



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΕ ΛΥΟΦΙΛΙΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ ΑΠΟ ΚΑΡΠΟΥΣ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ (PUNICA GRANATUM)



ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ ΜΠΟΚΑΡΗ
Χημικός Μηχανικός

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΣΕ ΛΥΟΦΙΛΙΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ ΑΠΟ ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ (PUNICA GRANATUM)

ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY USING MOLECULAR METHODS IN
LYOPHILIZED SAMPLES OF PRODUCTS AND BY-PRODUCTS OF PROCESS PRODUCING
POMEGRANATE JUICE FROM PUNICA GRANATUM

© 2012 ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ ΜΠΟΚΑΡΗ

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος 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

Γρηγόριος Αμούτζιας: Λέκτορας Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Φτάνοντας, πλέον, στο τέλος αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, όντας ένα βήμα πριν την απόκτηση του ΜΔΕ, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν να φτάσω μέχρι εδώ. Δε θα μπορούσα παρά να ξεκινήσω από τον καθηγητή μου κύριο Δημήτριο Κουρέτα γιατί με εμπιστεύτηκε με την ανάθεση αυτής της μελέτης και για τις ουσιαστικές παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Στάγκο για τη συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γρηγόριο Αμούτζια γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης μου.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου μου γιατί από την πρώτη στιγμή με έκανε νιώσω μέλος της καθώς και για τις δημιουργικές ημέρες που περάσαμε μαζί. Επίσης, θα ήθελα ειδικά να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Κώστα Γερασόπουλο και Κώστα Ζαμπάκα, για τις ώρες που διαβάσαμε μαζί, για τη βοήθεια τους κυρίως, όμως, γιατί μετά από αυτή τη συνεργασία έγιναν καλοί μου φίλοι.

Τελειώνοντας, δε θα μπορούσα να ξεχάσω να ευχαριστήσω, το συμφοιτητή, συνάδελφο και πλέον αγαπημένο μου φίλο Τάσο Μπέσιο για την αγάπη και την ανοχή που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα και γιατί στήριξε όλη την προσπάθεια μου και εμένα την ίδια με κάθε τρόπο και μέσο. Υπάρχουν ώρες (και είναι πολλές αυτές) που πιστεύω ότι του χρωστάω αυτό το δίπλωμα...

Αφιερώνω αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία στο Γιώργο

Αυτή η νίκη δεν είναι μόνο δική μου, αλλά και δική του...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανακάλυψη και ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τα τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Πολλά φρούτα, λαχανικά, ψυχανθή κ.λ.π. που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές παθήσεις και διαβήτη. Είναι γενικά αποδεκτό, πως οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες σχετίζονται με πολλές από αυτές τις ασθένειες. Τα εκχυλίσματα πολλών φυτών από τα παραπάνω είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Στα πλαίσια αυτά το ρόδι έχει κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου του, στο οποίο έχει αποδοθεί αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης λυοφιλισμένων δειγμάτων του φυτού ροδιά (*Punica granatum*) από την ποικιλία *Wonderful*. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τρεις *in vitro* μέθοδοι. Οι δύο πρώτες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από τα λυοφιλισμένα δείγματα και προέκυψε ότι τα περισσότερα από αυτά παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης και των δύο ριζών. Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση των ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης του περιεχομένου των δειγμάτων. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η ικανότητά των λυοφιλισμένων δειγμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]). Η αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου σε ανοιχτή κυκλική ή γραμμική, αντικατοπτρίζει κάποιο μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξιγόνου δράσης. Κατά συνέπεια και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προτείνεται η ανάκτηση με χρήση σύγχρονων και ασφαλών, για την ανθρώπινη υγεία, μεθόδων του περιεχομένου των λυοφιλισμένων δειγμάτων που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα παραπροϊόντα (απορρίμματα) της παραγωγικής διαδικασίας και η χρήση τους είτε για την ενίσχυση των τελικών προϊόντων (χυμοί) είτε για τη δημιουργία νέων προϊόντων (καλλυντικά, συμπληρώματα διατροφής κ.α.).

ABSTRACT

In recent years, a lot of research has been directed towards the discovery and development of chemopreventive agents derived from the daily food diet. Many fruits vegetables etc. that dominate the diet all over the world, thought to be associated with beneficial effects on chronic diseases such as different forms of cancers (eg colon, breast, prostate), cardiovascular disease and diabetes. It is generally accepted that free radicals and oxidative stress are associated with many of these diseases. Extracts of many of the above plants are rich in polyphenols, plant phytochemicals with many important antioxidant properties. In this context, the pomegranate has earned a lot of interest because of its polyphenolic content to which it has been attributed antioxidant and chemopreventive activity. The aim of this study is to evaluate the antioxidant and chemopreventive activity of lyophilized samples of the pomegranate plant (*Punica granatum*) of the Wonderful variety. Totally, three in vitro methods were used. The first two are based on chemical neutralization of stable chemical radicals DPPH \cdot and ABTS $\cdot\cdot$ by lyophilized samples and showed that most of them showed strong neutralizing ability of both radicals. The differences observed are due to the different nature of the radicals and the different chemical composition of the samples. The second part of the study examined the ability of lyophilized samples to protect the DNA damage induced by free radicals and in particular peroxy radicals (ROO \cdot). The results showed that the extracts inhibited ROO \cdot -induced DNA damage. Consequently, and based on the results of this study, it is proposed to recover, using modern and safe for people's health methods the content of lyophilized samples found in large quantities in the by-products (waste) of the production process, and use them either for strengthening the antioxidant activity of the final products (juices) or for the creation of new products (cosmetics, dietary supplements, etc.)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα πινάκων	11
Περιεχόμενα εικόνων	12
Περιεχόμενα γραφημάτων	14
Συνομογραφίες	16
1. Εισαγωγή	17
1.1 Ελεύθερες ρίζες	17
1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	18
1.2.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	19
1.2.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	20
1.3 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	21
1.4 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	22
1.5 Ελεύθερες ρίζες και καρκινογένεση	25
1.6 Οξειδωτικό στρες	26
1.7 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	27
2. Πολυφαινόλες	29
2.1 Κατηγορίες και πηγές πολυφαινολών	29
2.1.1 Φλαβονοειδή	30
2.1.2 Φαινολικά οξέα	34
2.1.3 Στιλβеноειδή	35
2.1.4 Τανίνες	36
2.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων	38
2.3 Οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων	39
2.4 Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών	39
2.5 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών	39
3. Η ροδιά και τα προϊόντα της	40
3.1 Ιστορικά στοιχεία	40
3.2 Γενικά Στοιχεία	41
3.3 Τρόπος - Περίοδος καρποφορίας του ροδιού	42
3.4 Ποικιλίες	43
3.4.1 Ποικιλία Wonderful (η ποικιλία που μελετάται στην παρούσα διατριβή)	43
3.5 Παραγωγή	44
3.6 Κόστος Εγκατάστασης - Τιμή και Απόδοση	46
3.7 Χημική σύνθεση ροδιού	47
3.8 Φυτικές Πολυφαινόλες του ροδιού	48

3.9	Λειτουργικές ιδιότητες του ροδιού	51
3.10	Αντιοξειδωτικές και Αντικαρκινικές Ιδιότητες	51
3.11	Συγκομιδή και βιομηχανική επεξεργασία του ροδιού για την παραγωγή χυμού	53
4.	Σκοπός του πειράματος	56
5.	Υλικά και μέθοδοι	56
5.1	Υλικά	56
5.1.1	Πλασμιδιακό DNA	56
5.1.2	Χημικά αντιδραστήρια	57
5.1.3	Λυοφιλισμένα Δείγματα	57
5.1.4	Διαδικασία απόκτησης δειγμάτων	58
5.1.5	Αρχή της λυοφιλίωσης	59
6.	Μέθοδοι	60
6.1	Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας	60
6.1.1	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•	61
6.1.1.i	Αρχή της μεθόδου	61
6.1.1.ii	Πειραματική διαδικασία	62
6.1.1 iii	Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας- Στατιστική ανάλυση	63
6.1.2	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+	64
6.1.2.i	Αρχή της μεθόδου	64
6.1.2.ii	Πειραματική διαδικασία	66
6.1.2.iii	Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας- Στατιστική ανάλυση	68
6.2	Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης	68
6.2.1	Γενικά	68
6.2.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	70
6.2.3	Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων Θραυσμάτων στο DNA	72
6.2.3.i	Αρχή της μεθόδου	72
6.2.3.ii	Πειραματική διαδικασία	73
6.2.3.iii	Στατιστική ανάλυση	76
7.	Αποτελέσματα	76

7.1	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λυοφιλισμένων δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•	76
7.2	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λυοφιλισμένων δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+	81
7.3	Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους	86
7.4	Αποτελέσματα της επίδρασης των λυοφιλισμένων δειγμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους	88
7.5	Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα	93
8.	Συμπεράσματα	94
9.	Βιβλιογραφία	100

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)	18
Πίνακας 2: Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες	27
Πίνακας 3: Κατηγορίες πολυφαινολών	30
Πίνακας 4: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών	32
Πίνακας 5: Σημαντικότερες χώρες παραγωγής ροδιών	44
Πίνακας 6: Είδος και περιεχόμενο δειγμάτων	58
Πίνακας 7: Δείγματα πριν και μετά τη λυοφιλίωση	59
Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (μέθοδος DPPH')	63
Πίνακας 9: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (μέθοδος DPPH')	63
Πίνακας 10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων (μέθοδος ABTS')	64
Πίνακας 11: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (μέθοδος ABTS')	64
Πίνακας 12: Ποσότητες αντιδραστηρίων (Μέθοδος ROO•)	74

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα	17
Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στο μιτοχόνδριο	19
Εικόνα 3: Μηχανισμός μεταβολισμού ξενοβιοτικής ουσίας και παραγωγή ελευθέρων ριζών	20
Εικόνα 4: Θετικές και αρνητικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών	22
Εικόνα 5: Οξειδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών, DNA και RNA από ελεύθερες ρίζες	23
Εικόνα 6: Ασθένειες που προκαλούνται από την επίδραση των ελευθέρων ριζών	25
Εικόνα 7: Οξειδωτικό stress	26
Εικόνα 8: Τα αντιοξειδωτικά μόρια προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν καθιστώντας τες ακίνδυνες	28
Εικόνα 9: Δομή των φλαβονοειδών	30
Εικόνα 10: Οι κυριότερες υποκατηγορίες φλαβονοειδών (R: -OH ή -H)	31
Εικόνα 11: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων τανινών, προανθοκυανιδινών (αριστερά), παράδειγμα χημικής δομής μιας τριμερούς προανθοκυανιδίνης (δεξιά)	33
Εικόνα 12: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της ανθοκυανίνης	33
Εικόνα 13: Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυβενζοϊκών οξέων	34
Εικόνα 14: Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυκινναμικών οξέων	35
Εικόνα 15: Η χημική δομή των στιλβενοειδών και της trans-ρεσβερατρόλης	35
Εικόνα 16: Άνθη και καρποί ροδιάς (<i>Punica Granatum</i>)	42
Εικόνα 17: Άνθος και καρπός της ποικιλίας ροδιάς Wonderful	44
Εικόνα 18: A: Ολόκληρα ρόδια, B: χυμός ροδιού (juice), C: τμήμα ροδιού, D: φλοιός ροδιού (peel), E: επισπέρμιο ροδιού (arils), F: σπέρματα ροδιού (seeds)	47
Εικόνα 19: A) Σημαντικότερες ανθοκυανίνες που παρουσιάζονται στο χυμό του ροδιού	49
Εικόνα 20: Οι σημαντικότερες ελαγτανίνες που παρουσιάζονται στο φλοιό του ροδιού 1:punicalin; 2: pedunculagin; 3:punicalagin	50

Εικόνα 21: Σχηματικό διάγραμμα ροής επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων	54
Εικόνα 22: Διάγραμμα Ροής Διαδικασίας Παραγωγής Χυμού Ροδιού	55
Εικόνα 23: Βασική διάταξη λυοφιλίωσης	59
Εικόνα 24: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH•	61
Εικόνα 25: Φασματοφωτομέτρο - συσκευή Hitachi U-1500	62
Εικόνα 26: Η οξειδωση του ABTS σε δραστική ρίζα ABTS•	65
Εικόνα 27: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με τη ρίζα ABTS	65
Εικόνα 28: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA	70
Εικόνα 29: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής διάσπασης και του σχηματισμού ριζών ROO•	73
Εικόνα 30: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης - στάδια απομάκρυνσης των χρωματισμένων ζωνών, οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης	75

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Εκτάσεις ροδιών ανά νομό (2006)	45
Γράφημα 2: Συνολικές εκτάσεις ροδιών στην Ελλάδα (1994-2007)	46
Γράφημα 3: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 1 (ρόδι χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - βρώσιμο τμήμα)	77
Γράφημα 4: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων)	78
Γράφημα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)	78
Γράφημα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)	79
Γράφημα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 5 (μια μορφή πούλπας)	79
Γράφημα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 6 (μια μορφή πούλπας)	80
Γράφημα 9: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το λυοφιλισμένο Δείγμα 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν)	80
Γράφημα 10: Γραφική απεικόνιση τιμών IC50 των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH•	81
Γράφημα 11: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 1 (ρόδι χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - βρώσιμο τμήμα)	82
Γράφημα 12: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων)	83
Γράφημα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)	83
Γράφημα 14: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)	84
Γράφημα 15: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 5 (μια μορφή πούλπας)	84
Γράφημα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το λυοφιλισμένο Δείγμα 6 (μια μορφή πούλπας)	85

Γράφημα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το λυοφιλισμένο Δείγμα 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν)	85
Γράφημα 18: Γραφική απεικόνιση τιμών IC50 των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα ABTS ^{•+}	86
Γράφημα 19: Απεικόνιση των τιμών IC50 των λυοφιλισμένων δειγμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους (DPPH - ABTS)	87
Γράφημα 20: Συσχέτιση των τιμών IC50 των δύο μεθόδων (DPPH - ABTS)	87
Γράφημα 21: Επίδραση του Δείγματος 1 (ρόδι χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - βρώσιμο τμήμα) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	89
Γράφημα 22: Επίδραση του Δείγματος 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	89
Γράφημα 23: Επίδραση του Δείγματος 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	90
Γράφημα 24: Επίδραση του Δείγματος 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	90
Γράφημα 25: Επίδραση του Δείγματος 5 (μια μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	91
Γράφημα 26: Επίδραση του Δείγματος 6 (μια μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	91
Γράφημα 27: Επίδραση του Δείγματος 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO [•] , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	92
Γράφημα 28: Γραφική απεικόνιση τιμών IC50 των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων, από ρίζες ROO [•] , ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA	92
Γράφημα 29: Απεικόνιση των τιμών IC50 των δειγμάτων που εξετάστηκαν και με τις τρεις μεθόδους	93
Γράφημα 30: Συσχέτιση των τιμών IC50 των μεθόδων DPPH - ROO [•]	94
Γράφημα 31: Συσχέτιση των τιμών IC50 των μεθόδων ABTS - ROO [•]	94

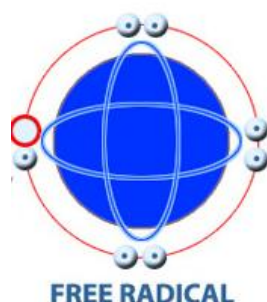
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	2,2' -Azobis(2-amidinopropane hydrochloride)	
ABTS	azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)	
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	διμέθυλο σουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic Acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl	1,1 διφαινυλ-2-πυκκριδραζύλιο
EDTA	<u>Ethylenediaminetetraacetic acid</u>	αιθυλενοδιαμινετετραοξικό οξύ
HDL	High-Density Lipoprotein	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HRP	Horseradish Peroxidase	υπεροξειδάση
LDL	Low-Density Lipoprotein	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
NFC	Not From Concentrated	(χυμός) μη προερχόμενος από συμπύκνωμα
PON 1	Paraoxonase	Παραοξονάση 1
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma	γ -υποδοχείς του ενεργοποιητή του πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων
RNAse	Ribonuclease	ριβονουκλεάση
RNS	Reactive Nitrogen Species	δραστικές μορφές αζώτου
RO \cdot	alkoxyl radical	ρίζα του αλκοξυλίου
ROO \cdot	peroxyl radicals	ρίζες περοξυλίου
ROS	Reactive Oxygen Species	δραστικές μορφές οξυγόνου
SET	Single Electron Transfer	μεταφορά ηλεκτρονίου
TGFb1	Transforming Growth Bactor beta 1	
UV	ultra violet	υπεριώδης ακτινοβολία
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	υπεροξειδιο του υδρογόνου
O ₂ ^{•-}	superoxide radicals	ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
OH \cdot	hydroxyl radicals	ρίζες υδροξυλίου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

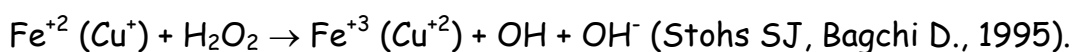
Ελεύθερη ρίζα είναι κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα (Εικόνα 1) (Halliwell B., 2001). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής και προκύπτει είτε από την απώλεια ($X \rightarrow e^- + X^{*+}$) είτε από την προσθήκη ($Y + e^- \rightarrow Y^{*-}$) ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas 1999). Όταν τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας βρίσκονται συζευγμένα δηλαδή έχουν αντίθετο spin (+ 1/2 και - 1/2), το μόριο διατηρείται αδρανές και κατά συνέπεια δεν είναι δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας μένουν ασύζευκτα έχουν spin προς την ίδια κατεύθυνση (+ 1/2, ή - 1/2), τότε το μόριο γίνεται ασταθές και τείνει να αντιδράσει περισσότερο με άλλα μόρια (Bulkley G., 1990). Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αποκτήσουν ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα κάτι που μπορεί να επιφέρει τόσο εξουδετέρωση όσο και δημιουργία νέων ριζών.



Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα

Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες εντάσσονται και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο καθώς και οι ενεργές ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), που

προέρχονται από το άζωτο. Μπορούν να παραχθούν και άλλα μόρια από παράγωγα οξυγόνου και αζώτου που δεν είναι ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (Πίνακας 1) (Halliwell B., 2001). Επίσης, τα μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, τα οποία έχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα μπορούν να αντιδράσουν με υπεροξειδίο του υδρογόνου προς σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου, η γνωστή αντίδραση Fenton:



Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	
Ρίζες	Μη ρίζες
$O_2^{\cdot-}, OH^{\cdot}, RO_2^{\cdot}, RO^{\cdot}, H_2O^{\cdot}$	$H_2O_2, HOCl, HOBr, O_3, \text{Μονήρες } O_2$
Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	
Ρίζες	Μη ρίζες
$NO^{\cdot}, NO_2^{\cdot}, ONOO^-$	$HNO_2, NO^+ / NO^-, N_2O_4, N_2O_3,$
$ONOOH, NO_2^+, ROONO$	

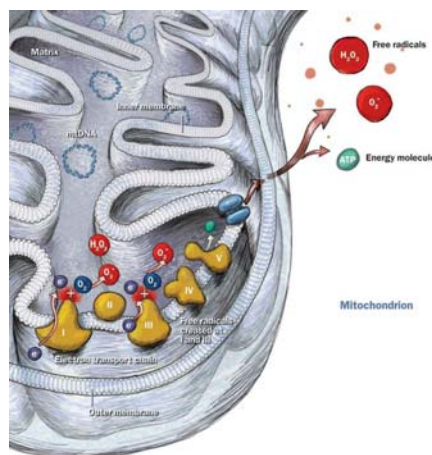
Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (Halliwell B., 2001)

1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής κι αναπόφευκτη. Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός πηγών ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς.

1.2.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

A) Η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ROS. Υπολογίζεται ότι 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Εικόνα 2) (Boveris & Cadenas 1997). Όπως είναι γνωστό, η απαραίτητη για τους οργανισμούς ενέργεια (ATP) παράγεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, στο οξυγόνο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, κάποια ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων.

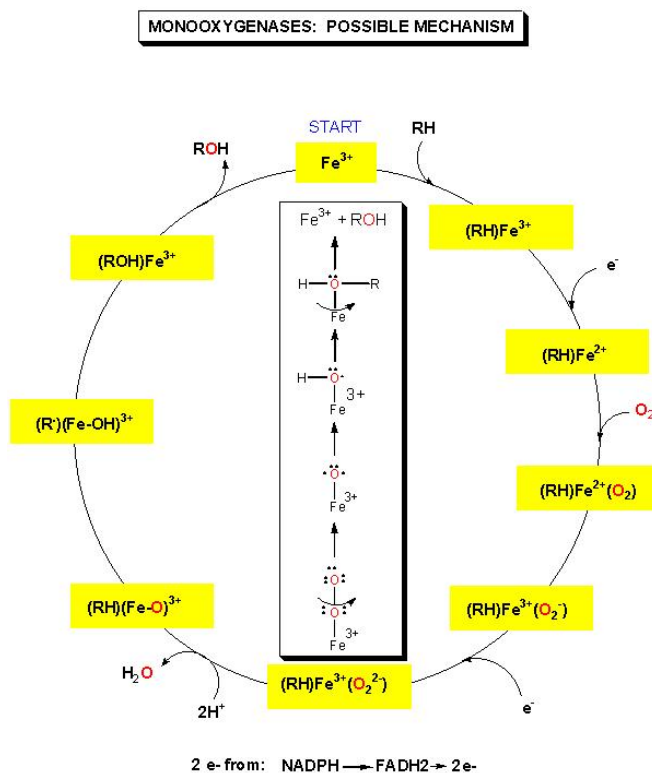
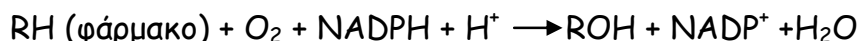


Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στο μιτοχόνδριο

B) Η φλεγμονώδης αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους.

Γ) Το σύστημα του κυτοχρώματος P450. Το κυτόχρωμα P450 αποτελεί μία εξίσου σημαντική πηγή παραγωγής ROS. Σε αυτό εντοπίζεται το ενζυμικό σύστημα των μονοοξυγενασών, το οποίο εκτός από την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών παραγόντων (π.χ. φάρμακα, εντομοκτόνα κ.α.) είναι υπεύθυνο και για το σχηματισμό των ROS. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το

NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο), (Εικόνα 3) (Κουρέτας Δ. 2003) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Εικόνα 3: Μηχανισμός μεταβολισμού ξενοβιοτικής ουσίας και παραγωγή ελευθέρων ριζών

Δ) **Υπεροξειδισώματα**. Αποτελούν μία ακόμη ενδογενή πηγή ROS, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Πρόκειται για μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα, τα οποία μεσολαβούν σε αντιδράσεις οξείδωσης (Alberts, 2000).

1.2.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Α) **Διάφορα βιομόρια - Αυτοοξειδωση μορίων**. Σε αυτά ανήκουν οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες και η αιμογλοβίνη που μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) (Cutler 1994).

Β) Στις εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται το **κάπνισμα**, η **ρύπανση του περιβάλλοντος**, η **κατανάλωση αλκοόλ**, η **άσκηση**, (η υποξία ή υπεροξία), η **ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία** (συμπεριλαμβανομένης της ηλιακής) και διάφορα **συντηρητικά τροφών**. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυγουανίνης (μεταλλαξιγόνος βάση που είναι αποτέλεσμα δράσης ελευθέρων ριζών) έχουν παρατηρηθεί στα λευκοκύτταρα μετά από άσκηση (Ihoue et al., 1993; Roulson et al., 1993), κάπνισμα (Suzuki et al., 1995), έκθεση σε καπνό (Howard et al., 1998) και κατανάλωση αλκοόλ (Nakajima et al., 1998). Επίσης, πολλές τροφές περιέχουν διάφορα χημικά, όπως εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα, που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσα στο σώμα. Ακόμη, κάποια επεξεργασμένα τρόφιμα περιέχουν σε υψηλά επίπεδα υπεροξειδία λιπιδίων, τα οποία σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες, που βλάπτουν το καρδιαγγειακό σύστημα. Τέλος, μία άλλη πολύ σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι το **άγχος** που ενεργοποιεί την απόκριση του σώματος στο στρες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, οι ορμόνες που εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες, όπως η κορτιζόλη και οι κατεχολαμίνες αποικοδομούνται σε ιδιαίτερα επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες.

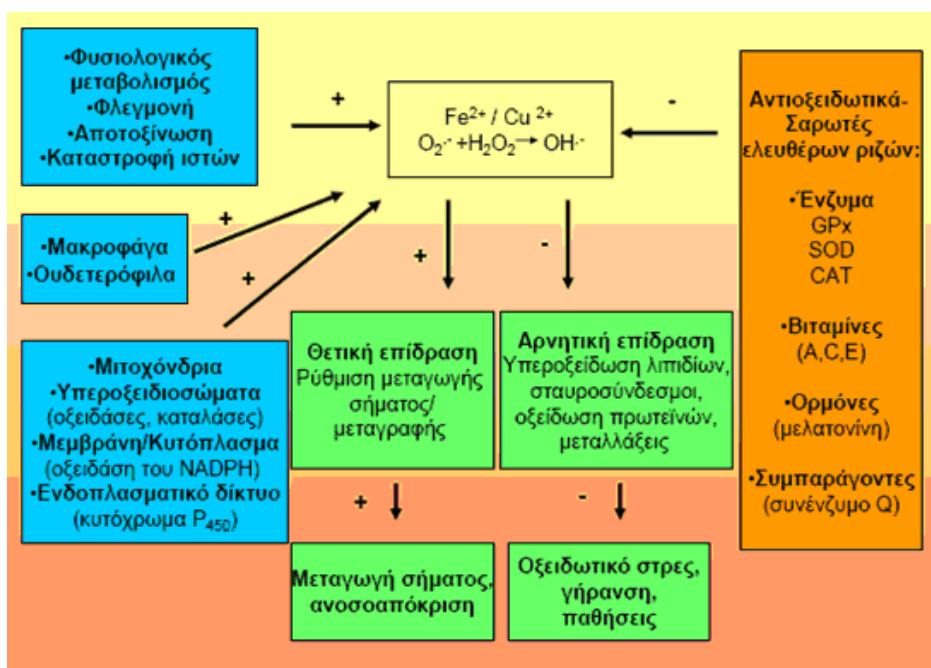
1.3 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Α) Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως **κυτταρικοί αγγελιοφόροι** στα σηματοδοτικά μονοπάτια και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το επίπεδο οξειδοαναγωγής (Sen et al., 1996; Reid 2001; Sen 2001; Linnane et al., 2002). Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση των υποδοχέων ινσουλίνης με δράση κινάσης τυροσίνης (Schmid et al., 1999). Ακόμα, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών, του καταρράκτη κινασών MAPK καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 (Nose et al, 1991; Schieven et al, 1994) και NF-κB (Devary et al., 1991). Επιπλέον, οι ROS συμβάλλουν στη ρύθμιση μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Hensley et al., 2002).

Β) Οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη **μυϊκή συστολή** καθώς έχει βρεθεί ότι η αναστολή παραγωγής των ROS οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας συστολής των μυϊκών ινών (Reid 2001; Linnane et al., 2002). Ωστόσο, αυξημένη

ποσότητα ROS στους μυϊκούς ιστούς έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

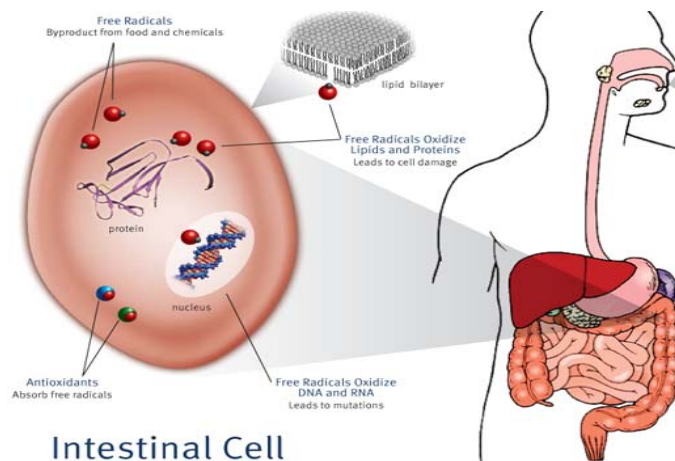
Γ) Η συνεισφορά των ελευθέρων ριζών και στο **ανοσοποιητικό σύστημα** είναι αξιοσημείωτη, καθώς παράγονται από τα φαγοκύτταρα και δρουν ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης, όπως συμβαίνει στη διαδικασία της φλεγμονής (Finaud et al., 2006) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Θετικές και αρνητικές επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών (πράσινο πλαίσιο). Παραγωγή ROS (μπλε πλαίσιο), αντιοξειδωτικά μόρια (κόκκινο πλαίσιο) (Gabi N. Cellscience 2004).

