



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ  
ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ,  
ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ ΚΑΙ ΖΕΛΑΤΙΝΗ



*Φουστέρη Άννα-Ζηνοβία*

*Λάρισα 2013*

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ  
ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ,  
ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ ΚΑΙ ΖΕΛΑΤΙΝΗ

*Study of antioxidant activity of polyphenolic extract from olive oil waste waters after encapsulation into protein, maltodextrin and gelatin*

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Κων/νος Πετρωτός:** Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστώ τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του η οποία μου προσέφερε σημαντικές εμπειρίες και γνώσεις.

Επίσης, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τη πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν, όπως επίσης όλους τους προπτυχιακούς κι μεταπτυχιακούς που συνεργάστηκαν άψογα μαζί μου κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| <b>Κεφάλαιο</b>   | <b>Σελίδα</b> |
|---|---------------|
| Περίληψη.....   | σελ. 6        |
| 1. Εισαγωγή.....  | σελ. 8        |
| 1.1 Η παραγωγή του ελαιολάδου και τα απόβλητα του.....  | σελ. 9        |
| 1.2 Η Ποιοτική Κατάταξη του Ελαιολάδου.....   | σελ. 10       |
| 1.3 Πώς Καθορίζεται η Ποιότητα του Ελαιολάδου;.....   | σελ.11        |
| 1.4 Απόβλητα Ελαιουργείων .....   | σελ.13        |
| 1.4.1 Η Σύσταση των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου.....  | σελ.13        |
| 1.5 Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων.....                                     | σελ.15        |
| 1.5.1. Μηχανική επεξεργασία.....  | σελ.16        |
| 1.5.2 Φυσικοχημική επεξεργασία.....   | σελ.18        |
| 1.6 Το Φαινολικό Περιεχόμενο των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου....                                  | σελ.19        |
| 1.6.1 Φυσικές Ιδιότητες.....  | σελ.19        |
| 1.6.2 Φυτικές Πολυφαινόλες – Κατηγορίες.....  | σελ.21        |
| 1.6.3 Πολυφαινόλες στα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.....   | σελ. 22       |
| 1.6.4 Μέθοδοι Εξαγωγής των Φαινολικών Ενώσεων.....  | σελ. 24       |
| 1.7 Η Βιοδραστικότητα των Πολυφαινολών από τα απόβλητα ελαιοτριβείου.....                         | σελ. 25       |
| 1.8 Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O <sub>2</sub> .....  | σελ. 25       |
| 1.8.1 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες.....  | σελ.27        |
| 1.9 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου;.....  | σελ.30        |
| 1.10 Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.....   | σελ.33        |
| 1.11 Η Βιοδραστικότητα των πολυφαινολών.....  | σελ.35        |
| 2. Σκόπος.....  | σελ.41        |
| 3. Υλικά και Μέθοδοι.....   | σελ.42        |
| 3.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS <sup>•+</sup> ..... | σελ.42        |
| 3.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων ..                                    | σελ.46        |
| 3.3 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής .....           | σελ 53        |
| 4. Αποτελέσματα Μετρήσεων.....  | σελ. 61       |

|  |         |
|--|---------|
| 4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS <sup>•+</sup> .....  | σελ.61  |
| 4.2 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO <sup>•</sup> ) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους..... | σελ. 69 |
| 4.3 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους.....  | σελ.78  |
| 4.4 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο του ΧΤΤ.....   | σελ. 79 |
| 4.5 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής .....  | σελ. 80 |
| 4.6 Αποτελέσματα από τον Προσδιορισμό των επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής .....  | σελ 84  |
| 5. Σύζηση .....  | σελ.86  |
| 6. Βιβλιογραφία .....  | σελ.88  |

## Περίληψη

Εδώ και αρκετά χρόνια έχει παρατηρηθεί έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη των φυτικών προϊόντων με πολυφαινολικό περιεχόμενο στο οποίο αποδίδεται μεγάλη σε έκταση βιοδραστικότητα. Για το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στο πολυφαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου και των αποβλήτων του, στο οποίο αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που πιθανόν να σχετίζονται στην πρόσληψη ασθενειών.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα δειγμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη, ζελατίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης δίνει την δυνατότητα για προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση των εκχυλισμάτων μέσω της παγίδευσης τους στο φορέα, όπως επίσης και στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας για την αξιοποίηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν (3) μέθοδοι για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης. Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής χημικής ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από τις πολυφαινολικές ενώσεις. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι τα δείγματα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>). Και στις 2 in vitro μεθόδους η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων σύμφωνα με την αντιοξειδωτική δράση ήταν παραπλήσια, με ισχυρότερο το εκχύλισμα 13 το οποίο ήταν ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη ενώ ασθενέστερα παρουσιάστηκαν τα εκχυλίσματα 2 και 24 τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του πιο ισχυρού εκχυλίσματος σε ενδοθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy 926), όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Και οι δύο δείκτες εξετάστηκαν και παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά χωρίς την παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα, ενώ παρουσία του η αύξηση δεν ήταν τόσο σημαντική λόγω του οξειδωτικού stress. Τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών θα αναμέναμε να μειωνόντουσαν, αλλά παρατηρήθηκε μείωση απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μόνο στην μεγάλη συγκέντρωση, ενώ παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών δεν επηρεάστηκαν σε σύγκριση με το control.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων, των φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στα παραπροϊόντα (απορρίμματα) της παραγωγικής διαδικασίας. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την ενθυλάκωσή τους τα εκχυλίσματα διατήρησαν ισχυρή ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης και ιδιαίτερα αυτά που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη.

## **ABSTRACT**

Although olive mill waste waters (OMWW) cause serious environmental problems, they are rich in plant polyphenols, bioactive compounds having beneficial effects on human health, especially due to their antioxidant activity (1). Thus, in the present study, a polyphenolic extract was isolated from OMWW using the supercritical carbon dioxide method. Afterwards, the extract was encapsulated in whey protein, maltodextrin and gelatin or in combinations of these materials using the spray drying method in order to increase their bioavailability. Then, the encapsulated extracts were examined for their antioxidant activity using the ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging assay. The results showed that the encapsulated samples had antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values from 145 to 710 µg/ml. Moreover, the DNA plasmid breakage assay was used to assess the samples' activity to inhibit DNA damage induced by peroxy radicals (ROO•) produced from thermal decomposition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride (AAPH). The results showed that the samples protected from peroxy radical-induced DNA damage with IC<sub>50</sub> values from 397 to 2300 µg/ml. Furthermore, it was examined the samples' ability to affect the antioxidant mechanisms in human endothelial cells by estimating the total reactive oxygen species (ROS) levels and GSH levels by flow cytometry. The results showed that the encapsulated extracts reduced ROS and increased GSH levels, and thus suggesting the enhancement of antioxidant mechanisms. In conclusion, the results showed that polyphenolic extracts from OMWW after encapsulation have strong antioxidant activity, and consequently they may be used as food supplements or for the development of biofunctional foods.



## ***1. Εισαγωγή***

Χωρίς αμφιβολία, η καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή ελαιόλαδου χαρακτηρίζεται ζήτημα ζωτικής σημασίας για την οικονομία της χώρας και την ανάπτυξη της επαρχίας ειδικότερα. Η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση στον κόσμο στον τομέα αυτό, και γι αυτό η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί μια από τις σημαντικότερες δραστηριότητες του πρωτογενούς τομέα παραγωγής. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές μελέτες που χαρακτηρίζουν τη μεσογειακή δίαιτα ως ένα υγιές μοντέλο διατροφής που συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Φυσικά, η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή, βασίζεται στην πλούσια ποικιλία των φυτικών τροφών, στην υψηλή κατανάλωση δημητριακών, στο ελαιόλαδο, στην χαμηλή κατανάλωση κρέατος και στην μέτρια κατανάλωση κρασιού.

Η παραγωγή όμως του ελαιόλαδου συμπεριλαμβάνει και την παραγωγή αποβλήτων τα οποία συγκαταλέγονται στα κατ' εξοχήν βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο, παράγει περίπου 1.000 τόνους απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιοκάρπου, με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων. Από τα συστατικά των υγρών αποβλήτων (κατσίγαρος), ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινόλες, οι οποίες ως αντιοξειδωτικές ουσίες εμποδίζουν τη διάσπαση των λιπαρών οξέων και βοηθούν στη διατήρηση του λαδιού, δεν το αφήνουν δηλαδή να οξειδωθεί, (Tsimidou et al., 1992 ; Ryan & Robards et.al., 1998). Είναι όμως η κύρια ρυπαντική παράμετρος, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων. Για το λόγο αυτό η απομόνωση των πολυφαινόλων και η εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων τους προσφέρει θετικά μηνύματα όχι μόνο για οικονομικούς λόγους αλλά και για περιβαλλοντικούς.

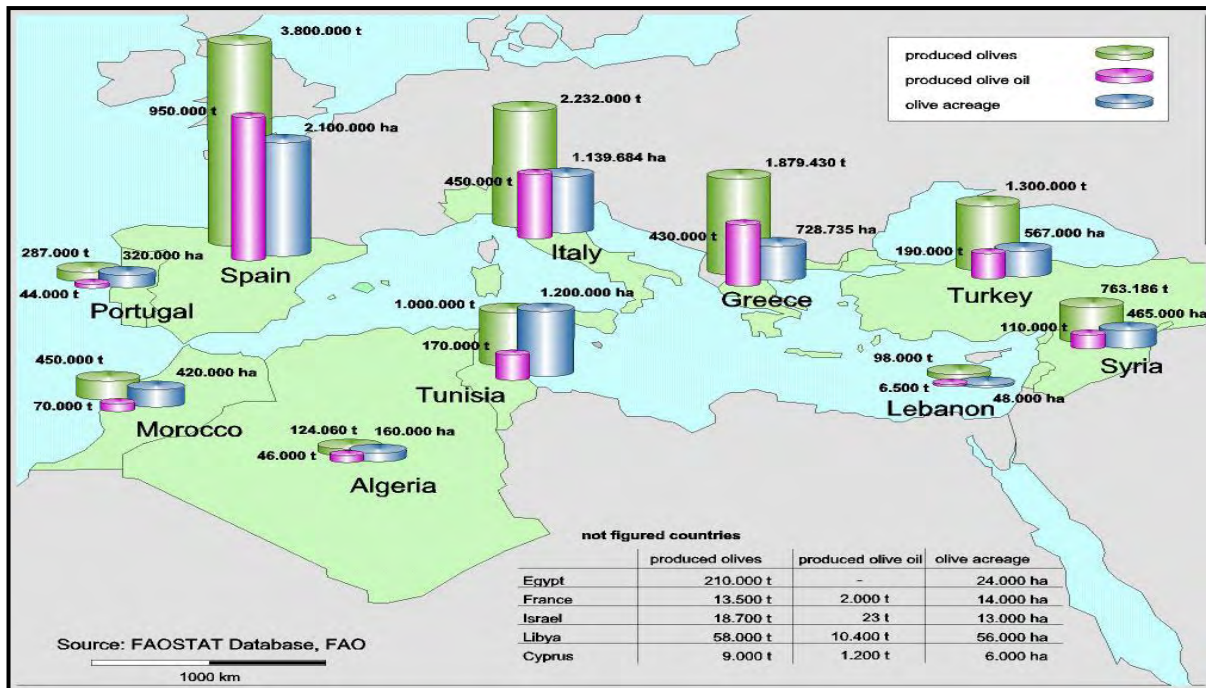
## 1.1 Η παραγωγή του ελαιολάδου και τα απόβλητα του

Από την αρχαιότητα είχε αναγνωριστεί στο ελαιόλαδο η ιδιαίτερη συνεισφορά του σε θέματα υγείας και ο Ιπποκράτης είχε αναφερθεί σε αυτό ως «το μέγα φάρμακο». Σήμερα, οι περισσότερες εμπειριστατωμένες έρευνες και μελέτες έχουν αναδείξει το ελαιόλαδο, ως ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα υγιεινής διατροφής. Θεωρείται ότι συμβάλλει στην μείωση των καρδιακών νοσημάτων, της χοληστερόλης και παρεμποδίζει την εμφάνιση καρκίνου, ενώ οι **πολυφαινόλες** του ελαιολάδου, οι οποίες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά επιδρούν ευεργετικά στην πρόληψη ή και θεραπεία πολλών άλλων νοσημάτων (Visioli F., Galli, C. 1998, Owen et al. 2000, Andrikopoulos et al. 2002).

Οι καλλιεργούμενες με ελιά εκτάσεις στη χώρα μας αποτελούν το 18,5% της συνολικής γεωργικής γης, οι οποίες δίνουν περίπου, μια παραγωγή 1.880.000 τόνους ελιάς ανά έτος. Στην *Εικόνα 1*, δίνονται η παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου καθώς και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις στη Μεσόγειο.

*Εικόνα 1. Παραγωγή Ελιάς - Ελαιολάδου - Καλλιεργούμενες Εκτάσεις.*

( <http://www.fw.rwth-aachen.de/cms/index.php?id=349> )





## 1.2 Ποιοτική Κατάταξη του Ελαιολάδου

Η ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου, ακολουθεί συγκεκριμένη μεθοδολογία και υπακούει σε διεθνείς σταθερές όπως αυτές προβλέπονται από τους κανονισμούς που έχει εφαρμόσει το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (International Olive Council), το οποίο έχει συσταθεί ακριβώς για την προστασία της ποιότητας του ελαιολάδου και των καταναλωτών. Για τη εγγύηση της ποιότητας του ελαιολάδου έχει σχεδιαστεί ένα ευρύ και τεκμηριωμένο Σύστημα Διασφάλισης Ποιότητας, το οποίο ακολουθεί σαφείς και συγκεκριμένες διαδικασίες.

Ως ποιότητα, εκφράζεται «το σύνολο των χαρακτηριστικών μιας υπηρεσίας ή ενός προϊόντος, που ικανοποιούν εκφρασμένες ή συνεπαγόμενες ανάγκες». Οι επίσημες ποιοτικές κατηγορίες ελαιολάδου είναι οι ακόλουθες:

- **Παρθένα Ελαιόλαδα:** Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης. Εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιοχημική δράση, ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμειξης με έλαια άλλης φύσης. Τα έλαια αυτά κατατάσσονται και ταξινομούνται αναλυτικά με τις ακόλουθες ονομασίες:

**α) Εξαιρετικό ή έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο (virgin olive oil - extra).**

Το ελαιόλαδο, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα), δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g (0,8%) και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή:

**β) Παρθένο Ελαιόλαδο.** Το ελαιόλαδο η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή

**γ) Ελαιόλαδο Λαμπάντε.** Το ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα είναι μεγαλύτερη του 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

- **Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο:** Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3 % και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.
- **Ελαιόλαδο-αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα:** Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.
- **Ακατέργαστο Πυρηνέλαιο:** Το έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς, κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή το έλαιο που αντιστοιχεί (με εξαίρεση ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά), σε ελαιόλαδο λαμπάντε.
- **Εξευγενισμένο Πυρηνέλαιο:** Το έλαιο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.
- **Πυρηνέλαιο:** Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.



## **1.2 Πώς Καθορίζεται η Ποιότητα του Ελαιολάδου;**

Οι φυσικοχημικές παράμετροι βάσει των οποίων χαρακτηρίζεται η ποιότητα του ελαιολάδου είναι οι ακόλουθες:

α. **Οξύτητα.** Υψηλή οξύτητα συνήθως σημαίνει ότι το ελαιόλαδο προέρχεται από τάλαιπωρημένο ελαιόκαρπο ή ακατάλληλες συνθήκες ελαιοποίησης.

β. **Υπεροξειδία.** Τα υψηλά υπεροξειδία υποδηλώνουν ότι το ελαιόλαδο έχει υποστεί οξειδωτικές ή άλλες αλλοιώσεις.

γ. **Κήροι** (Ένδειξη παρουσίας πυρηνελαίου).

δ. **Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα στη Θέση 2.** (Παρουσία εστεροποιημένων «συνθετικών» ελαίων).

ε. **Στιγμασταδιένια.** (Ένδειξη παρουσίας ραφινέ ελαίων σε παρθένα ελαιόλαδα).

στ. **ΔECN 42** (Ένδειξη παρουσίας σπορέλαιων).

ζ. **K 232** (Δείκτης αρχικών σταδίων οξείδωσης).

η. **K 270** (Δείκτης προχωρημένου σταδίου οξείδωσης).

θ. **ΔK** (Μαθηματική σχέση υπολογισμού συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας).

ι. **Οργανοληπτική Αξιολόγηση.** (Στατιστική μέθοδος προσδιορισμού οργανοληπτικών χαρακτηριστικών).

ια. **Μυριστικό, Λινολενικό, Αραχιδικό, Εικοσενικό, Βεχενικό, Λιγνοκηρικό οξύ.** (Περιεκτικότητες μεγαλύτερες των ποσοστών των επιτρεπτών ορίων, υποδηλώνουν αντίστοιχα την παρουσία κάποιου σπορέλαιου).

ιβ. **Trans Ισομερή Λιπαρά Οξέα.** (Ένδειξη παρουσίας ραφινέ ελαίων σε παρθένα ελαιόλαδα).

ιγ. **Χοληστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας ζωικού λίπους).

ιδ. **Βρασικαστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιε. **Καμπεστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιστ. **Στιγμαστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιζ. **Συνολική β-Σιτοστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιη. **δ7-Στιγμαστερόλη.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιου).

ιθ. **Συνολικές Στερόλες.** (Πιθανή ένδειξη παρουσίας σπορέλαιων).

κ. **Ερυθροδιόλη και Ουβαόλη**. (Πιθανή ένδειξη παρουσίας πυρηνελαίου).

κα. **Αλογονωμένοι Διαλύτες**. (Επιμόλυνση του ελαιολάδου με διάφορα τοξικά).

*Πηγή: [http://www.gge.gr/up/files/elaiol\\_typo.pdf](http://www.gge.gr/up/files/elaiol_typo.pdf)*

### **1.3 Απόβλητα Ελαιουργείων**

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι:

- ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού),
- Τα ελαιόφυλλα, που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιοκάρπο και
- Μία σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "λιοζούμι", "κατσίγαρος" ή "μούργα". Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο.

Ουσιαστικά, πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει *ευτροφικά φαινόμενα* σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους, λίμνες κ.τ.λ).

### **1.4 Η Σύσταση των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου.**

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα.
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου.
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g/l).
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6.
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα .
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l).

- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία.

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, ανήκουν στα Γεωργικά απόβλητα, που το εύρος των τιμών τους, επηρεάζεται από παράγοντες όπως:

- Κλιματολογικές συνθήκες.
- Ποικιλία ελιών.
- Ηλικία ωρίμανσης των καρπών.
- Χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων.
- Τύπος εδάφους.
- Τύπος τεχνολογίας παραγωγής.
- Χρόνος συγκομιδής και αποθήκευσης, πριν την επεξεργασία.

Από τα συστατικά που περιέχονται στον κασίγαρο, *οι πολυφαινόλες* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό, από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ από την άλλη είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό.

Επειδή, η παραγωγή του ελαιολάδου είναι μία φυσική διαδικασία, πρέπει να σημειωθεί ότι ο κασίγαρος δεν περιέχει άλλες ουσίες που είναι ιδιαίτερα τοξικές, όπως τα βαρέα μέταλλα και οι συνθετικές οργανικές ενώσεις..

Το υψηλό οργανικό φορτίο του κασίγαρου, σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών, δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την περαιτέρω επεξεργασία του.

Για την επεξεργασία και διάθεση του κασίγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές κατά περίπτωση, που παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσεως και δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

### 1.5 Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. (ΥΑΕ).

| Μηχανική επεξεργασία.                 | Βιολογική επεξεργασία.   | Φυσικοχημική επεξεργασία.                                    |
|---------------------------------------|--|--|
| 1) Διήθηση ( <i>Filtration</i> ).     | 1) Λίμνες Εξάτμισης ( <i>Lagoons</i> ).  | 1) Διαχωρισμός με μεμβράνες. ( <i>Membrane separation</i> ). |
| 2) Επίπλευση ( <i>Flotation</i> ).    | 2) Μέθοδος Ενεργού ιλύος ( <i>Activated Sludge</i> ).<br><br>(α) Απομάκρυνση Αμμωνιακού Αζώτου.<br>(β) Απομάκρυνση Φωσφόρου. | 2) Αποτέφρωση ( <i>Incineration</i> ).                       |
| 3) Καθίζηση ( <i>Sedimentation</i> ). |  |  |
| 4) Απολίπωση ( <i>Degreasing</i> ).   |  |  |

Πίνακας 1. Μέθοδοι Διαχείρισης των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείων.

Πολλοί επιστήμονες εργάζονται πάνω στην εύρεση αποδοτικών, και από άποψη κόστους, εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός, διάφορες μέθοδοι, αλλά και συνδυασμοί αυτών, έχουν εφαρμοστεί, συμπεριλαμβανομένου χημικών, μηχανικών, φυσικών, βιολογικών και θερμικών μεθόδων.



### 1.5.1. Μηχανική επεξεργασία.

1) **Διήθηση (Filtration).** Η διήθηση, είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους για την απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα. Τα στερεά περιλαμβάνουν άργιλο και ιλύ, οργανική ουσία, ιζήματα από άλλες επεξεργασίες, σίδηρο, μαγγάνιο και μικροοργανισμούς. Ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια πορώδους υλικού που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση της υγρής φάσης. Τα φίλτρα μπορεί να είναι στρώματα άμμου, αμμοχάλικου ή ενεργού άνθρακα που βοηθούν στην αφαίρεση και των πιο μικρών μορίων.

Συνήθως, η διήθηση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των στερεών υλικών από τα υγρά απόβλητα που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία (πχ φράξιμο σωλήνων). Η διήθηση για την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα βασίζεται στις μεθόδους διαχωρισμού μεμβρανών.

2) **Επίπλευση (Flotation):** Η επίπλευση, είναι μια μηχανική μέθοδος διαχωρισμού των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα. Η χρήση ενός αερίου στο σύστημα, όπως αέρα ή αζώτου, διευκολύνει το διαχωρισμό. Η αρχή της μεθόδου είναι απλή. Το αέριο διοχετεύεται υπό πίεση στα απόβλητα σχηματίζοντας λεπτές φυσαλίδες και προσροφάται στην επιφάνεια των στερεών, μειώνοντας το ειδικό βάρος και διευκολύνοντας το διαχωρισμό. Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες όπως:

I. Ουσίες που προκαλούν αφρισμό (*foaming chemicals*). Η δημιουργία αφρού σταθεροποιεί τις φυσαλίδες και τον αφρό στην επιφάνεια της δεξαμενής. Σε διαφορετική περίπτωση, εάν σταματήσει ο σχηματισμός φυσαλίδων και αφρού, τα αιωρούμενα στερεά θα κατακρημνιστούν.

II. Ουσίες που καθιστούν τα αιωρούμενα στερεά υδρόφοβα. Με τη χρήση των ουσιών αυτών, τα αιωρούμενα στερεά προσκολλώνται ευκολότερα στις φυσαλίδες του αέρα και κινούνται προς την επιφάνεια. Αυτοί οι χημικοί παράγοντες καλούνται επίσης συλλέκτες (*collectors*).

III. Μερικοί ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ρυθμιστές pH, ουσίες που προκαλούν κροκίδωση, κλπ.

Εφαρμόζονται διάφοροι τύποι επίπλευσης, οι όποιοι διαφέρουν κυρίως στον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες. Η επίπλευση με διαλυμένο αέρα (*dissolved air flotation*), είναι η ευρύτερη μέθοδος που εφαρμόζεται λόγω της αποτελεσματικότητας στην απομάκρυνση μεγάλου εύρους στερεών. Μέχρι τώρα, η επίπλευση χρησιμοποιούνταν μόνο σε πειραματικό στάδιο για την επεξεργασία των αποβλήτων των

ελαιοτριβείων. Η επίπλευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση της πολύ λεπτής φάσης ελαίου (γαλάκτωμα) στα απόβλητα, αλλά η εφαρμογή παραμένει οριακή λόγω της χαμηλής αναλογίας δαπάνη/όφελος.

