



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε  
εκχυλίσματα από *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*,  
και *Artemisia arborescens*

Assessment of antioxidant activity of extracts from *Conium  
divaricatum*, *Ruta graveolens* and *Artemisia arborescens*



ΛΑΔΑΣ Δημήτριος

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Σέρκος Χαρουτουγιάν:** Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. ΣΤΑΓΚΟΥ Δημητρίου , Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. ΚΟΥΡΕΤΑ Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα, το οποίο μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια του και για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να στηρίξει την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Τέλος ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό μετά από πολλές μελέτες που έχουν γίνει, ότι οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, σχετίζονται με πλήθος ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α. Επίσης έχει βρεθεί ότι αρκετά φυτικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτική δράση και χημειοπροστατευτική τους δράση. Σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τα είδη φυτών *Conium divaricatum* της οικογένειας Apiaceae, *Ruta graveolens* της οικογένειας Rutaceae, και *Artemisia arborescens* της οικογένειας Asteraceae. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε in vitro η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH, ABTS, Reducing Power, αναστολή της ρίζας OH<sup>·</sup>, αναστολή της ρίζας O<sub>2</sub><sup>·</sup>, με ισχυρότερο το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exd) με IC<sub>50</sub> **60μg/ml** για την DPPH, RP<sub>0.5AU</sub> **44μg/ml** για την Reducing Power, και IC<sub>50</sub> **28μg/ml** για την αναστολή της ρίζας O<sub>2</sub><sup>·</sup>. Ενώ με τις μεθόδους ABTS και αναστολή της ρίζας OH<sup>·</sup> ισχυρότερο ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* με τιμή IC<sub>50</sub> **85μg/ml** και **70μg/ml**, αντίστοιχα . Επίσης εξετάστηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπου το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exd) έδειξε τη μεγαλύτερη τιμή (**87,8 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και ιδιαίτερα του υδατικού εκχύλισματος του *Conium divaricatum* (93 Exd) είχαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, και θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω για τις ευεργετικές τους δράσεις.

## ABSTRACT

It is known that free radicals and oxidative stress relate to a variety of diseases, like cancer and cardiovascular diseases. Additionally, many of extracts derived from plants are rich in polyphenols, which have important biological properties, like antioxidant and chemopreventive. In the present study, we examined plant extracts from *Conium divaricatum* (Apiaceae family), *Ruta graveolens* (Rutaceae family) and *Artemisia arborescens* (Asteraceae family). We tested in vitro the antioxidant activity of the extracts using DPPH, ABTS, Reducing Power, OH $\cdot$  radical scavenging and O $_2\cdot$  radical scavenging assays. The aquatic extract from *Conium divaricatum* (93 Exd) was the most potent with IC $_{50}$  **60 $\mu$ g/ml** for the DPPH assay, RP $_{0.5AU}$  **44 $\mu$ g/ml** for the Reducing Power assay and IC $_{50}$  **28  $\mu$ g/ml** for the O $_2\cdot$  radical scavenging assay. While, the methanolic extract from *Conium divaricatum* (93 Exc) was the most potent in the ABTS assay and for the OH $\cdot$  radical scavenging assay with IC $_{50}$  **85 $\mu$ g/ml** and **70 $\mu$ g/ml**, respectively. Regarding the Total Phenolic Content assessed by Folin-Ciocalteu assay, the aquatic extract from *Conium divaricatum* (93 Exd) exhibited the highest value (**87,8 mg TPC/g dry extract**).

The results of the study provided significant information for the antioxidant activity of the above mentioned extracts and especially for the aquatic extract from *Conium divaricatum* (93 Exd), which should be further examined for their beneficial health effects.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.1.1. Ενδογενείς πηγές .....	8
1.1.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	9
1.2. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών .....	9
1.2.1. Θετικές επιδράσεις .....	9
1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	10
Οξείδωση λιπιδίων .....	10
Οξείδωση πρωτεϊνών.....	10
Οξείδωση DNA.....	11
1.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	11
1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά .....	11
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) .....	12
Καταλάση (CAT) .....	12
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX).....	12
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).....	13
1.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	13
Γλουταθειόνη .....	13
Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).....	13
Βιταμίνη E (τοκοφερόλη) .....	14
Ουρικό οξύ.....	14
Συνένζυμο Q10 .....	14
Σελήνιο .....	14
Μεταλλοθειονίνες.....	14
1.4. Οξειδωτικό στρες .....	15
1.5. Πολυφαινόλες .....	15
1.5.1. Φλαβονοειδή.....	17
1.5.2. Πολυφαινολικά οξέα.....	17
1.5.3. Στιλβένια.....	17
1.5.4. Λιγνάνες.....	18
1.6 <i>Conium divacatum</i> .....	18
1.7 <i>Ruta graveolens</i> .....	19
1.8 <i>Artemisia arborescens</i> .....	20
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	21
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	22

3.1. Αντιδραστήρια.....	22
3.2. Εκχυλίσματα .....	22
3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH• ..	23
3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+ ..	25
3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	27
3.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• .....	29
3.7. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> .....	30
3.8. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης .....	31
<b>4. Αποτελέσματα Μετρήσεων.....</b>	<b>33</b>
4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH.....	33
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+ .....	37
4.3. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	41
4.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• .....	42
4.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> .....	45
4.6. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης. ....	48
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>51</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>54</b>

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Ελεύθερες ρίζες**

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δομές καθώς τείνουν να αποσπαστούν ηλεκτρόνια από άλλα άτομα ή μόρια με σκοπό να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα. Διακρίνονται στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο, τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS), που προέρχονται από το άζωτο, τις δραστικές μορφές θείου (RSS), που προέρχονται από το θείο και τις δραστικές μορφές χλωρίου (RCS), που προέρχονται από το χλώριο (Halliwell & Gutteridge, 2007). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που θεωρούνται οι σημαντικότερες μεταξύ των ελεύθερων ριζών, είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ) και του υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), καθώς και χημικά μόρια που δεν φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα, τα ηλεκτρόνια τους ωστόσο βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση και είναι ιδιαίτερα τοξικά για τα κύτταρα, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και η μονή ρίζα οξυγόνου ( $1\text{O}_2^-$ ) (Rice-Evans & Gopinathan, 1995)

#### **1.1.1. Ενδογενείς πηγές**

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ενδογενώς από βιοχημικές διεργασίες με κυριότερη την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Di Meo & Venditti, 2001). Οι κυριότερες διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου περιλαμβάνουν: 1) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου  $\text{OH}^\bullet$ , οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων, 2) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ως παραπροϊόν κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων, 3) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων, 4) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Messner & Imlay, 2002).

Την πλέον σημαντική θέση παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου συνιστούν τα μιτοχόνδρια, τα οποία φέρουν τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και εντός αυτών πραγματοποιείται, κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κατά τις παραπάνω μεταβολικές διεργασίες σημαντικός αριθμός ηλεκτρονίων μεταφέρονται από τα ένζυμα απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας ανιόντα



υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Messner & Imlay, 2002, Wulf, 2002).

Μία ακόμα ενδογενής πηγή ROS και κυρίως H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελούν τα υπεροξειδιοσώματα. Τα μεμβρανικά αυτά κυστίδια διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα όπως είναι η καταλάση, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με στόχο την απομάκρυνση διαφόρων επιβλαβών ουσιών για το κύτταρο (Berg *et al.*, 2010).

Επίσης, τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο O<sub>2</sub> και οξειδώνοντας το υπόστρωμα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Κατά τη διάρκεια της άσκησης η αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης οδηγεί στην παραγωγή O<sub>2</sub><sup>•</sup> (Cooper *et al.*, 2002), ενώ και η αυτοοξειδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brantley *et al.* 1993, Βεσκούκης, 2010). Τέλος, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•</sup>, OH<sup>-</sup> και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Klebanoff *et al.*, 1988, Βεσκούκης, 2010).

### **1.1.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών**

Πολλά φάρμακα, και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, φυτοφάρμακα αλλά και το αλκοόλ ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Κατά ανάλογο τρόπο, η διατροφή φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Halliwell, 1994, Bailey *et al.*, 1999, Mohanty, 2002). Επίσης διάφοροι, εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση (Lodovici & Bigagli, 2011), ο καπνός του τσιγάρου (Valavanidis *et al.*, 2009), η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Liebel *et al.*, 2012, Poljsak & Dahmane., 2012) μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

### **1.2. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών**

Είναι φανερό ότι ενώ οι ελεύθερες ρίζες σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για την κυτταρική λειτουργία και την άμυνα του οργανισμού, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι υπεύθυνες για κυτταρικές βλάβες (Ντουνούση *et al.*, 2009).

#### **1.2.1. Θετικές επιδράσεις**

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού που σε χαμηλές συγκεντρώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως χρήσιμα σηματοδοτικά μόρια στους

μηχανισμούς ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης (Ji, 2007), στην επιδιόρθωση ογκογενετικών φαινότυπων καρκινικών κυττάρων (Valko 2007), στην διακυτταρική μεταγωγή σήματος (Reid, 2001), στην έκφραση γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη φλεγμονή (Fehrenbach *et al.*, 2001, Reid 1992). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Finnaudet al., 2006), ενώ συνδέονται με την ενζυμική ενεργοποίηση, την αναπλήρωση του γλυκογόνου καθώς και την αποτοξικοποίηση φαρμάκων (Jenkins, 1988)

### **1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις**

#### **Οξειδωση λιπιδίων**

Ένας στόχος των ελευθέρων ριζών είναι η λιπιδική μεμβράνη η οποία υφίσταται λιπιδική υπεροξείδωση και καταστρέφεται προκαλώντας βλάβη στην λειτουργία του κυττάρου. Τα λιπίδια των μεμβρανών που είναι παρόντα σε υποκυτταρικά οργανίδια, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβη προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες. Τα λιπίδια όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να υποβληθούν σε μια εξαιρετικά επιζήμια αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξείδωσης (Devasagayam *et al.*, 2003). Η συνολική διαδικασία της λιπιδικής υπεροξείδωσης περιγράφεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination) (Girotti, 1985). Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει ως συνέπεια αλυσιδωτές αντιδράσεις, λόγω της δημιουργίας ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων (LOOH, LOO<sup>·</sup>), τα οποία προκαλούν την απώλεια δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της μεμβράνης (Masson *et al.*, 1997). Αυτές οι ελεύθερες ρίζες (ROO<sup>·</sup>) είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες. Κατά αυτόν τον τρόπο αυτό οι ROO<sup>·</sup> προωθούν τη διάδοση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε άλλα λιπαρά οξέα (Halliwell & Gutteridge, 2007; Clarkson & Thompson, 2000). Η οξειδωση όλων των ειδών των λιπιδίων έχει συσχετισθεί με την γενικότερη υγεία του οργανισμού και ειδικότερα με την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης, (Guo *et al.*, 2001, Witztum & Steinberg, 2001) της καρδιακής ανεπάρκειας (Mozaffarian *et al.*, 2004), της στεφανιαίας νόσου (Zaloga *et al.*, 2006), με τη γήρανση και διάφορα είδη νεοπλασιών.

#### **Οξειδωση πρωτεϊνών**

Η οξειδωση των πρωτεϊνών από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) επάγει την παραγωγή σταθερών και δραστικών προϊόντων όπως τα πρωτεϊνικά υδροπεροξειδία, τα οποία καταλήγουν στην δημιουργία περαιτέρω δραστικών μορίων ειδικά αν αλληλεπιδράσουν με μεταλλικά ιόντα. Αν και οι

περισσότερες οξειδωμένες πρωτεΐνες που είναι λειτουργικά ανενεργές απομακρύνονται ταχύτατα, ορισμένες από αυτές μπορεί να συσσωρευτούν με την πάροδο του χρόνου και να προκαλέσουν βλάβες που συνδέονται με τη γήρανση και με άλλες ασθένειες (Goswami *et al.*, 2006). Η πρωτεϊνική οξείδωση έχει ως συνέπεια τον μετασχηματισμό της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και την τροποποίηση ή παύση της λειτουργικότητάς τους (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### Οξείδωση DNA

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν το DNA προκαλώντας θραύση στις αλυσίδες του και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βάσεων του (Jenkins, 1988). Τελικά, προκαλείται βλάβη στο DNA, που αποδίδεται ως οξείδωση του DNA, και επάγει την καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση καθώς και τη γήρανση (Radak *et al.*, 1999, Dizdaroglu *et al.*, 2002).

### 1.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Σαν αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοδήποτε συστατικό που όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα, αναστέλλει ή επιβραδύνει σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge, 2007). Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Γιαννακοπούλου, 2009). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.



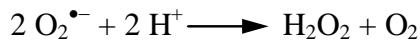
**Εικόνα 1.** Σχηματική παράσταση δράσης αντιοξειδωτικών κατά των ελεύθερων ριζών (Προσαρμοσμένο από Αποστολίδου, 2016)

#### 1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

### Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η ανακάλυψη του ενζύμου SOD από τους McCord και Fridovich το 1969 αποτέλεσε την απαρχή μιας νέας εποχής για τη διερεύνηση των δράσεων των δραστικών ριζών οξυγόνου στους ζώντες οργανισμούς. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), που απομακρύνει τη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$  καταλύοντας την μετατροπή της σε  $H_2O_2$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση

*SOD*

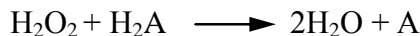


Τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν ένα SODένζυμο που περιέχει μαγγάνιο (MnSOD) στα μιτοχόνδρια, και ένα SODμε χαλκό και ψευδάργυρο (CuZnSOD) κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Αντωνιάδη, 2007).

### Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο, που εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, και καταλύει τη διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση

*CAT*



Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Masters *et al.*, 1986). Συνιστά ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Σε αυτό το τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το  $H_2O_2$  (Halliwell&Gutteridge, 2007).

### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Πρόκειται για ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου. Η GPX καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σύμφωνα με την αντίδραση:

*GPX*



Το ένζυμο αυτό είναι απόλυτα εξειδικευμένο όσον αφορά το δότη των ηλεκτρονίων (GSH). Έχει, όμως, σε αντίθεση με την καταλάση, την ικανότητα να ανάγει έναν μεγάλο αριθμό υπεροξειδίων, εκτός από το  $H_2O_2$  (Γάλαρης, 2015). Η ποικιλία στην ειδικότητα

των υποστρωμάτων και την κυτταρική θέση καθιστούν την GPx πολύτιμη ως ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Το γεγονός ότι πολλά ισοένζυμα GPx ανάγουν μια μεγάλη ποικιλία υδροπεροξειδίων, κάνει την GPx ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων από βλάβες προερχόμενες από ROS (Φλαμπουράρη, 2015).

### **Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)**

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH (Στατήρη, 2014).

### **1.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά**

#### **Γλουταθειόνη**

Η γλουταθειόνη είναι η κύρια μη-πρωτεϊνική θειόλη που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική κυτταρική άμυνα. Είναι ένα τριπεπτίδιο γ-γλουταμινικό – κυστεΐνη – γλυκίνη (γ-Glu-Cys-Gly). Η ενεργός μορφή του γλουταθειού οφείλεται στη θειόλη (-SH) της κυστεΐνης. Είναι ένα ευρέως διαδεδομένο μόριο που παράγεται σε όλα τα όργανα, κυρίως στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους νεφρούς και στους φακούς του ματιού και είναι παρόν ουσιαστικά σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών και σε όλους τους κυτταρικούς τύπους σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM (Pastore *et al.*, 2003).

Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Εξουδετερώνει και απευθείας τις ελεύθερες ρίζες ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May *et al.*, 1996)

#### **Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)**

Η βιταμίνη C είναι το σημαντικότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό το οποίο δρα σε υδατικά περιβάλλοντα στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως αυτά των ματιών και των πνευμόνων. Συνεργάζεται με την τοκοφερόλη(βιταμίνη E), τα καροτενοειδή καθώς και άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Έχει προστατευτική δράση στις μεμβράνες από την οξείδωση. Η χορήγηση βιταμίνης C περιορίζει τους δείκτες οξειδωτικού στρες στο DNA καθώς και τη φθορά στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Επίσης σημειώνει προ-αποπτωτική

δράση και προστασία από τον κυτταρικό θάνατο μετά από έκθεση σε διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα (Valko *et al.*, 2004., Valko *et al.*, 2006).

### **Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)**

Η α-τοκοφερόλη στα κύτταρα αποτελεί σημαντικό συστατικό σε όλες τις βιολογικές μεμβράνες. Η κυριότερη λειτουργία της βιταμίνης Ε συνίσταται στο να διατηρεί την ακεραιότητα των μεμβρανών και αυτό συμπεριλαμβάνει και τη φυσική σταθερότητα στα σωματικά κύτταρα. Η βιταμίνη Ε προστατεύει την καταστροφή των μεμβρανών και προλαμβάνει την οξείδωση ή υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες και συγκεκριμένα στα φωσφολιποειδή. (Gropper, Smith & Groff 2008)

### **Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Το 60% περίπου της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος οφείλεται στο ουρικό οξύ.

