



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πτυχιακή Εργασία**

**«Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος σιλυμαρίνης από σπόρους του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum* (L.) διαφορετικού χρόνου συγκομιδής»**



**Τζώρτζης Απόστολος**

**Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Τσιρόπουλος**

**-ΒΟΛΟΣ, 2019-**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πτυχιακή Εργασία**

**«Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος σιλυμαρίνης από σπόρους του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum* (L.) διαφορετικού χρόνου συγκομιδής»**

**«Effect of harvest stage on antioxidant activity of extracts from seeds of *Silybum marianum* (L.) »**

**Τζώρτζης Απόστολος**

**Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Τσιρόπουλος (Καθηγητής)**

**Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή αποτελείται από τους:**

- 1. Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής( ως επιβλέπων μέλος ΔΕΠ)**
- 2. Καρκάνης Ανέστης, Επίκουρος Καθηγητής**
- 3. Νάνο Γεώργιο, Καθηγητής**

## Πρόλογος

Η πτυχιακή εργασία αυτή αποτελεί μια προσπάθεια αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σιλυμαρίνης του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum* (L.) σε διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για τη συνεχή καθοδήγηση κατά η διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων αλλά και της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας μου.

Ακόμα, ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Ανέστη Καρκάνη και κ. Γεώργιο Νάνο, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την αρτιότερη εκτέλεση και παρουσίαση της εργασίας.

Μεγάλη και ουσιαστική βοήθεια πρόσφερε ο υποψήφιος διδάκτορας κ. Δημήτριος Αραμπατζής, με τον οποίον η συνεργασία ήταν άμογη και ουσιαστική σε όλα τα στάδια του πειράματος καθώς και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Όποτε χρειάστηκα κάτι ήταν πάντα εκεί και των ευχαριστώ γι' αυτό.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια συνέπασχαν μαζί μου και μου προσέφεραν ό,τι μπορούσαν για να επιτύχω το στόχο μου καθώς και όλους τους φίλους μου που με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή.

## Περίληψη

Το φυτό *Silybum marianum* ή αλλιώς κουφάγκαθο ή γαιδουράγκαθο είναι ένα ζιζάνιο το οποίο μελετάται για θεραπευτικούς σκοπούς έχοντας ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες, με κυρίαρχη ουσία τη σιλυμαρίνη, η οποία κατά κύριο λόγο απαντάται στους σπόρους του φυτού. Σκοπός της εν λόγω πτυχιακής ήταν η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σιλυμαρίνης από τους σπόρους πειραματικής καλλιέργειας του φυτού, οι οποίοι συγκομίστηκαν σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης τους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βελεστίνο, το χρονικό διάστημα από το Μάρτιο, όπου έγινε η σπορά, έως τον Ιούνιο 2017 όπου η πλήρης άνθιση έλαβε χώρα. Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια, όταν οι ανθοκεφαλές ήταν ανώριμες, ώριμες και υπερώριμες (Στάδιο I, Στάδιο II και Στάδιο III, αντίστοιχα). Για την παραλαβή της σιλυμαρίνης πραγματοποιήθηκε εκχύλιση αλεσμένων σπόρων με μεθανόλη σε συσκευή Soxhlet, μετά από απολίπανση τους με εξάνιο. Ο προσδιορισμός της σιλυμαρίνης έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των μεθόδων DPPH και FRAP, ενώ τα ολικά φαινολικά του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό σιλυμαρίνης των σπόρων μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης, τόσο στις κεντρικές όσο και στις πλευρικές ανθοκεφαλές, με τη μέγιστη περιεκτικότητα (4,5%) να παρατηρείται στο τελικό στάδιο ωρίμανσης και στις δύο περιπτώσεις. Σχετικά με τα ολικά φαινολικά στους σπόρους παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ του πρώτου και του τρίτου σταδίου ωρίμανσης και στις πλευρικές και στις κεντρικές ταξιανθίες με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται στο στάδιο III. Σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος η μεγαλύτερη τιμή βρέθηκε στο στάδιο III. Σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος, εκτιμώμενη με τη μέθοδο DPPH, εντοπίστηκαν μεταξύ πρώτου και τρίτου σταδίου ωρίμανσης καθώς και μεταξύ δεύτερου και τρίτου, όσον αφορά τις κεντρικές κεφαλές, ενώ σχετικά με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν για τις πλευρικές κεφαλές αυτές ήταν μεταξύ πρώτου και τρίτου και μεταξύ πρώτου και δεύτερου σταδίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο FRAP παρουσίασε για τις πλευρικές κεφαλές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωριμότητας παρόμοιες με αυτές της DPPH, ενώ στις κεντρικές κεφαλές δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Συμπερασματικά ο χρόνος συγκομιδής αποτελεί καθοριστικό παράγοντα προκειμένου να εξασφαλιστεί η υψηλή περιεκτικότητα των σπόρων σε σιλυμαρίνη, όπως και η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα τους.

## **ABSTRACT**

*Silybum marianum* is a weed recently studied for therapeutic purposes and is known for its various beneficial properties. Silymarin is the predominant active constituent, which is mostly found in plant seeds rather than in the rest of the plant. The purpose of this work was to evaluate the antioxidant capacity of the silymarin extract of seeds harvested at different maturation stages. The experiment was conducted at the University farm located in Velestino. The sowing took place in March and blooming was completed until June 2017. The harvest was carried out in three stages, when the fruiting heads were immature, mature and overripe (Stage I, Stage II and Stage III, respectively). For the silymarin extraction ground seeds were extracted with methanol in a Soxhlet apparatus after defatting them with hexane. Silymarin was determined by high performance liquid chromatography. Determination of antioxidant capacity of the silymarin extract was performed by the DPPH and FRAP methods, while the total phenolics were determined by the Folin-Ciocalteu method.

Significant differences for the silymarin content of the seeds between the three stages of maturation occurred in both the central and lateral fruiting heads, the maximum content (4.5%) being observed in the overripe stage in both cases. Concerning total phenolics content, differences were observed between stage I and stage III in lateral and central fruiting heads. Regarding the antioxidant capacity of silymarin extract, estimated by the DPPH method, extracts from the overripe heads had higher antioxidant capacity than the other two stages. On the other hand, FRAP's antioxidant capacity showed similar to DPPH differences for side heads. In conclusion, harvest time is a determining factor affecting seed silymarin content as well as antioxidant capacity.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Θεωρητικό μέρος.....</b>	<b>9</b>
1.1 Εισαγωγή: Το φυτό <i>Silybum marianum</i> (L.) (γαϊδουράγκαθο).....	9
1.2 Αντιοξειδωτικά.....	11
1.2.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά.....	13
1.2.2 Η δράση των αντιοξειδωτικών.....	15
1.3 Μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των φαινολικών ενώσεων....	16
1.3.1 Μέθοδος DPPH.....	19
1.3.2 Μέθοδος FRAP.....	22
1.3.3 Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	24
1.4 Σκοπός της μελέτης.....	25
<b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Πειραματικό μέρος.....</b>	<b>26</b>
2.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	26
2.2 Πειραματικός αγρός.....	26
2.3 Εκχύλιση σπόρων-Παραλαβή σιλυμαρίνης.....	27
2.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την χρήση της μεθόδου DPPH.....	28
2.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου FRAP.....	30
2.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	33
<b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα.....</b>	<b>35</b>
3.1 Περιεκτικότητα σιλυμαρίνης (SLM %) του σπόρου.....	35
3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	36
3.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH.....	37
3.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP.....	38
<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>. Συζήτηση και Συμπεράσματα.....</b>	<b>39</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>47</b>

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 1:** Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση σιλυμαρίνης (Στάδιο I =2,99%, Στάδιο II = 3,48% και Στάδιο III =4,55%) στις κεντρικές κεφαλές.....35
- Διάγραμμα 2:** Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση σιλυμαρίνης (Στάδιο I =2,66%. Στάδιο II =2,94% και Στάδιο III =4,45%) στις πλευρικές κεφαλές.....35
- Διάγραμμα 3:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 1889 mg GA/100 g, Στάδιο II =2031 mg GA/100 g και Στάδιο III = 2670 mg GA/100 g), στις κεντρικές κεφαλές.....36
- Διάγραμμα 4:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 1425 mg GA/100 g, Στάδιο II =2156 mg GA/100 g και Στάδιο III = 2510 mg GA/100 g), στις πλευρικές κεφαλές.....36
- Διάγραμμα 5:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =1893  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II =2259  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 2944  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο DPPH, στις κεντρικές κεφαλές...37
- Διάγραμμα 6:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =1538  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II =2373  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 2843  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο DPPH, στις πλευρικές κεφαλές...37
- Διάγραμμα 7:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =7091  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II =7491  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 8936  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο FRAP, στις κεντρικές κεφαλές...38
- Διάγραμμα 8:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =5599  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II =8078  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 8712  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, στις πλευρικές κεφαλές...38
- Διάγραμμα 9:** Συσχέτιση των μετρήσεων του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM %) με τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).....40
- Διάγραμμα 10:** Συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM%) των σπόρων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).....41
- Διάγραμμα 11:** Συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM %) και των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu ( mg GA/100 g).....41
- Διάγραμμα 12:** Συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των σπόρων σε ολικά φαινολικά (mg GA/100 g) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).....43
- Διάγραμμα 13:** Συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των σπόρων σε ολικά φαινολικά (mg GA/100 g) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).....43
- Διάγραμμα 14:** Συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σιλυμαρίνης με τη μέθοδο FRAP ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ) και με τη μέθοδο DPPH ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).....45

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Χημική δομή των ισομερών που σχηματίζουν την σιλυμαρίνη.....	11
<b>Εικόνα 2:</b> Δομή φλαβονοειδών.....	14
<b>Εικόνα 3:</b> Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών.....	17
<b>Εικόνα 4:</b> Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH.....	19
<b>Εικόνα 5:</b> Μηχανισμός αντίδρασης της μεθόδου FRAP.....	22
<b>Εικόνα 6:</b> Βλαστικό στάδιο I, χρώμα του σπόρου ανοιχτό καφέ.....	26
<b>Εικόνα 7:</b> Βλαστικό στάδιο II, χρώμα του σπόρου καστανό σκούρο.....	26
<b>Εικόνα 8:</b> Βλαστικό στάδιο III, χρώμα του σπόρου καστανό-μαύρο.....	27
<b>Εικόνα 9:</b> Πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων μαζί με το αντιδραστήριο DPPH. Η μεταβολή του μωβ χρώματος στα διαλύματα σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος (αύξηση αντιοξειδωτικής δράσης). Στη δεξιά πλευρά υπάρχει το διάλυμα ελέγχου (control) που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις.....	29
<b>Εικόνα 10 :</b> Πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος με το αντιδραστήριο FRAP, που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. ....	32
<b>Εικόνα 11:</b> Πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F-C, δημιουργώντας στα διαλύματα ένα βαθύ μπλε χρώμα. Δίπλα από τα πρότυπα είναι ο μάρτυρας (νερό) που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις.....	34



# **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Θεωρητικό μέρος**

## **1.1 Εισαγωγή: Το φυτό *Silybum marianum* (L.) (γαϊδουράγκαθο)**

Το φυτό *Silybum marianum* (L.) Gaertn (συνώνυμο *Carduus marianus* L.) με κοινό όνομα κουφάγκαθο ή αλλιώς γαϊδουράγκαθο, ανήκει στην οικογένεια Asteraceae (Sidhu and Saini, 2011). Το γένος *Silybum* περιλαμβάνει δύο είδη: *S. marianum* και *S. eburneum* (Tutin et al. 1976). Το βοτανικό του όνομα προέρχεται από την ελληνική λέξη "Silybon" ή "Silybos" που σημαίνει φούντα ή θύσανος. Το κουφάγκαθο είναι ετήσιο ή διετές, ενώ καλλιεργείται ως ετήσιο φυτό (Gresta et al. 2007, Fritz and Saukel, 2011). Το είδος αυτό κατάγεται από την περιοχή της Μεσογείου και στην συνέχεια διαδόθηκε ανά τη γη (Kaur et al. 2012). Οι σπόροι του γαϊδουράγκαθου έχουν χρησιμοποιηθεί για περισσότερα από 2000 χρόνια για θεραπευτικούς σκοπούς και θεωρείται το πιο μελετημένο φυτό για τη θεραπεία ασθενειών του ήπατος (Alemardan et al. 2013), με τον Θεόφραστο (4ος αι. Π.Χ.) να είναι ο πρώτος που αναφέρθηκε στην ευεργετική και θεραπευτική δράση των σπόρων του κουφάγκαθου (Kren and Walterova, 2005). Τέλος, το φυτό *Silybum marianum* αναδείχτηκε σε μια από τις σημαντικότερες φαρμακευτικές καλλιέργειες στην Ευρώπη, ενώ πρόσφατα απέκτησε σημαντική θέση στις καλλιέργειες της Βόρειας Αμερικής (Zheljazkon et al. 2006). Το γαϊδουράγκαθο είναι ένα ζιζάνιο που παρουσιάζει μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα (Khan et al. 2009, Sidhu and Saini, 2011). Το ζιζάνιο αυτό το συναντάμε στα περιθώρια των δρόμων, σε ακαλλιέργητες εκτάσεις, καθώς και σε καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών (Karkanis et al. 2011).

Το κυριότερο από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *Silybum marianum* βρίσκεται στην ύπαρξη αγκαθιών σε πολλά από τα φυτικά μέρη. Το ύψος του φυτού ποικίλει και κυμαίνεται από 40 έως 200 cm, ενώ το στέλεχος είναι όρθιο και διακλαδισμένο προς την κορυφή (Montemurro et al. 2007). Τα φύλλα είναι μεγάλα και ακανθώδη (Gresta et al. 2007). Το βασικό χαρακτηριστικό στα φύλλα είναι η παρουσία των λευκών περιοχών πάνω στην επιφάνεια τους (Karkanis et al. 2011). Οι σπόροι του φέρουν πολύ λεπτό, μακρύ μεταξένιο-λευκό χνούδι (πάππος) (Kroll et al. 2007), με το χρώμα τους να κυμαίνεται από καφέ έως μαύρο και το βάρος των 1000 σπόρων είναι περίπου 28-30 g (Andrzejewska et al. 2011). Οι σπόροι στις δευτερεύουσες κεφαλές έχουν μικρότερο βάρος σε σύγκριση με τις πρωτογενείς. Κάθε κεφαλή παράγει περίπου 190 σπόρους, με μέσο όρο περίπου 6350 σπόρους ανά φυτό (Dodd, 1989). Οι σπόροι μπορούν να μεταφερθούν πολύ εύκολα με τον άνεμο, ενώ μπορούν να παραμένουν βιώσιμοι από 3 έως 9 έτη (Sindel, 1991).

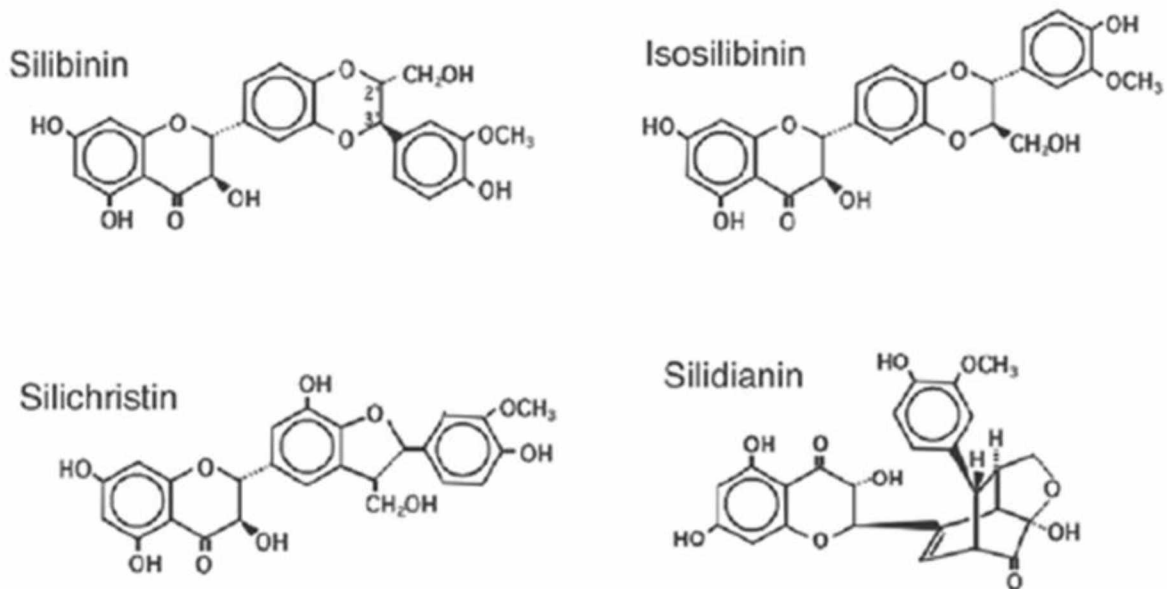
Το γαϊδουράγκαθο αναπτύσσεται με επιτυχία σε διάφορους τύπους εδαφών, από αμμώδη εδάφη μέχρι αργιλώδη εδάφη. Η σπορά του πραγματοποιείται το φθινόπωρο ή και την άνοιξη

σε αποστάσεις φύτευσης συνήθως 40-75 cm μεταξύ των σειρών και 20-30 cm μεταξύ των φυτών στη σειρά. Όσον αφορά, τις καλλιεργητικές απαιτήσεις του φυτού είναι χαμηλές έως μέτριες σε θρεπτικά συστατικά και νερό, δεδομένου ότι προσαρμόζεται σε υποβαθμισμένα εδάφη και σε πολλές διαφορετικές συνθήκες. Η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη κυμαίνεται από 1,0% έως 3,0%, αλλά μπορεί να υπερβεί το 8% (Karkanis et al. 2011).