1.4 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην οξείδωση μακρομορίων (Εικόνα 5), μπορούν να συνοψιστούν στις εξής:



Εικόνα 5: Οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών, DNA και RNA από ελεύθερες ρίζες

Α) Υπεροξειδωση λιπιδίων. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids - PUFAs), τα οποία συχνά προσβάλλονται από ελεύθερες ρίζες (λιπιδική υπεροξειδωση). Η υπεροξειδωση λαμβάνει χώρα μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης ριζών, η οποία αρχίζει με την οξείδωση ενός PUFA από μία ελεύθερη ρίζα οδηγώντας στο σχηματισμό μιας λιπιδικής ρίζας. Η ρίζα αυτή αντιδρά με το οξυγόνο και παράγεται μία ρίζα υπεροξυλίου, η οποία οξειδώνει ένα νέο PUFA οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων. Η οξειδωτική καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων και τα προϊόντα της υπεροξειδωσής τους είναι επιβλαβή για την επιβίωση των κυττάρων και των ιστών (Mylonas & Kouretas 1999).

Β) Οξείδωση πρωτεϊνών. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις πρωτεΐνες (Szweda et al., 2002) με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή και η λειτουργία τους. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία (Standman et al., 2001) και ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων διαταράσσει τη λειτουργία των δομικών μεμβρανικών πρωτεϊνών (Beckman et al., 1998).

Γ) Οξείδωση του DNA. Οι ROS προκαλούν μεταλλάξεις, καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων και επάγουν την κυτταρική διαίρεση. Επίσης, πιστεύεται ότι μέσω της καταστροφής του DNA επηρεάζουν τη λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Rodney et al., 2000). Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών στην ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην in vivo ομολυτική σύντηξη των δεσμών O-H στα μόρια νερού με αποτέλεσμα την παραγωγή OH· και H·. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα δραστικές και καταστρέφουν το DNA κι άλλα

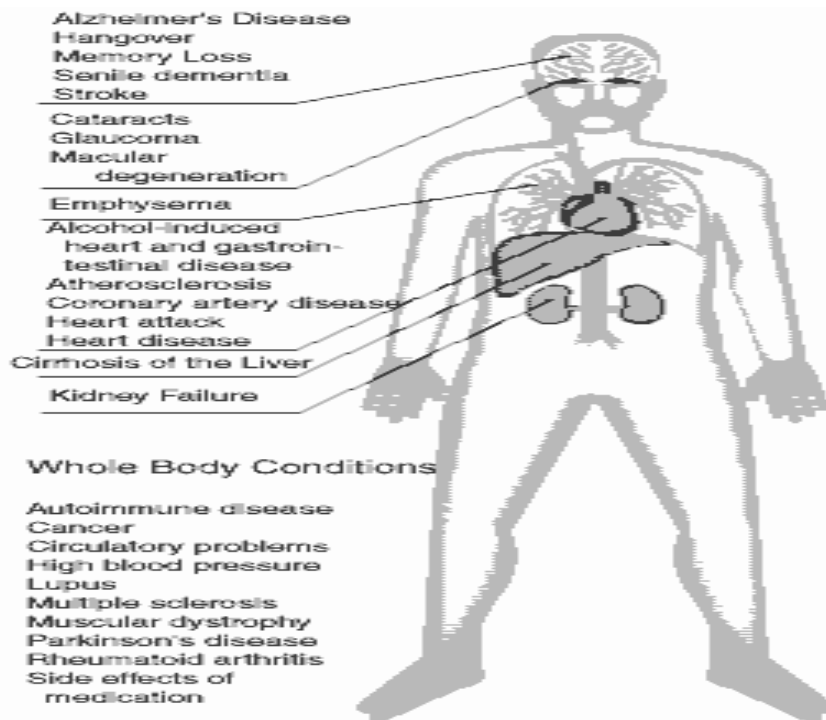
βιομόρια. Συγκεκριμένα, η ρίζα OH[·] αντιδρά με τη γουανίνη του DNA παράγοντας τη ρίζα [8-υδροξυγουανίνη], η οποία μπορεί στη συνέχεια να χάσει ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει τη μεταλλαξιγόνο βάση 8-υδροξυγουανίνη και να προκαλέσει μεταλλάξεις



(Cheng et al., 1992). Επιπλέον, τόσο η αδενίνη όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να τροποποιηθούν μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH[·] (Mylonas and Kouretas, 1999).

Δ) Γήρανση. Η γήρανση, που οφείλεται εν μέρει στη δράση των ελευθέρων ριζών, λαμβάνει χώρα μέσω καταστροφής του μιτοχονδριακού DNA (το οποίο σε αντίθεση με το πυρηνικό διαθέτει λιγότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και συνεπώς είναι πιο ευαίσθητο σε οξειδωτικές βλάβες) και απενεργοποίησης κάποιων ειδικών πρωτεϊνών, όπως η μετατόπιση ATP-ADP (Hamilton et al., 2001). Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, τα οποία δεν μπορούν να διατηρήσουν το δυναμικό της μεμβράνης και τη σύνθεση του ATP. Τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια απελευθερώνουν ιόντα Ca²⁺ και κυτόχρωμα C στο κυτταρόπλασμα και σηματοδοτούν την καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και την απόπτωση των κυττάρων.

Ε) Πρόκληση ασθενειών. Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, η χρόνια φλεγμονή, το σύνδρομο Down και η νόσος Parkinson (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ασθένειες που προκαλούνται από την επίδραση των ελευθέρων ριζών

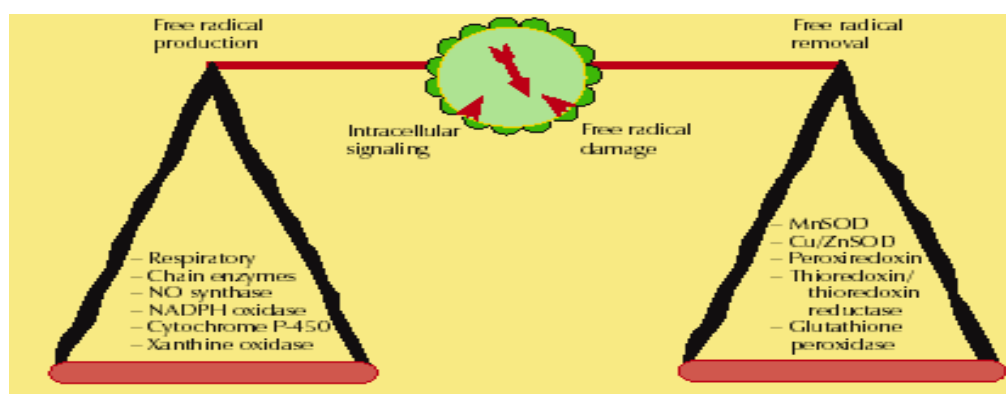
1.5 Ελεύθερες ρίζες και καρκινογένεση

Οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με διάφορους μηχανισμούς της καρκινογενετικής διαδικασίας (Klaunig & Kamendulis, 2004). Βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων (Shureiqi et al., 2000; Reddy et al., 2003). Πολλοί καρκινογόνοι και μεταλλαξιγόνοι παράγοντες έχουν την ικανότητα να οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες προκαλούν τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA και στα χρωμοσώματα (Hussain et al., 2003; Valko et al., 2004; Guyton & Kensler, 1993). Ακόμη μέσω των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις και σπασίματα στις αλυσίδες του DNA (Klaunig & Kamendulis, 2004; Marnett, 2002). Στην περίπτωση που οι επαγόμενες βλάβες στο DNA δεν επιδιορθωθούν, μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή ή επαγωγή της μεταγραφής, σε επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών και σε βλάβες κατά την αντιγραφή και γενωμική αστάθεια, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την έναρξη της καρκινογένεσης. Παρότι, οι μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA σχετίζονται κυρίως με την καρκινογένεση, και το μιτοχονδριακό DNA είναι ευπαθές σε μεταλλάξεις από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι μεταλλάξεις και

η τροποποίηση της λειτουργικότητας του μιτοχονδριακού γενώματος είναι ένας ακόμη μηχανισμός της καρκινογενετικής δράσης των ελευθέρων ριζών (Cavalli & Liang, 1998; Klaunig & Kamendulis, 2004).

1.6 Οξειδωτικό στρες

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ROS και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Deaton et al., 2003). Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αναγωγικών μέσων. Συγκεκριμένα, η κυτταρική παραγωγή προ-οξειδωτικών υπερέχει της φυσιολογικής ικανότητας του συστήματος να τα εξουδετερώνει (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Οξειδωτικό stress: η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Mylonas & Kouretas, 1999).

Κάθε κύτταρο ενός οργανισμού εκτίθεται σε οξειδωτικά μέσα. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες και που συχνά δρουν πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική (Πίνακας 2).

Ενδογενείς παράγοντες	Εξωγενείς παράγοντες				
<ul style="list-style-type: none"> • Φυσική άσκηση, καθιστική ζωή • Ψυχολογικό στρες • Φλεγμονή (παροδική μόλυνση/ χρόνια πάθηση) • Καρκίνος • Ισχαιμία/επανοξυγόνωση • Κυτταρικός θάνατος 	<p style="text-align: center;">Διατροφή</p> <ul style="list-style-type: none"> • Δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες ή λίπη • Προοξειδωτικά (ξеноβιοτικά) • Αντιοξειδωτικά (χαμηλή περιεκτικότητα διατροφής) • Αφεψήματα (αλκοόλ, καφεΐνη) 	<p style="text-align: center;">Ρύποι</p> <ul style="list-style-type: none"> • Κάπνισμα • Ρύπανση αέρα (SO_2, NO_2, O_3, υδρογονάνθρακες) • Επαγγελματικές νόσοι (μεταβατικά μέταλλα, άσβεστος, paraquat) 	<p style="text-align: center;">Φάρμακα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Αντικαρκινικά • Ψωραλένιο 	<p style="text-align: center;">Ακτινοβολία</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ιονίζουσα • Υπεριώδης • Μικροκύματα 	<p style="text-align: center;">Απορροφήσιμες ενώσεις από το δέρμα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Εντομοκτόνα • Ψωραλένιο • Φάρμακα (lindane, παράγωγα ψωραλενίου)

Πίνακας 2: Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες

1.7 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Τα κύτταρα είναι επιρρεπή στη δράση των ελευθέρων ριζών και για το λόγο αυτό εξελικτικά έχει δημιουργηθεί ένας ενδοκυττάριος αντιοξειδωτικός μηχανισμός που εξισορροπεί ή ελέγχει τη δραστικότητα των ROS. Στην πραγματικότητα η ισορροπία είναι ελαφρώς μετατοπισμένη προς όφελος των ROS, αφού όπως προαναφέρθηκε οι ROS είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν η παραγωγή ROS ξεπερνά κατά πολύ αυτή την ισορροπία. Για το λόγο αυτό υπάρχει η ανάγκη της δράσης αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Bulkley 1990). Η αντιοξειδωτική άμυνα εμφανίζει διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ιστών και κυτταρικών τύπων. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται με την τροφή και συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell

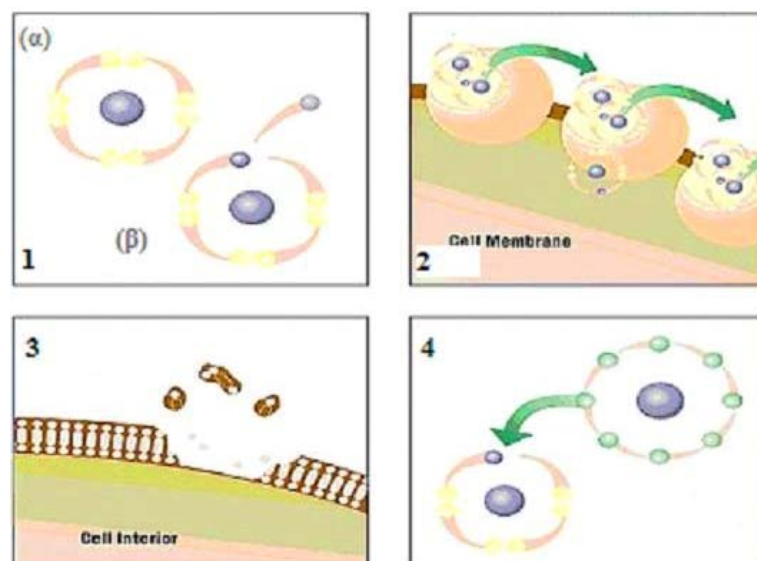
& Gutteridge 1998). Τα αντιοξειδωτικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά καθώς μπορούν να προσφέρουν ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα αυτές να μην προσβάλλουν τα κυτταρικά συστατικά (Εικόνα 8). Μετά την αντίδραση, τα αντιοξειδωτικά μετατρέπονται σε ρίζες, οι οποίες όμως δεν είναι δραστικές. Τα εξωκυττάρια υγρά διαθέτουν διαφορετικούς προστατευτικούς μηχανισμούς σε σχέση με το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να διαχωριστούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Γενικότερα, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κατατάσσονται ανάλογα με τη λειτουργία τους στις ακόλουθες κατηγορίες:

α. **Ένζυμα**, που απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

β. **Πρωτεΐνες**, που ελαχιστοποιούν τη διαθεσιμότητα προοξειδωτικών παραγόντων, όπως τα ιόντα σιδήρου, τα ιόντα χαλκού και η αίμη. Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι τρανσφερίνες, οι μεταλλοθειονίνες, η σερουλοπλασμίνη και οι πρωτεΐνες που προσδένουν την αίμη, την απτογλοβίνη και τις αιμοπεξίνες.

γ. **Πρωτεΐνες**, που προστατεύουν τα βιομόρια από την οξειδωτική καταστροφή, όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

δ. **Μικρού μοριακού βάρους διαλυτοί παράγοντες**, που απομακρύνουν τις ROS και RNS όπως η γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ και το ουρικό οξύ (Bulkley 1990).



Εικόνα 8: Τα αντιοξειδωτικά μόρια προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν καθιστώντας τες ακίνδυνες

2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν τόσο ως δέκτες ηλεκτρονίων όσο και ως δότες ατόμου Η στις ελεύθερες ρίζες

($RO^{\bullet} + RPH \rightarrow ROH + RP^{\bullet}$). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al., 2005). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Fe^{+2} και Cu^{+}) παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της ρίζας OH^{\bullet} που παράγεται από την αντίδραση Fenton. Τέλος, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ferguson P.L. 2001).

2.1 Κατηγορίες και πηγές πολυφαινολών

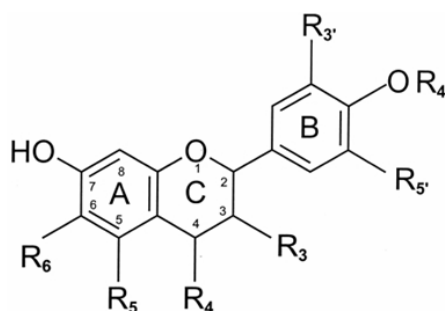
Οι πολυφαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι μόρια ευρέως κατανεμημένα στο φυτικό βασίλειο. Αποτελούνται από ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, οι άνθρακες του οποίου είναι συνδεδεμένοι με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και πολλές φορές εμφανίζονται με τη μορφή γλυκοζιτών. Τα κύρια σάκχαρα με τα οποία είναι συνδεδεμένες οι πολυφαινόλες είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη. Ορισμένες πολυφαινόλες είναι διαλυτές στο νερό, άλλες μόνο σε οργανικούς διαλύτες, ενώ άλλες δεν είναι διαλυτές σε κανένα διαλύτη. Έχουν πολύ σημαντικές ιδιότητες, καθώς προστατεύουν τα φυτά από τις δυσμενείς επιδράσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών και των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ σε αυτές οφείλεται το χρώμα των φυτών (Manach et al., 2004). Έχουν βρεθεί πάνω από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις στο φυτικό βασίλειο. Οι πολυφαινόλες διαιρούνται σε πάνω από 10 κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των βενζολικών δακτυλίων και των ομάδων με τις οποίες είναι συνδεδεμένοι οι άνθρακες τους (Πίνακας 3).

Structure	Class
C ₆	simple phenolics
C ₆ - C ₁	phenolic acids and related compounds
C ₆ - C ₂	acetophenones and phenylacetic acids
C ₆ - C ₃	cinnamic acids, cinnamyl aldehydes, cinnamyl alcohols
C ₆ - C ₃	coumarins, isocoumarins, and chromones
C ₁₅	chalcones, aurones, dihydrochalcones
C ₁₅	flavans
C ₁₅	flavones
C ₁₅	flavanones
C ₁₅	flavanonols
C ₁₅	anthocyanidins
C ₁₅	anthocyanins
C ₃₀	biflavonyls
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	benzophenones, xanthenes, stilbenes
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	quinones
C ₁₈	betacyanins
Lignans, neolignans	dimers or oligomers
Lignin	polymers
Tannins	oligomers or polymers
Phlobaphenes	polymers

Πίνακας 3: Κατηγορίες πολυφαινολών (Vermeerris W. & Nicholson R., 2006)

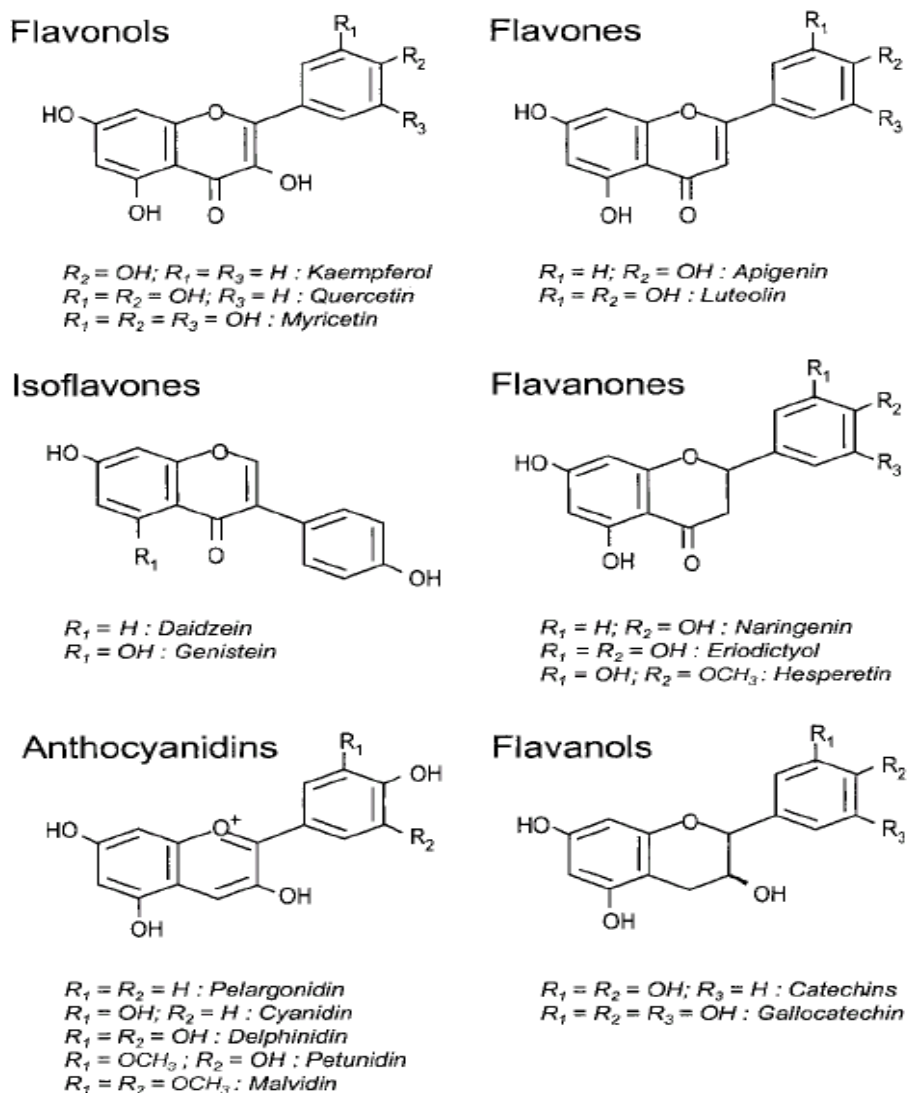
2.1.1 Φλαβονοειδή

Η μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία των πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, η κύρια ομάδα χρωστικών που απαντώνται στα φυτά. Η κατηγορία αυτή περιέχει πάνω από 5000 γνωστά μόρια ενώ μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε 6 υποκατηγορίες. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους με 15 άτομα άνθρακα, οι οποίοι συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο και έχουν πολλούς πιθανούς υποκαταστάτες (Εικόνα 9). Βρίσκονται, συνήθως, με τη μορφή γλυκοζιτών και ανάλογα με το σάκχαρο τροποποιούνται και οι ιδιότητές τους. Τα σταφύλια και τα προϊόντα τους αποτελούν κύρια πηγή φλαβονοειδών (Manach et al., 2004).



Εικόνα 9: Δομή των φλαβονοειδών. Διακρίνονται οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι A και B και ο πυρανικός δακτύλιος C με τον οποίο συνδέονται

Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι: οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 : Οι κυριότερες υποκατηγορίες φλαβονοειδών (R: -OH ή -H)

Ένα από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις τροφές είναι οι φλαβονόλες με περισσότερο συνηθισμένες τις κερκετίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη. Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή φρούτα και οι φλαβόνες στο σέλινο, ενώ οι κατεχίνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβανολών βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στις φράουλες και σε άλλα σαρκώδη φρούτα. Τέλος, οι ισοφλαβόνες όπως οι γενιστεΐνη και ντενζεΐνη βρίσκονται στα όσπρια και κυρίως στη σόγια (Di Carlo et al., 1999) (Πίνακας 4).

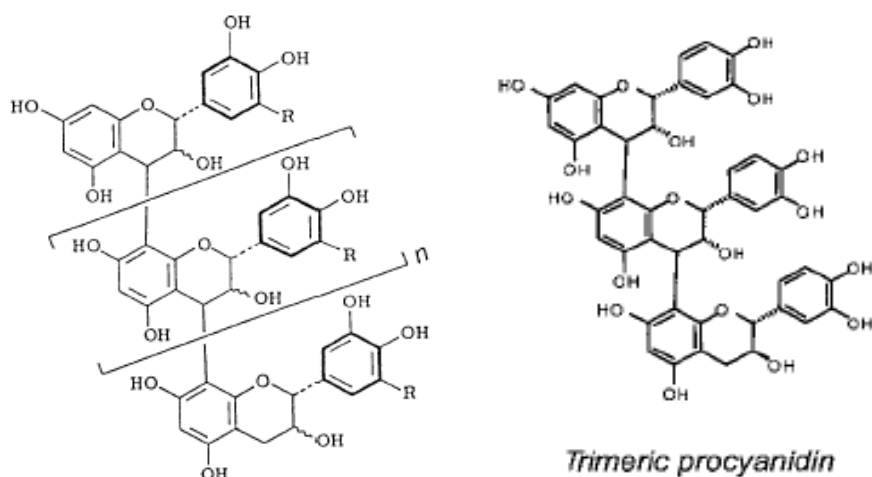
Ομάδα Φλαβονοειδών	Χαρακτηριστικές πολυφαινόλες	Κύριες διατροφικές πηγές
Φλαβονόλες	Κερκετίνη, Ρουτίνη, Μυρικετίνη	κρεμμύδια, σταφύλια, τσάι, μαρούλι, κεράσια, βατόμουρα, μπρόκολα, μήλα, ντομάτες
Φλαβόνες	Λουτεΐνη, Απιγενίνη	κίτρα
Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη	όσπρια, σόγια
Φλαβανόνες	Ναριγκίνη, Ταξιφολίνη	ντομάτες, μέντα, κίτρα, πορτοκάλια
Φλαβανόλες	Κατεχίνη, Επικατεχίνη	σταφύλια, τσάι, σοκολάτα
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη, Μαλβιδίνη	σταφύλια, κεράσια, βατόμουρα, τσάι, φράουλες

Πίνακας 4: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά μέλη των ομάδων αυτών και τα τρόφιμα τα οποία αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές τους.

Από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή ακόμη, είναι τα ισοφλαβονοειδή. Χωρίζονται σε 5 κατηγορίες στις ισοφλαβόνες (isoflavones), ισοφλαβάνες (isoflavanes), ισοφλαβανόνες (isoflavanones), κουμεστάνες (coumestanes), πτεροκαρπάνες (pterocarpanes). Εμφανίζουν αρκετά οφέλη για την υγεία, αφού παρουσιάζουν προστατευτική δράση ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία και η καρδιακή θρόμβωση καθώς και ενάντια στην οστεοπόρωση και στο κλιμακτηριακό σύνδρομο (Watanabe et al., 2002). Οι ισοφλαβόνες ανήκουν στα φυτοοιστρογόνα και εμφανίζουν αντικαρκινική, αντιιική, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση (Mazur et al., 1998).

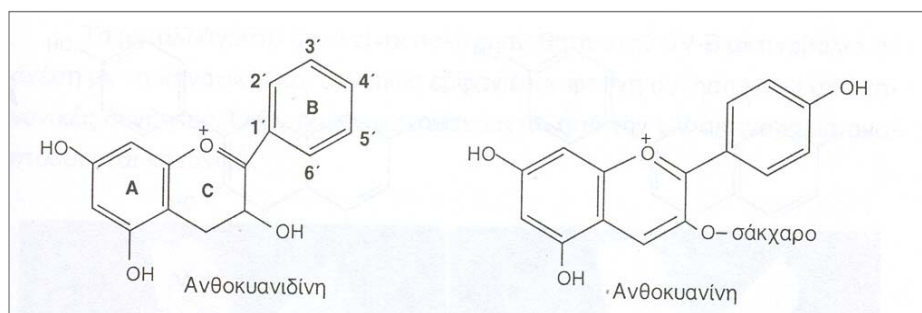
Από τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα σταφύλια, στο κρασί και στο τσάι είναι οι φλαβανόλες, οι οποίες βρίσκονται τόσο στη μονομερή μορφή τους, με πιο αντιπροσωπευτικές την κατεχίνη και την επικατεχίνη όσο και στην πολυμερή μορφή τους, τις προανθοκυανιδίνες. Οι προανθοκυανιδίνες ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες που είναι μια ετερογενής ως προς τη χημική δομή και το μοριακό βάρος ομάδα ενώσεων, που αποτελείται από διμερή, ολιγομερή, πολυμερή κατεχίνης (Εικόνα 11 αριστερά) που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον άνθρακα C4 και C8 (ή C6) των ενώσεων (Εικόνα 11 δεξιά). Ονομάζονται προανθοκυανιδίνες γιατί κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες. Ο ακριβής μηχανισμός πολυμερισμού δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, πιστεύεται όμως ότι

πραγματοποιείται ως αυτόματη συμπύκνωση. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν οι φλαβονόλες είναι ότι σε αντίθεση με τα άλλα φλαβονοειδή, δεν βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένες μορφές στα τρόφιμα (Manach et al. 2004).



Εικόνα 11: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων τανινών, προανθοκυανιδινών (αριστερά) (G.Soleas et al. 1997) (δεξιά), παράδειγμα χημικής δομής μιας τριμερούς προανθοκυανιδίνης

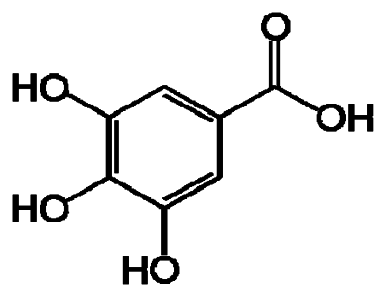
Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την γλυκοζυλιωμένη μορφή των ανθοκυανιδινών (Εικόνα 12). Επειδή, οι ανθοκυανιδίνες απουσία του σακχάρου είναι ασταθή μόρια, οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκονται στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή στα φρούτα που είναι οι ανθοκυανίνες. Ανήκουν στα χρωμοφόρα φλαβονοειδή και είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, μπλε, μοβ χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Βρίσκονται κυρίως στα κόκκινα φρούτα και στο κόκκινο κρασί.



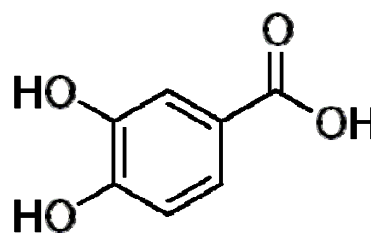
Εικόνα 12: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της ανθοκυανίνης

2.1.2 Φαινολικά οξέα

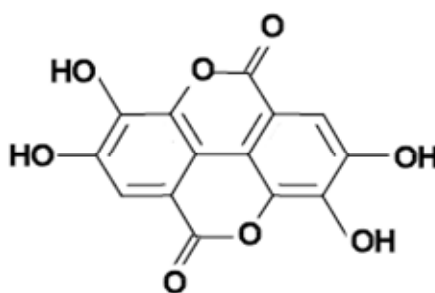
Μία ακόμα πολύ σημαντική κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, των οποίων η δομή είναι απλούστερη από αυτή των φλαβονοειδών. Έχουν έναν μόνο βενζολικό δακτύλιο και διακρίνονται σε υδροξυβενζοϊκά οξέα (Εικόνα 13), τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και υδροξυκινναμικά οξέα, που είναι παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 14). Βρίσκονται, όπως και τα φλαβονοειδή, σε υψηλές συγκεντρώσεις στα σταφύλια και το κρασί. Το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το ελλαγικό οξύ είναι από τους πιο γνωστούς εκπροσώπους των υδροξυβενζοϊκών οξέων ενώ το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ ανήκουν στα υδροξυκινναμικά οξέα (Soleas et al., 1997; Manach et al., 2004).



