ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ

«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

ΤΙΤΛΟΣ:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΒΟΤΑΝΙΚΟ ΕΛΙΞΙΡΙΟ - AMARO MONTECHRISTO ΚΑΙ ΣΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ

Ονοματεπώνυμο φοιτητή

ΝΑΤΣΙΟΥΛΗΣ Δ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ

«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

Τίτλος

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικών φαινολικών ενώσεων στο βοτανικό ελιξίριο - Amaro Montechristo και στα επιμέρους φυτικά εκχυλίσματά του

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νατσιούλης Δ. Αθανάσιος, Διαιτολόγος, Μεταπτυχικός φοιτητής

Επιβλέπων καθηγητής: Παπαδόπουλος Αθανάσιος - Καθηγητής

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2019

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ
«ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

Τίτλος

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικών φαινολικών ενώσεων στο βοτανικό ελιξίριο - Amaro Montechristo και στα επιμέρους φυτικά εκχυλίσματά του

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νατσιούλης Δ. Αθανάσιος, Διαιτολόγος, Μεταπτυχικός φοιτητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Παπαδόπουλος Αθανάσιος - Καθηγητής Τ.Ε.Ι Διατροφής

ΜΕΛΟΣ: Κοκοκύρης Λάμπρος - Επίκουρος Καθηγητής Τ.Ε.Ι Διατροφής

ΜΕΛΟΣ: Πρίτσα Αγαθή - Επίκουρη Καθηγήτρια Τ.Ε.Ι Διατροφής

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2019

ΣΕΛΙΔΑ ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΩΝ

copyright © 2017, Νατσιούλης Δ. Αθανάσιος

ALL RIGHTS RESERVED

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

Εγκρίθηκε την ……

ΒΑΘΜΟΣ: ΑΡΙΣΤΗ:…….

ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ:……

ΚΑΛΗ:…….

ΑΠΟΔΕΚΤΗ:……..

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**
…….	…….
…….	…….
…….	…….

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή του Τ.Ε.Ι Διατροφής κ. Παπαδόπουλο Αθανάσιο για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τ.Ε.Ι Διατροφής κ. Κοκοκύρη Λάμπρο για την βοήθειά του στο κομμάτι της στατιστικής ανάλυσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ i
Κατάλογος πινάκων ii
Κατάλογος διαγραμμάτων iii
Κατάλογος γραφημάτων iv
Κατάλογος σχημάτων v
Κατάλογος εικόνων vi
Περίληψη 12
Summary 14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 16
1.1. Γενικά για τα βοτανικά ποτά 16
1.1.1. Ιστορικά στοιχεία 16
1.1.2. Παραγωγή βοτανικών ποτών 17
1.1.3. Εμπορικά σήματα βοτανικών ποτών 18
1.2. Αντιοξειδωτικά 24
1.2.1. Η δράση των αντιοξειδωτικών 24
1.2.2. Διακρίσεις αντιοξειδωτικών 25
1.2.3. Φυτοχημικά 27
1.2.4. Πολυφαινόλες γενικά 28
1.2.5. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών 30
1.2.5.1. Αντιοξειδωτική δράση 30
1.2.5.2. Καρδιοπροστατευτική δράση 31
1.2.5.3. Αντικαρκινική δράση 32
1.2.5.4. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις 33
1.2.5.5. Αντιμικροβιακές δράσεις 34
1.2.5.6. Αντιγηραντικές δράσεις 34
1.2.5.7. Άλλες βιολογικές δράσεις 35
1.2.6. Βιοδιαθεσιμότητα 36
1.3. Ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και η αλληλεπίδραση 38
αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών 38
1.3.1. Δημιουργία ελευθέρων ριζών 38
1.3.2. Οξειδωτικό στρες 40

1.3.3. Οξειδωτικό στρες και ασθένειες 41
1.3.3.1. Οξειδωτικό στρες και διαταραχές του ανοσοποιητικού 43
1.3.3.2. Οξειδωτικό στρες και συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων 43
1.3.3.3. Οξειδωτικό στρες και μειωμένη ευαισθησία σε λοιμώξεις 44
1.3.3.4. Οξειδωτικό στρες και αύξηση του επιπολασμού διαφόρων κακοηθειών....45
1.3.3.5. Οξειδωτικό στρες και γήρανση 47
1.3.4. Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού 47
1.3.5. Τοξικότητα αντιοξειδωτικών 49
1.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων και ο προσδιορισμός της....53
1.4.1. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας....53
1.4.2. Εισαγωγή στη φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού....55
1.4.2.1. Νόμος των Lambert-Beer....55
1.4.2.2. Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους - ορατού....56
1.4.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός....57
1.4.3.1. Προσδιορισμός ενός συστατικού - καμπύλη αναφοράς 57
1.4.3.2. Επιλογή του αναλυτικού μήκους κύματος....58
1.4.3.3. Κυψελίδες....58
1.4.4. Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας UV-vis 59
1.4.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων - ποτών - α΄υλών βοτανικών ποτών 60
1.4.5.1. Μούρα, φρούτα και λαχανικά 62
1.4.5.2. Ξηροί καρποί και σπόροι 63
1.4.5.3. Σοκολάτα - μέλι - γλυκαντικά....63
1.4.5.4. Μπαχαρικά και βότανα....64
1.4.5.5. Βοτανικά / παραδοσιακά φυτικά φάρμακα....65
1.4.5.6. Αφεψήματα και ποτά γενικά 67
1.4.5.7. Αντιοξειδωτική ικανότητα των λικέρ 67
Σκοπός....68
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ....69
2.1. Περιγραφή Amaro Montecristo και δειγμάτων εκχυλισμάτων 69
2.2. Αντιδραστήρια 70
2.3. Όργανα 71
2.4. Σκεύη....71
2.5. Πειραματική διαδικασία....71
2.5.1. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων (Folin - Ciocalteu)....71
2.5.1.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων....72

2.5.1.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς 73
2.5.1.3. Πειραματική διαδικασία 74
2.5.2. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS 75
2.5.2.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων 76
2.5.2.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς 76
2.5.2.3. Πειραματική διαδικασία 77
2.5.3. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH 78
2.5.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων 79
2.5.3.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς 79
2.5.3.3. Πειραματική διαδικασία 80
2.6. Στατιστική ανάλυση 81
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 82
3.1. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων 82
3.1.1. Μέθοδος Folin - Ciocalteu 82
3.1.2. Μέθοδος ABTS 84
3.1.3. Μέθοδος DPPH 86
3.2. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης 89
3.2.1. Στατιστικός έλεγχος DPPH 89
3.2.2. Στατιστικός έλεγχος Folin - Ciocalteu 90
3.2.3. Στατιστικός έλεγχος ABTS 92
3.2.4. Γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των μεθόδων ABTS, Folin - Ciocalteu και DPPH 94
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 100
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 112
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ 116

Κατάλογος πινάκων……...i

Πίνακας 1.1. Εμπορικά παραγόμενα σήματα Amaro - Bitter…….……..18
Πίνακας 1.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις πολυφαινολών…….31
Πίνακας 1.3. Αντικαρκινικές δράσεις ορισμένων πολυφαινολών…….……...33
Πίνακας 1.4. Δραστικές μορφές οξυγόνου "ROS" και αζώτου "RON" …...……..40
Πίνακας 1.5. Εξωγενείς και ενδογενείς επαγωγείς του οξειδωτικού στρες…….……41
Πίνακας 1.6. Θανάσιμες ασθένειες που έχουν θετική συσχέτιση με το οξειδωτικό στρες…….45
Πίνακας 1.7. Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους…….48
Πίνακας 1.8. Διαφορετικές κατηγορίες προ-οξειδωτικών και ο κοινός μηχανισμός τους για την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες……..…….……50
Πίνακας 1.9. Στατιστική περιγραφή μεμονωμένων κατηγοριών του Πίνακα Αντιοξειδωτικών Τροφίμων…….61
Πίνακας 1.10. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο μπαχαρικών και βοτάνων από τον Πίνακα αντιοξειδωτικών Τροφίμων……..65
Πίνακας 2.1. Η περιεκτικότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων και γλυκαντικών % στα Amaro……...……70
Πίνακας 3.1. Περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu……..……...……..82
Πίνακας 3.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS……...……....84
Πίνακας 3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH……86
Πίνακας 3.4. Μέση περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά των διαφόρων εκχυλισμάτων με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH…….……87
Πίνακας 3.5. Συνοπτικά στατιστικά (Κανονικότητας, Ομοιογένειας διακύμανσης, Σύγκρισης δειγμάτων, Κατάταξης) για τις μεθόδους DPPH, Folin - Ciocalteu και ABTS……...…….93
Πίνακας 3.6. Γραμμικές συσχετίσεις Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.05 - 0.01 level)……...……..96

Κατάλογος διαγραμμάτων……..……ii

Διάγραμμα 1.1. Ταξινόμηση φυτοχημικών…….….22
Διάγραμμα 1.2. Μερικές από τις βιολογικές δράσεις των φυτοχημικών…….35

Κατάλογος γραφημάτων ……..……..iii

Γράφημα 2.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου Folin - Ciocalteu…….….74
Γράφημα 2.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου ABTS……..77
Γράφημα 2.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου DPPH…….……..80
Γράφημα 3.1. Μέση περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu……....……83
Γράφημα 3.2. Μέση αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS……85

Γράφημα 3.3. Μέση αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH……87
Γράφημα 3.4. Μέση περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά των διαφόρων εκχυλισμάτων με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH…….……88
Γράφημα 3.5. Ανάλυση διακύμανσης - Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο DPPH……..……89
Γράφημα 3.6. Ανάλυση διακύμανσης - Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο Folin-Ciocalteu……..……..91
Γράφημα 3.7. Ανάλυση διακύμανσης - Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο ABTS…….……..92
Γράφημα 3.8. Γραμμική συσχέτιση ABTS και Folin-Ciocalteu……..……94
Γράφημα 3.9. Γραμμική συσχέτιση Folin-Ciocalteu και DPPH……..95
Γράφημα 3.10. Γραμμική συσχέτιση Folin-Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.01 level)…….…95
Γράφημα 3.11. Γραμμική συσχέτιση DPPH και ABTS……96

Κατάλογος σχημάτων …….iv

Σχήμα 1.1. Χημικές δομές των κύριων κατηγοριών πολυφαινολών……29
Σχήμα 2.1. Ο χημικός τύπος του ABTS…..……75
Σχήμα 2.2. Ο χημικός τύπος του DPPH……...……78

Κατάλογος εικόνων……..….v

Εικόνα 1.1. Πηγές ελευθέρων ριζών……41
Εικόνα 1.2. Amla (ινδικό φραγκοστάφυλο)……..62
Εικόνα 1.3. Δέντρα baobab της Αφρικής……..63
Εικόνα 1.4. Το δέντρο Croton lechleri του Περού……66

Περίληψη

Σε πλήθος ερευνών, έχει διαπιστωθεί η ευεργετική επίδραση στην υγεία, της κατανάλωσης βοτάνων, μπαχαρικών, καφέ, φρούτων και κατ' επέκταση των εκχυλισμάτων τους, που διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο in vitro προσδιορισμός και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ελιξιρίου «Amaro Montecristo» (δείγματα 6 και 7) και των επιμέρους εκχυλίσματων του: (1) Βοτανικό, (2) Καφέ, (3) Ξηρών φρούτων, (4) Ξηρών καρπών και (5) Εσπεριδοειδών.

Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε, με τις δοκιμασίες σάρωσης ελεύθερων ριζών ABTS (2,2'-Αζινοδις-(3-αιθυλοβενζο θειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ), DPPH (1,1 διφαινύλο-2-πικρυλυδραζυλική ελεύθερη ρίζα) και των φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, μέθοδοι ευρέως χρησιμοποιούμενες σε αναλύσεις τροφίμων. Παράλληλα αξιολογήθηκε η συσχέτιση των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS και DPPH) με τη μέθοδο προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin-Ciocalteu).

Συγκριτικά με άλλα βοτανικά ποτά (από μια μελέτη που υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα, τουλάχιστον εξ όσων γνωρίζουμε), που φαίνεται να παρουσιάζουν φτωχή αντιοξειδωτική ικανότητα, τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν ότι πολλά από τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν παρουσίασαν αξιόλογη αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκρίσιμη με αυτή του κόκκινου κρασιού, ενώ σημειώνεται, ότι οι πειραματικοί προσδιορισμοί διεξήχθησαν από 3-4 και πλέον χρόνια μετά τις εκχυλίσεις, με ότι αυτό συνεπάγεται για τη υποβάθμιση του αντιοξειδωτικού τους δυναμικού από την επίδραση του χρόνου, του φωτός, της θερμοκρασίας και του οξυγόνου.

Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων, κυμάνθηκε από 411,75 - 1.599,36 mg Trolox /L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2), (6 - 7) να κυμαίνονται από 1.090,98 - 1.599,36 mg /L και τα εκχυλίσματα (3-5) από 411,75 - 758,82 mg/L.

Σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, με τη δοκιμασία ABTS αυτή κυμάνθηκε από 5.663,55 - 24.484,74 μM Trolox /L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2), (4 - 7) να κυμαίνονται από 15.297,54 - 24.484,74 μM/L και το εκχύλισμα (3) 5.663,55 mg/L.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, σύμφωνα με τη δοκιμασία DPPH κυμάνθηκε από 5.663,55 - 14.616,63 μM Trolox /L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2), (5 - 7) να κυμαίνονται από 10.200,03 - 14.616,63 μM/L και τα εκχυλίσματα (3 - 4) από 4.203,15 - 7.319,73 μM /L.

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS. Οι συγκρίσεις έγιναν με την χρήση της one-way ANOVA, τα 95% όρια εμπιστοσύνης, της μη παραμετρικής ανάλυσης (Kruskal-Wallis) και της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των τριών μεθόδων. Διαπιστώθηκε η διαφορετικότητα που παρουσιάζουν οι μέθοδοι μεταξύ τους, αλλά και η πολύ καλή τους συσχέτιση.
Η επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών με in vivo πειράματα, θα μπορούσε να αναδείξει το «Amaro Montecristo» ως ένα λειτουργικό τρόφιμο με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, που θα μπορούσε να συμβάλλει στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων.

Λέξεις κλειδιά: Ελιξίρια βοτάνων; Φυτικά εκχυλίσματα; Αντιοξειδωτικά; Οξειδωτικό στρες; Οφέλη για την υγεία; ABTS; DPPH; Folin - Ciocalteu;

Summary

In a lot of number of studies, it has been confirmed the beneficial effects on health, herb consumption, spices, coffee, fruit and by extension, extracts have been found to have a strong antioxidant capacity. The purpose of this study was is to in vitro determine and evaluate the antioxidant capacity of Amaro Montecristo (samples 6 and 7) and its individual extracts: (1) Botanic, (2) Coffee, (3) Dried fruits, (4) Nuts and (5) Citrus fruits.

The assay was carried out by the ABTS free radical scavenging assays (2,2'-azinobis- (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical) and the phenolic compounds Folin-Ciocalteu method, methods widely used in food analyzes, and the association of antioxidant assay methods (ABTS and DPPH) with the method of determining the total phenolic content (Folin-Ciocalteu).

Compared to other botanical beverages (from a study that has published results, at least as far as we know), which appear to have poor antioxidant capacity, our results revealed that many of the extracts tested showed remarkable antioxidant capacity, comparable to red wine, while it is noted that the experimental determinations were carried out more than 3-4 years after the extractions, as this leads to the degradation of their antioxidant potential by an influence of the time of light, temperature and oxygen.

The total phenolic content of the extracts ranged from 411.75 - 1.599,36 mg Trolox / L, with extracts (1-2), (6-7) ranging from 1.090,98 – 1.599,36 mg / L and the extracts (3-5) from 411.75 to 758.82 mg / L.

With regard to the antioxidant capacity of the extracts, the ABTS test ranged from 5.663,55 to 24.484,74 μM Trolox / L, with extracts (1 - 2), (4-7) ranging from 15.297,54 to 24.484, 74 μM / L and extract (3) 5.663,55 mg / L.

The antioxidant capacity of the extracts according to the DPPH test ranged from 5.663,55 to 14.616,63 μM Trolox / L, with extracts (1 - 2), (5-7) ranging from 10.200,03 – 14.616,63 μM / L and extracts (3-4) from 4.203,15 to 7.319,73 μM / L.

The statistical processing was done using the SPSS statistical program. Comparisons were made with the use of one-way ANOVA, 95% confidence limits, non-parametric analysis (Kruskal-Wallis) and the linear correlation between the three methods. The difference between the methods and their very good correlation was found.

The confirmation of these findings with in vivo experiments could highlight Amaro Montecristo as a functional food with high antioxidant capacity that could help prevent chronic diseases.

Keywords: Herbals elixir; Plant extracts; Antioxidants; Oxidative Stress; Health benefits; ABTS; DPPH; Folin - Ciocalteu;

. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά για τα βοτανικά ποτά

Τα βοτανικά ποτά bitters - amaro (πικρά στα Γερμανικά και στα Λατινικά αντίστοιχα) ή ελιξίρια, αποτελούν μια μεγάλη και ετερογενή κατηγορία από απόψεως σύνθεσης, οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων ποτών, που παράγονται από την εκχύλιση σε αλκοόλ διαφόρων φυτικών συστατικών. Γενικά, δεν υπάρχει μια αυστηρά επιστημονική ταξινόμησή τους και τα όρια μεταξύ τους είναι δυσδιάκριτα.

Amaro είναι το αλκοολούχο ποτό με δεσπόζουσα πικρή γεύση, που λαμβάνεται με αρωματισμό αιθυλικής αλκοόλης γεωργικής προέλευσης με αρωματικές ουσίες όπως ορίζονται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1334/2008. (https://el.glosbe.com/it/el/AMARO n.d.)

Ελιξίριο είναι ένα φάρμακο το οποίο υποτίθεται ότι θεραπεύει όλες τις ασθένειες ή είδος φαρμακευτικού παρασκευάσματος το οποίο είναι διάλυμα φαρμακευτικών ουσιών σε οινόπνευμα. (https://el.wiktionary.org/wiki n.d.)

Στην κατηγορία των ελιξιρίων ή bitters - amaro digestifs ανήκουν τα εκχυλίσματα ή αποστάγματα βοτάνων χωρίς ή με ελάχιστα γλυκαντικά, με πολύ πυκνή και έντονη πικρή γεύση, που καταναλώνονται σε μικροποσότητες, ενώ στα bitters - amaro aperitifs, που είναι πιο ευκολόπιοτα η πικρία τους ισορροπείται σε διάφορο βαθμό από τα προστιθέμενα γλυκαντικά και θεωρούνται με την ευρεία έννοια ως λικέρ. Γενικά όσο πιο πικρό είναι ένα bitter, τόσο πιο ισχυρή είναι η ευπεπτική του ικανότητα. Τα bitters θεωρούνται τονωτικά, χωνευτικά και ορεκτικά, πίνονται σαν απεριτίφ, συμμετέχουν σε πολλά κοκτέιλ ενώ μπορούν να καταναλωθούν ουσιαστικά κάθε ώρα, με τόνικ, κόλα, αναψυκτικά και χυμούς. (https://www.athinorama.gr n.d.)

1.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η καταγωγή των βοτανικών ποτών χάνεται στους μαιάνδρους της ιστορίας. Από αρχαιοτάτων χρόνων ήταν γνωστό σε διάφορους πολιτισμούς ότι το «πικρό», όσο και αν προκαλεί την αποστροφή πολλών ανθρώπων, έχει θεραπευτικές ιδιότητες. Τα πρώτα bitters πιστεύεται ότι φτιάχτηκαν στην αρχαία Αίγυπτο, αλλά συστηματικότερα άρχισαν να παρασκευάζονται στην Ευρώπη στις αρχές του 16ου αιώνα, όπου παρήγαγαν οινοπνευματώδη ποτά με βότανα και μπαχαρικά για φαρμακευτική χρήση, που ήταν τόσο πικρά, που τα αραίωναν με κρασί για να τα καταστήσουν πιο εύληπτα.

Πολλά από τα βοτανικά ποτά έχουν μοναστηριακές καταβολές, αφού κατά το μεσαίωνα τα μοναστήρια ήταν κυψέλες γνώσης και πολιτισμού, οι δε μοναχοί ήταν πανεπιστήμονες, λίγο απ' όλα: γιατροί, μαθηματικοί, φιλόσοφοι, αστρονόμοι και αλχημιστές. Πέρα από την προσπάθειά τους να ανακαλύψουν την «θεμέλια λίθο» και να φτιάξουν το ελιξίριο της ζωής, δημιούργησαν πολλά επιτυχημένα βοτανικά ποτά - γιατρικά.

Σιγά - σιγά, άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρύτερα, κυρίως ως ορεκτικά και για τη δυσπεψία. Με την έλευση του 18ου αιώνα οι παραγωγοί είχαν πλέον αποκτήσει μεγάλη εμπειρία στη χρήση των βοτάνων και στην ισορροπία της πικράδας, με την Ιταλία και τη Γερμανία να κονταροχτυπιούνται για τα πρωτεία. Χαρακτηριστικό είναι ότι υπάρχουν περισσότερα από 150 διαφορετικά βοτανικά ποτά σε όλη την Γερμανία. Πρακτικά, τα ποτά αυτά δεν υπάρχουν στην κουλτούρα και την παράδοση του Έλληνα, σε αντίθεση με τους περισσότερους Ευρωπαϊκούς λαούς όπως τους Ολλανδούς, Βέλγους, Γάλλους, Δανούς, Αυστριακούς, Ελβετούς και τους Ανατολικοευρωπαίους γενικότερα. Τα τελευταία χρόνια, τα bitters - amaro, έχουν επανέλθει δυναμικά ύστερα από τρεις δεκαετίες στην αφάνεια, ενώ παλαιότερες και πιο σπάνιες φιάλες των πρώτων antique bitters αγγίζουν τιμές δεκάδων χιλιάδων δολαρίων! (https://www.athinorama.gr n.d.),
(http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_(liqueur) n.d.)

1.1.2. Παραγωγή βοτανικών ποτών

Θεωρητικά, η παρασκευή των bitters - amaro είναι ευκολότερη και απλούστερη από το να φτιάξει κανείς κάποιο από τα κλασσικά ζυμούμενα ποτά, όπως κρασί ή κάποιο απόσταγμα όπως κονιάκ. Συνήθως χρησιμοποιούνται από 30 - 60 και πλέον συστατικά (πολλά από αυτά σπάνια και εξωτικά), βότανα, ρίζες, φύλλα, μπαχαρικά, ενίοτε και φρούτα στις διάφορες φόρμουλες. Όλα αυτά κατά κανόνα εκχυλίζονται σε μια αλκοολούχο βάση (ουδέτερη αλκοόλη από δημητριακά ή από σταφύλια και σπανιότερα από άλλα φρούτα) στην οποία τελικά θα αφήσουν την «ουσία» τους, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις κάποια μυρωδικά τα αποστάζουν. Η περιεκτικότητά τους σε αλκοόλη ποικίλει από 16 – 71 %. Όπου αυτό απαιτείται, γίνεται ανάμειξη με σιρόπι ζάχαρης ή άλλη γλυκαντική ύλη (καραμέλα, μέλι) και αφού το τελικό μείγμα «αναπαυτεί», φιλτράρεται και παλαιώνεται σε κάποιες περιπτώσεις σε βαρέλια είτε εμφιαλώνεται. (http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_(liqueur) n.d.)

1.1.3. Εμπορικά σήματα βοτανικών ποτών

Τα ακόλουθα σήματα από την αναζήτηση που έγινε στο διαδίκτυο, είναι εμπορικά παραγόμενα και αποτελούν ένα μικρό μέρος μπροστά σε όλα αυτά που πραγματικά υπάρχουν.

Πίνακας 1.1. Εμπορικά παραγόμενα σήματα Amaro - Bitter

Ιταλία	Amaro Ramazzotti	Amaro Poli
Amaro Isolabella	Amaro san Giuseppe	Ferro China Bisleri
Amaro Abruzzese	Amaro Santa Maria Al Monte	Radis Amaro
Amaro Antico de Capua	Amaro Savoia	Vecchia Umbria
Amaro Asiago	Amaro Sibilla	Amaro Montenegro
Amaro Averna	Amaro Tonico di Varnelli	
Amaro Braulio	Amaro Viparo	**Γερμανία**
Baroche Amaro Bio	Amaro Zara	Jägermeister
Amaro Borsci	Torani Amer	Black Forest Devil
Amaro Campano	Luxardo Amaro Abano	Fläminger Jagd
Amaro Ciociaro	Luxardo Amaro Fernet	Underberg
Vecchio Amaro del Capo	Nardini Amaro Bassano	
Amaro del Carabiniere	Bénéfort	**Άλλοι**
Amaro dei Trulli	China Martini	Amer Picon
Amaro di Sicilia	Galliano	Appenzeller Alpenbitter
Amaro di Etna	Liquore Strega	Altvater
Amaro Don Bairo	China Stemmi	Demänovka
Amaro Erbes	Cynar	Becherovka
Amaro Florio	Carciofo	Petrus Boonekamp
Amaro Giuliani	Diesus Amaro del Frate	Gammel Dansk
Amaro Gambarotti	Amaro Nonino	St. Hubertus
Amaro Lucano	Amaro Penna	Unicum
Amaro Medeiterraneo	Fernet-Branca	Gran Classico Bitter
Amaro Mio	Fernet Stock	Riga Black Balsam

(http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_(liqueur) n.d.)

Στη συνέχεια θα δούμε μερικά από τα σημαντικότερα και πιο αντιπροσωπευτικά βοτανικά ποτά:

Angostura bitter

Η Ανγκοστούρα είναι ένα διάσημο και πολυβραβευμένο bitter με 44,7% vol., και πικρή γεύση που βασίζεται στο ρούμι και την γεντιανή. Στη φόρμουλα συμμετέχουν πάνω από 40 διαφορετικά συστατικά, όπως εκχυλίσματα από το φλοιό των δέντρων Galipea officinalis και Cusparia trifoliata, βότανα, ρίζες και μπαχαρικά. Χρησιμοποιείται συνήθως σε σταγόνες για αρωματισμό ποτών και θεωρείται τονωτικό και ευστόμαχο. Δημιουργήθηκε το 1825 από τον Γερμανό Dr. Siegert, στην πόλη Angostura της Βενεζουέλας, ενώ πλέον παράγεται στο Τρινιντάντ. Ψάχνοντας το φάρμακο για την ελονοσία, ερεύνησε τροπικά φυτά και βότανα, πιθανότατα βασίστηκε και σε τοπικές συνταγές ιθαγενών, ανακάλυπτοντας έτσι τυχαία την Angostura.

(https://el.wikipedia.org/wiki/Angostura_bitters n.d.)

Το βότανο γεντιανή που κυριαρχεί στα bitters, αναφέρεται από τον Πλίνιο και τον Διοσκουρίδη ως ευστόμαχο, ενώ χορηγήθηκε ιστορικά σε όλες τις εποχές, ως καθαρτικό του αίματος, αντίδοτο δηλητηρίων φιδιών, σκωληκοκτόνο, αντιπυρετικό, διεγερτικό της όρεξης και ενισχυτικό της πέψης. Η πικρή της γεύση οφείλεται σε κάποιους γλυκοζίτες, την γεντιοπικρίνη και την αμαρογεντίνη που αποτελεί την πιο πικρή μέχρι σήμερα γνωστή φυτική ουσία! (Φωκάς 1984)

Campari

Δημιουργήθηκε το 1860 από τον Ιταλό μπάρμαν Gastone Campari στο Μιλάνο και αποτελεί μακράν το πιο δημοφιλές απεριτίφ παγκοσμίως με πωλήσεις σε πάνω από 160 χώρες. Η συνταγή του είναι μυστική και λέγεται ότι συμμετέχουν 68 διαφορετικά συστατικά όπως φλοιοί πορτοκαλιού, νεραντζιού, ginseng, κιγχόνη κ.α., τα οποία εκχυλίζονται σε αλκοόλη. Προστίθεται σιρόπι ζάχαρης και παλαιώνεται σε δρύινα βαρέλια. Το κατακόκκινο χρώμα του οφείλεται στο καρμίνιο, μια επιτρεπόμενη χρωστική (που προκαλεί όμως σε κάποιους αλλεργικά φαινόμενα) που προέρχεται από την σύνθλιψη ενός είδους κόκκινου σκαθαριού ονόματι κοχενίλλη, το οποίο παρασιτεί σε κάκτους του Μεξικού. Με 25% vol., το Campari έχει έντονο άρωμα που θυμίζει κυρίως κεράσι και πιπεράτη, γλυκόπικρη γεύση, που ορισμένοι καταναλωτές την βρίσκουν «συντριπτική» όταν καταναλώνεται σκέτο, για αυτό και πολλοί το έχουν συνδυάσει με κοκτέιλ. (http://en.wikipedia.org/wiki/Campari n.d.)

Averna

Το Averna, δημιουργήθηκε στο μοναστήρι Santo Spirito της Σικελίας, το 1868 από τον μοναχό Τζιρολάμο σαν ελιξίριο και το 1859 η συνταγή χαρίστηκε στην θεοσεβούμενη οικογένεια εμπόρων κλωστοϋφαντουργίας Averna, ευεργετών της μονής. Από το 1868 ξεκινάει η εμπορική διάθεση του πολυβραβευμένου ποτού με ηγετική θέση στην ιταλική αγορά. Για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται 30 βότανα από όλο τον κόσμο, ρίζες και φλοιοί εσπεριδοειδών, τα οποία εμποτίζονται σε αλκοόλ πριν από την προσθήκη σιροπιού ζάχαρης και καραμέλας. Το Averna έχει κόκκινο - καφέ χρώμα και 32% vol. Είναι ένα γλυκόπιοτο «φάρμακο», με τονωτικές και χωνευτικές ιδιότητες, με μεστή γεύση, πλούσιο σώμα και μαλακό βελούδινο στόμα. Η φυτική πικρία των βοτάνων εξισορροπείται από την ζάχαρη και την καραμέλα. Διακρίνουμε κομψά αρώματα από βότανα και λουλούδια, αλλά και νότες καφέ και σοκολάτας. (http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_Averna n.d.)

Fernet Branca

Άλλος ένας τύπος amaro που ξεκίνησε την καριέρα του ως φάρμακο, για τη θεραπεία της γαστρεντερικής δυσφορίας και της χολέρας. Δημιουργήθηκε το 1845 από τη Maria Scala στο Μιλάνο, η οποία αργότερα παντρεύτηκε τον κ. Branca ο οποίος έδωσε το όνομά του το χωνευτικό ποτό, που τελικά απέκτησε εκατομμύρια οπαδούς ανά τον κόσμο και συγκαταλέγεται στην ελίτ των χωνευτικών ποτών. Η μυστική συνταγή του ποτού περιλαμβάνει περισσότερα από 40 βότανα και εξωτικά μπαχαρικά, μεταξύ των οποίων, αλόη, ρίζα γεντιανής, σαφράν, κάρδαμο, κωδεΐνη, μανιτάρια που έχουν υποστεί ζύμωση, τεύτλα, φύλλα κόκας, βαλσαμόχορτο, ραβέντι, αρτεμισία, φύλλα δάφνης, φλούδα πορτοκαλιού, εχινάκεα, ginseng, βότανο του Αγ. Ιωάννη, κινίνη, φασκόμηλο, σμύρνα, αιθέριο έλαιο μέντας και χαμομήλι. Όλα αυτά εκχυλίζονται με ένα απόσταγμα σταφυλής και παλαιώνεται για 12 μήνες σε δρύινα βαρέλια. Περιέχει 45% αλκοόλη και είναι χρωματισμένο με καραμελόχρωμα. Χαρακτηρίζεται από έντονα βοτανικά αρώματα και η γεύση του πλησιάζει προς αυτήν του Jägermeister, σε μια πιο πικρή εκδοχή βεβαίως, θυμίζοντας Listerine με μαύρη γλυκόριζα. (http://en.wikipedia.org/wiki/Fernet n.d.)

Amaro Ramazzoti

Ο Ausano Ramazzotti, διατηρούσε ένα μικρό μαγαζί στο Μιλάνο, με κρασιά, λικέρ και διάφορα φυτικά προϊόντα όπως βότανα και ρίζες. Το 1815 δημιούργησε ένα τονωτικό ποτό που βρίσκεται σήμερα μέσα στις 100 κορυφαίες μάρκες αποσταγμάτων παγκοσμίως και στη Γερμανία έχει μεγαλύτερες πωλήσεις ακόμα και από το Jägermeister! Το Ramazzotti

ένα τονωτικό amaro, από 33 βότανα, ρίζες και μπαχαρικά, που μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται: γεντιανή, ραβέντι, γαρύφαλλο, κανέλα, κίνα, ρίγανη, νεράντζι από τα νησιά Κουρασάο, φλούδα από γλυκά πορτοκάλια Σικελίας κ.α. Με 30% vol., είναι ευκολόπιοτο, με λεπτή γεύση, σε μια εύθραυστη ισορροπία ανάμεσα στο γλυκό και το πικρό, όπου κυριαρχεί το πορτοκάλι, με κομψά αρώματα βοτάνων και γλυκών μπαχαρικών. (https://it.wikipedia.org/wiki/Amaro_Ramazzotti n.d.)

Amaro Lucano

Το Amaro Lucano δημιουργήθηκε από τον Pasquale Vena, ιδιοκτήτη μπαρ και διάσημο σεφ ζαχαροπλαστικής στο χωριό Pisticci το 1894, ενώ σήμερα παρασκευάζεται στην Basilicata της Ιταλίας. Έχει λάβει πολλές τιμητικές διακρίσεις και κατέχει ηγετική θέση στην Ιταλική αγορά. Βασίζεται σε μια παλιά συνταγή από σπάνια βότανα και ρίζες, η οποία παραμένει απόρρητη. Τα 37 επιλεγμένα βότανα όπως γεντιανή, αγγελική, απήγανος, φασκόμηλο, θυμάρι, κέδρο, ζάχαρη και άλλα μυστικά συστατικά εκχυλίζονται για να δώσουν ένα πικάντικο, γλυκόπικρο amaro, με πιπεράτη γεύση και νότες κόλα. Έχει έντονο χρώμα καραμέλας και περιέχει 30% αλκοόλ. (https://it.wikipedia.org/wiki/Amaro_Lucano n.d.)

Jagermeister

Ποτό θρύλος το γερμανικό bitter, που στα Γερμανικά σημαίνει «ο αρχηγός των κυνηγών» και αναφέρεται στον Γερμανό Άγιο Herbertus, προστάτη των κυνηγών. Αρχικά δημιουργήθηκε για ιατρική χρήση και συγκεκριμένα για την θεραπεία του επίμονου βήχα και των χωνευτικών προβλημάτων, ενώ κατά την διάρκεια του Β΄ Παγκόσμιου πολέμου το χρησιμοποιούσαν ως αναισθητικό στο πεδίο της μάχης. Δημιουργήθηκε το 1934 από τον Γερμανό Curt Mast και δεν άργησε να διαδοθεί σε όλο τον κόσμο και το 2005 να ανέβει στη 13η θέση της παγκόσμιας κατάταξης πωλήσεων. Η συνταγή παραγωγής του είναι μυστική. Είναι ένα μείγμα καθαρής αλκοόλης μέσα στην οποία εκχυλίζονται 56 διαφορετικά βότανα, φρούτα, ρίζες, μπαχαρικά και ζάχαρη από τεύτλα και ζαχαροκάλαμο. Με 35 % vol. και γλυκόπικρη γεύση, όπου κυριαρχούν φυτικοί και γήινοι χαρακτήρες. Είναι διακριτικά γλυκό και ελαφρά σιροπώδες, μαλακό, πλην όμως «σωματώδες» bitter, με καφέ χρώμα και μελένιες ανταύγειες. Με διακριτικά φαρμακευτικά αρώματα βοτάνων, κανέλας, πιπεράτων μπαχαρικών και ανηθόλης. (http://wikipedia.qwika.com/en2el/J%C3%A4germeister n.d.)