### **Συνένζυμο Q10**

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### **Σελήνιο**

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπάρογος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### **Μεταλλοθειονίνες.**

Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό στρες. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του  $\text{Cu}^{2+}$  και του  $\text{Zn}^{2+}$ , στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο Cu (Γιαννακοπούλου, 2009).

#### 1.4. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά ενδιάμεσα και να επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν (Sies, 1997; Storz & Imlay, 1999). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες έχουν σαν αποτέλεσμα την κυτταρική εκφύλιση και εμπλέκονται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται, κατά ένα μέρος, υπεύθυνες (Halliwell *et al.*, 1992).



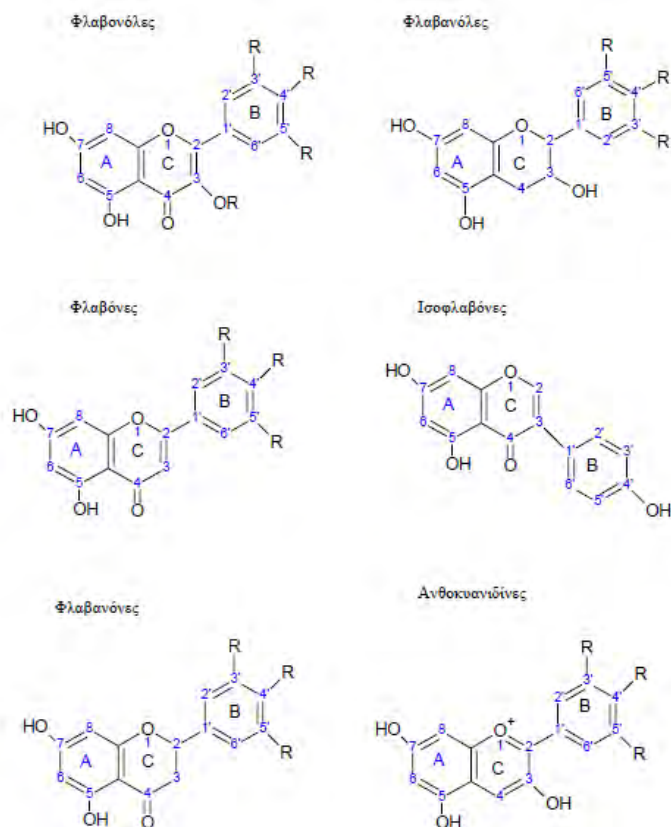
**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

#### 1.5. Πολυφαινόλες

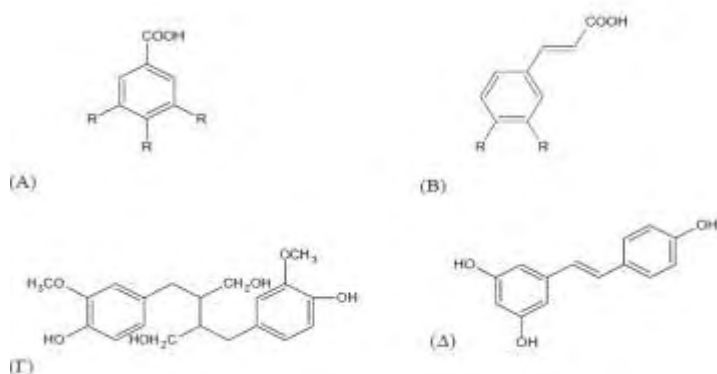
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Σχήματα 1.3 και 1.4) (Manach *et al.*, 2004, Στάγκος, 2006).

Τα φρούτα καθώς και διάφορα ροφήματα (τσάι) όπως και το κρασί συνιστούν κύριες πηγές πολυφαινολών. Ορισμένες πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη απαντώνται σε όλα τα φυτικά είδη και τα προϊόντα αυτών (φρούτα, δημητριακά, λαχανικά, όσπρια, χυμοί φρούτων, τσάι, κρασί, διάφορα αφεψήματα), σε αντίθεση με άλλες που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα (φλαβανόνες σε εσπεριδοειδή, ισοφλαβόνες σε σόγια, φλοριδζίνη

σε μήλα ). Σε πολλές περιπτώσεις, τα τρόφιμα περιέχουν μίγματα από πολυφαινόλες, τα οποία δεν έχουν μελετηθεί (Manach *et al.*, 2004).



**Εικόνα 3.** Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Προσαρμοσμένο από Στάγκος, 2006).



**Εικόνα 4.** Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνάνων. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Προσαρμοσμένο από Στάγκος, 2006).



### **1.5.1. Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι μία κατηγορία φαινολικών ενώσεων που απαντώνται ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο. Υπάρχουν φλαβονοειδή που φέρουν πλήθος διαφορετικών χρώσεων, στις οποίες αποδίδεται σημαντικά το χρώμα των ανθών και καρπών πολλών φυτών (Strack & Wray, 1994).

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών είναι οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης, βασίζεται αφενός στη δημιουργία συμπλόκων με μέταλλα, αφετέρου στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην προσφορά ατόμων Η από τους υδροξυ-υποκαταστάτες στις ελεύθερες ρίζες, περιορίζοντας εξαιρετικά τη δραστηριότητα των τελευταίων. Όλα τα υδροξύλια δεν έχουν την ίδια ικανότητα προσφοράς ατόμου Η, ενώ τα πιθανά είδη OH- υποκατάστασης είναι πάρα πολλά. Καθίσταται λοιπόν εμφανές ότι τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν μεγάλη διαβάθμιση στη δραστηριότητά τους (Τσιμογιάννης, 2008).

### **1.5.2. Πολυφαινολικά οξέα**

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκινναμικά (C6-C3) οξέα.. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford&Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερούλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Τα οξέα αυτά σπανίως βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, με εξαίρεση επεξεργασμένα τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, αποστείρωση και ψύξη (Manach *et al.*, 2004). Έχει δειχθεί ότι τα φαινολικά οξέα συμβάλλουν σε μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης .

### **1.5.3. Στιλβένια**

Τα στιλβένια απαντώνται μόνο σε μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διαίτα. Ένα εξ αυτών, η ρεσβερατρόλη, με ισχυρή αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση, εντοπίζεται σε μικρές ποσότητες στο κρασί και κυρίως στο κόκκινο (Vitrac *et al.*, 2002). Επίσης, η καρδιοπροστατευτική της δράση τονίστηκε ιδιαίτερα μετά την παρατήρηση του «γαλλικού παράδοξου» (Korpp, 1998). Ειδικότερα, η ρεσβερατρόλη φάνηκε ότι προστατεύει και από την ανάπτυξη κακοήθων όγκων, εμποδίζει την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος καθώς και την εξέλιξη καρκίνου του μαστού σε

ποντίκια. Επιπλέον της έχει αποδοθεί πιθανή αντιμιτογόνο δράση. Η αντικαρκινική της δράση έχει δειχθεί και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μεταξύ των οποίων κυττάρων μαστού, προστάτη, παχέος εντέρου και στόματος (Kampaetal., 2000, Ider *et al.*, 2000, Αποστολίδου, 2016).

#### **1.5.4 Λιγνάρες**

Οι λιγνάρες είναι πολυφαινολικές ενώσεις που απαντώνται στα φυτά και εμφανίζουν μεγάλη δομική ποικιλομορφία. Ανήκουν σε μία ομάδα φυτικών φαινολών, των οποίων η δομή καθορίζεται από την ένωση δύο κινναμικών οξέων (δομή 2,3-διβενζυλβουτένιο) ή των βιογενετικών ισοδύναμων τους, ενώ η καταγραφή του περιλαμβάνει 500 ενώσεις (Ayres&Loike, 1990). Συγχρόνως, εμφανίζουν ένα ιδιαίτερα εκτεταμένο εύρος βιολογικών εφαρμογών και μπορούν να δράσουν ως κυτταροτοξικοί, αντιϊικοί (συμπεριλαμβανομένου του ιού HIV), αντιμυκητιακοί, αντιοξειδωτικοί και αντιρευματικοί παράγοντες (Ρηγόπουλος, 2016). Ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, έχουν αναφερθεί βακτηριοκτόνες και εντομοκτόνες ιδιότητες των λιγνανών (Yamasuto *et al.*, 2003). Τέλος, σημειώνουν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στην αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων σε συνεργιστική δράση με τοκοφερόλες (Penalvo *et al.*, 2006).

#### **1.6 *Conium divaricatum***

Το *C. divaricatum* είναι μία διετής πόα με όρθιο κυλινδρικό βλαστό, κοίλο στο εσωτερικό του. Ο βλαστός είναι αραιά διακλαδισμένος, συνήθως χωρίς τα χαρακτηριστικά στίγματα, με τα κατώτερα φύλλα όχι τόσο διαιρεμένα και με ορισμένα τμήματα αδιαίρετα. Τα άνθη των σκιαδίων είναι λευκά και τοποθετούνται σε 6-15 ακτίνες. Οι ακτίνες των σκιαδίων εκτείνονται αποκλίνουσες σε επίπεδο χαμηλότερο του οριζοντίου και στη βάση τους διαθέτουν εύπτωτο περίβλημα αποτελούμενο από 1-3 ελεύθερα, επιμήκη-λογχοειδή βράκτια, που μπορεί και να απουσιάζουν. Οι ακτίνες και οι ποδίσκοι των ανθέων είναι λείοι. Το *C. divaricatum* απαντάται στον ελλαδικό χώρο, σε διάφορες περιοχές της χώρας. Συγκεκριμένα, έχει ανευρεθεί στην Ήπειρο, τη Μακεδονία, τη Θεσσαλία, την Αιτωλία, την Αχαΐα, τη Λακωνία, την Εύβοια και την Κρήτη. Είθισται να φυτρώνει σε χέρσες εκτάσεις με πετρώδες υπόστρωμα, σε άκρες δρόμων, σε ερείπια και ορισμένες φορές σε ανθρωπογενείς τόπους (Καββαδάς, 1956, Βλάση, 2016).



**Εικόνα 5.** *Conium divaricatum*

Αυτό που χαρακτηρίζει χημικά το γένος *Conium*, είναι η ύπαρξη αλκαλοειδών. Συγκεκριμένα, στο *Conium maculatum* περιέχονται πιπεριδινικά αλκαλοειδή, με δύο από αυτά, τη κωνειίνη και τη γ-κωνικεΐνη, να εμφανίζονται συνήθως σε μεγαλύτερες ποσότητες. Όπως και οι περισσότεροι αντιπρόσωποι της οικογένειας *Apiaceae*, το γένος *Conium* φέρει πτητικά συστατικά. Από το φυτό έχουν αναφερθεί επιπλέον στεροειδή, φλαβονοειδή, κουμαρίνες και πολυακετυλένια. Το κώνειο σημειώνει αναλγητική, αντιμικροβιακή, αντιπαρασιτική, αντιφλεγμονώδης δράση καθώς και κυτταροτοξική δράση (Βλάση, 2016).

### **1.7 *Ruta graveolens***

Είναι πολυετές φυτό. Έχει βλαστό όρθιο, λείο, χρώματος γλαύκου, ύψους 20-80εκ, φύλλα έμμισχα, φτεροσχιδή και άνθη κίτρινα. Σήμα κατατεθέν είναι η έντονη χαρακτηριστική μυρωδιά. Αυτοφύεται σε ξηρούς τόπους σε όλη την Ελλάδα. Ευδοκίμει σε παραθαλάσσιες και ημιορεινές περιοχές καθώς επίσης και σε χωράφια ξηρικά. Ανθίζει από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο (Σκρουμπής, 1998).

Το γένος *Ruta* περιλαμβάνει είδη που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη φαρμακευτική χημεία και την ιατρική καθώς περιέχουν πλήθος δραστικών ουσιών (Ulubelen *et al.*, 1986). Το πιο κοινό είδος της οικογένειας *Rutaceae* είναι το *Ruta graveolens*, γνωστό και ως απήγανος το οποίο είναι ενδημικό των Μεσογειακών περιοχών. Χρησιμοποιείται στην λαϊκή ιατρική από αρχαιότητας και αναφέρονται σε αυτό ο Ιπποκράτης και ο Διοσκουρίδης. Χρησιμοποιείται στην ομοιοπαθητική για την θεραπεία των ρευματισμών, γαστρικών διαταραχών και πονοκεφάλων (Miguel, 2003).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, αντιπυρετική, αντισυλληπτική, αντιπαρασιτική δράση, χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της κατανάλωσης αλκοόλ καθώς και ως έμπλαστρο για την αντιμετώπιση των ρευματισμών (Pacífico *et al.*, 2016).



**Εικόνα 6.** *Ruta graveolens*

Το φυτό περιέχει περισσότερες από 120 δραστικές ουσίες, όπως αλκαλοειδή, κουμαρίνες, φλαβονοειδή καθώς και φουροκινολίνες (Kuzonkina *et al.*, 2004). Ο απήγανος περιέχει 2% ρουτίνη, ένα φλαβονοειδές γνωστό για την αντιοξειδωτική του ικανότητα έναντι των οξειδίων αζώτου (Van Acker *et al.*, 1995). Επίσης το μεθανολικό εκχύλισμα του απήγανου, σε αναλογία κατάποσης 20 mg εκχυλίσματος/kg/ανά ημέρα για χρονικό διάστημα 90 ημερών, μειώνει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή σε αρουραίους με υψηλό ποσοστό χοληστερίνης και ως εκ τούτου μπορεί να φανεί χρήσιμο στην αντιμετώπιση της αρτηριοσκλήρυνσης (Ratheesh *et al.*, 2011).

### 1.8 *Artemisia arborescens*

Η Αρτεμισία είναι ένα μεγάλο γένος φυτών της οικογένειας των Asteraceae (Compositae), με περίπου 300 διαφορετικά είδη γνωστά παγκοσμίως. Πρόκειται για φυτά ποώδη ή ημιξυλώδη με αποξυλωμένο το κατώτερο μέρος του κορμού, αλλά με ετήσια ποώδη βλάστηση, πολυετή, σπανίως δε θάμνοι ή ετήσιες πόες. Φέρουν εναλλασσόμενα πτεροειδή ή παλαμοειδή φύλλα και αναπτύσσουν ταξιανθία βότρυς ή βοτρυοειδή φόβη με πολλές ανθικές κεφαλές. Το ύψος των φυτών εξαρτάται από το είδος και ποικίλει από 30-120 εκ. Περίπου 30 είδη Αρτεμισίας αναπτύσσονται γύρω από

τη λεκάνη της Μεσογείου, με 7 από αυτά να απαντώνται και στην Ελλάδα. Συνήθως τα συναντάμε σαν μικρές συστάδες θάμνων ή ποωδών φυτών, με τα περισσότερα από αυτά τα είδη να είναι αρωματικά (Tutin *et. al*, 1976).



**Εικόνα 7.** *Artemisia arborescens*

Πολλά είδη Αρτεμισίας σημειώνουν σημαντική βιολογική δράση, παράγοντας σημαντικούς φαρμακευτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Διάφορες έρευνες αποδεικνύουν σειρά από αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Ahameethunisa & Hopper, 2010; Baykan *et al.*, 2012). Τα είδη της Αρτεμισίας συχνά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ασθενειών όπως φλεγμονές, ηπατίτιδα, καρκίνο και μολύνσεις από Μαλάρια, μύκητες, βακτήρια και διάφορους ιούς. Επίσης αναφέρονται και αντιδιαβητικές ιδιότητες (Jeong-Dan, 2007; Nezhadali *et al.*, 2008). Ειδικότερα, η *Artemisia arborescens* εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, αποχρεμπτική, αντιαλλεργική, αντισταμινική δράση καθώς και δράση προστατευτική της χολής. Ενδείκνυται, για την θεραπεία της βρογχικής καταρροής, του άσθματος, δερματικές προσβολές καθώς και για την εύρυθμη λειτουργία της χολής (Rosé & Earle, 1996).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη φυτών *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens*.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών: τα Tris-HCl, Δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου), PMS (phenazinemethosulfate), 2-δεοξυριβόζη, αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ρίζα DPPH και το ένζυμο HRP ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία), το καυστικό νάτριο (NaOH), το γαλλικό οξύ (gallic acid), το άνυδρο ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ο Θεϊκός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ ), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το EDTA ήταν της εταιρίας Panreac (Ισπανία), το NBT (nitrobluetetrazolium) και το ABTS ήταν της εταιρείας AlphaAesar (Γερμανία), το TCA ήταν της εταιρείας Chem-Lab (Βέλγιο), το TBA ήταν της εταιρείας J&KScientific (Γερμανία).

#### 3.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν, απομονώθηκαν από τα φυτά *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens*, με 4 διαφορετικούς διαλύτες, νερό, μεθανόλη, εξάνιο και διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες διότι καθένας έχει διαφορετική πολικότητα, με αποτέλεσμα να εκχυλίζουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Πίνακας 1.** Λίστα φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Διαλύτης	Κωδικός
<i>Conium divaricatum</i>	Εξάνιο	93 Exa
<i>Conium divaricatum</i>	Διχλωρομεθάνιο	93 Exb
<i>Conium divaricatum</i>	Νερό	93 Exc
<i>Conium divaricatum</i>	Μεθανόλη	93 Exd
<i>Ruta graveolens</i>	Νερό	127 Exd
<i>Artemisia arborescens</i>	Νερό	129 Exd

### 3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•

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, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• 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•) 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•) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). 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.

