

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΠΑΪΡΛΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ  
ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΣΚΟΝΕΣ ΜΕ ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΕΣ  
ΤΙΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ C ΚΑΙ D ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2021**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Κωνσταντίνος Πετρωτός:** Καθηγητής Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας-Αγροτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### ***Ευχαριστίες***

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5-6
<b><u>A' ΜΕΡΟΣ</u></b> .....	7-21
<b>1.1. ΓΕΝΙΚΑ: ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ</b> .....	7-8
<b>1.2. ΒΙΤΑΜΙΝΗ C</b> .....	8-12
1.2.1. Γενικά.....	8-9
1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	9
1.2.3. Πηγές βιταμίνης C και συνιστώμενες δόσεις .....	10
1.2.4. Φαρμακοκινητική .....	10-11
1.2.5. Φαρμακοδυναμική.....	11-12
<b>1.3. ΒΙΤΑΜΙΝΗ D</b> .....	12-18
1.3.1. Γενικά.....	12-13
1.3.2. Χημικά χαρακτηριστικά & Ιδιότητες.....	13-14
1.3.3. Μεταβολισμός & Φυσιολογικές λειτουργίες.....	14-16
1.3.4. Πηγές & ημερήσιες ανάγκες.....	17-18
<b>1.4. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ</b> .....	18-20
1.4.1. Γενικά .....	18
1.4.2. Ελεύθερες ρίζες.....	18-19
1.4.3. Παραγωγή ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα.....	19
1.4.4. Ελεύθερες ρίζες στη βιολογία.....	19-20
1.4.5. Οξειδωτικό στρές.....	20
<b>1.5. ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b> .....	20-21
1.5.1. Γενικά .....	20
1.5.2. Δομή .....	20
1.5.3. Χρήσεις τροφίμων.....	21
<b>1.6. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ</b> .....	21
<b>1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	21
<b><u>B' ΜΕΡΟΣ</u></b> .....	
<b>2.1. ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	22-24
2.1.1. Μέθοδος DPPH.....	22-23
2.1.2. Μέθοδος ABTS .....	23-24
2.1.3. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	24

<b>2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>24-39</b>
2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH.....	25-29
2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+.....	29-33
2.2.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αναγωγικής δύναμης.....	34-39
<b>2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>40-42</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>42-44</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν να εξακριβωθεί εάν θα μπορούσε να γίνει χρήση σκόνης με ενσωματωμένες τις βιταμίνες C ή/και D σε μαλτοδεξτρίνη, ως πρόσθετα αναψυκτικών και συγκεκριμένα, την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών (πριν καθώς και μετά την προσθήκη τους σε αναψυκτικό) σε ανθρακούχο πορτοκαλάδα. Η εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε με τις μεθόδους DPPH, ABTS και Αναγωγική Δύναμη.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε και στις παραγόμενες σκόνες, αλλά και στα αναψυκτικά μετά την προσθήκη των σκονών. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τις σκόνες έδειξαν ότι η σκόνη που περιείχε τη βιταμίνη C και η σκόνη που περιείχε τις βιταμίνες C και D είχαν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Η σκόνη που περιείχε μόνο τη βιταμίνη D είχε μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τις σκόνες της βιταμίνης C. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε και στην πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκαν οι σκόνες με τις βιταμίνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την προσθήκη στην πορτοκαλάδα, ιδιαίτερα των σκονών που περιείχαν μόνο τη βιταμίνη C ή τις βιταμίνες C και D μαζί, η αντιοξειδωτική ικανότητα του αναψυκτικού ενισχύθηκε σημαντικά. Στην πορτοκαλάδα που προστέθηκε μόνο τη βιταμίνη D δεν ενισχύθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τη σκέτη πορτοκαλάδα.

Συνοψίζοντας ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παραγόμενων σκονών με τις βιταμίνες C ή και D και του αναψυκτικού στο οποίο προστέθηκαν έδειξε ότι: i) οι σκόνες αλλά και το αναψυκτικό στο οποίο προστέθηκαν είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και επομένως μπορεί να έχουν ευεργετικές επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, ii) οι σκόνες αλλά και το αναψυκτικό στο οποίο προστέθηκαν είχαν αντιοξειδωτική δράση που ήταν παραπλήσια με τη θεωρητικώς αναμενόμενη τιμή, γεγονός που δείχνει ότι οι συνθήκες ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επιτυχείς τόσο όσον αφορά τη διατήρηση της ποσότητας των βιταμινών αλλά και των βιολογικών τους δράσεων.

## **SUMMARY**

The purpose of this dissertation was to determine whether powder with vitamins C and / or D incorporated in maltodextrin could be used as soft drink additives and, in particular, to examine their antioxidant activity (before and after their addition to soft drinks) in carbonated orange juice. The examination of the antioxidant activity was done with the methods of DPPH, ABTS and Reducing Power.

The antioxidant capacity was determined in the powders produced, but also in the soft drinks after the addition of the powders. The results regarding the powders showed that the powder containing vitamin C and the powder containing vitamins C and D had a very strong antioxidant capacity. Powder containing only vitamin D had lower antioxidant capacity compared to vitamin C powders. The antioxidant capacity was also determined in the orange juice to which the powders with the vitamins were added. The results showed that after the addition to the orange juice, especially the powders that contained only vitamin C or both vitamins C and D, the antioxidant capacity of the soft drink was significantly enhanced. In the orange juice that was added only vitamin D, the antioxidant capacity was not enhanced in relation to the ordinary orange juice.

Summing up the determination of the antioxidant capacity of the powders produced with vitamins C or even D and the soft drink to which they were added showed that:

- i) the powders and the soft drink to which they were added had a strong antioxidant effect and therefore can have a beneficial effect on human health
- (ii) the powders and the soft drink to which they were added had an antioxidant effect which was close to the theoretically expected value, which shows that the encapsulation conditions used were successful both in terms of maintaining the amount of vitamins and their biological actions.

## **A' ΜΕΡΟΣ**

### **ΓΕΝΙΚΑ**

#### **1.1. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ**

Οι βιταμίνες (ή αλλιώς ‘‘βοηθητικοί παράγοντες’’) ανακαλύφθηκαν από τους επιστήμονες στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν έγινε γνωστό ότι εκτός από λίπη, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, νερό και ανόργανα στοιχεία απαιτούνται κι' άλλοι παράγοντες τόσο για την ζωή όσο και για την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Οι βιταμίνες απέκτησαν το όνομά τους ύστερα από τον προσδιορισμό των χημικών τους δομών (κάτι το οποίο προϋπέθετε την απομόνωσή τους). Το κάθε ξεχωριστό όνομα πλέον ισοδυναμεί σε μια χημική ένωση με εξιδεικευμένη βιολογική δράση.

Οι βιταμίνες (Πίνακας 1.1) είναι οργανικά μόρια που λειτουργούν ως συστατικά συνενζύμων ή ενζύμων σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό και εισέρχονται σ' αυτόν σε ένα ποσοστό ή αποκλειστικά από τη διατροφή. Χωρίζονται σε δύο διαφορετικούς τύπους τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού όπως ο μεταβολισμός. Κάθε μια κατηγορία περιλαμβάνει έναν αριθμό μη-σχετιζόμενων χημικά ενώσεων που διαφέρουν ως προς το φυσιολογικό τους ρόλο στον οργανισμό (McDowell, 2000). Τέλος, το ποσό των βιταμινών που απαιτείται σε ημερήσιο επίπεδο είναι πολύ μικρό (mg ή µg).

Οι δύο τύποι βιταμινών (υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές) αντιμετωπίζονται διαφορετικά από τον οργανισμό. Επειδή οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες αφομοιώνονται στο αίμα, δε διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα για τον οργανισμό (εκτός της Β12) είναι σημαντική η πρόσληψη αυτών των βιταμινών καθημερινά από τη διατροφή. Όταν μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη βρίσκεται σε πλεόνασμα στον οργανισμό, τότε αυτό το πλεόνασμα αποβάλλεται με τα ούρα. Η πρόσδεση των βιταμινών αυτών σε μεταφορικές πρωτεΐνες ή ένζυμα οδηγεί στην αποθήκευσή τους. Από την άλλη πλευρά βρίσκονται οι λιποδιαλυτές βιταμίνες των οποίων η μεταφορά και η απορρόφηση σχετίζεται με τα λιπίδια. Η μεταφορά τους πραγματοποιείται από τα χυλομικρά ενώ η για την απορρόφησή τους είναι σημαντική η παρουσία χολικών αλάτων. Επίσης, αντίθετα με τις υδατοδιαλυτές, αποθηκεύονται στον οργανισμό, η κάθε μορφή όμως σε διαφορετικά ποσοστά.

Πίνακας 1.1.1: Λιποδιαλυτές & Υδατοδιαλυτές Βιταμίνες

Βιταμίνες	Συνώνυμα
<u>Λιποδιαλυτές</u>	
A	<u>Ρετινόλη, Ρετινάλη, Ρετινοϊκό οξύ</u>
D2	<u>Εργοκαλσιφερόλη</u>
D3	<u>Χοληκαλσιφερόλη</u>
K1	<u>Φυλλοκινόνη</u>
<u>Υδατοδιαλυτές</u>	
Θειαμίνη	Βιταμίνη B1
<u>Ριφοβλαβίνη</u>	Βιταμίνη B2
<u>Νιασίνη</u>	Βιταμίνη B3
<u>Βιταμίνη B6</u>	<u>Πυριδοξίνη</u>
<u>Παντοθενικό Οξύ</u>	Βιταμίνη B5
<u>Βιοτίνη</u>	Βιταμίνη H
<u>Φολικό Οξύ</u>	<u>Βιταμίνη B12</u>
<u>Κυανοξοβαλαμίνη</u>	<u>Χολίνη</u>
Βιταμίνη C	<u>Ασκορβικό Οξύ</u>

## 2. ΒΙΤΑΜΙΝΗ C (Ασκορβικό οξύ)

### 1.2.1. Γενικά

Μια από τις πιο απαραίτητες βιταμίνες που πρέπει να προσλαμβάνει ο οργανισμός σε καθημερινή βάση από τις τροφές είναι το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς βιταμίνη C, η οποία ανήκει στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών βιταμινών και προέρχεται από το μεταβολισμό της γλυκόζης. Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας της βιταμίνης C, εμφανίζεται η ασθένεια σκορβούτο που παρατηρείται σπάνια στις ανεπτυγμένες χώρες (σύμφωνα με μελέτες, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση συσχετίζεται με τα επίπεδα βιταμίνης C στο πλάσμα καθώς τα άτομα που ανήκουν σε χαμηλές κοινωνικές τάξεις, με χαμηλό μορφωτικό επίπεδο ή εκείνα που ζουν σε υποβαθμισμένες περιοχές, έχουν χαμηλότερα επίπεδα ασκορβικού οξέος λόγω της μειωμένης πρόσληψής της από τη διατροφή). Χαρακτηρίζεται από την παρουσία αδυναμίας, πόνου στις αρθρώσεις ή δερματικών βλαβών, αιμορραγίας των ούλων, εύκολη εμφάνιση μωλώπων ή καθυστέρησης στην

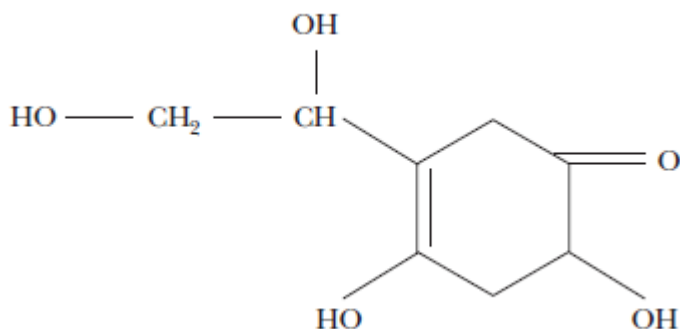


επούλωση πληγών και στο τέλος αιφνίδιο θάνατο του ασθενούς που προέρχεται από εσωτερική αιμορραγία ή και καρδιακή κάμψη. Ακόμη, η ανεπάρκεια της βιταμίνης C συνεπάγεται διαταραχές των οστών με διόγκωση και συχνά αναιμία. Οι πολύ υψηλές δόσεις από την άλλη, αν χορηγούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, είναι πιθανό να δημιουργήσουν πέτρες στα νεφρά.

Ακόμη, λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας που απαιτείται για τη σύνθεση ιών κολλαγόνου μέσω υδροξυλίωσης προλίνης και λυσίνης. Προστατεύει επίσης το σώμα από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Οι άνθρωποι δεν μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ καθώς τους λείπει ένα ένζυμο που ονομάζεται γουλονολακτόνη οξειδάση. Μεταξύ των τροφίμων με υψηλά επίπεδα βιταμίνης C είναι οι ντομάτες, οι πατάτες και τα κίτρινα φρούτα όπως τα λάιμ, τα πορτοκάλια και τα λεμόνια. Η τρέχουσα σύσταση της ημερήσιας πρόσληψης βιταμίνης C είναι 90 mg/ημέρα για τους άνδρες και 75 mg/ημέρα για τις γυναίκες. Οι ασθενείς με χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης ή αυτοί που καπνίζουν χρειάζονται υψηλότερες δόσεις ασκορβικού οξέος στη διατροφή τους.

### 1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Το ασκορβικό οξύ είναι μια λακτόνη ενός σακχαρούχου οξέος που προέρχεται από γουλονικό οξύ και συντίθεται από γλυκόζη (Εικ. 1.2.1). Από βιοχημική άποψη, η βιταμίνη C ή το L-ασκορβικό οξύ είναι μια κρυσταλλική, λευκή και άοσμη σκόνη, πολύ διαλυτή στο νερό και σχετικά αδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες. Σε ξηρή κατάσταση και προστατευμένο από το φως, είναι σταθερό για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα περισσότερα θηλαστικά και φυτά συνθέτουν βιταμίνη C ενδογενώς από γλυκόζη και γαλακτόζη. Ωστόσο, οι άνθρωποι στερούνται αυτής της ικανότητας. Σε ορισμένα ζώα όπως πρωτεύοντα, ινδικά χοιρίδια, ινδικές νυχτερίδες, άλογα, ορισμένα είδη ψαριών, μερικά έντομα και άλλα ασπόνδυλα, δεν υπάρχει το ένζυμο γουλονολακτόνη οξειδάση που εμπλέκεται στη σύνθεση του ασκορβικού οξέος.



Εικόνα 1.2.1. Η δομή του Ασκορβικού Οξέος

### 1.2.3. Πηγές βιταμίνης C και συνιστώμενες δόσεις

Η βιταμίνη C βρίσκεται στα εσπεριδοειδή, το μπρόκολο, το κουνουπίδι, το σπανάκι, τις πατάτες, τα ακτινίδια, τις φράουλες και τις ντομάτες. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αρτοσκευάσματα και οι ξηροί καρποί παρέχουν λίγη βιταμίνη C. Τα φάρμακα που περιέχουν ασκορβικό οξύ είναι χημικά πανομοιότυπα με τη φυσική μορφή και δεν έχουν καμία διαφορά στη δραστηριότητα ή τη βιοδιαθεσιμότητα.

