



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΤΟΜΑΤΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**ΑΛΕΞΙΟΥ ΓΙΩΡΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΤΟΜΑΤΑΣ.**

**DETERMINATION OF ANTIOXANT ACTIVITY IN POLYPHENOL EXTRACTS FROM  
WASTE OF ELABORATION TOMATO.**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Κωνσταντίνος Πετρωτός:** Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Στάγκο Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία και την υποστήριξη που μου παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την πραγματοποίηση την πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο που διευθύνει μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον, καθώς επίσης και τον κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό στο εργαστήριο του οποίου έγινε η απομόνωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πολύτιμη ψυχολογική και οικονομική στήριξη που μου παρείχε αυτά τα χρόνια.

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι σχετίζονται με πολλές ασθένειες. Τα εκχυλίσματα πολλών φυτών είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Στα πλαίσια αυτά, τα τελευταία χρόνια, οι τομάτες έχουν κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου τους. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των τοματών είναι η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική τους δράση. Έτσι, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από απόβλητα επεξεργασίας τομάτας με την *in vitro* μέθοδο DPPH<sup>•</sup> που στηρίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής χημικής ρίζας DPPH<sup>•</sup> από τις πολυφαινολικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της χημικής ρίζας. Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται στα εκχυλίσματα και στις διαφορετικές συνθήκες παρασκευής των εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για τη βελτιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων που προέρχονται από απόβλητα τομάτας.

# Περιεχόμενα:

Περίληψη	5
Περιεχόμενα Εικόνων	9
Περιεχόμενα Πινάκων	9
Περιεχόμενα Γραφημάτων	10
<b><u>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	
<b>1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ</b>	
1.1.1. Γενικά	15
1.1.2. Σχηματισμός ελεύθερων ριζών	15
<b>1.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	
1.2.1. Γενικά	17
1.2.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	18
<b>1.3. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ</b>	18
<b>1.4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ</b>	
1.4.1. Γενικά	21
1.4.2. Χημική δομή-Κατηγορίες πολυφαινολών	21
1.4.2.1.Φλαβονοειδή	22
1.4.2.2.Μη φλαβονοειδή	24
1.4.2.3.Καροτενοειδή	26

1.4.3. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών και καροτενοειδών	28
1.4.3.1. Αντιοξειδωτική/προ-οξειδωτική δράση	28
1.4.3.2. Άλλες σημαντικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών	31
<b>1.5 ΤΡΟΦΙΜΑ ΠΛΟΥΣΙΑ ΣΕ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ</b>	
1.5.1. Γενικά	32
1.5.2. Λυκοπένιο	32
1.5.3. Δράσεις λυκοπενίου	33
1.5.4. Χρήσεις λυκοπενίου	34
<b>1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΑΓΩΓΗΣ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ</b>	
1.6.1. Γενικά	34
1.6.2. Εκχύλιση Υγρού-Υγρού	35
1.6.3. Εκχύλιση Στερεού-Υγρού	35
1.6.4. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση Ρευστού	36
<b>1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ</b>	39
<b><u>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>	
<b>2.1. ΥΛΙΚΑ</b>	
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	39
2.1.2. Εκχυλίσματα	40
<b>2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	40
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	41
2.2.2.3. Στατιστική ανάλυση	42
<b><u>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	43



**4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

77

**5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

80

### Περιεχόμενα εικόνων

**Εικόνα 1:** Απεικόνιση της δραστικότητας της ελεύθερης ρίζας που οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας.

**Εικόνα 2:** Απεικόνιση του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης και της δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

**Εικόνα 3:** Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

**Εικόνα 4 :** Απεικόνιση των ασύζευκτων ηλεκτρονίων στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

**Εικόνα 5:** Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.

**Εικόνα 6:** Οξειδωτικό στρες.

**Εικόνα 7:** Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών.

**Εικόνα 8:** Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS.

**Εικόνα 9:** Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

**Εικόνα 10:** Οργανικοί Διαλύτες που Χρησιμοποιούνται για την Εξαγωγή των Πολυφαινολών.

**Εικόνα 11:** Φάσεις του CO<sub>2</sub> με το Τριπλό Σημείο (ΤΣ) και το Κρίσιμο Σημείο (ΚΣ).

**Εικόνα 12:** Αναγωγή του DPPH σε DPPH:H

### Περιεχόμενα πινάκων

**Πίνακας 1:** οργανικοί διαλύτες για εξαγωγή πολυφαινολών.

**Πίνακας 2:** Επεξεργασία δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες και συγκέντρωση της βασικής πολυφαινόλης.

**Πίνακας 3:** Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.

**Πίνακας 4:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων.

## Περιεχόμενα γραφημάτων

**Γράφημα 1:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #1.

**Γράφημα 2:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #2.

**Γράφημα 3:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #3.

**Γράφημα 4:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #4.

**Γράφημα 5:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #5.

**Γράφημα 6:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #7.

**Γράφημα 7:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #8.

**Γράφημα 8:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #9.

**Γράφημα 9:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #10.

**Γράφημα 10:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #11.

**Γράφημα 11:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #13.

**Γράφημα 12:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #14.

**Γράφημα 13:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #15.

**Γράφημα 14:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #16.

**Γράφημα 15:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #17.

**Γράφημα 16:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #19.

**Γράφημα 17:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #20.

**Γράφημα 18:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #21.

**Γράφημα 19:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #22.

**Γράφημα 20:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #23.

**Γράφημα 21:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #25.

**Γράφημα 22:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #26.

**Γράφημα 23:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #27.

**Γράφημα 24:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #28.

**Γράφημα 25:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #29.

**Γράφημα 26:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #33.

**Γράφημα 27:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #34.

**Γράφημα 28:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #35.

**Γράφημα 29:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #37.

**Γράφημα 30:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #38.

**Γράφημα 31:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #39.

**Γράφημα 32:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #40.

**Γράφημα 33:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #41.

**Γράφημα 34:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #45.

**Γράφημα 35:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #46.

**Γράφημα 36:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #47.

**Γράφημα 37:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #51.

**Γράφημα 38:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #52.

**Γράφημα 39:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #53.

**Γράφημα 40:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #56.

**Γράφημα 41:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #57.

**Γράφημα 42:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #58.

**Γράφημα 43:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #59.

**Γράφημα 44:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #63.

**Γράφημα 45:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #64.

**Γράφημα 46:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #65.

**Γράφημα 47:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #68.

**Γράφημα 48:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #69.

**Γράφημα 49:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #71.

**Γράφημα 50:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #74.

**Γράφημα 51:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #75.

**Γράφημα 52:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #76.

**Γράφημα 53:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #77.

**Γράφημα 54:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #78.

**Γράφημα 55:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #80.

**Γράφημα 56:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #81.

**Γράφημα 57:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #82.

**Γράφημα 58:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #83.

**Γράφημα 59:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #86.

**Γράφημα 60:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #87.

**Γράφημα 61:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #88.

**Γράφημα 62:** Επί % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #89.

**Γράφημα 63:** Συσχέτιση των τιμών  $ic_{50}$  και της συγκέντρωσης του λυκοπενίου.

**Γράφημα 64:** Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών  $IC_{50}$ .

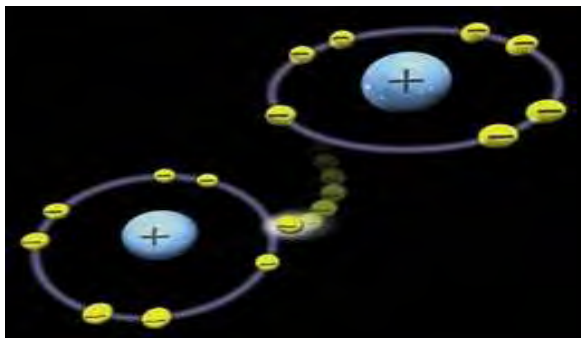
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. Ελεύθερες ρίζες

### 1.1.1 Γενικά

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



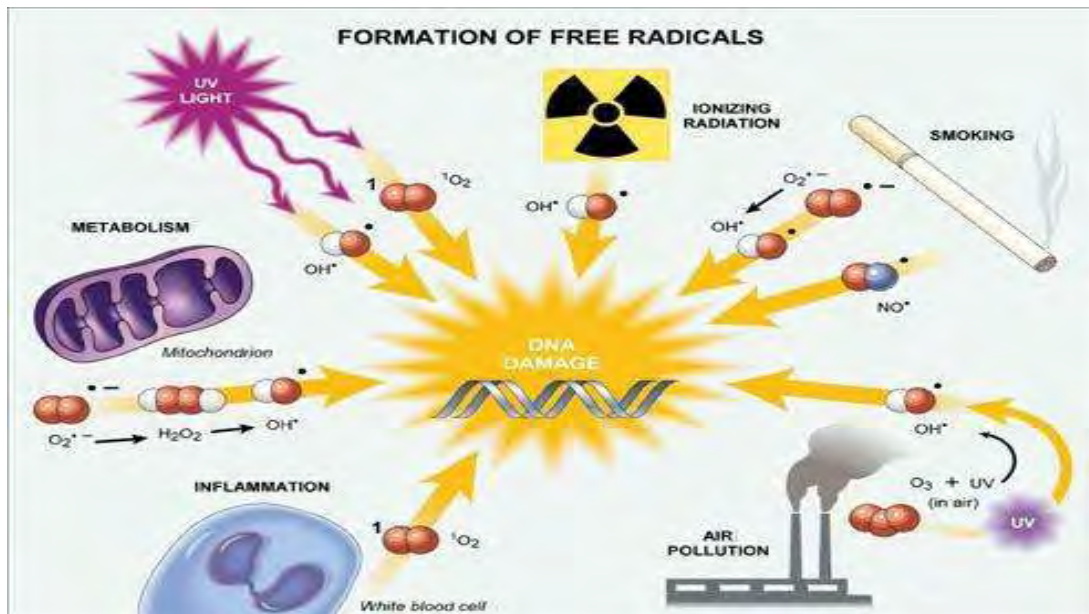
**Εικόνα 2** Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδα.

### 1.1.2. Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα, καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό [Halliwell B, 2001]. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση,



από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από ρυπαντές της ατμόσφαιρας. (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

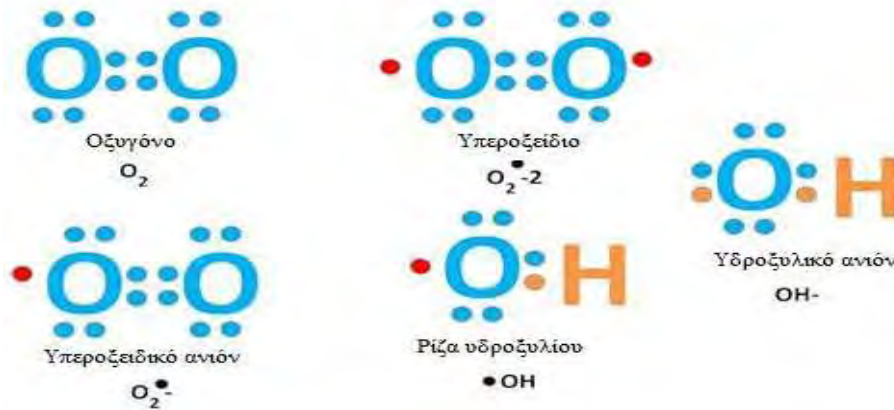


Εικόνα 3: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

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

## ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

● = Μονήρη ηλεκτρόνια

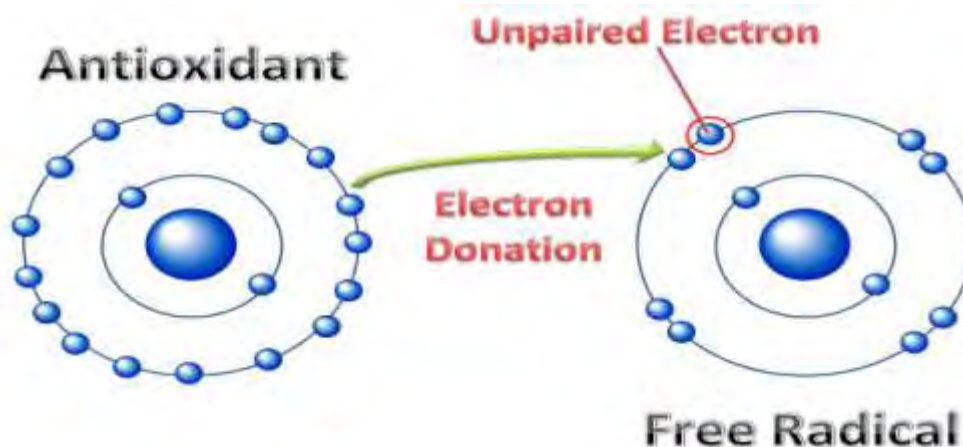


Εικόνα 4: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

### 1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

#### 1.2.1 Γενικά

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



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.

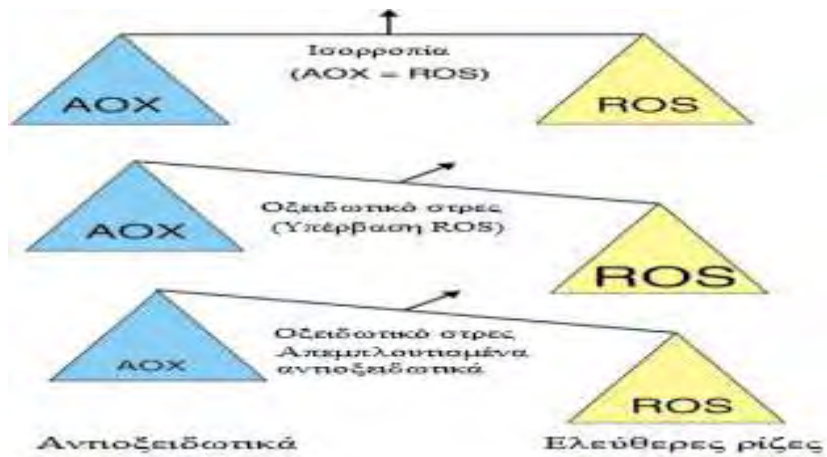
### 1.2.2 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).

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

### 1.3 Οξειδωτικό στρες

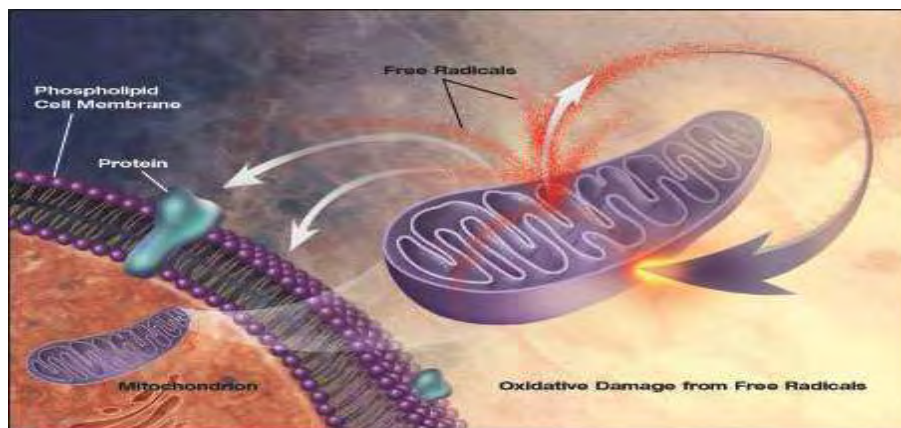
Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 6) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).



Εικόνα 6: Οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

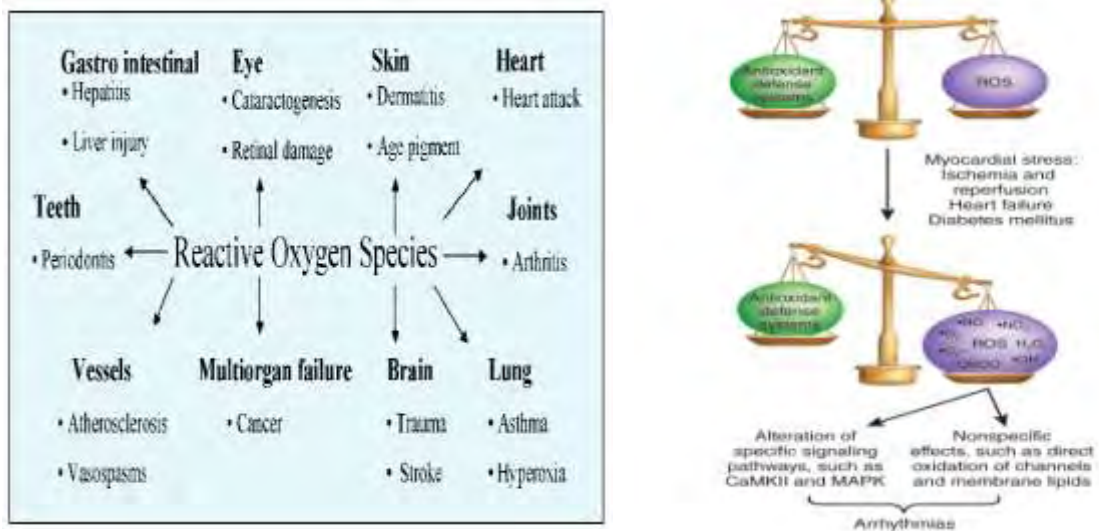
- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων



Εικόνα 7: Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών.

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) , για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 8) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Τογokuνι1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993)

και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά. ).



**Εικόνα 8 :** Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS.

Σήμερα η 'χημειοπροφύλαξη', αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για την πρόληψη όχι μόνο του καρκίνου αλλά και μιας σειράς άλλων χρόνιων παθήσεων (Hong και Sporn 1997; Liu 2003). Γενικά, μία σειρά από επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση φυτικών τροφών παίζει σημαντικό χημειοπροστατευτικό ρόλο, γιατί συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για προσβολή από ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και γενικότερα οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι. (Willett 2002; Nerka και συν., 1999; Huang και συν., 1994; Joseph και συν., 1999; Tijburg και συν., 1997). Επιπλέον, τα φυτοχημικά συστατικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παρασκευή φαρμάκων καθώς σε ένα μεγάλο ποσοστό των σύγχρονων χρησιμοποιούμενων φαρμάκων οι δραστικές τους ουσίες είναι ή προέρχονται από τέτοια συστατικά (Colic και Pavelic 2000).

## **1.4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

### **1.4.1. Γενικά**

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ, 2010). Οι πολυφαινόλες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελούν μία από τις πολυπληθέστερες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν οι τροφές αυτές (Kris- Etherton P.M. et al, 2002). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al 2005).

### **1.4.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών**

Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Όσον αφορά τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, μιας και ενώ άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες πάλι είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Οι πολυφαινόλες προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οζικού οξέος (Scalbert et al, 2005). Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων

που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, στυλβένια και οι λιγνάνια).

#### **1.4.2.1. Φλαβονοειδή**

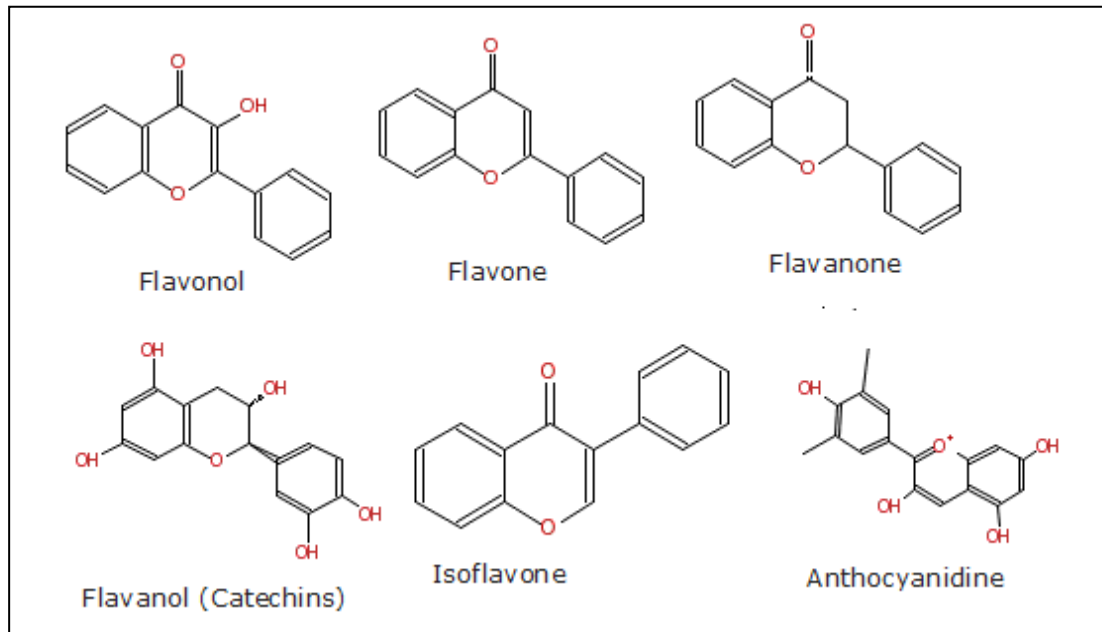
Τα φλαβονοειδή είναι η πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 4000 ενώσεις σε πολλές φυτικές πηγές. Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Επίσης δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Cheyrier, 2005). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανιδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach et al., 2004).

- Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Συναντώνται στις περισσότερες τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο με σημαντικότερες πηγές τους να είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα και το κρασί. Βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως O – γλυκοσίδια και συσσωρεύονται κυρίως στην επιδερμίδα και στα φύλλα του φυτού εφόσον η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al., 2004).
- Φλαβανόλες: Αποτελούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών, Υπάρχουν ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) ή ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, έπειτα από κατεργασία με ισχυρά οξέα. (Crozier A, et al. 2006). Οι φλαβανόλες εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, ενώ σημαντικότερες

πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.

- Φλαβόνες: Οι κυριότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στα φρούτα και στα λαχανικά είναι γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης. Οι περισσότερες υπάρχουν ως 7 - Ο - γλυκοσίδια. Βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά και στα εσπεριδοειδή (σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi F, Naczk M. 1995).
- Φλαβανόνες: βρίσκονται στις ντομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N., 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες (Manach C. et al, 2004).
- Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτο-οιστρογόνου και την ικανότητα τους να μπορούν να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Συναντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης (Manach C. et al, 2004).
- Ανθοκυανιδίνες: Οι ανθοκυανιδίνες εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων τους και προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Μέσα στο φυτό είναι πολύ ανθεκτικές στο φως, το pH και σε καταστάσεις οξείδωσης. Η κυανιδίνη είναι η κύρια εκπρόσωπός τους. Συναντώνται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαίτερος στα φρούτα (Clifford M.N., 2000).





**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

#### 1.4.2.2. Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- **Φαινολικά οξέα:** Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά (C6-C3) οξέα. Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξαίρεση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες τανίνες (Clifford M.N., Scalbert A, 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά σε σύγκριση με τα υδροβενζοϊκά. Τα πιο σημαντικά είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006, Manach et al., 2004).
- **Λιγνάνια:** σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Είναι συνήθως συνδεδεμένα με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκο-ισο-καϊλαρισειρινόλη και η ματαιρεσινόλη, τα

οποία μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε δημητριακά, φρούτα, λαχανικά και δημητριακά (Adlercreutz H., Mazur W., 1997).

- Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί (Bertelli A. et al., 1998).
- Φαινολικά οξέα: Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά (C6-C3) οξέα. Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξαιρέση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες τανίνες (Clifford M.N., Scalbert A, 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά σε σύγκριση με τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουϊνικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006, Manach et al., 2004).
- Λιγνάνια: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένα με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκο-ισο-καϊλαρισειρινόλη και η ματαιρεσινόλη, τα οποία μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε

δημητριακά, φρούτα, λαχανικά και δημητριακά (Adlercreutz H., Mazur W., 1997).

- Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί (Bertelli A. et al., 1998).

#### **1.4.2.3. Καροτενοειδή**

Τα καροτενοειδή αποτελούν κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες χρωστικές. Βρίσκονται σε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, όμως το χρώμα τους καλύπτεται από αυτό της χλωροφύλλης. Είναι γραμμικά μόρια που περιέχουν συζυγιακά συστήματα διπλών δεσμών, στα οποία οφείλεται και το χρώμα τους. Αυτά είναι υδρογονάνθρακες στα καροτένια και οξυγωνομένοι υδρογονάνθρακες στις ξανθοφύλλες με αλυσίδες 40 ατόμων άνθρακα. Τα καροτενοειδή βρίσκονται συνήθως σε στενή επαφή με τις χλωροφύλλες. Η ενέργεια που απορροφούν μπορεί να μεταφερθεί στη χλωροφύλλη. Επίσης, σε καταστάσεις έντονου φωτισμού, τα καροτενοειδή προστατεύουν τη χλωροφύλλη. Τα καροτενοειδή προσλαμβάνουν την επιπλέον ενέργεια από την χλωροφύλλη και την αποδίδουν ως θερμότητα, αντί αυτή η ενέργεια να δοθεί στο οξυγόνο, με αποτέλεσμα την φωτοξείδωση και καταστροφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στον άνθρωπο, τα καροτενοειδή έχουν δράση παρόμοια με την βιταμίνη Α, δηλαδή μπορούν να μετατραπούν σε ρετινάλη, και έχουν επίσης αντιοξειδωτική δράση. Τα καροτενοειδή, μαζί με τις βιταμίνες C και E, αποτελούν βασικά αντιοξειδωτικά. Οι έρευνες καταδεικνύουν ότι η κατάλληλη λήψη αυτών των σημαντικών θρεπτικών συστατικών μπορεί να συμβάλλει στην καθυστέρηση ή την αποτροπή της εκδήλωσης καρκίνου, καρδιακών παθήσεων, καταρράκτη και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Από τα 500-600 καροτενοειδή που έχουν ήδη προσδιοριστεί, περίπου 40 απαντώνται στην ανθρώπινη διατροφή και περίπου 14 από αυτά απορροφώνται και

χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό. Τα πιο συνήθη και αυτά που θεωρούνται πιο σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία είναι το β-καροτένιο, το α-καροτένιο, η κρυπτοξανθίνη, η ζεαξανθίνη, το λυκοπένιο και η λουτεΐνη. Τα καροτενοειδή είναι φυτικές χρωστικές που προστατεύουν τους ιστούς των φυτών από την ηλιακή ακτινοβολία. Το β-καροτένιο είναι το βασικότερο καροτενοειδές και είναι η πιο δραστική πρόδρομος ουσία της βιταμίνης Α. Άλλα καροτενοειδή επίσης μετατρέπονται σε βιταμίνη Α, με τη μισή όμως περίπου αποτελεσματικότητα συγκριτικά με το β-καροτένιο. Εκτός από τη δράση τους ως πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης Α, τα καροτενοειδή δρουν επίσης ως «εκκαθαριστές» ελευθέρων ριζών. Αυτό σημαίνει ότι έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν το ευαίσθητο περιεχόμενο των κυττάρων από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και πιθανώς να αδρανοποιούν μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ουσίες. Τα καροτενοειδή παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία από τις επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται όταν τα φυτά εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία. Τα καροτενοειδή περιέχονται σε διάφορες τροφές και ιδιαίτερα στα φρούτα και τα λαχανικά όπως στις ντομάτες, τα βερίκοκα, τις πιπεριές και τα καρότα. Καταναλώνοντας τροφές πλούσιες σε καροτενοειδή, προσφέρουμε στα κύτταρά μας παρόμοια αντιοξειδωτική προστασία. Τα καροτενοειδή συμβάλλουν στην αποφυγή πρόκλησης βλαβών στα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από διάφορους παράγοντες όπως ο ήλιος, ο καπνός του τσιγάρου, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων, τα εντομοκτόνα, καθώς και από τις μεταβολικές διεργασίες του ίδιου του οργανισμού. Όπως το σύμπλεγμα βιταμινών Β και το μίγμα των τοκοφερολών στη βιταμίνη Ε, έτσι και τα καροτενοειδή δρουν καλύτερα ως μίγμα παρά ως μεμονωμένες ουσίες. Παρόλο λοιπόν που το β-καροτένιο είναι γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση, διερευνάται πλέον με ιδιαίτερο ενδιαφέρον η δράση και άλλων καροτενοειδών, κυρίως λόγω της έρευνας που γίνεται σχετικά με τη σύνδεση διατροφής και εμφάνισης ασθενειών. Θεωρείται ότι η πιο αποτελεσματική γενική προστασία του οργανισμού εξασφαλίζεται περισσότερο με τη λήψη μίγματος καροτενοειδών, παρά με τη λήψη υψηλής δοσολογίας ενός μεμονωμένου καροτενοειδούς.

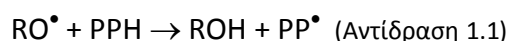
### **1.4.3. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών και των καροτενοειδών**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Γενικά οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή:

- Θεωρούνται υπεύθυνα για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύνοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Ακόμη, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων (Manach C., et al, 2004, Di Carlo G., et al., 1999, Harborne J.B. 1986).
- Ως αντιοξειδωτικά μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al, 2005).
- Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών και καροτενοειδών, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M. & Dong Z, 2006).
- Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

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

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινόλων που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blacina et al., 2003; Ferguson, 2001). Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες (αντίδραση 1.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 1.2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



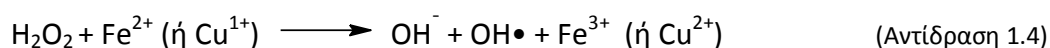
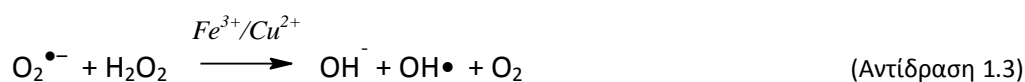
Όπου :  $RO^{\bullet}$ : η ελεύθερη ρίζα

PPH: η πολυφαινόλη

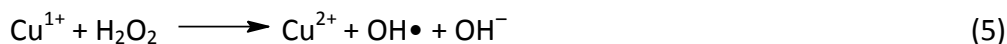
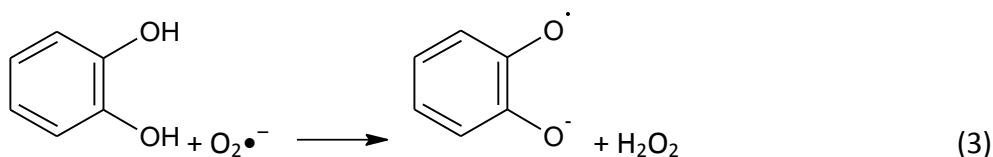
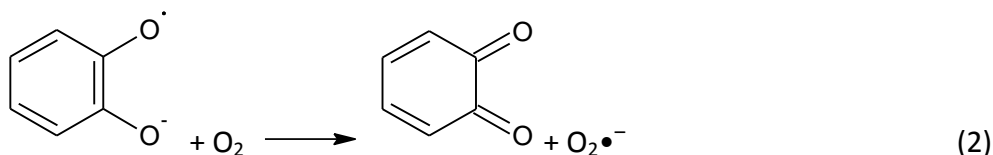
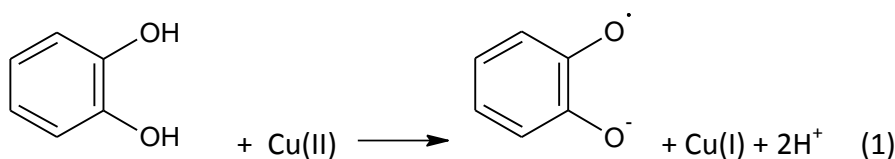
$PP^{\bullet}$ : η φαινολική ρίζα



Η ικανότητα των πολυφαινόλων, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν, πιθανότατα στοχευμένα, ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (αντίδραση 1.3) και της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 1.4) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001).



Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans και συν., 1996). Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, όπως είναι η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση (Robak και συν., 1988) και η οξειδάση της ξανθίνης (Chang και συν., 1993). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, όπως είναι η καταλάση, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Breinhold και συν., 1999). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να γίνεται με άμεση ή έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element ή ARE) (Yu και συν., 1997). Το ARE βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους. Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman και συν., 1989). Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το  $Fe^{3+}$  ή το  $Cu^{2+}$  σε  $Fe^{2+}$  και  $Cu^{1+}$  αντίστοιχα (Yoshino και συν., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό  $OH\bullet$ . Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των πολυφαινολών με το  $Fe^{3+}$  ή το  $Cu^{2+}$  μπορεί να προκαλέσει μέσω μιας σειράς αντιδράσεων (Σχήμα 1.1) και το σχηματισμό  $H_2O_2$ , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton (Sakihama και συν., 2002). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino και συν., 1999) και άρα έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto και συν., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).



**Σχήμα 1.1** Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Η οξείδωση της πολυφαινόλης από το Cu(II) οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης (αντίδραση 1), η οποία μπορεί να αντιδράσει με O<sub>2</sub> και να σχηματίσει τη ρίζα του O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (αντίδραση 2). Η αντίδραση αυτή έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα, αφού το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> μπορεί να αντιδράσει με την αρχική πολυφαινόλη και να ξανασχηματιστεί η ημικινόνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (αντίδραση 3). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να σχηματιστεί και από την αντίδραση του O<sub>2</sub><sup>•-</sup> με H<sup>+</sup> (αντίδραση 4). Τέλος ο Cu(I) μπορεί να αντιδράσει με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσω της αντίδρασης Fenton και να οδηγήσει στην παραγωγή OH<sup>•</sup> (αντίδραση 5).

Η βιοσύνθεσή των καροτενοειδών γίνεται μέσω το μονοπατιού των ισοπρενοειδών, το οποίο ξεκινάει από το ακέτυλο-συνένζυμο A. Το πρώτο κύριο τερπενοειδές στο μονοπάτι είναι το 15-cis-φυτοένιο, το οποίο ύστερα από μια σειρά οξειδώσεων σχηματίζει το λυκοπένιο. Μετά από αυτό το στάδιο το μονοπάτι διακλαδίζεται και παράγονται τα δύο μόρια από τα οποία συντίθενται το 15-cis-φυτοένιο αλλά και τα γ και δ καροτένια.

#### 1.4.3.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών και καροτενοειδών

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες και καροτενοειδή συνδέεται με



μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog και συν., 1993; Knekt και συν., 1996) και προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt και συν., 2002), του στήθους (Dai και συν., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas και συν., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand και συν., 2000). Η προστατευτική αυτή δράση παρέχεται μέσα από ποικίλους αντικαρκινικούς μηχανισμούς. Η πρόσληψη καροτενοειδών προσδίδει προστασία έναντι του καταρράκτη και ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Ακόμη, η πρόσληψη πολυφαινόλων μέσω της διατροφής παρέχει κάποιου είδους προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994 και του έλκους (Alarcon και συν., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιϊκές (Chu και συν., 1992) αντιαλλεργικές (Di Carlo και συν., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia και συν., 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach και συν., 2004).

### **1.5. Τρόφιμα πλούσια σε καροτενοειδή**

#### **1.5.1. Γενικά**

Με την πάροδο των χρόνων ο σκοπός της παραγωγής τροφίμου έχει αλλάξει ριζικά από τη βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας που εγγυάται επαρκή διατροφή, στη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων για την κάλυψη των απαιτήσεων υγειονομικής περίθαλψης. Πρόσφατα, μεγάλη προσοχή δίνεται στις τροφές πλούσιες σε βιοδραστικά μόρια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη της ανθρώπινης παθολογίας. Οι τομάτες και τα παράγωγά τους είναι παραδείγματα αυτών των λεγόμενων “λειτουργικών τροφίμων”, επειδή περιέχουν μεγάλη ποσότητα ουσιών όπως το ασκορβικό οξύ, τα φαινολικά, την α-τοκοφερόλη και, ειδικότερα, τα καροτενοειδή που ασκούν προληπτικά προστατευτικές επιδράσεις σε πολλές εκφυλιστικές νόσους. (Schauer N et al, 2006).

#### **1.5.2. Λυκοπένιο**

Το λυκοπένιο, η κόκκινη χρωστική που συντίθεται και αποθηκεύεται στους χρωμοπλάστες των καρπών της τομάτας, είναι ένα από τα 750 καροτενοειδή που βρίσκονται στην φύση. (Britton G et al, 2004) Είναι ένα μη-προβιταμινούχο Α ακυλικό τετρατερπένιο που περιέχει 11 συζευγμένους διπλούς δεσμούς άνθρακα και αντιπροσωπεύει το πιο άφθονο καροτενοειδές στην τομάτα, που αποτελεί περισσότερο

από το 80% της παρούσας χρωστικής ουσίας σε πλήρως ώριμους κόκκινους καρπούς (Khachik F et al, 2002). Το λυκοπένιο είναι ένα διαλυτό σε λιπίδιο καροτενοειδές (C40H56), που παρουσιάζει-Z (cis) και E-(trans) γεωμετρικά ισομερή λόγω της παρουσίας των ομάδων μεθυλίου που συνδέονται με μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα ζώα δεν είναι σε θέση να συνθέσουν λυκοπένιο, έτσι το επίπεδο του στο αίμα πλάσματος καθορίζεται από το λυκοπένιο που προσλαμβάνεται με την τροφή. Οι φρέσκοι καρποί τομάτας είναι η κύρια πηγή λυκοπενίου στην ανθρώπινη διατροφή. Ωστόσο, η συγκέντρωση του λυκοπενίου στο αίμα επηρεάζεται κυρίως από την κατανάλωση των παραγώγων της τομάτας παρά από την φρέσκια τομάτα λόγω της μεγαλύτερης βιοδιαθεσιμότητας του μορίου μετά την επεξεργασία του (Van het Hof KH et al, 2000). Στο ανθρώπινο σώμα, το λυκοπένιο που έχει προσληφθεί από την τροφή αποθηκεύεται στο ήπαρ, τον προστάτη, τα επινεφρίδια, τους όρχεις, τους πνεύμονες, τα νεφρά, το παχύ έντερο και του δέρματος. Η συγκέντρωσή της στους ιστούς του σώματος τείνει να είναι υψηλότερη από εκείνη όλων των άλλων καροτενοειδών (Shi J et al, 2000).

### **1.5.3. Δράσεις λυκοπενίου**

Έχει αποδειχθεί ότι το λυκοπένιο ασκεί μια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε διαφορετικά *in vitro* και *in vivo* συστήματα, που εξαρτώνται κυρίως από τη δέσμευση του μονήρους οξυγόνου και των ριζών υπεροξυλίου (Mortensen A et al, 1997). Έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ όλων των διατροφικών αντιοξειδωτικών και ως εκ τούτου διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη οξειδωτικών και σχετιζόμενων με την ηλικία ασθενειών όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αθηροσκλήρωση και το Αλτσχάιμερ (Rao AV et al, 1999). Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση του, πολλές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι το μόριο του λυκοπενίου έχει σημαντικές αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιγόνες λειτουργίες. Η πρόσληψη λυκοπενίου και η συγκέντρωσή του στον ορό φαίνεται να σχετίζεται με ένα χαμηλότερο κίνδυνο διάφορων καρκίνων, ιδιαίτερα εκείνων του προστάτη, του γαστρεντερικού σωλήνα, των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης (Bhuvaneshwari V et al, 2005). Διάφοροι μη-οξειδωτικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την διαπίστωση της δράσης του λυκοπενίου στην πρόληψη του καρκίνου. Αυτοί περιλαμβάνουν αντι-πολλαπλασιαστική και προ-

διαφοροποιητική δραστηριότητα σε ένα αριθμό κακοήθων κυττάρων και τη συμμετοχή του στη διαμόρφωση της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας χασμοσυνδέσμων, των ορμονικών και ανοσοποιητικών συστημάτων και των μεταβολικών οδών των ξενοβιοτικών (Rao AV et al,2007).

#### **1.5.4. Χρήσεις λυκοπενίου**

Οι βιομηχανίες τομάτας παράγουν μεγάλες ποσότητες στερεών αποβλήτων, μέχρι 3-4% των επεξεργασμένων καρπών που αποτελούνται κυρίως από φλοιούς και τους σπόρους (Leoni et al,1997). Κατά συνέπεια, το μεγαλύτερο μέρος του αρχικού λυκοπενίου στις τομάτες δεν χρησιμοποιείται. Από την άλλη πλευρά, αυτά τα στερεά απόβλητα χρησιμοποιούνται συχνά, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ως ζωοτροφές. Συνεπώς, η εκχύλιση του λυκοπενίου θα μπορούσε να είναι μια καλή εναλλακτική λύση για τη αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος (Knoblich et al,2005). Το λυκοπένιο χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα των τροφίμων, της φαρμακευτικής βιομηχανίας και της βιομηχανίας καλλυντικών ως φυσική χρωστική και αντιοξειδωτικό και αντι-γηραντικό προϊόν. Το περισσότερο από τα εμπορικά διαθέσιμα λυκοπένια παράγεται με χημική σύνθεση ή με μικροβιακή ζύμωση ή εξάγεται από τις τομάτες χρησιμοποιώντας εξαιρετικά τοξικούς οργανικούς διαλύτες όπως το βενζόλιο, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο και το χλωριούχο μεθυλένιο (Fraser PD et al, 2004). Η αυξανόμενη ζήτηση βιολογικού λυκοπενίου, μετά από οδηγίες της ΕΕ υπέρ των φυσικών παρά των συνθετικών εκχυλισμάτων, έχει κάνει επιτακτική την αναζήτηση για μία κατάλληλη τεχνική εκχύλισης για να ληφθεί ένα προϊόν απαλλαγμένο από ρύπους.

#### **1.6. Μέθοδοι Εξαγωγής Λυκοπενίου.**

##### **1.6.1. Γενικά.**

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά στην εξαγωγή – εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων. (Pinelo et al., 2005). Η εξαγωγή λοιπόν, είναι ένα μεγάλο βήμα όσον αφορά στην απομόνωση – ταυτοποίηση και χρήση των φαινολικών ενώσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχει κάποια ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος. Οι πλέον κοινές είναι:

α. Η εκχύλιση με διαλύτη. (Baydar, et.al., 2004 – Bucic, et.al., 2007) και

β. Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό. (Bleve et al, 2008. Nahar & Sarker, 2005.

Palma & Taylor, 1999).

Οι φαινολικές ενώσεις εξάγονταν από την άλεση, την ξήρανση ή τη λυοφιλοποίηση των φρούτων, λαχανικών και αρωματικών φυτών ή μόνο από εκχύλιση των νωπών φυτών με τους κατάλληλους διαλύτες (Merken & Beecher, 2000). Οι μεθοδολογίες αυτές όμως, συνεξάγουν και μη φαινολικές ουσίες, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα και πρωτεΐνες, που απαιτούν και άλλες διεργασίες καθαρισμού (Castarpeda Ovando, et. al., 2009).

### **1.6.2. 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 τα εξής:

- 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.

### **1.6.3. Εκχύλιση Στερεού – Υγρού.**

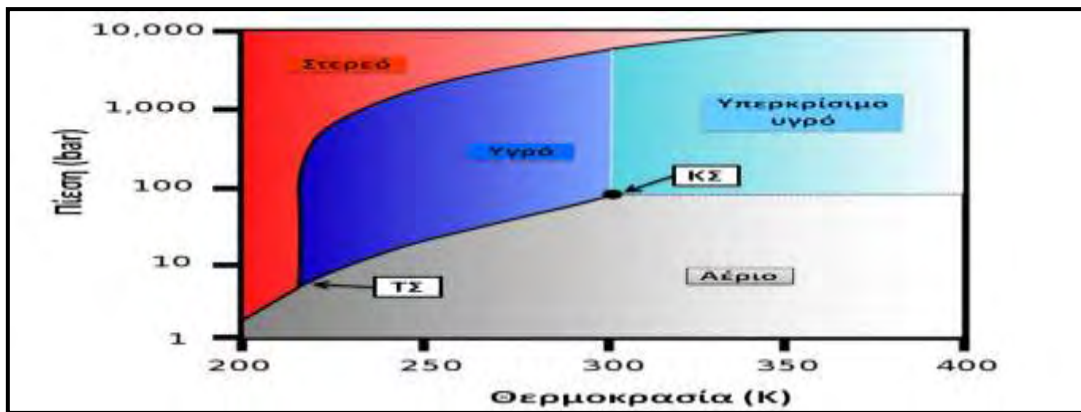
Η Εκχύλιση Στερεού – Υγρού ή έκπλυση, μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας, κατά το οποίο κάποια στερεά μόρια, αρχίζουν να αποχωρούν από την αρχική τους θέση και να κινούνται μέσα σε ένα διαλύτη, όταν αυτός ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό. Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας, μπορεί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

Polyphenolic compounds	Solvent	References
Phenolic acids, flavonols, anthocyanins	Ethyl acetate	Pinelo et al. (2005); Russell et al. (2008)
Anthocyanins, Phenolic acids, catechins, flavanones, flavones, flavonols, procyanidins, ellagic acids, Rutin, chlorogenic acids	Methanol and different aqueous forms (50–90%, v/v)	Eleve et al. (2008); Candi et al. (2007); Ross et al. (2009); Mattila and Kumpulainen (2002)
Anthocyanins, flavonols, free phenolic acids	Ethanol and different aqueous forms (10–90%, v/v)	Altiok et al. (in press); Balas and Popa (2007); Wang et al. (2009); Eleve et al. (2008); Bucic-Kojic et al. (2006); Comales et al. (2009); Ross et al. (2009)
Flavonols, free phenolic acids	Chloroform	Sharififar, Dehghan-Nudeh, and Mirtajalimi (2009)
Flavonols, phenolic acids	Diethyl ether	Ross et al. (2009)
Proanthocyanidins, phenolic acids	Hot water 80–100.	Diouf, Stevanovic, and Cloutier (2009)
Tannins, bound phenolic acids	NaOH (2 N–10 N)	Nardini et al. (2002); Popa et al. (2008); Ross et al. (2009)
Phenolic compounds, phenolic acids	Petroleum ether	Zhang et al. (2009)
Flavonols, phenolic acids, hydroxycinnamic acids, coumarins, Flavonols xanthones	Acetone/water 10–90% (v/v)	Altiok et al. (in press); Nacz & Shahidi (2006); Sharififar et al. (2008); Schieber et al. (2003)
Flavonols, phenolic acids, simple phenolics, anthocyanins	n-Hexane, isooctane, ethyl acetate	Alonso Garcia et al. (2004)
Polyphenols from olive leaves, oleuropein and rutin	Acetone, ethanol and their aqueous forms (10–90%, v/v)	Altiok et al. (in press)
Flavonols, quercetin 3,4'-diglucoside and quercetin 4'-monoglucoside.	Methanol/water 70% v/v	Candi et al. (2007)

**Πίνακας 1.** Οργανικοί Διαλύτες που Χρησιμοποιούνται για την Εξαγωγή των Πολυφαινολών. (Ignat I, et.al, 2011)

#### 1.6.4. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση Ρευστού (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*).

