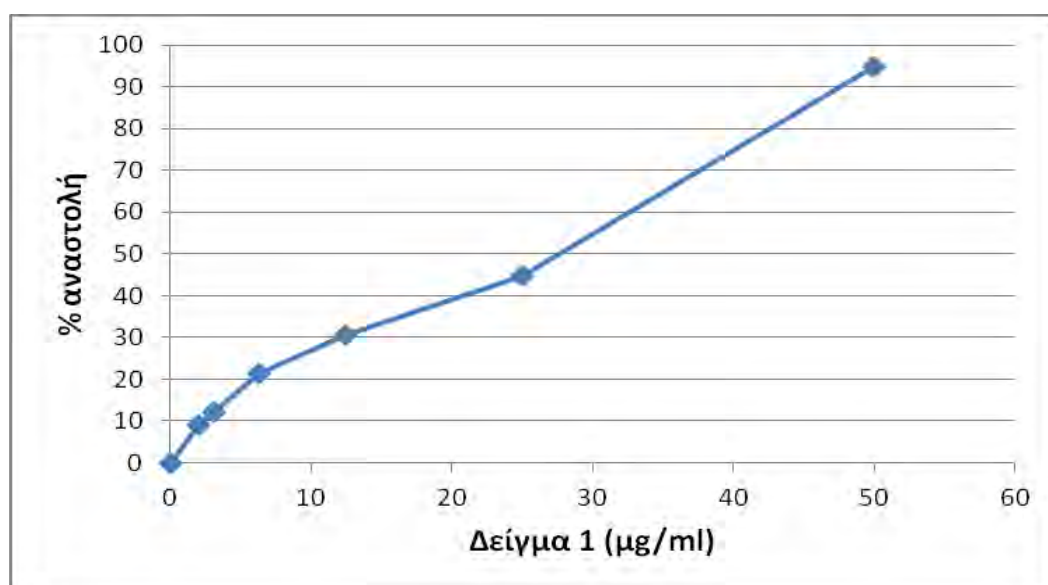
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH<sup>•</sup>

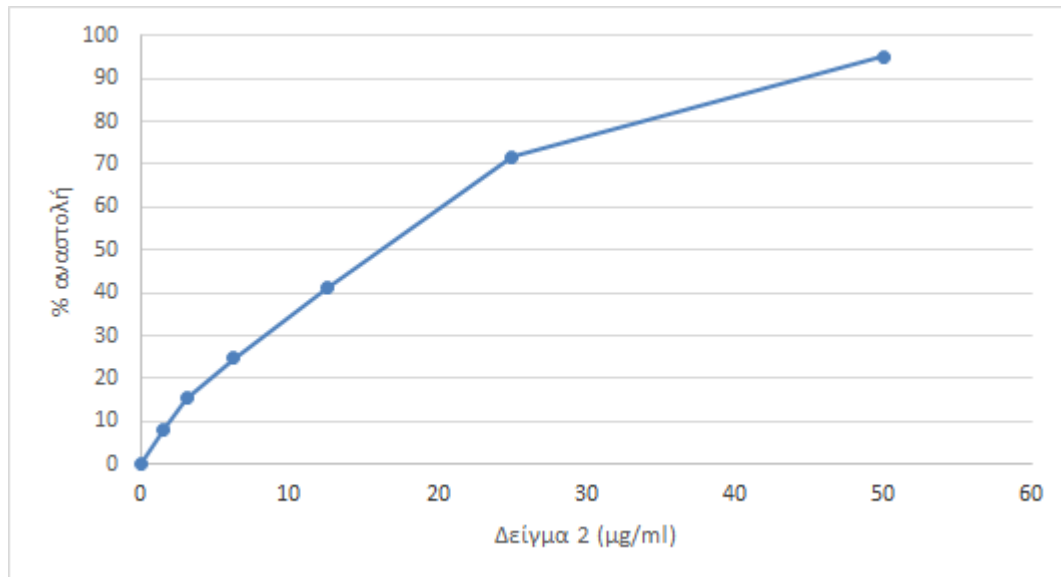
Συνολικά μελετήθηκαν 23 δείγματα εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae και 10 δείγματα του φυτού ροδιά (*Punica granatum*). Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 2,7 μg/ml έως 540 μg/ml.

#### 4.1.1 Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae

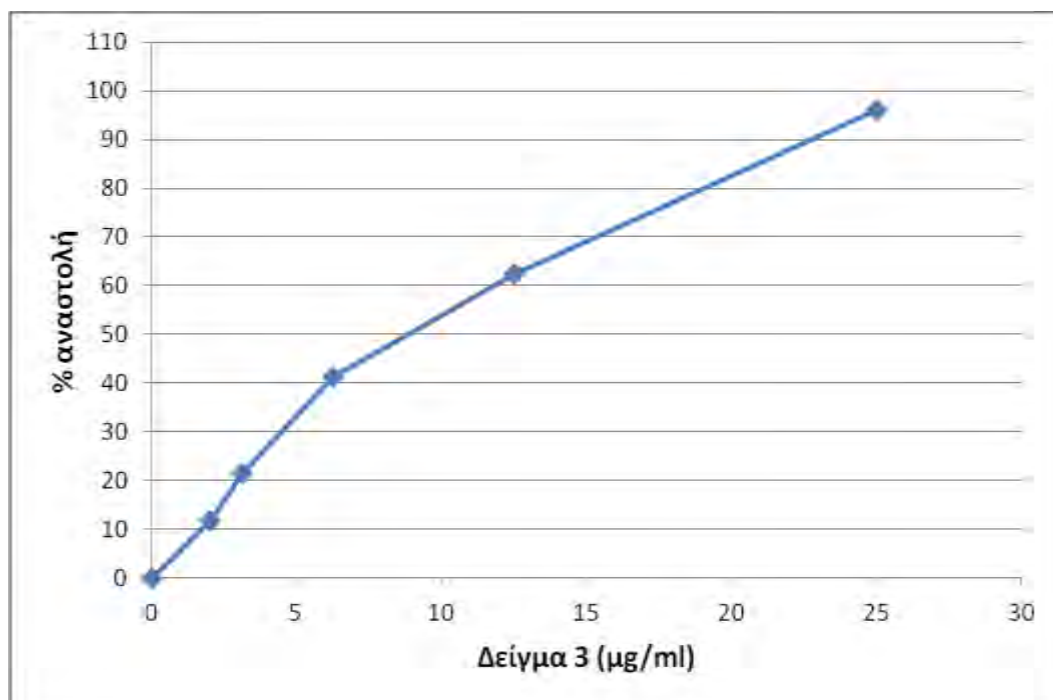
Όσον αφορά τα δείγματα των εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae οι τιμές του IC<sub>50</sub> κυμαίνονταν από 7,5μg/ml έως 580μg/ml. Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το δείγμα 17 με IC<sub>50</sub> 7,5μg/ml.



**Σχήμα 1.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της (IC<sub>50</sub>: 27μg/ml).

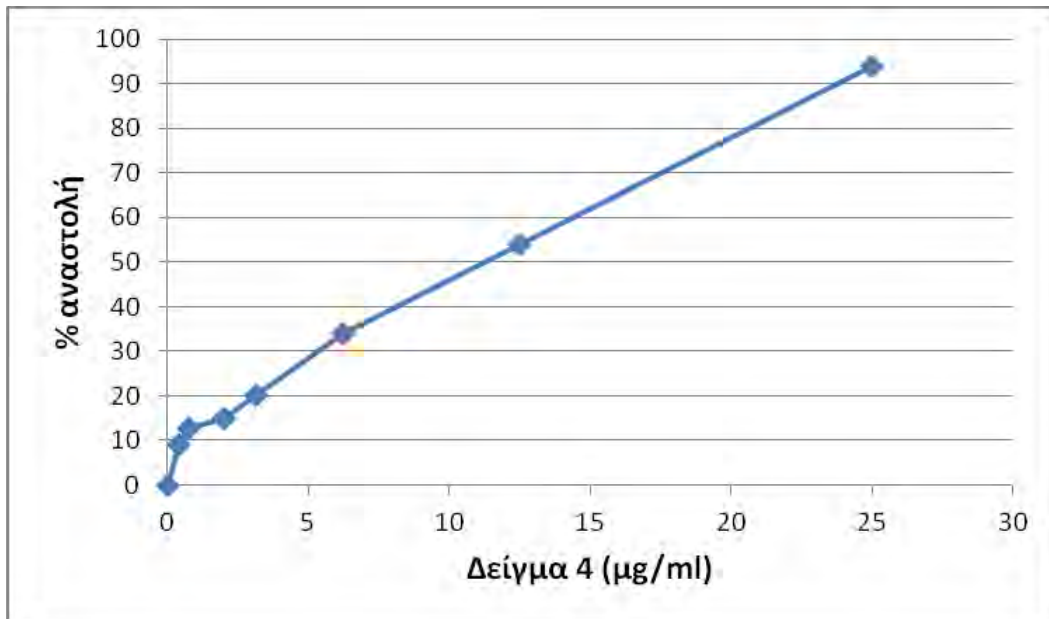


**Σχήμα 2.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 16,5μg/ml).

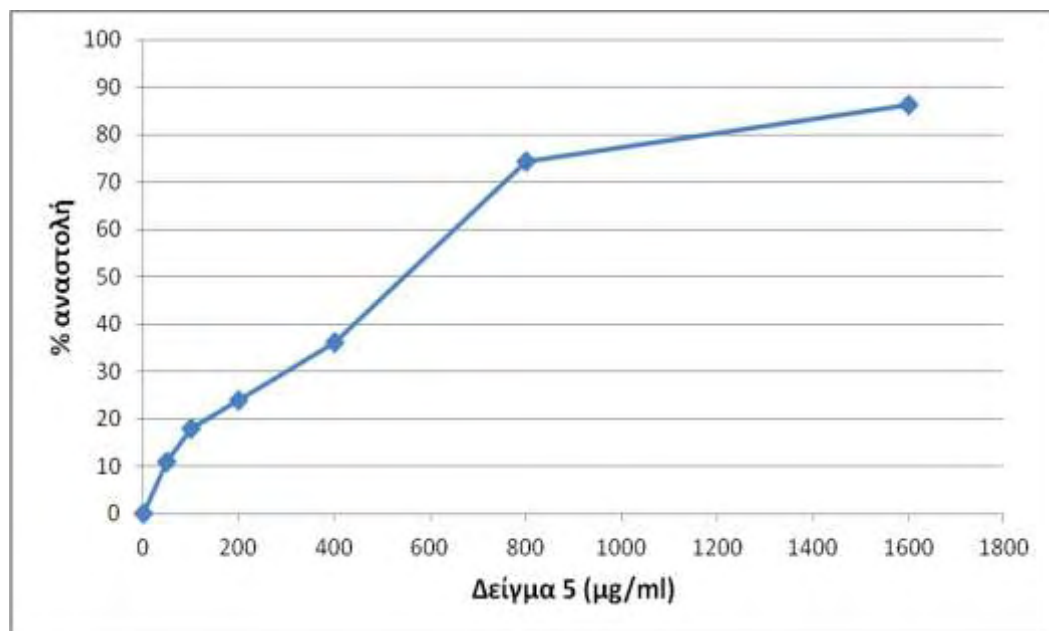


**Σχήμα 3.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 8,9 μg/ml).

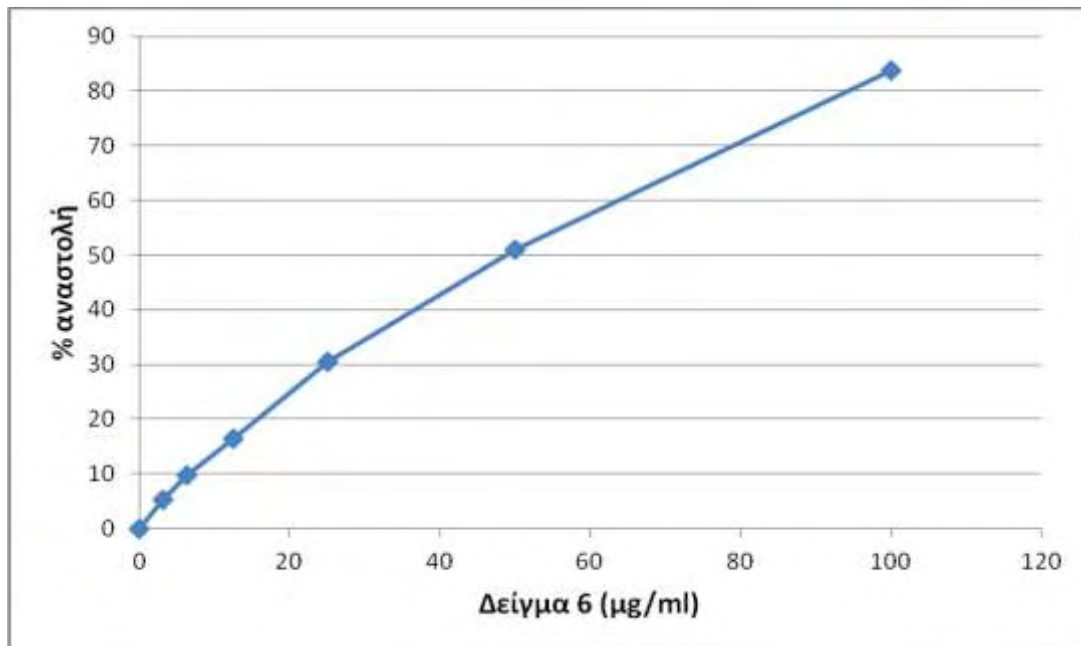




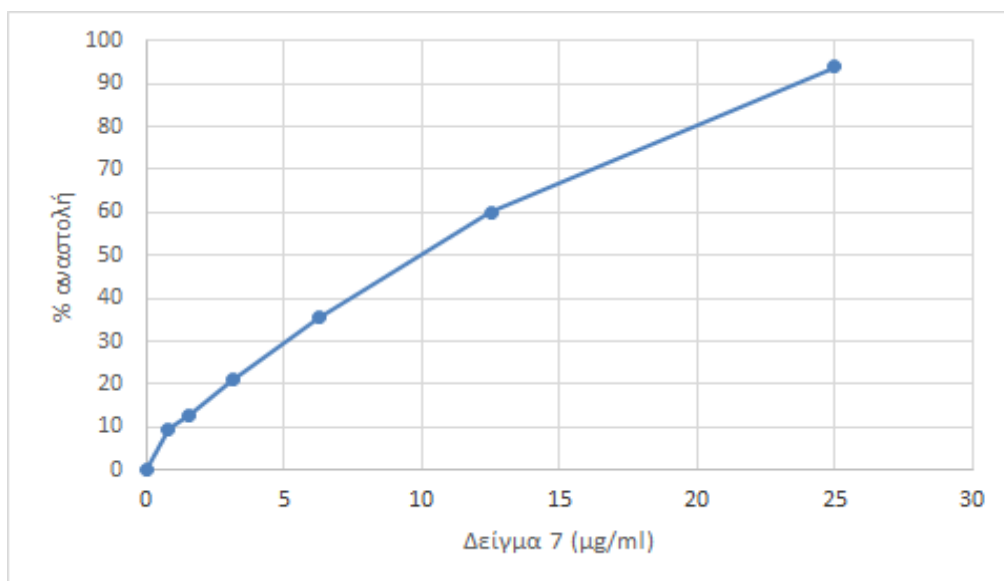
**Σχήμα 4.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 11  $\mu\text{g/ml}$ ).



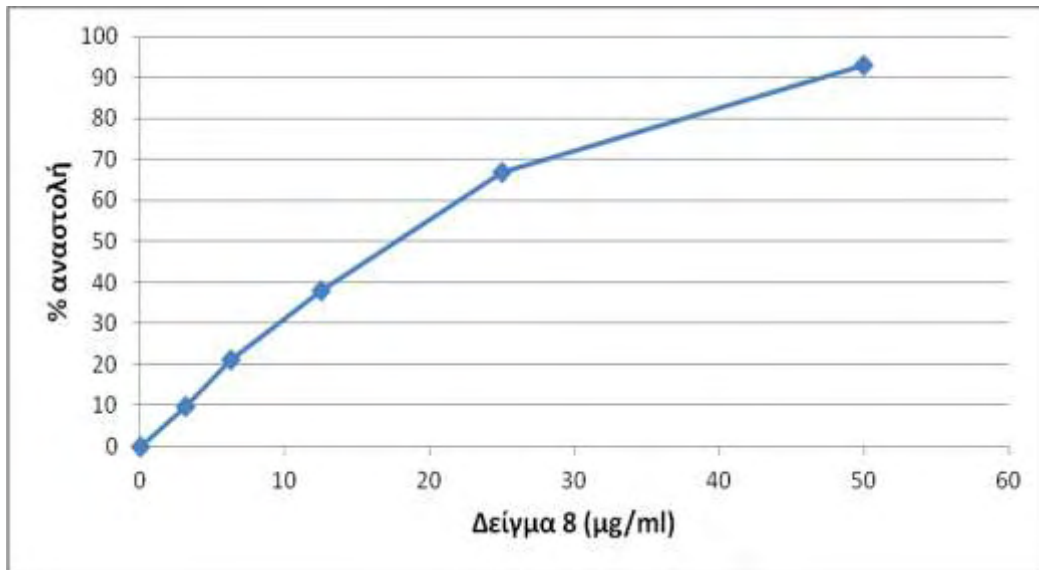
**Σχήμα 5.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 540  $\mu\text{g/ml}$ ).



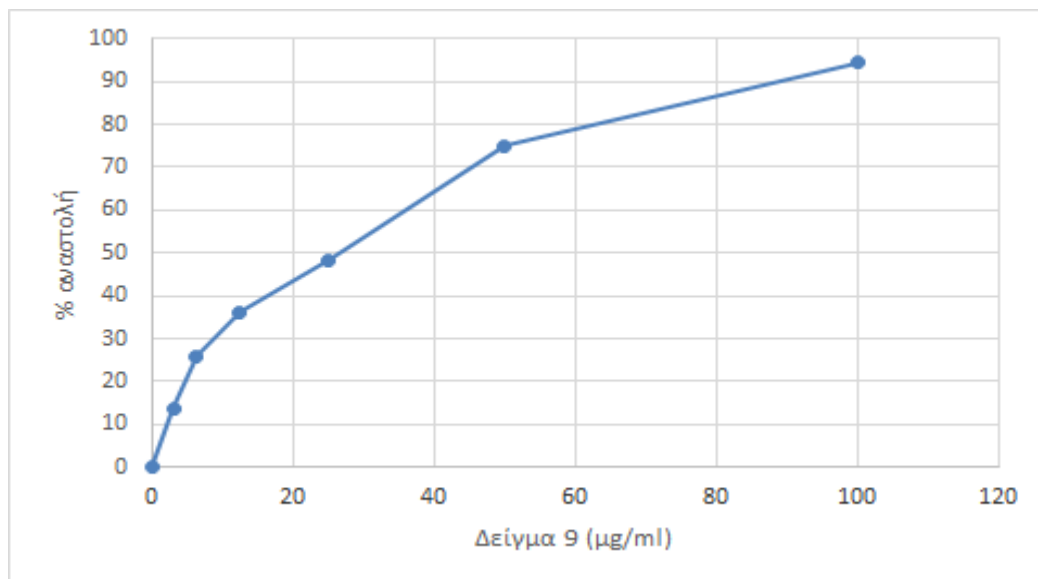
**Σχήμα 6.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 49  $\mu\text{g/ml}$ ).



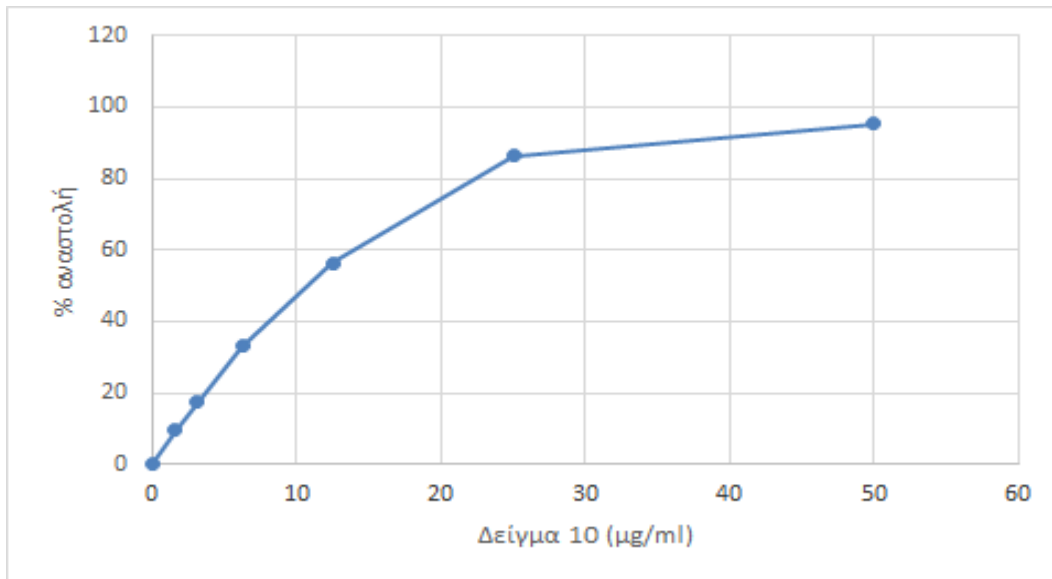
**Σχήμα 7.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 10  $\mu\text{g/ml}$ ).