**3) Καθίζηση (Sedimentation):** Η καθίζηση στηρίζεται στη μεγαλύτερη πυκνότητα των μορίων από αυτή του νερού για την απομάκρυνσή τους από την υδατική φάση. Η διαδικασία μπορεί να είναι φυσική (κατακρήμνιση λόγω βαρύτητας) ή εξαναγκασμένη (σε φυγοκεντρικό διαχωριστή ή κυκλώνα). Μετά από την αφαίρεση των ογκωδών στερεών, τα υγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές καθίζησης, όπου η ταχύτητα ροής μειώνεται και τα αιωρούμενα υλικά βυθίζονται στον πυθμένα της δεξαμενής. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται το 50% περίπου των διαλυμένων στερεών και το 35% του BOD. Επίσης, τα συστατικά που επιπλέουν όπως το έλαιο συλλέγονται από την επιφάνεια των δεξαμενών. Το υλικό που καθιζάνει (ιλύς), συλλέγεται σε μια χοάνη και οδηγείται για περαιτέρω επεξεργασία. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ασβέστης για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων οσμών.

**4) Απολίπωση (Degreasing):** Πριν την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων στο σύστημα βιολογικού καθαρισμού, θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθεί η λιπαρή φάση με τη χρήση παγίδας λιπών, δεδομένου ότι εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των βιολογικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Παράγοντας αποφασιστικής σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος απολίπωσης είναι το μέγεθος των ελαιοσταγονιδίων. Όσο μεγαλύτερα είναι τα σταγονίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση τους να σχηματίσουν ένα φιλμ ελαίου στην επιφάνεια του νερού, για την απομάκρυνση του οποίου χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές, οι απολιπωτές (*oil skimmer*). Οι συσκευές αυτές είναι ιμάντες ή δίσκοι από χάλυβα ή πλαστικό που βυθίζονται συνεχώς στα υγρά απόβλητα. Το έλαιο προσκολλάται στην υδρόφιλη φάση και στη συνέχεια απομακρύνεται από την επιφάνεια. Στην περίπτωση που τα σταγονίδια του ελαίου είναι πολύ μικρά ή η συγκέντρωση του ελαίου είναι χαμηλή, χρησιμοποιούνται οι φυγοκεντρικοί διαχωριστές ή διαχωριστές βαρύτητας.

### 1.5.2 Φυσικοχημική επεξεργασία.

Η αποτελεσματική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων περιλαμβάνει την κατάλληλη προ-επεξεργασία με μεθόδους όπως η διήθηση, η συσσωμάτωση (*flocculation*) και το φιλτράρισμα. Με την επιλογή του καλύτερου χημικού παράγοντα (πολυηλεκτρολύτη) για συσσωμάτωση, είναι δυνατόν να αποβληθεί σημαντικό ποσοστό κολλοειδών σωματιδίων από τα υγρά απόβλητα, τα οποία θα αφαιρεθούν στη συνέχεια με ένα φίλτρο άμμου (*sandbed*). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει διήθηση μέσω μεμβρανών που εξασφαλίζει συνολική μείωση του οργανικού φορτίου κατά **95%**.

#### 1) Διαχωρισμός με μεμβράνες (*Membrane separation*).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την απομάκρυνση αιωρούμενων, κολλοειδών και διαλυμένων ουσιών από τα υγρά απόβλητα. Χρησιμοποιείται μία ημιπερατή ή πορώδης μεμβράνη, η οποία λειτουργεί σαν φυσικό φράγμα μέσω του οποίου οι ουσίες είτε περνούν είτε παρακρατούνται ανάλογα με το μέγεθός τους. Η δομή και τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης καθορίζουν τη φύση του διαχωρισμού. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των διαδικασιών διήθησης με μεμβράνες είναι η εφαρμογή πίεσης, η οποία αναγκάζει το διάλυμα να περάσει μέσω της πορώδους μεμβράνης και να επιτευχθεί εκλεκτικός διαχωρισμός. Η διαπερατότητα εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων και των πόρων των μεμβρανών.

Γενικά, ο διαχωρισμός με μεμβράνες διακρίνεται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων σε:

|                    |  |
|--------------------|--|
| ➔ Στερεά από αέρια | ➔ Αέρια από υγρά                       |
| ➔ Στερεά από υγρά  | ➔ Υγρά από υγρά                        |
| ➔ Αέρια από αέρια  | ➔ Διαλυμένα ή κολλοειδή υλικά από υγρά |

Πριν το διαχωρισμό με μεμβράνες είναι απαραίτητο ένα στάδιο προ-φιλτραρίσματος ώστε να αφαιρεθούν τα μεγάλα αιωρούμενα στερεά.

Έχει υποστηριχτεί ότι η τεχνολογία των μεμβρανών επιτρέπει το διαχωρισμό ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων π.χ. πολυφαινόλες, (Rozzi et al., 1996), αλλά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία μονάδα που να αξιοποιεί τα υγρά απόβλητα προς την κατεύθυνση αυτή. Ο διαχωρισμός με μεμβράνες δεν είναι κατάλληλος για υγρά απόβλητα υψηλού ρυπαντικού φορτίου από την παραγωγή ελαιολάδου, γιατί δημιουργούν προβλήματα στην ομαλή λειτουργία των μεμβρανών, λόγω φραξίματος των πόρων και φαινομένων συσσωμάτωσης και προσρόφησης, γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία ενός στρώματος γλοιώδους υφής στην επιφάνεια

των μεμβρανών.

Η τεχνολογία των μεμβρανών είναι αποτελεσματική στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων, μόνον όταν το υψηλό ρυπαντικό φορτίο έχει μειωθεί προηγουμένως με άλλες μηχανικές ή βιολογικές μεθόδους. (Brenes et al., 1993).

## **2) Αποτέφρωση (Incineration).**

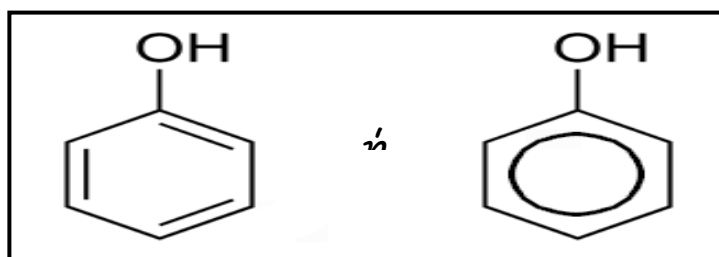
Η αποτέφρωση είναι η καταστροφή του οργανικού περιεχομένου των αποβλήτων. Παρουσία αέρα σε υψηλή θερμοκρασία, που συνοδεύεται από πλήρη εξάτμιση του ύδατος.

Η επεξεργασία αυτή είναι αποτελεσματική για τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανική ουσία. Όσο υψηλότερο είναι το οργανικό περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων (οργανική ουσία τουλάχιστον 10%), τόσο αποτελεσματικότερη είναι η τεχνολογία αποτέφρωσης σε σύγκριση με τη μηχανική-βιολογική επεξεργασία.

## 1.6. Το Φαινολικό Περιεχόμενο των Αποβλήτων του Ελαιοτριβείου

**Πολυφαινόλες – (Polyphenols):** Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών.

Σύνθετο ουσιαστικό, που σχηματίζεται από την λέξη (πολύ) και την λέξη (φαινόλη), η οποία αναφέρεται σε μία χημική δομή ενός βενζοϊκού δακτυλίου (αρωματικός υδρογονάνθρακας) και μίας υδροξυλικής ομάδας (-OH), που βρίσκονται σε δεσμό μεταξύ των. Είναι δηλαδή, μόρια όπου έχουν μία υδροξυλική ομάδα, σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι  $C_6H_5OH$ , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 2. Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.

### 1.6.1 Φυσικές Ιδιότητες

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυροτέρου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

Εμφανίζουν **υψηλή οξύτητα** ( $pK_a = -\log_{10}K_a = 8^{-10}$ ). Όπου  $K_a = [A^-][H^+] / [HA]$ . HA = το αρχικό οξύ που διασπάται σε  $A^-$  (συζευγμένη βάση του οξέως) και σε ένα (υδρογόνιο ή πρωτόνιο)  $H^+$ .

Το  $pK_a$  μας βοηθά να κατανοούμε την φύση ενός οξέως ή μιας βάσης σαν το pH:

- $pK_a < 2$  --strong acid.
- $pK_a > 2$  but  $< 7$  -- weak acid.
- $pK_a > 7$  but  $< 10$  -- weak base.
- $pK_a > 10$  --strong base

Λόγω της υψηλής οξύτητας, οι φαινόλες συχνά ονομάζονται και καρβολικά οξέα (*carbolic acids*). Το μόριο της φαινόλης έχει υψηλή οξύτητα, διότι έχει μερικώς θετικό

φορτίο στο άτομο του οξυγόνου, λόγω συντονισμού και το ανιόν το οποίο σχηματίζεται από την απώλεια ενός υδρογόνου, σταθεροποιείται και αυτό με το συντονισμό.

### **1.6.2 Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.**

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998). Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

➤ Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση.

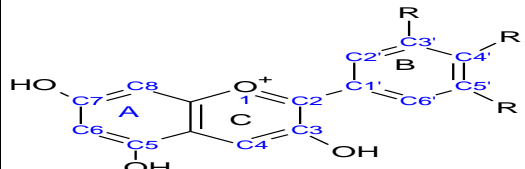
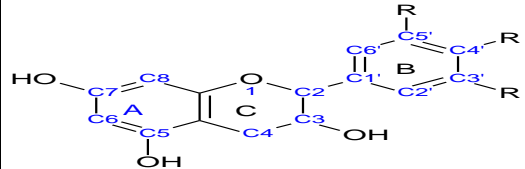
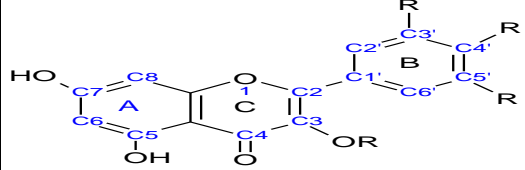
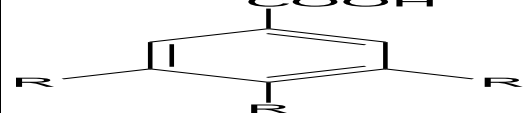
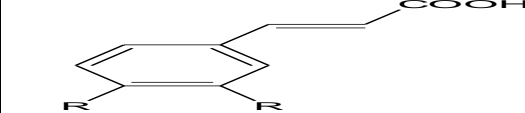
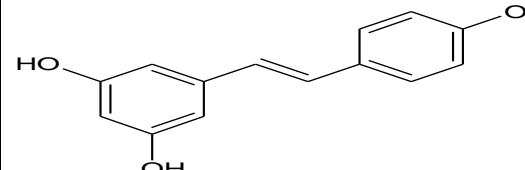
➤ Δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών.

➤ Συνήθως, δρουν συνεργικά, δηλαδή εμφανίζουν ισχυρότερη δράση όταν συνδυάζονται διαφορετικές κατηγορίες φυτοχημικών.

➤ Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005).

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Οι ταννίνες, οι λιγνίνες και τα φλαβονοειδή είναι υποκατηγορίες των πολυφαινολών.

| α/α | Κατηγορία          | Υποκατηγορία               | Χημικοί Τύποι  |
|-----|--------------------|----------------------------|--|
| 1   | Φλαβονοειδή        | Φλαβονόλες                 |    |
|     |                    | Φλαβανόλες                 |    |
|     |                    | Ανθοκυανιδίνες             |    |
| 2   | Πολυφαινολικά οξέα | Υδροξυβενζοϊκό οξύ         |    |
|     |                    | Υδροξυκινναμικό οξύ        |   |
| 3   | Στιλβένια          | <i>trans</i> -ρεσβερατρόλη |  |

**Πίνακας 2.** Φυτικές Πολυφαινόλες.

### 1.6.3 Πολυφαινόλες στα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου

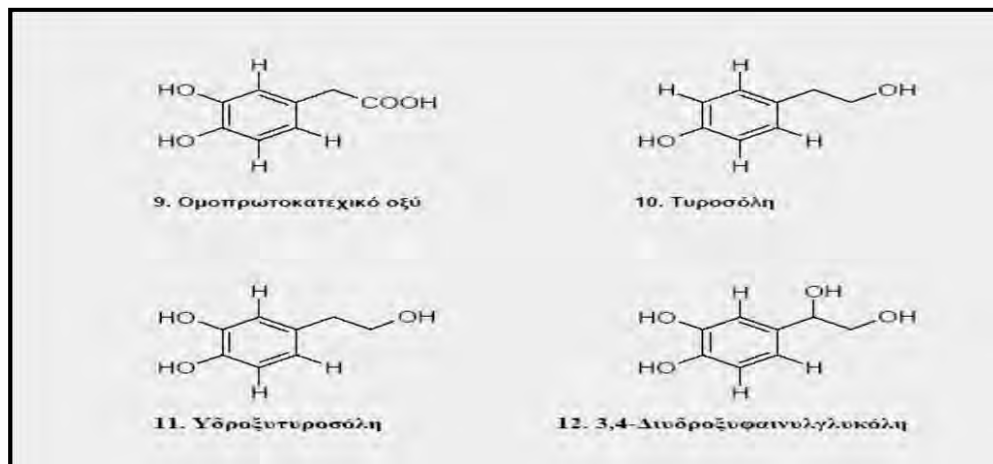
Η τοξικότητα και η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων, αφορά στη συγκέντρωση των φαινολών, συστατικά που προκαλούν δύσκολη αποικοδόμηση (Mekki A. et.al., 2007).

Στο λάδι και στα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν, χαρακτηρίζονται ως πολυφαινόλες. Αυτός ο όρος έχει καθιερωθεί, χωρίς να σημαίνει ότι όλες οι φαινόλες είναι αρωματικοί υδρογονάνθρακες με περισσότερες από 2 υδροξυλομάδες. Για παράδειγμα το κινναμικό οξύ, το ελενολικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το κουϊνικό οξύ, φέρονται ως φαινολικά οξέα, παρόλο που βρίσκεται ένας αρωματικός δακτύλιος ή μία υδροξυλομάδα.

Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιοκάρπου μειώνεται η συγκέντρωση πολυφαινολών λόγω οξειδωτικών και υδρολυτικών διαδικασιών. Λόγω της υδατοδιαλυτότητας των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών, κατά την παραγωγή ελαιόλαδου, επηρεάζουν τις φαινολικές ενώσεις με μερική διάλυση, όπου στη συνέχεια απομακρύνονται με τα απόνερα. (Tsimidou, M., et.al, 1992).

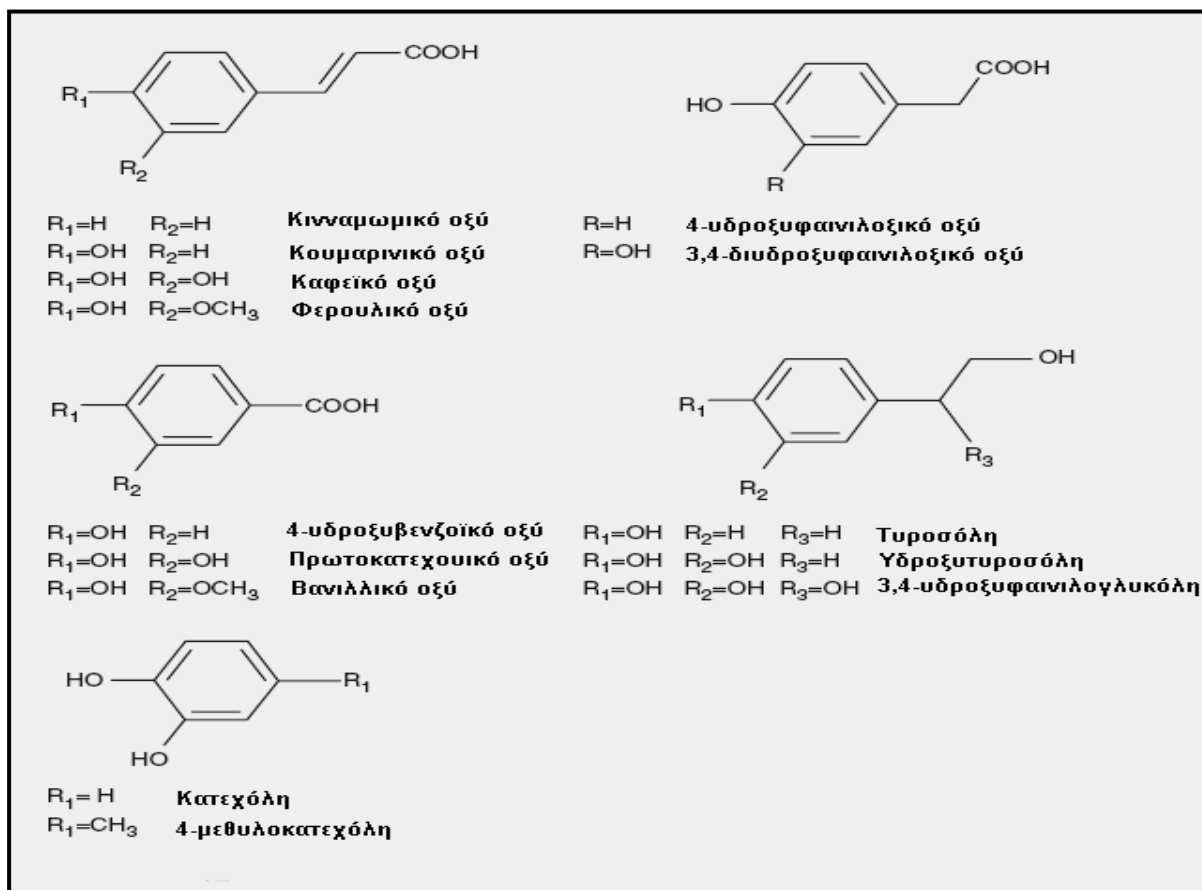
**Η Τυροσόλη και η Υδροξυτυροσόλη**, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Υπάρχουν και άλλα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο όπως ελαιοευροπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ, σιναπικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντιστικό οξύ, σικιμικό οξύ, p-φαινυλοξικό και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη.

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές αλκοόλες.



**Εικόνα 3:** Οι Φαινολικές Ενώσεις που Υπάρχουν στον Κατσίγαρο





**Εικόνα 4:** Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων.

(Niaounnakis & Halvadakis, 2006).

Η Υδροξυτυροσώλη, είναι αποδεδειγμένα η πολυφαινόλη με το υψηλότερο επίπεδο προστασίας, έναντι των ελευθέρων ριζών που έχει ποτέ αναφερθεί, για τα φυσικά αντιοξειδωτικά.

#### 1.6.4 Μέθοδοι Εξαγωγής των Φαινολικών Ενώσεων.

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά στην εξαγωγή – εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχει κάποια ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος. Οι πλέον κοινές είναι:

- Η εκχύλιση με διαλύτη. (Baydar, et.al., 2004 – Bucic, et.al., 2007) και
- Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό. (Bleve et al, 2008. Nahar & Sarker, 2005. Palma & Taylor, 1999).

### **Εκχύλιση Υγρού – Υγρού.**

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μία λειτουργία μεταφοράς μάζας, στην οποία ένα υγρό διάλυμα, που αρχικά περιέχει μία ή περισσότερες διαλυτές ουσίες, αναμιγνύεται καλώς με ένα υγρό (διαλύτης) . Ο διαλύτης, παρουσιάζει καλύτερη επιλεκτικότητα προς ένα ή και περισσότερα από τα συστατικά του διαλύματος. Από αυτή την διαδικασία προκύπτουν δύο προϊόντα:

- Το εκχύλισμα, που περιέχει το επιθυμητό εξαγόμενο διάλυμα και
- Το ραφινρισμένο, που περιέχει το υπόλοιπο διάλυμα, με μικρή ποσότητα διαλυμένης ουσίας.

Αυτή η εκχύλιση, λειτουργεί πολύ καλά, εάν επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης.

### **Εκχύλιση Στερεού – Υγρού.**

Η Εκχύλιση Στερεού – Υγρού ή έκπλυση, μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας, κατά το οποίο κάποια στερεά μόρια, αρχίζουν να αποχωρούν από την αρχική τους θέση και να κινούνται μέσα σε ένα διαλύτη, όταν αυτός ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό.

Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας, μπορεί να ενισχυθεί με αλλαγές στην συγκέντρωση, στον συντελεστή μεταφοράς (*diffusion coefficient-  $m^2/s$*  ) και στο οριακό στρώμα (*boundary layer*). (Corrales, et.al., 2009). Αυτή η λειτουργία, χρησιμοποιείται ευρέως για ανάκτηση σπουδαίων συστατικών των τροφίμων, όπως φυσικά και αυτών των πολυφαινολικών συστατικών.

## **1.7 Η Βιοδραστικότητα των Πολυφαινολών από τα απόβλητα ελαιотριβείου**

Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθεραπευτικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα όπως (μήλα, μούρα, πεπόνι, κεράσια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, φράουλες) και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, **το ελαιόλαδο**, η γύρη της μέλισσας είναι επίσης άλλες σημαντικές πηγές.

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να εξολοθρεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να ανάγουν ορισμένες χηλικές αντιδράσεις δραστικά ιόντα που περιέχουν οξυγόνο -ελεύθερες ρίζες- πρέπει να αφαιρούνται από τα κύτταρα συνεχώς για να διατηρηθεί ο σωστός μεταβολισμός). Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα :

- Να μειώσουν τις φλεγμονώδεις επιδράσεις, όπως της στεφανιαίας νόσου, και να βελτιώσουν την υγεία των ενδοθηλίων, περιορίζοντας την οξείδωση της χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL).
- Να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου – οι πολυφαινόλες που αναφέρονται για την πρόληψη του καρκίνου είναι η κατεχίνη επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα.
- Να καθυστερήσουν την διαδικασία της γήρανσης.
- Να προστατεύσουν τις λιπομεμβράνες των κυττάρων, τις πρωτεΐνες και το DNA.

## 1.8 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη $O_2$ .

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε - *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -σε *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται *παραμαγνητικά*, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, *διαμαγνητικά*. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται *οξειδοαναγωγικές (redox)*. Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων, από ένα άτομο. Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990). Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ ),
- η ρίζα υδροξυλίου ( $-OH^{\cdot}$ ),
- η ρίζα υπεροξειδίου ( $-ROO^{\cdot}$ ),
- το  $O_2$  απλής κατάστασης,

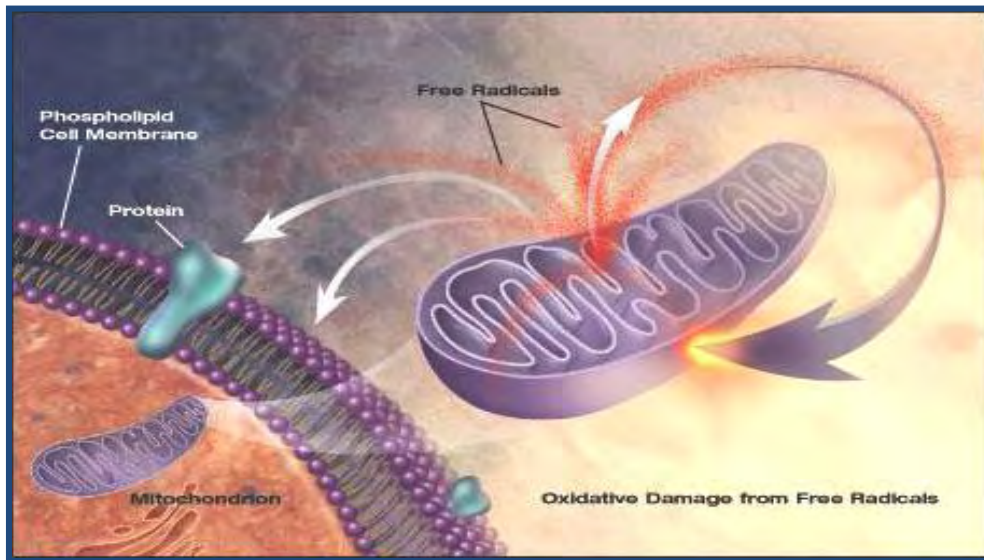
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO<sup>·</sup>), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

### ***1.8.1 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.***

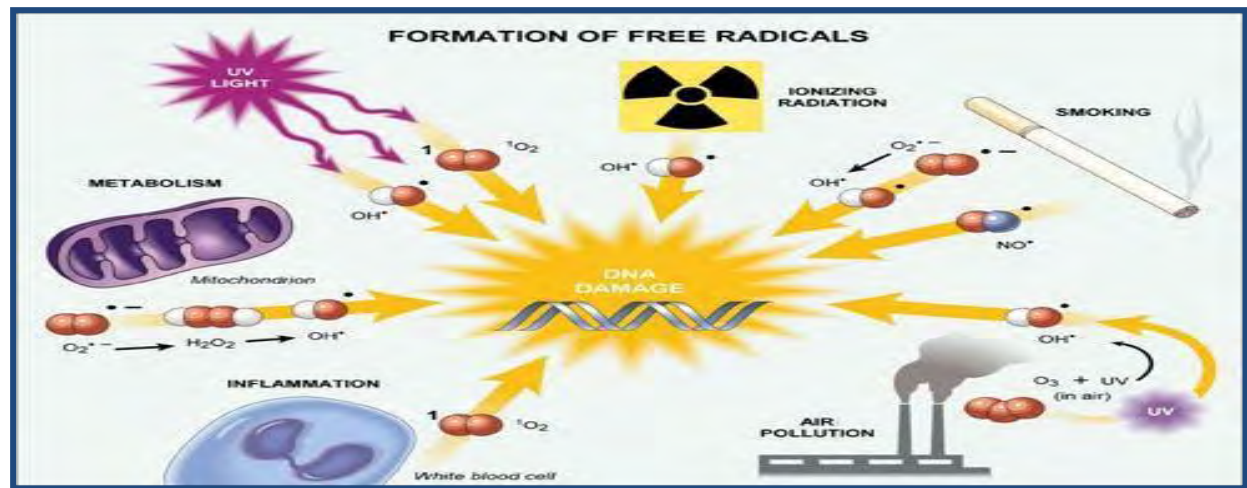
Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξείδιο.
- Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.
- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.
- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.