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού (SFE) θα μπορούσε να είναι μια περιβαλλοντικά ευεργετική εναλλακτική λύση, έναντι της συμβατικής εκχύλισης, με οργανικό διαλύτη των βιολογικών ενώσεων. Οι μέθοδοι (SFE) είναι ταχείες, αυτοματοποιημένες, επιλεκτικές και αποφεύγεται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών διαλυτών. Επιπλέον, η απουσία του φωτός και του αέρα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης μειώνει την υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης (Bleve et al., 2008). Αυτή η εκχύλιση βασίζεται στο γεγονός ότι, πλησίον του κρίσιμου σημείου, το υγρό αλλάζει τις ιδιότητές του, μόνο με μερικές διακυμάνσεις στην πίεση (Palenzuela et al., 2004). Τα υπερκρίσιμα ρευστά τα τελευταία χρόνια, λαμβάνουν την θέση οργανικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο και άλλα που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική εκχύλιση, τον καθαρισμό και σε διαδικασίες κρυστάλλωσης. Μέχρι στιγμής, το υπερκρίσιμο υγρό που χρησιμοποιείται, είναι αυτό του διοξειδίου του άνθρακα (SC-CO<sub>2</sub>), που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον, είναι χαμηλής τοξικότητας, δεν είναι αναφλέξιμο και παρέχει συμβατότητα με τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Επιπλέον, έχει μέτρια κρίσιμες συνθήκες, μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από διαλυμένες ουσίες και είναι φθινό.



**Γράφημα 4.** Φάσεις του CO<sub>2</sub> με το Τριπλό Σημείο (ΤΣ) και το Κρίσιμο Σημείο (ΚΣ). (300°K = 26,85°C)

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) είναι μία τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην αυξημένη διαλυτική ικανότητα του CO<sub>2</sub> πάνω από το κρίσιμο σημείο της. Χάρη στην χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία του CO<sub>2</sub> και στην ιδιότητα του να μην είναι ούτε τοξικό ούτε εύφλεκτο, καθιστά την εξόρυξη με υπερκρίσιμη εκχύλιση CO<sub>2</sub> μια εξαιρετική τεχνική κατάλληλη να αντικαταστήσει τη χρήση των επιβλαβών διαλυτών. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση λυκοπενίου από μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων που προέρχονται από τομάτα (ιδιαίτερα παραπροϊόντων επεξεργασίας τομάτας) χρησιμοποιώντας το CO<sub>2</sub> ως διαλύτη έχει αποδειχθεί να είναι τεχνικά εφικτή. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος διαλύτης λόγω των ξεκάθαρων ιδιοτήτων του, αλλά άλλοι διαλύτες όπως το αιθάνιο ή το προπάνιο έχουν επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία. Η χρήση του αιθανίου αντί του CO<sub>2</sub> ως διαλύτη για τη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, δεδομένου ότι το αιθάνιο, αν και είναι πιο ακριβό από το CO<sub>2</sub>, έχει χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία, κοντά σε εκείνη του CO<sub>2</sub> και χαμηλή κρίσιμη πίεση (305,4 K και 48,2 atm). Αυτό κάνει εφικτή τη μείωση του ενεργειακού κόστους. Από την άλλη πλευρά, το αιθάνιο είναι ένας μη πολικός διαλύτης, με υψηλότερη από το CO<sub>2</sub> πολωσιμότητα, πράγμα που το καθιστά προφανώς ως ένα καλύτερο διαλύτη όσον αφορά τα καρτενοειδή που βρίσκονται στην τομάτα. Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, της πίεσης, του ρυθμού ροής, του χρόνου εκχύλισης και της προσθήκης συν-διαλύτη έχουν ερευνηθεί εκτενώς και οι παράμετροι βελτιστοποίησης της εκχύλισης έχουν μελετηθεί (Vasapollo G et al, 2005). Παρ'όλα αυτά, η ανάκτηση του λυκοπενίου συνήθως δεν

υπερβαίνει το 20% της συνολικής ποσότητας των καρροτενοειδών σε απουσία ενός συν-διαλύτη και κυμαίνεται μεταξύ 50 και 70% όταν η αιθανόλη ή τα φυτικά έλαια προστίθενται ως συν-διαλύτης (Ciurlia L et al, 2009). Οι περισσότερες μελέτες έχουν επισημάνει την σπουδαιότητα της προ-κατεργασίας πρώτων υλών με στόχο την αύξηση σε μεγάλο βαθμό της απόδοσης της εξαγωγής του λυκοπενίου. Για παράδειγμα, διεργασίες όπως η ξήρανση και η άλεση επηρεάζουν τις φυσικές ιδιότητες και την ποιότητα των πρώτων υλών. Επιπλέον, η εφαρμογή των γεωπονικών τεχνικών, η επιλογή των ποικιλιών και οι συνθήκες αποθήκευσης μπορούν επίσης να συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας μέσω της μεγιστοποίησης της απομόνωσης του λυκοπενίου όσον αφορά την πρώτη ύλη.

#δείγματος	T(Oc)	P(x1000 psi)	Time(mins)	Λυκοπένιο (mg/kg)
1	40	3000	15	10,33
2	40	3000	30	12,65
3	40	3000	45	14,10
4	40	3000	60	13,96
5	40	3000	75	15,12
7	40	3000	15	14,39
8	40	3000	30	13,37
9	40	4000	45	14,83
11	40	4000	75	17,03
13	40	4000	15	12,07
14	40	4000	30	13,96
15	40	5000	45	17,03
16	40	5000	60	21,92
17	40	5000	75	19,84
19	40	5000	15	14,69
20	40	5000	30	14,54
21	40	6000	45	15,12
22	40	6000	60	19,39
23	40	6000	75	15,86
25	40	6000	15	13,37
26	40	6000	30	18,06
27	40	7000	45	19,39
28	40	7000	60	19,54
29	40	7000	75	16,44
33	60	3000	45	28,26
34	60	3000	60	34,09
35	60	3000	75	32,55
37	60	3000	15	31,78
38	60	3000	30	56,26
39	60	4000	45	59,72
40	60	4000	60	65,22
41	60	4000	75	76,96
45	60	5000	45	75,07
46	60	5000	60	89,21

47	60	5000	75	112,44
51	60	6000	45	82,87
52	60	6000	60	110,03
53	60	6000	75	159,00
56	60	6000	30	48,30
57	60	7000	45	56,92
58	60	7000	60	91,69
59	60	7000	75	105,61
63	80	3000	45	15,27
64	80	3000	60	22,37
65	80	3000	75	19,99
68	80	3000	30	48,13
69	80	4000	45	72,16
71	80	4000	75	90,45
74	80	4000	30	117,49
75	80	5000	45	177,68
76	80	5000	60	206,63
77	80	5000	75	216,92
78	80	5000	90	139,13
80	80	5000	30	162,86
81	80	6000	45	198,84
82	80	6000	60	188,39
83	80	6000	75	218,69
86	80	6000	30	162,65
87	80	7000	45	216,48
88	80	7000	60	294,38
89	80	7000	75	240,23

**Πίνακας 2:** Επεξεργασία δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες και συγκέντρωση της βασικής πολυφαινόλης.

### 1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα τομάτας. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1. ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1. Αντιδραστήρια

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- Εξάνιο (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)



### 2.1.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν από τομάτες, από ελληνικές ποικιλίες. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Εργαστήριο της Μηχανικής Τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας. Τα εκχυλίσματα ετοιμάστηκαν σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, το καθένα από τα δείγματα επεξεργάστηκε στις θερμοκρασίες των 40, 60 και 80<sup>οc</sup>, σε πίεση 3000-4000-5000-6000 και 7000 psi και σε χρόνους εκχύλισης των 15-30-45-60-75 και 90 min.

### 2.2 Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η in vitro μέθοδος DPPH.

#### 2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH<sup>\*</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>\*</sup>) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>\*</sup>) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντίδραση 2.1). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη



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

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

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

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

### 2.2.3. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

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

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

A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A<sub>δ</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση

των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### 3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες τομάτας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH .

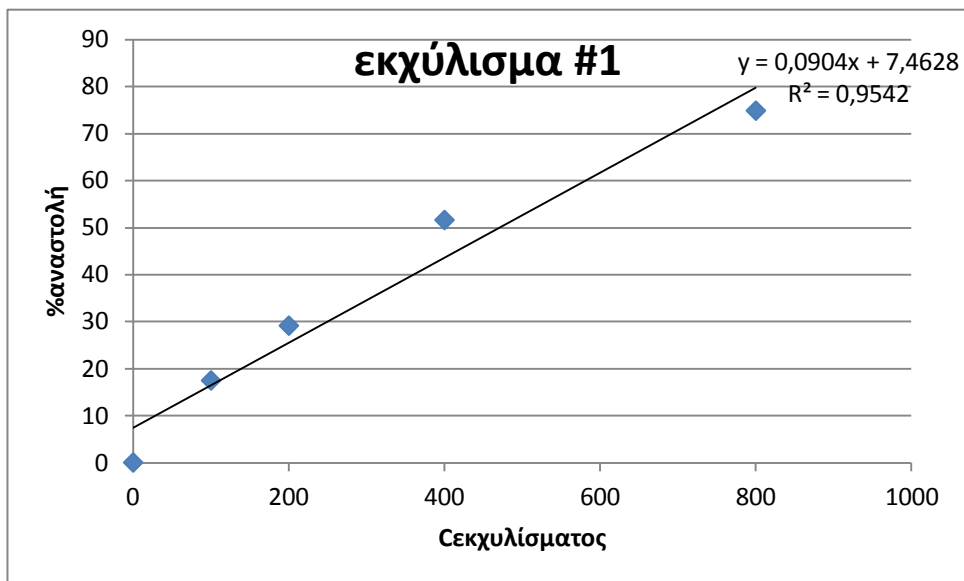
Συνολικά μελετήθηκαν 63 εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες τομάτας και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 10 συγκεντρώσεις από 1,5-800μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH\*, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.2 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από 9,44μg/ml έως 470,54μg/ml (Γράφημα 3.2).

Το πιο ισχυρό ήταν το εκχυλίσματα τομάτας #81 (Διάγραμμα 3.1.21). Δεύτερο ήταν το #82 (Διάγραμμα 3.1.19). Τα ασθενέστερα εκχυλίσματα ήταν τα #1,#19,#20 με τιμές IC<sub>50</sub> μεγαλύτερες από 310μg/ml (Διαγράμματα 3.1.14,3.1.15,3.1.24).

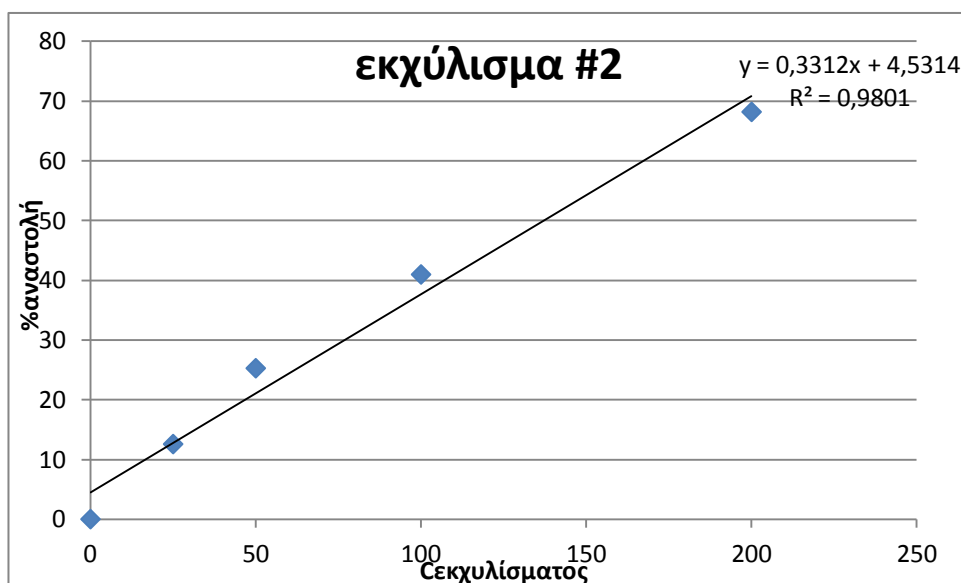
Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν (περίπου 45 δείγματα) παρουσίασαν IC<sub>50</sub> μεταξύ των τιμών 10μg/ml και 75μg/ml (Γράφημα 3.1).

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 517nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

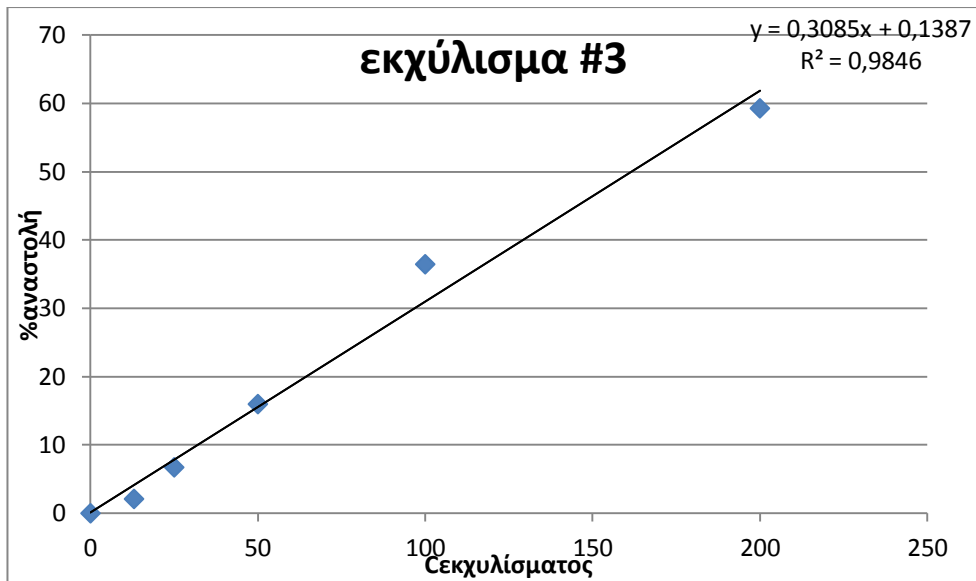
Επίσης, η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC<sub>50</sub> και τη συγκέντρωση του λυκοπενίου έδειξε ότι υπήρξε σχετικά μεγάλη συσχέτιση ( $r = -0,7$ ) και στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ).



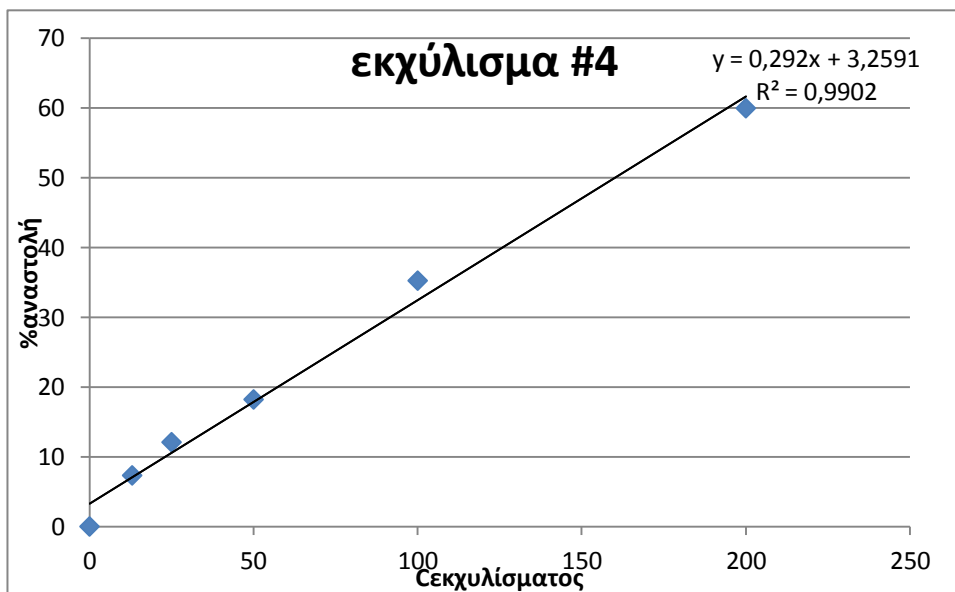
Διάγραμμα 3.1.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #1.



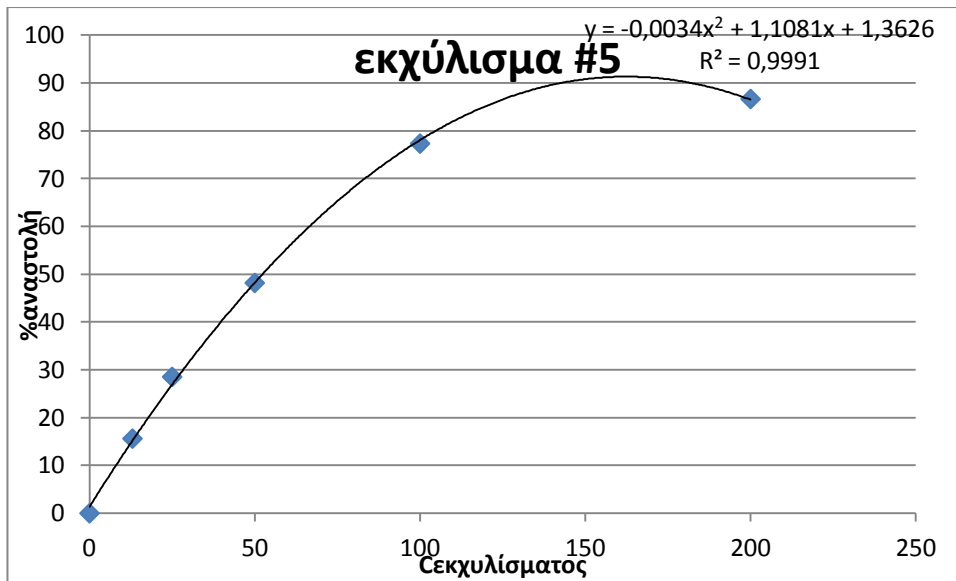
Διάγραμμα 3.1.2 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #2.



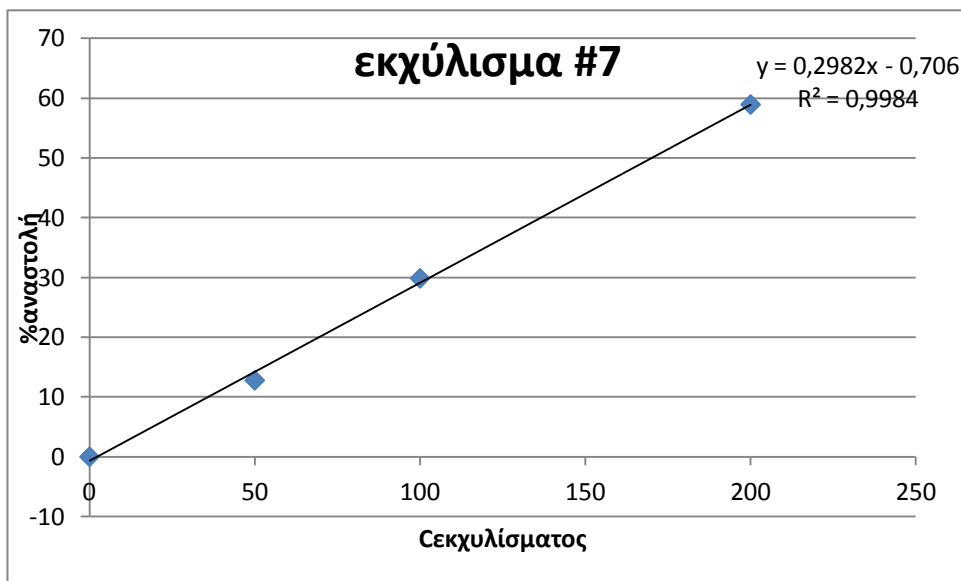
Διάγραμμα 3.1.3 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #3.



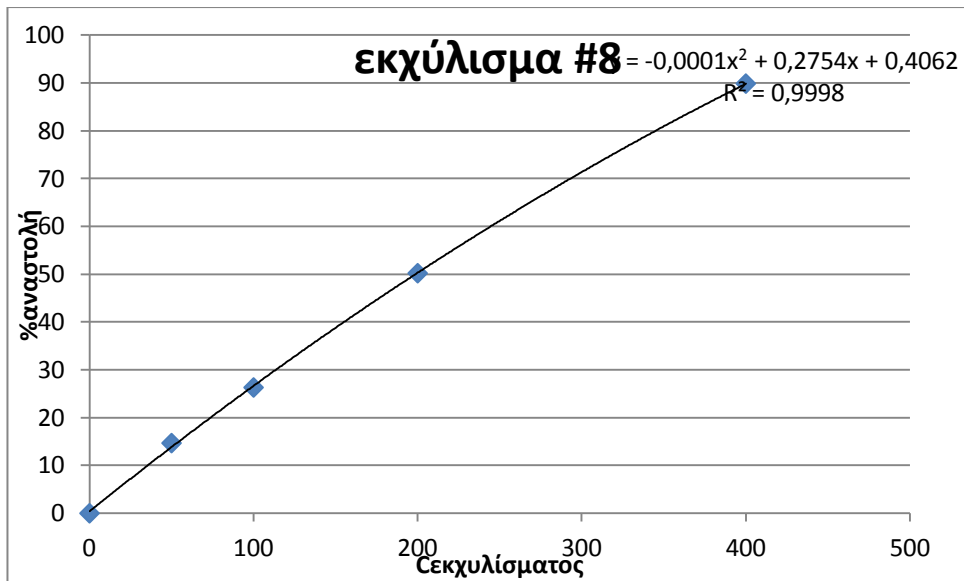
Διάγραμμα 3.1.4 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #4.



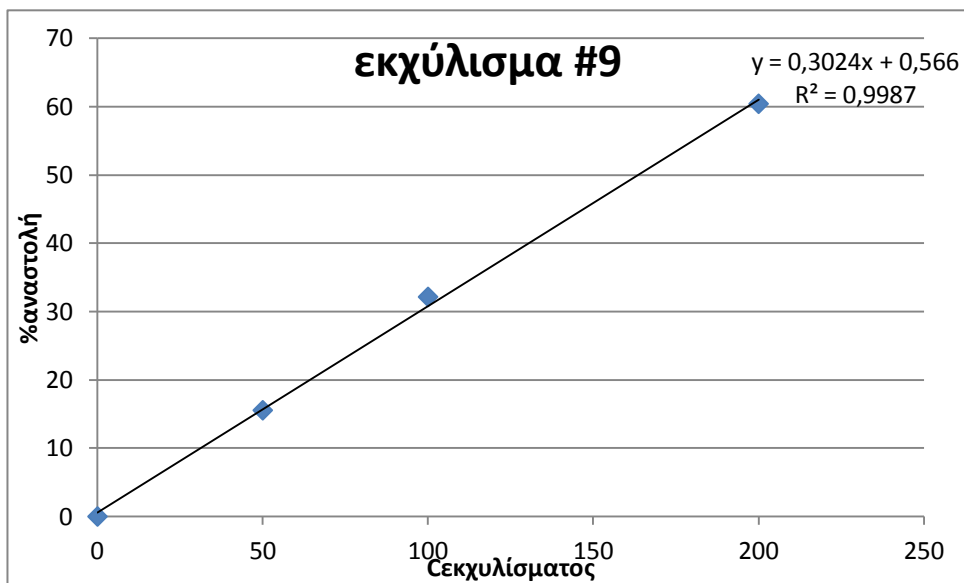
Διάγραμμα 3.1.5 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #5.



Διάγραμμα 3.1.6 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #7.