Underberg

Δημιουργήθηκε το 1846 από τον Hubert Underberg, στο Rheinberg της Γερμανίας, αξιοποιώντας παραδοσιακές συνταγές που είχε βρει όταν ταξίδεψε στην Ολλανδία και το Βέλγιο, όπου ο κάθε ξενοδόχος είχε τη δική του συνταγή για bitter και μετά από συστηματική μελέτη και πολλά πειράματα κατέληξε στην τελική συνταγή. Το Underberg είναι ένα σκούρο καφέ bitter με 44% vol., που εξάγεται σε περισσότερες από 100 χώρες, αποτελούμενο από βότανα που προέρχονται από 43 διαφορετικές χώρες, τα οποία εκχυλίζονται σε καθαρή αλκοόλη. Στη συνέχεια αναμιγνύεται με νερό πηγής και ωριμάζει σε δρύινα βαρέλια για πολλούς μήνες. Διακρίνεται για την πλούσια και έντονη φαρμακευτική γεύση του που σε μεγάλο βαθμό οφείλεται στην γεντιανή. Κάτω από την διάχυτη πικράδα, ξεπηδούν αρώματα, γλυκάνισου, μέντας, κανέλας, γαρίφαλου και μούρων. (https://www.underberg.com/ n.d.)

Chartreuse

Δημιουργήθηκε το 1737 από τους μοναχούς της μονής Chartreuse, βορείως του Παρισιού. Η μυστική συνταγή, αποτελείται από 130 βότανα και μυρωδικά από την περιοχή των Άλπεων, που εκχυλίζονται μέσα σε οινόπνευμα, αποστάζονται, αναμιγνύονται με μέλι και σιρόπι ζάχαρης και παλαιώνεται για πολλά χρόνια σε δρύινα βαρέλια. Το Herbal Elixir de la Grand Chartreuse είναι η αρχική πικρή έντονα βοτανική εκδοχή του ποτού - ελιξιρίου με 71% vol., το οποίο παράγεται πλέον και σε πιο απαλές και γλυκές εκδόσεις τύπου λικέρ, όπως το πράσινο Verte με 55% vol. και το κίτρινο Jaune με 40% vol., που φτιάχνονται με βάση μπράντυ και χαρακτηρίζονται από μια πιο διακριτική φυτική, γλυκιά και πικάντικη γεύση. (https://en.wikipedia.org/wiki/Chartreuse_(liqueur) n.d.)

Benedectine

Η Βενεδικτίνη δημιουργήθηκε το 1510, στο μοναστήρι των Βενεδικτίνων μοναχών στην πόλη Fecamp, στη Νορμανδία της Γαλλίας από τον Μπερνάντο Βιντσέλλι. Είναι το πιο παλιό λικέρ που κυκλοφορεί μέχρι και σήμερα και όπως συνέβη με πάρα πολλά λικέρ, ξεκίνησε σαν φάρμακο με τονωτικές και αναζωογονητικές ιδιότητες. Στην ετικέτα υπάρχουν τα αρχικά DOM, (Deo Optimo Maximo), που σημαίνουν: στον Θεό τον Άριστο, τον Μέγιστο. Η βάση του λικέρ είναι ένα μπράντυ, όπου αναμιγνύονται αποστάγματα από 27 διαφορετικά αρωματικά βότανα (το θυμάρι είναι ένα από τα βασικά συστατικά του), φλοιοί φρούτων και μπαχαρικά από όλο τον κόσμο. Με 45% vol., παλαιώνεται και ωριμάζει σε

βαρέλια δρυός, έχει κεχριμπαρένιο χρώμα, απαλή γεύση και διακριτικά αρώματα εσπεριδοειδών, μπαχαρικών και βανίλιας.

(http://en.wikipedia.org/wiki/B%C3%A9n%C3%A9dictine n.d.)

Unicum

«Das ist ein unicum!» (αυτό είναι μοναδικό!). Αυτά ήταν τα λόγια του Κάιζερ Joseph II, αφού δοκίμασε το ποτό για πρώτη φορά και αυτή η δήλωση έδωσε στο ποτό το σημερινό του όνομα. Ο Peter Zwack δημιούργησε το εθνικό ποτό της Ουγγαρίας το 1790 και από τότε οι Ούγγροι ορκίζονται σ' αυτό! Η μυστική συνταγή, αποτελείται από 23 ή ίσως και 40 φυτικά συστατικά. Μέρος από αυτά έχει εκχυλιστεί για 30 μέρες, ενώ το άλλο μέρος είναι αποσταγμένο. Στη συνέχεια και τα δύο αναμιγνύονται σε δρύινα βαρέλια και παλαιώνουν για τουλάχιστον 6 μήνες. Με γλυκόπικρη γεύση και εξωτικό άρωμα, καταπραϋντική επίδρασή στο στομάχι, θεωρείται τονωτικό και ιαματικό για πολλές ασθένειες.
(http://en.wikipedia.org/wiki/Unicum n.d.)

Altvater

Το Altvater, είναι ένα πολυβραβευμένο βοτανικό λικέρ, με 38% vol., που δημιουργήθηκε από τον Gessler τον 19ο αιώνα στη Σιλεσία και θεωρείται ως ένα από τα παραδοσιακά ποτά της Αυστρίας. Βότανα και μπαχαρικά, εκχυλίζονται σε αλκοόλη, για να προκύψει ένα λικέρ με χρυσαφένιο χρώμα, μοναδικό άρωμα και γεύση. Την εποχή εκείνη ήταν πολύ δημοφιλές, συχνά συνίστατο από γιατρούς, ενώ το 1886 ο καθηγητής και πρόεδρος του Αυτοκρατορικού και Βασιλικού Χημείου της Βιέννης Δρ. Ρίτσαρντ Godeffroy, πιστοποίησε τις ιδιαίτερα ευεργετικές του ιδιότητες.
(http://www.agjab.com/agjab_2012/aboutus.htm n.d.)

Περισσότερες πληροφορίες για τα βοτανικά ποτά μπορείτε να αντλήσετε από 9 άρθρα του Νατσιούλη Δ. Αθανάσιου - Διατροφολόγου - Οινογνώστη, που δημοσιεύτηκαν στην εφημερίδα «ΟΙΝΟΣ & ΠΟΤΟ», στο παρακάτω link:
https://www.natsioulis.eu/search/label/%CE%92%CE%BF%CF%84%CE%B1%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AC%20%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%81

1.2. Αντιοξειδωτικά

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η ζωή στη γη εξελίχθηκε μετά από ένα μεγάλο αριθμό καταστροφικών γεγονότων και την εμφάνιση πριν από περίπου 3,8 δισεκατομμύρια έτη σε μεγάλες ποσότητες του οξυγόνου, το οποίο ευνοούσε το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών. Αυτό απλά σημαίνει, ότι χωρίς την εξέλιξη των ισχυρών αντιοξειδωτικών, η ζωή δεν θα είχε επιβιώσει. Η χρήση των αντιοξειδωτικών χρονολογείται από την αρχαιότητα. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι διέθεταν αξιοσημείωτη τεχνογνωσία, αφού κατάφερναν με φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε αντιοξειδωτικά, να διατηρήσουν τα νεκρά σώματα. (Ashwell 2010)

Τα *αντιοξειδωτικά* είναι ενώσεις που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την προκαλούμενη από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο οξείδωση των τροφικών συστατικών. Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι συνήθως πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, που διαθέτουν μια τουλάχιστον ελεύθερη υδροξυλομάδα ή αμινοαμάδα. (Μπόσκος 2004)

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται κυρίως σε συνδυασμό με τους λεγόμενους *συνεργούς σταθεροποιητές και συμπλοκοποιητές*. Τα μίγματα αυτά συμβάλουν στην ενεργοποίηση και βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης, στη διεύρυνση της εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σε περισσότερες κατηγορίες τροφίμων και στην ευκολότερη χρήση τους. Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν διάφορες χημικές ενώσεις, όπως τα οξέα και τα άλατα. (Φουρτουνόπουλος 2004)

1.2.1. Η δράση των αντιοξειδωτικών

Η δράση των αντιοξειδωτικών βασίζεται στην απομάκρυνση ή στην εξουδετέρωση των $ROO^{\cdot}$ και $R^{\cdot}$ ελευθέρων ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις στην πλήρη αναστολή της οξείδωσης (σουλφονικά). Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνοντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών ROO και R, με τη δημιουργία μιας ανενεργού αντιοξειδωτικής ελεύθερης ρίζας. (Roberfroid 1994)

Η απενεργοποίηση και η αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας συντελεί στην διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης και στην παραγωγή σταθερών προϊόντων, μέσω διμερισμού. Η άμεση αντίδραση του αντιοξειδωτικού (AH) με το υπόστρωμα της ελεύθερης ρίζας R, δίνεται από την αντίδραση: $R^{\cdot} + AH \rightarrow RH + A^{\cdot}$, που φαίνεται να μην έχει την παραμικρή σχέση με την αντίδραση του αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα ενός υπεροξειδίου ROO: $ROO^{\cdot} + AH \rightarrow ROOH + A^{\cdot}$.

Κατά τον ίδιο τρόπο δημιουργείται και ένα σύμπλοκο μεταξύ του αντιοξειδωτικού και της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου: $ROO^{\cdot} + AH \rightarrow (ROO\ ^{\cdot}AH)$, που μπορεί να

αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες και να προκαλέσει αναστολή της οξείδωσης. Σε κάποιες περιπτώσεις (μερική πίεση ατμοσφαιρικού οξυγόνου - θερμοκρασία δωματίου) διασπάται η αλυσίδα της ελεύθερης ρίζας και έχουμε σύγκρουση δυο ριζών ελεύθερων υπεροξειδίων: $2\ ROO^{\cdot} \rightarrow 2\ ROOR + O_2$. (Μπόσκος 2004)

Έτσι αποδεικνύεται, ότι όλοι οι αναστολείς της οξείδωσης θα πρέπει αφ΄ ενός να είναι ενεργοί, ώστε να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες για να σπάσουν την αλυσίδα και αφετέρου μεταφορικά ενεργοί, προκειμένου να αποφευχθεί η άμεση αντίδραση του οξυγόνου με την ανταλλασσόμενη ελεύθερη ρίζα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών σε συνδυασμό με την υψηλή τους δραστικότητα κατά την φάση της διάδοσης, θα μπορούσε να οδηγήσει στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ως μεταφορέων και συνεπώς στη δράση τους ως προοξειδωτικά. Έτσι καθίσταται επιτακτικό, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών να γίνεται πολύ πριν από το στάδιο της προαγωγής (διάδοση). Αν στο υπόστρωμα αυξηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, τότε το αντιοξειδωτικό που προστίθεται καταναλώνεται γρήγορα, οπότε είναι πλέον αδύνατον να επιβραδυνθεί η πρόοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης. (Μπόσκος 2004)

1.2.2. Διακρίσεις αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

Πρωτογενή αντιοξειδωτικά: Είναι συνήθως φαινολικές ενώσεις, που ως δότες ηλεκτρονίων προκαλούν τον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών. Πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι οι τοκοφερόλες, η BHA (βουτυλουδροξυανισόλη), το BHT (βουτυλο υδροξυτολουόλιο), η TBHQ (τετρα-βουτυλο-υδροξυκινόνη) κ.α.

Συνοπτικά, ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δίνεται με τις παρακάτω αντιδράσεις (Shahidi 1997):

$$RH \longrightarrow R\bullet \qquad \textbf{Έναρξη}$$

$$\left.\begin{array}{l} R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet \\ ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet \end{array}\right\} \qquad \textbf{Διάδοση}$$

$$\left.\begin{array}{l} R\bullet + R\bullet \longrightarrow R - R \\ R\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR \\ ROO\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR + O_2 \end{array}\right\} \text{αδρανή προϊόντα} \qquad \textbf{Τερματισμός}$$

Η δράση των αντιοξειδωτικών στο μηχανισμό της οξείδωσης:

$$AH_2 + ROO\bullet \longrightarrow ROOH + AH\bullet$$
$$AH\bullet + AH\bullet \longrightarrow A + AH_2$$
$$ROO\bullet + AH\bullet \longrightarrow ROOH + A\bullet$$

Όπου: AH_2 = αντιοξειδωτική ουσία, ROOH = υπεροξείδιο, ROO• = ελεύθερη ρίζα, AH• = ελεύθερη ρίζα αντιοξειδωτικού.

Δευτερογενή αντιοξειδωτικά: Η δράση τους συνίσταται στη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων (προϊόντα οξείδωσης), προς σταθερά τελικά προϊόντα, που δεν παίρνουν μέρος σε αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπως το διαρυλο-θειοδιπροπιονικό οξύ και ο εστέρας του. (Μπόσκος 2004)

Ενώσεις που απομακρύνουν το οξυγόνο: Τα αντιοξειδωτικά αυτά σχηματίζουν ενώσεις με το οξυγόνο δεσμεύοντάς το, εμποδίζοντας έτσι την αντίδραση με τα λιπίδια που αποτελεί την έναρξη της αυτοξείδωσης. Τέτοια αντιοξειδωτικά είναι το ασκορβικό οξύ και ο παλμιτικός εστέρας του, το ερυθορβικό οξύ, τα άλατα του με νάτριο κ.α. (Pokorny 2001)

Ενώσεις που δημιουργούν σύμπλοκα (συνεργιστικές ενώσεις): Οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως του χαλκού και του σιδήρου. Έτσι δεσμεύουν σωματίδια που δρουν ως εκκινητές της οξείδωσης. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν το κιτρικό οξύ, τα αμινοξέα, το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) κ.α. Προϋπόθεση εκδήλωσης της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι η χρήση τους σε συνδυασμό με άλλο αντιοξειδωτικό. (Roberfroid 1994)

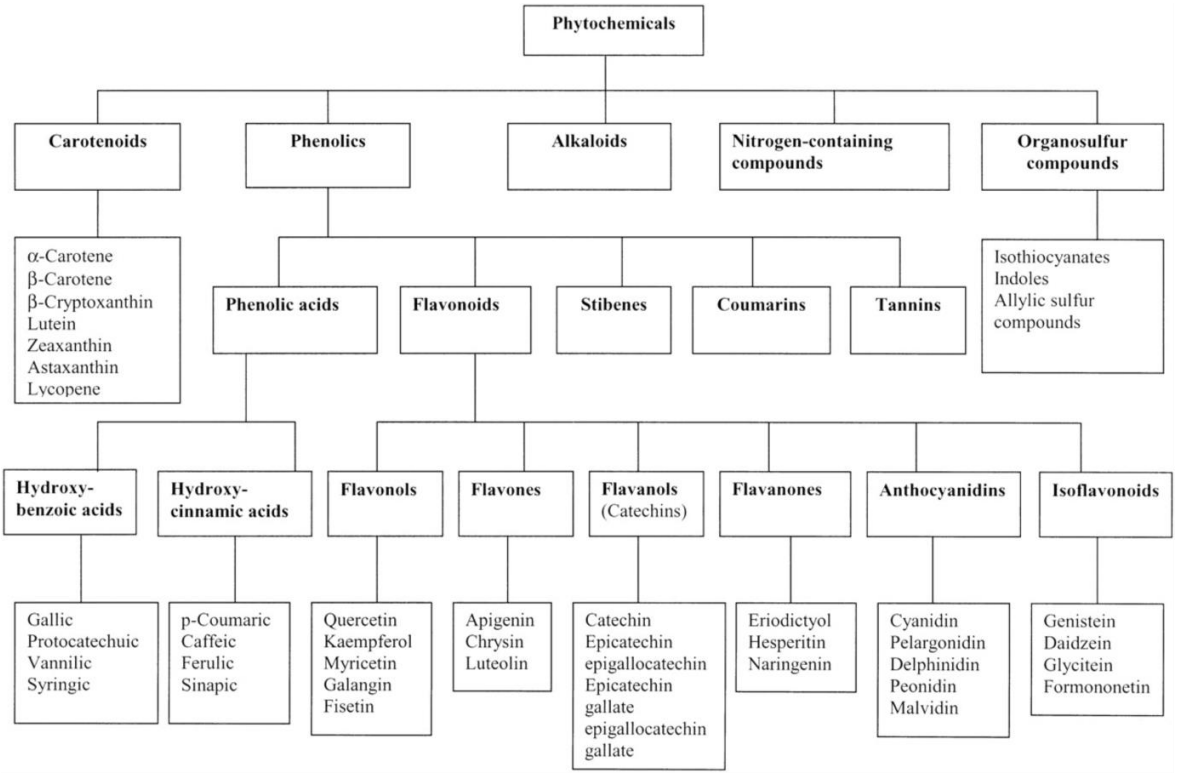
Τα αντιοξειδωτικά με βάση την προέλευση τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

Συνθετικά αντιοξειδωτικά: Αυτά συντίθενται βιομηχανικά. Επιτρεπόμενα για τρόφιμα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι το BHT, η BHA, το Trolox, ο PG (γαλλικός προπυλεστέρας) η TBHQ. Πολλά από αυτά, αν και παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα, δεν χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στα τρόφιμα, λόγω των αρνητικών επιπτώσεων τους στον ανθρώπινο οργανισμό (Pokorny 2001). Η πρόσληψή τους θα μπορούσε να προκαλέσει γενοτοξικότητα και καρκινογένεση σε υψηλές συγκεντρώσεις. (Gutteridge 2010)

Φυσικά αντιοξειδωτικά: Τα αντιοξειδωτικά των τροφίμων, είναι πιθανώς πιο αποτελεσματικά στη μείωση των ROS συγκριτικά με τα συνθετικά, λόγω συνεργικών δράσεων ενός ευρέος φάσματος βιομορίων όπως οι βιταμίνες C και E, φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, τερπενοειδή και φυτοπροστατευτικών. (Pérez-Jiménez, et al. 2008)

1.2.3. Φυτοχημικά

Τα φυτοχημικά είναι βιοδραστικά συστατικά των φυτών με πλήθος ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία (Κατσιλάμπρος 2010). Είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες οι οποίοι λειτουργούν αμυντικά κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας (Beckman 2000), εντομοαπωθητικά ή εντομοκτόνα, προσελκύουν επικονιαστές και συμβάλουν στην αλληλεπίδραση με γειτονικά φυτά (Taiz 2006). Τα περισσότερα φυτοχημικά είναι ενεργά οξειδοαναγωγικά μόρια και επομένως ορίζονται ως αντιοξειδωτικά. Πλήθος ερευνών δείχνουν τον ευεργετικό τους ρόλο ενάντια σε χρόνιες παθήσεις όπως στον καρκίνο, τις καρδιοπάθειες, τον διαβήτη, την υπέρταση και την φλεγμονή (Dillard 2000), ενώ αποδεδειγμένα διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιγηραντικές, αγγειοδιασταλτικές και αντιαλλεργικές επιδράσεις. (Cook 1996)



Διάγραμμα 1.1. Ταξινόμηση φυτοχημικών (Liu 2004)

Τα φυτοχημικά ταξινομούνται σε 5 βασικές κατηγορίες:

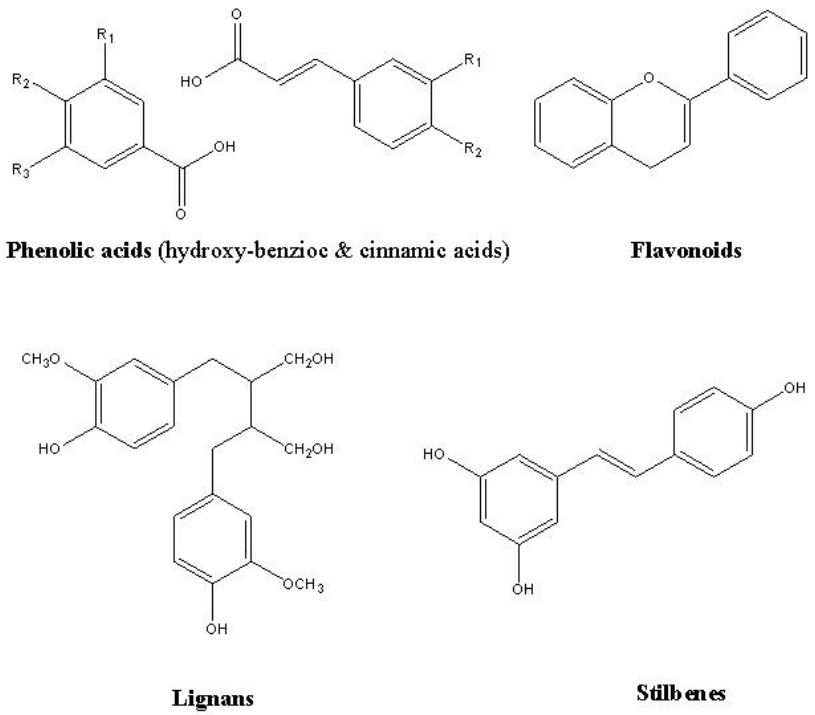
- Πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια, κουμαρίνες, ταννίνες).
- Καροτενοειδή (α- και β- καροτένιο, κρυπτοξανθίνη, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη).
- Αλκαλοειδή (αζωτούχες ενώσεις όπως, πυριδίνες, πουρίνες, κινολίνες, τερπενοειδή)
- Θειούχες οργανικές ενώσεις (ισοθειοκυανικά, ινδόλες, θειούχα αλλύλια).
- Άλλες αζωτούχες ενώσεις.

1.2.4. Πολυφαινόλες γενικά

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτών έχουν αποδοθεί κυρίως στο φαινολικό τους περιεχόμενο, με τις σχετικές δημοσιεύσεις εργασιών να ξεπερνούν τις 150.000 (Shen 2007). Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν ποσοτικά την πλέον άφθονη κατηγορία αντιοξειδωτικών, με εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη 1 g / ημέρα, η οποία είναι 10 φορές υψηλότερη από την πρόσληψη βιταμίνης C και 100 φορές αυτής της βιταμίνης E. (Scalbert A. 2005)

Οι *πολυφαινόλες* είναι δευτερογενείς φυτικοί υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες (Haslam 1998) και εμπλέκονται σε διεργασίες, φυτοπροστασίας (Duthie 2003). Είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών, αφού έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 10.000 σε διάφορα φυτά (Kondratyuk 2009) και έχουν επιπτώσεις στην πίκρα, τη στυπτικότητα, το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα στα τρόφιμα (Gutteridge 2010). Οι φυσικές πολυφαινόλες έχουν προσελκύσει την προσοχή ως πιθανοί παράγοντες για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες αφού διαθέτουν αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιγηραντικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Οι πολυφαινόλες εμφανίζονται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα υπολείμματα σακχάρου συνδεδεμένα με υδροξυλομάδες, αλλά υπάρχουν και απευθείας δεσμοί του σακχάρου με αρωματικό άνθρακα. Η σύνδεση με ενώσεις, όπως αμίνες, καρβοξυλικά, οργανικά οξέα, λιπίδια και άλλες φαινόλες είναι επίσης κοινές (Middleton 2008). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές ομάδες με βάση τον αριθμό φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που δεσμεύονται στους δακτυλίους και ταξινομούνται σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια, κουμαρίνες, και ταννίνες.



Σχήμα 1.1. Χημικές δομές των κύριων κατηγοριών πολυφαινολών (An-Na Li 2014)

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε πολλά φυτικά τρόφιμα, όπως σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, δημητριακά, φαρμακευτικά φυτά και άγρια άνθη (Krishnaiah 2010). Σημαντικό φαινολικό περιεχόμενο βρέθηκε σε σταφύλια, βατόμουρα, μάνγκο, εσπεριδοειδή, μπρόκολο, σχοινόπρασο, μαυρομάτικα φασόλια, κύμινο, λωτούς, γλυκοπατάτες, φασόλια σόγιας, φύλλα πιπεριού, φύλλα ginseng και ελαιόλαδο (Podsędek 2007).

Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την συγκέντρωση και τις μορφές των πολυφαινολών στα τρόφιμα, είναι ο τρόπος καλλιέργειας ο βαθμός ωρίμανσης, οι συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας και η έκθεση στον ήλιο (Scalbert 2000). Οι μέθοδοι μαγειρέματος προκαλούν σημαντική μείωση στο περιεχόμενο των πολυφαινολών. Τα καρότα χάνουν σημαντικό ποσοστό πολυφαινολών κατά τον βρασμό, ενώ το μαγείρεμα στον ατμό και το τηγάνισμα είχαν λιγότερο αρνητική επίδραση (Miglio 2008). Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητά τους φαίνεται να αυξάνεται όταν τα λαχανικά μαγειρεύονται (Gliszczynska-Swiglo A. 2006).

Η αποθήκευση μειώνει επίσης την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Μετά από 11 μήνες αποθήκευσης χυμού μήλου, παρατηρήθηκαν απώλειες από 5% - 21% (Gliszczynska-Swiglo 2003). Μείωση του περιεχομένου του ρ-κουμαρικού οξέος παρατηρήθηκε επίσης σε κατεψυγμένα κόκκινα σμέουρα (Mullen 2002). Απώλεια φαινολικών συστατικών παρατηρήθηκε και στο ελαιόλαδο μετά από 8 μήνες αποθήκευσης σε κλειστές φιάλες στο

σκοτάδι (Lavelli 2006), αλλά παράλληλα λόγω της υδρόλυσης σύνθετων φαινολών, αναφέρθηκε αύξηση της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης (D'Archivio 2010).

1.2.5. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

1.2.5.1. Αντιοξειδωτική δράση

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως δέσμευση των ελευθέρων ριζών, αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων, μείωση σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων, ενώ μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά στο πλάσμα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στους παράγοντες μεταγραφής (Sato 1996).

Το πράσινο τσάι είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, όπως κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλικό οξύ. Μια τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη μελέτη, κατέδειξε την ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικά και της έκτασης της αντιοξειδωτική δράσης του in vivo (Pecorari 2010).

Σε άλλη μελέτη, η κατανάλωση καρυδιών ή αμυγδάλων, αύξησε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων στο πλάσμα (Torabian 2009).

Φαινολικές ενώσεις, όπως επικατεχίνη, πρωτοκατεχικό οξύ, προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος, βανιλλικό οξύ, κερκετίνη, μυρισετίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και γαλλικό οξύ προστατεύουν τις μεμβράνες και αναστέλλουν τις βλάβες στο DNA (Perron 2011).

Μηχανισμοί αποτροπής των βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες από τις πολυφαινόλες:

1. Δέσμευση των δραστικών ενώσεων οξυγόνου. (ROS) (Procházková 2011)
2. Ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. (Nijveldt 2001)
3. Σχηματισμός συμπλόκων με προοξειδωτικά μέταλλα. (Ferrali 1997)
4. Αναστολή των οξειδασών. (Heim 2002)
5. Μείωση του οξειδωτικού στρες από το μονοξείδιο του αζώτου. (Van-Acker 1995)
6. Αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος. (Lotito 2006)

Πίνακας 1.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις πολυφαινολών (An-Na Li 2014)

Πολυφαινόλες	**Αντιοξειδωτική δράση**	**Αναφορές**
Εκχύλισμα σταφυλιού πλούσιο σε πολυφαινόλες	Μείωση του οξειδωτικού στρες στον ορό	(Garcia-Alonso 2006)
Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού	Μείωση της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα	(Sano 2007)
Αιθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών Chardonnay	Συντηρητικό ψαριών και ιχθυελαίων	(Luther 2007)
Επικατεχίνη και Προκυανιδίνη	Συντηρητικό φρούτων	(Sun 2010)
Υδροξυτυροσόλη και παράγωγά της	Μείωση της οξείδωσης της LDL στο πλάσμα και βελτίωση βιοδεικτών οξειδωτικής βλάβης.	(Raederstorff 2009)
Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Γαλλικό οξύ	Δοσοεξαρτώμενη αντιοξειδωτική δράση στο πλάσμα	(Pecorari 2010)
Ανθοκυανίνες	Δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες	(Deng G. 2013)
Εκχύλισμα από καρύδια και αμύγδαλα	Μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων στο πλάσμα	(Torabian 2009)
Καρνοσικό οξύ, Καρνοσόλη, Ροσμαδιάλη, Γενκουανίνη, Ροσμαρινικό οξύ	Προστατεύουν τις μεμβράνες από οξειδωτική καταστροφή	(Perez-Fons 2010)

1.2.5.2. Καρδιοπροστατευτική δράση

Η μεταγευματική υπερλιπιδαιμία και το οξειδωτικό στρες είναι καλά τεκμηριωμένοι παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση (Vita 2014) και θρόμβωση, οι οποίες είναι από τις κύριες αιτίες εμφράγματος του μυοκαρδίου, που θα μπορούσε να μειωθεί με τις πολυφαινόλες (Santhakumar 2015).

Η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως φρούτων και των λαχανικών, σχετίζεται με μείωση της δυσλιπιδαιμίας, της αθηροσκλήρωσης, της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, της υπέρτασης, της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, της θρόμβωσης και της φλεγμονής που συνδέονται άρρηκτα με τη καρδιαγγειακή νόσο (Desch 2010).

Η καρδιοπροστατευτική επίδραση του κόκκινου κρασιού αποδόθηκε στην υψηλή περιεκτικότητά του σε φαινόλες, όπως η ρεσβερατρόλη και οι προανθοκυανιδίνες (Deng

2012), ενώ και ο λευκός οίνος θεωρείται εξίσου καρδιοπροστατευτικός με τον ερυθρό, επειδή περιέχει άλλα αντιοξειδωτικά, όπως καφεϊκό οξύ και τυροσόλη (Samuel 2008).

1.2.5.3. Αντικαρκινική δράση

Οι πολυφαινόλες προανθοκυανιδίνες, φλαβονοειδή, ρεσβερατρόλη, ταννίνες, 3-γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, γαλλικό οξύ και ανθοκυανίνη, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο ως αντικαρκινικά φάρμακα, αφού αντικαρκινικές τους επιδράσεις έχουν καταγραφεί για το στόμα, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, το κόλον, το ήπαρ, τον πνεύμονα, τον μαστό και το δέρμα (Johnson 1994).

Τα μούρα είναι πλούσια σε ανθοκυάνες, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων. Μελέτη με εκχυλίσματα μούρων δείχνει ότι προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης όγκων κατά περισσότερο από 50% (Bagchi 2004).

Σύμφωνα με μετα-ανάλυση μελετών παρατήρησης, το πράσινο τσάι θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη (Davalli 2012). Η κατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και η επιγαλλοκατεχίνη, τα οποία άφθονούν στο πράσινο τσάι δρουν ως επαγωγείς θανάτου των καρκινικών κυττάρων (Landis-Piwowar 2007).

Το γαλλικό οξύ μπορεί επίσης να εμποδίσει την καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω της αναστολής της βλάβης του DNA (Giftson 2010). Οι φλαβόνες θα μπορούσαν να αποτρέψουν τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αφού βρέθηκε ότι μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29 και επάγουν ισχυρά τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Wenzel 2000).

Η ρεσβερατρόλη που βρίσκεται κυρίως στους σπόρους και στον φλοιό των σταφυλιών, αποτελεί έναν αναδυόμενο ισχυρό παράγοντα πρόληψης του καρκίνου (Stewart 2003).

Πίνακας 1.3. Αντικαρκινικές δράσεις ορισμένων πολυφαινολών (An-Na Li 2014)

Πολυφαινόλες	**Επιδράσεις**	**Αναφορές**
Προανθοκυανιδίνες	Αναστολή μετάστασης καρκίνου του μαστού	(Mantena 2006)
Ανθοκυανίνη	Επισκευή - προστασία της ακεραιότητας του DNA, επιβράδυνση της ανάπτυξης αιμοφόρων αγγείων σε ορισμένους όγκους	(Bagchi 2004)
Γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης-3	Αναστολή πρωτεασώματος, κυτταρικός θάνατος όγκων, πρόληψη καρκίνου του προστάτη	(Davalli 2012) (Landis-Piwowar 2007)
Γαλλικό οξύ	Πρόληψη της καρκίνου παχέος εντέρου, αναστέλλοντας τη βλάβη του DNA	(Giftson 2010)
2-φαινυλ-4Η-1-βενζοπυραν-4-όνη	Πρόκληση απόπτωσης	(Wenzel 2000)
Ρεσβερατρόλη	Αναστολή κάθε σταδίου της καρκινογένεσης του προστάτη, ξεκαθάρισμα του αρχικού πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων	(Stewart 2003)
Ελλαγιτανίνες	Πρόκληση απόπτωσης σε όγκους του στόματος	(Yoshida 2000)

1.2.5.4. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται κρίσιμος παράγοντας σε πολλές ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου ΙΙ, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της γήρανσης.

Οι πολυφαινόλες έχουν δείξει σημαντικά αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα in vivo και in vitro (Santangelo 2007). Μεταβολίτες πολυφαινολών προερχόμενοι από τη χλωρίδα του παχέος εντέρου φαίνεται ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση και αναστέλλουν περισσότερο από 50% την παραγωγή της προσταγλανδίνης Ε-2 (Larrosa 2009).

Παρθένο ελαιόλαδο με υψηλό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες επέδρασε προστατευτικά στη φλεγμονή (Martinez-Dominguez 2001).

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων των δεικτών φλεγμονής και των προφλεγμονωδών κυτοκινών, σε χρονίως εκτεθειμένους σε UVB δερματικούς όγκους άγριων ποντικών (Meeran 2009). Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των κατεχινών, που αφθονούν στο πράσινο τσάι ενεργοποιούνται μέσω μιας ποικιλίας διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης των ισομορφών της σύνθεσης του νιτρικού οξειδίου, ενώ διαθέτουν επιβεβαιωμένες νευροπροστατευτικές ιδιότητες μετά από εγκεφαλική ισχαιμία (Sutherland 2006).

Οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αγγειακή φλεγμονή και βλάβη, όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά αλλά και ως ρυθμιστές φλεγμονωδών οδών σηματοδότησης οξειδοαναγωγής (Vauzour 2010). Ένας από τους πολλούς αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς των πολυφαινολών in vivo είναι και η αναστολή - ρύθμιση της δραστικότητας των ενζύμων που παράγουν τα εικοσανοειδή, συμπεριλαμβανομένης της φωσφολιπάσης A2, και της κυκλοοξυγενάσης (Kim 2004), όπως και των κυτοκινών (Miles 2005).

1.2.5.5. Αντιμικροβιακές δράσεις

Οι πολυφαινόλες διαθέτουν αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητισιακή και αντιϊκή δράση (Baydar 2006). Η αποσταθεροποίηση καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με την κυτταρική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως η Listeria monocytogenes, θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός της δράσης τους (Plumed-Ferrer 2013).

Οι πολυφαινόλες του τσαγιού και ιδιαίτερα η επιγαλλοκατεχίνη έδειξαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του Bacillus stearothermophilus. Η αντοχή στη θερμότητα των σπορίων Bacillus stearothermophilus και σπορίων του Clostridium thermoaceticum μειώθηκαν με την προσθήκη πολυφαινολών του τσαγιού (Sakanaka 2000).

Οι πολυφαινόλες φαίνεται να καταστέλλουν μια σειρά μικροβιακών παθογόνων παραγόντων, μέσω της μείωσης των υποδοχέων προσκόλλησης, της αναστολής σχηματισμού βιομεμβρανών, της εξουδετέρωσης των βακτηριακών τοξινών και της συνέργειας με τα αντιβιοτικά (Daglia 2012).

1.2.5.6. Αντιγηραντικές δράσεις

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, μπορεί να είναι χρήσιμη για την αναστροφή της πορείας της γήρανσης. Το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού, μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων και είχε ανασταλτική δράση επί της συσσώρευσης οξειδωτικών βλαβών του DNA στον νωτιαίο μυελό αρουραίων, που σχετίζονται με την ηλικία, καθώς και σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως τον εγκεφαλικό φλοιό, το ραβδωτό σώμα και τον ιππόκαμπο (Balu 2006).

Οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) έχουν αποδειχθεί σε ποντίκια με νόσο Parkinson, αφού εμπόδισαν τη μείωση των επιπέδων της πρωτεάσης της ντοπαμίνης και της υδροξυλάσης της τυροσίνης και αύξησαν τη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης στον εγκέφαλο (Levites 2001).

Η ρουτίνη, είναι ένας ελπιδοφόρος παράγοντας για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αναγωγικών δραστηριοτήτων της (Xu 2014), όπως και οι πολυφαινόλες και το φερουλικό οξύ από το πίτουρο του αραβοσίτου (Rossi 2008).