Το *Silybum marianum* είναι ένα φυτό υψηλής φαρμακευτικής σημασίας με ευεργετικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση κυρίων πολλών παθήσεων του ήπατος (Eltahir and Abuereish, 2010, Freedman et al. 2011). Η υψηλότερη ποσότητα σιλυμαρίνης ανιχνεύεται στους σπόρους, αλλά και τα άλλα τμήματα του φυτού περιέχουν σιλυμαρίνη αλλά σε μικρή περιεκτικότητα (Karkanis et al. 2011). Οι σπόροι εκτός από σιλυμαρίνη περιέχουν και έλαιο (25%) (Wallace et al. 2005, Sersen et al. 2006, Engelberth et al. 2008). Οι θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού για τη θεραπεία του ήπατος οφείλονται στην παρουσία σιλυμαρίνης, ενός μείγματος διαφόρων φλαβονολιγνάνων (πχ. σιλυβίνη (SBA,SBB), ισοσιλυβίνη (ISBA,ISBB), σιλυδιανίνη (SD) και σιλυκριστίνη (SC) (Εικόνα 1) (Abenavoli et al. 2010). Στους σπόρους η σιλυμαρίνη αποτελεί το 70-80% και το υπόλοιπο 20-30% αποτελείται κυρίως από πολυφαινολικές ενώσεις (Dixit et al. 2007). Η σιλυβίνη λοιπόν αποτελεί το μεγαλύτερο σε ποσοστό περίπου 50-70% των συστατικών της σιλυμαρίνης. Επίσης, στους σπόρους έχουν ανιχνευτεί, σε μικρές ποσότητες φλαβονοειδή (ταξιφολίνη), λιπαρά οξέα 20-35% και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις (Ramasaamy και Agarwal, 2008). Από μελέτες, έχει βρεθεί στους σπόρους ένας αριθμός άλλων φλαβονολιγνάνων όπως, η δεϋδροσιλυβίνη (dehydrosilybin), η δεσοξυσιλυκριστίνη (desoxysilycristin), η δεσοξυσιλυδιανίνη (desoxysilydianin), η σιλυδρίνη (silandrin), η σιλυβινόνη (silybinome), η σιλυλερίνη (silyhermin) και η νεοσιλυλερίνη (neosilyhermin) (Kvasnicka et al. 2003).

Τα επίπεδα της σιλυμαρίνης στους σπόρους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το γενετικό υλικό (ποικιλία), κλιματικές συνθήκες καθώς και οι διάφορες καλλιεργητικές τεχνικές (π.χ. λίπανση, άρδευση και πυκνότητα φυτών) (Martin et al. 2006, Shokrpour et al. 2008, Andrzejewska et al. 2011). Άλλοι παράγοντες είναι ο χρόνος συγκομιδής και το στάδιο ωριμότητας της καλλιέργειας, διότι η ωρίμανση δεν είναι ταυτόχρονη σε όλες τις κεφαλές του φυτού (Curioni et al. 2002). Έχει διαπιστωθεί ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη έχει ληφθεί από την όψιμη συγκομιδή των κεφαλών σε αντίθεση με την πρόιμη συγκομιδή (Carrier et al. 2003). Ωστόσο, η καθυστέρηση της συγκομιδής έχει επίπτωση στην απώλεια της απόδοσης των σπόρων, εξαιτίας της άνισης ανθοφορίας και της ωρίμανσης των σπόρων. Οι απώλειες αυτής της απόδοσης είναι της τάξης του 30-40% (Hevia et al. 2007). Επίσης, οι διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές παίζουν ρόλο στην περιεκτικότητα σιλυμαρίνης. Για παράδειγμα, η Νέα Ζηλανδία και οι Ευρωπαϊκές χώρες έχουν διαφορετικά περιεχόμενα και συνθέσεις σιλυμαρίνης (Martin et al. 2006, Shokrpour et al. 2008). Στο Ισραήλ, η

περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ουσίες ήταν 30% υψηλότερη στους σπόρους που προέρχονταν από μωβ ταξιανθίες παρά σε σχέση με εκείνες που προέρχονται από τις λευκές (Vaknin et al. 2008).



**Εικόνα 1:** Χημική δομή των ισομερών που σχηματίζουν την σίλυμαρίνη (Abenavoli et al. 2011).

Άλλες ιδιότητες των σπόρων του φυτού είναι η αντικαρκινική δράση, η αντιφλεγμονώδης και η αντιδιαβητική δράση, η χρήση τους ως αντίδοτο για δηλητηριάσεις που προέρχονται από μανιτάρια, και η αντιοξειδωτική δράση (Corchete, 2008, Ghosh et al. 2010).

Το γαϊδουράγκαθο μπορεί να καλλιεργηθεί επίσης και ως ενεργειακό φυτό (Sulas et al. 2008, Ledda et al. 2013) καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως πηγή παραγωγής βιοντίζελ (Ahmad et al. 2013). Ακόμα, το γαϊδουράγκαθο είναι ένα φυτό ανεκτικό σε εδάφη που περιέχουν βαρέα μέταλλα (π.χ. του μολύβδου και του ραδιενεργού καυσίου) και να συμβάλει στην απορρύπανση των εδαφών (Brunetti et al. 2009, Perrino et al. 2014).

## 1.2 Αντιοξειδωτικά

Με τον όρο αντιοξειδωτικά ορίζουμε τις ενώσεις που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, δηλαδή αποτελούνται από μόρια συνήθως <1% της ποσότητας του υλικού που απαιτεί προστασία, όπου είναι σε θέση να προστατεύσει τέτοια μόρια καθυστερώντας ή αναστέλλοντας την αυτοοξειδωσή τους (Valgimigli and Pratt, 2012, Amorati et al. 2013). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες συμμετέχουν στη διαδικασία πρόληψης και κατανάλωσης του οξυγόνου (Comert and Gokmen, 2018).

Στα τέλη της δεκαετίας του 19ου αιώνα οι αντιοξειδωτικές ουσίες, χρησιμοποιήθηκαν γενικά σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες και αργότερα έγινε κυρίαρχη η χρήση τους για την πρόληψη της τάγγισης των τροφίμων που προκαλείται από την οξείδωση των ακόρεστων λιπών (Stirton et al. 1945).

Στα τρόφιμα τα αντιοξειδωτικά, θεωρήθηκαν ως προσθετικές ουσίες διασφαλίζοντας τη θρεπτική αξία των τροφίμων και εμποδίζοντας τις διάφορες λιποδιαλυτές βιταμίνες και τα απαραίτητα λιπαρά οξέα από την οξείδωση, παρέχοντας οφέλη για την υγεία εμποδίζοντας το οξειδωτικό στρες και τις σχετικές ασθένειες (Comert and Gokmen, 2018). Τα αντιοξειδωτικά είναι οργανικές ενώσεις που στο μόριο τους έχουν μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλουν και την αντιοξειδωτική δράση (Σφλώμος, 2011). Έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έδειξαν ότι η συνεργιστική δράση των αντιοξειδωτικών ενισχύει στην αύξηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού σε σχέση με την επίδραση ενός αντιοξειδωτικού ξεχωριστά (Jorgensen et al. 1999). Η λειτουργία που επιτελούν τα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό συνοψίζονται στην συμβολή τους στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε παθολογικές καταστάσεις που προέρχονται από την οξείδωση και την δράση των ελεύθερων ριζών (Pisoschi and Negulescu, 2011). Επειδή, τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών (Prior et al. 2005).

Ορισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η βιταμίνη E, οι ουβικινόνες και τα καροτενοειδή (Oroian and Escriche, 2015).

Εκτός από τις παραπάνω ενώσεις, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις περιλαμβάνουν και ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση (Pisoschi and Negulescu, 2011). Οι επιστήμονες ανακάλυψαν ένα μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών που απομονώθηκαν από φυσικές πηγές, ορισμένα από τα οποία είναι η βιταμίνη E, η βιταμίνη C (Jacob, 1996). Ορισμένα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και το γαλλικό προπύλιο (PG) που βρέθηκαν ασφαλείς και αποτελεσματικά στην επιβράδυνση της τάγγισης των τροφίμων (Kraybill and Dugan, 1954). Ωστόσο, η ανησυχία των καταναλωτών για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά όσον αφορά στην τοξικότητα τους και την ασφάλεια των τροφίμων, οδήγησε στην ανάγκη της ανακάλυψης φυσικών πηγών με αντιοξειδωτικό δυναμικό. Διάφορα βότανα, λαχανικά και φρούτα περιέχουν διάφορες αντιοξειδωτικές ενώσεις (π.χ. τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ, καροτενοειδή και φαινολικές ενώσεις) (Moure et al. 2001).

### 1.2.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

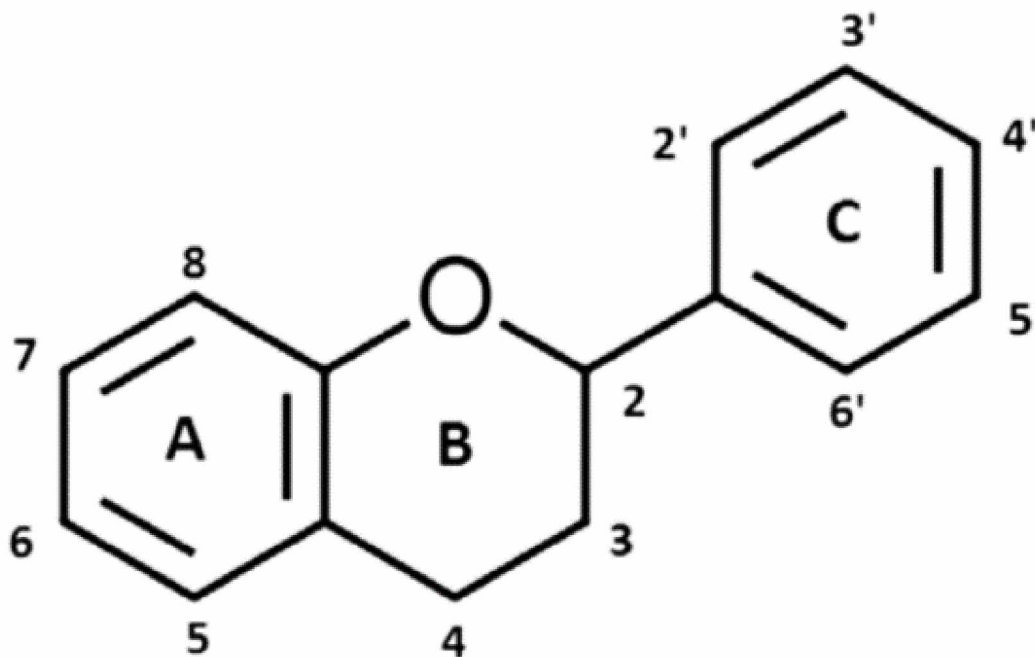
Πρόκειται για τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα φυτά, στους μικροοργανισμούς, στους μύκητες και ακόμη και σε ζωικούς ιστούς, συμβάλλοντας στη προστασία των λιπιδίων τους από την οξείδωση καθώς με τη δράση τους εξασφαλίζεται η σταθερότητα των τελικών προϊόντων (Σφλώμος, 2011, Culcin, 2012). Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), οι φαινολικές ενώσεις (π.χ οι τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα) και τα καροτενοειδή (Culcin 2012).

Το ασκορβικό οξύ θεωρείται ότι είναι ένα από τα πιο ισχυρά και λιγότερο τοξικά φυσικά αντιοξειδωτικά καθώς αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλά τρόφιμα ή φυτά (Bendich et al. 1986). Το ασκορβικό οξύ συμβάλλει στη μεταφορά ηλεκτρονίων, αποσκοπώντας στο τερματισμό τις αντιδράσεις ριζών της αλυσίδας (Weber et al. 1996). Οι κύριες πηγές του ασκορβικού οξέος στη διατροφή είναι τα φρούτα, ιδίως τα εσπεριδοειδή, τα ακτινίδια, τα κεράσια, τα πεπόνια αλλά και τα λαχανικά όπως οι ντομάτες, τα φυλλώδη πράσινα, το μπρόκολο, το κουνουπίδι, τα λάχανα Βρυξελλών και το λάχανο. Η περιεκτικότητα του ασκορβικού οξέος του μπορεί να υπερβαίνει τα 100 mg ασκορβικού οξέος / 100 g νωπού βάρους (Culcin, 2012). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro*, έδειξαν ότι η βιταμίνη C είναι ικανή να ανασχηματίσει την τοκοφερόλη από τη ρίζα του τοκοφεροξυλίου, η οποία σχηματίζεται με την αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων από τη βιταμίνη E (Niki et al. 1985).

Οι τοκοφερόλες είναι τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά και αποτελούν μία κατηγορία χημικών ενώσεων, εκ των οποίων πολλά αυτά συμπεριφέρονται ως βιταμίνη E (Gulcin et al. 2005). Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και σε κάθε μία από αυτές τις δύο κατηγορίες, υπάρχουν τέσσερα ισομερή (a, b, c και d) που σχηματίζουν συνολικά οκτώ ισομερή τοκοφερόλης. Το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό αυτής της ομάδας είναι η α-τοκοφερόλη, η οποία είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων και των οργανικών κυττάρων. Οι κύριες πηγές τοκοφερολών στα τρόφιμα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε βιταμίνη E είναι τα φυτικά έλαια, ακολουθούμενα από τους ξηρούς καρπούς (Godbout et al. 2004).

Η κατάταξη των φαινολικών ενώσεων σε ομάδες γίνεται με βάση τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και έτσι διακρίνονται σε απλές φαινόλες, οι οποίες περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο όπως είναι τα φαινολικά οξέα και οι κουμαρίνες, και σε πολυφαινόλες οι οποίες περιέχουν δύο ή και περισσότερους δακτυλίους (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν περίπου το 30% των φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά σε ελεύθερες και δεσμευμένες μορφές ή συχνότερα εμφανίζεται με τη μορφή εστέρων, γλυκοσιδίων και γλυκόζης με αδιάλυτα δεσμευμένα σύμπλοκα (Ross et al. 2009). Τα φαινολικά οξέα προέρχονται από παράγωγα αρωματικών καρβοξυλικών οξέων, τα οποία προκύπτουν είτε από την ομάδα βενζοϊκού οξέος είτε από το ομάδα κινναμωμικού οξέος. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων που είναι συνδεδεμένες στον αρωματικό δακτύλιο, τη θέση των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο και τον τύπο των υποκαταστατών (Stroka and Cisowski, 2003).



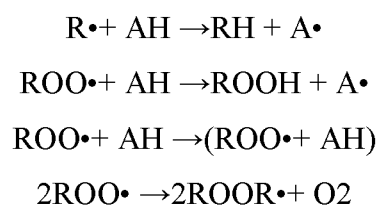
**Εικόνα 2:** Δομή φλαβονοειδών (Oroian and Escriche 2015).

Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις μειώνοντας την οξειδωση λιποπρωτεϊνών, ενώ η ημερήσια πρόσληψη από τον άνθρωπο είναι πάνω από 100 mg (Dragsted et al. 1997). Η βασική χημική δομή των φλαβονοειδών είναι ότι ο πυρήνας αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένους σε τρεις δακτυλίους (C6-C3-C6), οι οποίοι επισημαίνονται A, B και C και φέρουν δύο αρωματικούς δακτυλίους και από έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο που φέρει οξυγόνο (Εικόνα 2). Τα φλαβονοειδή είναι η πιο συνηθισμένη και δημοφιλής ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων καθώς οι αντιοξειδωτικές και οι βιολογικές δραστηριότητες τους εξαρτώνται από τη χημική τους δομή (Gulcin et al. 2011). Στα σημαντικότερα οφέλη των φλαβονοειδών συγκαταλέγεται η προστασία από οξειδωτικές ασθένειες, η ικανότητα να ρυθμίζει τη δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων και αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους υποδοχείς (Williams et al. 2004).

Τέλος, τα καροτένια αποτελούν μια κατηγορία φυσικών λιποδιαλυτών ενώσεων που διαθέτουν φυσικές χρωστικές με έντονη αντιοξειδωτική δράση (Rodriguez-Amaya et al. 2008). Οι χημικές ιδιότητες των καροτενίων είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την παρουσία ενός εκτεταμένου συστήματος συζευγμένων διπλών δεσμών που υποκαθίσταται με διάφορες τελικές ομάδες (Palozza and Krinsky, 1992). Πρόκειται για μία κατηγορία μείζονος διατροφικής αξίας για τον άνθρωπο που εμφανίζονται συνήθως σε φρούτα και λαχανικά (Maiani et al. 2009). Τα σημαντικότερα καροτενοειδή στη διατροφή του ανθρώπου είναι το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η λουτεΐνη, η β-κρυπτοξανθίνη, η ζεαξανθίνη και η ασταξανθίνη (Oroian and Escriche, 2015). Πολλές μελέτες, υποστηρίζουν ότι τα καροτενοειδή ή μεταβολίτες αυτών των θρεπτικών ουσιών συνδέονται με καρδιαγγειακές παθήσεις (Lichtenstein, 2009).

### 1.2.2 Η δράση των αντιοξειδωτικών

Ο μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών βασίζεται στην απομάκρυνση ή την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και σε σπάνιες περιπτώσεις στην πλήρη αναστολή της οξείδωσης. Επειδή, τα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνουν την παραγωγή των ελεύθερων ριζών, με ταυτόχρονη δημιουργία μιας ανενεργού ελεύθερης ρίζας (Μπλούκας, 2004). Με τη διαδικασία του διμερισμού προκύπτει η αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας, καθώς συντελεί στην αδρανοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης και στην παραγωγή σταθερών προϊόντων. Παράδειγμα του μηχανισμού δράσης των αντιοξειδωτικών απεικονίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Έχει αποδειχθεί ότι οι αναστολές της οξείδωσης πρέπει αφενός να είναι ενεργοί, ώστε να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες και να διασπάσουν την αλυσίδα και αφετέρου να είναι μεταφορικά ενεργοί, για να αποτραπεί η άμεση αντίδραση του οξυγόνου με την ελεύθερη ρίζα. Η μεγάλη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να οδηγήσει σε αντιοξειδωτικά που λειτουργούν ως μεταφορείς και κατά συνέπεια στη δράση τους ως προοξειδωτικά. Γι' αυτό, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται πριν από το στάδιο της προαγωγής (διάδοσης), για να αποτραπούν οι παραπάνω παράγοντες. Σε περίπτωση που αυξηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών στο υπόστρωμα, τότε το

αντιοξειδωτικό καταναλώνεται γρήγορα , οπότε είναι αδύνατο να διακοπεί η εξέλιξη της αλυσιδωτής αντίδρασης (Μπόσκος, 1997).

