



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

### **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Προσδιορισμός *in vitro* της αντιοξειδωτικής δράσης  
πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ευρωπαϊκής καστανιάς (*Castanea sativa*)

Assessment *in vitro* of antioxidant activity of polyphenolic extracts from  
*Castanea sativa*



**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΟΣΚΙΝΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κωνσταντίνος Πετρωτός:** Καθηγητής του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

Η πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Δημήτριου Στάγκου, Επίκουρου καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Κουρέτα για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στον εργαστήριο του, όπου ασχολήθηκα με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον διδακτορικό κ. Δημήτρη Λαδά με τον οποίο συνεργάστηκα άψογα σε ολόκληρη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας και ο οποίος μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια σε ό,τι χρειαζόμουν για να μπορέσω να ολοκληρώσω με επιτυχία το πειραματικό μέρος της εργασίας μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα παιδιά του εργαστηρίου που ήταν πολύ φιλικά και καταφέραμε να εργαστούμε όλοι μαζί σε ένα πολύ ευχάριστο κλίμα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πλήθος ερευνών έχουν δείξει πως τόσο οι ελεύθερες ρίζες αλλά και το οξειδωτικό στρες συνδέονται με πλήθος ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα ή ο καρκίνος. Επίσης έχει βρεθεί ότι πολλές ουσίες είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική τους δράση. Για παράδειγμα, φυτικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί αυτές οι ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα από το είδος φυτού *Castanea sativa* της οικογένειας *Fagaceae* και εξετάστηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους DPPH, ABTS, αναστολή της ρίζας  $\text{OH}\cdot$ , αναστολή της ρίζας  $\text{O}_2\cdot^-$  και με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγική δύναμης. Αναλυτικότερα, εξετάσαμε ουσιαστικά έξι δείγματα: το σκέτο κάστανο, το ενθυλακωμένο με μαλτοδεξτρίνη κάστανο, το ενθυλακωμένο με οροπρωτεΐνη κάστανο, το σκέτο φύλλο, το ενθυλακωμένο με μαλτοδεξτρίνη φύλλο και το ενθυλακωμένο με οροπρωτεΐνη φύλλο. Ισχυρότερο βρέθηκε το δείγμα του σκέτου φύλλου με  $\text{IC}_{50}$  **13,1  $\mu\text{g/ml}$**  με τη μέθοδο ABTS,  $\text{IC}_{50}$  **19,4  $\mu\text{g/ml}$**  με τη μέθοδο DPPH,  $\text{IC}_{50}$  **14,8  $\mu\text{g/ml}$**  με τη μέθοδο αναστολής ρίζας  $\text{O}_2\cdot^-$ ,  $\text{IC}_{50}$  **135,4  $\mu\text{g/ml}$**  με τη μέθοδο αναστολής ρίζας  $\text{OH}\cdot$  και  $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$  **16,0  $\mu\text{g/ml}$**  για τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα είχαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω για τις ευεργετικές τους δράσεις.

## ABSTRACT

Numerous studies have shown that both free radicals and oxidative stress are associated with diseases, such as cardiovascular diseases or cancer. It has also been found that many substances are known for their antioxidant and chemopreventive activity. For example, herbal extracts are rich in polyphenols, to which these beneficial biological properties have been attributed. In the present study, extracts from *Castanea sativa* (Fagaceae family) were studied and their in vitro antioxidant ability was investigated using DPPH, ABTS, OH<sup>•</sup> radical scavenging, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical scavenging and Reducing Power assays. Specifically, we examined six extracts: from chestnut, from chestnut encapsulated with maltodextrin, from chestnut with whey protein, from leaves, from leaves encapsulated with maltodextrin and from leaves encapsulated with whey protein. The most potent was the extract from leaves with IC<sub>50</sub> **13,1 µg/ml** for the ABTS assay, IC<sub>50</sub> **19,4** for the DPPH assay, IC<sub>50</sub> **14,8 µg/ml** for O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical scavenging assay, IC<sub>50</sub> **135,4 µg/ml** for the OH<sup>•</sup> radical scavenging assay and RP<sub>0.5AU</sub> **16,0 µg/ml** for Reducing Power.

The results of the study provided significant information about the antioxidant activity of the above mentioned extracts, which should be further examined for their beneficial health effects.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.1.1 Ενδογενείς πηγές.....	8
1.1.2 Εξωγενείς πηγές.....	10
1.2 Βιολογικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών.....	10
1.2.1 Θετικές επιδράσεις.....	11
1.2.2 Αρνητικές επιδράσεις-Οξειδωτικό στρες.....	11
1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	15
1.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	15
1.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	16
1.4 Φυτικές πολυφαινόλες.....	17
1.5 Castanea Sativa.....	20
<b>2.ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	24
<b>3.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	25
3.1 Αντιδραστήρια.....	25
3.2 Εκχυλίσματα.....	25
3.3 Αντιοξειδωτικές μέθοδοι.....	26
3.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•.....	26
3.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS <sup>•+</sup> .....	28
3.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	30
3.3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•.....	32
3.3.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	33
<b>4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ</b> .....	34
4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•.....	34
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS <sup>•+</sup> .....	38

4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\bullet}$ .....	43
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $OH^{\bullet}$ .....	46
4.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	51
<b>5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>56</b>
<b>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>61</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού (Phaniendra et. al., 2015). Μια ελεύθερη ρίζα είναι μια ασταθής δομή ικανή για αυτόνομη ύπαρξη (εξού και ο όρος ελεύθερη) που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell and Gutteridge, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες τείνουν να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα και η δημιουργία τους προκαλείται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου. Ο μη φυσιολογικός αριθμός ηλεκτρονίων των ελεύθερων ριζών είναι αυτός που τις καθιστά ασταθή, βραχύβια και ιδιαίτερα δραστικά μόρια. Υπάρχουν διάφορες μορφές ελεύθερων ριζών, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που θεωρούνται οι σημαντικότερες μεταξύ των άλλων, διακρίνονται στο ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), στη ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), στη ρίζα του περοξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ) και σε παράγωγα οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η μονή ρίζα οξυγόνου ( $^1O_2$ ). Είναι κατανοητό πως η παραγωγή των ελεύθερων αυτών ριζών είναι η αναπόφευκτη συνέπεια της ζωής σε μια πλούσια σε οξυγόνο ατμόσφαιρα (Perrone et. al., 2012).

#### 1.1.1 Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

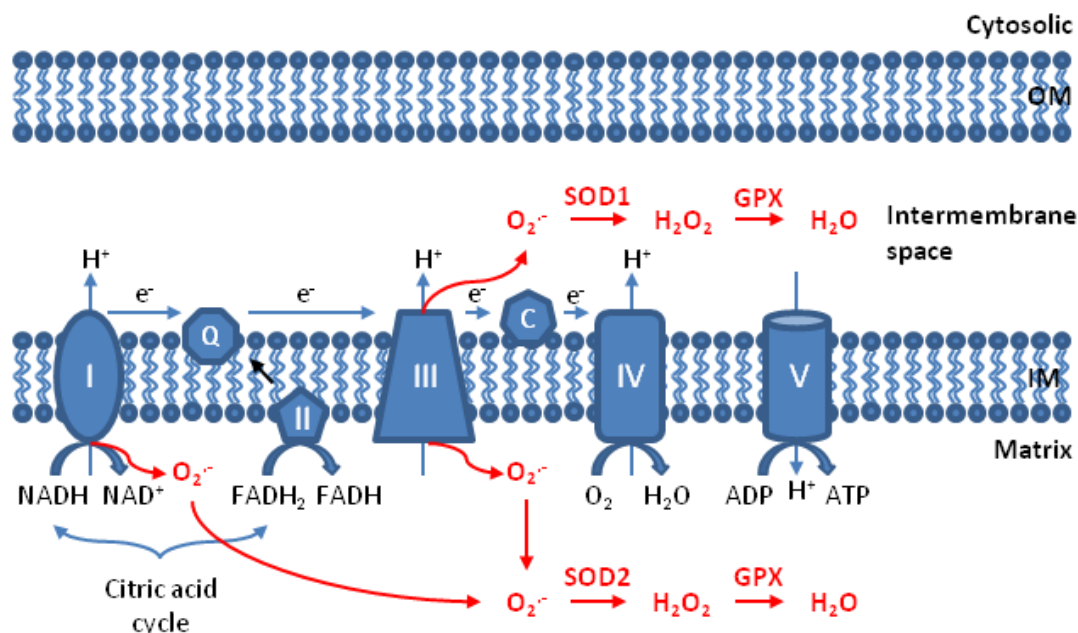
Οι ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν διαφορετικά κυτταρικά όργανα όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση του οξυγόνου είναι υψηλή. (Phaniendra et. al., 2015).

##### Μιτοχόνδρια και Οξειδωτική φωσφορυλίωση:

Η πλειοψηφία των δραστικών μορφών οξυγόνου προέρχεται από τα μιτοχόνδρια, τα οποία συχνά αποκαλούνται ως «εργοστάσια κυττάρου», καθώς διαθέτουν τα ένζυμα που διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού, κατά τον οποίον παράγεται ATP. Η βιοχημική διεργασία παραγωγής ενέργειας ATP ονομάζεται οξειδωτική



φωσφορυλίωση και πραγματοποιείται σε ένα σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το πρώτο στο τελευταίο σύμπλοκο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι ρίζες υπεροξειδίου παράγονται σε δύο μεγάλες θέσεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, δηλαδή το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση) και το σύμπλοκο III (αναγωγή κυτοχρώματος c - ουβικινόνης) (Phaniendra et. al., 2015). Από τα ανιόντα υπεροξειδίου στη συνέχεια παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω ώστε να σχηματίσει ρίζες υδροξυλίου. (Cadenas and Davies, 2000). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



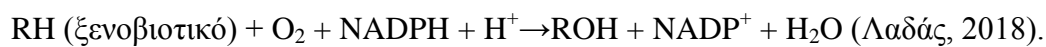
Εικόνα 1. Σχηματικό μοντέλο οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και παραγωγής ROS.

### Υπεροξειδισώματα

Μία ακόμα ενδογενή πηγή ROS αποτελούν τα υπεροξειδισώματα. Αυτά είναι μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα, όπως η β-οξειδάση της μακράς αλυσίδας των λιπαρών οξέων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου. Διαθέτουν επίσης ένζυμα, όπως η καταλάση, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με στόχο την απομάκρυνση διαφόρων επιβλαβών ουσιών για το κύτταρο (Berg et al., 2010).

### Ενδοπλασματικό Δίκτυο

Τα ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως τα ένζυμα του Κυτοχρώματος P450 και b5 και η οξειδάση διαμίνης συμβάλλουν στο σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450 συγκεκριμένα είναι μια οικογένεια ισοενζύμων που είναι άφθονα στο ήπαρ και καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις της Φάσης I του μεταβολισμού. (Katzung, 2009). Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο O<sub>2</sub> και οξειδώνοντας το υπόστρωμα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Επιπλέον, ένα άλλο σημαντικό ένζυμο θειολικής οξειδάσης, το Ego1p καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διθειόλες σε μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Phaniendra et. al., 2015).

Άλλες ενδογενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελούν η σύνθεση προσταγλανδίνης, η αυτοοξειδωση της αδρεναλίνης, το ψυχικό στρες, η έντονη εργασία, ο καρκίνος.

#### **1.1.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών**

Δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν επίσης να σχηματιστούν στα βιολογικά συστήματα και από εξωγενείς πηγές. Ορισμένες από αυτές είναι ρυπαντές της ατμόσφαιρας, η υψηλή εξωτερική θερμοκρασία, το αλκοόλ, ο καπνός ή και διάφορα φάρμακα, όπως η παρακεταμόλη, η μπλεομυκίνη κ.α. (Phaniendra et. al., 2015).

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

Οι ελεύθερες ρίζες από τη μία έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στον οργανισμό σε μέτριες συγκεντρώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν φυσιολογικούς ρόλους στις κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες. Για παράδειγμα σημαντικό παίζουν ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, στη λειτουργία διαφόρων κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και στην επαγωγή μιτογόνου απόκρισης. Από την άλλη πλευρά, η υπερπαραγωγή των

ελευθέρων ριζών και η ανεπάρκεια ενός αντιοξειδωτικού μηχανισμού οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, μία κατά κύριο λόγο παθολογική κατάσταση και σημαντικό μεσολαβητή της βλάβης στις κυτταρικές δομές και τους ιστούς. (Perrone et. al.,2012).

### **1.2.1. Θετικές επιδράσεις**

Σε μικρές ή και σε μέτριες συγκεντρώσεις, όπως προαναφέραμε, τόσο οι δραστικές μορφές οξυγόνου όσο και οι δραστικές μορφές αζώτου είναι απαραίτητες στη διαδικασία ωρίμανσης κυτταρικών δομών και μπορούν να λειτουργήσουν ως όπλα του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού (Pham-Huy et. al., 2008). Πράγματι, τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μονοκύτταρα) απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες για να καταστρέψουν εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς. Η σημασία παραγωγής ROS από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σαφώς παραδειγματική στους ασθενείς με χρόνια κοκκιωματώδη νόσο. Πρόκειται για μια γενετικά προσδιορισμένη (κληρονομική) νόσο που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της οξειδωτικής ικανότητας των φαγοκυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς δεν μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και κάποια ακόμα οξειδωτικά μόρια, οπότε δεν μπορούν να σκοτώσουν και να πέσουν ορισμένους μικροοργανισμούς. Επίσης, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως χρήσιμα σηματοδοτικά μόρια σε μηχανισμούς ανάπτυξης και επομένως είναι απαραίτητες στη διακυτταρική μεταγωγή σήματος. Επιπλέον συμβάλλουν στη μυϊκή συστολή. Τέλος, οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι ικανές να επάγουν την κυτταρική απόπτωση και μπορούν έτσι να συμβάλλουν στην εξάλειψη καρκινικών κυττάρων, λειτουργώντας ως «αντι-ογκογόνα» (Valko et. al., 2007).

### **1.2.2 Αρνητικές επιδράσεις – Οξειδωτικό στρες**

Όταν υπάρχει μια σοβαρή ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού, τότε οι πρώτες θα παραχθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός το οποίο τελικά θα οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού και οδηγεί στη

μείωση των αμυντικών μηχανισμών του. Από τη στιγμή που οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες και στις τρεις σημαντικές τάξεις βιομορίων του οργανισμού, δηλαδή στα νουκλεϊκά οξέα, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια (Phaniendra et. al., 2015).



Εικόνα 2. σχηματική απεικόνιση οξειδωτικού στρες

#### Οξείδωση νουκλεϊκών οξέων:

- DNA:

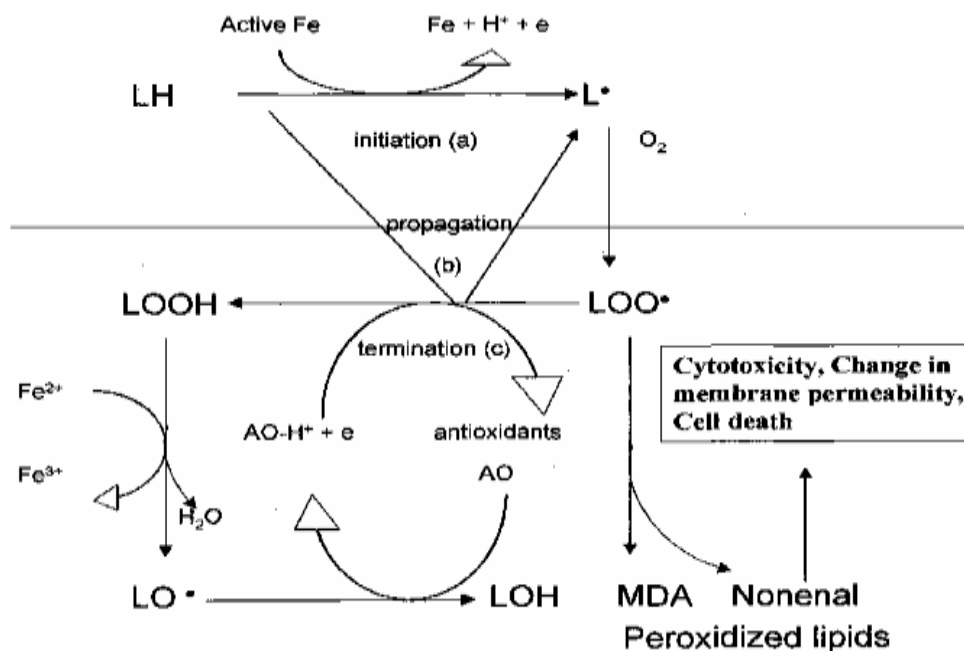
Τόσο οι ROS όσο και οι RNS μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στο DNA. Συγκεκριμένα, το μιτοχondριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στις «επιθέσεις» των ROS από ότι είναι το πυρηνικό DNA, επειδή βρίσκεται σε κοντινή απόσταση σε σχέση με το σημείο παραγωγής των ROS. Η ρίζα υδροξυλίου αλληλεπιδρά με όλα τα συστατικά του DNA, όπως τις πουρίνες και τα πυριμιδίνες αλλά και τη δεοξυριβόζη, και προκαλεί διάφορες μεταβολές, όπως μονόκλωνα και δίκλωνα θραύσματα στις αλυσίδες του DNA. (Phaniendra et. al., 2015). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η δράση του OH<sup>-</sup> στη θυμίνη, η οποία μετατρέπεται σε γλυκόλη της θυμίνης που είναι κυτταροτοξική καθώς αναστέλλει την αντιγραφή του DNA (Tropp, 2014).

- RNA:

Το RNA είναι πιο επιρρεπές σε οξειδωτική βλάβη από το DNA, λόγω της μονόκλωνής του φύσης, λόγω της έλλειψης ενεργού μηχανισμού επισκευής για το οξειδωμένο RNA, γιατί έχει λιγότερη προστασία από τις πρωτεΐνες (ιστόνες) από ότι το DNA, και επιπλέον τα κυτταροπλασματικά RNA βρίσκονται σε στενή απόσταση με τα μιτοχόνδρια όπου παράγονται πολλές ROS (Phaniendra et. al., 2015).

Οξείδωση λιπιδίων:

Τα λιπίδια της μεμβράνης, ιδιαίτερα τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από ελεύθερες ρίζες. (Phaniendra et. al., 2015). Τα λιπίδια όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να υποβληθούν σε μια εξαιρετικά επιζήμια αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξείδωσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων (LOOH, LOO<sup>•</sup>), τα οποία προκαλούν την απώλεια δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της μεμβράνης. Το τελευταίο βήμα της αλυσίδας αντιδράσεων οδηγεί στην παραγωγή ενεργού Fe<sup>2+</sup> (Devasagayam et al., 2003). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η εν λόγω αλυσίδα αντιδράσεων κατά την λιπιδική οξείδωση.