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH•) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και το H<sub>2</sub>O και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται παρακάτω. Γίνεται μνεία ότι στα εκχυλίσματα 93 Εκα και 93 Εχβ χρησιμοποιήθηκε μόνο μεθανόλη σύμφωνα με το ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 2.** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
<b>Μεθανόλη</b>	1000μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	100μl	100μl						
<b>DPPH•</b>	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>V τελ</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>

**Πίνακας 3.** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για εκχυλίσματα 93 Exa και 93 Exb.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
<b>Μεθανόλη</b>	1000μl	950μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl
<b>DPPH'</b>	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
<b>V τελ</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>	<b>1ml</b>

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 HitachiU-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 (100μl εκχυλίσματος σε 900μl μεθανόλη) Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH' σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

#### **Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.**

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

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

όπου:

$A_0$ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

$A_\delta$ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

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 % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις



συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $IC_{50}$ , τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

### 3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans *et al.*, 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα  $ABTS^{•+}$ . Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonicacid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα  $ABTS^{•+}$  (κατιόν) (Εικόνα 18). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

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

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 64, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

**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  $H_2O$ .

**Διάλυμα  $H_2O_2$  (30  $\mu\text{M}$ ):** Για τελική συγκέντρωση  $H_2O_2$  30  $\mu\text{M}$  σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα 600  $\mu\text{M}$ . Από το stock διάλυμα  $H_2O_2$  30% 8,8 M αραιώνουμε με  $H_2O_2$ , 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 1/10 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 1000 $\mu\text{l}$  στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$
<b>ABTS</b>	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
<b>HRP</b>	-	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50ml	50ml	50ml
<b>V τελ</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>
<b>Εκχύλισμα</b>			10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα ενώ 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.

### ***Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.***

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

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

όπου:  $A_0$ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS<sup>•+</sup> κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

### ***3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu***

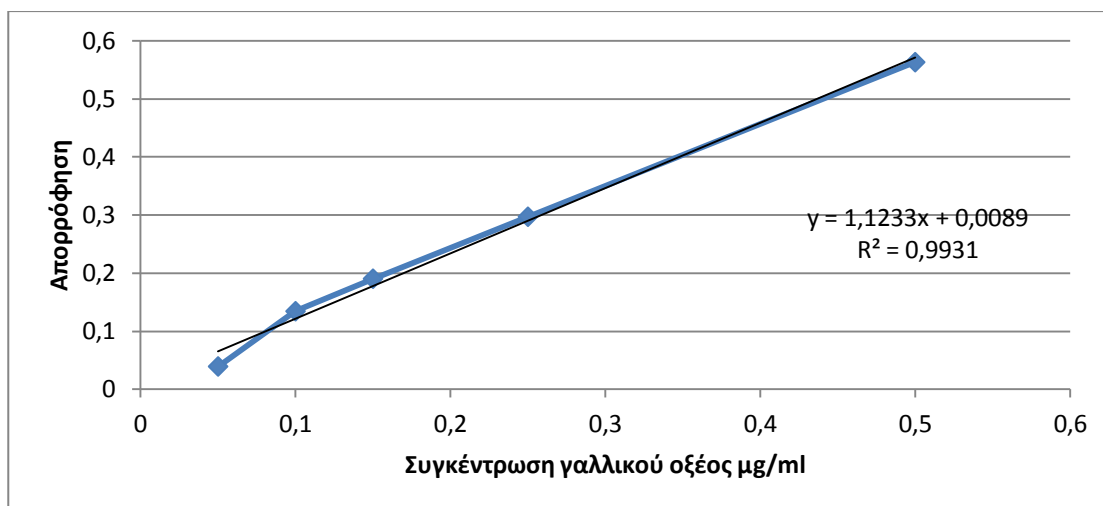
Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ( $P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$ ,  $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$ ). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστήριου FC και του προϊόντος της αντίδρασης. Τα μίγματα της αντίδρασης παρασκευάστηκαν σε erpendorf tubes σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Για κάθε κατάσταση είχαμε 3 επαναλήψεις:

**Πίνακας 5.** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	<b>Δείγμα</b>	<b>Negative Control</b>	<b>Τυφλό</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>1ml</b>	<b>1,1ml</b>	<b>1,02ml</b>
<b>Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau</b>	<b>100μl</b>	<b>-</b>	<b>100μl</b>
<b>C1</b>	<b>20μl</b>	<b>20μl</b>	<b>-</b>
<b>C2</b>	<b>20μl</b>	<b>20μl</b>	<b>-</b>

Ακολούθως, τα δείγματα επώστηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστέθηκαν 280 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765nm (Priftis *et al.*, 2015).

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 ,0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση  $y = 1,1233x + 0,0089$  με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman  $r = 0,9931$ . Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



**Διάγραμμα 3.5.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

### 3.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH·

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH· έγινε με τη μέθοδο των Chung *et al.*, 1997.

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH· μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton και διασπάται σε μαλονδιαλδεΐδη (Gutteridge, 1984, 1987). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου εκτιμάται ως ο ρυθμός αναστολής της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες υδροξυλίου.

Πιο αναλυτικά, 30µL εκχυλίσματος αυξανόμενων συγκεντρώσεων προστέθηκαν σε 225µl sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), 75µl 2-deoxyribose (10 mM), 75 µl FeSO<sub>4</sub>- EDTA (10 mM), 270 µl H<sub>2</sub>O και 75µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) και ακολουθεί επώαση για 1h στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 375 µl TCA (2.8 %) και 375 µl TBA (1 %) και τα δείγματα επωάζονται στους 95° C για 10 min. Ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520

nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν  $H_2O_2$  (10 mM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας  $OH\cdot$  υπολογίζεται από τον τύπο:

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

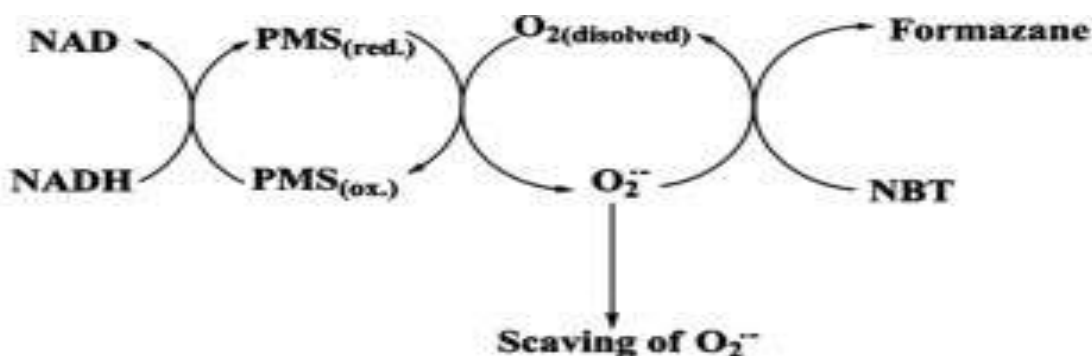
$A_0$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520nm

$A_d$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520nm

### 3.7. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2\cdot^-$

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας  $O_2\cdot^-$  πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin *et al.*, 2004.

Η ρίζα  $O_2\cdot^-$  έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το  $O_2\cdot^-$  μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το  $NBT^{2+}$  με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2\cdot^-$ ) μέσω του συστήματος μεθουλοφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδοαδενινονουκλεοτίδιο (NADH).

Πιο αναλυτικά, σε 625 μl Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστίθενται 125μl NBT (300μM), 125μl NADH (468μM) και 50 μl εκχυλίσματος σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 125 μl PMS (60μM). Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60μM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

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

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

A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560nm

A<sub>d</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560nm

### 3.8. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen&Duh (1994).

Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον  $Fe^{3+}$  και τον ανάγουν σε  $Fe^{2+}$ , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Πιο αναλυτικά, τα εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) σε συγκεντρώσεις των 250, 125, 64, 32 και 16 μg/ml για τα εκχυλίσματα 129 Exd, 127 Exd, 93 Exc καθώς και 125, 64, 32, 16 και 8 μg/ml για το εκχύλισμα 93 Exd. Προστέθηκαν 250μl από το διάλυμα του δείγματος μας σε 250μl potassium ferricyanide (1%) και τα δείγματα μας επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 250μl TCA (10%) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους

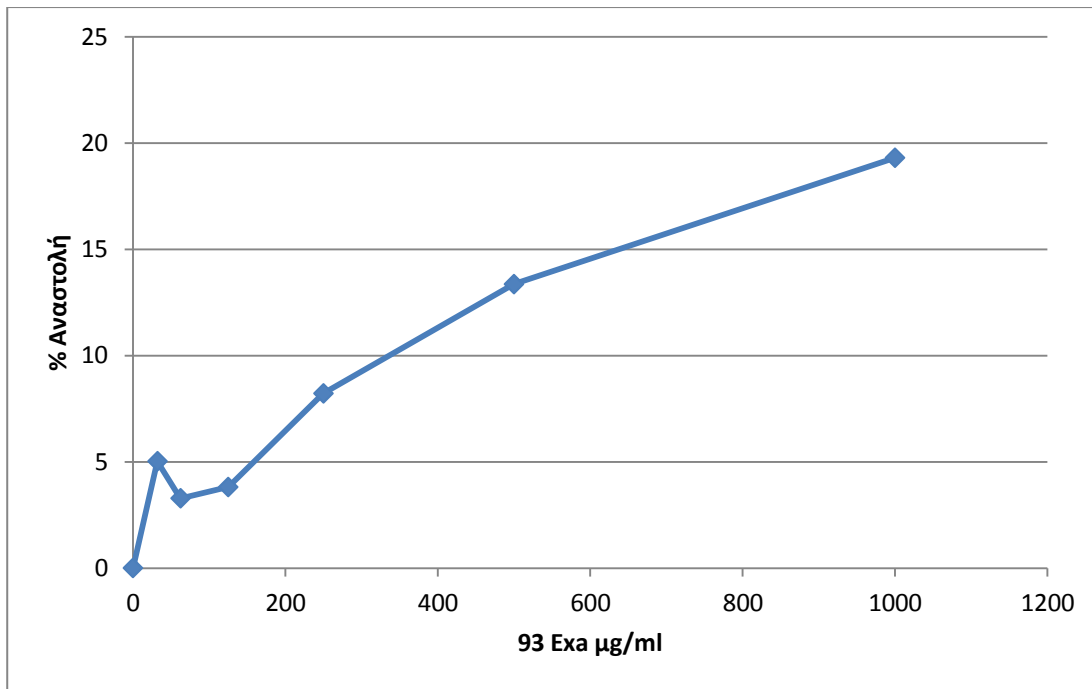
25°C. Στο υπερκείμενο (250μl) προστίθενται 250μl απιονισμένου νερού και 50 μl χλωριούχου σιδήρου(0.1 %) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν τα εκχυλίσματα απορροφούσαν στις ανωτέρω αναφερόμενες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 700 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.



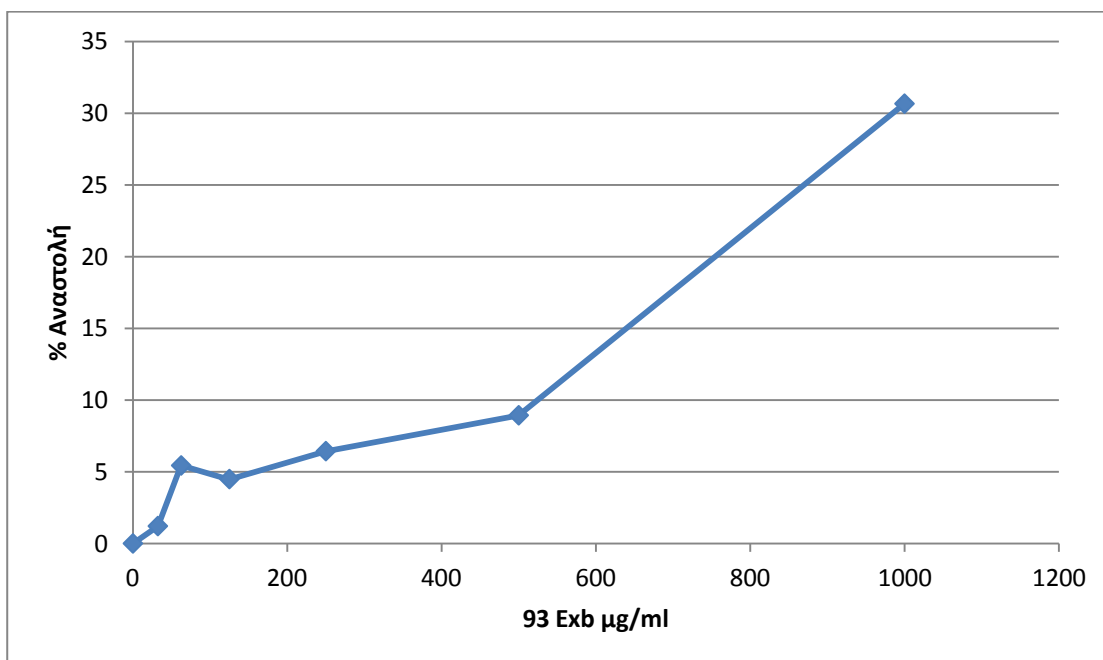
#### 4. Αποτελέσματα Μετρήσεων

##### 4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH

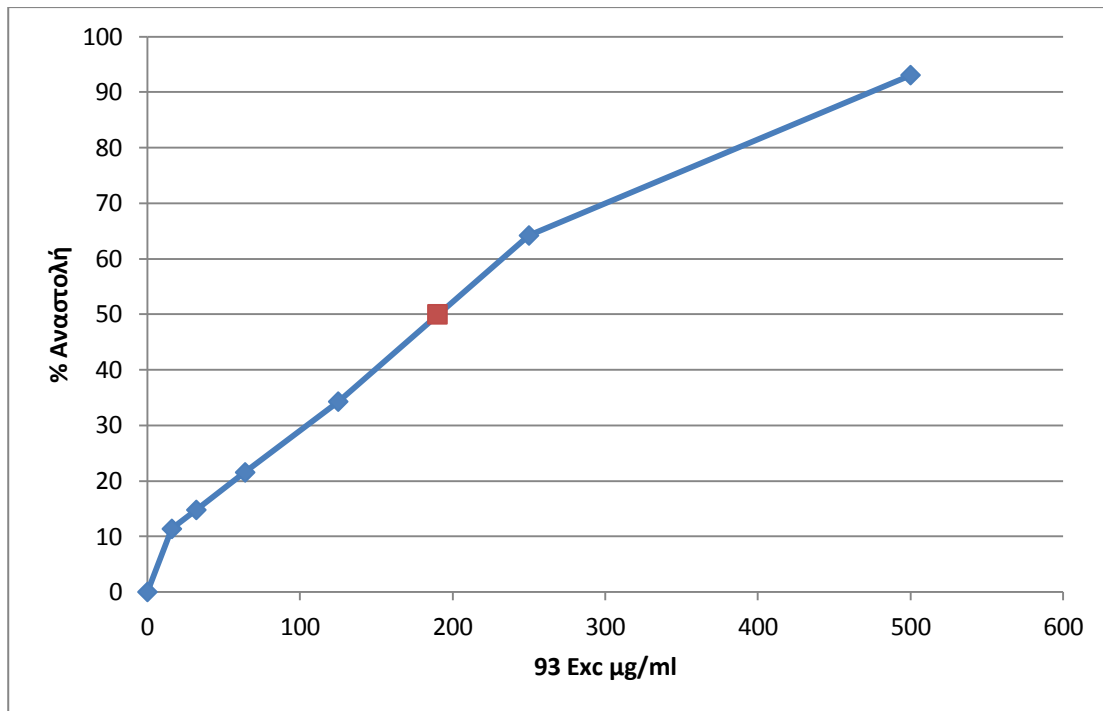
Συνολικά μελετήθηκαν 6 εκχυλίσματα από φυτά των *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 16-1000μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH\*, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.1.7 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από **60μg/ml** έως **192μg/ml** (διάγραμμα 4.1.7). Ειδικότερα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: 93 Exd (IC<sub>50</sub>=**60μg/ml**) > 129 Exd (IC<sub>50</sub>=**165μg/ml**) > 93 Exc (IC<sub>50</sub>=**190μg/ml**) > 127 Exd (IC<sub>50</sub>=**192μg/ml**). Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα εκχυλίσματα 93 Exa και 93 Exb ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1000μl/ml) δεν σημείωσαν αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH κατά 50%.