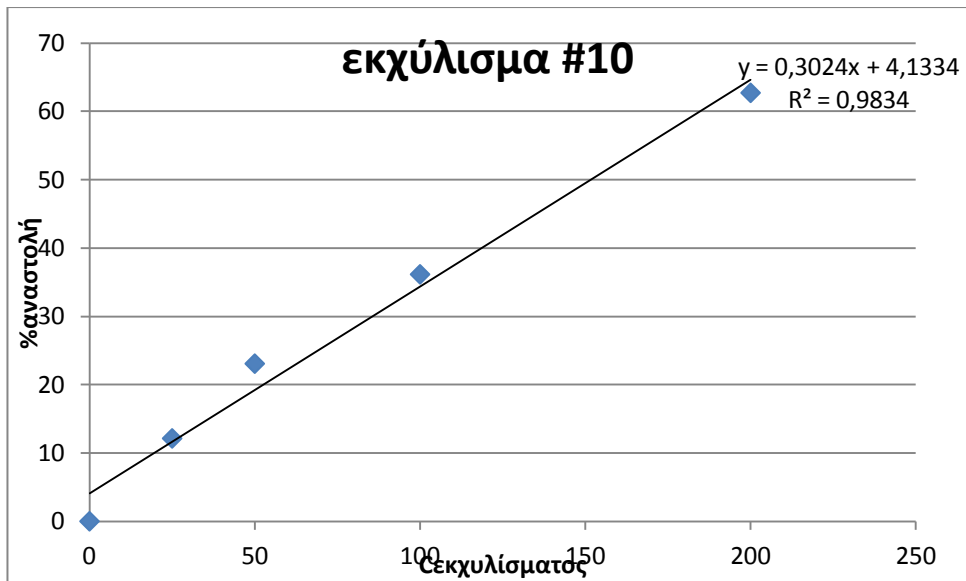


Διάγραμμα 3.1.7 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #8.

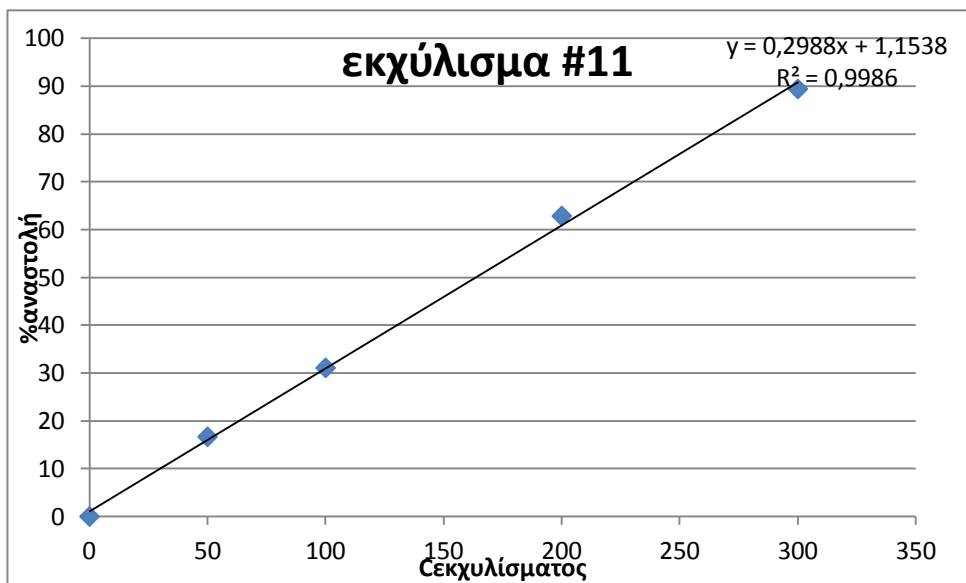


Διάγραμμα 3.1.8 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #9.

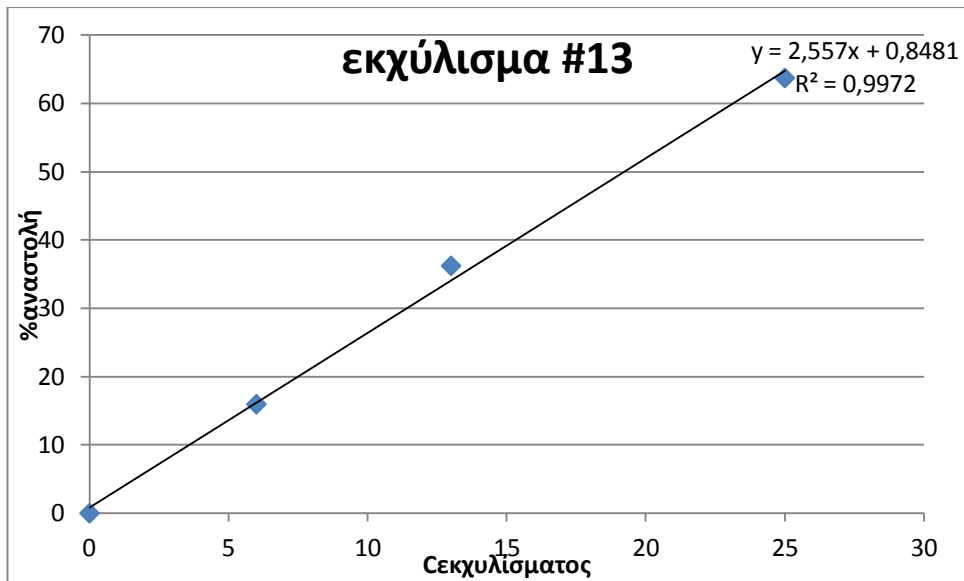




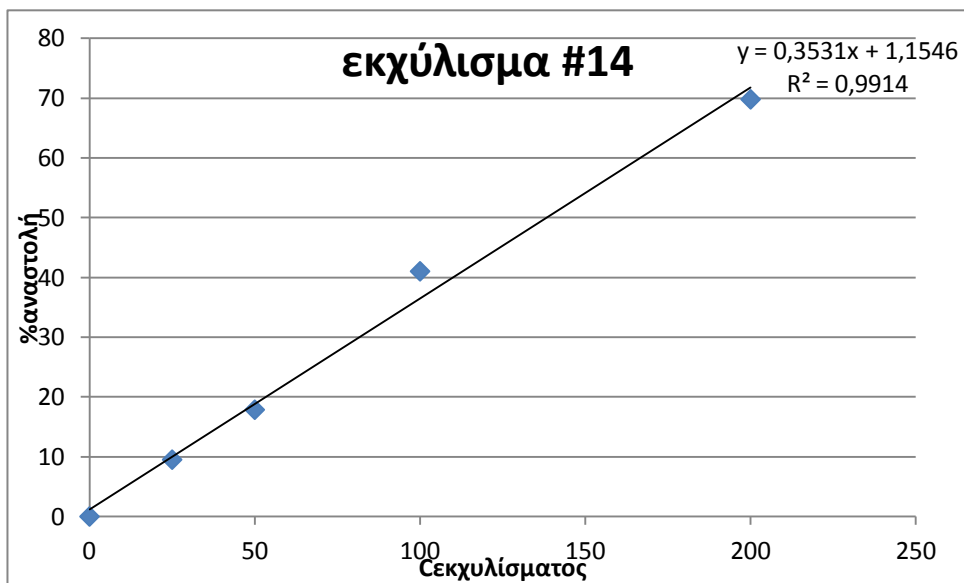
Διάγραμμα 3.1.9 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #10.



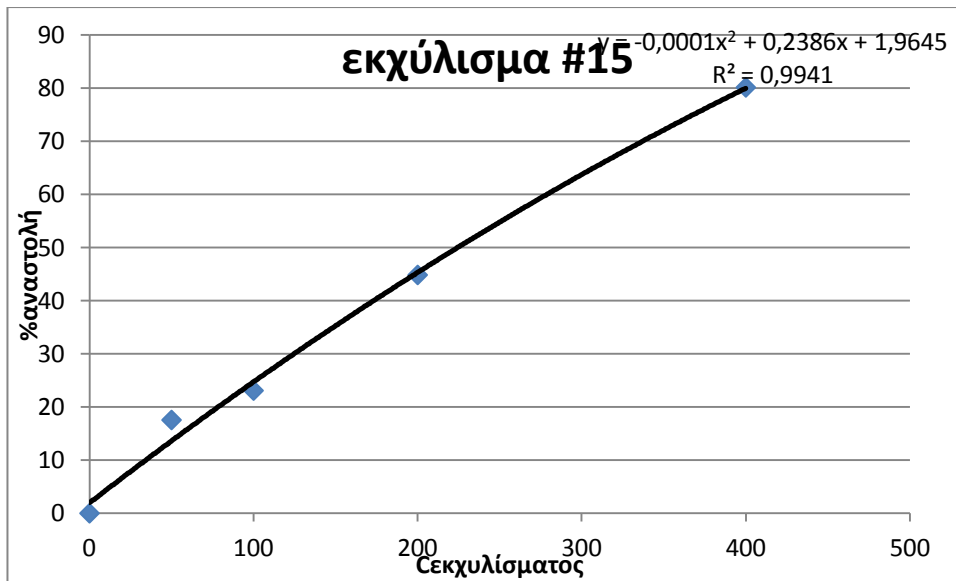
Διάγραμμα 3.1.10 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #11.



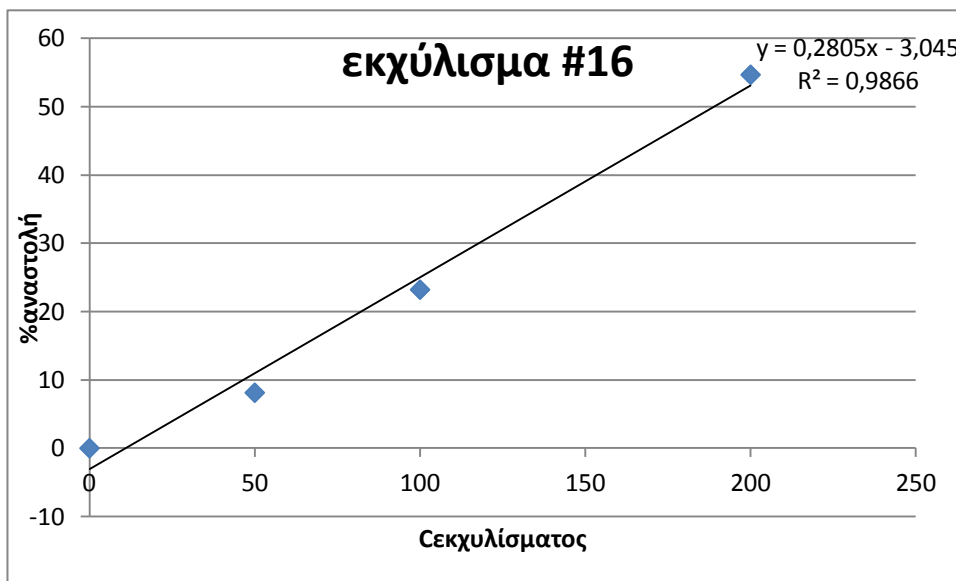
Διάγραμμα 3.1.11 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #13.



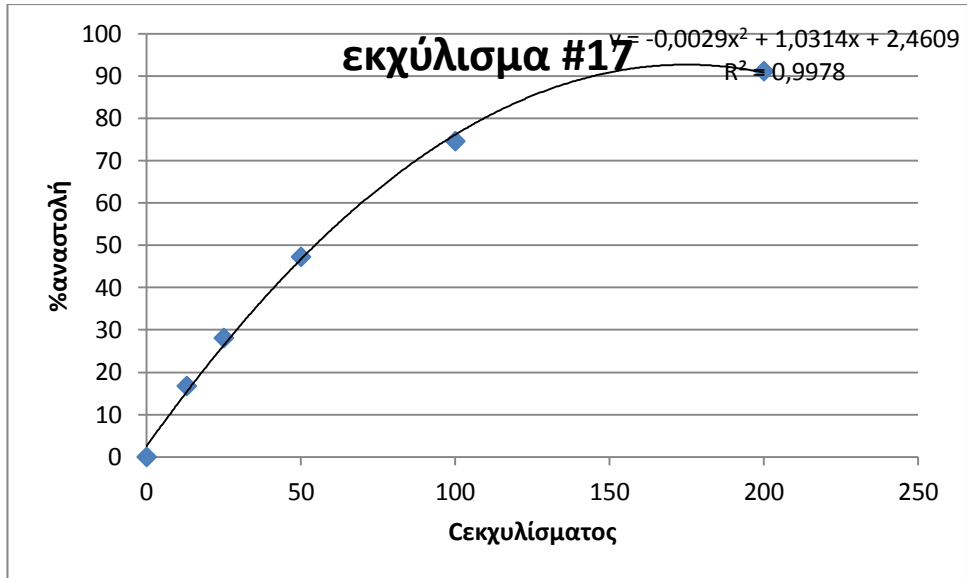
Διάγραμμα 3.1.12 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #14.



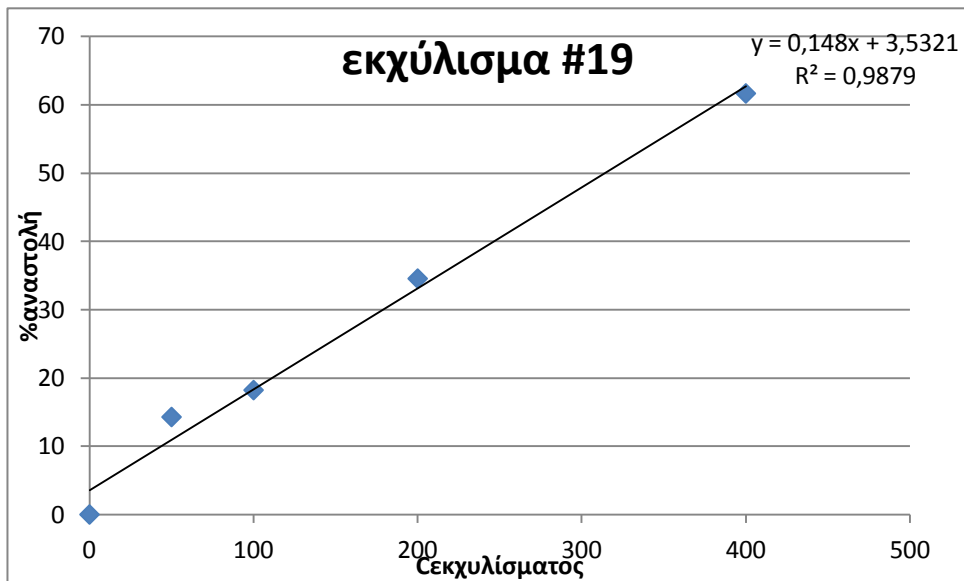
Διάγραμμα 3.1.13 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #15.



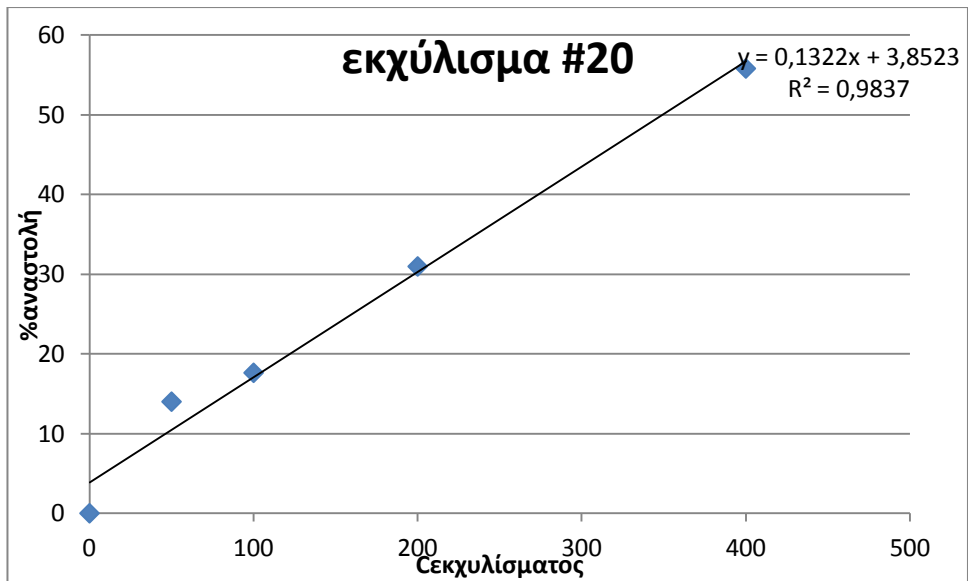
Διάγραμμα 3.1.14 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #16.



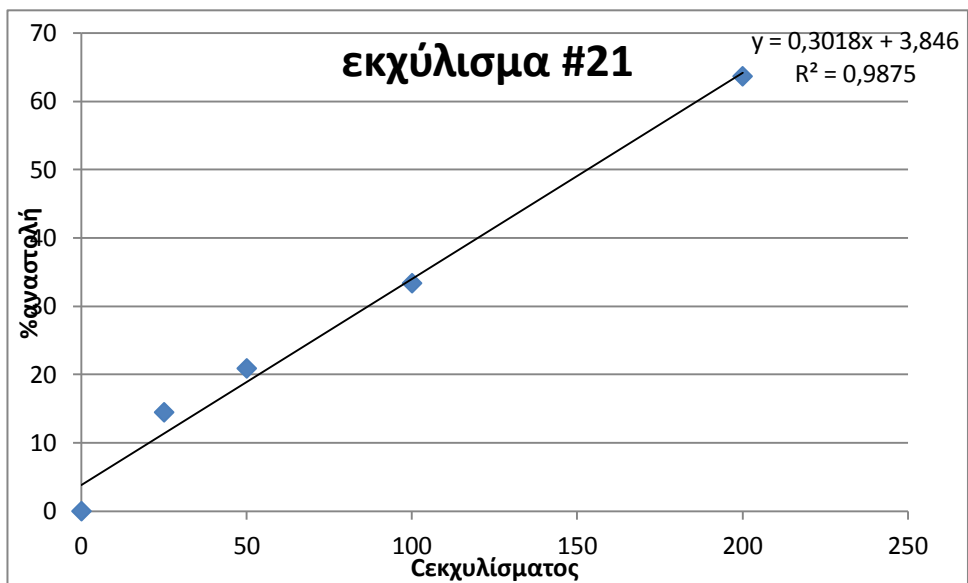
Διάγραμμα 3.1.15 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #17.



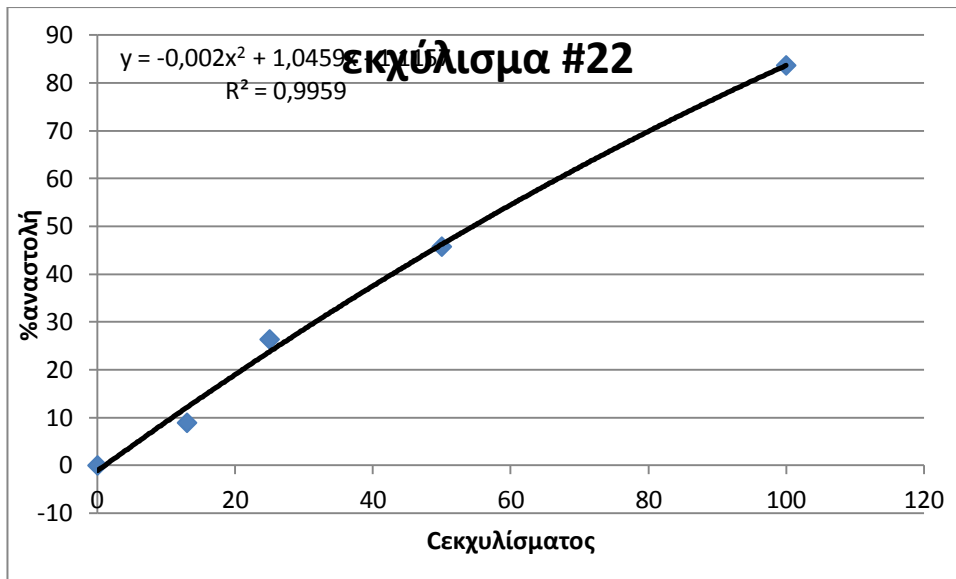
Διάγραμμα 3.1.16 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #19.



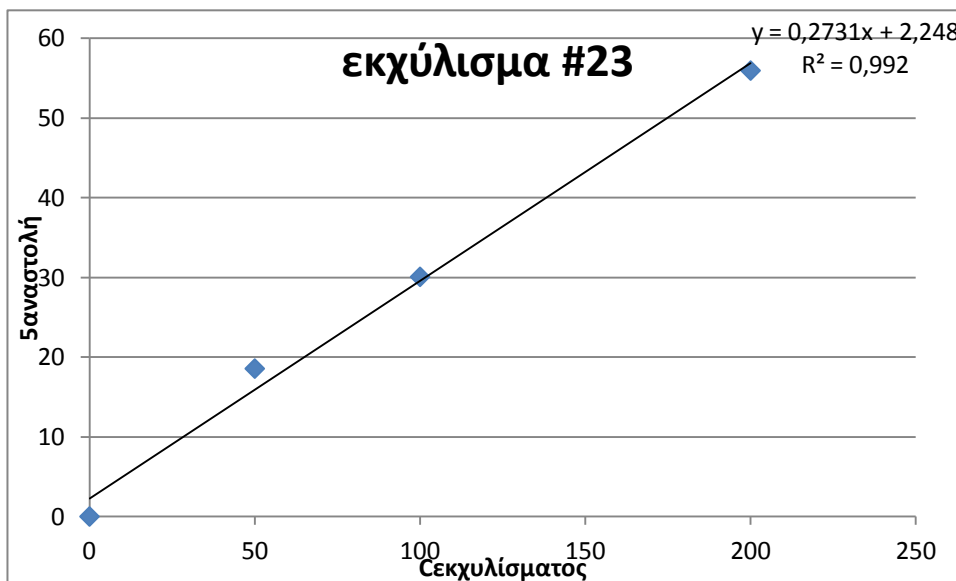
Διάγραμμα 3.1.17 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #20.



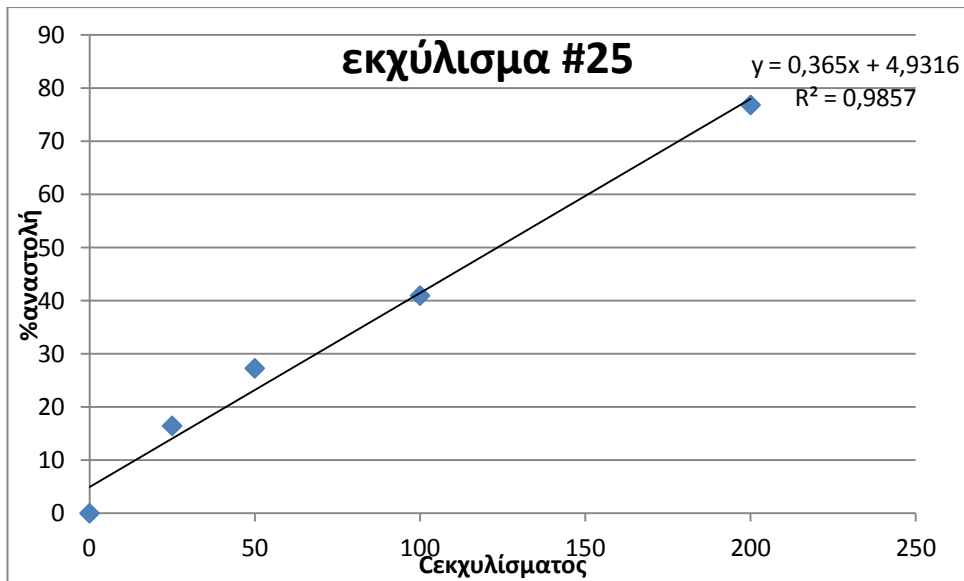
Διάγραμμα 3.1.18 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #21.