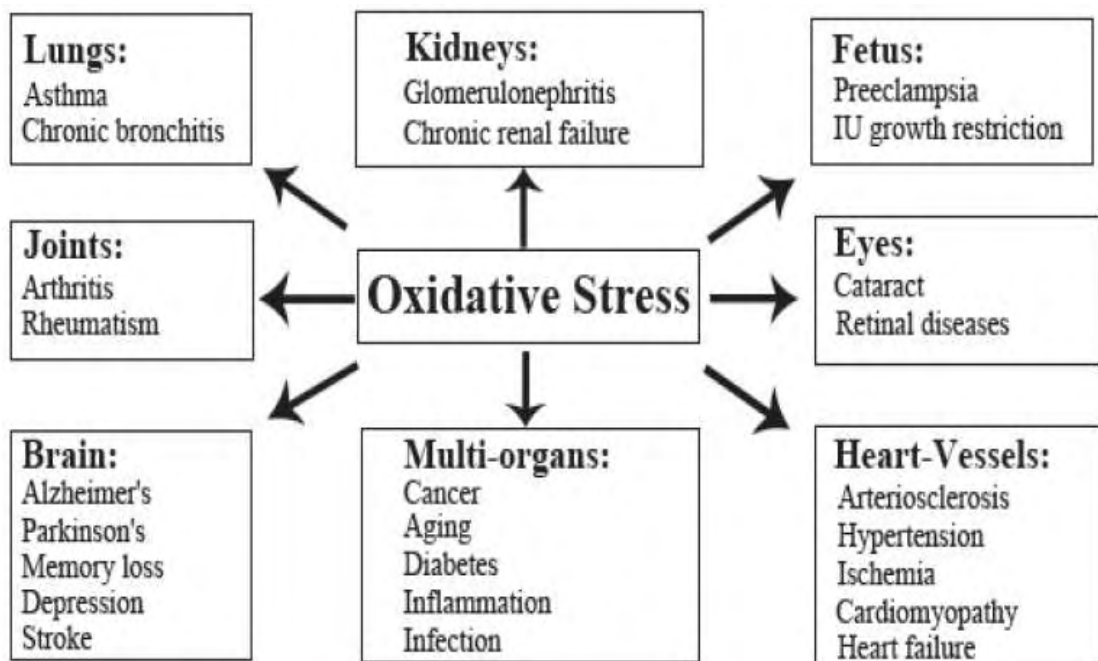
Εικόνα 3. Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην Fe<sup>2+</sup>- επαγόμενη λιπιδιακή οξείδωση

### Οξείδωση πρωτεϊνών:

Η οξείδωση μιας πρωτεΐνης μπορεί να προκληθεί από ελεύθερες ρίζες, όπως το  $O_2^{\bullet-}$ , η ρίζα  $OH^{\bullet}$ , το περοξύλιο, όπως επίσης και από μη ριζικά είδη, όπως το  $H_2O_2$ . Οι ROS οξειδώνουν διάφορα αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες, προκαλώντας το σχηματισμό διασυνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετουσίωση και την απώλεια λειτουργίας των πρωτεϊνών, την απώλεια ενεργότητας ενζύμων και την απώλεια λειτουργίας των υποδοχέων και των πρωτεϊνών μεταφοράς (Phaniendra et. al., 2015).

### Οξειδωτικό στρες και παθοφυσιολογία:

Το οξειδωτικό στρες, όπως προαναφέραμε, προκαλεί σημαντική μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διάφορους τύπους ασθενειών. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται ορισμένες ασθένειες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με το οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 4. Επαγόμενες από το οξειδωτικό στρες ασθένειες στον άνθρωπο. (Pham-Huy et. al., 2008).

### 1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ο οργανισμός διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για να αντισταθμίσει το οξειδωτικό στρες με την παραγωγή αντιοξειδωτικών, τα οποία είτε παράγονται φυσικά *in situ* (ενδογενή αντιοξειδωτικά) είτε προμηθεύονται εξωτερικά μέσω τροφίμων (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Χαρακτηρίζονται ως σταθερά μόρια ικανά να «δωρίσουν» ένα ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα, με σκοπό να ελαττώσουν την δυνατότητά της να προκαλέσει βλάβη (Lobo et. al., 2010). Οι ρόλοι των αντιοξειδωτικών, λοιπόν, είναι να εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών, να προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών.

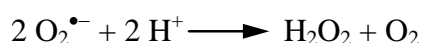
Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (Pham-Huy et. al., 2008).

#### 1.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα κύρια ενζυμικά αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται άμεσα στην εξουδετέρωση δραστηκών μορφών οξυγόνου και αζώτου είναι τα εξής:

- Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)
- Καταλάση (CAT)
- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)
- Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRx)

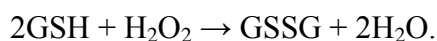
Η *υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)* αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις ROS και RNS και εξαλείφει τη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$  καταλύοντας τη μετατροπή της σε  $H_2O_2$  (Pham-Huy et. al., 2008). Η αντίδραση είναι η εξής:



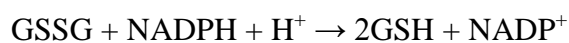
Τα ένζυμα SOD υπάρχουν σε σχεδόν όλα τα αερόβια κύτταρα και στα εξωκυτταρικά υγρά (Lobo et. al., 2010).

Η *καταλάση* (CAT) με τη σειρά της καταλύει τη διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό και οξυγόνο. Σε όλους τους ζωικούς οργανισμούς υπάρχει καταλάση, και σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ (Lobo et. al., 2010).

Η *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης* (GPx) είναι ένα ένζυμο που περιέχει τέσσερις συμπαραγοντες σεληνίου που καταλύουν την διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, αλλά και γενικότερα ενός μεγάλου αριθμού οργανικών υδροϋπεροξειδίων. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ζώα. Η GPx-1 είναι η πλέον άφθονη και έχει υψηλά αποτελεσματική δράση ενάντια στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ η GPx-4 είναι περισσότερο δραστική με υδροϋπεροξειδία λιπιδίων. (Lobo et. al., 2010). Η GPx-1 καταλύει τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό οξειδώνοντας την GSH (ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης) σε GSSG (στην οξειδωμένη μορφή γουταθειόνης) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η *αναγωγή της γλουταθειόνης* (GRx) είναι ένα ένζυμο φλαβοπρωτεΐνης (Pham-Huy et. al., 2008). Καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου (Λαδάς, 2018). Η GRx χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (FAD), ενώ το NADPH αποτελεί πηγή αναγωγικής δύναμης. Η εν λόγω αντίδραση είναι η εξής:



### 1.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται επίσης σε μεταβολικά αντιοξειδωτικά και σε θρεπτικά αντιοξειδωτικά. Τα μεταβολικά αντιοξειδωτικά είναι ενδογενή, παράγονται δηλαδή από τον οργανισμό. Ορισμένα από αυτά η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η μελατονίνη, το συνένζυμο Q<sub>10</sub>, η L-αργινίνη, το λιποϊκό οξύ, η χολερυθρίνη κ.α. (Pham-Huy et. al., 2008).

#### Γλουταθειόνη:

Η γλουταθειόνη είναι η κύρια μη-πρωτεϊνική θειόλη που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική κυτταρική άμυνα. Είναι ένα τριπεπίδιο που συντίθεται από γ-γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η ενεργός μορφή του γλουταθείου οφείλεται στη θειόλη (-SH) της κυστεΐνης. Η γλουταθειόνη είναι ένα άφθονο μόριο που



παράγεται σε όλα τα όργανα, και ειδικά στο ήπαρ (Pastore, 2008). Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης και του κεντρικού ρόλου της στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου, η γλουταθειόνη θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά κυτταρικά αντιοξειδωτικά. (Lobo et. al., 2010).

Τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά είναι εξωγενή. Επομένως είναι ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να παραχθούν από τον ίδιο τον οργανισμό και γι αυτό πρέπει να παρέχονται μέσω των τροφών ή άλλων συμπληρωμάτων. Σε αυτήν την κατηγορία αντιοξειδωτικών ανήκουν: η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, τα ιχνοστοιχεία, και τα ω3 και ω6 λιπαρά οξέα (Pham-Huy et. al., 2008).

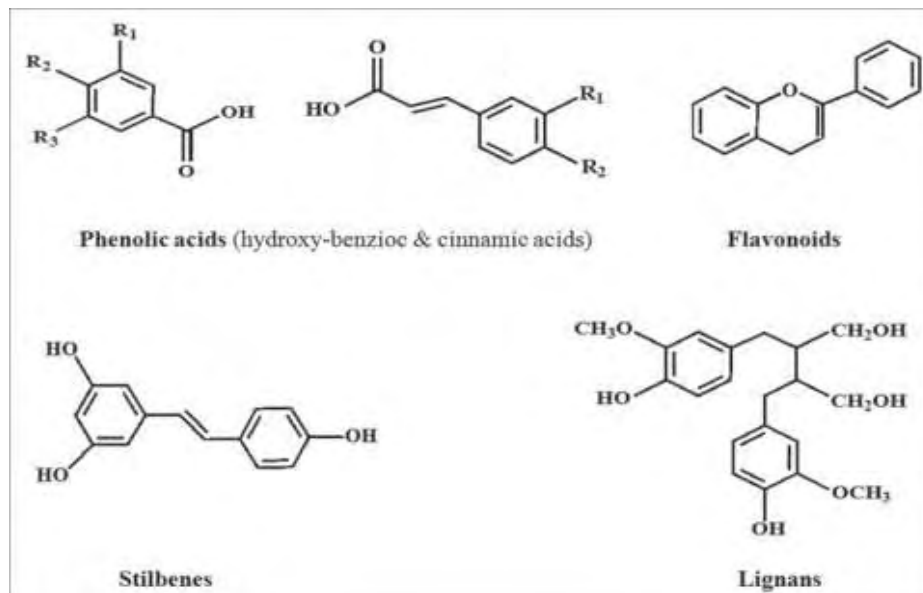
#### **1.4 Φυτικές πολυφαινόλες**

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Είναι ενώσεις οι οποίες εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό στα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και τα ποτά. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις σε διάφορα φυτικά είδη (Pandey et. Rizvi, 2009).

Οι πολυφαινόλες συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα κατά της υπερϊώδους ακτινοβολίας και των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι ερευνητές έχουν διερευνήσει ότι αυτά τα μόρια είναι πολύ καλά αντιοξειδωτικά και μπορούν να εξουδετερώσουν την καταστρεπτική δραστηριότητα των ανεπιθύμητων δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου που παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι πολυφαινόλες παρέχουν σημαντική προστασία από την ανάπτυξη αρκετών χρόνιων παθήσεων όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι μολύνσεις, το άσθμα κ.α. (Pandey et. Rizvi, 2009).

Βασικό χαρακτηριστικό των πολυφαινολών αποτελεί ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς, οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα πολυφαινολικά οξέα, στα

φλαβονοειδή, στα στυλβένια και στις λιγνάνες (Manach et al., 2004). Τα πολυφαινολικά οξέα διακρίνονται περαιτέρω στα υδροξυβενζοϊκά και στα υδροξυκινναμικά οξέα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι χημικές δομές αυτών των κατηγοριών πολυφαινολών που αναφέραμε.



Εικόνα 5. Χημικές δομές των διαφόρων κατηγοριών των πολυφαινολών (Pandey et. Rizvi, 2009).

### Φλαβονοειδή:

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο μελετημένη ομάδα φυτικών πολυφαινολών. Αυτή η ομάδα έχει μια κοινή βασική δομή αποτελούμενη από δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μια γέφυρα τριών ανθράκων. (Bravo, 1998). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 4.000 ποικιλίες φλαβονοειδών, στις οποίες οφείλονται τα ελκυστικά χρώματα των ανθέων, των φρούτων και των φύλλων (Pandey et. Rizvi, 2009). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες, όπως τις ανθοκυανιδίνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόνες, τις χαλκόνες, τις φλαβονόλες, τις ισοφλαβόνες κ.α. Τα φλαβονοειδή βρίσκονται σε διάφορα είδη τροφών, όπως το κρεμμύδι, το μπρόκολο, το μήλο, το κεράσι, το κόκκινο κρασί, το τσάι κ.α.

### Πολυφαινολικά οξέα:

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα. Τα πολυφαινολικά οξέα βρίσκονται άφθονα στις τροφές και ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: στα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκινναμικά οξέα.

Η περιεκτικότητα των εδώδιμων φυτών σε υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι γενικά χαμηλή, με εξαίρεση ορισμένα κόκκινα φρούτα, το μαύρο ραπανάκι και τα κρεμμύδια, τα οποία μπορεί να περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις υδροξυβενζοϊκού οξέος. Τα υδροξυκιναμικά οξέα είναι πιο κοινά στα φυτά σε σχέση με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Αποτελούνται κυρίως από κουμαρικά, καφεϊκά, φερούλικά και σιναπικά οξέα. Τα οξέα αυτά σπανίως βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, με εξαίρεση επεξεργασμένα τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, αποστείρωση και ψύξη (Manach et al., 2004).

### **Στιλβένια:**

Τα στιλβένια περιέχουν δύο φαινύλια που συνδέονται με γέφυρα μεθυλενίου δύο ατόμων άνθρακα. Απαντώνται σε μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διατροφή. Τα περισσότερα στιλβένια στα φυτά ενεργούν ως αντιμυκητιακές φυτοαλεξίνες, ενώσεις που συντίθενται μόνο στην απόκριση σε κάποια λοίμωξη ή τραυματισμό. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί το πιο εκτενώς μελετημένο στιλβένιο και εντοπίζεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα σταφύλια και το κόκκινο κρασί (Pandey et. Rizvi, 2009). Η ρεσβερατρόλη έχει αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική δράση.

### **Λιγνάες:**

Οι λιγνάες είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν μια δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου που σχηματίζεται από το διμερισμό δύο υπολειμμάτων κινναμικού οξέος (Pandey et. Rizvi, 2009). Αρκετές λιγνάες, όπως η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη, θεωρούνται φυτοοιστρογόνα. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, αλλά περιέχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα δημητριακά, τα φρούτα και σε ορισμένα λαχανικά. Οι λιγνάες μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από την εντερική μικροχλωρίδα. (Manach et al., 2004).

## 1.5 Castanea Sativa

### Γενικά:

Η Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa* L.) είναι αρκετά σημαντικής οικονομικής αξίας δενδροκομική καλλιέργεια για τις ορεινές περιοχές της νότιας Ευρώπης και κάποιες περιοχές της Ελλάδας. Πράγματι, το ευρωπαϊκό κάστανο κυριαρχεί στην αγορά χάρη στην εξαιρετική του ποιότητα και καλλιεργείται τόσο στην Ελλάδα όσο και την υπόλοιπη Ευρώπη. Η χώρα μας μαζί με τις Κίνα, Τουρκία, Κορέα, Ιταλία, Ιαπωνία, Ισπανία, Πορτογαλία, Γαλλία και Αλβανία παράγουν πολύ σημαντικές ποσότητες καστώνων (Γκουντάρας, 2012).

Η εγχώρια παραγωγή φαίνεται να βρίσκεται σε μία σταθερά ανοδική πορεία. Η Ευρωπαϊκή καστανιά, παρουσιάζει, συγκεκριμένα, ένα έντονο οικονομικό ενδιαφέρον κυρίως για τις ορεινές και ημιορεινές περιοχές της Ελλάδας. Μάλιστα, η καλλιέργεια της καστανιάς στις ορεινές περιοχές θεωρείται από τις πιο αποδοτικές καλλιέργειες για τους παραγωγούς αυτών των περιοχών που μειονεκτούν σχετικά με τις εύφορες και πεδινές περιοχές. Η Ελληνική μέση ετήσια παραγωγή κάστανου υπολογίζεται σήμερα σε περίπου 12000 τόνους από 18000 που έφθανε την δεκαετία του 1960 και είναι βέβαιο ότι υπάρχει δυνατότητα τουλάχιστον για διπλασιασμό της παραγωγής του (Γκουντάρας, 2012).



Εικόνα 6. Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea Sativa*)

**Χαρακτηριστικά:**

Η ευρωπαϊκή καστανιά ανήκει στην οικογένεια Fagaceae. Φύεται και καλλιεργείται σε όλες τις χώρες της Ευρώπης και ονομάζεται επίσης και ιταλική, ισπανική αλλά είναι γνωστή και ως γλυκιά καστανιά. Στην Ελλάδα φύεται σε πολλές περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, ακόμη και στην Κρήτη. Είναι δέντρο φυλλοβόλο και αιωνόβιο και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 25-30 μέτρα. Ευδοκίμει σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές (σε υψόμετρο 500-700 μέτρα) και σε περιβάλλον με σχετικά υψηλή υγρασία, αλλά μπορεί να εμφανιστεί σε υψηλότερες υψομετρικές ζώνες. Βέβαια φαίνεται πως σε ζώνες πάνω από τα 1000 μέτρα η γλυκιά καστανιά δεν καρποφορεί φυσιολογικά.

Η φυσική εξάπλωσή της συνδέεται άμεσα με την ιδιομορφία της να αναπτύσσεται σε όξινα εδάφη. Μάλιστα, η ιδανική οξύτητα για την ανάπτυξή της κυμαίνεται σε pH από 5 μέχρι 6,2. Αναπτύσσεται σε πλαγιές άγονες γόνιμες, αρκεί να είναι δυνατή ανάπτυξη πλούσιου ριζικού συστήματος. Το δέντρο γίνεται ορθόκλαδο και υψηλό όταν έχουμε πυκνή βλάστηση, ενώ ανοιχτόκλαδο με χοντρούς κεντρικούς βραχίονες όταν βρίσκεται σε ανοιχτό και διαθέσιμο χώρο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η ευρωπαϊκή καστανιά αργεί να μπει στην καρποφορία καθώς χρειάζεται 7-10 χρόνια από το χρόνο φύτευσης για την παραγωγή καρπών. (Γκουντάρας, 2012).

**Ανατομία-Μορφολογία καστανιάς:**

Τα φύλλα της είναι απλά, κατ' εναλλαγή, ελλειπτικά, μεγάλα, δερματώδη, οδοντωτά στην περιφέρεια και παραμένουν στο δέντρο μέχρι αργά το φθινόπωρο.



Εικόνες 7 και 8. Φύλλα της *Castanea sativa*

Οι οφθαλμοί της μπορούν να διακριθούν σε ξυλοφόρους και μικτούς ανθοφόρους που απαντώνται πλάγια επάκρια των βλαστών, και διάκριση μεταξύ τους είναι δύσκολη. Είναι μόνοικο και δικλινές, δηλαδή φέρει αρσενικά και θηλυκά άνθη σε ξεχωριστά άνθη αλλά στο ίδιο δέντρο. Τα άνθη εκπτύσσονται σε βλαστούς του τρέχοντος έτους, αργά την άνοιξη-αρχές θέρους μετά την πλήρη ανάπτυξη των φύλλων και βλαστών. Συνήθως ανθίζει τον Ιούλιο και ωριμάζει τους καρπούς της το φθινόπωρο του ίδιου έτους. (Γκουντάρας, 2012).

Οι καρποί αναπτύσσονται σε μια στρογγυλή ταξικαρπία που έχει το μέγεθος μικρής μπάλας. Είναι καλυμμένη με πολλά αγκάθια, έχει εχινώδες περίβλημα και μοιάζει με μικρό σκαντζόχοιρο. Κάθε ταξικαρπία φέρει 1-3 κάστανα και σπανιότερα 5-7. Βοτανικά, κάθε κάστανο αποτελεί έναν πλήρη καρπό. Κατά την ωρίμανση, το εχινώδες περίβλημα αλλάζει χρωματισμό και από ανοιχτό πράσινο-κίτρινο γίνεται γκριζο-καφετί. Στη συνέχεια, σχίζεται στην κορυφή στα δύο ή στα τέσσερα και ελευθερώνονται οι καρποί πέφτοντας στο έδαφος, απ' όπου και συγκομίζονται. Ο καρπός περιβάλλεται από ένα σκληρό, δερματώδες περικάρπιο-κέλυφος με σκούρες κόκκινες και καφετί γραμμώσεις, το οποίο παράγεται από το τοίχωμα της ωοθήκης. (Γκουντάρας, 2012).