Γαλλικό οξύ

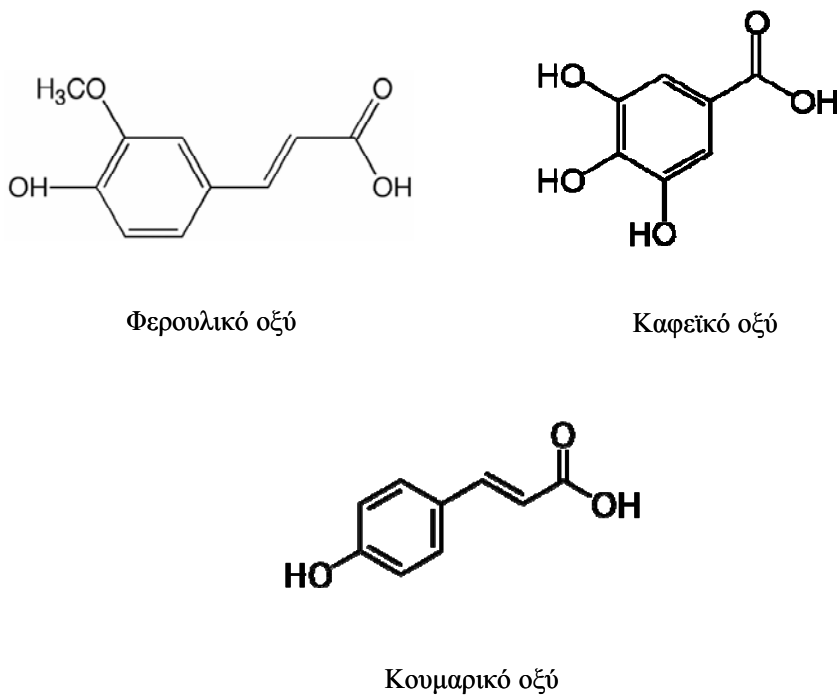


Πρωτοκατεχοϊκό οξύ



Ελλαγικό οξύ

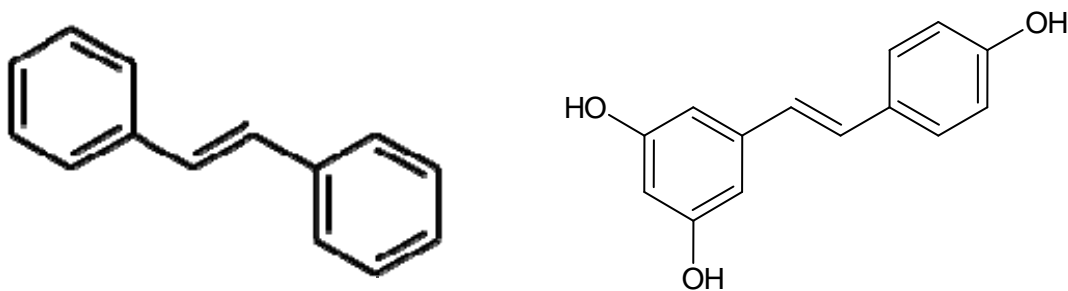
Εικόνα 13. Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυβενζοϊκών οξέων



Εικόνα 14: Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυκινναμικών οξέων

2.1.3 Στιλβενοειδή

Εκτός από τα φαινολικά οξέα, ακόμα μία κατηγορία πολυφαινολών που ανήκουν στα μη φλαβονοειδή είναι τα στιλβενοειδή. Δομικά αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με μία γέφυρα μεθυλενίου (Εικόνα 15). Από τα πιο χαρακτηριστικά στιλβένια είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία είναι παρούσα στα σταφύλια και το κρασί σε υψηλές συγκεντρώσεις (Soleas et al., 1997).



Εικόνα 15. Η χημική δομή των στιλβενοειδών και της *trans*-ρεσβερατρόλης

2.1.4 Τανίνες

Είναι ενώσεις μεσαίου έως χαμηλού μοριακού βάρους. Οι τανίνες είναι υδροξυλιωμένα μόρια που είναι ικανά να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα βασίζεται και η στυφή γεύση των τροφών που είναι πλούσιες σε τανίνες διότι σχηματίζονται ιζήματα με πρωτεΐνες του σιέλου. Οι τανίνες κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες: τις υδρολυόμενες, που περιέχουν γαλλικό οξύ και τις συμπυκνωμένες, που περιέχουν πολυμερή των φλαβονοειδών.

- **Υδρολυόμενες τανίνες:** Αποτελούνται από γαλλικό οξύ ή εξαϋδροξυ-διφενικό οξύ εστεροποιημένο με μια πολυόλη που είναι κυρίως γλυκόζη (Porter, 1989). Από τη συμπύκνωση των μεταβολιτών αυτών δημιουργούνται πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος. Η πιο γνωστή υδρολυόμενη τανίνη είναι το τανικό οξύ.
- **Συμπυκνωμένες τανίνες:** Οι προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Προκύπτουν από πολυμερισμό μιας φλαβαν-3-όλης (κατεχίνη, επικατεχίνη, κ.α.) με ένα μόριο φλαβαν-3,4-διόλης ή λευκοανθοκυανιδίνης. Η οξειδωτική συμπύκνωση πραγματοποιείται μεταξύ του άνθρακα C4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου και των ανθράκων C6 ή C8 των γειτονικών μονάδων (Porter, 1989). Αξιοσημείωτο, είναι ότι οι προανθοκυανιδίνες και οι υδρολυόμενες τανίνες χαμηλού μοριακού βάρους είναι διαλυτές σε διάφορους διαλύτες (νερό και οργανικούς), ενώ οι υδρολυόμενες υψηλού μοριακού βάρους τανίνες είναι αδιάλυτες. Τέλος, αδιάλυτες παραμένουν και οι τανίνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος ή με πολυσακχαρίτες.

2.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων

Έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, τις οποίες μετατρέπουν σε σταθερά μόρια, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



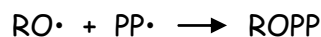
RO·: η ελεύθερη ρίζα

PPH: η πολυφαινόλη

ROH: το σταθερό προϊόν της ρίζας

PP·: η φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σχετικά σταθερή και μπορεί να αντιδράσει και με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση, ώστε να αποτρέψει τις βλαβερές επιδράσεις τους στα βιομόρια.

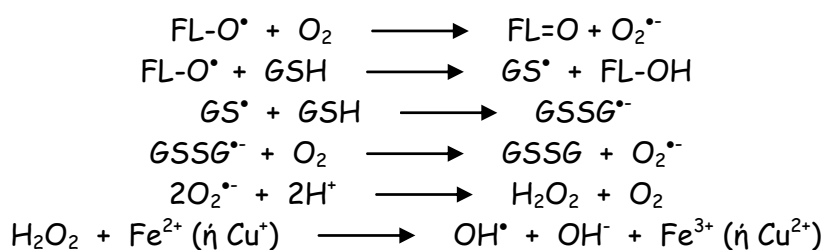


ROPP: το σταθερό προϊόν μετά τη δράση της πολυφαινόλης

Εκτός από την απευθείας αλληλεπίδρασή τους με τις ελεύθερες ρίζες, οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση δεσμεύοντας χηλικά ιόντα Cu και Fe, τα οποία μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Πολλές εργασίες έχουν ασχοληθεί με την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Έχει, λοιπόν, βρεθεί ότι η κατανάλωση πολυφαινολών οδήγησε σε μειωμένη εμφάνιση καρδιοαγγειακών παθήσεων (Hertog et al., 1995, 1997) καθώς εμποδίζουν την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον, αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P₄₅₀ και ενζύμων, όπως η κυκλοοξυγενάση, η οξειδάση της ξανθίνης και η λιποξεγενάση με οξειδωτική δράση (Ferguson 2001; Rice-Evans et al., 1996; Cotelle, 2001). Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οδηγεί στην παρεμπόδιση της οξειδωτικής καταστροφής του DNA και στην πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου (Hertog et al., 1996; Kagan et al., 1998; Cotelle, 2001; Wang et al., 1999). Οι πολυφαινόλες, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα την κερκετίνη και την κατεχίνη, εμποδίζουν τη νιτροσυλίωση μορίων, τα οποία έχουν καρκινογόνο δράση, όπως βρέθηκε μετά από πειράματα που έγιναν τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο (Pignatelli et al., 1980). Επίσης, αναστέλλουν τη δράση της συνθάσης του NO, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις από τη δράση του ενζύμου αυτού (Ferguson et al., 1996).

2.3 Οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας φαινολικής ρίζας. Συνήθως, η ρίζα αυτή δεν είναι ιδιαίτερα δραστική, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις που έχει υψηλή δραστηριότητα και έτσι μπορεί να είναι η αιτία για την οξειδωτική τους δράση. Ορισμένα φλαβονοειδή, όταν δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, παράγουν αρκετά ασταθείς φαινολικές ρίζες. Οι ρίζες αυτές αντιδρούν με το O_2 ή την GSH και παράγουν $O_2^{\cdot-}$, το οποίο σχηματίζει H_2O_2 μέσω της συμμετοχής του στην αντίδραση Fenton (Cotelle, 2001).



FL-O[·]: η ρίζα του φλαβονοειδούς

Ένας ακόμα μηχανισμός της οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών σχετίζεται με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης Cu και Fe. Τα μέταλλα αυτά συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών με ταυτόχρονο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Αρχικά, η πολυφαινόλη μετατρέπει τον Cu^{2+} σε Cu^+ και η ίδια μετατρέπεται σε ρίζα, η οποία με την αντίδρασή της με το O_2 οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Το $O_2^{\cdot-}$ αντιδρά με μία άλλη πολυφαινόλη ανακυκλώνοντας τη φαινολική ρίζα και σχηματίζοντας H_2O_2 , το οποίο συμμετέχει στην αντίδραση Fenton με τα Cu^+ σχηματίζοντας την ισχυρή οξειδωτική OH^{\cdot} (Sakihama et al., 2002). Τέλος, οι πολυφαινόλες μπορούν να προσβάλλουν και το DNA πιο άμεσα. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει δείχτει ότι φαινολικές ρίζες προερχόμενες από την κερκετίνη προκάλεσαν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA σε πυρήνες ηπατικών κυττάρων επιμύων (Sahu & Gray, 1997).

2.4 Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικά ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως αντιμεταλλαξιγόνου εξαρτάται από την ακριβή χημική δομή της και από το αν η ουσία αυτή ήταν παρούσα πριν ή κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι διάφορες αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες έχουν προκύψει από παρατήρηση της δράσης τους παρουσία κάποιων μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές είναι μη εξειδικευμένες όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιγόνων μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο, έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001). Γενικά, οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση είναι οι ακόλουθοι:

- επίδραση στη σύνθεση και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- επίδραση στη δέσμευση των μεταλλαξιγόνων, όπως το διβενζοπυρένιο στο DNA
- αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II
- επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών (Ferguson, 2001).

2.5 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Herzog 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 (García-Closas και συν., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand και συν., 2000). Η προστατευτική αυτή δράση παρέχεται μέσα από ποικίλους αντικαρκινικούς μηχανισμούς. Ακόμη, η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής παρέχει κάποιου είδους προστασία έναντι της οστεοπόρωσης

(Eaton-Evans 1994) και του έλκους (Alarcon 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).

3. Η ΡΟΔΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ

3.1 Ιστορικά στοιχεία

Το ρόδι (*Punica granatum* L.) είναι ένας αρχαίος καρπός που καταναλώνεται διαχρονικά από ποικίλους πολιτισμούς για χιλιάδες χρόνια. Η χρήση του ροδιού χρονολογείται από τα βιβλικά έτη, ενώ οι αναφορές για τις θεραπευτικές του ιδιότητες χάνονται στα βάθη των χιλιετιών (Longtin 2003). Οι σπόροι του ροδιού αντιπροσώπευαν για τους Βαβυλώνιους τη μετενσάρκωση και την αναγέννηση, για τους Πέρσες το αήττητο στη μάχη, ενώ για τους αρχαίους Κινέζους ήταν σύμβολα μακροζωίας και αθανασίας (Aniram et al. 2000).

Το ρόδι ανήκει στην οικογένεια των Πουνικοειδών (*Punicaceae*). Παρότι η καταγωγή του τοποθετείται στην ευρύτερη περιοχή της Περσίας και της Βόρειας Ινδίας, καλλιεργείται συστηματικά από την αρχαιότητα στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου με αποτέλεσμα να έχει πλέον «πολιτογραφηθεί» ως φυτό της περιοχής αυτής (Meerts et al. 2009). Σήμερα, το ρόδι καλλιεργείται σε πολλές περιοχές της υψηλίου, με κυριότερες χώρες παραγωγής το Ιράν, την Ινδία, τις χώρες της Μεσογείου, τα ξηρότερα τμήματα της Νοτιοανατολικής Ασίας, τη Μαλαισία, τις Ανατολικές Ινδίες και την τροπική Αφρική. Σε μικρότερο βαθμό καλλιεργείται σε ξηρότερα μέρη των πολιτειών των ΗΠΑ στην Καλιφόρνια και την Αριζόνα. Επίσης, καλλιεργείται στην Κίνα, την Ιαπωνία και τη Ρωσία (Fadavi et al. 2006).

Τα βρώσιμα μέρη του ροδιού καταναλώνονται νωπά ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φρέσκου χυμού, κονσερβοποιημένων ποτών, ζελέ, μαρμελάδας ή ως αρωματικά-χρωστικά πρόσθετα των ποτών (Fadavi et al. 2005; Mousavinejad et al. 2009). Παράλληλα, χρησιμοποιούνται ευρέως για την

παρασκευή φυτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, φυσικών καλλυντικών, ως καρυκεύματα, ως πρόσθετα τροφίμων ή συμπληρώματα διατροφής. Από την αρχαιότητα, το ρόδι έχει καθιερωθεί ως "θεραπευτική τροφή" με πολλές ευεργετικές επιδράσεις για τη θεραπεία ποικίλων δυσλειτουργιών του οργανισμού και ασθενειών (Vidal et al. 2003). Στο πλαίσιο αυτό, το ρόδι χρησιμοποιείται ευρύτατα στη λαϊκή ιατρική για την εξάλειψη ποικίλων εντερικών λοιμώξεων, διαφόρων τύπων έλκους, τη θεραπεία της άφθας, διάρροιας, δυσεντερίας, οξέωσης, αιμορραγίας, την καταπολέμηση των παρασίτων και ως αντισκωληκικό φάρμακο, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και ως αντιπυρετικό (Larrosa et al. 2010; Lee et al. 2010).

Τα τελευταία χρόνια ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων έχει αρχίσει να υιοθετεί ένα περισσότερο «υγιεινό» τρόπο ζωής ως μέσον πρόληψης ασθενειών που σχετίζονται με την αύξηση του προσδόκιμου χρόνου ζωής (καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, άνοια κλπ), με επακόλουθο να αυξηθεί η ζήτηση για διατροφικά προϊόντα, τα οποία εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, να έχουν και ευεργετική επίδραση στην υγεία (Viuda-Martos et al. 2010a). Η τάση αυτή ενισχύεται από μελέτες που δείχνουν ότι η συχνότητα εκδήλωσης των ασθενειών αυτών μειώνεται σημαντικά σε ομάδες ανθρώπων που διατρέφονται κυρίως με φρούτα και λαχανικά. Σήμερα, οι καταναλωτές και η βιομηχανία τροφίμων έχουν εστιάσει μεγάλο τμήμα του ενδιαφέροντός τους στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων λειτουργικών τροφίμων. Τα τρόφιμα της κατηγορίας αυτής εκτός από την κάλυψη βασικών διατροφικών αναγκών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους οργανισμούς στον τομέα πρόληψης των ασθενειών ή της επιβράδυνσης της προόδου των χρόνιων παθήσεων (Viuda-Martos et al. 2010b). Έτσι, το ρόδι, ένας καρπός με τεκμηριωμένη θρεπτική και θεραπευτική αξία, εξαιτίας της πολυσχιδούς διατροφικής και θεραπευτικής λειτουργίας του, αποτέλεσε ένα από τα φυτά των οποίων μελετήθηκε το περιεχόμενο σε βιοδραστικά μόρια, γνωρίζοντας τεράστια ανάπτυξη και εφαρμογές (Martinez et al. 2006; Jaiswal et al. 2010).

3.2 Γενικά Στοιχεία

Η ροδιά καλλιεργείται κυρίως στις εύκρατες περιοχές, σε χαμηλό και υψηλό υψόμετρο. Είναι σχετικά ανθεκτική στο ψύχος, ενώ δεν απαιτεί ιδιαίτερες εδαφικές συνθήκες. Ωστόσο, οι μεγαλύτερες και ποιοτικότερες αποδόσεις της

επιτυγχάνονται σε εδάφη πλούσια, βαθιά, με pH από 5.5 έως 7 με συχνή υγρή λίπανση. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ροδιάς ευδοκιμεί σε όλες τις περιοχές που διαθέτουν μεσογειακό κλίμα, με πολύ μεγάλες δυνατότητες επέκτασης της καλλιέργειας σε ξηρές περιοχές με εδάφη υψηλής αλατότητας. Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα για την εμπορική καλλιέργεια της ροδιάς αποτελεί το σχίσσιμο των καρπών. Το φυσιολογικό αυτό φαινόμενο έχει πολλαπλά αίτια όπως η μεγάλη διακύμανση μεταξύ ημερήσιας και νυκτερινής θερμοκρασίας, η διακύμανση της εδαφικής υγρασίας, η καθυστέρηση της συγκομιδής, οι προσβολές από έντομα και οι ασθένειες καθώς και η έλλειψη βορίου στους νεαρούς καρπούς (Δρογούδη Π et al.2007).



Εικόνα 16: Άνθη και καρποί ροδιάς (*Punica Granatum*)

3.3 Τρόπος - Περίοδος καρποφορίας του ροδιού

Ο καρπός είναι ράγα, έχει μεγάλο μέγεθος και σχήμα σφαιρικό. Ο φλοιός είναι κοκκινοπράσινος ή βιολετί κατά την ωρίμανση. Ένας κανονικός καρπός περιέχει κατά μέσο όρο περίπου 667 σπόρους (Kihara, 1958). Κάθε σπέρμα περιβάλλεται από σάρκα ροδοκόκκινη ή λευκοκίτρινη, χυμώδη, γλυκιά ή υπόξινη, μερικές φορές ελαφρά στυφή. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται την άνοιξη (μέσα Μαρτίου έως μέσα Απριλίου) και δίνουν κανονική βλάστηση ή λογχοειδή βλάστηση, που φέρουν ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους οφθαλμούς. Οι μικτοί καρποφόροι εκπτύσσονται, επίσης, την άνοιξη (Μάιος) και δίνουν βραχεία βλάστηση (συνήθως άφυλλη) με άνθη επάκρια. Η λογχοειδής βλάστηση είτε φέρει επάκρια αγκάθι και πλάγια συνήθως δυο οφθαλμούς από τους οποίους ο ένας

είναι συνήθως μικτός, είτε μόνον αγκάθι. Η ροδιά μπαίνει σε αξιόλογη καρποφορία από τον 3^ο-4^ο χρόνο της ηλικίας της. Η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 40 έως 50 χρόνια.

3.4 Ποικιλίες

Οι πλέον αξιόλογες ξενικές ποικιλίες της ροδιάς είναι η *Dolce Nostrana* (έντονο κόκκινο χρώμα, σπόροι γλυκείς, φλοιός λεπτός), *Dolce Alaria* (σπόροι γλυκείς, φλοιός λεπτός), *Dolce a Dente di Cavallo* (σπόροι επιμήκεις), *Amara verace* (υπόξινη, φλοιός ανοιχτόχρωμος κόκκινος), *Wonderful* (θεωρείται μια από τις καλύτερες), *Ruby Red*, *Early Red* και *Granada*. Οι ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες έχουν προέλθει ως σποριόφυτα και στο εμπόριο φέρονται με το όνομα του τόπου προέλευσης.

3.4.1 Ποικιλία Wonderful (η ποικιλία που μελετάται στην παρούσα διατριβή)

Η ποικιλία *Wonderful* κατάγεται από τη Φλόριντα των ΗΠΑ. Ο καρπός της είναι μεγάλος, με χρώμα βαθύ μωβ έως κόκκινο (Εικόνα 17). Ο φλοιός του καρπού έχει μέτριο πάχος και σάρκα με βαθύ κόκκινο χρώμα, η οποία είναι χυμώδης με θαυμάσια γεύση κρασιού. Οι σπόροι της δεν είναι σκληροί, ενώ οι καρποί προσφέρονται περισσότερο για την παρασκευή χυμών παρά για νωπή κατανάλωση. Το δένδρο είναι ζωντανό και παραγωγικό. Αποτελεί σπουδαία εμπορική ποικιλία της Καλιφόρνια.

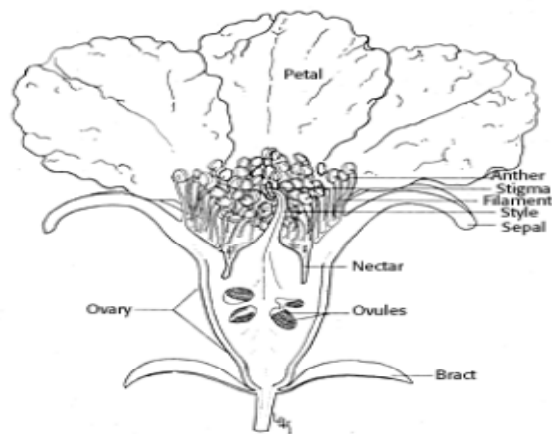
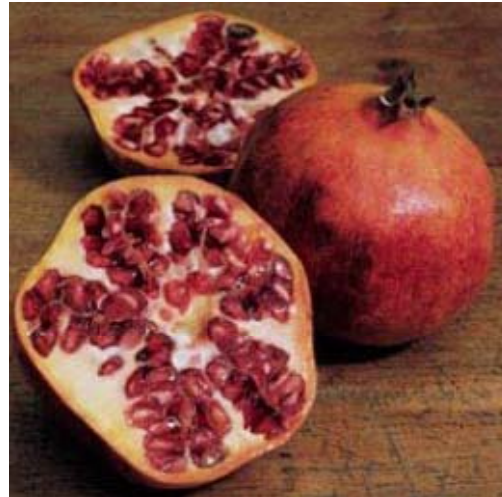


Figure 161. - Longitudinal section of 'Wonderful' Pomegranate flower, x2.



Εικόνα 17: Άθος και καρπός της ποικιλίας ροδιάς Wonderful

3.5 Παραγωγή

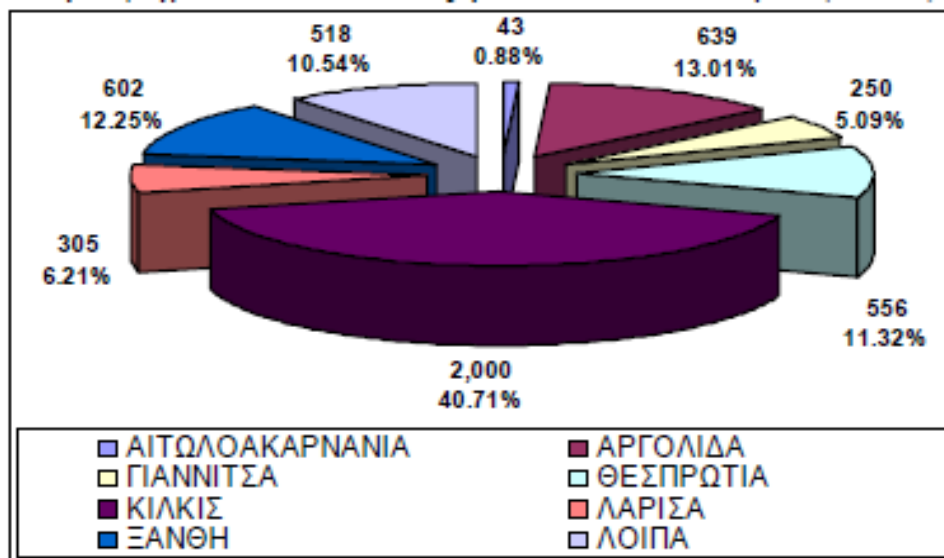
Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται ετησίως στους 2.250.000 τόνους (Πίνακας 5) (Tzourmani et al., 2008).

Χώρα	Παραγωγή(τόνοι)	Ποσοστό (%)
Ινδία	1.200.000	53,33
Ιράν	650.000	28,89
Η.Π.Α.	100.000	4,44
Τουρκία	75.000	3,33
Ισπανία	60.000	2,67
Ισραήλ	20.000	0,89
Λοιπές	145.000	6,44
Σύνολο	2.250.000	

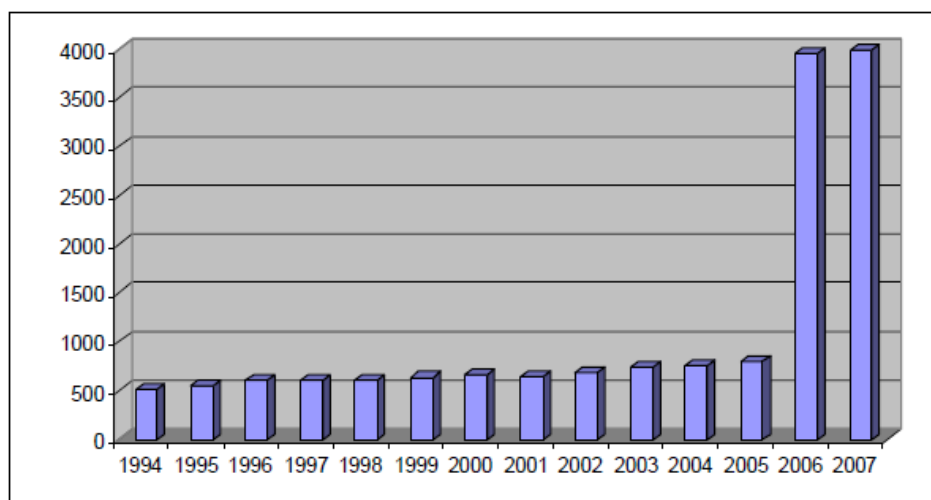
Πίνακας 5 : Σημαντικότερες χώρες παραγωγής ροδιών (Tzourmani et al., 2008)

Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία, φαίνεται ότι σε πολλές χώρες -με σημαντικότερο το Ισραήλ (Abelson J.2006) - οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά λόγω νέων φυτεύσεων. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ροδιάς είναι γνωστή από τα αρχαία

χρόνια (Lionakis S. 1994). Σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (1989), μόνο το 10% του συνόλου των δέντρων βρίσκονταν σε οργανωμένους οπωρώνες ενώ η συνολική ετήσια παραγωγή, ανερχόταν σε 2.700 τόνους περίπου. Ωστόσο, τη δεκαετία του 1990 μειώθηκαν σημαντικά τόσο οι εκτάσεις των κανονικών οπωρώνων όσο και η συνολική παραγωγή. Σήμερα, ο κύριος όγκος ροδιών στην Ελλάδα παράγεται στην περιοχή της Ερμιόνης (300-400 τόνοι), όπου η ροδιά αποτελεί παραδοσιακή καλλιέργεια.



Γράφημα 1: Εκτάσεις ροδιών ανά νομό (2006) Πηγή: Υπ.Α.Α.Τ.



Γράφημα 2: Συνολικές εκτάσεις ροδιών στην Ελλάδα (1994-2007) Πηγή: Υπ.Α.Α.Τ.

Τα τελευταία χρόνια, πολλοί παραγωγοί έχουν προβεί σε νέες φυτεύσεις δέντρων ροδιάς κυρίως της ποικιλίας wonderful, στην Αργολίδα, την Ηλεία, τη Λακωνία, τα Γιαννιτσά, την Ξάνθη, τη Λάρισα και τα Φάρσαλα (Ορφανός, 2000; Φραγκούλη Ν, 2006). Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, τα τελευταία χρόνια, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις έχουν αυξηθεί τουλάχιστον κατά 3 χιλιάδες στρέμματα, φτάνοντας συνολικά τα 4.000 στρέμματα περίπου (Γραφήματα 1, 2).