1.2.5.7. Άλλες βιολογικές δράσεις

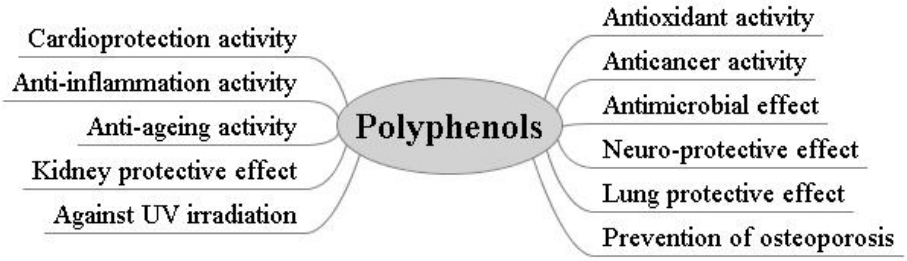
Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού προστατεύουν από βλάβες του δέρματος, από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την UV ακτινοβολία (Meeran 2009).

Η προστασία των νεφρών από τις πολυφαινόλες έχει επίσης αναφερθεί (Rodrigo R. 2006) και παρατηρείται συχνότερα στην χρόνια κατανάλωση κόκκινου κρασιού (Rodrigo 2011).

Εκτός από τους νεφρούς, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν και από την αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Η υψηλή πρόσληψη ισοφλαβονών σόγιας και γενιστεϊνης συνδέθηκε με καλύτερη πνευμονική λειτουργία σε ασθματικούς ασθενείς (Woods 2003).

Η ινσουλινοαντίσταση, μια σοβαρή μεταβολική διαταραχή, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον διαβήτη και τις καρδιοπάθειες. Υπάρχουν αναφορές από μελέτες in vivo που δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, ασκούν ευεργετικές επιδράσεις στην παχυσαρκία και την ινσουλινοαντίσταση (Dasgupta 2007), (Meydani 2010). Επίσης η συμπληρωματική λήψη επιγαλλοκατεχίνης φαίνεται να βελτιώνει την ανοχή γλυκόζης, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την ενδοθηλιακή λειτουργία (Jang 2013).

Τέλος, η κατανάλωση γενιστεΐνης, νταϊζεΐνης ή γλυκοζιτών τους θα μπορούσε να αποτρέψει την μείωση της οστικής πυκνότητας (Pandey 2009).



Διάγραμμα 1.2. Μερικές από τις βιολογικές δράσεις των φυτοχημικών (An-Na Li 2014)

1.2.6. Βιοδιαθεσιμότητα

Ο ορισμός της βιοδιαθεσιμότητας, είναι η αναλογία της θρεπτικής ουσίας που απορροφάται αφομοιώνεται και μεταβολίζεται μέσω των φυσιολογικών οδών (Manach 2004). Παρά το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το ασκορβικό οξύ και την α-τοκοφερόλη, μερικές φαινολικές ενώσεις έχουν περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα και συνεπώς συμβάλλουν λιγότερο στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Morillas-Ruiza 2006).

Ο (King 2000) ανέφερε ότι η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών κατεχίνη, κερκετίνη και ισοφλαβόνη είναι 10-50%. Ο (Vissers 2004) βρήκε ότι η απορρόφηση των φαινολών του παρθένου ελαιολάδου είναι μεταξύ 55-66% και από αυτή την ποσότητα, το 5% απεκκρίνεται στα ούρα ως τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.

Ένα πλήθος παραγόντων επηρεάζουν την απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων. Κατ΄αρχήν υπάρχουν σε πολλές διαφορετικές χημικές δομές, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά τις αντιδράσεις σύζευξής τους με ομάδες γλυκουρονιδίου, μεθυλίου και θειικού άλατος που ευνοούν την απορρόφησή τους, ενώ άλλες χημικές αντιδράσεις όπως η ακυλίωση και η εστεροποίηση μειώνουν την απορρόφησή τους. (Ashwell 2010)

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις συνήθως υπάρχουν σε γλυκοζυλιωμένες μορφές, ενωμένες συνήθως με γλυκόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη ή ξυλόζη. Αυτό επηρεάζει σημαντικά τις βιολογικές τους ιδιότητες και μειώνει την απορρόφησή τους, η οποία αυξάνεται με την απομάκρυνση του ζαχάρου από το ένζυμο γλυκοζιτάση του γαστρεντερικού βλεννογόνου ή της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου (Scalbert 2000).

Η in vivo συμπλοκοποίηση της πολυφαινόλης και της β-γλυκάνης, επηρέασε τη βιοδιαθεσιμότητα και τις ωφέλιμες ιδιότητες και των δύο μεμονωμένων συστατικών. Επίσης, βρέθηκε ότι οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν έλξη με ορισμένες πρωτεΐνες μετά την απορρόφηση. Για παράδειγμα, ο σχηματισμός συμπλόκου πολυφαινόλης - πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσει την πεπτική ικανότητα αρκετών πεπτικών ενζύμων στο ανθρώπινο σώμα. Ομοίως, μπορεί επίσης να μειώσει ή να ενισχύσει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών (Bandyopadhyay 2012).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα περιλαμβάνουν την παρουσία λίπους στη διατροφή, την περιεκτικότητα σε ίνες και τις θερμικές επεξεργασίες (Ratnam 2006).

Η αύξηση των συνδεδεμένων με λιπίδια πολυφαινολών στον ορό θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως αποτέλεσμα της βιοδραστικότητας των πολυφαινολών. Μετά από μια περίοδο 48 ωρών με μια δίαιτα με χαμηλή σε αντιοξειδωτικά, 12 νηστικά άτομα (6 άνδρες

και 6 γυναίκες) κατανάλωσαν 400 mL φρέσκου φαινολικού χυμού. Μία ελαφρά αύξηση παρατηρήθηκε στις συνδεδεμένες πολυφαινόλες με τα λιπίδια του ορού, που σχετίστηκε με σημαντική μείωση των προϊόντων υπεροξείδωσής τους για 2-6 ώρες. Η απέκκριση των φαινολών στα ούρα αυξήθηκε και κορυφώθηκε σε 2 ώρες και συνέχισε μέχρι και 6 ώρες μετά την πρόσληψη (Garcia-Alonso 2006).

Επιπλέον, μετά από δύο εβδομάδες καθημερινής κατανάλωσης κόκκινου κρασιού, οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολών πλάσματος αυξήθηκαν σημαντικά. Τα ίχνη των μεταβολιτών εντοπίστηκαν στο πλάσμα και δεν βρέθηκαν στην ομάδα ελέγχου (Tsanga 2005).

Σε πείραμα in vitro πέψης, βρέθηκε ότι περίπου το 43,9% της κατεχίνης, το 85,3% της επικικατίνης και όλα τα διμερή, εξαφανίστηκαν μετά από 2 ώρες παραμονής στο έντερο. Επίσης, μειώθηκε η δραστικότητα κάποιων ενζύμων, όπως της αλκαλικής φωσφατάσης, της αμινοπεπτιδάσης N και της σακχαρόζης - ισομαλτάσης. Αυτό υπονοεί την αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τις παγκρεατικές πρωτεΐνες, οι οποίες ανιχνεύθηκαν μετά από εκχύλιση με ακετονιτρίλιο. (Laurent 2007)

Οι πολυφαινόλες διασπώνται στον εντερικό αυλό από τις μεταβολές του pH. Τα ολιγομερή είναι λιγότερο σταθερά από τα μονομερή σε όξινο και αλκαλικό pH. Σε προσομοίωση του γαστρικού σταδίου με γαστρικό υγρό (pH 1,8), παρατηρήθηκε διάσπαση των υψηλά πολυμερισμένων προκυανιδινών και ελαφρά αύξηση των διμερών προκυανιδινών. Μετά από 2 ώρες in vitro επώασης σε εντερικό μέσο, τα μονομερή και τα διμερή ήταν αρκετά σταθερά σε pH 7, αλλά το 20% των διμερών αποικοδομήθηκαν σε pH 7.4 και όλα τα διμερή εξαφανίστηκαν σε pH 8.5. Σε pH 7,5 με επώαση για 2 ώρες, αποικοδομήθηκε το 15-34% της επικικατίνης, ενώ η κατεχίνη παρέμεινε σταθερή (Zhu 2002).

Σε μια άλλη μελέτη, το παχύ έντερο των χοίρων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο του μεταβολισμού της ανθοκυανίνης, διότι η μικροχλωρίδα του είναι παρόμοια με αυτή του ανθρώπινου εντέρου. Ένα εκχύλισμα ανθοκυανίνης, επωάστηκε αναερόβια στο παχύ έντερο πρόσφατα σφαγμένου χοίρου για 0, 0,5 και 6 ώρες. Μετά από 6 ώρες, οι ανθοκυάνες δεν ανιχνεύθηκαν πλέον, αλλά αναγνωρίστηκαν τρεις μεταβολίτες τους: 3-O-μεθυλγαλικό οξύ, συριγγικό οξύ και 2,4,6-τριυδροξυβενζαλδεΰδη. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση ανθοκυανινών μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των συγκεκριμένων μεταβολιτών στο ανθρώπινο έντερο, οι οποίοι ευθύνονται για την προστατευτική επίδραση κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου (Forester 2008).

Ο (Halliwell 2000) επίσης, πρότεινε ότι αντιοξειδωτικά όπως τα φλαβονοειδή, θα μπορούσαν χωρίς να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο, να ασκήσουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στην γαστρεντερική οδό που είναι συνεχώς εκτεθειμένη σε αντιδραστικά είδη οξυγόνου, χλωρίου και αζώτου από τη διατροφή και σε προϊόντα βακτηριακών ζυμώσεων. Έτσι το πράσινο τσάι για παράδειγμα, μειώνει την προσταγλανδίνη Ε2 στο ανθρώπινο παχύ έντερο, προκαλώντας αναστολή των ενζύμων της κυκλοοξυγενάσης.

Ο μεταβολισμός πολλών πολυφαινολών θεωρείται καλά κατανοητός. Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο, αλλά οι περισσότερες πολυφαινόλες βρίσκονται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοσίδων ή πολυμερών που δεν απορροφούνται με την αρχική τους μορφή (Manach 2004), δηλαδή οι μορφές που φθάνουν στο αίμα και τους ιστούς είναι διαφορετικές από αυτές των τροφίμων. Αν και είναι δύσκολο, είναι αναγκαίο να εντοπιστούν όλοι οι μεταβολίτες και να αξιολογηθεί η βιοδιαθεσιμότητά τους (Zhang Y 2003).

1.3. Ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και η αλληλεπίδραση αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών

1.3.1. Δημιουργία ελευθέρων ριζών

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια τα οποία περιστρέφονται σε τροχιές με διαφορετικές αποστάσεις γύρω από τον πυρήνα (τροχιακά). Τα ηλεκτρόνια ενός τροχιακού, μπορεί να είναι ζεύγη είτε ασύζευκτα (μονήρη ηλεκτρόνια). Το «ζευγάρωμα» των ηλεκτρονίων συμβάλλει στη σταθερότητά του μορίου, στη μικρότερη ενεργειακή του κατάσταση, καθιστώντας το λιγότερο δραστικό, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά των εξωτερικών τροχιακών του ατόμου είναι ασύζευκτα. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, έλκουν ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων, με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Τα άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια λέγονται *ελεύθερες ρίζες* και αλληλεπιδρουν πολύ εύκολα οξειδοαναγωγικά με γειτονικά μόρια (Rosen 1999), ενώ υπάρχουν επίσης και οι *διρίζες* όπου δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κάποια απόσταση μεταξύ τους, αλλά στο ίδιο μόριο. (Schlesier 2002)

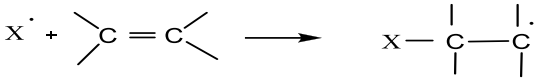
Οι κατηγορίες αντιδράσεων (Papas 1999) μέσω των οποίων δρουν οι ελεύθερες ρίζες είναι οι ακόλουθες:

Αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου οξυγόνου

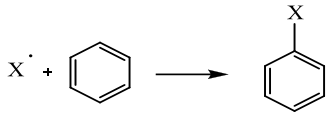
$$X^{\bullet} + RH \longrightarrow XH + R^{\bullet}$$

$$X^{\bullet} + RH \longrightarrow X^{\bullet -} + RH^{\bullet +} \longrightarrow XH + R^{\bullet}$$

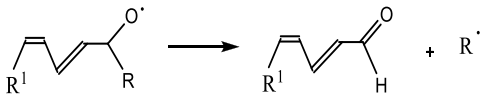
• Αντιδράσεις προσθήκης



• Αντιδράσεις αρωματικής υποκατάστασης



• Αντιδράσεις β-διαίρεσης



• Αντιδράσεις σύζευξης

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow R^{-}R$$

Κατά τις αντιδράσεις αυτές, μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι και μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. Η μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών, οφείλεται στον

πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. (Schlesier 2002)

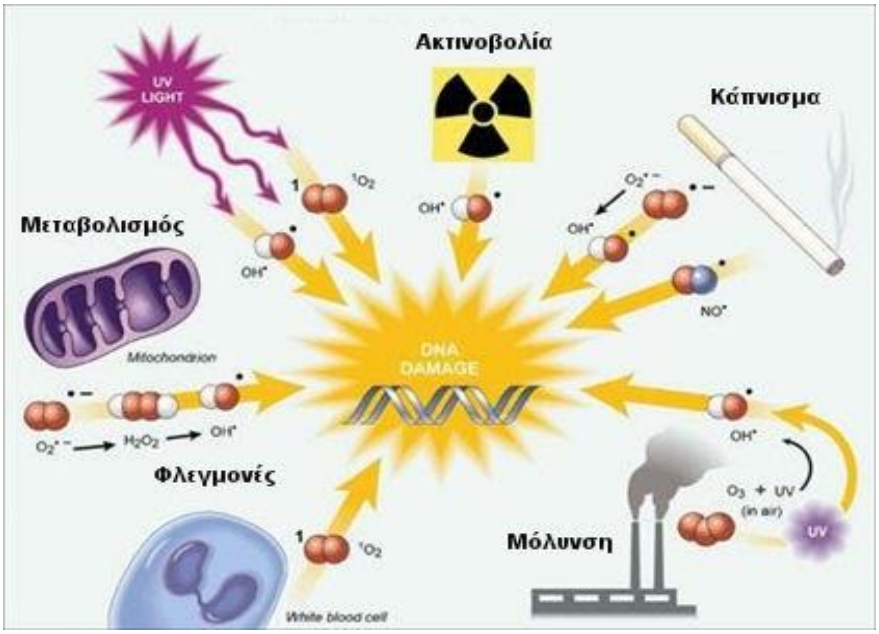
Πίνακας 1.4. Δραστικές μορφές οξυγόνου "ROS" και αζώτου "RON" (Anu-Rahal 2014)

ROS	
Ελεύθερες ρίζες	Μη ριζικά μόρια
O2• ¯ (ανιόν σουπεροξειδίου)	H2O2 (υπεροξείδιο του υδρογόνου)
HOO• (υδροϋπεροξειδική ρίζα)	ROOH (οργανικά υπεροξείδια)
OH• (ρίζα υδροξυλίου)	O2• (μονήρες οξυγόνο)
RO• (ρίζα αλκοξειδίου)	O3 (όζον)
ROO• (ρίζα υπεροξειδίου)	HClO (υποχλωριώδες οξύ)
RON	
NO2• και NO• (διοξείδιο και μονοξείδιο του αζώτου)	
ONOO¯ (υπεροξυνιτρώδες)	

1.3.2. Οξειδωτικό στρες

Η επιβλαβής επίδραση των ελεύθερων ριζών ROS και RNS που προκαλούν πιθανές βιολογικές βλάβες ονομάζεται *οξειδωτικό και νιτροζωτικό στρες,* αντίστοιχα (Ridnour 2005). Αυτό συμβαίνει όταν υπάρχει υπερβολική παραγωγή ROS / RNS και / ή ανεπάρκεια ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών. Η επίδρασή του στον οργανισμό, εξαρτάται από τον τύπο του, από την τοποθεσία και την έντασή του, από τη σύνθεση και την δραστικότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών, καθώς και από την ικανότητα των συστημάτων επισκευής (Duraˇckov´a 2007).

Οι ROS αποτελούν υποπροϊόν του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού και τα μιτοχόνδρια είναι τα κύρια κυτταρικά οργανίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ROS (Inoue 2003). Παράγουν ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης - αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγώντας στο σχηματισμό O_2· ή H_2O_2, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε άλλες ROS. Άλλες πηγές ROS μπορεί να είναι οι υπεροξυσωμικές οξειδάσες (Dvorakova 2000), τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 (Geiszt 1997), οι οξειδάσες NAD(P)H (Cheng 2001), η οξειδάση ξανθίνης (Dorsam 2000).



Εικόνα 1.1. Πηγές ελευθέρων ριζών

(http://kardiologika.blogspot.com/2013/03/blog-post_28.html n.d.)

Πίνακας 1.5. Εξωγενείς και ενδογενείς επαγωγείς του οξειδωτικού στρες

(Anu-Rahal 2014), (Groff 2000)

Εξωγενείς	**Ενδογενείς**
Κάπνισμα, περιβαλλοντική μόλυνση, όζον, ακτινοβολίες (ηλιακή, UV, ιονίζουσες), φυτοφάρμακα	Ενδογενείς μεταβολίτες (μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, μεταβολισμός κατεχολαμινών, εικοσανοειδών, οξείδωση αιμοσφαιρίνης)
Μεταπτωτικά μέταλλα, χημικά πρόσθετα	Μεταβολίτες φαρμάκων
Παθογόνα (βακτήρια, μύκητες, ιοί, παράσιτα)	Κυτταρικός μεταβολισμός
Φάρμακα - ναρκωτικά	Μεταπτωτικά μέταλλα (Fe)
Τοξίνες	Άγχος
Δίαιτα (υδατάνθρακες, λίπη, επεξεργασμένα τρόφιμα, αντιοξειδωτικά)	Παθοφυσιολογία (ισχαιμία, φαγοκύτωση)

1.3.3. Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

Σήμερα ο κόσμος αντιμετωπίζει μια έκρηξη των χρόνιων παθήσεων όπως καρδιαγγειακά, καρκίνους, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη κλπ. με τις σχετικές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και την θνησιμότητα. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) είναι

εξαιρετικά ευαίσθητο σε βλάβες από ελεύθερες ρίζες εξαιτίας της σχετικά μικρής αντιοξειδωτικής του ικανότητας.

Οι ROS που παράγονται στους ιστούς μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε μακρομόρια όπως τα λιπίδια (τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι από τους πιο εύκολους στόχους), νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες (Ballinger 2005). Οι ROS, ιδιαίτερα η ρίζα ανιονικού υπεροξειδίου ($O_2\cdot$ -), η ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$ -) και ρίζα αλκυλοπεροξυλίου (OOCR), είναι ισχυροί εκκινητές της υπεροξείδωσης λιπιδίων, ο ρόλος της οποίας είναι καλά εδραιωμένος στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Μόλις ξεκινήσει η υπεροξείδωση λιπιδίων, η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων θα λάβει χώρα μέχρι τον τερματισμό της με τα τελικά προϊόντα μαλονιοδιαλδεΰδη (MDA), 4-υδροξυ-2-εννενόλη (4-HNE), και F2-ισοπροστάνια, να συσσωρεύονται στα βιολογικά συστήματα. (Anu-Rahal 2014)

Οι βάσεις DNA είναι επίσης πολύ ευαίσθητες σε οξείδωση από τις ROS και το κυρίαρχο ανιχνεύσιμο προϊόν οξείδωσης των βάσεων του DNA in vivo είναι η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη. Η οξείδωση των βάσεων του DNA μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις και διαγραφές τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε οξειδωτική βλάβη λόγω της εγγύτητάς του με μια κύρια πηγή ROS και της ελλειμματικής ικανότητας επισκευής του σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA. Αυτές οι οξειδωτικές τροποποιήσεις, προκαλούν λειτουργικές αλλαγές σε διάφορες πρωτεΐνες (ένζυμα και δομικές), με σημαντικές φυσιολογικές επιπτώσεις. Επίσης, η οξειδοαναγωγή των παραγόντων μεταγραφής τροποποιεί την γονιδιακή έκφραση. (Anu-Rahal 2014)

Σημαντικοί δείκτες οξειδωτικού στρες θεωρούνται σήμερα, η μαλονιοδιαλδεΰδη (MDA), τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα μεταλλοένζυμα Cu, Zn-υπεροξειδική δισμουτάση (Cu, Zn-SOD), και η εξαρτώμενη από το σελήνιο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) (Singh K. 2011). Η μαλονιοδιαλδεΰδη σχηματίζεται από υπεροξειδωμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών, κυρίως από το αραχιδονικό οξύ. Η Cu, Zn-SOD είναι ένα ενδοκυτταρικό μεταλλοένζυμο που υπάρχει σε όλα αερόβια κύτταρα, που μετατρέπει το εξαιρετικά τοξικό υπεροξείδιο στο λιγότερο τοξικό H_2O_2. Η δραστηριότητά του εξαρτάται από τον ελεύθερο χαλκό και τα αποθέματα ψευδαργύρου στους ιστούς. Η GSHPx, είναι ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο, που μεταβολίζει το H_2O_2 και τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων. (Anu-Rahal 2014)

1.3.3.1. Οξειδωτικό στρες και διαταραχές του ανοσοποιητικού

Η σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και ανοσολογικής λειτουργίας είναι καλά εδραιωμένη. Οι ROS και RNS διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη δολοφονία παθογόνων παραγόντων. Τα εξειδικευμένα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ετερόφιλα), καθώς και τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, περιέχουν το ένζυμο NADPH οξειδάση (Babior 1999), το οποίο αυξάνει την παραγωγή ROS μετά από ανοσολογική πρόκληση, για την εμφάνιση ανοσολογικής απόκρισης, με αποτέλεσμα τα φαγοκύτταρα να αυξάνουν την πρόσληψη οξυγόνου έως και 10-20 φορές (αναπνευστική έκρηξη). Το O·- που παράγεται από αυτό το ένζυμο, χρησιμεύει ως αρχικό υλικό για την παραγωγή μιας σειράς αντιδρώντων ειδών όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ (HOOI), υπεροξυνιτρίτης (ONOO-) και ενδεχομένως υδροξύλιο (OH·) και όζον (O_3), παρόλο που η χρήση τους στην κυτταροτοξική απόκριση των φαγοκυττάρων βλάπτει επίσης και τους ιστούς του ξενιστή (Rice-Evans 1995).

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την αλληλεξάρτηση του οξειδωτικού στρες, του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής. Η αυξημένη έκφραση του NO έχει τεκμηριωθεί στο δάγκειο πυρετό και σε καλλιέργειες μολυσμένων κυττάρων με διαφορετικούς ιούς, η οποία συνοδεύεται με αύξηση στους οξειδωτικούς δείκτες όπως της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και με αλλοιωμένη ενζυματική και μη-ενζυματική αντιοξειδωτική απόκριση (Valero 2013).

Επιπλέον, φαίνεται ότι η μειωμένη NADPH οξειδάση που υπάρχει στους κόκκους της γύρης μπορεί να επάγει το οξειδωτικό στρες στον αεραγωγό και να προκαλέσει αλλεργική φλεγμονή με ενεργοποίηση της παραγωγής ιντερλευκίνης (IL)-8 μαζί με προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF)-a και IL-6 (Csillag 2010).

Οι μοιραίες ιογενείς και βακτηριακές ασθένειες, προκαλούν έντονο οξειδωτικό στρες (OS) που οδηγεί σε σοβαρή κυτταρική βλάβη. Ωστόσο, η έναρξη, η πρόοδος και η μείωση των βλαβών διέπεται από την ισορροπία της οξείδωσης και της αντιοξείδωσης. Το μονοπάτι της παθογένειας για την καταστροφή των κυττάρων περνά μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, ιδιαιτέρως στα μικροσώματα, στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο λόγω του OS και των ελεύθερων ριζών (Stehbens 2004).

1.3.3.2. Οξειδωτικό στρες και συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ROS, που μπορούν να τροποποιήσουν τις πρωτεΐνες. Μεταβολές στα αυτοαντιγόνα (δηλ. τροποποιημένες

πρωτεΐνες) μπορεί να προκαλέσουν τη διαδικασία της αυτοάνοσης ασθένειας (Abu-Shakra 1991). Υπό οξειδωτικό στρες, τα κύτταρα μπορεί να παράγουν περίσσεια ROS / RNS που αντιδρούν και τροποποιούν τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες στο κύτταρο (Dalle-Donne 2005). Τα τελικά προϊόντα αυτών των αντιδράσεων μπορεί να είναι μόρια όπως η 3-χλωροθυροσίνη και 3-νιτροτυροσίνη, που μπορεί όχι μόνο να παρεμποδίζουν τους φυσικούς μετασχηματισμούς της τυροσίνης όπως την φωσφορυλίωση, αλλά επίσης και να αλλάξουν το αντιγονικό προφίλ της πρωτεΐνης (Allison 2000).

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα αυτοάνοσων ασθενειών που προκύπτουν από οξειδωτικές τροποποιήσεις των αυτο-πρωτεϊνών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος) (Trigwell 2001) και διάχυτο σκληρόδερμα (οξείδωση της β-2-γλυκοπρωτεΐνης) (Casciola-Rosen 1997). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες δημιουργεί μια πρόσθετη απειλή τους ιστούς - στόχους όπως στα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans που παράγουν ινσουλίνη (Gandy 1982).

Στην παθογένεση της αυτοάνοσης νόσου, πιθανός είναι και ο ρόλος του ψυχολογικού στρες, με τα υψηλά επίπεδα ορμονών του στρες που προκαλούν δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού με αύξηση της παραγωγής κυτοκινών (Stojanovich 2010).

1.3.3.3. Οξειδωτικό στρες και μειωμένη ευαισθησία σε λοιμώξεις

Όλα τα παθογόνα (βακτήρια, ιοί, παράσιτα), με μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα δείχνουν αυξημένη ευαισθησία στη φαγοκυττάρωση, γεγονός που υποδεικνύει έναν μικροβιοκτόνο ρόλο των ROS (Halliwell B 2007). Αντίθετα με αυτό, διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα άτομα με ανεπαρκή αντιοξειδωτικό μηχανισμό είναι πιο ευάλωτα σε σοβαρές λοιμώξεις όπως από τον ιό HIV (Nathan 2000), ενώ η χρόνια φλεγμονή, μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη των ιστών με μια επακόλουθη έκρηξη οξειδωτικού στρες (Sorci 2009).

Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων και της επίδρασης των κυτταρικών προϊόντων των παθογόνων με συγκεκριμένους υποδοχείς η φλαβοπρωτεΐνη NADPH οξειδάση παίζει ζωτικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες, καταλύοντας την υπερβολική παραγωγή ROS, οδηγώντας σε κυτταρικές βλάβες που οδηγούν σε μείωση της ανοσολογικής απόκρισης στις μικροβιακές μολύνσεις (Puertollano 2011).

Πίνακας 1.6. Θανάσιμες ασθένειες που έχουν θετική συσχέτιση με το οξειδωτικό στρες (Anu-Rahal 2014)

Ασθένεια	**Όργανα που εμπλέκονται**	**Αιτιολογία**	**Αναφορές**
Εκφύλιση ωχράς κηλίδας	Μάτια	Ενδιάμεσα αντιδραστικού οξυγόνου (ROI)	(Beatty 2000)
Διαβήτης	Πολυοργανική	Υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, γλουταθειόνη αναγωγάση και υπεροξειδάση	(Maritim 2003)
Χρόνια κόπωση	Πολυοργανική	C - αντιδρώσα πρωτεΐνη	(Fulle 2007)
Αθηροσκλήρωση	Αιμοφόρα αγγεία	Μειωμένη δραστικότητα NADPH οξειδάσης	(Singh U. 2006)
Αυτοάνοσα (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος)	Ανοσοποιητικό σύστημα	R_0 ριβονουκλεοπρωτεΐνη	(Scofield 2005)
Νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson)	Εγκέφαλος	Είδη αντιδραστικού οξυγόνου (ROS)	(Uttara 2009)
Άσθμα	Πνεύμονες	ROS ιδιαίτερα H_2O_2	(Cho 2010)
Ρευματοειδής, οστεοαρθρίτιδα	Αρθρώσεις	Είδη ριζών οξυγόνου	(Blackburn 2011)
Νεφρίτιδα	Νεφροί	Γλουταθειονη τρανσφεράση Κ (GSTK 1-1)	(Ziskoven 2010)
Μελάνωμα	Δέρμα	Παθοφυσιολογικές διεργασίες: βλάβη DNA, υπεροξείδωση λιπιδίων	(Sander 2003)
Έμφραγμα μυοκαρδίου	Καρδιά	Αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS)	(Filippo 2006)

1.3.3.4. Οξειδωτικό στρες και αύξηση του επιπολασμού διαφόρων κακοηθειών

Η καρκινογένεση μπορεί να οριστεί ως προοδευτική διαταραχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πολλαπλής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης βιολογικών δραστηριοτήτων του ξενιστή (ανοσοποιητικών και μη), με προοδευτική απώλεια της ακεραιότητας των ευαίσθητων ιστών. Οι πρωταρχικές φάσεις στην ανάπτυξη του καρκίνου, της μετάλλαξης και της γήρανσης είναι αποτέλεσμα της οξειδωτικής βλάβης στο DNA του κυττάρου. Σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν λόγω των βλαβών των ROS στο DNA με το σπάσιμο

της έλικας και από αλλαγές στους δακτυλίους των πουρινών ή πυριμιδινών (Valko 2006), (Aw-Tak 1999). Μαζί με τις ROS τα οξειδοαναγωγικά προϊόντα διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γήρανσης, της μετάλλαξης και των όγκων (Leonard 2004).

Στον κανονικό κυτταρικό μηχανισμό, οι ROS εξουδετερώνονται από τις βιταμίνες Ε, C και τη γλουταθειόνη, με ένζυμα όπως η καταλάση, οι υπεροξειδάσες και η υπεροξειδική δισμουτάση και έτσι ελέγχεται ο μηχανισμός της επισκευής του DNA. Ακανόνιστη επισκευή ή απουσία επισκευής βλαβών του DNA λόγω οξειδωτικού στρες (OS) μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαξιογένεση και καρκινογέννεση (Kryston 2011).

Το OS που εκλύεται εξαιτίας ανεπίλυτων και επίμονων φλεγμονών μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται στην αλλαγή της δυναμικής των ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να δημιουργήσουν ένα ανοσολογικό χάος που θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια της αρχιτεκτονικής ακεραιότητας των κυττάρων και των ιστών, οδηγώντας τελικά σε χρόνιες παθήσεις ή καρκίνους (Khatami 2011).

Το OS αναφέρεται ως αίτιο επαγωγής αλλεργιών, αυτοάνοσων ή νευροεκφυλιστικών ασθενειών μαζί με αλλοιωμένη κυτταρική ανάπτυξη, χρόνιες λοιμώξεις που οδηγούν σε νεοπλασία, μεταστατικό καρκίνο και αγγειογένεση (O'Brien 2008). Βλάβη σε κυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, γονίδια και αγγεία είναι πίσω από τέτοιες αλλαγές. Η νέκρωση του ιστού και η κυτταρική ανάπτυξη διεγείρονται με συν-έκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών λόγω του επαγόμενου OS, μεταβάλλοντας τη δραστηριότητα του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα τις αυτοάνοσες, νευροεκφυλιστικές και καρκινικές παθήσεις (Zhang 2010).

Διάφοροι παράγοντες που παράγονται λόγω του OS, όπως αποπτωτικοί παράγοντες τύπου TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων), πρωτεάσες, ROSs και κινάσες, συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των όγκων και απαιτούνται για την αποικοδόμηση της μεμβράνης, την εισβολή τους γειτονικούς ιστούς και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω των αγγείων και της λέμφου για τη μετάσταση (Davalos 2010).

Επίμονο OS λόγω φλεγμονής προδιαθέτει για γενετικές μεταλλάξεις, επιγενετικές ανωμαλίες, κακή κωδικοποίηση του γονιδιώματος και κακή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Babbar 2011). Γεγονότα όπως η μεθυλίωση των νουκλεϊνικών οξέων, η δέσμευση των πρωτεϊνών του DNA, ο σχηματισμός, η δέσμευση ιστόνης και η λειτουργία αποκατάστασης είναι ευαίσθητες στο OS (Shames 2007). Αυτά τα γεγονότα εμπλέκονται σε επιγενετική τροποποίηση και η οδος τελομερούς - τελομεράσης μπορεί να προκαλέσει

μεταλλάξεις των κατασταλτικών γονιδίων (Aubert 2008), αλλοιώνοντας τη σωματική συντήρηση - επισκευή, τον πολλαπλασιαστικό έλεγχο και την έκφραση των γονιδίων, οδηγώντας σε πολυμορφισμό και μείωση του μεγέθους των τελομερών (Zingg 2008).

1.3.3.5. Οξειδωτικό στρες και γήρανση

Η γήρανση αναφέρεται ως η προοδευτική έκπτωση των βιολογικών λειτουργιών των ιστών σε σχέση με το χρόνο, η μείωση της προσαρμοστικότητας σε διαφορετικά είδη στρες καθώς και η αύξηση της ευαισθησίας σε ασθένειες (Kregel 2007).

Οι δύο πιο σημαντικές θεωρίες σχετικά με τη γήρανση που έχουν αντέξει στη δοκιμασία του χρόνου είναι οι ελεύθερες ρίζες και η μιτοχονδριακή θεωρία. Έτσι, πιστεύεται ότι ένας φαύλος κύκλος δημιουργείται στα μιτοχόνδρια όπου οι ROS παράγονται σε αυξημένη ποσότητα αυξάνοντας έτσι το μέγεθος της βλάβης (Romano 2010). Το οξειδωτικό στρες υφίσταται σε επίπεδο γενετικό, μοριακό, κυτταρικό, ιστών και συστημάτων όλων των ζωντανών όντων και συνήθως εκδηλώνεται ως προοδευτική συσσώρευση ποικίλων επιβλαβών αλλαγών στα κύτταρα σε προχωρημένη ηλικία που αυξάνουν τον κίνδυνο ασθένειας και θανάτου (Harman 2001). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι με την ηλικία, οι ROS συσσωρεύονται σε μεγάλα συστήματα οργάνων, όπως στο ήπαρ, την καρδιά, τον εγκέφαλο και τους σκελετικούς μυς (Bejma 2000) και αυτό οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή τους ή στη μειωμένη αποτοξίνωση.

Η θεωρία του οξειδωτικού στρες είναι σήμερα η πιο αποδεκτή εξήγηση για τη γήρανση και πρεσβεύει ότι οι αυξήσεις των ROS οδηγούν σε λειτουργικές μεταβολές, παθολογικές καταστάσεις, στη γήρανση και τέλος στο θάνατο (Hagen 2003).

Δεν έχει σημασία αν πρόκειται για βλάβη μιτοχονδριακού DNA ή αν η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι υπεύθυνη για τη γήρανση, τη διαφοροποίηση της απόκρισης του κυτταρικού σήματος στο στρες ή την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων που είναι ευαίσθητοι στην οξειδοαναγωγή. Αναλογικά με την ηλικία το OS προκαλεί την προφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση, οδηγώντας τελικά σε αύξηση των ROS (Kregel 2007).

1.3.4. Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού

Για να εξουδετερωθούν οι ROS, το κύτταρο έχει εξελίξει ορισμένες στρατηγικές, για την πρόληψη της βλάβης, μηχανισμούς επισκευής για την αποκατάσταση των οξειδωτικών βλαβών και κυρίως τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που με βάση τη θεωρία των ελευθέρων ριζών, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες.

Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού, περιλαμβάνουν ένα σύνολο ενζυμικών και μη-ενζυμικών μορίων αντιοξειδωτικών, που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια. Σε ευκαρυωτικά κύτταρα, αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάσες, ενεργοποιούν έναν πολύπλοκο καταρράκτη αντιδράσεων για την μετατροπή των ROS σε πιο σταθερά μόρια, όπως νερό και O_2. (Anu-Rahal 2014)

Εκτός από τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα, ένας μεγάλος αριθμός δευτερευόντων ενζύμων ενεργοποιείται οξειδοαναγωγικά από αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους όπως: γλουταθειόνη, βιταμίνες Ε, C και ιχνοστοιχεία όπως το σελήνιο, που επίσης λειτουργούν ως άμεσοι σαρωτές των ROS. Αυτά τα ενζυμικά και μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής, διατηρώντας την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, ελαχιστοποιώντας έτσι τις κυτταρικές βλάβες από τις ROS (Dura˘ckov´a 2010).

Πίνακας 1.7. Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους (Anu-Rahal 2014), (Μπόσκος 2004)

Ενδογενή αντιοξειδωτικά υψηλού Μ.Β.	**Εξωγενή αντιοξειδωτικά χαμηλού Μ.Β.**
υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση	βιταμίνες A, B1, B2, B5, B6, C, E, καροτενοειδή
υπεροξειδάση και S - τρανσφεράση της γλουταθειόνης	λιποϊκό οξύ, ινοσιτόλη, ουμπικινόνη, συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA)
λευκωματίνη	γλουταθειόνη
τρανσφερίνη, μεταλλοθειονίνη	κυστεϊνη, κυστίνη, ταυρίνη, τυροσίνη, (L-DOPA)
διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA)	ορισμένες κινόνες
μελατονίνη, μελανίνη	π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA)
πρωτεάσωμα	πολυφαινόλες
Ενδογενή αντιοξειδωτικά χαμηλού Μ.Β.	κιτρικό οξύ, φυτικό οξύ
ουρικό οξύ, χολερυθρίνη	σελήνιο

Κυρίαρχο ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού παίζουν η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες Ε, C και οι πολυφαινόλες.

Η *γλουταθειόνη*, είναι ένα ενδογενές πεπτίδιο και αποτελεί συνένζυμο του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, το οποίο εκτός της άμεσης σάρωσης ROS ανακυκλώνει τις βιταμίνες Ε και C (Leeuwenburgh 2001).

Η *βιταμίνη Ε,* είναι λιποδιαλυτή και αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και άλλων πλούσιων σε λιπίδια δομών, όπως τα μιτοχόνδρια

και το σαρκοπλασματικό δίκτυο, αποτρέποντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Ji 2006) και διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μετατροπή του υπεροξειδίου, του υδροξυλίου και των υπεροξυλικών ριζών των λιπιδίων σε λιγότερο δραστικές μορφές (Michailidis 2013).

Η *βιταμίνη C,* είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, που εξουδετερώνει άμεσα το υπεροξείδιο, το υδροξύλιο και τις υδρουπεροξειδικές ρίζες των λιπιδίων. Επίσης, ανακυκλώνει την βιταμίνη Ε (Kojo 2004) και ελέγχει την παραγωγή των ROS στα ουδετερόφιλα (Dwenger 1992).

Οι δε *πολυφαινόλες* (αναλύονται στην ενότητα των φυτοχημικών), έχουν λάβει μεγάλη προσοχή τις τελευταίες δύο δεκαετίες, για τον σύνθετο και πολλά υποσχόμενο βιολογικό τους ρόλο, ως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά και αντι-αποπτωτικά - διαμορφωτικά μόρια (Laughton 1991).

1.3.5. Τοξικότητα αντιοξειδωτικών

Το συντριπτικά μεγαλύτερο κομμάτι της έρευνας στον τομέα των αντιοξειδωτικών, εστιάζεται στις επωφελείς επιδράσεις των αντιοξειδωτικών, ενώ οι έρευνες σχετικά με την τοξικότητά τους είναι συγκριτικά ελάχιστες. Αυτό είναι κυρίως αποτέλεσμα μιας γενικής πεποίθησης ότι τα φυτικά προϊόντα είναι ασφαλή, κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει σε κατάχρηση αντιοξειδωτικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. Αυτό θορύβησε τους τοξικολόγους, που προειδοποίησαν πρόσφατα για την παρενέργειες και τους κινδύνους τοξικότητας των φυσικών προϊόντων και ιδίως για τα φυτικά αντιοξειδωτικά (Bast A. 2003).

Για να διαπιστωθεί η ασφάλεια των αντιοξειδωτικών, θα πρέπει προηγουμένως να απαντηθούν τα παρακάτω ερωτήματα: Ποιά είναι τα αποτελέσματα της υπερκατανάλωσης αντιοξειδωτικών - συμπληρωμάτων και η σχέση αλληλεπίδρασής τους με άλλα μικροθρεπτικά συστατικά; Ποιά είναι η απορρόφηση, η βιοδιαθεσιμότητα και η τύχη των αντιοξειδωτικών και των μεταβολιτών τους; Ποιά είναι η επίδραση των στομαχικών οξέων στις χημικές δομές και στην δραστικότητά τους; (Ashwell 2010)

Σήμερα πλέον, υπάρχει σημαντική αβεβαιότητα σχετικά με τις αρνητικές επιπτώσεις των αντιοξειδωτικών. Σύμφωνα με τον (Urso 2003), τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών, θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στην ανάνηψη από άσκηση που προκαλεί βλάβη στους μυς. Τα ευρήματα αυτά ήρθαν σε αντίθεση με παρόμοια μελέτη (Jakeman 1993) που διαπίστωσε ότι το συμπλήρωμα βιταμίνης C πριν από την άσκηση, οδήγησε σε ταχύτερη ανάκτηση της μυϊκής δύναμης.

Πίνακας 1.8. Διαφορετικές κατηγορίες προ-οξειδωτικών και ο κοινός μηχανισμός τους για την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες (Anu-Rahal 2014)

Κλάση	**Παραδείγματα**	**Μηχανισμός**
Φάρμακα	Παρακεταμόλη, μεθοτρεξάτη	Δημιουργία ROS που οδηγούν σε αλλοιώσεις μακρομορίων που μπορούν να βλάψουν θανάσιμα τους ιστούς κυρίως του ήπατος και των νεφρών
Μεταπτωτικά μέταλλα	Mg, Fe, Cu	Δημιουργία ROS από υψηλές λήψεις Mg, αιμοχρωμάτωση λόγω Fe, ασθένεια Wilson λόγω Cu
Φυτοφάρμακα	BHC, DDT κ.α	Διέγερση παραγωγής ROS, επαγωγή υπεροξείδωσης λιπιδίων, μεταβολές αντιοξειδωτικών ενζύμων και γλουταθειόνης
Φυσική άσκηση	Τρέξιμο, άρση βαρών	Η σύσπαση των μυών προκαλεί την παραγωγή ROS. Η σκληρή άσκηση οδηγεί σε υπερβολικές ROS
Ψυχικό άγχος	Ένταση, ανησυχία	Η ανισορροπία στο σύστημα οξειδοαναγωγής παίζει ρόλο σε: νευροφλεγμονή, νευροεκφυλισμό, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, αλλοιωμένη νευρωνική σηματοδότηση, αναστολή της νευρογένεσης
Παθοφυσιολογία	Τοπική ισχαιμία	Αυξάνει την παραγωγή ROS
Περιβαλλοντικοί παράγοντες	Ακραίες καιρικές συνθήκες (ζέστη, ψύχος)	Κατά την προσαρμογή, μειώνεται η ρευστότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και διακόπτεται η μεταφορά ηλεκτρονίων, αυξάνοντας την παραγωγή ROS
Αντιοξειδωτικά	βιταμίνη C, E, πολυφαινόλες	Ενεργούν ως προοξειδωτικά υπό ορισμένες συνθήκες, π.χ. βαρέα μέταλλα

Οι υψηλές λήψεις *βιταμίνης Ε,* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα με την πήξη του αίματος (Kappus 1992). Ο (Van-Haaften 2001), ανέφερε ότι η βιταμίνη Ε και πολλοί από τους εστέρες της, αναστέλλουν την S-τρανσφεράση P 1-1 της γλουταθειόνης (GST P 1-1).

Αναφορές υπάρχουν και για την προ-οξειδωτική δράση των βιταμινών C και E, η οποία προκαλείται από την επίδρασή τους με κάποια μεταπτωτικά μέταλλα, προκαλώντας τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών, οι οποίες σχετίζονται με θανατηφόρα εμφράγματα του μυοκαρδίου που παρατηρήθηκαν σε κλινική μελέτη με συμπληρώματα βιταμίνης Ε (Bast A. 2003), (Kappus 1992).

Ο (Bast A. 2003) ανέφερε ότι οι κινόνες, μεταβολίτες που παράγονται όταν η βιταμίνη Ε ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση, είναι έντονα κυτταροτοξικές, λόγω της

προκαλούμενης παραγωγής ριζών οξυγόνου, της οξείδωσης κυτταρικών στοιχείων και του σχηματισμού ενώσεων προσθήκης με κυτταρικές θειόλες.

Το *β-καροτένιο* (προ-βιταμίνη Α), σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου στους καπνιστές και σε εργαζόμενους εκτεθειμένους στον αμίαντο (Pryor 2000) και αυτό αποδίδεται στο ότι είναι αποτελεσματική ως αντιοξειδωτικό μόνο σε χαμηλή τάση O_2, ενώ σε υψηλές τάσεις μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση των λιπιδίων (Bast 1998). Επίσης οι ασταθείς οξειδωμένοι μεταβολίτες της β-καροτίνης προάγουν την καρκινογένεση μέσω της καταστροφής του DNA ή επηρεάζοντας ένζυμα του κυτοχρώματος P450, που προάγουν την ενεργοποίηση καρκινογόνων μέσω άλλων ξενοβιοτικών μεταβολιτών (Paolini 1999).

Πέραν της αντιοξειδωτικής του δράσης, το *διυδρολιποϊκό οξύ*, ένας μεταβολίτης του λιποϊκού οξέος, μπορεί επίσης δράσει ως προ-οξειδωτικό, με την μεσολάβηση μεταπτωτικών μετάλλων (Bast A. 2003). Η βιοσύνθεση του λιποϊκού οξέος γίνεται από λιπαρά οξέα και αφθονεί στο κρέας και στο συκώτι. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, λειτουργεί ως συνένζυμο συνδεόμενο με την λυσίνη των συμπλοκών του πολυενζύμου αφυδρογονάσης (Biewenga 1997), μεσολαβώντας στις αντιδράσεις δέσμευσης και μεταφοράς ακυλικών ομάδων, συμμετέχοντας στον σχηματισμό του NADH. Το λιποϊκό οξύ και ο μεταβολίτης του διϋδρολιποϊκό οξύ, λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικό ζεύγος, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα της αφυδρογονάσης στο NAD^+ (Bast A. 2003).

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξαν αναφορές για πιθανή τοξικότητα ορισμένων πολυφαινολών.

Τα *φλαβονοειδή* έχει αναφερθεί ότι λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά (Halliwell 2008) και μεταλλαξιογόνα in vitro όταν μεταπτωτικά μέταλλα είναι διαθέσιμα (Cherubini 2005). Η αντιοξειδωτική τους δράση και η οφειλόμενη από τον χαλκό προ-οξειδωτική δράση τους εξαρτώνται από τη δομή τους, με τον αριθμό των ελεύθερων OH να αυξάνουν την αντιοξειδωτική και την προοξειδωτική τους δράση (Guohua 1997). Η φλαβόνη και φλαβανόνη, που δεν φέρουν OH, δεν παρουσιάζουν ούτε αντιοξειδωτική ούτε προοξειδωτική δράση με τον χαλκό. Επίσης, έχει αναφερθεί ισχυρότερη ικανότητα σάρωσης υπεροξειδίου σε φλαβονοειδή με υψηλότερους βαθμούς πολυμερισμού (Scalbert 2000).

Η μεθυλίωση και πιθανώς και άλλες τροποποιήσεις των υποκαταστατών του OH των φλαβονοειδών καταργούν την αντιοξειδωτική αλλά και την προ-οξειδωτική τους δράση. Έτσι, η αντιοξειδωτική δράση της κουρσετίνης στην υπεροξείδωση των λιπιδίων από ROS, είναι υψηλότερη από αυτή των μονογλυκοσιδών (Ioku 1995), ενώ η λουτεολίνη είναι σημαντικά ισχυρότερη από τους δύο γλυκοζίτες (Igile 1994).

Αν και η προστασία που παρέχεται από τα φρούτα και τα λαχανικά σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιοπάθειες, έχει αποδοθεί στα διάφορα αντιοξειδωτικά, όπως τα φλαβονοειδή, κάποια από αυτά όπως η κερκετίνη και η καμπφερόλη, προκαλούν βλάβες στο DNA και υπεροξείδωση λιπιδίων παρουσία μεταπτωτικών μετάλλων, η πρόληψη όμως της επαγόμενης από τον σίδηρο υπεροξείδωσης των λιπιδίων των ηπατοκυττάρων από φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, είναι κοινώς παραδεκτή (Sinsch 1992), (Weiss 1994).

Αξιοσημείωτη βλάβη παρατηρήθηκε στο DNA του σπλήνα ποντικών μετά από υψηλές λήψεις κατεχίνης (Fan 2004). Επίσης, τα εκχυλίσματα σταφυλιών όπως και ένα μίγμα καφεϊκού οξέος, γαλλικού οξέος και ένυδρης ρουτίνης, σε συγκέντρωση από 75-300 μg/mL, φαίνεται ότι προάγουν την μιτομυκίνη C που προκαλεί ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (Stagos D. 2007). Αρνητικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν και σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων μετά από έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση επικατεχίνης για 24 ώρες ή περισσότερο, ενώ μεγαλύτερη τοξικότητα παρατηρήθηκε σε ενώσεις με μια γαλλική ομάδα από ότι χωρίς τη γαλλική ομάδα (Ugartondo 2006).

Το *καφεϊκό οξύ,* μπορεί επίσης να δράσει ως προ-οξειδωτικό, ιδίως τα προϊόντα αποσύνθεσής του, κάποια εξαιρετικά αντιδραστικά κατιόντα που προκύπτουν κατά τη θερμική του επεξεργασία. (Andueza 2009).

Συμπερασματικά, θετικές επιδράσεις θα μπορούσαμε να έχουμε από τις πολυφαινόλες σε ασφαλές εύρος συγκεντρώσεων. Εκτός από τη συγκέντρωση κρίσιμοι παράγοντες θεωρούνται η συνέργεια και ο χρόνος έκθεσης. Συνεπώς, η δόση και η σύνθεση των πολυφαινολών για ασφαλή και υγιή εφαρμογή, θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω (Fu 2011).

Άλλες αρνητικές επιδράσεις των εξωγενών αντιοξειδωτικών γενικότερα, περιλαμβάνουν την απορύθμιση των ενδογενών αντιοξειδωτικών, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, πιθανή αύξηση των μικροβιακών βλαβών ή των φυσιολογικών κυτταρικών προστατευτικών αποκρίσεων των ιστών σε βλάβες. (Ashwell 2010)

Τα συμπληρώματα με υψηλές δόσεις αντιοξειδωτικών, γενικά δεν προτείνονται και προφανώς μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στην ανθρώπινη υγεία, ενώ σε μικρές δόσεις μπορούν κάποιες φορές να έχουν θετική επίδραση, αλλά καλό είναι να συνιστώνται κυρίως σε υποσιτιζόμενους πληθυσμούς (Gutteridge 2010).

1.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων και ο προσδιορισμός της

1.4.1. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Παρά την έκρηξη στη δημοτικότητα των ερευνών πάνω στα αντιοξειδωτικά, η έλλειψη μιας ενιαία καθολικά αποδεκτής μεθόδου μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, που να είναι ευρέως εφαρμοστέα από τους ερευνητές και τη βιομηχανία αποτελεί μεγάλη πρόκληση (Huang 2005), (Prior 2005).

Διάφορες χημικές δοκιμασίες in vitro έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε βιολογικά δείγματα - τρόφιμα. Η αναγκαιότητά τους οφείλεται στη δυσκολία μέτρησης του κάθε αντιοξειδωτικού ξεχωριστά και στις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων αντιοξειδωτικών λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων. (Rixao 2007)

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρέπει να τυποποιηθεί σε 4 στάδια σύμφωνα με τον (Becker 2004):

(1) προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων, (2) προσδιορισμός της ριζικής ικανότητας απορρόφησης και της ενδεχόμενης μείωσής της λόγω του διαλύτη. (3) αξιολόγηση της ικανότητας αναστολής ή παύσης της οξείδωσης των λιπιδίων σε μοντέλα βιολογικών συστημάτων και (4) μελέτες με χρήση πραγματικών αντιοξειδωτικών ενσωματωμένων σε τρόφιμα ή με μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους χρησιμοποιώντας σχετικούς βιοδείκτες.

Οι μηχανισμοί αντίδρασης των προσδιορισμών της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος βασίζονται κυρίως στην μέτρηση προϊόντων αντιδράσεων μεταφοράς:

α) υδρογόνου (HAT), β) ηλεκτρονίων (SET) και γ) υδρογόνου και ηλεκτρονίων ταυτόχρονα. (Huang 2005), (Prior 2005)

Οι αναλύσεις που βασίζονται σε μηχανισμούς HAT μετράνε την ανταγωνιστική κινητική και αποτελούνται από μια γεννήτρια συνθετικών ριζών, έναν οξειδώσιμο μοριακό ανιχνευτή και το αντιοξειδωτικό. Επειδή η μεταφορά ατόμων υδρογόνου αποτελεί βασικό βήμα στην ριζική αλυσίδα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε HAT σχετίζονται καλύτερα με την αντιοξειδωτική ικανότητα ριζικής αλυσίδας.

Απεναντίας, οι δοκιμές που βασίζονται σε SET περιλαμβάνουν μία οξειδοαναγωγική αντίδραση, όπου το οξειδωτικό είναι ο ανιχνευτής για την παρακολούθηση της αντίδρασης. Οι δοκιμές που βασίζονται σε μεταφορά μεμονωμένου ηλεκτρονίου περιλαμβάνουν δύο

αντιδρώντα, το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό (ανιχνευτής) ακολουθώντας τη σχέση: *Ανιχνευτής (οξειδωτικό) + e (από αντιοξειδωτικό) → μείωση ανιχνευτή + οξειδωμένο αντιοξειδωτικό*. Η μεταβολή του χρώματος στην εξέταση συμβαίνει όταν αφαιρείται ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό, ενώ ο βαθμός αλλαγής χρώματος είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο δείγμα. Το τέλος της αντίδρασης σηματοδοτείται όταν σταματήσει η αλλαγή του χρώματος (Huang 2005).

Οι κύριες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση τους μηχανισμούς αντίδρασης ταξινομούνται ως εξής:

α) SET: Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, FRAP.

β) HAT: ORAC, μοντέλο β-καροτίνης / λινολεϊκού οξέος και αναστολής της υπεροξείδωσης φωσφολιπιδίων. (Huang 2005)

Σύμφωνα με τον (Prior 2005) οι μέθοδοι DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu, χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς αντίδρασης SET και HAT, αν και βασίζονται κυρίως στην μεταφορά ηλεκτρονίων.

Παρακάτω, αναφέρονται συνοπτικά *μερικές από τις σπουδαιότερες μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας*: (Rixao 2007)

Η αντίδραση των αντιοξειδωτικών με *ABTS, DPPH* (σταθερές έγχρωμες ελεύθερες ρίζες), οι οποίες αποχρωματίζονται, χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθαρών ενώσεων, συστατικών τροφίμων και κυτταρικών εκχυλισμάτων. (Packer 1999)

Η μέθοδος *ORAC* (Oxygen Radical Absorbance Capacity / Ικανότητα Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου) βασίζεται στην μείωση του φθορισμού των φυκοερυθρινών, με την προσθήκη ελευθέρων ριζών, η δράση των οποίων αναστέλλεται από τα αντιοξειδωτικά.

Η μέθοδος *EPR* (Electron Paramagnetic Resonance / Παραμαγνητικός Συντονισμός Ηλεκτρονίων), βασίζεται στην ελάττωση του σήματος EPR συγκεκριμένων ελευθέρων ριζών, μετά την αντίδραση τους με το αντιοξειδωτικό, παρουσία μιας παγίδας σπιν.

Η μέθοδος *FRAP* (Ferric Reducing Antioxidant Power / Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου), βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου του Fe^{+++} προς Fe^{++} από το αντιοξειδωτικό προς ένα προϊόν κυανού χρώματος.

Η μέθοδος *TRAP* (Total Peroxyl Radical - Trapping Potential / Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου), βασίζεται στην αντίδραση ελευθέρων ριζών

υπεροξειδίου με λουμινόλη, δίνοντας μία ρίζα η οποία εκπέμπει φως (χημειοφωταύγεια), η οποία μειώνεται παρουσία αντιοξειδωτικών. (Packer 1999)

1.4.2. Εισαγωγή στη φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού

Η απορρόφηση ακτινοβολιών, όπως της υπεριώδους (UV) και της ορατής από τα μόρια μιας ουσίας, οφείλεται σε ηλεκτρονικές διεγέρσεις όπου τα ηλεκτρόνια χωρίς να αλλάζουν ηλεκτρονική στοιβάδα, μεταπίπτουν σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση.
Οι κυριότερες διεγέρσεις ηλεκτρονίων πού συμβαίνουν στα μόρια των οργανικών μορίων είναι: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\eta \rightarrow \sigma^*$ *και* $\eta \rightarrow \pi^*$. Οι διεγέρσεις αυτές παρατηρούνται στο UV φάσμα. Σε μόρια με εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα, παρατηρούνται μετατοπίσεις διεγέρσεων σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ακόμα και στην ορατή περιοχή τού φάσματος.
Η απορρόφηση της UV ακτινοβολίας από διαλύματα ανόργανων ενώσεων οφείλεται κυρίως σε διεγέρσεις μεταφοράς φορτίου. Αντιθέτως, η απορρόφηση του ορατού φάσματος της ακτινοβολίας οφείλεται σε διεγέρσεις των d και f ηλεκτρονίων των μεταβατικών στοιχείων. Οι άχρωμες οργανικές ή ανόργανες ενώσεις, που δεν απορροφούν στην ορατή περιοχή του φάσματος, θα μπορούσαν να μετατραπούν σε έγχρωμες, με χημικές αντιδράσεις, όπως οξείδωση, σχηματισμός συμπλόκων κ.α. Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις συνοδεύονται από διεγέρσεις δονήσεως και περιστροφής των μορίων και από διάφορες επιδράσεις των μορίων τού διαλύτη. Έτσι, τα μοριακά φάσματα απορρόφησης έχουν την μορφή ταινιών, σε αντίθεση με τα ατομικά φάσματα που είναι γραμμωτά. (Κουιμτζής 1982)

1.4.2.1. Νόμος των Lambert-Beer

Σε μία κυψελίδα πάχους στοιβάδας l, περιέχεται διάλυμα μιας ουσίας με συγκέντρωση C. Στο διάλυμα προσπίπτει κάθετα στα τοιχώματα της κυψελίδας παράλληλη μονοχρωματική δέσμη με ένταση I_0. Η δέσμη περνώντας μέσα από το διάλυμα, βγαίνει με ένταση I, ενώ ένα ποσοστό της απορροφάται από το διάλυμα. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από το πάχος της στοιβάδας l και από τη συγκέντρωση της ουσίας C. Λόγω του ότι η απορρόφηση μιας ακτινοβολίας συνοδεύεται και από ορισμένες ηλεκτρονικές διεγέρσεις, επόμενο είναι ότι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και το ποσοστό της που απορροφάται από ένα διάλυμα, εξαρτώνται από τη φύση της διαλυμένης ουσίας, δηλαδή από ένα συντελεστή ε.

Η μαθηματική σχέση που συνδέει την ένταση της προσπίπτουσας δέσμης I_0, με την ένταση εκείνης που εξέρχεται από το διάλυμα I, είναι γνωστή σαν *νόμος των Lambert-Beer*:
$I = I_0 * 10^{-\varepsilon l C}$ *(1)*

Αν λογαριθμίσουμε τη σχέση αυτή παίρνουμε τη σχέση: $-\log I / I_0 = \varepsilon lC$ *(2)*

Ο λόγος I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα (transmitance) και συμβολίζεται με T. Ο δεκαδικός λογάριθμος του αντίστροφου της διαπερατότητας (-log T) ονομάζεται οπτική πυκνότητα (optical density) και συμβολίζεται με D και η απορρόφηση (absordance) συμβολίζεται με A.

Έτσι η σχέση (2) υπάρχει και με τη μορφή: $A = -\log = I / I_0 = \varepsilon lC$ *(3)*

Από τη σχέση αυτή προκύπτει ότι: α) η απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας για ορισμένη συγκέντρωση και σε ορισμένο μήκος κύματος είναι γραμμική εξάρτηση τού πάχους της στοιβάδας l (*νόμος του Lambert*) και β) η απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας για ορισμένο πάχος στοιβάδας και σε ορισμένο μήκος κύματος είναι γραμμική εξάρτηση της συγκέντρωσης C (*νόμος του Beer)*. Ο νόμος του Beer αποτελεί τη βάση της φασματοφωτομετρίας.

Ο συντελεστής ε ονομάζεται μοριακός συντελεστής απόσβεσης (molar extinction coefficient) και παριστάνει την απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας, όταν η συγκέντρωσή της είναι 1 mole/L και το πάχος της στοιβάδας είναι 1 cm. Οι φυσικοχημικές διαστάσεις του ε είναι $mole^{-1}*cm^2$. Η τιμή του ε εξαρτάται από τη φύση της ουσίας και από το μήκος κύματος, στο οποίο γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης. Όταν η ουσία που απορροφά την ακτινοβολία, είναι άγνωστη και δεν είναι γνωστό το μοριακό της βάρος, τότε στη θέση του συντελεστή ε χρησιμοποιούμε τη σταθερά αναλογίας $A^{1\%}_{1cm.}$ Η σταθερά αυτή παριστάνει την απορρόφηση A ενός διαλύματος της ουσίας 1% (w/v), σε πάχος στοιβάδας 1 cm. (Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου 1996)

1.4.2.2. Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους - ορατού

Η γραφική παράσταση της απορρόφησης ενός διαλύματος σε σχέση με το μήκος κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, δίνει το φάσμα απορρόφησης της διαλυμένης ουσίας. Η συγκέντρωση του διαλύματος και το πάχος της κυψελίδας επιλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι μετρήσεις της απορρόφησης να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβείς.

Στην ποιοτική ανάλυση, χρησιμοποιούνται οι καμπύλες log ε σε σχέση με το μήκος κύματος, επειδή η μορφή τους είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση. Σε κάποιες περιπτώσεις τα φάσματα δίνονται και σαν μεταβολή της διαπερατότητας. Ορισμένα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης υποστηρίζουν την αυτόματη καταγραφή της πρώτης ή της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων απορρόφησης, που χρησιμοποιούνται στην ποιοτική, αλλά και στην ποσοτική χημική ανάλυση.

Το μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται η μεγαλύτερη απορρόφηση, ονομάζεται *μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης* και συμβολίζεται ως λ_{max}. Η θέση που βρίσκεται το μέγιστο της απορρόφησης, εξαρτάται από το ηλεκτρονικό σύστημα της υπό διέγερση ουσίας. Στο λ_{max} ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης έχει τη μέγιστη τιμή και συμβολίζεται με ε_{max}. (Opie 2007)

1.4.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί βασίζονται στο νόμο του Beer. Τα υπό προσδιορισμό δείγματα, επεξεργάζονται έτσι, ώστε στο τελικό στάδιο να έχουμε διάλυμα. Ο δε προσδιορισμός των συστατικών του διαλύματος, γίνεται είτε με τη βοήθεια προτύπων διαλυμάτων ή με μία φασματοφωτομετρική ογκομέτρηση (Calderon 1990)

1.4.3.1. Προσδιορισμός ενός συστατικού - καμπύλη αναφοράς

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ενός συστατικού σε ένα διάλυμα γίνεται ως εξής: Παρασκευάζεται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων, στα οποία οι συγκεντρώσεις του συστατικού είναι γνωστές και ένα διάλυμα αναφοράς στο οποίο η συγκέντρωση του συστατικού είναι μηδέν. Η χημική σύσταση των πρότυπων διαλυμάτων και του διαλύματος αναφοράς πρέπει να προσομοιάζει κατά το δυνατόν στη χημική σύσταση του αγνώστου διαλύματος.

Η απορρόφηση των προτύπων διαλυμάτων μετριέται σε ένα ορισμένο μήκος κύματος σε σχέση με το διάλυμα αναφοράς. Το μήκος κύματος στο οποίο γίνονται οι μετρήσεις, ονομάζεται *αναλυτικό μήκος κύματος,* ενώ η γραφική παράσταση των τιμών απορρόφησης σε σχέση με τη συγκέντρωση αποτελεί την *καμπύλη αναφοράς*. Οι συγκεντρώσεις του συστατικού στα πρότυπα διαλύματα πρέπει να είναι τέτοιες, ώστε η απορρόφησή τους να κυμαίνεται από 0.2 - 0.8. Έπειτα, γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στο άγνωστο διάλυμα. Η τιμή της συγκρίνεται με τις τιμές της καμπύλης αναφοράς και έτσι υπολογίζεται η συγκέντρωση του συστατικού στο διάλυμα. Αν η απορρόφηση στο άγνωστο διάλυμα είναι μεγαλύτερη από 0.8, το διάλυμα πρέπει να αραιωθεί, ενώ αν είναι μικρότερη από 0.2, τότε γίνεται κατάλληλη ρύθμιση του οργάνου.

Όταν δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του συστατικού, παρασκευάζεται μόνο ένα πρότυπο διάλυμα. Έστω C_π η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος και A_π η απορρόφησή του. Αν A_α είναι η απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος, η συγκέντρωσή του C_α προκύπτει από τη σχέση: $C_\alpha = C_\pi * A_\alpha / A_\pi$ (4). Για την

εφαρμογή της σχέσης (4) απαιτείται το χημικό σύστημα να υπακούει στο νόμο του Beer. (Κουιμτζής 1982)

1.4.3.2. Επιλογή του αναλυτικού μήκους κύματος

Η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για ποσοτικούς προσδιορισμούς, γίνεται στο λ_{max}. Η επιλογή του λ_{max} έχει τα εξής πλεονεκτήματα: α) συνήθως, στο λ_{max} το εύρος της ταινίας απορρόφησης είναι μεγάλο. Έτσι, μικρά σφάλματα στη ρύθμιση του επιθυμητού μήκους κύματος, δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις απορρόφησης. Επίσης, οι αποκλίσεις από το νόμο του Beer, που προέρχονται από το μεγάλο εύρος της μονοχρωματικής δέσμης είναι αμελητέες, β) η ευαισθησία και η ακρίβεια των προσδιορισμών έχουν τη μέγιστη τιμή τους στο λ_{max} και γ) η επίδραση διαφόρων προσμείξεων, που πιθανώς υπάρχουν στα δείγματα ή στα αντιδραστήρια, ελαχιστοποιείται.

Όταν στο άγνωστο διάλυμα, υπάρχουν και άλλες ουσίες που απορροφούν στο λ_{max}, τότε επιλέγεται ένα μήκος κύματος, όπου οι απορροφήσεις τους να είναι μηδέν. Αν δεν υπάρχει τέτοιο μήκος κύματος, τότε οι ουσίες αυτές παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του συστατικού και πρέπει να απομακρυνθούν. Αυτό γίνεται συνήθως με κάποια μέθοδο διαχωρισμού, όπως ιοντοανταλλαγή, εκχύλιση, χρωματογραφία κ.α. Σε άλλους προσδιορισμούς, αν χρησιμοποιηθεί η δεύτερη παράγωγος των φασμάτων απορρόφησης, δεν είναι απαιτητή η απομάκρυνση των παρεμποδιστών. Επίσης με τη χρήση της δεύτερης παραγώγου, μπορούν να γίνουν ποσοτικοί προσδιορισμοί και σε θολά διαλύματα, όπου σαν χαρακτηριστικό μέγεθος χρησιμοποιείται η κατακόρυφη απόσταση ανάμεσα σε ένα μέγιστο και σε ένα διπλανό ελάχιστο. Η απόσταση αυτή είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης και όταν υπάρχουν πολλά ζεύγη μέγιστου - ελάχιστου, τότε χρησιμοποιείται το ζεύγος που έχει τη μεγαλύτερη απόσταση. (Κουιμτζής 1982)

1.4.3.3. Κυψελίδες

Οι κυψελίδες των φασματοφωτόμετρων κατασκευάζονται από απλό γυαλί για την ορατή περιοχή ή από χαλαζία για την UV και ορατή περιοχή. Η επιλογή του μεγέθους και του σχήματός τους εξαρτάται από τη φύση και την ποσότητα του δείγματος. Οι κυψελίδες που χρησιμοποιούνται για το διάλυμα αναφοράς και για το διάλυμα του δείγματος πρέπει να έχουν το ίδιο ακριβώς πάχος στοιβάδας και την ίδια διαπερατότητα σε όλη την περιοχή του φάσματος. Ο έλεγχος αυτός γίνεται ως εξής: Προσθέτουμε στις δύο κυψελίδες νερό ή έναν οποιονδήποτε διαλύτη. Μετά τοποθετούμε τη μία κυψελίδα στη θέση του διαλύματος

αναφοράς και την άλλη στη θέση του δείγματος. Στο σημείο αυτό η ένδειξη του οργάνου πρέπει να είναι ακριβώς 100% T ή A = 0 σε όλη την περιοχή του φάσματος.

Οι κυψελίδες πρέπει να καθαρίζονται πριν χρησιμοποιηθούν με απορρυπαντικό και αποσταγμένο νερό. Αν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για οργανικούς διαλύτες, ο καθαρισμός συνεχίζεται με αλκοόλη και αιθέρα. Αν δεν καθαρίσουν με τον τρόπο αυτό, τότε χρησιμοποιούμε μείγμα πυκνού υδροχλωρικού οξέος και αιθανόλης 1:1 ή θερμό νιτρικό οξύ. Αν παρόλα αυτά δεν καθαρίσουν τότε βυθίζονται σε χρωμοθειϊκό οξύ για μικρό χρονικό διάστημα. (Κουιμτζής 1982)

1.4.4. Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας UV-vis

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού έχει πολλές εφαρμογές, τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση. Χρησιμοποιείται στη διευκρίνιση της δομής των μορίων, στην ταυτοποίηση ουσιών, στον ποσοτικό προσδιορισμό ανόργανων και οργανικών ενώσεων, στη μελέτη της κινητικής των αντιδράσεων, στην μελέτη της χημικής ισορροπίας των αμφίδρομων αντιδράσεων κ.α.

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί βασίζονται στα φάσματα απορρόφησης. Ως χαρακτηριστικά μεγέθη χρησιμοποιούνται η θέση του $\lambda_{\mu\alpha\chi}$ και η τιμή του $\varepsilon_{\mu\alpha\chi}$. Όταν υπάρχουν και οι παράγωγοι των φασμάτων απορροφήσεως, τότε ως χαρακτηριστικά μεγέθη χρησιμοποιούνται τα μήκη κύματος των μεγίστων - ελαχίστων και η ποσοτική συσχέτισή τους.

Η χρήση των φασμάτων απορρόφησης UV - ορατού, στη διευκρίνιση της δομής των μορίων και στην ταυτοποίηση των ουσιών δεν είναι ευρεία, όσο άλλες φασματοσκοπικές μέθοδοι όπως Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), αφού οι ταινίες απορρόφησης που οφείλονται στις ηλεκτρονικές διεγέρσεις διευρύνονται από τις διεγέρσεις ταλαντώσεως και περιστροφής των μορίων. Σε πολλές περιπτώσεις όμως τα φάσματα αυτά χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση δομών, που βρίσκονται με άλλες μεθόδους. Με τα φάσματα αυτά μπορεί να γίνει: α) διάκριση μεταξύ συζυγικών συστημάτων, β) διαπίστωση ταυτομερών δομών, και γ) ταυτοποίηση μίας ουσίας.