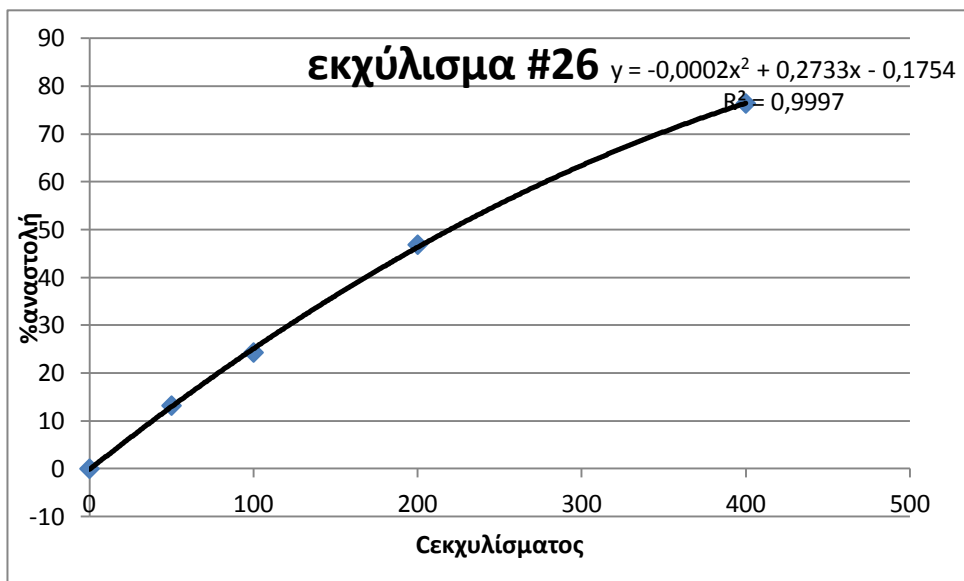
Διάγραμμα 3.1.19 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #22.



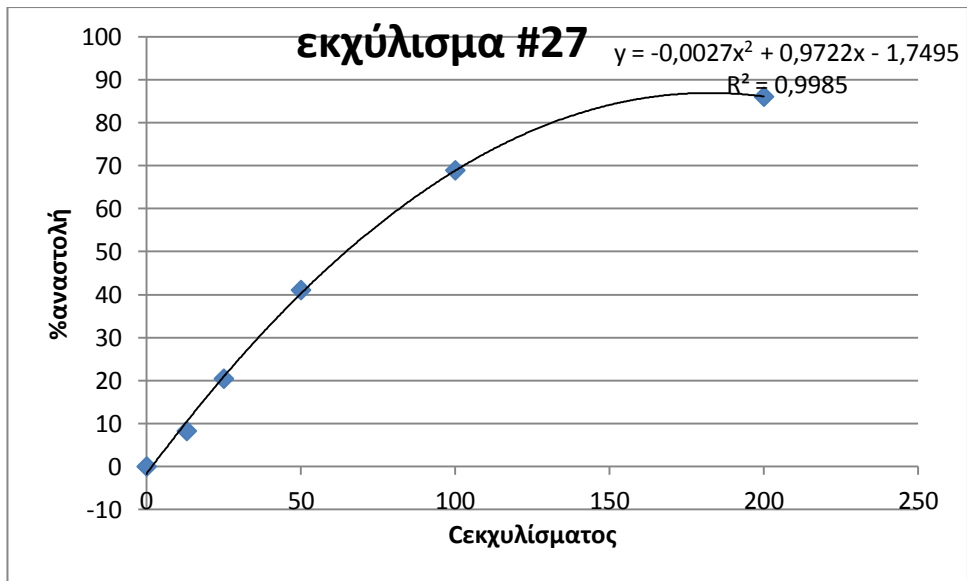
Διάγραμμα 3.1.20 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #23.



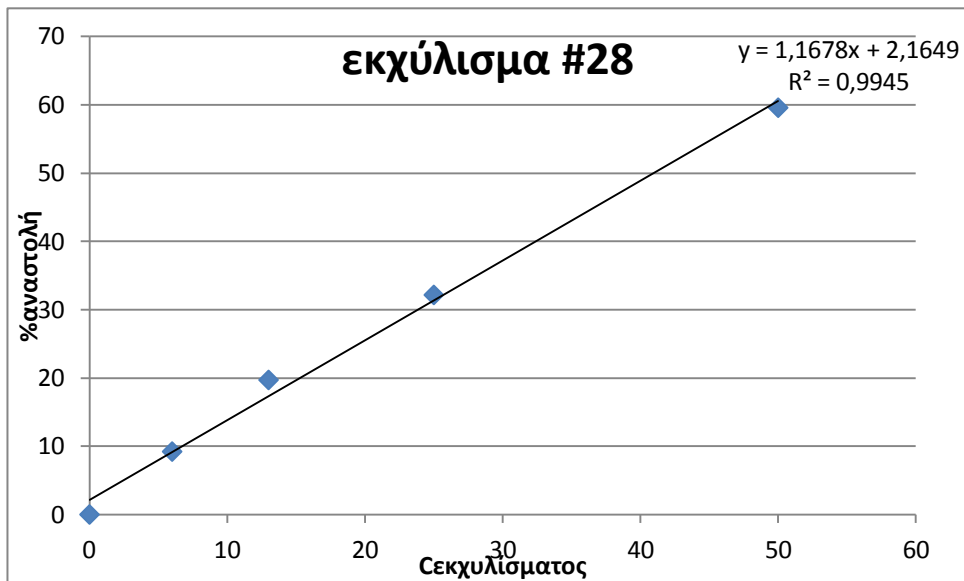
Διάγραμμα 3.1.21 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #25.



Διάγραμμα 3.1.22 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #26.

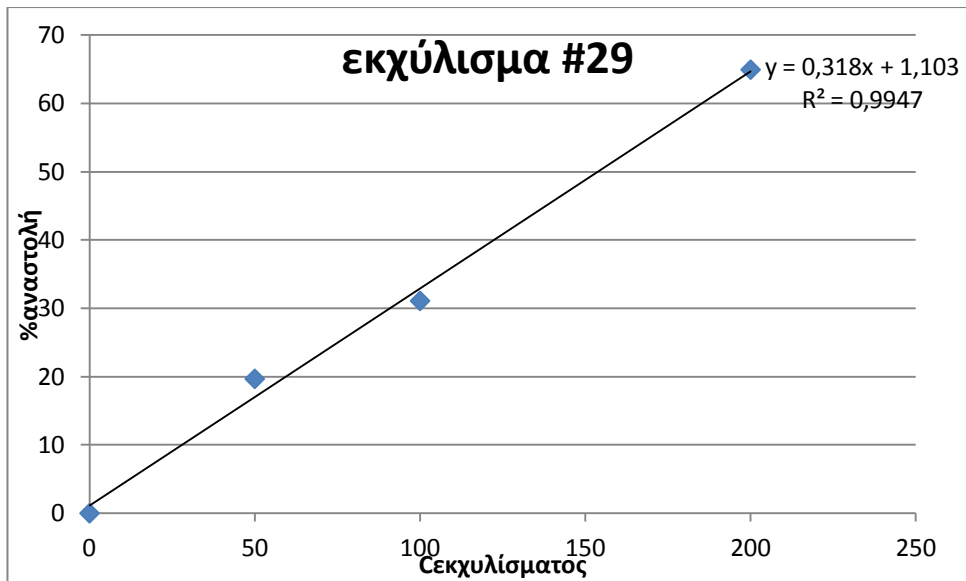


Διάγραμμα 3.1.23 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #27.

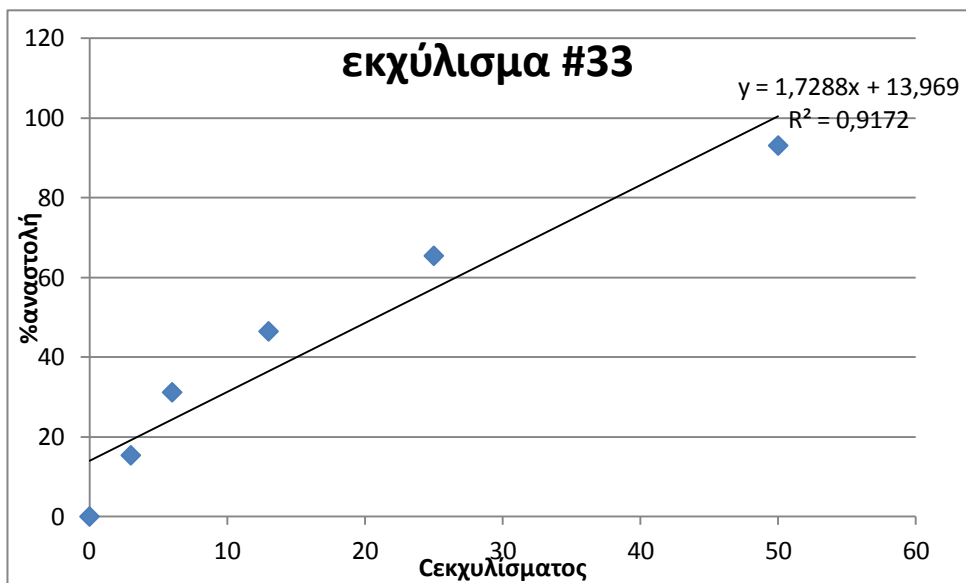


Διάγραμμα 3.1.24 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #28.

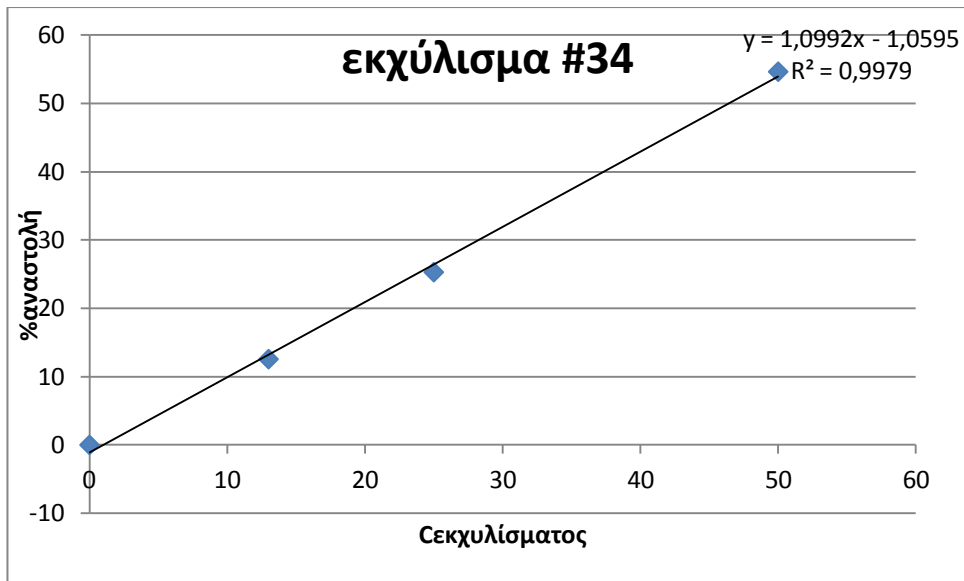




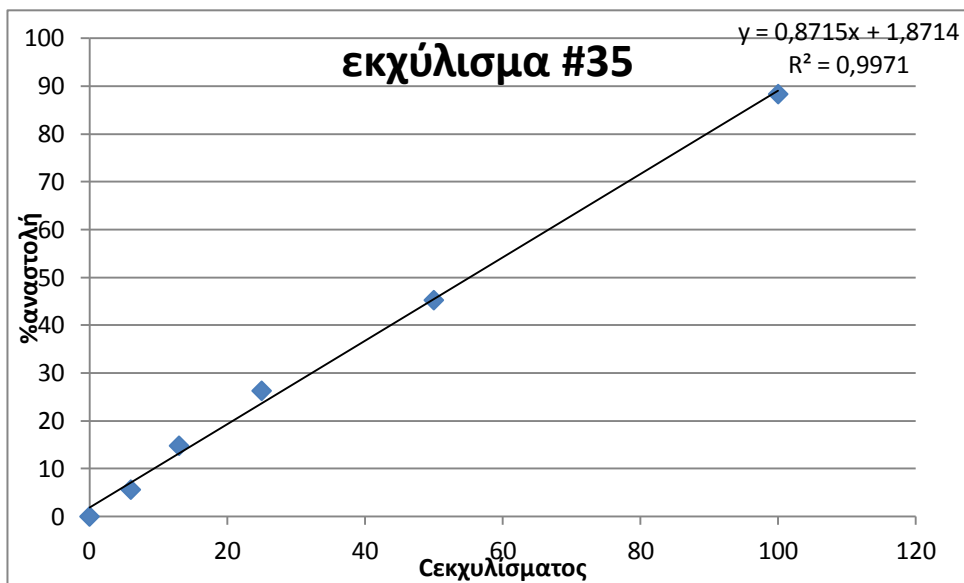
Διάγραμμα 3.1.25 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #29.



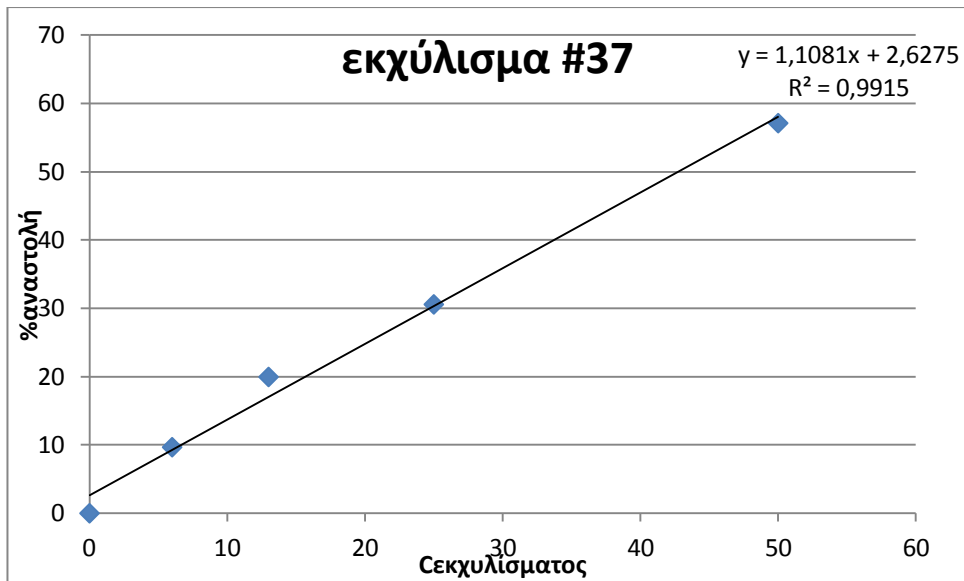
Διάγραμμα 3.1.26 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #33.



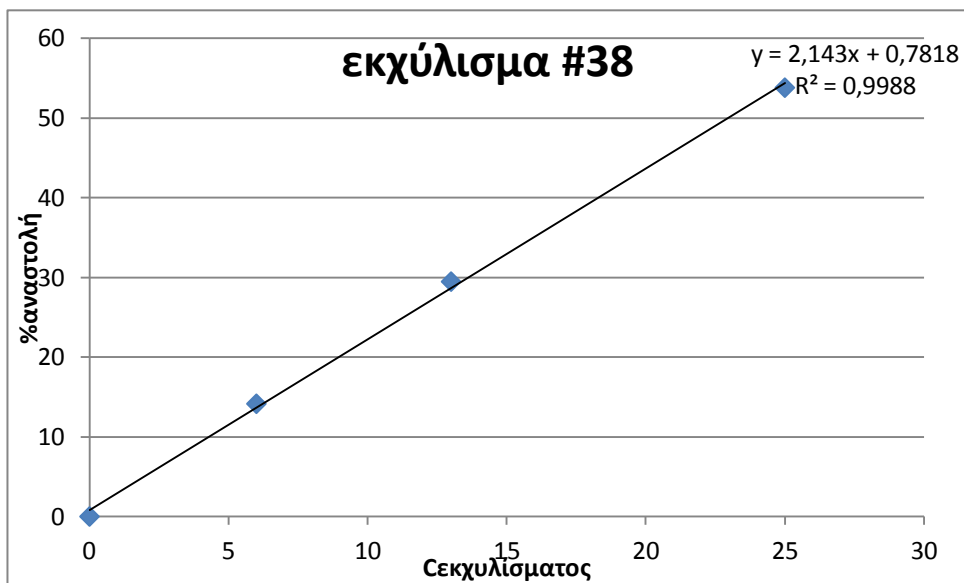
Διάγραμμα 3.1.27 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #34.



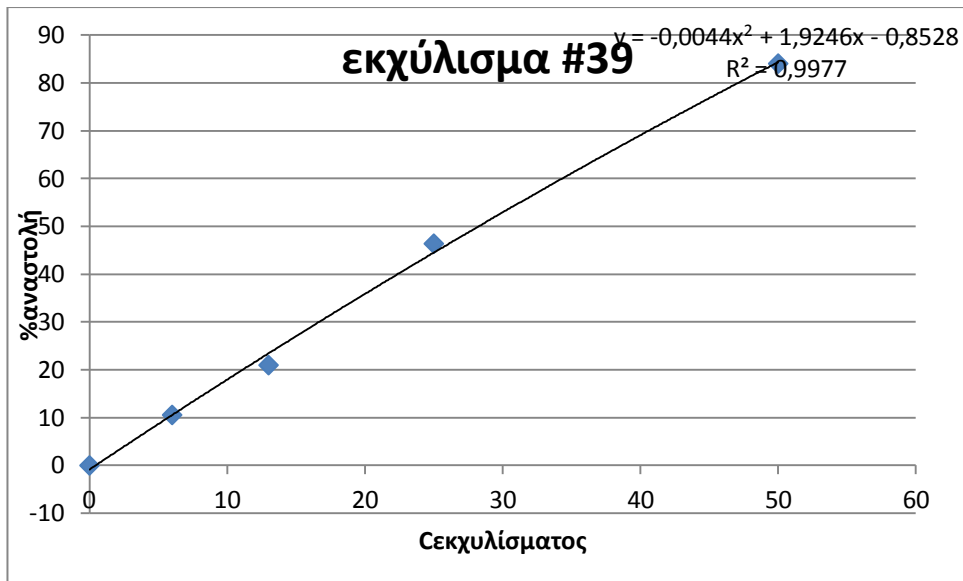
Διάγραμμα 3.1.28 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #35.



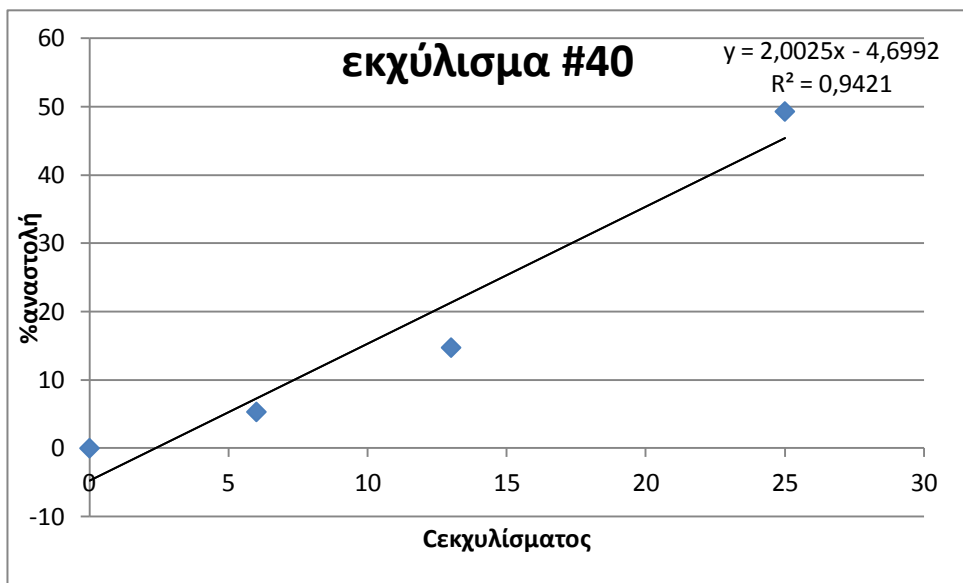
Διάγραμμα 3.1.29 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #37.



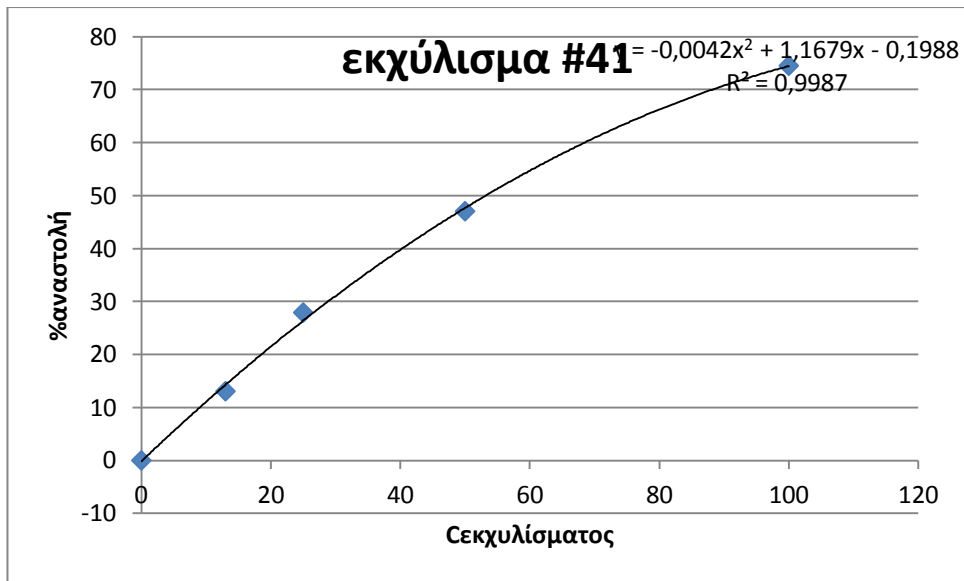
Διάγραμμα 3.1.30 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #38.



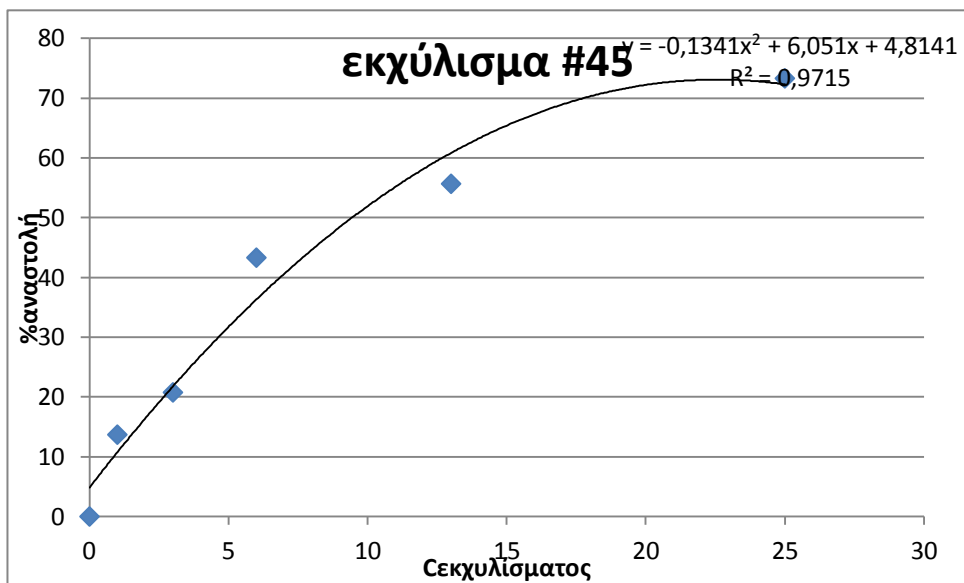
Διάγραμμα 3.1.31 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #39.



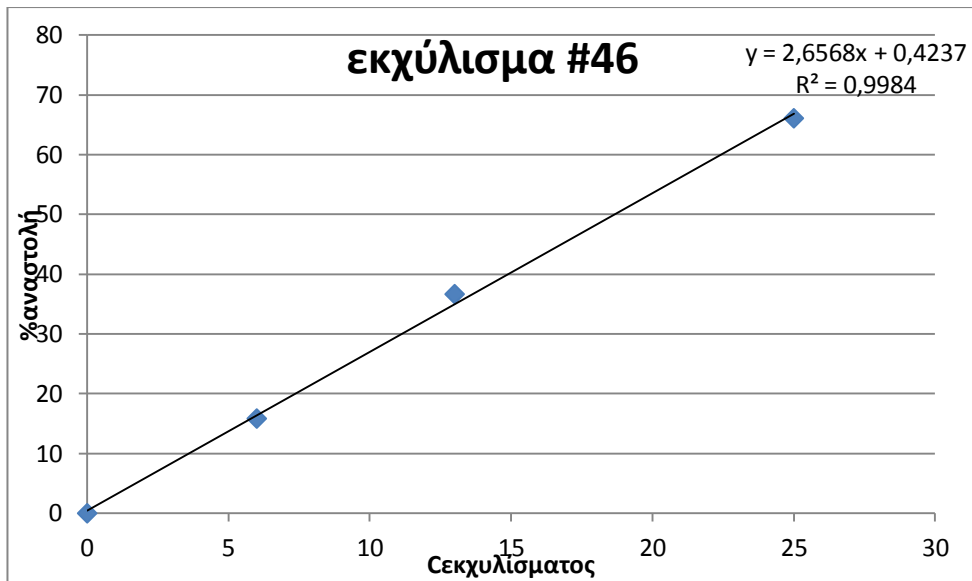
Διάγραμμα 3.1.32 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #40.