**Εικόνα 5:** Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

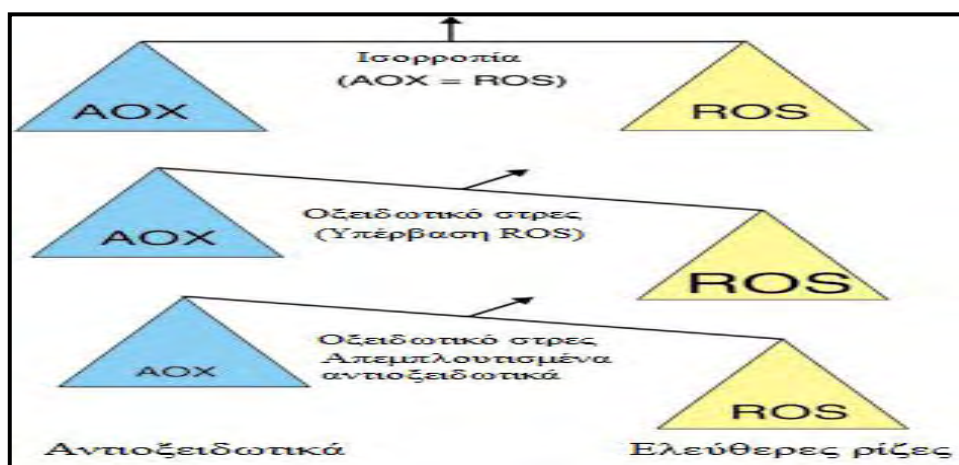
Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία).



**Εικόνα 6:** Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

## 1.9 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «Βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας. (Rosen G.M., et.al., 1999). Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



**Εικόνα 7:** Οξειδωτικό Στρες.

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species - (ROS)* και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Μπορούμε επίσης, να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση. Έτσι υπάρχουν:

- ✓ Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες και
- ✓ Αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός μας με την τροφή.

|   |  |
|---|--|
| <p style="text-align: center;"><b><u>Ένζυμα:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δισμουτάση του υπεροξειδίου</li> <li>• Καταλάση</li> <li>• Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης</li> <li>• Παραοξονάση</li> <li>• Πρωτεόσωμα</li> </ul> <p>Ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΕΟ μέσω της απομάκρυνσης οξειδωτικών ή μετατρέποντας τα ΔΕΟ, σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις.</p> <p>Περιλαμβάνονται επίσης:</p> <p style="text-align: center;"><b><u>Πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα):</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αλβουμίνη.</li> <li>• Σερουλοπλασμίνη.</li> <li>• Τρανσφερίνη.</li> <li>• Ατογλοβίνη.</li> </ul> <p>Δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα.</p> | <p style="text-align: center;"><b><u>Λιποδιαλυτά Αντιοξειδωτικά</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε).</li> <li>• Καροτενοειδή.</li> <li>• Χολερυθρίνη.</li> <li>• Ορισμένες Κινόνες.</li> <li>• Πολυφαινόλες.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b><u>Υδατοδιαλυτά Αντιοξειδωτικά</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).</li> <li>• Ουρικό οξύ .</li> <li>• Πολυφαινόλες.</li> </ul> |
|---|--|

**Πίνακας 4: Ενδογενή Αντιοξειδωτικά.**



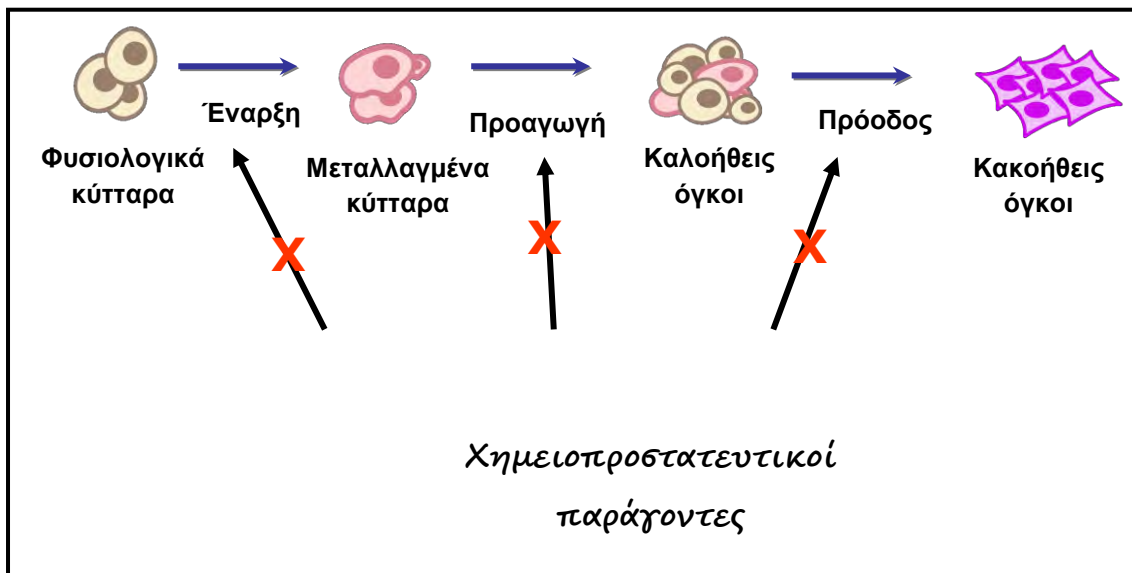
Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις).

### ***1.10 Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.***

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες. Τα ΔΕΟ αρχικά οξειδώνουν μόνο τα φωσφολιπίδια της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της LDL, οπότε λέμε ότι η LDL είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη LDL μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχέων, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη LDL, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης LDL μέσα στα μακροφάγα τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύπαρα. Καθώς τα αφρώδη κύπαρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

Ένα άλλο παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: στην έναρξη (initiation), στην προαγωγή (promotion) και στην πρόοδο (progression). (Greenwald, 1995).



### *Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων.*

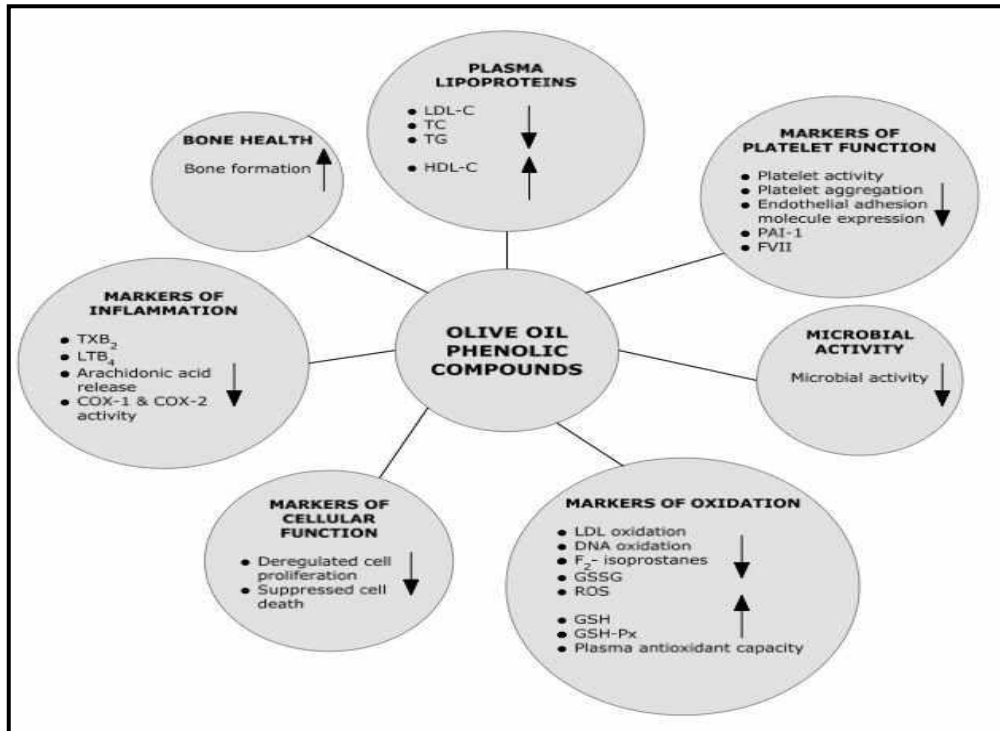
Η έναρξη, το πρώτο στάδιο, προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA (πιθανότατα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση) σε ένα ‘αρχικό κύτταρο’ (initiated cell) που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε (Trosko και Chang 1989).

Στο δεύτερο στάδιο, στην προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάτω από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων) με τελική κατάληξη το σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από αυτά τα κύτταρα, μία ‘κρίσιμη’ μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο αφού αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέρθει στην φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει ‘αρχικά κύτταρα’ (Trosko et.al., 1983).

Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, στην πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης (Kerbel et. al., 1984).

## 1.6 Η Βιοδραστητικότητα των πολυφαινόλων – Γενικά

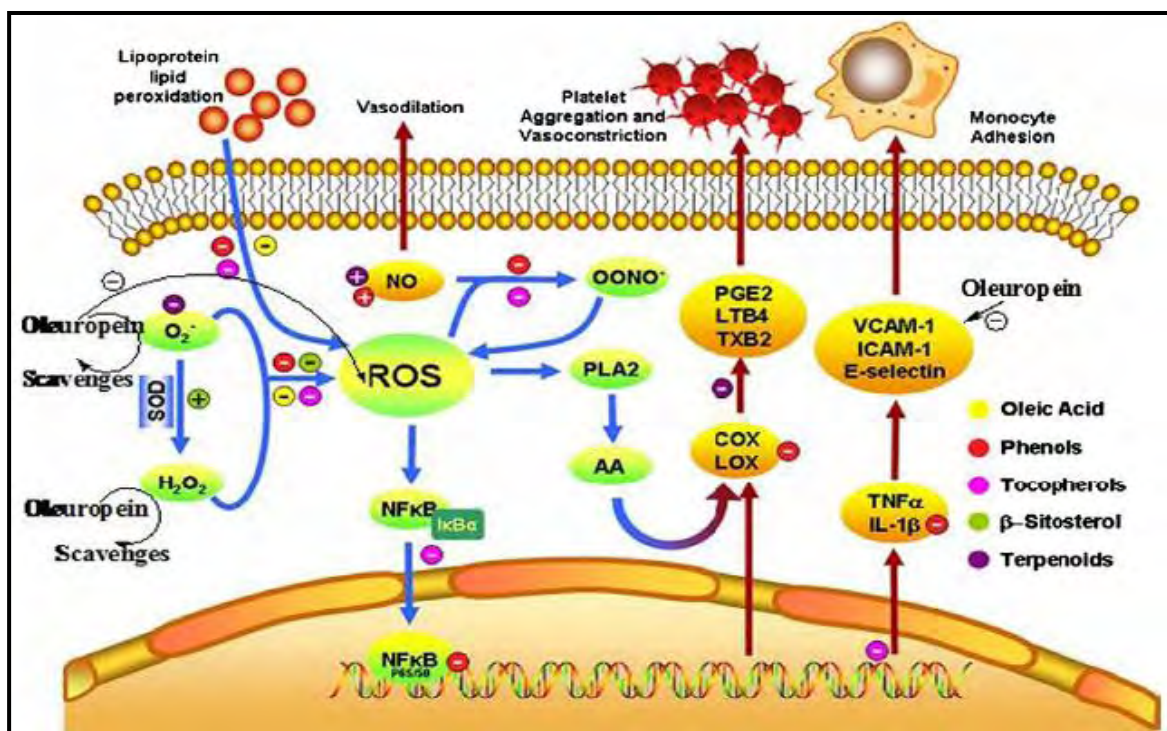
Μελέτες υποστηρίζουν την άποψη πως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατά συνέπεια στα απόβλητά του, είναι ικανές να δρουν ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά. Στην εικόνα παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολικών συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες.



**Εικόνα 8:** Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale, S. et.al., 2010).

- **Καρδιαγγειακό:** Η επίδραση των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στα αντισώματα, κατά της οξειδωμένης LDL - *Low Density Lipoprotein*. (Olga Castaner, et. al., 2011). Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, προωθούν την δημιουργία OLAB (OxLDL autoantibodies – Αυτοαντισώματα της οξειδωμένης LDL). Παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα, σε υψηλές συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL.

➤ Καρδιοπροστατευτικός και νευροπροστατευτικός ρόλος της ελευρωπαΐνης στο ελαιόλαδο. (Syed Haris Omar. 2010).



**Προτεινόμενο μοντέλο για τους μηχανισμούς δράσης της του ελαϊκού οξέως και άλλων ενώσεων του ελαιολάδου**

Η μελέτη υποστηρίζει πως το ελαϊκό οξύ, η ελευρωπαΐνη και η β-σιτοστερόλη (φυτική στερόλη), ενδέχεται ενδοκυτταρικά, να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, με το να δημιουργούν ένα λιγότερο οξειδωτικό περιβάλλον. Η β-σιτοστερόλη μπορεί επίσης να ενισχύσει την δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD activity), μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του οξυγόνου.

Οι τοκοφερόλες και οι φαινολικές ενώσεις είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, με την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και των νιτρικών μονοξειδίων  $\text{NO}^\cdot$ .

Το νιτρικό μονοξείδιο είναι ένα σημαντικό μόριο κυτταρικής σηματοδότησης, που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Ισχυρό αγγειοδιασταλτικό με μια σύντομη ημιζωή από λίγα δευτερόλεπτα στο αίμα.

Επίσης, μειώνεται ο σχηματισμός των νιτρικών ιόντων  $\text{OONO}^\cdot$ . Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μπορεί να ενεργοποιήσουν τον πυρηνικό παράγοντα NFkB που είναι ένας πρωτεϊνικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε το 1986. Σήμερα, είναι γνωστό ότι εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (Karin et al., 2005). Αυτός ο παράγοντας, που συνδέεται με αλληλουχίες αναγνώρισης

στο DNA και επάγει την γονιδιακή έκφραση, με την παρουσία των ελεύθερων ριζών, μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα.

- **Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση.** (Manna C, et.al. 2009).

Πρέπει να αναφερθεί πως, η ομοκυστεΐνη είναι ένα θειούχο αμινοξύ το οποίο παράγεται ενδοκυτταρικά, από τον μεταβολισμό της μεθειονίνης (ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα) και διοχετεύεται στην κυκλοφορία μέσω του πλάσματος, κυρίως σε οξειδωμένη μορφή, δεσμευμένη σε πρωτεΐνες. Η ομοκυστεΐνη, επηρεάζει τη μεθυλίωση και γι' αυτό είναι πολύ σημαντική. Η μεθυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία χιλιάδες νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και άλλα βασικά βιοχημικά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία, δηλαδή τα μεθύλια προσκολλώνται σε τοξίνες με σκοπό να τις αποβάλλουν από τον οργανισμό. Η μεθυλίωση βοηθά επίσης στην δημιουργία των φιλικών λιπαρών για τον εγκέφαλο (φωσφολιπίδια) και ακόμα ελέγχει την έκφραση των γονιδίων.

Με χαμηλή ομοκυστεΐνη έχουμε ισορροπία στο σώμα, εάν όμως έχουμε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, διαταράσσεται η μεθυλίωση, προκαλείται ερεθισμός και φλεγμονή στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και αυξάνεται ο κίνδυνος του εμφράγματος, γιατί οι βλάβες στα τοιχώματα των αρτηριών προκαλούν την εναπόθεση πλακών, που οδηγούν στη στένωση και τελικώς στο έμφραγμα.

- **Επιδράσεις των πολυφαινόλων του ελαιολάδου, στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων.** (Paiva-Martins F., et.al, 2009).

Εδώ, διαπιστώθηκε πως η 3,4-DHPEA-EDA (3-Υδροξυτυροσόλη), μία πολυφαινόλη του ελαιολάδου, μπορεί να διαδραματίσει έναν αξιοσημείωτο προστατευτικό ρόλο έναντι των ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του ανθρώπου. Χαμηλότερες δόσεις αυτής της ένωσης, ήταν ικανές για την προστασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων in vitro και στην αποτροπή της αιμόλυσης.

- **Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από φαινόλες ελαιολάδου, μέσω cAMP-φωσφοδιεστεράσης.** (Dell'Agli M., et.al., 2008).

Το κυκλικό AMP (cAMP ή 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη), είναι ένας αγγελιοφόρος σημαντικός σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Προέρχεται από τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια μετάδοση

σημάτων στους οργανισμούς. Η cAMP, συντίθεται από την ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) από την αδενυλική κυκλάση, που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Καταλύεται από το ένζυμο της φωσφοδιεστεράσης, το οποίο καταλύει με υδρόλυση τον φωσφοδιεστερικό δεσμό. Στην παραπάνω εργασία, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα αιμοπετάλια, που διεγείρονταν με θρομβίνη και έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης αυτών. Χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα και πολυφαινόλες ελαιόλαδου. Το φαινολικό περιεχόμενο των HPE (high phenol content), ήταν μεταξύ 250 and 500 mg/kg, ενώ των LPH (low phenol levels) 46 mg/kg. Τελικά, η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από φαινόλες ελαιόλαδου, κατά 50% κυμάνθηκε από 1,23 έως 11,2 µg/ml.

➤ **Αντι-Αθηρωματικά συστατικά του ελαιόλαδου.** (Visioli F, et.al. 2001).

Αναφέρεται στο ότι το ελαιόλαδο, είναι η κύρια πηγή των λιπαρών στην Μεσογειακή διατροφή, με αποτέλεσμα, την παρουσία μικρού σχετικά αριθμού της στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου. Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων (ελαϊκό οξύ), αλλά η κύρια ιδιαιτερότητα του έξτρα-παρθένου ελαιόλαδου, είναι η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων των φαινολικών ενώσεων, κυρίως υδροξυτυροσόλης και ελευρωπαΐνης, που παρέχουν υψηλή σταθερότητα και την έντονη γεύση. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινολικά συστατικά της ελιάς είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, τόσο in vitro, όσο και in vivo, που θα μπορούσαν εν μέρει, να ευθύνονται για την καρδιοπροστατευτική δράση που παρουσιάζεται στην Μεσογειακή διατροφή.

➤ **Η προστατευτική δράση του ελαιόλαδου και των φαινολικών του συστατικών, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας.** (Fito M, et.al. 2000).

Εδώ, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το παρθένο ελαιόλαδο [0.1-0.3 mg/L caffeic acid equivalents (CAE) - ισοδύναμο καφεϊκού οξέως], που περιέχει πολυφαινόλες, έχει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με εκείνη του εξευγενισμένου ελαιόλαδου (0 mg/L CAE). Φαινολικές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 mg/L, παρεμπόδισαν την δημιουργία των δραστικών ουσιών από το θειοβαρβιτουρικό οξύ, όταν το AAPH [(2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), σαν ελεύθερη ρίζα, ξεκίνησε την οξείδωση της LDL.

➤ **Ελαιόλαδο και αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Ο ρόλος των φαινολικών συστατικών.** (Fito M, et.al. 2000).

Ο σκοπός της εργασίας ήταν να ερευνηθεί η προστατευτική επίδραση των ελαιολάδων, με διαφορετική φαινολική σύσταση, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Χρησιμοποιήθηκαν:

- Εξευγενισμένο ελαιόλαδο, με φαινολικό περιεχόμενο: 0 mg/l CAE),
- Κοινό ελαιόλαδο (0.1 - 0.3 mg/l CAE) και
- Παρθένο ελαιόλαδο, αραιωμένο με εξευγενισμένο ελαιόλαδο .

Η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη, αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, που προκαλείται από θειικό χαλκό (CuSO<sub>4</sub>). Ο θειικός χαλκός, μειώνει ταχύτατα την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης E, στην LDL. (Afanas IB, 1985). Τα λιπαρά οξέα που προσβάλλονται από την επίδραση του θειικού χαλκού είναι κυρίως τα πολυακόρεστα (λινολεϊκό, αραχιδονικό και εικοσαπεντοϊκό), που είναι περισσότερο ευπαθή στην οξείδωση. Η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη, μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή να δρουν σαν παράγοντες χηλικοποίησης, διακόπτοντας έτσι την αλυσίδα του πολλαπλασιασμού των υπεροξειδίων. Μετά από πολλαπλές αναλύσεις, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο, επιδεικνύουν μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, στην οξείδωση της LDL, σε σχέση με το εξευγενισμένο ελαιόλαδο.

➤ **Καρκίνος**

Οι πολυφαινόλες της Μεσογειακής δίαιτας μειώνουν την φλεγμονώδη αγγειογένεση μέσω αναστολής των MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9* – μεταλλοπρωτεΐνασες, μία ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης) και COX-2 (*Cyclooxygenase 2* - Κυκλοοξυγενάση - πρωτεΐνη που η υπερέκφρασή της εμπλέκεται σε ασθένειες), σε ανθρώπινα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα: Έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών ελευρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης από το ελαιόλαδο, της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης από το κόκκινο κρασί, πάνω στην αγγειογόνο απόκριση, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών. Καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προ-επώαστηκαν με 0,1 έως 50 μmol / L πολυφαινολών, πριν από τη διέγερσή τους με οξική μυριστική φορβόλη (PMA). Όλες οι πολυφαινόλες, μείωσαν την εκφύλιση των ενδοθηλίων κυττάρων (ποροειδείς αυλοί).

Η κεντρική ιδέα έχει ως εξής:

- Η μεσογειακή διατροφή συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου.

- Αν η Μεσογειακή δίαιτα εισαχθεί σε χώρες με την τυπική δυτική δίαιτα, ο συνολικός κίνδυνος του καρκίνου θα μπορούσε να μειωθεί κατά 10% και ειδικότερα ο κίνδυνος του ορθοκολικού και άλλων καρκίνων του πεπτικού συστήματος μπορεί να μειωθεί έως και 25%.

- Οι βιολογικοί μηχανισμοί για την πρόληψη του καρκίνου που σχετίζονται με τη μεσογειακή διατροφή έχουν σχέση με μια ισορροπημένη αναλογία των ωμέγα-6 και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και στις υψηλές ποσότητες φυτικών ινών, αντιοξειδωτικών και πολυφαινολών που βρίσκονται στα φρούτα, λαχανικά, ελαιόλαδο και κρασί.

Ήδη, μετά την αναφορά στις παραπάνω μελέτες, φαίνεται η σπουδαιότητα και η πολυδιάστατη δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου. Πρέπει όμως να αναφερθούν και άλλα πεδία της βιοδραστικότητας αυτών που είναι:

- Η προστασία του νευρικού συστήματος.
- Η προώθηση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων.
- Η υγεία του δέρματος.



## 2.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικού εκχυλίσματος τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη τυρογάλακτος και ζελατίνη από απόβλητα ελαιοτριβείου για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους. Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ύστερα από αλληλεπίδραση με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Στο δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η αντιμεταλλαξινογόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών του DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου (ROO•). Ενώ στο τρίτο και τελευταίο στάδιο του πειράματος χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ρόης προσδιοριστικαν δείκτες οξειδωτικού στρες για να εξετάσουμε εάν υπάρχει αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος ,έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

### 3.Υλικά και Μέθοδοι

#### ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από το εργαστήριο Μηχανικών Βιοσυστημάτων με την βοήθεια του επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Πετρωτού του ΤΕΙ Λάρισας του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν καθώς και οι συνθήκες ενθυλάκωσής τους.