### 1.3 Μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των φαινολικών ενώσεων

Τα τελευταία 20 χρόνια, παρατηρείται ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά, που προέρχονται από διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι τα αντιοξειδωτικά φυτικής προέλευσης σχετίζονται με την πρόληψη διαφόρων παθολογικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, διαφόρων καρδιαγγειακών και νευρολογικών ασθενειών . Προκύπτει έτσι, ένα φλέγον ζήτημα για τους επιστήμονες και τους ερευνητές που ασχολούνται με τους κλάδους της υγείας και της διατροφής είναι η εκτίμηση δηλαδή, της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα τρόφιμα (Comert and Gokmen, 2018). Όσον αφορά τα τρόφιμα, υπάρχουν δυο κατηγορίες αντιοξειδωτικών που προέρχονται είτε από φυσικές, είτε από συνθετικές πηγές και έχουν ως σκοπό την πρόληψη ή την καθυστέρηση της αλλοίωσης των τροφίμων παρουσία οξυγόνου του αέρα. Από τις δυο αυτές κατηγορίες των αντιοξειδωτικών, προτιμάται η χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών που προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς και συγκεκριμένα από τα εκχυλίσματα διαφόρων βοτάνων. Πιο συγκεκριμένα, στα βότανα πέρα από κάποιες βιταμίνες που περιέχονται (A, C και E), υπάρχουν και ορισμένες ομάδες αντιοξειδωτικών σε μεγάλες ποσότητες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου καθώς και στον μεταβολισμό του όπως τα καροτενοειδή και οι φαινολικές ενώσεις (π.χ. φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες ,φλαβονολίνες και κατεχίνες (Lee et al. 2003, Fernandez-Pachon et al. 2006). Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται με ποικίλες τεχνικές που όμως μπορούν να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα, γεγονός που ίσως να οφείλεται στην περιπλοκή σύνθεση κάθε τροφίμου, στον εξοπλισμό του εργαστηρίου καθώς και στο χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση των δειγμάτων. Για αυτό, η επιλογή μιας μεθόδου για τη μελέτη κάθε αντιοξειδωτικού θεωρείται δύσκολη, χρονοβόρα και πολλές φορές μη έγκυρη διαδικασία, αφού υπάρχει ένα πλήθος μεθόδων για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας in vitro (Tabart et al. 2009). Οι κυριότερες μέθοδοι, λοιπόν που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ,ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο δρουν:

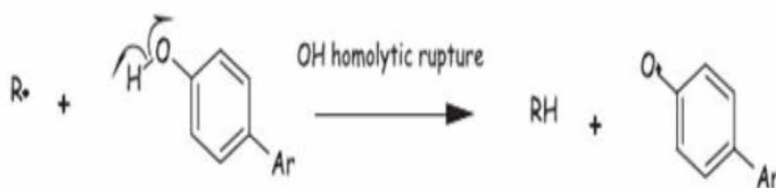
1) Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (**HAT**: Hydrogen Atom Transfer reaction based assays) , και

2) Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (**SET**: Single Electron Transfer reaction based assays) (Huang et al. 2005, Prior et al. 2005).



Στην πρώτη κατηγορία, οι μέθοδοι HAT βασίζονται στην ύπαρξη ενός φθορισμομετρικού δείκτη και μιας ένωσης που παράγει ελεύθερες ρίζες. Με την προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού σε ένα διάλυμα, το τελευταίο οδηγείται σε αναστολή του φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ικανότητα που έχει το κάθε αντιοξειδωτικό να δίνει ένα άτομο υδρογόνου με παράλληλη καταστροφή των ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που εκκινούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Εικόνα 3). Με λίγα λόγια, το αντιοξειδωτικό και το υπόστρωμα (ανιχνευτής) ανταγωνίζονται τις ελεύθερες ρίζες (Huang et al. 2005). Επιπλέον, οι αντιδράσεις HAT είναι αρκετά σύντομες και πραγματοποιούνται μέσα σε δευτερόλεπτα έως κάποια λεπτά ανεξάρτητα από τον διαλύτη και το pH που χρησιμοποιείται. Επίσης, η παρουσία ορισμένων μετάλλων μπορεί να συμβάλει σε εσφαλμένη υψηλή αντιδραστικότητα των δειγμάτων (Prior et al. 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μέθοδοι: ORAC (δοκιμασία απορρόφησης ριζών οξυγόνου), η TRAR και η δοκιμασία λεύκανσης κροκίνης κ.λ.π. (Huang et al. 2005).

### 1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



### 2. Single Electron Transfer (SET)



**Εικόνα 3:** Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών (Leopoldini et al. 2011).

Στη δεύτερη κατηγορία, οι μέθοδοι SET βασίζονται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε ένα οξειδωτικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα, αυτό να ανάγεται. Κατά το στάδιο της αναγωγής αυτής γίνεται παράλληλα και η αλλαγή του χρώματος καθώς το δυναμικό του οξειδωτικού μειώνεται. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης είναι όταν το

χρώμα παύει να αλλάζει και αποχρωματίζεται. Επομένως, ο βαθμός αλλαγής χρώματος της αντιδράσης σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων (Huang et al. 2005, Rrior et al. 2005). Οι αντιδράσεις SET βασίζονται σε ακόμα δύο παραμέτρους, την αποπρωτονίωση και την IP (Ionization Potentials) της δραστικής ομάδας, έτσι ώστε οι αντιδράσεις να εξαρτώνται από το pH. Γενικά, υπάρχει μείωση των τιμών IP με την αύξηση του pH, έχοντας αντίκτυπο στην αυξημένη ικανότητα ηλεκτροδιαστολής με αποπρωτονίωση (Lemanska et al. 2001). Σε αντίθεση με τις αντιδράσεις HAT, οι SET απαιτούν περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθούν (Sartor et al. 1999). Επίσης, είναι πολύ ευαίσθητες στο ασκορβικό και στο ουρικό οξύ, καθώς οι αντιδράσεις SET διατηρούν τον οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα στο πλάσμα του κυττάρου. Η παρουσία ορισμένων μετάλλων και πολυφαινόλων στο διάλυμα επηρεάζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του, δίνοντας ανακριβή αποτελέσματα (Huang et al. 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφοροι μέθοδοι όπως είναι: η DPPH, η FRAP, η TEAC, η CUPRAC, η DMPD, κ.λ.π. (Huang et al. 2005, Tabart et al. 2009). Επίσης, ανήκει και η μέθοδος Folin-Ciocalteu για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων (Gao et al. 2000).

Πέρα από τις δυο αυτές σημαντικότερες κατηγορίες, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι οποίες είναι:

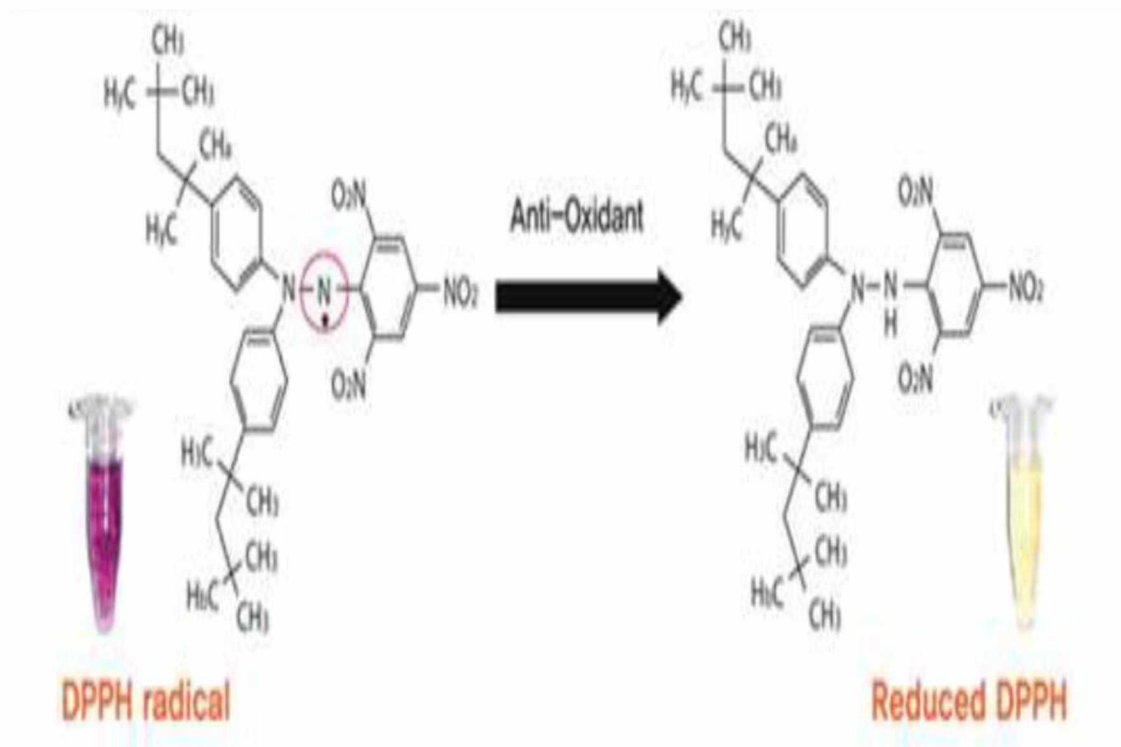
- ✓ Ο προσδιορισμός της ολικής οξειδωτικής ικανότητας (TOSC)
- ✓ Η διαδικασία της χημειοφωταύγειας και
- ✓ Η διαδικασία της ηλεκτροχημειοφωταύγειας κ.λ.π. (Huang et al. 2005, Prior et al. 2005).

Ωστόσο, σύμφωνα με τους ερευνητές Frankel και Meyer (2000), καμία μέθοδος δεν είναι επαρκής για την πλήρη αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και αυτό γιατί οι διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να αποφέρουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών των δειγμάτων.

Παρακάτω, αναφέρονται και περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση του πειράματος.

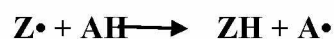
### 1.3.1 Μέθοδος DPPH

Η ρίζα DPPH• (1,1 διφαινυλ-2 πικρυλδραζύλιο) αποτελεί μια από τις πιο γνωστές και σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και δεν χρειάζεται να δημιουργηθεί πριν από την δοκιμασία, όπως η ρίζα ABTS• (Molyneux, 2003, Huang et al. 2005). Το DPPH είναι μια μέθοδος SET, που βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου, όπου το διάλυμα μετατρέπεται σε πορφυρό χρώμα (Fotis et al. 2004, Huang et al. 2005). Η σταθερή ρίζα DPPH• αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται). Με τη μείωση, το χρώμα του διαλύματος εξασθενεί και αποχρωματίζεται (Εικόνα 4). Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται σε φασματοφωτόμετρο στα 517 nm (Blois, 1958, Sharma and Bhat, 2009).



Εικόνα 4: Διαδικασία αποχρωματισμού DPPH ( Molyneux ,2003).

Αποτυπώνοντας τα σε μια αντίδραση, συμβολίζοντας τη ρίζα DPPH• με Z• και το μόριο του δότη με AH, η αντίδραση θα είναι:



Όπου, η ZH είναι η ανηγμένη μορφή και η ρίζα A• είναι η ελεύθερη ρίζα που παράγεται. Έπειτα, η ρίζα A• θα υποστεί περαιτέρω αντιδράσεις ως αποτέλεσμα τα μόρια του DPPH να μειώνονται και να αποχρωματίζεται το διάλυμα. Άρα, το μόριο του DPPH αντιπροσωπεύει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται, των οποίων η δραστηριότητα πρέπει να περιορίζεται από την ουσία AH. Το ποσοστό της υπόλοιπης DPPH μετά τη μείωση, υπολογίζεται ως :

$$\% DPPH \cdot quenched = \left( 1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Το % DPPH που παραμένει, είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί μείωση της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH (Molyneux, 2003).

Ο πρώτος που καθιέρωσε τη μέθοδο DPPH ήταν ο Blois (1958), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αντιοξειδωτικό την ομάδα θειολ- το οποίο περιέχει αμινοξύ κυστεΐνης. Ύστερα, από συνεχή επιστημονικά πειράματα, η πιο πρόσφατη και καθιερωμένη μέθοδος είναι αυτή του Brand-Williams και της ομάδας του (1995), οι οποίοι όρισαν και την παράμετρο EC50 . Μια παράμετρος που εισήχθη πρόσφατα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθώς ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που προκαλεί απώλειες της τάξης 50% της δραστηριότητας του DPPH. Παρόλ' αυτά, η EC50 έχει ως μειονέκτημα ότι όσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο η τιμή του EC50 μειώνεται. Ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης με συγκέντρωση EC50, υπολογίζεται από την κινητική καμπύλη και ορίζεται ως T<sub>EC50</sub>. Η ταξινόμηση της κινητικής συμπεριφοράς σε συνάρτηση με το χρόνο μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

- < 5 min, (ταχεία αντίδραση)
- 5-30 min, (ενδιάμεση αντίδραση) και
- > 30 min, (αργή αντίδραση) (Sanchez-Moreno et al. 1998, Sanchez-Moreno et al. 1999).

Πιο πρόσφατες έρευνες, έδειξαν ότι ο χρόνος της αντίδρασης μπορεί να είναι:

- 5 min ( Lebeau et al. 2000)
- 10 min (Schwart et al. 2001) και
- 30 min (Kim et al. 2002).

Υπάρχουν πολλοί παράμετροι για τον χαρακτηρισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, ένας από αυτούς είναι η « αποτελεσματικότητα κατά των ριζών » (AE: Antiradical Efficiency) και υπολογίζεται ως (Jimenez-Escrig et al. 2000, Huang et al. 2005):

$$AE = (1/EC_{50}) * T_{EC50}$$

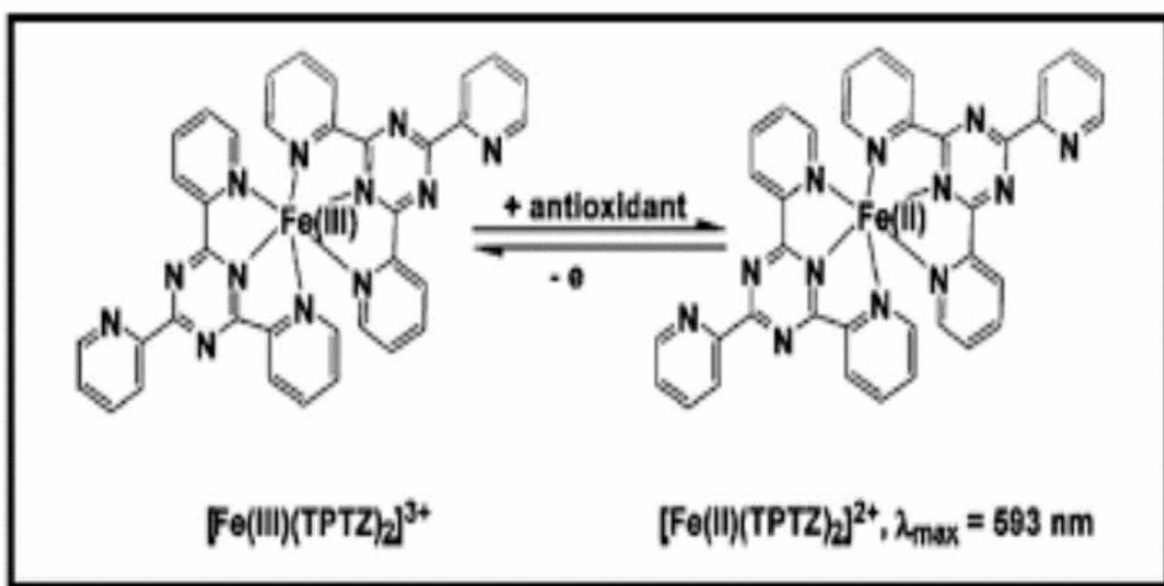
Επίσης, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση είναι το φως, το οξυγόνο και το pH του διαλύματος (Ozcelik et al. 2003).

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο DPPH είναι συνήθως η μεθανόλη ή η αιθανόλη (Bondet et al. 1997). Η χρήση άλλων διαλυτών όπως το νερό ή η ακετόνη, αποδείχθηκε ότι δίνει χαμηλότερες τιμές. Επίσης, η ρίζα DPPH• είναι αδιάλυτη στο νερό (Guo et al. 2001). Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η διατήρηση του pH περίπου στα 5-6,5 με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών ενώσεων. (Blois, 1958). Με την τυχαία προσθήκη οξέων ή βάσεων που υπάρχουν στο διάλυτη, μπορεί να επηρεαστεί δραματικά η ισορροπία ιοντισμού. Αυτό καθιστά την δοκιμασία του DPPH μη έγκυρη για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Fotis et al. 2004).

