



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός φυσικών αντιοξειδωτικών και ανόργανων συστατικών σε
Υπερτρόφιμα. Μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμυκητιακής δραστηριότητας.**

Ροϊδάκη Άννα

Χημικός

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός φυσικών αντιοξειδωτικών και ανόργανων συστατικών σε
Υπερτρόφιμα. Μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμυκητιακής δραστηρότητας**

ΡΟΪΔΑΚΗ ANNA

A.M.: 54406

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΠΡΟΕΣΤΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Επίκουρος καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΡΟΕΣΤΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Επίκουρος καθηγητής ΕΚΠΑ

ΜΑΡΚΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Αναπληρώτρια καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΑΝΤΩΝΙΑ ΧΙΟΥ Επίκουρη καθηγήτρια Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 15/02/2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας όλο και περισσότεροι άνθρωποι κάνουν ένα άνοιγμα προς έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής και ακολουθούν μια διατροφή που περιλαμβάνει τρόφιμα τα οποία προάγουν την υγιή γήρανση. Μερικά από αυτά τα τρόφιμα είναι υπέρτροφές που κατέχουν λειτουργικές ιδιότητες κι είναι ωφέλημα για την υγεία πέρα από τη θρεπτική τους αξία. Αυτά τα τρόφιμα περιέχουν πληθώρα θρεπτικών συστατικών και φυτοχημικές ενώσεις, φυσικά αντιοξειδωτικά που θα μπορούσαν να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα από βλάβες που προκύπτουν από το χρόνιο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Ο κύριος σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη των υπέρτροφές που παράγονται στην Ελλάδα και τα οποία αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων. Για αυτή η μελέτη, έγινε επιλογή συγκεκριμένων ειδών που καλλιεργούνται σε περιοχές της Ελλάδας ερευνήθηκαν ως προς τη περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως είναι οι ανθοκυανίνες, καθώς και ανόργανα συστατικά. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα κι η ικανότητα αυτών των υπέρτροφων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των τοξινογόνων μυκήτων.

Τα πιο σημαντικά από τα τρόφιμα που μελετήθηκαν ήταν τα Goji berry (*Lycium barbarum*), ιπποφαές (*Hippophae rhamnoides*), Αρώνια (*chokeberries*), Φυσαλίσ του Περού (*Golden berries*), το κυνόροδο (*Rosa canina*) και η εχινάκεια (*Echinacea*).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους (DPPH, Folin Ciocalteu), οι επί μέρους ανθοκυανίνες ανιχνεύθηκαν με ανάλυση υγροχρωματογραφίας (HPLC), ενώ η μέτρηση των μετάλλων κι ιχνοστοιχείων έγινε με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS). Για το αντιμυκητιακό προσδιορισμό, οι αφλατοξινογόνοι μύκητες *Aspergillus parasiticus* και ο οχρατοξινογόνος μύκητας *Aspergillus carbonarius*.

Συμπερασματικά τα αρώνια και τα φύλλα του ιπποφαούς της ποικιλίας Hergo κι τα φύλλα των Goji berry είχαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές ολικού φανολικού περιεχομένου. Στα αρώνια κι στην εχινάκεια ανιχνεύθηκαν μεγάλες περιεκτικότητες του γλυκοζίτη της κυανιδίνης καθώς επίσης κι επί μέρους ανθοκυανίνες σε μικρότερες ποσότητες. Αναφορικά με τον μικροβιολογικό

έλεγχο την μεγαλύτερη ανάσχεση στην μυκηλιακή ανάπτυξη έδωσε ο κίστος και το τριβόλι ενώ τα μύρτιλα διέγειραν την ανάπτυξη των μυκήτων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημαεία Τροφίμων, Ανάλυση τροφίμων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιμικροβιακή ικανότητα, μέταλλα, ανθοκυανίνες, , Υγρή χρωματογραφία, ICP-MS, υπερτροφές

ABSTRACT

Nowadays more and more people are opening up to a healthier way of life and follow a diet that includes foods which promote healthy aging. Some of these foods are superfoods and superherbs that possessed functional health properties beyond its nutritive value. These foods containing exogenous nutrient and phytochemical antioxidants that could protect the human body from damage arising from chronic oxidative stress caused by excessive production of free radicals.

The main purpose of this work was the study of superfoods and superherbs produced in Greece and which consist the raw material for the production of innovative products. In this study, a variety of superfoods cultivated in regions of Greece was investigated for inorganic content and the antioxidant capacity. The antioxidant capacity was determined along with the potential of these superfoods to inhibit the growth of mycotoxigenic fungal was also studied.

Some of the superfoods studied were goji berries (*Lycium barbarum*), sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*), chokeberries (aronia), golden berries (*Physalis peruviana*), rose-hip (*Rosa canina*).

The antioxidant capacity was measured by spectrophotometric methods (dpsh, folin ciocalteu) while phenolic compounds especially anthocyanins were detected by HPLC analysis. Inorganic compounds were qualified by ICP-MS. For the antifungal assay, the aflatoxigenic fungi *Aspergillus parasiticus* and the ochratoxigenic fungi *Aspergillus carbonarius* were inoculated in *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar (AFPA) and in Potato Dextrose Agar (PDA) medium, respectively.

SUBJECT AREA: superfoods

KEYWORDS: superfoods, superherbs, antioxidant activity, antifungal activity

Στη μητέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Επιβλέπων της εν λόγω ερευνητικής εργασίας ήταν ο κ. Χαράλαμπος Προεστός, Επίκουρος καθηγητής του Ε.Κ.Π.Α, τον οποίον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλην τη διάρκεια εκτέλεσης της εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ την κα.Μαρκάκη Παναγιώτα Αναπληρώτρια καθηγήτρια του ΕΚΠΑ και την κα. Αντωνία Χίου επίκουρη καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθώς επίσης κι για την πολύτιμη συμβολή τους για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην κα Κατερίνα Σακελλάρη κι στον κ.Σωτήριο Καραβώλτσο για την πολύτιμη βοήθεια τους και για την άψογη συνεργασία μας καθόλη την διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας εργασίας στο εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ.Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., σε όλους τους συνεργάτες μου στο Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ και του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου ιδιαίτερα την υποψήφια δηδάκτωρ του Τμήματος Χημείας Κόλλια Ελένη καθώς και την υποψήφια δηδάκτωρ του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Παναγοπούλου Ειρήνη για την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	23
1.2 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ	36
1.2.1 Βιοσύνθεση και αποθήκευση των δευτερογενών μεταβολιτών	39
1.2.2 Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων.....	41
1.2.3 Αντιοξειδωτικές Ενώσεις	50
1.3 Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών συστατικών.	53
1.4 Ενοργανες τεχνικές ανάλυσης	57
1.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).....	57
1.4.2 Φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS).....	59
1.5 ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ASPERGILLUS.....	61
1.5.1 Aspergillus Carbonarius	63
1.5.2 Aspergillus Parasiticus	64
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
2.1 Δείγματα	65
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων	67
2.2.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών	70
Αντιδραστήρια –Όργανα	70
2.3 Φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί	72
2.3.1 Συνολικά Φαινολικά Συστατικά (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin—Ciocalteu	73
2.3.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2- diphenyl-2-picryl-hydrazyl)	74
2.4 Προσδιορισμός Ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	75

2.5	Προσδιορισμός μετάλλων κι ιχνοστοιχείων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευμένο πλάσμα (ICP-MS).....	76
2.5.1	Προκατεργασία δειγμάτων	76
2.5.2	Ανάλυση των δειγμάτων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS).....	77
2.6	Μικροβιολογικό μέρος	78
2.6.1	Παρασκευή θρεπτικών υλικών	81
2.6.2	Παρασκευή εναιωρήματος κονιδίων των μυκήτων <i>Aspergillus Parasiticus</i> και <i>Aspergillus Carbonarius</i>	83
2.6.3	Εμβολιασμός τρυβλίων θρεπτικού υλικού PDA για την μακροσκοπική παρατήρηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων πάνω στην ανάπτυξη των μυκήτων <i>AspergillusParasiticus</i> και <i>AspergillusCarbonarius</i>	84
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
3.1	Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας των Δειγμάτων	87
3.1.1	Εκτίμηση της ικανότητας δεσμευσης της ρίζας DPPH των δειγμάτων	87
3.1.2	Εκτίμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (total phenolic content, TPC) που προσδιορίστηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.	93
3.2	Προσδιορισμός ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής απόδοσης (HPLC).....	99
3.3	Προσδιορισμός μετάλλων κι ιχνοστοιχείων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευμένο πλάσμα (ICP-MS).....	102
3.4	Μικροβιολογικός έλεγχος.....	109
3.5	Συμπεράσματα	113
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	116
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	117
4.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	118
17.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	121

19. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	125
--------------------	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα για τα δείγματα εσοδείας 2014 και 2015.....	89
Σχήμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα των φυλλων ιπποφαούς και Goji B. για τις εσοδείες 2014-2015	89
Σχήμα 3: Σύγκριση δειγμάτων goji berry που έχουν συλλεχθεί από διάφορα υψόμετρα	90
Σχήμα 4: Σύγκριση δειγμάτων των ποικιλιών του Ιπποφαούς	91
Σχήμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα μεταξύ όλων των superfoods(1).....	92
Σχήμα 6 :Συγκριτικό διάγραμμα όλων των superfoods(2)	92
Σχήμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων των δύο σοδειών 2014-2015(1)	95
Σχήμα 8: Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων των δύο σοδειών 2014-2015(2)	95
Σχήμα 9:Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων goji berry απο διαφορα υψόμετρα.....	96
Σχήμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα GAE mg/g dried sample των ποικιλιών του ιπποφαούς.....	97
Σχήμα 11: Συγκριτικό διάγραμμα GAE mg/g dried sample των superfoods(1).....	97
Σχήμα 12:Συγκριτικό διάγραμμα GAE mg/g dried sample των superfoods(2).....	98

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: <i>Hippophae</i> L.	23
Εικόνα 2: <i>Cistus incanus</i>	25
Εικόνα 3: <i>Rosa canina</i>	26
Εικόνα 4: <i>Echinacea</i>	26
Εικόνα 5: <i>Crataegus</i>	27
Εικόνα 6: <i>Hypericum perforatum</i>	28
Εικόνα 7: <i>Tribulus terrestris</i>	29
Εικόνα 8: chokeberries	30
Εικόνα 9: <i>lycium barbarum</i>	30
Εικόνα 10: <i>Physalis spp.</i>	31
Εικόνα 11: <i>Vaccinium myrtillus</i>	32
Εικόνα 12: <i>Rubus idaeus</i> L	33
Εικόνα 13: <i>Morus alba</i> L	33
Εικόνα 14: <i>Arbutus unedo</i>	34
Εικόνα 15: <i>cornus mas</i>	35
Εικόνα 16: <i>Silybum marianum</i>	36
Εικόνα 17: βιοσύνθεση και αποθήκευση δευτερογενών μεταβολιτών	41
Εικόνα 18: Δομή των φλαβονοειδών μφαινολικών ενώσεων	42
Εικόνα 19: Δομή φλαβονολών	43
Εικόνα 20: Δομές φλαβονονών.....	44
Εικόνα 21: Δομές φλαβονών	45
Εικόνα 22: Δομές ισοφλαβονών	45
Εικόνα 23: Δομές ανθοκυανιδίνων.....	46
Εικόνα 24: Δομές των μονομερών των φλαβον-3-ολών	47
Εικόνα 25: Δομές φαινολικών οξέων	48

Εικόνα 26: Δομές των πιο συνηθισμένων στιλβενίων	49
Εικόνα 27: Δομές των BHA, BHT, TBHQ, PG	53
Εικόνα 28: Συσκευή εκχύλισης soxhlet	54
Εικόνα 29: Συσκευή δημιουργίας υπερήχων	56
Εικόνα 30: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F-C	56
Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση ICP-MS.....	59
Εικόνα 32: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>Aspergillus</i>	62
Εικόνα 33: <i>Aspergillus Carbonarius</i>	63
Εικόνα 34: <i>Aspergillus Parasiticus</i>	64
Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης του δείγματος με ICP-MS.....	78
Εικόνα 36: χαρακτηριστική αποικία <i>A. parasiticus</i> σε AFPA.....	81
Εικόνα 37 Πειραματική πορεία για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στη μυκηλιακή ανάπτυξη του <i>A. parasiticus</i> και του <i>A. Carbonarius</i> (Πηγή: Κόλλια Ελένη, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, 2014).....	85
Εικόνα 38: (1) Chokeberries (2) πολυπρότυπο ανθοκυανινών (3) πολυπρότυπο ανθοκυανινών και δείγμα.	101
Εικόνα 39: (1) cornellian cherry (2) echinacea, (std) πολυπρότυπο ανθοκυανινών.	102
Εικόνα 40: Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα βαρέων μετάλλων στα τρόφιμα σύμφωνα με την οδηγία 1881/2006 και ΕΕ 1005/2015.....	108
Εικόνα 41: Δράση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των μυκήτων	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατάλογος δειγμάτων και οι συντομογραφίες τους	68
Πίνακας 2: Πίνακας με τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μικροβιολογικό έλεγχο.....	85
Πίνακας 3: Συγκρεντρωτικός πίνακας(AAE mg/g στερεού υπολείμματος).....	87
Πίνακας 4: Συγκρεντρωτικός πίνακας(GAE mg/g dried sample).....	93
Πίνακας 5: Πίνακας με τις επί μέρους ανθοκυανίνες που ανιχνεύθηκαν στα Δείγματα. .	99
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων ICP-MS	103
Πίνακας 7: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Mn	104
Πίνακας 8: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε μαγγάνιο.	104
Πίνακας 9: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Fe	105
Πίνακας 10: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε σίδηρο.....	105
Πίνακας 11: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Zn	106
Πίνακας 12: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε ψευδάργυρο.....	106
Πίνακας 13: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Cu.....	107
Πίνακας 14: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε χαλκό	107
Πίνακας 15: Ποσοστά αναστολής ή διέγερσης της μυκηλιακής ανάπτυξης παρουσία των εκχυλισμάτων.	109
Πίνακας 16: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	116

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο χημείας τροφίμων του ΕΚΠΑ καθώς επίσης κι στο εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ. Ο προσδιορισμός των επί μέρους ανθοκυανινών με χρήση Υγρόχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο χημείας τροφίμων του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Χημείας τροφίμων του Εθνικού κι Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κι του Εργαστηρίου Χημείας τροφίμων του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Για την παρούσα εργασία, επιλέχθηκαν τα δείγματα των υπέρτροφών με αντικείμενο μελέτης την αντιοξειδωτική τους δράση και την ύπαρξη φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών όπως τα φαινολικά. Επίσης μελετήθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε επί μέρους ανθοκυανίνες κι σε μέταλλα κι ιχνοστοιχεία. Επίσης μελετήθηκε κι η επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων.

Πιο συγκεκριμένα δείγματα υπέρτροφών που καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας κι σε διάφορα υψόμετρα συλλέχθηκαν φρέσκα. Αφού αποξηράνθηκαν όλα στις ίδιες συνθήκες έγινε σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ειδών των υπέρτροφων , μεταξύ των δύο σοδειών που συλλέχθηκαν καθώς επίσης κι η επίδραση των πεδοκλιματικών αλλαγών στην βιοσύνθεση των βιοδραστικών συστατικών.για τις συγκρίσεις μετρήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση κι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων Έπειτα με την χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης εκτιμήθηκε το περιεχόμενό τους σε επί μέρους ανθοκυανίνες κι με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικό πλάσμα έγινε ο προσδιορισμός του περιεχομένου των δειγμάτων σε ανόργανα συστατικά. Τέλος έγινε μικροβιολογικός έλεγχος για κάποια από τα δείγματα έτσι ώστε να εκτιμηθεί κατά πόσο τα δείγματα πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά διεγείρουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Ιπποφαές (*Hippophae* L.)



Εικόνα 1: *Hippophae* L.

Το Ιπποφαές (*Hippophae* L.) είναι φυλλοβόλος θάμνος που ανήκει στην οικογένεια των Ελαιαγνοειδών. Η κοινή ονομασία στα αγγλικά sea-buckthorn, γράφεται με ενωτικό (-) για να μην συγχέεται με το buckthorn, που αποτελεί κοινή ονομασία του φυτού ράμνος (λευκαγκαθιά) (*Rhamnu*).