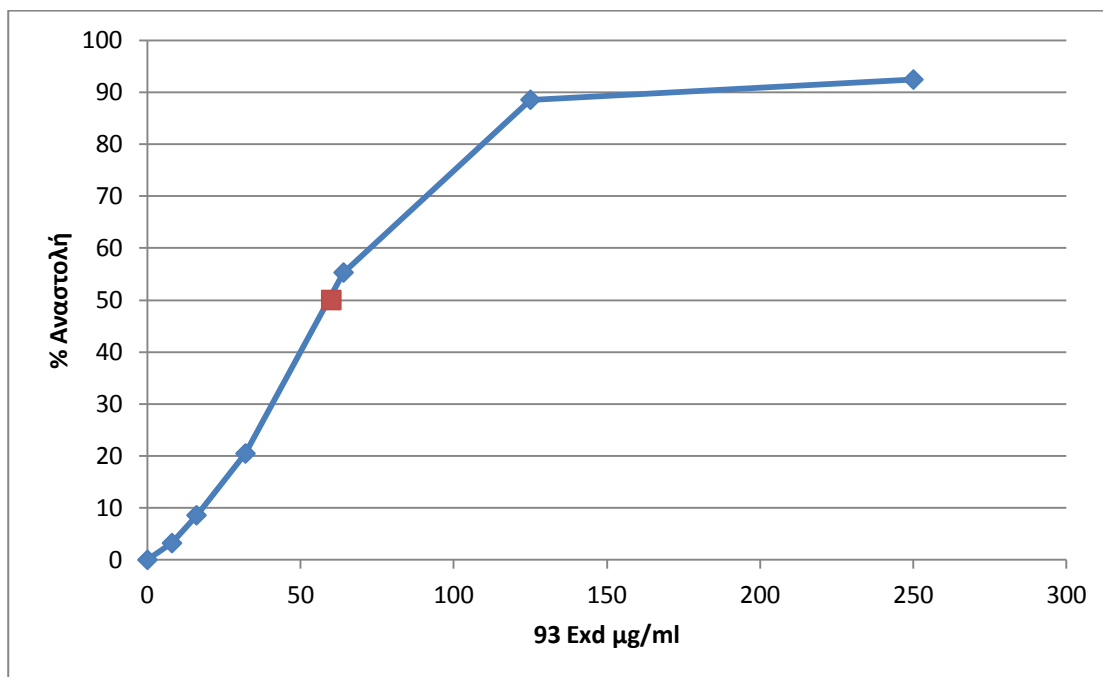
**Διάγραμμα 4.1.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 93 Exa (*Conium divaricatum*).



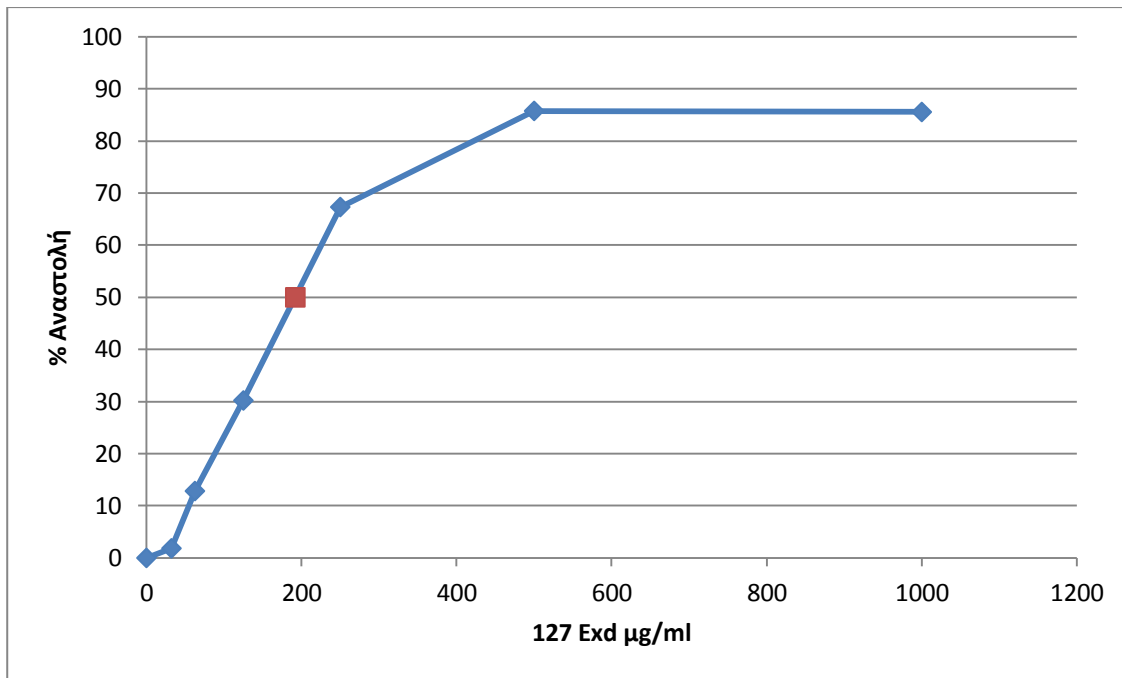
**Διάγραμμα 4.1.2.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 93 Exb (*Conium divaricatum*).



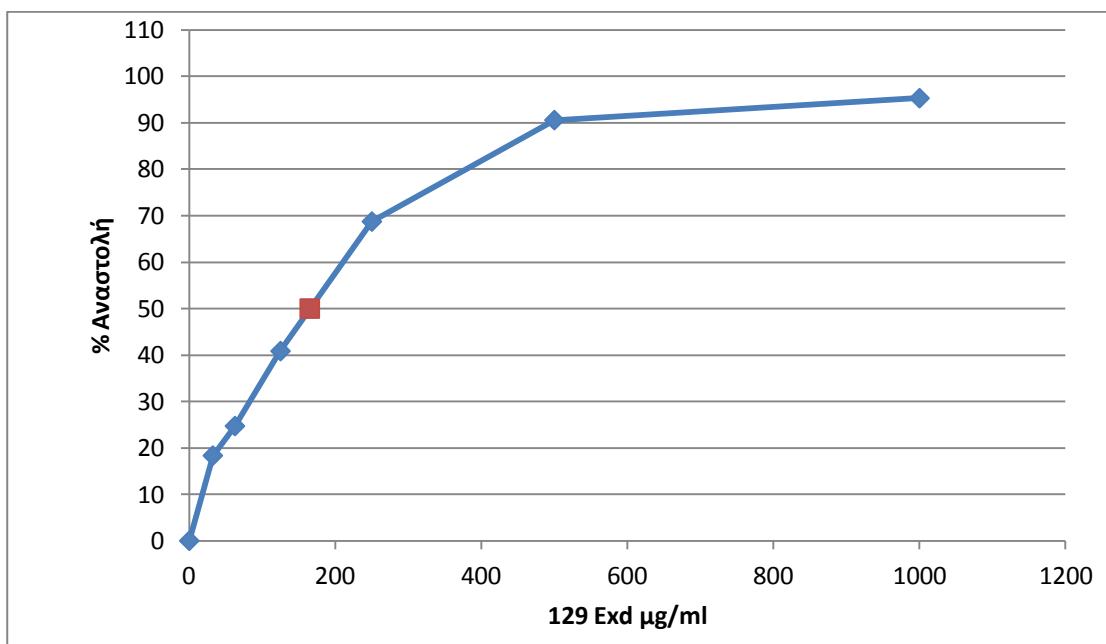
**Διάγραμμα 4.1.3.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 93 Exc (*Conium divaricatum*).



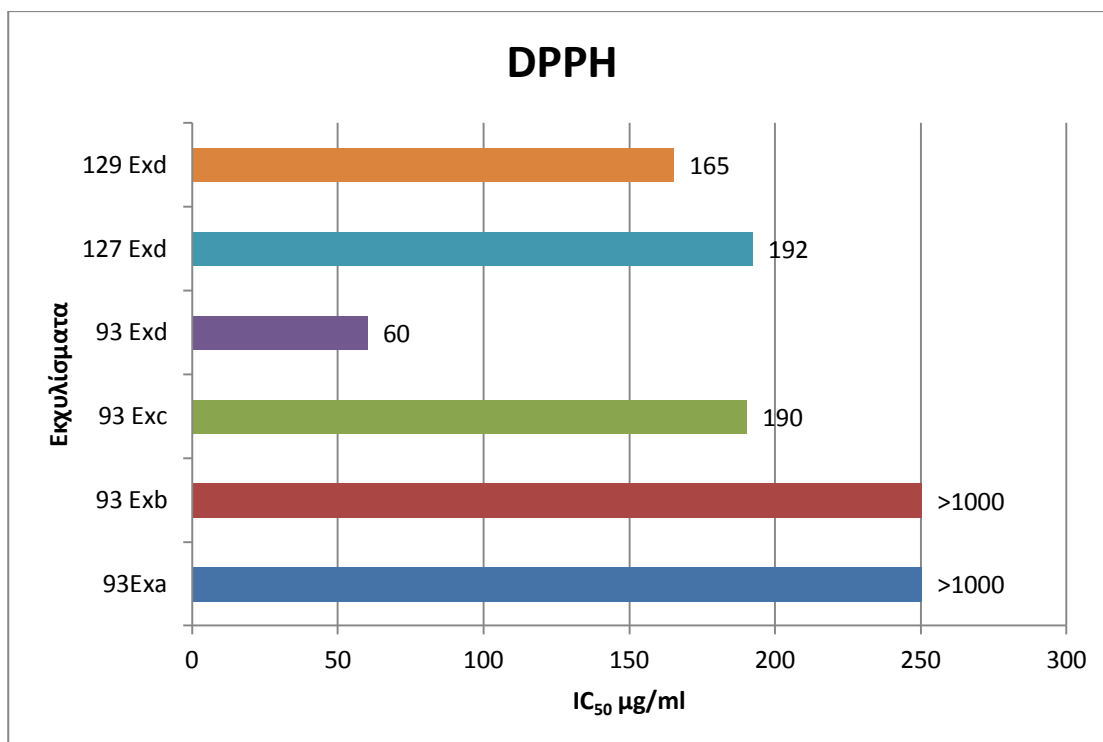
**Διάγραμμα 4.1.4.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 93 Exd (*Conium divaricatum*).



**Διάγραμμα 4.1.5.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 127 Exd (*Artemisia arborescens*).



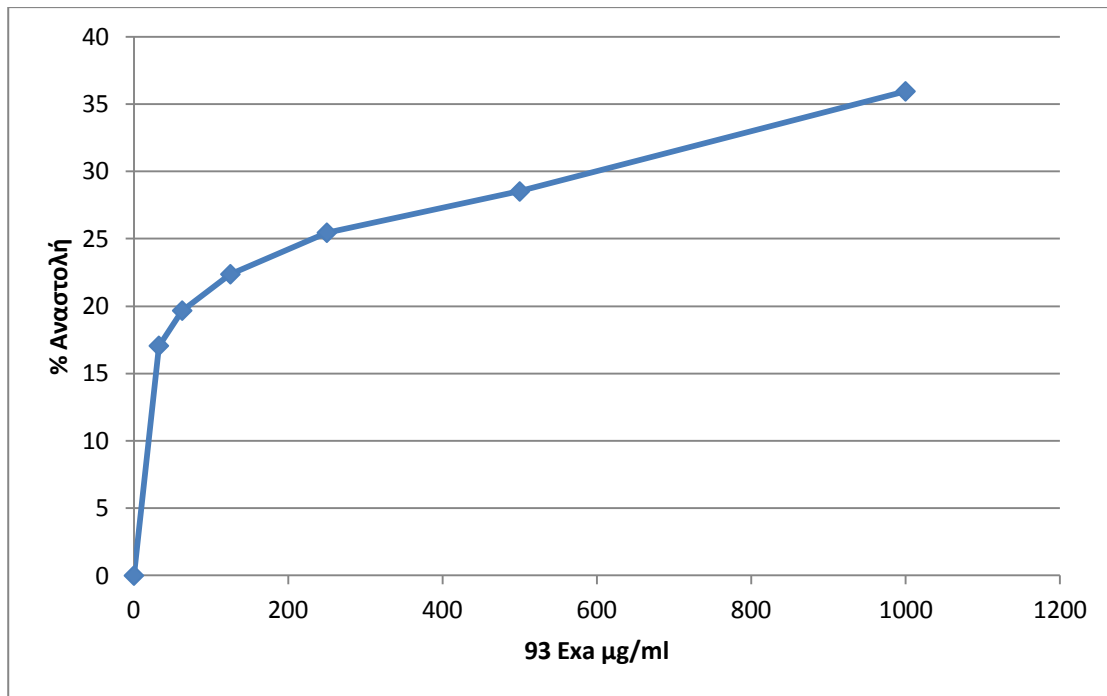
**Διάγραμμα 4.1.6.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 129 Exd (*Ruta graveolens*).



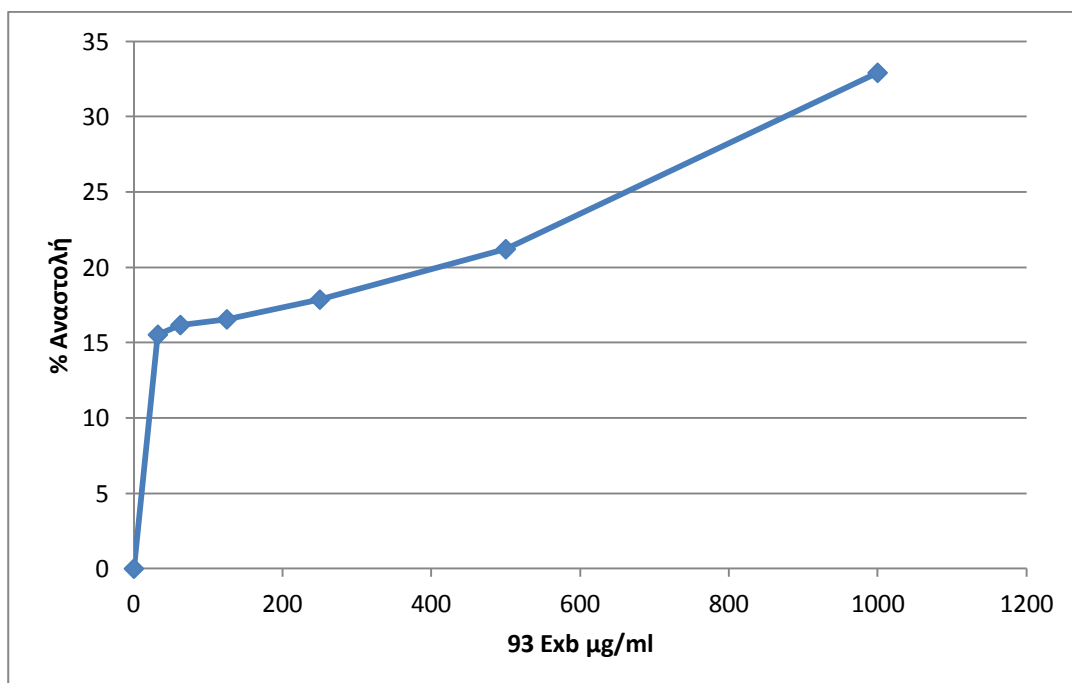
**Διάγραμμα 4.1.7.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

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

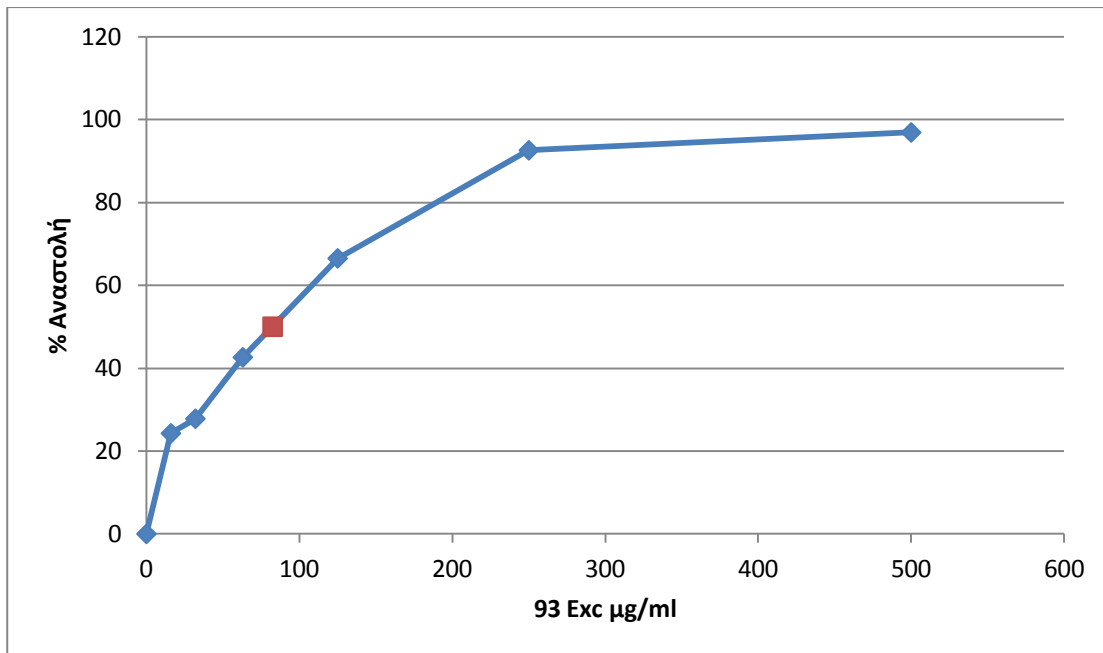
Συνολικά μελετήθηκαν 6 εκχυλίσματα από φυτά των *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 16-1000 µg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος ABTS στα 730nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 4.2.7 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από **82,5 µg/ml** έως **232,5 µg/ml** (διάγραμμα 4.2.7). Ειδικότερα η σειρά δραστηρότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: 93 Exc (IC<sub>50</sub>=**82,5 µg/ml**) > 93 Exd (IC<sub>50</sub>=**100 µg/ml**) > 129 Exd (IC<sub>50</sub>=**120 µg/ml**) > 127 Exd (IC<sub>50</sub>=**232,5 µg/ml**). Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα εκχυλίσματα 93 Exa και 93 Exb ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (1000 µl/ml) δεν σημείωσαν αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH κατά 50%.