Οι συνιστώμενες ημερήσιες δόσεις ασκορβικού οξέος είναι 200 mg/ημέρα. Υπάρχουν 1,2-2 g (20 mg/kg βάρος) ασκορβικού οξέος σε όλο το σώμα και ο χρόνος ημίσειας ζωής του κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Σε μια μελέτη 15.800 ατόμων στις ΗΠΑ, οι τιμές του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα στους άνδρες κυμαίνονταν από 36,3-46,0 mg / dl και 42,6-55,1 mg / dl στις γυναίκες. Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 2.500 άτομα σχετικά με πηγές τροφής βιταμίνης C, αποδείχθηκε ότι η πρόσληψη ασκορβικού οξέος ξεπέρασε τα 60 mg / ημέρα, τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες για όλες τις ηλικιακές κατηγορίες. Μόνο η κατηγορία ηλικίας 18 έως 34 ετών στο γυναικείο φύλο ήταν κάτω από 100 mg / ημέρα (εύρος κάτω από τη συνιστώμενη δόση για τη συγκεκριμένη υποομάδα των συνήθων καπνιστών). Τα φρούτα, τα λαχανικά και τα όσπρια αποτελούν το 86% της συνολικής συνεισφοράς. Ποτά, σάλτσες, γαλακτοκομικά προϊόντα και αυγά παρείχαν το 12,5% του ασκορβικού οξέος. Οι ξηροί καρποί και τα λίπη δεν συνέβαλαν σε αυτήν τη συνεισφορά. Η πρόσληψη βιταμίνης C επιτεύχθηκε στο 75,2% των φρέσκων φρούτων και λαχανικών, της ντομάτας και του κουνουπιδιού. Τα εσπεριδοειδή συνέβαλαν το 44% και η ομάδα των λαχανικών, των ντοματών και του κουνουπιδιού το 32,8%.

### 1.2.4. Φαρμακοκινητική

Η απορρόφηση ποικίλλει ανάλογα με τη δόση. Στο λεπτό έντερο, απορροφάται σε ποσοστό 80-90% με έναν εξαρτημένο από Na<sup>+</sup> μηχανισμό μεταφοράς όταν λαμβάνονται ποσότητες έως 100 mg/ημέρα, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται γρήγορα όταν λαμβάνονται δόσεις 500 mg/ημέρα. Δεν δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και η περίσσειά της ρυθμίζεται με νεφρική απέκκριση όταν λαμβάνονται δόσεις άνω των 100 mg/ημέρα, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πλάσματος 60 mg/dl, οπότε το πλάσμα και τα λευκοκύτταρα είναι πλήρως κορεσμένα. Δόσεις μεγαλύτερες από 500 mg/ημέρα συμβάλλουν ελάχιστα στην αύξηση των επιπέδων βιταμίνης C στο πλάσμα ή στους ιστούς. Η συνολική ικανότητα απορρόφησης είναι 1.200 mg σε 24 ώρες, η οποία επιτυγχάνεται με δόση 3g. Διανέμεται σε όλο το σώμα, αν και υψηλά επίπεδα βρίσκονται στον εγκέφαλο, τον φλοιό των επινεφριδίων, το συκώτι, τη σπλήνα, το πάγκρεας, τα νεφρά και τα λευκοκύτταρα για λόγους που είναι άγνωστοι σήμερα.

Υποβάλλεται σε ηπατικό μεταβολισμό με τη μορφή ανενεργών μεταβολιτών όπως θειικά παράγωγα ή σε συνδυασμό με οξαλικό. Με φυσιολογικά επίπεδα πλάσματος 0,8-0,9 mg/dl, η βιταμίνη C που φιλτράρεται από το νεφρό επαναρροφάται στο σωληνάριο. Πάνω από αυτές τις τιμές, αποβάλλεται ως έχει ή με τη μορφή των μεταβολιτών του.

Όσο μεγαλύτερη είναι η πρόσληψη, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό που αποβάλλεται. Η περίσσεια ασκορβικού οξέος απεκκρίνεται στα ούρα ως οξαλικό οξύ. Ένα κλάσμα της μη απορροφημένης δόσης απεκκρίνεται επίσης στα κόπρανα.

### **1.2.5. Φαρμακοδυναμική**

Τα επίπεδα βιταμίνης C μειώνονται σε ορισμένες καταστάσεις όπως ο διαβήτης, η οξεία παγκρεατίτιδα, η καρδιακή προσβολή, ο πυρετός, οι ιογενείς λοιμώξεις, η έντονη σωματική δραστηριότητα, το κάπνισμα ή το στρες. Μετά από 4 εβδομάδες διακοπής του καπνίσματος, οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης C στο πλάσμα αυξάνονται κατά 13,5%. Για περισσότερα από 50 χρόνια γίνεται λόγος για τις ελεύθερες ρίζες ως αιτία της φωτογήρανσης και τη σημασία της βιταμίνης C σε αυτή τη διαδικασία.

Χαμηλά επίπεδα ασκορβικού οξέος στο πλάσμα έχουν επίσης βρεθεί σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ, η οποία εγείρει υποψίες για το ρόλο των ελεύθερων ριζών στην παθοφυσιολογία αυτής της νόσου. Το ανθρώπινο σώμα παράγει ελεύθερες ρίζες ως συνέπεια ενδογενών διεργασιών όπως κυτταρική αναπνοή, φαγοκυττάρωση, απόπτωση ή μεταβολισμός  $O_2$  ή εξωγενείς διαδικασίες όπως άσκηση, διατροφή, υπεριώδη ακτινοβολία, ρύπανση ή κάπνισμα. Οι ελεύθερες ρίζες περιέχουν ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια που είναι υπεύθυνα για βλάβες σε πρωτεΐνες, DNA ή κυτταρικές μεμβράνες. Είναι ενδιάμεσοι μεταβολίτες με πολύ μικρή διάρκεια ζωής (χιλιοστά του δευτερολέπτου) που χαρακτηρίζονται από την υψηλή αντιδραστικότητα και τη μεγάλη αστάθεια τους. Η παρουσία ενός περιττού αριθμού ηλεκτρονίων στην εξωτερική τροχιά των ατόμων τους τις κάνει να συνδέονται με ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων, παράγοντας αλυσιδωτές αντιδράσεις. Παράγονται σε εκείνες τις κυτταρικές περιοχές όπου το οξυγόνο είναι πιο ενεργό, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια ή τα κυτταροπλασματικά υπεροξώματα. Σχεδόν όλα τα οργανικά και ανόργανα μόρια που βρίσκονται στα κύτταρα, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και DNA, μπορούν να θεωρηθούν ως υπόστρωμα.

Το σώμα μας έχει δημιουργήσει αμυντικούς μηχανισμούς που προσπαθούν να εξουδετερώσουν τις επιβλαβείς επιδράσεις αυτών των σωματιδίων με ενζυματικά συστήματα όπως καταλάσες, δισμουτάσες υπεροξειδίου ή αναγωγάσες γλουταθειόνης. Η ζημιά που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες μπορεί να αντισταθμιστεί με τρεις μηχανισμούς: μείωση του αριθμού των αντιδράσεων που τις προκαλούν, μείωση συστατικών της διατροφής που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τέλος, συμπλήρωση της διαίτας με αναστολείς των αντιδράσεων που προκαλούν ελεύθερες ρίζες.

Η επιβλαβής επίδραση των ελεύθερων ριζών μπορεί να χαρακτηριστεί σε διαφορετικά επίπεδα. Στα λιπίδια, προκαλούν τη λεγόμενη υπεροξειδωση των λιπιδίων, αλλάζοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με την εμφάνιση οιδήματος και κυτταρικού θανάτου. Στις πρωτεΐνες υπάρχει οξειδωση αμινοξέων όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και μεθειονίνη και αυτές οι οξειδωτικές τροποποιήσεις του DNA έχουν ως

αποτέλεσμα βλάβη στην γονιδιακή έκφραση, διαγραφές, κατακερματισμούς ή χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Εδώ το ασκορβικό οξύ θα μπορούσε να διαδραματίσει θεμελιώδη ρόλο ως αμυντικός μηχανισμός ενάντια στην οξειδωτική επίθεση. Πιο συγκεκριμένα, οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική διαδικασία της βιταμίνης C σε ασθένειες όπως ο καρκίνος σχετίζονται με την ενσωμάτωση ασκορβικού οξέος στο σύστημα αναστολέα της υαλουρονιδάσης αποτρέποντας τη μεταστατική εξάπλωση των όγκων, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος με την αύξηση της παραγωγής λεμφοκυττάρων, την πρόληψη του σχηματισμού νιτροζαμινών στο γαστρεντερικό σωλήνα και με την αύξηση της αποτοξίνωσης με τη δράση του συστήματος κυτοχρώματος P-450.

Σε μοριακό επίπεδο, η βιταμίνη C λειτουργεί ως “εξουδερωτής” για τις ROS που παράγονται, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμποδίζουν τη βλάβη που προκαλείται από τις ROS, ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, διατηρεί μια ισορροπημένη κατάσταση στις αντιδράσεις οξειδωσης-μείωσης και διευκολύνει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης ως απάντηση στη βλάβη του DNA. Μεταξύ των πολλών άλλων λειτουργιών του είναι η σύνθεση πεπτιδίων και η υδροξυλίωση προλίνης και λυσίνης, εξ ου και η σημασία της στη γένεση των ιών κολλαγόνου.

### **1.3. ΒΙΤΑΜΙΝΗ D**

#### **1.3.1. Γενικά**

Με τον όρο βιταμίνη D γίνεται αναφορά σε μια σειρά χημικών ενώσεων. Οι πιο βασικές είναι η βιταμίνη D<sub>2</sub> (ή αλλιώς εργοκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D<sub>3</sub> (ή χοληκαλσιφερόλη). Από την ταξινόμηση απουσιάζει η βιταμίνη D<sub>1</sub>. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι όταν έγινε η απομόνωση και η μετονομασία των βιταμινών η D<sub>1</sub> ήταν μείγμα των υπόλοιπων D βιταμινών και έτσι πλέον δεν υπάρχει στην κατάταξη.

Η εργοστερόλη είναι ένα στεροειδές που βρίσκεται στα φυτά και μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας ενεργοποιείται και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της βιταμίνης D<sub>2</sub>. Αντιθέτως, στα ζώα υπάρχει η 5,7-χολεστεανοδιενόλη (βρίσκεται στην επιδερμίδα), ένα διαφορετικό στεροειδές από την εργοστερόλη. Η απορρόφηση της UV ακτινοβολίας - λόγω της ύπαρξης συζυγιακών διπλών δεσμών στο μόριο - οδηγεί στην δημιουργία της της προβιταμίνης D<sub>3</sub> (προκαλσιφερόλη). Η πλειονότητα της ποσότητας της προβιταμίνης D<sub>3</sub> ισομερίζεται εντός ολίγων ημερών προς τη βιταμίνη D<sub>3</sub> (χοληκαλσιφερόλη).

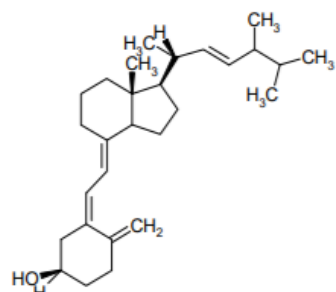
Αν το ανθρώπινο σώμα εκτεθεί στην ηλιακή ακτινοβολία, υπάρχουν διαφορετικά επίπεδα απορρόφησης, ανάλογα με την δερματική απόχρωση. Έτσι, το άσπρο δέρμα απορροφά σχεδόν το 80%, ενώ το σκούρο δέρμα το 95% σχεδόν των φωτονίων UV-B που προσπίπτουν σ' αυτό. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως λόγω της φωτοχημικής ρύθμισης, ελέγχεται η σύνθεση της προβιταμίνης D<sub>3</sub> και έτσι η παραγωγή της βιταμίνης D δεν είναι γραμμική με την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Αυτό συμβαίνει

γιατί αλλιώς θα υπήρχαν σημαντικοί κίνδυνοι για την υγεία καθώς μεγάλες συγκεντρώσεις βιταμίνης D είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό. Ως προστατευτικός παράγοντας δρα η μελανίνη του δέρματος μέσω του συναγωνισμού της με την 7-δεϋδροχοληστερόλη για τα φωτόνια UV-B. Ακόμη, ρυθμιστικά στην παραγωγή της προβιταμίνης λειτουργεί η ίδια η ηλιακή ακτινοβολία. Όταν γίνει στο δέρμα η παραγωγή της προβιταμίνης D<sub>3</sub>, τότε μπορεί να ακολουθήσει 2 οδούς: είτε να τροποποιηθεί σε βιολογικά αδρανές μόριο, μέσω απορρόφησης ακτινοβολίας, είτε να ισομεριστεί σε βιταμίνη D<sub>3</sub>.

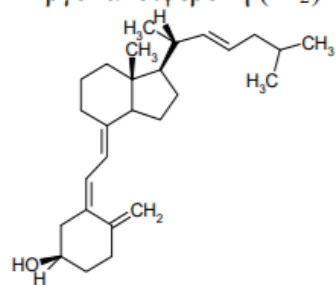
### **1.3.2. Χημικά χαρακτηριστικά & Ιδιότητες**

Η βιταμίνη D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> που αποτελούν τις χημικές δομές της βιταμίνης D (Σχήμα 1.3.1) διαφοροποιούνται μόνο στην πλευρική αλυσίδα στον C-17. Σ' αυτό το σημείο, υπάρχει ένας διπλός δεσμός και μια πρόσθετη ομάδα μεθυλίου στη βιταμίνη D<sub>2</sub>. Ακόμη, οι πρόδρομες προβιταμίνες έχουν στο μόριό τους τέσσερις (4) βενζοϊκούς δακτυλίους, ενώ οι βιταμίνες D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> έχουν στο μόριό τους τρεις (3) δακτυλίους. Έτσι, το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης των βιταμινών D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> προκαλείται από αυτό το σύστημα.

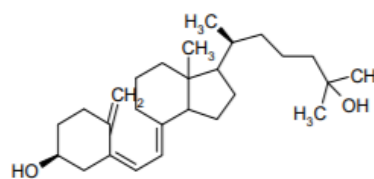
Έχει γίνει απομόνωση και προσδιορισμός σχεδόν 50 διαφορετικών μεταβολιτών των D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> βιταμινών. Η εργοκαλσιφερόλη, η χοληκαλσιφερόλη, οι προβιταμίνες τους και οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες αποτελούν τις κύριες ενώσεις της βιταμίνης D που υπάρχουν σε τρόφιμα. Είναι σημαντικό κατά τον υπολογισμό της περιεκτικότητας τροφίμων σε βιταμίνη D να υπάρχει αξιόπιστη εκτίμηση της ποσότητάς της.



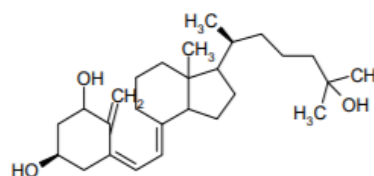
Εργοκαλσιφερόλη (D<sub>2</sub>)



Χοληκαλσιφερόλη (D<sub>3</sub>)



25-υδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>  
(Καλσιδιόλη)



1,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>  
(Καλσιτριόλη)

Πηγή: Morrissey & Hill, 2009

Σχήμα 1.3.1: Κυριότεροι μεταβολίτες της Βιταμίνης D

### 1.3.3. Μεταβολισμός & Φυσιολογικές λειτουργίες

Μια από τις τέσσερις λιποδιαλυτές βιταμίνες με σημαντικές βιολογικές δράσεις είναι η βιταμίνη D. Η χημική της δομή (στεροειδές) επιβεβαιώθηκε όταν η ομάδα του Windaus με πρωτοποριακό πειραματικό τρόπο πραγματοποίησε τη χημική σύνθεση των αναλόγων της.