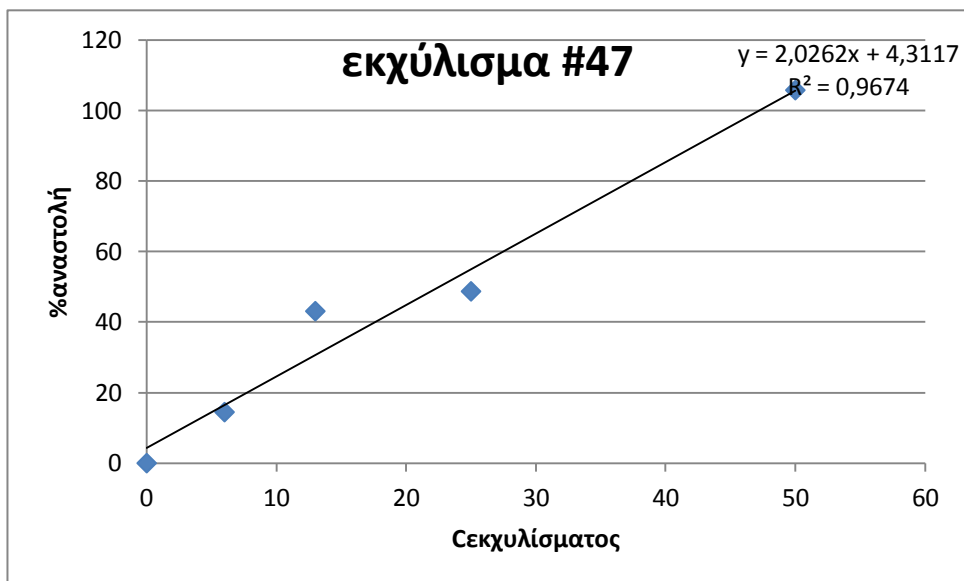
Διάγραμμα 3.1.33 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #41.



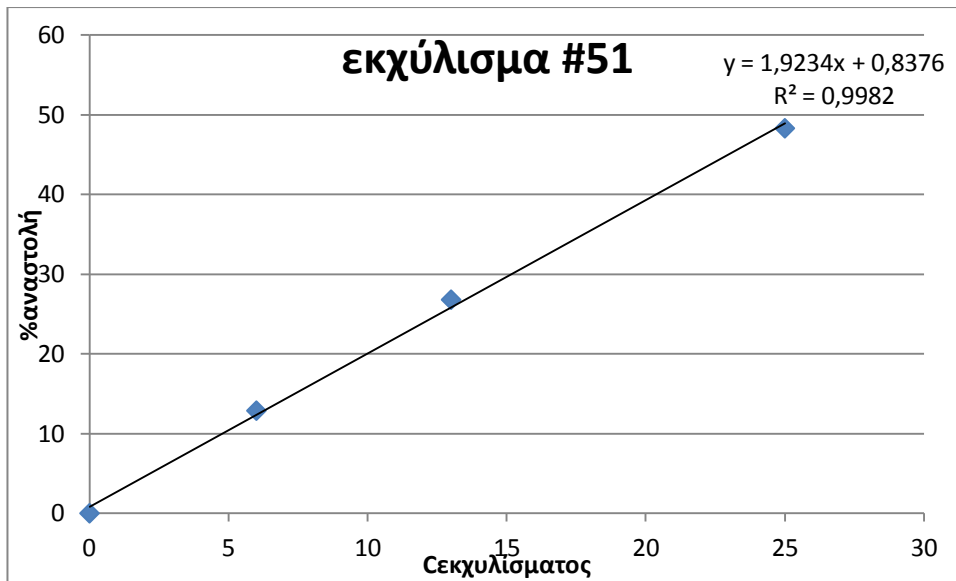
Διάγραμμα 3.1.34 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #45.



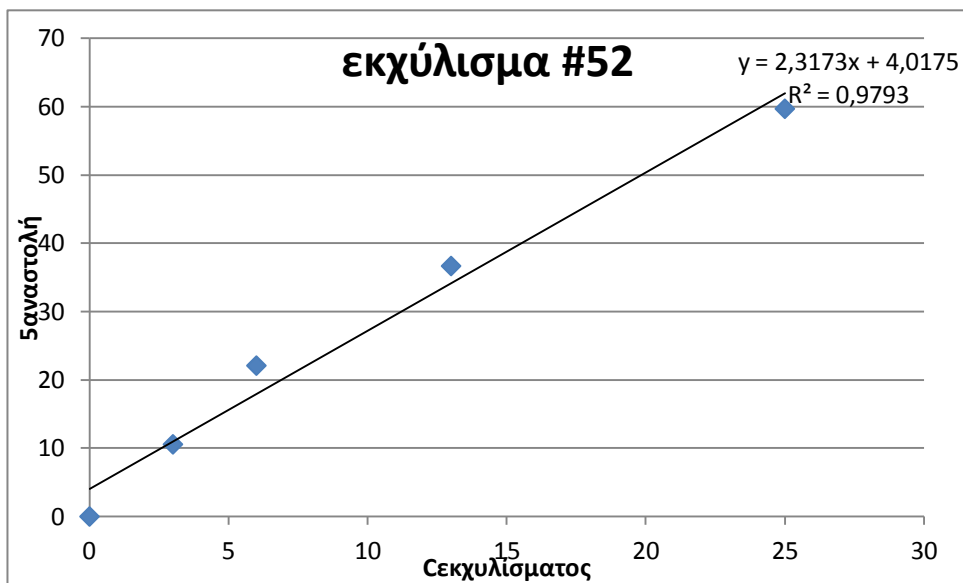
Διάγραμμα 3.1.35 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #46.



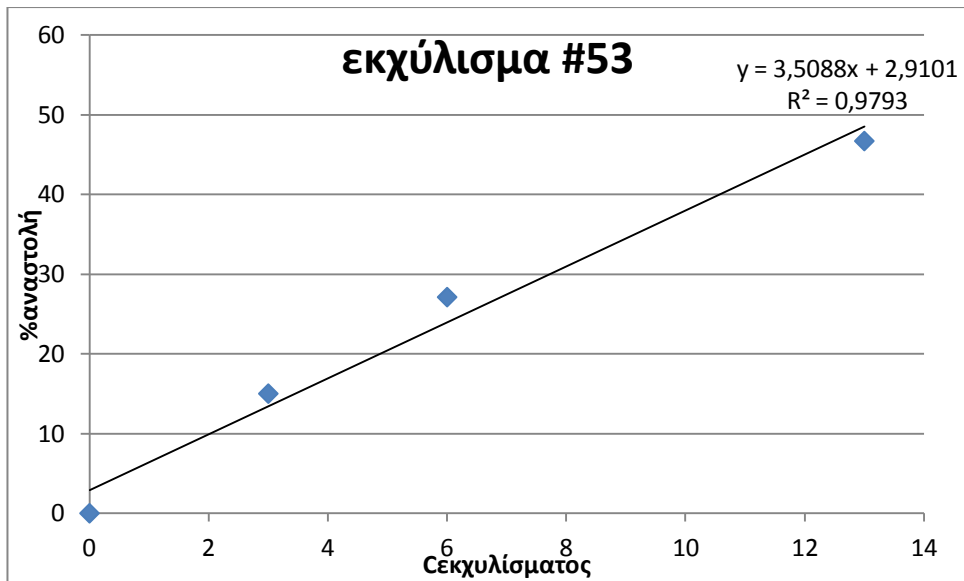
Διάγραμμα 3.1.36 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #47.



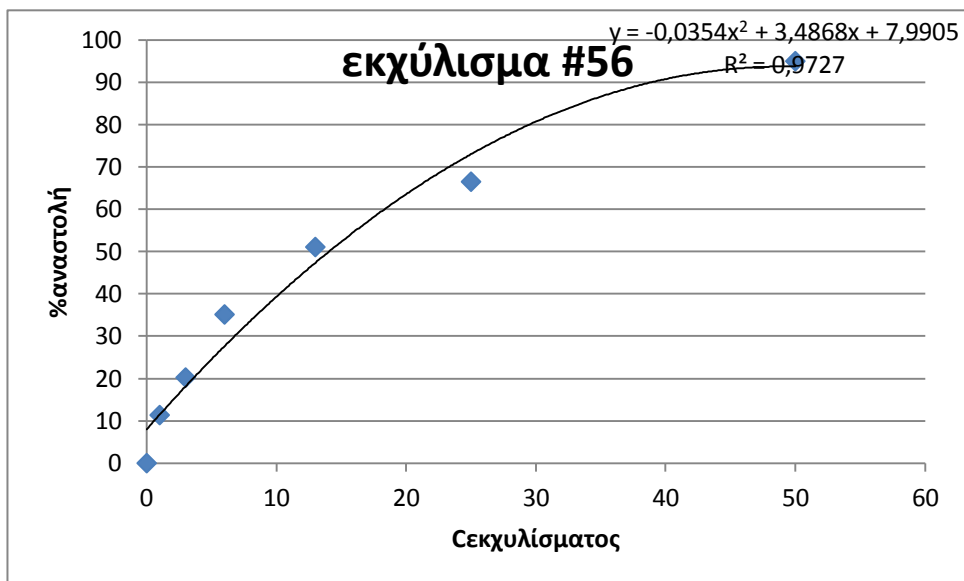
Διάγραμμα 3.1.37 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #51.



Διάγραμμα 3.1.38 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #52.

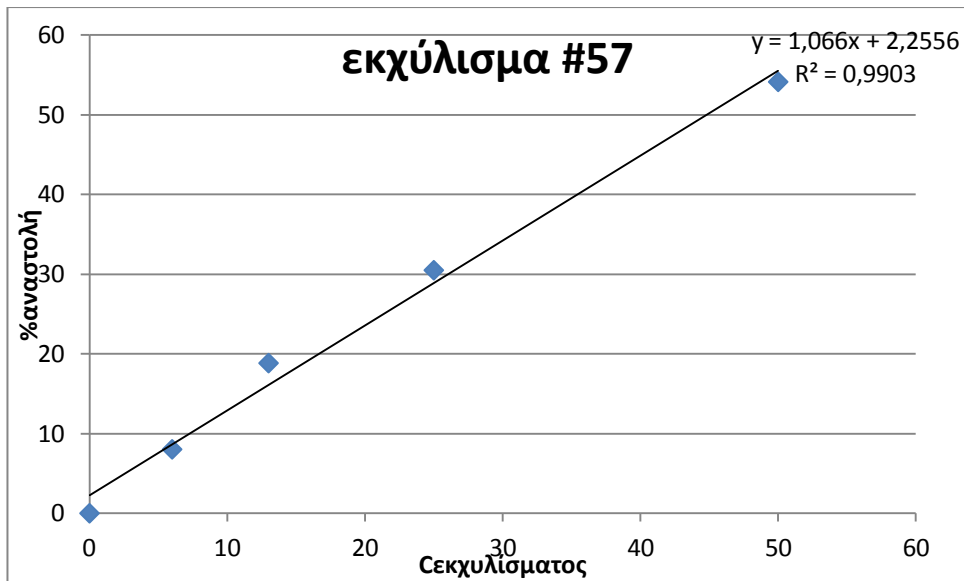


Διάγραμμα 3.1.39 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #53.

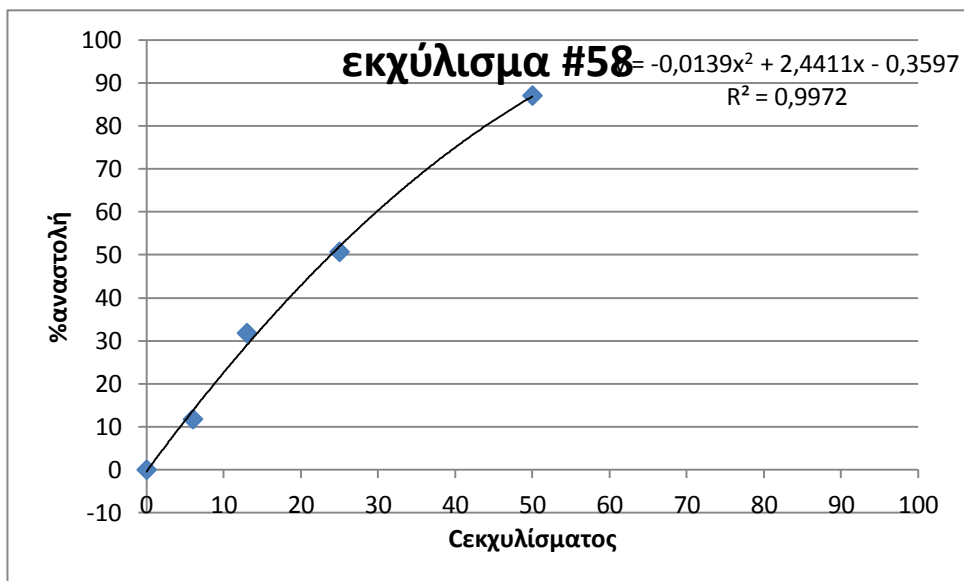


Διάγραμμα 3.1.40 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #56.

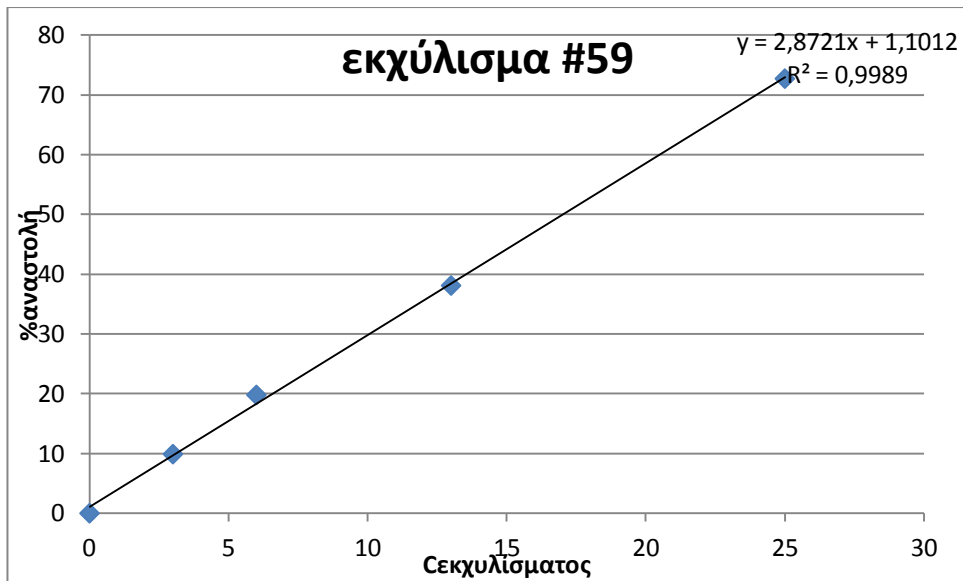




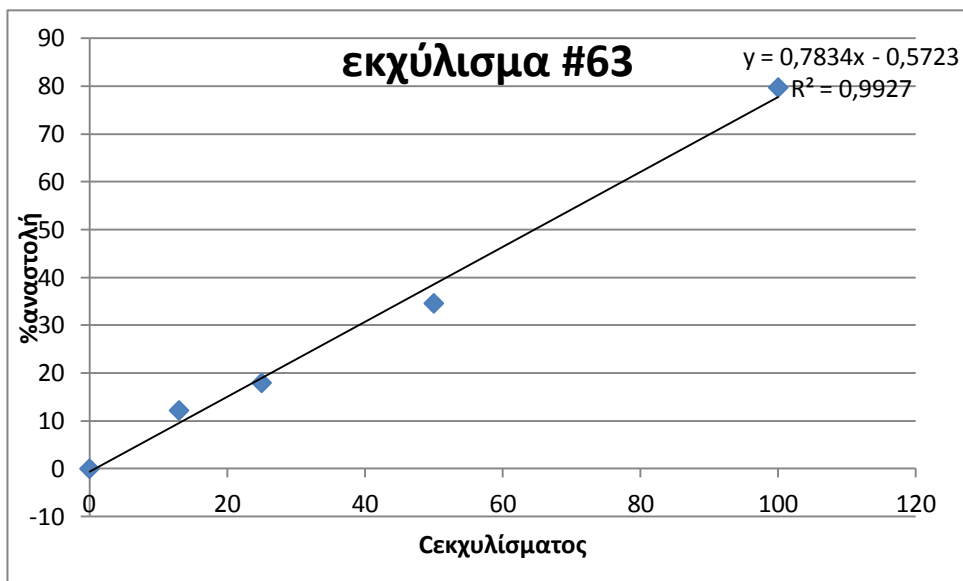
Διάγραμμα 3.1.41 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #57.



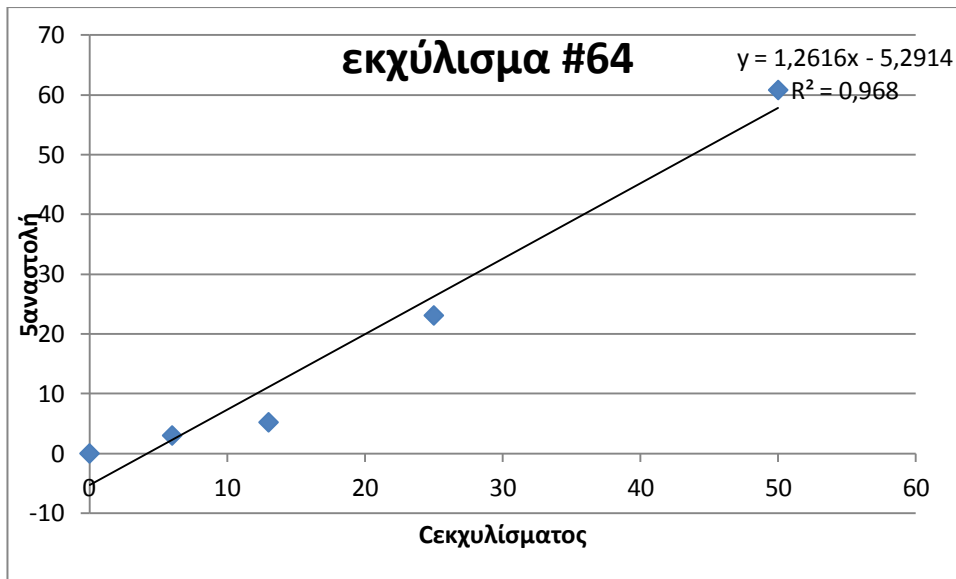
Διάγραμμα 3.1.42 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #58.



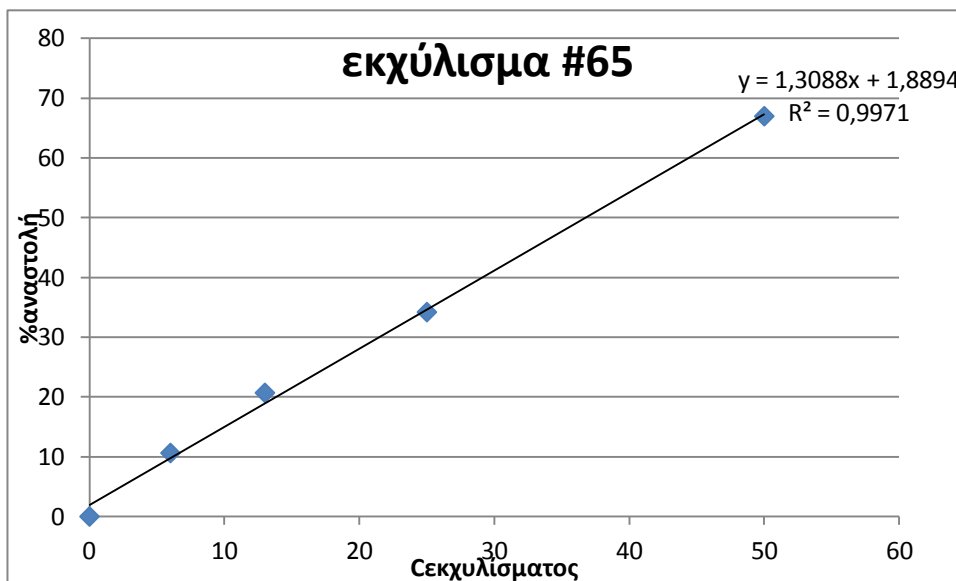
Διάγραμμα 3.1.43 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #59.



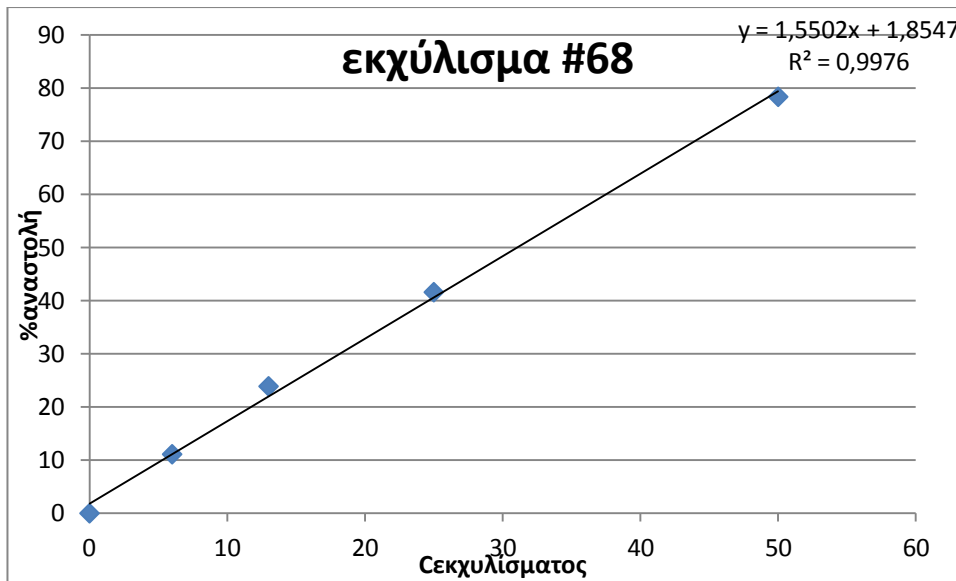
Διάγραμμα 3.1.44 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #63.



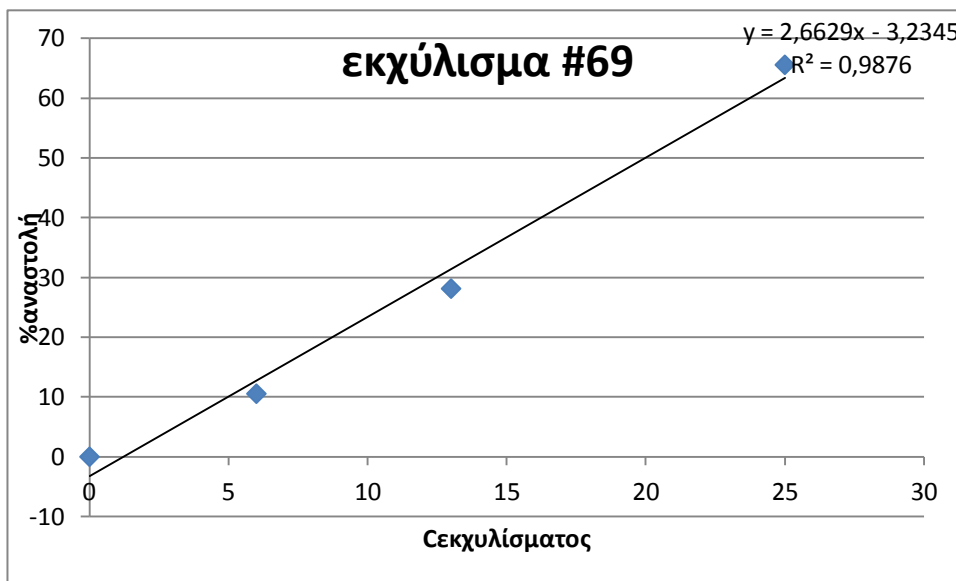
Διάγραμμα 3.1.45 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #64.