Το ιπποφαές θεωρείται σύμφωνα με πολλές μελέτες που έχουν δει το φως της δημοσιότητας, ένας σημαντικός σύμμαχος της υγείας μας. Οι καρποί του ιπποφαούς είναι εδώδιμοι και θρεπτικοί, αν και πολύ όξινοι (στυπτικοί) και ελαιώδεις, δυσάρεστοι αν φαγωθούν ωμοί, εκτός κι αν "υπερ-ωριμάσουν" (παγώσουν ώστε να μειωθεί η στυπτικότητα) και/ή αν αναμειχθούν με γλυκύτερο χυμό από μήλο, σταφύλι κλπ. Ο καρπός του ιπποφαούς είναι πλούσιος σε λάδι. Όπως έχει αναφερθεί έχει 3,5% περιεκτικότητα σε έλαιο και ο πολτός ιπποφαούς περιέχει 32,8% παλμιτελαϊκό οξύ, 17,3% ελαϊκό οξύ, 9,1% δαμαλικού οξέως, 9% λινελαϊκό οξύ και 3,4% α-λινολενικό οξύ.¹

Όταν οι καρποί πολτοποιηθούν, ο χυμός που προκύπτει διαχωρίζεται σε τρία στρώματα: πάνω-πάνω ένα λεπτό, πορτοκαλί καϊμάκι· στη μέση, ένα στρώμα που περιέχει, τα χαρακτηριστικά για το ιπποφαές, υψηλής συγκέντρωσης κεκορεσμένα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα· και το κατώτερο στρώμα που είναι ίζημα και χυμός. Περιέχει λίπη που χρησιμοποιούνται για καλλυντικούς σκοπούς, τα δύο ανώτερα στρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κρέμες και αλοιφές, ενώ το κατώτερο στρώμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδώδιμο προϊόν, όπως το σιρόπι.

Έχει στυπτικές ιδιότητες και βοηθά στην καταπολέμηση της διάρροιας και στη σπαστική κολίτιδα.²

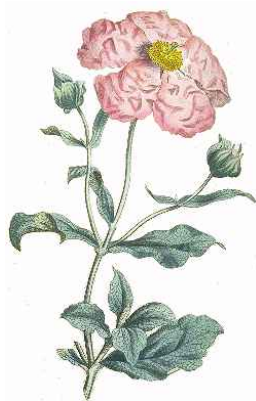
Όταν οι καρποί πολτοποιηθούν, ο χυμός που προκύπτει διαχωρίζεται σε τρία στρώματα: πάνω-πάνω ένα λεπτό, πορτοκαλί καϊμάκι· στη μέση, ένα στρώμα που περιέχει, τα χαρακτηριστικά για το ιπποφαές, υψηλής συγκέντρωσης κεκορεσμένα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα· και το κατώτερο στρώμα που είναι ίζημα και χυμός. Περιέχει λίπη που χρησιμοποιούνται για καλλυντικούς σκοπούς, τα δύο ανώτερα στρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κρέμες και αλοιφές, ενώ το κατώτερο στρώμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδώδιμο προϊόν, όπως το σιρόπι. Ο καρπός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C — 114 έως 1550 mg ανά 100 gr με μέση περιεκτικότητα (695 mg ανά 100 gr) περίπου 15 φορές περισσότερη από το πορτοκάλι (45 mg ανά 100 grams) — που κατατάσσει το ιπποφαές στις πιο πλούσιες πηγές, από τα φυτά, σε βιταμίνη C. Ο καρπός ωστόσο είναι πλούσιος σε καροτενοειδή, βιταμίνη E, αμινοξέα, μέταλλα, β-σιτοστερόλη και πολυφαινολικά οξέα.³

Υπάρχουν 6 είδη και 12 υποείδη αυτόχθονα σε μια ευρεία περιοχή της Ευρώπης και της Ασίας, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής Λαντάκ (Ladakh, Ινδία), όπου χρησιμοποιείται για παραγωγή χυμού.⁴ Πάνω από το 90% ή περίπου 1.5 εκατομμύρια εκτάρια των παγκόσμιων πηγών του Ιπποφαούς, εντοπίζονται στην Κίνα, όπου γίνεται η εκμετάλλευσή του με σκοπο τον έλεγχο των απωλειών νερού και της διάβρωσης του εδάφους. Ο θάμνος φθάνει σε ύψος 0.5–6 m, σπάνια έως τα 10 m στην κεντρική Ασία και συνήθως αναπτύσσεται σε ξηρές και αμμώδεις περιοχές. Είναι ανθεκτικό σε αλατούχες συνθήκες είτε δια του αέρα είτε δια του εδάφους, αλλά έχει μεγάλη απαίτηση σε πλούσια ηλιοφάνεια για την καλή ανάπτυξή του και δεν ανέχεται σκιερές συνθήκες δίπλα σε μεγαλύτερα δέντρα.

Το κοινό είδος Ιπποφαές το ραμνοειδές (*Hippophae rhamnoides* L) είναι μακράν το πιο διαδεμένο, με ένα ευρύ φάσμα εξάπλωσης από τις Ατλαντικές ακτές της Ευρώπης έως τη βορειοδυτική Κίνα. Στη δυτική Ευρώπη, είναι σε μεγάλο βαθμό περιορισμένο σε παράκτιες περιοχές, όπου τα αλατούχα υδροσταγονίδια της θάλασσας εμποδίζουν άλλα μεγαλύτερα φυτά να το ανταγωνιστούν, ενώ στην κεντρική Ασία είναι πιο διαδεμένο σε ξηρές ημι-ερημώδεις περιοχές, όπου άλλα φυτά δε μπορούν να επιβιώσουν σε ξηρές συνθήκες· επίσης εμφανίζεται στην

κεντρική Ευρώπη και Ασία ως υπο-αλπικός θάμνος πάνω από τη δέντρο-γραμμή στα βουνά και σε άλλες ηλιόλουστες περιοχές όπως οι όχθες των ποταμών.⁵ Το ιπποφαές ραμνοειδές (*Hippophae rhamnoides* L.) περιέχει μια σειρά από χημικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών, τοκοφερολών, στερολών, φλαβονοειδών, λιπιδίων, ασκορβικού οξέος, τανίνων, κλπ. Αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο από τη χημική άποψη, αλλά και επειδή πολλές από αυτές έχουν βιολογικές και θεραπευτικές δράσεις συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, έχουν ηπατο-προστατευτικές ιδιότητες και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες.⁶

Κίστος – Λαδανιά – Κουνούκλα – *Cistus incanus*



Εικόνα 2: *Cistus incanus*

Ανήκει στην οικογένεια των Κιστιδών (Cistaceae). Εξαπλώνεται στο μεγαλύτερο τμήμα της Μεσογείου και είναι κοινό στην Ελλάδα. Είναι θερμόφιλο φυτό, το οποίο απαιτεί ξέφωτα και ηλιόλουστα μέρη. Αγαπάει τις πετρώδεις θέσεις, τα φρύγανα και τα διάκενα ημιορεινών δασών, τα φτωχά και ασβεστολιθικά εδάφη. Οι λαδανιές ή Κουνουκλιά ή Λάδανος ή Αλαδανιά είναι φυτά αειθαλή,

θαμνώδη μέχρι ένα μέτρο ύψος, με πολύκλαδο βλαστό και παχιά, με πυκνούς αδένες και ρυτιδωδή φύλλα. Τα άνθη είναι σαν μικρά τριαντάφυλλα, ροδόχρωμα. Η άνθηση αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί μέχρι και τον Αύγουστο. Ο Κίστος έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες από οποιασδήποτε φυτό στην Ευρώπη, με εκπληκτική ικανότητα καταστροφής των ελευθέρων ριζών καθώς επίσης και υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα.⁷⁸ Ο βλαστός και τα φύλλα περιέχουν βαλσαμώδη ρητινική αρωματική ύλη, το λάδανο. Στη ρητίνη περιέχονται οργανικές ενώσεις που ονομάζονται λαμβανικά διτερπένια, οι οποίες σύμφωνα με μελέτες παρουσιάζουν αντιμικροβιακή και κυτταροστατική δράση.⁹

Αγριοτριανταφυλλιά *Rosa canina*



Εικόνα 3: *Rosa canina*

Η αγριοτριανταφυλλιά ανήκει στην οικογένεια των Ροδανθών (Rosaceae) είναι θάμνος αυτοφυής, πολυετής, φυλλοβόλος, πολύκλαδος, αγκαθωτός που φτάνει έως και τα 3 μέτρα ύψος, οι βλαστοί είναι καλυμμένοι με μικρά, αιχμηρά, αγκάθια.¹⁰ Περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, περισσότερη και από τα εσπεριδοειδή (5 φορές περισσότερη C από τα λεμόνια) και τα ακτινίδια (100 γρ.