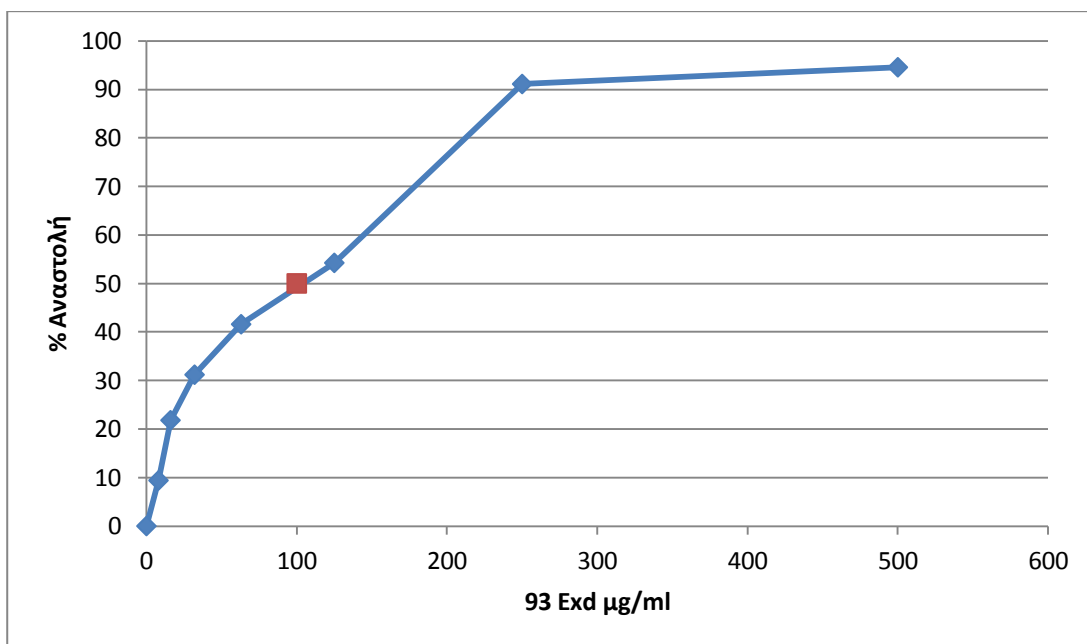
**Διάγραμμα 4.2.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 93Exa (*Conium divaricatum*).



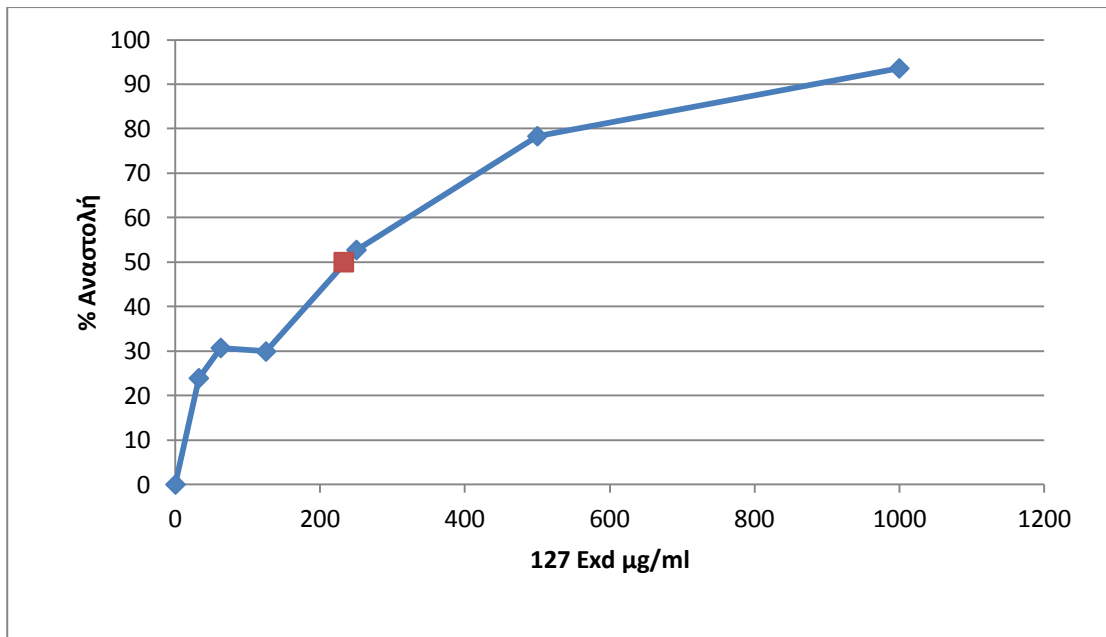
**Διάγραμμα 4.2.2.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 93 Exb (*Conium divaricatum*).



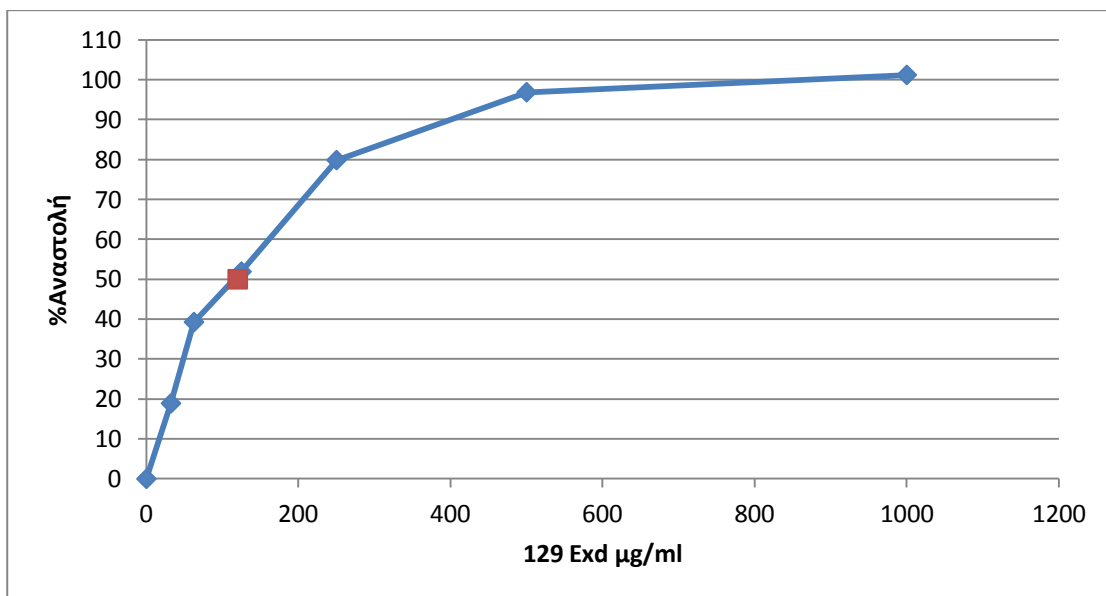
**Διάγραμμα 4.2.3.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 93 Exc (*Conium divaricatum*).



**Διάγραμμα 4.2.4.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 93Exd (*Conium divaricatum*).

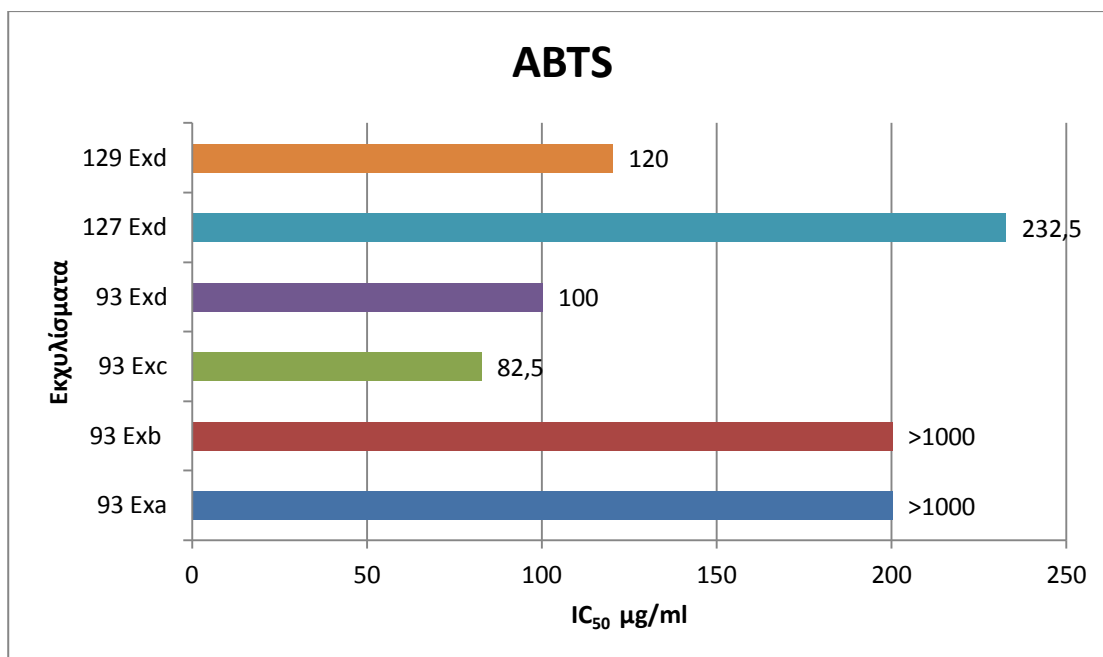


**Διάγραμμα 4.2.5.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 127 Exd (*Artemisia arborescens*).



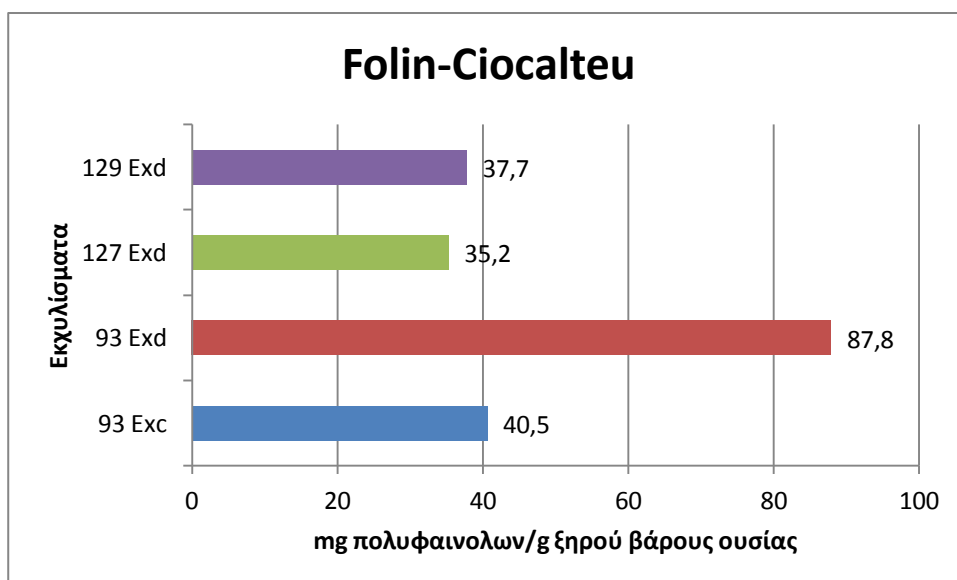
**Διάγραμμα 4.2.6.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 129 Exd (*Ruta graveolens*).





**Διάγραμμα 4.2.7.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

#### 4.3. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu



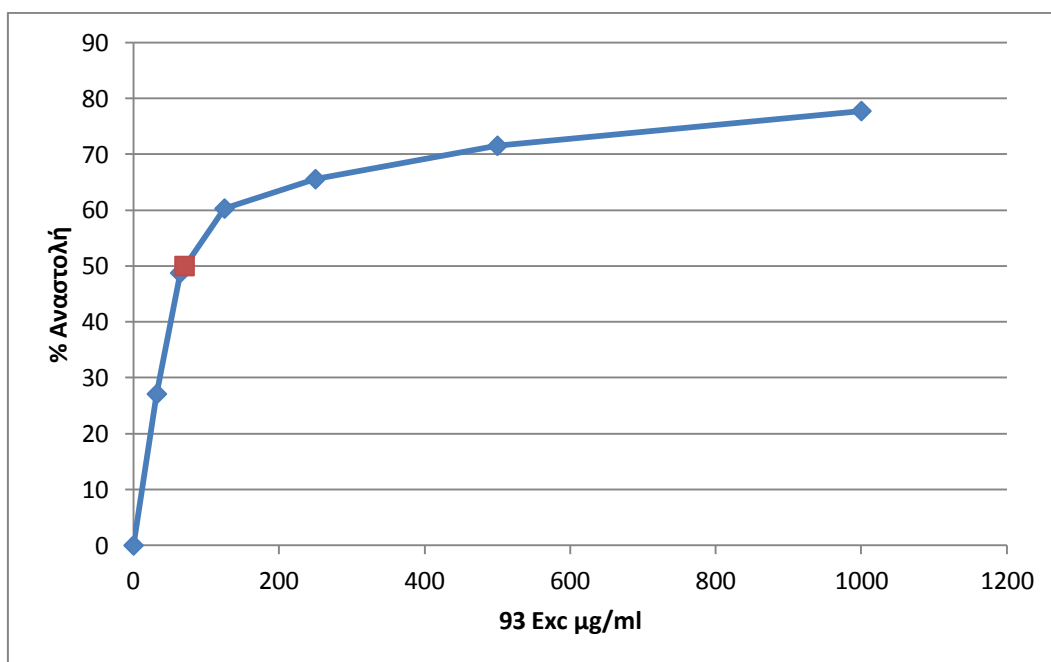
**Διάγραμμα 4.3.1.** Απεικονίζονται οι τιμές TPC (mg/g ξηρού βάρους ουσίας) των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

Στο διάγραμμα 4.3.1 παρουσιάζεται οι τιμές των ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, για όλα τα εκχυλίσματα εκτός του 93 Exa και 93 Exb, τα οποία εξαιρέθηκαν λόγω υψηλής τιμής IC<sub>50</sub> στις εξουδετερώσεις των ριζών ABTS και DPPH.

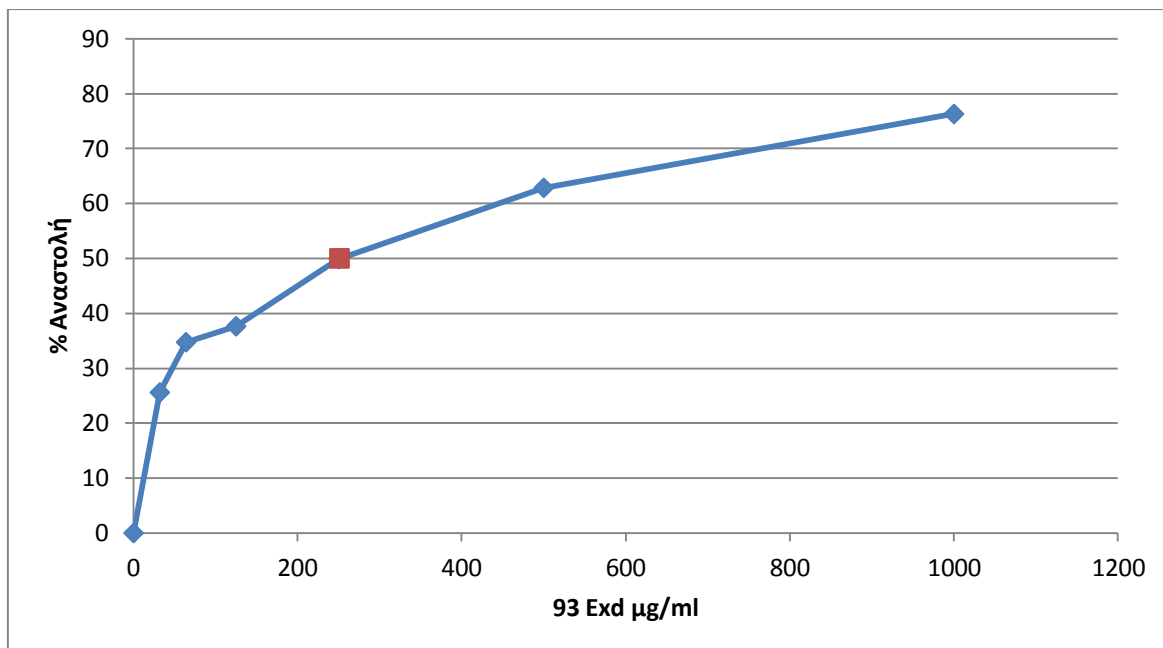
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exd) εμφανίζει υψηλότερες τιμές στα ολικά φαινολικά (**87,8 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**) ακολουθούμενο από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exc) (**40,5 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**) και τα αντίστοιχα υδατικά του *Ruta graveolens* (129 Exd) (**37,7 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**) και του *Artemisia arborescens* (127 Exd) (**35,2 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**) που εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή.