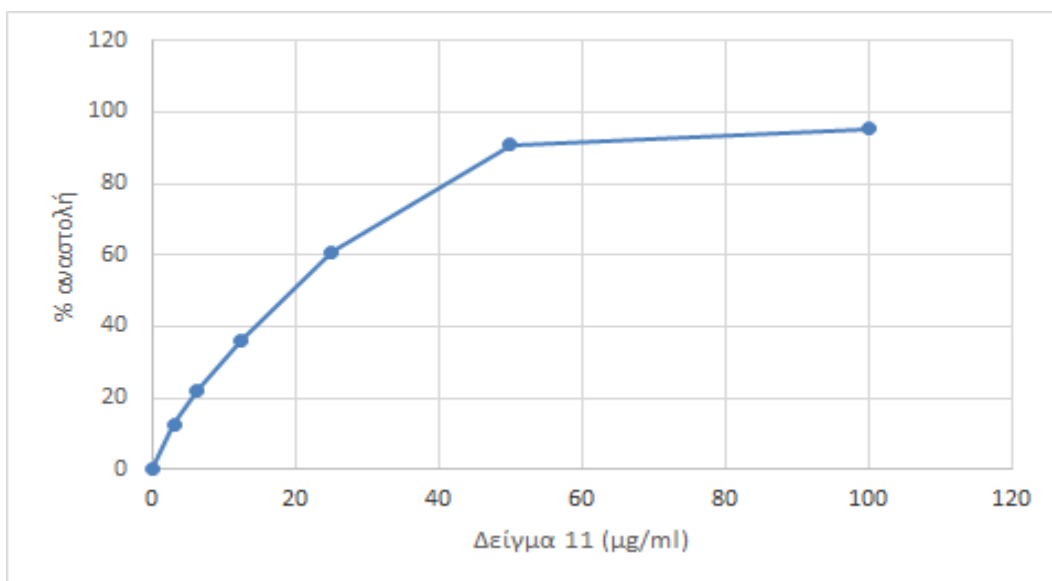
**Σχήμα 8.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 17  $\mu\text{g/ml}$ )



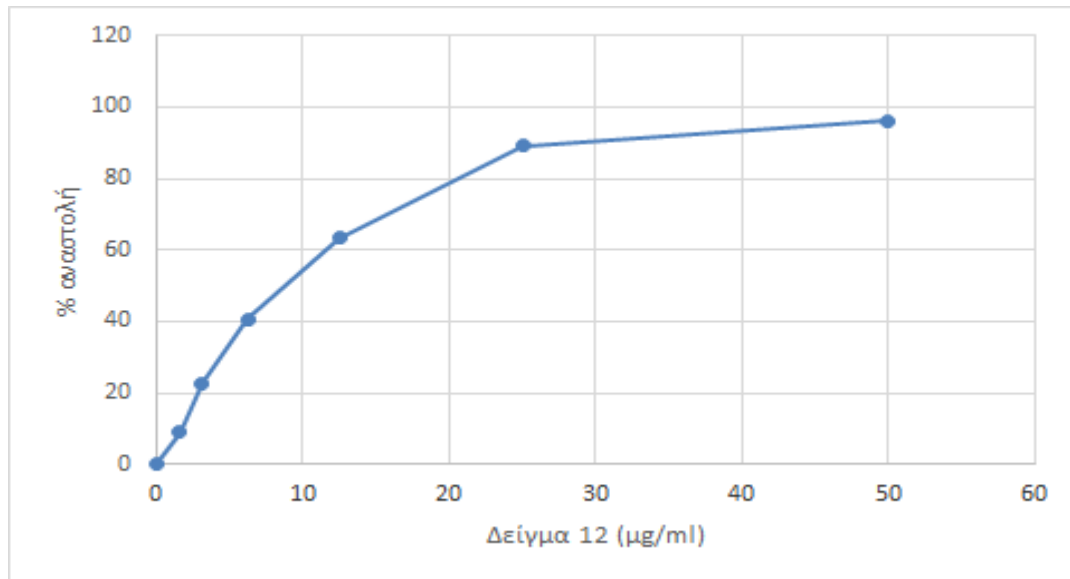
**Σχήμα 9.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 26  $\mu\text{g/ml}$ )



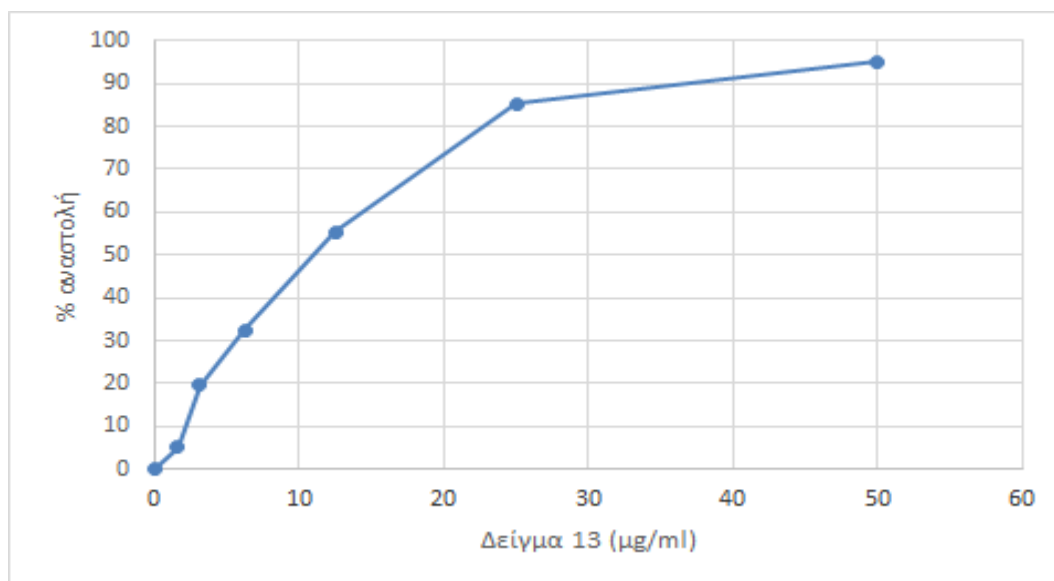
**Σχήμα 10.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 10,5 µg/ml)



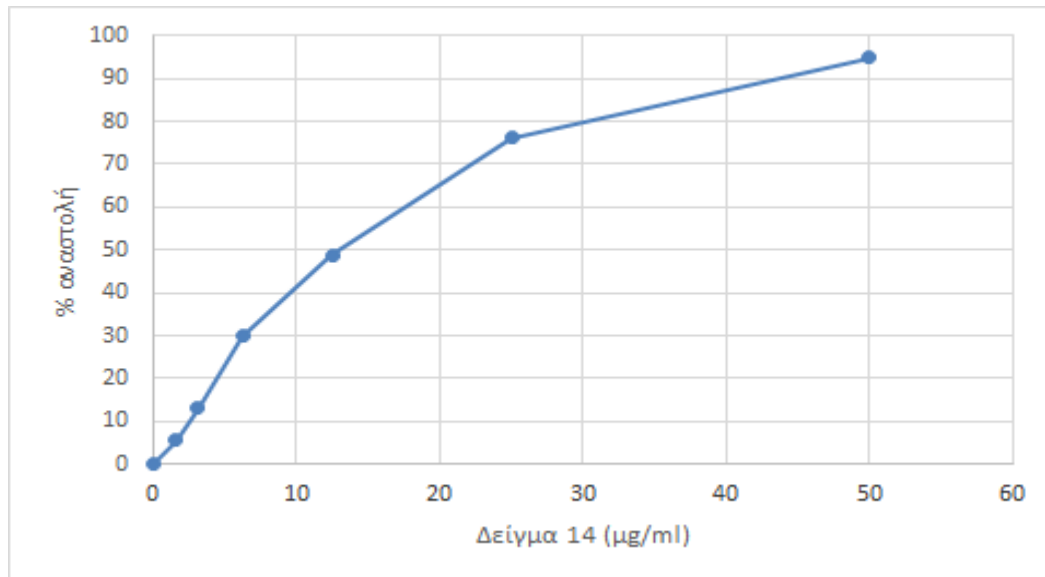
**Σχήμα 11.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 19 µg/ml)



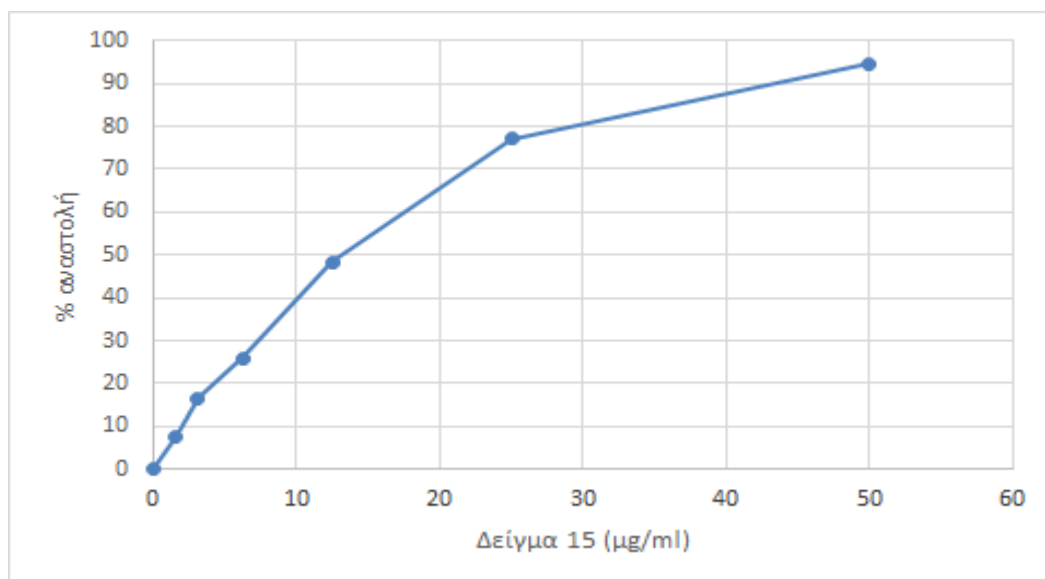
**Σχήμα 12.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 8,5  $\mu\text{g/ml}$ )



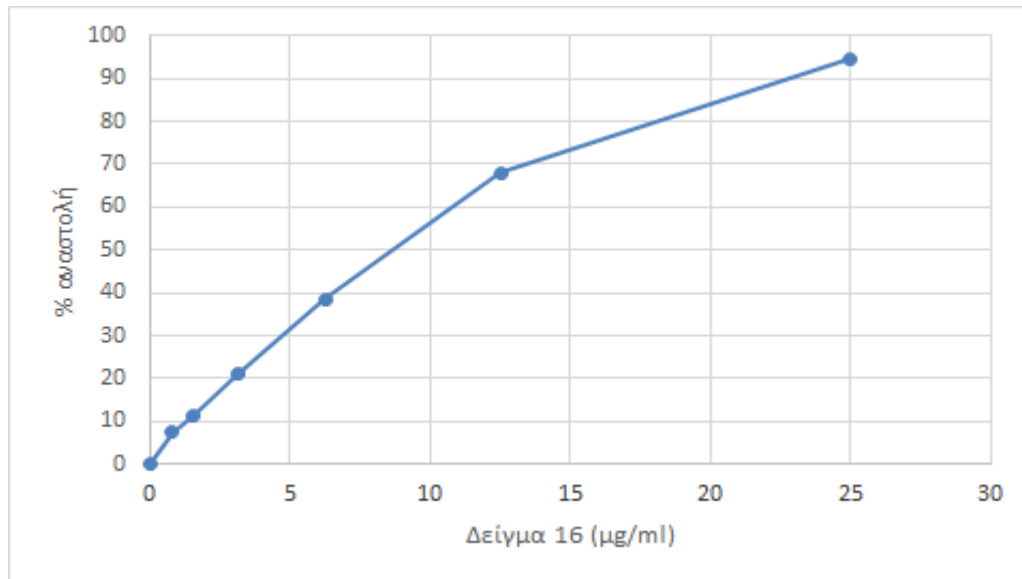
**Σχήμα 13.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 11  $\mu\text{g/ml}$ )



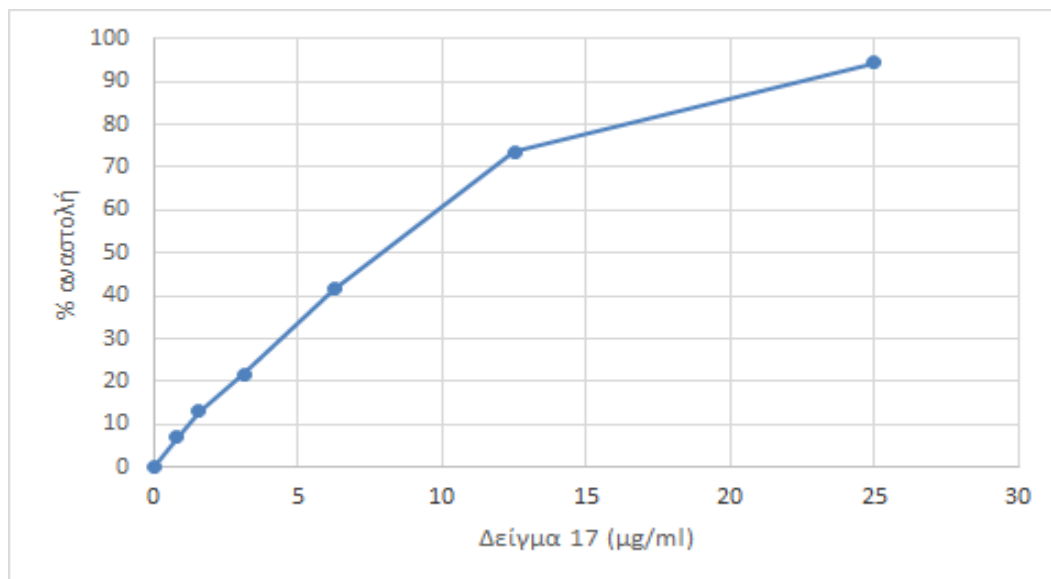
**Σχήμα 14.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 13  $\mu\text{g/ml}$ )



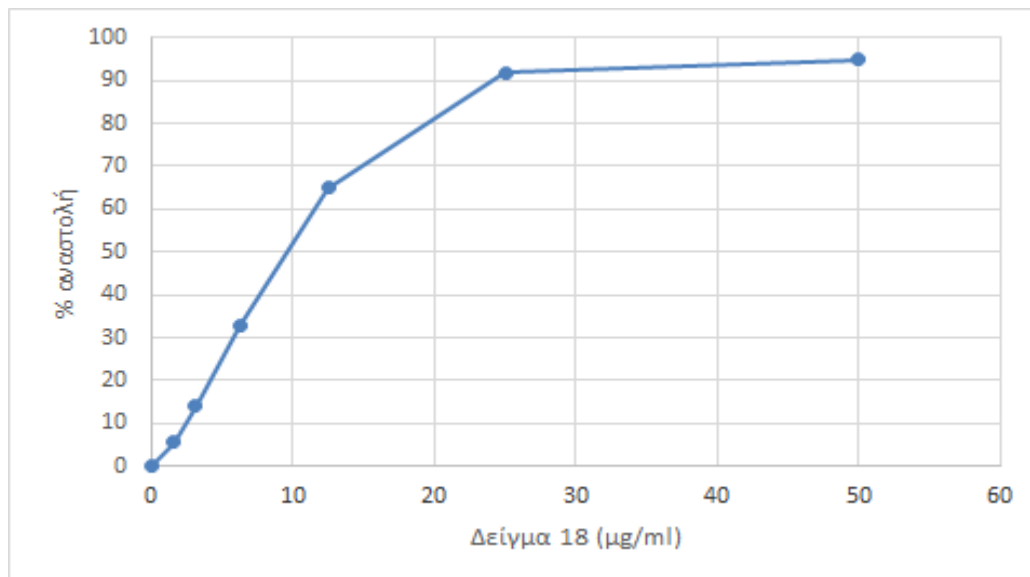
**Σχήμα 15.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 13  $\mu\text{g/ml}$ )



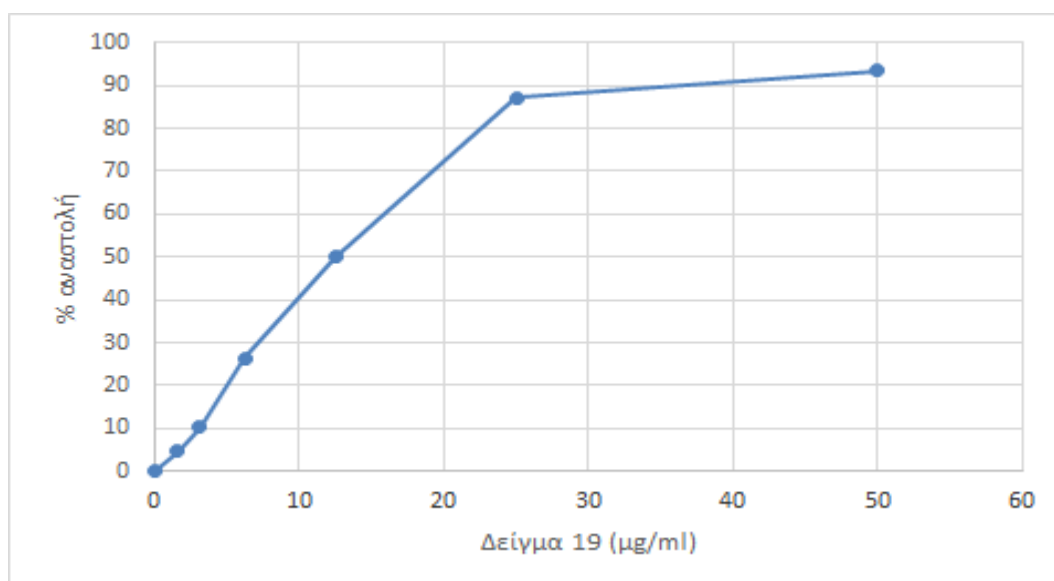
**Σχήμα 16.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 8,5  $\mu\text{g/ml}$ )



**Σχήμα 17.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 7,5  $\mu\text{g/ml}$ )

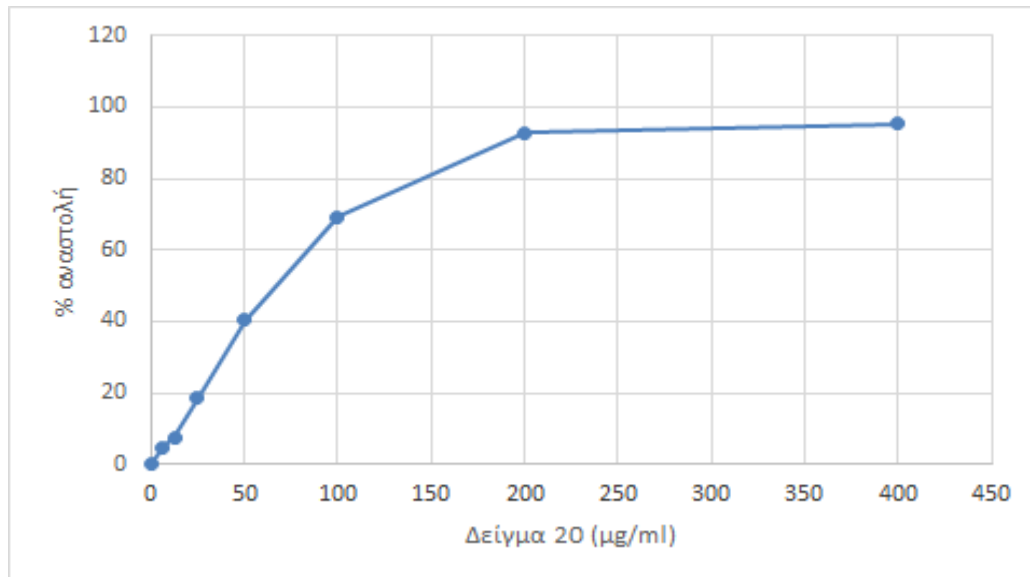


**Σχήμα 18.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 9,5  $\mu\text{g/ml}$ )

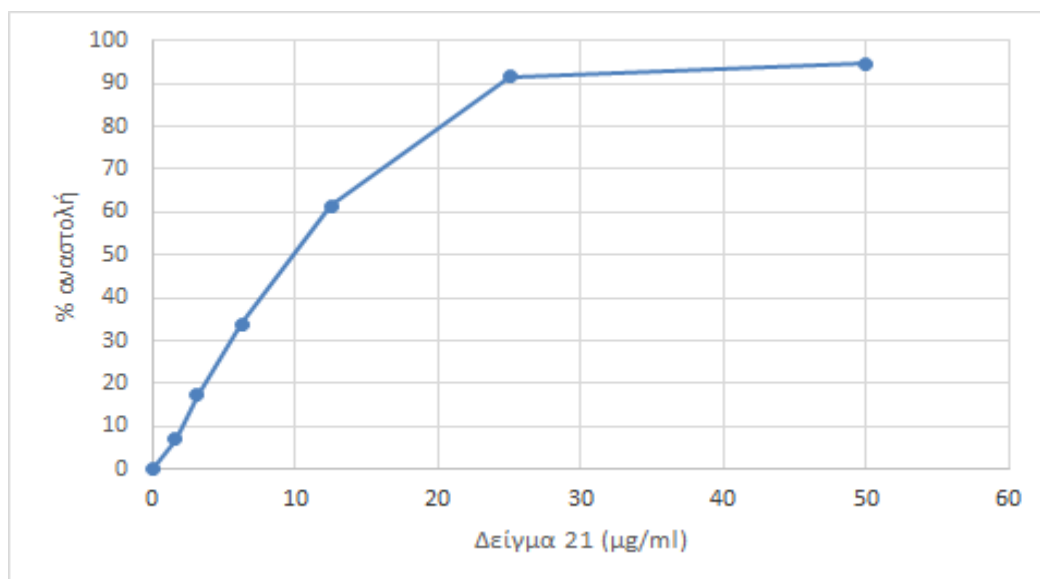


**Σχήμα 19.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 12  $\mu\text{g/ml}$ )

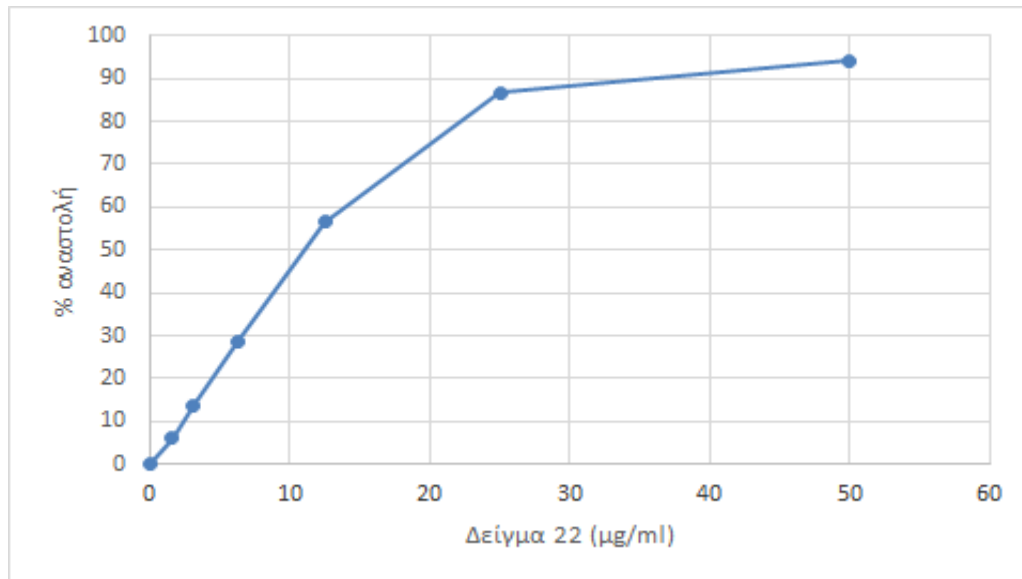




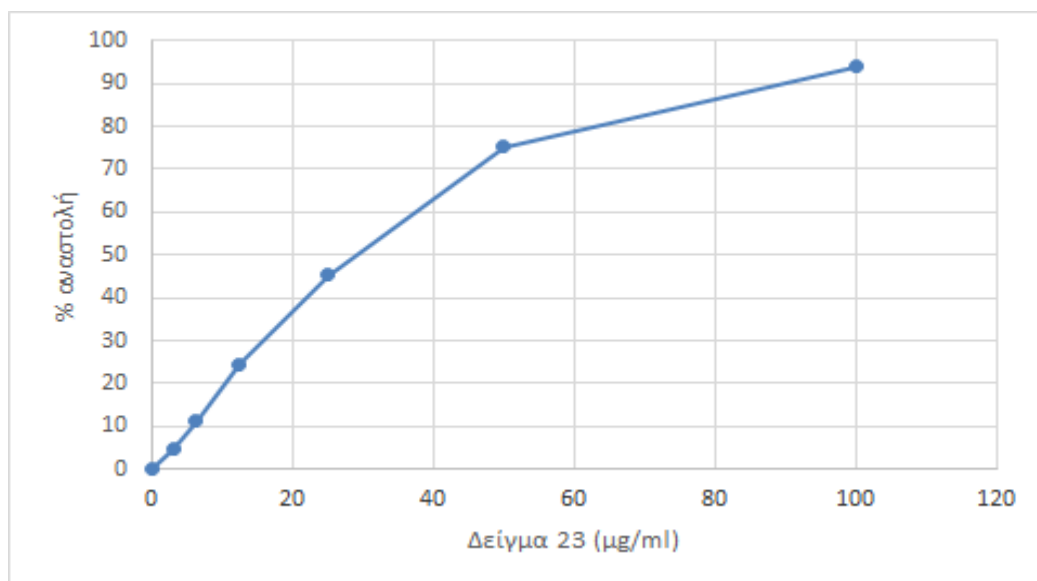
**Σχήμα 20.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 65  $\mu\text{g/ml}$ )