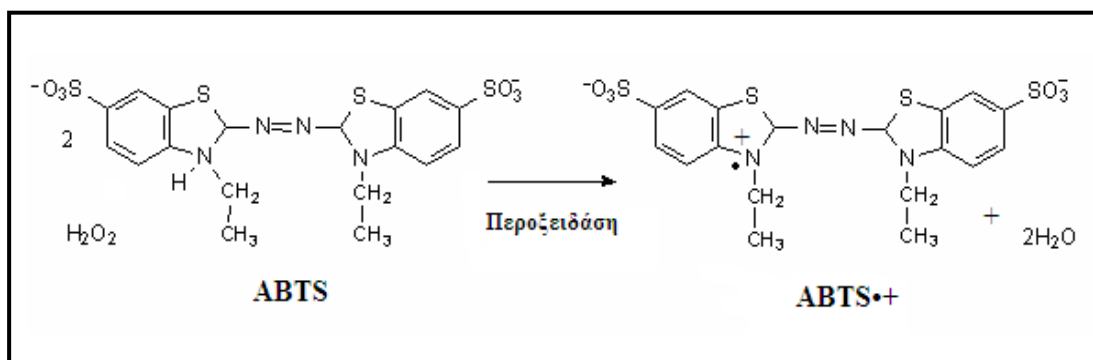
| <u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ</u> |       |                        |                         |               |          |                   |               |               |                    |               |                       |                       |
|--|-------|------------------------|-------------------------|---------------|----------|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|
| ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ                      | ΜΠΛΙΑ | INLET TEMPERATURE (°C) | OUTLET TEMPERATURE (°C) | ASPIRATOR (%) | PUMP (%) | ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ (ml) | TWEEN 80 (ml) | ΠΡΩΤΕΙΝΗ (gr) | ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ (gr) | ΖΕΛΑΤΙΝΗ (gr) | H <sub>2</sub> O (ml) | ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ml) |
| 2                                      | 40    | 120                    | 82                      | 100           | 5        | 37,5              | 12,5          | 25            |                    |               | 175                   | 250                   |
| 9                                      | 60    | 120                    | 76                      | 100           | 5        | 37,5              | 12,5          |               | 25                 |               | 175                   | 250                   |
| 12                                     | 60    | 160                    | 86                      | 100           | 10       | 37,5              | 12,5          |               | 25                 |               | 175                   | 250                   |
| 13                                     | 60    | 140                    | 78                      | 100           | 10       | 37,5              | 12,5          |               | 25                 |               | 175                   | 250                   |
| 14                                     | 60    | 120                    | 67                      | 100           | 10       | 37,5              | 12,5          |               | 25                 |               | 175                   | 250                   |
| 17                                     | 60    | 100                    | 59                      | 100           | 5        | 37,5              |               | 25            |                    | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 18                                     | 60    | 100                    | 61                      | 100           | 5        | 37,5              |               |               | 25                 | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 19                                     | 60    | 120                    | 68                      | 100           | 5        | 37,5              |               |               | 25                 | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 20                                     | 60    | 120                    | 71                      | 100           | 5        | 37,5              |               | 25            |                    | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 21                                     | 60    | 140                    | 80                      | 100           | 5        | 37,5              |               |               | 25                 | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 22                                     | 60    | 140                    | 79                      | 100           | 5        | 37,5              |               | 25            |                    | 5             | 175                   | 242,5                 |
| 24                                     | 60    | 160                    | 96                      | 100           | 5        | 37,5              |               | 25            |                    | 5             | 175                   | 242,5                 |

Πίνακας 3: Πίνακας συνθήκων των πειραμάτων

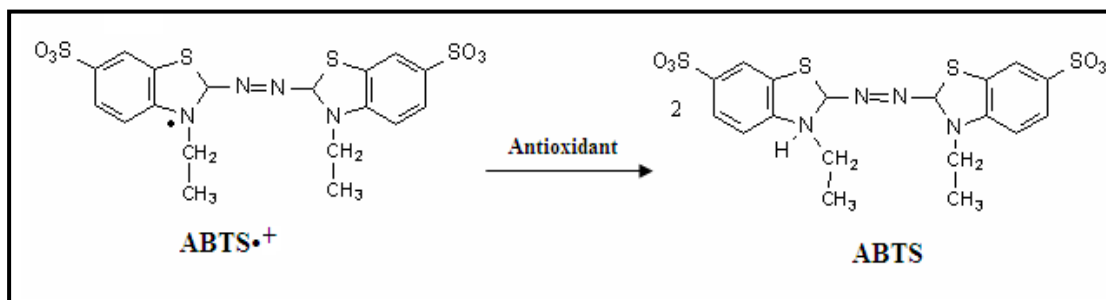
### 3.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

#### Αρχή της Μεθόδου

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<sup>•+</sup>. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), **οξειδώνεται** και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (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.



**Εικόνα 9:** Η Οξείδωση του ABTS σε Δραστική ρίζα.



**Εικόνα 10:** Η Αλληλεπίδραση του Αντιοξειδωτικού με την Ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 19) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).

### **Πειραματική Διαδικασία**

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50,100 μg/ml).

**Διάλυμα ABTS (1mM):** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H<sub>2</sub>O.

**Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM):** Για τελική συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8,8 M αραιώνουμε με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

**Διάλυμα HRP (6 μM):** 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 1000μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml) , σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 11). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 13).

|                               | Τυφλό  | Control | C1     | C2     | C3     | C4    | C5    |
|-------------------------------|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| H <sub>2</sub> O              | 450 μL | 400 μL  | 400 μL | 400 μL | 400 μL | 400μl | 400μl |
| ABTS                          | 500 μL | 500 μL  | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500μl | 500μl |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 50 μL  | 50 μL   | 50 μL  | 50 μL  | 50 μL  | 50μl  | 50μl  |
| HRP                           | -      | 50 μL   | 50 μL  | 50 μL  | 50 μL  | 50ml  | 50ml  |
| V τελ                         | 1 mL   | 1 mL    | 1 mL   | 1 mL   | 1mL    | 1mL   | 1mL   |
| <b>Επώαση 45 min</b>          |        |         |        |        |        |       |       |

**Πίνακας 5:** Η Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων.

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

**Πίνακας 6:** Έλεγχος Απορρόφησης Εξεταζόμενης Συγκέντρωσης , Χωρίς την Προσθήκη του Ενζύμου.

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).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup> που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman.

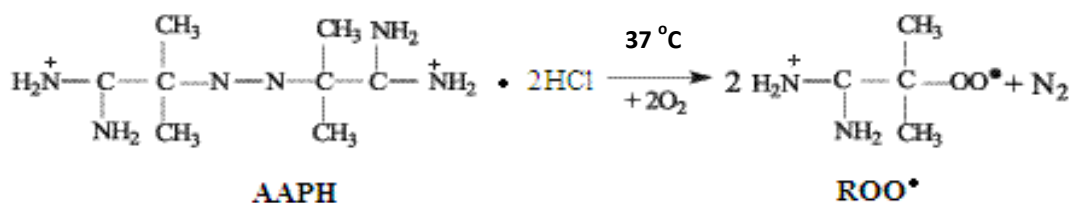
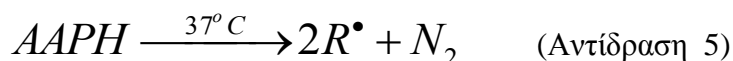
Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS<sup>•+</sup> κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή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

### 3.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001). Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO• χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO• (Αντιδράσεις 5,6)(Εικόνα 20).



**Εικόνα 12:** Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

Οι ρίζες ROO<sup>•</sup> έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO<sup>•</sup>.

### ***Πειραματική διαδικασία***

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 g αгарόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.
- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.



Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 13. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex ) (Εικόνα 21)

|                  | PBS  | Αντιοξειδωτικός παράγοντας | DNA plasmid | AAPH |
|------------------|------|----------------------------|-------------|------|
| Control (-)      | 8 μl | -                          | 2μl         | -    |
| AAPH 15mM (+)    | 4 μl | -                          | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (4 μg/ml)   | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (8 μg/ml)   | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (16 μg/ml)  | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (32 μg/ml)  | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (64 μg/ml)  | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (128 μg/ml) | 1 μl | 3μl                        | 2μl         | 4μl  |
| Εκχ. (128 μg/ml) | 5 μl | 3μl                        | 2μl         | -    |

**Πίνακας 7:** Ποσότητες αντιδραστηρίων.

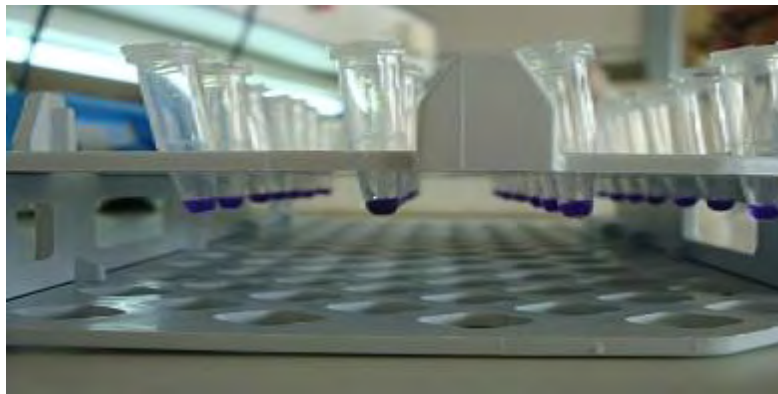


**Εικόνα 13:** Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

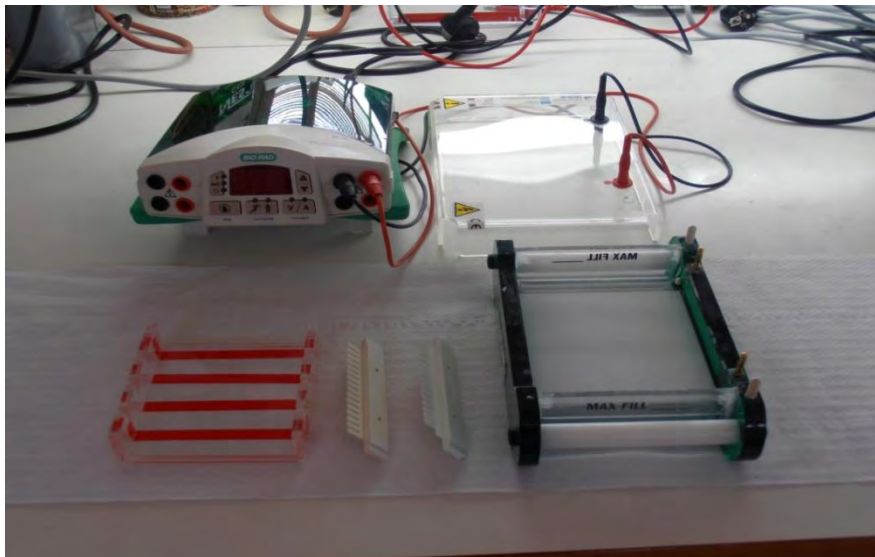
Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 22) και ακολούθουσε

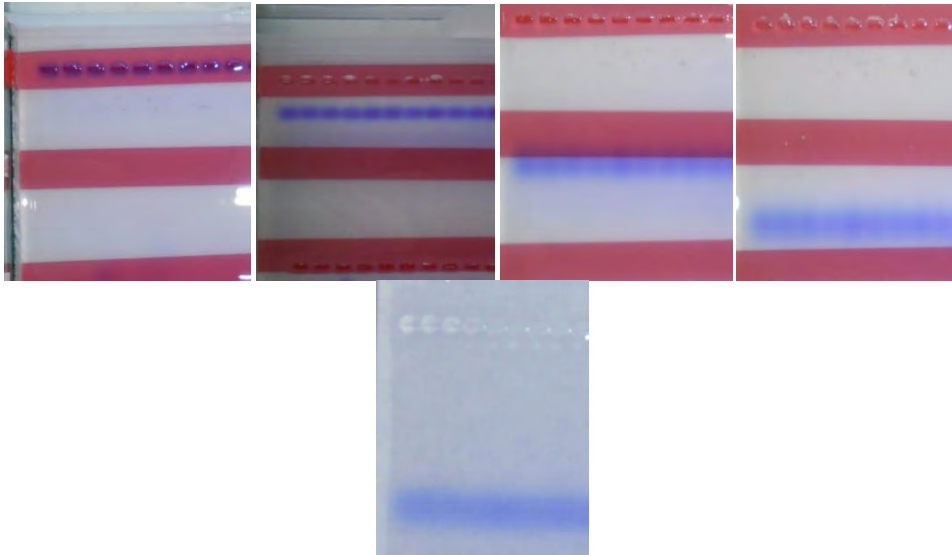
ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min (Εικόνες 23 και 24). Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech (Εικόνα 25). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.



**Εικόνα 14:** Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης



**Εικόνα 15:** Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 16:** Διαδικασία ηλεκτροφόρησης, στάδια απομάκρυνσης χρωματισμένων ζωνών.



**Εικόνα 17:** Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών  $\text{ROO}^\bullet$ , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

$S_{\text{control}}$  το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

$S_0$  το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και

$S$  το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή ( $\bar{x}$ ) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα.

### 3.3 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων παραθέτονται παρακάτω και είναι τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)
- Τρυψίνη
- PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)

Ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας, παρασκευάζουμε διαλύματα με ή χωρίς FBS. Μάλιστα στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιέχει FBS, τότε η περιεκτικότητα αυτού ανέρχεται στο 10%. Το θρεπτικό μέσο με 10% FBS, χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, το θρεπτικό χωρίς FBS χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος όπου τοποθετούμε το εκχύλισμα στα κύτταρα. Αναλυτικότερα λοιπόν, οι αναλυτικές συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

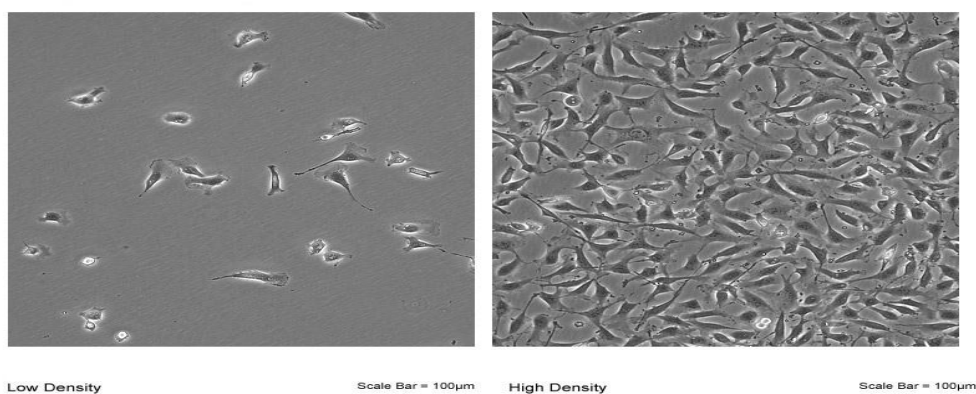
| Θρεπτικό μέσο με 10% FBS | Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS |
|--------------------------|-------------------------|
| 20 mL FBS                |                         |
| 2 mL anti-anti           | 2 mL anti-anti          |
| 2 mL glutamine           | 2 mL glutamine          |
| 200ml DMEM41966          | 200ml DMEM41966         |

Για την μέτρηση της GSH με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιούμε τα εξής αντιδραστήρια:

- Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- FACS Clean (Becton-Dickinson)
- FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- Απεσταγμένο νερό

### 3.3.1 Κυτταρική σειρά EA.hy 926

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τύπου EA.hy 926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549). Η αθανοτοποιημένη κυτταρική σειρά που προέκυψε διαθέτει πολλές αγγειακές, ενδοθηλιακές ιδιότητες και επίσης η κυτταρική αυτή σειρά μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Ακόμη, διαθέτει ένα μοναδικό δείκτη χρωμοσωμάτων που βοηθά στην εύκολη ταυτοποίηση τους. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν αυτή την κυτταρική σειρά ως πρότυπο για τη μελέτη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου [Edgell et al., 1983].



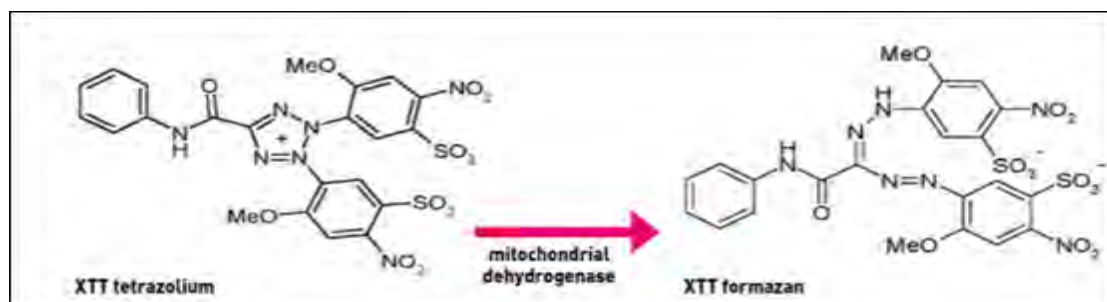
**Εικόνα 18** : Κύτταρα Ea.hy 926 σε οπτικό μικροσκόπιο

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100µg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO<sub>2</sub> 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα, ώστε να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1000 µL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

### 3.3.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης με τη μέθοδο XTT.

#### Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της πρωτεΐνης του τυρογάλακτος στους μυοβλάστες χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



**Εικόνα 19:** Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

#### Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γινόταν επίστρωση 10000 κυττάρων/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37<sup>0</sup>C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του τριβλίου της καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό

αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης τυρογάλακτος ή του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, επωάζονταν για 24 ώρες. Τα κύτταρα στα οποία προσθέσαμε τον οξειδωτικό παράγοντα επώαστηκαν για 1 ώρα. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της πρωτεΐνης έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξετάζοταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της πρωτεΐνης στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων EA.hy 926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$



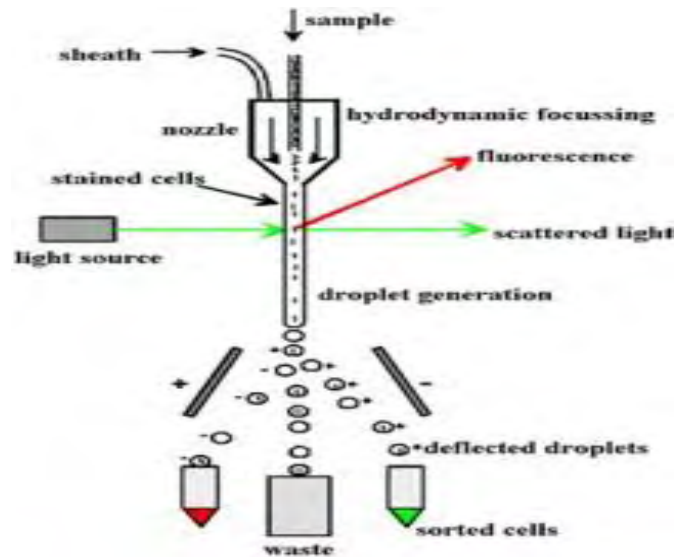
**Εικόνα 20:** α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer, β) 96-well plate.



### 3.3.3 Κυτταρομετρία Ροής

#### *Αρχή Μεθόδου*

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



**Εικόνα 21:** Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών

χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



***Εικόνα 22:*** Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

### ***3.3.4 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών***

#### ***Πειραματική διαδικασία***

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150  $\mu\text{L}$  PBS και 15  $\mu\text{L}$  χρωστικής mercury orange ή 15  $\mu\text{L}$  χρωστικής DCF για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5%  $\text{CO}_2$ . Έπειτα, ξεπλένουμε με 250  $\mu\text{L}$  PBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250  $\mu\text{L}$  PBS και προχωράμε στην ανάλυση. Για τον προσδιορισμό του συνολικού επιπέδου των ROS στα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούμε τη χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Η DCFDA μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον

προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Η DCF είναι μια φθορίζουσα χρωστική (excitation 495nm, emission 529nm) που μπορεί να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής. Άρα, από τα επίπεδα της DCF υπολογίζονται τα επίπεδα των ROS: όσο μεγαλύτερη η τιμή της DCF, τόσο περισσότερες οι ROS

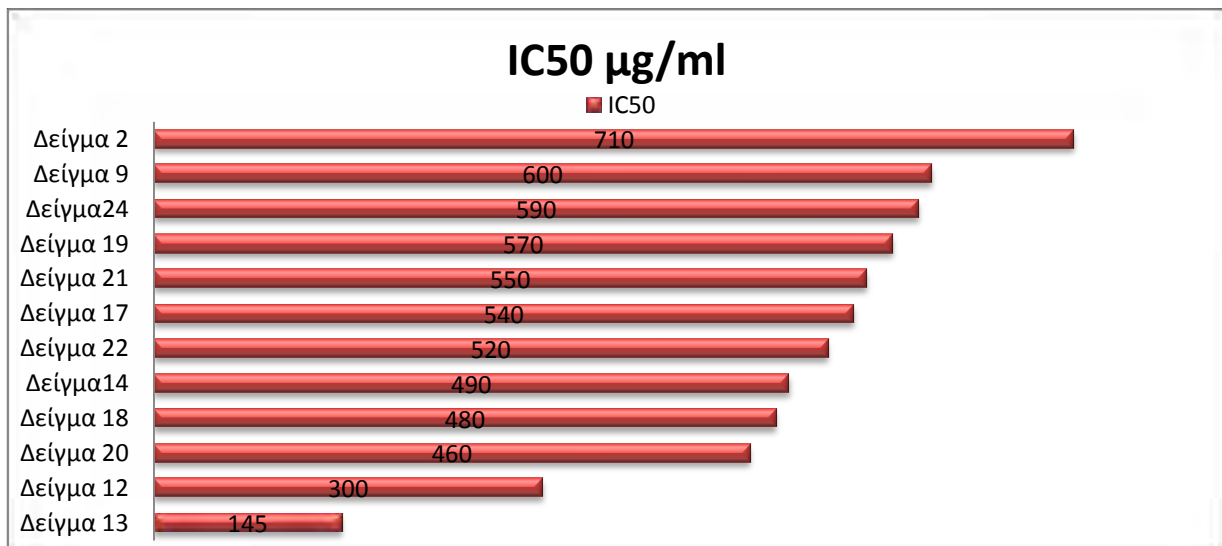
Σημείωση: Η χρωστική που χρησιμοποιείται για την γλουταθειόνη ονομάζεται orange mercury (Hg) και διαλύεται σε ακετόνη, η οποία τον μετατρέπει σε πιο τοξική μορφή για αυτό και χρειάζεται προσοχή στην επαφή με το διάλυμα. Επίσης, να αναφερθεί ότι η χρωστική εκπέμπει στο FL-2.

#### 4. Αποτελέσματα Μετρήσεων

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

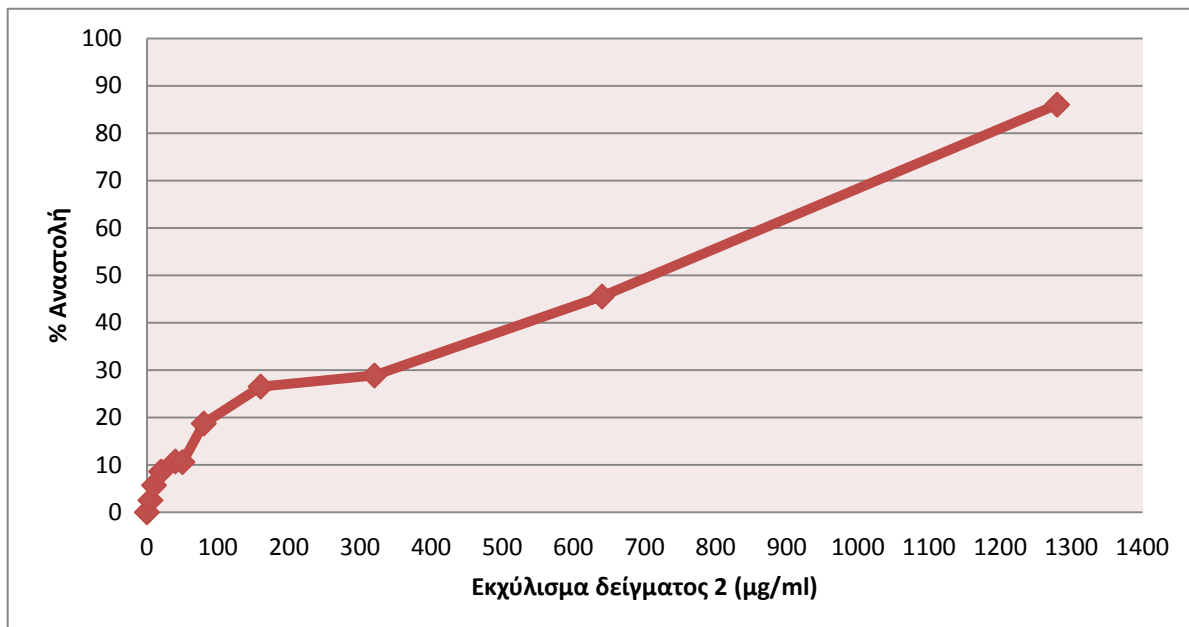
Συνολικά μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα δειγμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε διαφορετικές συνθήκες με Ζελατίνη, Μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Τα δείγματα 2, 9, 14, 18, 20, 21, 22 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280  $\mu\text{g/ml}$ . Τα δείγματα 12 και 13 εξετάστηκαν σε ευρός συγκεντρώσεων 5, 10, 50, 100, 300, 600 $\mu\text{g/ml}$  ενώ τα δείγματα 17, 19 και 24 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 $\mu\text{g/ml}$ .