Εικόνα 9. Καρποί της *Castanea Sativa*

**Βιοδραστικότητα:**

Τα τελευταία χρόνια έχουν εκπονηθεί πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων από τα φύλλα της γλυκιάς καστανιάς αλλά και του ίδιου του κάστανου. Επίσης έχουν γίνει μελέτες για τις πολυφαινόλες που μπορεί να περιέχονται στα εκχυλίσματα αυτά.

Έχει δειχθεί ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων της ευρωπαϊκής καστανιάς, έχουν τόσο αντιοξειδωτική όσο και αντιμικροβιακή δράση. Στην παραδοσιακή ιατρική, τα συγκεκριμένα φύλλα καταναλώνονται ως τσάι για την καταπολέμηση του οξέος βήχα, αλλά και της διάρροιας (Munekata et. al., 2017). Συγκεκριμένες έρευνες έχουν αποδείξει, επίσης, ότι τα φύλλα έχουν δράση τόσο ενάντια στα Gram+ όσο και τα Gram- βακτήρια. Ωστόσο, φαίνεται πως τα βακτήρια που είναι πολύ ευαίσθητα στη βιοδραστικότητα αυτών των εκχυλισμάτων, είναι το *Staphylococcus aureus* και το *Klebsiella aerogenes* (εντεροβακτήριο) (Basile et. al., 2010).

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως τέτοια εκχυλίσματα από την *Castanea sativa*, είναι ευεργετικά έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, και συγκεκριμένα της UV-B. Οι ακτίνες αυτές ευθύνονται για το μαύρισμα, αλλά και για το ηλιακό έγκαυμα, τις αλλεργικές αντιδράσεις και τους καρκίνους του δέρματος. Φαίνεται πως τα εκχυλίσματα από τα φύλλα της γλυκιάς καστανιάς, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, μπορούν να εξουδετερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου που ανιχνεύονται στο δέρμα, έπειτα από την έκθεση σε UV-B ακτινοβολία. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις, λοιπόν, αποτελούν προστατευτικό παράγοντα για τα κύτταρα του δέρματος ενάντια σε επαγόμενες από UV-B ακτινοβολία, βλάβες (Cerulli et. al., 2018).

Πολυάριθμα πειράματα, έχουν επίσης δείξει την ύπαρξη διαφόρων πολυφαινολών στα εκχυλίσματα φύλλων και κάστανων της Ευρωπαϊκής καστανιάς, γεγονός που επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Συγκεκριμένα έχουν βρει διάφορα φλαβονοειδή ,πολυφαινολικά οξέα και ταννίνες.(Munekata et. al., 2017). Πιο αναλυτικά, όσων αφορά τα φλαβονοειδή, τα εκχυλίσματα φαίνεται να είναι πλούσια σε κερκετίνη (φλαβονόλη), καμπφερόλη (φλαβονοειδές), κατεχίνη και λουτεολίνη (φλαβόνη). Όσων αφορά τα πολυφαινολικά οξέα, τα εκχυλίσματα φαίνεται να περιέχουν γαλλικό και βανιλικό οξύ (υδροξυβενζοϊκά οξέα). (Munekata et. al., 2017). Επίσης είναι γνωστή η περιεκτικότητα του καρπού του καστανού σε

αντιοξειδωτικά, όπως το ελλαγικό οξύ, η τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και τα καροτενοειδή. (Dinis et. al. ,2012). Έχει βρεθεί επίσης από διάφορες μελέτες πως τα φύλλα διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών από τα κάστανα.

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η *Castanea sativa* αποτελεί μια εξαιρετική πηγή βιοδραστικών ουσιών που παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις και πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες για μελλοντικές εφαρμογές τους.

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φύλλα και καρπούς από το φυτό Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*) από την περιοχή Μελιβοίας του Ν. Λάρισας. Τα εκχυλίσματα είχαν παραληφθεί μέσω της τεχνικής Microwave-assisted extraction (MAE). Επίσης εξετάστηκαν εκχυλίσματα του φύλλου όσο και του κάστανου, που είχαν ενσωματωθεί με ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνη και οροπρωτεΐνη.



### 3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζίλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)
- 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ [(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid), ABTS]
- νιτροκυανό του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT),
- μεθοσουλφονική φαιναζίνη (phenazine methosulfate, PMS),
- νικοτιναμίδιο αδενινο νουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH),
- χλωριούχος σίδηρος (ferric chloride)
- διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v)
- το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP)
- 2-δεοξυριβόζη (2-deoxyribose)
- τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA)
- 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA)
- σιδηροκυανιούχο κάλιο (potassium ferricyanide)

#### 3.2 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν απομονώθηκαν από το φυτό *Castanea Sativa*. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν εκχυλίσματα τόσο από τα φύλλα του φυτού όσο και από τα κάστανά του. Συνολικά, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση 6 δειγμάτων που είναι τα εξής: εκχύλισμα σκέτου φύλλου, εκχύλισμα φύλλου ενθυλακωμένου με μαλτοδεξτρίνη (90% μαλτοδεξτρίνη – 10% δείγμα), εκχύλισμα φύλλου ενθυλακωμένου με οροπρωτεΐνη (90% οροπρωτεΐνη 10% δείγμα), εκχύλισμα σκέτου κάστανου, εκχύλισμα κάστανου ενθυλακωμένου με μαλτοδεξτρίνη (90%μαλτοδεξτρίνη-10%δείγμα) και εκχύλισμα κάστανου ενθυλακωμένου με οροπρωτεΐνη. (90% οροπρωτεΐνη -10% δείγμα)

### 3.3 Αντιοξειδωτικές μέθοδοι

Οι φωτομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των παραπάνω δειγμάτων, ήταν:

- 1) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH).
- 2) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας του 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ (ABTS).
- 3) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας  $\text{OH}\cdot$ .
- 4) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας  $\text{O}_2\cdot^-$ .
- 5) Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης.

Για τις μεθόδους DPPH, ABTS, αναστολή ρίζας  $\text{OH}\cdot$  και αναστολή ρίζας  $\text{O}_2\cdot^-$  υπολογίστηκε η τιμή  $\text{IC}_{50}$  των εκχυλισμάτων, δηλαδή η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε εκχυλίσματος κατά την οποία έχει εξουδετερωθεί το 50% της εκάστοτε ρίζας. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $\text{IC}_{50}$ , τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

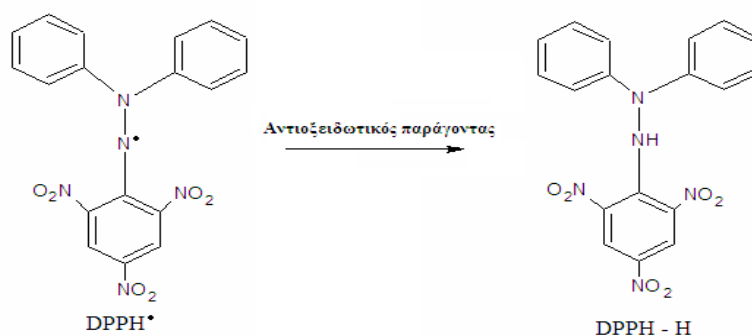
Για τη μέθοδο της αναγωγικής δύναμης υπολογίστηκε η τιμή  $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ , δηλαδή η τιμή της συγκέντρωσης που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ , τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Οι στατιστικές αναλύσεις καθώς και τα γραφήματα των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism.

#### 3.3.1 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH $\cdot$

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH $\cdot$  πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH $\cdot$ ). Η ρίζα

DPPH<sup>•</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 10. : Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H)

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης) (850μL), 100 μM ρίζας DPPH<sup>•</sup> (50μL), νερό (100 μL ) και η εξεταζόμενη ουσία (50μL) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min, καθώς το DPPH είναι φωτοευαίσθητο. Μετά την επώαση, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση γίνεται με συσκευή HitachiU-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

(100μl εκχυλίσματος σε 900μl μεθανόλη) Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

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

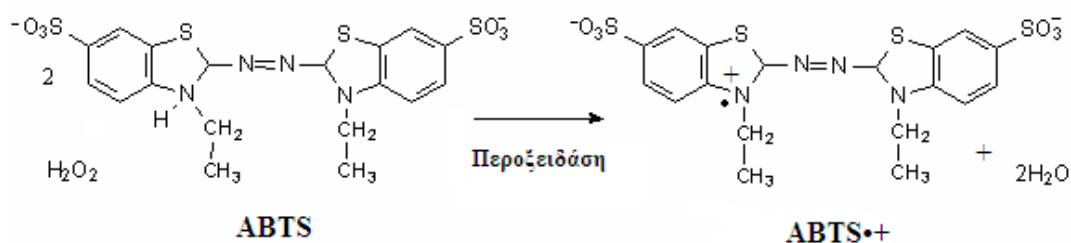
A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

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

### **3.3.2 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS<sup>•+</sup>**

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH<sup>•</sup>, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH<sup>•</sup>, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία  $H_2O_2$ , όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 11. : Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού (ABTS<sup>•+</sup>) μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL  $H_2O$ , 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM  $H_2O_2$  (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση κυανοπράσινου χρώματος). Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος (10μL) σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl	400μl
<b>ABTS</b>	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl	500μl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl	50μl
<b>HRP</b>	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml	50ml
<b>V τελ</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>	<b>1mL</b>

Εκχύλισμα			10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
-----------	--	--	-------	-------	-------	-------	-------	-------

**Πίνακας 1.** Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο θετικό μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθεται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H<sub>2</sub>O με 1 mM ABTS, 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελεί το τυφλό, με το οποίο πραγματοποιείται ο μηδενισμός του φωτόμετρου. Επίσης, ελέγχεται αν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα απορροφούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 730 nm.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> υπολογίζεται από τον τύπο:

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

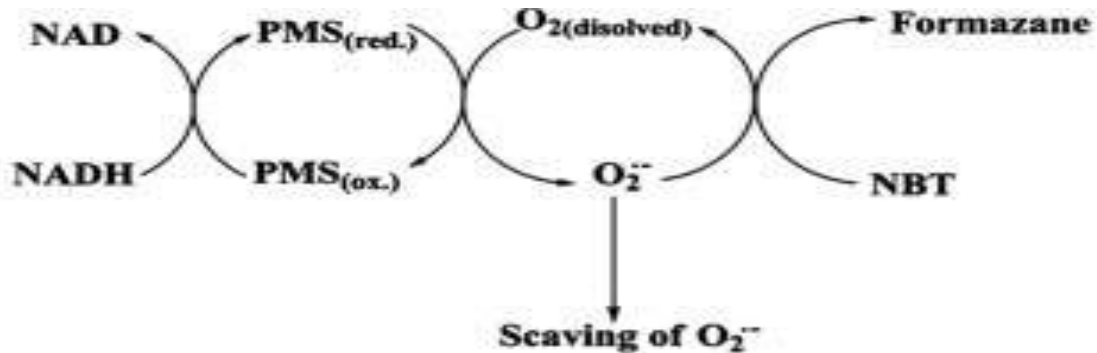
A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A<sub>δ</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

### 3.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004. Η ρίζα O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT<sup>2+</sup> με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά

στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) μέσω του συστήματος μεθιοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδο αδενινουκλεοσίδιο (NADH).

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

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup> υπολογίζεται από τον τύπο:

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

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

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

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

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH· έγινε με τη μέθοδο των Chung et al., 1997. Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH· μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

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

Πιο αναλυτικά, 30μL εκχυλίσματος αυξανόμενων συγκεντρώσεων προστέθηκαν σε 225μL sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), 75μL 2-deoxyribose (10 mM), 75 μL FeSO<sub>4</sub>- EDTA (10 mM), 270 μL H<sub>2</sub>O και 75μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) και ακολουθεί επώαση για 1h στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 375 μL TCA (2.8 %) και 375 μL TBA (1 %) και τα δείγματα επωάζονται στους 95° C για 10 min. Ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν εκχύλισμα αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν τα δείγματά μας απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH· υπολογίζεται από τον τύπο:

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

A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520nm

A<sub>δ</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520nm



### 3.3.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994). Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον  $Fe^{3+}$  και τον ανάγουν σε  $Fe^{2+}$ , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Πιο αναλυτικά, τα εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Προστέθηκαν 250μl από το διάλυμα του δείγματος μας σε 250μl potassium ferricyanide (1%) και τα δείγματα μας επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 250μl TCA (10%) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Στο υπερκείμενο (250μl) προστίθενται 250μl απιονισμένου νερού και 50 μl χλωριούχου σιδήρου(0.1 %) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν τα εκχυλίσματα απορροφούσαν στις ανωτέρω αναφερόμενες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 700 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

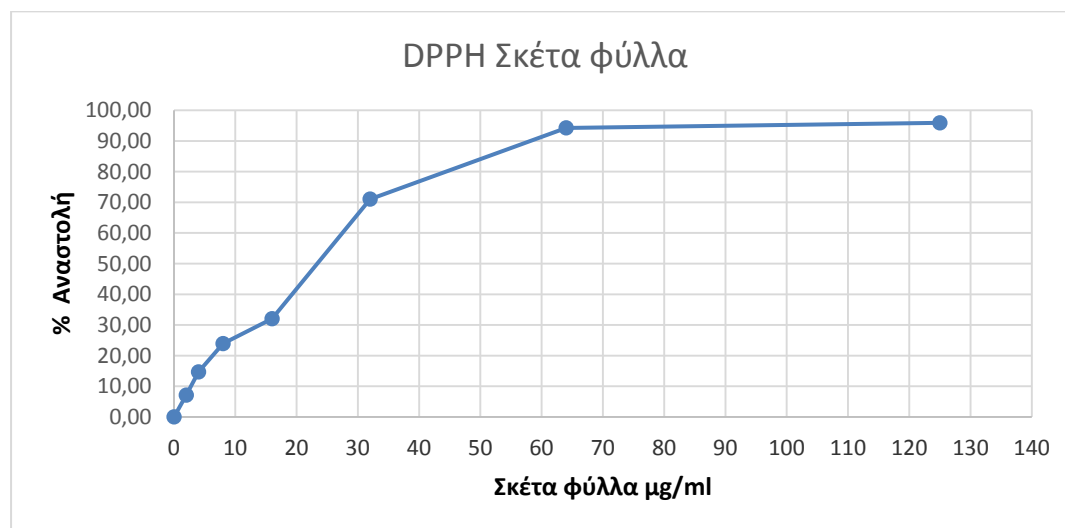
#### 4. Αποτελέσματα

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

Συνολικά μελετήθηκαν 6 εκχυλίσματα και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH\*, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα.

##### Σκέτο φύλλο:

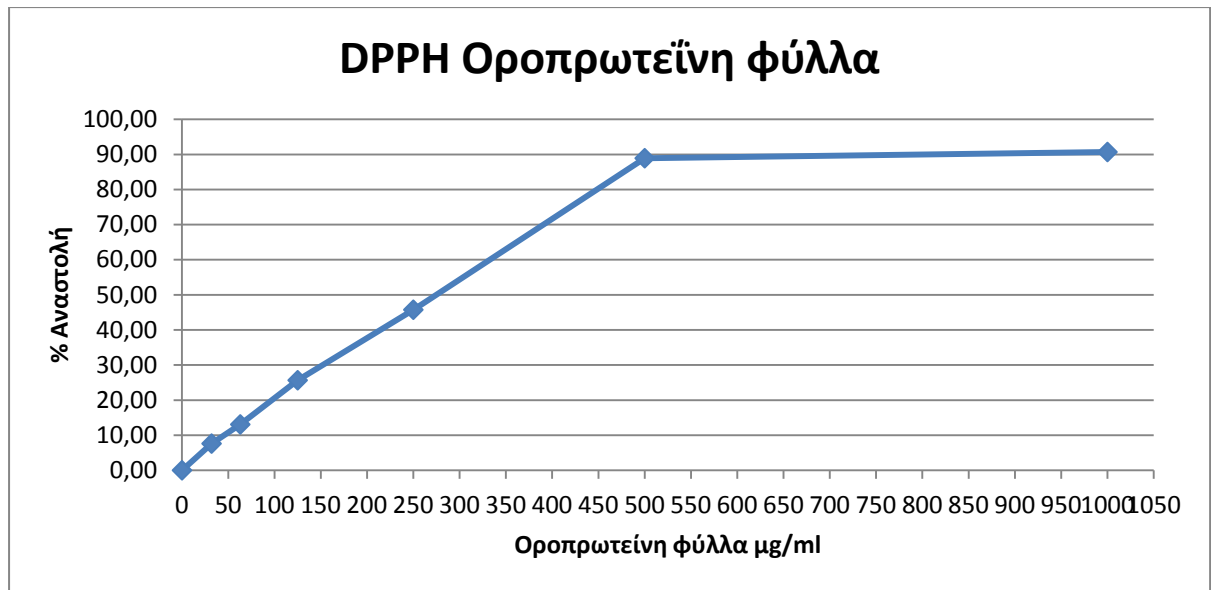
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε  $19,4 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 1. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα του σκέτου φύλλου.

##### Φύλλο ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη:

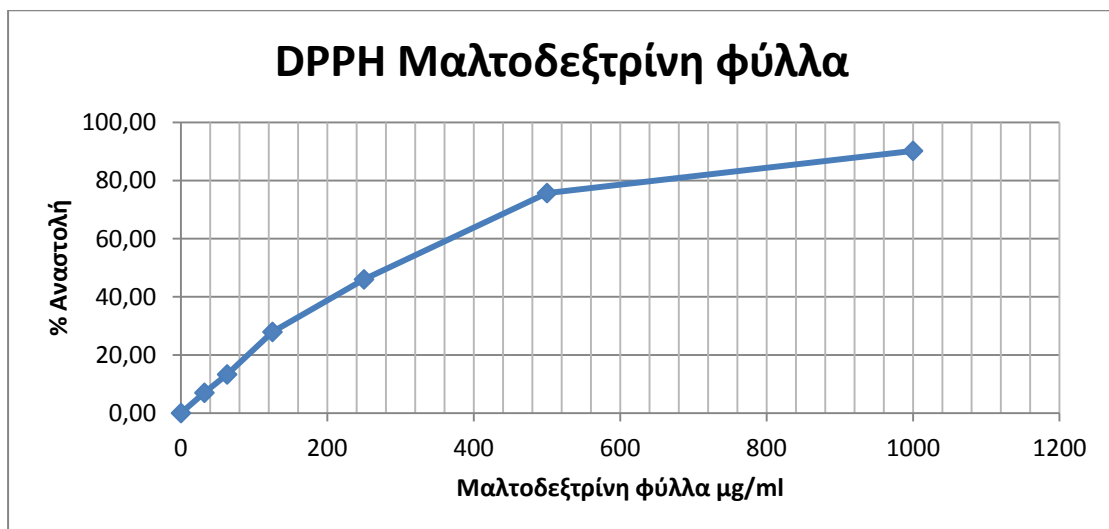
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε  $231,5 \pm 23,1 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 2. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα φύλλου-οροπρωτεΐνης.