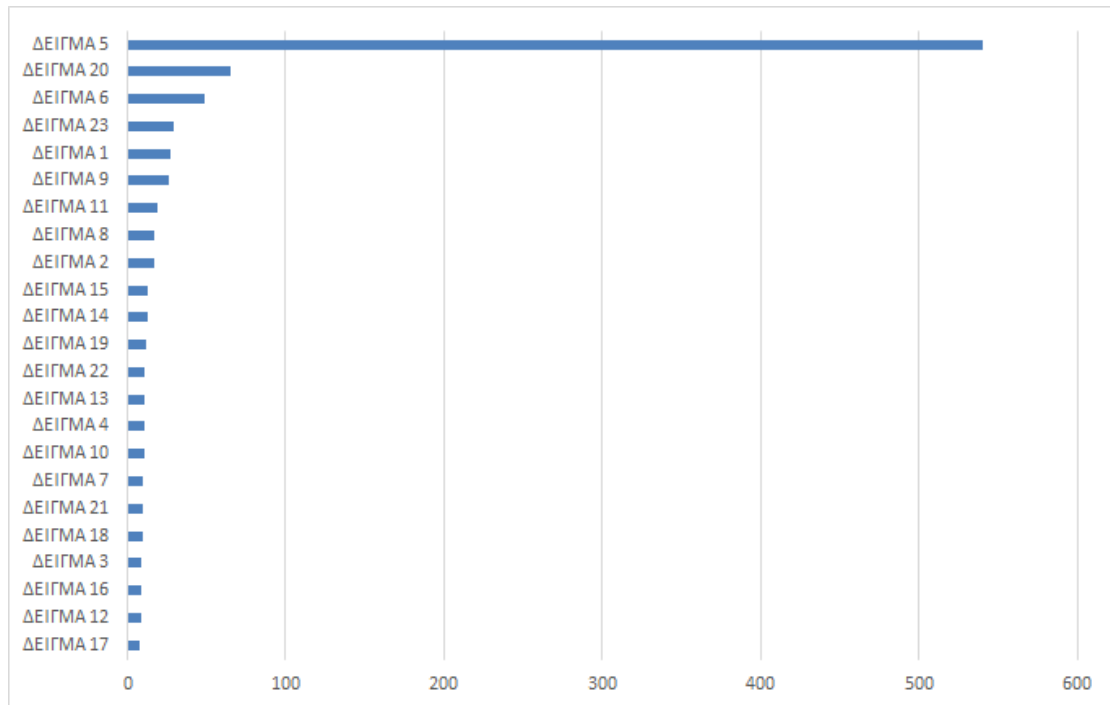
**Σχήμα 21.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 9,5  $\mu\text{g/ml}$ )



**Σχήμα 22.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 11  $\mu\text{g/ml}$ )



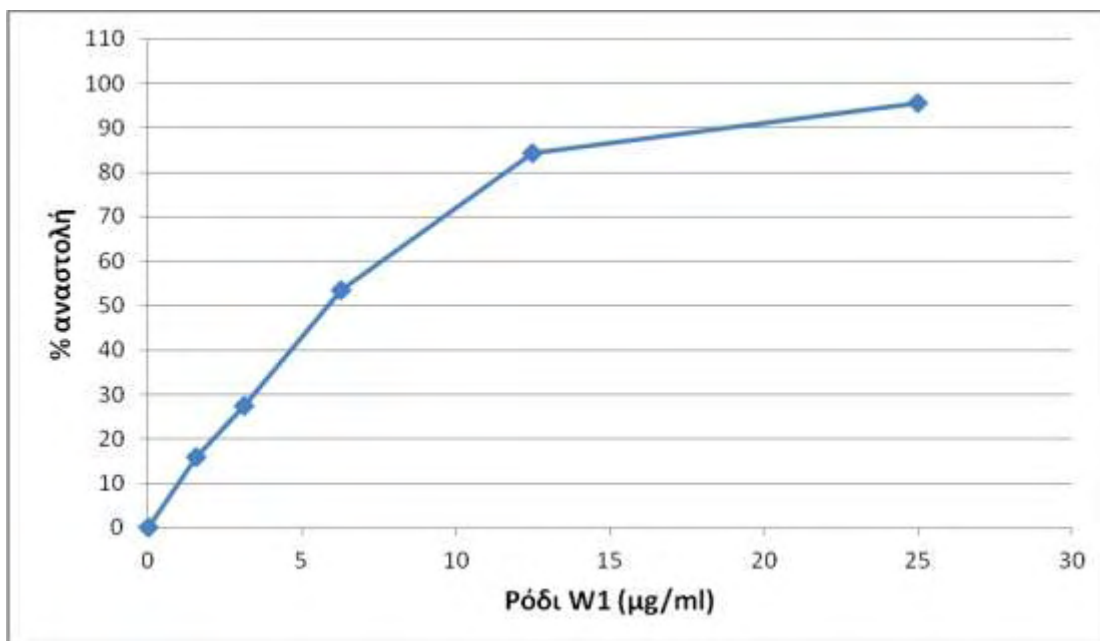
**Σχήμα 23.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 29  $\mu\text{g/ml}$ )



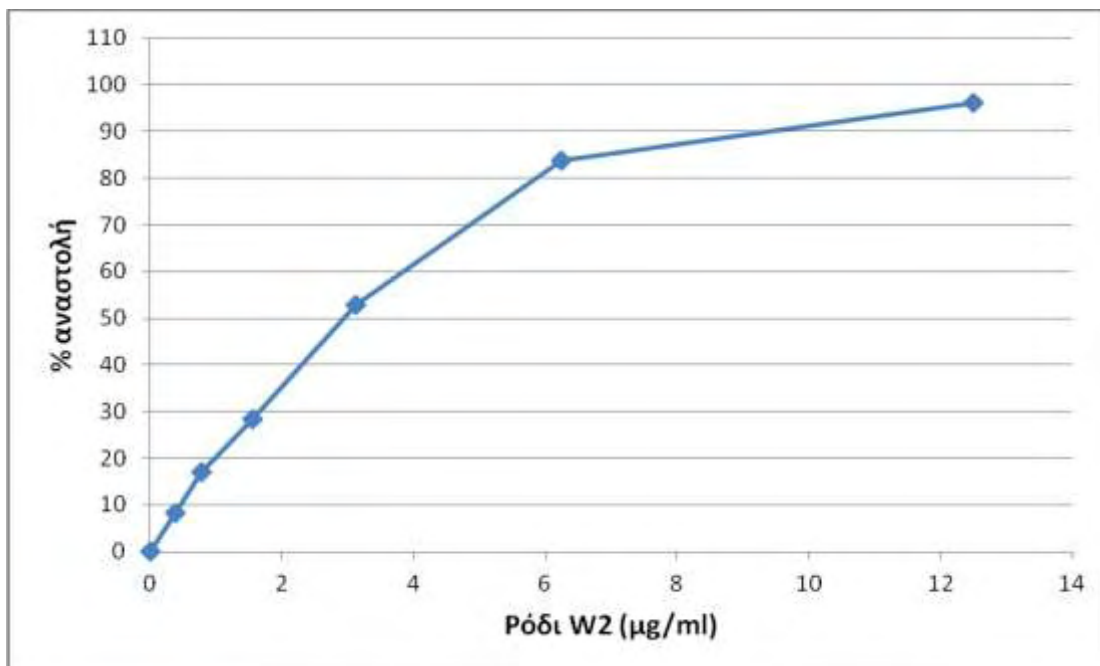
**Σχήμα 24.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από ποικιλίες φυτών της οικογένειας Rosaceae.

#### 4.1.2. Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών Ροδιά

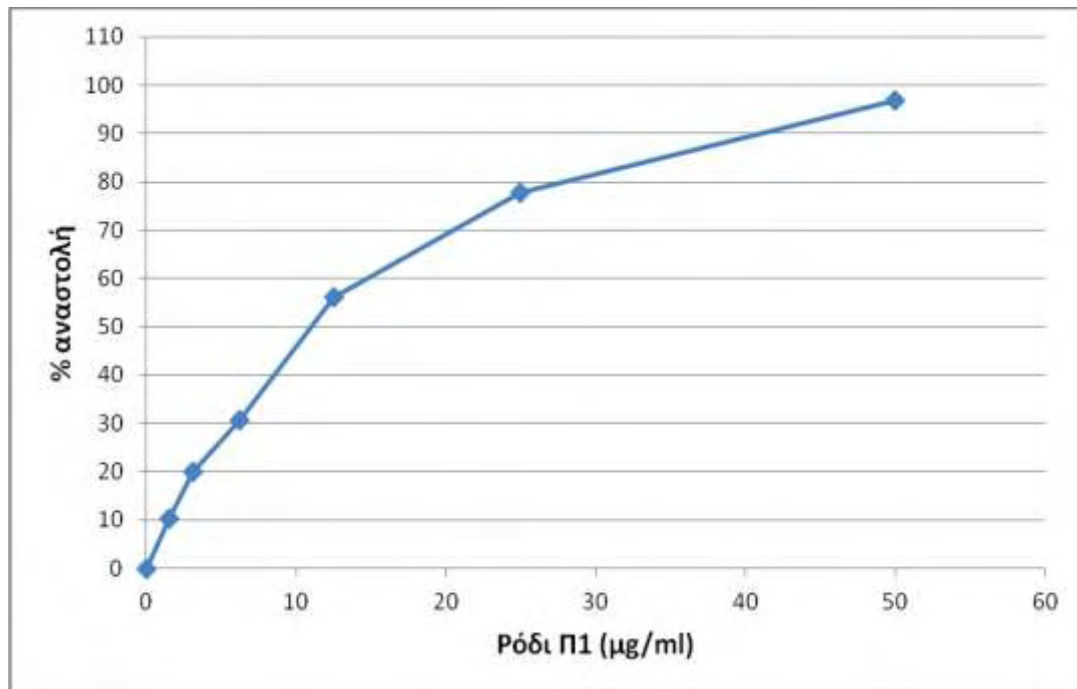
Όσον αφορά τα δείγματα των εκχυλισμάτων φυτών Ροδιά οι τιμές του  $IC_{50}$  κυμαίνονταν από 2,7  $\mu\text{g/ml}$  έως 11  $\mu\text{g/ml}$ . Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το δείγμα Π2 με  $IC_{50}$  2,7  $\mu\text{g/ml}$ .



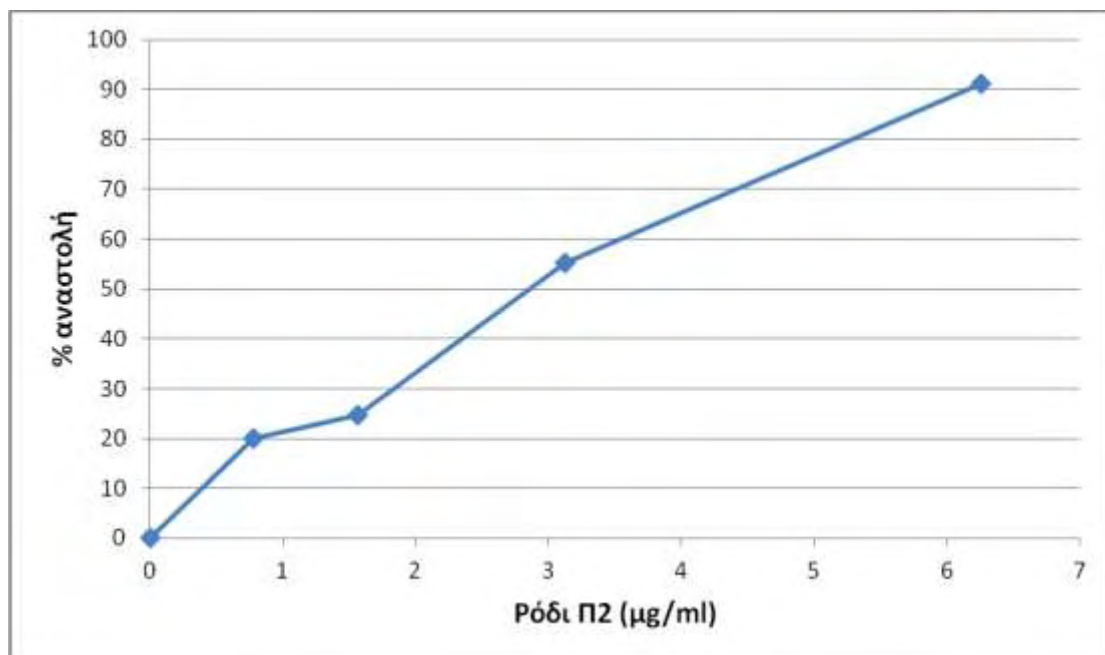
**Σχήμα 25.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5,7  $\mu\text{g/ml}$ )



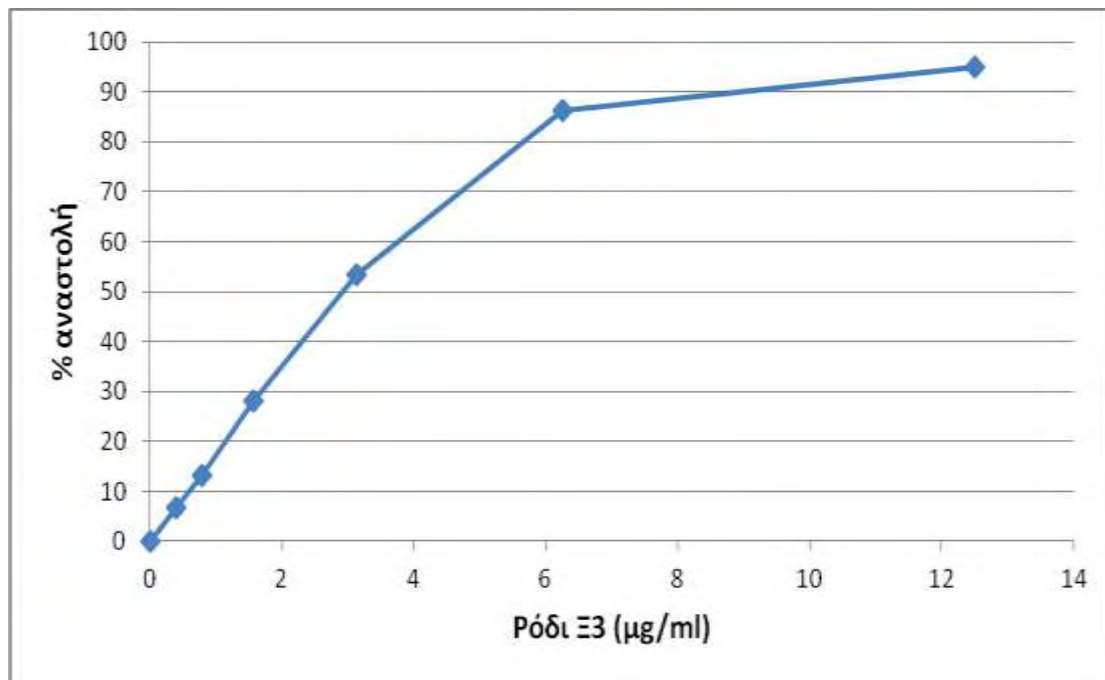
**Σχήμα 26.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,9  $\mu\text{g/ml}$ )



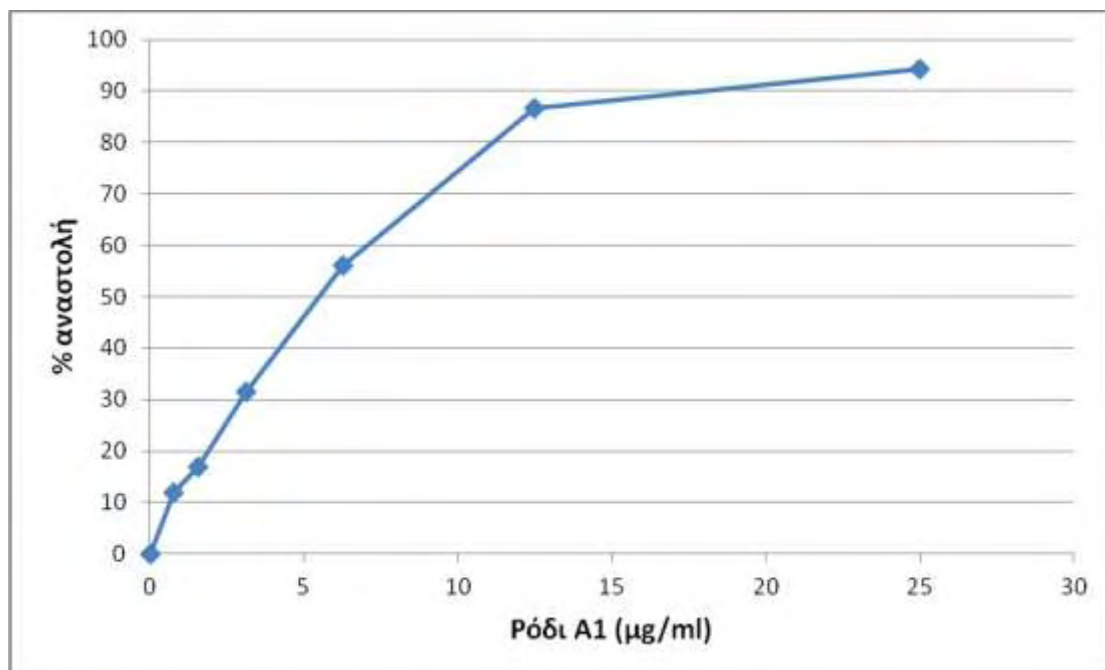
**Σχήμα 27.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 11  $\mu\text{g/ml}$ )



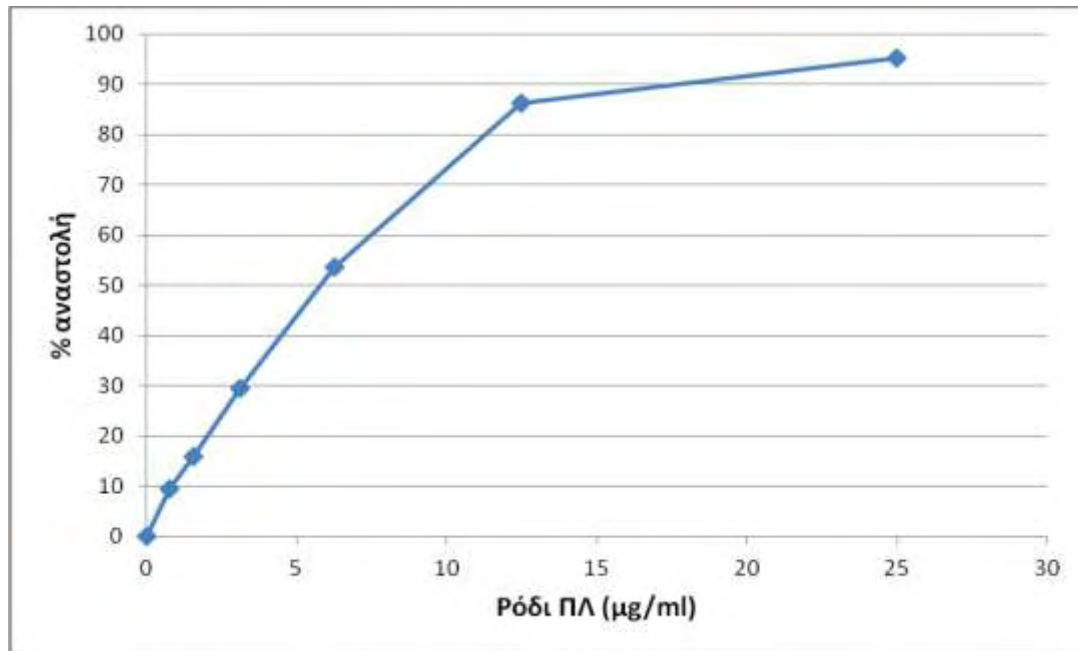
**Σχήμα 28.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,7  $\mu\text{g/ml}$ )



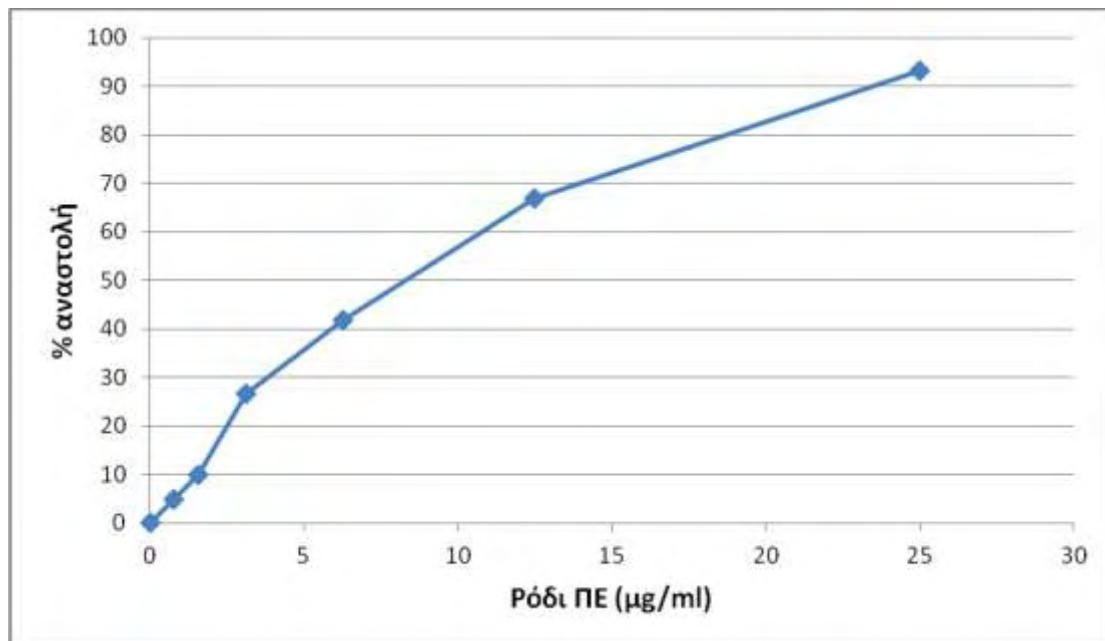
**Σχήμα 29.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 3 μg/ml)