Η μέθοδος DPPH είναι σχετικά απλή και γρήγορη καθώς δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό παρά μόνο ένα φασφατοφωτόμετρο, γεγονός που πιθανώς να εξηγεί τη διαδεδομένη χρήση της στο αντιοξειδωτικό έλεγχο (Prior et al. 2005). Ωστόσο, η ερμηνεία της μεθόδου είναι περίπλοκη και ορισμένα μειονεκτήματα περιορίζουν την εφαρμογή της. Το DPPH μπορεί να διαλυθεί μόνο σε οργανικούς διαλύτες και ειδικά σε μεθανόλη ή αιθανόλη, αποτελώντας περιορισμό στην ερμηνεία των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών (Wojdylo et al. 2007). Η ρίζα DPPH• είναι μια σταθερή ρίζα αζώτου που δεν έχει ομοιότητα με τις εξαιρετικά δραστικές και παραδοσιακές ρίζες υπεροξειδίου, που εμπλέκονται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Γι' αυτό, πολλά αντιοξειδωτικά που δρουν γρήγορα με τις ρίζες υπεροξειδίου, μπορεί να αντιδράσουν αργά ή να παραμείνουν ανενεργά με το DPPH. Η μέθοδος αυτή δεν αποτελεί ανταγωνιστική αντίδραση διότι το DPPH δρα τόσο ως ανιχνευτής ρίζων όσο και ως οξειδωτικό. Το χρώμα του διαλύματος μπορεί να χαθεί είτε μέσω των αντιδράσεων HAT είτε μέσω των SET, καθώς και η στερεοχημική προσβασιμότητα αποτελεί ένα καθοριστικό παράγοντα της αντίδρασης, οδηγώντας ωστόσο σε ανακριβή αποτελέσματα. Έτσι, τα μικρά μόρια που δεσμεύονται στις ριζικές θέσεις, έχουν υψηλότερη πρόσβαση. Όσον αφορά, την κινητικότητα της αντίδρασης μεταξύ του DPPH και των αντιοξειδωτικών δεν είναι γραμμική. Επομένως, η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται χρησιμοποιώντας την παράμετρο EC50 (Prior et al. 2005, Huang et al. 2005). Τέλος, η αντίδραση DPPH σε σχέση με την ευγενόλη (eugenol) είναι αντιστρέψιμη, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε χαμηλές μετρήσεις των δειγμάτων που περιέχουν ευγενόλη και άλλες φαινολικές ενώσεις που φέρουν παρόμοιο τύπο όπως και η ο-μεθοξυφαινόλη (Bondet et al. 1997, Huang et al. 2005).

### 1.3.2 Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού δυναμικού, μετρώντας την αναγωγική ισχύς στο πλάσμα του αίματος και έπειτα προσαρμόστηκε για την χρήση της σε δείγματα βοτάνων (Benzie and Strain, 1996, Benzie and Szeto, 1999, Ou et al. 2002, Prior et al. 2005). Πρόκειται, συνεπώς για μια φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ισχύος, χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό στην αντίδραση ένα άλας σιδήρου  $\text{Fe(III)(TRTZ)}_2\text{Cl}_3(\text{TRTZ})$ , που μετρά την αναγωγική ισχύ μιας ένωσης. Η αναγωγική ισχύ συσχετίζεται με τον βαθμό υδροξυλίωσης καθώς και με τη σύζευξη σε πολυφαινόλες (Pulido et al. 2000).



Εικόνα 5: Μηχανισμός αντίδρασης της μεθόδου FRAP (Prior et al. 2005).

Το δυναμικό της αντίδρασης FRAP είναι περίπου 0,7 V ,καθώς παρόμοιο δυναμικό παρουσιάζει και η ρίζα  $\text{ABTS}\cdot$  0,68V. Συνεπώς, δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δοκιμασίων FRAP και TEAC, διότι παρόμοιες ενώσεις αντιδρούν και με τις δύο δοκιμασίες. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο μεθόδων είναι ότι διεξάγονται σε διαφορετικά pH . Η δοκιμασία TEAC διεξάγεται σε ουδέτερο pH, ενώ η FRAP σε όξινο pH (3,6). Το χαμηλό pH στη μέθοδο FRAP, εξασφαλίζει τη διαλυτότητα του σιδήρου μέσα στο διάλυμα (Huang et al. 2005, Prior et al. 2005). Σε όξινες συνθήκες, η αντίδραση FRAP έχει ως σκοπό την μείωση του δυναμικού ιοντισμού και την καταστολή λόγω της πρωτονίωσης, εμποδίζοντας τις ριζικές αλυσίδες να ρυθμίσουν τον οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα στο πλάσμα και στους ιστούς των κυττάρων. Ο μηχανισμός της αντίδρασης FRAP, βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου, αυξάνοντας το δυναμικό της αντίδρασης με παράλληλη μετατόπιση του μηχανισμού της

αντίδρασης δηλαδή, με την αναγωγή του συμπλόκου του Fe (III)-TRTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) σε Fe (II)-TRTZ, παρουσιάζοντας ένα έντονο μπλε χρώμα στο διάλυμα (Εικόνα 5) (Prior et al. 2005). Οι μετρήσεις των δειγμάτων πραγματοποιούνται σε φασματοφωτόμετρο στα 593 nm. Η μεταβολή της απορρόφησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιδραστήριου (Benzie and Strain, 1996).

Ωστόσο, η μέθοδος FRAP δεν μπορεί να ανιχνεύσει ενώσεις που δρουν με τη μεταφορά υδρογόνου και συγκεκριμένα τέτοιες ενώσεις είναι οι θειόλες και διάφορες πρωτεΐνες (Ou et al. 2002). Επιπλέον, με τη διαδικασία της οξειδωσης ή της αναγωγής των ριζών στα ιόντα και ιδιαίτερα στα ιόντα ορισμένων μετάλλων που παίζουν ενεργητικό ρόλο στις ριζικές αλυσίδες, έχουν σαν αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αναγωγή του υδρουπεροξειδίου σε ρίζα RO. Μελέτες έδειξαν ότι παρουσιάζουν υψηλές τιμές FRAP σε διάφορες πολυφαινόλες όπως, φλαβόνες και φλαβονόνες κάτω από ορισμένες συνθήκες για να καταστούν προ-οξειδωτικά (Gao et al. 2000).

Σύμφωνα, με τον ερευνητή Pulido και τους συνεργάτες του (2000), αποδείχθηκε ότι οι τιμές FRAP των πολυφαινόλων σε νερό ή μεθανόλη στα 593 nm η απορρόφηση δεν σταματάει στα 4 min. Αντίθετα, συνεχίζει να αυξάνεται μετά από μερικές ώρες, δίνοντας τιμές που δεν μπορούν να ληφθούν με ακρίβεια σε ορισμένο χρονικό περιθώριο. Γι' αυτό, στηρίζονται στην υπόθεση ότι οι αντιδράσεις οξειδωαναγωγής πραγματοποιούνται τόσο γρήγορα ώστε οι αντιδράσεις να είναι πλήρης εντός των 4 και 6 min, που στην πραγματικότητα αυτό δεν ισχύει πάντοτε (Perkampus, 1991).

Συνοψίζοντας, η μέθοδος FRAP είναι απλή, γρήγορη, φθηνή και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό σε σύγκριση με άλλες δοκιμές της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επίσης, η FRAP μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένες ή ημιαυτόματες μεθόδους. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μειονεκτήματα στη μέθοδο. Ένα από αυτά είναι και ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων, ο οποίος αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση των τιμών της FRAP, καθώς τα αποτελέσματα μπορούν να διαφέρουν δραματικά. Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις που δεσμεύουν το σίδηρο ή έχουν την ικανότητα να διασπώνται σε ενώσεις με χαμηλή διαλυτότητα αναλύονται καλύτερα σε σύντομα χρονικά διάστημα (λ.χ. 4 min), ενώ ενώσεις όπως είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις αντιδρούν πιο αργά και χρειάζονται μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης για να ανιχνευθούν (λ.χ. 30min) (Prior et al. 2005). Ο χρόνος αντίδρασης μπορεί να διαφέρει και να αλλάζει τη σειρά της αντιδραστικότητας των αντιοξειδωτικών (Pulido et al. 2000). Τέλος, η μέθοδος FRAP δεν μπορεί να μετρήσει αντιοξειδωτικά που περιέχουν στο μόριο τους θειόλες, όπως είναι η γλουταθειόνη, αλλά μετράει μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα της ανηγμένης μορφής του Fe(III) (Prior et al. 2005).

### 1.3.3 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) είναι μία φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1927 για την ανάλυση πρωτεϊνών, που εκμεταλλεύονται τη δραστηριότητα του αντιδραστηρίου και που χρησιμοποιείται ενάντια στο πρωτεϊνικό υπόλοιπο της τυροσίνης, η οποία περιέχει ομάδα φαινόλης (Musci and Yao, 2017). Η μέθοδος (F-C) μετράει την αναγωγική ικανότητα ενός δείγματος καθώς πραγματοποιήθηκαν εφαρμογές μαζί με άλλες τεχνικές αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως η FRAP ή η TEAC και υπήρχε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών (Stevanato et al. 2004).

Η μέθοδος (F-C) βασίζεται σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση των συνολικών φαινολικών *in vitro* δηλαδή, την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδενικού ( $H_3Mo_{12}O_{40}$ ) και του φωσφοροβολφραμικού ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) οξέως, τα οποία είναι συστατικά του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1999). Για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων παρουσιάζεται απορρόφηση στα 745-750nm μέσω του φασματοφωτομέτρου, ο οποίος είναι ανάλογος με την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, αυτό γιατί δεν υπάρχει ρίζα οξυγόνου και είναι αμφίβολο το ότι τα αποτελέσματα συσχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Άρα, θεωρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ίση με την αναγωγική ικανότητα (Benzie and Strain, 1996). Η αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού εκφράζεται με την κλίση της καμπύλης ως ισοδύναμο Trolox (TE) ή ισοδύναμο γαλλικό οξύ (GAE) (Huang et al. 2005). Συνήθως, ως πρότυπο χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ, που όμως μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να γίνει η αντικατάσταση του με άλλες ουσίες όπως: η κατεχίνη (Katsube et al. 2003), το ταννικό οξύ (Nakamura et al. 2003), το χλωρογενικό οξύ (Wang et al. 2003), το καφεϊνικό οξύ (Maranz et al. 2003), το πρωτεκαχικό οξύ (Cai et al. 2003), το βανιλικό οξύ (Jayasinghe et al. 2003) και το φερουλικό οξύ (Velioglu et al. 1998). Η έλλειψη τυποποίησης των μεθόδων μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές τιμές των φαινολικών ενώσεων.

Για τον σχηματισμό του αντιδραστηρίου χρειάζονται περίπου 10 h βρασμού του μίγματος του βολφραμικού νατρίου ( $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ , 100 g), του μολυβδαινικού νατρίου ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 25 g), πυκνό υδροχλωρικό οξύ (100 mL), φωσφοτικού οξέος 85% (50 mL) και νερό (700 mL). Ύστερα από τον βρασμό, γίνεται προσθήκη στο τελικό διάλυμα με θειικό λίθιο ( $Li_2SO_4 \cdot 4H_2O$ , 150 g), δίνοντας ένα έντονο κίτρινο χρώμα στο διάλυμα. Με την επιμόλυνση μέσω αναγωγικών ουσιών εμφανίζεται στο διάλυμα ένα πράσινο-πορφυρό χρώμα, ενώ με την προσθήκη οξειδωτικών ουσιών επαναφέρετε το επιθυμητό κίτρινο χρώμα. Όπως προαναφέρθηκε, στις αναγωγικές αντιδράσεις γίνεται η μεταφορά ενός ή δυο ηλεκτρονίων που οδηγούν στην εμφάνιση του μπλε χρώματος στο διάλυμα, που πιθανώς οφείλεται στην ένωση



(PMoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>4-</sup>. Στην πράξη όμως, το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα στο σύμπλοκο και πραγματοποιείται η αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των αναγωγικών ενέσεων και του Mo(VI):



Το αντιδραστήριο (F-C) δεν είναι αποτελεσματικό στις φαινολικές ενώσεις, καθώς μπορεί να επηρεαστεί και να αναχθεί από άλλα μη-φαινολικά συστατικά όπως η βιταμίνη C και το Cu (I). Μόνο κάτω από βασικές συνθήκες μπορούν οι φαινολικές ενώσεις να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο έτσι ώστε να διατηρηθεί το pH κοντά στο 10 με την χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων όπως το διάλυμα του ανθρακικού νατρίου. Αντίθετα, σε όξινες συνθήκες η αντίδραση είναι πολύ αργή και δεν παρουσιάζει καμία εξειδίκευση. Η εκτίμηση των ολικών φαινολικών βασίζεται στις αντιδράσεις SET, που στηρίζεται στην δημιουργία και την ύπαρξη ενός φαινολικού πρωτονίου που οδηγεί στην αναγωγή του αντιδραστηρίου (F-C) (Huang et al. 2005, Rrior et al., 2005).

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μια απλή και χρήσιμη διαδικασία για τη μελέτη των ολικών φαινολικών αντιοξειδωτικών σε βοτανικά δείγματα, δίνοντας έγκυρα και ορθολογικά αποτελέσματα κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Είναι μια τυποποιημένη διαδικασία, εφόσον το αντιδραστήριο (F-C) είναι και εμπορικά διαθέσιμο (Prior et al. 2005). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το αντιδραστήριο (F-C) μπορεί να αντιδράσει από μια σειρά παρεμβαλλόμενων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μη-φαινολικών οργανικών ουσιών (αδενίνη, αλανίνη, ασκορβικό οξύ, κ.λ.π.) και ορισμένων ανόργανων ουσιών (υδραξίνη, χλωριούχο, συμπλοκοποίηση Cu(I), κ.λ.π.), αυξάνοντας την αντιδραστικότητα των φαινολικών αντιοξειδωτικών προς το αντιδραστήριο (Everette et al. 2010).

#### 1.4 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης, αποτελεί μια προσπάθεια αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σιλυμαρίνης του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum* (L.) σε διαφορετικό χρόνο συγκομιδής. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η επίδραση των τριών σταδίων ωρίμανσης στο ποσοστό σιλυμαρίνης, την αντιοξειδωτική ικανότητα και τα ολικά φαινολικά.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Πειραματικό μέρος

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.2 Πειραματικός αγρός

Για την εκπόνηση του πειράματος στο χώρο του αγροκτήματος της γεωπονικής σχολής στο Βελεστίνο, σπάρθηκε η καλλιέργεια του φυτού *Silybum marianum* στις 4/03/17. Η καλλιέργεια του φυτού φύτρωσε σε περίπου 15 ημέρες μετά τη σπορά. Η πλήρης άνθηση της καλλιέργειας ήταν στις 30/05/17. Η συγκομιδή των ταξιανθιών ξεκίνησε το πρώτο δεκαπενθήμερο του Ιουνίου για τα 3 βλαστικά στάδια και ολοκληρώθηκε στα τέλη του μήνα. Η διαφορά συγκομιδής μεταξύ των σταδίων ήταν 10 ημέρες. Τα 3 βλαστικά στάδια χωρίζονται σε: ανώριμες (Εικόνα 6), ώριμες (Εικόνα 7) και υπερώριμες ανθοκεφαλές (Εικόνα 8), που περιέχουν τους σπόρους. Σε κάθε στάδιο ο χρωματισμός του σπόρου αλλάζει, καθώς υπάρχει μικρή διαφορά στα δυο τελευταία στάδια. Μετά τη συλλογή των ταξιανθιών, έγινε το καθάρισμα των σπόρων και η διατήρησή τους στην κατάψυξη μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα.



**Εικόνα 6:** Βλαστικό στάδιο I, χρώμα του σπόρου ανοιχτό καφέ.



**Εικόνα 7:** Βλαστικό στάδιο II, χρώμα του σπόρου καστανό σκούρο.



Εικόνα 8: Βλαστικό στάδιο III, χρώμα του σπόρου καστανό-μαύρο.

### 2.3 Εκχύλιση σπόρων – Παραλαβή σιλυμαρίνης

Για την εκχύλιση της σιλυμαρίνης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα, σκεύη και υλικά:

- Συσκευή Soxhlet
- Περιστροφικός εξατμιστήρας
- Αναδευτήρας Vortex
- Συσκευή υπερήχων
- Ζυγός ακριβείας
- Μύλος άλεσης
- Ποτήρια ζέσεως
- Σπάτουλα
- Σιφόνια
- Σφαιρικές φιάλες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 5 mL
- Εξάνιο Analytical reagent grade (SIGMA-ALDRICH)
- Μεθανόλη Analytical reagent grade (SIGMA-ALDRICH)
- Μεθανόλη HPLC (SIGMA-ALDRICH)
- Νερό HPLC (Fisher Chemical)

### Λιαδικασία εκχύλισης:

1. Προετοιμασία δειγμάτων (36 δείγματα) σπόρων του φυτού *Silybum marianum* με κονιοποίηση των σπόρων (περίπου 7 g) σε μύλο άλεσης
2. Εκχύλιση 5 g αλεσμένου σπόρου σε συσκευή Soxhlet με εξάνιο (200 mL εξανίου για 4 ώρες) για την παραλαβή των λιπαρών ουσιών .
3. Μέτρηση των λιπαρών ουσιών. Αρχικά πραγματοποιείται εξάτμιση μέχρι ξηρού του εξανικού εκχυλίσματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό στους 40°C και ακολουθεί μέτρηση της μάζας των λιπαρών ουσιών με ζύγιση.
4. Συνέχεια με εκχύλιση του απολιποποιημένου αλεσμένου σπόρου με μεθανόλη (200 mL μεθανόλης σε συσκευή Soxhlet, για 4 ώρες) για την παραλαβή της σιλυμαρίνης.
5. Εξάτμιση μέχρι ξηρού του μεθανολικού εκχυλίσματος σιλυμαρίνης στον περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό στους 40°C (περίπου για 2 h) και μέτρηση της μάζας του στερεού υπολείμματος της σιλυμαρίνης με ζύγιση.
6. Επαναδιάλυση του στερεού υπολείμματος της σιλυμαρίνης με 25 mL μεθανόλης και με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων.
7. 1 mL από το μεθανολικό εκχύλισμα σιλυμαρίνης αραιώνεται εκ νέου σε 25 mL μεθανόλης. Μέρος του αραιωμένου διαλύματος μεταφέρεται σε φιαλίδια χρωματογραφίας και οδηγείται προς ανάλυση για το χρωματογραφικό προσδιορισμό των συστατικών της σιλυμαρίνης. Η ανάλυση των συστατικών της σιλυμαρίνης πραγματοποιήθηκε με HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Τα δείγματα (μεθανολικά εκχυλίσματα του σταδίου 7) τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθούν στις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων.