#### Φύλλο ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη:

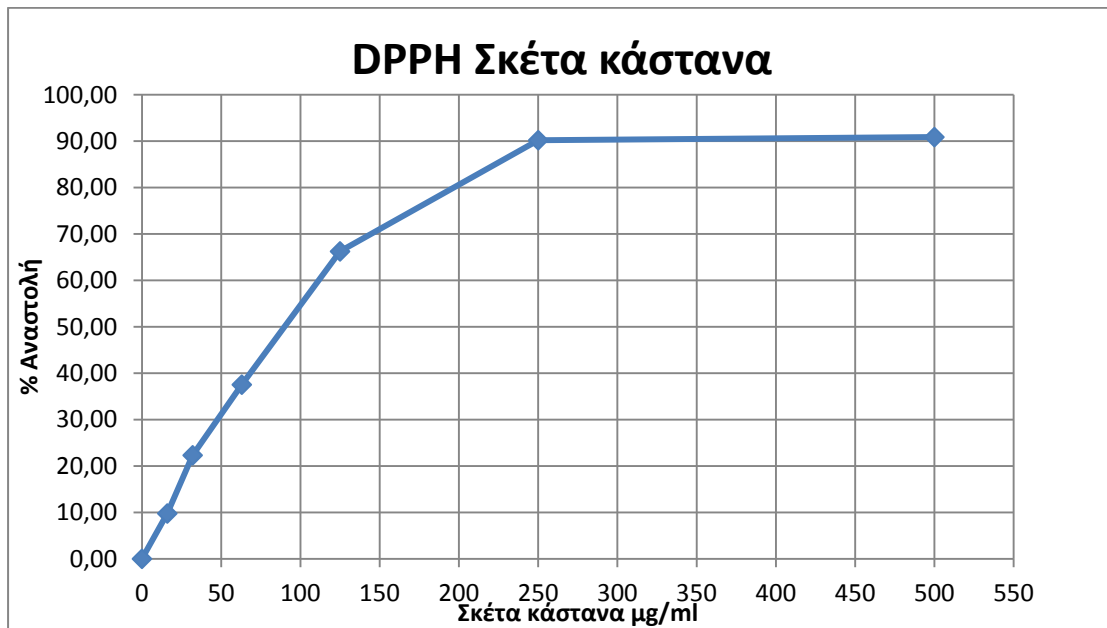
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 242 ± 16,94 µg/mL



Διάγραμμα 3. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα φύλλου-μαλτοδεξτρίνης

**Σκέτο κάστανο:**

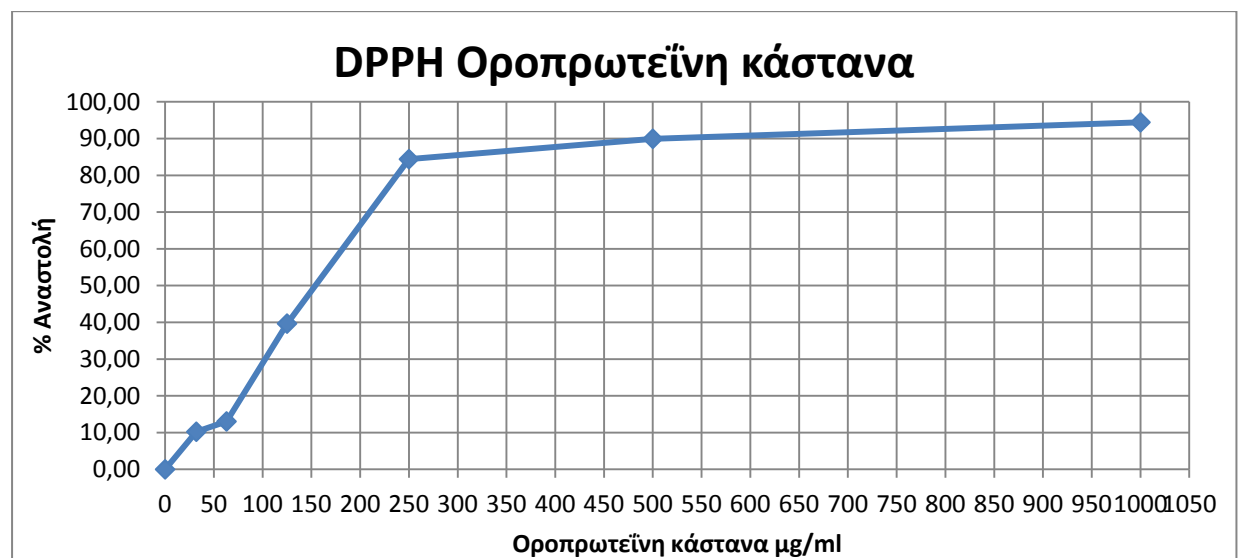
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 79,6 ± 7,1 µg/mL



Διάγραμμα 4. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα σκέτου κάστανου.

**Κάστανο ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη**

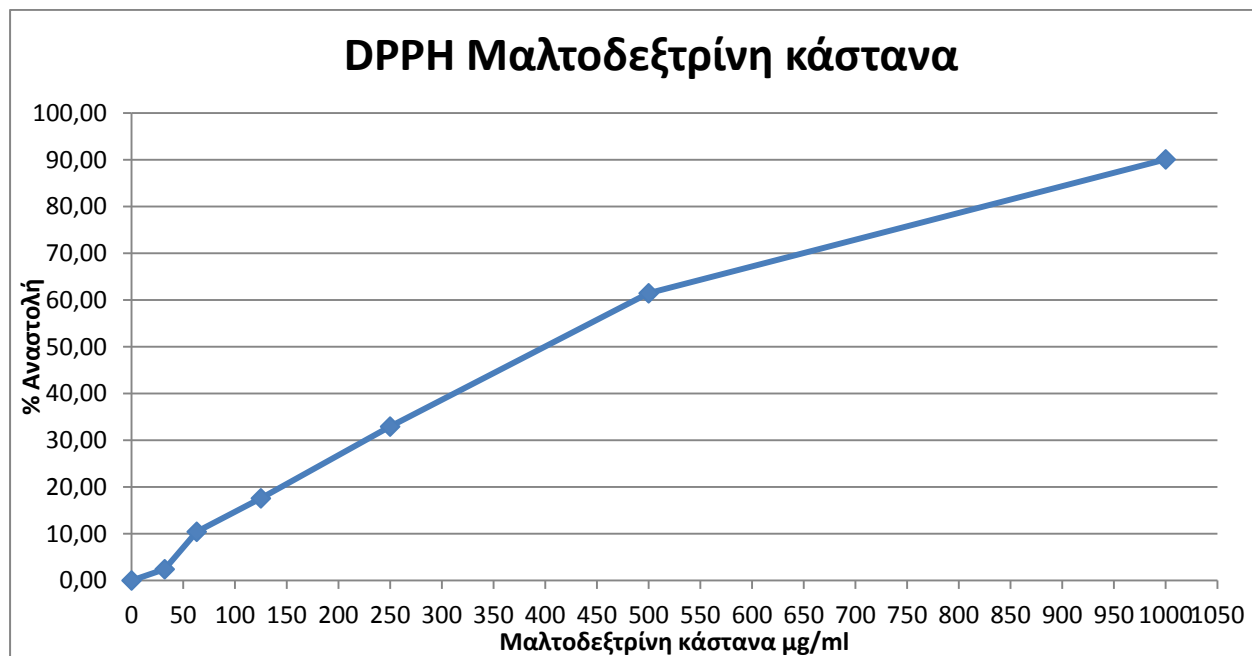
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 141,3 ± 16,9 µg/mL



Διάγραμμα 5. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα κάστανου-οροπρωτεΐνης.

### Κάστανο ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη

Η  $IC_{50}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $354,2 \pm 49,5 \mu\text{g/mL}$

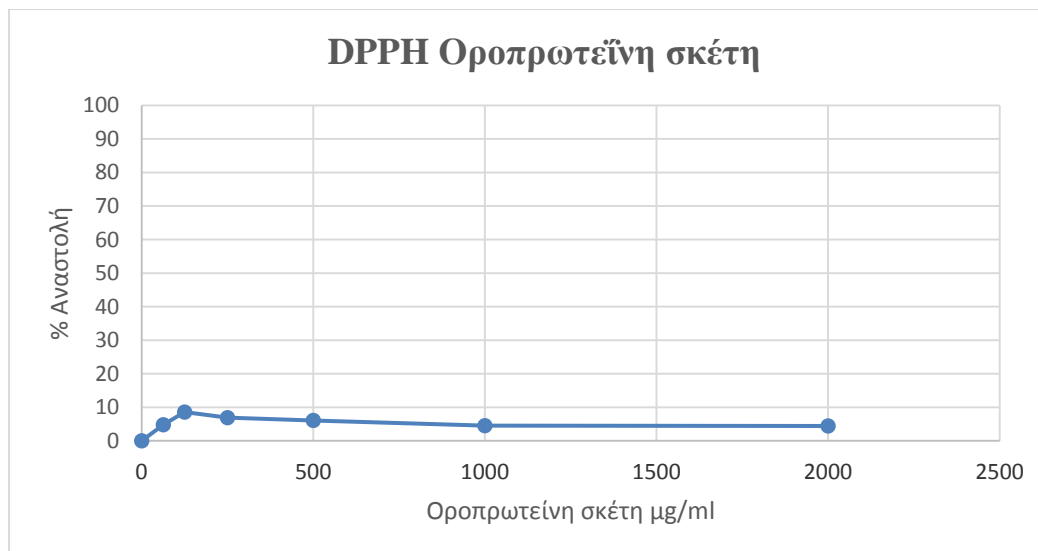


Διάγραμμα 6. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το δείγμα κάστανου μαλτοδεξτρίνης

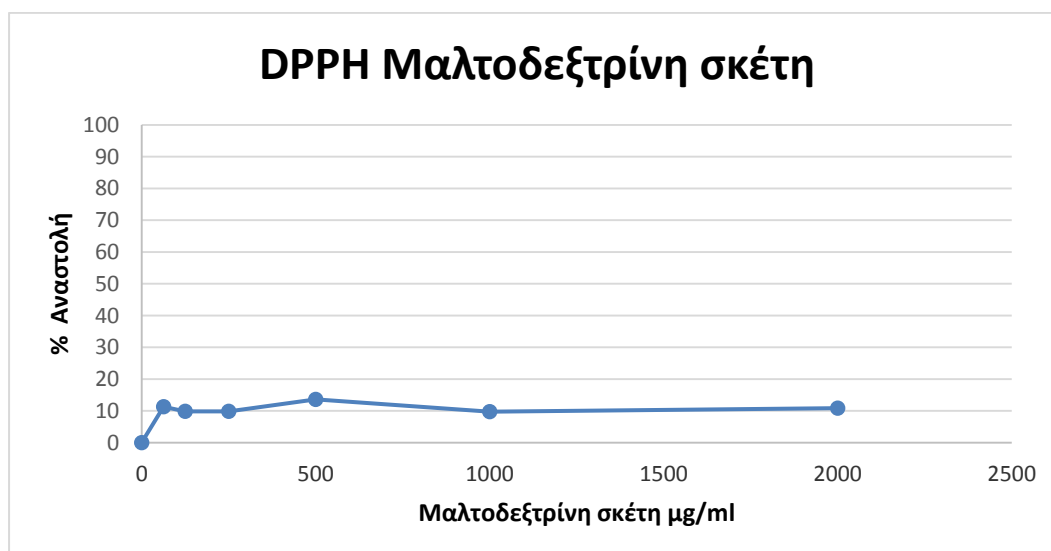
Συνολικά η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η εξής:

Σκέτο φύλλο ( $IC_{50}=19,4 \mu\text{g/mL}$ ) > σκέτο κάστανο ( $IC_{50}=79,6 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη-κάστανο ( $IC_{50}=141,3 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη φύλλο ( $IC_{50}=231,5 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-φύλλο ( $IC_{50}=242,0 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-κάστανο ( $IC_{50}=354,2 \mu\text{g/mL}$ )

Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την δράση της σκέτης οροπρωτεΐνης και της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα DPPH.



Διάγραμμα 7. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης οροπρωτεΐνης ενάντια στη ρίζα DPPH



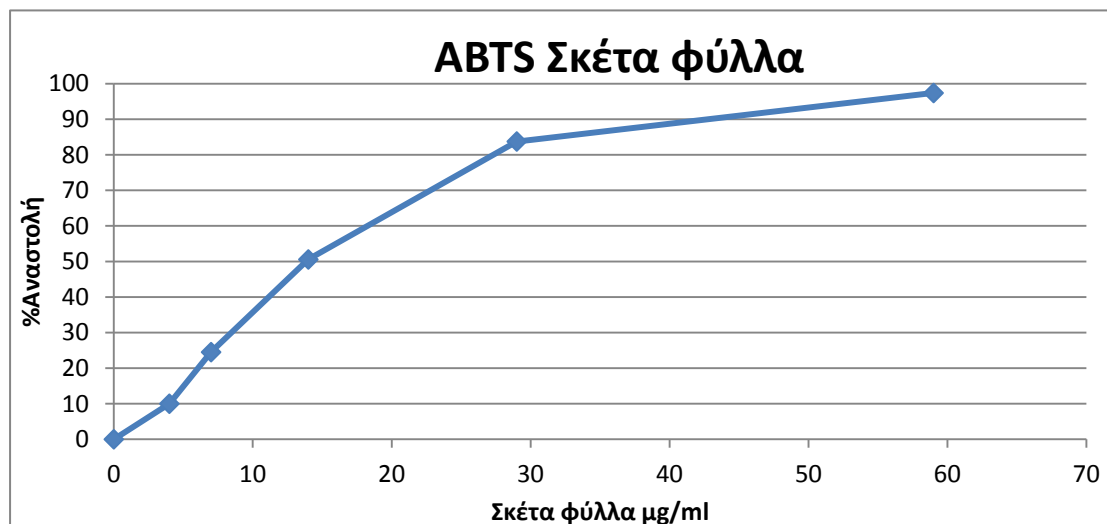
Διάγραμμα 8. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα DPPH.

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

Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος ABTS στα 730nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα.

**Σκέτο φύλλο:**

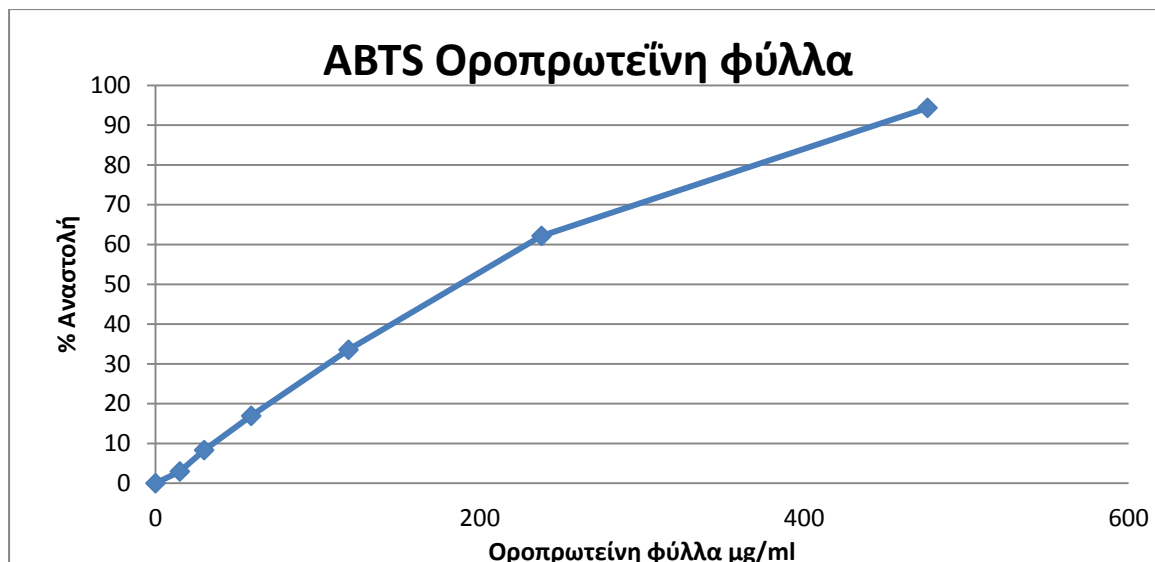
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 13,1 ± 1,2 µg/mL



Διάγραμμα 9. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα σκέτου φύλλου.

**Φύλλο-οροπρωτεΐνη**

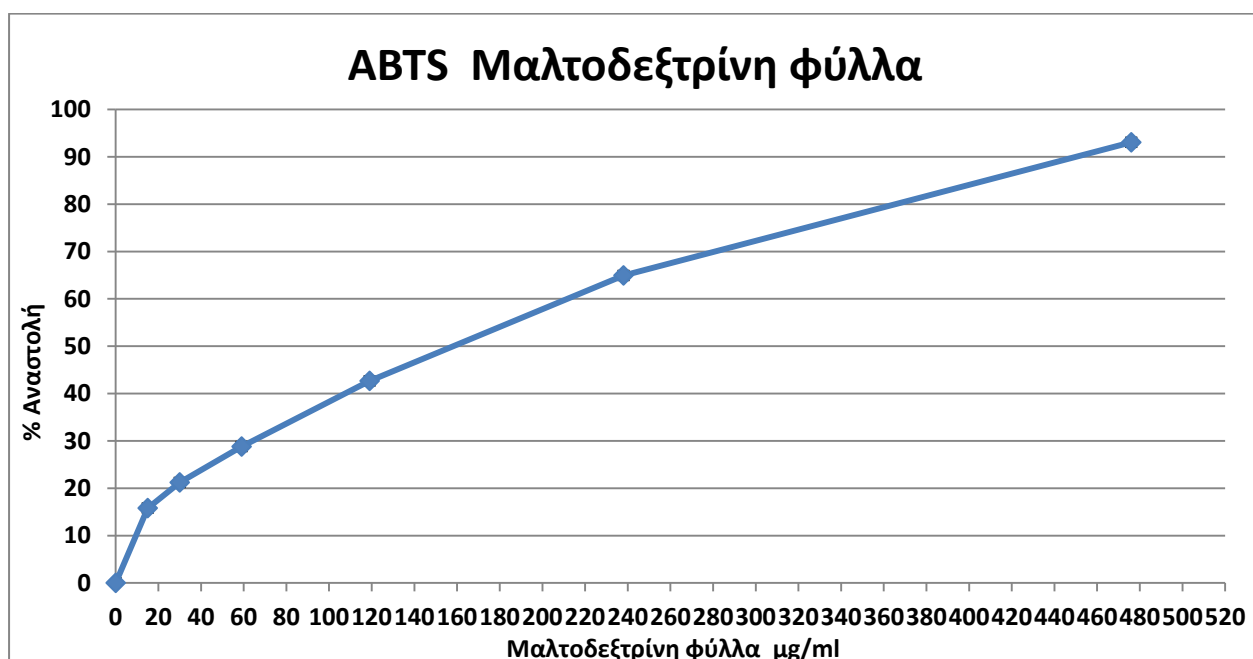
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 164,6 ± 16,4 µg/mL



Διάγραμμα 10. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα φύλλο-οροπρωτεΐνη.