#### 4.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH·

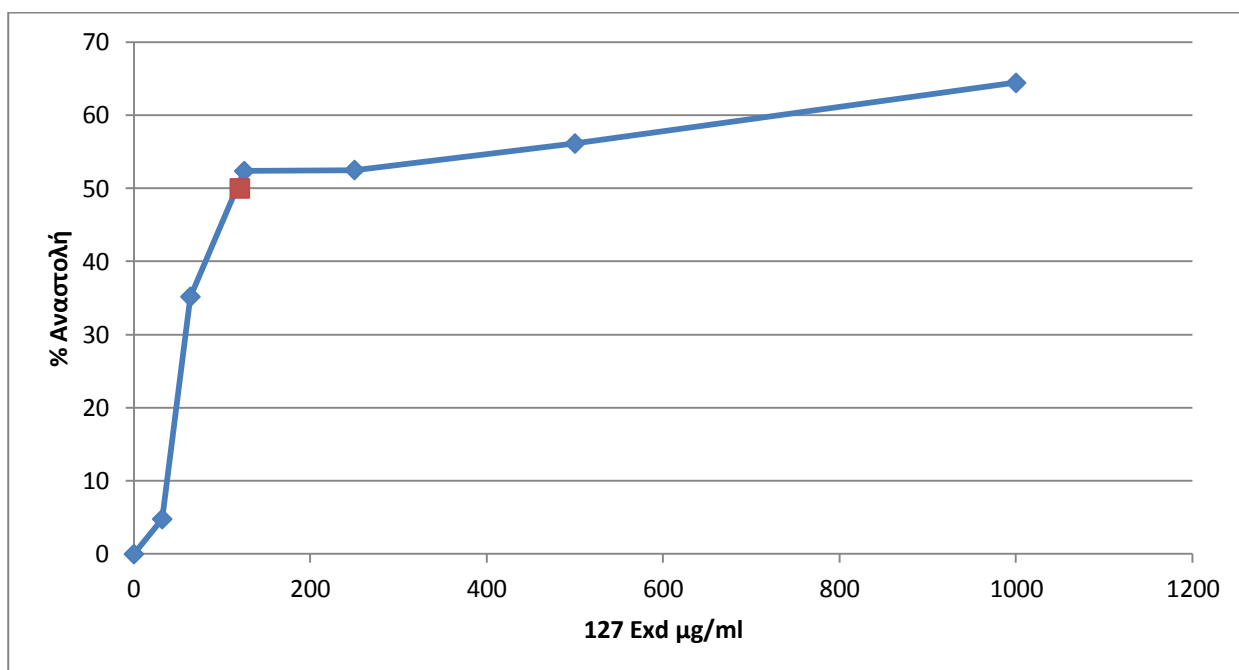
Συνολικά μελετήθηκαν 4 εκχυλίσματα από φυτά των *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 16-1000 μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος OH· στα 520nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH·, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.4.5 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από **70 μg/ml** έως **252 μg/ml** (Διάγραμμα. 4.5.5). Ειδικότερα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: 93 Exc (**IC<sub>50</sub>=70 μg/ml**) > 127 Exd (**IC<sub>50</sub>=120 μg/ml**) > 129 Exd (**IC<sub>50</sub>=172 μg/ml**) > 93 Exd (**IC<sub>50</sub>=252 μg/ml**).



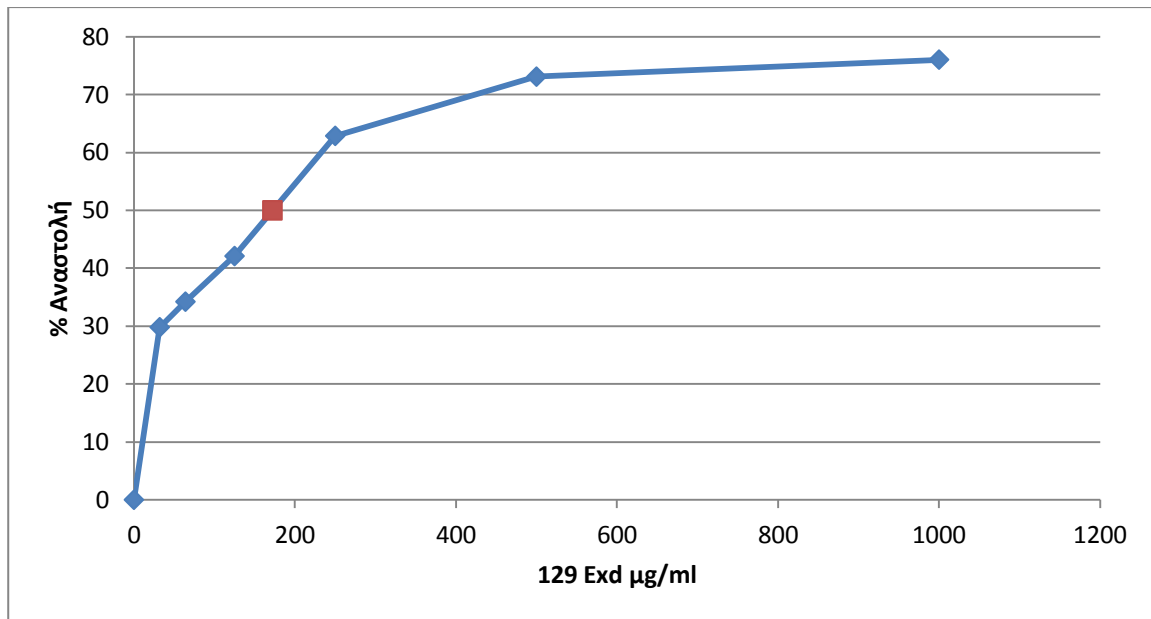
**Διάγραμμα 4.4.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα 93 Exc (*Conium divaricatum*).



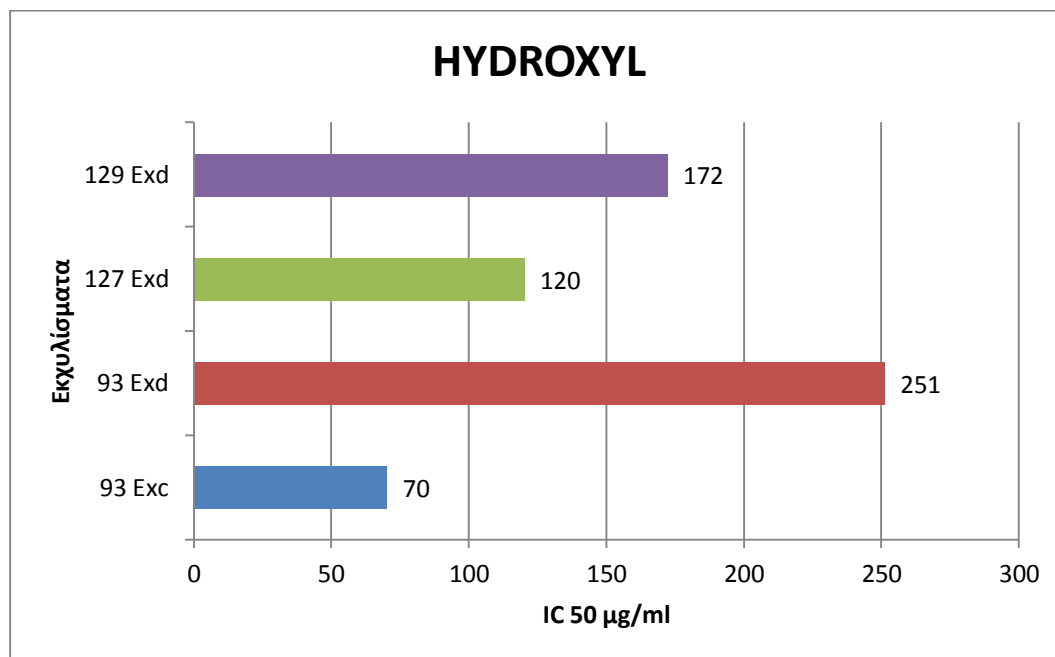
**Διάγραμμα 4.4.2.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα 93 Ecd (*Conium divaricatum*).



**Διάγραμμα 4.4.3.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα 127 Ecd (*Artemisia arborescens*).



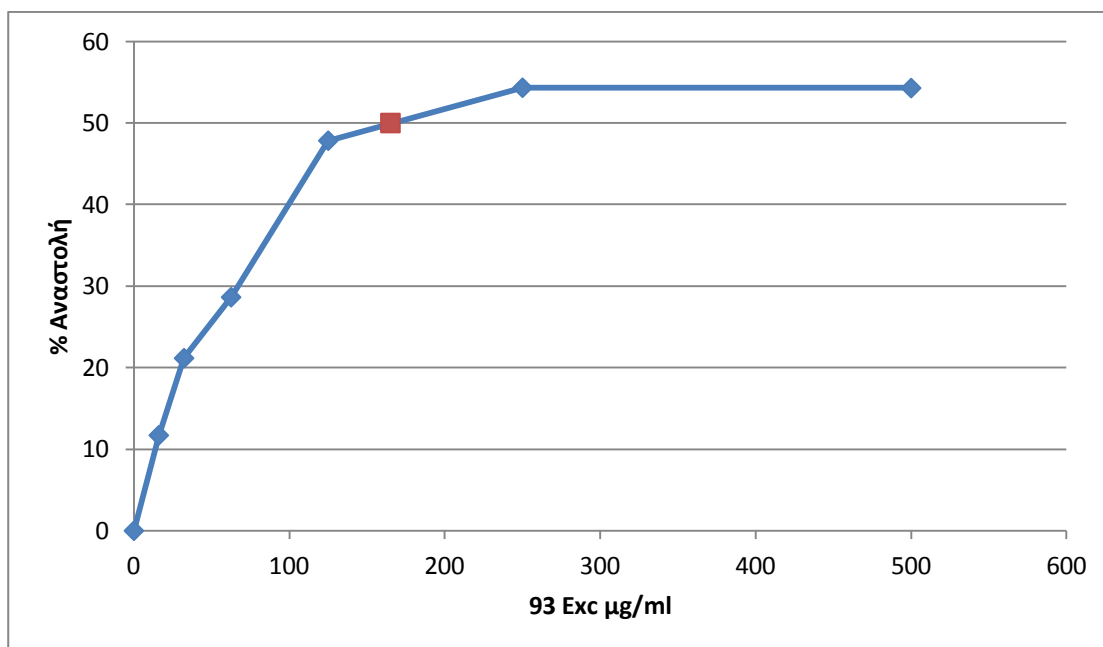
**Διάγραμμα 4.4.4.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>-</sup> από το εκχύλισμα 129 Exd (*Ruta graveolens*).



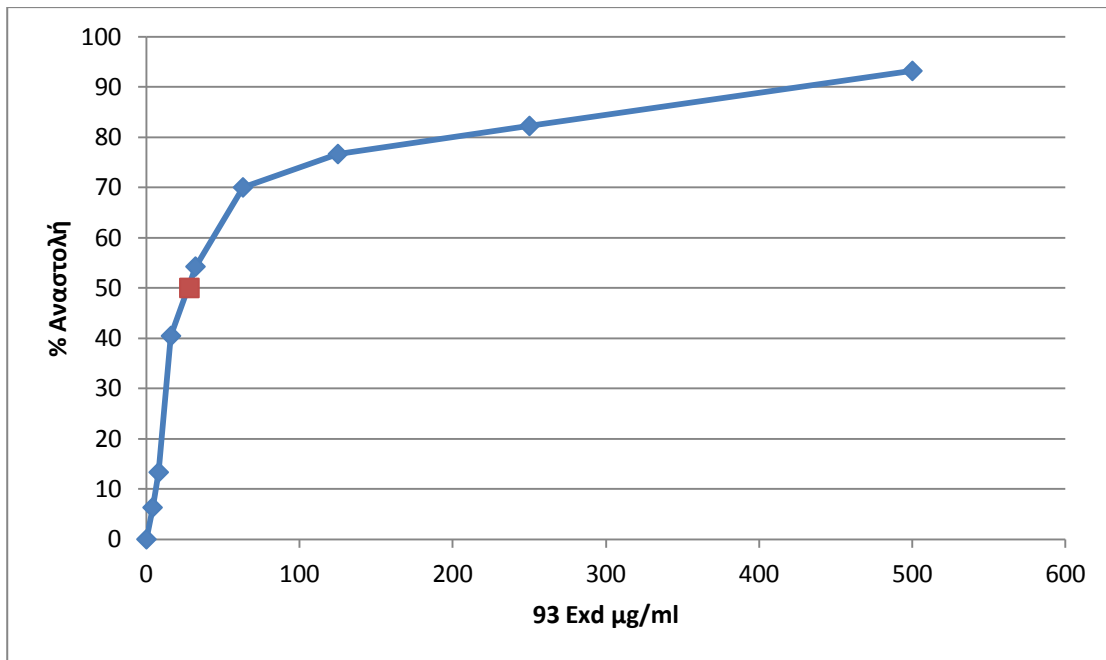
**Διάγραμμα 4.4.5.** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας OH<sup>-</sup> από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα

#### 4.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ -

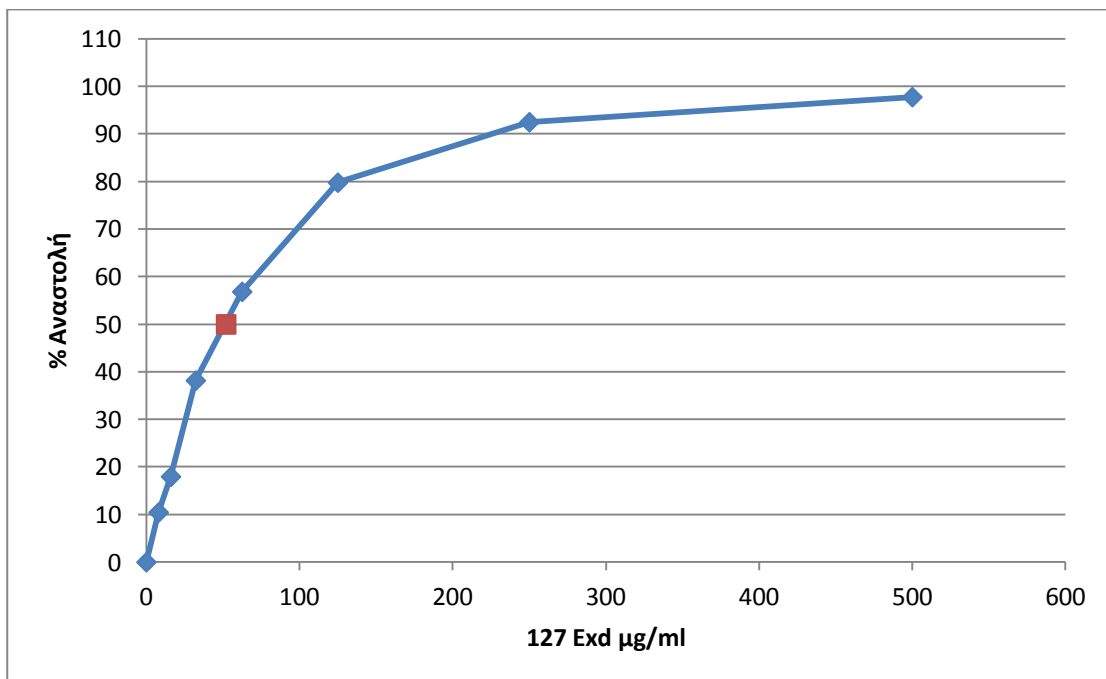
Συνολικά μελετήθηκαν 4 εκχυλίσματα από φυτά των *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 4-1000 $\mu\text{g/ml}$ . Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος  $O_2^{\cdot-}$  στα 560nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα  $O_2^{\cdot-}$ , δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές  $IC_{50}$  όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.5.5 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των  $IC_{50}$  κυμαίνονται από **28  $\mu\text{g/ml}$**  έως **165 $\mu\text{g/ml}$**  (Διάγραμμα. 4.5.5). Ειδικότερα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: 93 Exd( $IC_{50}$ =28 $\mu\text{g/ml}$ )>127 Exd ( $IC_{50}$ =52 $\mu\text{g/ml}$ )>129 Exd( $IC_{50}$ =120 $\mu\text{g/ml}$ )>93 Exc( $IC_{50}$ =165 $\mu\text{g/ml}$ ).