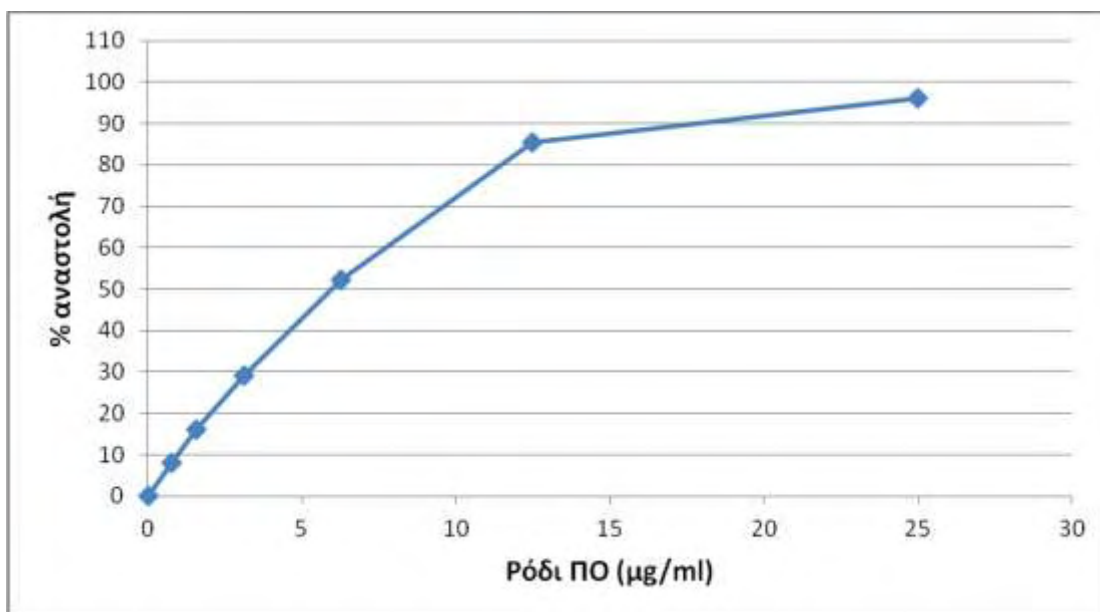
**Σχήμα 30.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5,2 μg/ml)



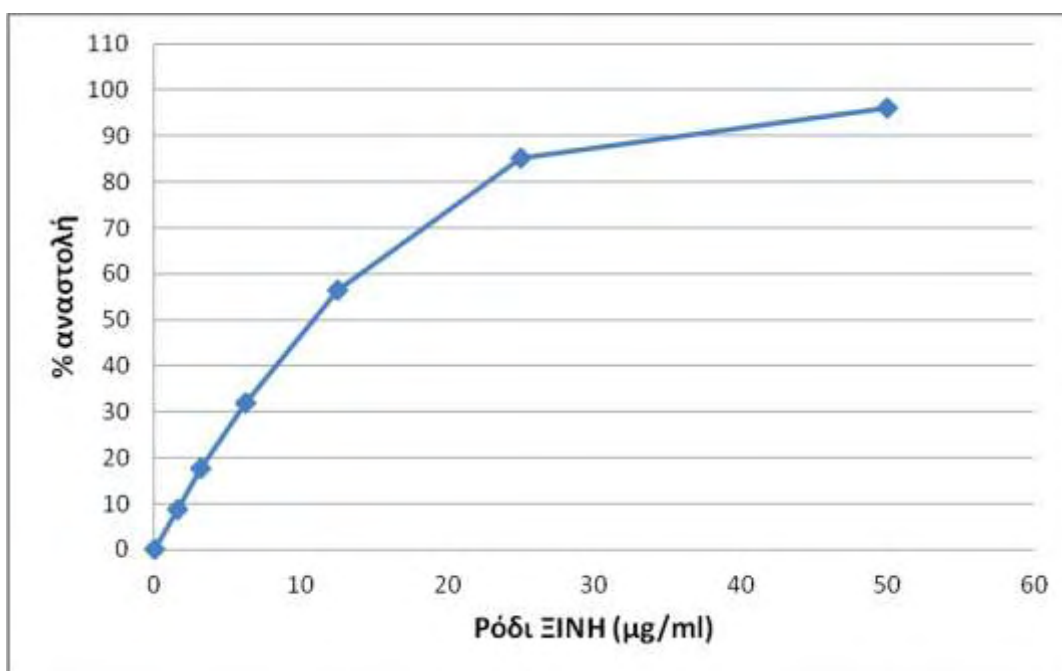
**Σχήμα 31.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5,7 μg/ml)



**Σχήμα 32.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 8 μg/ml)

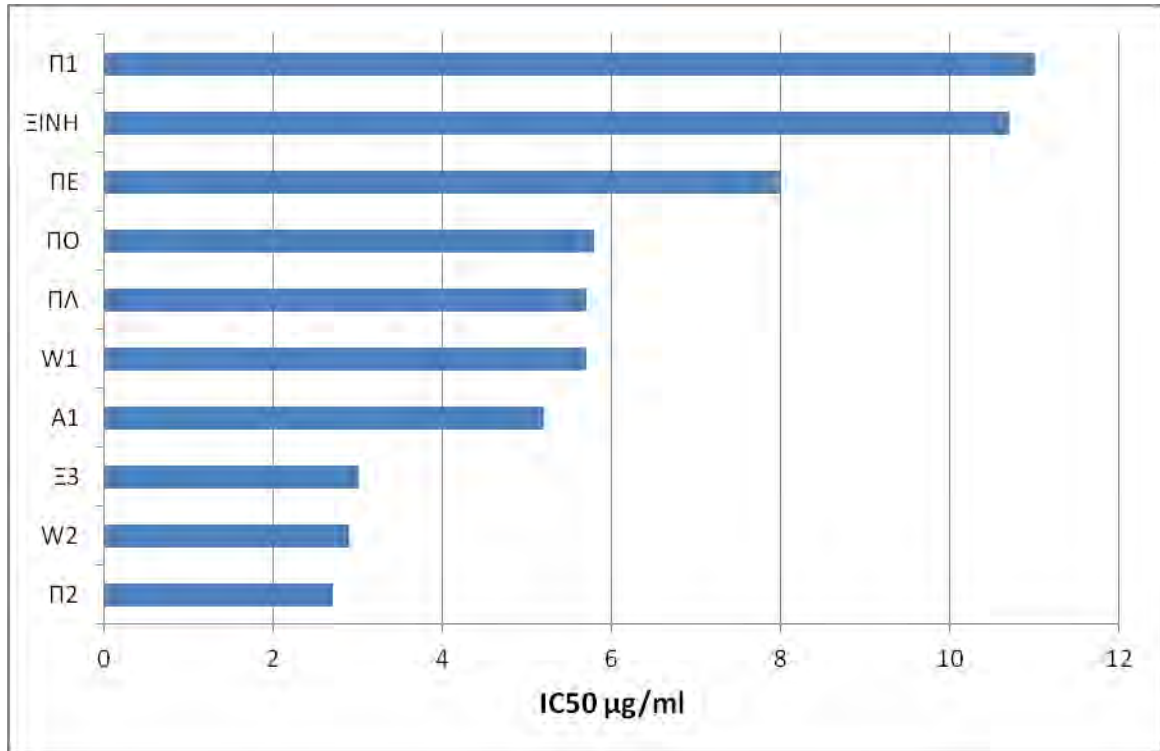


**Σχήμα 33.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5,8  $\mu\text{g/ml}$ )



**Σχήμα 34.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 10,7  $\mu\text{g/ml}$ )





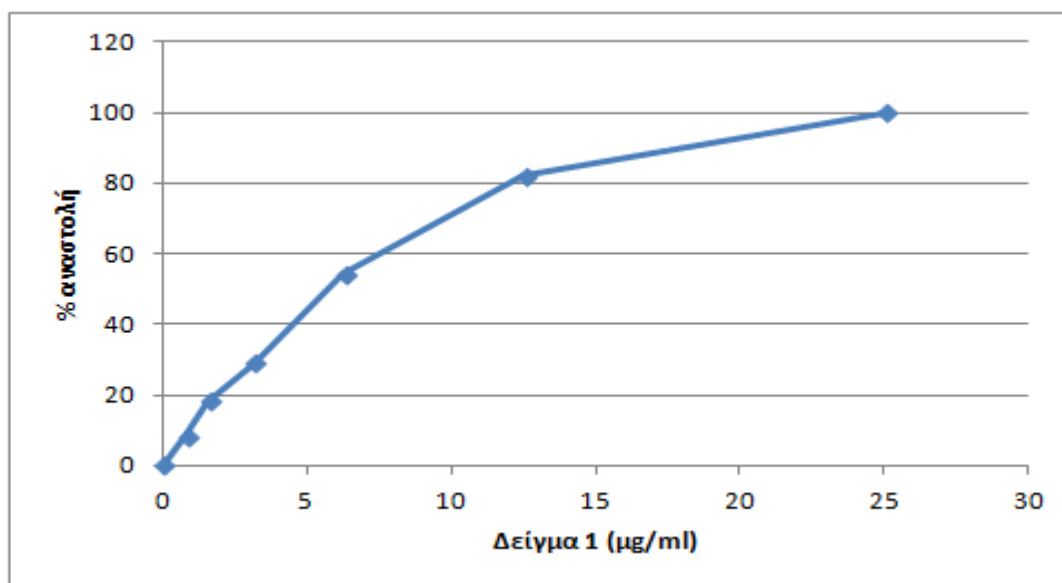
**Σχήμα 35.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από ποικιλίες Ροδιάς.

## 4.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS<sup>+</sup>

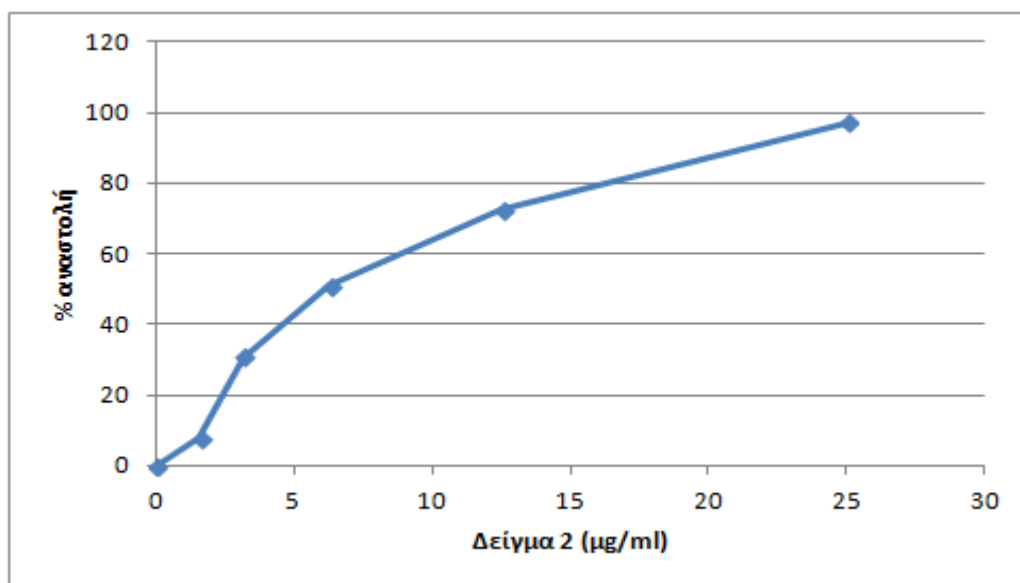
Συνολικά μελετήθηκαν 23 δείγματα εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae και 10 δείγματα του φυτού ροδιά (*Punica granatum*). Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>+</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 1,6 μg/ml έως 280 μg/ml.

### 4.2.1. Αποτελέσματα ABTS εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae

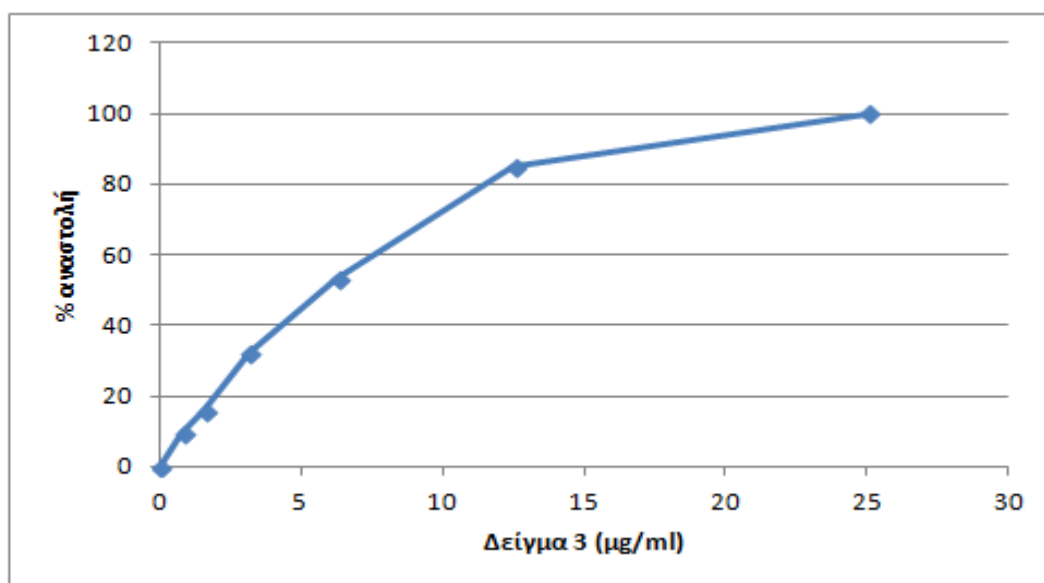
Όσον αφορά τα δείγματα των εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae οι τιμές του IC<sub>50</sub> κυμαίνονταν από 3,5 μg/ml έως 280 μg/ml. Ισχυρότερη δράση παρουσίασε τα δείγμα 17 και 21 με IC<sub>50</sub> 7,5 μg/ml.



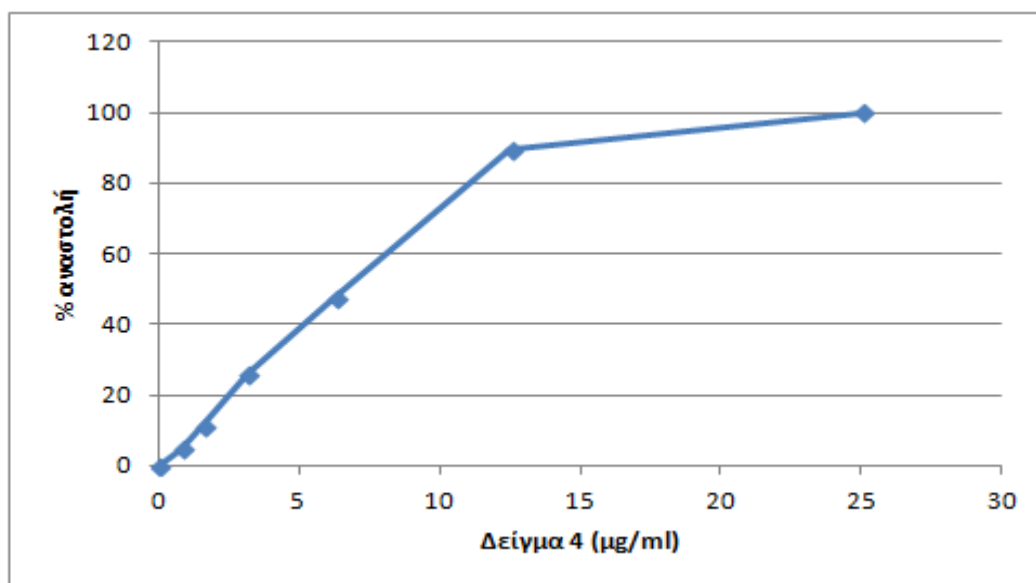
**Σχήμα 36.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της (IC<sub>50</sub>: 5,5 μg/ml).



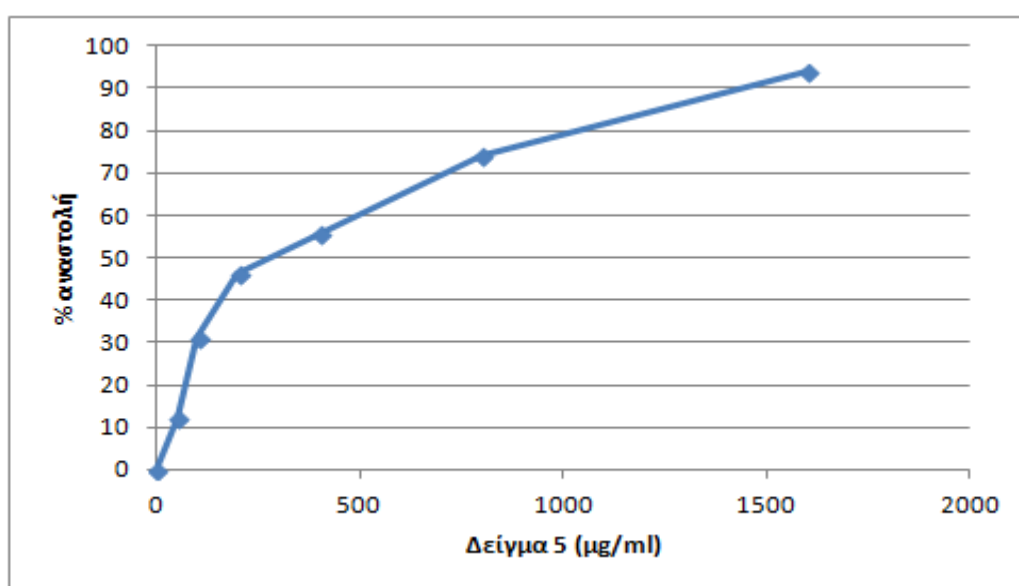
**Σχήμα 37.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6  $\mu\text{g/ml}$ ).



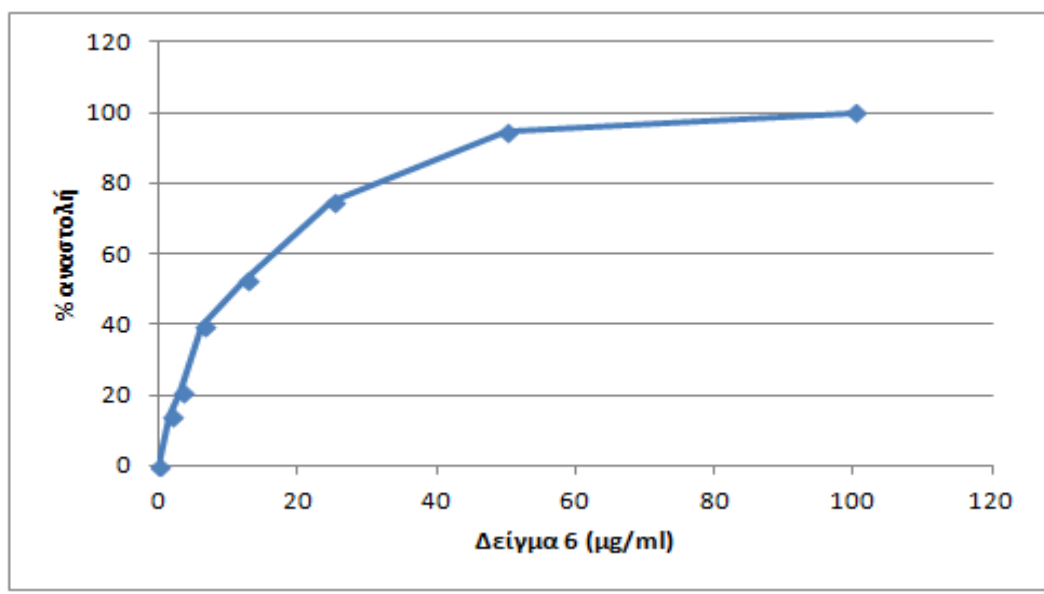
**Σχήμα 38.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



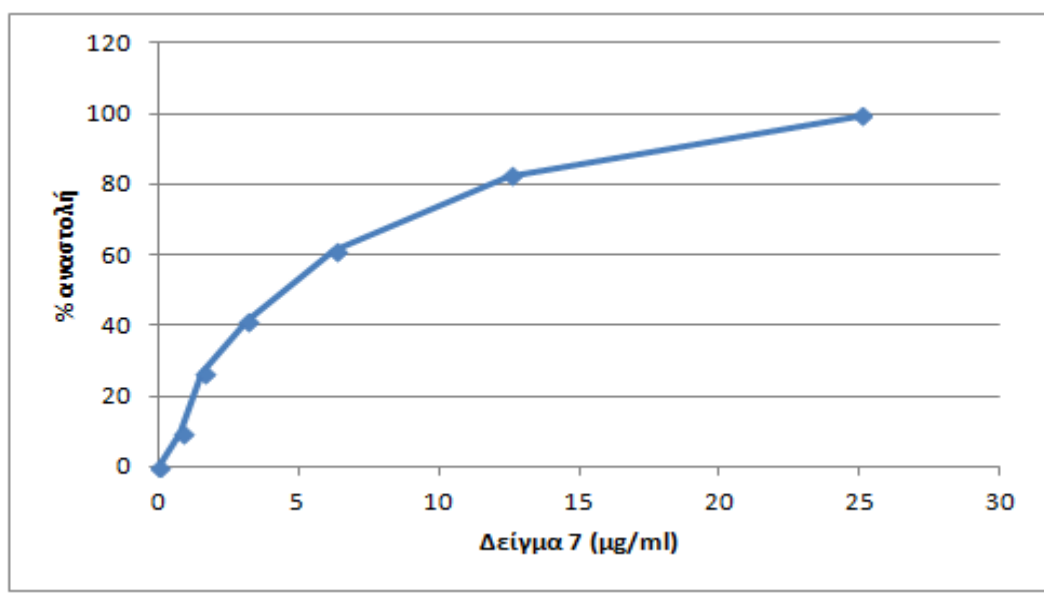
**Σχήμα 39.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



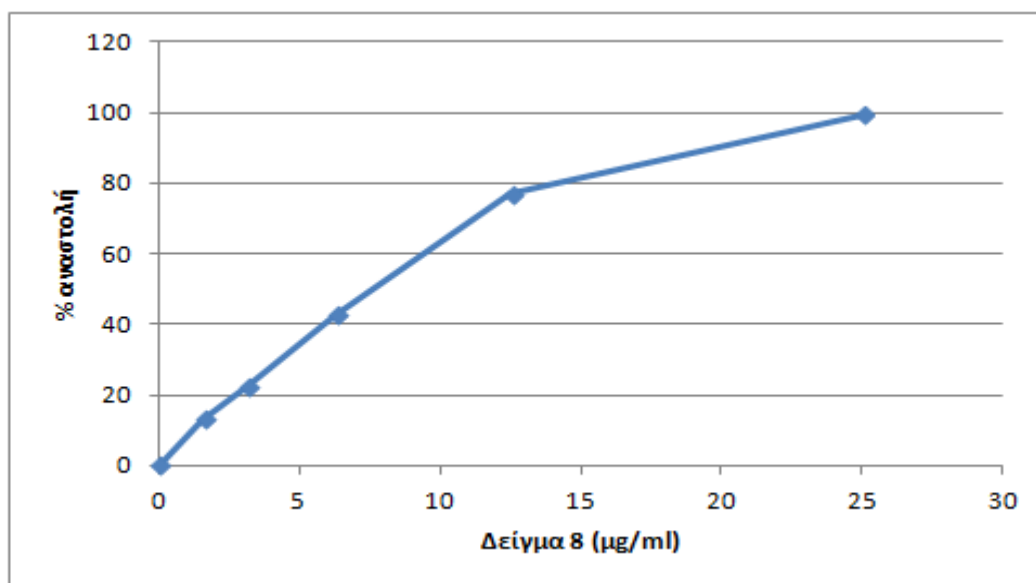
**Σχήμα 40.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 280  $\mu\text{g/ml}$ ).