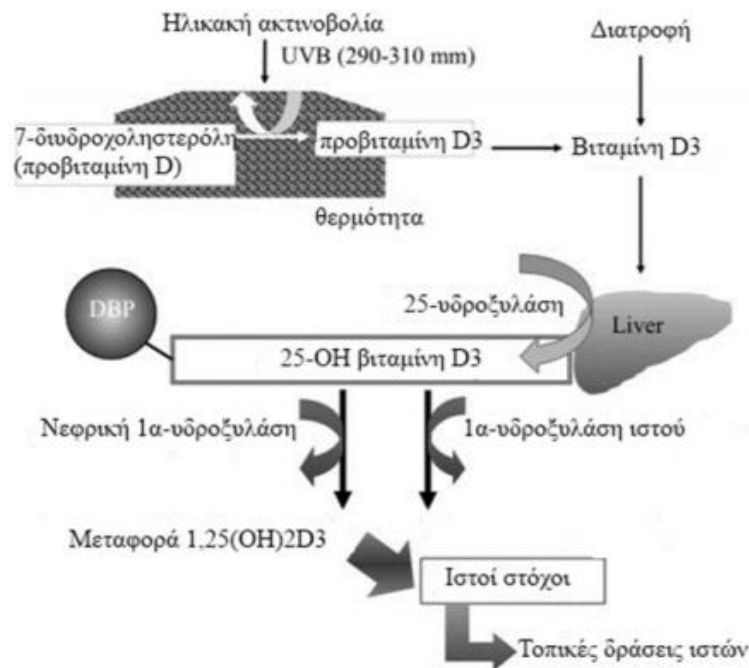
Ο μεταβολισμός του ασβεστίου και των οστών είναι ο σημαντικότερος ρόλος της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D εμπλέκεται στη διατήρηση της σταθερότητας των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων συγκεντρώσεων του φωσφόρου και του ασβεστίου. Παρ' όλα αυτά, πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την ομοιοστασία του ασβεστίου και τη βιταμίνη D με ένα πολυάριθμες εξωσκελετικές διαταραχές όπως καρκίνο του παχέος εντέρου, ψωρίαση, νευρομυϊκές διαταραχές και σκλήρυνση κατά πλάκα.

Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D ξεκινάει από το ήπαρ και συνεχίζει, με την προσθήκη υδροξυλικών ομάδων, σε συγκεκριμένα νεφρικά κύτταρα και αυτό συμβαίνει ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης της,

Ο δραστικός τύπος της βιταμίνης D είναι η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D που αποτελεί και το τελικό αποτέλεσμα των αλλαγών που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Πιο αναλυτικά, ένα στεροειδές το οποίο συσσωρεύεται στο δέρμα αλλά όχι στους άλλους ιστούς, είναι η 7-διυδροχοληστερόλη (προβιταμίνη D) που αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν στη σύνθεση της χοληστερόλης. Αυτό το στεροειδές, μέσω της έκθεσής του στη UV ακτινοβολία,

υφίσταται μια μη ενζυμική αντίδραση, οδηγώντας στην παραγωγή της προβιταμίνης D<sub>3</sub>. Αυτή μετέπειτα υποβάλλεται για αρκετές ώρες σε περαιτέρω διεργασία έτσι ώστε να παραχθεί χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>3</sub>), η οποία εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος.

Η βιταμίνη D<sub>3</sub> (χοληκαλσιφερόλη), η οποία είτε προσλαμβάνεται από τη τροφή είτε συντίθεται στο δέρμα, υπόκειται δύο υδροξυλίωσεις και έτσι δημιουργείται η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D ή καλσιτριόλη, που είναι και ο ενεργός μεταβολίτης. Η βιταμίνη D<sub>2</sub> (ή εργοκαλσιφερόλη) από τα τρόφιμα υφίσταται παρόμοια υδροξυλίωση με την χοληκαλσιφερόλη, από την οποία παράγεται η εργοκαλσιτριόλη. Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D ξεκινάει από το ήπαρ. Εκεί υφίστανται υδροξυλίωση και δημιουργείται η καλσιδιόλη. Η καλσιδιόλη είναι 25-υδροξυπαράγωγο το οποίο, προσδεμένο με μια δεσμεύουσα της βιταμίνης D σφαιρίνη, απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η βιταμίνη D δεν συσσωρεύεται στους ιστούς. Ο κύριος τύπος αποθηκευμένης βιταμίνης D, που εμφανίζει και τις περισσότερες εποχιακές διακυμάνσεις στα εύκρατα κλίματα, είναι η 25- υδροξυβιταμίνη D (καλσιδιόλη) πλάσματος. Έπειτα, στα νεφρά λαμβάνει χώρα το δεύτερο στάδιο του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Εκεί, η 25-υδροξυβιταμίνη D υπόκειται σε υδροξυλίωση της οποίας παράγωγο είναι η 1,25- διυδροξυβιταμίνη D (καλσιτριόλη, ενεργός μεταβολίτης). Μπορεί όμως να υποστεί υδροξυλίωση από την οποία παράγεται η 24,25-διυδροξυβιταμίνη D (24-υδροξυκαλσιδιόλη), ένας ανενεργός μεταβολίτης.



Πηγή: Morrissey & Hill, 2009

Σχήμα 1.3.2: Μεταβολισμός βιταμίνης D

Η διέγερση της ενεργητικής απορρόφησης ασβεστίου από το έντερο είναι ο κύριος ρόλος της καλσιτριόλης (1,25-υδροξυβιταμίνης D). Έτσι, σε περιπτώσεις ανεπάρκειας της βιταμίνης D η κύρια επίδραση είναι η περιορισμένη εντερική απορρόφηση ασβεστίου η οποία προκαλεί ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο πλάσμα. Η ποσότητα της καλσιτριόλης (1,25- διυδροξυβιταμίνης D) υπόκειται σε φυσιολογικό έλεγχο στο αίμα. Το δεύτερο στάδιο υδροξυλίωσης είναι, το οποίο λαμβάνει χώρα στους νεφρούς, είναι και το σημαντικότερο σημείο ελέγχου. Η παραθορμόνη, η οποία παράγεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες και είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη, διεγείρει το ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίστοιχη αντίδραση. Έτσι η μειωμένη συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα προκαλεί την έκκριση της παραθορμόνης. Αυτή η έκκριση, ενισχύει την παραγωγή της καλσιτριόλης (1,25-διυδροξυβιταμίνη D) και αυτές οι δύο ορμόνες συμβάλλουν στην τάση επαναφοράς φυσιολογικών τιμών ασβεστίου στο πλάσμα (Σχήμα 1.3.2).

Όπως προαναφέρθηκε, ο έλεγχος της ομοιόστασης του ασβεστίου είναι η βασική λειτουργία της βιταμίνης D. Έτσι, είναι φανερό πως η ρύθμιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D γίνεται στο επίπεδο της 1 ή 24- υδροξυλίωσης και αυτή η ρύθμιση κατευθύνεται από παράγοντες που ανταποκρίνονται στα επίπεδα φωσφορικών και ασβεστίου στο πλάσμα.

Η καλσιτριόλη (1,25-διυδροξυβιταμίνη D) η οποία παράγεται από τους νεφρούς, δρα ως στεροειδής ορμόνη και είναι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D, αλληλεπιδρά τόσο με τους πυρηνικούς υποδοχείς της, που ονομάζονται VDR (Vitamin D Receptors), όσο και με τους υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών. Μέσω των VDR ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων και έχουν ταυτοποιηθεί σε περισσότερα από 30 όργανα, όπως στους νεφρούς, στο έντερο, στα οστά, στους μύες και τους πνεύμονες.

Οι βιολογικές δράσεις της καλσιτριόλης (1,25-διυδροξυβιταμίνη D), χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1. Συμπεριλαμβάνονται λειτουργίες όπως κυτταρική ανάπτυξη και ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, δράσεις δηλαδή οι οποίες δεν σχετίζονται με τον μεταβολισμό του ασβεστίου
2. Σχετίζονται με την ομοιόσταση του ασβεστίου

Η κύρια δράση της καλσιτριόλης (1,25-διυδροξυβιταμίνη D), είναι η διατήρηση των επιπέδων φωσφόρου και ασβεστίου στο φυσιολογικό αποδεκτό εύρος. Είναι πολύ σημαντική η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων ορού του ασβεστίου. Αυτό συμβαίνει επειδή τα φυσιολογικά επίπεδα ασβεστίου χρειάζονται για την σωστή σύσπαση των μυών, επιμετάλλωση των οστών και πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Η καλσιτριόλη (1,25-διυδροξυβιταμίνη D), ασκεί πολυάριθμες ρυθμιστικές δράσεις, στις οποίες αποτελεί σημαντικό αλλά όχι αρκετό παράγοντα. Κάποιες από αυτές τις δράσεις είναι η απέκκριση και σύνθεση θυρεοειδών και παραθυρεοειδών ορμονών, η απέκκριση ινσουλίνης και η ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



#### 1.3.4. Πηγές & ημερήσιες ανάγκες

Τα ηπατέλαια και κυρίως τα ιχθυέλαια των ψαριών είναι οι σημαντικότερες πηγές της βιταμίνης D. Το μωρουνέλαιο είναι η κυριότερη πηγή. Άλλες τροφές όπως το τυρί και το βούτυρο περιέχουν επίσης βιταμίνη D. Το μόνο λαχανικό που περιέχει βιταμίνη D είναι τα μανιτάρια.

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D, μπορεί να οφείλεται τόσο στην μειωμένη πρόσληψή της από τις τροφές, όσο και στην μη επαρκή σύνθεση της από το δέρμα υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας. Τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D στους ενήλικες (25-υδροξυβιταμίνη D <20ng/ml στο πλάσμα), είναι πιθανό να συμβάλλουν στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών, όπως ψυχιατρικές ασθένειες, καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και II και υπέρταση. Σήμερα για την εκτίμηση της επάρκειας της βιταμίνης D χρησιμοποιείται η μέτρηση της 25(OH)D του ορού.

Η χρήση διαφορετικών πληθυσμών αναφοράς από τους επιστήμονες στις έρευνες αποτελεί το κύριο πρόβλημα στον προσδιορισμό επάρκειας των επιπέδων βιταμίνης D. Από αρκετούς επιστήμονες συστήνεται να θεωρείται έλλειψη βιταμίνης D όταν αυτή βρίσκεται σε επίπεδα χαμηλότερα από τα 12 ng/ml. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως δεν υπάρχει σύμφωνη γνώμη για το κατώφλι έλλειψης ή επάρκειας, όμως υπάρχει μια αυξητική τάση του κατώτερου φυσιολογικού ορίου. Σύμφωνα με νεότερες μελέτες, το κατώτερο φυσιολογικό σε ενήλικες άνω των 49 ετών ορίζεται η τιμή των 20ng/ml

Ακόμη μια μέθοδος ήπιας έλλειψης της βιταμίνης D είναι ο υπολογισμός της μείωσης της PTH ύστερα την αναπλήρωση με βιταμίνη D. Όταν η μείωση της PTH μειώνεται είναι μεγαλύτερη από 15-20% μετά την αναπλήρωση με βιταμίνη D, τότε εαυτό είναι πιθανό να σημαίνει κλινικά σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης D.

*Πίνακας 1.3.1: Συνιστώμενες προσλαμβανόμενες ποσότητες βιταμίνης D*

Vitamin D (μg/d)				
Φύλο	Ηλικία	ΣΗΔ <sup>1</sup>	ΑΕ <sup>2</sup>	ΥΜΑ <sup>3</sup>
Αντρες	9-13	15	100	10
	14-18	15	100	10
	19-30	15	100	10
	31-50	15	100	10
	51-70	15	100	10
	>70	20	100	10
Γυναίκες	9-13	15	100	10
	14-18	15	100	10
	19-30	15	100	10
	31-50	15	100	10
	51-70	15	100	10
	>70	20	100	10

Πηγή: (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, National Academies, 2012)

## 1.4. ANTIΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

### 1.4.1. Γενικά

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στον τομέα της χημείας των ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες (αντιδραστικά είδη οξυγόνου και αντιδραστικά είδη αζώτου) δημιουργούνται από το σώμα μας από διάφορα ενδογενή συστήματα, έκθεση σε διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες ή παθολογικές καταστάσεις. Η ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών είναι απαραίτητη για τη σωστή φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Εάν οι ελεύθερες ρίζες υπερισχύσουν της ικανότητας του σώματος να τις ρυθμίζει, προκύπτει μια κατάσταση γνωστή ως οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες έτσι, μεταβάλλουν δυσμενώς τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά ανθρώπινων ασθενειών. Επομένως, η εφαρμογή εξωτερικής πηγής αντιοξειδωτικών μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες.

### 1.4.2. Ελεύθερες ρίζες

Μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί ως οποιοδήποτε μοριακό είδος ικανό ανεξάρτητης ύπαρξης που περιέχει ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο σε ένα ατομικό τροχιακό. Η

παρουσία ενός μη ζευγαρωμένου ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα ορισμένες κοινές ιδιότητες που μοιράζονται οι περισσότερες ρίζες. Πολλές ρίζες είναι ασταθείς και ιδιαίτερα αντιδραστικές. Μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, επομένως συμπεριφέρονται ως οξειδωτικά ή αναγωγικά. Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο σε πολλές ασθένειες είναι η ρίζα υδροξυλίου, η ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και το απλό οξυγόνο. Αυτά είναι εξαιρετικά αντιδραστικά είδη, που βρίσκονται στον πυρήνα και στις μεμβράνες των κυττάρων και δημιουργούν βλάβες σε μόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν σημαντικά μακρομόρια οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και διαταραχές στην ομοιόσταση. Οι στόχοι των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνουν όλα τα είδη μορίων στο σώμα. Μεταξύ αυτών, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες είναι οι κύριοι στόχοι.

### **1.4.3 Παραγωγή ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα**

Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται είτε από φυσιολογικές βασικές μεταβολικές διεργασίες στο ανθρώπινο σώμα είτε από εξωτερικές πηγές όπως έκθεση σε ακτίνες X, όζον, κάπνισμα, ατμοσφαιρικούς ρύπους και βιομηχανικές χημικές ουσίες. Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών συμβαίνει συνεχώς στα κύτταρα ως συνέπεια τόσο των ενζυμικών όσο και των μη ενζυμικών αντιδράσεων.

- Οι ενζυμικές αντιδράσεις, που συνεισφέρουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, περιλαμβάνουν εκείνες που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα, στη φαγοκυττάρωση, στη σύνθεση προσταγλανδινών και στο σύστημα κυτοχρώματος P-450.
- Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να σχηματιστούν από μη ενζυμικές αντιδράσεις οξυγόνου με οργανικές ενώσεις.

Μερικές εσωτερικές πηγές ελεύθερων ριζών είναι τα μιτοχόνδρια, η οξειδάση της ξανθίνης, τα υπεροξειδιοσώματα, η φλεγμονή και η φαγοκυττάρωση. Μερικές εξωτερικές πηγές ελεύθερων ριζών είναι ο καπνός τσιγάρου, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, η ακτινοβολία, ορισμένα φάρμακα, φυτοφάρμακα, βιομηχανικοί διαλύτες και το όζον.

### **1.4.4. Ελεύθερες ρίζες στη βιολογία**

Οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών αναμένεται να προκαλέσουν προοδευτικά δυσμενείς αλλαγές που συσσωρεύονται με την ηλικία σε όλο το σώμα. Αυτές οι «φυσιολογικές» αλλαγές με την ηλικία είναι σχετικά κοινές σε όλους. Ωστόσο, σε αυτό το κοινό μοτίβο αλλαγών, υπάρχουν γενετικές και περιβαλλοντικές διαφορές που αντεπιτίθενται και ρυθμίζουν τη βλάβη των ελεύθερων ριζών. Αυτά εκδηλώνονται ως ασθένειες σε ορισμένες ηλικίες που καθορίζονται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς

παράγοντες. Ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση, δύο κύριες αιτίες θανάτου, είναι συχνές ασθένειες «ελεύθερων ριζών».