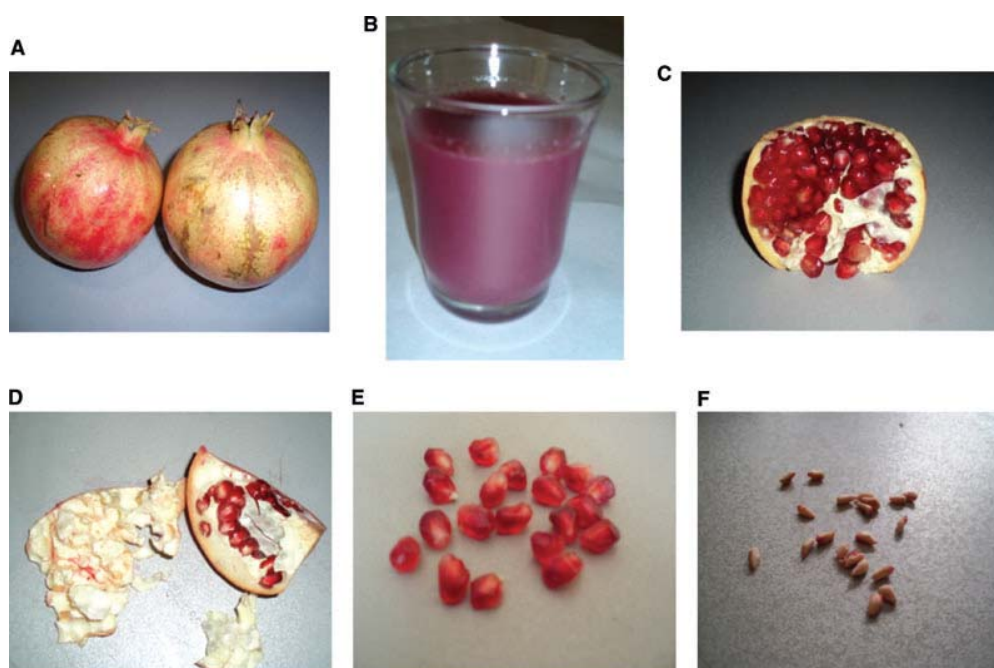
3.6 Κόστος Εγκατάστασης - Τιμή και Απόδοση

Το κόστος εγκατάστασης μιας φυτείας ροδιού ανέρχεται περίπου στα 1330 €/στρέμμα και περιλαμβάνει τις δαπάνες που πραγματοποιούνται κατά τα πρώτα τρία χρόνια, όσο διαρκεί η περίοδος εγκατάστασης της φυτείας. Οι δαπάνες του πρώτου έτους αφορούν κατά κύριο λόγο την εγκατάσταση των δενδρουλλίων και του αρδευτικού συστήματος. Όσον αφορά τα απαιτούμενα εργατικά για το διάστημα αυτό, περιλαμβάνονται κυρίως η χάραξη του δενδρώνα, η φύτευση των δενδρουλλίων και η τοποθέτηση των καλαμιών υποστήριξης. Έτσι, η εργασία καταλαμβάνει ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικών δαπανών εγκατάστασης και οι επενδύσεις σε πάγια ανέρχονται στο 84% του συνολικά απαιτούμενου ποσού. Η εμπορικά αξιοποιήσιμη παραγωγή στην υπό εξέταση περιοχή ξεκινάει το τρίτο έτος, με μέσο όρο αναμενόμενης απόδοσης να ανέρχεται στα 100 κιλά/στρέμμα περίπου.

Όσον αφορά την τιμή διάθεσης των ροδιών, σύμφωνα με τις εκτιμήσεις των παραγωγών η τιμή πώλησης αναμένεται να κυμανθεί γύρω στο 1 €/κιλό. Επισημαίνεται ότι η εμπορική αξία του καρπού επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το μέγεθός του. Έτσι, τα μεγαλύτερου μεγέθους ρόδια (>400 gr) πωλούνται ακριβότερα, ενώ τα πολύ μικρού μεγέθους έχουν πολύ μικρότερη εμπορική αξία. Επίσης, ο καρπός πρέπει να έχει έντονο κόκκινο χρώμα και καλά διαμορφωμένο στέμμα για να έχει αυξημένη εμπορική αξία (Blumenfeld A. et al.2000). Ένας καλός οπωρώνας 8-10 ετών, αποδίδει 1,8-2,5 τόνους/στρέμμα εμπορεύσιμα ρόδια, ενώ η απόδοση ελαττώνεται βαθμιαία μετά το 25°-30° έτος.

3.7 Χημική σύνθεση ροδιού

Το ρόδι ως φρούτο (Εικόνα 18) έχει πολύτιμα συστατικά στα διαφορετικά μέρη του. Αυτά μπορούν να διαχωριστούν στα παρακάτω ανατομικά τμήματα: φλοιός (peel), σπέρματα (seeds) και επισπέρμια (arils). Ένα άλλο πολύ σημαντικό προϊόν που παράγεται από το ρόδι είναι ο χυμός, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τα επισπέρμια ή από ολόκληρο το φρούτο.



Εικόνα 18: A: Ολόκληρα ρόδια, B: χυμός ροδιού (juice), C: τμήμα ροδιού, D: φλοιός ροδιού (peel), E: επισπέρμιο ροδιού (arils), F: σπέρματα ροδιού (seeds)

Η χημική σύνθεση του φρούτου (Εικόνα 18) διαφέρει και εξαρτάται από την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, το μικροκλίμα, την ωριμότητα συλλογής, τις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης (Roğrazoğlu et al. 2002; Barzegar et al. 2004; Fadani et al. 2005). Σημαντικές διαφορές έχουν αναφερθεί στο περιεχόμενό τους σε οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά, σάκχαρα, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και μεταλλικά ιχνοστοιχεία ανάλογα με το έτος και τόπο παραγωγής (Aviram et al. 2000; Mirdehghan and Rahemi 2007; Cam et al. 2009; Davidson et al. 2009; Tezcan et al. 2009). Περίπου το 50% του βάρους του φρούτου αντιστοιχεί στο φλοιό, ο οποίος αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή βιοδραστικών συστατικών όπως φαινολικών παραγώγων, φλαβονοειδών,

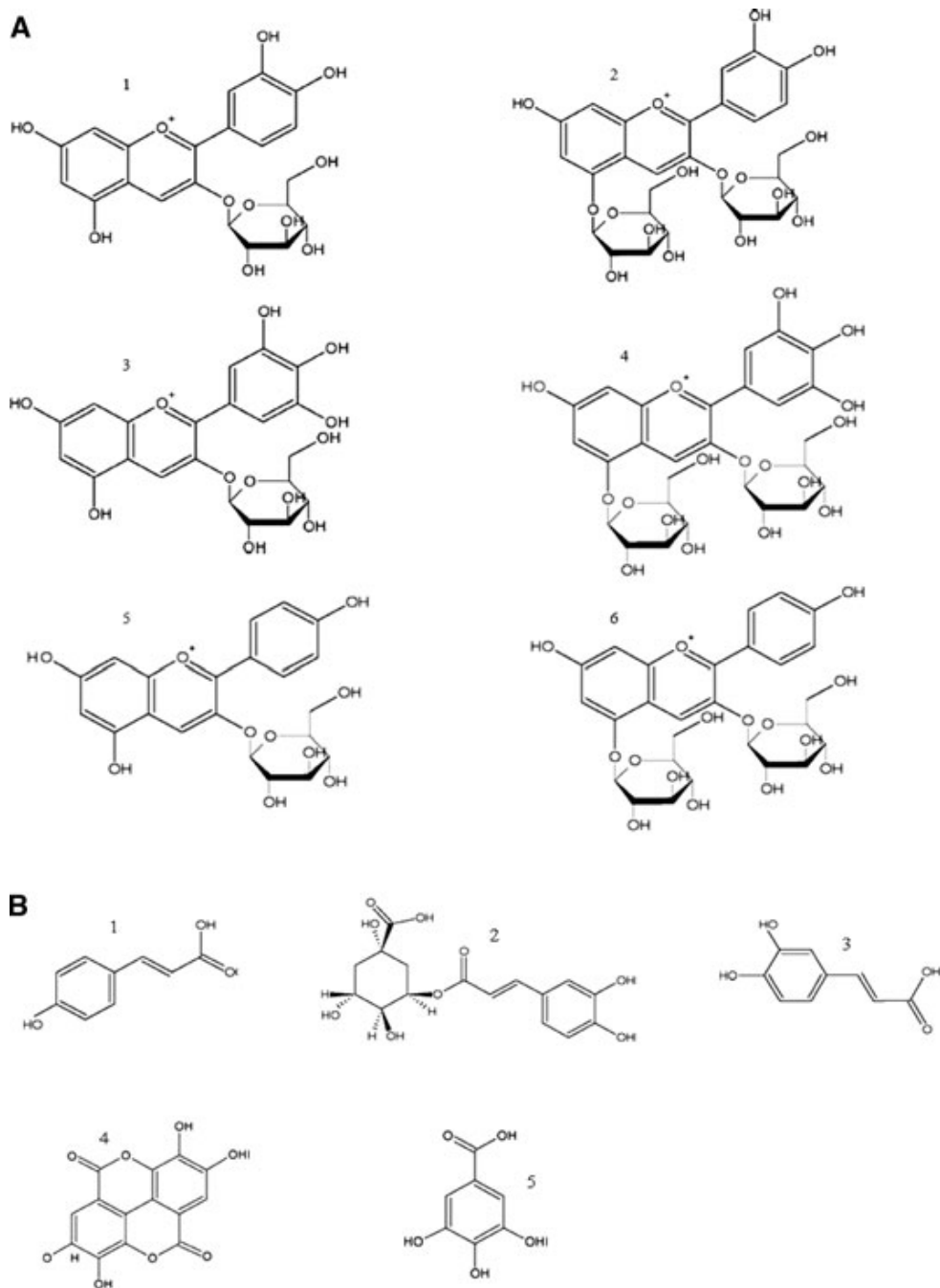
ελλαγοτανινών (ETs) και προανθοκυανιδινών (Li et al.2006), μεταλλικών στοιχείων όπως κάλιο, ασβέστιο, άζωτο, φώσφορο, μαγνήσιο και νάτριο (Mirdehghan and Rahemi 2007) και πολυσακχαριτών (Jahfar et al. 2003).

Το εδώδιμο τμήμα του ροδιού (50%) είναι κατά 40% το επισπέρμιο και 10% τα σπέρματα. Το επισπέρμιο περιέχει κατά 85% νερό, 10% σάκχαρα (κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη) και 1.5% πηκτίνες, οργανικά οξέα (πχ ασκορβικό, κιτρικό και μαλικό οξύ) και άλλα βιοδραστικά συστατικά όπως φαινολικά κυρίως ανθοκυανίνες (Aniram et al. 2000; Tezcan et al. 2009). Τα σπέρματα είναι πλούσια σε συνολικά λιπίδια, αφού στο ρόδι αποτελούν το 12% από το 20% του συνολικού βάρους των σπερμάτων. Τα λιπίδια αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα (n-3) λιπαρά οξέα, κυρίως λινολενικό και λινελαϊκό, πουνικό (runicic) οξύ, ελαϊκό, στεατικό και παλμιτικό (Ozgul-Yucel 2005; Fadanli et al. 2006). Επίσης, τα σπέρματα περιέχουν πρωτεΐνες, ακατέργαστες ίνες, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, πηκτίνη, σάκχαρα, πολυφαινόλες, κυρίως όμως τα φυτοοιστρογόνα γενιστεΐνη και κουμεστρόλη και το στεροειδές οιστρόνη (El-Nemr et al. 2006; Syed et al. 2007).

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ευεργετικές δράσεις στην υγεία, που αναφέρονται στην πρόληψη νοσημάτων, προέρχονται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και οφείλονται στο περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά συστατικά (Galaverna et al. 2008). Στο πλαίσιο αυτό το περιεχόμενο των καρπών του ροδιού σε βιοδραστικά συστατικά όπως πολυφαινόλες, οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες προσδιορίζει εν πολλοίς τη θρεπτική τους αξία (Aniram et al. 2000).

3.8 Φυτικές πολυφαινόλες του ροδιού

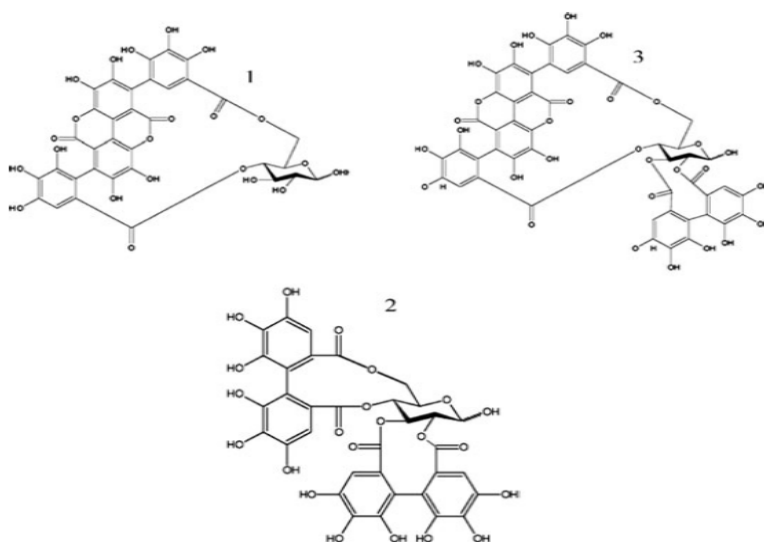
Η κυριότερη κατηγορία μορίων που είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο τμήμα των λειτουργικών ιδιοτήτων του καρπού του ροδιού είναι οι φαινολικές ενώσεις σε οποιαδήποτε από τις μορφές τους (Viuda-Martos et al. 2010a).



Εικόνα 19: Α) Σημαντικότερες ανθοκυανίνες που παρουσιάζονται στο χυμό του ροδιού: 1: κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 2: κυανιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη, 3: δελφινίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 4: δελφινίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη, 5: πελαργονιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτη, 6: πελαργονιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτη. (Β) Σημαντικότερα φαινολικά οξέα που παρουσιάζονται στο χυμό του ροδιού: 1: π-κουμαρικό οξύ, 2: χλωρογενικό οξύ, 3: καφεϊκό οξύ, 4: ελλαγικό οξύ ΕΑ; 5: γαλλικό οξύ.

Οι φυσικές πολυφαινόλες περιλαμβάνουν είτε απλά μόρια (φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή, στυλβένια) ή/και τα πολυμερή τους (λιγνάνες, μελανίνες, τανίνες), με πλέον διαδομένα τα φλαβονοειδή (Soobrattee et al. 2005) (Εικόνα 19). Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη και σημαντικότερη ομάδα φλαβονοειδών που υπάρχει στα επισπέρματα και στο χυμό του ροδιού. Αυτή η

φυσική χρωστική δίνει στο φρούτο και στο χυμό του ροδιού το κόκκινο χρώμα (Afaq et al., 2005). Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία από ανθοκυανίνες στο ρόδι, κυρίως με τη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, με κυριότερες την κυανιδίνη, τη δελφινιδίνη και την πελαργονίνη (Lansky et al., 2007). Οι φλαβονόλες αποτελούν την ομάδα των φλαβονοειδών με την υψηλότερη συγκέντρωση στη διατροφή. Οι κυριότερες ενώσεις αυτής της κατηγορίας, η κερκετίνη και η καμπφερόλη περιέχονται στο φλοιό (περικόρπιο) και στο χυμό του ροδιού. Στο φλοιό του ροδιού, επίσης, περιέχεται και λουτεολίνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των φλαβονών. Επίσης, στο χυμό του ροδιού περιέχονται τόσο υδροξυκιναμικά οξέα (κυρίως καφεϊκό αλλά και χλωρογενικό και p-κουμαρικό οξύ) (Rougazoglu et al., 2000) όσο και υδροξυβενζοϊκά οξέα (κυρίως γαλλικό αλλά και ελλαγικό οξύ) (Atakura et al., 2000). Τέλος, ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε υδρολυόμενες τανίνες (Εικόνα 20), κυρίως runicalin, redunculagin, και runicalagin (Seeram et al.2005b) οι οποίες διαφέρουν από τις προανθοκυανιδίνες ως προς τη χημική τους δομή. Οι τανίνες είναι εστέρες από εξαυδροξυδιφενικό οξύ και μια πολυόλη, συνήθως γλυκόζη ή quinic (κινικό) οξύ (Clifford and Scalbert 2000). Εκτός από τανίνες, ο φλοιός του ροδιού περιέχει υδροξυβενζοϊκό οξύ, όπως γαλαγικό (gallagic), και γλυκοζίτες (Atakura et al.2000).



Εικόνα 20: Οι σημαντικότερες ελαγitanίνες που παρουσιάζονται στο φλοιό του ροδιού. 1:runicalin; 2: redunculagin; 3:runicalagin

3.9 Λειτουργικές ιδιότητες ροδιού

Προς το παρόν, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για τις λειτουργικές ιδιότητες του ροδιού. Έχουν πραγματοποιηθεί περίπου 770 επιστημονικές εργασίες που αφορούν την καταπολέμηση των αγγειακών παθήσεων, (διαβήτης και καρκίνος) και τις λειτουργικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές) του ροδιού και των παραγώγων του, όπως ο χυμός, το έλαιο των σπερμάτων, ο φλοιός και ούτω καθεξής. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να έχουν ισχυρότερη επιστημονική υποστήριξη.

Το ρόδι θα μπορούσε να θεωρηθεί ως λειτουργικό τρόφιμο επειδή έχει πολύτιμα συστατικά σε διάφορα μέρη του καρπού του, που εμφανίζει φαρμακευτικά αποτελέσματα. Αυτά μπορεί να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Cam et al. 2009), ως αντικαρκινικοί (Hamad and Al-Momene 2009) ή ως αντιηπατοτοξικοί (Celik et al. 2009) παράγοντες και να βελτιώσουν την καρδιαγγειακή υγεία (Davidson et al. 2009). Έχει αποδειχθεί, ότι το ρόδι έχει αντιμικροβιακή (Duman et al. 2009), αντιφλεγμονώδη (Lee et al. 2010), αντιική (Haidari et al. 2009), αντιδιαβητική (Xu et al. 2009) ιδιότητα και μπορεί να βελτιώσει την υγεία του στόματος (Di Silvestro et al. 2009) και του δέρματος (Aslam et al. 2006).

Επίσης, το ρόδι μπορεί να προλάβει την άνοια-Alzheimer (Singh et al. 2008), να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος (Türk et al. 2008) και να βοηθήσει στην στυτική δυσλειτουργία στους άντρες ασθενείς (Forest et al. 2007). Ωστόσο, ελάχιστες καλά ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές έχουν ολοκληρωθεί και τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν θεσπιστεί. Οι Lansky και Newman το 2007 αναφέρουν ότι βαθύτερη έρευνα σε αυτό το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο καλείται να εκτιμήσει τη συνολική αξία του ροδιού ως ολόκληρο φρούτο και των διαφόρων παραγώγων που προέρχονται από τα συστατικά του.

3.10 Αντιοξειδωτικές και Αντικαρκινικές Ιδιότητες

Η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών (Naveena et al. 2008; C, Am et al. 2009; Mousavinejad et al. 2009; Tezcan et al. 2009), οι περισσότερες εκ των οποίων πραγματοποιήθηκαν in vitro και in vivo.

Όλες αυτές οι έρευνες μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικές φαινολικές ενώσεις που παρουσιάζονται στο ρόδι συμπεριλαμβανομένων των ισομερών punicalagin και των ανθοκυανινών (δελφινίνη, κυανιδίνη και πελαργονιδίνη 3- γλυκοζίτες και 3,5-διγλυκοζίτες). Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές για την ικανότητα τους να καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την οξειδωση των λιπιδίων *in vitro* (Gil et al.2000; Noda et al.2002). Ωστόσο, ο Tzulker και οι συνεργάτες του το 2007, πρότειναν ότι το punicalagin, που προέρχεται από το φλοιό και είναι ένα από τα σημαντικότερα φυτοχημικά έχει πρωτεύοντα ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού του ροδιού, ενώ οι ανθοκυανίνες συμβάλουν ελάχιστα σε αυτή.

Αρκετές μελέτες, έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του φρούτου του ροδιού και των παραγώγων του, που είναι προικισμένο με πολύ υψηλή και αντιοξειδωτική δράση, ως ανασταλτικός, αντιεπεμβατικός και προαποπτωτικός παράγοντας σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ζωικά μοντέλα (Afaq et al.2005; Lansky et al.2005a, 2005b; Lansky and Newman 2007; Syed et al.2007; Hong et al.2008; Hamad and Al-Momene 2009). Ο Koyama και οι συνεργάτες του το 2010, ανέφεραν ότι η θεραπεία του καρκίνου του προστάτη LAPC4 με 10 µg/mL εκχύλισμα ροδιού, που παρασκευάζεται από το φλοιό και τα επισπέρμια (εκτός των σπερμάτων με τυποποιημένο περιεχόμενο ελλαγιτανινών που περιέχονται 37% punicalagins), είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης. Ο Schubert και η ομάδα του το 2002, έδειξαν ότι το κρασί από ρόδι μπορεί να χρησιμεύσει ως ισχυρός αναστολέας του NF-κΒ στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το έλαιο από τα σπέρματα του ροδιού και οι πολυφαινόλες, που έχουν υποστεί ζύμωση, καθυστερούν την οξειδωση και τη σύνθεση των προσταγλαδινών και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή και προώθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Σε μια μελέτη την οποία διεξήγαγαν ο Malik και η ομάδα του το 2005 με ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη αξιολόγησαν τις αντιπολλαπλασιαστικές και προαποπτωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος του ροδιού. Το εκχύλισμα του ροδιού, (10 σε 100 µg/mL; 48 ώρες) που είναι ως θεραπεία εξαιρετικά επιθετική για τα ανθρώπινα κύτταρα του προστάτη PC3, οδήγησε σε μια δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και στην επαγωγή της απόπτωσης.

3.11 Συγκομιδή και βιομηχανική επεξεργασία ροδιού για την παραγωγή χυμού

Η συγκομιδή αποτελεί το πρώτο στάδιο για την παραγωγή του χυμού ροδιού, ενός από τα κυριότερα προϊόντα του ροδιού λόγω των θρεπτικών και φυτοχημικών συστατικών που περιέχει. Η υψηλή ποιότητα χυμού απαιτεί συλλογή του καρπού στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης. Όλα τα είδη φρούτων πετυχαίνουν το βέλτιστο της ωρίμανσής τους αν ωριμάσουν στο δέντρο. Ορισμένα φρούτα μπορεί να συλλεχθούν σε στάδιο που έχουν μεν σχηματιστεί αλλά δεν έχουν ακόμη ωριμάσει και μπορούν να ωριμάσουν μετά τη συγκομιδή. Το ρόδι σταματά να ωριμάζει μετά τη συγκομιδή, γι' αυτό πρέπει να συλλέγεται στο βέλτιστο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκομιδή γίνεται είτε χειρωνακτικά είτε μηχανικά με χρήση μηχανημάτων που οδηγούνται ανάμεσα στις συστοιχίες των δέντρων.

Τα βασικά στάδια επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων περιλαμβάνουν τα παρακάτω στάδια:

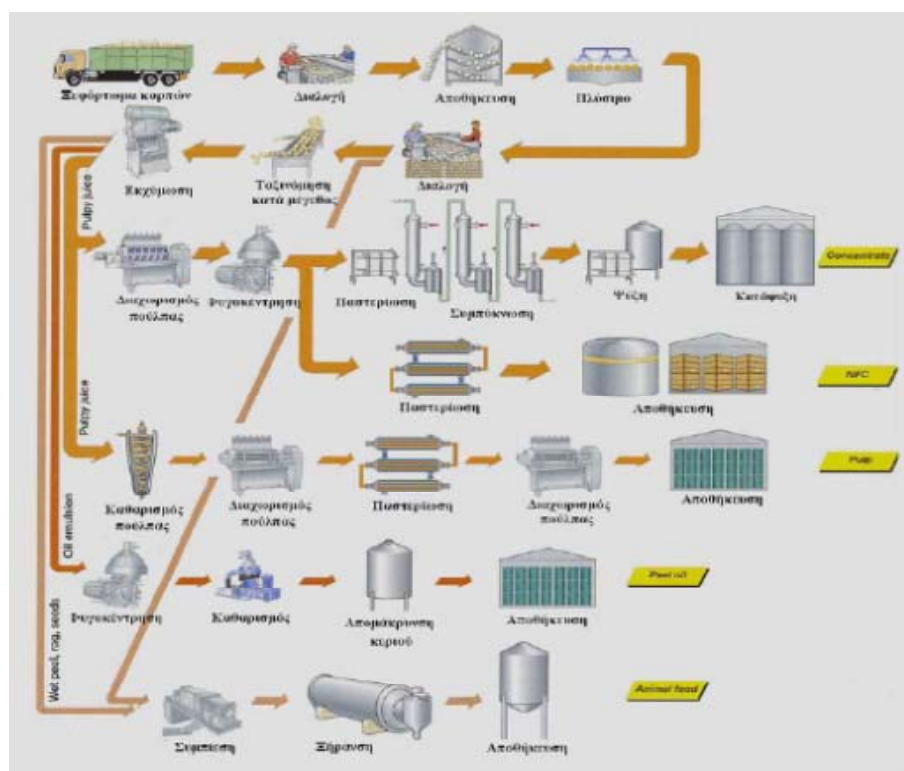
- Παραλαβή και διαλογή πρώτης ύλης.
- Πλύσιμο
- Εκχύμωση
- Διαχωρισμός Πούλπας - Φυγοκέντρηση - Παστερίωση και παραλαβή NFC (Not From Concentrate) χυμού ή/και συμπύκνωση για παραλαβή συμπυκνωμένου χυμού.
- Επεξεργασία φλούδας και παραλαβή αιθέριων ελαίων (peel oil)
- Επεξεργασία παραπροϊόντων για την παραγωγή πχ. ζωοτροφών

Στην εικόνα 21 δίνεται ένα σχηματικό διάγραμμα ροής με τα βασικά στάδια επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων. Το κομμάτι της παραγωγικής διαδικασίας που αφορά την παρούσα εργασία ξεκινά από την πρώτη ύλη (ρόδι) και φτάνει μέχρι την παραλαβή του χυμού του αμέσως πριν την παστερίωση.

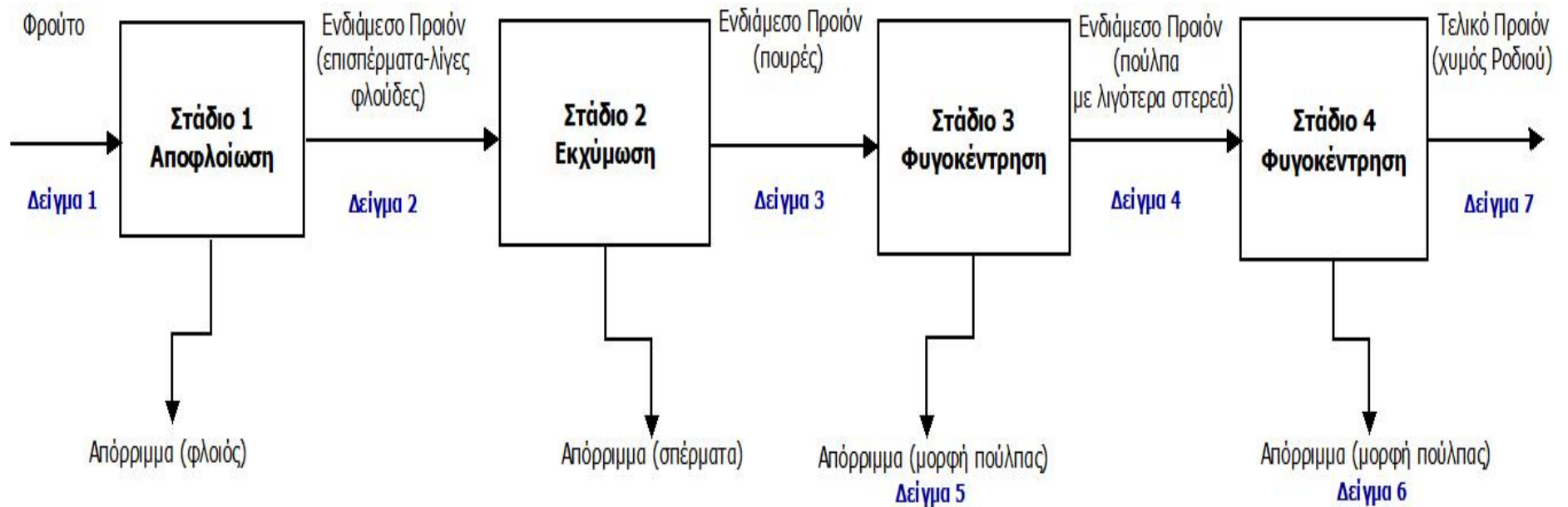
Συνοπτικά τα στάδια αυτής της διαδικασίας είναι τα παρακάτω (Εικόνα 22):

- Παραλαβή, πλύσιμο και τεμαχισμός του φρούτου (ρόδι).
- Αφαίρεση φλούδας και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν)-Στάδιο 1.
- Εκχύμωση και απομάκρυνση - παραλαβή σπερμάτων ως απορρίμματα (παραπροϊόντα) - Στάδιο 2.

- Φυγοκέντρηση του παραγόμενου από το στάδιο 2 πουρέ ροδιού για την αφαίρεση μέρους της πούλπας και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν) - **Στάδιο 3**.
- Φυγοκέντρηση του παραγόμενου από το στάδιο 3 ενδιάμεσου προϊόντος (μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά), για την αφαίρεση της επιπλέον πούλπας, και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν) - **Στάδιο 4**
- Παραλαβή του τελικού προϊόντος - (διαυγασμένου) χυμού ροδιού και απαέρωσή του για την αφαίρεση του διαλυμένου οξυγόνου (προστασία από οξειδώσεις).