κυνόροδα περιέχουν 3000 मिलिक्राम βιταμίνης C). Επίσης περιέχει βιταμίνες A, B1, B2 C, E, K και P, ασβέστιο, σίδηρο, φώσφορο, καροτένια, πηκτίνη, νιασίνη, ρητίνη,

ζάχαρα, ταννίνη, μηλικό οξύ, κιτρικό οξύ, κιτρικά άλατα, οργανικά οξέα και φλαβονοειδή. Οι καρποί έχουν μεγάλη θρεπτική αξία λόγω των πολλών βιταμινών που περιέχουν και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα βοηθώντας τον οργανισμό στην αντιμετώπιση του κρυολογήματος και στην καλή απορρόφηση του σιδήρου και του ασβεστίου.¹¹

Το αφέψημα συνίσταται για κρυολόγημα, γρίπη, αναπνευστικές αλλεργίες, για συνάχι, μολυσματικές ασθένειες.¹²

Εχινάκεια (*Echinacea*)



Εικόνα 4: *Echinacea*

Η λατινική ονομασία του βοτάνου είναι *Echinacea* και ανήκει στην οικογένεια των σύνθετων ή αστεριδών (όπως και η καλέντουλα, το χαμομήλι και το χρυσάνθεμο). Είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως ρουνμπεκία, αμερικάνικο κωνολούλουδο, μαυρομάτα, χτενολούλουδο, ινδιάνικο κεφάλι, ινδιάνικη φιδόρριζα, ποταπύριζα.

Υπάρχουν εννέα ποικιλίες του φυτού. Η *Echinacea angustifolia*, με ιώδη άνθη και η *Echinakia purpurea* με κόκκινα άνθη, είναι οι ποικιλίες που χρησιμοποιούμε για θεραπευτικούς σκοπούς. Η *Echinacea pallida* έχει λευκά άνθη, ενώ δύο από τις εννέα ποικιλίες, η *Echinacea tennesseensis* και η *Echinacea laevigata* κινδυνεύουν με εξαφάνιση επειδή συλλέγονται από άτομα που δεν γνωρίζουν να τις διακρίνουν

από τις προηγούμενες που χρησιμοποιούνται για θεραπεία. Το φυτό περιέχει αναλγητικές, αντισηπτικές και αιμοκαθαρτικές ιδιότητες που σκοτώνουν τα βακτήρια και τους μύκητες και αυξάνουν τη φυσική αντίσταση του οργανισμού. Οι άποικοι βέβαια υιοθέτησαν το φυτό ως σπιτικό γιατρικό για τα κρυολογήματα και τη γρίπη καθώς και για τους πονοκεφάλους, τη δυσπεψία, τη μαλάρια. Χρησιμοποιούσαν επίσης επιθέματα του βοτάνου για την αρθρίτιδα, τις αιμορροΐδες και τα αφροδίσια νοσήματα. Το βότανο περιέχει πτητικό έλαιο, αντιβιοτικά πολυακετυλένια και ινουλίνη. Περιέχει επίσης λιπαρά οξέα, σίδηρο, πρωτεΐνες, τανίνες και βιταμίνες Α, C και Ε. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των δραστικών ουσιών του βοτάνου βρίσκεται στις μαύρες ρίζες του φυτού και αυτές χρησιμοποιούμε κατά κύριο λόγο.¹³

Κράταιγος (*Crataegus*)



Εικόνα 5: *Crataegus*

Ο κράταιγος (*Crataegus*), επίσης γνωστός ως Τρικοκκιά, Μουρζιά, Μπουρμπουτζελιά, Ξανθή Τσαπουρνιά, Τσιατσιά και Ξαγκαθιά, είναι γένος της τάξης των ροδωδών που περιλαμβάνει περί τα 200 είδη. Είναι θάμνος-δέντρο με ύψος 5 με 15 μέτρα, κοινός κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο. Έχει κόκκινους καρπούς (τσιάτσια) που χρησιμοποιούνται στην εναλλακτική ιατρική ως τονωτικά του κυκλοφορικού συστήματος. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο με λοβωτά φύλλα. Οι καρποί του (τσιάτσια) είναι ωοειδείς, με μήκος 8 με 12 εκατοστά και έχουν κόκκινο χρώμα. Υπάρχουν είδη με κίτρινους, ασπριδερούς ή μαύρους καρπούς.

Το γένος περιλαμβάνει περί τα 200 είδη. Στην Ελλάδα απαντούν τα είδη Κράταιγος ο ανατολικός (*C. orientalis*), θάμνος ή δέντρο φυλλοβόλο που φύτεται σε ορεινές περιοχές, Κράταιγος ο μονόγυνος (*C. monogyna*), Κράταιγος ο λείος (συν. Κράταιγος η Οξυάκανθα) (*C. laevigata*, syn. *C. oxyacantha*), δέντρο ή θάμνος μετρίου μεγέθους, φυλλοβόλο, με βραδεία ανάπτυξη, ανθεκτικό στην ξηρασία. Απαντά σε άγονες περιοχές κυρίως υπό τη μορφή θάμνου και χρησιμεύει στον εμβολιασμό της αχλαδιάς και της μουσμουλιάς. Κράταιγος ο πυκνόλοβος (*C. ruscifolia*), θάμνος φυλλοβόλος που φύτεται σε ορεινές κυρίως περιοχές, Κράταιγος ο ποντικός (*C. pontica*), Κράταιγος ο Αζαρόλος (*C. azarolus*), η γνωστή

κουδουμηλιά, φυλλοβόλο δέντρο μέτριου μεγέθους, άριστο για εμβολιασμό αχλαδιών και μουσμουλιών, ανθεκτικό στην ξηρασία. Απαντά κυρίως στην Κρήτη και στην Κύπρο όπου είναι γνωστό με την ονομασία μοσφιλιά. Φτάνει τα δέκα μέτρα στο ύψος και έχει στρογγυλή κόμη και τραχύ αυλακωτό φλοιό. Τα κλαδιά φέρουν ισχυρά αγκάθια και οι κλαδίσκοι έχουν πυκνό τρίχωμα. Είναι είδος ολιγαρκές και εξαιρετικά ανθεκτικό στην ξηρασία. Πολλαπλασιάζεται με σπέρματα και μοσχεύματα.¹⁴ Ο καρπός τους είναι πλούσια σε βιταμίνη C , σάκχαρα , οργανικά οξέα και χρωστικές ουσίες , συμπεριλαμβανομένων ανθοκυάνες , φλαβονοειδή και φαινολικά συστατικά.¹⁵

Άλλα είδη Κραταίγου είναι τα εξής:

- C. altaica (Κ. ο αλταϊκός)
- C. chlorocarpa (Κ. ο χλωρόκαρπος)
- C. chlorosarca (Κ. ο χλωρόσαρκος)
- C. cordata (Κ. ο καρδιόφυλλος)
- C. grandifolia (Κ. ο μεγάλοφυλλος)
- C. integra (Κ. ο ακέραιος)
- C. pentagyna (Κ. πεντάγυνος)
- C. prunifolia (Κ. ο προυμνόφυλλος)
- C. pubescens (Κ. ο χνοώδης)

Βάλαμο (*Hypericum perforatum*)



Το βάλαμο (επιστ. Υπερικόντο διάτρητον, *Hypericum perforatum*) είναι φυτό του γένους Υπερικόν. Ήταν γνωστό ως υπερίκο στην αρχαία Ελλάδα, ενώ στη νεότερη Ελλάδα είναι γνωστό ως βαλασμόχορτο ή σπαθόχορτο, ενώ στην ξένη (αγγλική) βιβλιογραφία αναφέρεται ως St. John's wort. Τα φύλλα του Βάλαμου είναι φωτεινά κίτρινα-πορτοκαλί και τα πέταλα συνήθως κίτρινα. Όταν γυρίσουν προς το φως, αποκαλύπτουν