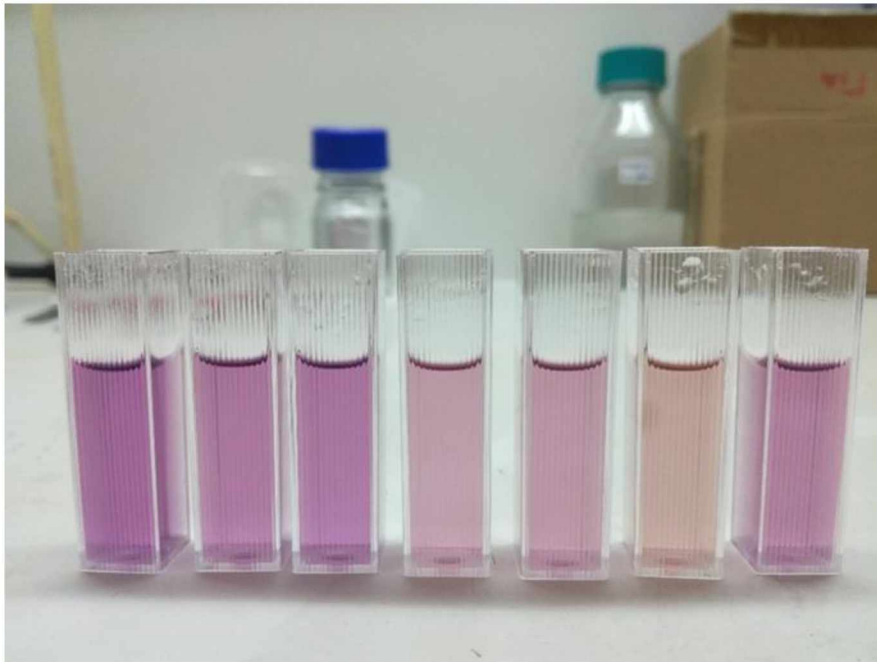
## **2.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH**

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σιλυμαρίνης με την μέθοδο DPPH χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα, σκεύη και υλικά:

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Αναδευτήρας Vortex
- Ζυγός ακριβείας
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ποτήρια ζέσεως

- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Σφαιρικές φιάλες
- Αυτόματη πιπέτα
- Σιφόνιο
- Κυψελίδες
- Αντιδραστήριο DPPH
- Μεθανόλη analytical grade
- Πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας (DPPH), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Blois (1958), με μερικές τροποποιήσεις. Όσο περισσότερες ελεύθερες ρίζες δεσμεύονται, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό του αντιδραστήριου αντιδρά με το δείγμα, έτσι ώστε το χρώμα του διαλύματος να αλλάζει από μωβ σε κίτρινο (Εικόνα 9). Όσο πιο πολύ αποχρωματίζεται το διάλυμα, τόσο πιο ισχυρό είναι το αντιοξειδωτικό.



**Εικόνα 9:** Πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων μαζί με το αντιδραστήριο DPPH. Η μεταβολή του μωβ χρώματος στα διαλύματα σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος (αύξηση αντιοξειδωτικής δράσης). Στη δεξιά πλευρά υπάρχει το διάλυμα ελέγχου (control) που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις.

### **Παρασκευή του αντιδραστηρίου DPPH:**

Πριν την έναρξη της δοκιμασίας, παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα DPPH σε μεθανόλη (η επιθυμητή συγκέντρωση είναι 50-60  $\mu\text{M}$ ). Ζυγίστηκαν, 0,00472 g DPPH και διαλύθηκαν σε 200 mL μεθανόλης. Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος με συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,8 και 1,0 mM με αραιώση από το μητρικό διάλυμα. Τα διαλύματα DPPH αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο πριν τη χρησιμοποίησή τους.

**Παρατήρηση:** Το αντιδραστήριο DPPH παρασκευαζόταν ημερησίως.

### **Μετρήσεις:**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3 mL ημερήσιου αντιδραστηρίου DPPH και 200  $\mu\text{L}$  (0,2 mL) του μεθανολικού εκχυλίσματος του σπόρου (δείγμα) ή ενός προτύπου διαλύματος (ασκορβικό οξύ) και ο σωλήνας σφραγιζόταν με ειδικές ταινίες Filmer. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ανάδευση του διαλύματος σε Vortex και διατήρησή του για μισή ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 30 min, το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα τοποθετούνταν σε κυψελίδες και ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 517 nm. Χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Όλοι οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα πρότυπα μεθανολικά διαλύματα του ασκορβικού οξέος. Η ικανότητα απομάκρυνσης του DPPH, εκφράστηκε σε  $\mu\text{mol}$  ασκορβικού ανά 100 g ξηρού βάρους ( $\mu\text{mol Asc}/ 100\text{g dw}$ ).

## **2.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με χρήση της μεθόδου FRAP**

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα, σκεύη και υλικά:

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Αναδευτήρας Vortex
- Υδατόλουτρο
- Ζυγός ακριβείας
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Σφαιρικές φιάλες

- Αυτόματη πιπέτα
- Προχοΐδα
- Αντιδραστήριο FRAP

Το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό των μεθανολικών εκχυλισμάτων σίλυμαρίνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Benzie and Strain (1996), με μερικές τροποποιήσεις.

#### **Παρασκευή του αντιδραστηρίου FRAP:**

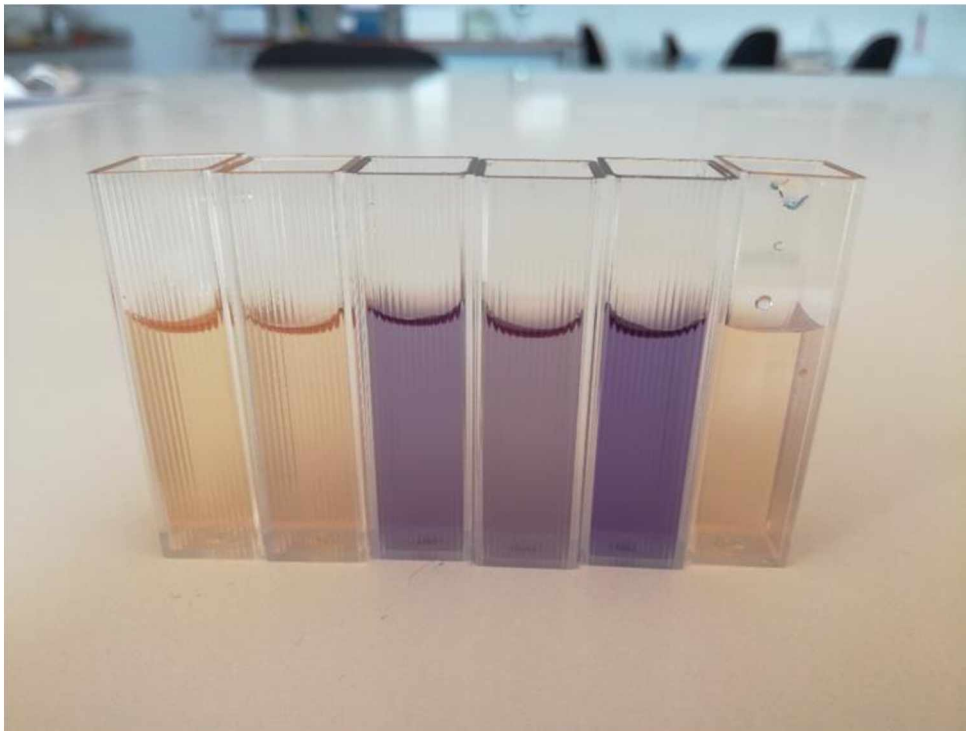
- Διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  ( $\Delta 1$ ): Ζυγίζονται 0,1352 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και διαλύονται σε απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL.
- Διάλυμα  $\text{HCl}$  40 mM με αραιώση 2 mL διαλύματος  $\text{HCl}$  1 M σε ογκομετρική των 50 mL με απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα TPTZ 10 mM σε  $\text{HCl}$  40 mM ( $\Delta 2$ ): Ζυγίζονται 0,0781 g TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Προσθέτουμε διάλυμα  $\text{HCl}$  40 mM.
- Ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $\Delta 3$ ): Ζυγίζονται 0,620 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL. Προστίθεται απιονισμένο νερό και ακολουθεί ρύθμιση του pH σε 3,6 με περίπου 3,2 mL glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με νερό.
- Δημιουργία αντιδραστηρίου FRAP 240 mL: Ανάμιξη των παραπάνω διαλυμάτων σε αναλογία 10:1:1 (v/v/v), δηλαδή 20 mL ( $\Delta 1$ ), 20 mL ( $\Delta 2$ ) και 200 mL ( $\Delta 3$ ). Το αντιδραστήριο παρασκευαζόταν ημερησίως.

#### **Διαδικασία:**

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα πρότυπα μεθανολικά διαλύματα του ασκορβικού οξέος 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,8 και 1,0 mM όπως και στη δοκιμασία του DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα (ικανότητα απομάκρυνσης) του FRAP, εκφράστηκε σε  $\mu\text{mol}$  ασκορβικού ανά 100 g ξηρού βάρους ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{g dw}$ ).

### **Μετρήσεις:**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3 mL αντιδραστηρίου FRAP και αναμείχθηκαν με 200  $\mu\text{L}$  (0,2 mL) του μεθανολικού εκχυλίσματος του σπόρου (δείγμα) ή ενός πρότυπου διαλύματος (ασκορβικό οξύ). Ύστερα ο δοκιμαστικός σωλήνας, αφού σφραγιζόταν με ειδικές ταινίες Filmer, οδηγούταν στο υδατόλουτρο στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση για 4 min. Έπειτα, το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα τοποθετούνταν σε κυψελίδες και ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 593 nm (Εικόνα 10). Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (pH σε 3,6) ως τυφλό για τον μηδενισμό των τιμών απορρόφησης του φασματοφωτομέτρου. Για κάθε προσδιορισμό πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα πρότυπα του ασκορβικού οξέος. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP εκφράστηκαν σε  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  ξηρού βάρους (dw).



**Εικόνα 10 :** Πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος με το αντιδραστήριο FRAP, που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP.



## 2.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και όργανα:

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Αναδευτήρας Vortex
- Ζυγός ακριβείας
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Σφαιρικές φιάλες
- Αυτόματη πιπέτα
- Σιφόνιο
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% w/v)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- Απιονισμένο νερό
- Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

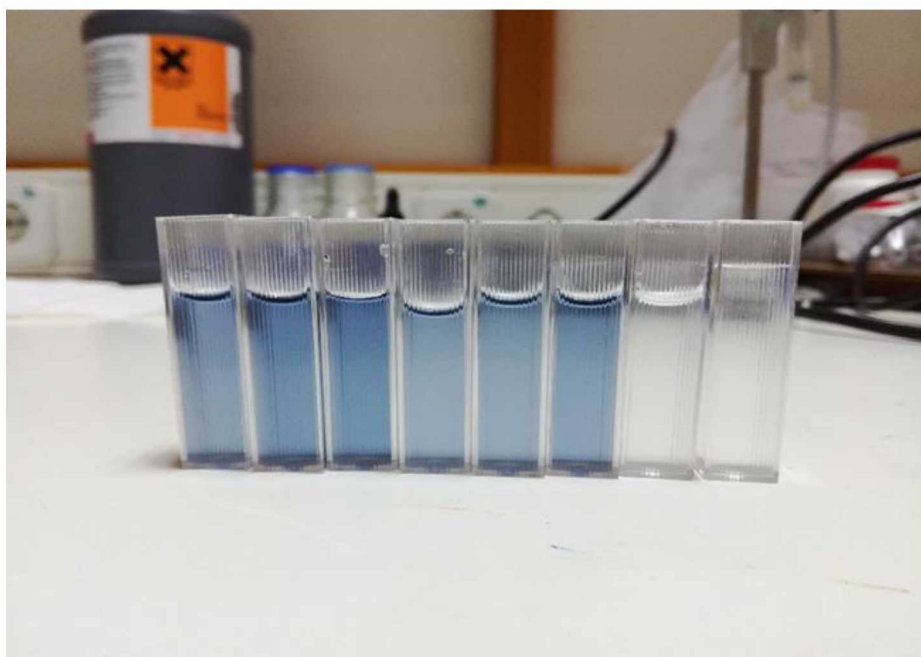
Η περιεκτικότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων του σπόρου σε ολικά φαινολικά προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gao et al., (2000) και Wojdylo et al., (2007). Έτοιμο αντιδραστήριο (F-C), αραιώθηκε σε φιάλη 250 mL με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10 (v/v) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή του διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20% w/v), ζυγίστηκαν 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκαν με νερό μέχρι την χαραγή. Παρασκευάστηκαν 6 πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος (GAE) με συγκεντρώσεις: 50, 100, 200, 300, 400 και 500  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Μετρήσεις:**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρθηκαν 2,2 mL αραιωμένου διαλύματος (F-C) μαζί με 100  $\mu\text{L}$  (0,1 mL) μεθανολικού εκχυλίσματος του σπόρου (δείγμα) ή ενός πρότυπου διαλύματος (γαλλικό οξύ). Μετά από 3 min, στο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου (20% w/v), αναδευτήκε καλά με συσκευή Vortex και σφραγίστηκε με ειδικές ταινίες Filmer. Ύστερα, το διάλυμα διατηρήθηκε για 1 h στο σκοτάδι και σε

θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 60 min 3 mL διαλύματος από το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα τοποθετήθηκε σε κυβελίδες και φωτομετρήθηκε στα 765 nm (Εικόνα 11). Χρησιμοποιήθηκε νερό για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Για κάθε προσδιορισμό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εις τριπλούν.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 765 nm των πρότυπων διαλυμάτων του γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος mg GAE/100 g ξηρού βάρους (dw).

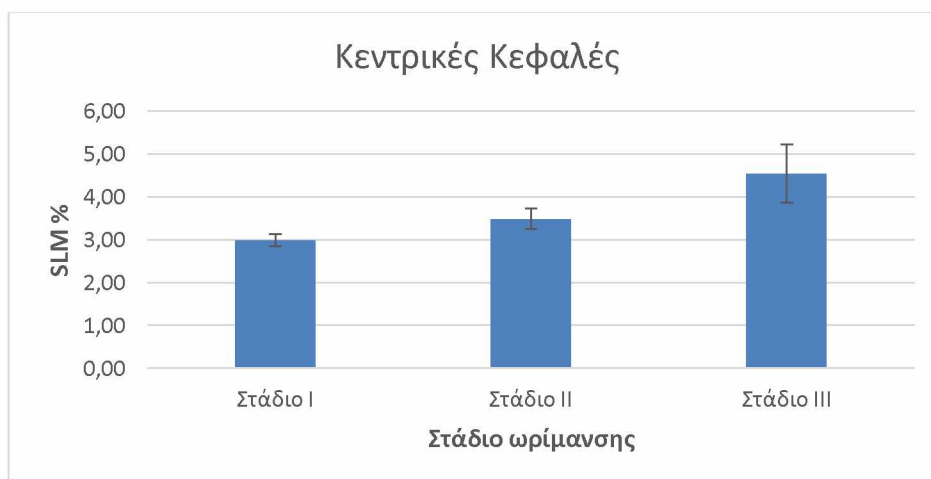


**Εικόνα 11:** Πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο (F-C), δημιουργώντας στα διαλύματα ένα βαθύ μπλε χρώμα. Δίπλα από τα πρότυπα είναι ο μάρτυρας (νερό) που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις.

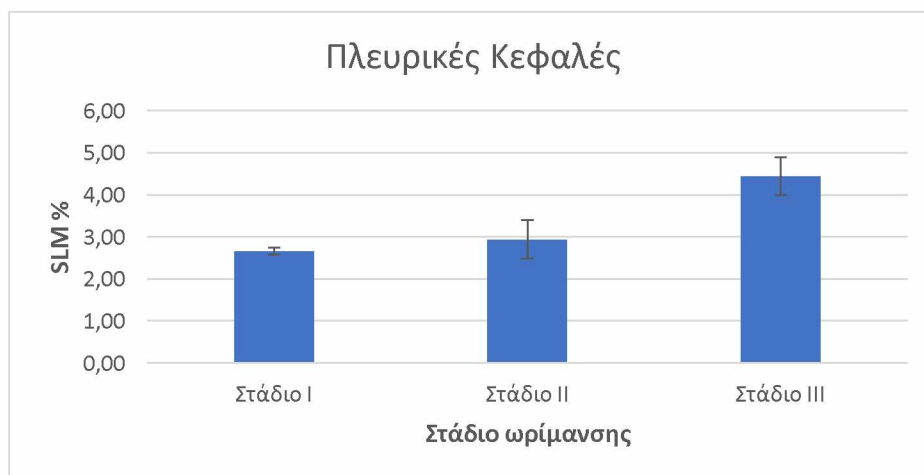
## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα

### 3.1 Περιεκτικότητα σιλυμαρίνης (SLM %) στους σπόρους

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται οι Μ.Ο. των τιμών της περιεκτικότητας σιλυμαρίνης επι τοις εκατό, σε κάθε στάδιο ωρίμανσης του φυτού. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό σιλυμαρίνης μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης τόσο στις κεντρικές όσο και στις πλευρικές κεφαλές του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ του πρώτου με του δεύτερου και του πρώτου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης, καθώς και του δεύτερου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης, όσον αφορά τις κεντρικές κεφαλές (Διάγραμμα 1). Επίσης, διαφορές παρατηρήθηκαν και στις πλευρικές κεφαλές μεταξύ του πρώτου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης και του δεύτερου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης (Διάγραμμα 2).



**Διάγραμμα 1:** Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση σιλυμαρίνης των σπόρων (Στάδιο I =2,99%, Στάδιο II = 3,48% και Στάδιο III =4,55%) στις κεντρικές κεφαλές.

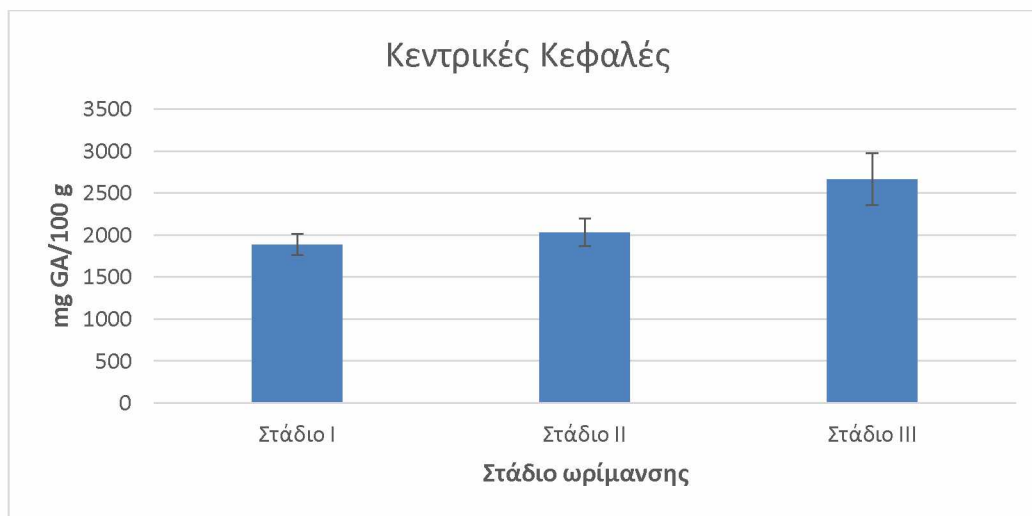


**Διάγραμμα 2:** Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση σιλυμαρίνης (Στάδιο I =2,66%. Στάδιο II =2,94% και Στάδιο III =4,45%) στις πλευρικές κεφαλές.