#### **1.4.5. Οξειδωτικό στρες**

Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση της οξειδωτικής βλάβης που προκύπτει όταν η κρίσιμη ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας είναι δυσμενής. Το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας, σχετίζεται με βλάβη σε ένα ευρύ φάσμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Βραχυπρόθεσμο οξειδωτικό στρες μπορεί να εμφανιστεί σε τραυματισμένους ιστούς από λοίμωξη, από θερμότητα, τοξίνες και υπερβολική άσκηση. Αυτοί οι τραυματισμένοι ιστοί παράγουν αυξημένες ποσότητες ενζύμων που δημιουργούν ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης, λιπογενάση, κυκλοοξυγενάση) και οδηγούν μετέπειτα στην ενεργοποίηση φαγοκυττάρων, απελευθέρωση ελεύθερου σιδήρου, ιόντων χαλκού ή διαταραχή των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, παράγοντας περίσσεια ROS. Η έναρξη, η προώθηση και η εξέλιξη του καρκίνου, καθώς και οι παρενέργειες της ακτινοβολίας και της χημειοθεραπείας, έχουν συνδεθεί με την ανισορροπία μεταξύ των ROS και του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος.

### **1.5. ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ**

#### **1.5.1. Γενικά**

Η μαλτοδεξτρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης (παράγεται με μερική υδρόλυση από το φυτικό άμυλο) και χρησιμοποιείται ως συστατικό τροφής καθώς είναι εύπεπτη. Συνήθως εντοπίζεται ως υγροσκοπική λευκή σκόνη που έχει στεγνώσει με ψεκασμό. Ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού η γεύση της διακρίνεται σε μέτρια γλυκιά ή σχεδόν άγευστη και η απορρόφησή της γίνεται τόσο γρήγορα όσο και η γλυκόζη. Βρίσκεται και ως συστατικό σε μια σειρά επεξεργασμένων τροφίμων.

#### **1.5.2. Δομή**

Η μαλτοδεξτρίνη απαρτίζεται κατά κύριο λόγο από μείγμα αλυσίδων διαφορετικού μεγέθους, που διαφέρουν από 3 έως 17 μονάδες γλυκόζης. Αποτελείται από μονάδες D – γλυκόζης (οι οποίες συνδέονται κυρίως με α(1→4) γλυκοσιδικούς δεσμούς) ενωμένες σε αλυσίδες μεταβλητού μήκους.

Η ταξινόμηση των μαλτοδεξτρινών γίνεται κατά DE (ισοδύναμο δεξτρόζης) και μπορούν να έχουν DE μεταξύ 3 και 20. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή DE, τόσο μεγαλύτερη είναι η γλυκύτητα, τόσο μικρότερου μήκους είναι οι αλυσίδες γλυκόζης και τόσο μεγαλύτερη η διαλυτότητα.

### **1.5.3 Χρήσεις τροφίμων**

Η χρήση της μαλτοδεξτρίνης γίνεται για τη βελτίωση της αίσθησης τροφίμων και ποτών στο στόμα. Γίνεται επίσης χρήση της σε κάποια σνακ, όπως πατατάκια καθώς και σε "ελαφρύ" φυστικοβούτυρο για γίνει μείωση της περιεκτικότητάς του σε λιπαρά αλλά με διατηρημένη την υφή του. Η μαλτοδεξτρίνη λαμβάνεται επίσης μερικές φορές σε σκόνη ή ενεργειακά ποτά από αθλητές ως συμπλήρωμα διατροφής.

## **1.6. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ**

Ως ενθυλάκωση, ορίζεται η τεχνική κατά την οποία ένα μίγμα ουσιών ή ουσίες, περιβάλλονται από ένα άλλο υλικό (μέσο εγκλεισμού) ή ενσωματώνονται σε μια ετερογενή ή ομογενή μήτρα, καταλήγοντας στη δημιουργία μικρών καψουλών. Η τεχνική της ενθυλάκωσης έχει, εδώ και αρκετές δεκαετίες, πολλές εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία, τα τελευταία χρόνια όμως, χρησιμοποιείται ευρέως και στη βιομηχανία τροφίμων. Ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως από τις βιομηχανίες τροφίμων για ενθυλάκωση είναι βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, γλυκαντικά, συντηρητικά κ.τλ. Με τη συντήρησή τους μέσω της ενθυλάκωσης, φυλάσσονται από φυσικοχημικές μεταβολές που είναι πιθανό να συμβούν κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση τροφίμων όπως οξείδωση, εξάτμιση, θέρμανση και απορρόφηση υγρασίας. Η ενθυλάκωση έχει πολλά πλεονεκτήματα κάποια από τα οποία είναι η μεγιστοποίηση του χρόνου ζωής των προϊόντων καθώς και η αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών που βρίσκονται στο μέσο εγκλεισμού.

## **1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

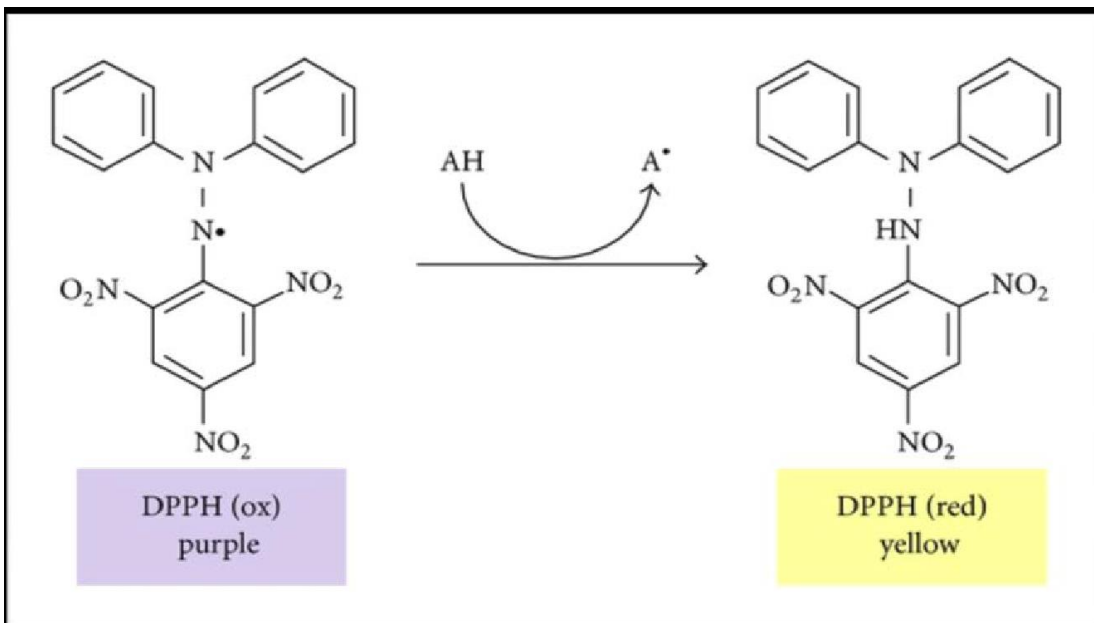
Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν σκόνες οι οποίες αποτελούνταν από βιταμίνες C ή/και D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη για το αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα αναψυκτικών. Συγκεκριμένα οι σκόνες εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση πριν καθώς και μετά την προσθήκη τους σε αναψυκτικό (ανθρακούχος πορτοκαλάδα). Η εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε με τις μεθόδους DPPH, ABTS και Αναγωγική Δύναμη.

## **B' ΜΕΡΟΣ**

### **2.1. ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **2.1.1. Μέθοδος DPPH**

Η οργανική ρίζα του αζώτου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ) είναι μία από τις λίγες σταθερές εμπορικά διαθέσιμες ρίζες. Η αντίδρασή της με τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του πορφυρού διαλύματος της ρίζας, εξαιτίας της κατανάλωσης αυτής από τα αντιοξειδωτικά. Ο βαθμός του αποχρωματισμού μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.



Σχήμα 2.1.1: Αντίδραση της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό μόριο

#### **Πειραματική διαδικασία**

Την ημέρα πραγματοποίησης του πειράματος ετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• (1000  $\mu$ l μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100  $\mu$ M ρίζας DPPH•) και λόγω του ότι είναι φωτοευαίσθητο, καλύπτεται με αλουμινοχαρτό. Ετοιμάζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000  $\mu$ l. Τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φωτομετρούνται στα 517nm σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Το διάλυμα της ρίζας DPPH• σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

#### **Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Αρχικά υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών και η τυπική απόκλιση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος υπολογίζεται ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH• σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A0 - A\delta) / A0] \times 100$$

όπου:

A0: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

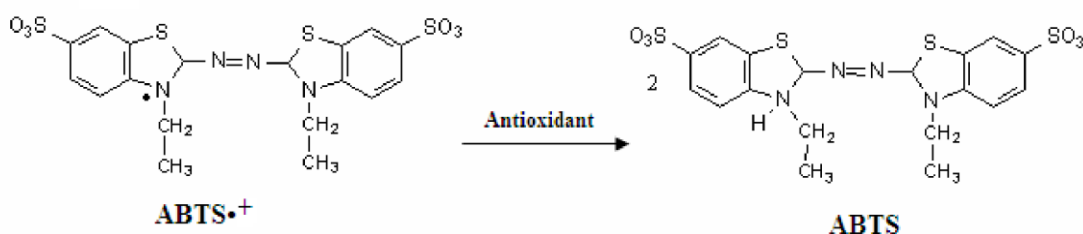
Aδ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε σχέση με το IC50. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC50 τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

### 2.1.2. Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) στηρίζεται στον αποχρωματισμό της μπλε/πράσινης ABTS<sup>•+</sup> ρίζας, μέσω της προσθήκης αντιοξειδωτικών ενώσεων. Αρχικά πραγματοποιείται ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια με την προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας εξετάζεται η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών μορίων ως προς την αναστολή της ρίζας, κάτι που γίνεται αντιληπτό από τον αποχρωματισμό του διαλύματος και συνεπώς τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm.

Η μέθοδος ABTS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολλών δειγμάτων ποτών, φρούτων εκχυλισμάτων κ.α.



Σχήμα 2.2.2: Αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

### Πειραματική διαδικασία

Στη μέθοδο αυτή, πρώτο βήμα αποτελεί η παρασκευή των διαλυμάτων τη μέρα εκτέλεσης του πειράματος και στη συνέχεια, επειδή είναι φωτοευαίσθητα, διατηρούνται σε σκιερό μέρος. Παράλληλα είναι θεμιτό να διατηρούνται σε πάγο.

- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα ABTS (1mM) σε τελικό όγκο αντίδρασης 10mL ζυγίζονται 10,97 mg ABTS και το διαλύεται σε H<sub>2</sub>O.
- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 30μM σε όγκο αντίδρασης 1mL δημιουργείται διάλυμα 600μM. Από το stock διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8,8M γίνεται αραιώση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ώστε να ετοιμαστεί το διάλυμα των 600μM.
- Για να ετοιμαστεί το διάλυμα HRP 6μM, γίνεται προσθήκη 1mg του ενζύμου σε 10mL αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια γίνεται αραιώση 1/20.

Τα διαλύματα προστίθενται με την εξής σειρά: 1) Διάλυμα ABTS, 2) Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3) Διάλυμα ενζύμου υπεροξειδάσης. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050μl. Γίνεται ανάδευση των δειγμάτων και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων τα οποία εξετάζονται εις τριπλούν φωτομετρικά, με μέτρηση της απορρόφησης στα 730nm. Το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

### **Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και η τυπική απόκλιση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος υπολογίζεται ως το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH• σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο

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

όπου:

A<sub>0</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου στα 730nm.

A<sub>d</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος στα 730nm.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε σχέση με το IC<sub>50</sub>. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

### **2.1.3. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης**

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

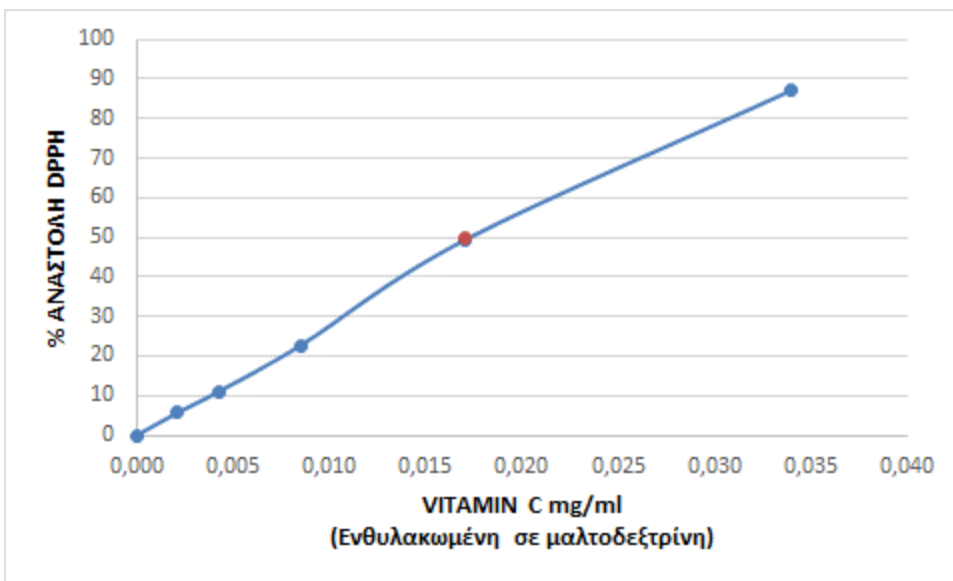
## **2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Οι σκόνες που προέκυψαν από την ενθυλάκωση των βιταμινών C και D σε μαλτοδεξτρίνη εξετάστηκαν in vitro για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους DPPH, ABTS και Αναγωγική δύναμη (Reducing Power). Επίσης, με τις ίδιες μεθόδους εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του αναψυκτικού (ανθρακούχος πορτοκαλάδα) στην οποία προστέθηκαν οι σκόνες που περιείχαν τις ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη βιταμίνες C και D.