#### Φύλλο-μαλτοδεξτρίνη:

Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 121,9 ± 15,8 μg/mL

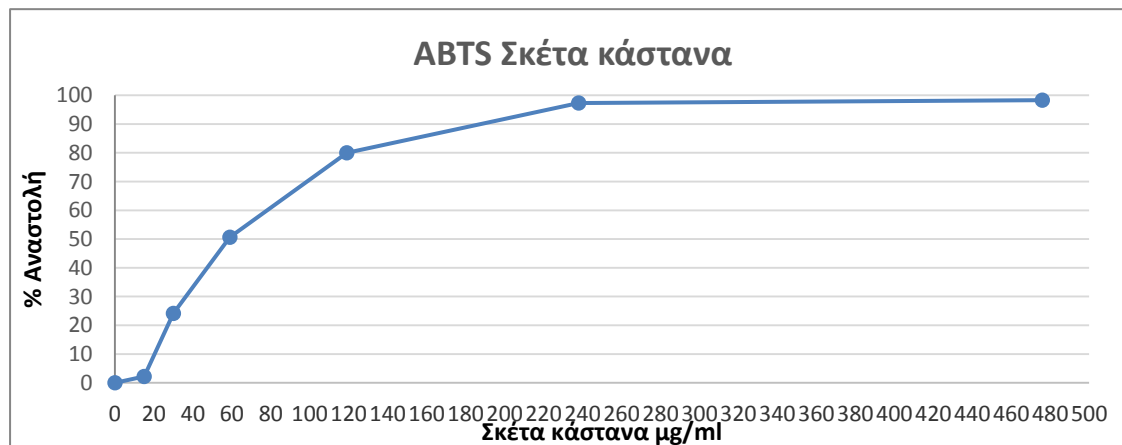


Διάγραμμα 11. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα φύλλο-μαλτοδεξτρίνη.



**Σκέτο κάστανο:**

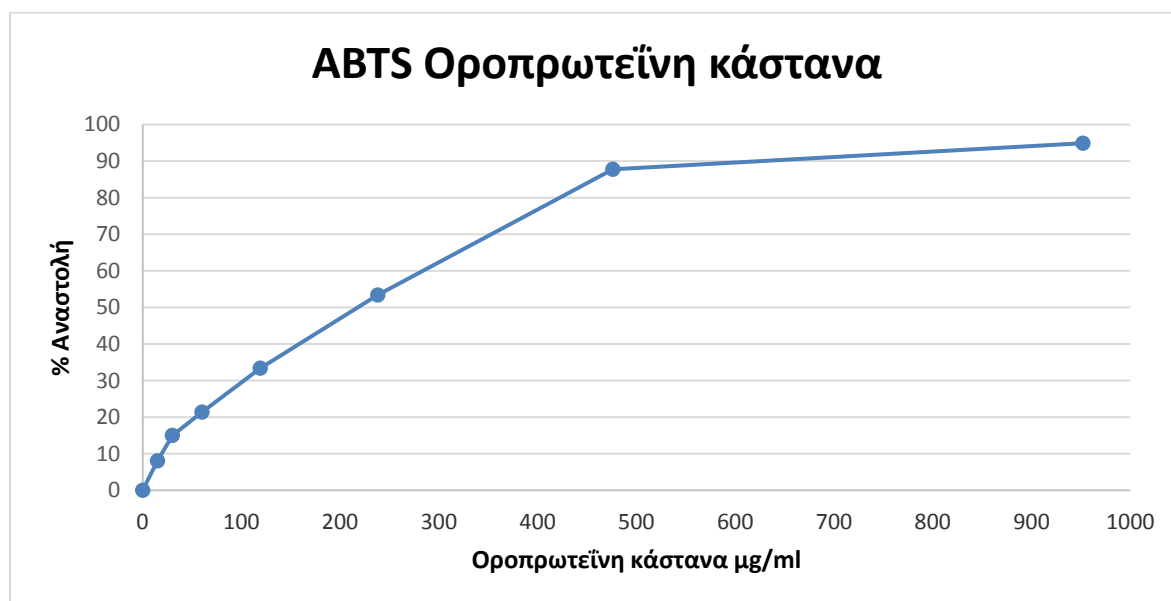
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε  $57,4 \pm 2,9$   $\mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 12. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα σκέτου κάστανου

**Κάστανο-οροπρωτεΐνη:**

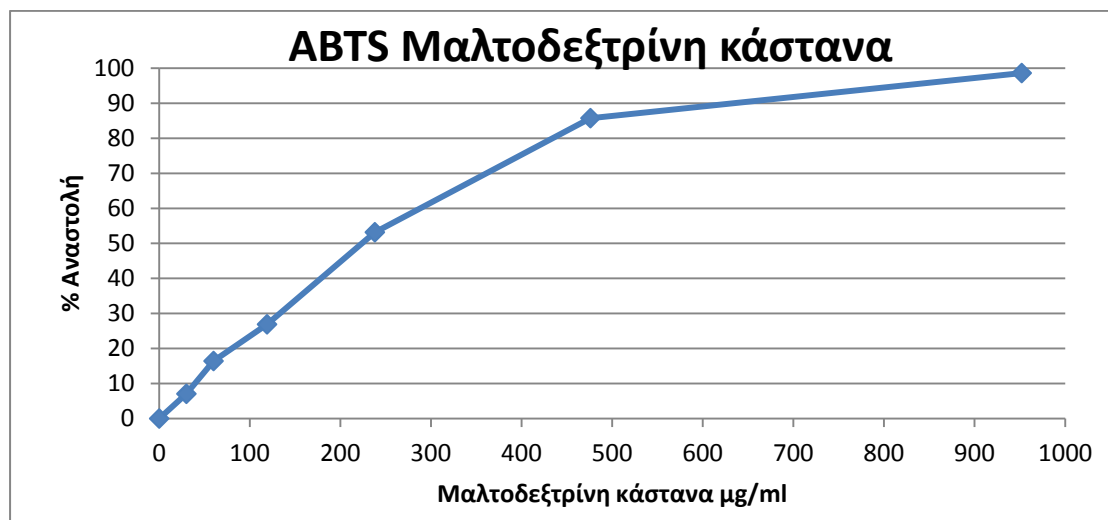
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε  $174,0 \pm 13,92$   $\mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 13. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα κάστανο-οροπρωτεΐνη

**Κάστανο-μαλτοδεξτρίνη:**

Η  $IC_{50}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $210,1 \pm 18,9 \mu\text{g/mL}$

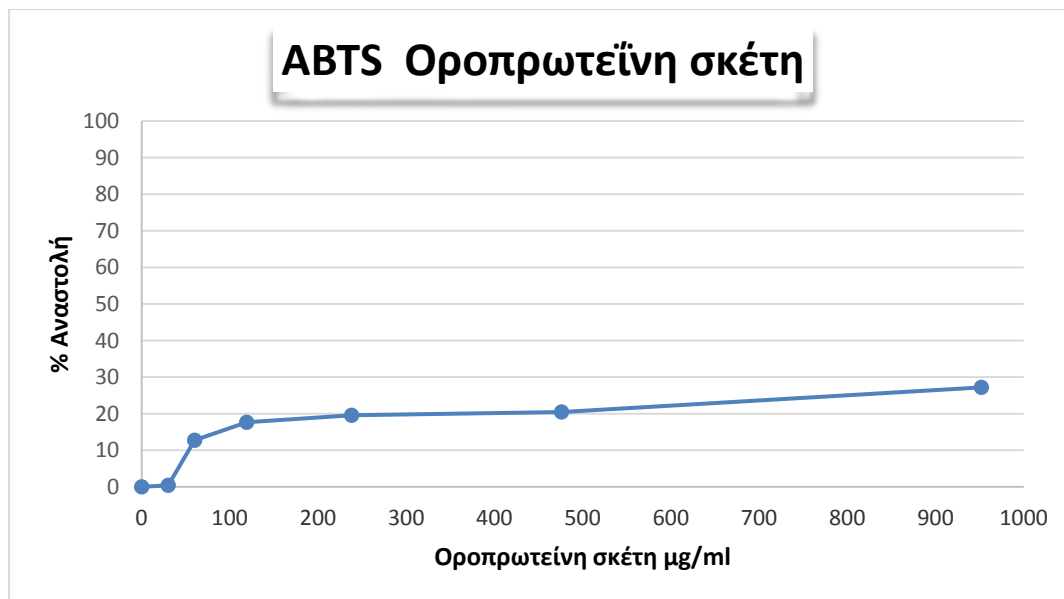


Διάγραμμα 14. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το δείγμα κάστανο-μαλτοδεξτρίνη.

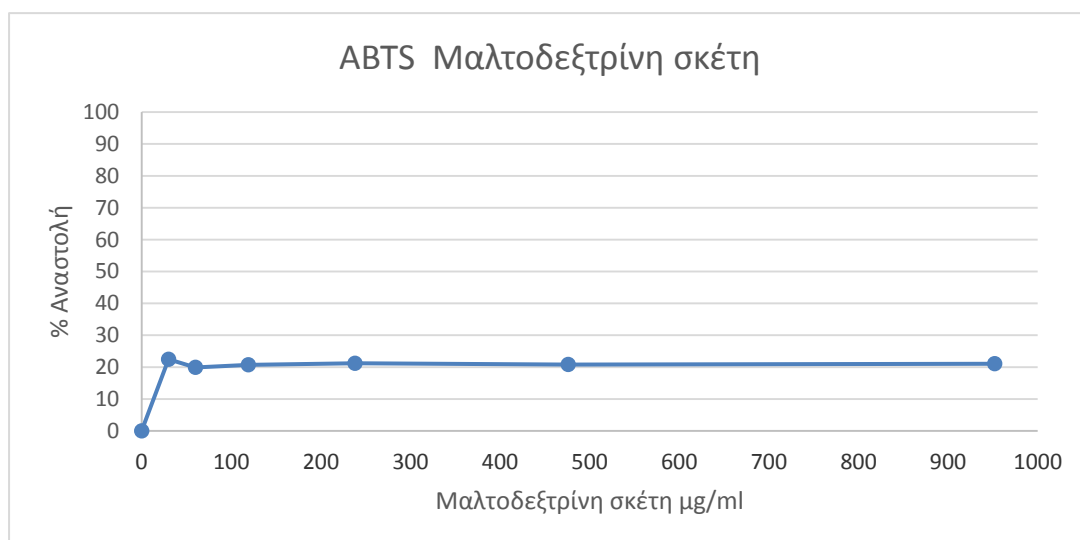
Συνολικά η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η εξής:

Σκέτο φύλλο ( $IC_{50}=13,1 \mu\text{g/mL}$ ) > σκέτο κάστανο ( $IC_{50}=57,4 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-φύλλο ( $IC_{50}=121,9 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη φύλλο ( $IC_{50}=164,6 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη-κάστανο ( $IC_{50}=174,0 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-κάστανο ( $IC_{50}=210,1 \mu\text{g/mL}$ ).

Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την δράση της σκέτης οροπρωτεΐνης και της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα ABTS.



Διάγραμμα 15. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης οροπρωτεΐνης ενάντια στη ρίζα ABTS.



Διάγραμμα 16. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα ABTS.

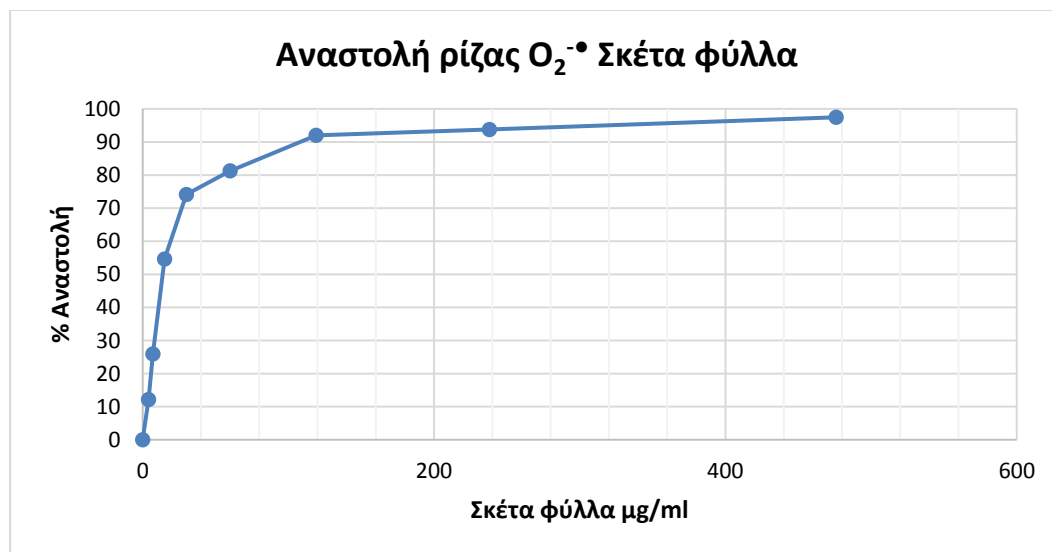
### 4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$

Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος  $O_2^{\bullet-}$ , στα 560nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$ ,

δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα δείγματα φύλλου-οροπρωτεΐνης και κάστανου-οροπρωτεΐνης, τα οποία δεν εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση.

### Σκέτο φύλλο:

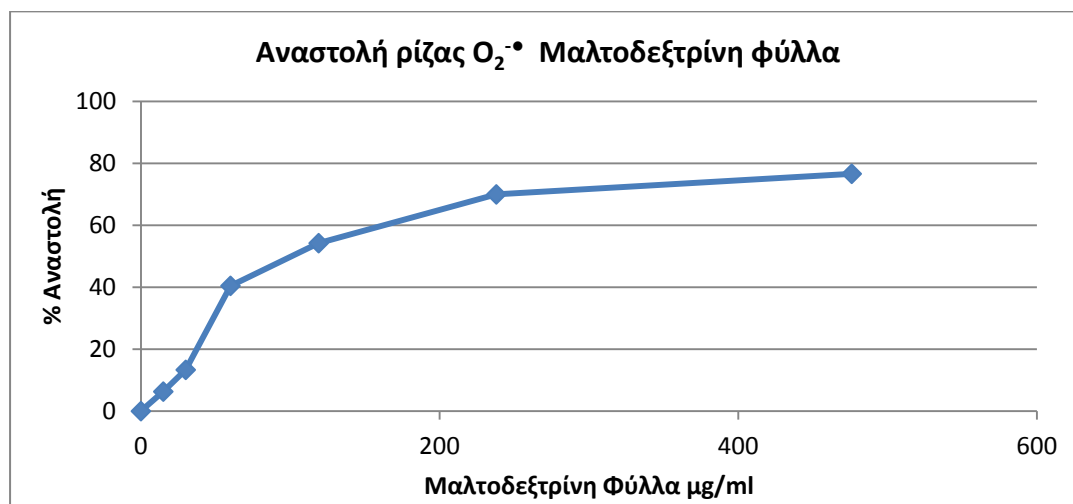
Η  $IC_{50}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $14,8 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 17. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$ , από το δείγμα σκέτου φύλλου

### Φύλλο μαλτοδεξτρίνη :

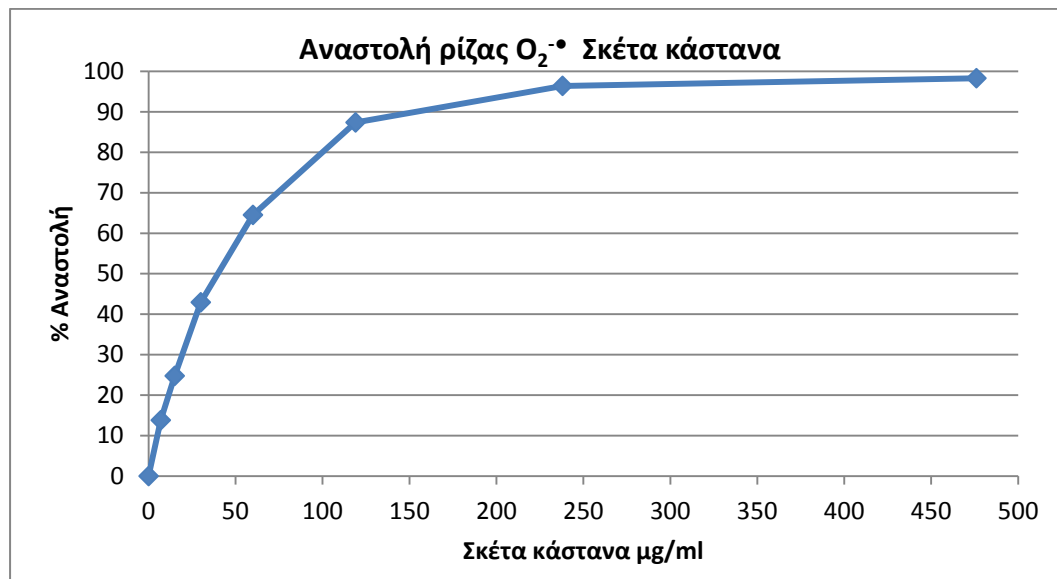
Η  $IC_{50}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $111,4 \pm 6,7 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 18. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$ , από το δείγμα φύλλο-μαλτοδεξτρίνη

**Σκέτο κάστανο:**

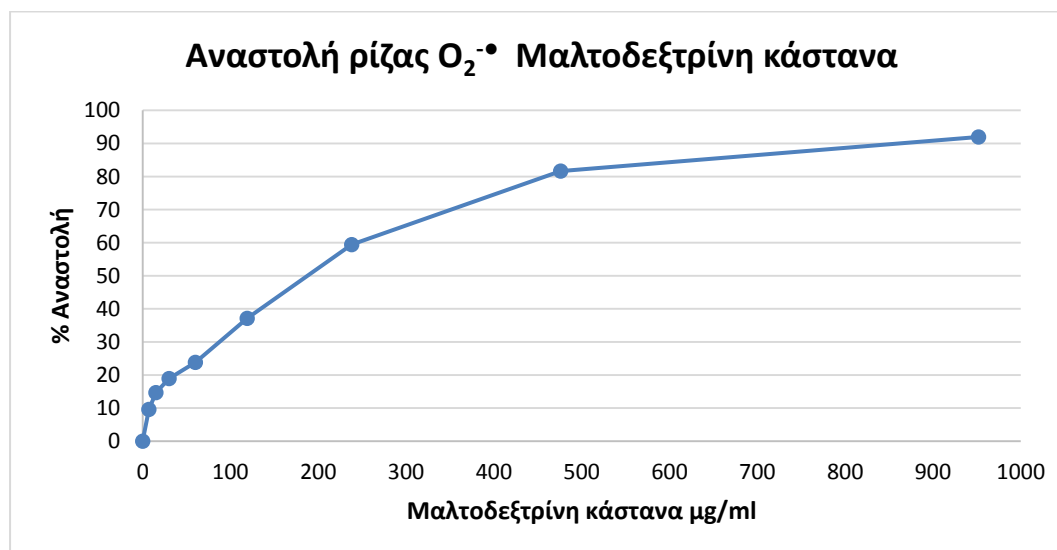
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 35,0 ± 3,15 µg/mL



Διάγραμμα 19. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, από το δείγμα σκέτου κάστανου.

**Κάστανο-μαλτοδεξτρίνη:**

Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 153,8 ± 10,7 µg/mL



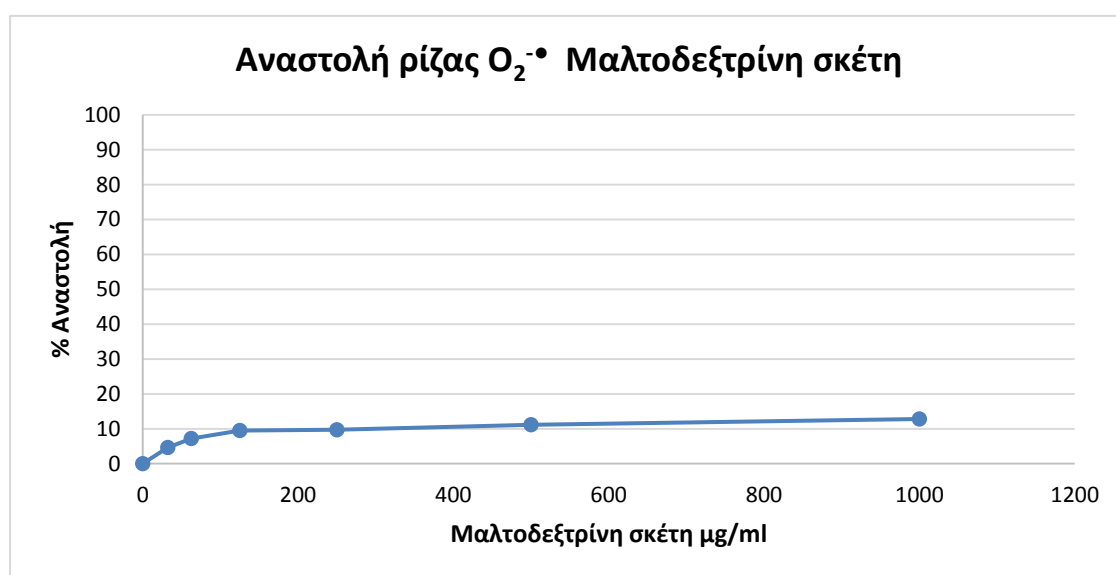
Διάγραμμα 20. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, από το δείγμα κάστανο-μαλτοδεξτρίνη.