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί των διαφόρων ουσιών βασίζονται στο νόμο του Beer. Όταν όμως, στο δείγμα συνυπάρχουν και άλλες ουσίες, με παρόμοια φάσματα απορρόφησης ή ο μοριακός συντελεστής αποσβέσεως της ουσίας είναι πολύ μικρός, ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός μιας ουσίας παρουσιάζει δυσκολίες. Σε τέτοιες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται συνήθως ειδικά αντιδραστήρια, τα οποία μετατρέπουν την

ουσία σε μία άλλη, που απορροφά σε διαφορετική περιοχή του φάσματος και έχει μεγάλο μοριακό συντελεστή απόσβεσης. Έτσι, προσδιορίζονται σχεδόν όλα τα στοιχεία και πάρα πολλές οργανικές ενώσεις. (Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου 1996)

1.4.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων - ποτών - α΄υλών βοτανικών ποτών

Η παρούσα ενότητα, που πραγματεύεται την αντιοξειδωτική ικανότητα του συνόλου των τροφίμων και κυρίως των πρώτων υλών των βοτανικών ποτών, βασίστηκε κατά κύριο λόγο στη «Βάση δεδομένων αντιοξειδωτικών τροφίμων» του Τμήματος Διατροφής, του Ινστιτούτου Βασικών Ιατρικών Επιστημών, του Πανεπιστήμιου του Όσλο της Νορβηγίας. Εξετάστηκαν δείγματα από όλο τον κόσμο ως προς το συνολικό αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη έκδοση της ανάλυσης FRAP.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι υπάρχουν τεράστιες διαφορές στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε αντιοξειδωτικά. Τα μπαχαρικά, τα βότανα και τα συμπληρώματα είναι τα πιο πλούσια σε αντιοξειδωτικά προϊόντα στη μελέτη, ορισμένα εξαιρετικά υψηλά. Τα μούρα, τα φρούτα, τα καρύδια, η σοκολάτα, τα λαχανικά και τα προϊόντα τους αποτελούν κοινά τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά.
Επίσης, φαίνεται ότι τα φυτικά τρόφιμα περιέχουν σημαντικά περισσότερα αντιοξειδωτικά από ότι τα μη φυτικά και υπονοείται ότι μια φυτική διατροφή προστατεύει από χρόνιες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Carlsen 2010)

Πίνακας 1.9. Στατιστική περιγραφή μεμονωμένων κατηγοριών του Πίνακα Αντιοξειδωτικών Τροφίμων (ανάλυση FRAP - αντιοξειδωτική περιεκτικότητα σε mmol/100 g. (Carlsen 2010)

Τρόφιμα βασισμένα σε	**n**	**Μέση τιμή**	**Διάμεσος**	**min**	**max**	**25th perc.**	**75th perc.**	**90th perc.**
Φυτά	1943	11.57	0.88	0.00	2897.11	0.27	4.11	24.30
Ζωικά τρόφιμα	211	0.18	0.10	0.00	1.00	0.05	0.21	0.46
Μικτά τρόφιμα	854	0,91	0,31	0,00	18,52	0,14	0,68	1,50
Κατηγορίες								
Μούρα και παράγωγα	119	9.86	3.34	0.06	261.53	1.90	6.31	37.08
Ποτά	283	8.30	0.60	0.00	1347.83	0.15	2.37	3.64
Δημητριακά πρωινού	90	1.09	0.89	0.16	4.84	0.53	1.24	1.95
Σοκολάτες - γλυκά	80	4.93	2.33	0.05	14.98	0.82	8.98	13.23
Γαλακτοκομικά	86	0.14	0.06	0.00	0.78	0.04	0.14	0.44
Επιδόρπια - κέικ	134	0.45	0.20	0.00	4.10	0.09	0.52	1.04
Αυγά	12	0.04	0.04	0.00	0.16	0.01	0.06	0.14
Λίπη - έλαια	38	0,51	0,39	0,19	1,66	0,30	0,50	1,40
Ψάρια - θαλασσινά	32	0.11	0.08	0.03	0.65	0.07	0.12	0.21
Φρούτα - χυμοί	278	1.25	0.69	0.03	55.52	0.31	1.21	2.36
Σπόροι και παράγωγα	227	0.34	0.18	0.00	3.31	0.06	0.38	0.73
Βοτανικά / παραδοσιακά φυτικά φάρμακα	59	91.72	14.18	0.28	2897.11	5.66	39.67	120.18
Βρεφικά τρόφιμα - ποτά	52	0.77	0.12	0.02	18.52	0.06	0.43	1.17
Όσπρια	69	0.48	0.27	0.00	1.97	0.12	0.78	1.18
Κρέας και παράγωγα	31	0.31	0.32	0.00	0.85	0.11	0.46	0.57
Διάφορα συστατικά, καρυκεύματα	44	0,77	0,15	0,00	15,54	0,03	0,41	1,70
Μικτά πιάτα	189	0.19	0.16	0.03	0.73	0.11	0.23	0.38
Ξηροί καρποί - σπόροι	90	4,57	0,76	0,03	33,29	0,44	5,08	15, 83
Πουλερικά και παράγωγα	50	0.23	0.15	0.05	1.00	0.12	0.23	0.59
Σνακ, μπισκότα	66	0,58	0,61	0,00	1,17	0,36	0,77	0,97
Σούπες, σάλτσες, dressing	251	0.63	0.41	0.00	4.67	0.25	0.68	1.27
Μπαχαρικά και βότανα	425	29.02	11.30	0.08	465.32	4.16	35.25	74.97
Λαχανικά - φυτικά προϊόντα	303	0,80	0,31	0,00	48,07	0,17	0,68	1,50

1.4.5.1. Μούρα, φρούτα και λαχανικά

Πάνω από 100 είδη *μούρων* και 19 προϊόντα τους αναλύθηκαν. Η μέση αντιοξειδωτική περιεκτικότητα στα μούρα και τα προϊόντα τους είναι σχετικά υψηλή με το 25ο και 75ο εκατοστημόριο να έχουν τιμές από 1,90 - 6,31 mmol/100 g αντίστοιχα. Υπήρχαν 13 δείγματα με ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, συμπεριλαμβανομένων των αποξηραμένων amla (ινδικό φραγκοστάφυλο με 261,5 mmol/100 g), άγριου ξηρού Rosa canina και τα προϊόντα ξηρού dog rose με αντιοξειδωτικό περιεχόμενα από 20,8 - 78,1 mmol/100 g. Αποξηραμένα άγρια bilberries (Vaccinum Myrtillus, ιθαγενές στη Β. Ευρώπη), zereshk (κόκκινα ξινό μούρα) από το Ιράν και φρέσκο dog rose (από τη Νορβηγία και την Ισπανία) έχουν μέση αντιοξειδωτική περιεκτικότητα 48,3, 27,3 και 24,3 mmol/100 g αντίστοιχα. Άλλα παραδείγματα πλούσιων σε αντιοξειδωτικά μούρα είναι τα φρέσκα crowberries, μύρτιλλα, βατόμουρα, goji berries και cranberries. Με την υψηλή τους περιεκτικότητα σε φυτοχημικά όπως φλαβονοειδή, ταννίνες, στιλβένια, φαινολικά οξέα και λιγνάνες τα μούρα και τα προϊόντα τους είναι εξαιρετικές αντιοξειδωτικές πηγές.

Εικόνα 1.2. Amla (ινδικό φραγκοστάφυλο)
(https://www.amazon.in/plantsguru-pg-fruit-plants-amla-small-Plantsguru-Amla-Small/dp/B00T9SCWIC)

Συνολικά 278 *φρούτα* και προϊόντα τους εξετάστηκαν. Η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά κυμαίνεται από 0,02 mmol/100 g για το καρπούζι σε 55,5 mmol/100 g στο κίτρινο μέρος κάτω από τη φλούδα στο Ισπανικό ρόδι. Παραδείγματα φρούτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά (mmol/100 g) είναι: αποξηραμένα βύσσινα με 48,3, αποξηραμένα μήλα

3,8, αποξηραμένα δαμάσκηνα 3.2, αποξηραμένα βερίκοκα 3,1, δαμάσκηνα 2.4, φράουλες 2.1 και ρόδι με 1,8 mmol/100 g.

Στα *λαχανικά* που αναλύθηκαν, το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο ποικίλει από 0,0 mmol/100 g σε λευκασμένο σέλινο έως 48,1 mmol/100 g σε αποξηραμένα φύλλα σε σκόνη του δέντρου baobab της Αφρικής. Πλούσια σε αντιοξειδωτικά λαχανικά ήταν οι αγκινάρες με 3,5 και το κόκκινο και πράσινο τσίλι με 2,4 mmol/100 g (Carlsen 2010)

Εικόνα 1.3. Δέντρα baobab της Αφρικής
(https://www.tilestwra.com/17-apo-ta-oreotera-dentra-ston-kosmo/)

1.4.5.2. Ξηροί καρποί και σπόροι

Στην κατηγορία των ξηρών καρπών και σπόρων αναλύθηκαν 90 διαφορετικά προϊόντα, με τα αντιοξειδωτικά περιεχόμενα να κυμαίνονται από 0,03 mmol/100 g σε σπόρους παπαρούνας έως 33,3 mmol/100 g σε καρύδια με μεμβράνη και άθικτο κέλυφος. Πεκάν με μεμβράνη, ηλιόσποροι και κάστανα με μεμβράνη, έχουν μέση αντιοξειδωτική περιεκτικότητα από 4,7 - 8,5 mmol/100 g. Αναλυτικότερα: πεκάν με μεμβράνη 8,5, ηλιόσποροι 6,4, κάστανα 4,7, φιστίκια φρυγμένα με μεμβράνη 2, φυστίκια αιγίνης 1,7 και καλαμπόκι 0,6 mmol/100 g. (Carlsen 2010)

1.4.5.3. Σοκολάτα - μέλι - γλυκαντικά

Διάφοροι τύποι *σοκολάτας* αναλύθηκαν με τα αντιοξειδωτικά να κυμαίνονται από 0,23 στη λευκή έως 14,98 mmol/100g σε δείγμα μαύρης σοκολάτας. Το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο αυξήθηκε με την αυξανόμενη περιεκτικότητα σε κακάο στο προϊόν. Προϊόντα σοκολάτας με περιεκτικότητα σε κακάο 24 - 30%, 40 - 65% και 70 - 99% είχαν μέση αντιοξειδωτική περιεκτικότητα 1,8, 7,2 και 10,9 mmol/100 g, αντίστοιχα. (Carlsen 2010)

Τα Αμερικάνικα *μέλια* που ελέχθησαν κυμάνθηκαν από 0,14 - 0,19 mmol/100 g με τη μέθοδο FRAP. (Carlsen 2010)

Οι τιμές ORAC των Ελληνικών μελιών κυμαίνονταν μεταξύ 415 και 2129 mmol TE/kg και ήταν υψηλότερες σε μέλια κωνοφόρων (μέσος όρος: 1237,8 mmol TE/kg) συγκριτικά με του θυμαριού και των εσπεριδοειδών (μέσος όρος: 490,4 mmol TE/kg). Οι αντίστοιχες τιμές από μελέτες με κουβανικά μέλια κυμαίνονταν από 430 - 1220 mmol TE/kg ενώ της Βόρειας Αμερικής από 110 - 900 mmol TE/kg (Bentabol-Manzanares 2011), (Szweda 2017).

Τα ελληνικά μέλια κωνοφόρων δέντρων, έχει αναφερθεί ότι είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φαινολικά οξέα και επωφελή στον σακχαρώδη διαβήτη λόγω της περιεκτικότητάς τους σε πρωτοκατεχικό και καφεϊκό οξύ (Erejuwa 2012). Συγκεντρωτικά στοιχεία δείχνουν ότι το μέλι διαθέτει καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδραστικές ιδιότητες in vivo (Rakha 2008), ενώ έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από διάφορους καρκίνους, όπως της ουροδόχου κύστης, του κόλου και του μαστού (Jaganathan SK 2009), (Jaganathan 2010)

Άλλη μελέτη έδειξε ότι οι πιο ισχυροί τύποι μελιού που προέρχονταν από την περιοχή του Ολύμπου παρουσίασαν αντιοξειδωτική δραστηριότητα συγκρίσιμη ή ανώτερη από εκείνη του μελιού Manuka. Το Manuka, βρέθηκε ότι είναι ένας από τους λιγότερο ισχυρούς τύπους μελιού με ανάλυση DPPH, ενώ με ABTS, ήταν το πέμπτο ισχυρότερο από τους 13 τύπους ελληνικού μελιού που ελέγχθηκαν. (D. Stagos 2018)

Σε ότι αφορά την *καραμέλα*, πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι οι ενώσεις Amadori και οι μελανοϊδίνες, τα τελικά προϊόντα στα προχωρημένα στάδια της αντίδρασης Maillard, παρουσιάζουν ισχυρή δραστικότητα δέσμευσης ROS όπως ρίζες υδροξυλίου, H_2O_2 και υπεροξειδίων (Genichi Okamoto 2014). Εικάζεται ότι η ρεδουκτόνη, οι εναμίνες και οι πυρρολικές δομές στις μελανοϊδίνες ευθύνονται για αυτό (Hayase 1990).

Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ασκούν αντιοξειδωτική δράση στην υπεροξείδωση των λιπιδίων αν και η δραστηριότητα αυτή δεν είναι τόσο ισχυρή όσο εκείνη των μελανοϊδινών. (Utsunomiya 1983)

Άλλα γλυκαντικά Αμερικάνικης προέλευσης που ελέγχθησαν (εκφρασμένα σε mmol/100 g): ζάχαρη μαύρη 15.54, ζάχαρη ακατέργαστη από ζαχαροκάλαμο βιολογική 0.33, ζάχαρη ραφιναρισμένη κόκκοι 0, γλυκαντικά στέβιας από 0.02 - 0,31, σιρόπι σφενδάμου 0,45, μελάσα 4,90 και ασπαρτάμη 0,04 mmol/100 g. (Carlsen 2010)

1.4.5.4. Μπαχαρικά και βότανα

425 μπαχαρικά και βότανα αναλύθηκαν στην μελέτη. 27 μόνο προϊόντα βρίσκονται στην περιοχή 100 - 465 mmol/100 g και η διακύμανση είναι από 0,08 mmol/100 g σε

ακατέργαστη πάστα σκόρδου από την Ιαπωνία έως 465 mmol/100 g σε γαρύφαλλο σκόνη. Ταξινομώντας το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο, το γαρύφαλλο έχει την υψηλότερη μέση τιμή αντιοξειδωτικών και ακολουθούν μέντα, μπαχάρι, κανέλα, ρίγανη, θυμάρι, φασκόμηλο, δεντρολίβανο, σαφράν και εστραγκόν, όλα αποξηραμένα και αλεσμένα, με μέσο όρο τιμές που κυμαίνονται από 44 - 277 mmol/100 g. Τα νωπά δείγματα ρίγανης, δενδρολίβανου και θυμαριού, έχουν χαμηλότερες τιμές από 2,2 - 5,6 mmol/100 g συγκριτικά με τα αποξηραμένα. (Carlsen 2010)

Πίνακας 1.10. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο μπαχαρικών και βοτάνων από τον Πίνακα αντιοξειδωτικών Τροφίμων (Carlsen 2010)

	Αντιοξειδωτικά (mmol / 100 g [a])	**n**	**min**	**max**
Μπαχάρι, αποξηραμένο σκόνη	100,4	2	99,28	100,40
Βασιλικός, αποξηραμένος	19,9	5	9,86	30,86
Δάφνη φύλλα, αποξηραμένα	27,8	2	24,29	31,29
Κανέλα sticks και φλοιός	26.5	3	6.84	40.14
Κανέλα, αποξηραμένη σκόνη	77,0	7	17,65	139,89
Γαρύφαλλο αποξηραμένο, ολόκληρο και σκόνη	277,3	6	175,31	465,32
Άνιθος, αποξηραμένος σκόνη	20,2	3	15,94	24,47
Estragon, αποξηραμένο σκόνη	43,8	3	43,22	44,75
Τζίντζερ, αποξηραμένο	20,3	5	11,31	24,37
Φύλλα δυόσμου, αποξηραμένα	116,4	2	71,95	160,82
Μοσχοκάρυδο, αποξηραμένο σκόνη	26,4	5	15,83	43,52
Ρίγανη, αποξηραμένη σκόνη	63,2	9	40,30	96,64
Δενδρολίβανο, αποξηραμένο σκόνη	44,8	5	24,34	66,92
Σαφράν, αποξηραμένο σκόνη	44,5	3	23,83	61,72
Σαφράν, αποξηραμένα στίγματα	17.5	3	7.02	24.83
Φασκόμηλο, αποξηραμένο σκόνη	44,3	3	34,88	58,80
Θυμάρι, αποξηραμένο σκόνη	56,3	3	42,00	63,75

[a] μέση τιμή όταν n > 1

1.4.5.5. Βοτανικά / παραδοσιακά φυτικά φάρμακα

Αυτή είναι η πλέον πλούσια σε αντιοξειδωτικά κατηγορία και με τη μεγαλύτερη διακύμανση μεταξύ των 59 προϊόντων που εξετάστηκαν. Τα μισά από τα προϊόντα έχουν

αντιοξειδωτικό τιμές άνω του 90ου εκατοστημορίου του πλήρους αντιοξειδωτικού πίνακα Τροφίμων. Μόνο 4 προϊόντα αυτής της κατηγορίας έχουν τιμές μικρότερες από 2,0 mmol/100 g. Εικάζουμε ότι το υψηλό αντιοξειδωτικό τους δυναμικό αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα στις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. (Carlsen 2010)

Το *Sangre de Grado* (αίμα του δράκου), χυμός από τον κορμό του δέντρου Croton lechleri του Περού έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά όλων των προϊόντων (2897,1 mmol/100 g). Αυτός ο χυμός έχει μακρόχρονη ιστορία χρήσης στη Νότια Αμερική για την επούλωση πληγών και ως αντιμυκητιασικό, αντισηπτικό, αντιϊκό και αντιαιμορραγικό. Οι προανθοκυανιδίνες είναι τα κυριότερα συστατικά του (Cai 1991) και οι μελέτες έδειξαν ότι περιορίζει τη μεταγραφή ενός ευρέως φάσματος προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μεσολαβητών, επιταχύνει την επούλωση των ελκών του στομάχου (Miller MJ. 2000), (Miller MJ 2001) και προάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα (Sandoval 2002).

Εικόνα 1.4. Το δέντρο Croton lechleri του Περού, από τον χυμό του κορμού του οποίου εξάγεται το *Sangre de Grado* (αίμα του δράκου)
http://www.inkanat.com/es/arti.asp?ref=sangre-de-drago-grado

Άλλα πλούσια σε αντιοξειδωτικά προϊόντα είναι τα: Triphala, Amalaki και Arjuna με αντιοξειδωτικές τιμές από 132,6 - 706,3 mmol/100 g. Αναλυτικότερα:

- Το *Triphala*, είναι ένα ινδικό αγιουρβεδικό φυτικό σκεύασμα, με αντιφλεγμονώδη δράση (Rasool 2007), αντιβακτηριακή, επουλωτικό των πληγών (Kumar 2008), (Srikumar 2007) και αντικαρκινικό (Deep 2005).
- Το *Arjuna*, ένα άλλο αγιουρβεδικό φάρμακο, έχει αποδειχθεί ότι ασκεί ευεργετικές στην υγεία επιδράσεις (Manna 2007),

- Το *Goshuyu-tou*, ένα παραδοσιακό Γιαπωνέζικο φάρμακο έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά την εξωκυτταρική συγκέντρωση NO στα LPS-διεγερμένα κύτταρα (Okayasu 2003).

1.4.5.6. Αφεψήματα και ποτά γενικά

Οι υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικών σε αυτή την κατηγορία βρέθηκαν μεταξύ των μη επεξεργασμένων τσαγιών και κόκκων καφέ. Ο έλεγχος σε 54 διαφορετικούς τύπους παρασκευασμάτων καφέ έδειξε μεγάλη διακύμανση, που κυμαίνεται από 0,89 mmol/100 g για έναν τύπο καφέ με γάλα μέχρι 16,33 mmol/100 g το μέγιστο για ένα τον τύπο διπλού καφέ εσπρέσο.

Μετά το νερό, το τσάι και ο καφές είναι τα δύο ποτά με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως και αποτελούν σημαντικές αντιοξειδωτικές πηγές σε πολλές δίαιτες, αν και τα καταναλωτικά πρότυπα διαφέρουν μεταξύ των χωρών. Αρκετές διαφορετικές ενώσεις συμβάλλουν στο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του καφέ, π.χ., καφεΐνη, πολυφαινόλες, πτητικές, αρωματικές και ετεροκυκλικές ενώσεις (Illy 2002). Πολλά από αυτά απορροφώνται αποτελεσματικά και τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος αυξάνονται μετά την πρόσληψη καφέ (Olthof 2001).

Στο πράσινο τσάι, τα κύρια φλαβονοειδή που υπάρχουν είναι μονομερείς κατεχίνες, γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, γαλλική επικατεχίνη και επικικατίνη. Στο μαύρο τσάι οι πολυμερισμένες κατεχίνες θεαφλαβίνη και θεαρουμπιγίνη κυριαρχούν εκτός από την κουρσετίνη και τις φλαβονόλες (McKay 2002).

Άλλα ποτά πλούσια σε αντιοξειδωτικά είναι τα κόκκινα κρασιά, που έχουν μικρότερη διακύμανση στο αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο (1,78 - 3,66 mmol/100 g), χυμός ροδιού, πράσινο τσάι (0,57 - 2,62 mmol/100 g), χυμός σταφυλιών, χυμός δαμάσκηνο και μαύρο τσάι (0,75 - 1,21 mmol/100 g).

Η μπύρα, τα αναψυκτικά και το ginger ale περιέχουν τα λιγότερα αντιοξειδωτικά των ποτών στη μελέτη μας ενώ το πόσιμο νερό δεν περιέχει καθόλου αντιοξειδωτικά. Αξιοσημείωτο είναι ότι το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο στο ανθρώπινο γάλα είναι συγκρίσιμο με αυτό του χυμού ροδιού, της φράουλας και του καφέ και είναι κατά μέσο όρο υψηλότερο από τα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα για βρέφη. (Carlsen 2010)

1.4.5.7. Αντιοξειδωτική ικανότητα των λικέρ

Γενικά, τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των λικέρ που παρασκευάζονται από διάφορα υλικά φυτών και φρούτων, είναι πολύ περιορισμένα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα 11 εμπορικά διαθέσιμων λικέρ διερευνήθηκε με παραμαγνητικό συντονισμό ηλεκτρονίων (EPR) χρησιμοποιώντας DPPH και ABTS, εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox (TEAC), συγκρινόμενη με αυτή των οίνων.

Τα λικέρ που εξετάστηκαν ήταν: 1. Becherovka Τσεχική Δημοκρατία, 2. Becherovka, Τσεχία, 3. Demänovka bitter, Σλοβακία, 4. Demänovka, Σλοβακία, 5. Milder, Σλοβακία, 6. Bylinovka, Σλοβακία, 7. Armillar Amaretto, Ιταλία, 8. Stará myslivecká, Τσεχία, 9. Alchymista, Σλοβακία, 10. Fernet Amaro citrus, Σλοβακία, 11. Noble Cherry, Γερμανία. Ερευνήθηκαν συγκριτικά με: Μπράντυ (Γεωργία) και δείγματα οίνου: Veltlín zelený 2005 (λευκό κρασί, Σλοβακία), Frankovka modrá 2005 (κόκκινο κρασί, Σλοβακία) και Cabernet Sauvignon 2004 (κόκκινο κρασί, Σλοβακία).

Με το DPPH, τα περισσότερα από τα λικέρ (με μία εξαίρεση) παρουσίασαν τιμές TEAC DPPH στην περιοχή 0,04 - 0,58 mmol/l^{-1}, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για ερυθρούς οίνους κυμαίνονταν μεταξύ 7,7 - 8,8 mmol/l^{-1}.

Ακριβώς παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και με το ABTS με συντελεστή συσχέτισης rDPPH/ABTS = 0.9938. Αναλυτικότερα, η τιμή TEAC DPPH ήταν πολύ χαμηλή στα δείγματα 1-3 (0,04 - 0,11 mmol/l^{-1}), μεγαλύτερη στα δείγματα 4-10 (0.14-0.58 mmol/l^{-1}), με κατ 'εξαίρεση υψηλό δείγμα το 11 (0,82 mmol/l^{-1}). Το λευκό κρασί (12) είχε τιμή TEAC DPPH 0,49 mmol.l^{-1}, το γεωργιανό μπράντυ (13) 0,54 mmol/l^{-1} και τα δύο δείγματα κόκκινων κρασιών (14, 15) με τιμές 7,7 και 8,2 mmol/l^{-1} αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λικέρ με τα ερυθρά κρασιά αποκαλύπτει εκπληκτικά χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στα περισσότερα λικέρ. (Staško 2007)

Σκοπός

Στην παρούσα εργασία ο *σκοπός* της ερευνάς μας είναι ο in vitro προσδιορισμός και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ελιξιρίου «Amaro Montecristo» και των επιμέρους εκχυλισμάτων του με τις μεθόδους ABTS, DPPH και των φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, μέθοδοι ευρέως χρησιμοποιούμενες σε αναλύσεις τροφίμων. Παράλληλα αξιολογείται η συσχέτιση των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS και DPPH) με τη μέθοδο προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin-Ciocalteu).

. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Περιγραφή Amaro Montecristo και δειγμάτων εκχυλισμάτων

Το *«Amaro Montecristo»,* το αντικείμενο της παρούσας διατριβής, είναι μια φόρμουλα από 68 διαφορετικά φυσικά συστατικά, επιλεγμένα με κριτήριο την υψηλή τους περιεκτικότητα σε βιταμίνες, μέταλλα, αντιοξειδωτικές και βιολογικά δραστικές ουσίες. Βότανα και μπαχάρια από όλο τον κόσμο, ξηροί καρποί, φρούτα και άλλα μυστικά συστατικά, εκχυλίζονται σε μια βάση aqua vitae για να δώσουν την «ουσία τους».

Γευσιγνωσία: Το «Amaro Montecristo», είναι ένα γλυκόπιοτο «φάρμακο» με ελαφρώς πικρό φινίρισμα, στο χρώμα του μαονιού, με μελένιες ανταύγειες και μαλακό βελούδινο στόμα, όπου οι βοτανικές γεύσεις δημιουργούν μια αέρινη σοφιστικέ πικράδα. Η συναρπαστικά περίπλοκη βοτανική του πικρία εξισορροπείται από τη γλύκα του μελιού και της καραμέλας - χωρίς να γίνεται μελό - σε μια εύθραυστη ισορροπία ανάμεσα στο γλυκό και το πικρό. Κάτω από τη διάχυτη πικράδα, ξεπηδούν φαρμακευτικά αρώματα βοτάνων, όπως της γεντιανής και της αρτεμισίας, με κομψές διακριτές νότες από λεβάντα, γλυκόριζα και μπαχαρικά όπως γαρίφαλο, μοσχοκάρυδο, κανέλα, με ζωηρούς υπαινιγμούς, από μόκα, καραμέλα και εσπεριδοειδή.

Για το πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εκχυλίσματα και Amaro:
(1) Βοτανικό, (2) Καφέ, (3) Ξηρών φρούτων, (4) Ξηρών καρπών, (5) Εσπεριδοειδών, (6) Amaro 1, (7) Amaro 2.

Σύσταση εκχυλισμάτων

1. *Βοτανικό*: διάφορα βότανα (θυμάρι, αρτεμισία, δενδρολίβανο, κενταύριο κ.α.), μπαχαρικά (κανέλα, γαρίφαλο, βανίλια κ.α.), τσάγια (πράσινο, μαύρο, σιδηρίτης κ.α.).
2. *Καφέ*: μείγμα arabica - robusta 70/30.
3. *Ξηρών φρούτων*: σύκα, δαμάσκηνα, σταφίδες κ.α.
4. *Ξηρών καρπών*: καρύδια, αμύγδαλα, φουντούκια κ.α.
5. *Εσπεριδοειδών*: φλοιοί εσπεριδοειδών, αρώνια κ.α.
6. *Amaro 1:* μείγμα των εκχυλισμάτων 1-5 με καραμέλα και μέλι.
7. *Amaro 2*: μείγμα των εκχυλισμάτων 1-5 με μέλι.

Η καραμέλα ήταν πυκνό διάλυμα με 78% καραμέλα (από καραμελοποίηση λευκής ζάχαρης) και 22% amaro. Το μέλι που χρησιμοποιήθηκε στο amaro 1 ήταν ανθέων, κωνοφόρων και στο amaro 2 πεύκου).

Πίνακας 2.1. Η περιεκτικότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων και γλυκαντικών % στα Amaro

Εκχυλίσματα	**% στο Amaro 1**	**% στο Amaro 2**
1. Βοτανικό	45,45	48,06
2. Καφέ	20,20	21,35
3. Ξηρ. φρούτων	12,12	12,81
4. Ξηρ. καρπών	5,05	5,36
5. Εσπεριδοειδών	7,07	7,44
Καραμέλα	8,08	-
Μέλι	2,02	4,96

Η βάση εκχύλισης ήταν γκράπα από Μοσχάτο Αλεξανδρείας και Ασσύρτικο με αρχική περιεκτικότητα 40% vol. Με τις κατάλληλες αραιώσεις με νερό, τα δείγματα (1-5) είχαν τελική περιεκτικότητα σε αλκοόλ 23,5% vol, ενώ τα Amaro (1) 21,15% vol και Amaro (2) 22,33 % vol, μετά την προσθήκη των γλυκαντικών.

Τα φυτικά συστατικά εκχυλίστηκαν για >2 μήνες και οι ημερομηνίες εκχύλισης ήταν για το δείγμα (1) 5/2014, για τα (2) και (4) 2/2015, για το (5) 3/2015 και για το δείγμα (3) 4/2015. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα αεροστεγή δοχεία, σε συνθήκες δωματίου, δεχόμενα τις φθοροποιές επιδράσεις του χρόνου, του φυσικού και τεχνητού φωτός, της θερμοκρασίας και του οξυγόνου που υπήρχε μέσα στα δοχεία. Σημειώνεται ότι οι πειραματικοί προσδιορισμοί διεξήχθησαν τον 8/2018, δηλαδή από 3 χρόνια και 4 μήνες έως και 4 χρόνια και 3 μήνες μετά τις εκχυλίσεις.

2.2. Αντιδραστήρια

Για την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

• $CuSO_4$, $5H_2O$ 1%

• Τρυγικό K-Na 2%

• Na_2CO_3

• NaOH

• Folin - Ciocalteu

• ABTS+

• DPPH

• $K_2S_2O_8$

• Trolox

2.3. Όργανα

• Αναλυτικός ζυγός, Electronic Balance ER-18 OA

• Μικροπιπέτες των 5-50 μl, 50-200 μl και 100-1000 μl Socorex

• Συσκευή ανάδευσης, Framo-geratechnic M21/1

• Υδρόλουτρο, Grant GR ISO

• Φασματοφωτόμετρο, Thermo Electron Corporation NICOLET evolution 100

• Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν με το πρόγραμμα Thermo Spetronic ~ Vision Pro Software V2.00.

2.4. Σκεύη

• Σπάτουλα

• Ογκομετρικές φιάλες των 50, 100 ml και 1 lit

• Ποτήρια ζέσεως των 50 ml

• Γυάλινη ράβδος

• Κωνικές φιάλες των 100 ml

• Δοκιμαστικοί σωλήνες

2.5. Πειραματική διαδικασία

2.5.1. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων (Folin - Ciocalteu)

Η μέθοδος Folin - Ciocalteu αναπτύχθηκε αρχικά από τους Folin και Denis και Folin και Ciocalteu (Folin 1927) για τον προσδιορισμό της τυροσίνης (αμινοξύ με φαινολική ομάδα) και τροποποιήθηκε από τους Singleton και Rossi (Singleton 1965) για την ανάλυση του συνολικού φαινολικού φορτίου. Αν και κανένα αντιδραστήριο δε δίνει με τις διάφορες φαινολικές ενώσεις προϊόντα που να εμφανίζουν το ίδιο μέγιστο μήκος απορρόφησης, η μέθοδος Folin - Ciocalteau είναι η πλέον γενικώς αποδεκτή.

Το μειονέκτημα της μεθόδου Folin - Ciocalteu, είναι ότι και άλλες μη φαινολικές ενώσεις, κοινές σε φυτικά προϊόντα, όπως ασκορβικό οξύ, σάκχαρα, αρωματικές αμίνες, οργανικά οξέα και πρωτεΐνες επίσης προσδιορίζονται με το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu. Κάποιες ανόργανες ενώσεις, όπως θειικός σίδηρος, νιτρώδες κάλιο, φωσφορικό νάτριο και θειικό μαγγάνιο μπορούν επίσης να αντιδράσουν με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων. Για να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα θα πρέπει να τηρούνται οι συνθήκες που καθορίζονται από τους Singleton και Rossi και το γαλλικό οξύ θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως πρότυπο αναφοράς (Prior 2005).

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση του συνόλου των φαινολών, σε αλκαλικό περιβάλλον από το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteau. Το αντιδραστήριο αυτό (κίτρινου χρώματος), αποτελεί μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφομολυβδαινικού οξέος, $H_3PMo_{12}O_{40}$, το οποίο ανάγεται κατά την οξείδωση των φαινολών, προς μίγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), κυανού χρώματος.

Η μέγιστη απορρόφηση παρουσιάζεται στα 750 nm περίπου, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών και εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (Γαλλικού οξέος). Η επιλογή του Γαλλικού οξέος ως πρότυπο στηρίζεται στην καθαρότητα και την σταθερότητά του, στη διαθεσιμότητά του και στη σχετικά φθηνή του τιμή. Τα πρότυπα διαλύματα Trolox, έχει αποδειχτεί ότι χάνουν λιγότερο από το 5% της δραστικότητάς τους σε χρόνο άνω των δυο εβδομάδων, διατηρούμενα στεγανά κλεισμένα στο ψυγείο. (Tsimidou 1992)

2.5.1.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων

• Solution 1:

Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος χρειαζόμαστε:

1 ml διαλύματος (A), 1 ml διαλύματος (B) και 98 ml διαλύματος (C)

(A) → $CuSO_4$, $5H_2O$ 1%

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προσθέτουμε 0,5 g στερεού $CuSO_4$ - $5H_2O$ και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

(B) → Τρυγικό K - Na 2%

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προσθέτουμε 1 g τρυγικού οξέος και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

(C) → Σε ογκομετρική φιάλη του 1 lt προσθέτουμε 20g Na_2CO_3, και 4g NaOH. Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

• **Folin - Ciocalteu:** Το πυκνό αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu αραιώνεται σε αναλογία 1:1 με αποσταγμένο νερό.

• **Πυκνό διάλυμα Γαλλικού οξέος:** Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml προστέθηκαν 0,5 g ξηρού Γαλλικού οξέος και 10 ml αιθυλικής αλκοόλης. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και συμπλήρωση με αποσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

2.5.1.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

• Από το πυκνό διάλυμα Γαλλικού οξέος με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάσαμε 6 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, με συγκεντρώσεις: 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L και 300 mg/L, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

• Από αυτά τα 6 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα Γαλλικού οξέος, ελήφθησαν ποσότητες 0,5 ml και τοποθετήθηκαν σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες.