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 145  $\mu\text{g/ml}$  έως 710  $\mu\text{g/ml}$ . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 13 (με IC<sub>50</sub> ίσο με 145  $\mu\text{g/ml}$  ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 2 με IC<sub>50</sub> ίσο με 710  $\mu\text{g/ml}$ . Στο παρακάτω γράφημα (απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> και των 12 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος

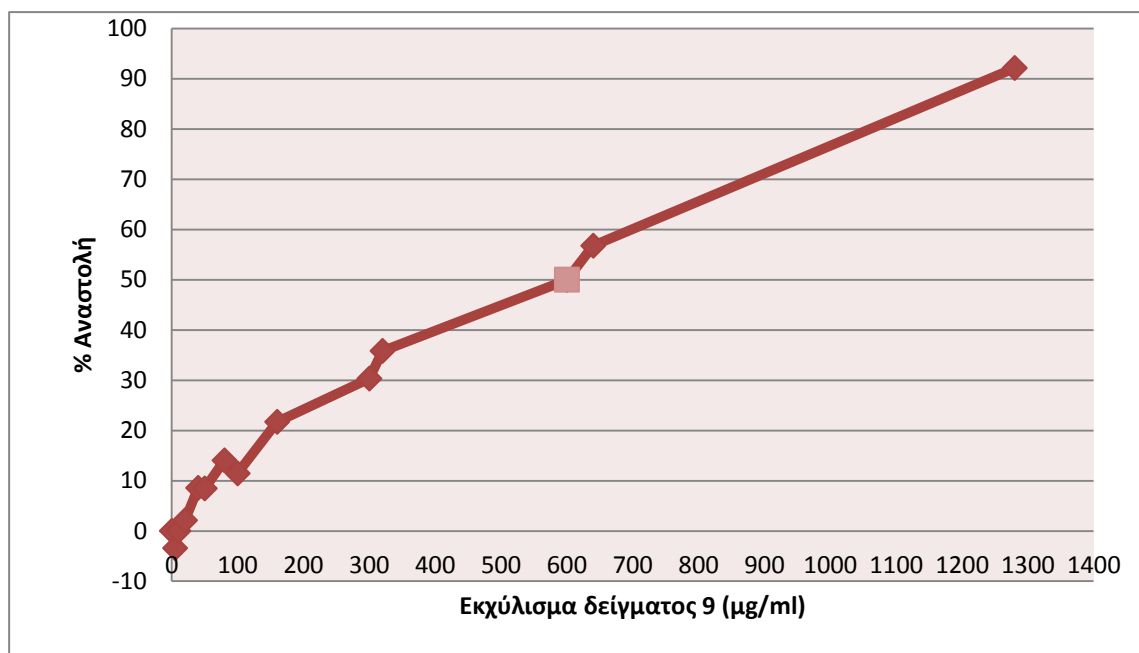


**Γράφημα 1:** Γραφική απεικόνιση τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων δειγμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>.

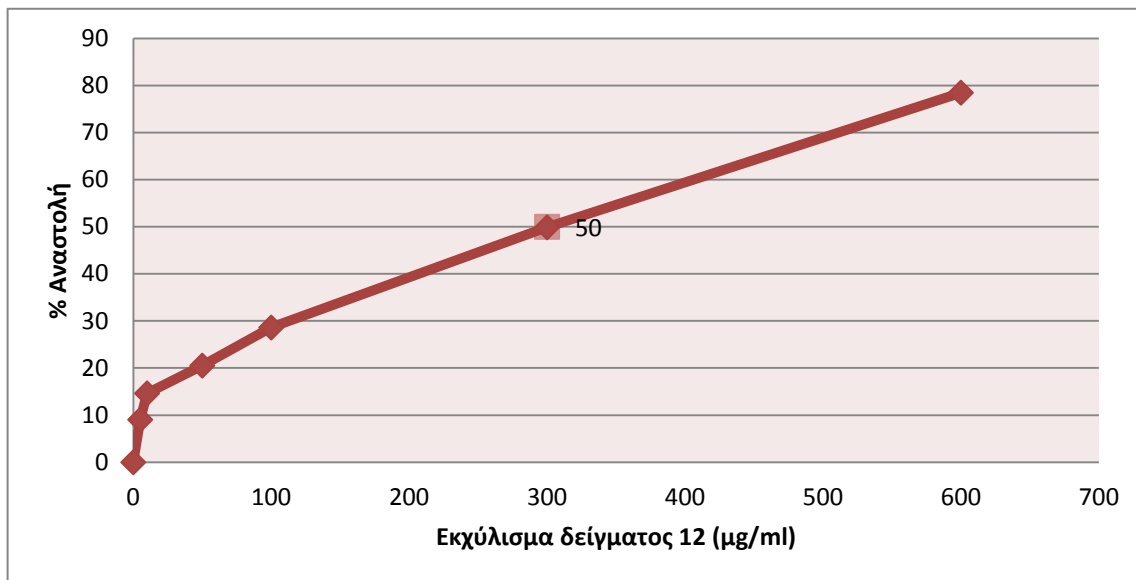
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα με κωδικούς 2, 9, 12, 13, 14, 17, 18,19, 20, 21, 22 και 24. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 730nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



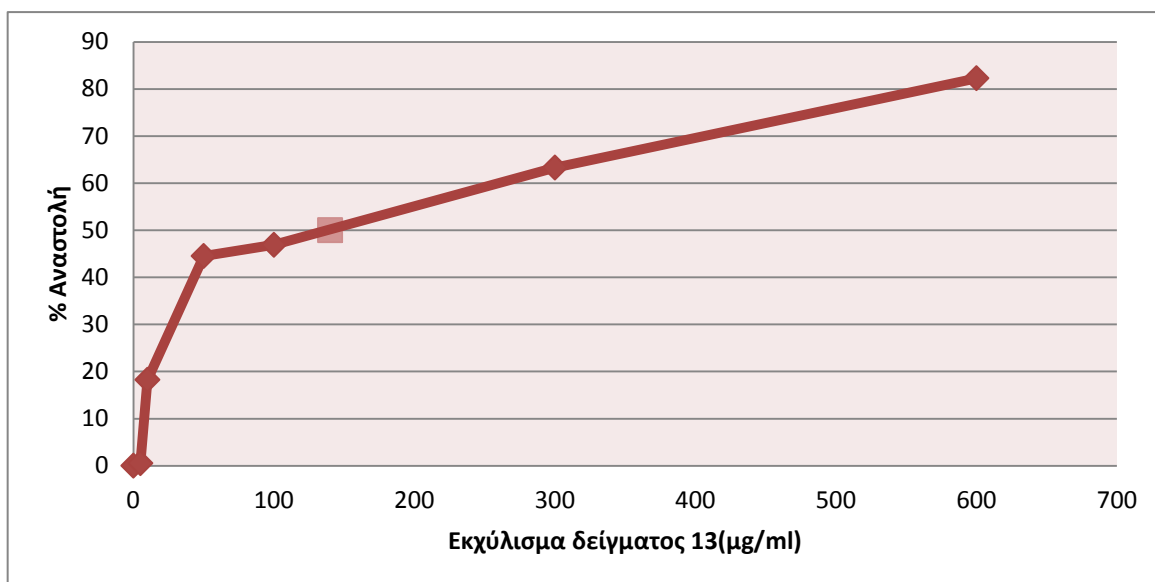
**Γράφημα 2:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 2



**Γράφημα 3:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 9

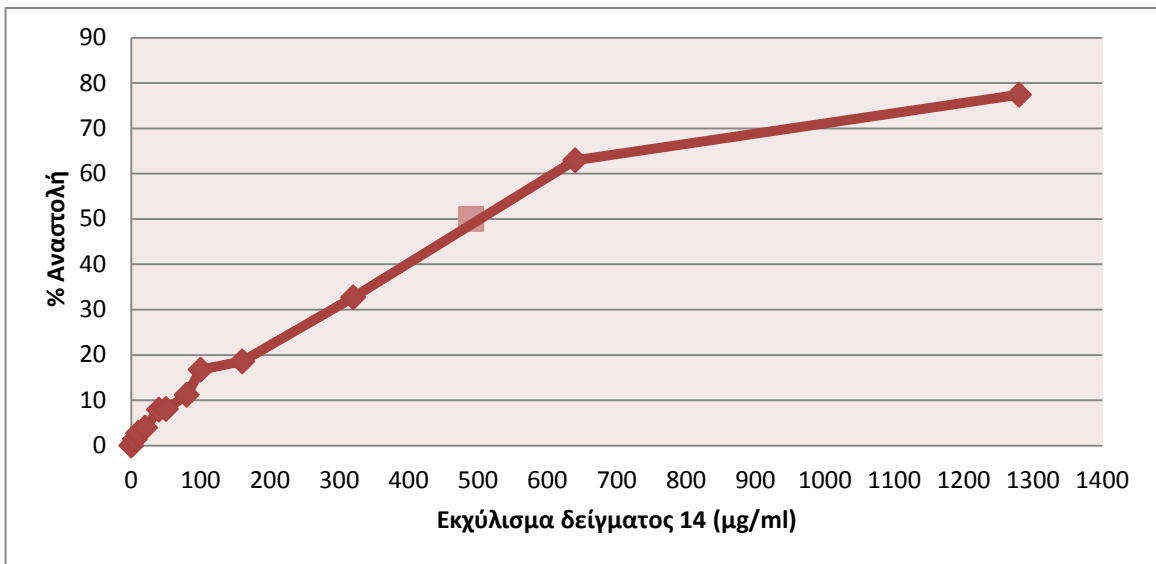


**Γράφημα 3:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{++}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 12

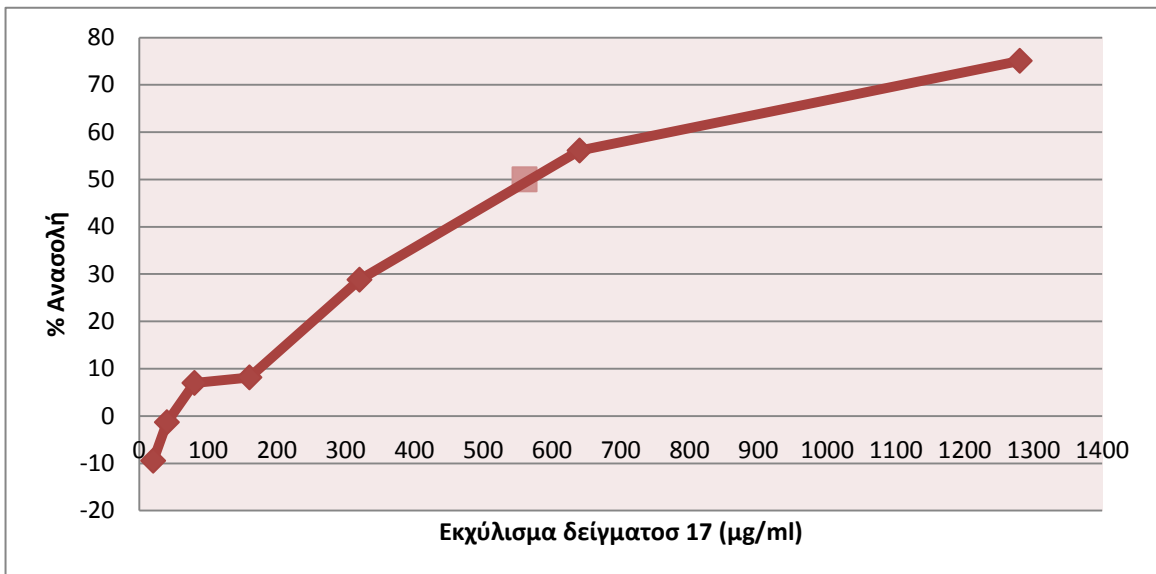


**Γράφημα 4:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{++}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 13

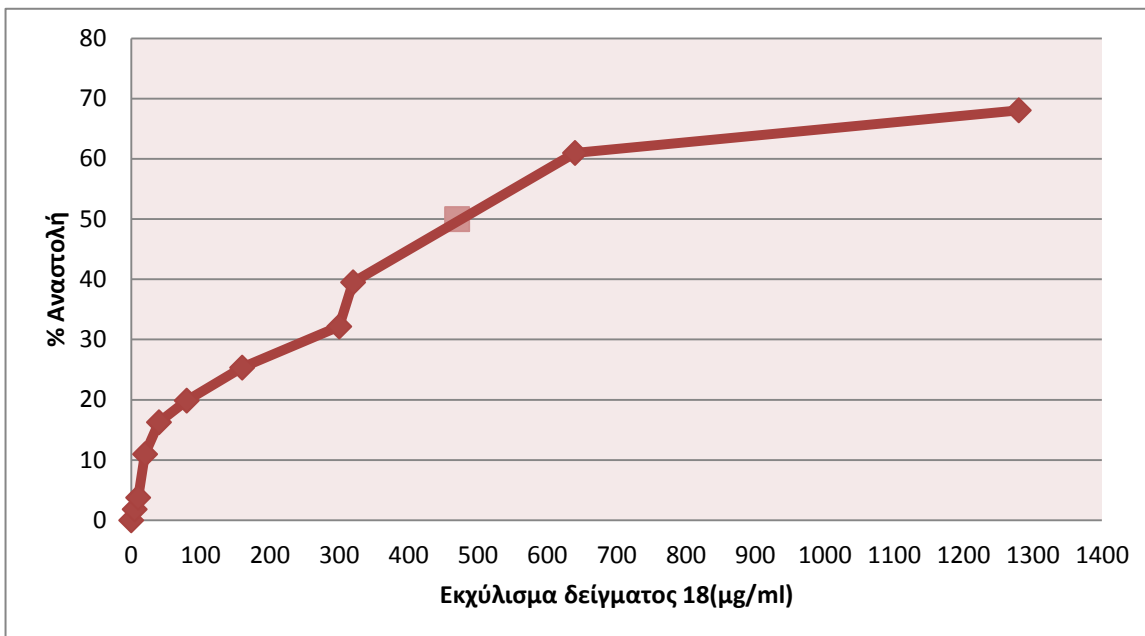




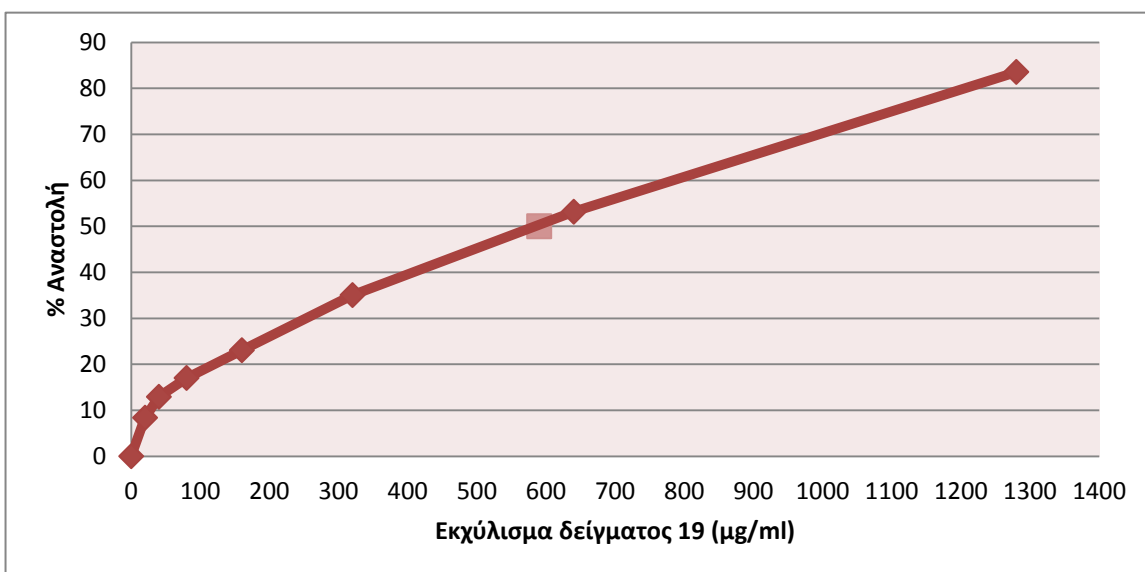
*Γράφημα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 14*



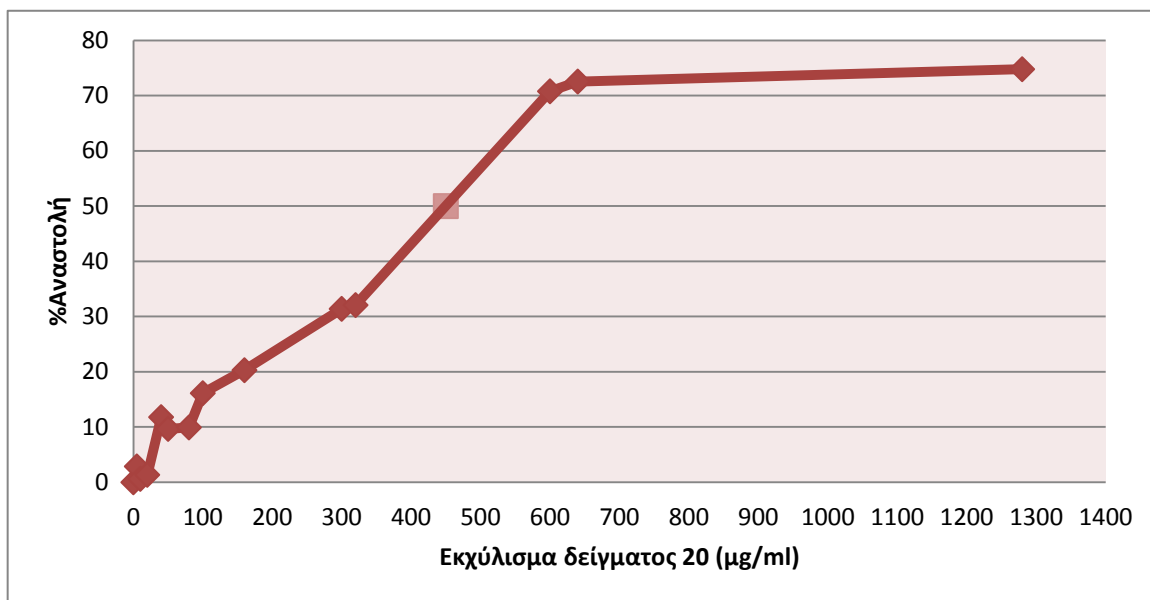
*Γράφημα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 17*



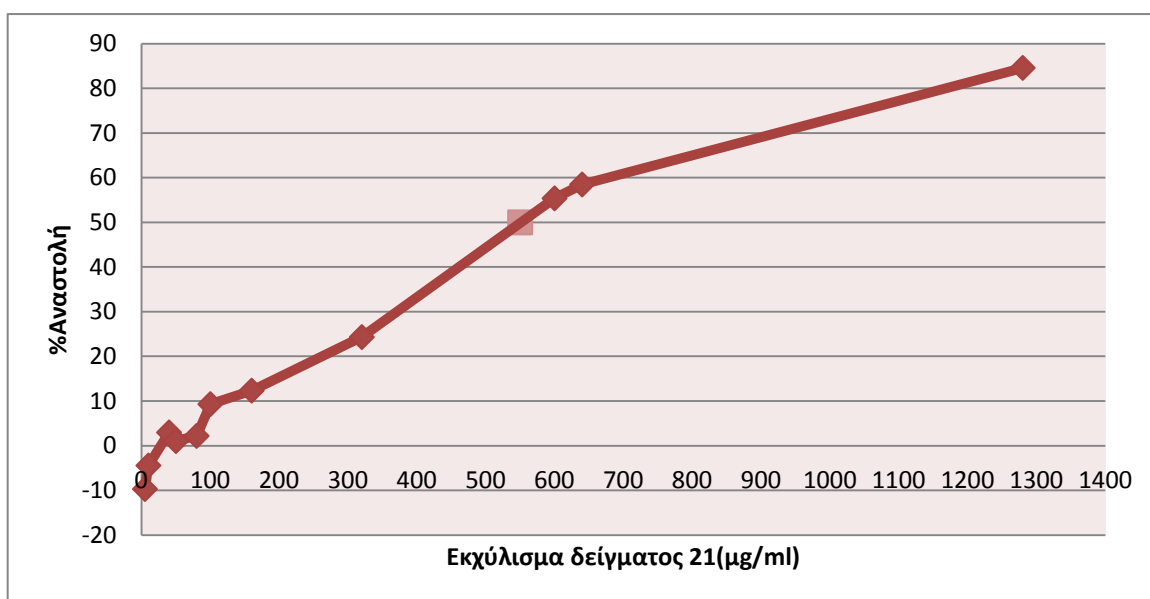
**Γράφημα 7:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{*+}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 18



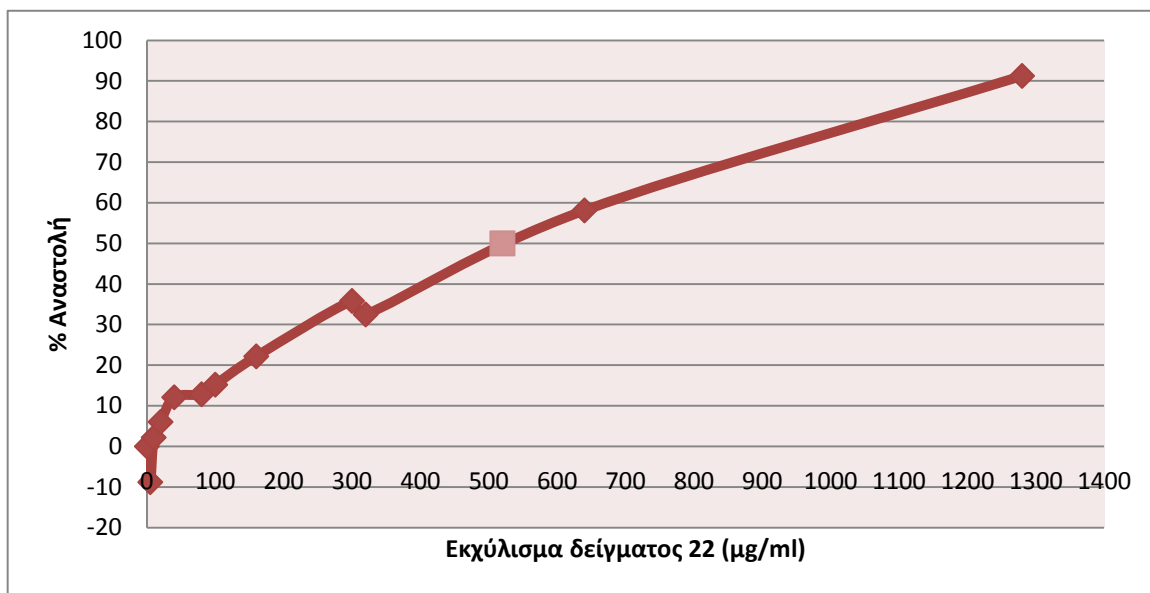
**Γράφημα 8:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{*+}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 19