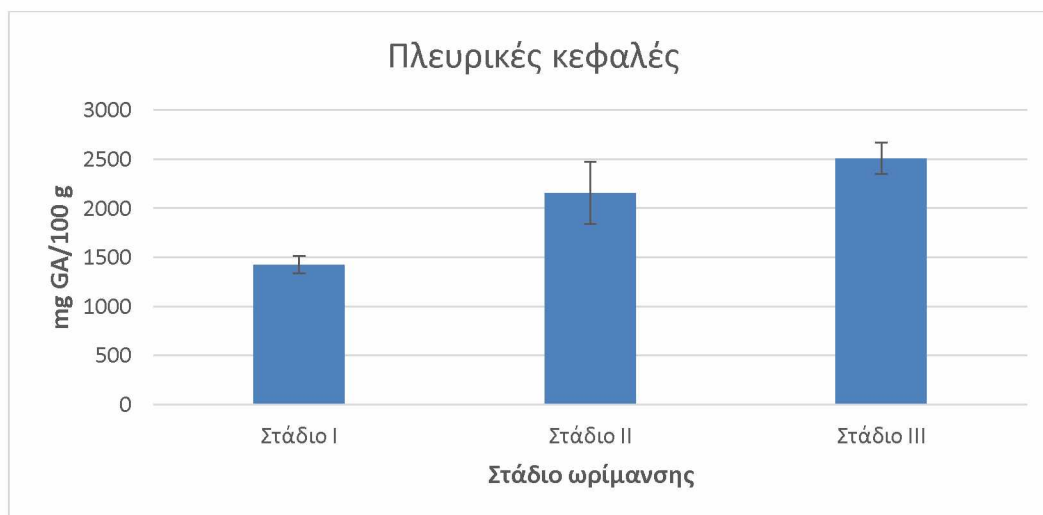
### 3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για την εκτίμηση των ολικών φαινολικών, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος ( $y=324,74x+15,47$ ,  $R^2=0,9997$ ) και οι τελικές τιμές των ολικών φαινολικών εκφράστηκαν σε mg GA/100g σπόρου.

Κατά τη σύγκριση των σταδίων ωρίμανσης παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρώτο με το τρίτο στάδιο ωρίμανσης και στο δεύτερο με το τρίτο στάδιο ωρίμανσης όσον αφορά τις κεντρικές κεφαλές (Διάγραμμα 3), ενώ εντοπίστηκαν διαφορές και στις πλευρικές κεφαλές μεταξύ του πρώτου με δευτέρου σταδίου καθώς και του πρώτου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης (Διάγραμμα 4).



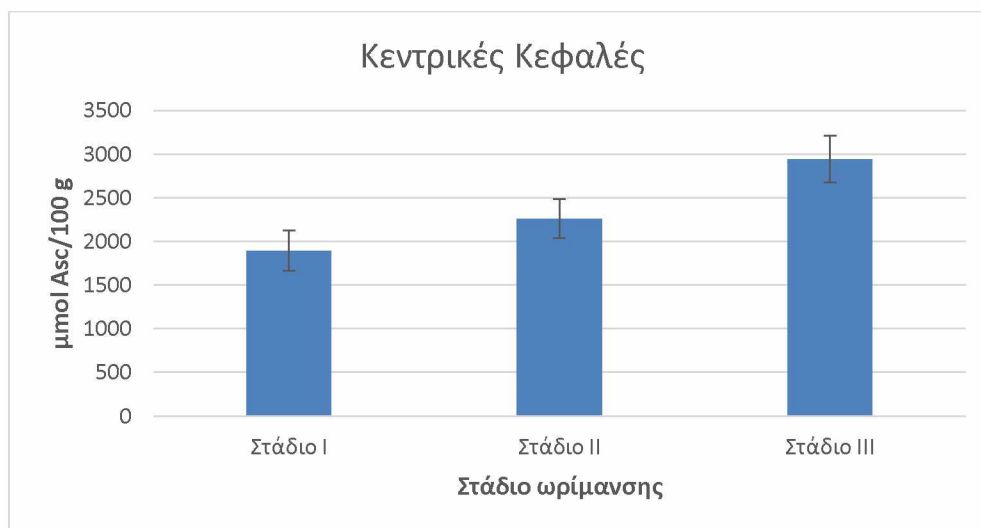
**Διάγραμμα 3:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 1889 mg GA/100 g, Στάδιο II = 2031 mg GA/100 g και Στάδιο III = 2670 mg GA/100 g), στις κεντρικές κεφαλές.



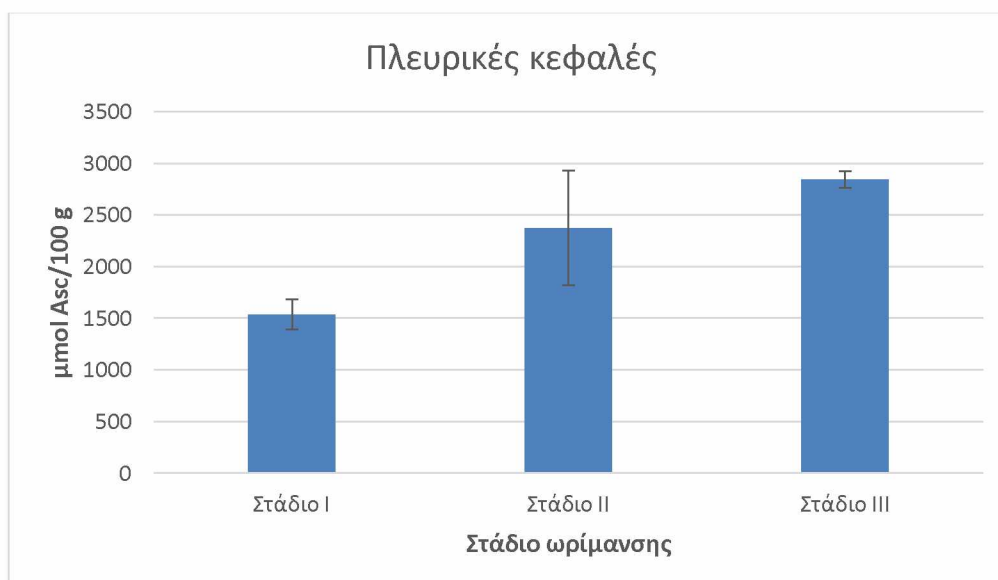
**Διάγραμμά 4:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 1425 mg GA/100 g, Στάδιο II = 2156 mg GA/100 g και Στάδιο III = 2510 mg GA/100 g), στις πλευρικές κεφαλές.

### 3.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του ασκορβικού οξέος ( $y=0,0055x-0,0496$ ,  $R^2=0,9823$ ) και οι τελικές τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράστηκαν σε  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$  σπόρου. Κατά τη σύγκριση των σταδίων ωρίμανσης παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρώτο με το τρίτο στάδιο ωρίμανσης και στο δεύτερο με το τρίτο στάδιο ωρίμανσης όσον αφορά τις κεντρικές κεφαλές (Διάγραμμα 5), ενώ εντοπίστηκαν διαφορές και στις πλευρικές κεφαλές μεταξύ του πρώτου με του δεύτερου σταδίου καθώς και του πρώτου με του τρίτου σταδίου ωρίμανσης (Διάγραμμα 6).



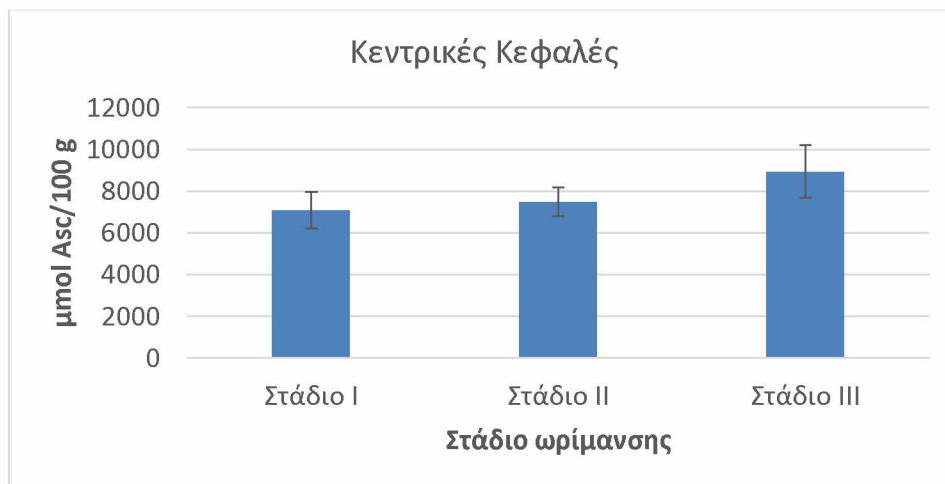
**Διάγραμμα 5:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =1893  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ , Στάδιο II =2259  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$  και Στάδιο III = 2944  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ ), που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH, στις κεντρικές κεφαλές.



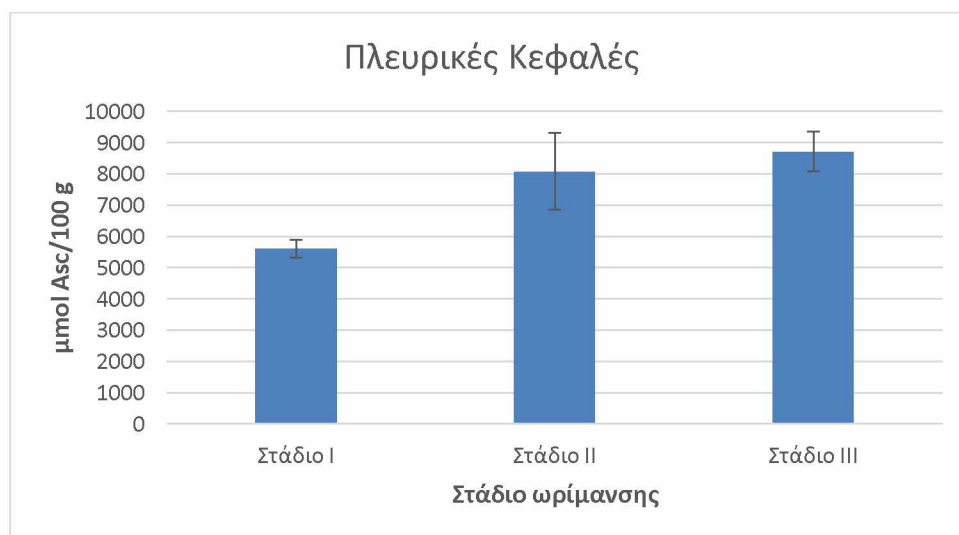
**Διάγραμμα 6:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I =1538  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ , Στάδιο II =2373  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$  και Στάδιο III = 2843  $\mu\text{mol Asc}/100\text{g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο DPPH, στις πλευρικές κεφαλές.

### 3.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του ασκορβικού οξέος ( $y=1,0444x+0,0858$ ,  $R^2=0,9992$ ) και υπολογίστηκαν οι τελικές τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφρασμένες σε  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  σπόρου. Κατά τη σύγκριση των σταδίων ωρίμανσης παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρώτο με το δεύτερο στάδιο ωρίμανσης και στο πρώτο με το τρίτο στάδιο ωρίμανσης όσον αφορά τις πλευρικές κεφαλές (Διάγραμμα 8), ενώ δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κεντρικές κεφαλές (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 7091  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II = 7491  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 8936  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο FRAP, στις κεντρικές κεφαλές.



**Διάγραμμα 8:** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμο ασκορβικό οξύ) στα τρία στάδια ωρίμανσης (Στάδιο I = 5599  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ , Στάδιο II = 8078  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  και Στάδιο III = 8712  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ), που προσδιορίστηκε με την μέθοδο FRAP, στις πλευρικές κεφαλές.

## **Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Συζήτηση και Συμπεράσματα**

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την επίδραση των τριών σταδίων της πειραματικής καλλιέργειας του *Silybum marianum* στην περιεκτικότητα και την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σιλυμαρίνης. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του φυτού οφείλονται στην παρουσία σιλυμαρίνης, η οποία είναι μια πολυφαινολική ουσία που απομονώθηκε από το φυτό *Silybum marianum* και χρησιμοποιείται ως φυτικό φάρμακο για την καταπολέμηση πολλών παθήσεων.

### **Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση σιλυμαρίνης**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Κεφάλαιο 3) της παρούσας μελέτης, η επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στη συγκέντρωση της σιλυμαρίνης στους σπόρους των κεντρικών κεφαλών της πειραματικής καλλιέργειας του *Silybum marianum* ήταν καθοριστική, καθώς καταγράφηκαν στατιστικές διαφορές της συγκέντρωσης σιλυμαρίνης μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σιλυμαρίνης (4,55%) στους σπόρους των κεντρικών κεφαλών καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση της σιλυμαρίνης (2,99%) κατά το πρώτο στάδιο. Η συγκέντρωση σιλυμαρίνης κατά το πρώτο στάδιο ήταν 14% μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του δεύτερου σταδίου, ενώ ήταν 34% μικρότερη σε σύγκριση με αυτή στο τρίτο στάδιο ωρίμανσης. Επίσης, η συγκέντρωση σιλυμαρίνης κατά το δεύτερο στάδιο ήταν 23% σε σύγκριση με αυτή στο τρίτο στάδιο ωρίμανσης.

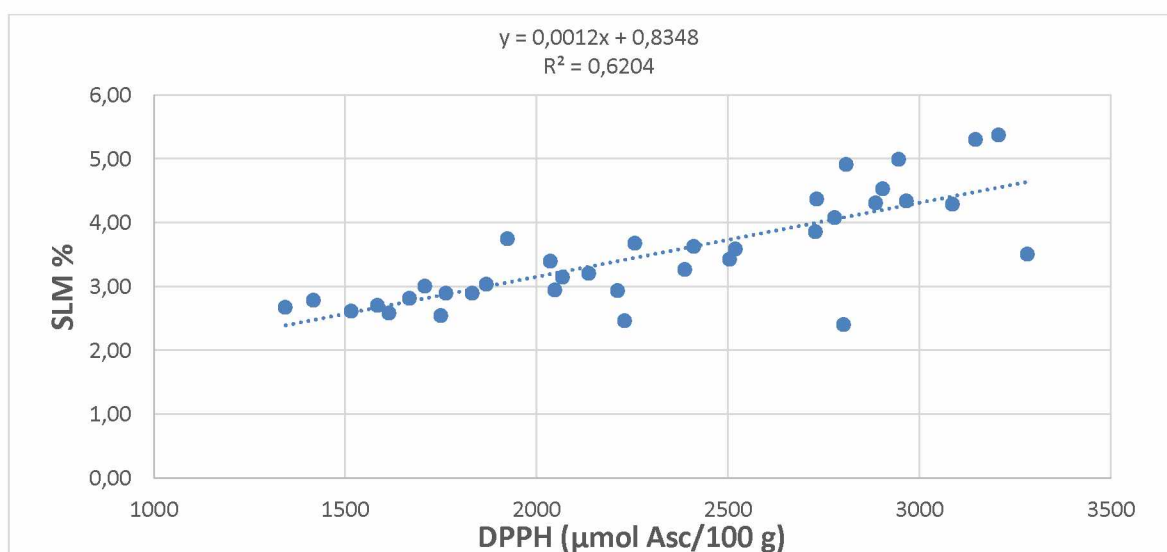
Παρόμοια σχεδόν εικόνα εμφανίζουν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στη συγκέντρωση της σιλυμαρίνης στους σπόρους των πλευρικών κεφαλών της πειραματικής καλλιέργειας του *Silybum marianum*. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σιλυμαρίνης (4,45%) στους σπόρους των πλευρικών κεφαλών παρουσιάστηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη (2,66%) παρουσιάστηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση σιλυμαρίνης κατά το πρώτο στάδιο ήταν 40% μικρότερη σε σύγκριση με αυτή στο τρίτο στάδιο ωρίμανσης, όπως επίσης και η συγκέντρωση σιλυμαρίνης κατά το δεύτερο στάδιο ήταν 34% μικρότερη αυτής του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Η συγκέντρωση σιλυμαρίνης μεταξύ των σπόρων των πλευρικών κεφαλών πρώτου και δεύτερου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

Το συμπέρασμα που προκύπτει συνοψίζεται στο ότι κατά την ωρίμανση των κεφαλών τόσο στις κεντρικές όσο και στις πλευρικές κεφαλές της πειραματικής καλλιέργειας του *Silybum marianum* αυξήθηκε το ποσοστό σιλυμαρίνης στους σπόρους. Παράλληλα, μελέτες δείχνουν ότι η περιεκτικότητα της σιλυμαρίνης αυξάνεται καθώς ο σπόρος ωριμάζει, αλλά η αύξηση αυτή συντελείται με μειωμένη ταχύτητα (Carrier et al. 2003, Martin et al. 2006). Πιο συγκεκριμένα, στις παραπάνω δύο μελέτες εξετάστηκε η περιεκτικότητα της σιλυμαρίνης για

δύο καλλιεργητικές περιόδους, σε τέσσερα στάδια ωρίμανσης (πρώιμο, μεσαίο, όψιμο και υπερώριμο στάδιο ωρίμανσης). Με το αρχικό στάδιο να μην περιέχει πρακτικά ανιχνεύσιμα επίπεδα σιλυμαρίνης, καθώς η καλλιέργεια αναπτυσσόταν και ωριμάζανε οι ανθοκεφαλές, η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη των σπόρων ήταν σε αυξημένα επίπεδα, με μέγιστη περιεκτικότητα στο τέταρτο στάδιο (πλήρης ωρίμανση), όπου οι σπόροι ήταν μαύρου χρώματος. Η έρευνα του Carrier et al. (2003), που πραγματοποιήθηκε στον Καναδά, έδειξε ότι η μέση συνολική περιεκτικότητα σιλυμαρίνης στα τρία τελευταία στάδια ωρίμανσης είναι: 2, 16 και 27 mg σιλυμαρίνης/g (dw). Ομοίως, η έρευνα του Martin et al. (2006), η οποία διεξάχθηκε στην Νέα Ζηλανδία, έδειξε ότι η μέση συνολική περιεκτικότητα σιλυμαρίνης στα τρία τελευταία στάδια ωρίμανσης είναι: 16, 28 και 40 mg σιλυμαρίνης/g (dw). Σημειώνεται ότι η περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη στην παρούσα έρευνα των τριών σταδίων ωρίμανσης (Στάδιο I, Στάδιο II και Στάδιο III, αντίστοιχα) στις κεντρικές κεφαλές βρέθηκε 29,9, 34,8, 45,5 mg σιλυμαρίνης/g (dw), ενώ στις πλευρικές κεφαλές βρέθηκε 26,6, 29,4, 44,5 mg σιλυμαρίνης/g (dw).