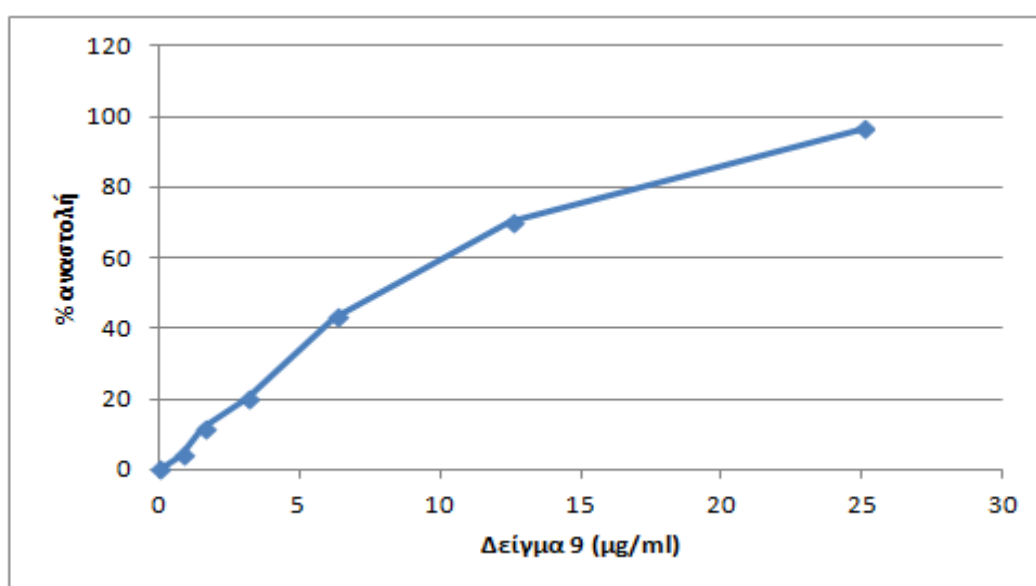
**Σχήμα 41.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 11  $\mu\text{g/ml}$ ).



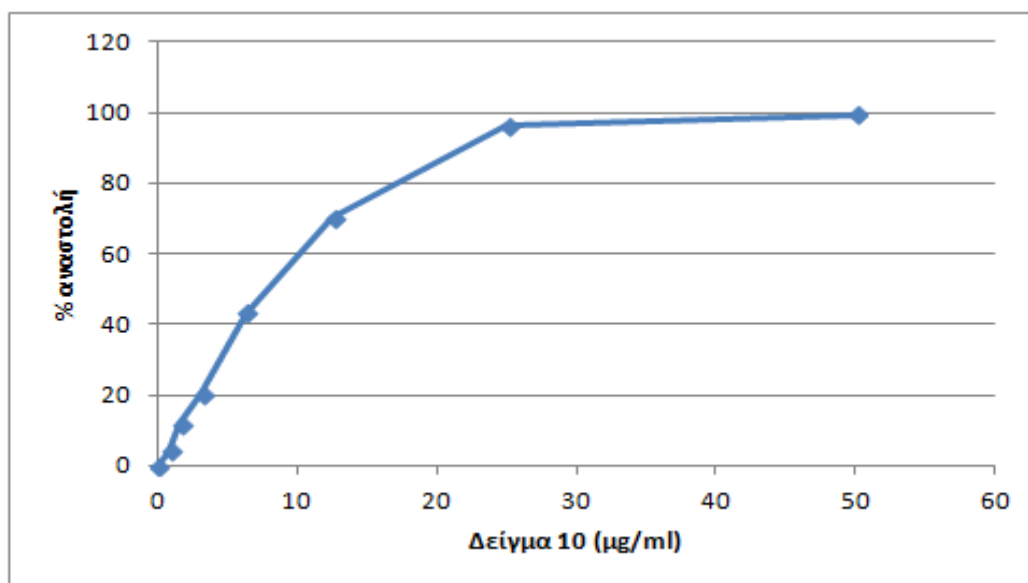
**Σχήμα 42.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



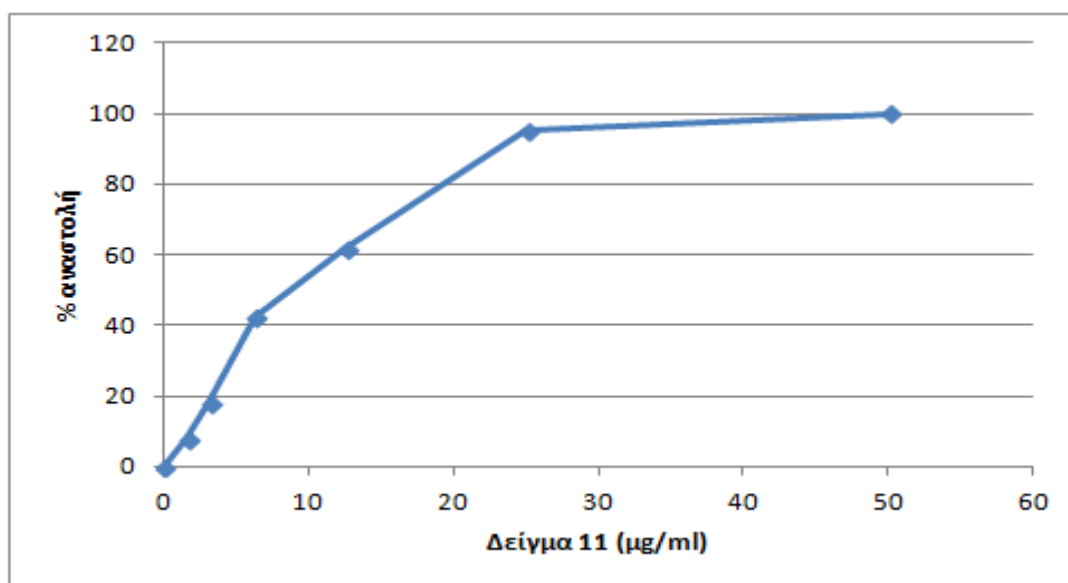
**Σχήμα 43.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 7,5 μg/ml).



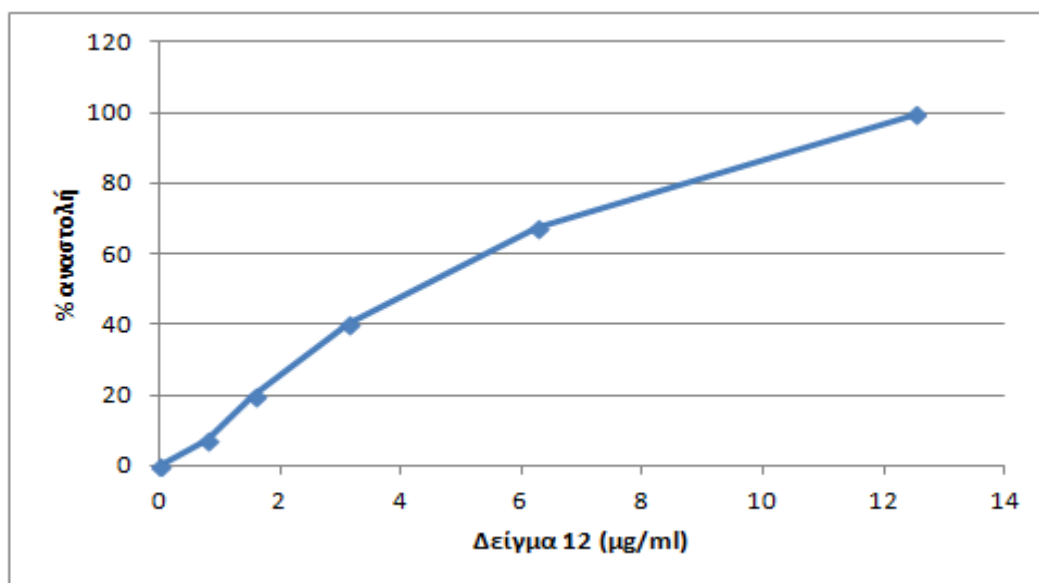
**Σχήμα 44.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 7,5 μg/ml).



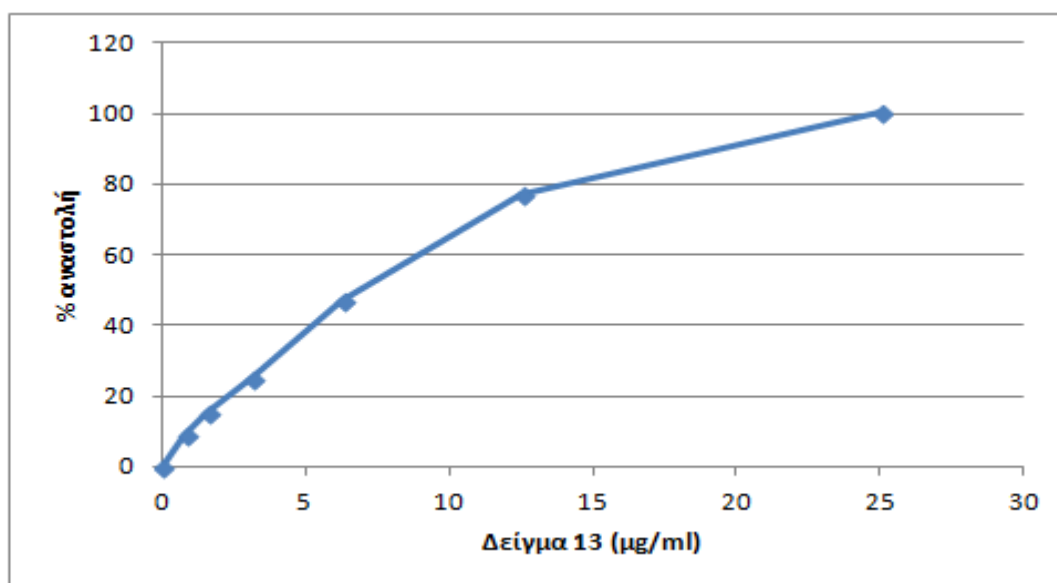
**Σχήμα 45.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Σχήμα 46.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 8,5  $\mu\text{g/ml}$ ).

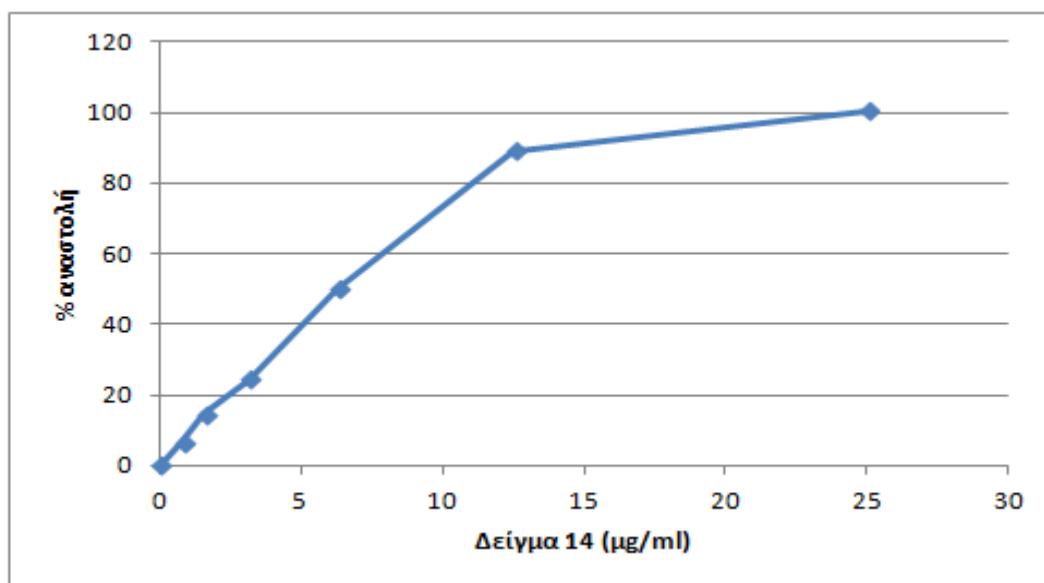


**Σχήμα 47.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4 μg/ml).

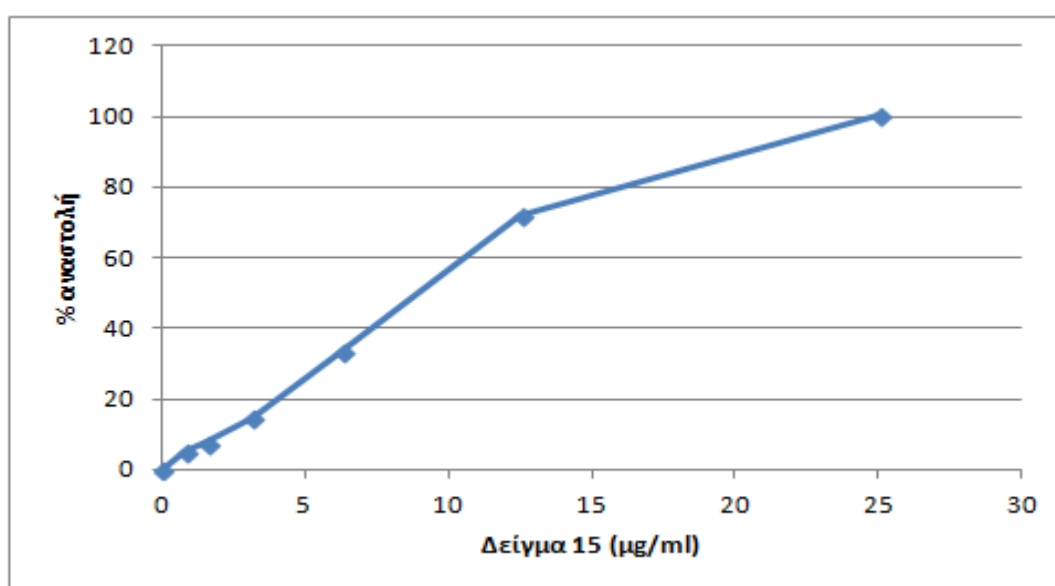


**Σχήμα 48.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6,5 μg/ml).

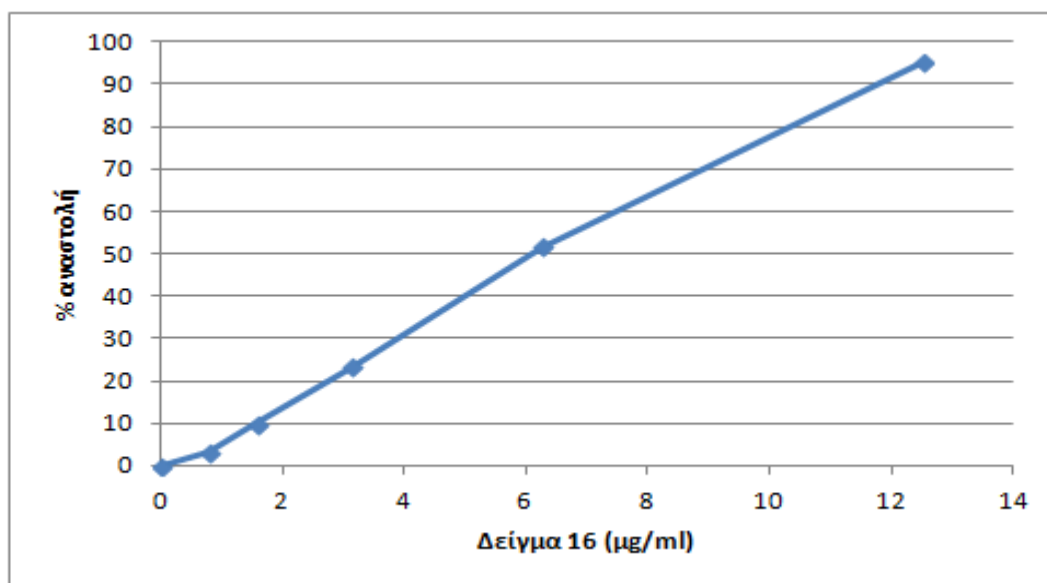




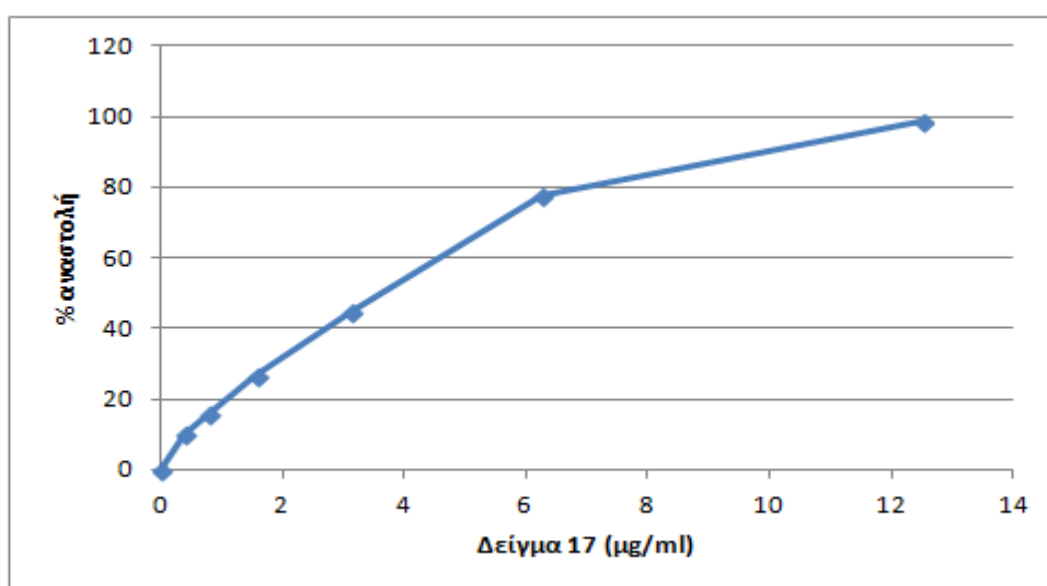
**Σχήμα 49.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6  $\mu\text{g/ml}$ ).



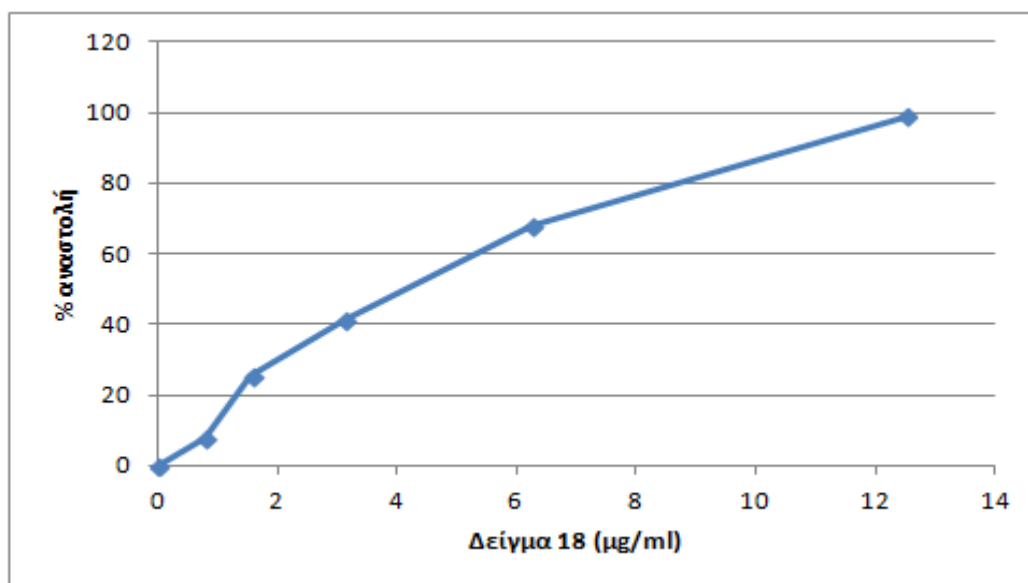
**Σχήμα 50.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 9  $\mu\text{g/ml}$ ).