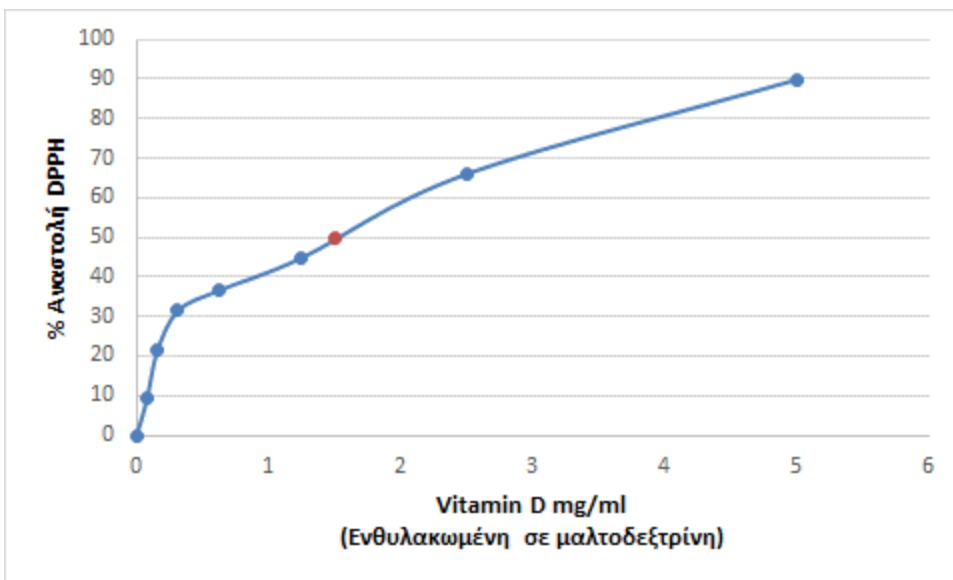


### 2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH

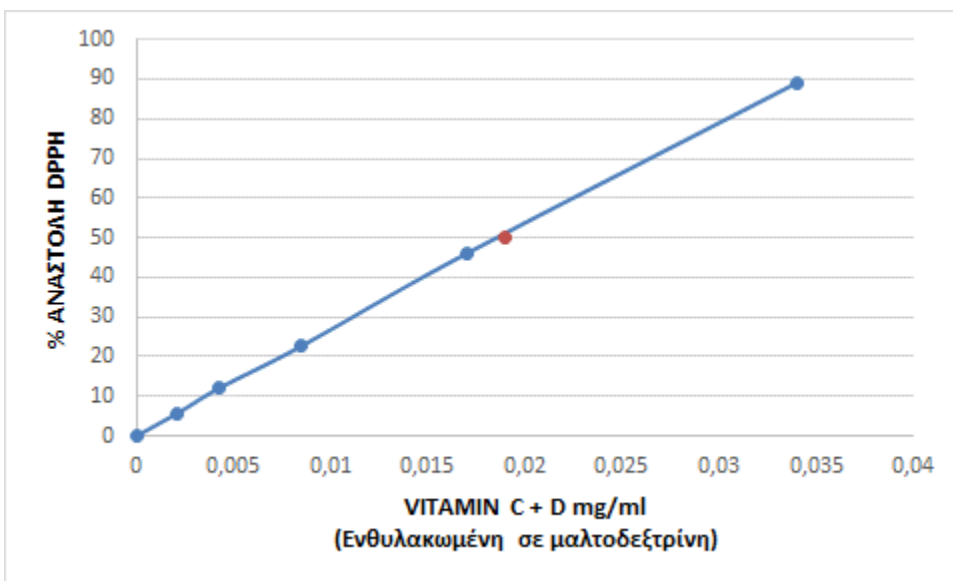
Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο DPPH για το κάθε εξεταζόμενο δείγμα φαίνονται στα διαγράμματα 1-8. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα όλα τα δείγματα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα τη ρίζα DPPH. Από κάθε διάγραμμα υπολογίστηκε για κάθε εξεταζόμενο δείγμα η τιμή IC50, δηλαδή η συγκέντρωση όπου το δείγμα εξουδετερώνει την ελεύθερη ρίζα κατά 50% (Πίνακας 3.2.1.). Οι τιμές IC50 για τις σκόνες κυμαινότανε από 0,017 έως 1,5 mg/ml. Η σειρά δραστηκότητας των σκονών ήταν: Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (0,019 mg/ml) = Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (0,017 mg/ml) > Βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (1,5 mg/ml). Η μαλτοδεξτρίνη από μόνη της όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4 στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις είχε αμελητέα δράση. Οι τιμές IC50 για τα αναφυκτικά κυμαινότανε από 11 έως 29 μl/ml (Πίνακας 2.3.1.). Η σειρά δραστηκότητας των αναφυκτικών ήταν: Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (13,5 μl/ml) = Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (11 μl/ml) > Πορτοκαλάδα (27 μl/ml) = Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (29 μl/ml).



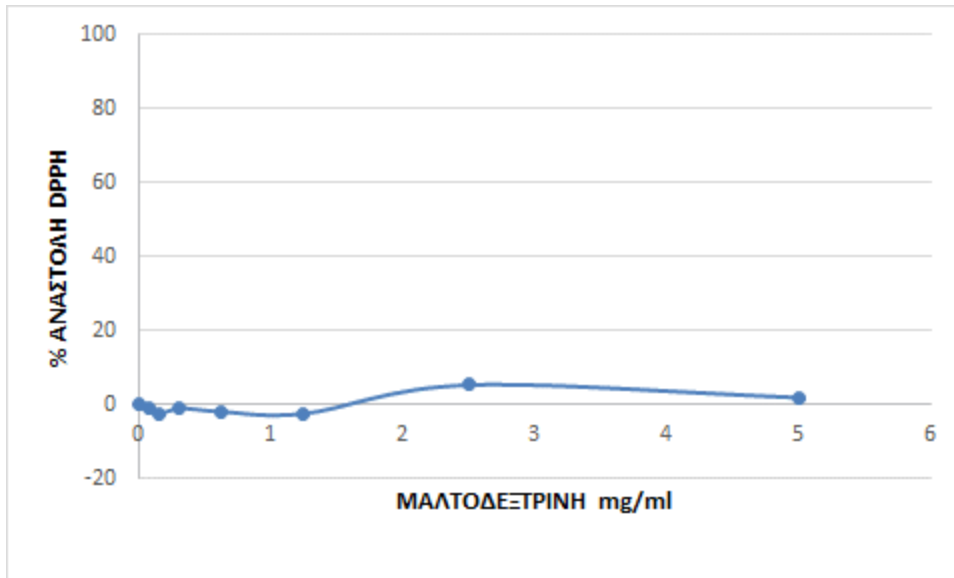
**Διάγραμμα 1.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη C που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



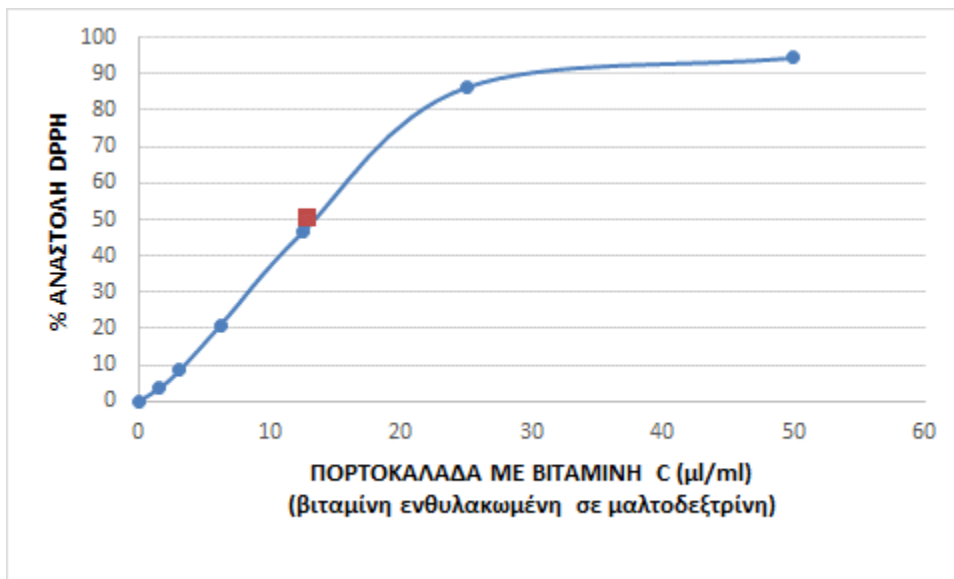
**Διάγραμμα 2.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη D που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



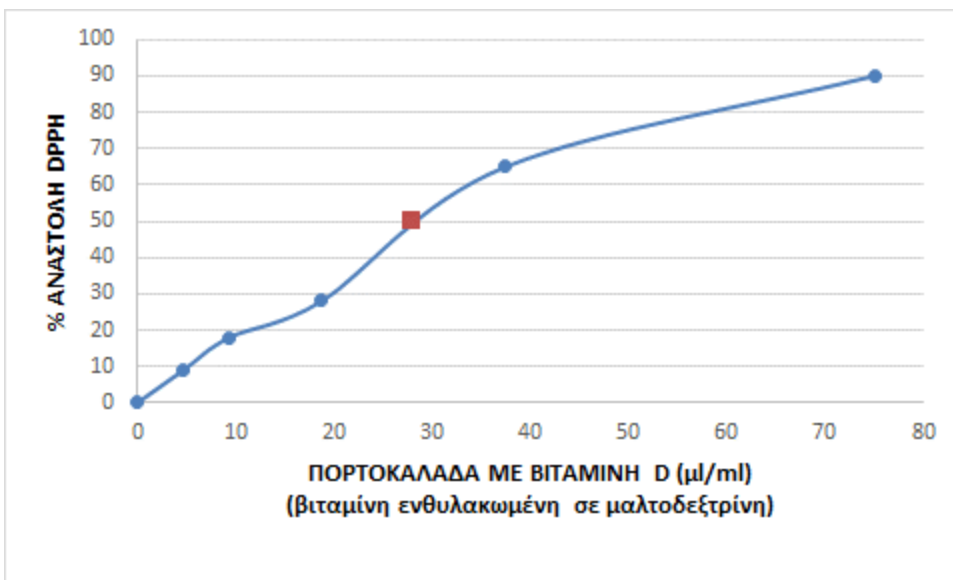
**Διάγραμμα 3.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη C και βιταμίνη D που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη.



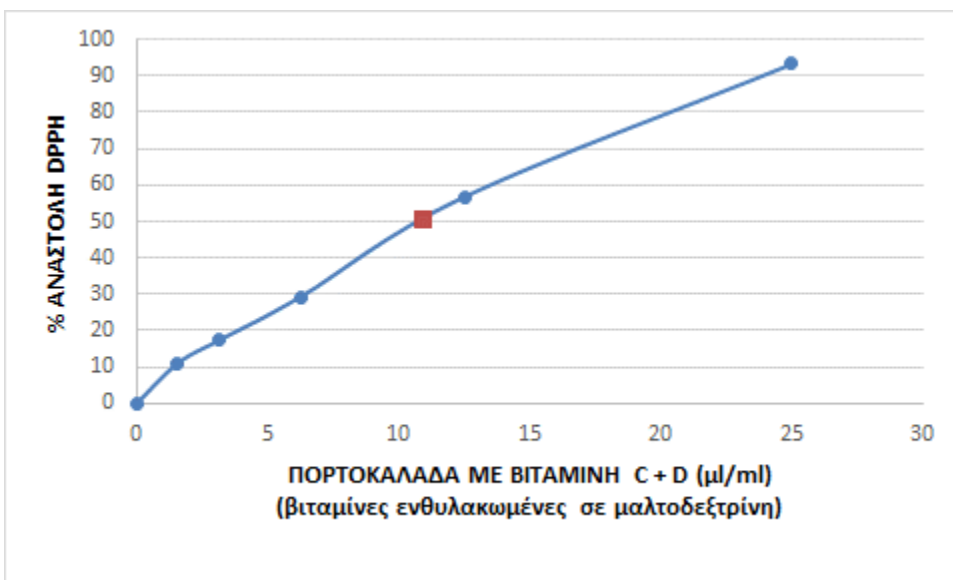
**Διάγραμμα 4.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από σκόνη που μαλτοδεξτρίνης.



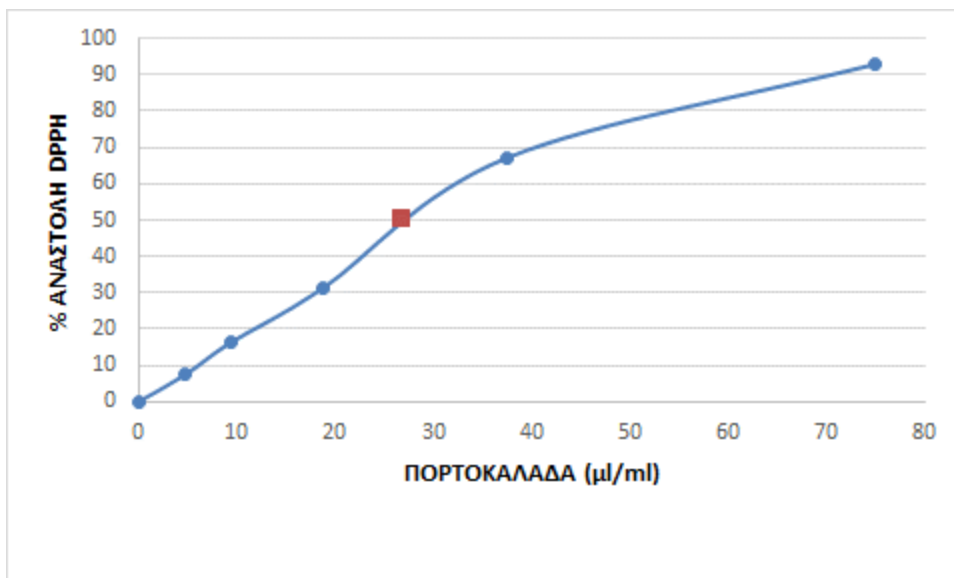
**Διάγραμμα 5.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκε βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.



**Διάγραμμα 6.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκε βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.



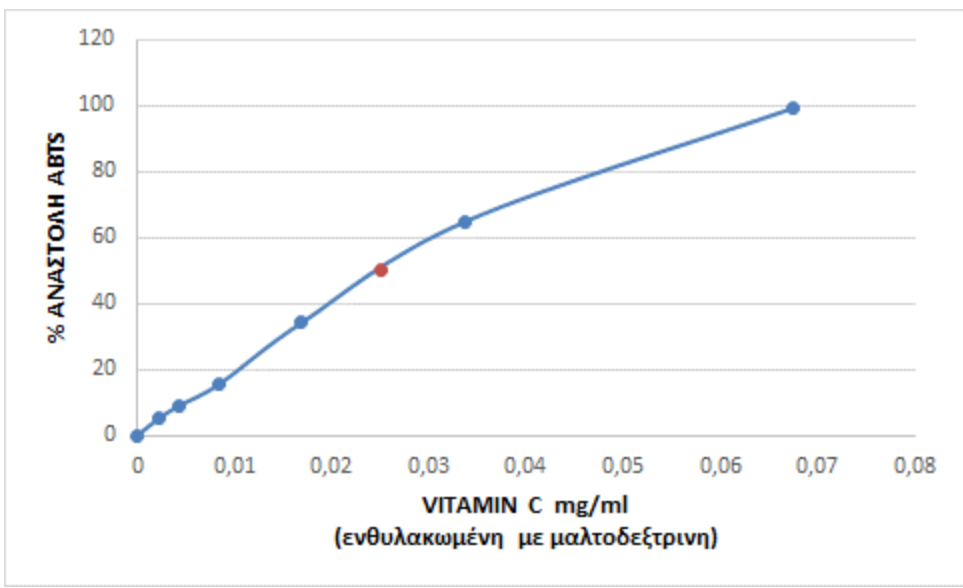
**Διάγραμμα 7.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκαν βιταμίνες C και D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη.



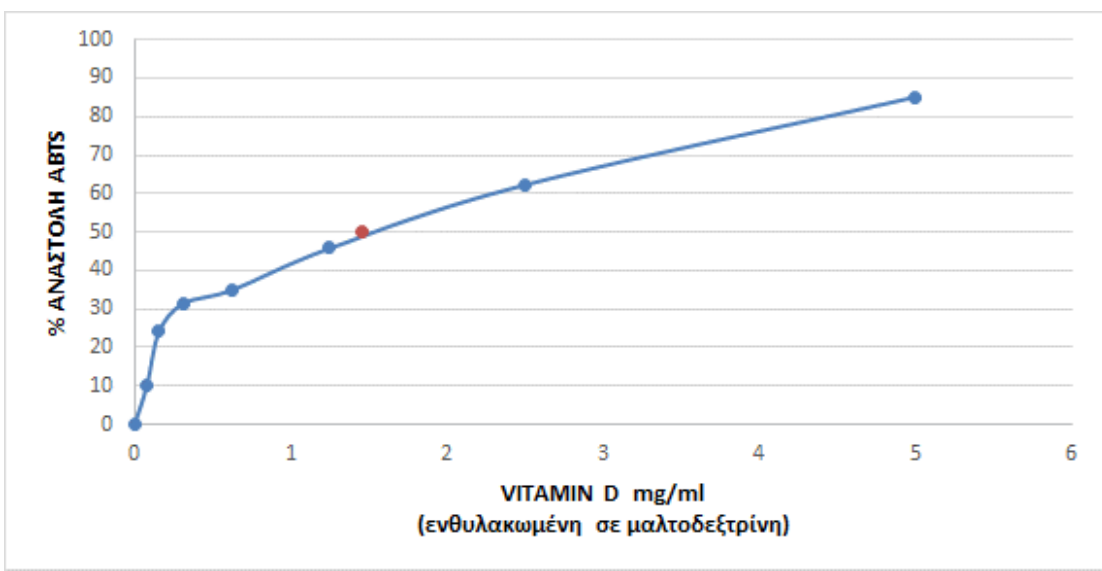
**Διάγραμμα 8.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από πορτοκαλάδα.