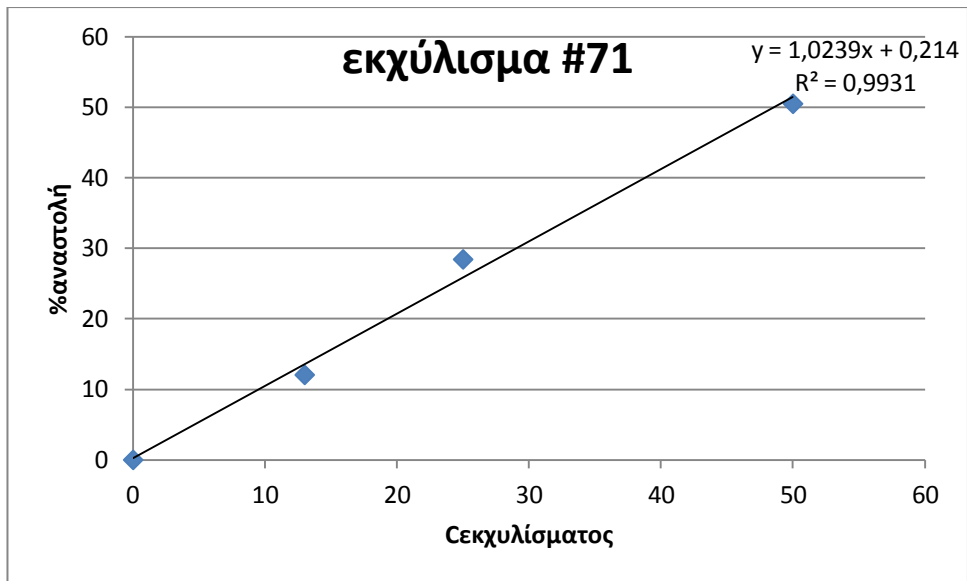
Διάγραμμα 3.1.46 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #65.



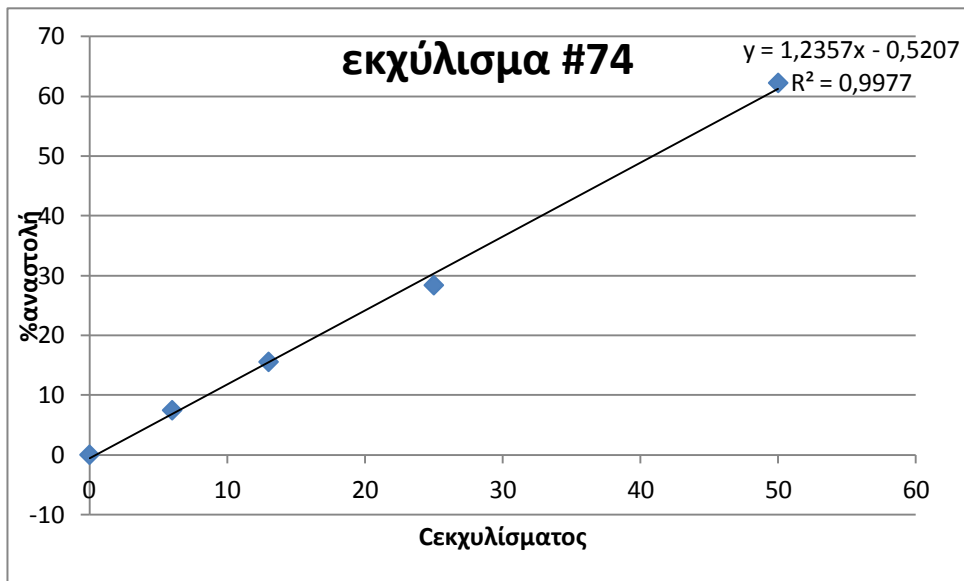
Διάγραμμα 3.1.47 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #68.



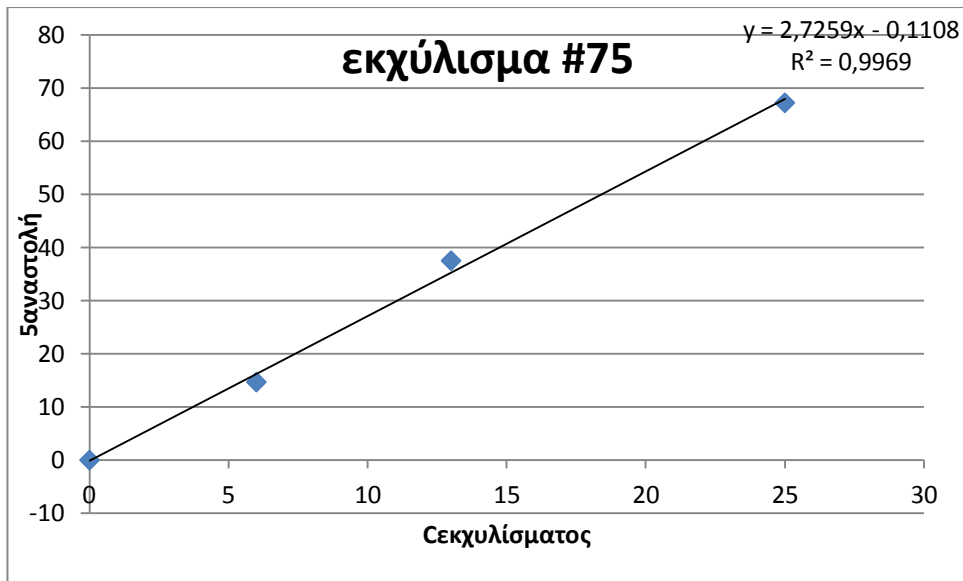
Διάγραμμα 3.1.48 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #69.



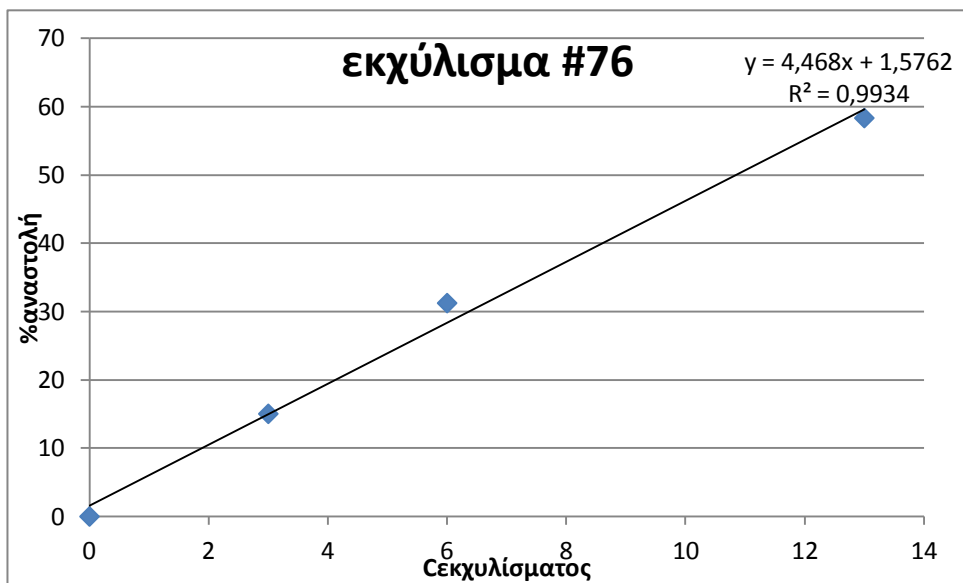
Διάγραμμα 3.1.49 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #71.



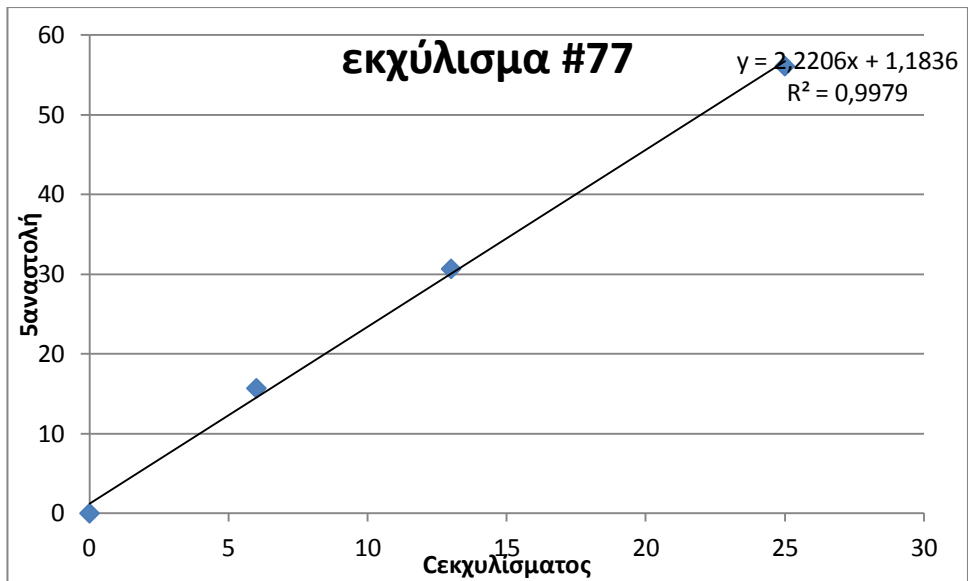
Διάγραμμα 3.1.50 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #74.



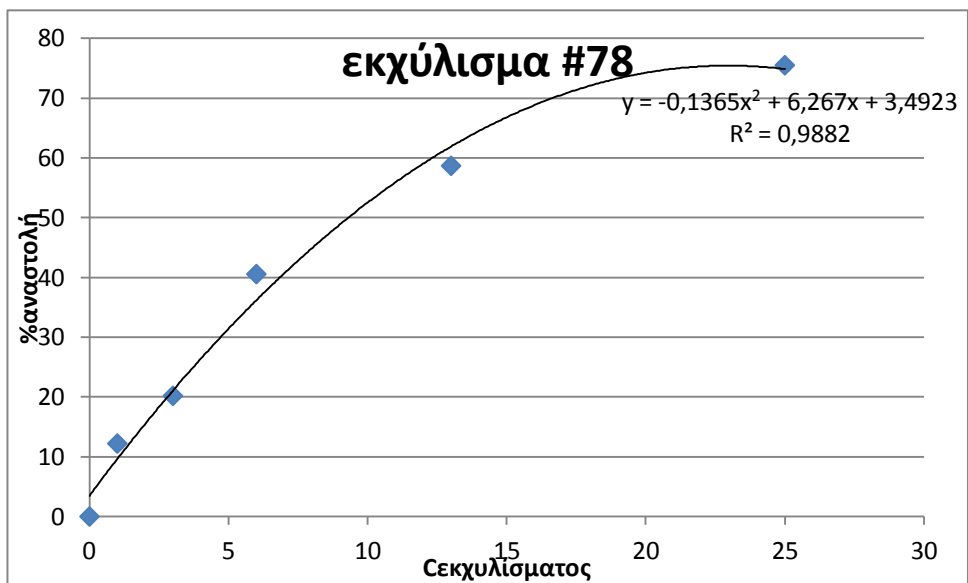
Διάγραμμα 3.1.51 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #75.



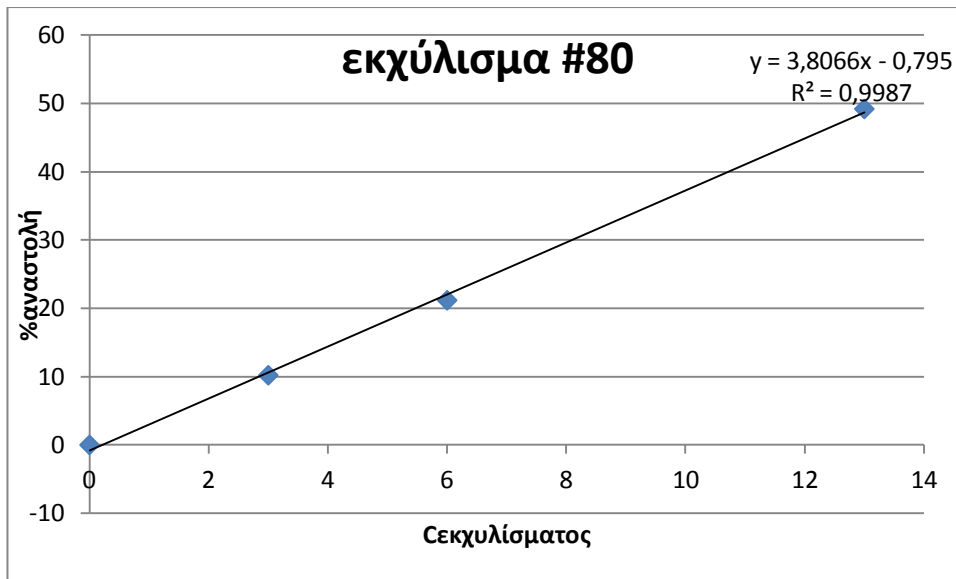
Διάγραμμα 3.1.52 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #76.



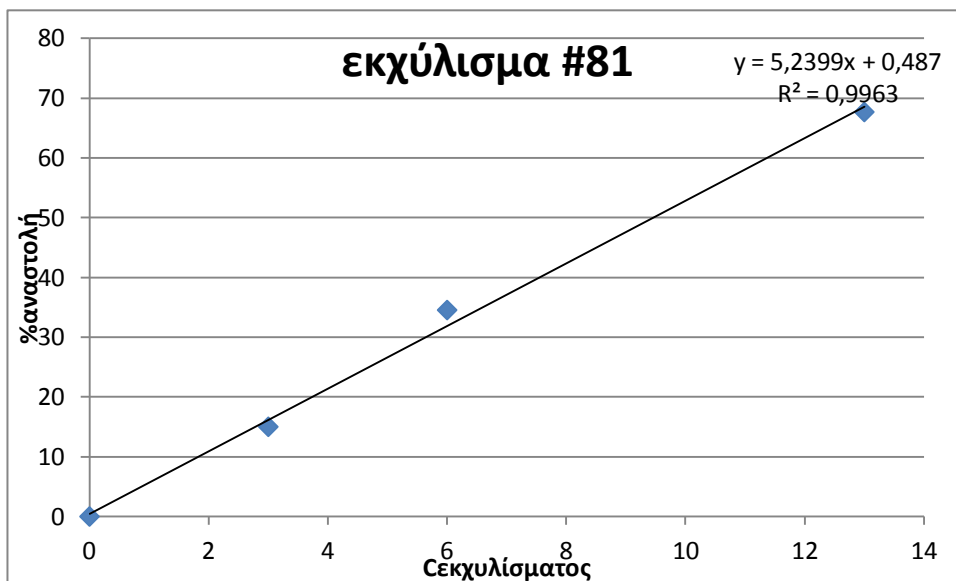
Διάγραμμα 3.1.53 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #77.



Διάγραμμα 3.1.54 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #78.

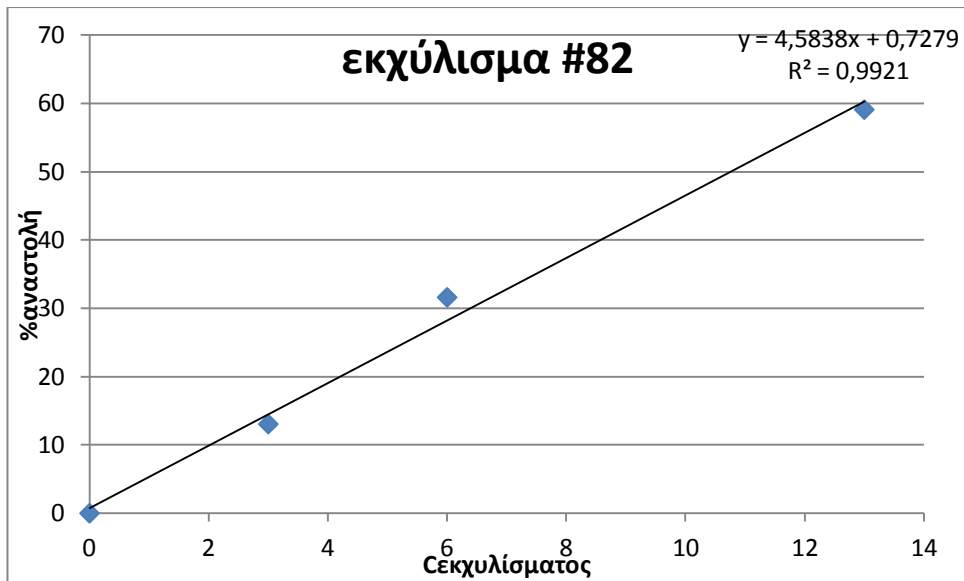


Διάγραμμα 3.1.55 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #80.

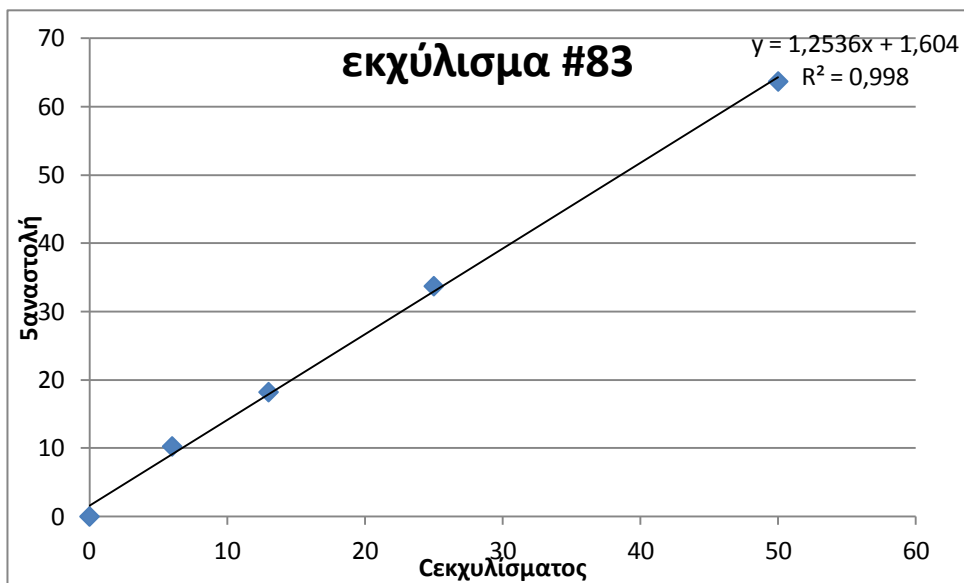


Διάγραμμα 3.1.56 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #81.

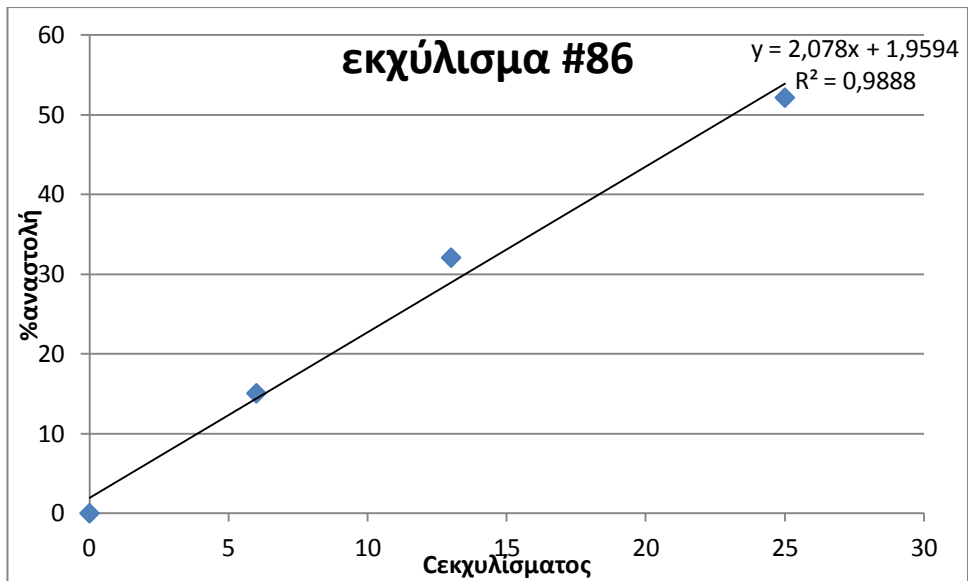




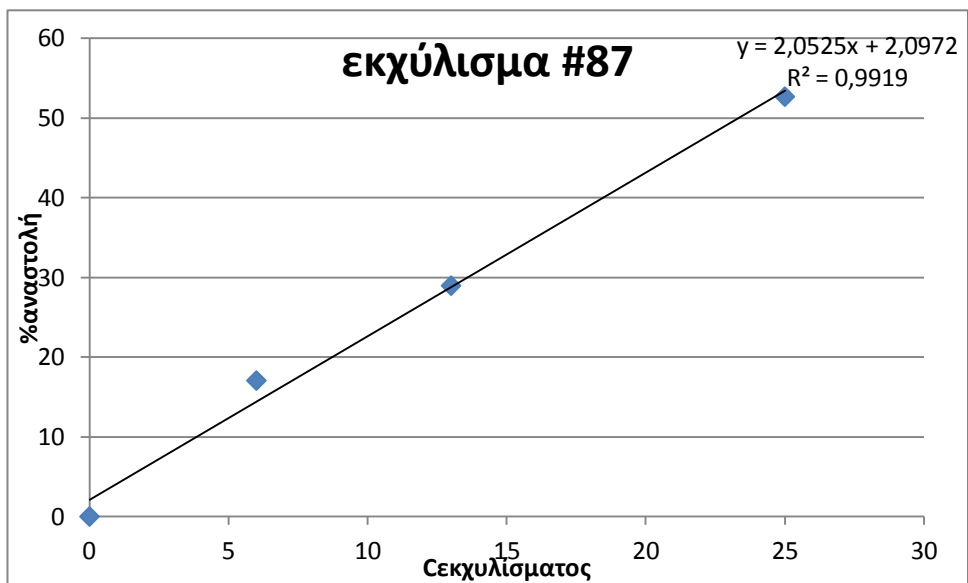
Διάγραμμα 3.1.57 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #82.



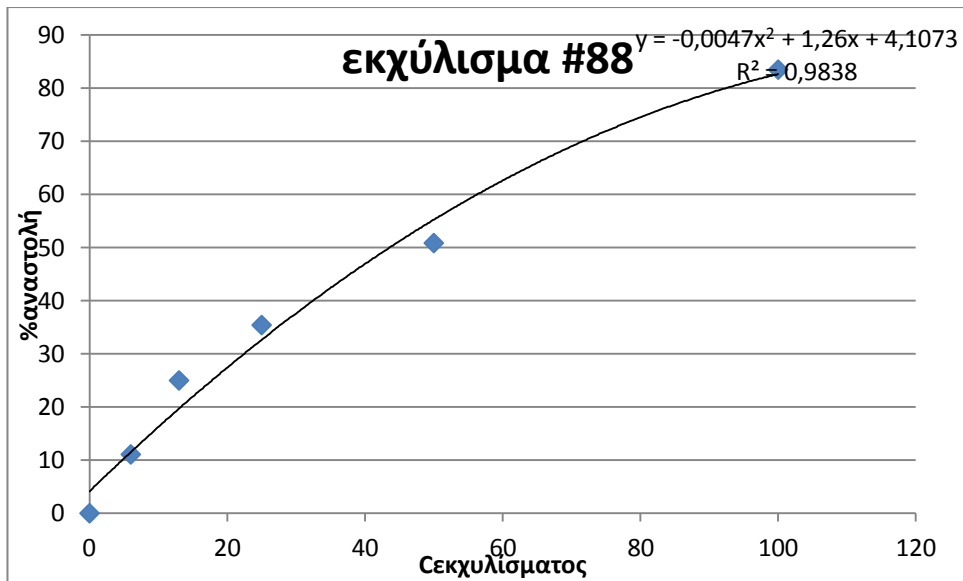
Διάγραμμα 3.1.58 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #83.