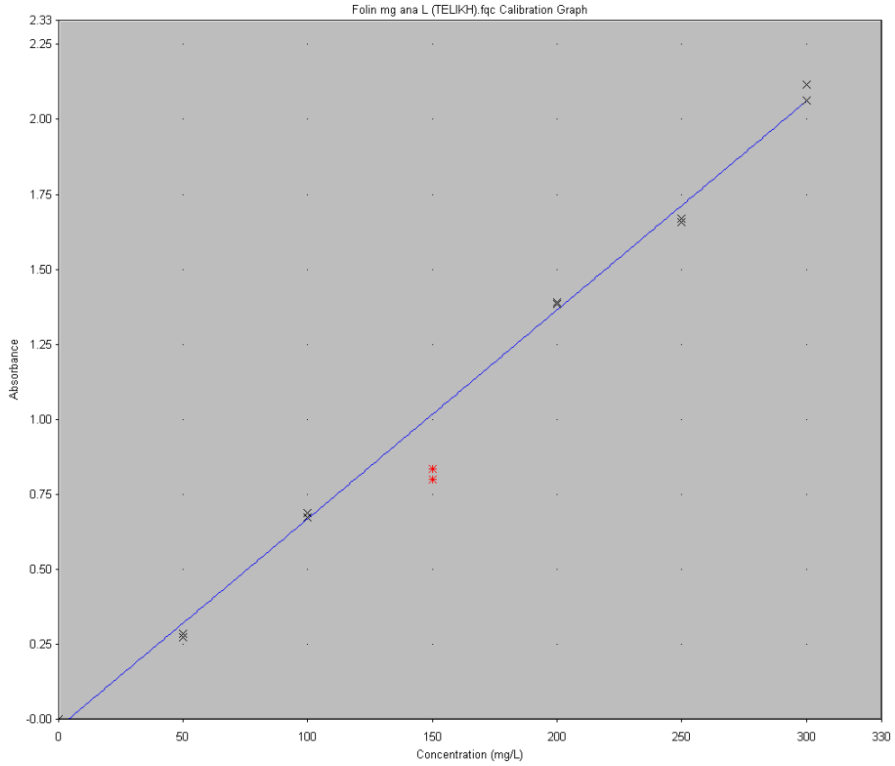
• Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 ml από το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu σε κάθε σωλήνα και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

• Μετά από 10 min προστέθηκαν 2 ml Solution 1 και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

• Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 50 ^{0}C για 5 min και κατόπιν ψύχθηκαν με κρύο νερό και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

• Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων με φασματοφωτόμετρο στα 760 nm.

Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα, το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τη διαφορά ότι αντί Γαλλικού οξέος προστέθηκε ίδια ποσότητα αποσταγμένου νερού. Έτσι, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη, όπου στον άξονα Χ έχουμε τα mg Trolox και στον άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις στα 760 nm.



Γράφημα 2.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου Folin - Ciocalteu

2.5.1.3. Πειραματική διαδικασία

• Σε 3 ογκομετρικές φιάλες των 10 ml έγινε η αραίωση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1:5, 1:10, 1:20), χρησιμοποιώντας την σχέση αραίωσης $C_1*V_1 = C_2*V_2$.

• Σε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 0,5 ml από το εκάστοτε αραιωμένο διάλυμα (δείγμα) και 2,5 ml από το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu. Ακολούθησε έντονη ανάδευση.

• Μετά από 10 min παραμονή, προσθέσαμε στους σωλήνες από 2 ml διάλυμα Solution 1 και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

• Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 5 min σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 50 ^{0}C.

• Στη συνέχεια τα δείγματα ψύχθηκαν με κρύο νερό και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

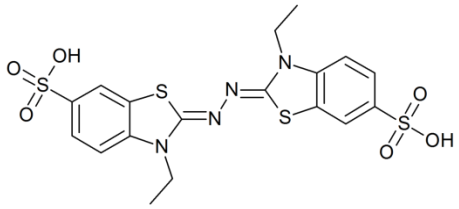
• Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 760 nm.

Η άνωθεν διαδικασία, έγινε προκειμένου να επιλεχθεί η κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων, ώστε η απορρόφησή τους να εμπίπτει εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Ως αποδεκτή αραίωση επιλέχθηκε η 1:30 για όλα τα δείγματα. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για το κάθε δείγμα.

Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι στη θέση του δείγματος προστέθηκε ίδια ποσότητα αποσταγμένου νερού.

2.5.2. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS

Η δοκιμασία των ισοδυνάμων αντιοξειδωτικής ικανότητας (TEAC), αναπτύχθηκε από τους Miller et al και προσαρμόστηκε από τους Van der Berg και Re et al., που συμπεριέλαβαν τη χρήση του ABTS, το οποίο παράγεται από την οξείδωση του (2,2'-Αζινοδις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) με υπερθεϊκά ιόντα. Το παραπάνω μείγμα διαλύεται σε αποσταγμένο νερό και αφήνεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες, προκειμένου να ολοκληρωθεί η μεταξύ τους αντίδραση, οπότε και αποκτά βαθύ κυανό χρώμα. Εν συνεχεία, αραιώνεται με αιθανόλη έως ότου δώσει απορρόφηση 0,7 μονάδες στα 734 nm. (Ashwell 2010)



Σχήμα 2.1. Ο χημικός τύπος του ABTS (https://en.wikipedia.org/wiki/ABTS n.d.)

Η μέθοδος βασίζεται στον αποχρωματισμό του σχηματιζόμενου ριζικού κατιόντος ABTS, ο οποίος προκαλείται από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά του δείγματος, τα οποία καταναλώνουν το ABTS σε βαθμό ανάλογο με την συγκέντρωσή τους μέσα σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο (6 λεπτά) σε σχέση με εκείνη του Trolox. Το ABTS που καταναλώνεται εκφράζεται σε ισοδύναμα trolox και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. (Erel 2004)

Το ABTS, που αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, είναι σταθερό σε μεγάλο εύρος τιμών pH και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των επιδράσεων του pH σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Lemanska 2001). Επίσης είναι διαλυτό σε υδατικούς και οργανικούς διαλύτες, δεν επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα υδρόφιλων και λιπόφιλων ενώσεων (Arno 2000). Έχει χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και ενδείκνυται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ενώσεων, λόγω του σχετικά χαμηλού οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού, καθώς και των θερμοδυναμικών του ιδιοτήτων (Osman 2006).

Ένας περιορισμός αυτής της μεθόδου, είναι ότι η τιμή TEAC χαρακτηρίζει την ικανότητα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων να αντιδρούν με την ρίζα ABTS και όχι για να

εμποδίσουν τη διαδικασία της οξείδωσης. Η δοκιμασία TEAC επίσης, παρουσιάζει υψηλή εξάρτηση από τον χρόνο επώασης και από την αναλογία της ποσότητας του δείγματος προς τη συγκέντρωση ριζών ABTS (Roginsky 2005).

2.5.2.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων

Πυκνό διάλυμα ABTS:

• Ζυγίζονται 0,036 g ABTS και 0,0066 g $K_2S_20_8$ (θειοθεικό κάλιο).

• Διαλύονται σε ένα ποτήρι ζέσεως με 20 ml αποσταγμένο νερό, αναδεύοντας έντονα.

• Τα μεταγγίζουμε σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και συμπληρώνουμε με αποσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή.

• Τοποθετούνται για 12 - 16 ώρες στο σκοτάδι.

Αραιό διάλυμα ABTS:

Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του πυκνού διαλύματος στα 734 nm και αραιώνουμε με αιθανόλη έως ότου δώσει απορρόφηση 0,7 μονάδες.

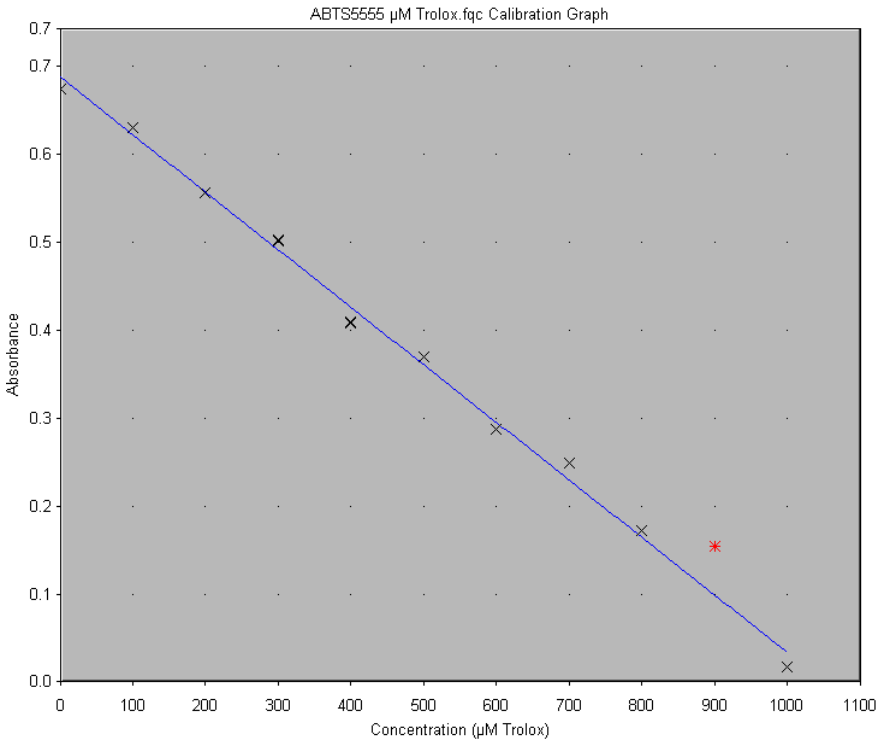
2.5.2.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

• Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα Trolox σε συγκεντρώσεις 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM, 600 μM, 700 μM, 800 μM, 900 μM και 1000 μM, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

• Κατόπιν σε 11 δοκιμαστικούς σωλήνες (το ένα τυφλό) προσθέσαμε 100 μl Trolox και 3,9 ml αραιού διαλύματος ABTS.

• Μετρήθηκε η απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο στα 734 nm.

• Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη όπου στον άξονα Χ έχουμε τα μg Trolox και στον άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις.



Γράφημα 2.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου ABTS

2.5.2.3. Πειραματική διαδικασία

• Σε 6 ογκομετρικές φιάλες των 10 ml έγινε αραίωση του εκάστοτε δείγματος σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) χρησιμοποιώντας την σχέση αραίωσης $C_1*V_1 = C_2*V_2$.

• Σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 100 μl του εκάστοτε αραιωμένου δείγματος και 3,9 ml αραιού διαλύματος ABTS.

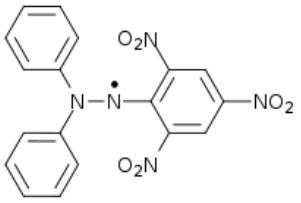
• Περιμένουμε 5 - 6 min και μετράμε την απορρόφηση UV στα 734 nm.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε προκειμένου να επιλεχθεί η κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων ώστε η απορρόφησή τους να εμπίπτει εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Ως αποδεκτή αραίωση επιλέχθηκε η 1:30 η οποία και εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα με τη χρήση δοκιμαστικών σωλήνων.

• Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για το καθένα από τα δείγματα μας. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι στη θέση του δείγματος προστέθηκε ίδια ποσότητα αιθανόλης.

2.5.3. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH

Η μέθοδος DPPH (1,1 διφαινύλο-2-πικρυλυδραζυλική ελεύθερη ρίζα) αποτελεί την παλιότερη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον (Bios 1958) και στην πορεία τροποποιήθηκε από πλήθος ερευνητών. Το DPPH, που αποτελεί μια από τις σταθερότερες εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου, αντιδρά με ενώσεις που μπορούν να δώσουν υδρογόνο και είναι μία από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Ashwell 2010).



Σχήμα 2.2. Ο χημικός τύπος του DPPH (https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH n.d.)

Ο μηχανισμός χημικής αντίδρασης της μεθόδου DPPH βασίζεται κυρίως σε μεταφορά ηλεκτρονίων, ενώ η αντίδραση αφαίρεσης ατόμων υδρογόνου είναι οριακή (Prior 2005). Τα φαινολικά συστατικά δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και η μείωσή της ελέγχεται με τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Το αρχικό μωβ χρώμα του διαλύματος, εξασθενεί και μετατρέπεται σε κίτρινο, όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά. (Schlesier 2002)

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται ευρέως επειδή είναι εύκολη, ακριβής και επαναλήψιμη. Ενδείκνυται για προσδιορισμούς υδρόφιλων ή υδρόφοβων δειγμάτων αντιοξειδωτικών.

Το DPPH είναι μια σταθερή, μακρόβια ρίζα, σε αντιδιαστολή με τις εξόχως δραστικές και παροδικές ρίζες υπεροξυλίου που υπάρχουν στον οργανισμό που σχετίζονται με την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Huang 2005). Συνεπώς, τα αντιοξειδωτικά που αντιδρούν ταχέως με τις ρίζες υπεροξυλίου μπορούν να αντιδράσουν αργά ή και να είναι αδρανή στο DPPH. Ένας άλλος περιορισμός του, είναι ότι κάποιες ενώσεις όπως τα καροτενοειδή, μπορεί να έχουν φάσματα απορρόφησης που επικαλύπτονται με το DPPH στα 515 nm. Επίσης λόγω στερεοχημικής προσβασιμότητας, τα μικρά μόρια αναμένεται να παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, λόγω της καλύτερης πρόσβασής τους στη θέση ριζών DPPH (Prior 2005).

Τέλος, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δυσκολεύει με την ύπαρξη στα εξεταζόμενα δείγματα μικρών μορίων που δρουν ως μειωτικοί παράγοντες, όπως το ασκορβικό οξύ, κάτι που ισχύει επίσης και για το ABTS, το οποίο μειώνεται είτε μέσω μεταφοράς υδρογόνου, είτε μέσω μεταφοράς μεμονωμένου ηλεκτρονίου. (Ashwell 2010)

2.5.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή πυκνού διαλυματος DPPH με αιθανόλη 12%

Ζυγίζονται 0,0197 g DPPH και τα διαλύουμε με αιθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, συμπληρώνοντας μέχρι την χαραγή, ώστε η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DPPH είναι 0,5 mM.

Παρασκευή αραιού διαλύματος DPPH με αιθανόλη 12%

Από το άνωθεν πυκνό διάλυμα DPPH λαμβάνονται 5 ml και προστίθεται αιθανόλη, μέχρι να πάρουμε τελικό διάλυμα που θα μας δίνει απορρόφηση UV 0,7 μονάδες στα 517 nm.

2.5.3.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

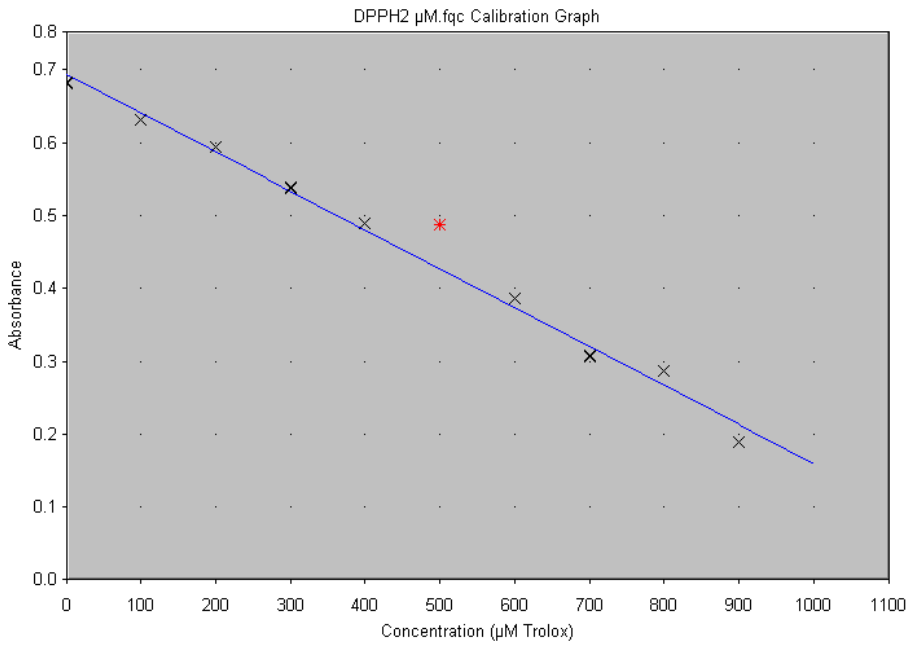
• Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα Trolox σε συγκεντρώσεις 100 μM, 200 μM, 300 μM , 400 μM, 500 μM, 600 μM,700 μM, 800 μM και 900 μM, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

• Κατόπιν σε 10 δοκιμαστικούς σωλήνες (με το τυφλό) προσθέσαμε 100 μl Trolox και 3,9 ml αραιού διαλύματος DPPH.

• Ακολούθησε έντονη ανάδευση και τοποθέτηση των διαλυμάτων σε σκοτεινό μέρος για 30 min.

• Μετρήθηκε η απορρόφησή τους με φασματοφωτόμετρο στα 517 nm.

• Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη όπου στον άξονα Χ έχουμε τα μg Trolox και στον άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις.



Γράφημα 2.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μεθόδου DPPH

2.5.3.3. Πειραματική διαδικασία

• Σε 6 ογκομετρικές φιάλες των 50 ml έγινε αραίωση του εκάστοτε δείγματος σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50,) χρησιμοποιώντας την σχέση αραίωσης $C_1*V_1 = C_2*V_2$.

• Σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 100 μl αραιωμένου δείγματος και 3,9 ml αραιού διαλύματος DPPH.

• Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τοποθέτησή τους σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά.

• Μετρήθηκε η απορρόφηση UV στα 517nm.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε προκειμένου να επιλεχθεί η κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων ώστε η απορρόφησή τους να εμπίπτει εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Ως αποδεκτή αραίωση επιλέχθηκε η 1:30 η οποία και εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα.

Η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματα με την χρήση δοκιμαστικών σωλήνων.

Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για όλα τα δείγματά μας. Χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα το οποίο περιείχε αιθανόλη για τον μηδενισμό του οργάνου.

2.6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS. Οι συγκρίσεις μεταξύ των μεθόδων έγιναν με την χρήση της one-way ANOVA, τα 95% όρια εμπιστοσύνης και της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των τριών μεθόδων.

Το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης εκφράζεται με την τιμή p που αν είναι <0,05, αυτό σημαίνει ότι οι τιμές είναι πραγματικές και δεν οφείλονται στην τυχαία διακύμανση των αριθμών.

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να ελεγχθούν πριν την εφαρμογή της ANOVA είναι:

Α. Να υπάρχει κανονικότητα. Ο έλεγχος της κανονικότητας γίνεται για το κάθε δείγμα ξεχωριστά με τη χρήση του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk.

Β. Οι διακυμάνσεις όλων των ομάδων θα πρέπει να είναι ίσες μεταξύ τους. Ο έλεγχος που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων, είναι ο έλεγχος του Lavene. (Πετρίδης 2013)

Επίσης, επειδή δεν είχαμε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ανά ποτό (n=3), δεν πληρείται η προϋπόθεση της κανονικότητας και ως εκ τούτου τα δείγματα συγκρίθηκαν και με μη παραμετρική ανάλυση (Kruskal-Wallis).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

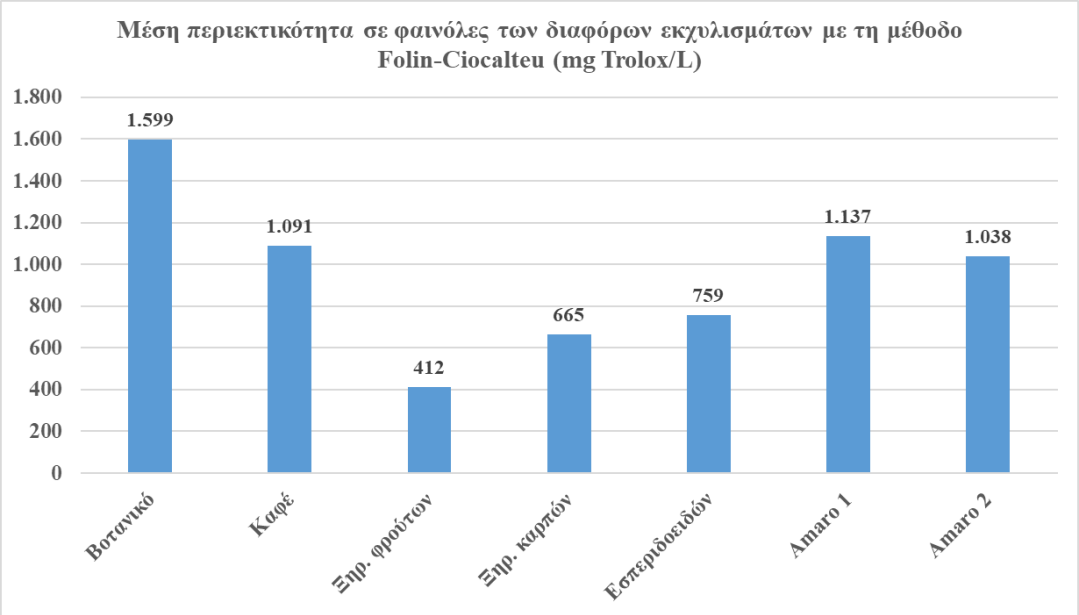
3.1.1. Μέθοδος Folin - Ciocalteu

Πίνακας 3.1. Περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (mg Trolox/L)

Εκχύλισμα	Δείγμα	Απορρόφηση 760,0 nm	Συγκέντρωση (mg/L)
Βοτανικό	1	0,348	1.616,61
	2	0,342	1.591,08
	3	0,342	1.590,45
	Μ.Ο.	0,344	1.599,36
Καφέ	1	0,22	1.063,38
	2	0,226	1.088,28
	3	0,233	1.121,28
	Μ.Ο.	0,226	1.090,98
Ξηρ. φρούτων	1	0,099	544,11
	2	0,053	345,45
	3	0,053	345,66
	Μ.Ο.	0,069	411,75
Ξηρ. καρπών	1	0,125	656,10
	2	0,129	672,48
	3	0,128	666,42
	Μ.Ο.	0,127	664,98
Εσπεριδοειδών	1	0,168	838,56
	2	0,135	696,51
	3	0,145	741,36
	Μ.Ο.	0,149	758,82
Amaro 1	1	0,232	1.117,11
	2	0,244	1.166,07
	3	0,235	1.127,13
	Μ.Ο.	0,237	1.136,76

Πίνακας 3.1. (συνέχεια) Περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (mg Trolox/L)

Εκχύλισμα	**Δείγμα**	**Απορρόφηση 760,0 nm**	**Συγκέντρωση (mg/L)**
Amaro 2	1	0,206	1.001,55
	2	0,225	1.085,13
	3	0,212	1.027,68
	Μ.Ο.	0,214	1.038,12

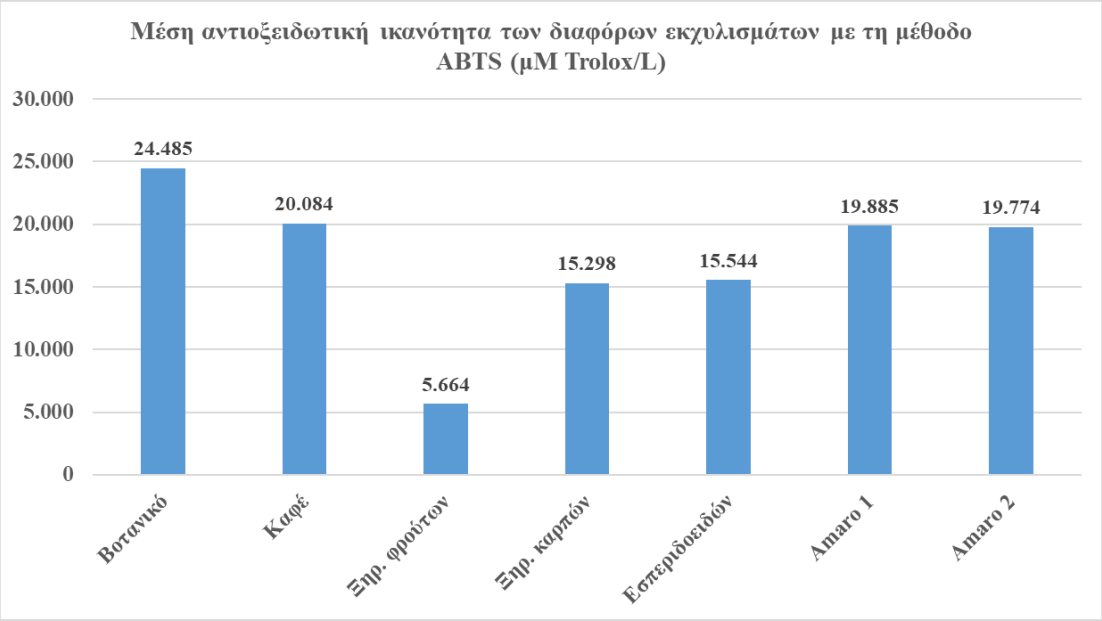


Γράφημα 3.1. Μέση περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (mg Trolox/L)

3.1.2. Μέθοδος ABTS

Πίνακας 3.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS (μM Trolox/L)

Εκχύλισμα	**Δείγμα**	**Απορρόφηση 734,0 nm**	**Συγκέντρωση (μM Trolox)**
Βοτανικό	1	0,249	20.117,19
	2	0,113	26.370,63
	3	0,1	26.966,43
	Μ.Ο.	0,154	24.484,74
Καφέ	1	0,268	19.247,10
	2	0,239	20.553,33
	3	0,242	20.451,57
	Μ.Ο.	0,25	20.084,01
Ξηρ. φρούτων	1	0,574	5.220,39
	2	0,559	5.870,46
	3	0,559	5.899,77
	Μ.Ο.	0,564	5.663,55
Ξηρ. καρπών	1	0,359	15.084,27
	2	0,392	13.533,03
	3	0,311	17.275,29
	Μ.Ο.	0,354	15.297,54
Εσπεριδοειδών	1	0,405	12.963,66
	2	0,323	16.734,09
	3	0,318	16.935,63
	Μ.Ο.	0,349	15.544,47
Amaro 1	1	0,277	18.812,73
	2	0,256	19.777,47
	3	0,228	21.066,18
	Μ.Ο.	0,254	19.885,47
Amaro 2	1	0,261	19.563,63
	2	0,261	19.539,60
	3	0,247	20.217,84
	Μ.Ο.	0,256	19.773,69

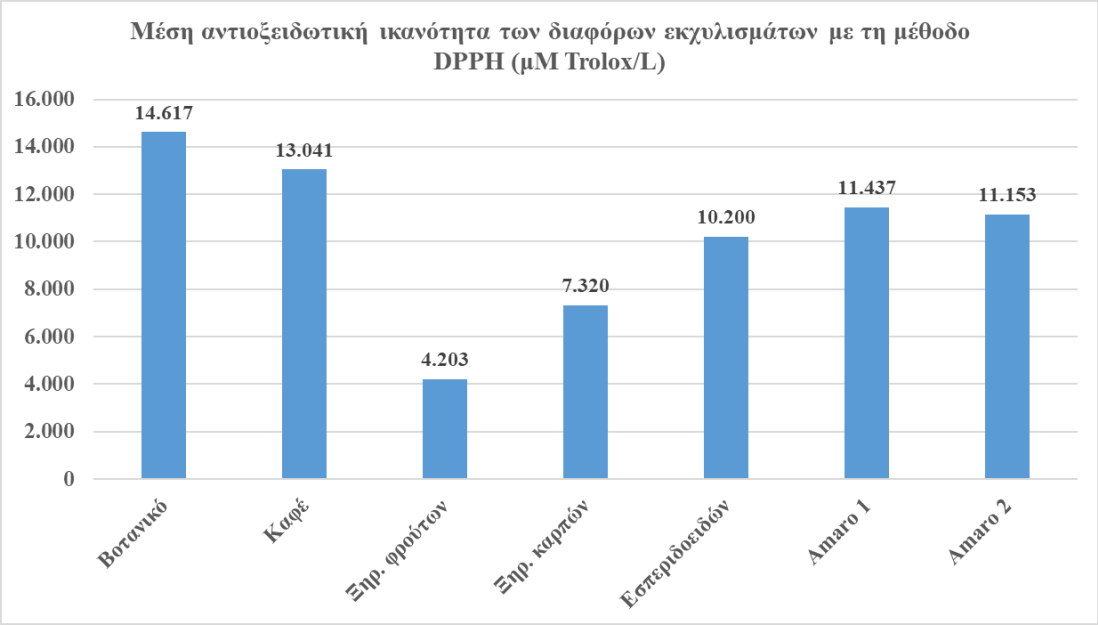


Γράφημα 3.2. Μέση αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS (mM Trolox/L)

3.1.3. Μέθοδος DPPH

Πίνακας 3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH (μM Trolox/L)

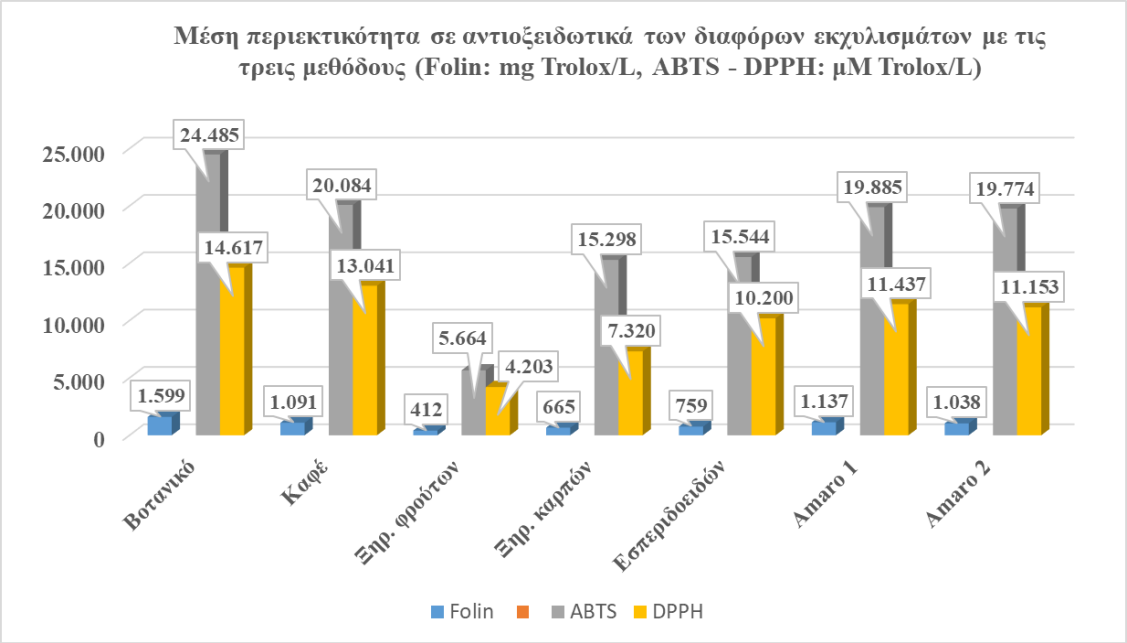
Εκχύλισμα	**Δείγμα**	**Απορρόφηση 517,0 nm**	**Συγκέντρωση (μM Trolox)**
Βοτανικό	1	0,431	14.745,03
	2	0,434	14.596,11
	3	0,435	14.508,75
	Μ.Ο.	0,433	14.616,63
Καφέ	1	0,46	13.114,53
	2	0,455	13.414,44
	3	0,469	12.593,28
	Μ.Ο.	0,461	13.040,76
Ξηρ. φρούτων	1	0,619	4.189,80
	2	0,623	3.979,02
	3	0,615	4.440,60
	Μ.Ο.	0,619	4.203,15
Ξηρ. καρπών	1	0,558	7.637,46
	2	0,573	6.759,96
	3	0,559	7.561,74
	Μ.Ο.	0,563	7.319,73
Εσπεριδοειδών	1	0,516	9.968,67
	2	0,513	10.141,83
	3	0,507	10.489,62
	Μ.Ο.	0,512	10.200,03
Amaro 1	1	0,481	11.925,93
	2	0,5	10.895,40
	3	0,489	11.490,00
	Μ.Ο.	0,49	11.437,11
Amaro 2	1	0,501	10.809,69
	2	0,491	11.374,98
	3	0,493	11.273,55
	Μ.Ο.	0,495	11.152,74



Γράφημα 3.3. Μέση αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH (μM Trolox/L)

Πίνακας 3.4. Μέση περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά των διαφόρων εκχυλισμάτων με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH

α/α	**Δείγμα**	**Folin** (mg Trolox/L)	**ABTS** (μM Trolox/L)	**DPPH** (μM Trolox/L)
1	Βοτανικό	1.599,36	24.484,74	14.616,63
2	Καφέ	1.090,98	20.084,01	13.040,76
3	Ξηρ. φρούτων	411,75	5.663,55	4.203,15
4	Ξηρ. καρπών	664,98	15.297,54	7.319,73
5	Εσπεριδοειδών	758,82	15.544,47	10.200,03
6	Amaro 1	1.136,76	19.885,47	11.437,11
7	Amaro 2	1.038,12	19.773,69	11.152,74



Γράφημα 3.4. Μέση περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά των διαφόρων εκχυλισμάτων με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH

3.2. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

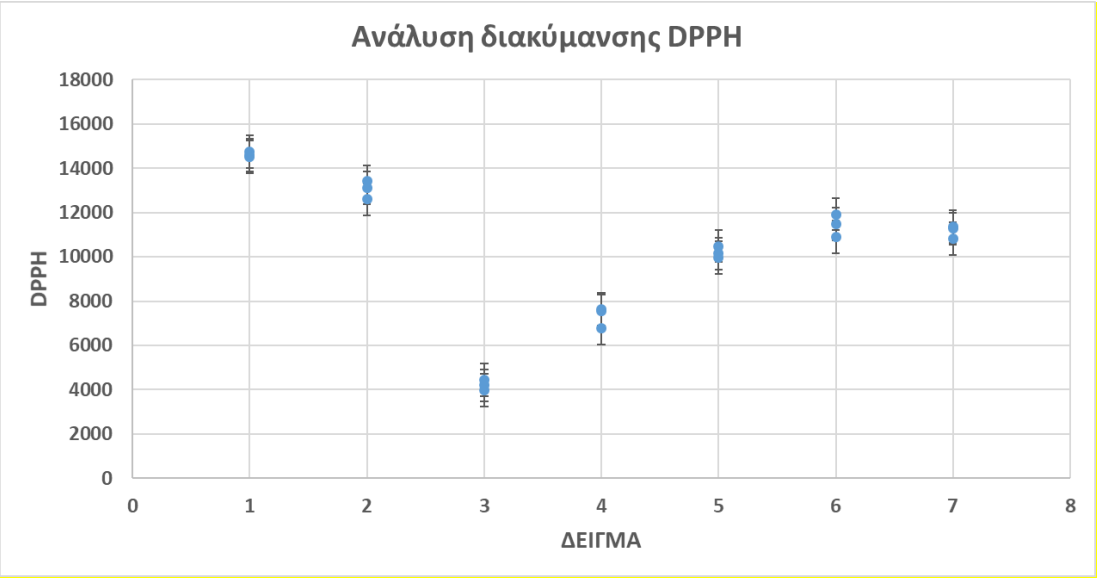
3.2.1. Στατιστικός έλεγχος DPPH

3.2.1.2. Έλεγχος κανονικότητας DPPH

ΟΚ. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού οι τιμές p είναι 0,084 και 0,075 αντίστοιχα (p>0,05), άρα οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή. (Πίνακας 1 παραρτήματος).

3.2.1.3. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος DPPH

ΟΚ. Η τιμή p είναι 0,319 (>0,05), που αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα. (Πίνακας 2 παραρτήματος).



Γράφημα 3.5. Ανάλυση διακύμανσης

Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο DPPH

3.2.1.4. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) Μέθοδος DPPH

ΟΚ. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων ορών ανάμεσα στα δείγματα, p = 0,000 (<0,05). Αυτό σημαίνει ότι οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους, όπως ήταν αναμενόμενο. (Πίνακας 3 παραρτήματος).

3.2.1.5. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος DPPH

Για τον εντοπισμό των διαφορών των δειγμάτων εφαρμόστηκε το Tukey test (Πίνακας 4 παραρτήματος). Δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Οι τιμές p ήταν αντίστοιχα για την ομαδική κατάταξη των δειγμάτων 1 (1,0), 2 (1,0), 3 (0,068), 4 (0,953), 5 (1,000), 6 (1,0). Όπως προκύπτει από τον έλεγχο, τα δείγματα κατατάσσονται με αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής ικανότητας ως εξής: $1 < 2 < 3 \leq 4 = 5 < 6 < 7$.

3.2.1.6. Μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis - Μέθοδος DPPH

Επειδή δεν είχαμε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ανά ποτό (n=3), δεν πληρείται η προϋπόθεση της κανονικότητας και ως εκ τούτου τα δείγματα συγκρίθηκαν και με μη παραμετρική ανάλυση (Kruskal-Wallis).