### 2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS.

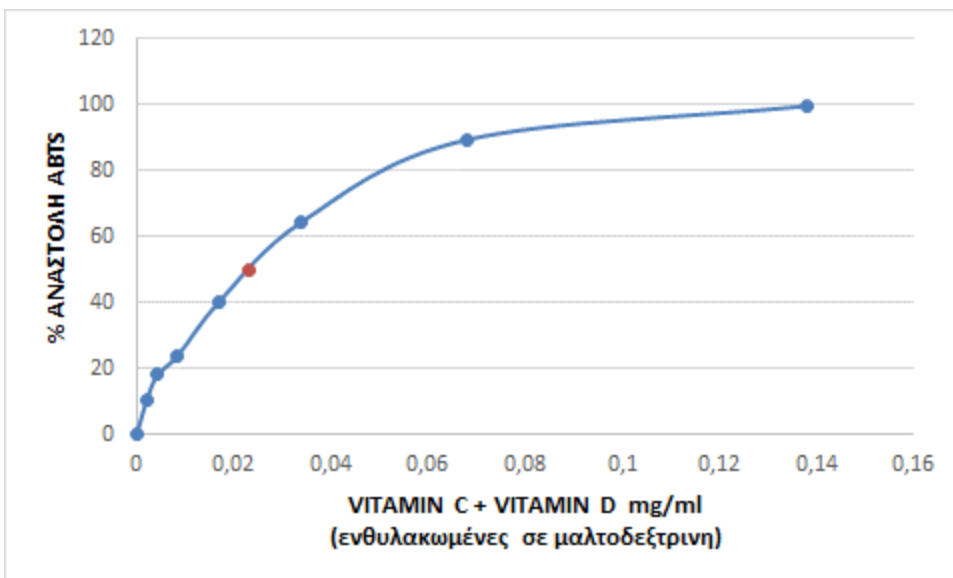
Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο ABTS για το κάθε εξεταζόμενο δείγμα φαίνονται στα διαγράμματα 9-16. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα όλα τα δείγματα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα τη ρίζα ABTS. Από κάθε διάγραμμα υπολογίστηκε για κάθε εξεταζόμενο δείγμα η τιμή  $IC_{50}$ , δηλαδή η συγκέντρωση όπου το δείγμα εξουδετερώνει την ελεύθερη ρίζα κατά 50% (Πίνακας 2.3.1.). Όσο μικρότερη η τιμή  $IC_{50}$  τόσο ισχυρότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Οι τιμές  $IC_{50}$  για τις σκόνες κυμαινότανε από 0,023 έως 1,45 mg/ml. Η σειρά δραστηριότητας των σκονών ήταν: Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (0,023 mg/ml) = Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (0,025 mg/ml) > Βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (1,45 mg/ml). Η μαλτοδεξτρίνη από μόνη της όπως φαίνεται στο διάγραμμα 12 στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις είχε πολύ μικρή δράση. Οι τιμές  $IC_{50}$  για τα αναψυκτικά κυμαινότανε από 7,5 έως 28 μl/ml (Πίνακας 2.3.1.). Η σειρά δραστηριότητας των αναψυκτικών ήταν: Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (7,5 μl/ml) = Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (9 μl/ml) > Πορτοκαλάδα (27 μl/ml) = Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (28 μl/ml).



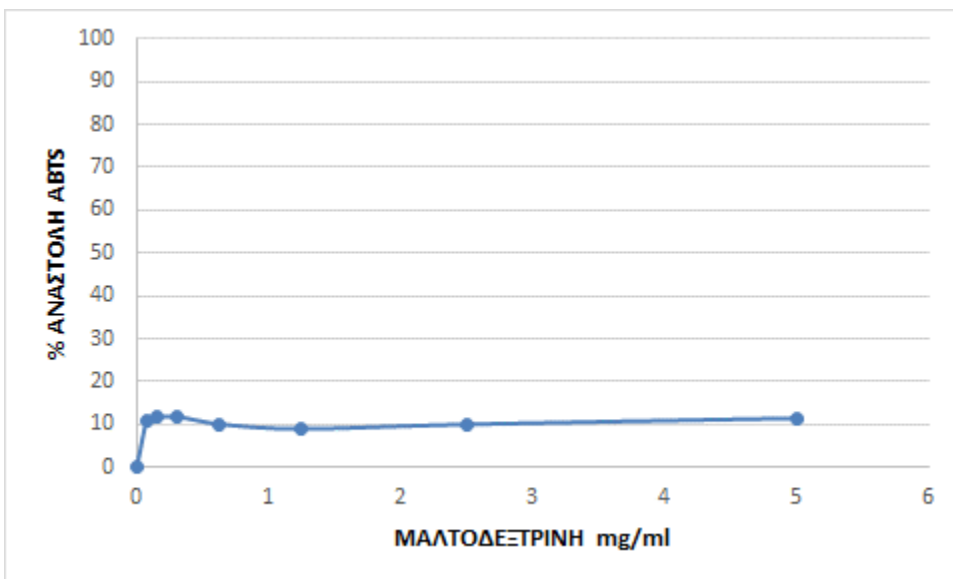
**Διάγραμμα 9.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη C που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



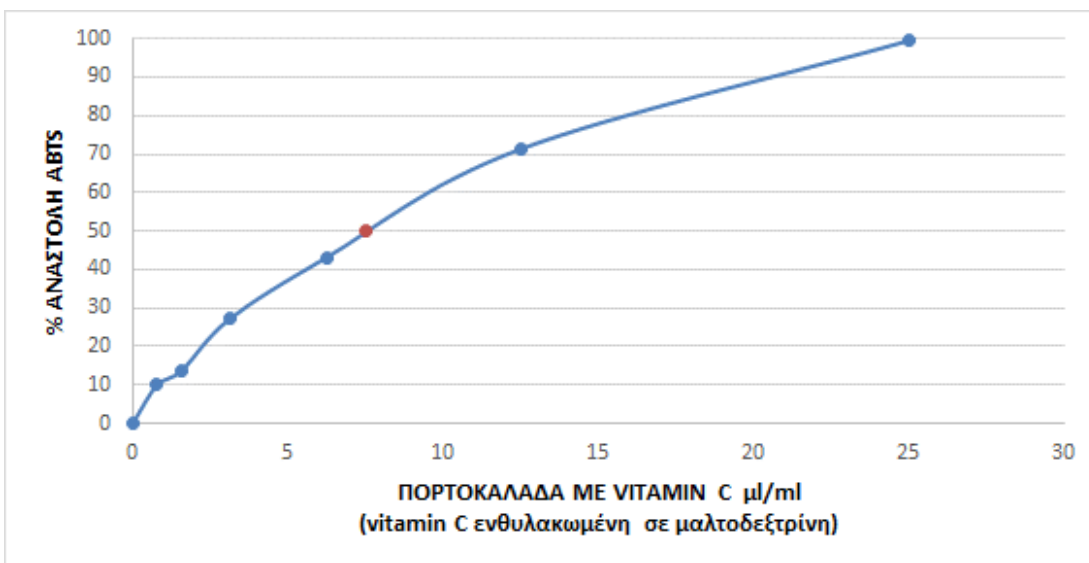
**Διάγραμμα 10.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη D που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



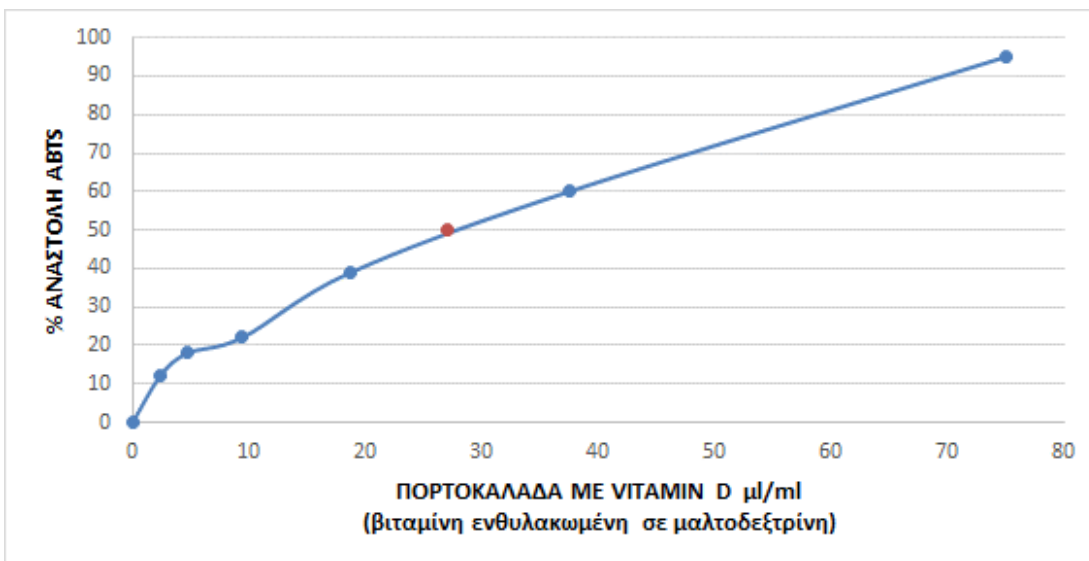
**Διάγραμμα 11.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τη σκόνη που αποτελούνταν από βιταμίνη C και βιταμίνη D που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη.



**Διάγραμμα 12.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από σκόνη που μαλτοδεξτρίνης.

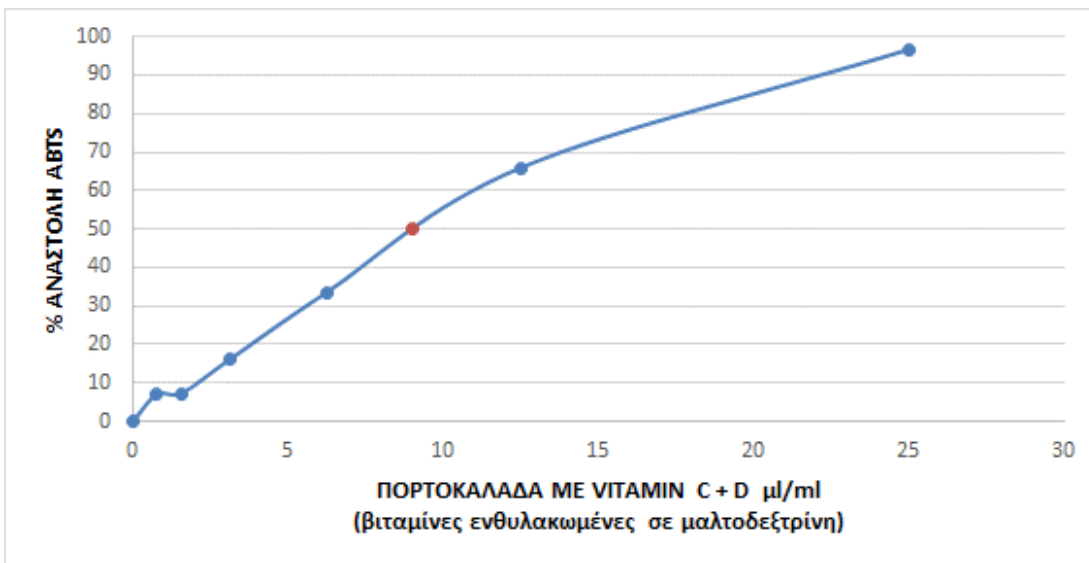


**Διάγραμμα 13.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκε βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.

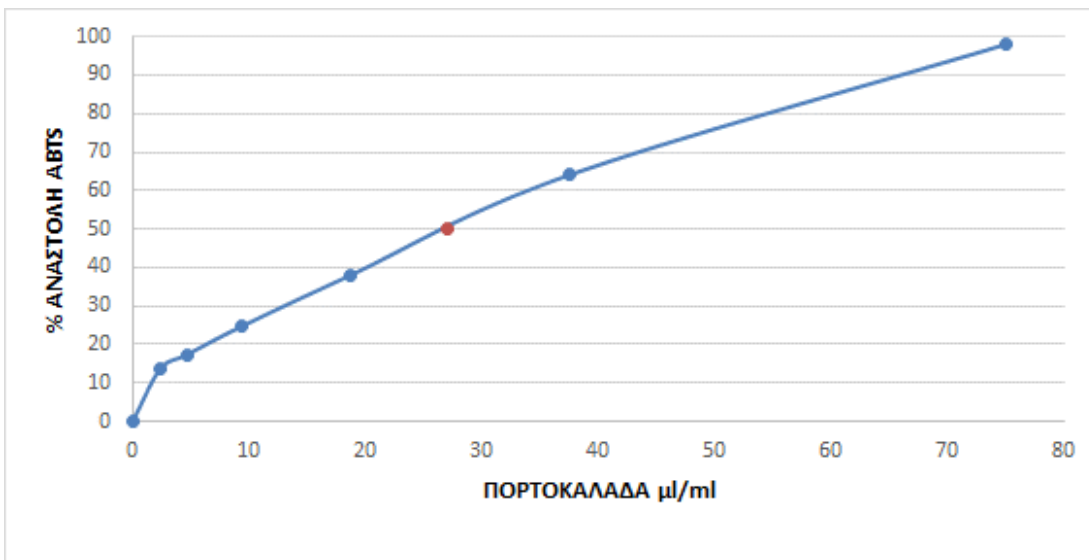


**Διάγραμμα 14.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκε βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.





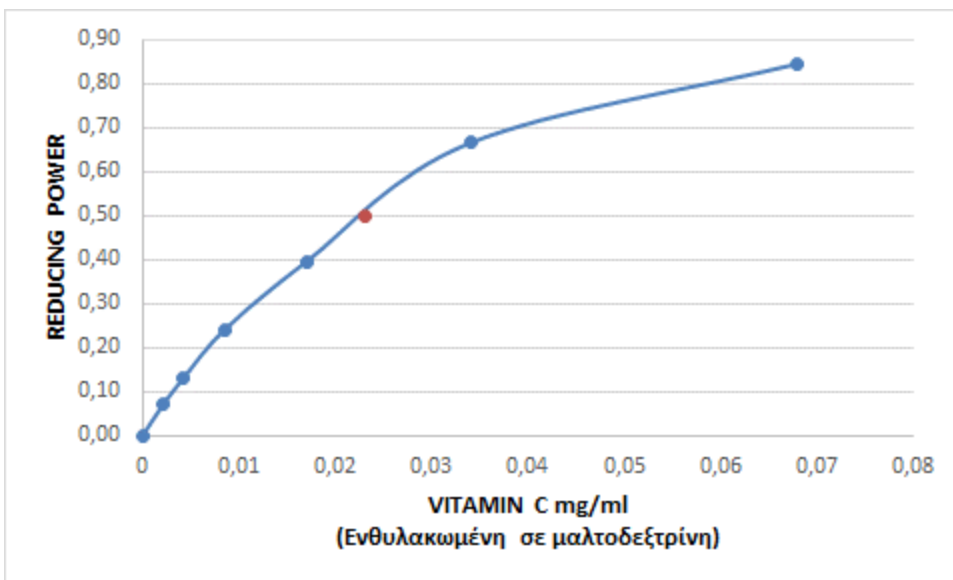
**Διάγραμμα 15.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από πορτοκαλάδα στην οποία προστέθηκαν βιταμίνη C και βιταμίνη D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη.