Εικόνα 21: Σχηματικό διάγραμμα ροής επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων



Εικόνα 22: Διάγραμμα Ροής Διαδικασίας Παραγωγής Χυμού Ροδιού.

Στο διάγραμμα φαίνονται τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, η πρώτη ύλη (φρούτο), τα ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα (απορρίμματα), καθώς και το τελικό προϊόν (χυμός ροδιού). Φαίνονται, επίσης, οι θέσεις λήψης των εξεταζόμενων στην εργασία δειγμάτων.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και εκτίμηση, με τη χρήση μοριακών μεθόδων, της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε λυοφιλισμένα δείγματα των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων βιομηχανικής παραγωγής χυμού, από καρπούς του φυτού *Punica Granatum* (Ροδιά). Στο πρώτο μέρος της μελέτης και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των δειγμάτων έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου (ROO•). Οι ρίζες περοξυλίου παράχθηκαν από τη θερμική διάσπαση του 2,2 -azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH). Η εκτίμηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού τόσο στο τελικό προϊόν (χυμός), όσο και στα παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας θα βοηθήσει στην ενίσχυση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και στην προσπάθεια δημιουργίας νέων και καινοτόμων.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υλικά

5.1.1 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

5.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

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

- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Merck-Γερμανία)
- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδισ-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma-Germany)
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Merck- Germany)
- DMSO (Διμεθυλοσουλφοξειδίο) [$(CH_3)_2SO$] (Merck-Γερμανία)
- H_2O_2 (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

5.1.3 Λυοφιλισμένα Δείγματα

Τα λυοφιλισμένα δείγματα, των οποίων η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση μελετήθηκε, απομονώθηκαν από τα στάδια γραμμής βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού και διατέθηκαν το Νοέμβριο του 2011 από την εταιρεία 'VITOM - Αφοί Χριστοδούλου'. Στο διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας (Εικόνα 22) φαίνονται οι θέσεις λήψης των δειγμάτων.

Η λήψη των δειγμάτων και η λυοφιλίωση τους έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στον Πίνακα 6 δίνονται οι θέσεις δειγματοληψίας, το είδος και το περιεχόμενο των δειγμάτων.

Αρ. Δείγματος	Θέση Δειγματοληψίας	Περιγραφή
1	Πρώτη ύλη (Είσοδος)	Φρούτο (Ρόδι) Μόνο το εδώδιμο μέρος (χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα) ¹
2	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 1 ^{ου} Σταδίου (Αποφλοιώση)	Επισπέρματα (Arils) και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων
3	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 2 ^{ου} Σταδίου (Εκχύμωση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ
4	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 3 ^{ου} Σταδίου (1 ^η Φυγοκέντρηση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά
5	Απόρριμμα 3 ^{ου} Σταδίου	Μορφή Πούλπας
6	Απόρριμμα 4 ^{ου} Σταδίου (2 ^η Φυγοκέντρηση)	Μορφή Πούλπας
7	Τελικό Προϊόν (Έξοδος)	Χυμός Ροδιού

Πίνακας 6 : Είδος και περιεχόμενο δειγμάτων

¹ Το δείγμα που εξετάστηκε δεν αφορούσε ολόκληρο το φρούτο (ρόδι αλλά μόνο το εδώδιμο μέρος του (είχαν αφαιρεθεί φλοιός και άσπρα τοιχώματα)

5.1.4 Διαδικασία απόκτησης δειγμάτων

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Μετά την παραλαβή των δειγμάτων από την παραγωγική διαδικασία ακολούθησε η λυοφιλίωση τους. Στον πίνακα 7 που ακολουθεί δίνονται τα βάρη (g) ή οι όγκοι

(ml) των δειγμάτων (ανάλογα με τη μορφή τους) πριν και μετά τη λυοφιλίωση. Μετά τη λυοφιλίωση (ή ξήρανση για τα επισπέρματα) τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν.

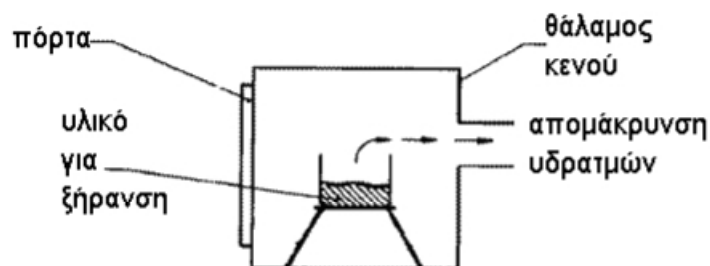
Δείγματα	Βάρη ή Όγκοι Δειγμάτων	
	Πριν τη Λυοφιλίωση	Μετά τη Λυοφιλίωση
1	573,00 mL	110,43 g
2	885,50 g	341,20 g
3	847,00 mL	223,49 g
4	710,00 mL	160,88 g
5	921,00 g	232,20 g
6	804,00 mL	200,40 g
7	584,00 mL	164,56 g

Πίνακας 7: Δείγματα πριν και μετά τη λυοφιλίωση.

Λυοφιλίωση ή κρυοξηήρανση ονομάζεται η διεργασία κατά την οποία τα δείγματα ψύχονται σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια το νερό απομακρύνεται από αυτά με εξάχνωση.

5.1.5 Αρχή της λυοφιλίωσης

Κάτω από το τριπλό σημείο (T, P) μια ουσία μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης. Συνεπώς, προκειμένου να ξηρανθεί μια ουσία, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά, ψύχεται η ουσία, οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό παγώνει. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε αεροστεγή χώρο (Εικόνα 23) όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού.



Εικόνα 23: Βασική διάταξη λυοφιλίωσης

Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή - παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης. Σε δεύτερη φάση, το υλικό θερμαίνεται ελαφρά και απομακρύνεται και το κρυσταλλικό ή «δεσμευμένο» νερό. Στη φάση αυτή, συνήθως, εφαρμόζεται η χαμηλότερη δυνατή πίεση.

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

Τρεις συνολικά μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση των υπό εξέταση λυοφιλισμένων δειγμάτων.

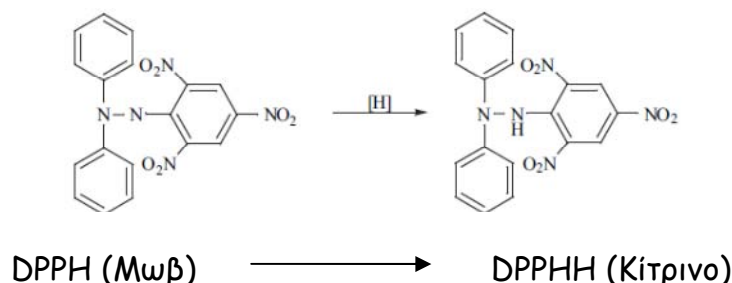
6.1 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των λυοφιλισμένων δειγμάτων εφαρμόστηκαν κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Πρόκειται για δύο, κατά βάση ποιοτικές, *in vitro* μεθόδους οι οποίες ανιχνεύουν την αντιοξειδωτική ή μη ικανότητα ενός συγκεκριμένου συστατικού. Και οι δύο μέθοδοι, βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν ρίζες όπως η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ή DPPH[·] (Brand-Williams et al., 1995) και 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS^{·+} (Rice-Evans et al., 1996). Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης του συστατικού επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό του IC₅₀, της συγκέντρωσης δηλαδή στην οποία οι εξεταζόμενες ουσίες προκαλούν την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH[·] ή ABTS^{·+} κατά 50% (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

6.1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH'

6.1.1.i 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 τη σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH' μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 24). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, τη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 24: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH'

6.1.1.ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH' την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH') και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων δειγμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 10, 50, 100, 250, 500 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει τη μέθοδο. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH') με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml (Εικόνα25). Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου έγινε με 1 ml μεθανόλης (τυφλό).



Εικόνα 25: Φασματοφωτομέτρο - συσκευή Hitachi U-1500

Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή, υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά

στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 9). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε ένα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH' σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Δείγμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DMSO	50 μl	50μl					
DPPH'	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (μέθοδος DPPH')

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Δείγμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
DMSO	50 μl	50μl					
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 9: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (μέθοδος DPPH')

6.1.1 iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό

αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

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

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

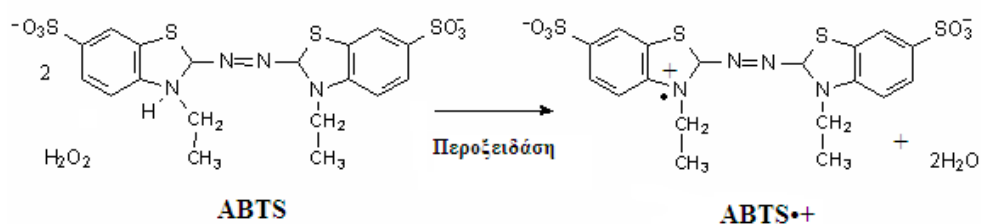
6.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

6.1.2.i Αρχή της μεθόδου

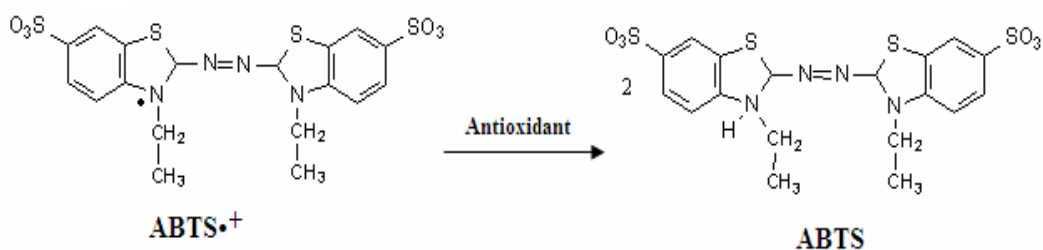
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993) και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)] παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου

περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ (κατιόν) (Εικόνα 26). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στη συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και έχει σαν συνέπεια τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 27) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).



Εικόνα 26: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα $ABTS^{\bullet+}$



Εικόνα 27: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με τη ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

6.1.2.ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων δειγμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μI) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μI) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον, διατηρούνται σε πάγο κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επwάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 2, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 10). Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει τη μέθοδο. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε φυτικό δείγμα, ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H_2O_2 , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επwασία και την προσθήκη των δειγμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή, υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							
	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Δείγμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
DMSO	50μl	50μl	-	-	-	-	-
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

(μέθοδος ABTS')

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H ₂ O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Δείγμα	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
DMSO	50μl	-	-	-	-	-
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 11: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

(μέθοδος ABTS')

6.1.2.iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

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

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

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

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

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

6.2 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

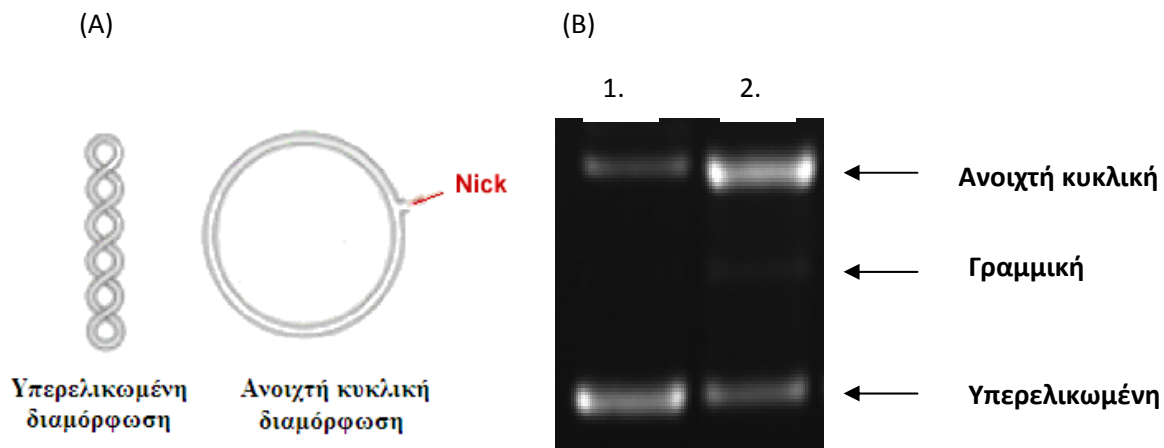
6.2.1 Γενικά

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι

μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων δειγμάτων. Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκε μια *in vitro* μέθοδος, και η ρίζα περοξυλίου (ROO[•]). Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των λυοφιλισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, τα οποία και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν «τρέχει» σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 28).

- Την **υπερελικωμένη διαμόρφωση** (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
- Την **ανοιχτή κυκλική** (Open circular, relaxed conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Τη **γραμμική διαμόρφωση** (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 28: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

(Α) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).

(Β) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνονται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα.

Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στη δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα, έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών δειγμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα της ρίζας ROO^{\cdot} να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζει τη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

6.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμικικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+

(Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στη συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS]] και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικό DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγαθεί το διάλυμα, προστίθενται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214 g στους 4°C, στη συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθεται διάλυμα προπυλάνης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί

ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

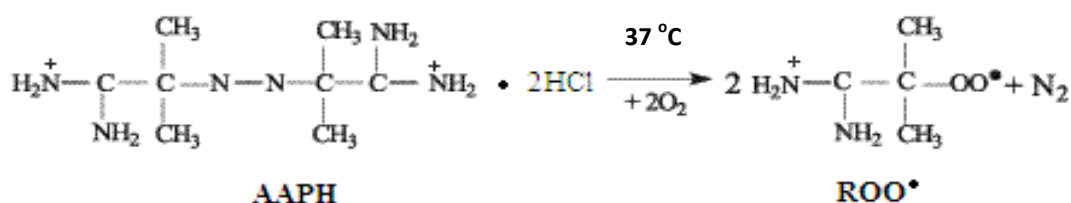
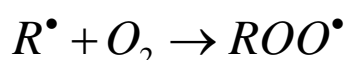
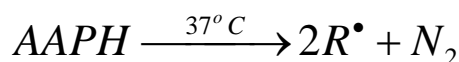
Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL ($1OD_{260} \rightarrow 50 \mu\text{g/mL}$). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στη συνέχεια, το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια, με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο, τελικά, χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

6.2.3 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

6.2.3.i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO[•] βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001). Οι ρίζες ROO[•] είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των

ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται. Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO[•] χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•] (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής διάσπασης και σχηματισμού των ριζών ROO[•].

Οι ρίζες ROO[•] έχουν την ικανότητα, επίσης, να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική. Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό δείγμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO[•].

6.2.3.ii Πειραματική διαδικασία

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

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων της αντίδρασης ως εξής:

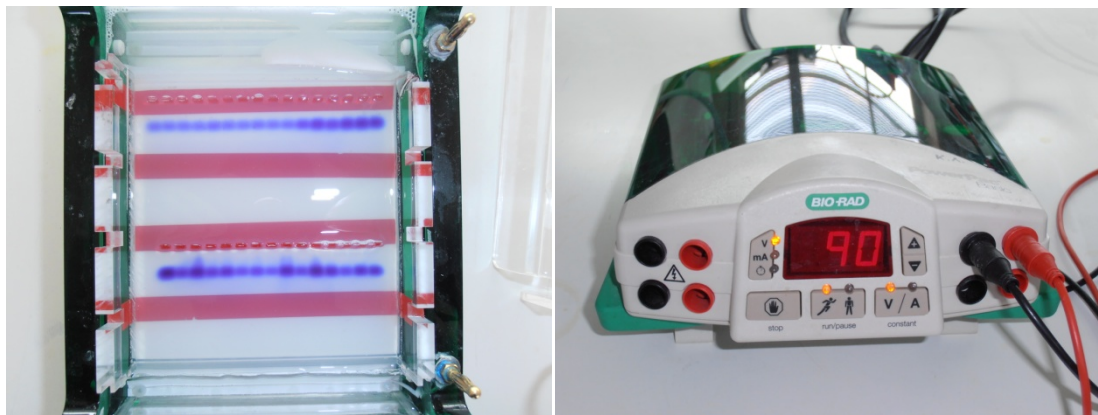
- **PBS** (pH=7,4): NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.
- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των λυοφιλισμένων δειγμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml. Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο δείγμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή της δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στη γραμμική διαμόρφωση. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με τη σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 12.

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

Πίνακας 12 : Ποσότητες αντιδραστηρίων (Μέθοδος ROO•)

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA. Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αгарόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8) (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης, στάδια απομάκρυνσης των χρωματισμένων ζωνών οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό, επίσης, για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια, με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν

6.2.3.iii Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO', που παράγονται από τη θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

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

Όπου:

S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,
 S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5 mM AAPH) και

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

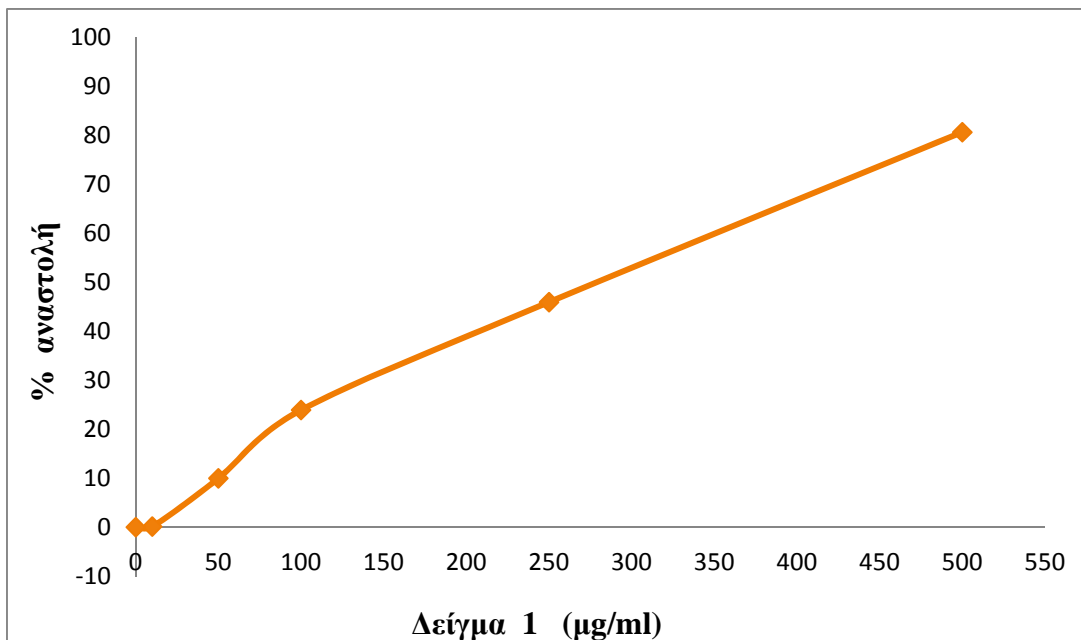
Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε δείγμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnett.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

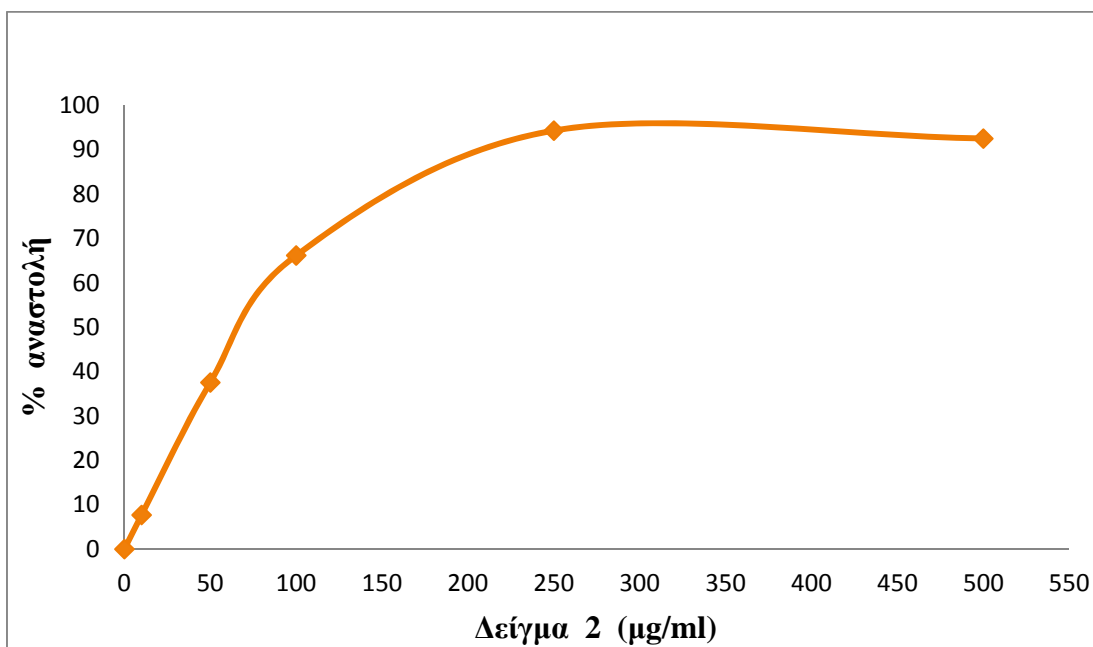
7.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λυοφιλισμένων δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH·

Συνολικά μελετήθηκαν 7 λυοφιλισμένα δείγματα της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 1,2,3,4,5, και 7 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το δείγμα 6 στις συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100 και 250 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν σχετικά υψηλή ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH'. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 33 $\mu\text{g/ml}$ έως 280 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το λυοφιλισμένο δείγμα 6 (απόρριμμα της 2^{ns} φυγοκέντρησης) (Γράφημα 8) με IC_{50} ίσο με 33 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές

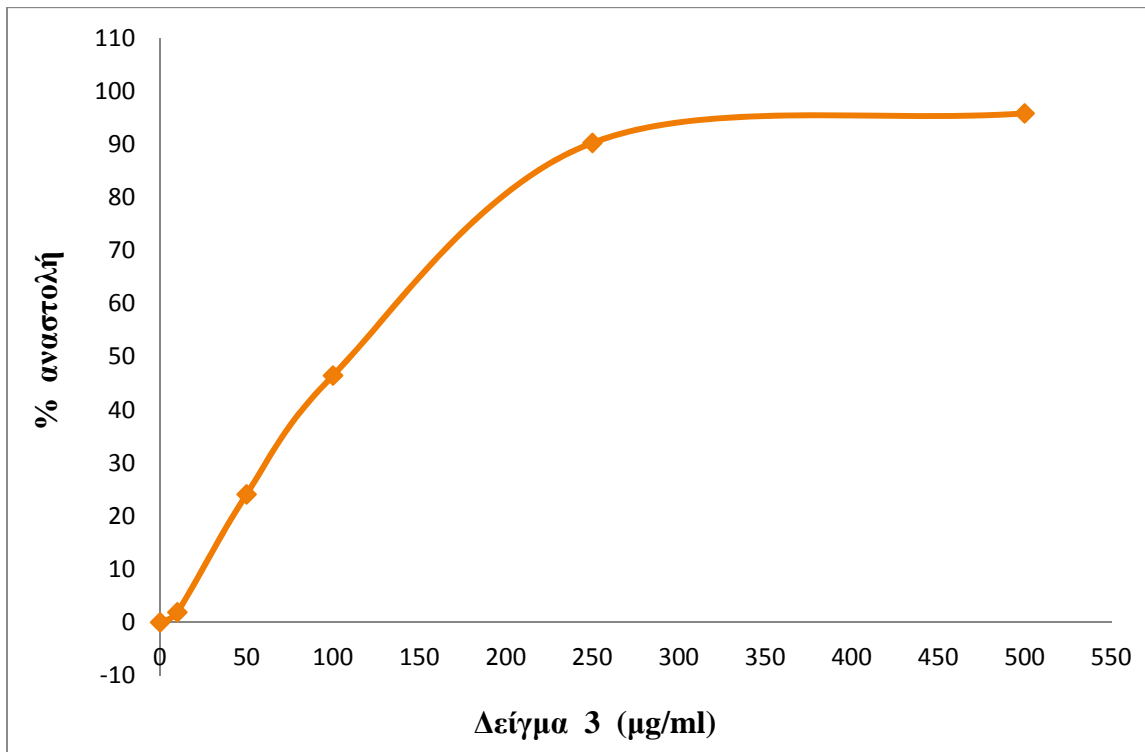
ήταν το δείγμα 1 (φρούτο - ρόδι χωρίς φλοιό και άσπρα τοιχώματα) (Γράφημα 3) με IC_{50} ίσο με 280 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από τα εξετασθέντα δείγματα.



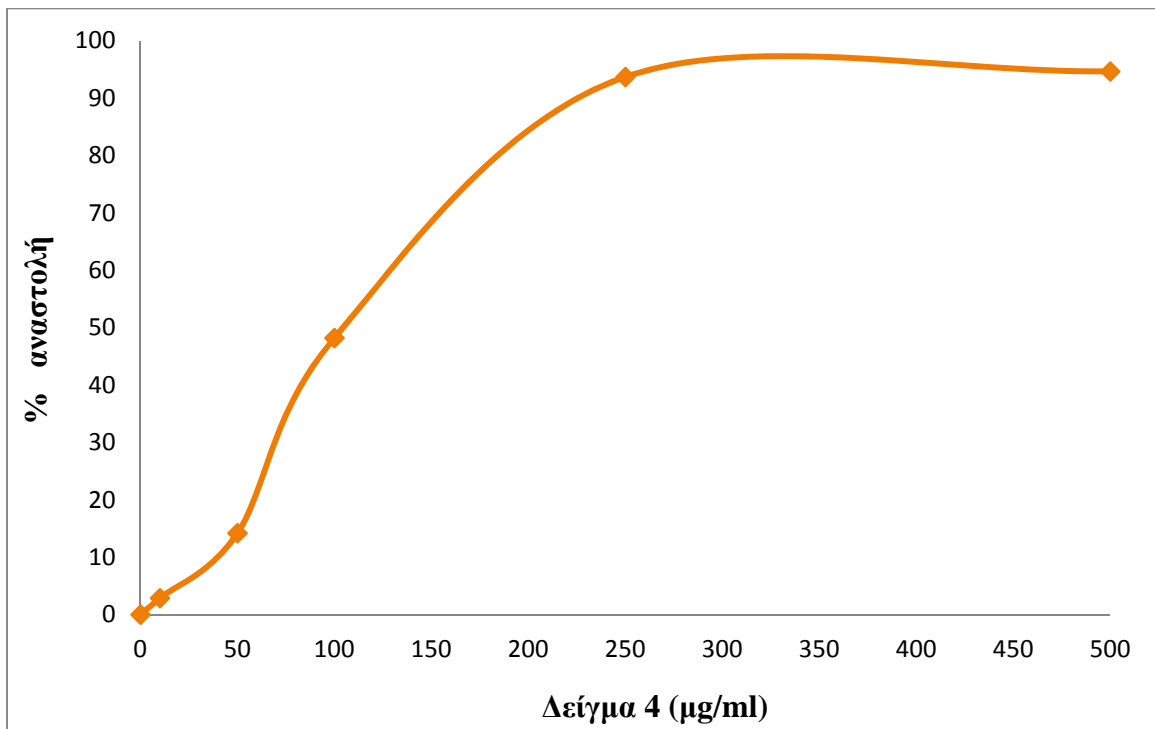
Γράφημα 3: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 1 (ρόδι χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - βρώσιμο τμήμα)



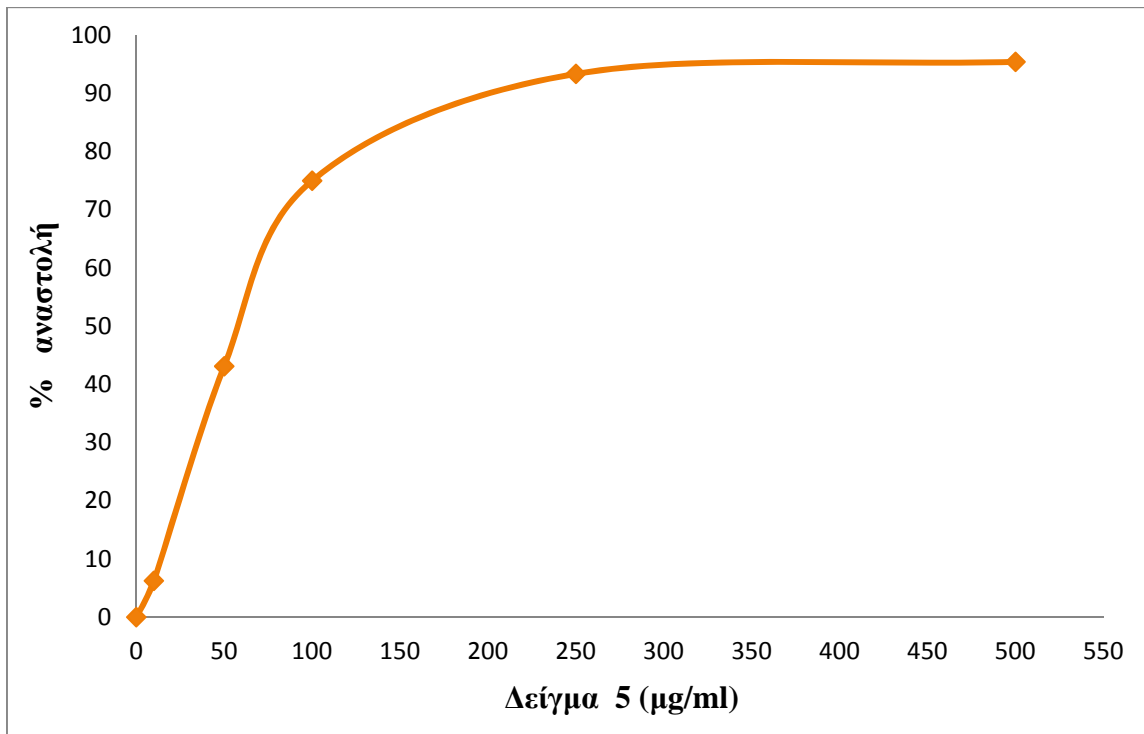
Γράφημα 4: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων)