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας ($p=0.004$) αλλά μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού ($p=0.008$). Κοντά σε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν και τα εκχυλίσματα: ξηρών φρούτων - καφέ ($p=0.064$) και ξηρών καρπών - βοτανικού ($p=0.064$) αλλά αφού δεν περνούν την δοκιμασία δεν μπορούμε παρά να τα θεωρήσουμε παρόμοιας αντιοξειδωτικής ικανότητας.

3.2.2. Στατιστικός έλεγχος Folin - Ciocalteu

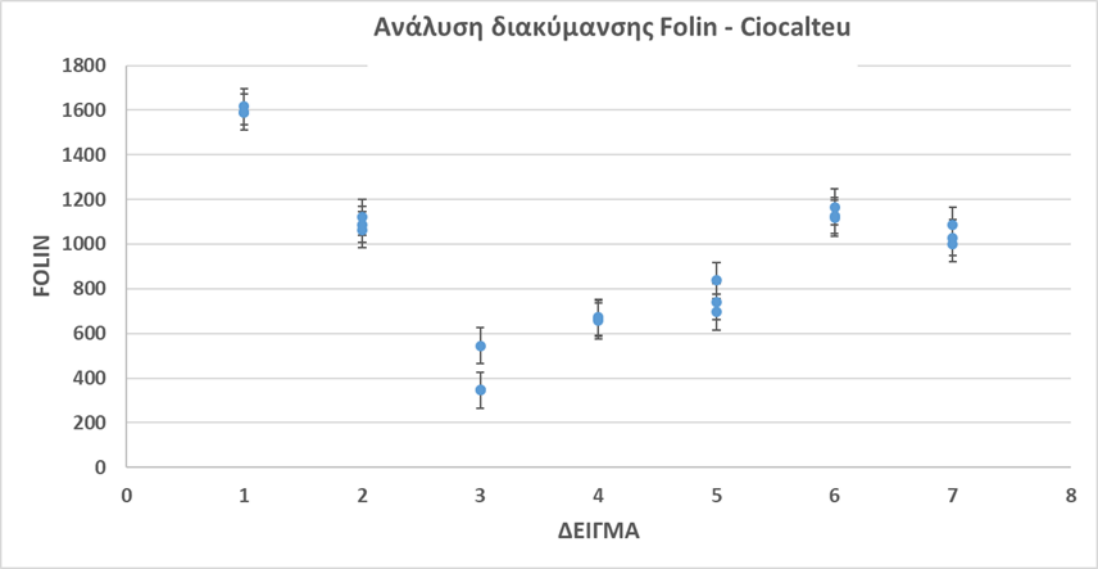
3.2.2.1. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk. - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

OK. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού οι τιμές p είναι 0,200 και 0,187 αντίστοιχα ($p>0,05$), άρα οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή.

OK. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού οι τιμές p είναι 0,084 και 0,075 αντίστοιχα ($p>0,05$), άρα οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή. (Πίνακας 5 παραρτήματος).

3.2.2.2. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

Not OK. Η τιμή p είναι 0,004 (<0,05) που αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και δεν υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα. (Πίνακας 6 παραρτήματος).



Γράφημα 3.6. Ανάλυση διακύμανσης

Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο Folin - Ciocalteu

3.2.2.3. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

ΟΚ. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων ορών ανάμεσα στα δείγματα, p = 0,000 (<0,05). Αυτό σημαίνει ότι οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους, όπως ήταν αναμενόμενο. (Πίνακας 7 παραρτήματος).

3.2.2.4. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

Για τον εντοπισμό των διαφορών των δειγμάτων εφαρμόστηκε το Tukey test (Πίνακας 8 Παραρτήματος). Δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά (p>0,05). Οι τιμές p ήταν αντίστοιχα για την ομαδική κατάταξη των δειγμάτων 1 (1,000), 2 (0,430), 3 (0,376), 4 (1,000). Όπως προκύπτει από τον έλεγχο, τα δείγματα κατατάσσονται με αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής ικανότητας ως εξής: 1 < 2 = 3 < 4 = 5 = 6 < 7.

3.2.2.5. Μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας (p=0.004), αλλά μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού (p=0.008). Κοντά σε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν και τα εκχυλίσματα: ξηρών καρπών - βοτανικού (p=0.064) και ξηρών φρούτων - Amaro 1 (p=0.080), αλλά αφού δεν περνούν την δοκιμασία δεν μπορούμε παρά να τα θεωρήσουμε παρόμοιας αντιοξειδωτικής ικανότητας.

3.2.3. Στατιστικός έλεγχος ABTS

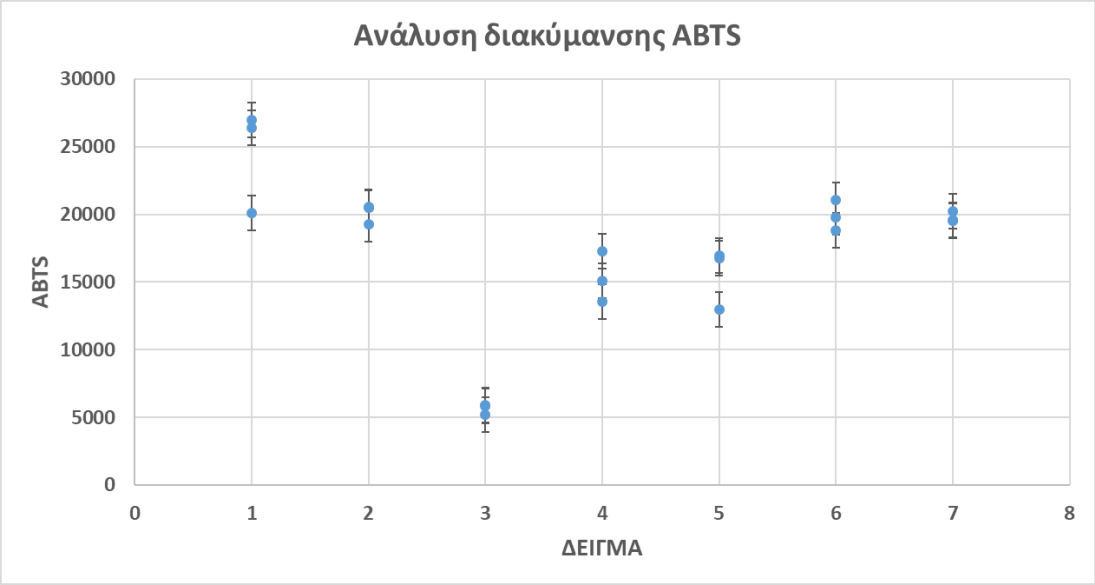
3.2.3.1. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk - Μέθοδος ABTS

OK. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, αφού η τιμή p είναι 0,076 (p>0,05) με Kolmogorov-Smirnov[a] , άρα οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή.

NOT OK. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού η τιμή p είναι 0,020 (p<0,05) με Shapiro-Wilk, άρα οι τιμές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. (Πίνακας 9 παραρτήματος).

3.2.3.2. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος ABTS

Not OK. Η τιμή p είναι 0,005 (<0,05), που αυτό σημαίνει ότι ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και ότι δεν υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα. (Πίνακας 10 παραρτήματος).



Γράφημα 3.7. Ανάλυση διακύμανσης

Όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων για την μέθοδο ABTS

3.2.3.3. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος ABTS

OK. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων ορών ανάμεσα στα δείγματα, p = 0,000 (<0,05). Αυτό σημαίνει ότι οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους, όπως ήταν αναμενόμενο. (Πίνακας 11 παραρτήματος).

3.2.3.4. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος ABTS

Για τον εντοπισμό των διαφορών των δειγμάτων εφαρμόστηκε το Tukey test (Πίνακας 12 παραρτήματος). Δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Οι τιμές p ήταν αντίστοιχα για την ομαδική κατάταξη των δειγμάτων 1 (1,000), 2 (0,087), 3 (0,094). Όπως προκύπτει από τον έλεγχο, τα δείγματα κατατάσσονται με αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής ικανότητας ως εξής: $1 < 2 = 3 \leq 4 = 5 = 6 \leq 7$.

3.2.3.5. Μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis - Μέθοδος ABTS

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας ($p=0.01$) αλλά μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού ($p=0.021$), όπως έδειξε η σύγκριση Posthoc.

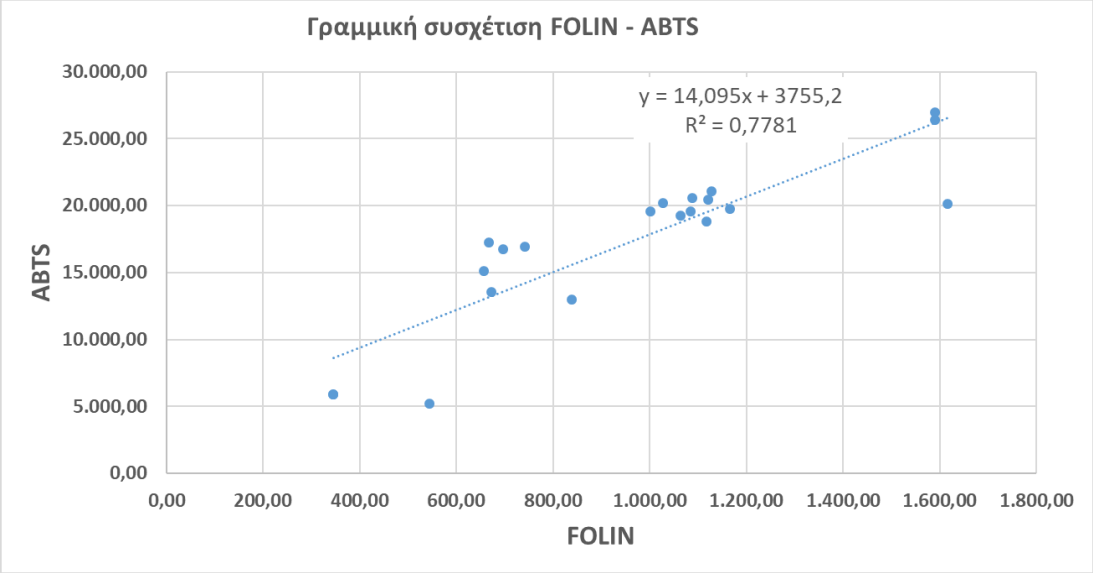
Πίνακας 3.5. Συνοπτικά στατιστικά (Κανονικότητας, Ομοιογένειας διακύμανσης, Σύγκρισης δειγμάτων, Κατάταξης) για τις μεθόδους DPPH, Folin - Ciocalteu και ABTS

Μέθοδος / Δοκιμασία	**Κανονικότητας** Kolmogorov-Smirnov[a] / Shapiro-Wilk	**Ομοιογένειας διακύμανσης** Levene	**Σύγκριση δειγμάτων** ANOVA	**Κατάταξη** Tukey
DPPH n = 3	OK. ($p>0,05$) κανονική κατανομή τιμών	OK. ($p>0,05$) υπάρχει ομοιογένεια	OK. ($p>0,05$) Οι Μ.Ο. δεν είναι ίσοι μεταξύ τους	($p>0,05$) $1 < 2 < 3 \leq 4 = 5 < 6 < 7$
Folin - Ciocalteu n = 3	OK. ($p>0,05$) κανονική κατανομή τιμών	Not OK. ($p<0,05$) δεν υπάρχει ομοιογένεια	OK. ($p>0,05$) Οι Μ.Ο. δεν είναι ίσοι μεταξύ τους	($p>0,05$) $1 < 2 = 3 < 4 = 5 = 6 < 7$
ABTS n = 3	(K.S.) OK. ($p>0,05$) κανονική κατανομή τιμών (S.W.) NOT OK. ($p<0,05$) Μη κανονική κατανομή τιμών	$p = 0,005$ Not OK. ($p<0,05$) δεν υπάρχει ομοιογένεια	OK. ($p>0,05$) Οι Μ.Ο. δεν είναι ίσοι μεταξύ του	($p>0,05$) $1 < 2 = 3 \leq 4 = 5 = 6 \leq 7$

3.2.4. Γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των μεθόδων ABTS, Folin - Ciocalteu και DPPH

3.2.4.1. Γραμμική συσχέτιση ABTS και Folin - Ciocalteu

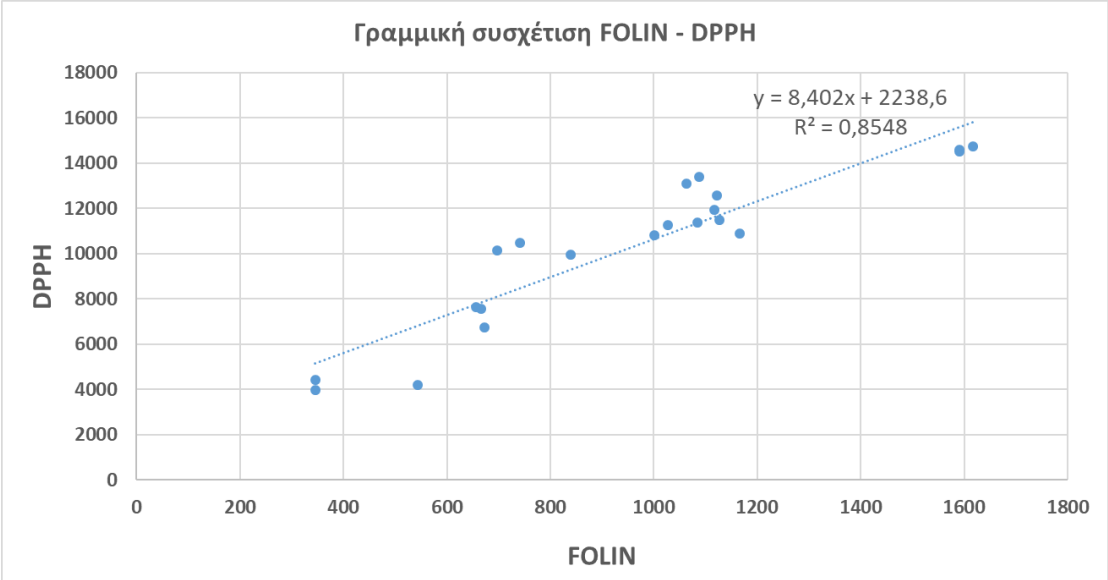
Υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά (p <0,05) και θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS και Folin - Ciocalteu με συντελεστή συσχέτισης (R-Sq = 77,8 %). (Πίνακας 13 παραρτήματος).



Γράφημα 3.8. Γραμμική συσχέτιση ABTS και Folin - Ciocalteu

3.2.4.2. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu και DPPH

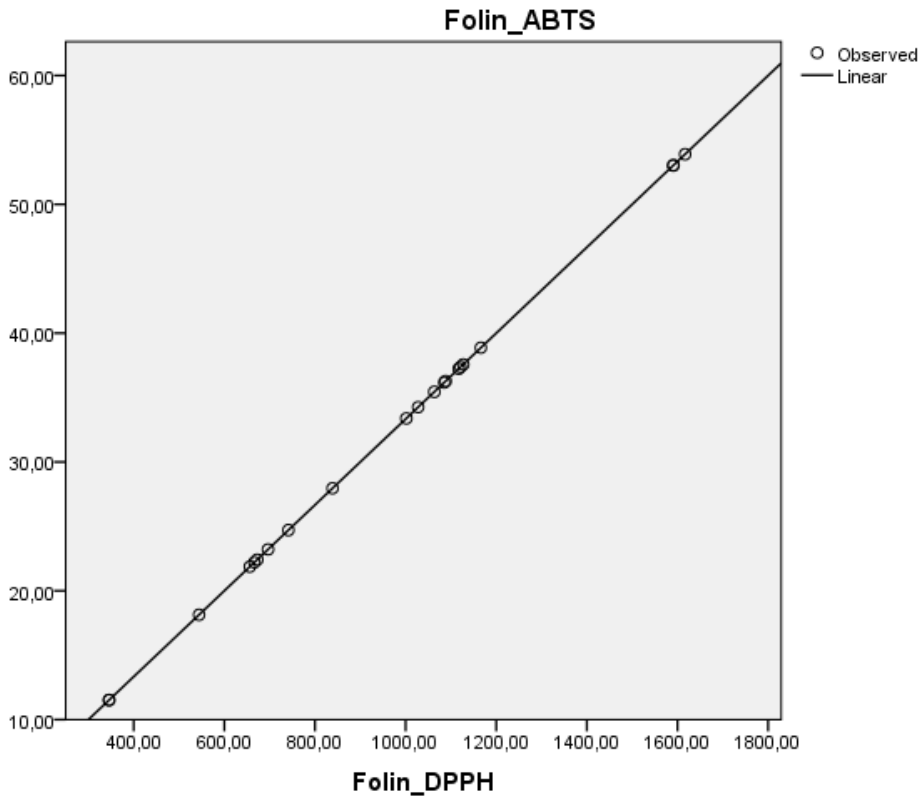
Υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά αφού p = 0,000 (<0,05) και θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων DPPH και Folin - Ciocalteu με συντελεστή συσχέτισης (R-Sq = 85,5 %). (Πίνακας 14 παραρτήματος).



Γράφημα 3.9. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu και DPPH

3.2.4.3. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.01 level)

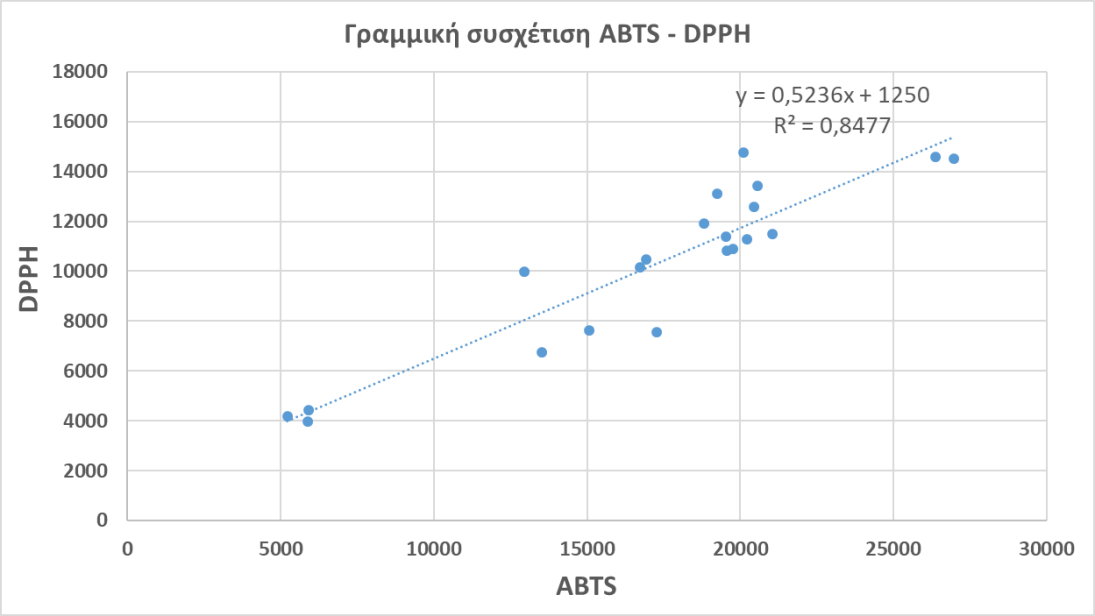
Τα αποτελέσματα δείχνουν (Correlation 1,000**) ότι υπάρχει ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH σε επίπεδο σημαντικότητας (0.01 level). (Πίνακας 15 παραρτήματος)



Γράφημα 3.10. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.01 level)

3.2.4.4. Γραμμική συσχέτιση DPPH - ABTS

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού p = 0,000 (<0,05) και ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS - DPPH με συντελεστή συσχέτισης (R-Sq = 84,8 %). (Πίνακας 16 παραρτήματος).



Γράφημα 3.11. Γραμμική συσχέτιση DPPH και ABTS

Πίνακας 3.6. Γραμμικές συσχετίσεις Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.05 - 0.01 level)

Μέθοδοι	**Επίπεδο σημαντικότητας**	**Συντελεστής συσχέτισης**	**P**
ABTS - Folin-Ciocalteu	0.05	0,778	0,000
DPPH - Folin-Ciocalteu	0.05	0,855	0,000
ABTS - Folin-Ciocalteu	0.01	1,000	0,000
DPPH - Folin-Ciocalteu	0.01	1,000	0,00
DPPH - ABTS	0.05	0,848	0,000

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων με την μέθοδο Folin - Ciocalteu, κυμαίνεται από 411,75 - 1.599,36 mg Trolox/L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2), (6 - 7) να κυμαίνονται από 1.090,98 - 1.599,36 mg/L και τα εκχυλίσματα (3-5) από 411,75 - 758,82 mg/L.

Σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, με τη δοκιμασία ABTS αυτή κυμαίνεται από 5.663,55 - 24.484,74 μM Trolox /L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2 και 4 - 7) να κυμαίνονται από 15.297,54 - 24.484,74 μM/L και το εκχύλισμα (3) 5.663,55 mg/L.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, σύμφωνα με τη δοκιμασία DPPH κυμαίνεται από 5.663,55 - 14.616,63 μM Trolox /L, με τα εκχυλίσματα (1 - 2), (5 - 7) να κυμαίνονται από 10.200,03 - 14.616,63 μM/L και τα εκχυλίσματα (3 - 4) από 4.203,15 - 7.319,73 mg/L.

Επειδή δεν είχαμε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ανά ποτό (n=3) και δεν πληρείται η προϋπόθεση της κανονικότητας, τα δείγματα συγκρίθηκαν με μη παραμετρική ανάλυση (Kruskal-Wallis).

Όπως προκύπτει από τον έλεγχο Kruskal-Wallis της δοκιμασίας Folin - Ciocalteu, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας (p=0.004), μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού (p=0.008). Κοντά σε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν και τα εκχυλίσματα: ξηρών καρπών - βοτανικού (p=0.064) και ξηρών φρούτων - Amaro 1 (p=0.080), αλλά αφού δεν περνούν την δοκιμασία δεν μπορούμε παρά να τα θεωρήσουμε παρόμοιας αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Τα αποτελέσματα του στατιστικού ελέγχου Kruskal-Wallis της δοκιμασίας ABTS, έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας (p=0.01) μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού (p=0.021), όπως έδειξε η σύγκριση Posthoc.

Ομοίως, και με τη δοκιμασία DPPH, φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας (p=0.004) μόνο μεταξύ των εκχυλισμάτων ξηρών φρούτων - βοτανικού (p=0.008). Κοντά σε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν και τα εκχυλίσματα: ξηρών φρούτων - καφέ (p=0.064) και ξηρών καρπών - βοτανικού (p=0.064), αλλά αφού δεν περνούν την δοκιμασία δεν μπορούμε παρά να τα θεωρήσουμε παρόμοιας αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Διαπιστώθηκε η διαφορετικότητα που παρουσιάζουν οι μέθοδοι μεταξύ τους. Οι αναμενόμενες διαφορές μεταξύ των μεθόδων πιθανώς σχετίζονται με τα διαφορετικά είδη των αντιοξειδωτικών μορίων που είναι ευαίσθητη η κάθε μέθοδος, πέραν του κοινού τους πεδίου.

Κατά κύριο λόγο, η αντιοξειδωτική δράση πολλών φυτικών ειδών οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις (Alzahrani 2012) και επίσης είναι παραδεκτό ότι όχι μόνο η ποσότητα, αλλά και η ποιότητα - χημική σύνθεση των πολυφαινολών είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση (Stagos 2012). Επίσης, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι εκτός από τις φαινολικές ενώσεις και άλλα μόρια θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική δράση, όπως μέταλλα, οργανικά οξέα, βιταμίνες (C, E κ.α.), αμινοξέα (προλίνη, γλυκίνη, γλουταμικό οξύ κ.α.) και πρωτεΐνες (Rodríguez 2012), (Pérez 2007).

Σε ότι αφορά τον συντελεστή συσχέτισης, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) και θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS και Folin - Ciocalteu καθώς και της DPPH με την Folin - Ciocalteu γεγονός αναμενόμενο και σύμφωνο με το σύνολο των αποτελεσμάτων από αντίστοιχους προσδιορισμούς σε τρόφιμα, αλλά και τη διεθνή βιβλιογραφία.

Πιο ισχυρή (R-Sq = 85,5 %) είναι η συσχέτιση που αναπτύσσεται μεταξύ των μεθόδων Folin - Ciocalteu και DPPH ($p = 0,000$).

Επίσης ισχυρή, αλλά λιγότερο από την προηγούμενη (R-Sq = 77,8 %) είναι η συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS και Folin - Ciocalteu ($p = 0,000$).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρή γραμμική συσχέτιση (Correlation $1,000^{**}$) μεταξύ των μεθόδων Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH σε επίπεδο σημαντικότητας (0.01 level). Επίσης, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού $p = 0,000$ ($<0,05$) και ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων ABTS - DPPH με συντελεστή συσχέτισης (R-Sq = 84,8 %).

Στη μοναδική σχετική έρευνα που βρήκαμε, η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λικέρ με τα ερυθρά κρασιά αποκαλύπτει εκπληκτικά χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στα περισσότερα λικέρ. (Staško 2007) Με το DPPH, τα περισσότερα από τα λικέρ (με εξαίρεση το Noble Cherry - Γερμανία με 0,82 $mmol/l^{-1}$). παρουσίασαν τιμές DPPH στην περιοχή 0,04 - 0,58 $mmol/l^{-1}$, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για ερυθρούς οίνους κυμαίνονταν μεταξύ 7,7 - 8,8 $mmol/l^{-1}$. Ακριβώς παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και με το ABTS με συντελεστή συσχέτισης r DPPH / ABTS = 0.9938.

Οι περιορισμοί της έρευνας έχουν να κάνουν με τους περιορισμούς των μεθόδων αντιοξειδωτικής ικανότητας και την ανυπαρξία μιας κοινά αποδεκτής μεθόδου υψηλής

ευαισθησίας για όλα τα αντιοξειδωτικά και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται συνήθως ένας συνδυασμός μεθόδων, ώστε να καλύψουμε ικανοποιητικά όσο το δυνατόν μεγαλύτερο φάσμα αντιοξειδωτικών μορίων.

Σχετικά με το «Amaro Montechristo» και τα συναφή πιο στοχευμένα μελλοντικά εκχυλίσματα, πρόκληση αποτελεί, η επαναδιερεύνηση του φαινολικού και ολικού αντιοξειδωτικού φορτίου τους με τη χρήση και άλλων μεθόδων και των πιθανών θεραπευτικών επιδράσεων στο άσθμα που υπάρχουν ήδη ενδείξεις (οι οποίες πρέπει να επιβεβαιωθούν με τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές), καθώς και σε άλλες νόσους σχετικές με το οξειδωτικό στρές.

Με βάση την βιβλιογραφία και την σύστασή τους τα εν λόγω εκχυλίσματα πιθανότατα διαθέτουν αντιμικροβιακή και αντιπαρασιτική δράση που θα ήταν δόκιμο να διερευνηθεί εκτός από τις σχετικές δοκιμασίες και με κυτταροκαλλιέργειες.
Ενδιαφέρον επίσης θα παρουσίαζε και η διευκρίνιση του φαινολικού προφίλ των δειγμάτων, η περιεκτικότητά τους σε βιταμίνες, μέταλλα, γλουταθειόνη, καφεΐνη, αμινοξέα και ανοσοδιαμορφωτικά μόρια όπως αργινίνη, γλουταμίνη και νουκλεοτίδια.

Στόχος του παρόντος πονήματος ήταν να συμβάλει στη διαφώτιση ενός πεδίου, αυτό των βοτανικών ποτών - ελιξιρίων που ακόμα παραμένει «άγνωστη γη». Η διερεύνηση του φαινολικού και ολικού αντιοξειδωτικού φορτίου και άλλων amaro θα ήταν επίσης μια καλή προοπτική, καθώς οι σχετικές έρευνες είναι ελάχιστες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

Abu-Shakra, M. and Shoenfeld Y. «"Parasitic infection and autoimmunity," Autoimmunity, vol. 9, no. 4, pp. 337–344.» 1991.

Allison, M., Fearon D. «"Enhanced immunogenicity of aldehyde bearing antigens: a possible link between innate and adaptive immunity," European Journal of Immunology, vol. 10, pp. 2881–2887.» 2000.

Alzahrani, HA, Boukraa L, Bellik Y, Abdellah F, Bakhotmah BA, Kolayli S and Sahin H. «Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. Glob J Health Sci 4: 191-196.» 2012.

Andueza, S., Manzocco L., Paz de Peña M., Cid C. «Nicoli C. Caffeic acid decomposition products: Antioxidants or pro-oxidants? Food Res. Int. 42, 51–55.» 2009.

An-Na Li, Sha Li, Yu-Jie Zhang, Xiang-Rong Xu, Yu-Ming Chen and Hua-Bin Li. «Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. Nutrients, doi:10.3390/nu6126020.» 2014.

Anu-Rahal, A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty, and K. Dhama. «Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. doi.org/10.1155/2014/.» 2014.

Arno, M.B. «Some methodological problems in the determination of antioxidant acitivity using chromogen radicals: a practical case. Trends Food Sci. Technol. 419-421.» 2000.

Ashwell, R. Ndhlala, Mack Moyo and Johannes Van Staden. «Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?» doi:10.3390/molecules15106905, 2010: 6905-6930;.

Aubert, G., Lansdorp P. «"Telomeres and aging," Physiological Reviews, vol. 88, no. 2, pp. 557–579.» 2008.

Aw-Tak, T. «"Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine," American Journal of Clinical Nutrition, vol. 70, no. 4, pp. 557–565.» 1999.

Babbar, N., Gerner E. «"Targeting polyamines and inflammation for cancer prevention," Recent Results in Cancer Research, vol. 188, pp. 49–64.» 2011.

Babior, B. M. «"NADPH oxidase: an update," Blood, vol. 93, no.5, pp. 1464–1476.» 1999.

Bagchi, D., Sen C.K., Bagchi M., Atalay M. «Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. Biochem. Moscow 69, 75–80.» 2004.

Ballinger, S. W. «"Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease," Free Radical Biology and Medicine, vol. 38, no. 10, pp. 1278–1295.» 2005.

Balu, M., Sangeetha P., Murali, G., Panneerselvam C. «Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. Brain Res. Bull. 68, 469-473.» 2006.

Bandyopadhyay, P., Ghosh A., Ghosh C. «Recent developments on polyphenol-protein interactionsEffects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. Food Funct. 3, 592–605.» 2012.

Bast A., Haenen, G.R.M.M. «The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environ. Toxicol. Toxicology. 189, 41-54.» 2003.

Bast, A., Haenen G., van den Berg R., van den Berg H. «Antioxidant effects of carotenoids. Int. J. Vit. Nutr. Res. 68, 399.» 1998.

Baydar, N., Sagdic O., Ozkan G., Cetin S. «Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (Vitis vinifera L.) seed extracts. Int. J. Food Sci. Technol. 41, 799–804.» 2006.

Beatty, S., Koh H., Phil M., Henson D., Boulton M.,. «"The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration," Survey of Ophthalmology, vol. 45, no. 2, pp. 115–134.» 2000.

Becker, E.M., Nissen L.R., Skibsted, L.H. «Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Eur. Food Res. Technol. 219, 561-571.» 2004.

Beckman, C. «Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?» Physiol Mol Plant Pathol, Volume 57, https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.02, 2000: p. 101 – 110.

Bejma, J., Ramires R., Ji L. «"Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver," Acta Physiologica Scandinavica, vol.169, no. 4, pp. 343–351.» 2000.

Bentabol-Manzanares, A, Hernández García Z, Rodríguez Galdón B, Rodríguez Rodríguez E and Díaz Romero C. «Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. Food Chem 126: 664 -672.» 2011.

Biewenga, G., Haenen, G.R.M.M., Bast A. «The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen. Pharmacol. 29, 315.» 1997.

Bios, M.S. « Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199-1200.» 1958.

Blackburn, A., Coggan M., Shield A. et al. «Glutathione transferase kappa deficiency causes glomerular nephropathy without overt oxidative stress," Laboratory Investigation, vol. 91,no. 11, pp. 1572–1583.» 2011.

Cai, Y, Evans FJ, Roberts MF, Phillipson JD, Zenk MH, Gleba YY. «Polyphenolic compounds from Croton Lechleri. Phytochemistry 30:2033-2040.» 1991.

Calderon, P., H. Sipe, W. Flitter, R. Mason, M. Roberfroida. «N-Acyl dehydroalanines scavenge oxygen radicals ad inhibit in vitro free radical mediated processes,Chemico-Biological Interactions ,73 ,77-88.» 1990.

Carlsen, M., Halvorsen B., Holte K., Bohn S., Dragland S., Sampson L. et al. «The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. Department of Nutrition, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Norway. Nutrition Journal.» 2010.

Casciola-Rosen, L., Wigley F., Rosen A.,. «"Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis," Journal of Experimental Medicine, vol. 185, no. 1, pp. 71–79.» 1997.

Cheng, G., Z. Cao, X., E. Meir, J. Lambeth. «"Regulation of capacitative Ca2+ influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease," Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 42, pp. 26471–26478.» 2001.

Cherubini, A., Ruggiero C., Polidori M., Mecocci P. «"Potential markers of oxidative stress in stroke," Free Radical Biology and Medicine, vol. 39, no. 7, pp. 841–852.» 2005.

Cho, Y., Moon H. « "The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma," Allergy, Asthma and Immunology Research, vol. 2, no. 3, pp. 183–187.» 2010.

Cook, N.C., Samman, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutr. Biochem p. 7, 66-76. 1996.

Csillag, A., Boldogh I., Pazmandi K. et al. «"Pollen-induced oxidative stress influences both innate and adaptive immune responses via altering dendritic cell functions," Journal of Immunology, vol. 184, no. 5, pp. 2377–2385.» 2010.

D. Stagos, Soulitsiotis N., Tsadila C., Papaeconomou S., Arvanitis C, et al. «Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. International journal of molecular m 726 edicine 42: 726-734.» 2018.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. «Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. Int. J. Mol. Sci., 11, 1321–1342. doi: 10.3390/ijms11041321.» 2010.

Daglia, M. «Polyphenols as antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol., Τόμος 23, pp. 174-181.» 2012.

Dalle-Donne, I., Scaloni A., Giustarini D. et al. « "Proteins as biomarkers of oxidattiv/e/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics," Mass Spectrometry Reviews, vol. 24, no. 1, pp. 55–99.» 2005.

Dasgupta, B., Milbrandt J. «Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 7217–7222.» 2007.

Davalli, P., Rizzi F., Caporali A., Pellacani D., Davoli S., Bettuzzi S., Brausi M., D'Arca D. «Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. Oxid. Med. Cell. Longev 984219.» 2012.

Davalos, A., Coppe J., Campisi J., Desprez P. «"Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression," Cancer andMetastasis Reviews, vol. 29, no. 2, pp. 273–283.» 2010.

Deep, G, Dhiman M, Rao AR, Kale RK. «Chemopreventive potential of Triphala (a composite Indian drug) on Benzo(a)pyrene induced forestomach tumorigenesis in murine tumor model system. J Exp Clin Cancer Res 24:555-563.» 2005.

Deng G., Xu X., Zhang Y., Li D., Gan R., Li H. «Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53, 296–306.» 2013.

Deng, G.F. Xu X.R., Li S., Li, F., Xia E.Q., Li H.B. «Natural sources and bioactivities of resveratrol. Int. J. Modern Biol. Med. 1–20.» 2012.

Desch, S. Schmidt J, Kobler D, Sonnabend M, Eitel I, Sareban M, Rahimi K, Schuler G, Thiele H. «Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. Am. J. Hypertens, Τόμος 23, pp. 97-103.» 2010.

Dillard, C. J. & German, B. J. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. Τόμ. 80, pp. 1744-1756. Sci Food Agric, 2000.

Dorsam, G., M. Taher, K. Valerie, N. Kuemmerle, J. Chan, R. Franson. «"Diphenyleneiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A(2) in rat mesangial cells," Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 292, no. 1, pp. 271–279.» 2000.