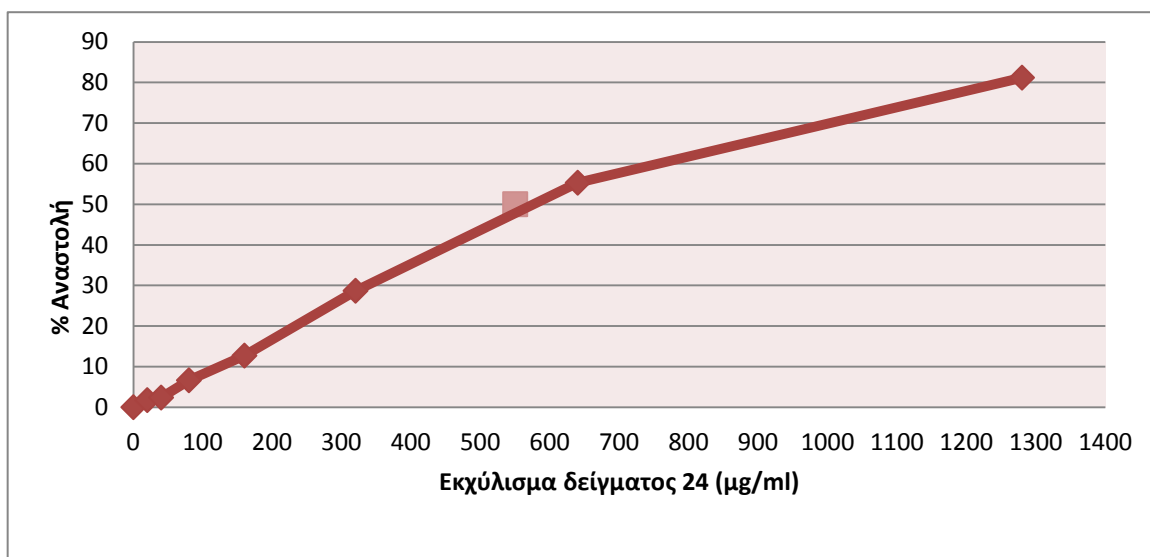
**Γράφημα 9:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{+\bullet}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 20



**Γράφημα 10:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $ABTS^{+\bullet}$  από το εκχύλισμα του Δείγματος 21



**Γράφημα 11:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 22

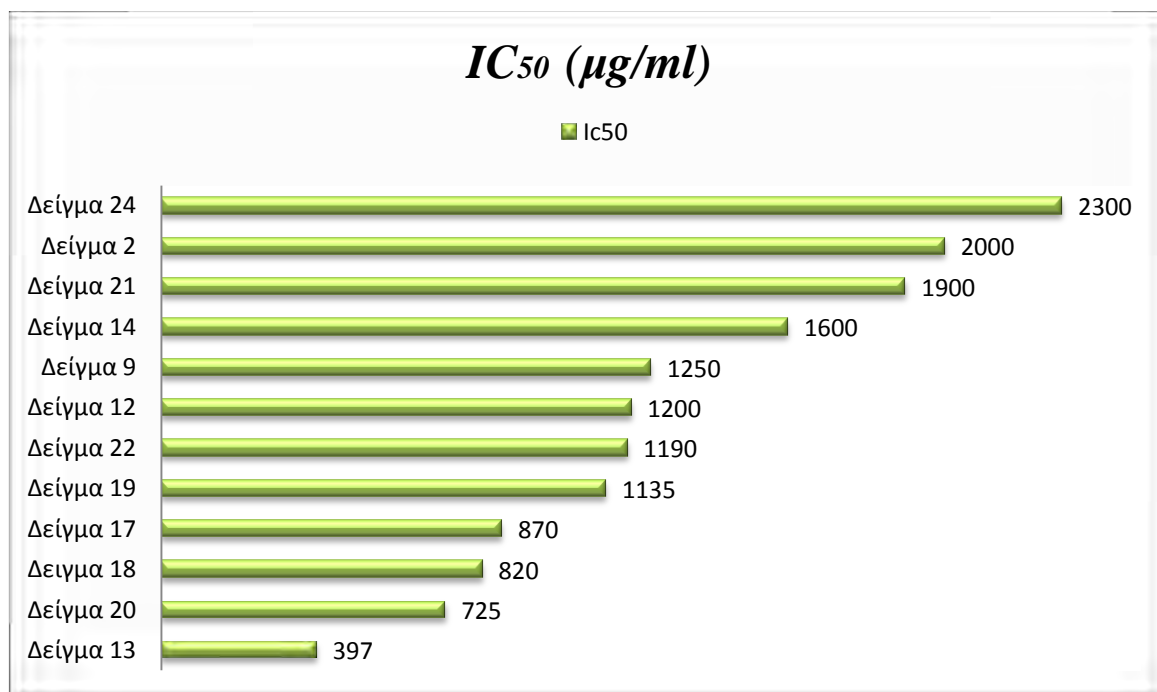


**Γράφημα 12:** Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>+</sup> από το εκχύλισμα του Δείγματος 24

#### 4.2 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

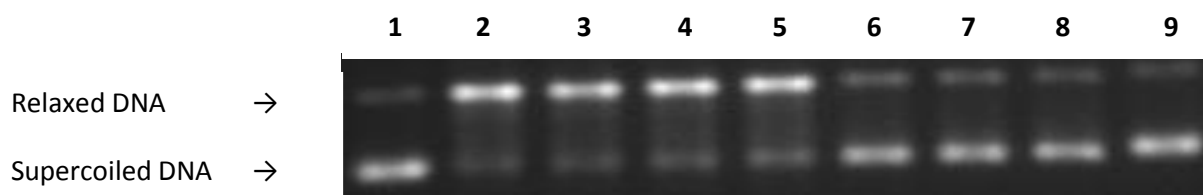
Συνολικά μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα από απόβλητα ελαιοτριβείου ενθυλακωμένα σε ζελατίνη, μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε διαφορετικές συνθήκες. Τα δείγματα 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20 και 21 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800 και 1600μg/ml ενώ τα δείγματα 2, 22 και 24 εξετάστηκαν και στη συγκέντρωση των 3200μg/ml.

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 397 μg/ml έως 2300 μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 13 με IC<sub>50</sub> ίσο με 397 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος με IC<sub>50</sub> ίσο με 2300 μg/ml. Στο παρακάτω γράφημα ( απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> και των 12 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα AAPH<sup>•+</sup> Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος



**Γράφημα 13:** Γραφική απεικόνιση τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων δειγμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα AAPH<sup>•+</sup>.

Στην Εικόνα 23 δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



**Εικόνα 23:** Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 50 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 100 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 200 µg/ml εκχυλίσματος

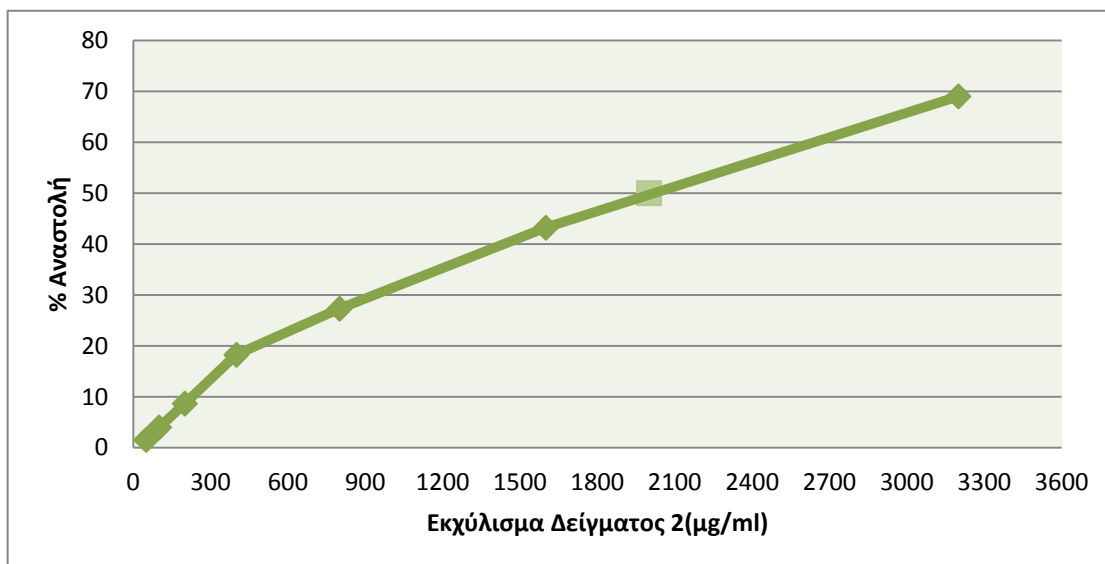
Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 400 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 800 µg/ml εκχυλίσματος

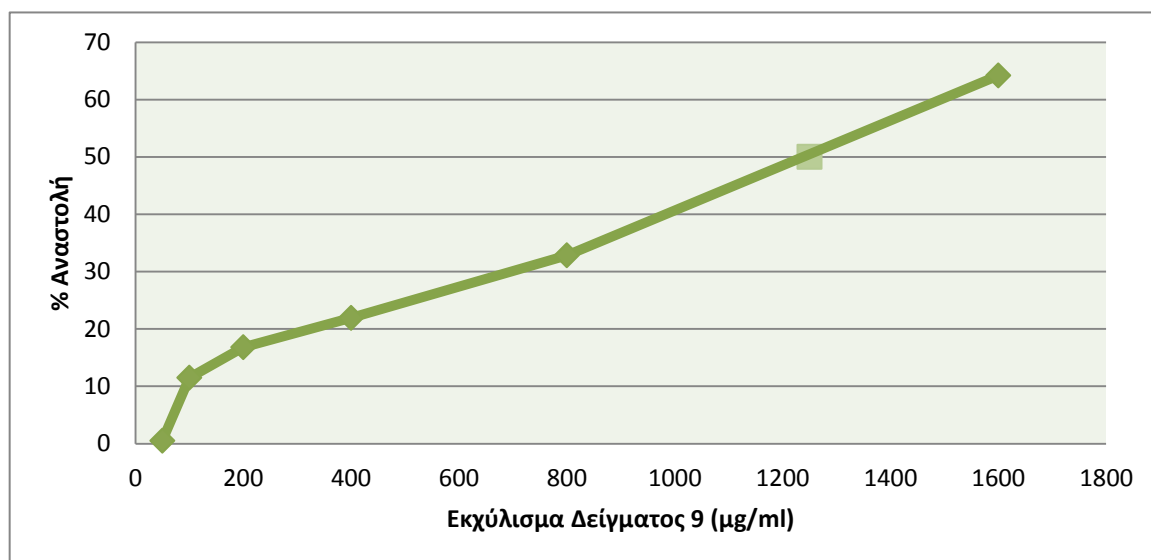
Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 1600 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + 1600 µg/ml εκχυλίσματος

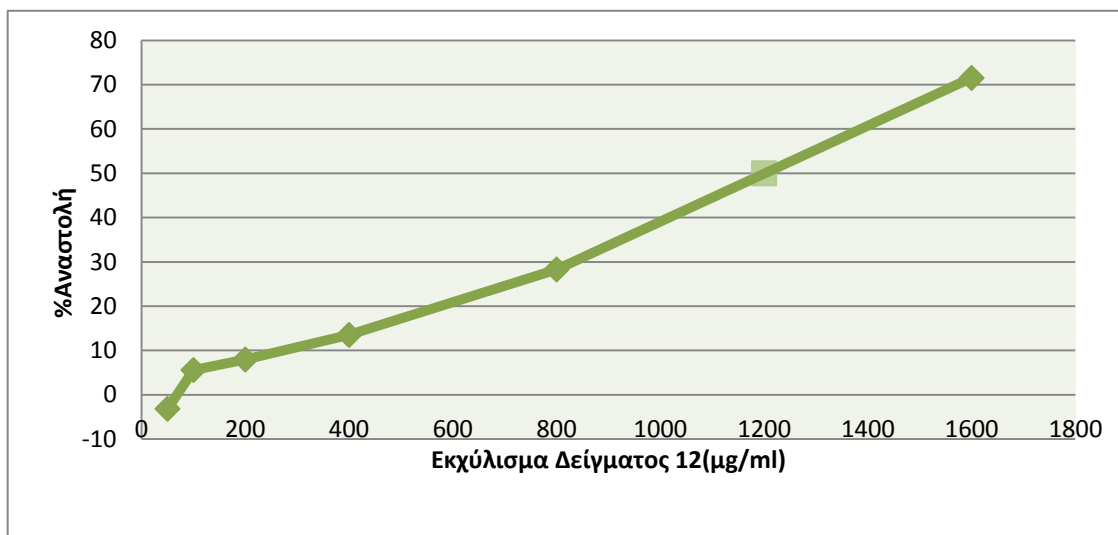
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας AAPH<sup>•+</sup> από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα με κωδικούς 2, 9, 12, 13, 14, 17, 18,19, 20, 21, 22 και 24.



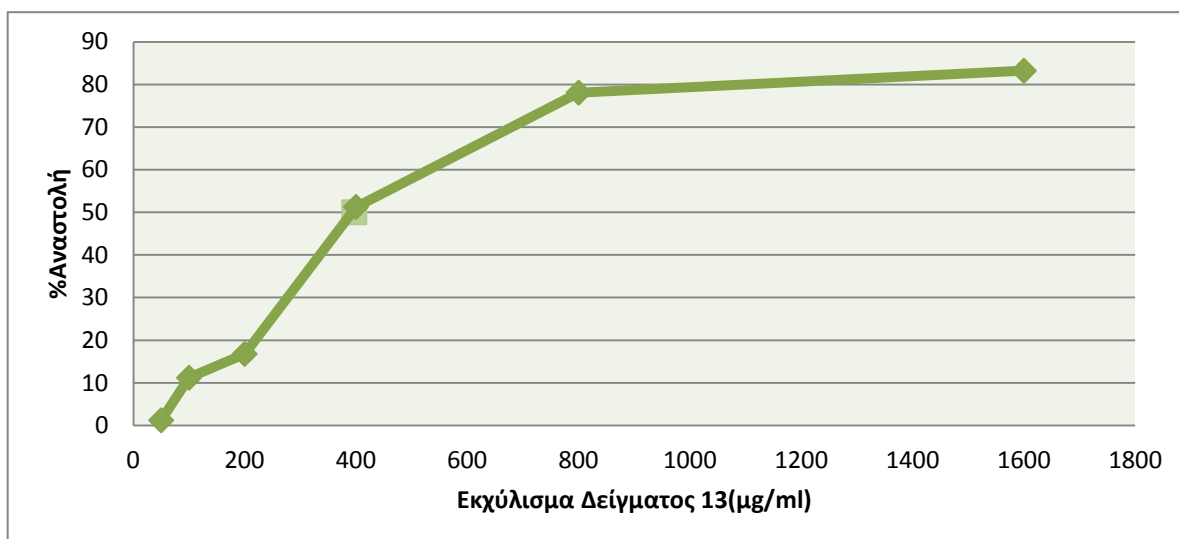
**Γράφημα 14 :** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 2, στις επαγόμενες από ρίζες  $ROO^*$  ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών  $ROO^*$ .



**Γράφημα 15 :** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 9, στις επαγόμενες από ρίζες  $ROO^*$  ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών  $ROO^*$ .

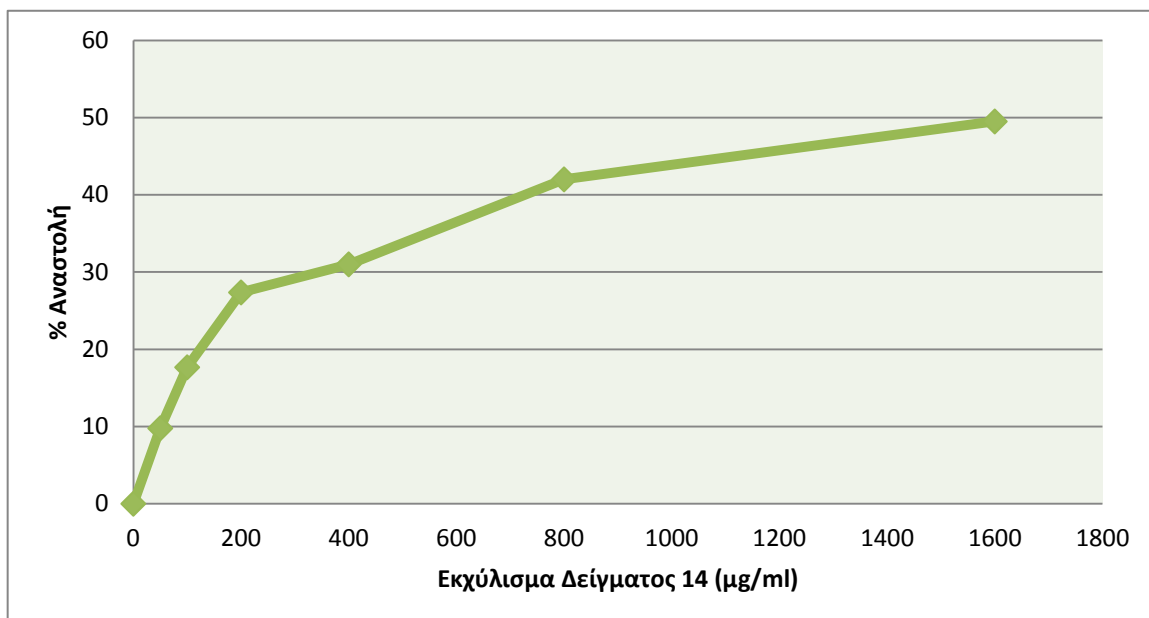


*Γράφημα 16: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 12 , στις επαγόμενες από ρίζες ROO\* ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO\* .*

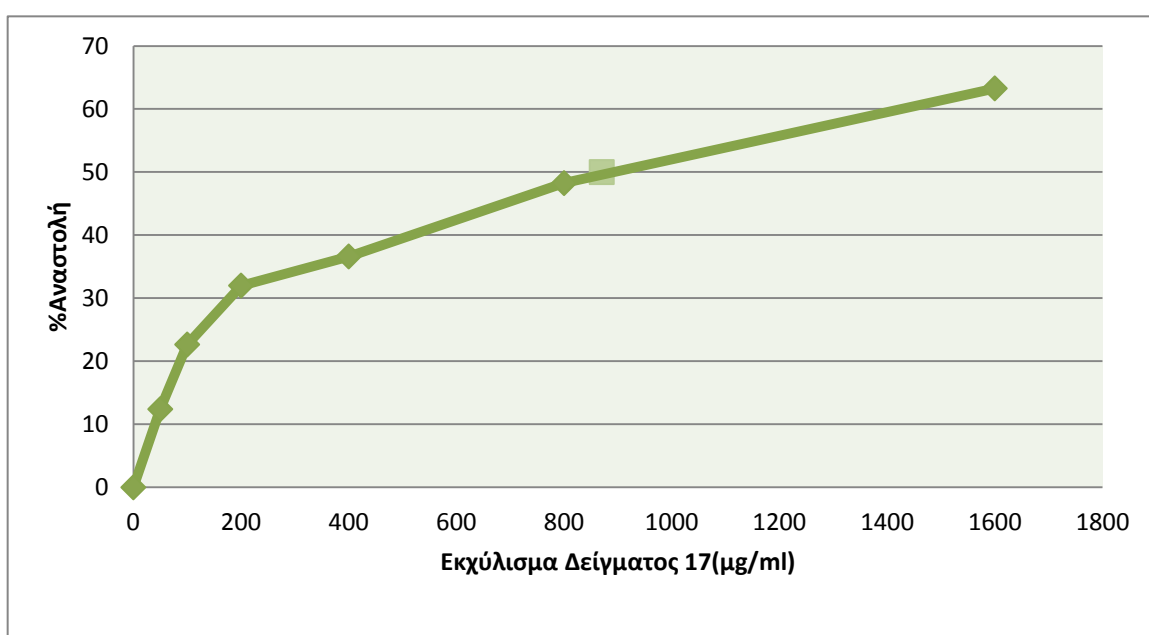


*Γράφημα 17: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 13 , στις επαγόμενες από ρίζες ROO\* ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO\* .*

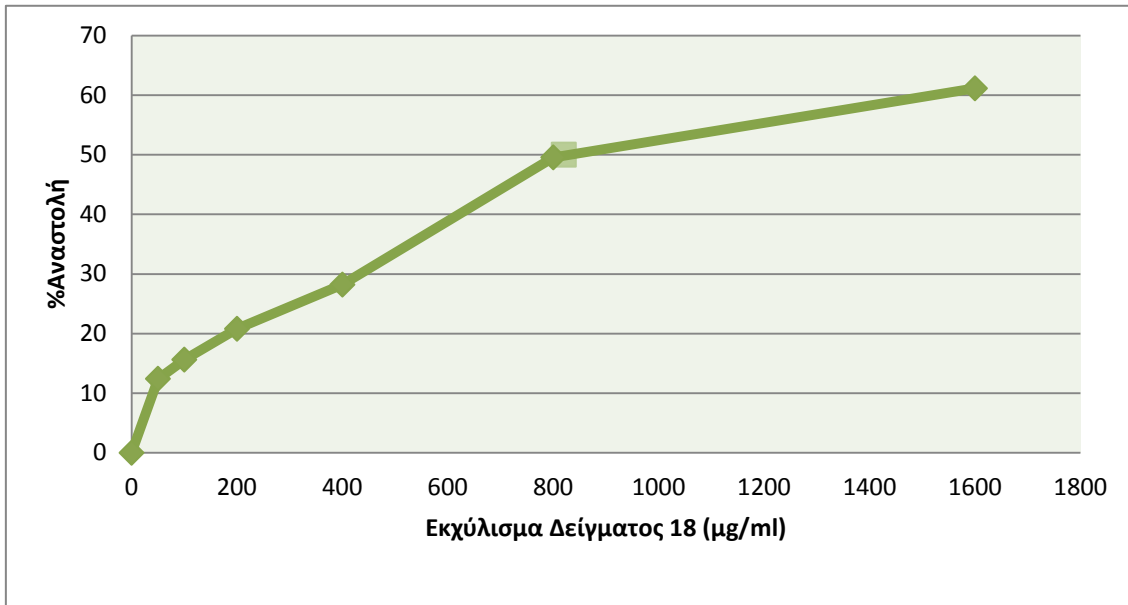




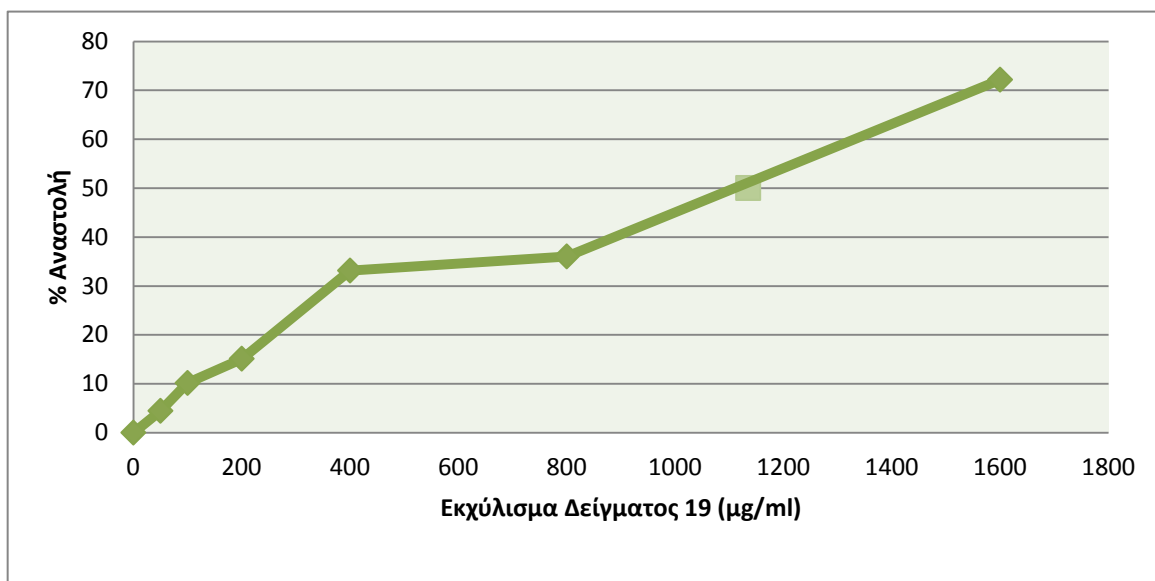
*Γράφημα 18: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 14 , στις επαγόμενες από ρίζες  $ROO^{\bullet}$  ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών  $ROO^{\bullet}$  .*