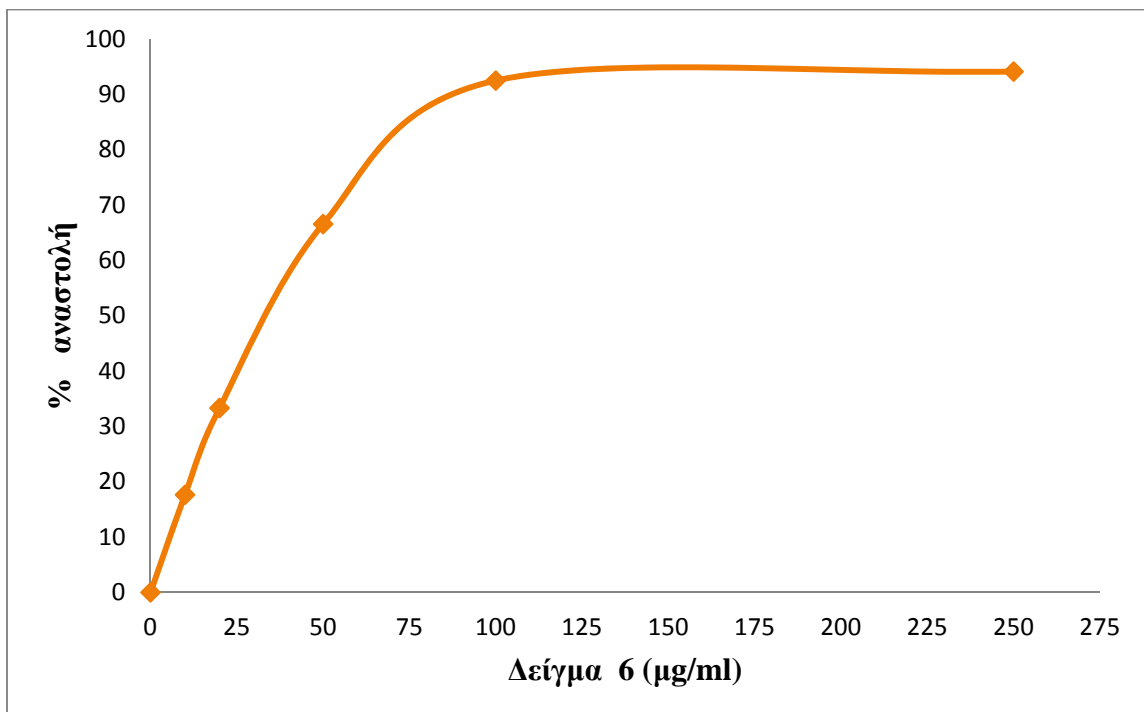
Γράφημα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)



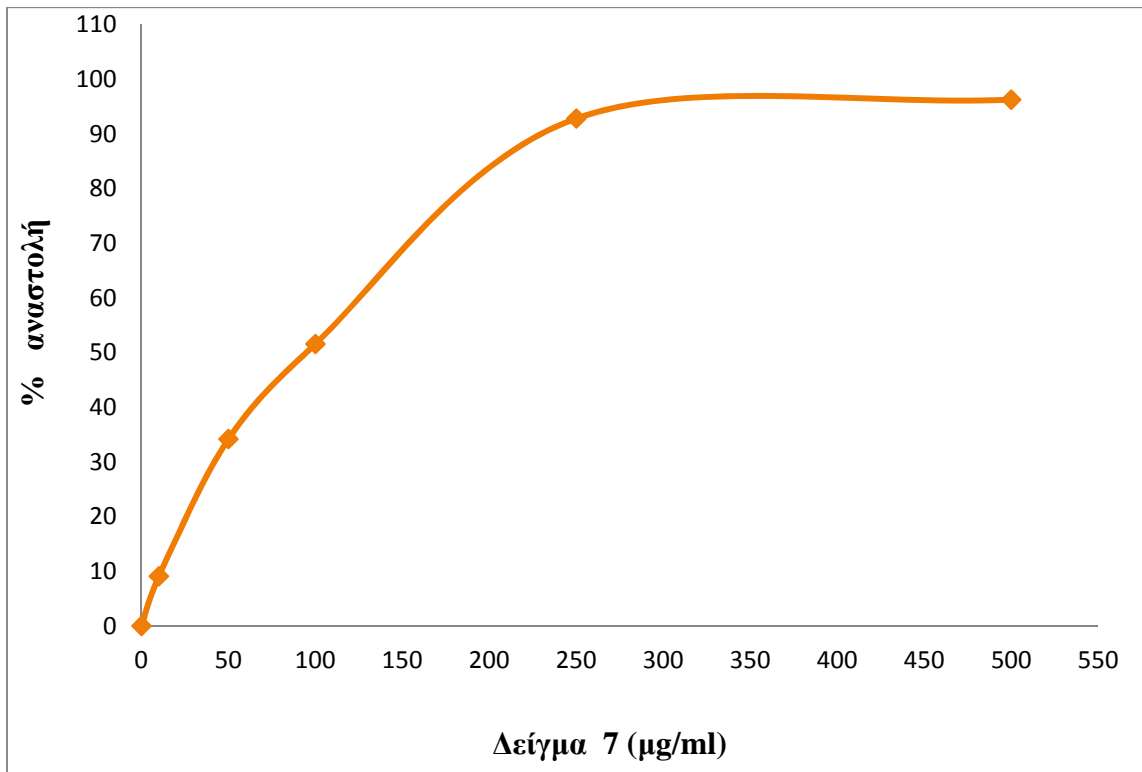
Γράφημα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)



Γράφημα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλισμένο Δείγμα 5 (μια μορφή πούλπας)

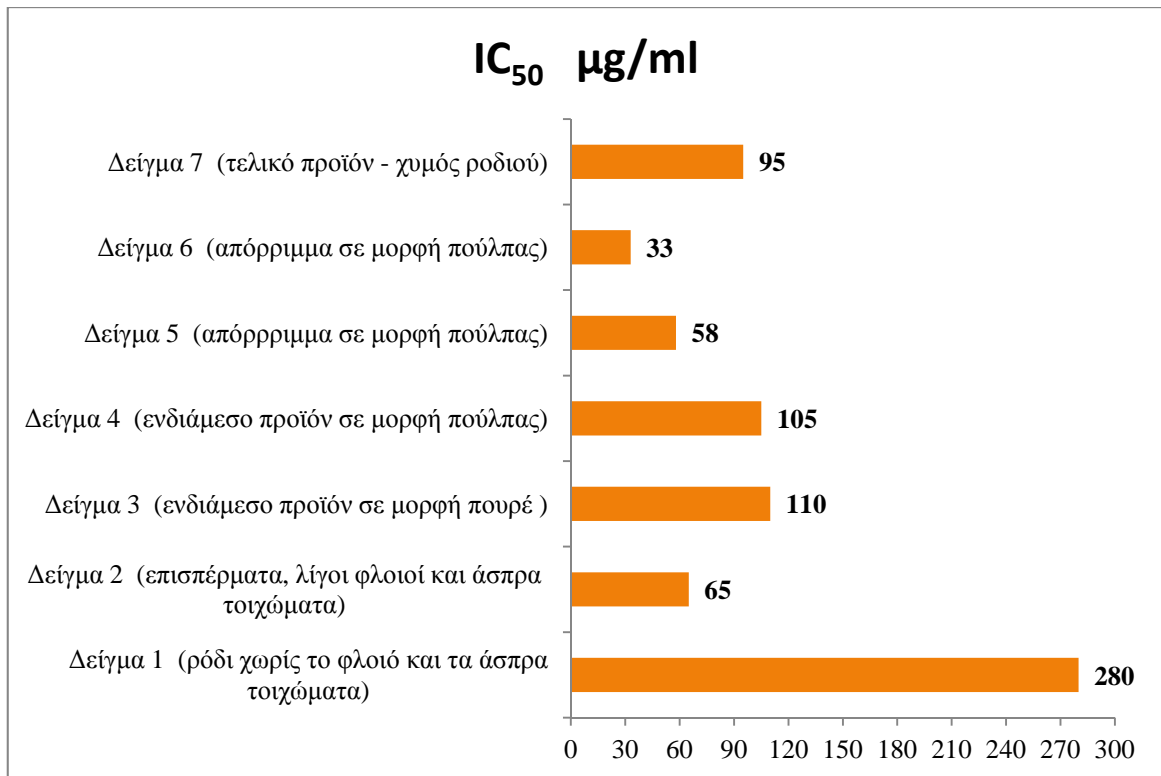


Γράφημα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλισμένο Δείγμα 6 (μια μορφή πούλπας)



Γράφημα 9: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH' από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν)

Στο παρακάτω γράφημα (10) απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ και των 7 λυοφιλιζμένων δειγμάτων σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH• και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 517nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



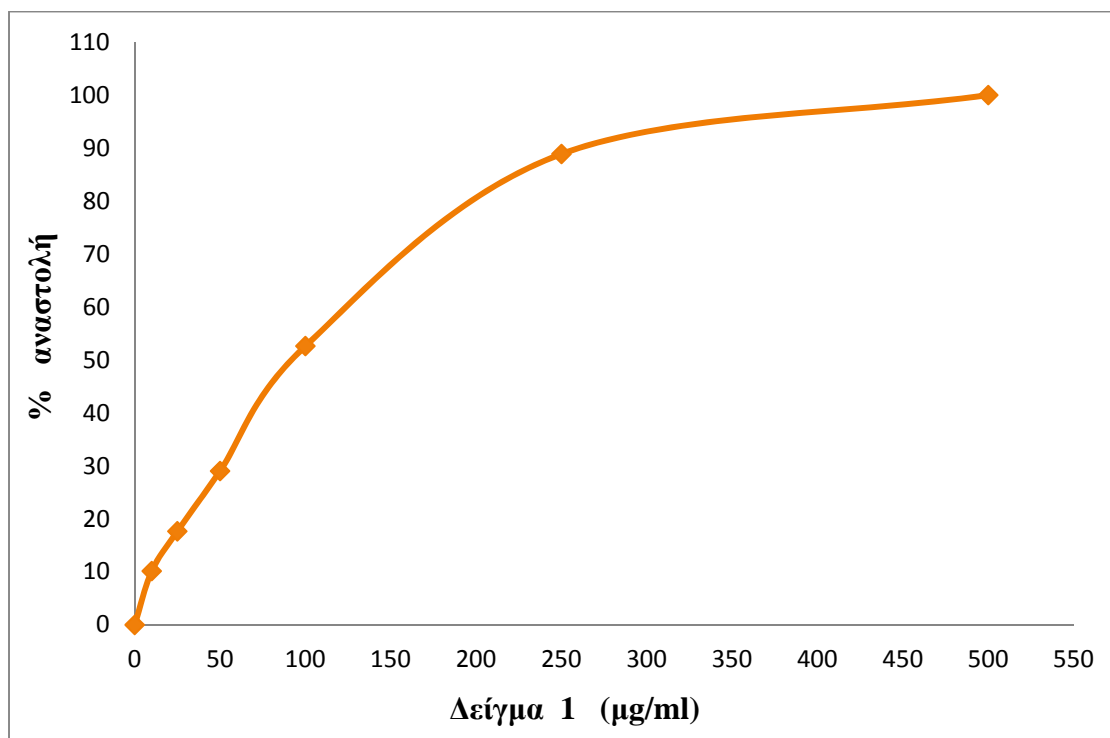
Γράφημα 10: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH' .

7.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λυοφιλισμένων δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

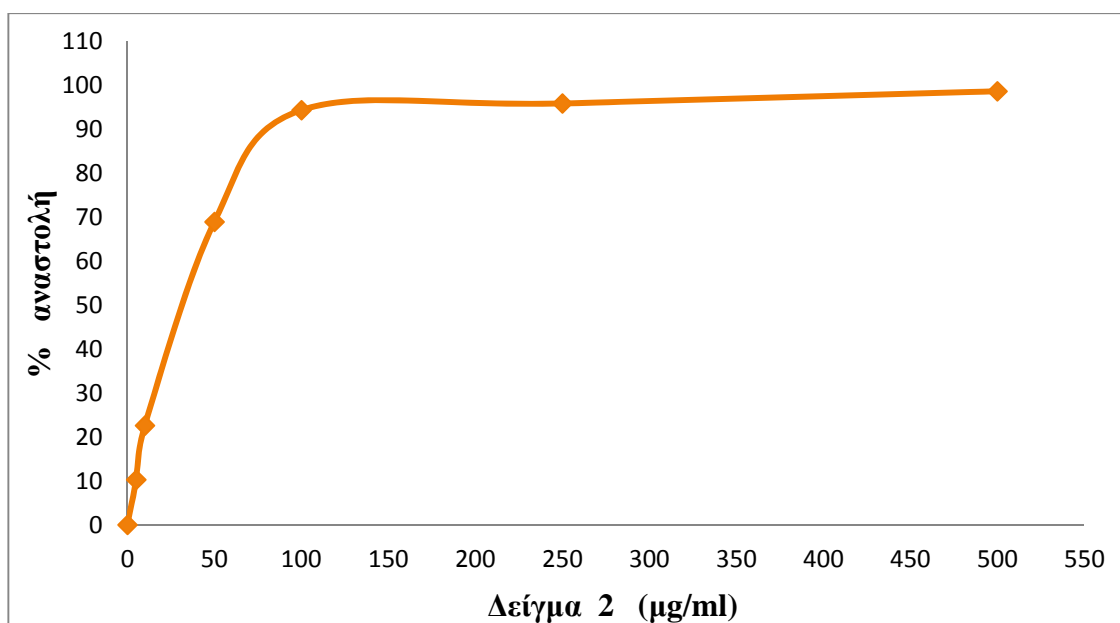
Συνολικά μελετήθηκαν 7 λυοφιλισμένα δείγματα της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 2, 3 και 7 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 25, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml, τα δείγματα 1 και 4 στις συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/ml, το δείγμα 6 στις συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50, 100, 200 και το δείγμα 5 στις συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100, 250 µg/ml.

Όλα τα δείγματα παρουσίασαν σχετικά υψηλή ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 15 µg/ml έως 93 µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το λυοφιλισμένο δείγμα 6 (απόρριμμα σε μορφή πούλπας από το στάδιο της δεύτερης φυγοκέντρησης) (Γράφημα 16) με IC₅₀ ίσο με 15 µg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το λυοφιλισμένο δείγμα 1 (φρούτο - ρόδι χωρίς φλοιό και άσπρα τοιχώματα) (Γράφημα 11) με IC₅₀ ίσο με 93 µg/ml. Παρακάτω,

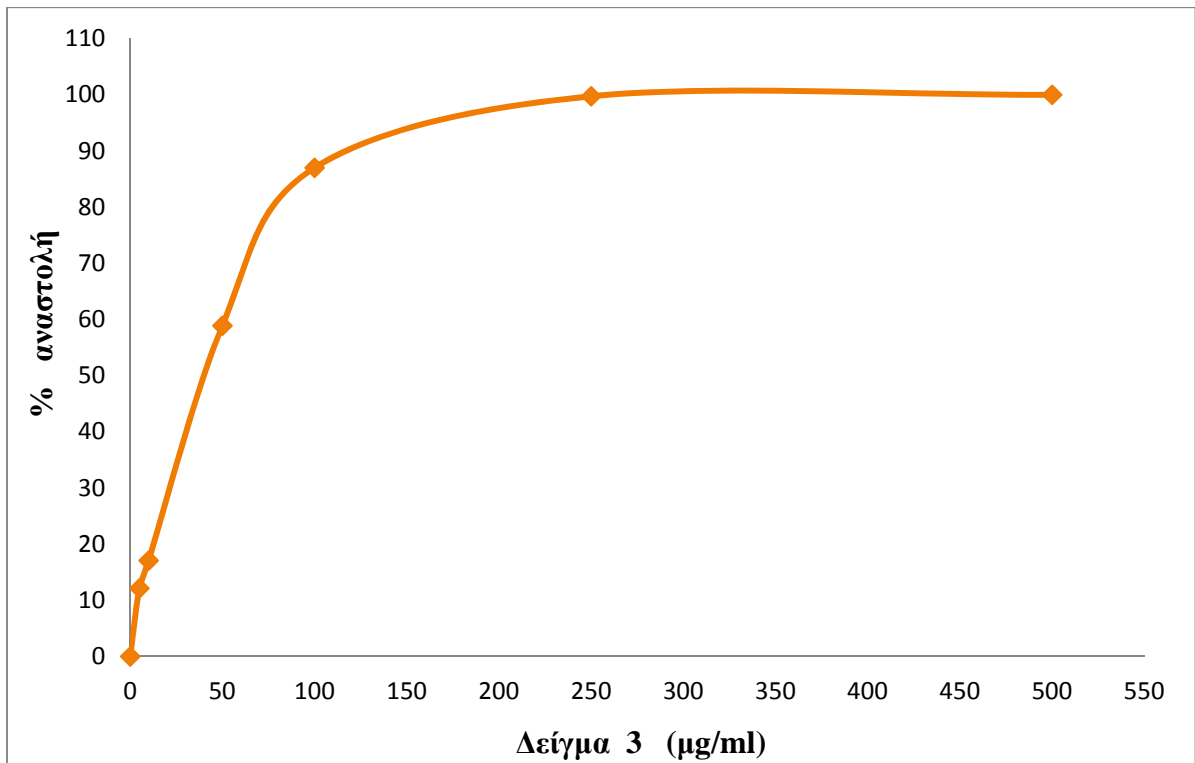
παρατίθενται τα γραφήματα (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από τα εξετασθέντα δείγματα.



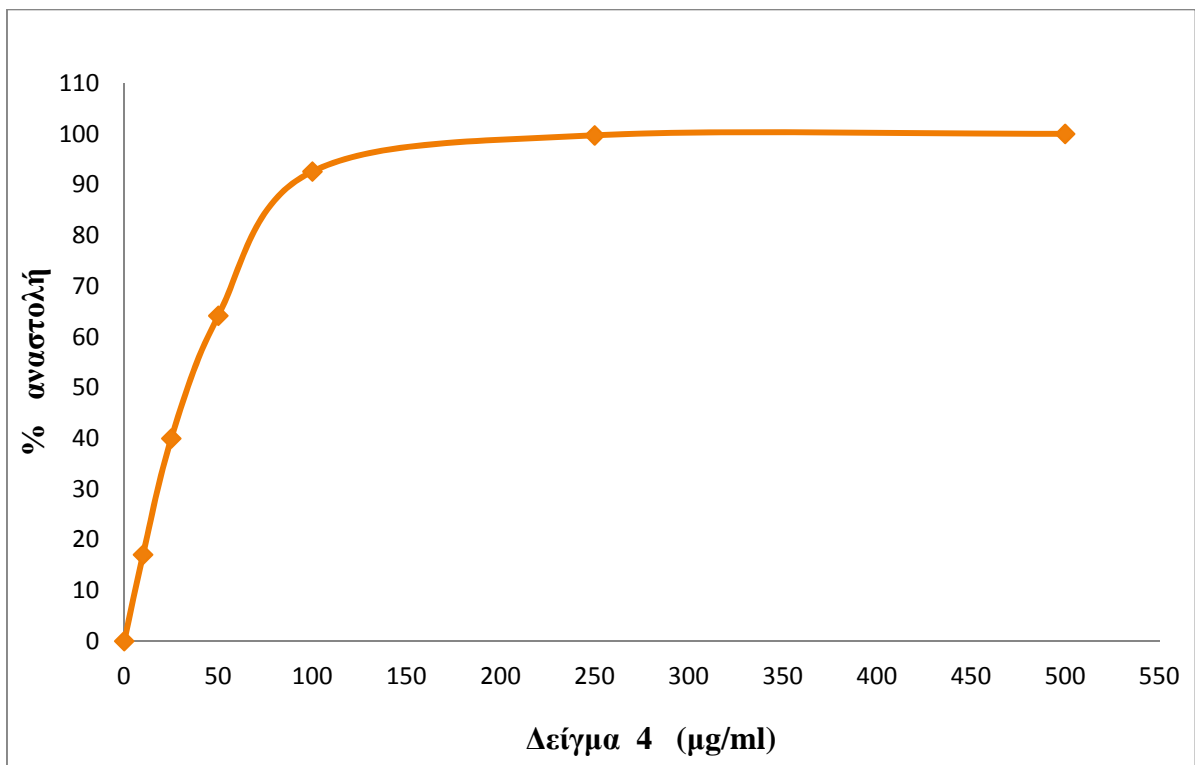
Γράφημα 11: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 1 (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - Βρώσιμο τμήμα).



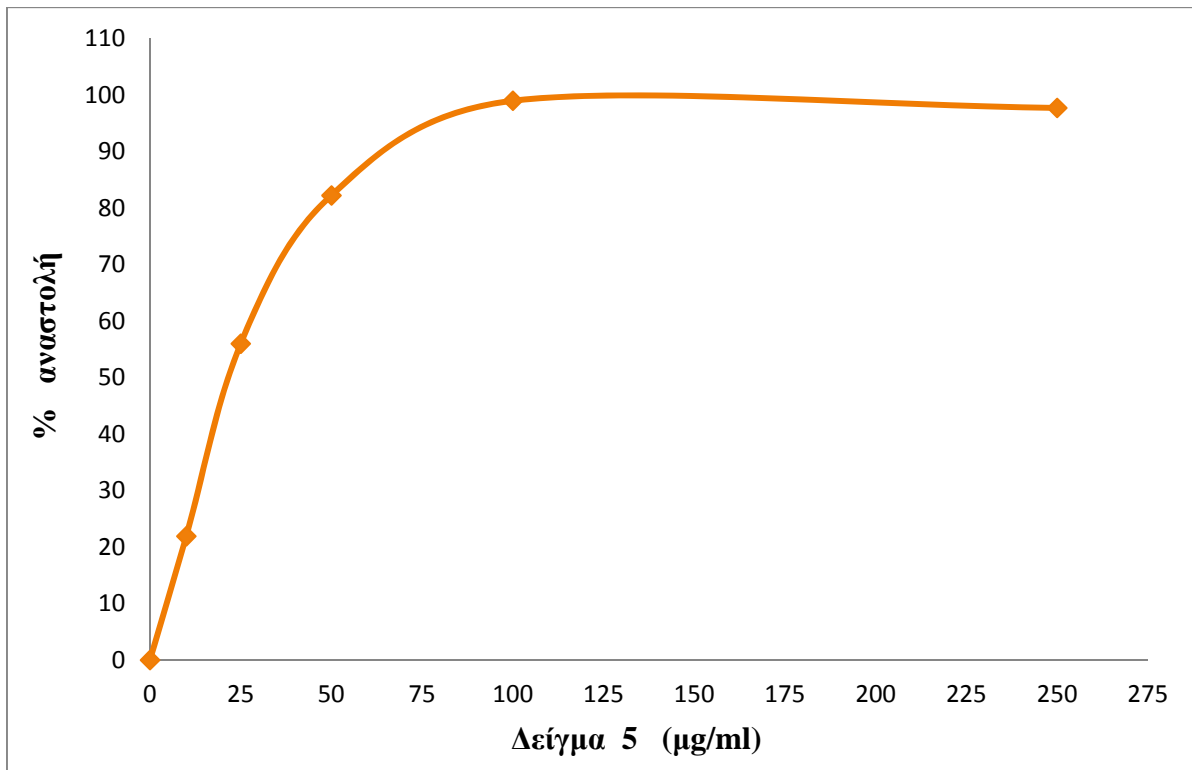
Γράφημα 12: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων).



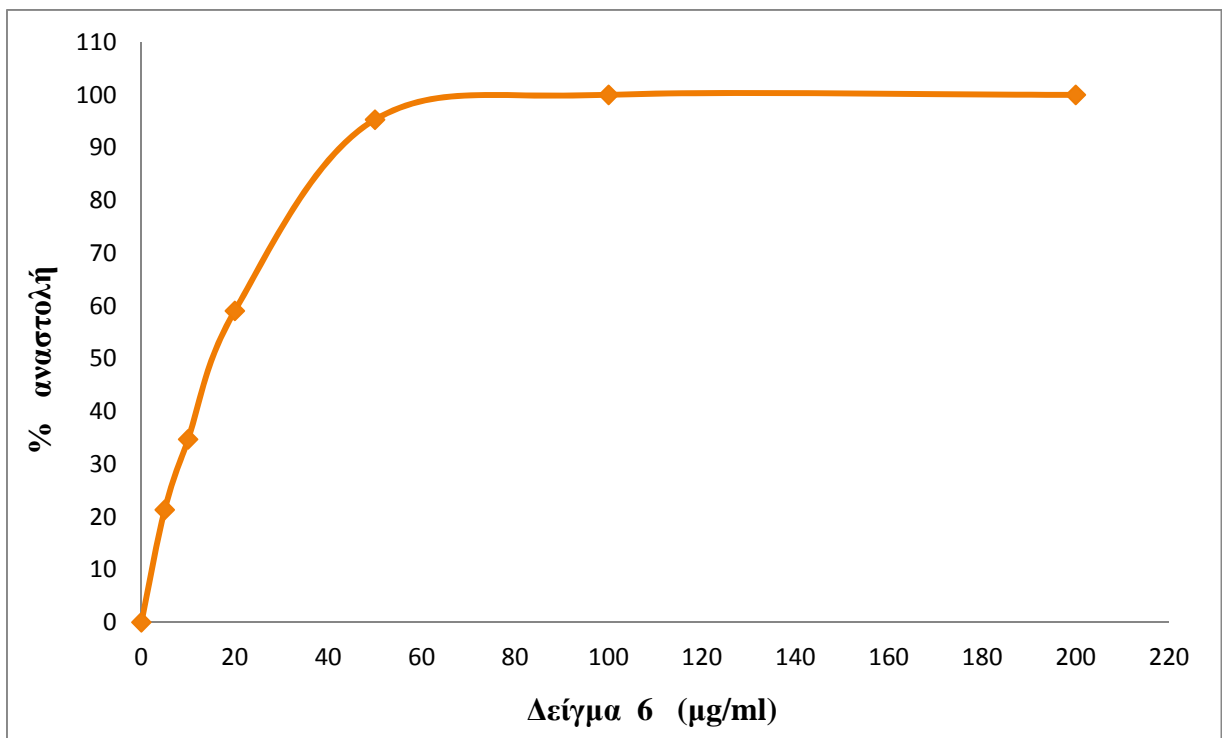
Γράφημα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)



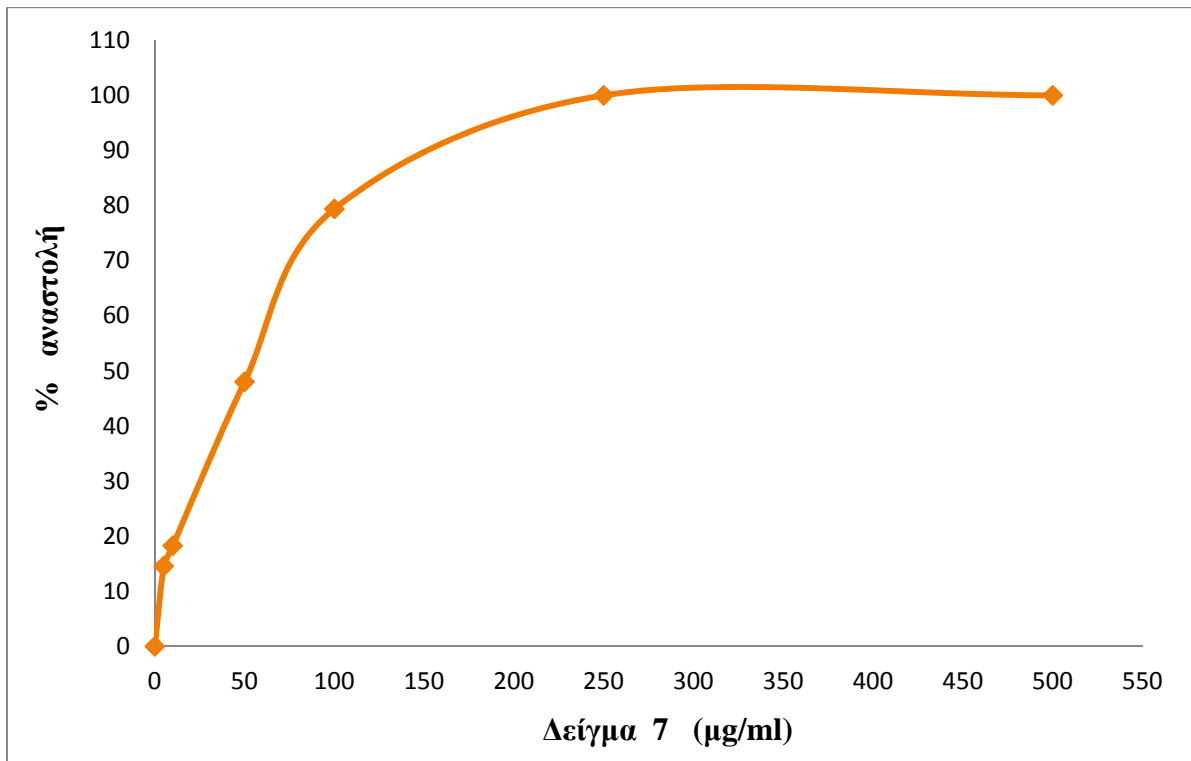
Γράφημα 14: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλιζμένο Δείγμα 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)