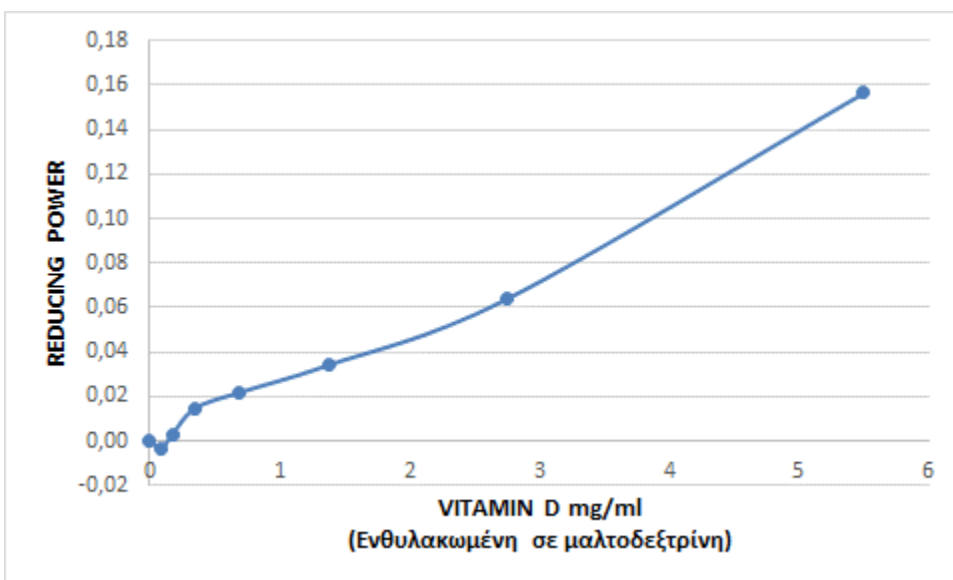
**Διάγραμμα 16.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας ΑΒΤS από πορτοκαλάδα.

### 2.2.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αναγωγικής δύναμης

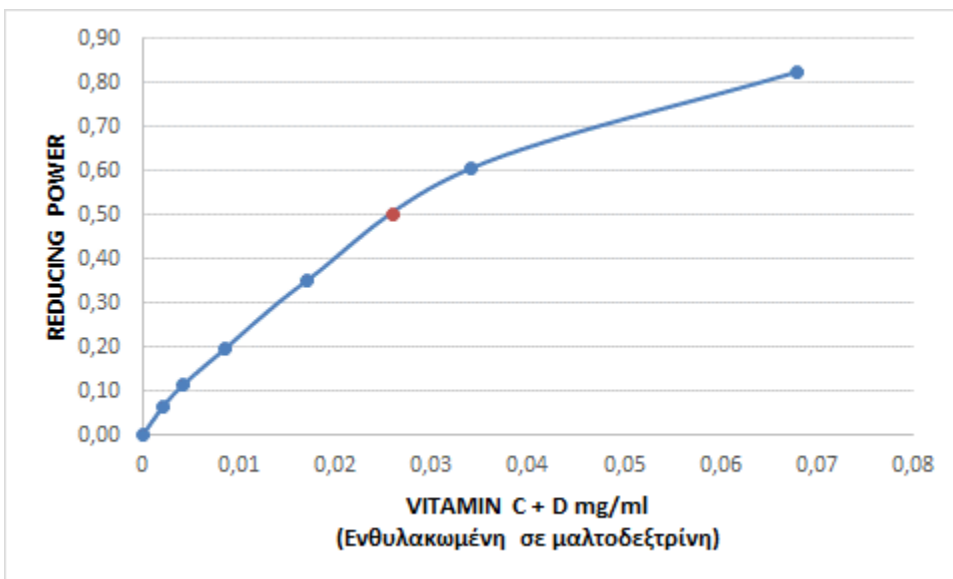
Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο Reducing Power για το κάθε εξεταζόμενο δείγμα φαίνονται στα διαγράμματα 17-24. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα όλα τα δείγματα έδειξαν δοσοεξαρτώμενη αναγωγική δύναμη. Από κάθε διάγραμμα υπολογίστηκε για κάθε εξεταζόμενο δείγμα η τιμή  $RP_{0,5AU}$ , δηλαδή η συγκέντρωση όπου το δείγμα παρουσιάζει τιμή απορρόφησης 0,5 (Πίνακας 2.3.1.). Οι τιμές  $RP_{0,5AU}$  για τις σκόνες κυμαινότανε από 0,023 έως 0,026 mg/ml. Η σειρά δραστηριότητας των σκονών ήταν: Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (0,026 mg/ml) = Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (0,023 mg/ml). Η σκόνη της Βιταμίνης D που ήταν ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις δεν έδειξε απορρόφηση 0,5. Μεγαλύτερη συγκέντρωση δεν γινότανε να εξεταστεί γιατί η σκόνη ήταν δυσδιάλυτη. Η μαλτοδεξτρίνη από μόνη της όπως φαίνεται στο διάγραμμα 20 στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις είχε αμελητέα δράση. Οι τιμές  $RP_{0,5AU}$  για τα αναψυκτικά κυμαινότανε από 9,5 έως 45 μl/ml (Πίνακας 1). Η σειρά δραστηριότητας των αναψυκτικών ήταν: Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (9,5 μl/ml) > Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη C+D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη (15 μl/ml) > Πορτοκαλάδα (44 μl/ml) = Πορτοκαλάδα με Βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη (45 μl/ml).



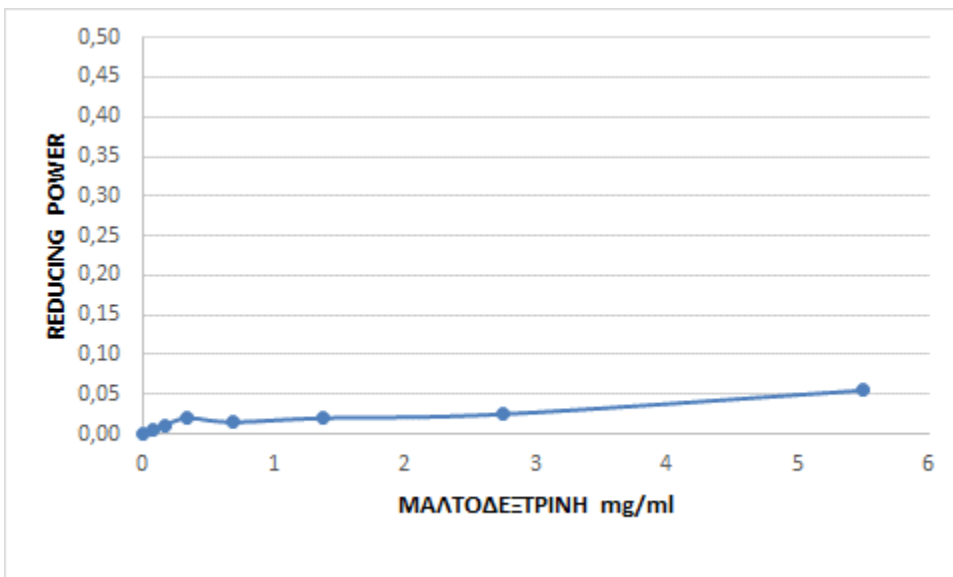
**Διάγραμμα 17.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της σκόνης που αποτελούνταν από βιταμίνη C που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



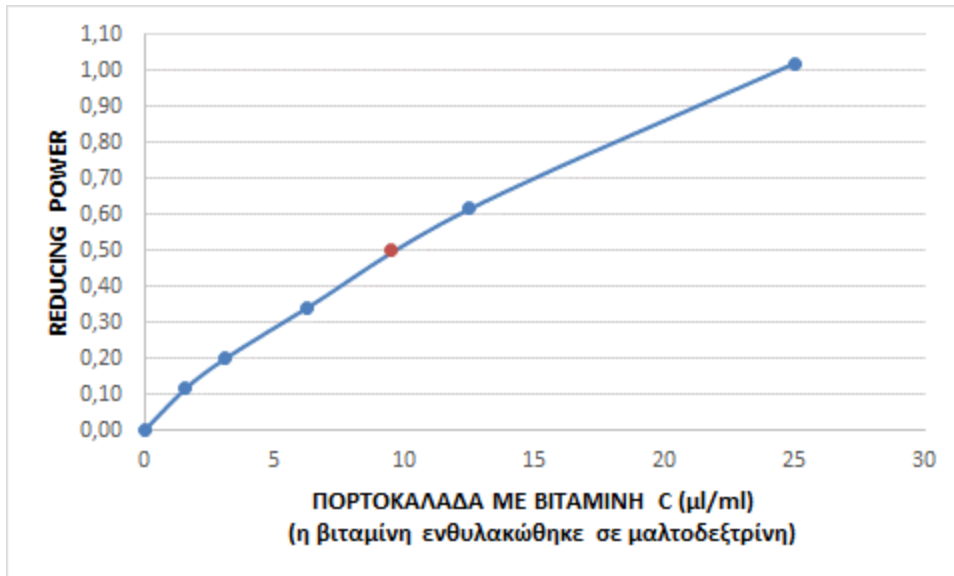
**Διάγραμμα 18.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της σκόνης που αποτελούνταν από βιταμίνη D που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη.



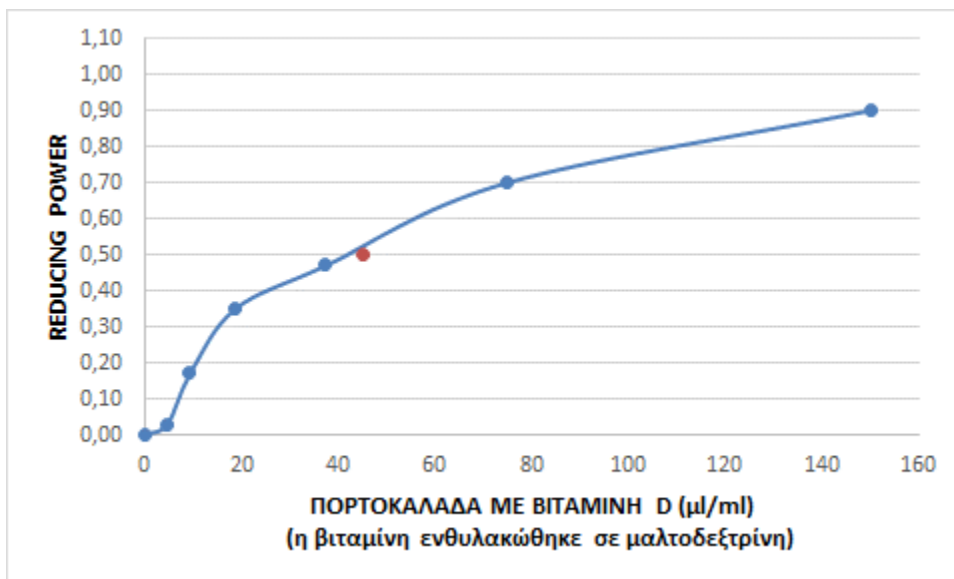
**Διάγραμμα 19.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της σκόνης που αποτελούνταν από βιταμίνες C και D που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη.



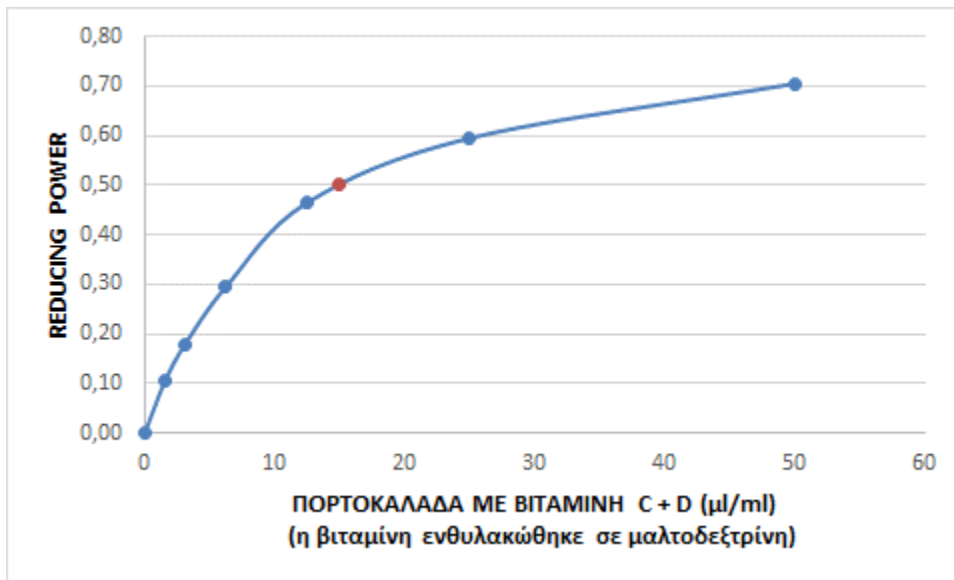
**Διάγραμμα 20.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της μαλτοδεξτρίνης.



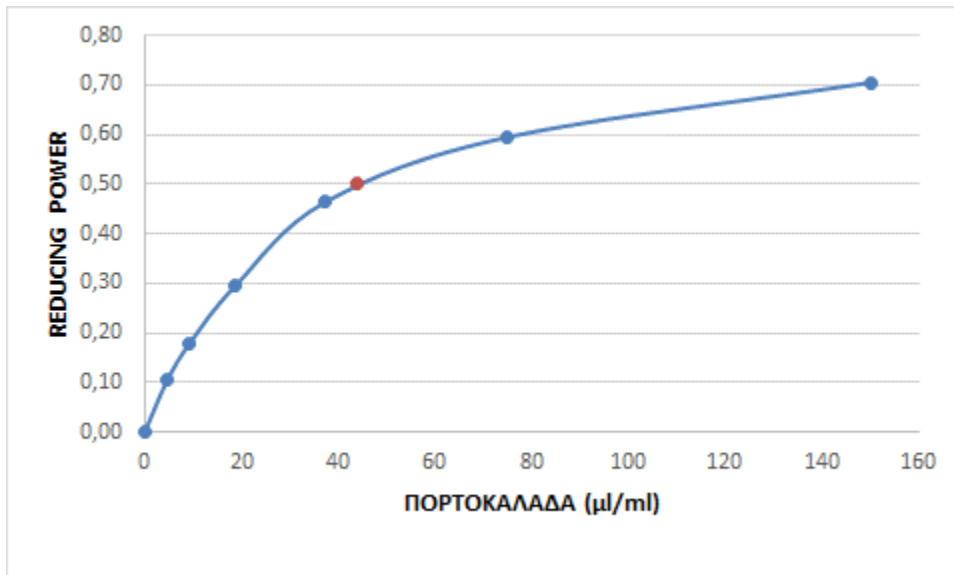
**Διάγραμμα 21.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της πορτοκαλάδας στην οποία προστέθηκε βιταμίνη C ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.



**Διάγραμμα 22.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της πορτοκαλάδας στην οποία προστέθηκε βιταμίνη D ενθυλακωμένη σε μαλτοδεξτρίνη.



**Διάγραμμα 23.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της πορτοκαλάδας στην οποία προστέθηκαν βιταμίνες C και D ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη.



**Διάγραμμα 24.** Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η αναγωγική ικανότητα της πορτοκαλάδας.

**Πίνακας 2.3.1** Ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών DPPH και ABTS\*<sup>α</sup> και αναγωγική ικανότητα των σκονών που αποτελούνταν από βιταμίνη C ή/και D μετά από ενθυλάκωσή τους σε μαλτοδεξτρίνη. Επίσης παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες τιμές για το αναψυκτικό (ανθρακούχος πορτοκαλάδα) στο οποίο προστέθηκαν οι ενθυλακωμένες σε μαλτοδεξτρίνη βιταμίνες C και D.