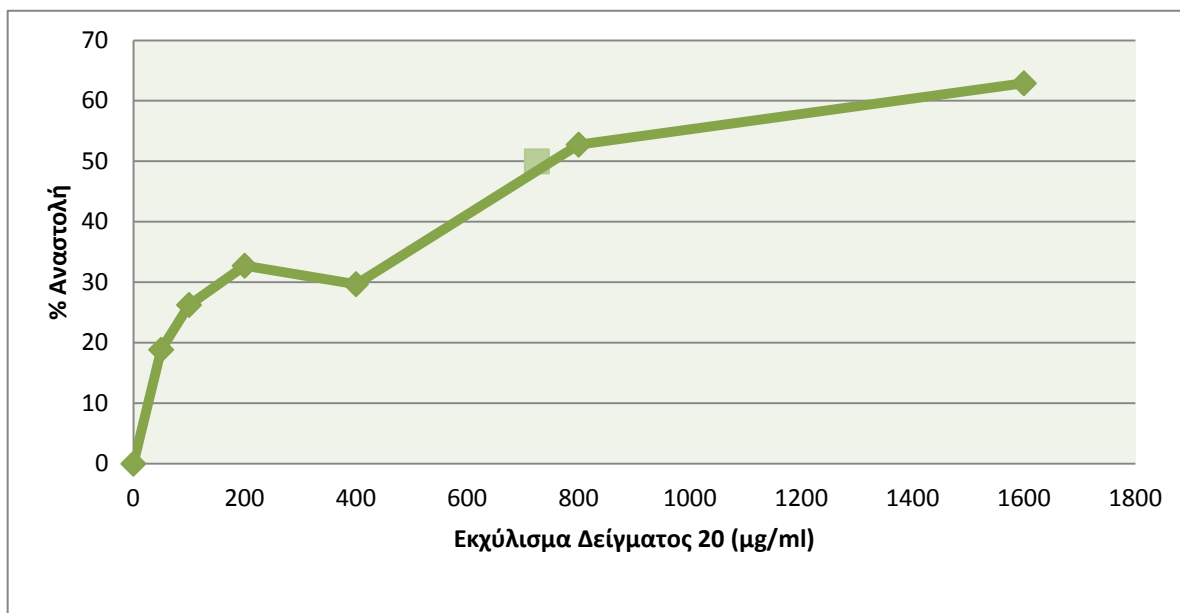
*Γράφημα 19: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 17 , στις επαγόμενες από ρίζες  $ROO^{\bullet}$  ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών  $ROO^{\bullet}$  .*



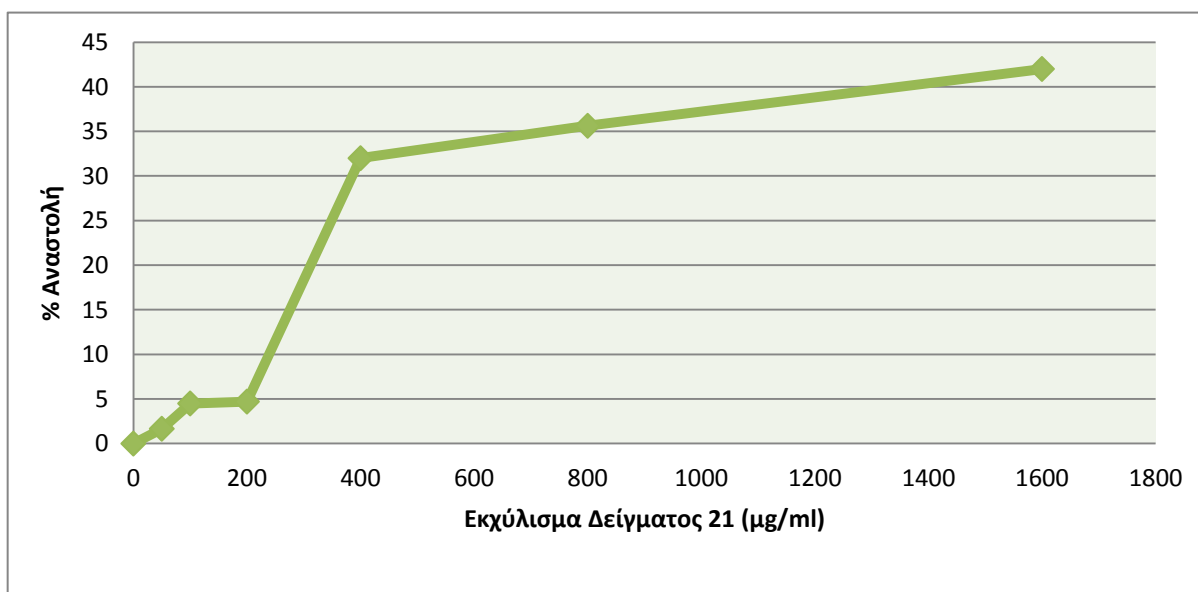
*Γράφημα 20: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 18, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO*



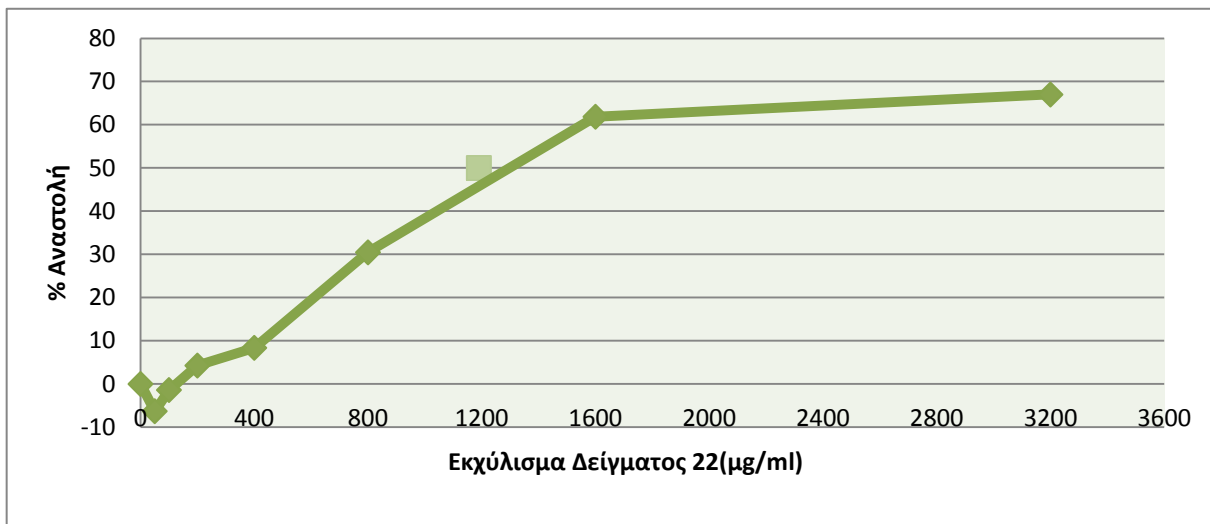
*Γράφημα 21: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 19, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO*



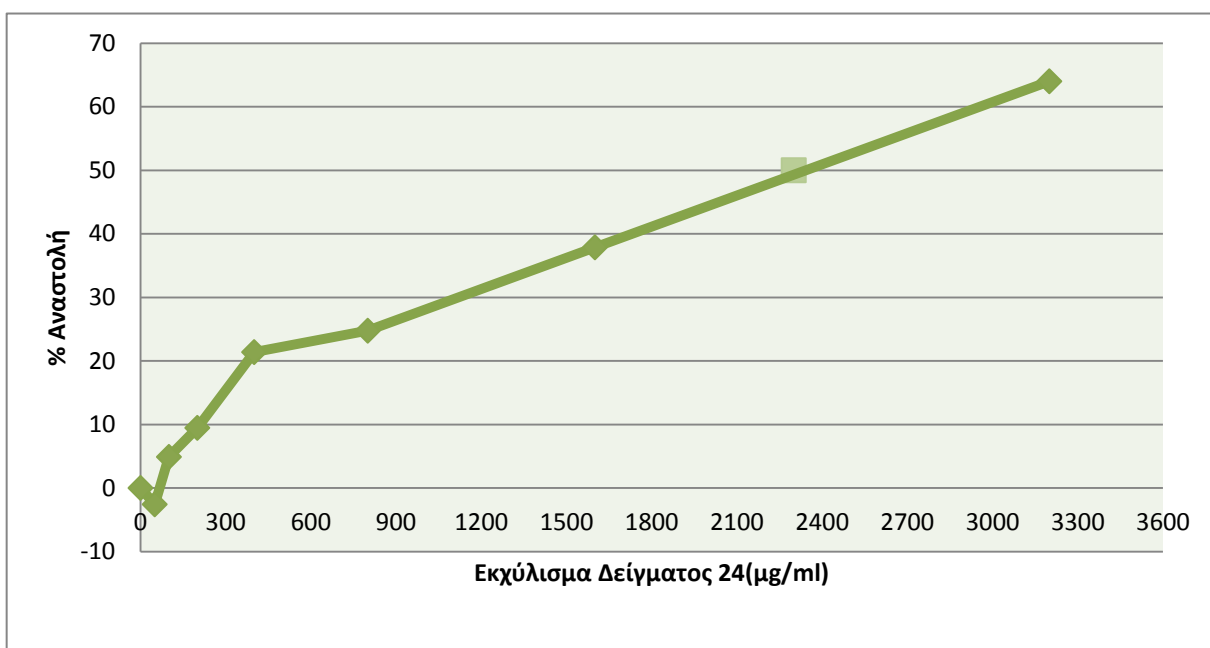
**Γράφημα 22:** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 20, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO



**Γράφημα 23:** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 21, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO



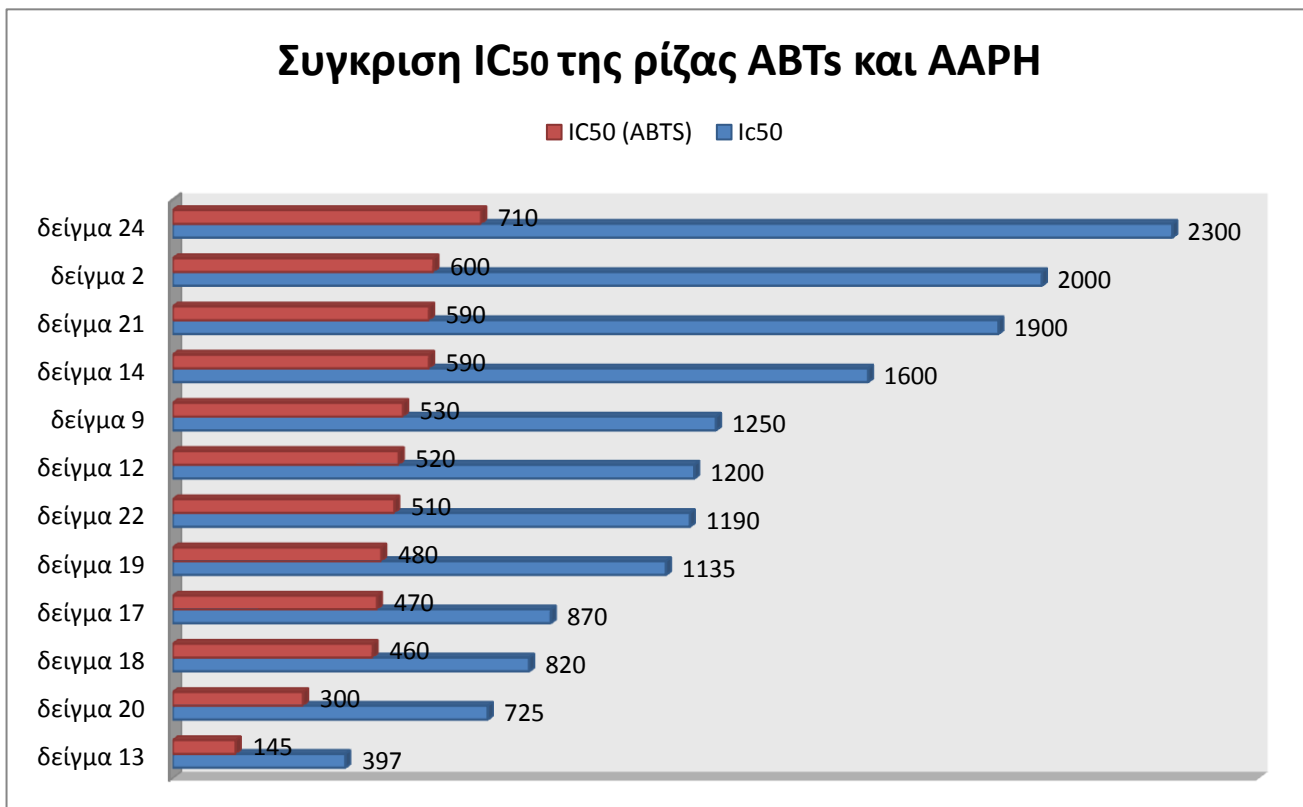
**Γράφημα 24:** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 22, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO



**Γράφημα 25:** Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 24, στις επαγόμενες από ρίζες ROO ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO

### 4.3 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το Γράφημα διαπιστώνουμε, ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις.

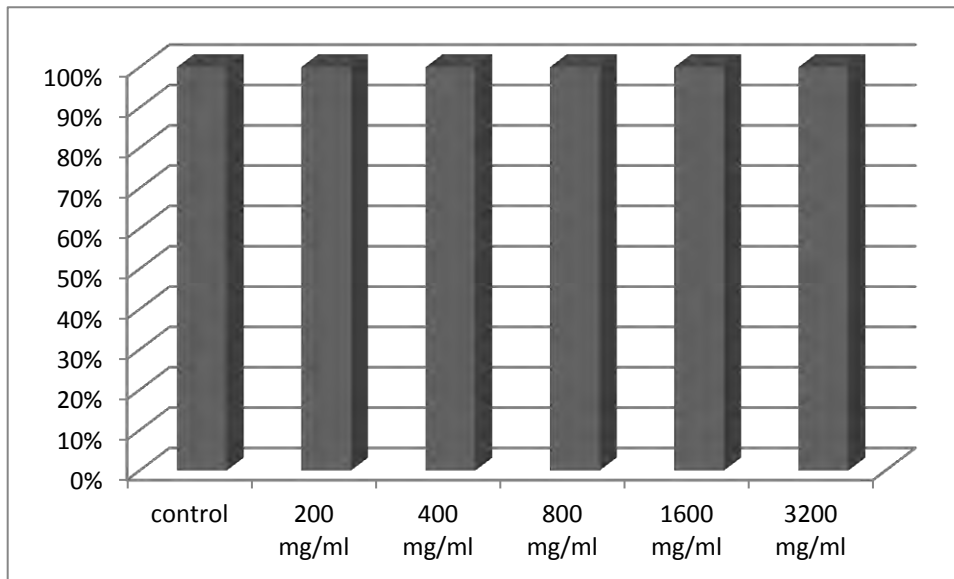


**Γράφημα 26:** Απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους.

Παρατηρείται ότι και στις δυο μεθόδους το δείγμα από το εκχύλισμα το οποίο είχε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι το Δείγμα 13 ενώ τα δείγματα με την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση είναι τα Δείγματα 2 και 24.

#### **4.4 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο του XTT.**

Μελετήθηκε το εκχύλισμα το οποίο παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και παρατηρήθηκε ότι δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά EA.hy926 στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.



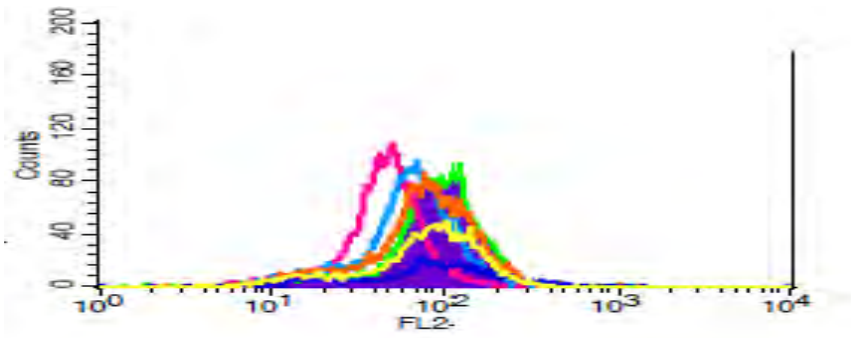
**Γράφημα 27:** Η % βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος.

#### **4.5 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής.**

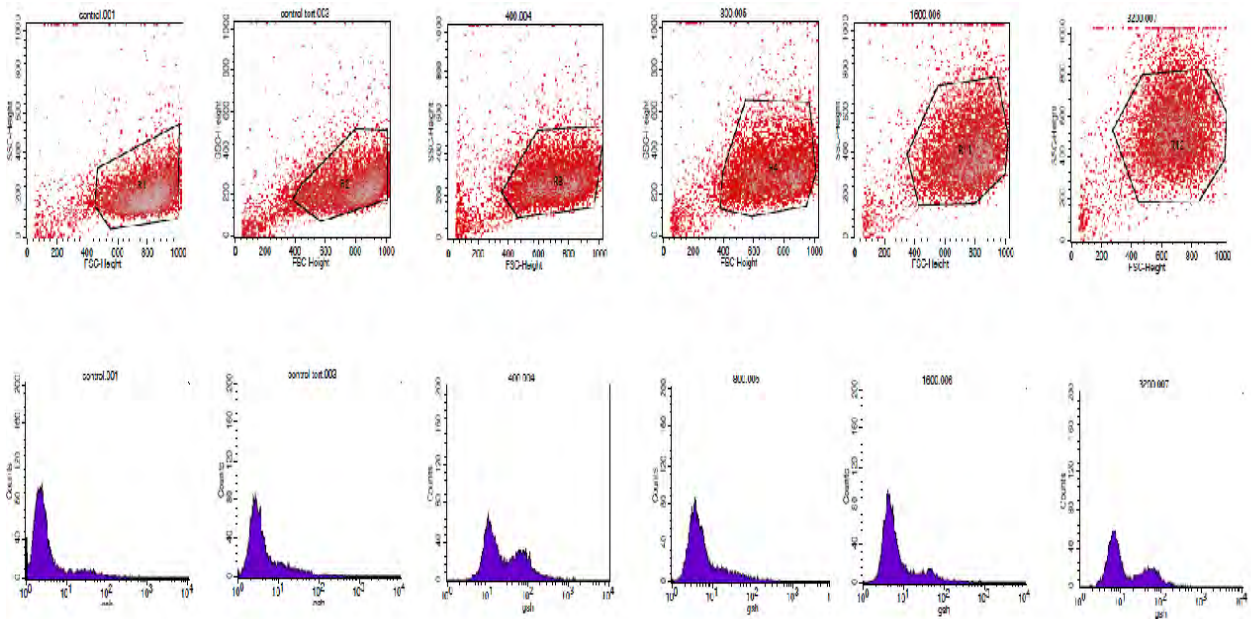
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά έπειτα από επώαση με το δραστικότερο εκχύλισμα από τα απόβλητα ελαιοτριβείου (3200, 1600, 800, 400, 200 mg/ml) για 24 ώρες και ακολουθήθηκε η προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3mM) για 1 ώρα. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης χωρίς την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα παρουσιάστηκαν αυξημένα σε σύγκριση με το control στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις έως και 300% στην συγκέντρωση των 3200μg/ml (Γράφημα 29). Όπως φαίνεται στο γράφημα 30 τα επίπεδα της γλουταθειόνης μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα μειώθηκαν σημαντικά κατά 50 % σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση του εκχυλίσματος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 146,8%, 170,7%, 176,5%, 162,8%, σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 400, 800, 1600, 3200 mg/ml αντίστοιχα.

Στο γράφημα 28 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.

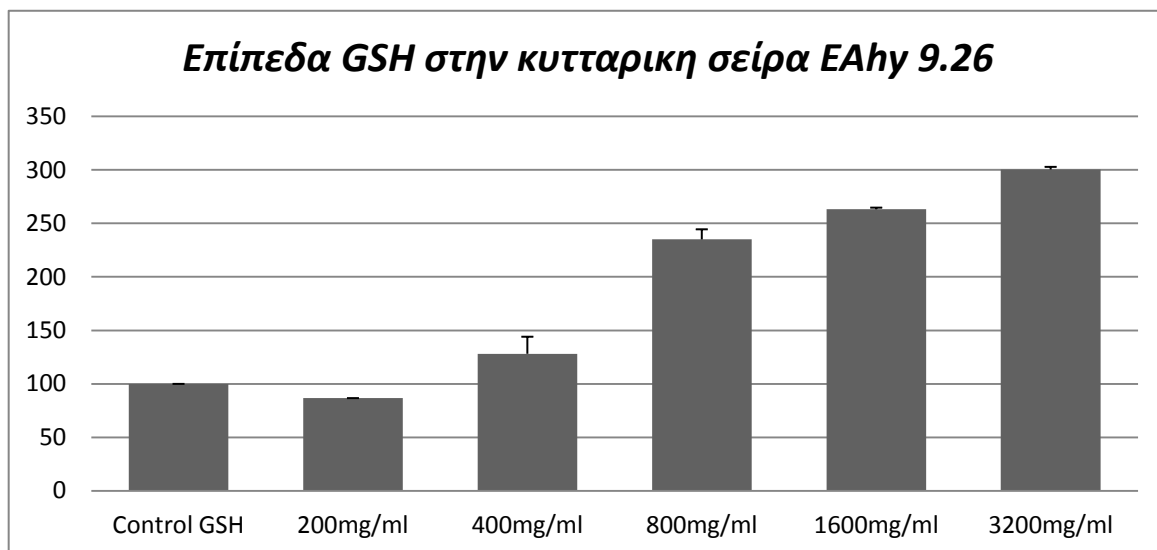


**Γράφημα 28:** Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

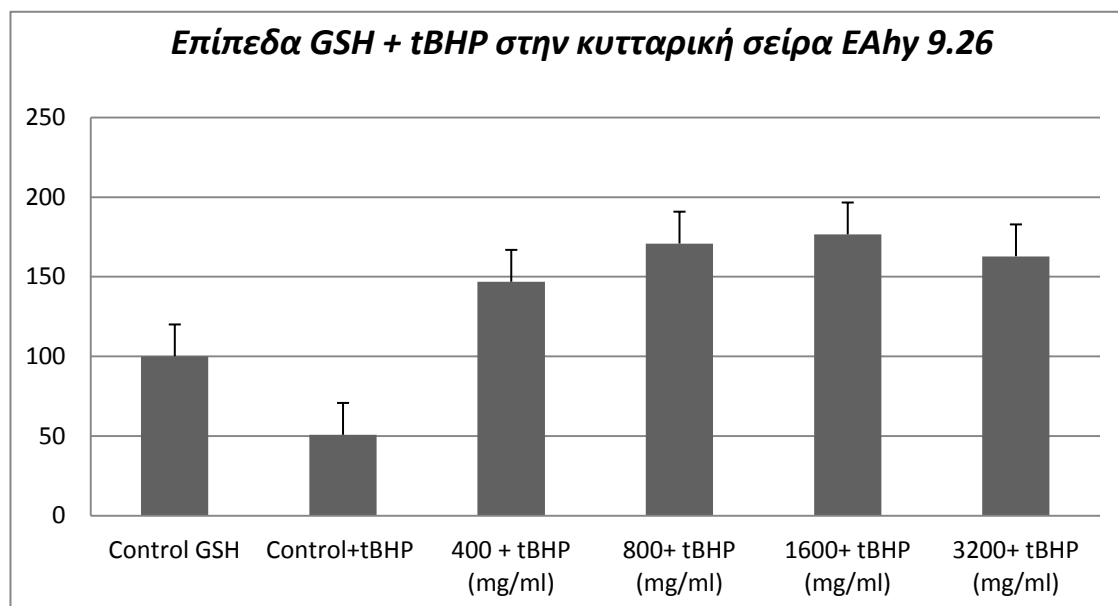


**Εικόνα 24:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης εκχυλίσματος και t-BHP.





**Γράφημα 29:** Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy 926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), και υπό τον συνδυασμό του εκχυλίσματος (400,800,1600,3200 mg/ml) για 24 ώρες

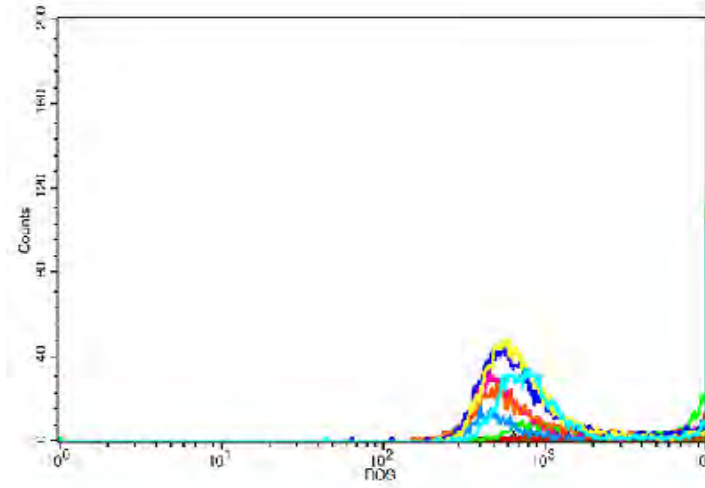


**Γράφημα 30:** Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό του εκχυλίσματος (400,800,1600,3200 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 h.