Συνολικά η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η εξής:

Σκέτο φύλλο ( $IC_{50}=14,8 \mu\text{g/mL}$ ) > σκέτο κάστανο ( $IC_{50}=35,0 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-φύλλο ( $IC_{50}=111,4 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-κάστανο ( $IC_{50}=153,8 \mu\text{g/mL}$ ).

Όπως αναφέραμε, τα ενθυλακωμένα με οροπρωτεΐνη εκχυλίσματα φύλλου και κάστανου δεν εμφάνισαν καμία αντιοξειδωτική δράση.

Παρακάτω φαίνεται το διαγράμμα που απεικονίζει την δράση της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$ .



Διάγραμμα 21. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$ .

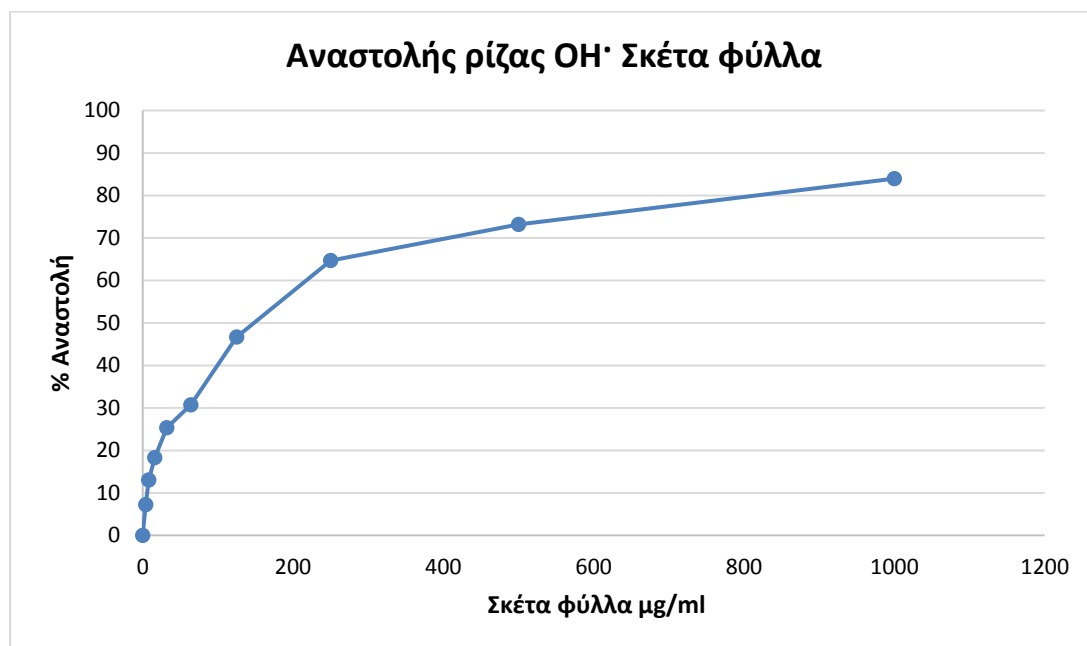
#### 4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $OH^{\bullet}$ .

Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος  $OH^{\bullet}$  στα 520nm, γεγονός που δείχνει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο στη συγκεκριμένη μέθοδο τα δείγματα του σκέτου φύλλου και του σκέτου κάστανου βρέθηκαν λιγότερο ισχυρά σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους καθώς οι τιμές  $IC_{50}$  είναι συγκριτικά αρκετά υψηλότερες. Αυτό εκφράζει μια σχετική δυσκολία στην

εξουδετέρωση της ρίζας OH<sup>·</sup> σε σχέση με τις υπόλοιπες ρίζες. Αξιοσημείωτο είναι επίσης πως το δείγμα του σκέτου κάστανου παρουσίασε μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα φύλλου ενθυλακωμένα με οροπρωτεΐνη και μαλτοδεξτρίνη, αλλά και από το δείγμα κάστανου ενθυλακωμένου με μαλτοδεξτρίνη.

### Σκέτο φύλλο:

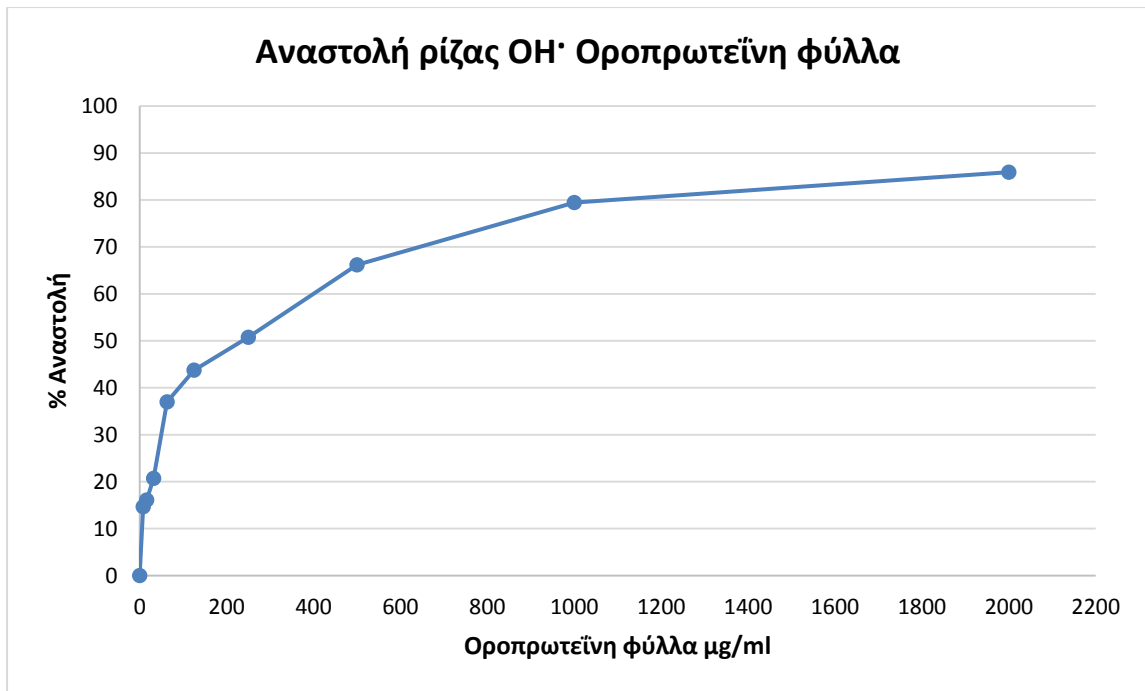
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 135,4 ± 6,7 μg/mL



Διάγραμμα 22. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>·</sup> από το δείγμα σκέτου φύλλου

### Φύλλο-οροπρωτεΐνη:

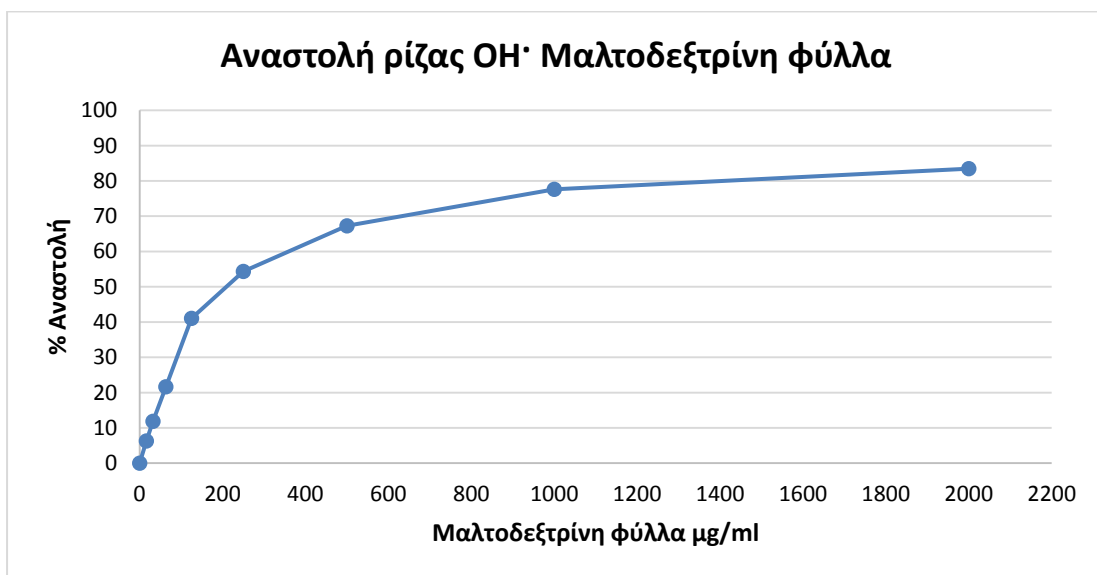
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 178, μg/mL 1 ± 8,9



Διάγραμμα 23. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>-</sup> από το δείγμα φύλλο-οροπρωτεΐνη.

### **Φύλλο-μαλτοδεξτρίνη:**

Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 228,1 ± 9,1 μg/mL

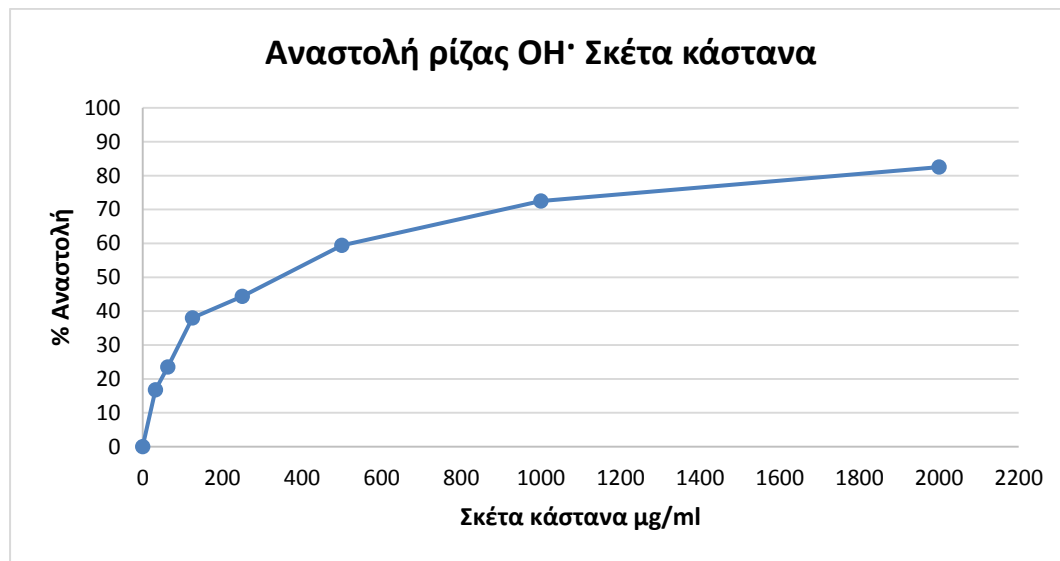


Διάγραμμα 24. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>-</sup> από το δείγμα φύλλο-μαλτοδεξτρίνη.



**Σκέτο κάστανο:**

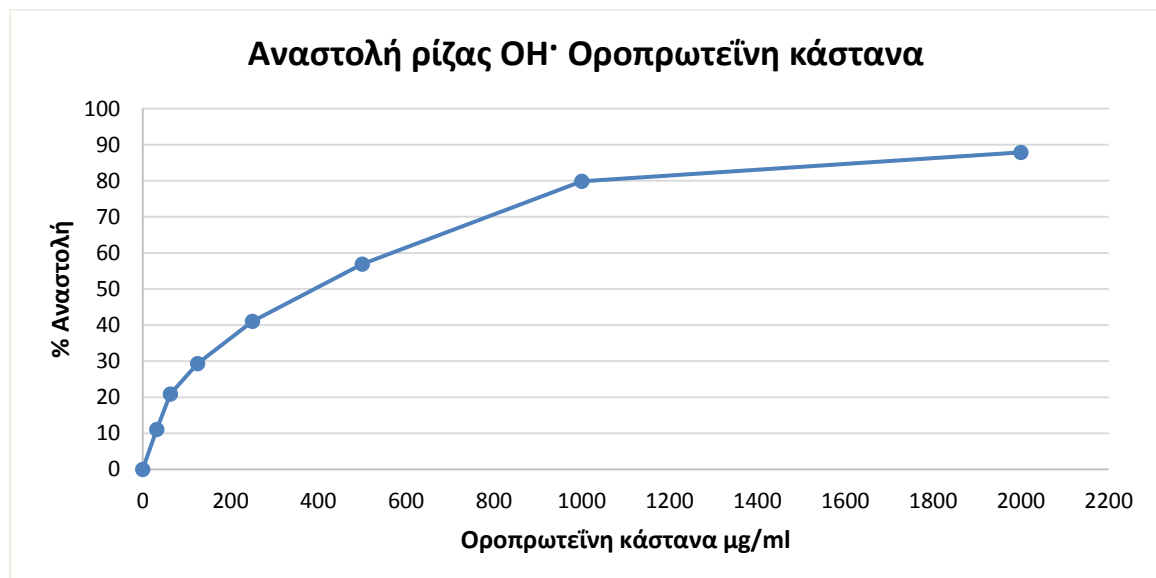
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 287,0 ± 17,2 µg/mL



Διάγραμμα 25. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>•</sup> από το δείγμα σκέτου κάστανου.

**Κάστανο-οροπρωτεΐνη:**

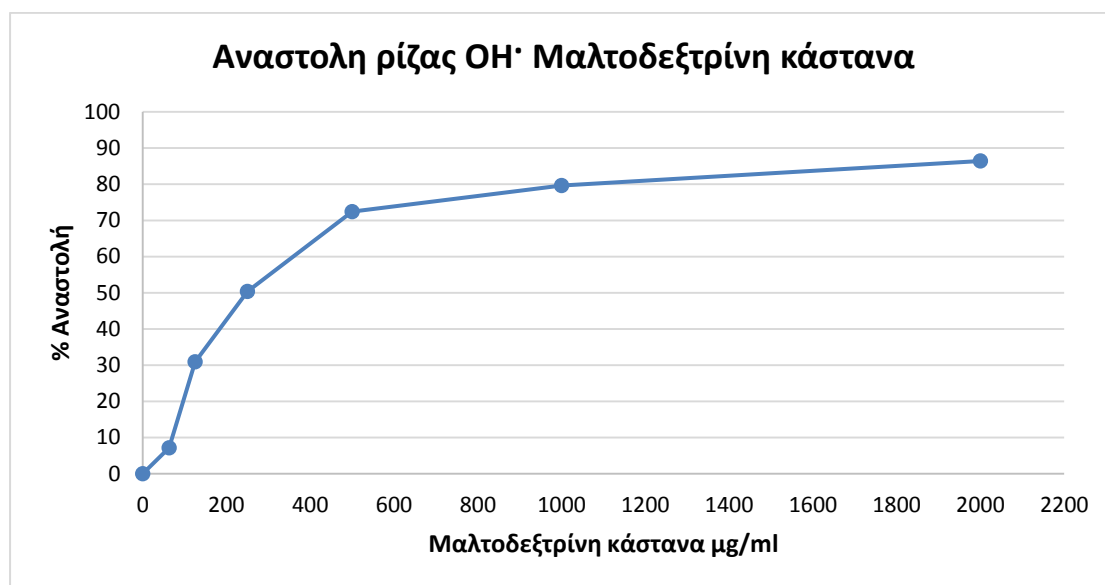
Η IC<sub>50</sub> του δείγματος υπολογίστηκε 315,5 ± 15,8 µg/mL



Διάγραμμα 26. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας OH<sup>•</sup> από το δείγμα κάστανου-οροπρωτεΐνης.

**Κάστανο-μαλτοδεξτρίνη:**

Η  $IC_{50}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $265,3 \pm 23,9 \mu\text{g/mL}$

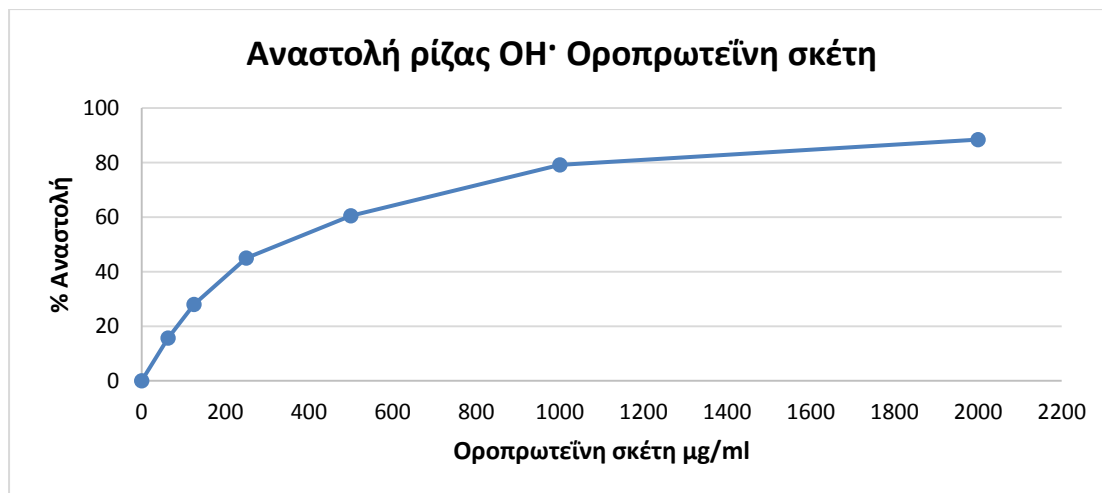


Διάγραμμα 27. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ΟΗ΄ από το δείγμα κάστανου-μαλτοδεξτρίνης.