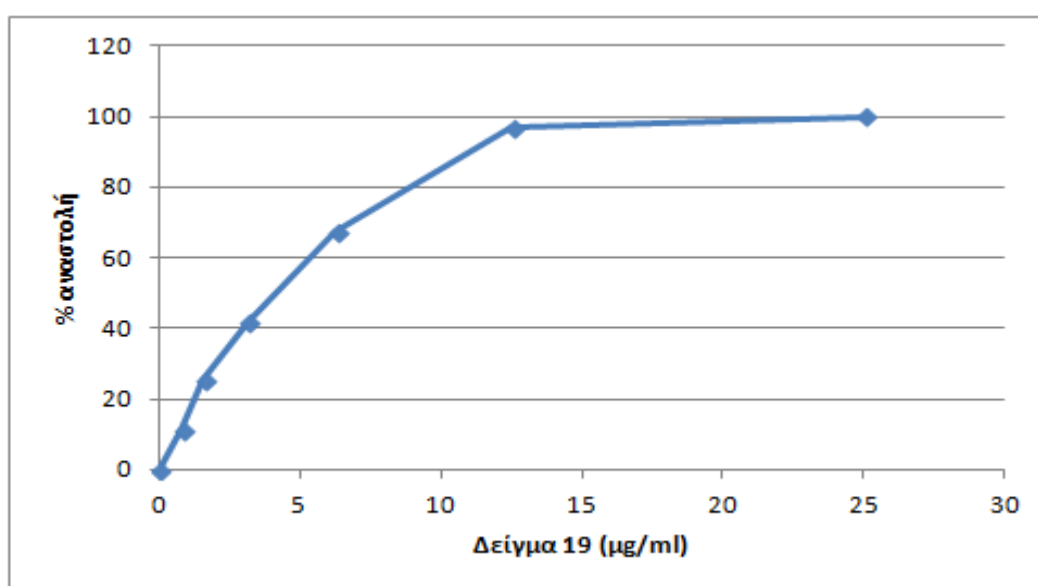
**Σχήμα 51.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 6  $\mu\text{g/ml}$ ).



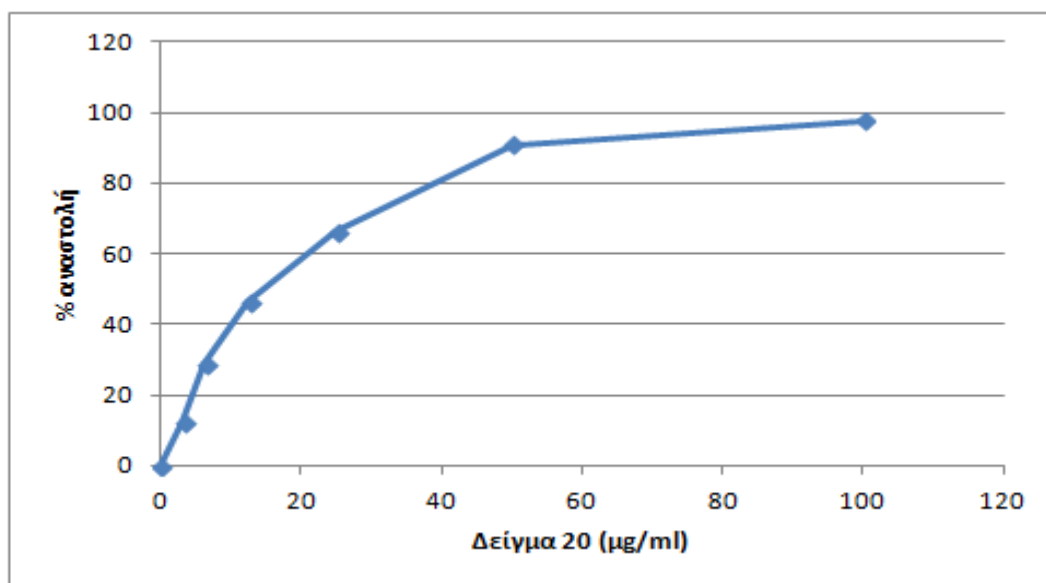
**Σχήμα 52.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 3,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



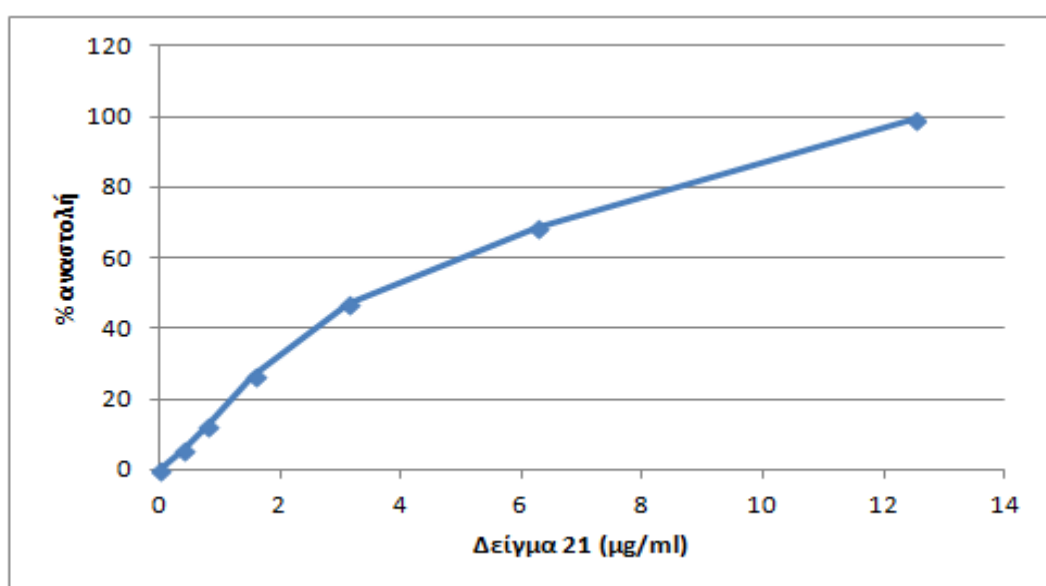
**Σχήμα 53.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4  $\mu\text{g/ml}$ ).



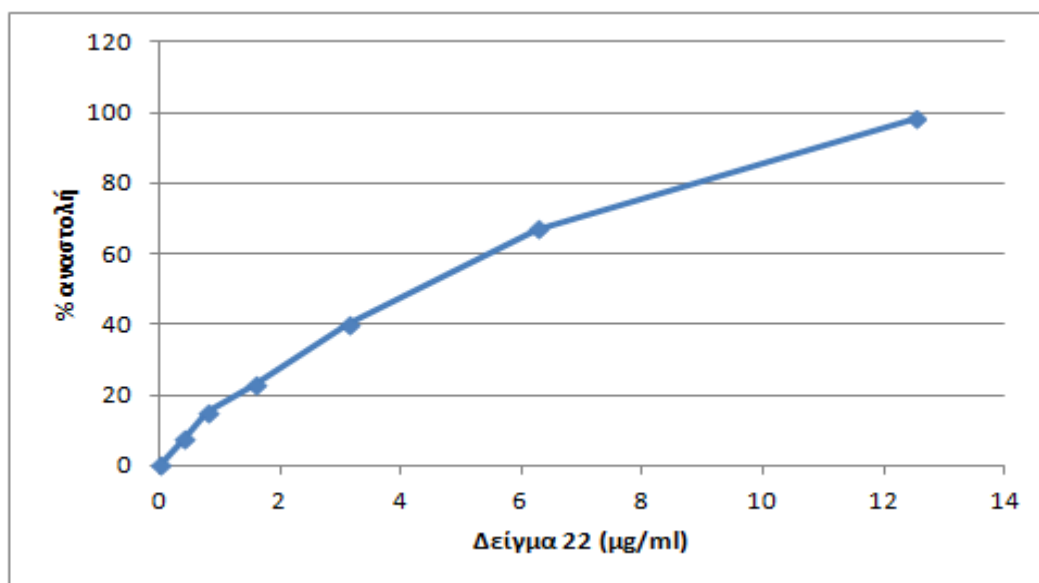
**Σχήμα 54.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4  $\mu\text{g/ml}$ ).



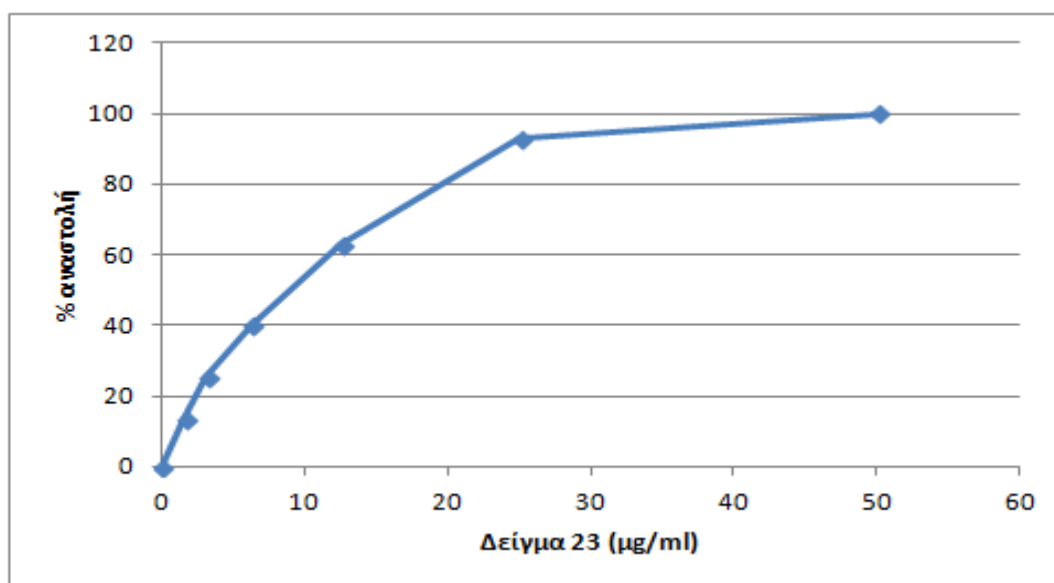
**Σχήμα 55.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 14,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



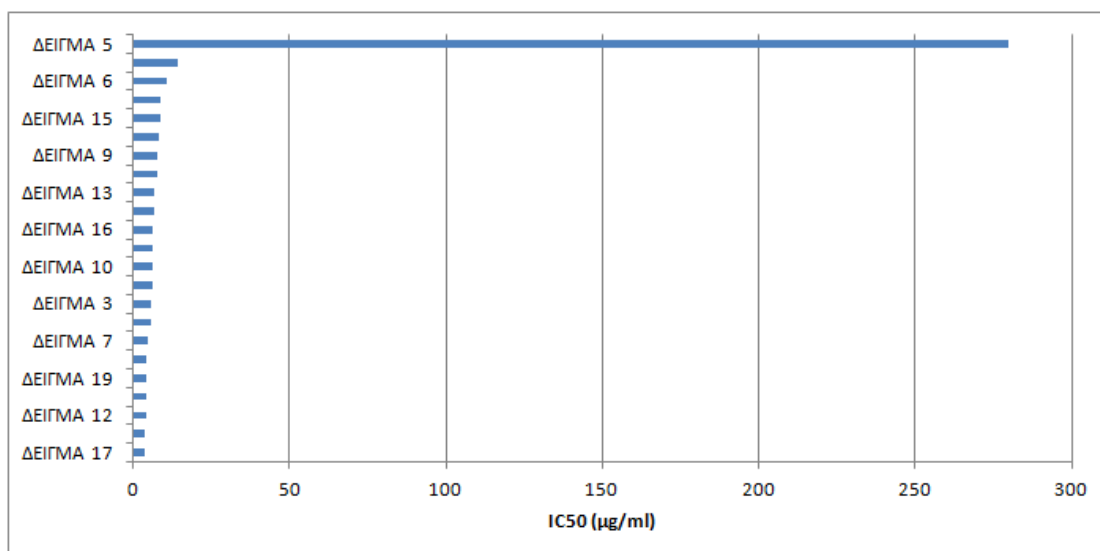
**Σχήμα 56.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 3,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



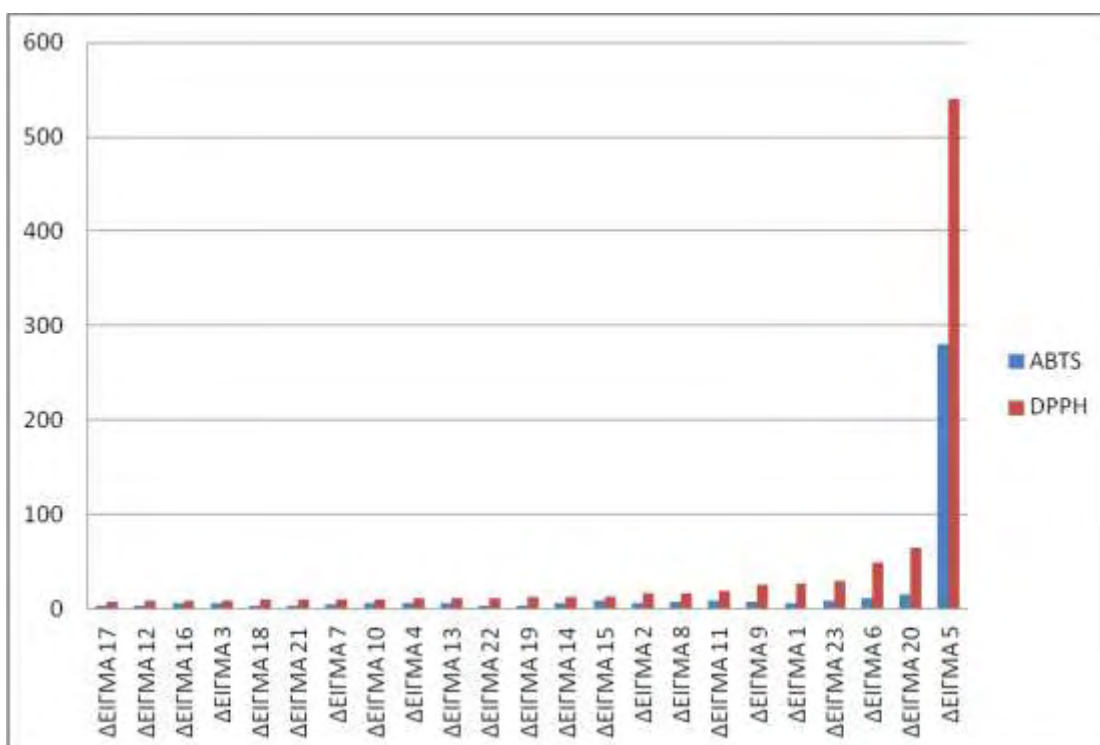
**Σχήμα 57.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4 µg/ml).



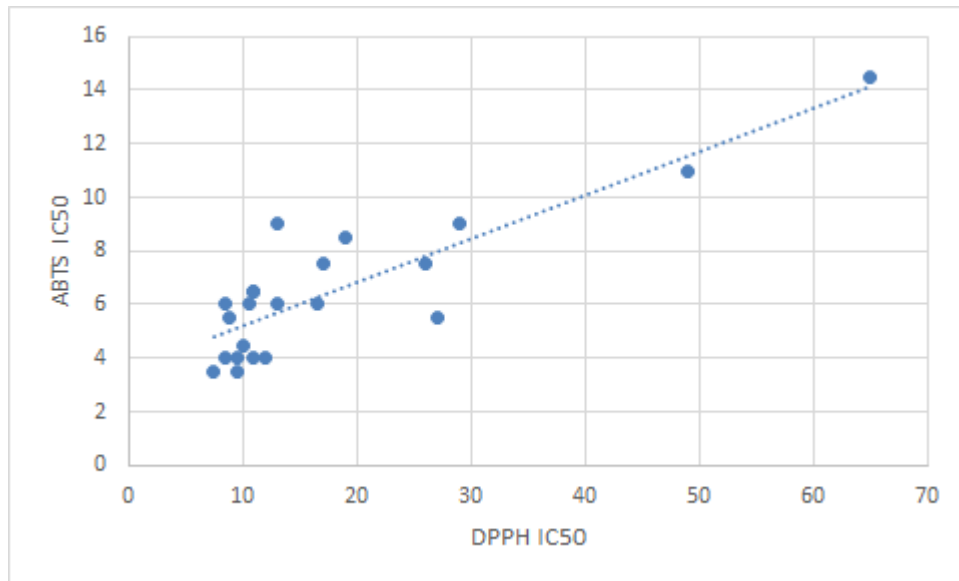
**Σχήμα 58.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 9 µg/ml).



**Σχήμα 59.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από ποικιλίες φυτών της οικογένειας Rosaceae.



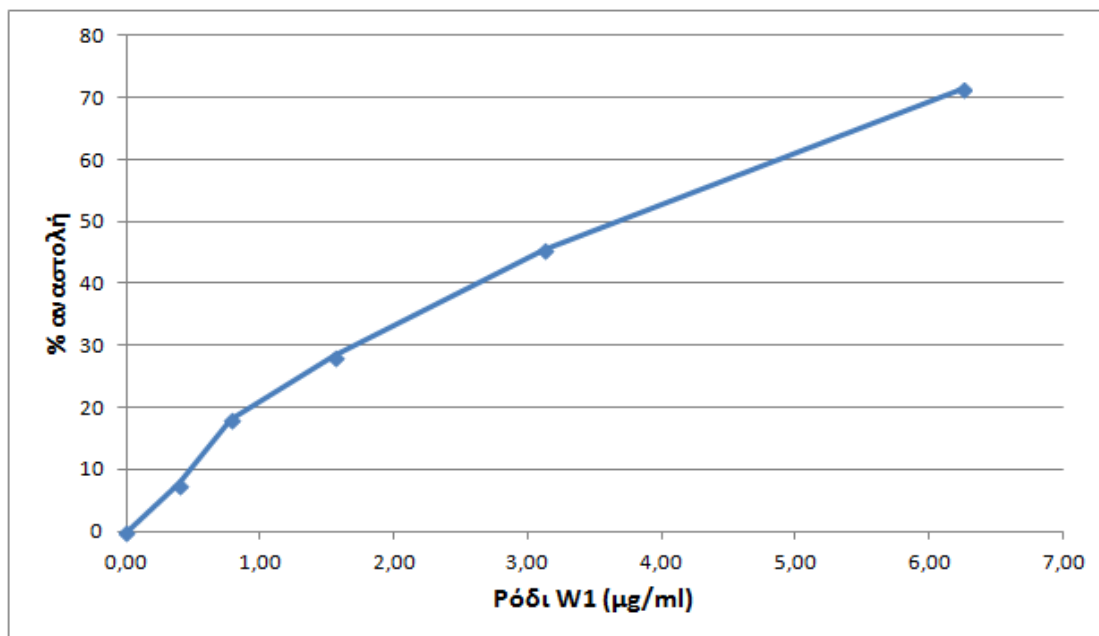
**Σχήμα 60.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από Rosaceae στις μεθόδους DPPH και ABTS.



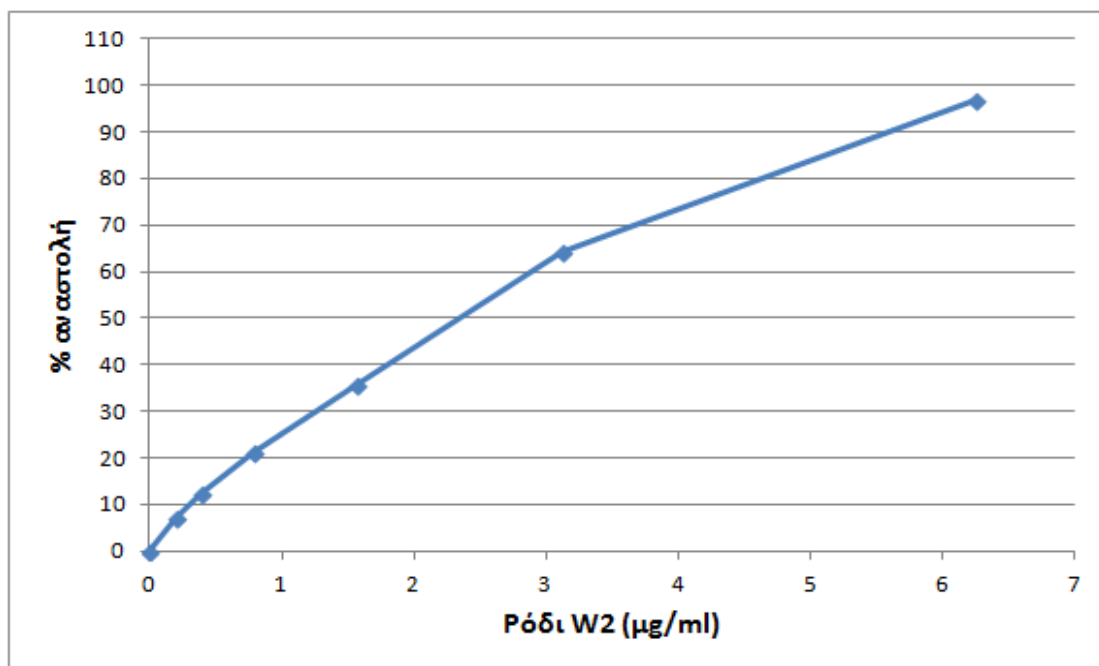
**Σχήμα 61.** Απεικονίζεται η συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων από Rosaceae στις μεθόδους DPPH και ABTS ( $r = 0,756$ ;  $p < 0.01$ ).

#### 4.2.2. Αποτελέσματα ABTS εκχυλισμάτων φυτών της Ροδιάς

Όσον αφορά τα δείγματα των εκχυλισμάτων φυτών του ροδιού οι τιμές του  $IC_{50}$  κυμαίνονταν από 1,6  $\mu\text{g/ml}$  έως 4,7  $\mu\text{g/ml}$ . Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το δείγμα Π2 με  $IC_{50}$  1,6  $\mu\text{g/ml}$ .