	ABTS <sup>α</sup> IC <sub>50</sub>	DPPH <sup>α</sup> IC <sub>50</sub>	REDUCING POWER <sup>α</sup> 0.5 AU
<b>ΣΚΟΝΗ VITAMIN C ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	0,025 ± 0,002* <sup>β</sup>	0,017 ± 0,001* <sup>β</sup>	0,023 ± 0,001* <sup>δ</sup>
<b>ΣΚΟΝΗ VITAMIN D ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	1,45 ± 0,18* <sup>β</sup>	1,5 ± 0,15* <sup>β</sup>	MA
<b>ΣΚΟΝΗ VITAMIN C + D ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	0,023 ± 0,002* <sup>β</sup>	0,019 ± 0,001* <sup>β</sup>	0,026 ± 0,001* <sup>δ</sup>
<b>ΠΟΡΤΟΚΑΛΑΔΑ ΜΕ VITAMIN C ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	7,5 ± 0,6* <sup>γ</sup>	13,5 ± 1,2* <sup>γ</sup>	9,5 ± 0,5* <sup>ε</sup>
<b>ΠΟΡΤΟΚΑΛΑΔΑ ΜΕ VITAMIN D ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	28 ± 1,3* <sup>γ</sup>	29 ± 2,2* <sup>γ</sup>	45 ± 3,4* <sup>ε</sup>
<b>ΠΟΡΤΟΚΑΛΑΔΑ ΜΕ VITAMIN C + D ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΗ ΣΕ ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ</b>	9 ± 0,8* <sup>γ</sup>	11 ± 0,9* <sup>γ</sup>	15 ± 1,2* <sup>ε</sup>
<b>ΠΟΡΤΟΚΑΛΑΔΑ</b>	27 ± 1,4* <sup>γ</sup>	27 ± 1,3* <sup>γ</sup>	44 ± 3,7* <sup>ε</sup>

<sup>α</sup>Οι τιμές είναι ο MO ± την τυπική απόκλιση από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα όπου το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. <sup>β</sup>Οι συγκεντρώσεις των τιμών IC<sub>50</sub> είναι μg/ml. <sup>γ</sup>Οι συγκεντρώσεις των τιμών IC<sub>50</sub> είναι μl/ml. <sup>δ</sup>Οι συγκεντρώσεις των τιμών RP<sub>0,5AU</sub> είναι μg/ml. <sup>ε</sup>Οι συγκεντρώσεις των τιμών RP<sub>0,5AU</sub> είναι μl/ml. \*  $p < 0,05$ , σημαίνει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις τιμές μάρτυρα. MA: Στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί τιμή RP<sub>0,5AU</sub>.

### 2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα των παραγόμενων σκονών από την ενθυλάκωση των βιταμινών C και D σε μαλτοδεξτρίνη εξετάστηκε και η βιοδραστικότητά τους και συγκεκριμένα η αντιοξειδωτική τους δράση. Επιλέχτηκε η αντιοξειδωτική δράση γιατί: i) θεωρείται σημαντική για την πρόληψη αρκετών ασθενειών οπότε τρόφιμα/ποτά που τη διαθέτουν έχουν ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία (Stagos 2019, Yang και συν., 2018, Varadharaj και συν., 2017), ii) είναι μία από τις βασικότερες ιδιότητες ιδιαίτερα της βιταμίνης C, iii) είναι μία δράση που εύκολα μπορεί να προσδιοριστεί με *in vitro* μεθόδους. Έτσι, ο προσδιορισμός αυτής της βιοδραστικότητας θα βοηθούσε να εκτιμηθεί αν οι βιταμίνες μετά την ενθυλάκωσή τους διατηρούσαν ταυτόχρονα και τις βιολογικές τους δράσεις.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε με 3 μεθόδους. Σε δύο από αυτές τις μεθόδους, τη DPPH και την ABTS, προσδιορίζεται η ικανότητα της εξεταζόμενης ουσίας να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Στην τρίτη μέθοδο, την αναγωγική δύναμη (Reducing Power), προσδιορίζεται η ικανότητα της εξεταζόμενης ουσίας να δρα ως αναγωγικό γιατί πολλά αντιοξειδωτικά δρουν ως αναγωγικά, δηλαδή ως δότες ατόμων υδρογόνου.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε και στις παραγόμενες σκόρες, αλλά και στα αναψυκτικά μετά την προσθήκη των σκονών. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τις σκόρες έδειξαν ότι η σκόνη που περιείχε τη βιταμίνη C και η σκόνη που περιείχε τις βιταμίνες C και D είχαν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Προφανώς και στις δύο σκόρες η αντιοξειδωτική ικανότητα οφείλονταν κυρίως στη βιταμίνη C. Συγκεκριμένα οι τιμές  $IC_{50}$  των μεθόδων DPPH και ABTS και η τιμή  $RP_{0,5AU}$  της αναγωγικής δύναμης αυτών των δύο σκονών ήταν περίπου 0,02 mg/ml. Με δεδομένο ότι 1 gr σκόνης περιείχε 200 mg βιταμίνης C, θα μπορούσε να εκτιμηθεί ότι για τη βιταμίνη C οι παραπάνω τιμές κυμαίνονται στο 0,004 mg/ml. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και με μετρήσεις που έχει πραγματοποιήσει η ερευνητική μας ομάδα τόση περίπου είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα της καθαρής βιταμίνης C σε αυτές τις μεθόδους (Nariva και συν., 2013). Αυτό σημαίνει ότι μετά την ενθυλάκωσή της σε μαλτοδεξτρίνη κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, η βιταμίνη C είχε διατηρήσει μία από τις βασικότερες βιολογικές της δράσεις. Η σκόνη που περιείχε μόνο τη βιταμίνη D είχε μικρότερη αντιοξειδωτική



ικανότητα σε σύγκριση με τις σκόνες της βιταμίνης C. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν φυσιολογικό γιατί η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν είναι από τις σημαντικότερες της βιταμίνης D και βέβαια είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι αυτή η βιταμίνη είναι πολύ ασθενέστερη από τη βιταμίνη C ως αντιοξειδωτικό (Name και συν., 2020).

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε και στο αναψυκτικό (πορτοκαλάδα) στο οποίο προστέθηκαν οι σκόνες με τις βιταμίνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την προσθήκη στην πορτοκαλάδα, ιδιαίτερα των σκονών που περιείχαν μόνο τη βιταμίνη C ή τις βιταμίνες C και D μαζί, η αντιοξειδωτική ικανότητα του αναψυκτικού ενισχύθηκε σημαντικά. Συγκεκριμένα, η σκόνη που περιείχε μόνο τη βιταμίνη C ενίσχυσε κατά 3,6, 2 και 4,6 φορές την αντιοξειδωτική ικανότητα της πορτοκαλάδας, στις μεθόδους ABTS, DPPH και αναγωγική δύναμη αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη σκέτη πορτοκαλάδα. Ενώ η σκόνη που περιείχε τις βιταμίνες C και D μαζί ενίσχυσε κατά 3, 2,5 και 2,9 φορές την αντιοξειδωτική ικανότητα της πορτοκαλάδας, στις μεθόδους ABTS, DPPH και αναγωγική δύναμη αντίστοιχα. Επίσης, στη μέθοδο DPPH η αντιοξειδωτική ικανότητα του αναψυκτικού στο οποίο προστέθηκε είτε η σκόνη με τη βιταμίνη C είτε η σκόνη με τις βιταμίνες C και D όπως υπολογίστηκε από το δείκτη  $IC_{50}$  ήταν 13,5 και 11  $\mu\text{l/ml}$ , αντίστοιχα. Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας είχε προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH σε ένα μεγάλο αριθμό αναψυκτικών που παράγονται από ελληνικές εταιρίες βρέθηκε ότι η πιο ισχυρή πορτοκαλάδα είχε τιμή  $IC_{50}$  14  $\mu\text{l/ml}$ , ενώ το πιο ισχυρό αναψυκτικό (βουσσινάδα) είχε τιμή  $IC_{50}$  8,5  $\mu\text{l/ml}$  (Πέϊος 2020). Επιπλέον σε άλλη μελέτη μας είχαμε προσδιορίσει την αντιοξειδωτική δράση χυμών της ελληνικής αγοράς (Κουτσουνάκου 2019). Σε 16 από τους 27 εξεταζόμενους χυμούς αυτής της μελέτης, η τιμή  $IC_{50}$  στη μέθοδο DPPH ήταν μεγαλύτερη από 11  $\mu\text{l/ml}$ . Επομένως, πετύχαμε η πορτοκαλάδα μετά την προσθήκη των σκονών με τη βιταμίνη C και με τις βιταμίνες C και D να έχει αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενη με αυτή των ισχυρότερων αναψυκτικών στην ελληνική αγορά καθώς και με πολλών χυμών. Στην πορτοκαλάδα που προστέθηκε μόνο τη βιταμίνη D δεν ενισχύθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τη σκέτη πορτοκαλάδα. Αυτό το αποτέλεσμα εξηγείται από το ότι όπως αναφέρθηκε παραπάνω η βιταμίνη D δεν έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βέβαια από το ότι

προστέθηκε σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τη βιταμίνη C. Η συγκέντρωση της βιταμίνης C στην πορτοκαλάδα ήταν 0,71 mg/ml, ενώ της βιταμίνης D 0,00014 mg/ml, έτσι ώστε η συνολική ποσότητά τους σε 1 μπουκάλι πορτοκαλάδας να είναι σύμφωνη με τη συνιστώμενη ημερήσια δόση τους (200 mg για τη βιταμίνη C και 40 μg για τη βιταμίνη D) (Oudemans-van Straaten 2014, Glerup 2000).

Επίσης, η τιμή IC<sub>50</sub> στη μέθοδο DPPH της πορτοκαλάδας στην οποία προστέθηκε η σκόνη με τη βιταμίνη C ήταν 13,5 μl/ml. Με δεδομένο ότι 1 gr σκόνης προστέθηκε σε 280 ml πορτοκαλάδας και το ότι 1 gr σκόνης περιέχει 200 mg βιταμίνης C ενθυλακωμένα, προκύπτει ότι η τιμή IC<sub>50</sub> 13,5 μl/ml της πορτοκαλάδας αντιστοιχεί σε 9 μg/ml βιταμίνης C. Πραγματικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και με δικές μας μετρήσεις η τιμή IC<sub>50</sub> στη μέθοδο DPPH για την βιταμίνη C είναι περίπου 10 μg/ml. Άρα, οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αναψυκτικό που προστέθηκε η σκόνη με τη βιταμίνη C είναι μία έμμεση απόδειξη ότι η ποσότητα που της βιταμίνης που θεωρητικά προστέθηκε, υπήρχε και στην πραγματικότητα στο αναψυκτικό. Βέβαια στην παρούσα μελέτη έγινε και άμεσος ποσοτικός προσδιορισμός των βιταμινών στο αναψυκτικό μετά την προσθήκη τους. Επίσης, τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αναψυκτικού μετά την προσθήκη των σκονών δείχνουν ότι οι βιταμίνες διατηρούν μία σημαντική βιολογική τους δράση μετά την ενθυλάκωσή τους και άρα η χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι επιτυχής.

Συνοψίζοντας ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παραγόμενων σκονών με τις βιταμίνες C ή και D και του αναψυκτικού στο οποίο προστέθηκαν έδειξε ότι: i) οι σκόνες αλλά και το αναψυκτικό στο οποίο προστέθηκαν είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και επομένως μπορεί να έχουν ευεργετικές επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, ii) οι σκόνες αλλά και το αναψυκτικό στο οποίο προστέθηκαν είχαν αντιοξειδωτική δράση που ήταν παραπλήσια με τη θεωρητικώς αναμενόμενη τιμή, γεγονός που δείχνει ότι οι συνθήκες ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επιτυχείς τόσο όσον αφορά τη διατήρηση της ποσότητας των βιταμινών αλλά και των βιολογικών τους δράσεων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. "Πίνακες αναφοράς: Περιγραφή και διαλυτότητα - Μ". Φαρμακοποιία των ΗΠΑ. Αρχειοθετήθηκε απότο πρωτότυπο στις 2018-03-26. Ανακτήθηκε 2011-07-17 .
2. Denise L. Hofman, Vincent J. van Buul, Fred JPH Brouns (2016). "Διατροφή, υγεία και κανονιστικές πτυχές των πεπτικών μαλτοδεξτρινών". *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56(12): 2091–2100. doi:10.1080/10408398.2014.940415.
3. Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, N., 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science & Nutrition*, 50, 213-224.
4. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S., 2006. Flavor encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21.
5. Zeller, B. L., Saleeb, F. Z., & Ludescher, R. D., 1999. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 389-394.
6. Baranauskienė, R., Bylaite, E., Ukauskaitė, J., & Venskutonis, R., 2007. Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3027-3036.
7. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res. England*; 1997 Mar;26(3):195–9.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med. United States*; 1999 May;26(9-10):1231–7.
9. V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118–126.
10. Lehninger AL. Vitaminas y coenzimas. En: Lehninger AL, editor. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2nd ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.; 1995. p. 341-70.
11. Flórez J. Vitaminas liposolubles e hidrosolubles. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, editores. *Farmacología humana.* 3rd ed. Barcelona: Editorial Masson, S.A.; 1999. p. 991-1005.
12. Nelson DL, Cox MM, Cuchillo CM. Estructura tridimensional de las proteínas. En: Nelson DL, Cox MM, Cuchillo CM, editores. *Lehninger. Principios de Bioquímica.* 4<sup>th</sup> ed. Sabadell: Ediciones Omega S.A.; 2006. p. 116-56.
13. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2003;2:7.
14. Cohen SA, Paeglow RJ. Scurvy: an unusual cause of anemia. *J Am Board Fam Pract.* 2001;14:314-6.
15. Covarrubias-Espinoza R, Sotelo-Cruz N. Escorbuto en la infancia. Presentación de un caso. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2003;20:114-8.
16. Rusell R. Deficiencias y excesos de vitaminas y oligoelementos. En: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al, editores. *Harrison principios de Medicina Interna.* México: McGraw-Hill Interamericana; 2005. p. 452-9.
17. Agte V, Tarwadi K, Mengale S, Hinge A, Chiplonkar S. Vitamin profile of cooked foods: how healthy is the practice of ready-to-eat foods? *Int J Food Sci Nutr.* 2002;53: 197-208.

18. Frei B, Trabe MG. The new US Dietary Reference Intakes for vitamins C and E. *Redox Rep.* 2001;6:5-9.
19. Padayatty SJ, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ.* 2001;164:353-5.
20. Torras H. Tratamiento médico del fotoenvejecimiento cutáneo. *Piel.* 2002;17:449-53.
21. Hampl JS, Taylor CA, Johnston CS. Vitamin C deficiency and depletion in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Am J Public Health.* 2004;94:870-5.
22. Gascón-Vila P, Ribas L, García-Closas R, Farrán A, Serra- Majem L. Fuentes alimentarias de vitaminas A, C, E y beta-caroteno en una población adulta mediterránea. *Gac Sanit.* 1999;13:22-9.
23. Fletcher RH, Fairfield KM. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA.* 2002; 287:3127-9.
24. Shohaimi S, Bingham S, Welch A, Luben R, Day N, Wareham N, et al. Occupational social class, educational level and area deprivation independently predict plasma ascorbic acid concentration: a cross-sectional population based study in the Norfolk cohort of the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC-Norfolk). *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1432-5.
25. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:3704-9.
26. Oeffinger KC. Scurvy: more than historical relevance. *Am Fam Physician.* 1993;48:609-13.
27. Lykkesfeldt J, Prieme H, Loft S, Poulsen HE. Effect of smoking cessation on plasma ascorbic acid concentration. *BMJ.* 1996;313:91.