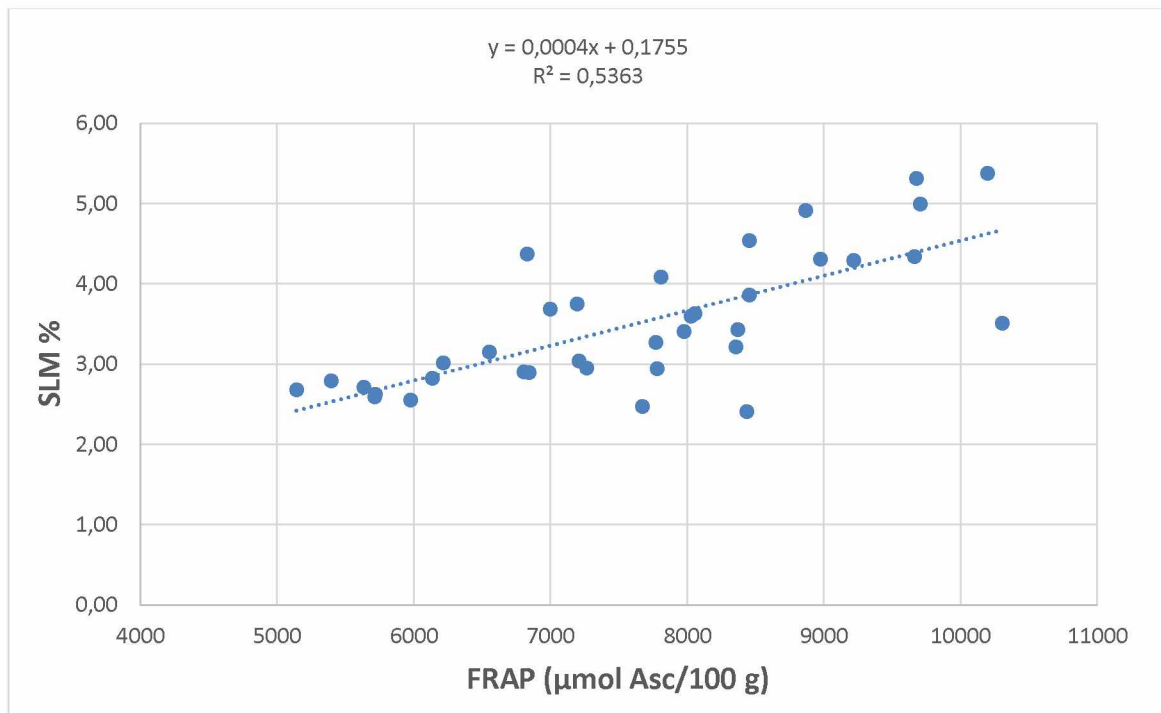
Περαιτέρω ακολούθησε στατιστική ανάλυση συσχέτισης των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης της σιλυμαρίνης των σπόρων (όλων των σταδίων ωρίμανσης των πλευρικών και των κεντρικών κεφαλών) με τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών του εκχυλίσματος των σπόρων.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM%) σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα με την μέθοδο DPPH ( $r=0,788$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 9), με την αντιοξειδωτική ικανότητα με την μέθοδο FRAP ( $r=0,732$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 10) και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu ( $r=0,836$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 11).

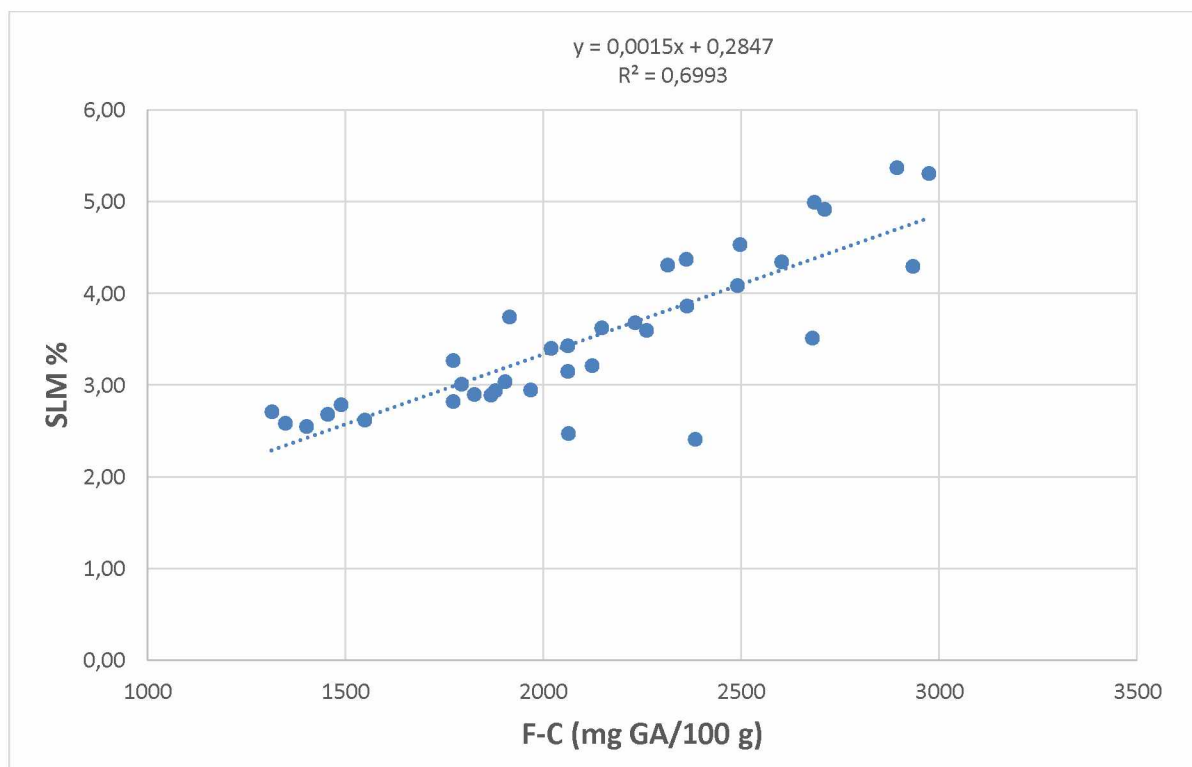


**Διάγραμμα 9:** Συσχέτιση των μετρήσεων του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM %) με τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH ( $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$ ).





**Διάγραμμα 10:** Συσχέτιση του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM%) των σπόρων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο FRAP (μmol Asc/100 g).



**Διάγραμμα 11:** Συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού σιλυμαρίνης (SLM %) και των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (mg GA/100 g).

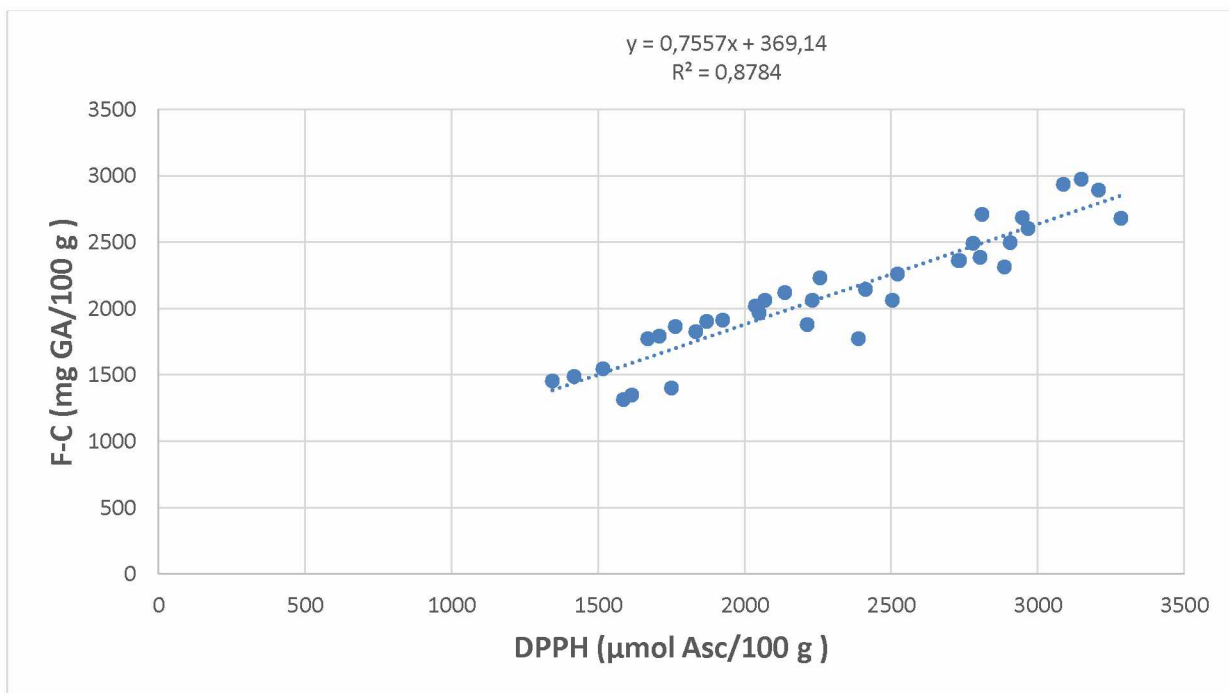
## Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών

Όσον αφορά την επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στις κεντρικές κεφαλές, τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των φαινολικών (2670 mg GA/100 g σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών (1889 mg GA/100 g σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση των φαινολικών κατά το πρώτο στάδιο ήταν 29% μικρότερη σε σύγκριση με αυτή στο τρίτο στάδιο, ενώ η συγκέντρωση των φαινολικών κατά το δεύτερο στάδιο ήταν 24% μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Η συγκέντρωση των φαινολικών στους σπόρους των κεντρικών κεφαλών μεταξύ του πρώτου και δεύτερου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

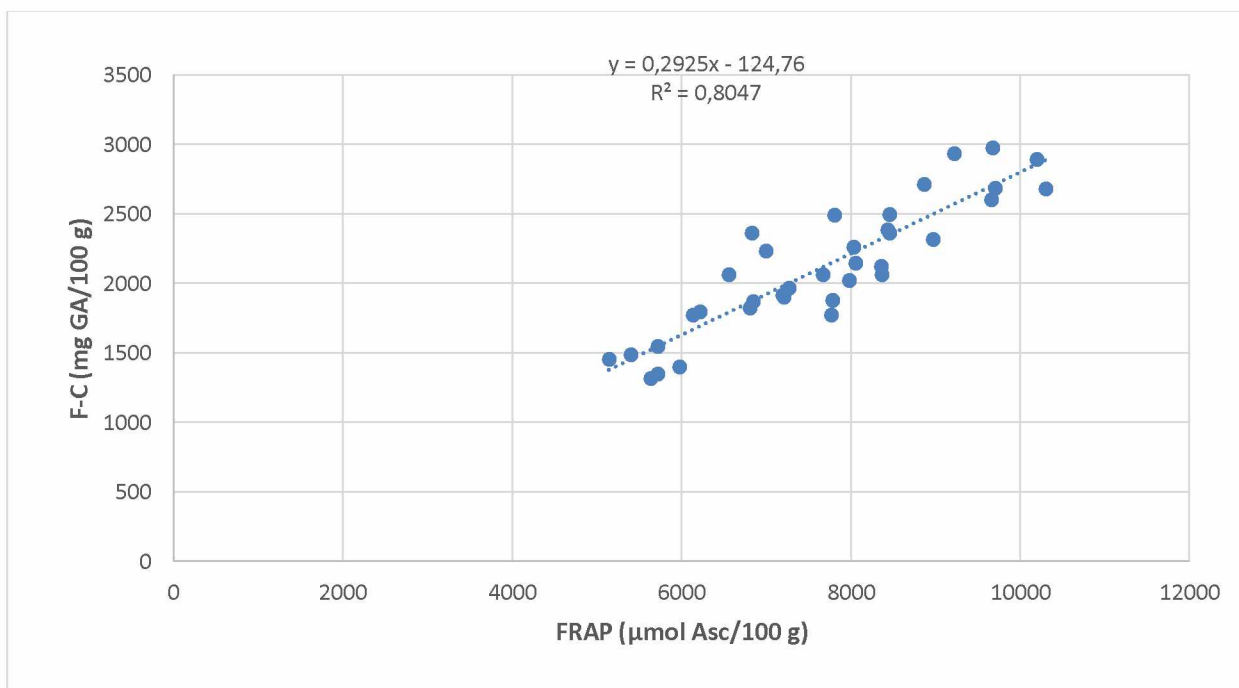
Στατιστικές διαφορές των συγκεντρώσεων φαινολικών στους σπόρους της πειραματικής καλλιέργειας μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης καταγράφηκαν και στις πλευρικές κεφαλές. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των φαινολικών (2510 mg GA/100 g σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη (1425 mg GA/100 g σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση των φαινολικών κατά το πρώτο στάδιο ήταν 34% μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση στο δεύτερο στάδιο, ενώ η συγκέντρωση των φαινολικών κατά το πρώτο στάδιο ήταν 43% μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Η συγκέντρωση των φαινολικών στους σπόρους των πλευρικών κεφαλών μεταξύ του δεύτερου και τρίτου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

Το συμπέρασμα ήταν ότι κατά την ωρίμανση των κεντρικών-πλευρικών κεφαλών, παρουσιάστηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών. Στη διεθνή βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την εξέλιξη των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Περαιτέρω ακολούθησε στατιστική ανάλυση συσχέτισης των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών των σπόρων (όλων των σταδίων ωρίμανσης των πλευρικών και των κεντρικών κεφαλών) με τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος των σπόρων. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH ( $r=0,936$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 12), όπως και μεταξύ της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP ( $r=0,897$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 13).



**Διάγραμμα 12:** Συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των σπόρων σε ολικά φαινολικά (mg GA/100 g) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους με τη μέθοδο DPPH (μmol Asc/100 g).



**Διάγραμμα 13:** Συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των σπόρων σε ολικά φαινολικά (mg GA/100 g) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP (μmol Asc/100 g).

## **Επίδραση των σταδίων ωρίμανσης στη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Όσον αφορά στην επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH στις κεντρικές κεφαλές, τα αποτελέσματα του πειράματος μου έδειξαν ότι παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (2944  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (1893  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το πρώτο στάδιο ήταν 36% μικρότερη σε σύγκριση με την συγκέντρωση στο τρίτο στάδιο, ενώ η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το δεύτερο στάδιο ήταν 23% μικρότερη σε σύγκριση με την συγκέντρωση του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Επίσης, η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ του πρώτου και δεύτερου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

Ωστόσο, υπήρξαν στατιστικές διαφορές των συγκεντρώσεων μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης και στις πλευρικές κεφαλές. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (2843  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (1538  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το πρώτο στάδιο ήταν 35% μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση στο δεύτερο στάδιο, ενώ η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το πρώτο στάδιο ήταν 46% μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ του δεύτερου και τρίτου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

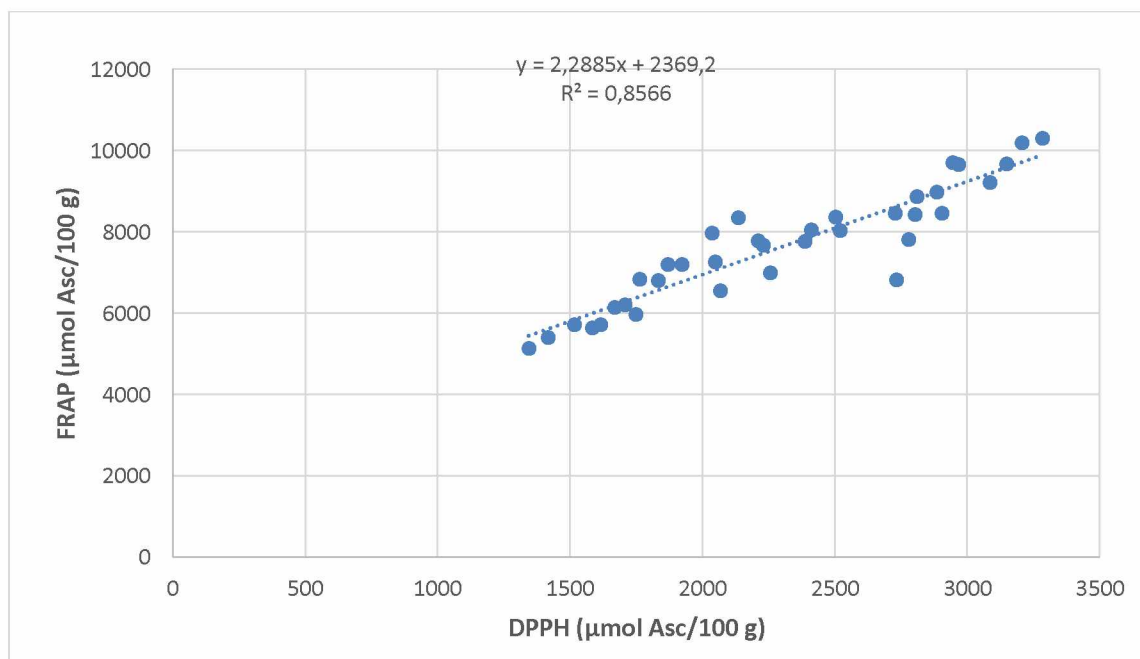
Το συμπέρασμα ήταν ότι υπήρξε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά την ωρίμανση των κεντρικών και πλευρικών κεφαλών του φυτού. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σχετικές αναφορές σε ότι αφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH σε διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Τέλος, όσον αφορά στην επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των σπόρων με τη μέθοδο FRAP στις κεντρικές κεφαλές, τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι δεν παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (8936  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (7091  $\mu\text{mol Asc}/100 \text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης.