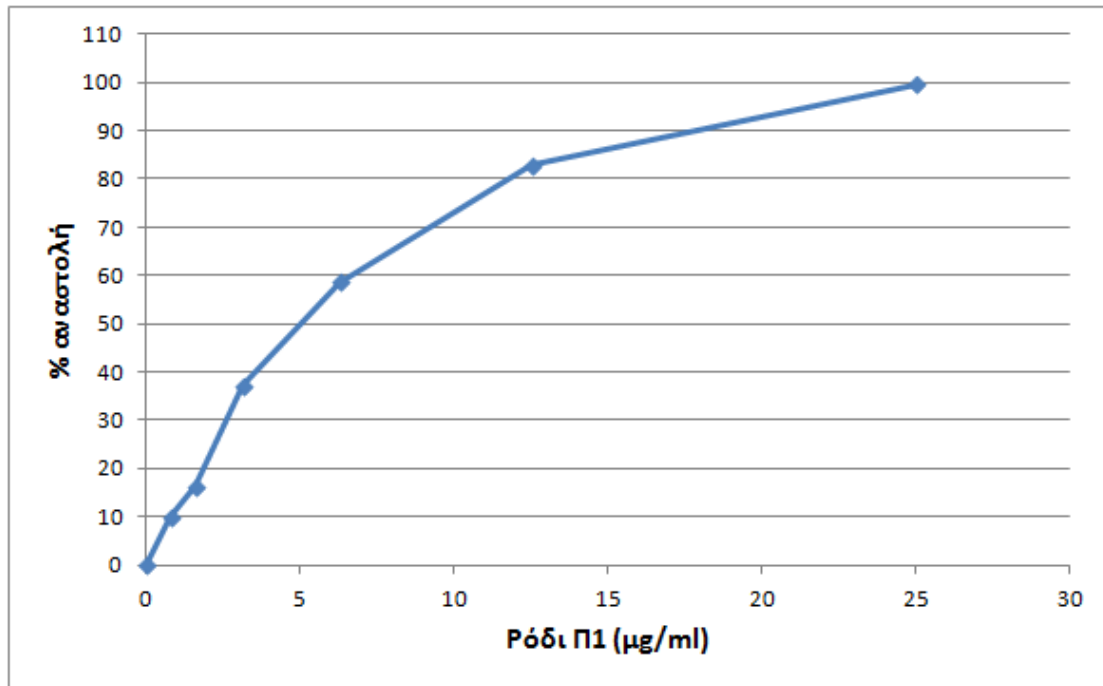


**Σχήμα 60.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 3,7  $\mu\text{g/ml}$ ).

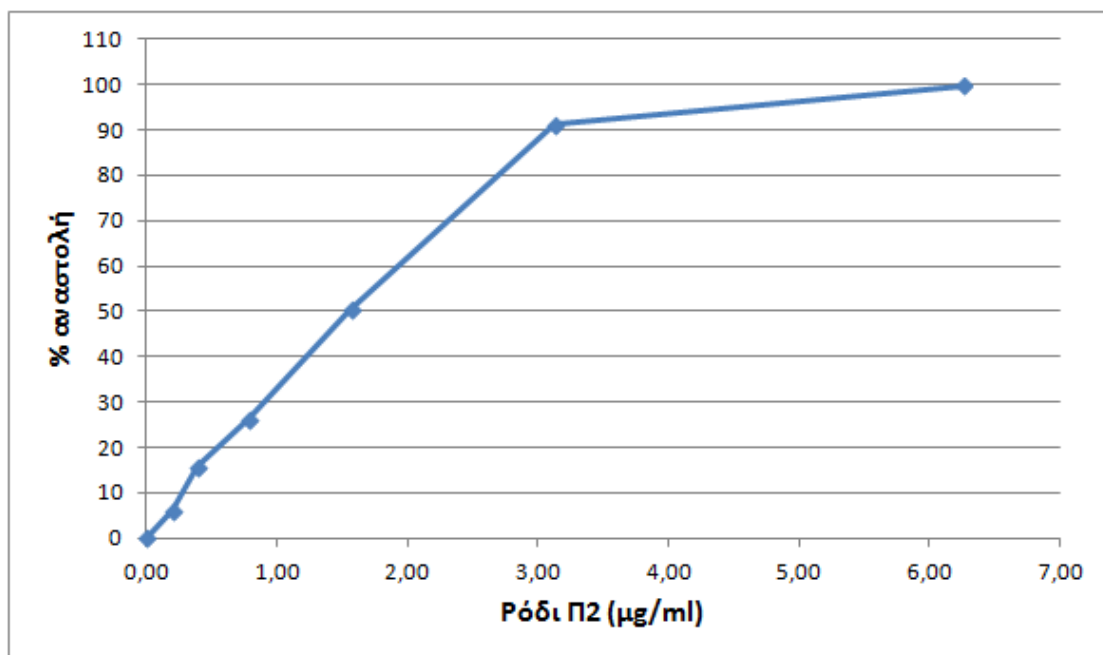


**Σχήμα 61.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,3  $\mu\text{g/ml}$ ).

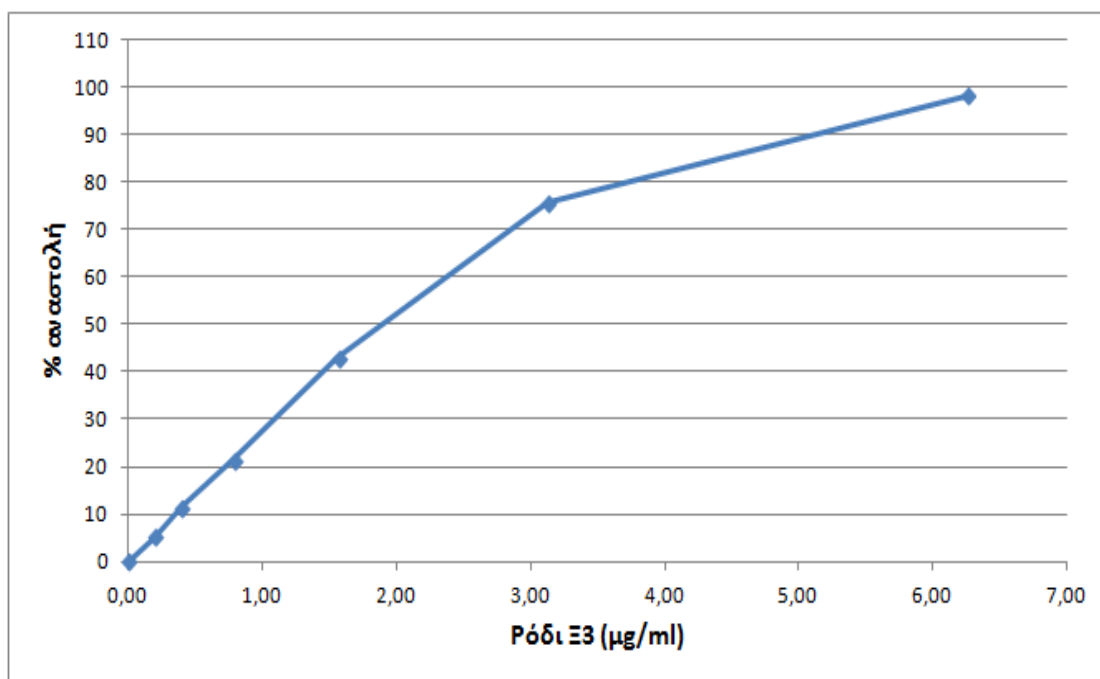




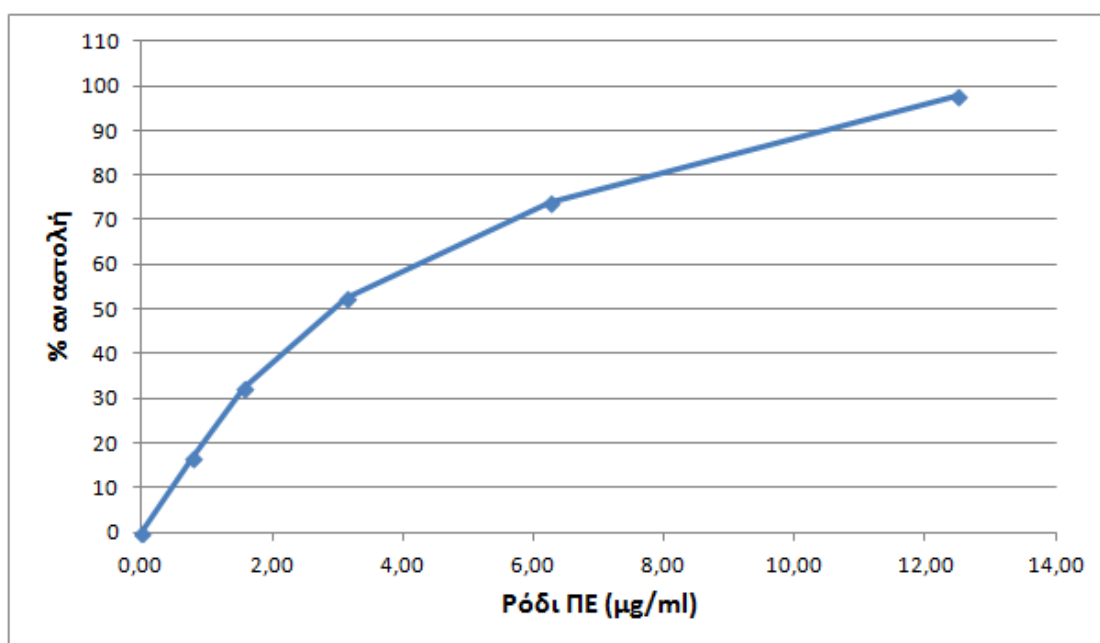
**Σχήμα 62.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 5 μg/ml).



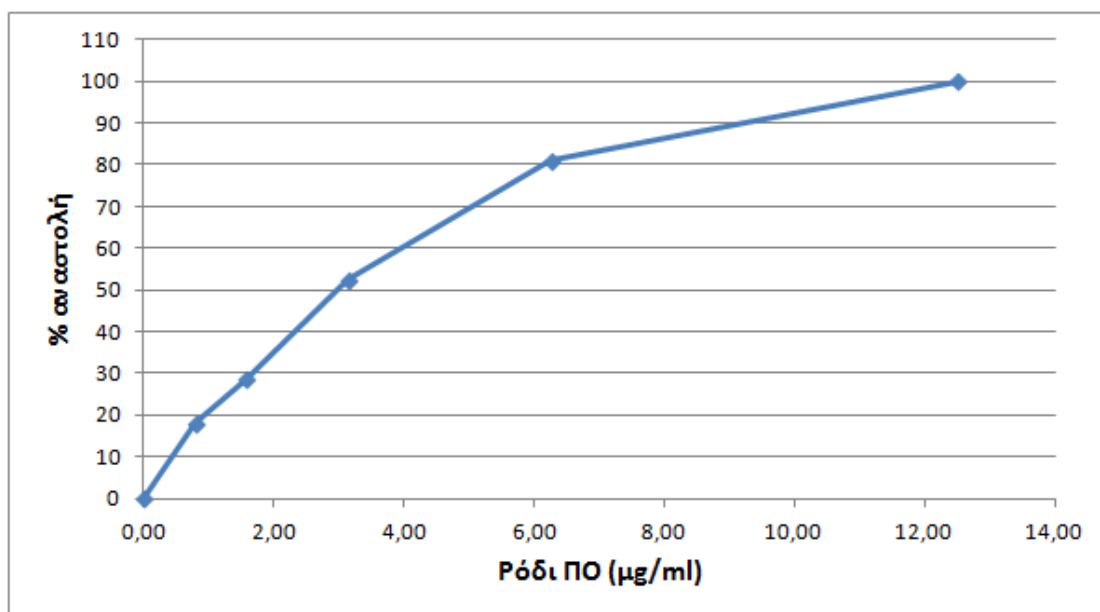
**Σχήμα 63.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 1,6 μg/ml).



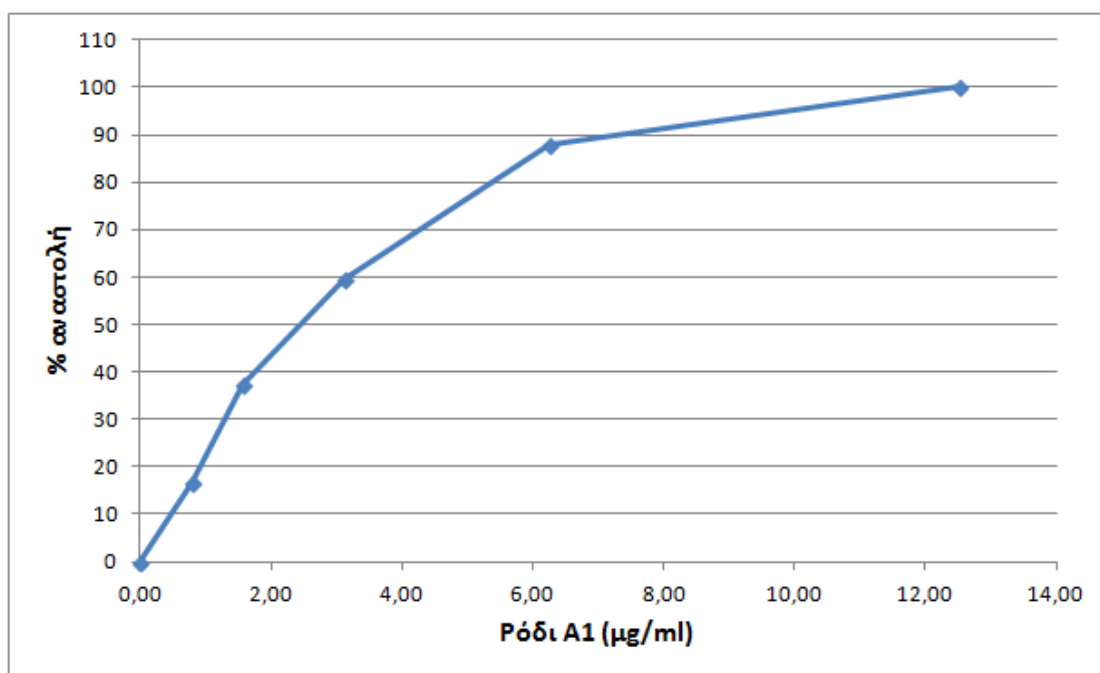
**Σχήμα 64.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 1,9 μg/ml).



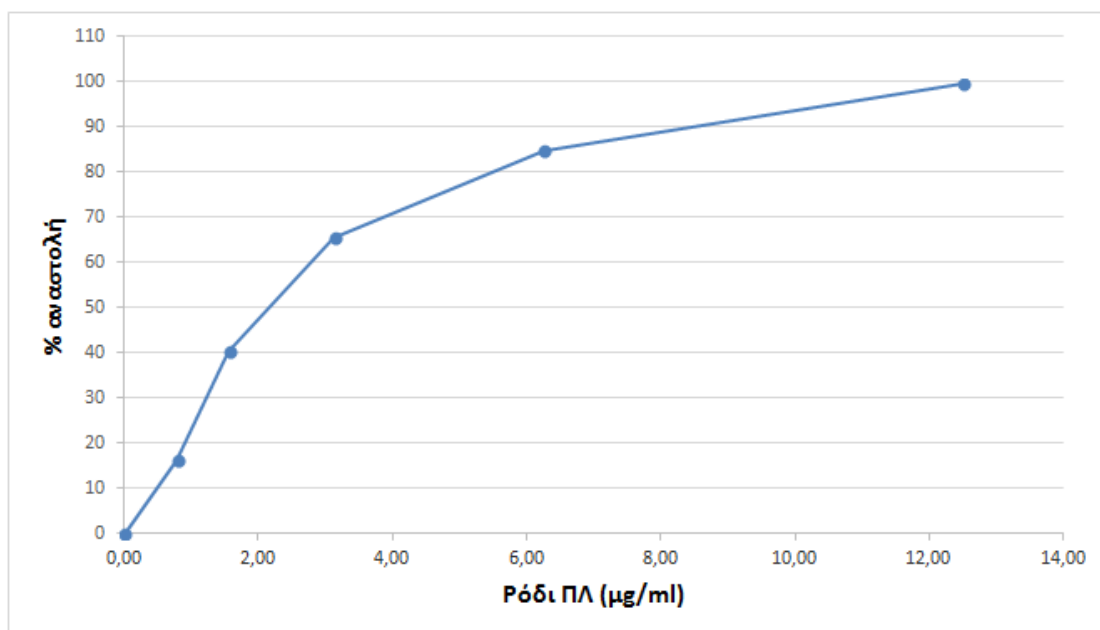
**Σχήμα 65.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,8 μg/ml).



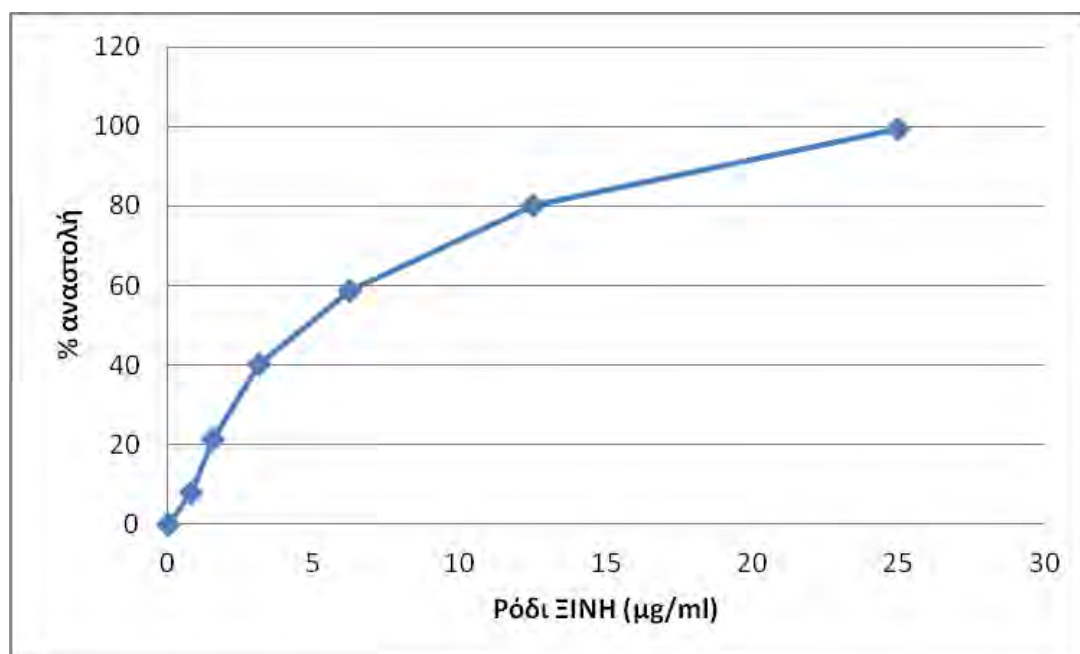
**Σχήμα 66.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,8 μg/ml).



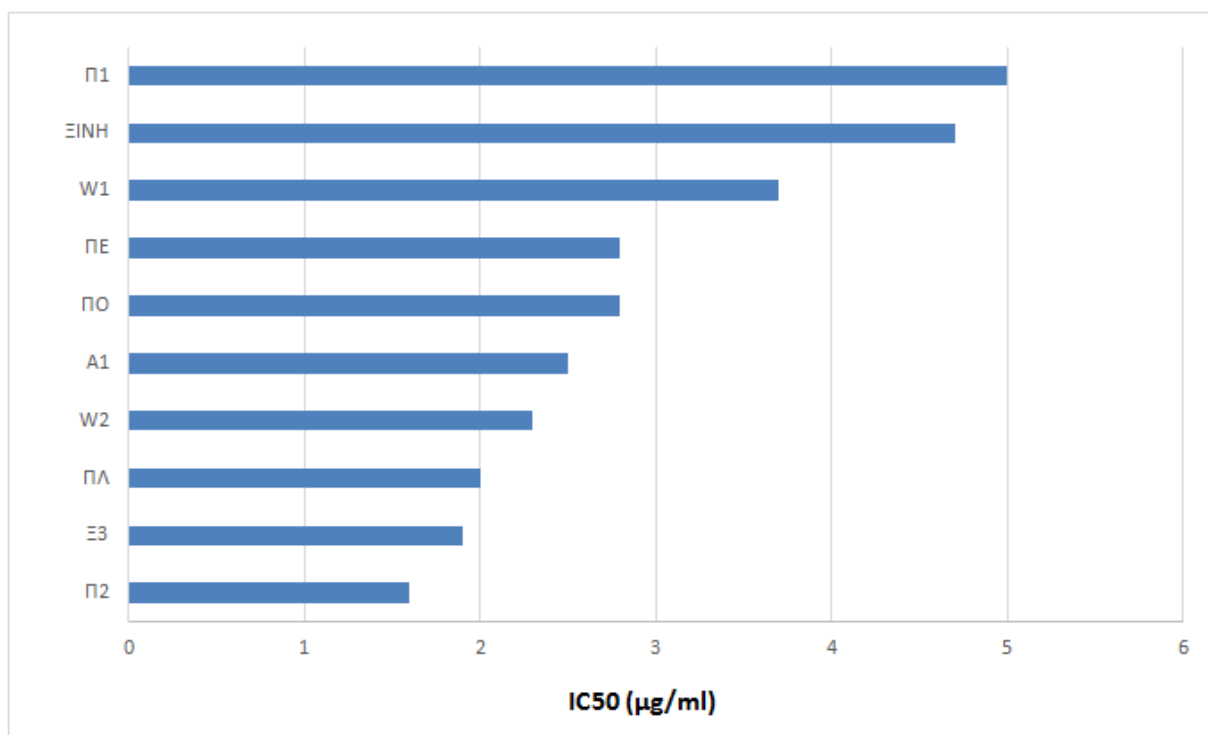
**Σχήμα 68.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2,5 μg/ml).



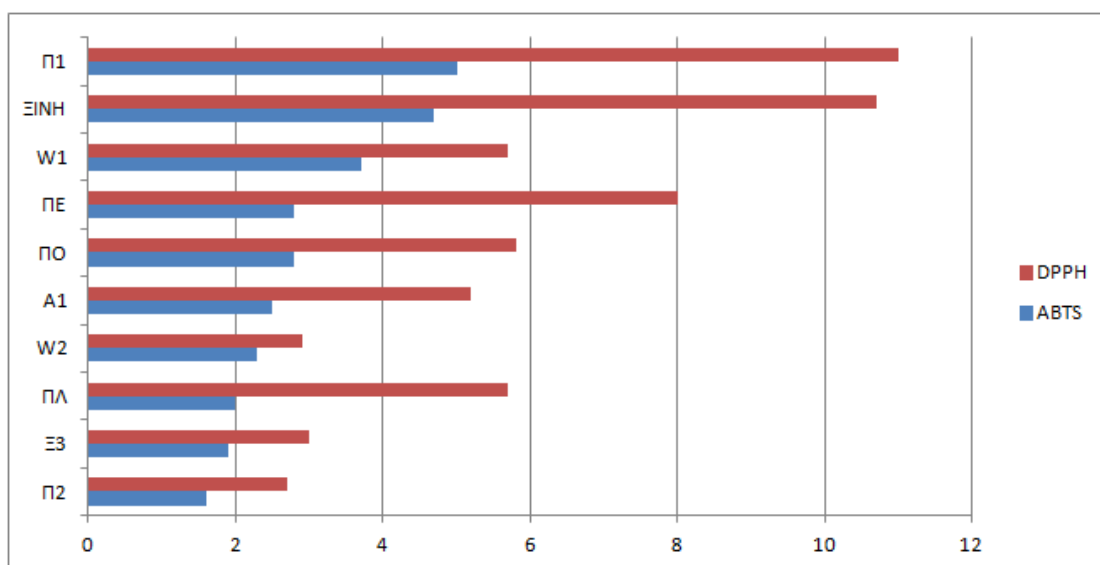
**Σχήμα 69.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 2 μg/ml).