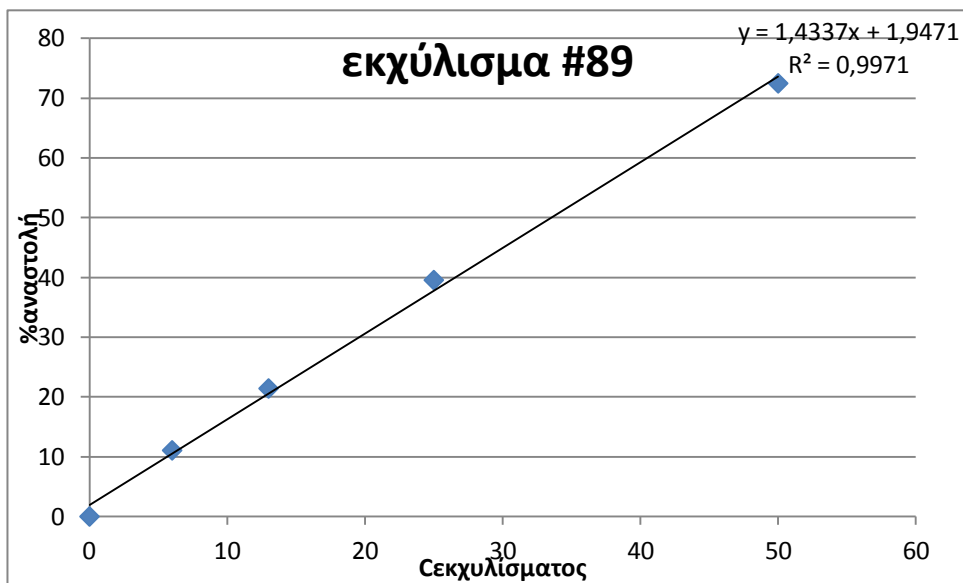
Διάγραμμα 3.1.59 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #86.



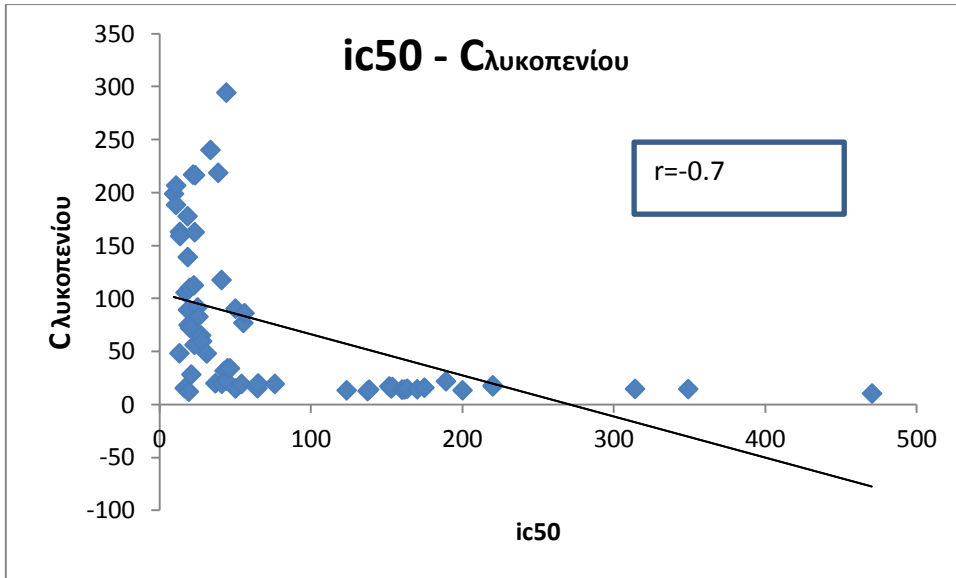
Διάγραμμα 3.1.60 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #87.



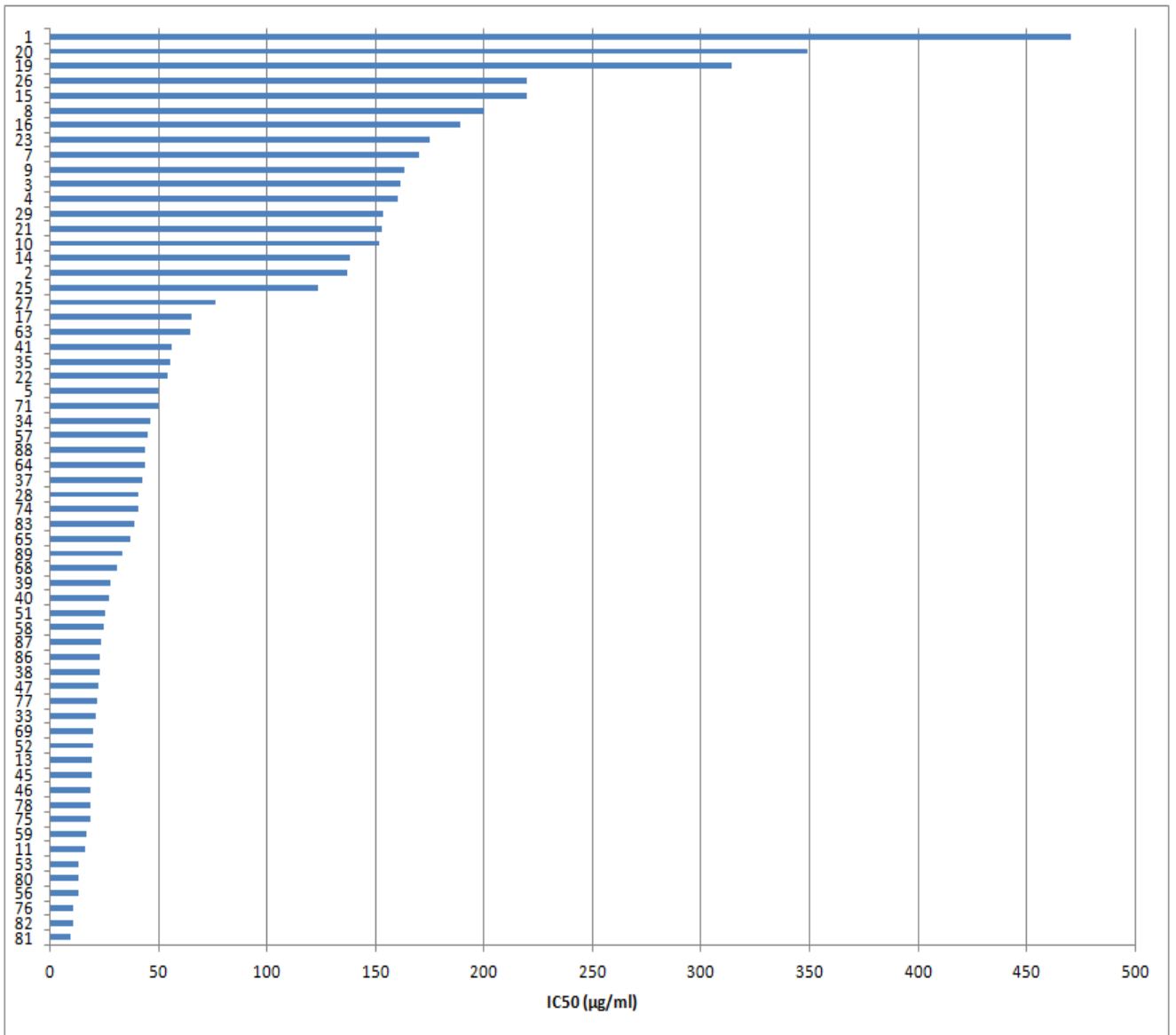
Διάγραμμα 3.1.61 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #88.



Διάγραμμα 3.1.62 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα τομάτας #89.



Διάγραμμα 3.1.63 Συσχέτιση των τιμών ic50 και της συγκέντρωσης του λυκοπενίου.



Διάγραμμα 3.2.64 Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τις τιμές ic50 των δειγμάτων με αύξουσα σειρά.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών μέσω της δίαιτας ή με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής με στόχο την προστασία από διάφορες ασθένειες θεωρείται μια από τις σημαντικότερες σύγχρονες στρατηγικές πρόληψης. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια και ιδιαίτερη βάση έχει δοθεί στην χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινόλων που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας. Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων και έχουν σημαντικές αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Crozier et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και του πιθανού ρόλου τους στην πρόληψη ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994) και το σύνδρομο ανοσοεπίκτητης ανεπάρκειας (AIDS) (Baruchel & Wainberg, 1992). Οι πολυφαινόλες φαίνεται να δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Bidlack et al., 2000).

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στο οποίο έχουν μελετηθεί πολυάριθμα εκχυλίσματα, διαφόρων φυτών ως προς την πιθανή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση τους, που οφείλεται κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιέχουν. Στα ίδια πλαίσια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από απόβλητα τομάτας ελληνικών ποικιλιών. Οι τομάτες έχουν κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου τους. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των τοματών είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Η απομόνωση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων έγινε στο εργαστήριο της Μηχανικής Τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας. Η απομόνωση

των εκχυλισμάτων έγινε σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου εκχύλισης. Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος DPPH, η οποία στηρίζεται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup>. Σε όλα τα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε από τις γραφικές παραστάσεις της % εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων, το IC<sub>50</sub> δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση - εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος. Συνολικά μελετήθηκαν 63 εκχυλίσματα από απόβλητα επεξεργασίας τομάτας και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 10 συγκεντρώσεις από 1,5-800μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων ήταν ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη ήταν η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 9,44μg/ml έως 470,54μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχυλίσματα τομάτας #81, σε συνθήκες T= 80<sup>o</sup>C, P=6000(x1000psi) και t=45mins, το οποίο χαρακτηριζόταν από μια C<sub>λυκοπενίου</sub>= 198,84mg/kg. Το δεύτερο πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα #82 με C<sub>λυκοπενίου</sub>=188,39mg/kg και συνθήκες απομόνωσης T=80<sup>o</sup>C, P=6000(x1000psi) και t=60mins και το τρίτο πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα #86 με C<sub>λυκοπενίου</sub>=162,65mg/kg σε συνθήκες απομόνωσης T=80<sup>o</sup>C P=6000(x1000psi) και t=30mins. Τα ασθενέστερα εκχυλίσματα ήταν τα #1,#19,#20 με τιμές IC<sub>50</sub> μεγαλύτερες από 310μg/ml, για τα οποία οι συνθήκες απομόνωσης ήταν: T= 40<sup>o</sup>C, P= 5000(x1000psi), t=15mins και η C τους στο λυκοπένιο κυμαινότα μεταξύ των τιμών 10-14mg/kg. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν (περίπου 45 δείγματα) παρουσίασαν IC<sub>50</sub> μεταξύ των τιμών 10μg/ml και 75μg/ml. Επίσης, η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC<sub>50</sub> και τη συγκέντρωση του λυκοπενίου έδειξε ότι υπήρξε σχετικά μεγάλη συσχέτιση ( $r = -0,7$ ) και στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ). Αυτό δείχνει πως στις συγκεκριμένες συνθήκες απομόνωσης του λυκοπενίου αυτό παραμένει βιολογικά δραστικό.

Τα τελευταία χρόνια έχει εκπονηθεί πληθώρα πειραμάτων που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα τομάτας, από φλούδα και χυμό της τομάτας, αλλά και μελετών πάνω στον τρόπο και στις συνθήκες

απομόνωσης των πολυφαινολών και κυρίως του λυκοπενίου της τομάτας. Πιο συγκεκριμένα, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με διάφορες μεθόδους, κυρίως της μεθόδου DPPH, που έδειξαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών που βρίσκονται στα απόβλητα τομάτας. Προέκυψε ότι ήταν πολύ μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα στα απόβλητα τομάτας παρά στον χυμό και την φλούδα της τομάτας, γιατί παρά το γεγονός ότι το προϊόν της απομόνωσης από την φλούδα και τον χυμό περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό σε καρτενοειδή, λιπίδια, τοκοφερόλες και σιτοστερόλες, η αντιοξειδωτική ικανότητά τους μειωνόταν κατά την διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας τους (Seybold et al,2004). Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, μελέτες με διαφορετικούς παράγοντες απομόνωσης των πολυφαινολών, εκτός της θερμοκρασίας, της πίεσης και του χρόνου απομόνωσης, όπως της αλληλεπίδρασης της θερμοκρασίας και της πίεσης, της χρήσης συνδιαλυτών, της ροής εκχύλισης, της περιεκτικότητας σε υγρασία και του μεγέθους των σωματιδίων αλλά και διάφορες μεθόδους απομόνωσης με εναλλακτικούς κύριους διαλύτες (π.χ. εξάνιο και αιθάνιο). Όσον αφορά την θερμοκρασία, την πίεση και τον χρόνο απομόνωσης, όσο αυξάνονταν οι τιμές τους τόσο μεγαλύτερη ήταν η απομόνωση του λυκοπενίου, πράγμα το οποίο συμπίπτει και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα σε απόβλητα τομάτας παρά στην φλούδα και στον χυμό της. Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους προέκυψε ότι μόνο με τον κατάλληλο συνδυασμό των παραμέτρων μπορούμε να έχουμε την μέγιστη απομόνωση λυκοπενίου λόγω της αλληλεπίδρασης τους και ότι οποιαδήποτε αλλαγή παραμέτρων οδηγεί σε διαφορετική τιμή απομόνωσης του λυκοπενίου (Mark H. Zuknik et al,2012). Κατά συνέπεια, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι δυνατή η αξιοποίηση των παραπροϊόντων της επεξεργασίας τομάτας στην κατεύθυνση της ανάκτησης αντιοξειδωτικών μορίων που περιέχουν και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Τα μόρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω ενίσχυση του τελικού προϊόντος (χυμός τομάτας) αλλά και άλλων χυμών και προϊόντων. Επίσης, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή βιολειτουργικών προϊόντων όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής. Για την πρόοδο της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο μένει να ακολουθήσουν και άλλες εργασίες που θα εξετάζουν την επίδραση των παραπάνω εκχυλισμάτων σε κυτταρικές σειρές, τους μηχανισμούς δράσης τους καθώς και τα επίπεδα ανεκτικότητάς τους από τον οργανισμό.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, (2003).
- Κωνσταντίνου Α. Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου. Περγαμνή-Ετήσια έκδοση του Πανεπιστημίου Κύπρου (2008).
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α. Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14, (1997).
- Adlercreutz H, Mazur W., Phyto-oestrogens and Western diseases, *Ann Med.* 1997 29:95–120.
- Alacron De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. *Pharmacology.* 1994 48:56-52.
- Ames BN, Gold LS, Willett WC: The causes and prevention of cancer, 1995, *Proc Nat Acad Sci USA*, 92: 5258-5265.
- 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).
- Baydar, N. G., Ozkan, G., & Sagdic, O. “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.)”. 2004. *Food Chemistry*, 15, 335–339.
- Breinhold V, Lauridson ST, Dragsted LO. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolising and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica.* 1999 29:1227-1240.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L., Rescioa, L. “An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. 2008. *Separation and Purification Technology*, 64, 192–197.
- Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H(eds), *Carotenoids Handbook*. Birkhauser, Basel (2004).
- Beatriz P. Nobre, Luisa Gouveia, Patricia G. S. Matos, Ana F. Cristino António F. Palavra and Rui L. Mendes Supercritical Extraction of Lycopene from Tomato Industrial. *Wastes with Ethane Molecules* (2012).
- Bode AM, Dong Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.*, 45:422–430, 2006 Clifford M.N, Scalbert A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric.* 2000 80:1118–1125.
- Bertelli A, Bertelli A.A, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.*, 1998 24:133–138.
- Bishop DJM, Weinberg RA, “The themes hallmarks in of Cancer”, *Cell*, 00:57-70, (2000).
- Bode AM, Dong Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.*, 45:422–430, 2006.
- Cammac R, “Electron spin response”, *The biochemistry of plants*, Vol 13, 229-57, (1987)
- Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, (1993).
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 1993 13:2165-2170.
- 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.
- Ciurlia L, Bleve M and Rescio L, Supercritical carbon dioxide coextraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): a new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *J Supercrit Fluids* 49:338–344 (2009).
- Corrales, M., Fernández Garcva, A., Butz, P., & Tauscher, B. “Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure”. 2009. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421.

- Castapeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernandez, Ma, Elena, Ma, Pæz Hernandez, J. A., Rodriguez Galøn-Vidal, J. A., & Galøn-Vidal. "Chemical studies of anthocyanins: A review". 2009. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med*. 2000 78:333-336.
- Cheyner V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 81:223-9, (2005).
- Crozier A, Clifford M.N, Ashihara J. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, (2006).
- 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.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353.
- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1986 213:481–489.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 1999, 65(4):337-53.
- De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albin A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res*. 2001 480-481:9-22.
- De Flora S, Ferguson L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut Res*, 591: 8-15, (2005).
- Dew TP, Day AJ, Morgan MR., 2005. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. *J Agric Food Chem* Aug 10;53(16):6510-5.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, "Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress", *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, (2004).
- Evans PH, "Free radicals in brain metabolism and pathology", *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, (1993).
- Elliot RH, Strunin L, "Hepatotoxicity of volatile anaesthetics", *British Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, (1993).
- Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1988 9:331-332.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 48:3597-3604.
- Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111.
- Fraser PD and Bramley PM, The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43:228–265 (2004).
- 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.
- Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, 41/12,1819-1828.
- Gilbert D.L, "Fifty years of radical ideas", *Ann NY Acad Sci*, 899:1, (2000).
- Harborne J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res*. 1986, 213:15-24.

- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Encyclopedia of Life Science.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, "The antioxidants of human extracellular fluids", Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 1–8, (1990).
- Halliwell B, Gutteridge JMC, "Free Radicals in Biology and Medicine", 11: 416-493, 188-266, (1989).
- Hill DL, Grubbs CJ. Retinoids and cancer prevention. Annu Rev Nutr. 1992 12:161-181.
- Huang MT, Ferraro T, Ho CT. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT eds. American Chemical Society: Washington, DC, (1994).
- Huang F.L, Roop D.R, De Luca L.M. Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea. In Vitro Cell Dev Biol. 1986 22:223.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect. 1994 102:5-12.
- Hennings H, Shores R, Wenk M.L, Spangler E.F, Tarone R and Yuspa S.H : Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters, 1983, Nature, 304: 67-69.
- 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
- Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. Science. 1997 278:1073-1077.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables". 2011. Food Chemistry, 126, 1821-1835.
- Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. Cancer. 1992 70:977s-982s.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. J Neurosci. 1999 19:8114-21.
- Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol Ther. 1998 78:167-209.
- Koufos A, Hansen M.F, Copeland N.G, Jenkins N.A, Lampkin B.C and Cavenee W.K : Loss of heterozygosity in the embryonal tumours suggests a common pathogenic mechanism, 1985, Nature, 316: 330-334.
- Knoblich, M.; Anderson, B.; Latshaw, D. Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. J. Sci. Food Agric. **2005**, 85, 1166–1170.
- Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY and Katz NB, Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp Biol Med **227**:845–851 (2002).
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. BMJ. 1996 312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am J Clin Nutr. 2002 76: 560-568.
- Kris Etherton P.M, Hecker K.D, Bonanome A, Coval S.M, Binkoski A.E, Hilpert K.F, Griel A.E, Etherton T.D, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med 113:S71-88.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: Chemical induction of cancer modulation and combination of effects. Arcos J, Argus M,

Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, (1997).

- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 1994 54:1895s-1898s.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003 78:517S-520S.
- Leoni, C. "Scarti" in the tomato processing industry: A contribution to disentanglement among culms rejected tomatoes. Production rejected and processing waste. *Indust. Cons.* 1997, 73, 278–290.
- Marcello S Lenucci,a\* Alessandro Caccioppola,a Miriana Durante,a Lucia Serrone,a Rescio Leonardo,b Gabriella Piroa and Giuseppe Dalessandroa. Optimisation of biological and physical parameters for lycopene supercritical CO<sub>2</sub> extraction from ordinary and high-pigment tomato cultivars Wiley Interscience (2010).
- Mark H. Zuknik ↑, N.A. Nik Norulaini, A.K. Mohd Omar. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene: A review. *Journal of Food Engineering*, 112 (2012) 253–262.
- Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J, Rice Evans C and Everett SA, Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett* 418:91–97 (1997).
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J. Clin Nutr.* 2004 79:727-747.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review". 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599.
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47.
- Nahar, L., & Sarker, S. D. "Supercritical fluid extraction" 2005. *Natural Products Isolation*, 20, 47–7.6
- Nepka C, Asproдини E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1999 24: 183-189.
- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.EC., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P. AM, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential 83 ynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25.
- 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).
- Palenzuela, B., Arce, L., Macho, A., Munoz, E., Rios, A., & Valcarcel, M. "Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap". 2004. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 2021–2027.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. J., & Nicoli, M. C. "Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts". 2005. *Food Chemistry*, 92, 109–117.
- Potter VR : A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver, 1981, *Carcinogenesis*, 2: 1375-1379.

- Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, “Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases”, *flammopharmacology*, 1: 3–36: (1991).
- Palma, M., & Taylor, L. T. “Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide”. 1999. *Journal of Chromatography A*, 849, 117–124.
- Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1988 40:451-458.
- 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.
- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res*. 1987 47:5340-5346.
- Rao AV and Agarwal S, Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr Res* 19:305–323 (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.
- Rao AV, Waseem Z and Agarwal S, Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Res Int* 31:737–741 (1998).
- Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin. *Arch Biochem Biophys*. 1990 283:107-113.
- Smith JJ, Tully P, Padberg RM. Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy. *Semin Oncol Nurs*, 21: 243-251, (2005).
- Seybold, C., Frohlich, K., Bitsch, R., Otto, K., & Bohm, V. Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7005–7010 (2004).
- 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).
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*. 35 (1976) 1332-1338 Trosko JE and Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, *Toxicol Lett*, 49:283-295.
- Surch Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3:768–80, (2003).
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(4):287-306.
- Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J. Nutrition*, 130:20735-855.
- Shahidi F, Nacz M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, (1995).
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, et al, Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotechnol* 24:447–454 (2006).
- Shukla Y., Kumar Pal.S. Dietary cancer chemoprevention: An overview. *Inter J Hum Gen*, 4: 265-276, (2004).
- Trosko JE, Chang CC and Medkalf A: Mechanisms of tumor promotion: potential role of

intercellular communication, 1983, *Cancer Invest*, 1:511-526.

- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000 80:1073–1080.
- Toyokuni S, “Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation”, *Biotherapy*, 11: 147-154, (1998).
- Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997 37:771-785.
- Vasapollo, G.; Longo, L.; Rescio, L.; Ciurlia, L. Innovative supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 29, 87–96.
- Van hetHof KH, deBoer BCJ, Tijburg LBM, Lucius B, Zijp I, West CE, et al, Carotenoid.
- Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*. 2002 296:695-698.
- 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.
- Wainfain E, Poirier A: Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) *Cancer Res*, 52: 2071-2077.
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45:1-8.
- 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.
- Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis*. 1997 18:451–456.
- Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells (1991) *Carcinogenesis*, 12:2109-2114
- Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer* 2:705-713, (2002).