Ωστόσο, υπήρξαν στατιστικές διαφορές των συγκεντρώσεων μεταξύ των τριών σταδίων ωρίμανσης στις πλευρικές κεφαλές. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (8712  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το τρίτο στάδιο ωρίμανσης, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (5599  $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$  σπόρου) καταγράφηκε κατά το πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το πρώτο στάδιο ήταν 31% μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση στο δεύτερο στάδιο, ενώ η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά το πρώτο στάδιο ήταν 36% μικρότερη σε σύγκριση με την συγκέντρωση του τρίτου σταδίου ωρίμανσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ του δεύτερου και τρίτου σταδίου ωρίμανσης δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά.

Το συμπέρασμα ήταν ότι υπήρξε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά την ωρίμανση τόσο των κεντρικών όσο και των πλευρικών κεφαλών του φυτού. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σχετικές αναφορές σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο FRAP σε διαφορετικό χρόνο συγκομιδής.

Ακολούθησε στατιστική ανάλυση συσχέτισης των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των σπόρων (όλων των σταδίων ωρίμανσης των πλευρικών και των κεντρικών κεφαλών) μεταξύ των μεθόδων FRAP και DPPH. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση προκύπτει μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP και αυτής με τη μέθοδο DPPH ( $r=0,923$ ,  $P<0,001$ , Διάγραμμα 14).



**Διάγραμμα 14:** Συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σιλυμαρίνης με τη μέθοδο FRAP ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ) και με τη μέθοδο DPPH ( $\mu\text{mol Asc}/100\text{ g}$ ).

Ανακεφαλαιώνοντας, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπως παρουσιάστηκαν και συζητήθηκαν προηγουμένως, προκύπτουν τα εξής κύρια συμπεράσματα:

- ❖ Σημαντική αύξηση του ποσοστού σιλυμαρίνης στους σπόρους της πειραματικής καλλιέργειας παρατηρήθηκε με την ωρίμανση τόσο των κεντρικών όσο και των πλευρικών ταξιανθιών.
- ❖ Σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος της σιλυμαρίνης παρατηρήθηκε με την ωρίμανση τόσο των κεντρικών όσο και των πλευρικών ταξιανθιών του φυτού.
- ❖ Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στους σπόρους των φυτών της πειραματικής καλλιέργειας παρουσιάστηκε άνοδο με το στάδιο ωρίμανσης των σπόρων.
- ❖ Τέλος, οι συσχετίσεις που πραγματοποιήθηκαν (για όλα τα στάδια ωρίμανσης των πλευρικών και των κεντρικών κεφαλών), έδειξαν ότι υπάρχει θετική επίδραση μεταξύ του ποσοστού σιλυμαρίνης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των σπόρων.

Ο χρόνος συγκομιδής αποτελεί καθοριστικό παράγοντα προκειμένου να εξασφαλιστεί η υψηλή περιεκτικότητα σιλυμαρίνης στους σπόρους της καλλιέργειας του φαρμακευτικού φυτού *Silybum marianum* (L.). Η ιδανική συγκομιδή θα πρέπει να γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης των ανθοκεφαλών και κατ' επέκταση των σπόρων. Τυχόν πρόωμη συγκομιδή μπορεί να συμβάλει στη μείωση έως 30-40% της απόδοσης της καλλιέργειας σε σιλυμαρίνη. Πρόβλημα αποτελεί ο διαφορετικός χρόνος ωρίμανσης των κεντρικών και πλευρικών κεφαλών, καθώς μεγαλύτερες απώλειες σπόρου παρατηρούνται στις υπερώριμες κεφαλές εξαιτίας του τινάγματος των σπόρων.

## **Βιβλιογραφία:**

### ***Ελληνική Βιβλιογραφία:***

- Δημόπουλος Κ. και Αντωνοπούλου Σ. (2009). Βασική Βιοχημεία. 2η έκδοση με βελτιώσεις και προσθήκες. Αθήνα Σελ: 217-218, 63-69 (παράρτημα).
- Μπλούκας Ι. (2004). Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Αθήνα: Αθ. Σταμούλη Σελ: 463-470.
- Μπόσκος, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. 4η Έκδοση, Κεφ. ΙΧ, σελ. 230-232, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη
- Σφλώμος Κ. (2011). Χημεία Τροφίμων με Στοιχεία Διατροφής. Β' Έκδοση, Τόμος Ι, Κεφ. 4 Σελ. 267-276, Κεφ. 7 Σελ. 505-515.

### ***Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία:***

- Abenavoli L., Capasso R., Milic N. and Capasso F., (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10):1423-1432.
- Abenavoli L., Aviello G., Capasso R., Milic N. and Capasso F., (2011). Milk thistle for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatitis Monthly*, 11(3): 173-177.
- Ahmad N., Fazal H., Abbasi B.H., Anwar S. and Basir A., (2013). DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicology and Industrial Health*, 29:460–467.
- Alemardan A., Karkanis A., Salehi R., (2013). Breeding objectives and selection criteria for milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca* 41(2):340–347.
- Amorati R., Foti M.C. and Valgimigli L., (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46): 10835– 10847.
- Andrzejewska, J., Sadowska K. and Mielcarek S., (2011). Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) on light soil in a moderate climate. *Industrial Crops Products*, 33(2): 462–468.
- Bendich A., Machlin L.J., Scandurra O., Burton G.W. and Wayner D.D.M., (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 2(2):419–444.

- Benzie I.F.F. and Strain J.J., (1996). The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Benzie I.F.F. and Szeto Y.T., (1999) Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 633-636.
- Blois M.S., (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181:1199–1200
- Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C., (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie (LWT)-Food Science and Technology*, 30: 609-615.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C., (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28:25-30.
- Brunetti G., Soler-Rovira P., Farrag K. and Senesi N., (2009). Tolerance and accumulation of heavy metals by wild plant species grown in contaminated soils in Aquila region, Southern Italy. *Plant and Soil*, 318(1-2):285–298.
- Cai R., Hettiarachchy N.S. and Jalaluddin, M., (2003). High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51(6): 1623-1627.
- Carrier D.J., Crowe T., Sokhansanj S., Wahab J. and Barl B., (2003). Milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants* 10(1): 65–74.
- Comert E.D. and Gokmen V., (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105: 76-93.
- Corchete P., (2008). *Silybum marianum* (L.) Gaertn.: The Source of Silymarin. In: *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Ramawat K. G., Merillon J. M. (eds.), 123-148.
- Curioni A., Carcía M., Alfonso W. and Arizio O., (2002). Predicción de la cosecha de cardo mariano a través de las características externas que presentan los capítulos. *Acta Horticulturae*, 569: 257–261.



- Dixit N., Baboota S., Kohli K., Ahmed S. and Ali J., (2007). Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approach. *Indian Journal of Pharmacology*, 39(4):172-179.
- Dodd J., (1989). Phenology and seed production of variegated thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., in Australia in relation to mechanical and biological control. *Weed Research*, 29(4): 255–263.
- Dragsted L.O., Strube M. and Leth T., (1997). Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention*, 6(6):522–528.
- Eltahir A.S. and Abuereish B.I., (2010). Leaf and stem anatomy of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon schoenanthus* in Sudan. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2(4): 766-71.
- Engelberth A.S., Carrier D.J. and Clausen E.C., (2008). Separation of silymarins from milk thistle (*Silybum marianum* L.) extracted with pressurized hot water using fast centrifugal partition chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(19): 3001–3011.
- Everette J.D., Bryant Q.M.; Green A.M., Abbey Y.A., Wangila G.W. and Walker R. B., (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14): 8139–44.
- Fernandez-Pachon M.S., Villano D., Troncoso A. M., & Garcia-Parrilla M. C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563: 101–108.
- Frankel E. and Meyer A.S., (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925–1941.
- Foti M.C., Daquino C. and Geraci C., (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69:2309-2314.
- Freedman N.D., Curto T.M., Morishima C., Seeff L.B., Goodman Z.D., Wright E.C., Sinha R., Everhart J.E. and HALT-C Trial Group., (2011). Silymarin use and liver disease

- progression in the Hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(1): 127–137.
- Fritz E. and Saukel J., (2011). Anatomy of Subterranean Organs of Medicinally Used Cardueae and Related Species and its Value for Discrimination. *Scientia Pharmaceutica*, 79(1): 157-74.
- Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Björk L. and Trajkovski V., (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1485-1490.
- Ghosh A., Ghosh T. and Jain S., (2010). Silymarin – a review on the pharmacodynamics and bioavailability enhancement approaches. *Journal of Pharmaceutical Science Technology*, 2(10): 348–355.
- Godbout J.P., Berg B.M., Kelley K.W. and Johnson R.W., (2004).  $\alpha$ -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*, 149(1-2):101–109.
- Gresta, F., Avola, G. and Guarnaccia P., (2007). Agronomic characterization of some spontaneous genotypes of milk thistle (*Silybum marianum* L Gaertn.) in Mediterranean environment. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 12(4):51–60.
- Gulcin I., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives Toxicology*, 86:345–391.
- Gulcin I., Berashvili D. and Gepdiremen A., (2005). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla panchinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3):287–293.
- Gulcin I., Topal F., Ozturk Sarıkaya S.B., Bursal E., Goren A.C. and Bilsel M. (2011) Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 5(3):158–175.
- Guo J.T., Lee H.L., Chiang S.H., Lin F.I. and Chang, C.Y., (2001). Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(2): 96-101.

- Hevia F., Wilckens R.L., Berti M.T. and Fischer S.U. (2007). Calidad de cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) cosechado diferentes estados fenológicos. *Información Tecnológica*, 18: 69–74.
- Huang D., Ou B., and Rrior R.L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841–1856.
- Jacob R.A., (1996). Three eras of vitamin C discovery. *Sub-Cellular Biochemistry*, 25: 1–16.
- Jayasinghe C., Gotoh N. and Aoki T., (2003). Wada, S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(15): 4442-4449.
- Jimenez-Escrig A., Jimenez-Jimenez, I., Sanchez-Moreno, C., Saura-Calixto F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1686-1690.
- Jorgensen L.V., Madsen H.L., Thomsen M.K., Dragsted L.O. and Skibsted L.H., (1999). Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radical Research*, 30:207–220.
- Karkanis A., Bilalis D. and Efthimiadou A., (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops Products*, 34(1): 825-830.
- Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K. and Kobori M., (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1): 68-75.
- Kaur A.K., Wahi A.K., Kumar B., Bhandari A. and Prasad N., (2012). Milk Thistle (*Silybum marianum*): a review. *International Journal of Pharma Research and Development*, ISSN 0974–9446.
- Khan, M.Z., Blackshaw, R.E., Marwat, K.B., 2009. Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biology and Management*. 9(2): 99–105.
- Kim J.K., Noh J.H., Lee S., Choi J.S., Suh H., Chung H.Y., Song Y.O. and Choi W.C., (2002). The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5- dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23(5): 661-662.

- Kraybill H.R. and Dugan L.R., (1954). Antioxidants, new developments for food use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(2): 81–84.
- Kren V. and Walterova, D., (2005). Silybin and silymarin – New effects and applications. *Biomed Papers*, 149(1): 29–41.
- Kroll D.J., Shaw H.S. and Oberlies N.H., (2007). Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integrative Cancer Therapies*, 6(2):110–119.
- Kvasnicka F., Bida B., Sevcik R., Voldrich M. and Kratka J.M., (2003). Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*, 990(1-2):239–245.
- Lebeau J., Furman C., Bernier J.L., Duriez P., Teissier E. and Cotelle N., (2000). Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9): 900-912.
- Ledda L., Deligios P., Farci R. and Sulas L., (2013). Biomass supply for energetic purposes from some Carduae species grown in a Mediterranean rainfed low input cropping system. *Industrial Crops and Products*, 47:218–226.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. and Lee C.Y., (2003). Cocoa has more phenolicphytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:7292–7295.
- Lemanska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zielinski R., Soffer A.E.M.F. and Rietjens I.M.C.M., (2001). The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 869-881.
- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M., (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants: *Food Chemistry*, 125(2): 288-306.
- Lichtenstein A.H., (2009). Nutrient supplements and cardiovascular disease: a heartbreaking story. *Journal of Lipid Research*, 50: S429–S433.
- Maiani G., Caston M.J., Catasta G., Toti E., Cambrodon I.G., Bysted A., Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Knuthsen P., Valoti M., Bohm V., Mayer-Miebach E., Behnlian D. and Schlemmer U., (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition Food Research*, 53(S2): S194–S218.

- Maranz S., Wiesman Z. and Garti N., (2003). Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21): 6268-6273.
- Martin R.J., Lauren D.R., Smith W.A., Jensen D.J., Deo B. and Douglas, J.A., (2006). Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (*Silybum marianum*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34(3): 239–245.
- Molyneux P., (2003). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2):211-219.
- Montemurro P., Fracchiolla, M. and Lonigro A., (2007). Effects of some environmental factors on seed germination and spreading potential of *Silybum marianum* Gaertner. *Italian Journal of Agronomy*, 3: 315–320.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J. M., Sineiro J., Domínguez H. and Parajó J.C., (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2): 145–171.
- Musci M. and Yao S., (2017). Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(8): 913-918.
- Nakamura Y., Tsuji S. and Tonogai Y., (2003). Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1): 331-339.
- Niki E., Kawakami A., Yamamoto Y. and Kamiya Y., (1985). Oxidation of lipids: VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58(7):1971–1975.
- Oroian M. and Escriche I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74: 10-36.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. and Deemer E., (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11): 3122-3128.

- Ozcelik B., Lee J.H. and Min D.B., (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2): 487-490.
- Palozza P. and Krinsky N.I., (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Method in Enzymology*, 213:403-420.
- Perrino E.V., Brunetti G. and Farrag K., (2014). Plant communities in multi-metal contaminated soils: a case study in the national park of Alta Murgia (Apulia Region-Southern Italy). *International Journal of Phytoremediation*, 16(9):871–888.
- Perkampus H.H., (1991). *UV-Vis Atlas of Organic Compounds*, 2nd ed.; VCH: New York, 1991; Part II, J4124: 1139.
- Pisoschi A.M. and Negulescu G.P., (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*.
- Prior R.L., Wu X. and Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290–4302.
- Pulido R., Bravo, L. and Saura-Calixto F., (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3396-3402.
- Ramasamy K. and Agarwal R., (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*, 269(2): 352–362.
- Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M., Godoy H.T. and Amaya-Farfan J., (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6):445–463.
- Ross K.A., Beta T.S. and Arntfield D., (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113(1):336–344.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2): 270-276.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto F., (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International*, 32: 407-412.

- Sartor V., Henderson P.T., Schuster G.B., (1999). Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 121:11027-11033.
- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonen M.I., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L.H. and Tijburg L., (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212: 319-328.
- Sersen F. Vensel T. and Annus J., (2006). Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. *Fitoterapia*, 77(7-8): 55–529.
- Sharma O.P. and Bhat T.K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202–1205.
- Shokrpour M., Mohammadi S.A., Moghaddam M., Ziai S.A. and Javanshir A., (2008). Variation in flavonolignan of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(4): 55–69.
- Sidhu M.C. and Saini P., (2011). Anatomical investigations in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Research in Biology*, 8: 603-608.
- Sindel B.M., (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research*, 31(4): 189–201.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Sroka Z. and Cisowski W., (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41(6):753–758.
- Stevanato R., Fabris S. and Momo F., (2004). Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20): 6287-6293.
- Stirton A.J., Turer J. and Riemenschneider R.W., (1945). Oxygen absorption of methyl esters of fat acids, and the effect of antioxidants. *Oil Amp: Soap*, 22(4): 81–83.

- Sulas L., Murgia L. and Ventura A., (2008). Phytomass production from *Silybum marianum* for bioenergy. *Options Mediterraneenes A*, 79 :487–490.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O. and Dommesa J., (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, Volume 113: 1226–1233.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. and Webb D.A., (1976). *Flora Europaea*. Cambridge University Press, 4: 249.
- Vaknin Y., Hadas R., Schafferman D., Murkhovsky L. and Bashan, N., (2008). The potential of milk thistle (*Silybum marianum* L.), an Israeli native, as a source of edible sprouts rich in antioxidants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4): 339–346.
- Valgimigli L. and Pratt D.A., (2012). Antioxidants in chemistry and biology. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, 3: 1623 – 1677.
- Velioglu Y.S., Mazza G. and Gao L. and Oomah B.D., (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10): 4113-4117.
- Wallace S.N., Carrier D.J. and Clausen, E.C., (2005). Batch solvent extraction of flavonoligans from milk thistle (*Silybum marianum* L Gaertner). *Phytochemical Analysis*, 16(1): 7–16.
- Wang M., Simon J. E., Aviles I.F., He K., Zheng Q.Y. and Tadmor Y., (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 601-608.
- Weber P., Bendich A. and Schalch W., (1996). Vitamin C and human health a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66(1):19–30.
- Williams R.J., Spencer J.P. and Rice-Evans C., (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7):838–849.
- Wojdylo A., Osxmianski J. and Czemerzys R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3): 940-949.
- Zheljzakov V.D., Zhalnov I. And Nedkov, N.K., (2006). Herbicides for weed control in blessed thistle (*Silybum marianum*). *Weed Technology*, 20(4): 1030–1034.