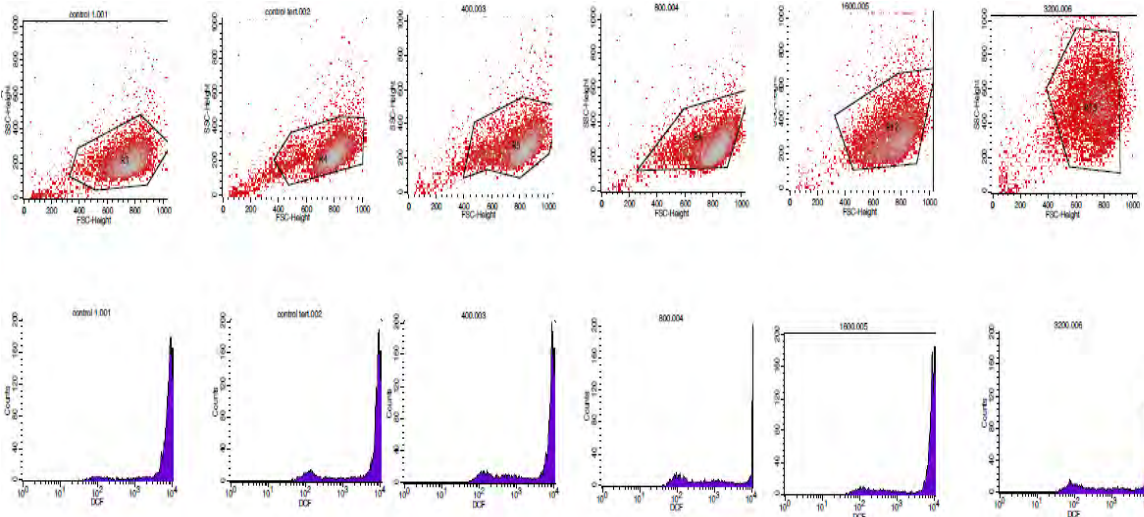
#### ***4.6 Αποτελέσματα από τον Προσδιορισμό των επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής***

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα ( 400, 800, 1600, 3200 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3mM) για 1 ώρα. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος . Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

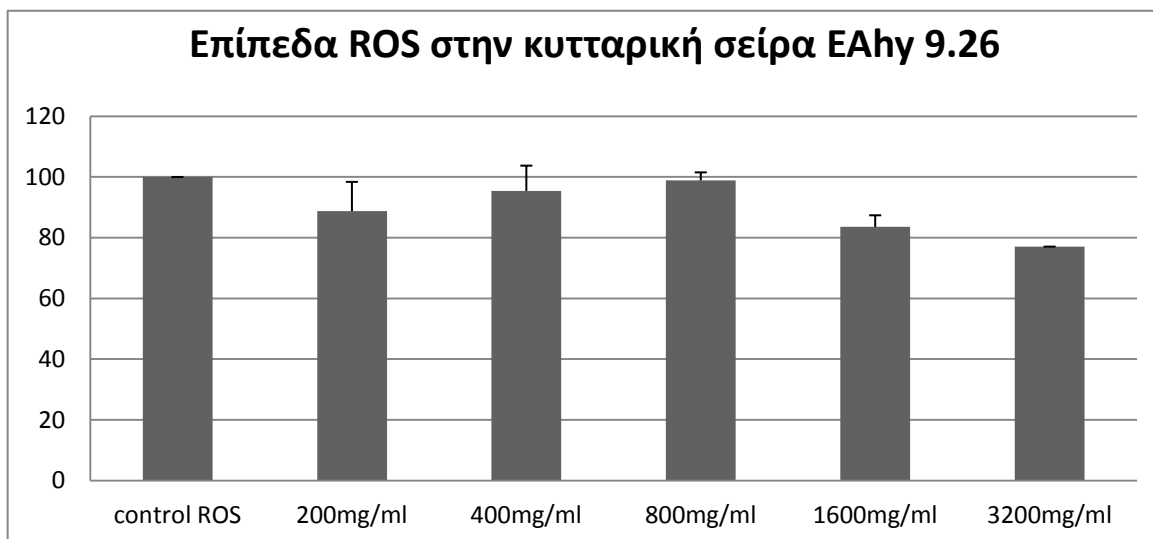
Όπως φαίνεται στο γράφημα 32 τα επίπεδα των ROS απουσία του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν ιδιαίτερα σε σχέση με το control για τις συγκεντρώσεις (400, 800, 1600, ) mg/ml. Μείωση της τάξεως των 23% παρατηρείται μόνο στην συγκέντρωση των 3200μg/ml. Αντίστοιχα παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα τα επίπεδα των ROS υπό την παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν σημαντικά σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες (control). Το ίδιο παρατηρείτε και υπό την επίδραση του εκχυλίσματός σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (Γραφημά 32).



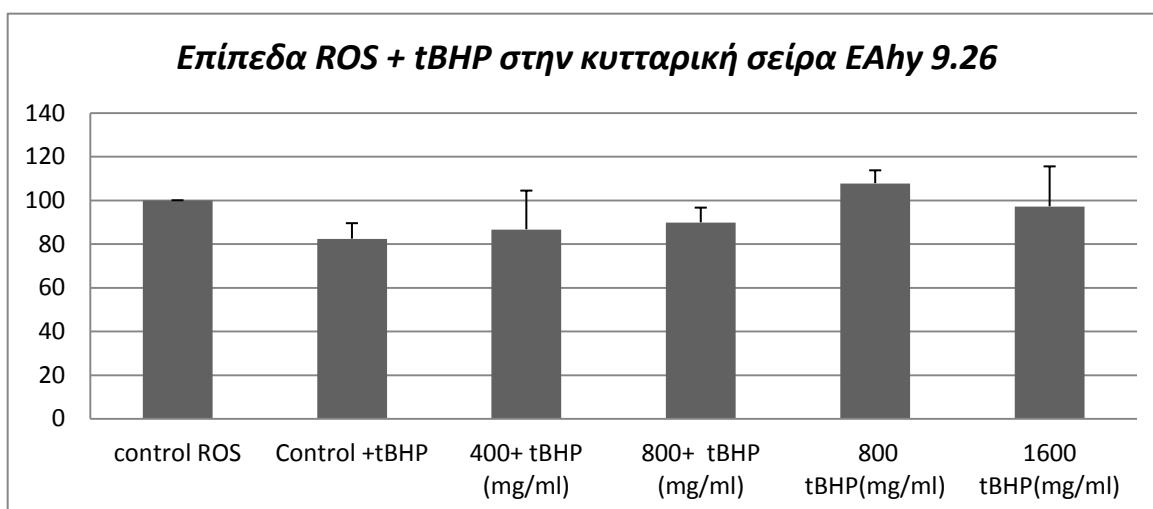
**Γράφημα 31:** Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων ROS από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.



**Γράφημα 25:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης του εκχυλίσματος και t-BHP.



**Γράφημα 31:** Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τον συνδυασμό εκχυλίσματος(400, 800, 1600, 3200 mg/ml) για 24 ώρες



**Γράφημα 32:** Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό εκχυλίσματος(400, 800, 1600, 3200 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 ώρα.

## 5. Συζήτηση:

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια, για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινόλων, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Έτσι καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

Αρκετά μελετημένο, ως προς τα βιοδραστικά του συστατικά και κυρίως τις φυτικές του πολυφαινόλες είναι το ελαιόλαδο όπως επίσης και τα απόβλητα επεξεργασίας του. Έχει αποδειχτεί επιστημονικά ότι το ελαιόλαδο, λόγω των πολυφαινολικών συστατικών του παρουσιάζει αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα και γι το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της και στα απόβλητα επεξεργασίας του ελαιόλαδου. Σκοπός τους δεν είναι μόνο η μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης με την επεξεργασία και την χρησιμοποίηση αλλά και η παροχή των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους στην καθημερινή ζωή μειώνοντας το οξειδωτικό στρες όπως επίσης και στην πρόληψη ασθενειών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα από απόβλητα ελαιοτριβείου τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη, ζελατίνη και πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν 2 in vitro μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση της σταθερής χημικής ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι η ρίζα ROO•. Και στις 2 μεθόδους προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν 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.

Με βάση τις τιμές των IC<sub>50</sub> του Γραφήματος 1 το σύνολο των 12 εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS. Το εύρος των

τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 145μg/ml έως 710μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν του δείγματος 13 με IC<sub>50</sub> 145μg/ml που ήταν ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη. Εκτός από τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για πιθανή προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO•, με την χρήση της δεύτερης μεθόδου και την επίδραση ριζών ROO• επάνω σε πλασμιδιακό DNA. Σύμφωνα με τις τιμές IC<sub>50</sub> του Γραφήματος 13 όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν αρκετά ισχυρή δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO• βλάβη στο DNA, με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 397 μg/ml έως 2300 μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα (όπως και στην περίπτωση της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>) ήταν του δείγματος 13 που αφορούσε με IC<sub>50</sub> 397μg/ml. Και στις δυο μεθόδους ασθενέστερα δείγματα αποδειχθήκαν τα δείγματα 2, 9 και 24. Το δείγμα 13 όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3 ήταν ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη με συνθήκες ανάπτυξης των πειραμάτων 78° C εξωτερική θερμοκρασία και 140° C εσωτερική θερμοκρασία. Όπως αποδεικνύεται και από τα IC<sub>50</sub> των δυο *in vitro* μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα μόνο σε μαλτοδεξτρίνη παρουσίαζαν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα είτε σε ζελατίνη είτε σε πρωτεΐνη. Ιδιαίτερα τα δείγματα που ήταν ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη όπως τα δείγματα 9 και 24 αποδείχθηκε και με τις δυο μεθόδους ότι έχουν ασθενή αντιοξειδωτική δράση.

Στο τελευταίο στάδιο της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική δράση ενδοκυτταρικά του εκχυλίσματος που παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις δύο προηγούμενες μεθόδους στις διάφορες συγκεντρώσεις της που έλαβαν χώρα κατά την πειραματική διαδικασία σε επιθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy 926), όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της μεθόδου XTT επιλέχθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (200,400, 800, 1600 3200 mg/ml) για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα. Απουσία οξειδωτικού παράγοντα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH έως και 300% για την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το control. Η αύξηση των επιπέδων GSH επιβεβαιώνει ότι το εκχύλισμα παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα κύτταρα μετά από επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP παρουσίασαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 49,5% συγκριτικά με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της εκχυλίσματος παρουσίασαν

αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 146,8%, 170,7%, 176,5%, 162,8% σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 400, 800, 1600, 3200 mg/ml αντίστοιχα. Επομένως, τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκαν σημαντικά έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα. Η διαφορά που παρατηρείται παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα στα επίπεδα γλουταθειόνης οφείλεται στον οξειδωτικό παράγοντα που προκαλεί στα κύτταρα οξειδωτικό stress. Ως πιθανή αιτία της παρατηρούμενης αύξησης στα επίπεδα GSH μπορεί να είναι η επαγωγή των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της GSH, όπως για παράδειγμα η αύξηση είτε σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης της έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της GSH. Επομένως, αν ληφθεί μέσω της τροφής, τότε θα επαχθεί η βιοσύνθεση γλουταθειόνης.

Ακόμη, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ROS, όπου τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν συγκριτικά με το control γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που παράγει το t-BHP από ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου όπως η γλουταθειόνη. Χωρίς τον οξειδωτικό παράγοντα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των ROS μειώνονται μόνο στην συγκέντρωση 3200μg/ml της τάξεως 77% ενώ στις άλλες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζονται τα επίπεδα των ROS. Παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα τα επίπεδα των ROS δεν επηρεάστηκαν υπό τις φυσιολογικές συνθήκες και σε σύγκριση με το control όπως επίσης σημαντική επιρροή δεν παρατηρήθηκε και υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Αυτό είναι λογικό αφού παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα λόγω του οξειδωτικού stress τα επίπεδα των ROS είναι δυσκολότερο να μειωθούν.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν πως πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείων μετά από ενθυλάκωσή σε μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη τυρογάλακτος και ζελατίνη διατηρεί ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Πιο ισχυρά όμως αποδείχτηκαν τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνη. Ιδιαίτερα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης από το εκχύλισμα που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη οφείλεται κυρίως στην αύξηση των επιπέδων της GSH. Αυτή η δράση του εκχυλίσματος δημιουργεί πρόσφορο έδαφος να χρησιμοποιηθεί σε βιολειτουργικά τρόφιμα ή σε διατροφικά συμπληρώματα. Επιπλέον η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα του, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση προϊόντων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη

αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.



## 6. Βιβλιογραφία

- **Albano E (2006):** Alcohol, oxidative stress and free radical damage., Proc Nutr Soc., 65, 278-290.
- **Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T (2004):** Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise., Free Radic Biol Med., 37, 480-487.
- **Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV (2011):** Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms., Br J Dermatol., 165, 1162-1168.
- **Attaallah W, Yilmaz AM, Erdoğan N, Yalçın AS, Aktan AO (2012):** Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats., Pathol Oncol Res., 18, 817-822.
- **Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009):** Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species., Physiol Rev., 89, 27-71.
- **Battin EE, Brumaghim JL (2009):** Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms., Cell Biochem Biophys., 55, 1-23.
- **Beer TM, Evans AJ, Hough KM, Lowe BA, McWilliams JE, Henner WD (2002):** Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk., Prostate Cancer Prostatic Dis., 5, 22-27.
- **Benov L, Beema AF (2003):** Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis, Free Radic Biol Med., 34, 429-433.
- **Berlett BS, Stadtman ER (1997):** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress., J Biol Chem., 272, 20313-20316.
- *Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. 2005. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer 113:423-33.*
- *Afaq F., Malik A., Syed D., Maes D., Matsui M.S., Mukhtar H. (2005). Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogenactivated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. Photochem Photobiol 81,38-45.*
- *Alarcon De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. Pharmacology. 1994 48:56-62.*
- *Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. 2000. High-performance liquid*

*chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. J Chromatog A 896:87–93.*

- Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. 1999 Cardiovascular and renal benefits of dry beans and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 70: S464-474.
- Anoosh E. , Mojtaba E., Sadeghy Fatemeh S. (2010). Study of the effect of juice of two variety of pomegranate on decreasing plasma LDL cholesterol, *Procedia Social and Behavioral Sciences* 2 620–623.
- Aslam MN, Lansky EP, Varani J. 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 103:311–8.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 71:1062–76.
- Aviram M, Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin-converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158(1):195–8.
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 23(3):423–33.
- Azadzoï KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urol* 174(1):386–93.
- Baruchel S, Wainberg MA, “The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus”: *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 111–114: 1992
- Betanzos-Cabrera G., Guerrero-Solano J. A., Martvnez-Pirez M. M., Calder n-Ramos Z.G., Belefant-Miller H., Cancino-Diaz J. C. (2011) Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet, *Food Research International* 44, 1381–1385.
- Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 957:210–229.
- Bishop DJM, Weinberg RA, “The themes hallmarks in of Cancer”, *Cell*, 00:57-70, 2000.
- Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan* 91: 179-194.
- Boussetta T, Raad H, Lettéron P, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC,

- Driss F, El-Benna J. 2009. Punicic acid, a conjugated linolenic acid, inhibits TNF $\alpha$ -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One* 4(7):6458.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Food Science and Technology*, 28, 25–30, 1995
  - Bravo L, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”, *Nutr Rev*, 56, (11): 317-33, 1998.
  - Cam M, Hıslı Y, Durmaz G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 112:721–6.
  - Caragay AB, “Cancer- preventative foods and ingredients” *Food Tech* 46(4), 65-68: 1992.
  - Celik I, Temur A, Isik I. 2009. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chem Toxicol* 47(1):145–9.
  - Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001 Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.
  - Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : *Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.
  - Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*. 1992 55:179–183.
  - Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. 2003 Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Curr Med Chem* 10: 1345-1359
  - Craig WJ, “Health Promoting Properties of Common Herbs”, *Am. J Clin Nutr* 70(3): 491-499, 1999.
  - Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 11:815-821.
  - Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinsein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provos JC, Liker H, Aviram M. 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame J Cardiol* 104(7):936–42.
  - De Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D’Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. 2007. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide* 17:50–4.

- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Progress in Clinical and Biological Research.* 1986 213:481–489.
- Dew T, Day A, Morgan M, “Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components” *Department of Food Science, University of Leeds, 2005.*
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences.* 1999 65:337-353.
- Di Silvestro RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. 2009. *Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. Phytother Res* 23:1123–7.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, “Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress”, *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, 2004.
- Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. 2009. *Antimicrobial activity of six pomegranate (Punica granatum L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules* 14:1808–17.
- Eaton-Evans J. *Osteoporosis and the role of diet. Br J Biomed Sci.* 1994 51:358–370.
- Elliot RH, Strunin L, “Hepatotoxicity of volatile anaesthetics”, *British Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, 1993.
- Evans PH, “Free radicals in brain metabolism and pathology”, *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, 1993.
- Fadavi A, Barzegar M, Azizi HM. 2006. *Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. J Food Comp Anal* 19:676–80.
- Ferguson Lynnette R, (2001), *Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutation Research*, 475:89-111
- Forest CP, Padma-Nathan H, Liker HR. 2007. *Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study. Int J Impot Res* 19(6):564–7.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet.* 1993 341:454-457.
- Fukumoto LR, Mazza G. *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem.* 2000 48:3597-3604.
- Fuster V. (1994) `Lewis A. Conner Memorial Lecture. *Mechanisms*

leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology', *Circulation*, 90, 2126-2146.

- Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581-9.
- Gilbert D.L, "Fifty years of radical ideas", *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000
- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS "Chemoprevention", *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49, 1995.
- Haidari M, Ali M, Casscells SW, Madjid M. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed*.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzyme bgy* 186, 1990.
- Halliwell B, "Free Radicals and otherreactive species in Disease", *National University of Singapore*, 2001.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, "Free Radicals in Biology and Medicine", 11: 416-493, 188-266, 1989
- Hamad AW, Al-Momene W. 2009. Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnol* 25(1):286.
- Harborne JB, Williams C.A., *Advances in flavonoid research since1992*, *Phytochemistry* 55, 481-504, 2000.
- Harborne JB. *Nature, distribution and function of plant flavonoids*. In: *Plant flavonoids in biology and medicine*. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.
- Harborne JB. *The flavonoids: advances in researchsince 1986*. London: Chapman and Hall, 1993
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships*, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships*, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Heinecke JW. 2006. *Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease:*

chief culprit or innocent bystander? *J Exp Med* 203(4):813–6

- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993 342:1007-1011.
- Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. 2000. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* 66:228–30.
- Huang M-T., Osawa T., Ho C-T., Rosen R. T. (1994). *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I - Fruits and Vegetables*, American Chemical Society, ISBN13: 9780841227682 Chapter 24, 294–302.
- Huang THW, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. 2005. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicol App Pharmacol* 207:160–9.
- Jahfar M, Vijayan KK, Azadi P. 2003. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res J Chem Environ* 7:43–50.
- Jaiswal V, DerMarderosian A, Porter JR. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem* 118:11–6.
- Janick J., Paull R. E. (2008). *The encyclopedia of fruit & nuts* Cabi Publishing, ISBN0851996388, 9780851996387.
- Kaefer CM, Milner JA, “The role of herbs and spices in cancer prevention”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6): 347-361, 2008.
- Kaur C, Kapoor HC, “Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables”, *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153–161, 2002
- Keum Y.S., Park K.K., Lee J.M., Chun K.S., Park J.H., Lee S.K., Kwon H., Surh Y.J. 2000 Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 150:41-8.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002 76: 560-568.
- Koyama S, Cobb L, Mehta H, Seeram N, Heber D, Pantuck A, Cohen P, “Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF–IGFBP axis Growth Hormone & IGF”, *Research*, 20(1) : 55-62, 2010.
- L. Yochum, L.H. Kushi, K. Meyer, A.R. Folsom, Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *Am J Epidemiol* 149 (1999) 943–949.

- Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. 2005a. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs* 23:11–20.
- Lansky EP, Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177–206.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 92:154-160.
- Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wanga CC. 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118:315–22.
- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 1994 54:1895s-1898s.
- López AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747–57.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
- M.G.L. Hertog, E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, D.Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heartdisease: the Zutphen elderly study, *Lancet* 342 (1993) 1007–1011.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-47.
- Mathers J.C. 2002 Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br J Nutr* 88: S273-9.
- Mazur A., D. Bayle, C. Lab, E. Rock, Y. Rayssiguier, Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro, *Atherosclerosis* 145 (1999) 421–42
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. 1993 A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-12
- Mirdehghan SH, Rahemi M. 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Sci Hort* 111(2):120–7.
- Molyneux P, “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219, 2004.
- Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars.

- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.EC., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.AM, (2001), *Flevonoids: a review of probable mechanisms of action and potential 95ynaecologic*, American Society for Clinical Nutrition, 74:48-25
- Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. 2002. *Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyani*
- *din, and pelargonidin. J Agric Food Chem 50:166–71.*
- Ozgul-Yucel S. 2005. *Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. J Am Oil Chem Soc 82(12):893–7.*
- Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, “Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases”, *flammopharmacology*, 1: 3–36: 1991
- Pérez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. 2002. *In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. J Agric Food Chem 50:2308–12.*
- Petti S, Scully C. 2009. *Polyphenols, oral health and disease: a review. J Dent 37:413–23.*
- Poyrazoglu E, Gökmen V, Artık N. 2002. *Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey. J Food Comp Anal 15:567–75.*
- Pradeepkumar T., Pradeep K. (2008). *Management of Horticultural Crops: Vol.11 Horticulture Science Series: In 2 Parts, New India Publishing, ISBN 8189422499, 9788189422493 (pages 147-150).*
- Prior R, Xianli W, Schaich K, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005.
- Ragan MA, Glombitza K. *Phlorotannins: brown algal polyphenols. Prog Phycol Res 1986;4:177-241*
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. *Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. Carcinogenesis. 1989 10:1833-1839*
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radicle Biologyl and Medicine*, 26: 1231–1237, 1999.
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), *Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Rosenblat M, Aviram M. 2006b. *Anti-oxidative properties of*



pomegranate: *In vitro* studies. In: SeeramNP, HeberD, editors. *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*. New York : Taylor and Francis Group. p 31–43.

- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. 2005 *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.
- Schultz T.P., Hubbard T.M.JR., Jin Le H., Fisher T.H., Nicholas D.D. *Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships*. *Phytochemistry*. 1990, 29 (5), 1501-1507.
- Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D. 2005a. *Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry*. *Sep Purif Technol* 41:49–55.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005b. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nut Biochem* 16:360–7.
- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “The role of oxidative stress in the genesis of heart disease”, *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Morthy V, Ramassamy C. 2008. *Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism and cellular and molecular mechanism*. *J Agric Food Chem* 56:4855–73.
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. *J ''Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts.*'' *Agric Food Chem*. 2008 Aug 27;56(16):6967-76. Epub 2008 Jul 16.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D ''Effects of grape extracts on the *in vitro* activity of enzymes involved in oxidative stress regulation.'' *In Vivo*. 2011 Jul-Aug;25(4):657-62.
- Spanou CI, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Aligiannis N, Angelis A, Skaltsounis AL, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Kouretas D. *J ''Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities.*'' *Physiol Biochem*. 2012 Mar;68(1):37-45.
- Sporn MB. *Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period*. *Cancer Res*. 1976 36:2699-2702.
- Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM, Kouretas D ''Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols'' *Food Chem Toxicol*. 2012 Jun;50(6):2155-70.
- Stagos D, Karaberis E anf Kouretas D, (2005), *Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, In Vivo: 741-747*

- Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J "Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes" *Agric Food Chem.* 2007 Jun 27;55(13):5246-52.
- Steinberg D. (1997). 'Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance', *J Biol Chem*, 272, 20963-20966.
- Steinmetz KA, Potter JD, "Vegetables, fruit and cancer preventions a review", *J Am Diet Assoc*, 96: 1027-1039, 1996.
- Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmeier JJ, Chew MH, Marlin R, Raisin CJ, Ornish D. 2005. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 96(6):810-4.
- Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol* 17:377-85.
- Tezcan F, Gültekin-Özgülven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem* 115(3):873-7.
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548-7555
- Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998
- Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, Aksu EH, Aksoy H. 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr* 27(2):289-96.
- Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res.* 1991 64:91-100.
- Tzouramani E., Lontakis A., Sintori A., Navrouzoglou P., Papaeuthymiou M., Karanikolas P., Alexopoulos G. (2008) Δεντροκομία-Ποδιά ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.
- Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. 2007. Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem* 55:9559-70.
- Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, Van Der Greef J. 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochem* 65(2):233-41
- Venn B.J., Mann J.I. 2004 Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr* 58: 1443-1461

- Wattenberg L W, “Chemoprevention of cancer”, *Cancer Res*, 45: 1-8, 1985
- Wilson RL, “Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In *biochemical mechanism of liver injuries*”, New York Academic Press: 123-224, 1978.
- Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.
- Zandi P, Ahmadi L, “Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family”, *J Food Sci Technol*, 37: 436–439, 2000.