Εικόνα 6: *Hypericum perforatum*

ημιδιαφανείς στιγμές, που δίνουν την εντύπωση πως είναι διάτρητες. Οι κουκίδες αυτές δεν είναι όμως τρύπες, αλλά έγχρωμα αιθέρια έλαια και ρητίνες. Αν τρίψει κανείς τις μαύρες αυτές κουκίδες που έχουν τα 5 πέταλα με τα δάχτυλά του, αυτά θα γίνουν κόκκινα. Για πολλούς φυτοθεραπευτές, αυτές οι κουκίδες περιέχουν μερικά από τα πιο πολύτιμα και αποτελεσματικά φυτικά συστατικά. Οι στήμονες του φυτού έχουν ιδιαίτερη μορφή, με στερεό κυλινδρικό στέλεχος, με δύο γραμμές που εξέχουν κατά μήκος. Αυτές οι γραμμές κάνουν τον στήμονα να μοιάζει επίπεδος, πράγμα εντελώς ασυνήθιστο στον κόσμο των φυτών. Περιέχει υπερικίνη και ψευδο-υπερικίνη, φλαβονοειδή (16% στα φύλλα), ξανθόνες, φαινολικά οξέα και αιθέρια έλαια (0,13% σε ολόκληρο το φυτό).¹⁶¹⁷

Τριβόλι(*Tribulus terrestris*)



Εικόνα 7: *Tribulus terrestris*

Το τριβόλι είναι βότανο με αγκαθωτούς σπόρους και ανθίζει κάθε χρόνο από το Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο. Το τριβόλι(*Tribulus terrestris*) έχει μακρά ιστορία χρήσης στην παραδοσιακή ιατρική και χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια (Ινδία για περισσότερο από 3.000 χρόνια) για τη θεραπεία σοβαρών και μη παθήσεων. Αν και η φαρμακοδυναμική του τριβολιού δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως σε ανθρώπους, θεωρείται ότι συμβάλει θετικά στην υγεία με την αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης μέσω της διέγερσης της πρόσθιας υπόφυσης. Όπως όλα τα βότανα, έτσι και το τριβόλι περιέχει πολλά δραστικά συστατικά. Ωστόσο, οι στεροειδείς σαπωνίνες, αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, πιστεύεται σήμερα, ότι είναι το κύριο δραστικό θρεπτικό συστατικό που προέρχεται από το τριβόλι. Το τριβόλι μπορεί να διαφέρει όσον αφορά τα δραστικά συστατικά του, από είδος σε είδος, ανάλογα με το κλίμα και τη γεωγραφική περιοχή. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις δραστικών συστατικών τριβολιού τείνουν να προέρχονται από την Τουρκία, την Ελλάδα και τη Βουλγαρία. Οι περισσότεροι άνθρωποι καταναλώνουν το τριβόλι στην προσπάθειά τους να ενισχύσουν την αθλητική απόδοση, την υγεία τους όπως προβλήματα του καρδιαγγειακού (χοληστερίνη, αρτηριακή πίεση) και κυκλοφορικού συστήματος,

πέτρες στα νεφρά, διαταραχές του δέρματος (ατοπική δερματίτιδα), πεπτικά προβλήματα, δυσκοιλιότητα καθώς και σεξουαλικά θέματα (πρόωρη εκσπερμάτιση, στύση κ.α.). Επίσης, έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις (προστατεύει συκώτι και νεφρά), προστατεύει τα κύτταρα του δέρματος που εκτίθενται σε ακτινοβολία UVB.¹⁸

Αρώνια (*Aronia Melanokarpa*)



Εικόνα 8: chokeberries

Η αρώνια (καιαρωνία,αγγλικά: chokeberries) είναι φυλλοβόλος θάμνος της οικογένειας Ροδιδες, ιθαγενής της ανατολικότερης Βόρειας Αμερικής που απαντάται κυρίως σε υγρά δάση και σε έλη. Το γένος συνήθως θεωρείται ότι περιλαμβάνει 2 είδη ή 3 , ένα από τα οποία καλλιεργείται και στην Ευρώπη. Ένας τέταρτος τύπος που καλλιεργείται με την ονομασία Aronia θεωρείται ότι είναι ένα ενδογενές υβρίδιο, είναι η *Sorbaronia mitschurinii*. Καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό και για τροφή. Οι καρποί μπορούν να φαγωθούν ωμοί, ωστόσο συχνότερα γίνεται επεξεργασία σε αυτούς. Η γεύση του είναι στυφή. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή κρασιού, μαρμελάδας, παγωτού, τσαγιού, μπίρας, σιροπιού, χυμού, ορεκτικών και αλκοολούχων ποτών με εμποτισμό. Τα φύλλα του είναι απλά και το φθινόπωρο γίνονται πολύ κόκκινα. Τα άνθη είναι μικρά με 5 πέταλα και 5 σέπαλα. Είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά συστατικά, ανθοκυανίνες καθώς θεωρείται πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών.¹⁹²⁰

Γκότζι Μπέρι (*Lycium barbarum*)



Εικόνα 9: *Lycium barbarum*

Το Γκότζι μπέρι είναι πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών και αμινοξέων.

Το Goji Berry θεωρείται ως μια από τις πλουσιότερες φυσικές πηγές θρεπτικών συστατικών. Περιέχει 18 αμινοξέα, 21

ιχνοστοιχεία και μερικές βιταμίνες και μέταλλα.

Έχει 6 φορές περισσότερα αμινοξέα από την γύρη μελισσών, 500 φορές περισσότερη βιταμίνη C ανά βάρος από τα πορτοκάλια, περισσότερο σίδηρο από το σπανάκι, και περισσότερη βήτα καροτίνη από τα καρότα. Το Γκότζι μπέρι περιέχει μέταλλα όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο και βιταμίνες B1, B2, B6 και βιταμίνη E, το οποίο συνήθως συναντάμε στα σιτηρά και τους σπόρους και σπάνια στα φρούτα. Άλλα χαρακτηριστικά είναι τα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης (το 13% των μούρων είναι πρωτεΐνη, περισσότερο από προϊόντα ολικής άλεσης) και υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών.

Επιπλέον τα Γκότζι μπέρι περιέχουν B-σιτοστερόλη, απαραίτητα λιπαρά οξέα. Η μεγάλη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικές ουσίες (10 φορές παραπάνω από τους υπόλοιπους κόκκινους καρπούς και 30 φορές περισσότερο από το κόκκινο κρασί) αλλά και η περιεκτικότητα σε αμινοξέα και μέταλλα (έχουν 11% πρωτεΐνη) και βοηθούν σημαντικά στην αναγέννηση των κυττάρων και όχι μόνο.²¹ Αυτές οι ιδιότητες το κάνουν να αποτελεί ένα άκρως υγιεινό φρούτο. Με όλα αυτά τα θρεπτικά συστατικά, δεν είναι να απορεί κανείς γιατί έχουν τόσο σημαντική αξία για την υγεία και την φαρμακευτική.²²

Φυσαλίσ – (*Physalis spp.*) -Golden berries



Εικόνα 10: *Physalis spp*

Η Φυσαλίσ (*Physalis*) είναι ένα γένος ανθοφόρων φυτών που ανήκει στην οικογένεια των σολανοειδών (*Solanaceae*), ενδημικό στα ζεστά κλίματα και τις υποτροπικές περιοχές όλου του κόσμου. Το γένος αυτό έχει εξίσου καλλωπιστική και φαγώσιμη χρήση, ανάλογα με το είδος και είναι ευρέως καλλιεργούμενο σε όλο τον κόσμο. Το χαρακτηριστικό του γένους είναι οι μικροί πορτοκαλί καρποί του που όλοι μοιάζουν στο μέγεθος, το σχήμα και την κατασκευή με μικρές ντομάτες, με τη διαφορά ότι βρίσκονται (μερικώς ή εντελώς) εσώκλειστοι σε έναν μεγάλο φλοιό με χάρτινη υφή, που προέρχεται από τον κάλυκα. Η *Physalis peruviana*, κοινώς γνωστή ως απλά Φυσαλίσ, είναι ενδημική της Νοτίου Αμερικής,

αλλά καλλιεργήθηκε στη Νότιο Αφρική στο Ακρωτήριο της Καλής ελπίδας κατά το 1800, όπου και απέκτησε την ονομασία *cape gooseberry*. Ο καρπός είναι ένα μικρό στρογγυλό μούρο, περίπου στο μέγεθος ενός βώλου, με πολλούς μικρούς κίτρινους σπόρους. Όταν είναι ώριμο είναι γλυκό κι έχει έντονο κίτρινο χρώμα που το κάνει ιδανικό για σνακ, πίτες και μαρμελάδες. Σύμφωνα με αναλύσεις, 100 g του μούρου είναι χαμηλά σε θερμίδες (53 kcal) και περιέχει μέτριες ποσότητες σε βιταμίνης C , θειαμίνη και νιασίνη , ενώ άλλες θρεπτικές ουσίες είναι αμελητέες. Αναλύσεις του ελαίου, κυρίως των σπόρων του, έδειξαν ότι το λινελαϊκό οξύ και το ελαϊκό οξύ ήταν το κύρια λιπαρά οξέα, η β-σιτοστερόλη και η καμπεστερόλη οι κύριες φυτοστερόλες , και στο έλαιο περιέχεται βιταμίνη K και β-καροτένιο.²³