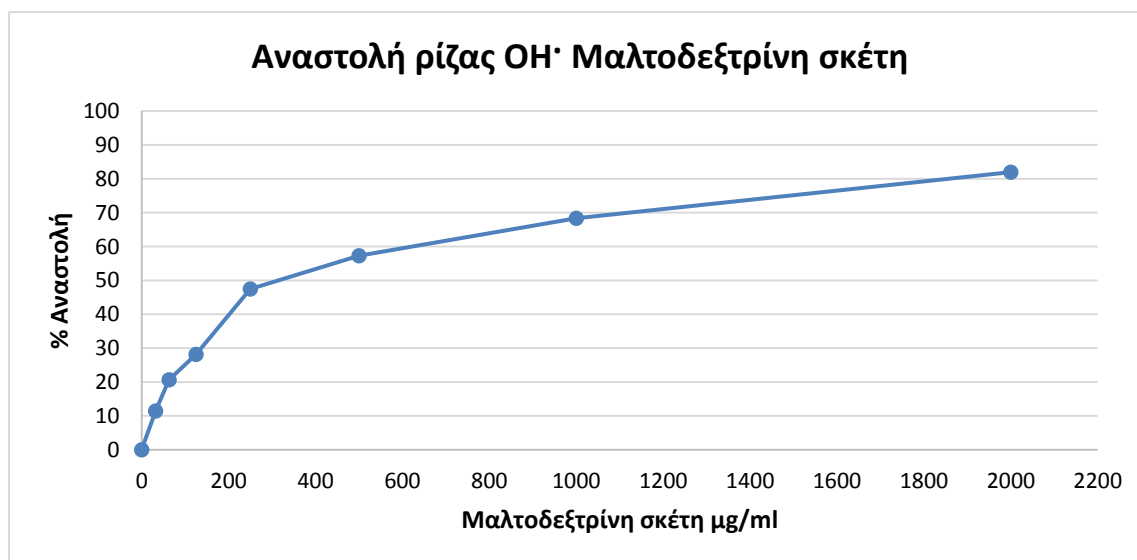
Συνολικά η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η εξής:

Σκέτο φύλλο ( $IC_{50}=135,4 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη φύλλο ( $IC_{50}=178,1 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-φύλλο ( $IC_{50}=228,1 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-κάστανο ( $IC_{50}=265,3 \mu\text{g/mL}$ ) > σκέτο κάστανο ( $IC_{50}=287,0 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη-κάστανο ( $IC_{50}=315,5 \mu\text{g/mL}$ ).

Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την δράση της σκέτης οροπρωτεΐνης και της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα ΟΗ΄.



Διάγραμμα 28. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης Οροπρωτεΐνης ενάντια στη ρίζα OH<sup>-</sup>.



Διάγραμμα 29. Το διάγραμμα απεικονίζει τη δράση της σκέτης μαλτοδεξτρίνης ενάντια στη ρίζα OH<sup>-</sup>.

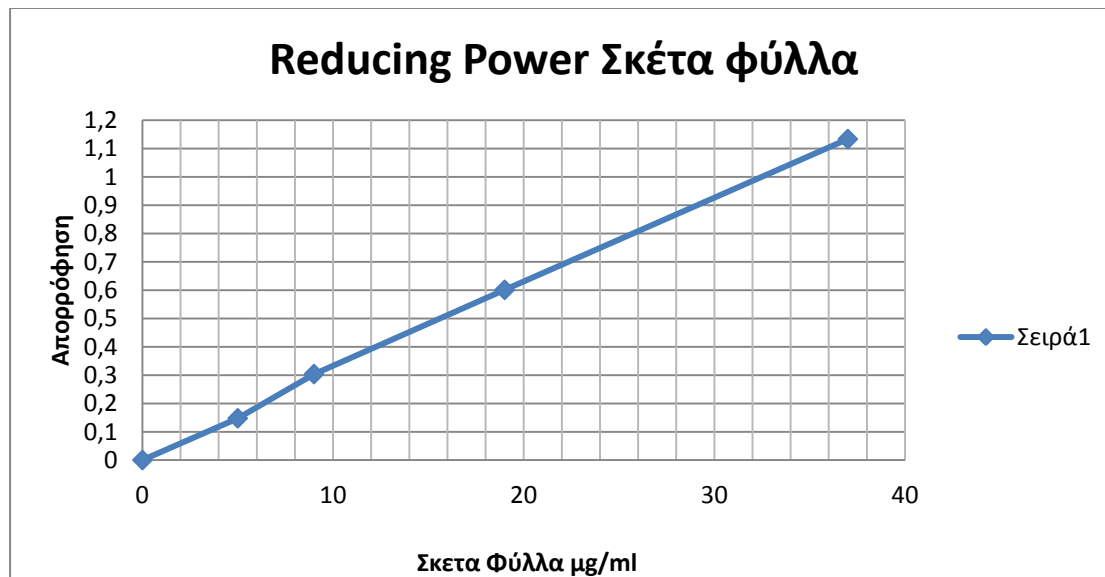
Παρατηρούμε ότι τόσο η σκέτη οροπρωτεΐνη όσο και η σκέτη μαλτοδεξτρίνη παρουσιάζουν ισχυρή δράση ενάντια στη ρίζα OH<sup>-</sup> και εμφανίζουν IC<sub>50</sub> με τιμές  $308,3 \pm 15,4$  μg/mL και  $342,2 \pm 30,8$  μg/mL αντίστοιχα.

#### 4.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.

Συνολικά μελετήθηκαν 6 εκχυλίσματα. Για τη μέθοδο της αναγωγικής δύναμης προσδιορίστηκε η τιμή RP<sub>0.5AU</sub> του κάθε εκχυλίσματος, δηλαδή η τιμή της συγκέντρωσης που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm.

**Σκέτο φύλλο:**

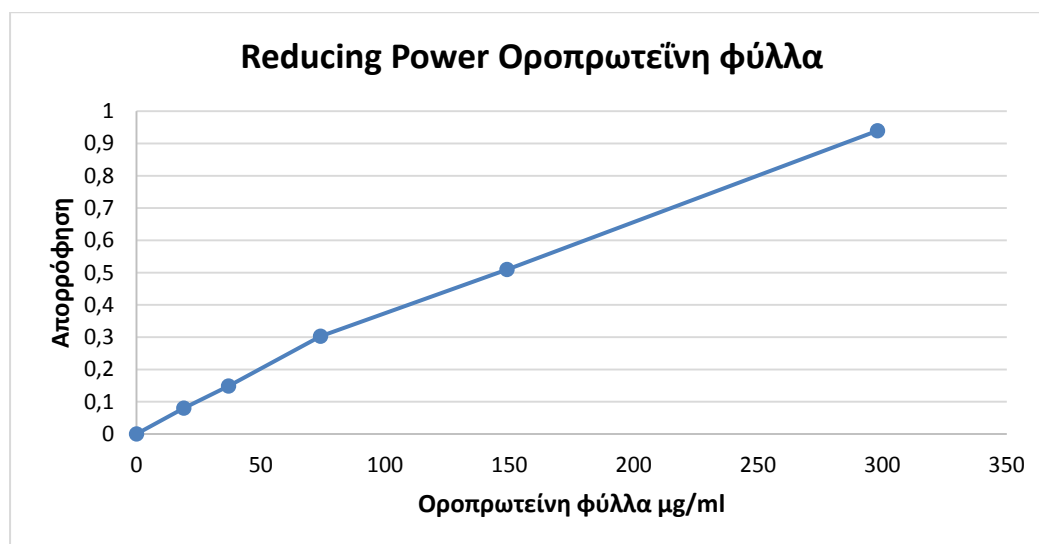
Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $16,0 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 30. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα του σκέτου φύλλου.

**Φύλλο-οροπρωτεΐνη:**

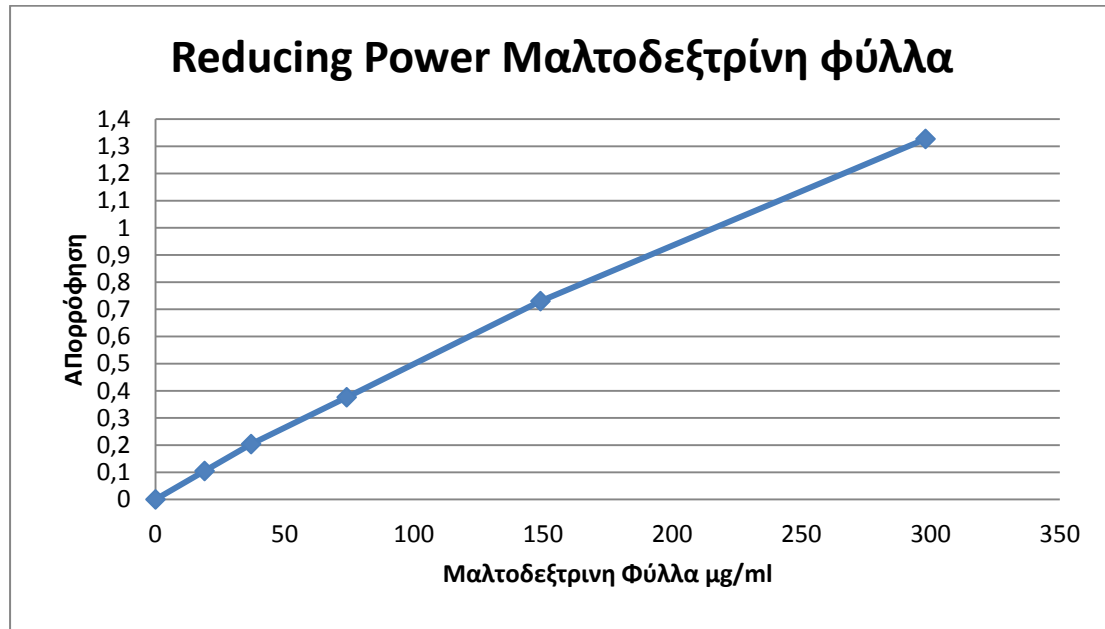
Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $150,9 \pm 10,6 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 31. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα του φύλλο-οροπρωτεΐνη

**Φύλλο-μαλτοδεξτρίνη:**

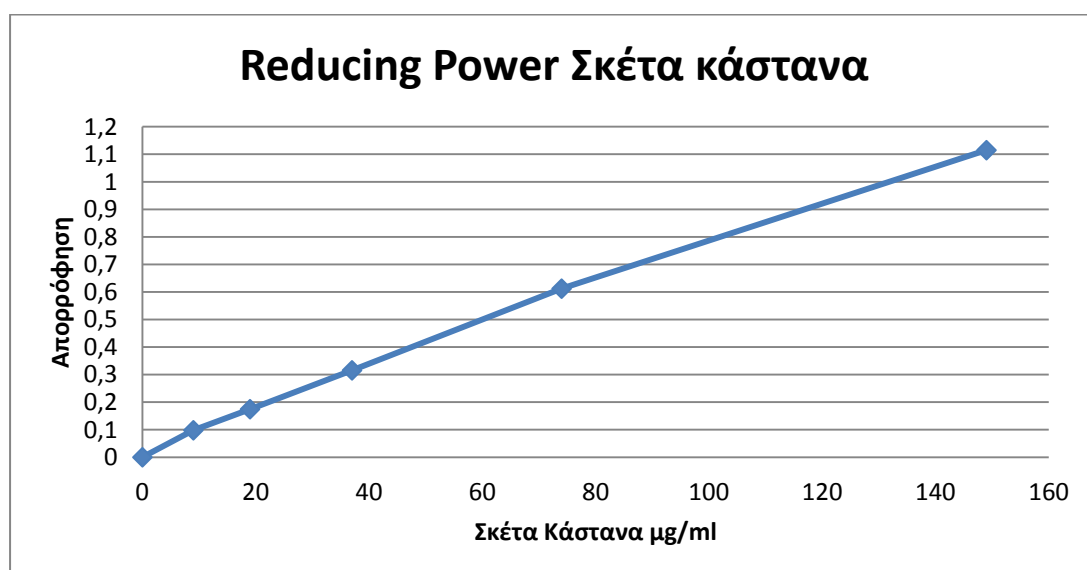
Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $105,9 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 32. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα του φύλλο-μαλτοδεξτρίνη.

**Σκέτο κάστανο:**

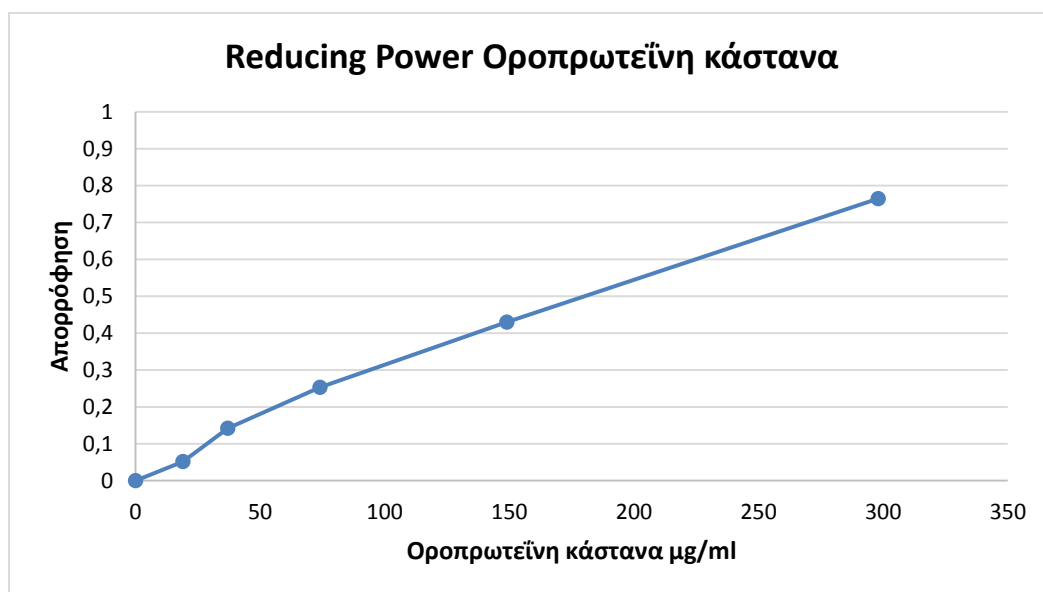
Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $63,4 \pm 7,6 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 33. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα του σκέτου κάστανου

**Κάστανο-οροπρωτεΐνη:**

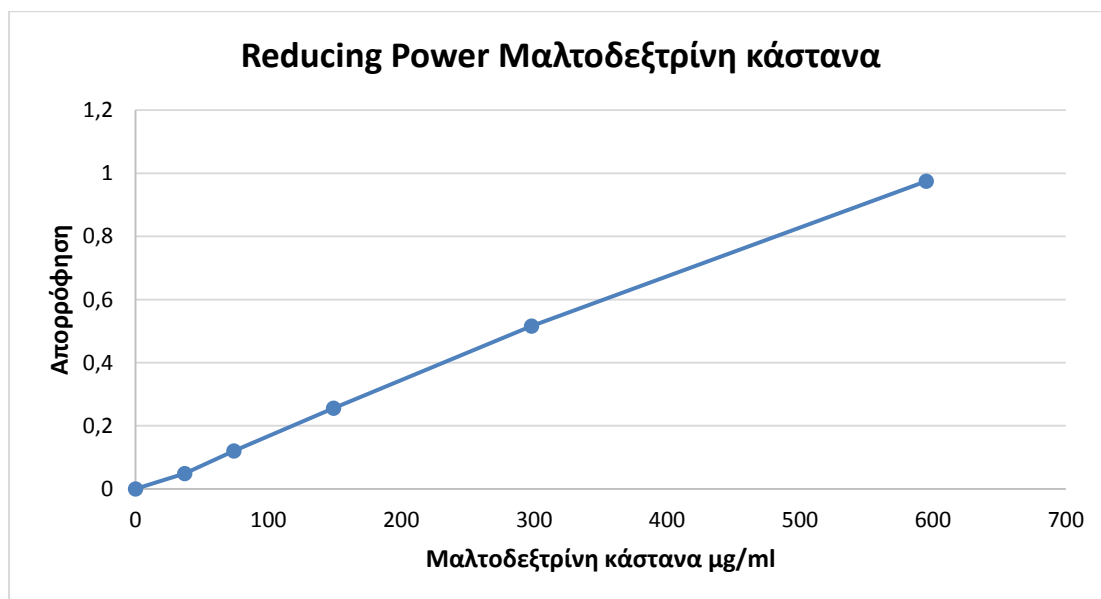
Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $198,6 \pm 17,9 \mu\text{g/mL}$



Διάγραμμα 34. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα κάστανο-οροπρωτεΐνη

**Κάστανο-μαλτοδεξτρίνη:**

Η  $RP_{0.5AU}$  του δείγματος υπολογίστηκε  $301,3 \pm 24,1 \mu\text{g/mL}$

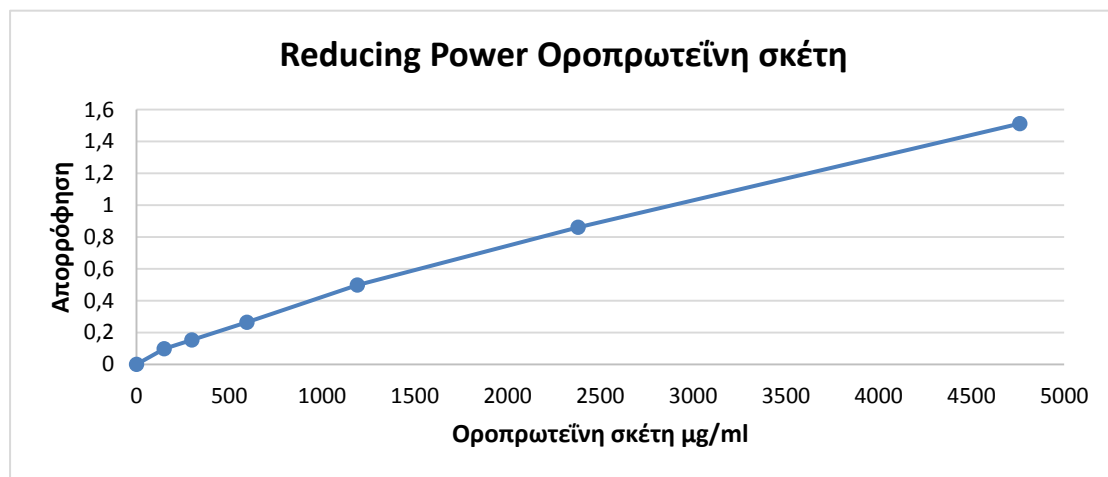


Διάγραμμα 35. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα κάστανο-μαλτοδεξτρίνη.

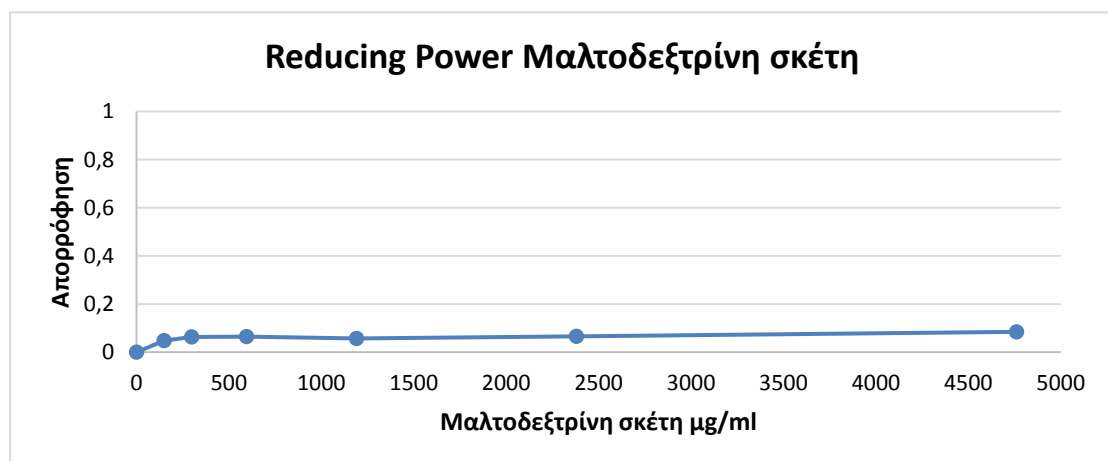
Συνολικά η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η εξής:

Σκέτο φύλλο ( $RP_{0.5AU} = 16,0 \mu\text{g/mL}$ ) > σκέτο κάστανο ( $RP_{0.5AU} = 63,4 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-φύλλο ( $RP_{0.5AU} = 105,9 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη-φύλλο ( $RP_{0.5AU} = 150,9 \mu\text{g/mL}$ ) > οροπρωτεΐνη-κάστανο ( $RP_{0.5AU} = 198,6 \mu\text{g/mL}$ ) > μαλτοδεξτρίνη-κάστανο ( $RP_{0.5AU} = 301,3 \mu\text{g/mL}$ ).