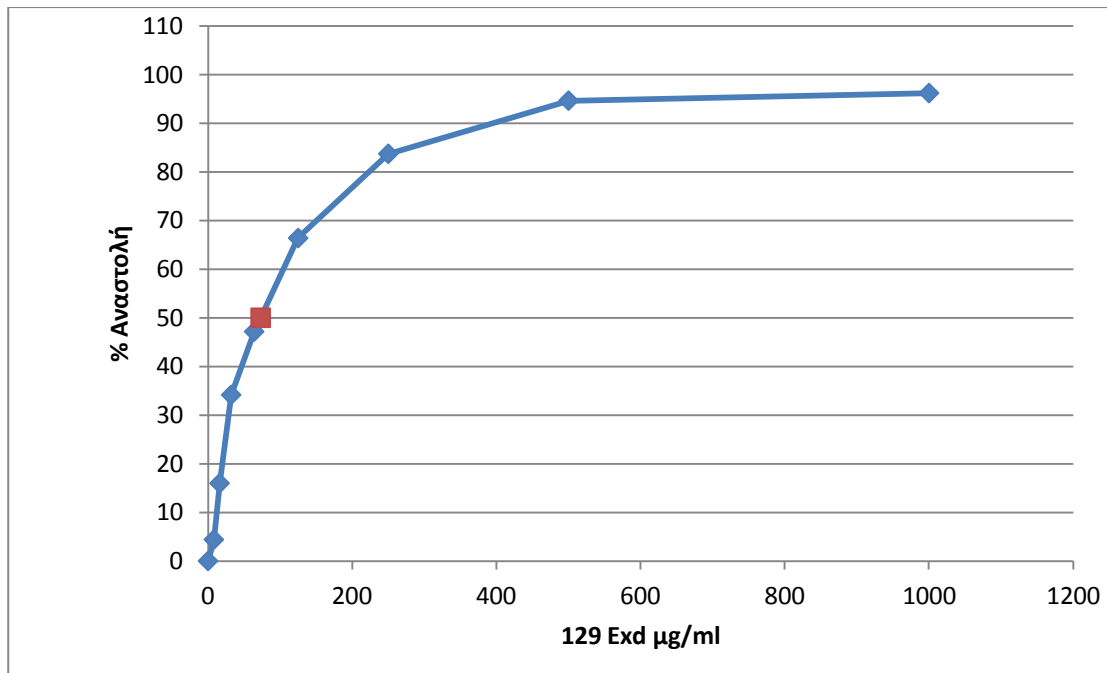
**Διάγραμμα 4.5.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα 93Exc (*Conium divaricatum*).



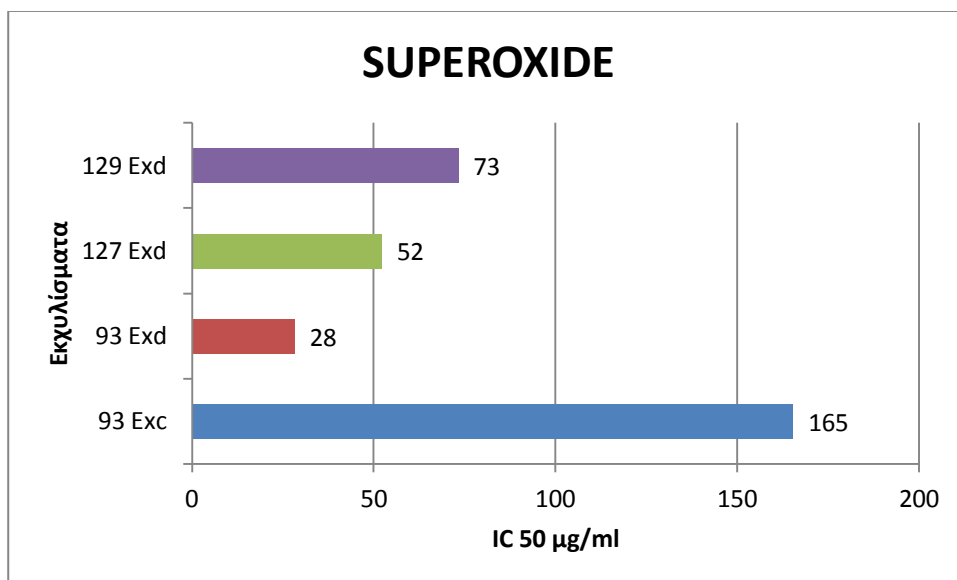
**Διάγραμμα 4.5.2.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^-$  από το εκχύλισμα 93Exd (*Conium divaricatum*).



**Διάγραμμα 4.5.3.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^-$  από το εκχύλισμα 127 Exd (*Artemisia arborescens*).



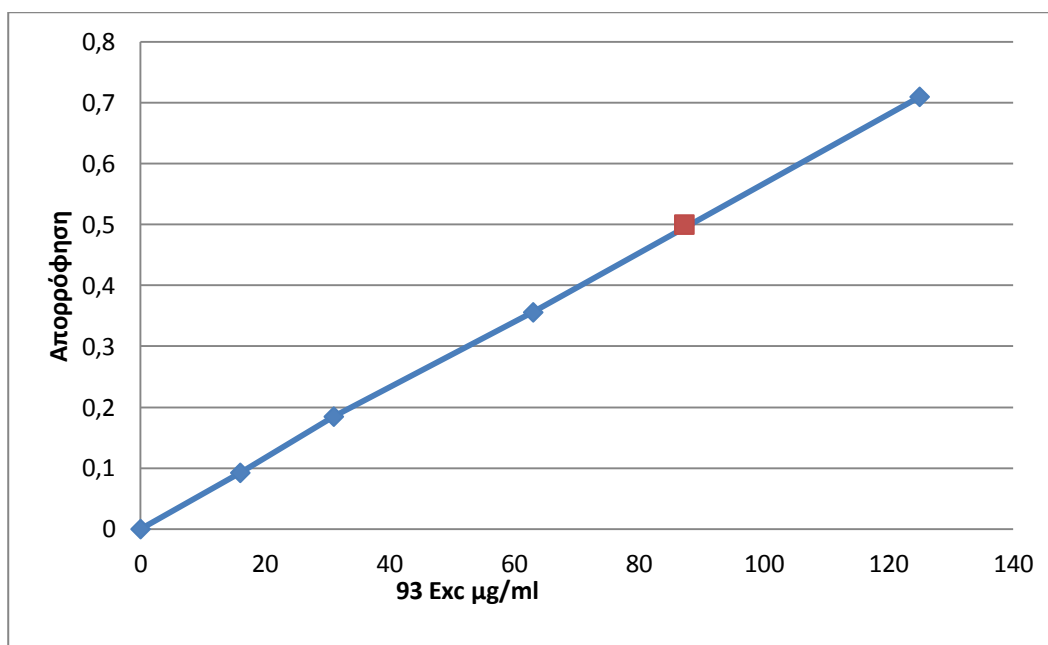
**Διάγραμμα 4.5.4.** Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα 129Exd (*Ruta graveolens*).



**Διάγραμμα 4.5.5.** Απεικονίζονται οι τιμές  $IC_{50}$  που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

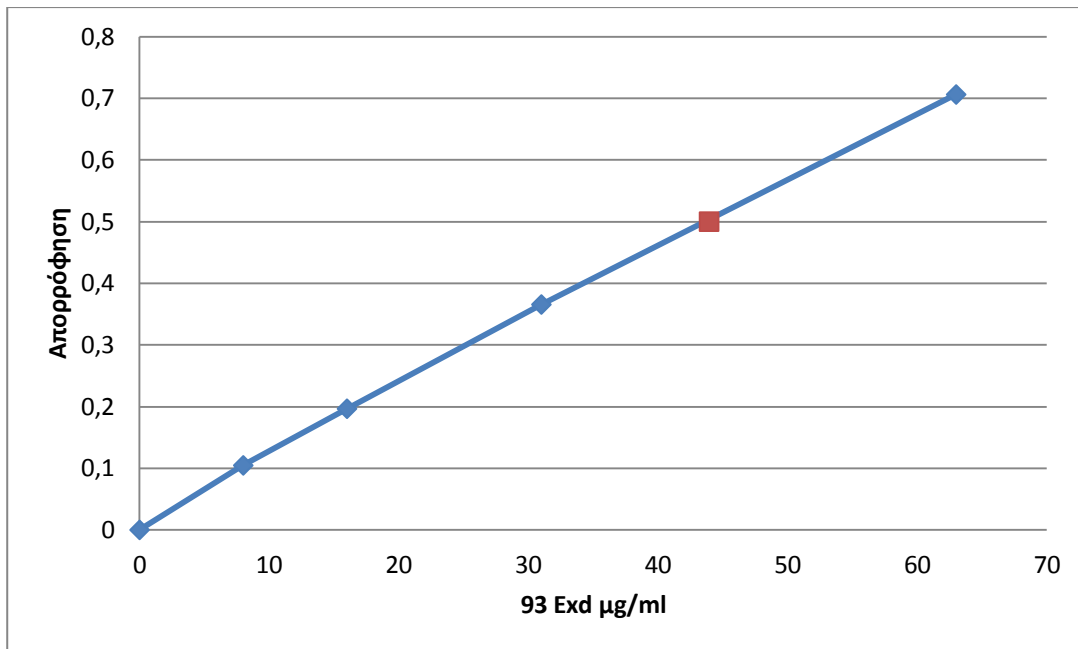
#### 4.6. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.

Συνολικά μελετήθηκαν 4 εκχυλίσματα των φυτών *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 4 συγκεντρώσεις από 16-250 $\mu\text{g/ml}$ . Προσδιορίστηκε η τιμή  $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ , η συγκέντρωση που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm. Η σειρά δραστηκότητας για τα εκχυλίσματα είναι η εξής: 93 Exd ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 44\mu\text{g/ml}$ ) > 93 Exc ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 87,24\mu\text{g/ml}$ ) > 127 Exd ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 96\mu\text{g/ml}$ ) > 129 Exd ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 117\mu\text{g/ml}$ ).

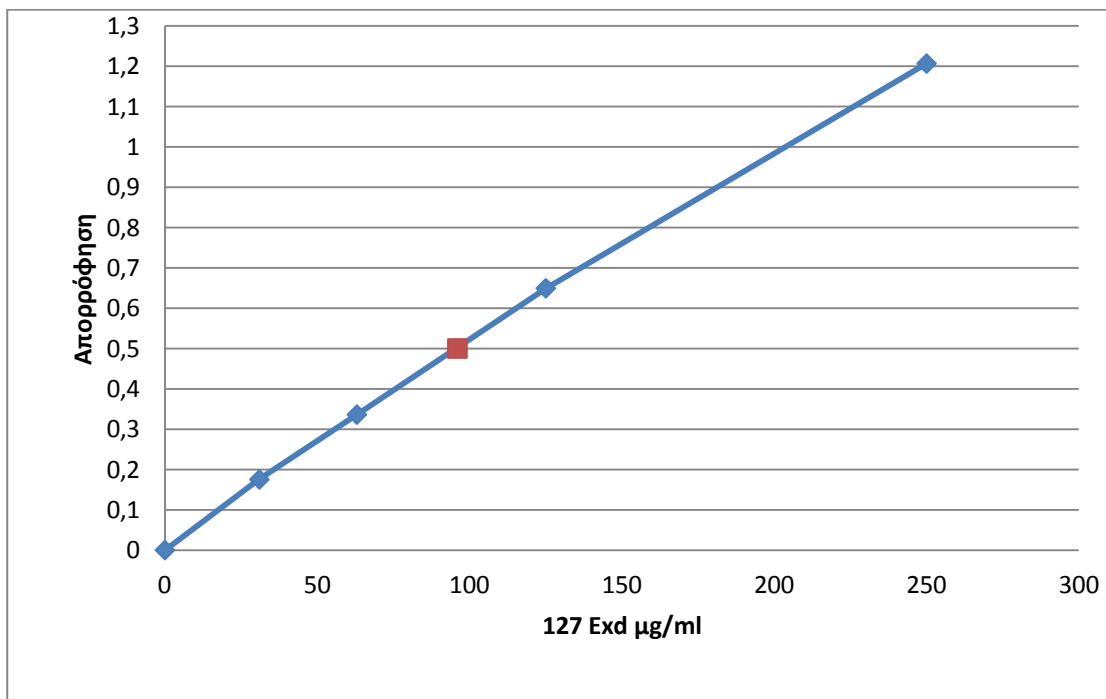


**Διάγραμμα 4.6.1.** Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις (16, 32, 64, 125 και 250  $\mu\text{g/ml}$ ) από το εκχύλισμα 93 Exd (*Conium divaricatum*).

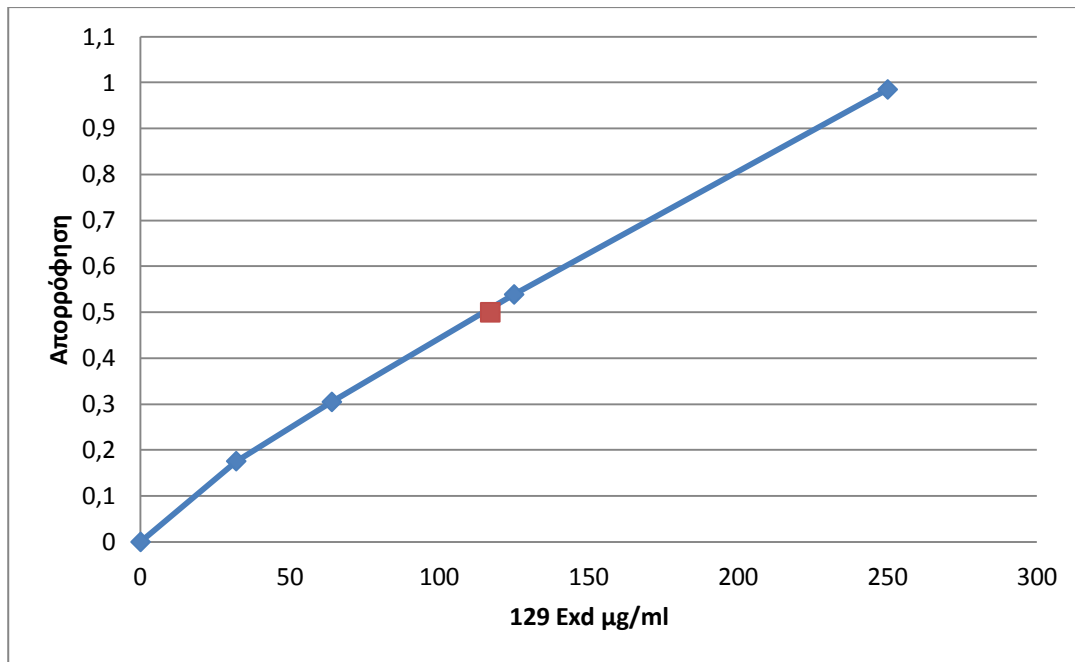




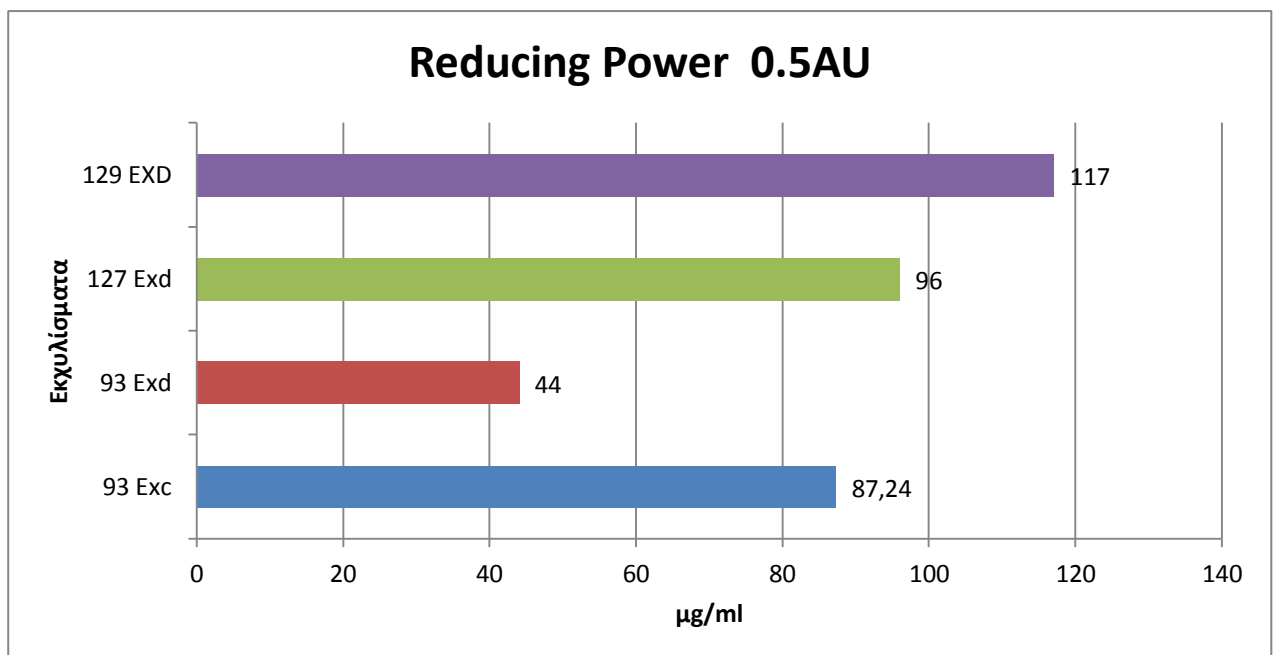
**Διάγραμμα 4.6.2.** Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις (8, 16, 32, 64 και 125 µg/ml) από το εκχύλισμα 93 Exd (*Conium divaricatum*).



**Διάγραμμα 4.6.3.** Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις (32, 64, 125 και 250 µg/ml) από το εκχύλισμα 127Exd (*Artemisia arborescens*).