Μύρτιλο (*Vaccinium myrtillus*)



Εικόνα 11: *Vaccinium myrtillus*

Το Μύρτιλο είναι ένα από τα διάφορα είδη φυτών χαμηλής ανάπτυξης της οικογενείας των Ερεικοειδών, παρά την επιστημονική του ονομασία (λατ. *Vaccinium myrtillus*) (Βακκίνιον ο μύρτιλλος) που υποδηλώνει ότι ανήκει στα Μυρτοειδή. Το θέμα περιπλέκεται ακόμα περισσότερο γιατί μερικοί βοτανολόγοι^[1] το συμπεριλαμβάνουν στην οικογένεια των Μορεοειδών (Moraceae) από την οποία διαφέρει ως προς την έλλειψη γαλακτώδους χυμού. Το μύρτιλο σχετίζεται με τη βελτίωση της νυχτερινής όρασης· μύρτιλα αναφέρονται σε μια δημοφιλή ιστορία του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, όπου πιλότοι της RAF καταναλώνουν μαρμελάδα μύρτιλο για να οξύνουν την όρασή τους στις αποστολές της νύχτας. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη του Πολεμικού Ναυτικού των ΗΠΑ δεν

εντόπισε καμία τέτοια επίδραση. Αν και η επίδραση του μύρτιλου στην όξυνση της νυκτερινής όρασης δεν έχει αποδειχθεί, εργαστηριακές μελέτες σε αρουραίους έχουν παράσχει προκαταρκτικά αποδεικτικά στοιχεία ότι η κατανάλωση μύρτιλου μπορεί να αναστείλει ή να αντιστρέψει οφθαλμικές διαταραχές, όπως η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Θεωρείται πλούσια πηγή φλαβονοειδών ενώσεων.

Βατομουρο (*Rubus idaeus* L)



Εικόνα 12: *Rubus idaeus* L

Η βατομουριά είναι θάμνος, του οποίου οι καρποί θεωρούνται ιδανικοί για την καταπολέμηση του διαβήτη και της υπέρτασης. Από τους καρπούς της βατομουριάς, παράγονται ξίδι, κρασί και με απόσταξη ρακή. Τα βατόμουρα έχουν εξαιρετικές θεραπευτικές ιδιότητες.²⁴ Το εξωτερικό τους είναι αποτελεσματικό σε δερματοπάθειες και σε αποστήματα. Οι καρποί της βατομουριάς περιέχουν πολλές βιταμίνες, κυρίως Α, Β, C, ουσίες που περιέχουν πολλά σιρόπια για την καταπολέμηση του πονόλαιμου και του βήχα. Χρησιμοποιείται επίσης ως φάρμακο κατά της φαρυγγίτιδας, της αναιμίας, της λαρυγγίτιδας, της διάρροιας, της ουλίτιδας και βοηθά στις λοιμώξεις του αναπνευστικού. Τα φύλλα της βατομουριάς χρησιμοποιούνται σε έγχυμα κατά της δυσεντερίας, των διαρροιών και των εσωτερικών αιμορραγιών. Συχνά χρησιμοποιείται και για την επούλωση των πληγών. Το έγχυμα αυτό της βατομουριάς, πιστεύεται ότι βοηθά τις εγκύους στη γέννα. Τα βατόμουρα έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδείς ενώσεις.²⁵

Λευκό μούρο (*Morus alba* L.)



Εικόνα 13: *Morus alba* L

Η λευκή μουριά (*Μορέα η λευκή - Morus alba*) ή κοινή. Έχει λευκούς και μερικές φορές κόκκινους καρπούς. Καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις στην Κίνα κυρίως για τα φύλλα της που δίνονται τροφή στους μεταξοσκώληκες και για την καλή ποιότητας ξυλεία που

παράγει.²⁶ Αξιοσημείωτο είναι ότι σπάνια βρίσκεις αυλή εκεί, χωρίς μια μουριά. Φτάνει στο ύψος τα 15 μέτρα, τα κλαδιά της απλώνονται και ο φλοιός της είναι χρώματος γκρίζου. Εγκλιματίστηκε στην Ευρώπη, όπου έφτασε το 12ο αιώνα μ.Χ., και υπάρχει σε πολλές περιοχές της Ελλάδας. Είναι καλλωπιστικό δέντρο και δίνει πολύ πλούσια σκιά. τα άγρια λευκά μούρα είναι πολύ θρεπτικά. Έχουν γλυκιά γεύση και είναι πλούσια σε βιταμίνη C και E, σίδηρο, ασβέστιο και φυτικές ίνες. Είναι πλούσια σε ανθοκυανίνες, φυτοχημικά, που ευθύνονται για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους. Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Βοηθούν στην πρόληψη νευρικών δυσλειτουργιών όπως της νόσου του Alzheimer και του Πάρκινσον. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό που βρέθηκε στα λευκά μούρα είναι η ρεσβερατρόλη (παρούσα σε κόκκινο κρασί).²⁷ Η ρεσβερατρόλη, επιδεικνύει παρόμοιες προστατευτικές ιδιότητες με την ανθοκυανίνη, αλλά επίσης ενεργοποιεί τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα και της κακής χοληστερόλης (LDL).²⁸

Κουμαριά (*Arbutus unedo*)



Εικόνα 14: *Arbutus unedo*

Η κουμαριά είναι ένα από τα ωραιότερα φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Είναι μεσογειακό είδος, αρκετά διαδεδομένο σε όλες τις χώρες της Μεσογείου. Ακόμη υπάρχει στην Ιρλανδία ως ιθαγενές φυτό, (άλλα όχι στην Αγγλία).²⁹

Η κουμαριά αναπτύσσεται σε όλη την Ελλάδα στην ζώνη των αείφυλλων – πλατύφυλλων, που εκτείνεται μέχρι 1.000 μ. υψόμετρο. Την συναντάμε σε θαμνώνες και δάση, σε ξηρές και πετρώδεις πλαγιές. Επειδή θεωρείτε άριστο καλλωπιστικό φυτό έχει μεταφερθεί σε όλο τον κόσμο. ³⁰(Αμερική , Αυστραλία κ.λ.π.) Είναι αειθαλές φυτό (δεν ρίχνει ποτέ τα φύλλα της) στην Ελλάδα είναι συνήθως θάμνος που μπορεί να φτάσει μέχρι τα 3 μέτρα, αλλά στις άλλες χώρες γίνεται δέντρο-ειδικά αυτά που χρησιμοποιούν ως καλλωπιστικό φυτό- που μπορεί να φτάσει και τα 10 μέτρα ύψος. Ο φλοιός της κουμαριάς περιέχει δεσφικές ουσίες και αρβουτίνη, ενώ τα φύλλα περιέχουν κουμαρίνη και οι καρποί πηκτίνες. Τα φύλλα της Κουμαριάς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις φλεγμονές του εντέρου, των νεφρών και της ουροδόχου

κύστης. Έχουν αντισηπτικές, διουρητικές, αντιφλεγμονώδεις, στυπτικές και αιμοστατικές ιδιότητες. Τα ώριμα κούμαρα συνιστώνται σε περιπτώσεις δυσκοιλιότητας και αεροφαγίας.³¹ Η κουμαρίνη βρίσκεται σε διάφορα φυτά όπως τα φασόλια tonka, τον μελίλωτο, την ασπερούλα (*Gallium* ή *Asperula odorata*), την συνηθισμένη και πολύ φθηνή ποικιλία της κανέλας *Cinnamomum Cassia*, τη τριγωνέλλα (*Trigonella foenum-graecum*), τη λεβάντα, τη γλυκόριζα, τις φράουλες, στο μαϊντανό, το σέλινο, το χαμομήλι, τα κόκκινα τριφύλλια, τα βερίκοκα, τα κεράσια και το γλυκό γαρίφαλο.. με μεγαλύτερη συγκέντρωση στα 4 πρώτα. Επίσης ως συστατικό αντιθρομβωτικών φαρμάκων (*Coumadin*, *Jantoven*, *Marevan* κτλ.). Η κουμαρίνη μπορεί να εμφανιστεί είτε ελεύθερη είτε συνδυασμένη με γλυκόζη (γλυκοζιτική κουμαρίνη).³²