Παρακάτω απεικονίζονται και τα διαγράμματα της αναγωγικής δύναμης της οροπρωτεΐνης και της μαλτοδεξτρίνης.



Διάγραμμα 36. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα της σκέτης οροπρωτεΐνης.



Διάγραμμα 37. Το διάγραμμα απεικονίζει την απορρόφηση στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις, από το δείγμα της σκέτης μαλτοδεξτρίνης.

Όπως βλέπουμε η σκέτη οροπρωτεΐνη εμφανίζει  $RP_{0.5AU} = 1390,7 \pm 97,3 \mu\text{g/mL}$ .

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σημασία της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα μεγάλη, καθώς αποτελεί την πρώτη μελέτη σε εκχυλίσματα από ελληνικές καστανιές, και συγκεκριμένα από καστανιές της περιοχής της Μελιβοίας, στη Λάρισα. Όπως αναφέρθηκε, σε προηγούμενη μελέτη είχε πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των δειγμάτων σε άριστες συνθήκες με τη τεχνική Microwave Assisted Extraction (MAE), χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μετατροπή των εκχυλισμάτων σε μορφή σκόνης με την τεχνική freeze-drying. Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, στόχος ήταν η περαιτέρω μελέτη και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων από το φυτό *Castanea sativa*.

Συγκεκριμένα είχαμε 6 δείγματα (διάλυμα σκέτου φύλλου, διάλυμα φύλλου ενθυλακωμένου σε οροπρωτεΐνη, διάλυμα φύλλου ενθυλακωμένου σε μαλτοδεξτρίνη, διάλυμα σκέτου κάστανου, διάλυμα κάστανου ενθυλακωμένου σε οροπρωτεΐνη και διάλυμα κάστανου ενθυλακωμένου σε μαλτοδεξτρίνη), τα οποία μελετήσαμε με 5 διαφορετικές φασφατοφωτομετρικές μεθόδους.

Με τη μέθοδο της DPPH, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εύρος τιμών του  $IC_{50}$  κυμαίνεται από **19,4  $\mu\text{g/mL}$**  έως **231,5  $\mu\text{g/mL}$** . Με τη μέθοδο ABTS, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εύρος τιμών του  $IC_{50}$  κυμαίνεται από **13,1  $\mu\text{g/mL}$**  έως **174,0  $\mu\text{g/mL}$** . Οι παρατηρούμενες διαφορές στην αλλαγή της σειράς δραστηριότητας μεταξύ των μεθόδων DPPH• και ABTS•+ μπορεί να εξηγηθεί από τη χρήση διαφορετικών διαλυτών στην κάθε μέθοδο. Συγκεκριμένα, στη μέθοδο DPPH•, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι η μεθανόλη και άρα αναμένεται να παρουσιάζουν δράση κυρίως μη πολικές ενώσεις. Από την άλλη, στη μέθοδο ABTS•+, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το νερό. Έτσι αναμένεται να παρουσιάζουν δράση κυρίως υδρόφιλες ενώσεις. (Kreatsouli et.al. , 2019)

Επιπλέον, για τη μέθοδο ABTS•+, πρέπει να σημειώσουμε το δείγμα της σκέτης οροπρωτεΐνης παρουσιάζει μια μικρή αντιοξειδωτική δράση έναντι στη ρίζα ABTS•+, καθώς από το διάγραμμα της φαίνεται ότι στα **950  $\mu\text{g/mL}$**  παρατηρείται μια αναστολή της ρίζας, περίπου της τάξης του 30%. Όπως έχουμε αναφέρει κατά την ενθυλάκωση των δειγμάτων με οροπρωτεΐνη, έχουμε 90% οροπρωτεΐνη και 10% το αντίστοιχο εκχύλισμα. Με άλλα λόγια στα 100  $\mu\text{g}$  ενθυλακωμένου δείγματος



περιέχονται 90  $\mu\text{g}$  οροπρωτεΐνης. Από τα διαγράμματα τώρα των ενθυλακωμένων σε οροπρωτεΐνη εκχυλισμάτων φύλλου και κάστανου, παρατηρούμε ότι περίπου στην συγκέντρωση 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , υπάρχει πλήρης (100%) αναστολή της ρίζας ABTS $\bullet+$ . Με μια απλή μέθοδο των τριών βρίσκουμε ότι στα 500  $\mu\text{g}$  περιέχονται 450  $\mu\text{g}$  σκέτης οροπρωτεΐνης. Στη τιμή της συγκέντρωσης 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  της σκέτης οροπρωτεΐνης υπάρχει αναστολή της ρίζας ABTS $\bullet+$  κατά 20%. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι στα ενθυλακωμένα σε οροπρωτεΐνη εκχυλίσματα φύλλου και κάστανου, υπάρχει φανερή συνεργική δράση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με το ενθυλακωτικό μέσο και σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των συγκεκριμένων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, κατά τη συλλογική αυτή δράση, το 80% της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων οφείλεται στις πολυφαινόλες τόσο του φύλλου όσο και του κάστανου, ενώ μόλις το 20% στη σκέτη οροπρωτεΐνη.

Εκτός από τις ρίζες DPPH $\bullet$  και ABTS $\bullet+$ , εξετάστηκε και η ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στις ρίζες OH $\bullet$  και O $_2^{\bullet-}$  που είναι παρούσες στους ζωντανούς οργανισμούς. Με τη μέθοδο αναστολής της ρίζας σουπεροξειδίου O $_2^{\bullet-}$  τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εύρος τιμών του IC $_{50}$  κυμαίνεται από **14,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$**  έως **153,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$** . Γνωρίζουμε πως η ρίζα σουπεροξειδίου O $_2^{\bullet-}$  αποτελεί μία από τις πιο κοινές και δραστικές ρίζες που έχουν βρεθεί σε ζωντανούς οργανισμούς και μπορεί να σχηματιστεί *in vivo* με ποικίλους τρόπους, όπως για παράδειγμα μέσω των αντιδράσεων των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, οι οποίες μπορούν να κλιμακωθούν με τη γήρανση. Επομένως, είναι εξαιρετικά σημαντικό να βρίσκονται ενώσεις που να μπορούν να εξουδετερώνουν αυτές τις ρίζες, ώστε να ενισχύεται η πρόληψη έναντι σε ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα που συγκεντρώνουμε από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα, μπορούμε να πούμε ότι είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς φαίνεται να αναστέλλουν την ρίζα O $_2^{\bullet-}$  σε μεγάλο βαθμό. (Stagos et.al, 2018).

Με τη μέθοδο αναστολή της ρίζας OH $\bullet$ , τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εύρος τιμών του IC $_{50}$  κυμαίνεται από **135,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$**  έως **315,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$** . Όπως γνωρίζουμε, η ρίζα OH $\bullet$  αποτελεί τη βασική δραστική μορφή οξυγόνου στους ζωντανούς οργανισμούς (Stagos et.al, 2018). Συγκεκριμένα, οι ρίζες OH $\bullet$  είναι πολύ δραστικές και μπορούν

να βλάβουν όλους τους τύπους μακρομορίων (υδατάνθρακες, λιπίδια, αμινοξέα). Αντιδρούν με τη δεσοξυριβόζη ή με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλούν θραύση στους κλώνους οδηγώντας σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα. (Κερασιώτη, 2019). Επομένως, η εξουδετέρωση αυτών των ριζών έχει εξαιρετική σημασία για την πρόληψη σοβαρών ασθενειών. Όπως αναφέραμε, στη συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρήθηκε η ασθενέστερη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του σκέτου φύλλου και του σκέτου κάστανου συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους. Αυτό οφείλεται στην ισχυρή ρίζα του  $\text{OH}\cdot$ . Ωστόσο η αντιοξειδωτική δράση τους δεν παύει να είναι και σε αυτή τη μέθοδο σημαντική. Επιπρόσθετα, σε αυτήν την μέθοδο θα πρέπει να τονιστεί ότι παρουσιάστηκε σημαντική αντιοξειδωτική δράση στα δείγματα της σκέτης οροπρωτεΐνης και της σκέτης μαλτοδεξτρίνης. Συγκεκριμένα τα δείγματα αυτά, παρουσίασαν  $\text{IC}_{50}$  ίσο με **308  $\mu\text{g/mL}$**  και **342,2  $\mu\text{g/mL}$**  αντίστοιχα. Τα ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη εκχυλίσματα φύλλου και κάστανου, παρουσίασαν αρκετά μικρότερο  $\text{IC}_{50}$  (**228  $\mu\text{g/mL}$**  και **265,3  $\mu\text{g/mL}$** ) από το δείγμα της σκέτης μαλτοδεξτρίνης, και άρα υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Αυτό σημαίνει πως τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα τόσο του φύλλου όσο και του κάστανου έδρασαν συνεργικά με τη μαλτοδεξτρίνη, ενισχύοντας σε σημαντικό βαθμό την αντιοξειδωτική δράση των ενθυλακωμένων με μαλτοδεξτρίνη δειγμάτων. Επιπλέον, το ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη εκχύλισμα φύλλου παρουσίασε σημαντικά μικρότερο  $\text{IC}_{50}$  (**178,1  $\mu\text{g/mL}$** ) από το δείγμα της σκέτης οροπρωτεΐνης. Και εδώ συμπεραίνουμε ότι το πολυφαινολικό εκχύλισμα του φύλλου έδρασε συνεργικά με την οροπρωτεΐνη, ενισχύοντας κατά μεγάλο βαθμό την αντιοξειδωτική δράση του ενθυλακωτικού μέσου. Ωστόσο, δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο για το δείγμα του ενθυλακωμένου με οροπρωτεΐνη κάστανου, το οποίο παρουσίασε σχεδόν ίδια τιμή  $\text{IC}_{50}$  (**315,5  $\mu\text{g/mL}$** ) με τη σκέτη οροπρωτεΐνη. Με βάση αυτό, λοιπόν, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως το πολυφαινολικό εκχύλισμα του κάστανου δεν έδρασε συνεργικά με την οροπρωτεΐνη, καθώς δεν κατάφερε να ενισχύσει την αντιοξειδωτική της δράση, κάτι που θα φαινόταν από τη μείωση της τιμής  $\text{IC}_{50}$  του δείγματος κάστανου-οροπρωτεΐνης.

Εκτός από την ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, μελετήθηκε και η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων. Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα, καθώς υποδεικνύει ότι οι ουσίες είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα διαδικασιών

λιπιδικής υπεροξειδωσης, ώστε να μπορούν να δρουν ως πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά (Chanda & Dave, 2009). Η εξέταση των εκχυλισμάτων αναφορικά με τον προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης μας έδωσε εύρος τιμών  $RP_{0.5AU}$  που κυμαίνονται από **16,0  $\mu\text{g/mL}$**  έως **301,3  $\mu\text{g/mL}$** .

Το συμπέρασμα που εξάγεται από όλες τις μετρήσεις είναι πως το δείγμα του σκέτου φύλλου έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, καθώς σε όλες τις μεθόδους παρουσιάζει την μικρότερη τιμή  $IC_{50}$ . Μάλιστα, η ισχυρότερη αντιοξειδωτική του δράση παρατηρήθηκε κατά τη μέθοδο ABTS, όπου η τιμή  $IC_{50}$  του εκχυλίσματος του σκέτου φύλλου υπολογίστηκε στα **13,1  $\mu\text{g/mL}$** . Επίσης, το εκχύλισμα του σκέτου κάστανου αποδείχθηκε ότι έχει και αυτό ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από όλες τις μεθόδους, αλλά μικρότερη από αυτή που έχει το εκχύλισμα του σκέτου φύλλου. Η ισχυρότερη αντιοξειδωτική του δράση παρατηρήθηκε κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας  $O_2$ , όπου η τιμή  $IC_{50}$  του εκχυλίσματος του σκέτου κάστανου υπολογίστηκε στα **35,0  $\mu\text{g/mL}$** . Τα αποτελέσματα αυτά είναι λογικά και αναμενόμενα, καθώς τόσο τα φύλλα όσο και τα κάστανα διαθέτουν ένα υψηλό ποσοστό πολυφαινόλων, και άρα έχουν και ανάλογη αντιοξειδωτική δράση. Τα φύλλα ωστόσο, διαθέτουν μεγαλύτερο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες από τα κάστανα και για αυτό παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτά. Συγκεκριμένα, σε μια παλιότερη μελέτη είχε βρεθεί πως τα υδατικά εκχυλίσματα φύλλων καστανιάς περιέχουν έως και 224 mg/g εκχυλίσματος πολυφαινόλες, αριθμός που είναι ακόμα μεγαλύτερος με τη χρήση διαφορετικού διαλύτη (Calliste, Trouillas, Allais, & Duroux, 2005). Σε μια άλλη, οι συνολικές πολυφαινόλες των φύλλων έφταναν τα 103 mgGAE/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος ενώ αυτές των καρπών από 7,66 – 42,82 mgGAE/g ξηρού βάρους (“Bioactive Compounds of Chestnuts as Health Promoters,” 2016). Σε μια πρόσφατη εργασία επίσης, όπου μελετήθηκε η αντι-μεταλλαξιγόνος (Ames test) δράση των εκχυλισμάτων που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη (αδημοσίευτα αποτελέσματα), οι πολυφαινόλες των φύλλων ήταν 158 mgGAE/g ξηρού βάρους, ενώ αυτές των καρπών 42,7 mgGAE/g ξηρού βάρους. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στη συγκεκριμένη εργασία τη μεγαλύτερη αντι-μεταλλαξιγόνο δράση την είχε επίσης το εκχύλισμα του σκέτου φύλλου. Μπορούμε, λοιπόν, με ασφάλεια να εξάγουμε το συμπέρασμα πως η αντιοξειδωτική δράση είναι ανάλογη του πολυφαινολικού περιεχομένου ενός εκχυλίσματος και πως τα φύλλα της ευρωπαϊκής

καστανιάς έχουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από τα κάστανα. Για αυτό το λόγο έχουν και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και αυτό είναι φανερό σε όλες τις μεθόδους. Τέλος, τα ενθυλακωμένα δείγματα που περιείχαν μαλτοδεξτρίνη και οροπρωτεΐνη, παρουσίασαν επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία όμως απείχε σημαντικά από τις πολύ ισχυρές δράσεις των δειγμάτων του σκέτου φύλλου και του σκέτου κάστανου.

Το συμπέρασμα που εξάγεται από όλες τις μετρήσεις είναι πως το δείγμα του σκέτου φύλλου έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, καθώς σε όλες τις μεθόδους παρουσιάζει την μικρότερη τιμή  $IC_{50}$ . Από όλα τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα από την ευρωπαϊκή καστανιά, εμφανίζουν σημαντική *in vitro* αντιοξειδωτική δράση. Είναι σημαντικό, βέβαια, να εκπονηθούν μελλοντικά περαιτέρω έρευνες πάνω στα βιοδραστικά συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων, ώστε να κατανοηθούν πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων, όπως φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα. Επίσης η αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων θα μπορούσε να στοχεύσει στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων ή συμπληρωμάτων διατροφής.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo Cobianchi R, Vuotto M.L, Ferrara L, (2000), Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 71,110-116

Brand-Williams W, Cuvelier M.E and C. Berset (1995), Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 28:25-30

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. November 1998: 317-333

Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης  
Bioactive Compounds of Chestnuts as Health Promoters. (2016). In *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part II*.

Cadenas E. and Davies K.J.A (2000). MITOCHONDRIAL FREE RADICAL GENERATION, OXIDATIVE STRESS, AND AGING. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 29, Nos. 3/4, pp. 222–230

Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., & Duroux, J. L. (2005). *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 282–288

Cerulli A, Masullo M, Mari A, Balato A, Filosa R, Lembo S, Napolitano A. & Piacente S (2018). Phenolics from *Castaneasativa* leaves and their effects on UVB-induced damage, *Natural Product Research*, 32:10, 1170-1175

Chanda S. and R. Dave. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(13) pp. 981-996 December, 2009

Devasagayam T.P.A, Boloor K.K and Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, Vol 40, October 2003, p.p. 300-308

Dinis L-T, Oliveira M.M, Almeida J, Costa R.L, Peixoto F. Antioxidant activities of chestnut nut of *Castanea sativa* Mill. (cultivar 'Judia') as function of origin ecosystem. Article in *Food Chemistry* 132(1):1-8 · October 2012

Gülçin, I., Küfreviöglu, O.I., Oktay, M., Büyükokuroglu, M.E. (2004). Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J.Ethnopharmacol.* 90, 205–215

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

Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford

Kantzung B.G (2009) *Βασική και Κλινική Φαρμακολογία*, Broken Hill Publishers

Kreatsouli K , Fousteri Z, Zampakas K , Kerasioti E, Veskoukis A.S, Mantas C. Gkoutsofidis P, Ladas D, Petrotos K, Kouretas D and Stagos D. A Polyphenolic Extract from Olive Mill Wastewaters Encapsulated in Whey Protein and Maltodextrin Exerts Antioxidant Activity in Endothelial Cells. *Antioxidants* (2019), 8, 280

Liu F, Chang S. T, and Ooi V. E. C (1997). *Life Sciences*, Vol. 60, No. 10, pp.763-771

Lobo V, Patil A, Phatak A and Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727–47

Mao X, Gu C, Chen D, Yu B, and He J, Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 46), pp: 81649-81661

MIller N. J., Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V and Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84, 407-412

Munekata P.E.S, Dominguez R, Campagnol P.C.B, Franco D, Trindade M.A and Lorenzo J.M. Effect of natural antioxidants on physicochemical properties and lipid

stability of pork liver pate manufactured with healthy oils during refrigerated storage. *J Food Sci Technol* (December 2017) 54(13):4324–4334

Pandey K.B. and Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278; November/December 2009, Landes Bioscience

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

Perrone S, Tataranno M.L, Stazzoni G, Buonocore G. Oxidative stress and free radicals related diseases of the newborn. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, (2012), 3, 1043-1050

Phaniendra A, Jestadi D.B and Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* (Jan-Mar 2015) 30(1):11–26

Pham-Huy L.A, He H and Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. (*Int J Biomed Sci* 2008; 4 (2): 89-96)

Prior R.L, Wu X and Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(10):4290-4302

Stagos D, Balabanos D, Savva S, Skaperda Z, Priftis A, Kerasioti E, Mikropoulou E.V, Vougiotiannopoulou K, Mitakou S, Halabalaki M and Kouretas D. Extracts from the Mediterranean Food Plants *Carthamus lanatus*, *Cichorium intybus*, and *Cichorium spinosum* Enhanced GSH Levels and Increased Nrf2 Expression in Human

Endothelial Cells. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Article ID 6594101, 14 pages

Tropp B.E. (2014) *Βασικές Αρχές Μοριακής Βιολογίας*, Published by Jones & Bartlett Learning

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84

Γκουντάρας Ι, 2012. Στοιγεία φυσιολογίας φύλλου και καρπού καστανιάς. Πτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κερασιώτη Ε, 2014 Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λαδάς Δ, 2018. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα από *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia arborescens*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.