Γράφημα 15: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλισμένο Δείγμα 5 (μια μορφή πούλπας)

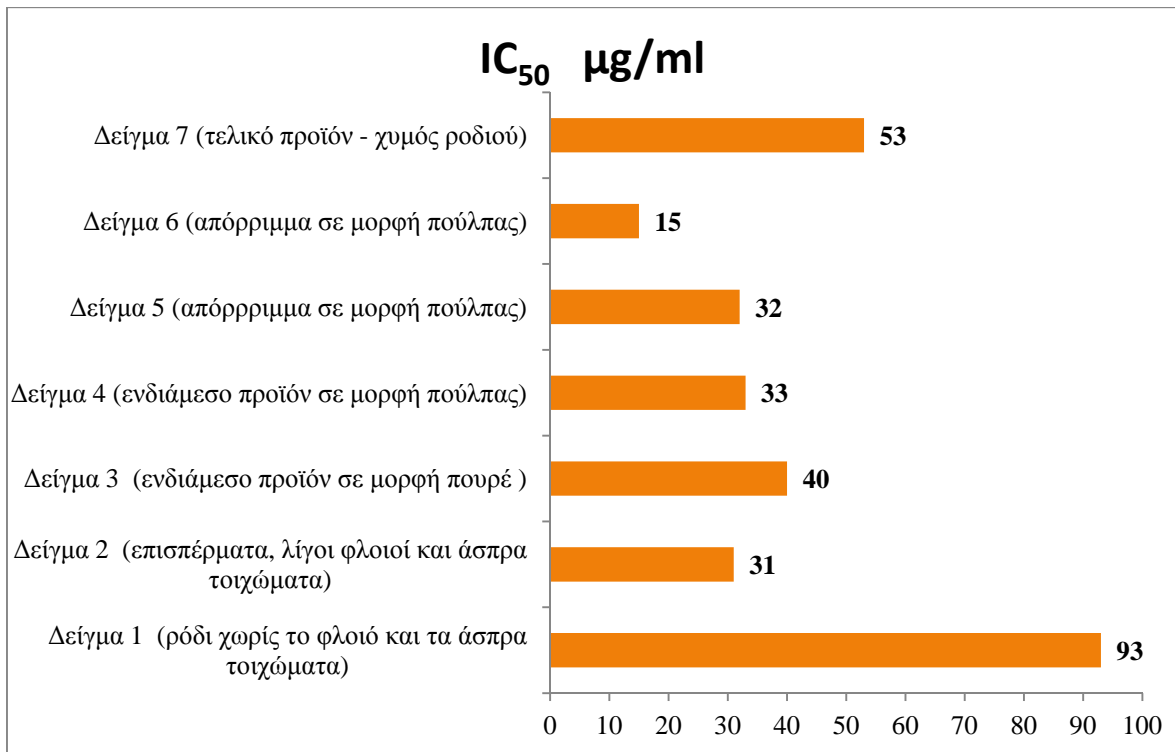


Γράφημα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλισμένο Δείγμα 6 (μια μορφή πούλπας)



Γράφημα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το λυοφιλισμένο Δείγμα 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν)

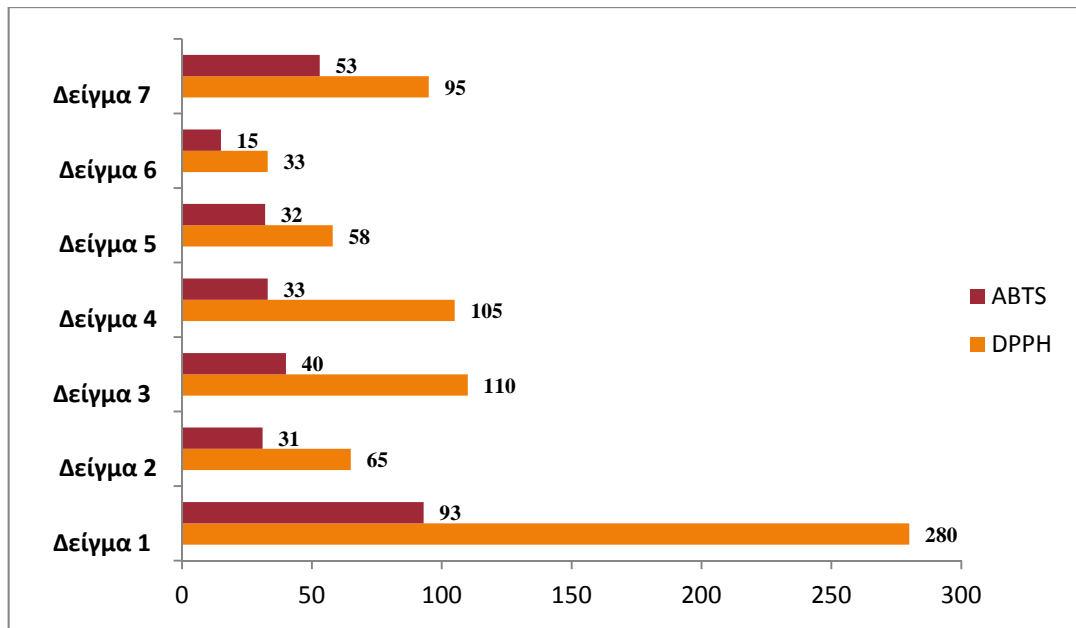
Στο παρακάτω γράφημα (18) απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} και των 7 λυοφιλισμένων δειγμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα ABTS^{•+} και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 730nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



Γράφημα 18: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα ABTS^{•+}.

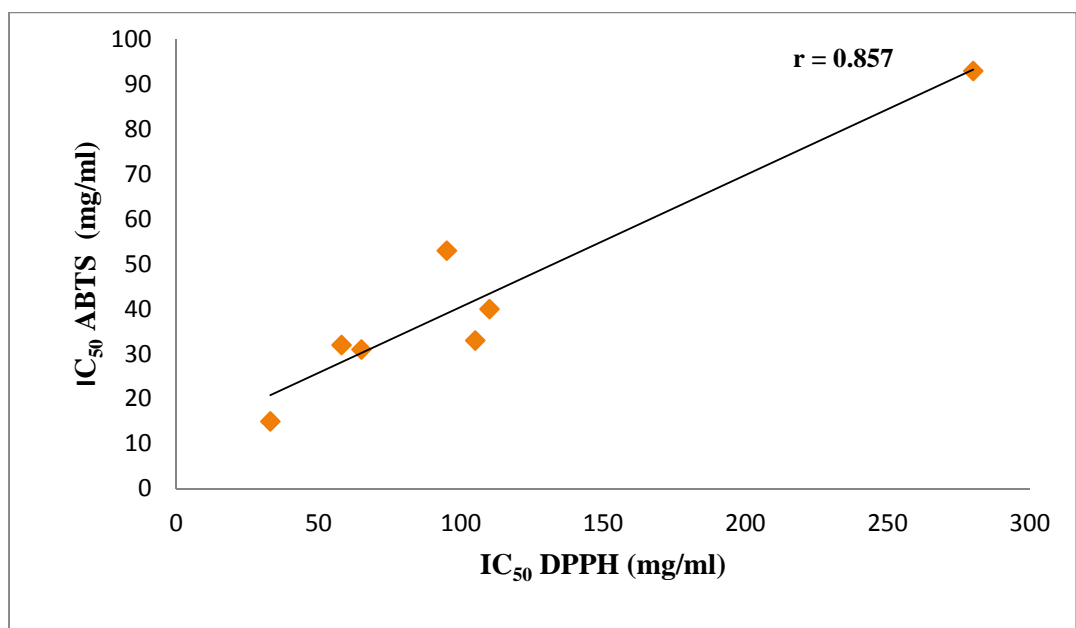
7.3 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το Γράφημα 19 διαπιστώνουμε ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων δειγμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 15 μg/ml έως 280 μg/ml.



Γράφημα 19: Απεικόνιση των τιμών IC_{50} των λυοφιλισμένων δειγμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους (DPPH - ABTS)

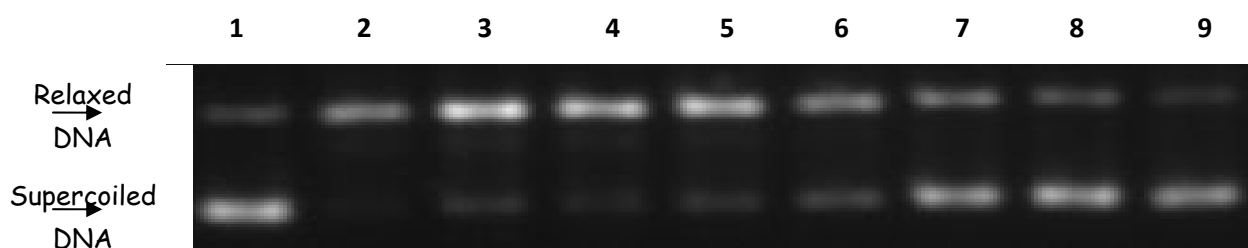
Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν μικρές διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δύο μεθόδων. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC_{50} που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, $r = 0,857$ με $p < 0,05$, παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. (Γράφημα 20).



Γράφημα 20: Συσχέτιση των τιμών IC_{50} των δύο μεθόδων (DPPH - ABTS)

7.4 Αποτελέσματα της επίδρασης των λυοφιλισμένων δειγμάτων στην αναστολή επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[·]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους

Συνολικά μελετήθηκαν 7 λυοφιλισμένα δείγματα της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 1, 2, 3, 4 και 6 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 5 στις συγκεντρώσεις 4, 8, 16, 32, 64, 128, $\mu\text{g/ml}$, και το 7 στις συγκεντρώσεις 16, 32, 64, 128, 192, 256, 312 $\mu\text{g/ml}$. (Γραφήματα 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27). Τα δείγματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[·]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO[·]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική - αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 12,5 $\mu\text{g/ml}$ έως 112 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα 3 (ενδιάμεσο προϊόν 2^{ου} σταδίου σε μορφή πουρέ) (Γράφημα 23) με IC_{50} ίσο με 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 7 (τελικό προϊόν - χυμός ροδιού) (Γράφημα 27) με IC_{50} ίσο με 112 $\mu\text{g/ml}$. Στην εικόνα 27 δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης.



Εικόνα 27: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 4 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 8 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

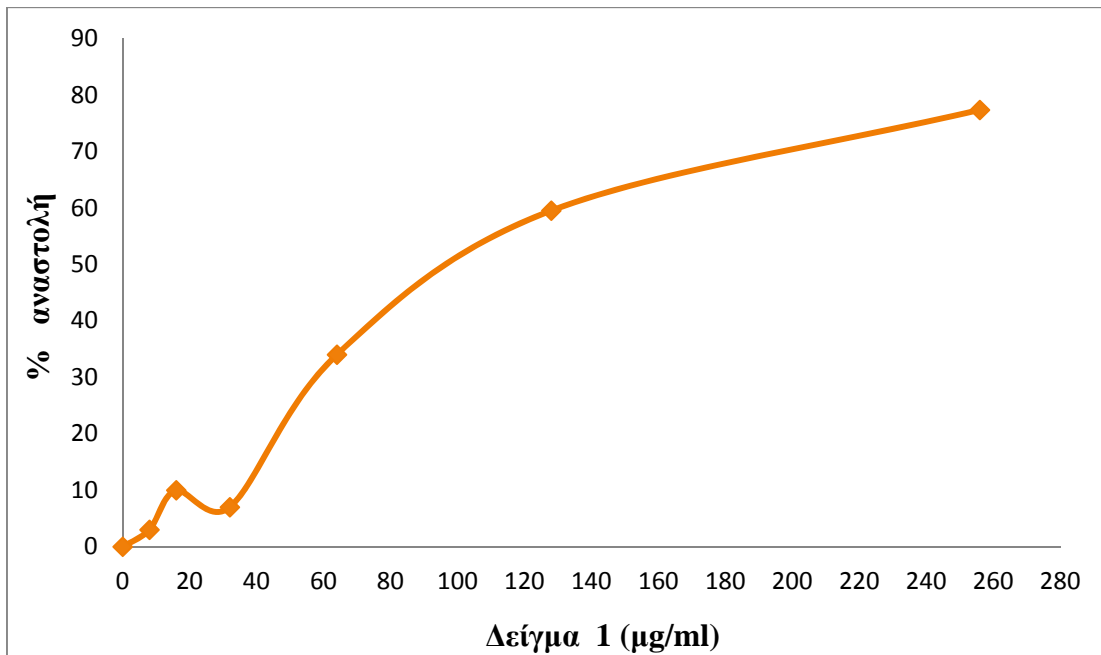
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 16 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 32 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

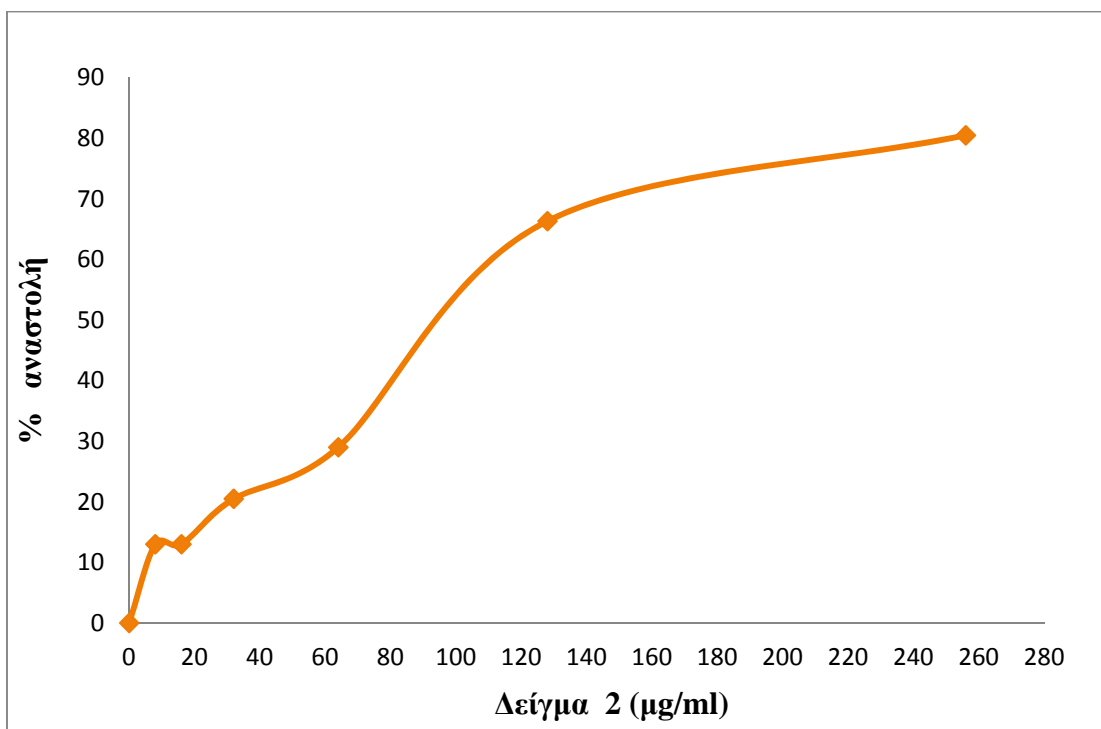
Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 64 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 128 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5

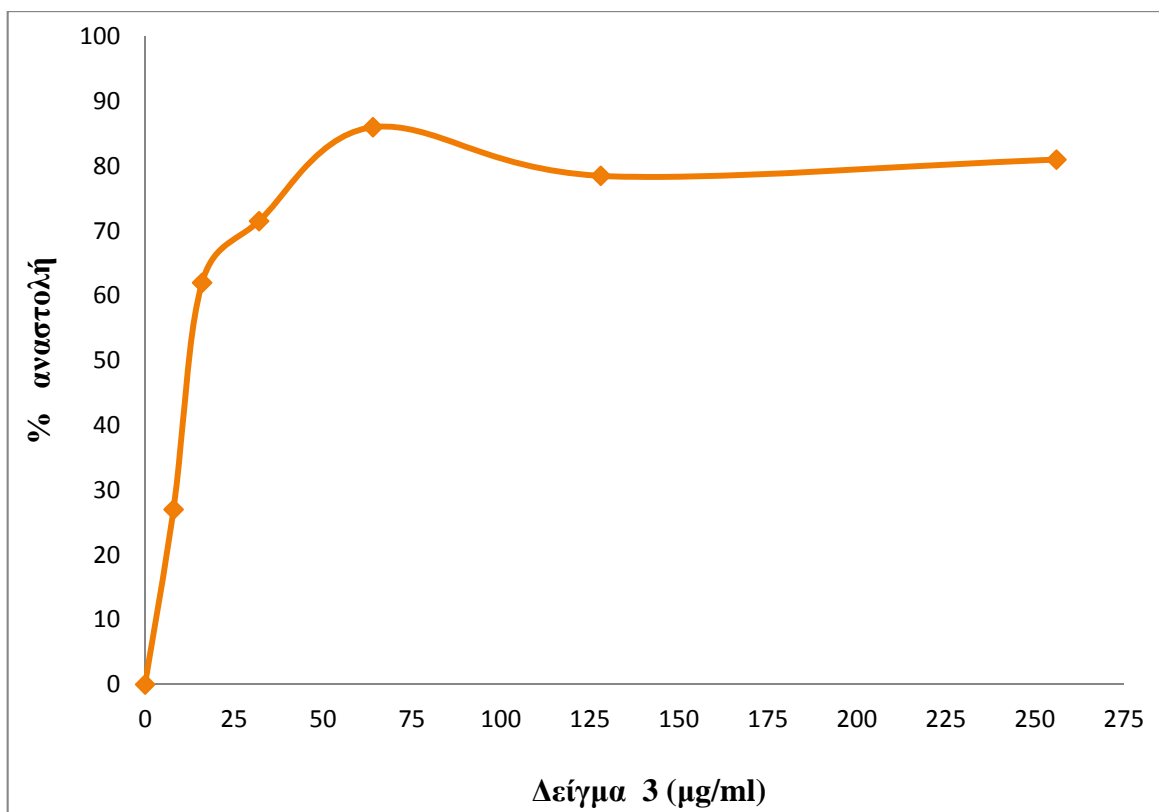
Σειρά 9: DNA plasmid + 128 $\mu\text{g/ml}$ λυοφιλισμένου δείγματος 5



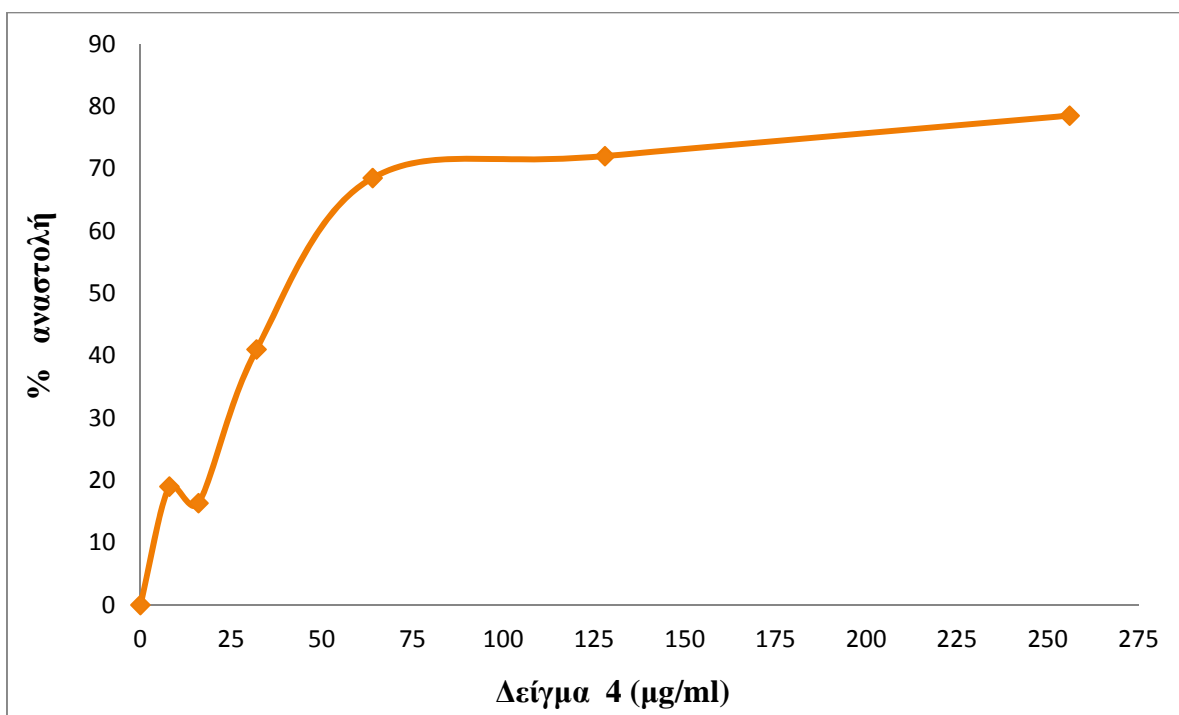
Γράφημα 21: Επίδραση του Δείγματος 1 (ρόδι χωρίς το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα - βρώσιμο τμήμα) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO' , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO'



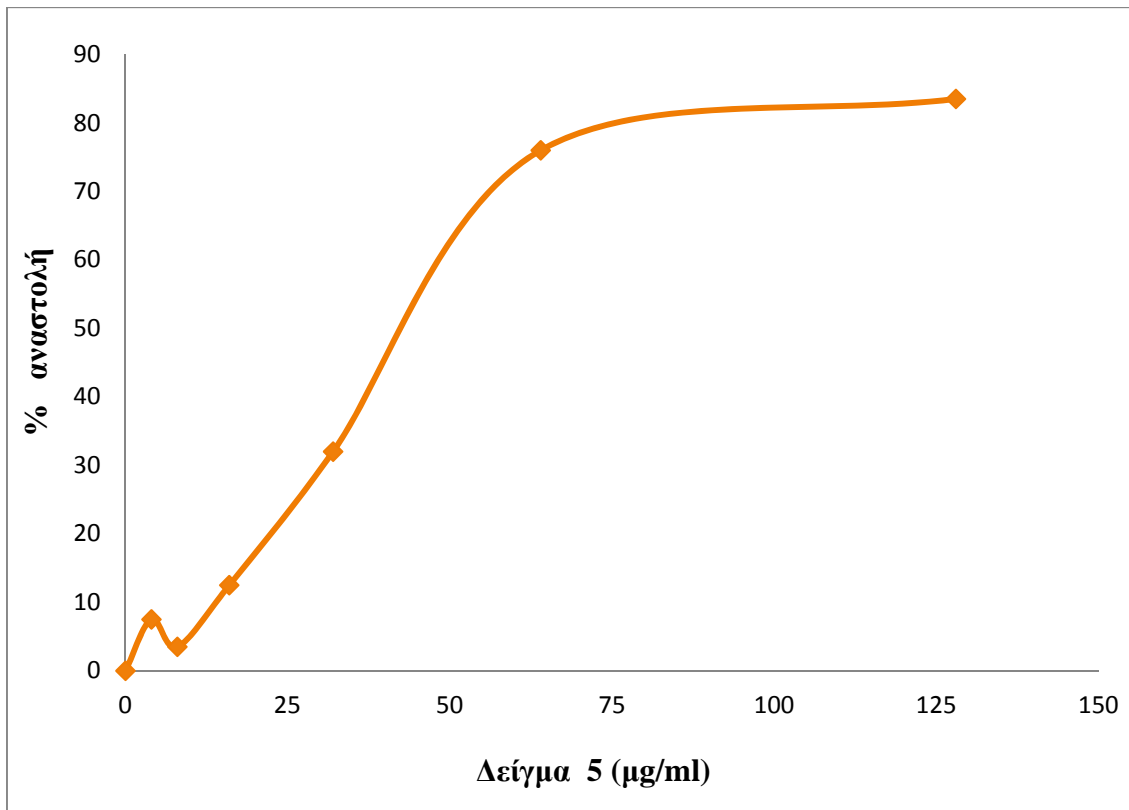
Γράφημα 22: Επίδραση του Δείγματος 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων) στις , από ρίζες ROO' , ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO'



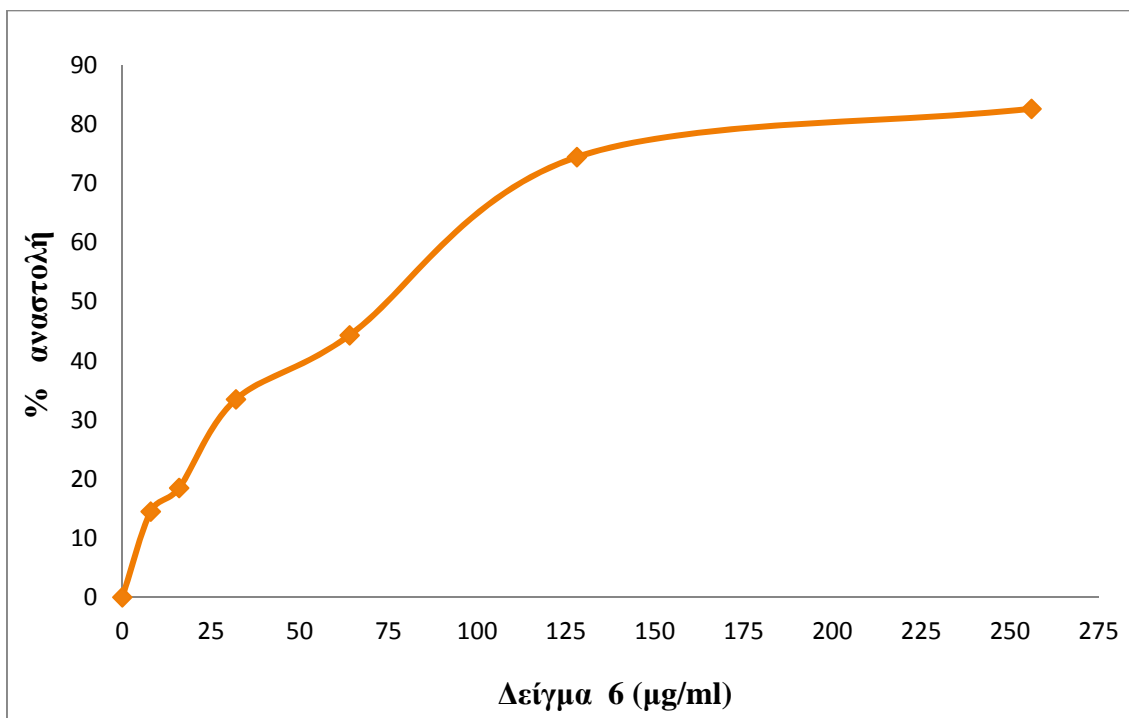
Γράφημα 23: Επίδραση του Δείγματος 3 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO⁺, ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺



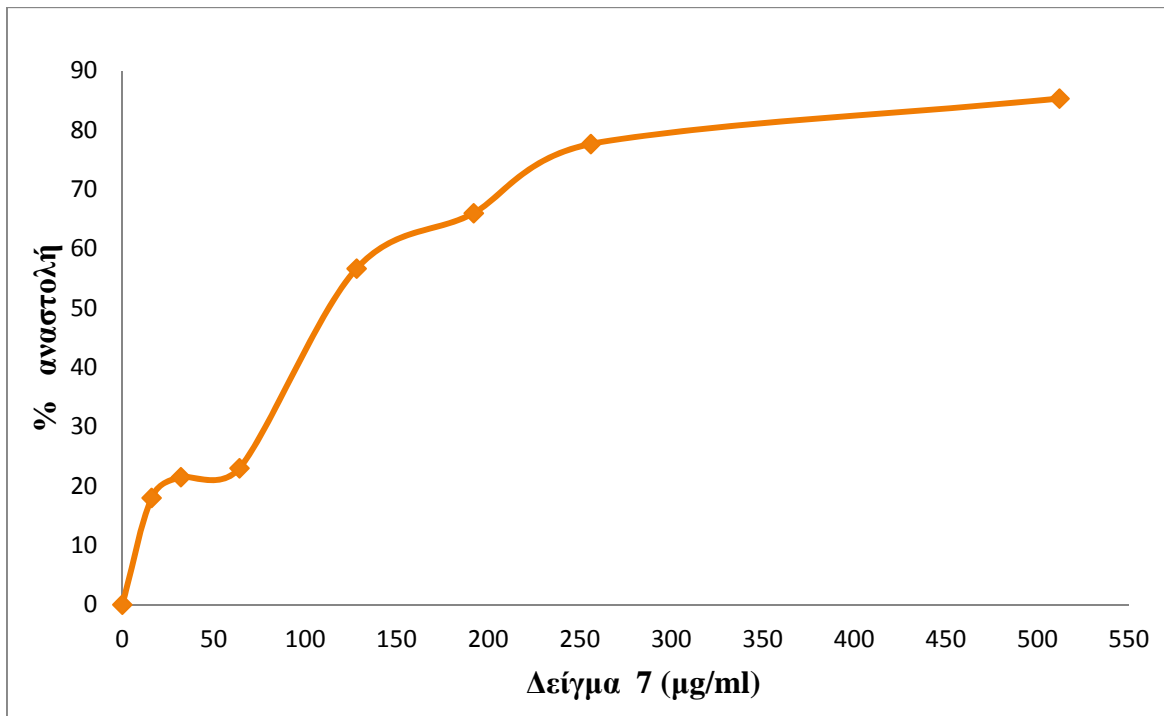
Γράφημα 24: Επίδραση του Δείγματος 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO⁺, ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺



Γράφημα 25: Επίδραση του Δείγματος 5 (μια μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO⁺, ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺

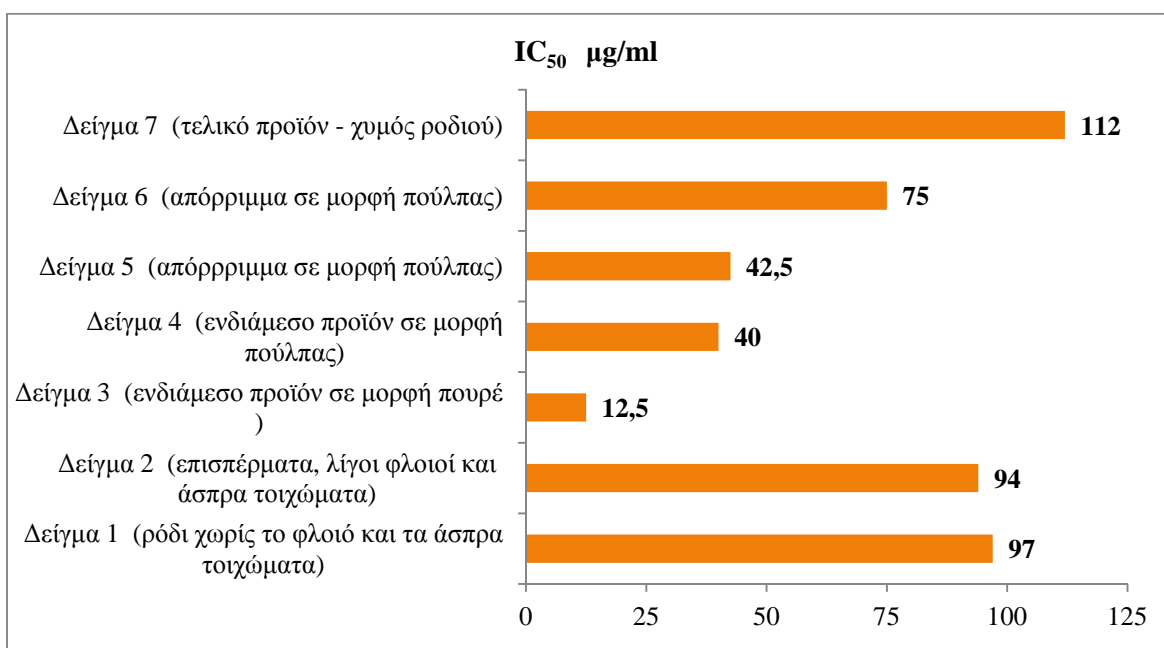


Γράφημα 26: Επίδραση του Δείγματος 6 (μια μορφή πούλπας) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO⁺, ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺



Γράφημα 27: Επίδραση του Δείγματος 7 (χυμός ροδιού - τελικό προϊόν) στις επαγόμενες, από ρίζες ROO⁺, ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺

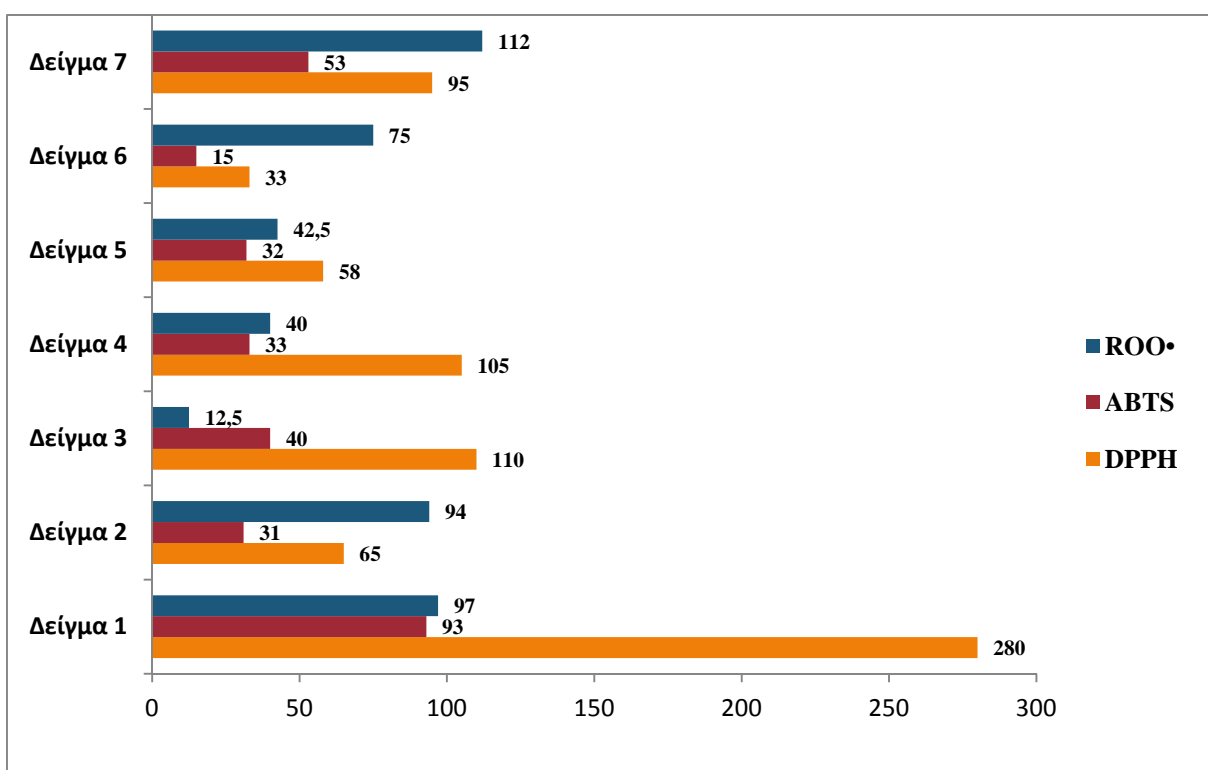
Στο Γράφημα (28) απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ και των 7 λυοφιλισμένων δειγμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους ρίζες ROO⁺ και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιόνου ικανότητας τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.



Γράφημα 28: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των λυοφιλισμένων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων, από ρίζες ROO⁺, ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA.

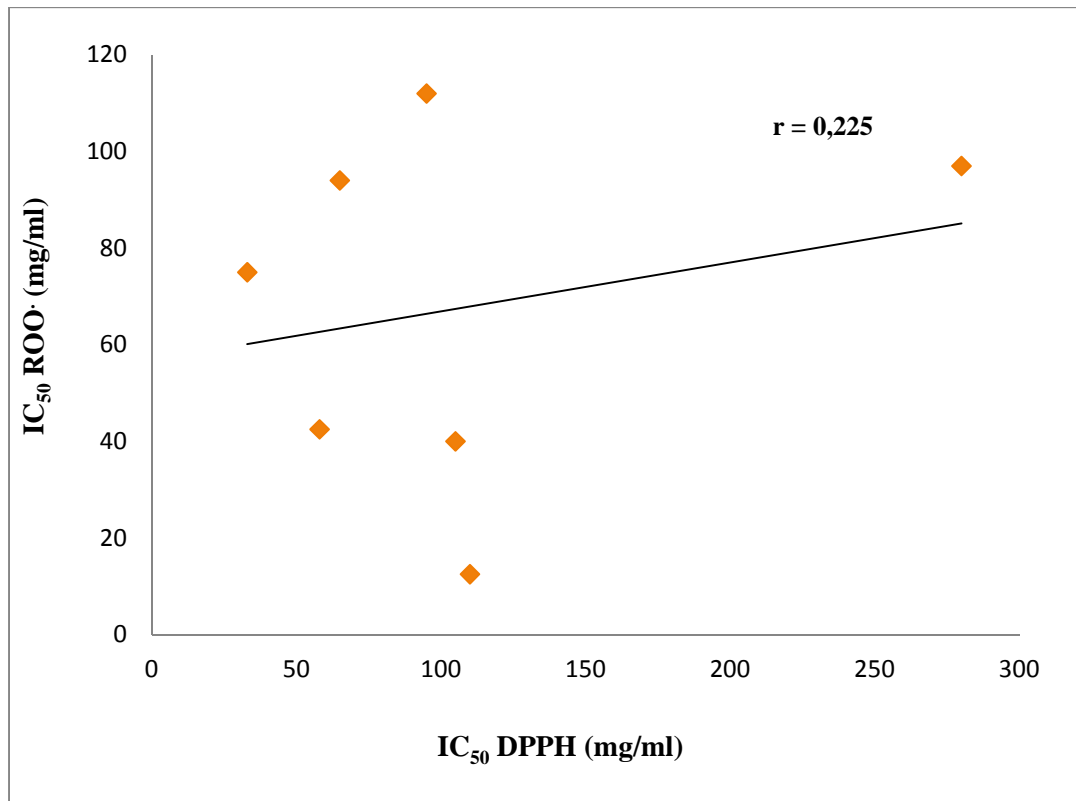
7.5 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το γράφημα 29 διαπιστώνουμε, ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων δειγμάτων και με τις τρεις ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 12,5 $\mu\text{g/ml}$ έως 280 $\mu\text{g/ml}$.

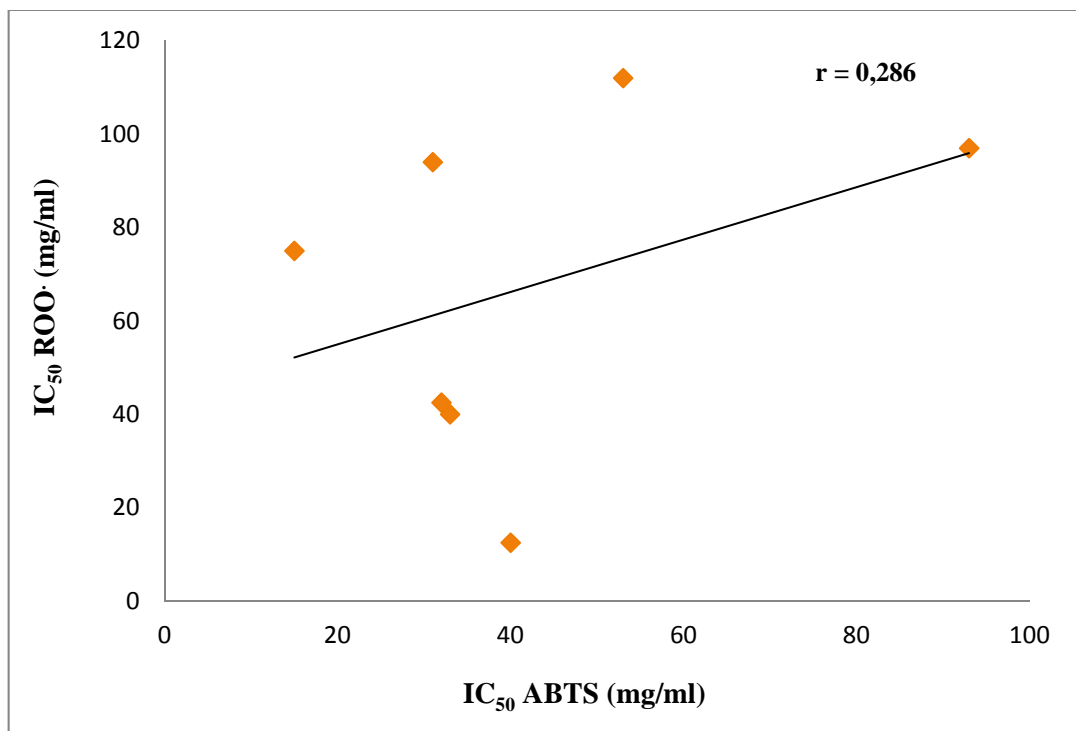


Γράφημα 29: Απεικόνιση των τιμών IC_{50} των δειγμάτων που εξετάστηκαν και με τις τρεις μεθόδους

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των τριών μεθόδων (Γράφημα 29). Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC_{50} που προέκυψαν για τη μέθοδο DPPH και $ROO\cdot$ ($r= 0,225$ με $p<0,01$) και για τη μέθοδο ABTS και $ROO\cdot$ ($r= 0,286$ με $p<0,01$) παρατηρείται ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση. (Γραφήματα 30, 31).



Γράφημα 30 : Συσχέτιση των τιμών IC_{50} των μεθόδων DPPH - ROO•



Γράφημα 31: Συσχέτιση των τιμών IC_{50} των μεθόδων ABTS - ROO•

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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 AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων, τους προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefler & Milner 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στα φυτά της οικογένειας Lamiaceae (Fecka & Turek, 2008) και κυρίως στο δενδρόλιβανο, το φασκόμηλο (Erkan et al, 2008), τη ρίγανη, τη μέντα και το θυμάρι (Zandi & Ahmadi, 2000) διότι τα συστατικά των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια αυτή παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση (Craig, 1999).

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 (Stagos D et al., 2012). Ειδικότερα, μελετηθήκαν πολλά είδη αρωματικών φυτών που πιστεύεται ότι παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες όπως εκχυλίσματα ενδημικά, ποικιλίες φασκόμηλου, μέντας, τσαγιού και ροδιού.

Στα ίδια πλαίσια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων από ελληνικές ποικιλίες του *Vitis Vinifera* (άμπελος) καθώς και εκχυλισμάτων από γίγαρτα και στέμφυλα ως συγκριτικά δεδομένα (Stagos D et al., 2007; Spanou C et al. 2007). Τα σταφύλια έχουν κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου τους. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι η αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Οι μελέτες έδειξαν ότι και οι βόστρυχοι του φυτού είναι πλούσιοι σε πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ακόμη στα πλαίσια αναζήτησης νέων

χημειοπροστατευτικών παραγόντων δοκιμάστηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από φυτά ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Τα ψυχανθή και ιδιαίτερα οι καρποί τους, τα όσπρια, που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές παθήσεις και διαβήτη. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα των οσπρίων σε πρωτεΐνες, μια πληθώρα βιοδραστικών πολυφαινολικών ενώσεων έχει αναγνωρισθεί σε αυτά. Οι ενώσεις αυτές είναι πιθανώς υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες των ψυχανθών. Το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις ποικιλίες των ψυχανθών καθώς και μεγάλη ποικιλομορφία στη σύστασή τους σε φυτοχημικές ενώσεις, καθιστά σημαντική τη διεξαγωγή ερευνών πάνω στις βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα ψυχανθή καθώς και τις βιολογικές τους ιδιότητες (Sranou CI et al., 2012; Sranou CI et al., 2008;).

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

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε λυοφιλισμένα δείγματα των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων

βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού. Για τη μελέτη των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των δειγμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι η ρίζα ROO[•]. Άλλωστε, όπως αναφέρθηκε, η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Σε όλες τις μεθόδους προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση - εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των λυοφιλισμένων δειγμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

Με βάση τις τιμές των IC₅₀ του Γραφήματος 10 το σύνολο των 7 λυοφιλισμένων δειγμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν καλή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•]. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 33 μg/ml έως 280 μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα 6 που αφορούσε το απόρριμμα (μορφή πούλπας) του τέταρτου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα τη φυγοκέντρηση ενδιάμεσου προϊόντος (πούλπα με λιγότερα στερεά) με IC₅₀ 33 μg/ml. Μετά το δείγμα 6 ισχυρότερη δράση παρουσίασαν τα δείγματα 5 (απόρριμμα 3ου σταδίου - μορφή πούλπας) και 2 [ενδιάμεσο προϊόν 1ου σταδίου, αποφλοιώση - επισπέρματα (Arils) και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων] με αντίστοιχα IC₅₀ 58 και 65 μg/ml. Οι τιμές IC₅₀ των υπολοίπων δειγμάτων κυμάνθηκαν από 95 έως 110 μg/ml με εξαίρεση την τιμή 280 μg/ml του δείγματος 1 που αφορούσε το φρούτο χωρίς όμως το φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα (μόνο το βρώσιμο μέρος του ροδιού). Συγκρίνοντας την τιμή του IC₅₀ του βρώσιμου μέρους του ροδιού (280 μg/ml) και την τιμή του τελικού προϊόντος της παραγωγικής διαδικασίας, του χυμού ροδιού (95 μg/ml), μπορούμε να συμπεράνουμε την αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του χυμού και το γεγονός της διατήρησης και ' 'συμπύκνωσης' ' αυτής σε σχέση με το βρώσιμο μέρος του φρούτου.

Η εξέταση των λυοφιλισμένων δειγμάτων με τη ρίζα ABTS^{•+} με βάση το γράφημα 18 έδειξε, όπως και η μέθοδος της ρίζας του DPPH[•], ικανότητα εξουδετέρωσής της. Έτσι, αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 15 μg/ml έως 93 μg/ml. Στην περίπτωση αυτής της μεθόδου το εύρος των τιμών IC₅₀ ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μέθοδο του DPPH[•] (33-280μg/ml). Το πιο ισχυρό

ήταν επίσης, όπως και στο DPPH[•], το δείγμα 6, που αφορούσε το απόρριμμα (μορφή πούλπας) του τέταρτου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα τη φυγοκέντρηση ενδιάμεσου προϊόντος, με IC₅₀ 15 µg/ml. Επίσης, ομοίως με τη μέθοδο της ρίζας του DPPH[•] μετά το δείγμα 6 ισχυρότερη δράση παρουσιάζουν τα δείγματα 2 [ενδιάμεσο προϊόν 1ου σταδίου, αποφλοιώση - επισπέρματα (Arils) και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων] και 5 (απόρριμμα 3ου σταδίου - μορφή πούλπας) με αντίστοιχα IC₅₀ 31 και 32 µg/ml.

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίζουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των λυοφιλισμένων δειγμάτων λόγω της αυτονόητης δυσκολίας διαχωρισμού και μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά αλλά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των λυοφιλισμένων δειγμάτων είναι παρόμοια ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση (Γράφημα 20, $r=0,857$ με $p<0,05$) γεγονός που δείχνει ότι οι ενώσεις που εξουδετερώνουν τη ρίζα του DPPH είναι παρόμοιες με εκείνες που εξουδετερώνουν τη ρίζα του ABTS.

Εκτός από τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}, τα λυοφιλισμένα δείγματα ελέγχθηκαν για πιθανή προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τη ρίζα ROO[•], με τη χρήση της τρίτης μεθόδου και την επίδραση ριζών ROO[•] στο πλασμιδιακό DNA. Σύμφωνα με τις τιμές IC₅₀ του Γραφήματος 28 όλα τα δείγματα επέδειξαν αρκετά ισχυρή δόσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη, από ρίζες ROO[•], βλάβη στο DNA με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 12,5 µg/ml έως 112 µg/ml. Το πιο ισχυρό από τα λυοφιλισμένα δείγματα ήταν το δείγμα 3 που αφορούσε το ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ του δεύτερου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα την εκχύμωση, με IC₅₀ 12,5 µg/ml. Ακολουθούν τα δείγματα 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά - προϊόν 3ου σταδίου - φυγοκέντρηση) και 5 (απόρριμμα 3^{ου} σταδίου σε μορφή πούλπας) με αντίστοιχα IC₅₀ 40 και 42,5 µg/ml.

Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν για τη μέθοδο DPPH και ROO[•] (Γράφημα 30, $r=0,225$ με $p<0,01$) και για τη μέθοδο ABTS και ROO[•] (Γράφημα 31, $r=0,286$ με $p<0,01$) παρατηρείται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση και στις δύο περιπτώσεις. Αυτό

σημαίνει ότι οι ουσίες, που δρώντας ως αντιοξειδωτικά ευθύνονται για την εξουδετέρωση των ριζών DPPH[·] και ABTS^{·+}, είναι διαφορετικές από αυτές, που έχοντας αντιμεταλλαξιγόνο δράση, εξουδετερώνουν τις ρίζες ROO[·] προστατεύοντας το DNA.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα λυοφιλισμένα δείγματα από τα στάδια βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού παρουσιάζουν σχετικά καλή αντιοξειδωτική δράση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση παρουσιάζει το τελικό προϊόν της παραγωγής, ο χυμός ροδιού, παρόμοια αν όχι ισχυρότερη από τη δράση που παρουσιάζει το βρώσιμο μέρος του φρούτου. Αυτό σημαίνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του, ωφέλιμου για την υγεία, βιοδραστικού περιεχόμενου του φρέσκου φρούτου (ροδιού) διατηρείται στο βιομηχανικά παραγόμενο χυμό.

Παρατηρώντας τα IC₅₀ και των τριών μεθόδων των δειγμάτων 5 και 6 από το Γράφημα 29, που αποτελούν απορρίμματα των 2 τελευταίων σταδίων της παραγωγικής διαδικασίας διαπιστώνεται η έντονη αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους. Τα απορρίμματα από τις φυγοκεντρήσεις σε μορφή πούλπας παρουσιάζουν ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Κατά συνέπεια, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι επιτακτική η αξιοποίηση των παραπροϊόντων στην κατεύθυνση της ανάκτησης αντιοξειδωτικών μορίων που περιέχουν και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Τα μόρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την περεταίρω ενίσχυση του τελικού προϊόντος (χυμός ροδιού) αλλά και άλλων χυμών φρούτων που ενδεχομένως μια βιομηχανία χυμοποίησης παράγει. Επίσης, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοφανών βιολειτουργικών προϊόντων όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abelson J. 2006: Pomegranate sows seeds of popularity. *The Boston Globe*. 12-10.
- Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. 2005. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 113:423-33.
- Alarcon De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study *Pharmacology*. 1994 48:56-62.
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. 2000. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatog A* 896:87-93.
- Aslam MN, Lansky EP, Varani J. 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 103:311-8.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clinl Nutr* 71:1062-76.
- Baruchel S, Wainberg MA, "The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus": *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 111-114: 1992
- Blumenfeld A., Shaya F. and Hillel R. Cultivation of pomegranate. In Melgarejo- Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.). 2000: Production, processing and marketing of

pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ.

- Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. *Inc* 1997; 1-25.
- 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
- Cam M, Hisil Y, Durmaz G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 112:721-6.
- Celik I, Temur A, Isik I. 2009. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chem Toxicol* 47(1):145-9.
- Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001 Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.
- 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.
- Cotelle N., Role of Flavonoids in Oxidative Stress, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001, 1, 569-590.
- Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provos JC, Liker H, Aviram M. 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame J Cardiol* 104(7):936-42
- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Progress in Clinical and Biological Research.* 1986 213:481-489.

- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 1999 65:337-353.
- Di Silvestro RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. 2009. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phytother Res* 23:1123-7.
- Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules* 14:1808-17.
- Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. *Br J Biomed Sci*. 1994 51:358-370.
- Evans PH, "Free radicals in brain metabolism and pathology", *British Medical Bulletin*, 49: 577-587, 1993.
- Fadavi A, Barzegar M, Azizi HM. 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *J Food Comp Anal* 19:676-80.
- Fadavi A, Barzegar M, Azizi MH, Bayat M. 2005: Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci Technol Int* 11:113-9.
- Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111
- Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000: Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581-9.
- Haidari M, Ali M, Casscells SW, Madjid M. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza

virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed*.

- Halliwell B, "Free Radicals and other reactive species in Disease", National University of Singapore, 2001.
- Hamad AW, Al-Momene W. 2009. Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnol* 25(1):286.
- Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D (1996). Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 5, 673-677.
- 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.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn C, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Int Med* 155, 381-386.
- Hong MY, Seeram NP, Heber D. 2008: Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells over-expressing the androgen receptor. *J Nut Biochem* 19:848-55.
- Jaiswal V, DerMarderosian A, Porter JR. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem* 118:11-6.
- Kaefer CM, Milner JA, "The role of herbs and spices in cancer prevention", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6): 347-361, 2008.
- Kaur C, Kapoor HC, "Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables", *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153-161, 2002

- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002 76: 560-568.
- Koyama S, Cobb L, Mehta H, Seeram N, Heber D, Pantuck A, Cohen P, "Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis Growth Hormone & IGF", *Research*, 20(1) : 55-62, 2010.
- Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. 2005b: Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™. *Invest New Drugs* 23:121-2
- Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. 2005a. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs* 23:11-20.

Lansky EP, Newman RA. 2007: *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177-206.

- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuño M, Toti S, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espina JC. 2010: Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nut Biochem* 21(8):717-25.
- Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. 2010: Anti inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118:315-22.

- Lionakis S.M. 9-10 Nov 1994: Present Status and Future Prospects of the Cultivation in Greece of the Plants Fig, Japanese Persimmon, Pomegranate and Barbary Fig in : Cultures Fruitières Sous-Utilisées dans la Région Méditerranéenne. First meeting of the CIHEAM Cooperative Working Group on Underutilized Fruit Crops in the Mediterranean Region, Zaragoza (Spain).
- Longtin R. 2003: The pomegranate: nature's power fruit. *J Natl Cancer Inst* 95:346-8
- Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. 2005: Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 102(41):14813-8.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727- 47.
- Mazur W.M., Duke J.A., Wahala K., Rasku S., Adlercreutz H., (1998), Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans, *Nutritional Biochemistry*, 9:193-200
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. 1993 A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-12
- Molyneux P, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219, 2004.
- Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem* 115:1274-8.
- Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295

- Pignatelli B, Friesen M, Walker EA (1980). The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation, in: E.A.Walker, I.Griciute, M. Castegnaro, M. Borzsonyi (Eds.), N
- Poyrazoglu E, Gökmen V, Artık N. 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J Food Comp Anal* 15:567-75.
- 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.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radicle Biologyl and Medicine*, 26: 1231-1237, 1999.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- 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
- Sahu SC, Gray GC (1997). Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol* 35, 443-447.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002). Plant phenolic antioxidants and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:287-306
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005b. In vitro antiproliferative, apoptotic and

antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nut Biochem* 16:360-7.

- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, "The role of oxidative stress in the genesis of heart disease", *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Morthy V, Ramassamy C. 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism and cellular and molecular mechanism. *J Agric Food Chem* 56:4855-73.
- Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., (1997), Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. J '' Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. '' *J Agric Food Chem*. 2008 Aug 27;56(16):6967-76.
- Spanou C, Veskokouk AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D '' Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. '' *In Vivo*. 2011 Jul-Aug;25(4):657-62.
- Spanou CI, Veskokouk AS, Stagos D, Liadaki K, Aligiannis N, Angelis A, Skaltsounis AL, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Kouretas D. J '' Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities. '' *Physiol Biochem*. 2012 Mar;68(1):37-45.
- Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*. 1976 36:2699-2702.
- Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM, Kouretas D '' Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols '' *Food Chem Toxicol*. 2012 Jun;50(6):2155-70.

- Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assessment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *In Vivo*: 741-747
- Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J ''Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes'' *Agric Food Chem*. 2007 Jun 27;55(13):5246-52.
- Stohs SJ, Bagchi D. (1995), Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radic Biol Med*, 18:321-36
- Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol* 17:377-85.
- Tezcan F, Gültekin-Özgülven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem* 115(3):873-7.
- Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998
- Tzouramani E., Lontakis A., Sintori A., Navrouzoglou P., Papaeuthymiou M., Karanikolas P., Alexopoulos G. (2008) *Δεντροκομία-Ροδιά ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.*
- Vermerris W. & Nicholson R., 2006, *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands, Springer.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin J.K (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 35, 1517-1525.
- Watanabe S., Uesugi S., Kikuchi Y., (2002), Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, 108ynaecological problems and possible immune potentiation, *Biomed Pharmacother*, 56:302-312

- Zandi P, Ahmadi L, "Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family", J Food Sci Technol, 37: 436-439, 2000.
- Δρογούδη Π, Πσιμπουρίδης Κ, Πανταζής Σ, "Η καλλιέργεια της Ροδιάς" Γεωργία -Κτηνοτροφία,1:24-27, 2007.
- Ορφανός. 2000: Ξεκίνησε μία Ενδιαφέρουσα Χρονιά για τα Ρόδια. Περιοδικό Φρουτονέα.93: 20-22
- Φραγκούλη Ν. Χρυσόφορα ρόδια μέσω Ισραήλ σε Θεσσαλία και Β. Ελλάδα. Εφημερίδα Agrenda. 2006: 36.