Κράνα (*cornus mas*)



Εικόνα 15: *cornus mas*

Κράνα είναι οι καρποί του θαμνοειδούς φυτού κраниά. Χρησιμοποιούνται για παρασκευή ποτών, γλυκών και μαρμελάδας. Είναι τονωτικά για τον ανθρώπινο οργανισμό και βοηθούν στη σωστή λειτουργία του εντέρου^[1]. Τα κράνα περιέχουν υψηλό επίπεδο φλαβονοειδών και ανθοκυάνης την περίοδο της ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού.³³ Έχουν βρεθεί 4 φλαβονοειδή. Έρευνες απέδειξαν ότι τα κράνα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, ανθοκυάνες και φαινολικά παράγωγα.³⁴ Σε άλλες εργαστηριακές έρευνες βρέθηκε μεγάλη περιεκτικότητα σε σίδηρο (Fe) αλλά και βιταμίνη C (103 mg/100 g), καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ (4873 mg/100 g, περισσότερο από φράουλες, πορτοκάλια και ακτινίδια), καροτίνη και τανίνες.³⁵ Οι ουσίες αυτές έχουν αντιοξειδωτικές και στυπτικές ιδιότητες. Αποτελούν τονωτικό του ανθρώπινου οργανισμού και ρυθμίζουν το πεπτικό σύστημα. Τα κράνα περιέχουν την υψηλότερη ποσότητα σε ανθοκυάνες σε σύγκριση με τα σμέουρα, τα βατόμουρα και τα φραγκοστάφυλα.

Γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum*)



Εικόνα 16: *Silybum marianum*

Διετές ακανθώδες φυτό που φθάνει σε ύψος το 1,5 μέτρο. Τα φύλλα του είναι πράσινα με χαρακτηριστικά άσπρα σημάδια σαν φλέβες και τα λουλούδια του έχουν χρώμα βυσσινί. Είναι φυτό ιθαγενές της Μεσογείου και φυτρώνει σε όλη την νότια Ευρώπη. Είναι αυτοφυές, ευδοκιμεί σε χερσότοπους αλλά και σε καλλιεργημένες εκτάσεις. Προτιμά τα ηλιόλουστα μέρη και τα καλά στραγκιζόμενα εδάφη. Πολλαπλασιάζεται εύκολα από μόνο του με τους σπόρους του και αντέχει μέχρι και τους -15 βαθμούς κελσίου. Στη σύγχρονη βοτανοθεραπευτική, το γαϊδουράγκαθο είναι το κύριο γιατρικό που χρησιμοποιείται στη προστασία του συκωτιού από λοιμώξεις, κατανάλωση αλκοόλ ή χημειοθεραπείες. Μπορεί να βοηθήσει στο να περιοριστούν οι βλάβες στο συκώτι αλλά και στην ανανέωση των κυττάρων του. Χρησιμοποιείται ακόμα στη θεραπεία της ηπατίτιδας, του ίκτερου και της κύρωσης του ήπατος. Το γαϊδουράγκαθο περιέχει πολλές φλαβονοειδείς ενώσεις και είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά συστατικά.

1.2 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

Τα φυτοχημικά είναι μια ετερογενής ομάδα ουσιών που βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα και αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Τα φυτά συνθέτουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων που παραδοσιακά διαχωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με βάση το ρόλο που επιτελούν στο φυτικό μεταβολισμό.

36

Οι κυριότερες λειτουργίες των φυτοχημικών είναι:

Αντιοξειδωτική δράση: τα περισσότερα φυτοχημικά αναπτύσσουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα, προστατεύοντας τα κύτταρά μας από την οξειδωτική ζημία και μειώνοντας τον κίνδυνο ορισμένων τύπων καρκίνου. Φυτοχημικά με αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι: τα σουλφίδια (κρεμμύδια,

πράσα, σκόρδο), τα καροτενοειδή (φρούτα, καρότα), τα φλαβονοειδή (φρούτα, λαχανικά), οι πολυφαινόλες (τσάι, σταφύλια).

Ορμονική δράση: ισοφλαβονοειδή, που βρίσκονται στη σόγια, μιμούνται τα ανθρώπινα οιστρογόνα και βοηθούν να μειώσουν τα εμμηνοπαυσιακά συμπτώματα και την οστεοπόρωση.

Υποκίνηση των ενζύμων: τα φυτοχημικά που βρίσκονται στα λάχανα, υποκινούν τα ένζυμα που καθιστούν τα οιστρογόνα λιγότερο αποτελεσματικό και θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο για τον καρκίνο του μαστού. Άλλα φυτοχημικά παρεμποδίζουν τα ένζυμα και είναι ανασταλτικοί παράγοντες των πρωτεασών (σόγια και φασόλια).

Παρέμβαση στο DNA: οι σαπωνίνες που βρίσκονται στα φασόλια παρεμποδίζουν την καταστροφή του DNA των κυττάρων, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η καψαΐσίνη, που βρίσκεται στα καυτά πιπέρια, προστατεύει το DNA από τις καρκινογόνες ουσίες.

Αντιβακτηριακή δράση: το φυτοχημικό αλλισίνη που περιέχεται στο σκόρδο έχει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες ³⁷

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες περιέχουν κυρίως άνθρακα, άζωτο και φωσφόρο, στοιχεία τα οποία μετασχηματίζονται μέσα στο φυτικό κύτταρο μέσω τριών κύριων καταβολικών οδών: την γλυκόλυση, την οδό των φωσφορικών πεντοζών και των κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Ο πρωτογενής μεταβολισμός των φυτών διαφέρει κατά πολύ από τον μεταβολισμό των ζώων καθώς είναι μία φωτοεξαρτώμενη διαδικασία, γνωστή ως φωτοσύνθεση. Με άλλα λόγια, η καθήλωση του άνθρακα στα φυτά ρυθμίζεται από την χλωροφύλλη και άλλων φωτοσυνθετικών χρωστικών που βρίσκονται στους χλωροπλάστες των μεσόφιλων κυττάρων. Στα πρωτογενή συστατικά ανήκουν τα κοινά σάκχαρα, , οι πουρίνες και πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες η χλωροφύλλη, τα ακυλολιπίδια, τα νουκλεοτίδια, οι φυτοστερόλες, τα οργανικά οξέα κ.ά.

Στα δευτερογενή συστατικά ανήκουν τα χημικά στοιχεία των φυτών, όπως τα αλκαλοειδή (που προέρχονται από τα αμινοξέα), τα φαινολικά (που

προέρχονται από τους υδατάνθρακες) και τα τερπένια (ομάδα λιπιδίων). Οι πρωτογενείς μεταβολίτες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, την αναπνοή και την ανάπτυξη. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τα στοιχεία του πρωτογενούς μεταβολισμού στο ότι δεν είναι αναγκαία στοιχεία για τις βασικές μεταβολικές λειτουργίες της ανάπτυξης του φυτού.³⁸ Είναι, ωστόσο, πολύ σημαντικά και καθοριστικά συστατικά για πολλές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο φυτό.

Μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρούνται ως μεταβολικές μορφές αποβολής στοιχείων όπως για παράδειγμα, τα αλκαλοειδή πιθανά αποτελούν μεταβολικά υπολείμματα αζώτου. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες επιτελούν πολύ σημαντικές λειτουργίες, όπως προστασία των φυτών από φυτοφάγα, έντομα, ιούς, βακτήρια και μύκητες, προσέλκυση επικονιαστών και ζώων που διασκορπίζουν τους σπόρους και ενεργούν για την προφύλαξη από την υπεριώδη ακτινοβολία.³⁹ Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης(στοιχεία με ορμονική δράση που διεγείρουν ή αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση και την μορφογένεση), την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών. Κάποια φυτοχημικά προσδίδουν χρώμα ή οσμή προκειμένου να προσφέρουν μεταμπίεση, άλλα λειτουργούν ως μόρια επικοινωνίας, ενώ αρκετά θεωρούνται ως φυσικά παρασιτοκτόνα. Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός γενικά αποτελεί το 10% του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά, εντούτοις τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση.⁴⁰ Αξίζει να σημειωθεί πως τα φυτά ελέγχουν τη σύνθεση και αποθήκευση των φυτοχημικών ουσιών, έτσι ώστε οι περισσότεροι ευαίσθητοι ιστοί, όπως τα νεαρά φύλλα, να περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φυτοχημικών από όσο οι πιο ώριμοι ιστοί.^{41,42}