Duraˇckov´a, Z. «"Oxidants, antioxidants and redox stress," in The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy, Z. ˇ Duraˇckov´a and S. Knasm¨uller, Eds., pp. 11–59, SAP, Bratislava, Slovakia.» 2007.

—. «"Some current insights into oxidative stress" Physiological Research, vol. 59, no. 4, pp. 459–469.» 2010.

Duthie, G. G., Gardner, P. T. & Kyle, J. A. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. Proc. Nutr. Soc., Τόμος 62, p. 599–603. 2003.

Dvorakova, M., B. H¨ohler, R. Vollerthun, T. Fischbach, and W. Kummer,. «"Macrophages: a major source of cytochrome b558 in the rat carotid body," Brain Research, vol. 852, no. 2,pp. 349–354.» 2000.

Dwenger, A, Funck M, Lueken B, Schweitzer G, Lehmann U. «Effect of ascorbic acid on neutrophil functions and hypoxanthine/xanthine oxidase-generated, oxygen-derived Clin Biochem.(4):187–91. radicals. Eur J Clin Chem radicals. Eur J Clin Chem.» 1992.

Erejuwa, OO, Sulaiman SA, Wahab MS. «Honey–a novel antidiabetic agent. Int J Biol Sci 8: 913–934.» 2012 .

Erel, O. A novel automated measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. J. Clinical Biochemistry, 37, 277-285. 2004.

Fan, P., Lou H. «Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. Mol. Cell. Biochem. 267, 67–74.» 2004.

Ferrali, M., Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M.,. «Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett, Τόμος 416, pp. 123-129. doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01182-4.» 1997.

Filippo, C., Cuzzocrea S., Rossi F., Marfella R., D'Amico M. «"Oxidative stress as the leading cause of acutemyocardial infarction in diabetics," Cardiovascular Drug Reviews, vol.24, no. 2, pp. 77–87.» 2006.

Folin, O., Denis, W. «On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem. 73, 627-650. .» 1927.

Forester, S., Waterhouse A. «Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. J. Agric. Food Chem. 56, 9299–9304.» 2008.

Fu, L., Xu B., Xu X., Gan R., Zhang Y., Xia E., Li H. «Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chem. 129, 345–350.» 2011.

Fulle, S., Pietrangelo T., Mancinelli R., Saggini R., Fan`o G. «“Specific correlations betweenmuscle oxidative stress and chronic fatigue syndrome: a working hypothesis,” Journal of Muscle Research and Cell Motility, vol. 28, no. 6, pp. 355–362.» 2007.

Gandy, S., Buse M., Crouch R. «“Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs,” Journal of Clinical Investigation, vol. 70, no. 3, pp. 650–658.» 1982.

Garcia-Alonso, J.M.U.E., Ros, G., Vidal-Guevara, M.L., Periago, M.J. «Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. Nutr. Res, 26, 330–339.» 2006.

Geiszt, M., A. Kapus, K. N´emet, L. Farkas, and E. Ligeti,. «“Regulation of capacitative Ca2+ influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease,” Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 42, pp. 26471–26478.» 1997.

Genichi Okamoto, Fumitaka Hayase & Hiromichi Kato. «Scavenging of Active Oxygen Species by Glycated. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. https://doi.org/10.1271/bbb.56.928.» 2014.

Giftson, J.S., Jayanthi S., Nalini N. «Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. Invest. New Drugs 251–259.» 2010.

Gliszczynska-Swiglo A., Ciska E., Pawlak-Lemanska K., Chmielewski J., Borkowski T., Tyrakowska B. «Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. Food Addit. 23, 1088–1098. DOI: 10.1080/02652030600887594.» 2006.

Gliszczynska-Swiglo, A.A.G.A., Tyrakowska, B. «Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. J. Food Sci., 68, 1844–1849. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12340.x.» 2003.

Groff, J., Gropper S. « Advanced Nutrition and Human Metabolism Wadsworth Tompson Learning.» 2000.

Guohua, G., Emin S., Ronald L. «“Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships,” Free Radical Biology and Medicine, vol. 22, no. 5, pp. 749–760.» 1997.

Gutteridge, J.M. Halliwell, B. «Antioxidants: Molecules, medicines and myths.Biochem. Biophys. Res. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071.» 2010: p. 393, 561-564.

Hagen, T. «“Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process,”Antioxidants and Redox Signaling, vol. 5, no. 5,pp. 503–506.» 2003.

Halliwell B, Gutteridge J.,. «Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, UK, 3rd edition.» 2007.

Halliwell, B. «“Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? Whatdowe learn fromcell culture andin vivo studies?” Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 476, no. 2, pp. 107–112.» 2008.

—. «The antioxidant paradox. Lancet 355, 1179.» 2000.

Harman, D. «“Aging: overview,” Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 928, pp. 1–21.» 2001.

Haslam, E. «Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press.» 1998.

Hayase, F., Hirashima S., Okamoto G., Kato H. «"The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology," ed. by P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrell, and R. Liardon, Adv. in Life Sci., Birkhauser Verlag, Basel, pp. 361-366.» 1990.

Heim, K., Tagliaferro AR, Bobilya DJ. «Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem. 572-584. doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5.» 2002.

Huang, D., Ou B., Prior R. «The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856.» 2005.

Igile, G., Oleszek W., Jurzysta M., Burda S., Fafunso M., Fasanmade A. «“Flavonoids from Vernonia amygdalina and their antioxidant activities,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 42, no. 11, pp. 2445-2448.» 1994.

Illy, E. «The complexity of coffee. Sci Am 286:86-91.» 2002.

Inoue, M., Sato E., Nishikawa M. et al.,. «“Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life,”CurrentMedicinal Chemistry, vol. 10,no. 23,pp. 2495–2505.» 2003.
Ioku, K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J. «“Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers,” Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1234, no. 1, pp. 99–104.» 1995.
Jaganathan SK, Mandal M. «Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. J Biomed Biotechnol 830616.» 2009.
Jaganathan, SK., Mandal, SM, Jana SK, Das S, Mandal M. «Studies on the phenolic profiling, anti-oxidant and cytotoxic activity of Indian honey: in vitro evaluation. Nat Prod Res 24: 1295–1306.» 2010.
Jakeman, P., Maxwell S. «Effect of antioxidant vitamin supplementation on muscle function after eccentric exercise. Eur. J. Appl. Physiol, 67, 426-430.» 1993.
Jang, H.J., Ridgeway S., Kim J. . «Effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on high-fat diet-induced insulin resistance and endothelial dysfunction. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 305, 1444–1451.» 2013.
Ji, LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. «Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. Ann N Y Acad Sci.1067:425–35.» 2006.
Johnson, I.T., Williamson G., Musk S.R. «Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. Nutr. Res. 175–204.» 1994.
Kappus, H., Diplock A. «Tolerance and safety of vitamin E. Free Rad. Biol. Med. 13, 55.» 1992.
Khatami, M. «“Unresolved inflammation: “Immune tsunami” or erosion of integrity in immune-privileged and immuneresponsive tissues and acute and chronic inflammatory diseases or cancer,” Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 11, no. 11, pp. 1419–1432.» 2011.
Kim, H., Son K., Chang H., Kang S. «Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J. Pharmacol. Sci. 96, 229–245.» 2004.
King, R.A. «The Role of Polyphenols in Human Health. In Tannins in Live Stock and Human Nutrition, Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, Brooker, J.D., Ed.; ACIAR: Adelaide, Australia, pp.75-81.» 2000.
Kojo, S. «Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. Curr Med Chem. (8):1041–64.» 2004.
Kondratyuk, T., Pezzuto J. «Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. Pages 46-63. Published Pharmaceutical Biology. https://doi.org/10.3109/13880200490893519.» 2009.
Kregel, K., Zhang H. «“An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations,” American Journal of Physiology, vol. 292, no. 1, pp. R18–R36.» 2007.
Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. «A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008.» 2010.
Kryston, T., Georgiev A., Pissis P., Georgakilas A. « “Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis,” Mutation Research, vol. 711, no. 1-2, pp. 193–201.» 2011.
Kumar, MS, Kirubanandan S, Sripriya R, Sehgal P. «Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. J Surg Res. 144:94-101.» 2008.
Landis-Piwowar, K.R., Huo C., Chen D., Milacic V., Shi G., Chan T.H., Dou Q.P. «A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. Cancer Res. 67, 4303-4310.» 2007.
Larrosa, M., Luceri C., Vivoli E., Pagliuca C., Lodovici M., Moneti G., Dolara P. «Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. Mol. Nutr. Food Res. 53, 1044–1054.» 2009.
Laughton, M., Evans P., Moroney M., Hoult J., Halliwell B. «“Inhibition ofmammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives.» n.d.
—. «“Inhibition ofmammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability,” Biochemical Pharmacology, vol. 42, no. 9, pp. 1673–1681.» 1991.

Laurent, C., Besancon P., Caporiccio B. «Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. Food Chem. 100, 1704–1712.» 2007.

Lavelli, V., Fregapane, G., Salvador, M.D. «Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. J. Agric. Food Chem., 54, 3002–3007. DOI: 10.1021/jf052918l.» 2006.

Leeuwenburgh, C, Heinecke JW. «Oxidative stress and antioxidants in exercise. Curr Med Chem. 829-38.» 2001.

Lemanska, K., Szymusiak H., Tyrkowska B., Zielinski R. et al. « The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radic. Biol. Med. 31, 869-881.» 2001.

Leonard, S., Harris G., Shi X,. « "Metal-induced oxidative stress and signal transduction," Free Radical Biology and Medicine, vol. 37, no. 12, pp. 1921–1942.» 2004.

Levites, Y., Weinreb O., Maor G., Youdim M., Mandel S. «Green tea polyphenol (−)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. J. Neurochem. 78, 1073-1082.» 2001.

Liu, RH. «Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action.» J Nutr. ;134(12):3479S-3485S. doi:10.1093/jn/134.12.3479S. American Society for Nutritional Sciences, 2004.

Lotito, S., Frei, B. «Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. Free Radic Bio Med, Τόμος 41, pp. 1727-1746. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.» 2006 .

Luther, M., Parry, J., Moore, J., Meng, J., Zhang, Y., Cheng, Z., Yu, L.L.L.U. «Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. Food Chem. 104.» 2007.

Manach, C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. «Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79, 727–747.» 2004.

Manna, P, Sinha M, Sil PC. «Phytomedicinal activity of Terminalia arjuna against carbon tetrachloride induced cardiac oxidative stress. Pathophysiology 14:71-78.» 2007.

Mantena, S.K., Baliga M.S., Katiyar S.K. « Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. Carcinogenesis 1682–1691. doi: 10.1093/carcin/bgl030. .» 2006.

Maritim, A., Sanders R., Watkins III J. «"Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review," Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, vol. 17, no. 1, pp. 24–38.» 2003.

Martinez-Dominguez, E. de la Puerta, R., Ruiz-Gutierrez V. «Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. Inflamm. Res. 50, 102–106.» 2001.

McKay, DL, Blumberg JB. «The role of tea in human health: an update. J Am Coll Nutr 21:1-13.» 2002.

Meeran, S., Akhtar S., Katiyar S. «Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. J. Investig. Dermatol. 129, 1258–1270.» 2009.

Meydani, M., Hasan S. «Dietary polyphenols and obesity. Nutrients 2, 737–751.» 2010.

Michailidis, Y, Karagounis LG, Terzis G, Jamurtas AZ, Spengos K, Tsoukas D, et al. «Thiol-based antioxidant supplementation alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery after intense eccentric exercise. Am J Clin Nutr. 98(1):233–45.» 2013.

Middleton, Jr. E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. «The effects of plant flavonoids onmammalian cells: Implication for inflammations, heart disease and cancer. Pharmacol. Rev.» 2008.

Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini N. «Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. J. Agric. Food Chem. 139–147. DOI: 10.1021/jf072304b.» 2008.

Miles, E., Zoubouli P., Calder P. «Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. Nutrition 21, 389–394.» 2005.

Miller MJ, Vergnolle N, McKnight W, Musah R, Davison C, et al. «Inhibition of neurogenic inflammation by the Amazonian herbal medicine sangre de grado. J Invest Dermatol 117:725-730.» 2001.

Miller MJ., MacNaughton W, Zhang X, Thompson J, Charbonnet R, et al. «Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279:G192-G200.» 2000.

Miller, N., Rice-Evans C., Davies M., Gopinathan V., Milner A. «A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 84, 407-412.» 1993.

Morillas-Ruiza, J., Villegas García J., López F., Vidal-Guevara, M., Zafrilla P. «Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. Clin. Nutr. 25, 444-453.» 2006.

Mullen, W., Stewart, A.J., Lean, M.E., Gardner, P., Duthie, G.G., Crozier, A. «Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. J. Agric. Food Chem., 50, 5197–5201.» 2002.

Nathan, C., Shiloh M. «"Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, no. 16, pp.8841–8848.» 2000.

Nijveldt, R. van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. «Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr, Τόμος 74, pp. 418-425. DOI: 10.1093/ajcn/74.4.418.» 2001.

O'Brien, K., Fitzgerald D., Naiken K., Alugupalli K., Rostami A., Gran B.,. «"Role of the innate immune system in autoimmune inflammatory demyelination," Current Medicinal Chemistry, vol. 15, no. 11, pp. 1105–1115.» 2008.

Okayasu, H, Suzuki F, Satoh K, Shioda S, Dohi K, et.al. «Comparison of cytotoxicity and radical scavenging activity between tea extracts and Chinese medicines. Vivo 17:577-581.» 2003.

Olthof, MR, Hollman PC, Katan MB. «Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. J Nutr. 131:66-71.» 2001.

Opie, L., Lecour S. «The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. Eur Heart J. (14)1683-93.» 2007.

Osman, A., Wong K., Hill S., Fernyhough A. « Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340, 597-603. 42.» 2006.

Packer, L. (ed.). Methods in Enzymology Vol 299, Oxidants and Antioxidants (Part A), Academic Press, San Diego. . 1999.

Pandey, K., Rizvi S. «Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Med. Cell. Longev. 2, 270–278.» 2009.

Paolini, M., Cantelli-Forti G., Perocco P., Pedulli G., et al. «Co-carcinogenic effect of β-carotene. Nature 398, 760.» 1999.

Papas, Andreas,. Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health, (5,6), . 1999.

Pecorari, M., Villano, D., Testa, M.F., Schmid, M., Serafini, M. «Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. Mol. Nutr. Food Res. 54 (Suppl. .» 2010.

—. «Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. Mol. Nutr. Food Res. 54 (Suppl.2), S278–S283. doi: 10.1002/mnfr.200900583.» 2010.

Pérez, RA , Iglesias MT, Pueyo E, Gonzalez M and de Lorenzo C. «Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. J Agric Food Chem 55: 360-365.» 2007.

Perez-Fons, L., Garzon M.T., Micol V. «Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) polyphenols on membrane phospholipid order. J. Agric. Food Chem. 58, 161–171.» 2010.

Pérez-Jiménez, J., και συν. «Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and and beverages: Extraction, measurement and expression of results.» 2008.

Perron, N.R., Garcia, C.R., Pinzon, J.R., Chaur, M.N., Brumaghim, J.L. «Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. J. Inorg. Biochem. 105, 745–753. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.02.009.» 2011.

Plumed-Ferrer, C., Vakevainen K., Komulainen H., Rautiainen M., Smeds A., Raitanen J., Eklund P., Willfor S., Alakomi H., Saarela M., von Wright A. «The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. Int. J.Food Microbiol. 164, 99–107.» 2013.

Podsędek, A. «Natural antioxidants and antioxidant activity of Brassica vegetables: A review. LWT-Food Sci. Technol., 40, 1-11. doi:10.1016/j.lwt.2005.07.023.» 2007.

Pokorny, J.,Yanishlieva N.,Gordon M. Antioxidants in Food Practical Applications. 1st Edition. Woodhead Publishing , 2001.

Prior, R., Wu X., Schaich K. «Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 53, 4290-4302.» 2005.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia, Vol 82, pp. 513-523. 2011.

Pryor, W., Stahl W., Rock C. «Beta-carotene: from biochemistry to clinical trials. Nutr. Rev. 58, 39.» 2000.

Puertollano, M., Puertollano E., A. de Cienfuegos G., de Pablo M.,. «"Dietary antioxidants: immunity and host defense," Current Topics in Medicinal Chemistry, vol. 11, no. 14, pp. 1752–1766.» 2011.

Raederstorff, D.D.R.D. «Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: A review. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 79, 152–165.» 2009.

Rakha, MK, Nabil ZI, Hussein AA. «Cardioactive and vasoactive effects of natural wild honey against cardiac malperformance induced by hyperadrenergic activity. J Med Food 11: 91–98.» 2008 .

Rasool, M, Sabina EP. «Antiinflammatory effect of the Indian Ayurvedic herbal formulation Triphala on adjuvant-induced arthritis in mice. Phytother Res. 21:889-894.» 2007.

Ratnam, D., Ankola D., Bhardwaj V., Sahana D., Kumar M. «Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmeumaceutical perspective. J. Control Release. 113,189-207.» 2006.

Rice-Evans, C. A., Gopinathan V. « "Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates," Essays in Biochemistry, vol. 29, pp. 39–63.» 1995.

Ridnour, L., Isenberg J., Espey M., Thomas D., Roberts D., Wink D. «"Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, no. 37, pp. 13147–13152.» 2005.

Rixao, N. Perestrelo R., Marques J.C., Camara J.S. «"Relationship between antioxidant capacity and total".» 2007.

Roberfroid, M. and Calderon, P. Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological System. CRC Press; 1 edition, p. 1,17-19, 1994.

Rodrigo R., Bosco. «Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 142, 317–327.» 2006.

Rodrigo, R. Miranda A., Vergara L. «Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clin. Chim. Acta 412, 410–424.» 2011.

Rodríguez, BA, Mendoza S, Iturriga MH and Castano-T ostado E. «Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. J Food Sci 77: C121-C 127.» 2012.

Roginsky, V., Lissi E. «Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 92, 235-254.» 2005.

Romano, A., Serviddio G., DeMatthaeis A., Bellanti F., Vendemiale G. «"Oxidative stress and aging," Journal ofNephrology, vol. 23, supplement 15, pp. S29–S36.» 2010.

Rosen, G., Britigan B., Halpern H., Pou S. «Free Radicals. Biology and Detection by Spin Trapping, Oxford University Press, New York.» 1999.

Rossi, L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo C., Rotilio G. «Benefits from dietary polyphenols for brain ageing and Alzheimer's disease. Neurochem. Res. 33, 2390–2400.» 2008.

Sakanaka, S., Juneja L., Taniguchi M. «Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. J. Biosci. Bioeng. 90, 81–85.» 2000.

Samuel, S.M., Thirunavukkarasu M., Penumathsa S.V., Paul D., Maulik N. «Akt/FOXO3a/ SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity. J. Agric. .» 2008.

Sander, C., Hamm F., Elsner P., Thiele J.,. «"Oxidative stress in malignantmelanoma and non-melanoma skin cancer," British Journal of Dermatology, vol. 148, no. 5,pp. 913–922.» 2003.

Sandoval, M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, Miller MJ. «Sangre de grado Croton palanostigma induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. J Ethnopharmacol 80:121-129.» 2002.

Sano, A., Uchida, R., Saito, M., Shioya, N., Komori, Y., Tho, Y., Hashizume, N. «Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 53, 174–182.» 2007.

Santangelo, C., Vari R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C., Masella R. «Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Ann. Ist. Super Sanita 43, 394-405.» 2007.

Santhakumar, A.B., Kundur A.R., Fanning K., Netzel M., Stanley R., Singh I. «Consumption of anthocyanin-rich queen garnet plum juice reduces platelet activation related thrombogenesis in healthy volunteers. J. Funct. Food. 11–22.» 2015.

Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H. «Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. J. Agric. Food Chem. 44, 37–41. DOI: 10.1021/jf950190.» 1996.

Scalbert A., Johnson, I. Saltmarsh, M. «Polyphenols: antioxidants and beyond.» Clin Nutr. 2005 Jan;81(1 Suppl):215S-217S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.215S., 2005.

Scalbert, A. Willianson G. «Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr., 130,2073S-2085S. doi: 10.1093/jn/130.8.2073S.» 2000.

Schlesier, K., Harwat M., Bohm V. and Bitsch R.,. «Assessment of Antioxidants Activity by using Different Vitro Methods, Free Radical Research, 36 (2) : 177-187.» 2002.

Scofield, R., Kurien B., Ganick S. et al. «"Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading," Free Radical Biology andMedicine, vol. 38, no. 6, pp. 719–728.» 2005.

Shahidi, Fereidoon. Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications,. AOCS press, 1997.

Shames, D., Minna J., Gazdar A. «"DNA methylation in health, disease, and cancer," CurrentMolecularMedicine, vol. 7, no. 1, pp. 85–102.» 2007.

Shen, L., Hong-Fang, J. Hong-Yu, Z. «How to understand the dichotomy of antioxidants.» Biochem. Biophys. Res., 2007: p. 362, 543-545.

Singh K., Ahmad A., Singh V., Pant K., Rahal A. «"Effect of Emblica officinalis fruit in combating mercuryinduced hepatic oxidative stress in rats," Indian Journal of Animal Sciences, vol. 81, no. 3, pp. 260–262.» 2011.

Singh U., Jialal I. «"Oxidative stress and atherosclerosis," Pathophysiology, vol. 13, no. 3, pp. 129–142.» 2006.

Singleton, V.L., Rossi J.A., Jr. «Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic.16, 144-158.» 1965.

Sinsch, U., Seine R., Sherif N. «"Seasonal changes in the tolerance of osmotic stress in natterjack toads (Bufo calamita)," Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 101, no. 2, pp. 353–360. .» 1992.

Sorci, G., Faivre B. « "Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems," Philosophical Transactions of the Royal Society B, vol. 364, no. 1513, pp. 71–83.» 2009.

Srikumar, R, Parthasarathy NJ, Shankar EM, Manikandan S, Vijayakumar et al. «Evaluation of the growth inhibitory activities of Triphala against common bacterial isolates from HIV infected patients. Phytother Res. 21:476-480.» 2007 .

Stagos D., Spanou C., Margariti M., Stathopoulos C., Mamuris Z., et all. «Cytogenetic effects of grape extracts (Vitis vinifera) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid

exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 5246–5452.» 2007.

Stagos, D., Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N. et al. «Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food Chem Toxicol 50: 4115-4124.» 2012.

Staško, A., Brezová V., Biskupič S., Rapta P. «Antioxidant properties of liqueurs - an EPR study. Journal of Food and Nutrition Research Vol. 46, No. 4, pp. 145-149.» 2007.

Stehbens, W. E. «"Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS," Experimental and Molecular Pathology, vol. 77, no. 2, pp. 121–132.» 2004.

Stewart, J.R., Artime M.C., O'Brian C.A. «Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. J. Nutr. 133, 2440S-2443S.» 2003.

Stojanovich, L. «"Stress and autoimmunity," Autoimmunity Reviews, vol. 9, no. 5, pp. A271–A276.» 2010.

Sun, J., Jiang, Y.Y.S.A., Shi, J., Wei, X., Xue, S.J., Shi, J., Yi, C. «Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit. Food Chem. 119, 753–757.» 2010.

Sutherland, B., Rahman R., Appleton I. «Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. J. Nutr. Biochem. 17, 291–306.» 2006.

Szweda, P. «Antimicrobial activity of honey. In: Honey Analysis. Arnaut de Toledo VA (ed). InTech, Madrid, pp215-232. https://www.intechopen.com/books/honey-nalysis/antimicrobialactivity-of-honey.» 2017.

Taiz, L. & Zeiger, E. «Secondary metabolites and plant defense, edn., Hardback s.l.:Plant physiology. Sinauer Associates. 3rd.» 2006.

Torabian, S., Haddad, E., Rajaram, S., Banta, J., Sabate, J. «Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. J. Hum. Nutr. Diet. 22, 64–71. doi: 10.1111/j.1365-277X.2008.00923.x.» 2009.

Trigwell, S., Radford P., Page S. et al.,. «"Islet glutamic acid decarboxylase modified by reactive oxygen species is recognized by antibodies from patients with type 1 diabetes mellitus," Clinical and Experimental Immunology, vol. 126, no. 2, pp. 242–249.» 2001.

Tsanga, C., Higginsa S., Duthiea G., Duthiea S., Howiea M., Mullena W., Leana M., Crozier A. «The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. Br. J. Nutr. 93, 233-240.» 2005.

Tsimidou, M., Papadopoulos G., Boskou D. «Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I.» n.d.

—. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I Food Chemistry. Volume 45, Issue 2, Pages 141-144, doi.org/10.1016/0308-8146(92)90025-W. 1992.

Ugartondo, V., Mitjans M., Lozano C., Torres, J., Vinardell, M. «Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. J. Agric. Food Chem. 54, 6945–6950.» 2006.

Urso, M., Clarkson, P. «Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 189, 41-54.» 2003.

Utsunomiya, N., Hayase F., Kato H. «J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 36, 461-465.» 1983.

Uttara, B., Singh A., Zamboni P., Mahajan R. «"Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options," Current Neuropharmacology, vol. 7, no. 1, pp. 65–74.» 2009.

Valero, N., Mosquera J., A˜nez G., Levy A., Marcucci R., Melchor D. «"Differential oxidative stress Induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals," PLoS ONE, vol. 8, no. 9,Article ID e73221.» 2013.

Valko, M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. «"Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stressinduced cancer," Chemico-Biological Interactions, vol.pp. 1–40, no. 1. 160,.» 2006.

Van-Acker, S., Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. «Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. Biochem Biophys Res Commun, Τόμος 214, pp. 755-759. doi.org/10.1006/bbrc.1995.2350.» 1995.

Van-Haaften, R., Evelo C., Haenen, G., Bast A. «α-Tocopherol inhibits glutathione S-transferase π. Biochem. Biophys. Res. 280, 631.» 2001.

Vauzour, D., Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha M.J., Spencer J.P.E. «Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. Nutrients 1106–1131.» 2010.

Vissers, M., Zock P., Katan M. «Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. Eur J Clin Nutr. 58, 955-965.» 2004.

Vita, J.A. «Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. Am. J. Clin. Nutr. 2005, 81, 292S–297S. Nutrients 2014, 6 6041.» 2014.

Weiss, G., Werner-Felmayer G., E. Werner, Gr¨unewald K., et all. «"Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription," Journal of Experimental Medicine, vol. 180, no. 3, pp. 969–976.» 1994.

Wenzel, U., Kuntz S., Brendel M.D., Daniel H. «Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. Cancer Res. 60, 3823–3831.» 2000.

Woods, R, Walters E., Raven J., Wolfe R., Ireland P., Thien F., Abramson M. «Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. Am. J. Clin. Nutr. 78, 414-421.» 2003.

Xu, P., Wang S., Yu X., Su Y., Wang T., Zhou W.W., Zhang H., Wang Y., Liu R. «Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A beta oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. Behav. Brain Res. 264, 173–180.» 2014.

Yoshida, T., Hatano T., Ito H. «Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. Biofactors 121–125.» 2000.

Zhang Y, Hendrich S., Murphy P. «Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. J. Nutr. 133, 399-404.» 2003.

Zhang, K. «"Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease," International Journal of Clinical and Experimental Medicine, vol. 3, no. 1, pp.33–40.» 2010.

Zhu, Q., Holt R., Lazarus S., Ensunsa J., Hammerstone J., Schmitz H. «Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. J. Agric. Food Chem. 50, 1700–1705.» 2002.

Zingg, J., Azzi A., Meydani M. «"Genetic polymorphisms as determinants for disease-preventive effects of vitamin E," Nutrition Reviews, vol. 66, no. 7, pp. 406–414.» 2008.

Ziskoven, C., M. J¨ager, Zilkens C., Bloch W., Brixius K., Krauspe R. «"Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation?" Orthopedic Reviews, vol. 2, no. 2, p. e23.» 2010.

Ελληνική

Κατσιλάμπρος, Ν. Λ. Λειτουργικά τρόφιμα και συγγενείς κατηγορίες από Κλινική διατροφή. Ιατρικές εκδόσεις ΒΗΤΑ. Αθήνα. p. 264-265. 2010.

Κουιμτζής, Θ. Φασματομετρία Υπεριώδους - Ορατού. Ενόργανη χημική ανάλυση, σελ.89-102, Δεύτερη έκδοση Γραφικές τέχνες. Θεσσαλονίκη. 1982.

Μπόσκος, Δ. Χημεία Τροφίμων, σελ. 230-232. 5η Έκδοση. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γαρταγάνη, 2004.

Πετρίδης, Δ. Εφαρμοσμένη Στατιστική με έμφαση στην επιστήμη των τροφίμων. 3η έκδοση. Εκδοτκή Ομηρος, Θεσ/νίκη. 2013.

Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, Α. Φασματοσκοπία. Ανάλυση τροφίμων. σελ.61-87. Ε' Έκδοση, Εκδόσεις Γαρταγάνη Θεσσαλονίκη. . 1996.

Φουρτουνόπουλος, Δ. Επιστήμη τροφίμων ΙΙ. Τμήμα εκδόσεων Α.Τ.Ε.Ι.Θ. 2004.

Φωκάς, Γ. Μαθήματα φαρμακογνωσίας. 2η έκδοση. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ. Σελ. 378. 1984.

Διαδίκτυο

http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_(liqueur). n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).

http://en.wikipedia.org/wiki/Amaro_Averna. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).

http://en.wikipedia.org/wiki/B%C3%A9n%C3%A9dictine. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).

http://en.wikipedia.org/wiki/Campari. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
http://en.wikipedia.org/wiki/Fernet . n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
http://en.wikipedia.org/wiki/Unicum . n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
http://kardiologika.blogspot.com/2013/03/blog-post_28.html. n.d. (πρόσβαση 2018).
http://wikipedia.qwika.com/en2el/J%C3%A4germeister . n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
http://www.agjab.com/agjab_2012/aboutus.htm. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://el.glosbe.com/it/el/AMARO. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://el.wikipedia.org/wiki/Angostura_bitters. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://el.wiktionary.org/wiki.n.d./%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BE%CE%AF%CF%81%CE%B9%CE%BF (πρόσβαση 1/10/2018).
https://en.wikipedia.org/wiki/ABTS. n.d. (πρόσβαση 11 20, 2018).
https://en.wikipedia.org/wiki/Chartreuse_(liqueur). n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH. n.d. (πρόσβαση 2018).
https://it.wikipedia.org/wiki/Amaro_Lucano. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://it.wikipedia.org/wiki/Amaro_Ramazzotti. n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).
https://www.amazon.in/plantsguru-pg-fruit-plants-amla-small-Plantsguru-Amla-Small/dp/B00T9SCWIC. 6 12 2018.
https://www.athinorama.gr.n.d.
https://www.athinorama.gr/umami/spirits/articles/?id=2001521 (πρόσβαση 1/10/2018).
https://www.tilestwra.com/17-apo-ta-oreotera-dentra-ston-kosmo/. 6 12 2018.
https://www.underberg.com/ . n.d. (πρόσβαση 1/10/2018).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ DPPH

Πίνακας 1. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk - Μέθοδος DPPH

Test of Normality DPPH

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DPPH	0,177	21	0,084	0,917	21	0,075

a. Lilliefors Significance Correction

Πίνακας 2. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος DPPH

Test of Homogeneity of Variances

Real_conc

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,301	6	14	**0,319**

Πίνακας 3. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος DPPH

Real_conc

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	222679629,177	6	37113271,530	286,880	0,000
Within Groups	1811159,560	14	129368,540		
Total	224490788,737	20			

Πίνακας 4. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος DPPH

Tukey HSD

sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Ξηρών φρούτων	3	4203,14					
Ξηρών καρπών	3		7319,72				
Εσπεριδοειδών	3			10200,04			
Amaro 2	3			11152,74	11152,74		
Amaro 1	3				11437,11		
Καφέ	3					13040,75	
Βοτανικό	3						14616,63
Sig.		1,0	1,0	0,068	0,953	1,000	1,0

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ FOLIN - CIOCALTEU

Πίνακας 5. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk - Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Test of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FOLIN	0,143	21	0,200*	,937	21	0,187

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Πίνακας 6. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος Folin - Ciocalteu

Test of Homogeneity of Variances
Real_conc

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,443	6	14	0,004

Πίνακας 7. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος Folin - Ciocalteu
Real_conc

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2674055,079	6	445675,846	141,508	0,000
Within Groups	44092,661	14	3149,476		
Total	2718147,740	20			

Πίνακας 8. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος Folin - Ciocalteu
Real_conc
Tukey HSD

Sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Ξηρών φρούτων	3	411,74000			
Ξηρών καρπών	3		665,00000		
Εσπεριδοειδών	3		758,81000		
Amaro 2	3			1038,12000	
Καφέ	3			1090,98000	
Amaro 1	3			1136,77000	
Βοτανικό	3				1599,38000
Sig.		1,000	0,430	0,376	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ABTS

Πίνακας 9. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk - Μέθοδος ABTS

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ABTS	0,180	21	0,076	0,887	21	0,020

a. Lilliefors Significance Correction

Πίνακας 10. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος ABTS

Test of Homogeneity of Variances

Real_conc

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,225	6	14	0,005

Πίνακας 11. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος ABTS

Real_conc

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	643964538,272	6	107327423,045	30,006	0,000
Within Groups	50075922,343	14	3576851,596		
Total	694040460,615	20			

Πίνακας 12. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος ABTS

Real_conc

Tukey HSD

sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Ξηρών φρούτων	3	5663,54000		
Ξηρών καρπών	3		15297,53000	
Εσπεριδοειδών	3		15544,46000	
Amaro 2	3		19773,69000	19773,69000
Amaro 1	3		19885,46000	19885,46000
Καφέ	3		20084,00000	20084,00000
Βοτανικό	3			24484,75000
Sig.		1,000	0,087	0,094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ. ΓΡΑΜΜΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ABTS, DPPH ΚΑΙ FOLIN - CIOCALTEU

Πίνακας 13. Γραμμική συσχέτιση ABTS και Folin – Ciocalteu (0.05 level)

Model Summary and Parameter Estimates
Dependent Variable: ABTS

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	0,778	66,609	1	19	0,000	3755,159	14,095

The independent variable is Folin - Ciocalteu.

Πίνακας 14. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu και DPPH (0.05 level)

Model Summary and Parameter Estimates
Dependent Variable: DPPH

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	0,855	111,809	1	19	0,000	2238,580	8,402

The independent variable is Folin - Ciocalteu.

Πίνακας 15. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.01 level)
Correlations

		Folin_ABTS	Folin_DPPH
Folin_ABTS	Pearson Correlation	1	1,000**
	Sig. (2-tailed)		0,00
	N	21	21
Folin_DPPH	Pearson Correlation	1,000**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	
	N	21	21

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 16. Γραμμική συσχέτιση DPPH και ABTS (0.05 level)

Model Summary and Parameter Estimates
Dependent Variable: DPPH

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	0,848	105,761	1	19	0,000	1249,951	,524

The independent variable is ABTS.
The independent variable is FOLIN.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Πίνακας 1. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnova και Shapiro-Wilk - Μέθοδος DPPH…….….112
Πίνακας 2. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος DPPH……112
Πίνακας 3. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος DPPH……...…..112
Πίνακας 4. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος DPPH……..112
Πίνακας 5. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnov[a] και Shapiro-Wilk - Μέθοδος Folin - Ciocalteu…….……...…113
Πίνακας 6. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος Folin-Ciocalteu…….....113
Πίνακας 7. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος Folin - Ciocalteu……..…113
Πίνακας 8. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος Folin-Ciocalteu…….…113
Πίνακας 9. Έλεγχος κανονικότητας - Test Kolmogorov-Smirnova και Shapiro-Wilk - Μέθοδος ABTS……..……114
Πίνακας 10. Έλεγχος ομοιογένειας διακύμανσης - Test Levene - Μέθοδος ABTS..……114
Πίνακας 11. Σύγκριση δειγμάτων (ANOVA) - Μέθοδος ABTS……..114
Πίνακας 12. Κατάταξη αντιοξειδωτικής ικανότητας - Tukey test - Μέθοδος ABTS…....114
Πίνακας 13. Γραμμική συσχέτιση ABTS και Folin-Ciocalteu……..……115
Πίνακας 14. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu και DPPH…….....115
Πίνακας 15. Γραμμική συσχέτιση Folin - Ciocalteu με ABTS και DPPH (0.01 level)….115
Πίνακας 16. Γραμμική συσχέτιση DPPH και ABTS…….……115