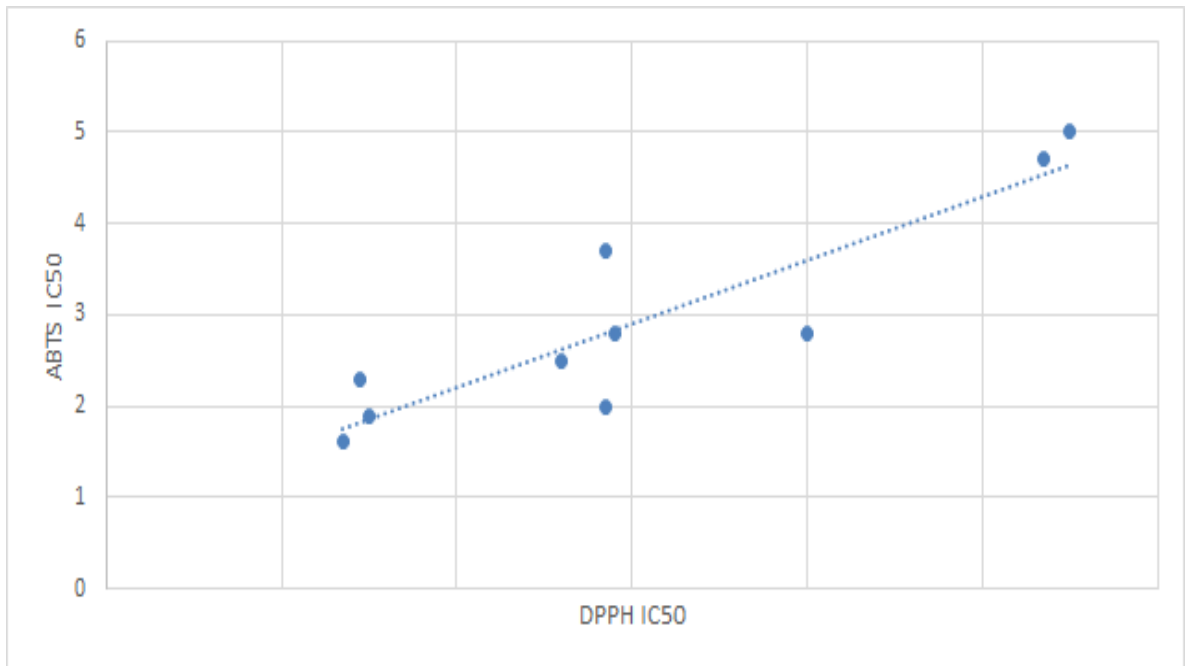
**Σχήμα 67.** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας ABTS λόγω εξουδετέρωσής της ( $IC_{50}$ : 4,7 μg/ml).



**Σχήμα 70.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου ABTS.



**Σχήμα 71.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων από ροδιά στις μεθόδους DPPH και ABTS.



**Σχήμα 61.** Απεικονίζεται η συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων από Ροδιά στις μεθόδους DPPH και ABTS ( $r = 0,892$ ;  $p < 0.01$ ).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια, για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινόλων, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), η πρόωγη γήρανση (Wiseman, 1995) και το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έχει ακόμη αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων, τους προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefter & Milner 2008).

Αρκετά μελετημένο, ως προς τα βιοδραστικά του συστατικά και κυρίως τις φυτικές του πολυφαινόλες, είναι και το φυτό *Punica Granatum* (Ροδιά), και κυρίως ο καρπός του, το Ρόδι. Οι ουσίες που υπάρχουν στα διάφορα μέρη του ροδιού (φλοιός, σπέρματα, χυμός) αναφέρεται ότι μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Çam, 2009), αντικαρκινικοί (Hamad and Al-Momene 2009), αντιηπατοξικοί (Celik, 2009) και καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες (Davidson, 2009). Μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει, ότι ο χυμός ροδιού αποτρέπει ή επιβραδύνει την ανάπτυξη όγκων σε διάφορες μορφές καρκίνου και συμβάλλει στην επιδιόρθωση της βλάβης στο DNA (Syed., 2007, Koyama, 2010). Επιπλέον, τα συστατικά στα διάφορα μέρη του ροδιού αναφέρεται ότι παρουσιάζουν αντι-υικές (Haidari, 2009), και αντιμικροβιακές (Duman, 2009) ιδιότητες και συμβάλουν στην στοματική υγεία (Di Silvestro, 2009) και στην υγεία του δέρματος (Aslam, 2006). Επίσης φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της ασθένειας του Αλτσάιμερ (Singh, 2008). Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι να αυξάνεται τόσο η ζήτηση και η απαίτηση για τρόφιμα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις από τους καταναλωτές όσο και η ανάγκη της βιομηχανίας τροφίμων για έρευνα, παραγωγή και κατοχύρωση τέτοιων καινοτόμων προϊόντων.

Ρόδι (*Punica granatum* L.) αποτελεί ένα από τα πρώτα μεταγραφόμενα καλλιεργούμενα δέντρα από τον άνθρωπο. Πρόκειται για ενδημικό φυτό από τα Ιμαλία (βόρεια Ινδία), που σήμερα καλλιεργείται σε πολλές περιοχές συμπεριλαμβανομένων των χωρών της Μεσογείου, το Ιράν, το Αφγανιστάν,

την Ινδία, την Κίνα, την Ιαπωνία, την Ρωσία και ορισμένα τμήματα των Ηνωμένων Πολιτειών.

Το ρόδι έχει χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική από τους αρχαίους χρόνους ως αντιμικροβιακό (Gurib-Fakim, 2006) και ως φυσικό στυπτικό για τη θεραπεία της διάρροιας (Das, 1999). Σήμερα, το ερευνητικό ενδιαφέρον για το ρόδι αυξάνεται ως συνέπεια των οφελών του στην υγεία του ανθρώπου (Faria και Calhau, 2011). Από την άποψη αυτή, τα ρόδια έχουν μελετηθεί ως προστατευτικά του καρδιαγγειακού συστήματος, για την θεραπεία του συνδρόμου της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, σε χημειοπροφύλαξη (Lansky, 2005), ως μικροβιοκτόνα (Neurath, 2004) και ως αντιυπερλιπιδαιμικό (Fuhrman, 2005). Ο χυμός ροδιού περιέχει 85% νερό, 10% ολικών σακχάρων, 1.5% πηκτίνη, ασκορβικό οξύ, και πολυφαινόλες (Aviram, 2000). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει μια σειρά αποτελεσμάτων για κλινικά οφέλη του χυμού, όπως η μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης σε υπερτασικούς ασθενείς, μείωση του πάχους της κοινής καρωτιδικής αρτηρίας (IMT) (Aviram, 2004), την εξασθένηση της μυοκαρδιακής ισχαιμίας και τη βελτίωση του προφίλ των λιπιδίων διαβητικών ασθενών (Rosenblat, 2006). Επιπλέον, χημειοπροστατευτική, χημειοθεραπευτική, αντιαθηροσκληρωτική και αντι-φλεγμονώδη δράση (Aviram και Dornfeld, 2001; Kaplan, 2001; Rozenberg, 2006; Adams, 2006.; Malik, 2005) έχει επίσης βρεθεί. Όλες οι προαναφερθείσες ευεργετικές επιδράσεις του χυμού στην ανθρώπινη υγεία έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες του (Rosenblat, 2006; Balasundram, 2006), δεδομένου ότι ο χυμός είναι πλούσιος αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως ανθοκυανίνες (3-γλυκοζίτες και 3,5-γλυκοζίτες της δελφινιδίνης, cyanidin, και πελαγονιδίνης), ελλαγιταννίνες (π.χ. πουνικαλαγίνη, η πιο άφθονη πολυφαινόλη φθάνοντας σε επίπεδα πάνω από 2 g / L χυμό), φλαβονοειδή (π.χ. quercetin, kaempferol και luteolin γλυκοζίτες) και πολυφαινολικά οξέα (π.χ. ελλαγικό και γαλλικό οξύ) (Gil, 2000; Seeram, 2005; Lansky, 2006). Επιπλέον, η *in vitro* αντιοξειδωτική δραστηριότητα του έχει προσδιοριστεί ως τρεις φορές υψηλότερο σε σύγκριση προς εκείνα των ερυθρών οίνων και το πράσινο τσάι (Castilla et al., 2008). Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες αυτές αφορούν την αξιολόγηση των *in vitro* αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του χυμού ροδιού και εκεί είναι μόνο λιγοστές αναφορές στις επιπτώσεις του στον άνθρωπο. Έτσι, υπήρχε περιέργεια να διερευνηθεί το παρόν *in vivo* αντιοξειδωτική ικανότητα των PJ μέσω της αξιολόγησης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας τους (TAC), τα επίπεδα MDA (ένας βιοδείκτης της υπεροξειδωσης λιπιδίων) και τα επίπεδα από καρβονύλια πρωτεΐνης



(CARB), τα οποία αποτελούν ένα βιοδείκτη οξειδωσης πρωτεΐνης στο ανθρώπινο πλάσμα. Τέλος, τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και η δραστηριότητα καταλάσης (CAT) αξιολογούνται επίσης σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.

Λιγότερο μελετημένα για την αντιοξειδωτική του ικανότητα είναι τα φυτά της οικογενείας Rosaceae. Η Rosaceae είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια (η οικογένεια των ρόδων) ανθοφόρων φυτών, που συμπεριλαμβάνει περίπου 2830 είδη σε 95 γένη (Steves, 2001). Το όνομα προέρχεται από το είδος του γένους *Rosa*. Μεταξύ των γενών με τα περισσότερα είδη γένη αλχεμίλλα (270), *Sorbus* (260), *Crataegus* (260), *Cotoneaster* (260), και *Rubus* (250) (Steves, 2001), αλλά το μεγαλύτερο γένος είναι το γένος *Prunus* (δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βερίκοκα και αμύγδαλα) με περίπου 430 είδη. Έχει δειχθεί ότι τα φυτά αυτά έχουν αντιοξειδωτική δράση και προϊόντα τους χρησιμοποιούνται για δερματολογική χρήση. Έχουν την ικανότητα να μειώνουν την φλεγμονή στο δέρμα καθώς και το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς που πάσχουν από δερματικές παθήσεις (Jones, 2009; Tisma, 2009). Όσον αφορά την *in vitro* αντιοξειδωτική τους ικανότητα μελετώνται για πρώτη φορά στην συγκεκριμένη εργασία.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, σε εκχυλίσματα φυτών της οικογενείας Rosaceae καθώς και σε εκχυλίσματα ροδιού. Τα δείγματα Rosaceae που εξετάστηκαν ήταν 23. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δυο *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> από αντιοξειδωτικές ενώσεις. Σε όλες τις μεθόδους προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Με βάση τις τιμές των IC<sub>50</sub> το σύνολο των 23 εκχυλισμάτων φυτών της οικογενείας Rosaceae παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH<sup>•</sup> και μάλιστα τα περισσότερα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> για τα Rosaceae κυμαίνονταν από 7,5 μg/ml έως 580 μg/ml. Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το *Potentilla speciosa* με IC<sub>50</sub> 7,5μg/ml. Το δεύτερο σε αντιοξειδωτική δράση ήταν το *Aremonia agrimonoides* και το *Alchemilla xanthochlora* με IC<sub>50</sub> 8,5μg/ml. Αμέσως μετά ήταν το *Fragaria vesca* και το *Rosa arvensis* με IC<sub>50</sub> 9,5μg/ml. Επίσης, η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> έδειξε ότι το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> για τα Rosaceae κυμαίνονταν από 3,5 μg/ml έως 280 μg/ml. Ισχυρότερη δράση είχαν το *Potentilla speciosa* και το *Rosa arvensis* με IC<sub>50</sub> 3,5 μg/ml. Αμέσως μετά ήταν το *Aremonia agrimonoides*, το *Fragaria vesca*, το *Rubus*

*idaeus* και το *Sanguisorba agrimonoides* με  $IC_{50}$  4 $\mu$ g/ml, ενώ το τρίτο σε αντιοξειδωτική δράση ήταν το *Rosa sempervirens* με 4,5  $\mu$ g/ml. Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα διαφορετικά είδη Rosaceae οφείλονται προφανώς στη διαφορετική σύστασή τους σε βιοδραστικά συστατικά και κυρίως σε πολυφαινόλες. Επιπλέον, ήταν χαρακτηριστικό ότι μεταξύ των τιμών  $IC_{50}$  των μεθόδων DPPH και ABTS υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση ( $r = 0,756$ ;  $p < 0,01$ ) γεγονός που δείχνει ότι πιθανώς οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των εκχυλισμάτων είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση των δύο ριζών.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα ροδιού παρουσίασαν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH• από ότι τα εκχυλίσματα Rosaceae. Το εύρος των τιμών  $IC_{50}$  για τα δείγματα ροδιού ήταν μικρότερο και κυμαίνονταν 2,7  $\mu$ g/ml έως 11  $\mu$ g/ml. Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το δείγμα Π2 που προέρχεται από τον φλοιό του καρπού της ποικιλίας Περσεφόνη με  $IC_{50}$  2,7  $\mu$ g/ml. Αμέσως μετά ήταν το δείγμα W2 που προερχόταν από τον φλοιό του καρπού της ποικιλίας Wonderful και το δείγμα Ξ3 που προερχόταν από τον καρπό της ποικιλίας Ξινή Ερμιόνης με  $IC_{50}$  2,9 και 3  $\mu$ g/ml αντίστοιχα. Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> έδειξε ότι το εύρος των τιμών  $IC_{50}$  για τα δείγματα ροδιού κυμαίνονταν 1,6  $\mu$ g/ml έως 4,7  $\mu$ g/ml. Ισχυρότερη δράση παρουσίασε το δείγμα Π2 που προέρχεται από τον φλοιό του καρπού της ποικιλίας Περσεφόνη με  $IC_{50}$  1,6  $\mu$ g/ml. Αμέσως μετά ήταν το δείγμα Ξ3 που προερχόταν από τον καρπό της ποικιλίας Ξινή Ερμιόνης με  $IC_{50}$  1,9  $\mu$ g/ml και το δείγμα ΠΛ που προερχόταν από το βρώσιμο τμήμα του καρπού της ποικιλίας Πλούτο με 2  $\mu$ g/ml αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε κι εδώ μια μεγαλύτερη ικανότητα των εκχυλισμάτων ροδιού να εξουδετερώνουν τη ρίζα του ABTS. Στην περίπτωση αυτής της μεθόδου το εύρος των τιμών  $IC_{50}$  ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μέθοδο του DPPH•. Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα διαφορετικά εκχυλίσματα Ροδιάς οφείλονται προφανώς στη διαφορετική σύστασή τους σε φυτικές πολυφαινόλες. Επιπλέον, ήταν χαρακτηριστικό ότι μεταξύ των τιμών  $IC_{50}$  των μεθόδων DPPH και ABTS υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση ( $r = 0,892$ ;  $p < 0,01$ ) γεγονός που δείχνει ότι πιθανώς οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των εκχυλισμάτων είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση των δύο ριζών. Φαίνεται λοιπόν, ότι ο συνδυασμός των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει το ρόδι μπορεί αποτελέσει σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών (Lansky et Newman, 2007). Επιπλέον σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου δείχθηκε ότι ο χυμός ροδιού είχε σημαντική αντιοξειδωτική δράση σε ανθρώπους που τον κατανάλωσαν για 15 ημέρες καθώς βελτίωσε τους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα (Matthaiou, 2014).

Συγκεκριμένα οι δείκτες οξειδωτικού στρες που βελτιώθηκαν ήταν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδά τους πριν τη λήψη του χυμού, τα επίπεδα της MDA που ήταν επίσης μειωμένα ακόμα και μια βδομάδα μετά την διακοπή της λήψης του χυμού. Επίσης, η γλουταθειόνη παρατηρήθηκε αυξημένη σημαντικά μετά την διακοπή λήψης του χυμού. Αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο με σημαντική δράση για το κύτταρο. Πιθανόν ο χυμός να ενισχύει τη δράση των ενζύμων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα του χυμού.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα των δειγμάτων Rocaseae και ροδιού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα του ροδιού Π2 που προέρχεται από τον φλοιό του καρπού της ποικιλίας Περσεφόνη ήταν ιδιαίτερα ισχυρό με τιμή  $IC_{50}$  2,7  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH και 1,6  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο ABTS. Ήταν το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση όλα τα φυτά, που εξετάστηκαν και με τις δύο τεχνικές. Τα εκχυλίσματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή διαφόρων συμπληρωμάτων διατροφής. Επίσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν πρόσθετα σε διάφορες κρέμες ή σε διάφορα βιολειτουργικά τρόφιμα. Ωστόσο είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη τους σε *in vivo* συστήματα για να προσδιοριστεί η δράση τους σε επίπεδο οργανισμού.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alper Neslihan Bahçeci , K. Savas and Jale Acar. Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice., *Journal of Food Processing and Preservation*, October 2005, Volume 29, Issue 5-6, pages 357–368

Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. 1999 Cardiovascular and renal benefits of dry beans and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 70: S464-474.

Aslam MN, Lansky EP, Varani J. 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 103:311–8.

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

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D. 2004. "Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation". *Clin Nutr* 23 (3): 423–33.

Baruchel S, Wainberg MA, "The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus": *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 111–114: 1992

Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L., 1998 , "Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity.", *Drugs Exp Clin Res.* 24:133–138

Bettors JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2004; 170:1179-1184.

Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D (11 November 2009). "Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay". *J Agric Food Chem* 57 (21): 10181–6.

Bishop DJM, Weinberg RA, "The themes hallmarks in of Cancer", *Cell*, 00:57-70, 2000.

Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan* 91: 179-194.  
Caragay AB, "Cancer- preventative foods and ingredients" *Food Tech* 46(4), 65-68: 1992.

Cam M, Hisil Y, Durmaz G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 112:721–6.

Celik I, Temur A, Isik I. 2009. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chem Toxicol* 47(1):145–9.

Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.

Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.

Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod.* 1992 55:179–183.

Craig WJ, “Health Promoting Properties of Common Herbs”, *Am. J Clin Nutr* 70(3): 491-499, 1999.

Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 11:815-821.

Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provos JC, Liker H, Aviram M. 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame J Cardiol* 104(7):936–42

Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Progress in Clinical and Biological Research.* 1986 213:481–489.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* 1999 65:337-353.

Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. *Br J Biomed Sci.* 1994 51:358–370.

Di Silvestro RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. 2009. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phytother Res* 23:1123–7.

Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules* 14:1808–17.

Elliot RH, Strunin L, “Hepatotoxicity of volatile anaesthetics”, *British*

*Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, 1993.

Evans PH, “Free radicals in brain metabolism and pathology”, *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, 1993.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L (2004). "Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia". *J Med Food* 7 (3): 305–8.

Ferguson Lynnette R, (2001), *Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutation Research*, 475:89-111

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 48:3597-3604.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.

Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000

Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS “Chemoprevention”, *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49, 1995.

Haidari M, Ali M, Casscells SW, Madjid M. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed*.

Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzyme* 186, 1990.

Halliwell B, “Free Radicals and other reactive species in Disease”, *National University of Singapore*, 2001.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.

Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989

Harborne JB, Williams C.A., *Advances in flavonoid research since 1992*, *Phytochemistry* 55, 481–504, 2000.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine*. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.

Harborne JB. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall, 1993

Hamad AW, Al-Momene W. 2009. Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnol* 25(1):286.

Heber DH (October 8, 2008). "Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins". *Cancer Lett* 269 (2): 262–8.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships*, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584

Hernández F., P. Melgarejo, F. A. Tomás-Barberán and F. Artés, *Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (Punica granatum) clones* *European Food Research and Technology*, November 1999, Volume 210, Issue 1, pages 39-42

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet.* 1993 342:1007-1011.

Huang M-T., Osawa T., Ho C-T., Rosen R. T. (1994). *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I - Fruits and Vegetables*, American Chemical Society, ISBN13: 9780841227682 Chapter 24, 294–302.

Jenkins RR. *Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med* 1988; 5: 156 70.

Ji LL. 1999. *Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.

Jones DA. *Rosacea, reactive oxygen species, and azelaic Acid. J Clin Aesthet Dermatol.* 2009 Jan;2(1):26-30.

Kaefer CM, Milner JA, "The role of herbs and spices in cancer prevention", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6): 347-361, 2008.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. BMJ.* 1996 312:478-481.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. *Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am J Clin Nutr.* 2002 76: 560-568.

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

Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM (February 21, 2007). "In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin". *J Agric Food Chem* 55 (4): 1491–500

LaRue, James H. (1980). "Growing Pomegranates in California". *California Agriculture and Natural Resources*.

Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wanga CC. 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118:315–22.

Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999; 25: 1205-1208.

Lee FT, Kuo TY, Liou SY, Chien CT. Chronic *Rhodiola rosea* extract supplementation enforces exhaustive swimming tolerance. *Am J Chin Med*. 2009;37(3):557-72.

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.

Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res*. 1994 54:1895s-1898s.

Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 276:E1083–E1091.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727- 47.

Mathers J.C. 2002 Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br J Nutr* 88: S273-9.

Morton JF (1987). "Pomegranate, *Punica granatum L.*". *Fruits of Warm Climates. Purdue New Crops Profile*. pp. 352–5

Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M, (2001), *Flevooids: a review of probable mechanisms of action and potential 88ynaecologic*, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med*. 2008;38(7):579-606.

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc*. 38: 1443-1450.

Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, "Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases", *flammopharmacology*, 1: 3–36: 1991



Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74

Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*. 1989 10:1833-1839

Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.

Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. 2005 Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.

Schubert SY, Lansky EP, Neeman I (July 1999). "Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids". *J Ethnopharmacol* 66 (1): 11–17.

Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D (1 October 2006). "Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours". *J Nutr*. 136 (10): 2481–5.

Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, "The role of oxidative stress in the genesis of heart disease", *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998

Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Morthy V, Ramassamy C. 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism and cellular and molecular mechanism. *J Agric Food Chem* 56:4855–73.

Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.

Steinmetz KA, Potter JD, "Vegetables, fruit and cancer preventions a review", *J Am Diet Assoc*, 96: 1027-1039, 1996.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website Version 9, June 2008

Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998

Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555

Tisma VS, Basta-Juzbasic A, Jaganjac M, Brcic L, Dobric I, Lipozencic J, Tatzber F, Zarkovic N, Poljak-Blazi M. Oxidative stress and ferritin expression in the skin of patients with rosacea. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Feb;60(2):270-6. doi: 10.1016/j.jaad.2008.10.014. Epub 2008 Nov 25.

Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol* 17:377–85.

Watson, L., and Dallwitz, M.J. (1992 onwards). *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.* Version: 21st March 2010.

Wattenberg L W, "Chemoprevention of cancer", *Cancer Res*, 45: 1-8, 1985

Wilson RL, "Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries", *New York Academic Press*: 123-224, 1978.

Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.

Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.

Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.

Yu F, Lu S, Yu F, Feng S, McGuire PM, Li R, Wang R. Protective effects of polysaccharide from *Euphorbia kansui* (*Euphorbiaceae*) on the swimming exercise-induced oxidative stress in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Oct;84(10):1071-9.

Venn B.J., Mann J.I. 2004 Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr* 58: 1443-1461

Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120

Zandi P, Ahmadi L, "Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family", *J Food Sci Technol*, 37: 436–439, 2000.