**Διάγραμμα 4.6.4.** Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις (32, 64, 125 και 250 µg/ml) από το εκχύλισμα 129 Exd (*Ruta graveolens*).



**Διάγραμμα 4.6.5.** Το διάγραμμα απεικονίζει την συγκέντρωση που δίνει 50% μείωση της απορρόφησης για τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες κυρίως λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και τους πιθανούς ρόλους τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Halliwell *et al.*, 1992).

Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι μικροβιακές και βακτηριακές λοιμώξεις, οι ιώσεις, ο διαβήτης και η ρευματοειδής αρθρίτιδα ( Ider *et al.*, 2000).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη των φυτών *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens*.

Με βάση τις τιμές των IC<sub>50</sub> από τα 6 εκχυλίσματα τα 4 παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH<sup>•</sup>. Το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (93 Exb) καθώς και το αντίστοιχο εξανίου (93 Exa) του *Conium divaricatum* δεν παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH<sup>•</sup> και δεν ανέστειλαν της ρίζα DPPH κατά 50%, ούτε στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 1000μg/ml. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> για τα 4 εκχυλίσματα κυμαινόταν από 60μg/ml έως 192μg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το υδατικό του *Conium divaricatum* (93Exd) με IC<sub>50</sub> 60μg/ml, ενώ τα πιο ασθενή ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα (93 Exc) καθώς και το υδατικό του *Artemisia arborescens* (127Exd), με τιμές IC<sub>50</sub> 190 και 192 μg/ml, αντίστοιχα. Είναι, αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exd) παρουσίασε σχεδόν τριπλάσια ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το αντίστοιχο μεθανολικό (93 Exc) του ίδιου φυτού. Αυτό δείχνει ότι οι περισσότεροι βιοδραστικές ουσίες του φυτού είναι υδατοδιαλυτές και όχι μη πολικές. Επίσης, υπήρξε πλήρης συσχέτιση ανάμεσα στην ικανότητα εξουδετέρωσης των εκχυλισμάτων της ρίζας του DPPH και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου τόσο ισχυρότερη ήταν η εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS<sup>++</sup>, έδειξε όπως και η μέθοδος με το DPPH ότι από τα 6 εκχυλίσματα τα 4 παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 82,5μg/ml έως 232,5μg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό του *Conium divaricatum* (93Exc) με IC<sub>50</sub> 82,5μg/ml ακολουθούμενο από το αντίστοιχο υδατικό (93Exd) με IC<sub>50</sub> 82,5μg/ml, ενώ το πιο ασθενές, και σε αυτήν την περίπτωση, ήταν το υδατικό του *Artemisia arborescens* (127Exd) με IC<sub>50</sub> 232,5μg/ml. Είναι, αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93 Exd) παρουσίασε μικρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της

ρίζας ABTS σε σύγκριση με το αντίστοιχο μεθανολικό (93 Exc) του ίδιου φυτού, σε αντίθεση με τα ευρήματα της DPPH. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχει διαφορά στην χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Τέλος είναι χαρακτηριστικό ότι για τα εκχυλίσματα του ίδιου φυτού (*Conium divaricatum*) με διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης (νερό, μεθανόλη, διχλωμεθάνιο, εξάνιο) είχαμε διαφορετικά αποτελέσματα, γεγονός που αποδίδεται στην ικανότητα των διαλυτών να εκχυλίζουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις, ανάλογα με την πολικότητά τους. Παρόμοια με τη μέθοδο του DPPH, και στη μέθοδο του ABTS το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (93 Exb) καθώς και το αντίστοιχο εξανίου (93 Exa) του *Conium divaricatum* δεν παρουσίασαν σημαντική δράση, ως εκ τούτου κρίθηκε μη αναγκαία η περαιτέρω εξέτασή τους.

Στην συνέχεια, η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με την ικανότητα εξουδετέρωσης με τη ρίζα  $\text{OH}^\cdot$ , έδειξε ότι τα 4 εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών  $\text{IC}_{50}$  κυμαίνονται από 70  $\mu\text{g/ml}$  έως 252  $\mu\text{g/ml}$ . Και σε αυτήν την περίπτωση, το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό του *Conium divaricatum* (93Exc) με  $\text{IC}_{50}$  70  $\mu\text{g/ml}$  ενώ εντύπωση προκαλεί ότι το πιο ασθενές, σε αντίθεση με τα περισσότερα ευρήματα ήταν το αντίστοιχο υδατικό (93Exd) του ίδιου φυτού με  $\text{IC}_{50}$  252  $\mu\text{g/ml}$ . Γεγονός που ερμηνεύεται στην διαφορετική δομή των επί μέρους ριζών, λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα των διαλυτών να εκχυλίζουν διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις, και ως εκ τούτου τα εκχυλίσματα του ίδιου φυτού να παρουσιάζουν διακύμανση στη δράση.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με την ικανότητα εξουδετέρωσης με τη ρίζα  $\text{O}_2^\cdot$ , έδειξε ότι τα 4 εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών  $\text{IC}_{50}$  κυμαίνονται από 28  $\mu\text{g/ml}$  έως 165  $\mu\text{g/ml}$ . Και σε αυτήν την περίπτωση, το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το υδατικό του *Conium divaricatum* (93Exd) με  $\text{IC}_{50}$  28  $\mu\text{g/ml}$  ενώ εντύπωση προκαλεί ότι το πιο ασθενές, ήταν το αντίστοιχο μεθανολικό (93Exc) του ίδιου φυτού με  $\text{IC}_{50}$  165  $\mu\text{g/ml}$ . Γεγονός που αποδίδεται στην ικανότητα των διαλυτών να εκχυλίζουν διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις με αποτέλεσμα τα εκχυλίσματα του ίδιου φυτού να παρουσιάζουν διακύμανση στη δράση.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με τον προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης μας έδωσε εύρος τιμών  $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$  που κυμαίνονται από 44  $\mu\text{g/ml}$  έως 117  $\mu\text{g/ml}$ . Σε συμφωνία με τα παραπάνω το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το υδατικό του *Conium*

*divaricatum* (93Exd) με  $RP_{0.5AU}$  44 $\mu$ g/ml ενώ το πιο ασθενές, ήταν τουδατικό του *Ruta graveolens* (127Exd) με  $RP_{0.5AU}$  117 $\mu$ g/ml.

Επίσης, από την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, σε συμφωνία με τα ευρήματα των παραπάνω μετρήσεων το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το υδατικό του *Conium divaricatum* (93Exd) με τιμή 87,8 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας ενώ το πιο ασθενές, ήταν το υδατικό του *Artemisia arborescens* (127 Exd) (35,2 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας).

Συμπερασματικά θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υδατικό κυρίως εκχύλισμα του *Conium divaricatum* (93Exd) και δευτερευόντως το αντίστοιχο μεθανολικό (93 Exc) του ίδιου φυτού έχουν in vitro σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Οπότε, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, θα πρέπει να διερευνηθούν και οι μοριακοί μηχανισμοί. Οι εφαρμογές της έρευνας θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων όπως βιολειτουργικά τρόφιμα, είτε άλλου τύπου προϊόντα, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρωμάτων διατροφής.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahameethunisa AR, Hopper W (2010). Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. BMC Complement. Altern. Med. 10:6.

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. MedSciSportsExerc, 2000, 32(9), 1576-81.

Ayres D.C., and Loike J.D. (1990). Lignans: chemical, biological, and clinical properties. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge [England]: Cambridge University Press

BaileySM, PietschEC, CunninghamCC. ETHANOL STIMULATES THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AT MITOCHONDRIAL COMPLEXES I AND III. Free Radic Biol Med, 1999, 27, 891–900.

Baykan ES, Reznicek G, Senol SG, Karabay Yavasogul NU, Konyalioglu S, Ulvi Zeybek A (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. Turk. J. Biol. 36:75–84.

Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. J Biol Chem 268(10), 6995-7010

BergJ, TymoczkoJ, StryerL (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης

ClarksonPM, ThompsonHS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr 2000; 72 (S): 637-46

Clifford MN, Scalbert A.(2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. Volume 80, Issue 7

Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans 30(2), 280-5.

Devasagayam, T.P.A., Boloor, K.K., Ramsarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian J. Bioche. Biophys.* 40, 300-308.

Di Meo S, Venditti P (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10, 125-40.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102-1115.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4), 327-358.

Girotti, A.W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med*, 1(2), 87-95

Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 1988;20(1):55–59.

Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR. Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 31;342(1):184-90.

Guo, Z. M.; Van Remmen, H.; Yang, H.; Chen, X. L.; Mele, J.; Vijg, J.; Epstein, C. J.; Ho, Y. -S.; Richardson, A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxLDL induced apoptosis in mouse aorta cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1131– 1138; 2001

Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.

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

Halliwell, B. et al., Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*: 598.

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

Jeong-Dan C (2007). Chemical composition and antibacterial activity against oral bacteria by essential oil of *Artemisia iwayomogi*. *J. Bacteriol. Virol.* 37(3):129–136.

Ider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raoul F. (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes, and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* ,158:85-91.

Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E. (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* ,37: 223-33.

Kopp ,P.(1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol.*,138(6),619-20

Klebanoff SJ (1988). Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York Raven, 391– 444.

Kuzovkina I, Alterman I, Schneider B. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 2004;65:1095–100

Liebel F, Simarna Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *J Invest Dermatol*, 2012, 132, 1901– 1907.

Lodovici M, Bigagli E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *J Toxicol*, 2011, Article ID 487074.

Masson, R.P., Walter, M.F., & Mason, P.E. (1997). Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med*, 23(3), 419-425



Masters, C., Pegg, M., Crane, D., (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Molecular Cell Biochemistry*, 70, (2), 113-120.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 79:727-747.

May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244:6049–6055

Messner KR, Imlay JA (November 2002). “Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase”. *J. Biol. Chem.* 277 (45): 42563–71.

Miguel, E.S., 2003. Rue (*Ruta L.*, Rutaceae) in traditional Spain: frequency and distribution of its medicinal and symbolic applications. *Economic Botany* 57, 231–244.

Mohanty P, Ghanim H, Hamoud W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75, 767–72.

Mozaffarian, D.; Rimm, E. B.; King, I. B.; Lawler, R. L.; McDonald, G. B.; Levy, W. C. Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1521–1525; 2004

Muriach M, López-Pedrajas R, Barcia JM, Sanchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ. 2010. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem* 114:675-684

Nezhadali A, Akbarpour M, Zarrabi Shirvan B (2008). Chemical composition of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia herba*. *E. J. Chem.* 5(3):557–561.

Pacifico S, Piccolella S., Galasso S., Fiorentino A., Kretschmer N., Pan S., Bauer R., Monaco P. Influence of harvest season on chemical composition and bioactivity of wild rue plant hydroalcoholic extracts. *Food and Chemical Toxicology* 90 (2016) 102e111

Palumbo ML, Fosser NS, Rios H, Zorrilla Zubilete MA, Guelman LR, Cremaschi GA, Genaro AM. 2007. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *J Neurochem* 102:261-274.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333 (2003) 19-39.

Peñalvo J. L., Hopia A., & Adlercreutz, H. (2006). Effect of sesamin on serum cholesterol and triglycerides levels in LDL receptor-deficient mice. *European Journal of Nutrition*, 45, 439–444

Poljsak B, Dahmane R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging *Dermatology. Dermatol Res Pract*, 2012, 2012:135206.

Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). 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* 27(1-2), 69-74.

Ratheesh M., Shyni G.L., Sindhu G., A. A. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteremic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63 (2011) 285–290

Reid, M.B., Haack, K.E., Franchek, K.M., Valberg, P.A., Kobzik, L., West, M.S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 73, 1797–1804.

Rice-Evans CA, Gopinathan V (1995). "Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates". *Essays Biochem.* 29: 39–63

Rosé J, Earle S (1996). *The World of Aromatherapy*. Berkeley, California. p 206.

Sharma DR, Sunkaria A, Bal A, Bhutia YD, Vijayaraghavan R, Flora SJ, Gill KD. 2009. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of

proapoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 240:208-218.

Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *ExpPhysiol* 82:291-295

Storz G, Imlay JA. 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2:188-194

Strack D. and Wray V. (1994). The anthocyanins in the J.B. Harborne's *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida, USA, pp 1-22

Tutin T.G., Persson K., and Guterman W., 1976. *Flora Europaea*, vol.4 Cambridge University Press, London, p. 180.

Ulubelen B, Terem E, Tuzlaci K, Cheng F, Kong YC. Alkaloids and coumarins from *Ruta chalepensis* A. *Phytochemistry* 1986;25:2692-3.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int J Environ Res Public Health* 2009, 6, 445-462.

Valko M, Izakovic I, Mazur M, Rhodes CJ, Telser. Role of oxygen radicals in DNA damage. *J. Mol Cell Biochem.*, 2004, Τόμ. 1-2. 37-56

Valko M, Rhodes Cj, Moncol J, Izakovic M, Mazur M Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer., 2006, Τόμ.160 *Chem Biol Interact.* 1-40.

Van Acker, S.A., Tromp, M.N., Haenen, G.R., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 755-759.

Vitrac X, Moni JP, Vercauteren J, Deffieux G, Mérillon JM. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanones in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 2002;458:103-10.

Wulf Dröge, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological Reviews*, Vol. 82, No. 1, January 2002, pp. 47-95; 10.1152/physrev.00018.2001.

Witztum, J.L.; Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc. Med.* 11:93– 102; 2001

Yasumoto S, Katsuta M, Okuyama Y, Takahashi Y, Ide T. Effect of sesame seeds rich in sesamin and sesamol on fatty acid oxidation in rat liver. *J Agric Food Chem.* 2001 May;49(5):2647-51.

Zaloga, G. P.; Harvey, K. A.; Stillwell, W.; Siddiqui, R. Trans fatty acids and coronary heart disease. *Nutr. Clin. Prac.* 21:505–512; 2006

ΑντωνιάδηΓ. (2007). Έλεγχος της επίδρασης της βιταμίνης Ε στον τίτλο των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και στη συχνότητα θρομβωτικών επεισοδίων σε ασθενείς που βρίσκονται σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας με εξωνεφρική κάθαρση. ΔιδακτορικήΔιατριβή. ΔημοκρίτειοΠανεπιστήμιοΘράκης. Σελ 22

Αποστολίδου Χ. (2016). Επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών του ερυθρού οίνου και της ρεσβερατρόλης στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων σε υγιείς και ασυμπτωματικούς υπερλιπιδαιμικούς συμμετέχοντες. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Χημικών Μηχανικών. Α.Π.Θ.

Βεσκουκης Α., (2010). Επίδραση της χορήγησης Αλοπουρινόλης στο Οξειδωτικό Στρες κατά την άσκηση. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Βλάση Α., (2016). Μελέτη πτητικών συστατικών του γένους *Conium*L. (*Coniumdivaricatum*Boiss&Orph., *C.maculatum*L.), Έλεγχος τοξικότητας. Τμήμα Φαρμακευτικής. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γάλαρης Δ. (2015). Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες, Χημεία-Βιολογία-Ιατρική. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.σελ 90

Γιαννακοπούλου Ε. (2009) Οξειδωτικό stress-αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία. *ΑρχείαΕλληνικήςΙατρικής*, 26 (1), 23-35

Καββαδάς Δ Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν Τόμος Ε. Πελεκάνος, Αθήνα 1956, σελ 2228-2229

Ντουνούση Ε.Χ., Τσελέπης Α.,Σιαμόπουλος Κ.Χ. (2009) Οξειδωτικό στρες, μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος του στη χρόνια νεφρική νόσο. *ΕλληνικήΝεφρολογία* 21 (1), 34-45.

Ρηγόπουλος Α., (2016).Μελέτες με στόχο τη σύνθεση λιγνανών και αμιδικών αναλόγων τους με βιολογικό ενδιαφέρον. ΜεταπτυχιακήΕργασία. ΤμήμαΧημείας. Πανεπιστήμιο Πατρών.

Σκρουμπής Γ. Βύρων, 1998, «Αρωματικά, Φαρμακευτικά & Μελισσοτροφικά Φυτά της Ελλάδας», Αγρότυπος, Αθήνα

Στατήρη, Α. (2014). Προσδιορισμός γλουταθειόνης, ολικής αντιοξειδωτική ικανότηταςκαι πρωτεϊνικών καρβονυλίωνσε ενδοθηλιακά κύτταραέπειτα από τη χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος στέμφυλων. Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σελ. 14

Τσιμογιάννης Δ. (2008).Αντιοξειδωτική δράση Φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: Αναγωγή Ελευθέρων Ριζών και Προστασία Φυτικών Ελαίων. Διδακτορική διατριβή. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Ε.Μ.Π.

ΦλαμπουράρηΑ.Ε. (2015). Μελέτη της επίδρασης ουσιών με μυκητοκτόνο-κυτταροτοξική δράσησε κυτταρικούς πληθυσμούς με εξειδικευμένα χαρακτηριστικά μέσω μετά-μεταγραφικής τροποποίησης αυτών για χρήση σε βιοαισθητήρες. ΔιδακτορικήΔιατριβή. ΓεωπονικόΠανεπιστήμιοΑθηνών.σελ. 32