Έχουν, επίσης, δομικό ρόλο σε ιστούς, καθώς και σηματοδοτικές ιδιότητες, κυρίως στην αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον. Όταν εισάγονται στο περιβάλλον και στο έδαφος έχουν σημαντικές επιδράσεις στη σύσταση του εδάφους και τα μικροπεριβάλλοντα όπου τα φυτά αναπτύσσονται. Ορισμένα από αυτά τα στοιχεία είναι φαρμακολογικώς ενεργά, ενώ άλλα είναι είτε δύσγευστα είτε ιδιαίτερα τοξικά. Αξίζει να σημειωθεί πως τα φυτά ελέγχουν τη

σύνθεση και αποθήκευση των φυτοχημικών ουσιών, έτσι ώστε οι περισσότεροι ευαίσθητοι ιστοί, όπως τα νεαρά φύλλα, να περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φυτοχημικών από όσο οι πιο ώριμοι ιστοί.⁴³

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται ως χρωστικές ίνες, κόλλες, έλαια, κεριά, παραδοσιακά φάρμακα, φίλτρα για την υπεριώδη ακτινοβολία, καλλυντικά και αρώματα, και θεωρούνται πιθανές πηγές για νέα φυτικά φάρμακα, αντιβιοτικά, ζιζανιοκτόνα και παρασιτοκτόνα. Φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν τανίνες χρησιμοποιούνται στην κατεργασία του ζωικού δέρματος. Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών ως συστατικά της τροφής με προληπτική και προστατευτική δράση αναγνωρίζεται ευρέως στην έρευνα για την ανθρώπινη διατροφή. Αντίθετα με τις παραδοσιακές βιταμίνες, δεν είναι τόσο αποτελεσματικά για τη βραχυπρόθεσμη ανάκτηση της καλής φυσικής κατάστασης και υγείας στον άνθρωπο, ωστόσο, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω υπάρχουν ολοένα αυξανόμενες ενδείξεις για τη θετική επίδραση που έχει η μέτρια μακροχρόνια κατανάλωση στην πρόληψη εμφάνισης καρκίνων και πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο διαβήτης τύπου 2.

1.2.1 Βιοσύνθεση και αποθήκευση των δευτερογενών μεταβολιτών

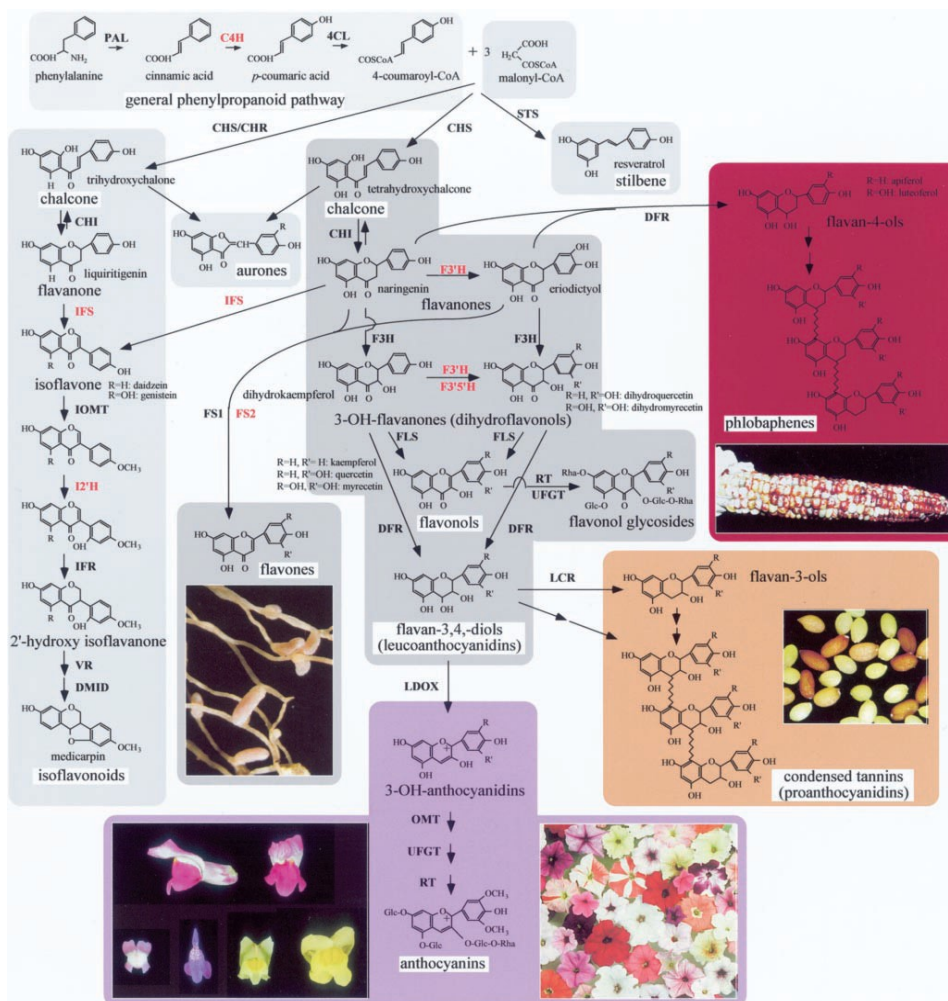
Η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών είναι ανεπτυγμένη σε όλα σχεδόν τα είδη των φυτών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι τρόποι σύνθεσης, και μάλιστα τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτή τη σύνθεση, ρυθμίζονται στενά και μπορεί να συνδέονται με περιβαλλοντικά, εποχιακά ή εξωτερικά ερεθίσματα. Οι κυτταρικές θέσεις που λαμβάνει χώρα η σύνθεση είναι απομονωμένες στο φυτικό κύτταρο, με τη πλειονότητα των μηχανισμών να είναι μερικώς ενεργοί στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι ενώσεις όπως τα αλκαλοειδή, η καφεΐνη και ορισμένα τερπένια συντίθενται στο χλωροπλάστη.⁴⁴

Η βιοσύνθεση κάποιων από αυτές τις ενώσεις εμφανίζεται σε κυστίδια κυττάρων και κάποιες άλλες όπως οι αμίνες συντίθενται στα μιτοχόνδρια. Η σύνθεση των λιπόφιλων ενώσεων είναι συνήθως συνδεδεμένη με το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως επίσης είναι και πολλές μετα-συνθετικές τροποποιήσεις όπως η υδροξυλίωση. Αν και οι δευτερογενής μεταβολίτες ανιχνεύονται συχνά σε όλο το φυτό, η αρχική θέση της σύνθεσής τους συχνά περιορίζεται σε μία μόνο περιοχή ενός οργάνου όπως οι ρίζες, τα φρούτα ή τα φύλλα. Στη συνέχεια, μπορούν να μεταφέρονται γύρω από το φυτό μέσω του φλοιώματος ή του ξυλώματος και αποθηκεύεται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ιστών. Η θέση της αποθήκευσης συχνά εξαρτάται από την πολικότητα των ενώσεων, οι υδρόφιλες ενώσεις όπως τα αλκαλοειδή, και οι τανίνες που αποθηκεύονται σε κυτταρικά κενά ή ιδιόβλαστα κύτταρα, ενώ λιπόφιλες ενώσεις όπως έλαια που βασίζονται στο τερπένιο αποθηκεύονται σε τριχώματα, σε αγωγούς ρητίνης, σε θυλακοειδείς μεμβράνες ή στην επιδερμίδα. Η αποθήκευση μπορεί να είναι σε ιστούς ή κυτταροεκλεκτική, με τα άνθη, τους καρπούς και τους σπόρους να είναι πλούσιες πηγές πολλών δευτερογενών μεταβολιτών, ιδιαίτερα σε φυτά που ανθοφορούν μια φορά το χρόνο. Σε άλλα είδη φυτών αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα σε βολβούς, ρίζες, ριζώματα και στο φλοιό των ριζών και των μίσχων.

Οι δευτερογενής μεταβολίτες μπορεί να μην είναι τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού, αλλά μπορεί να έχει έναν κανονικό ρυθμό κύκλου εργασιών. Δευτερογενής μεταβολίτες που περιέχουν άζωτο όπως αλκαλοειδή ή μη πρωτεϊνικά αμινοξέα αποθηκεύονται από το φυτό και μεταβολίζονται κατά την βλάστηση για να χρησιμεύσουν ως πηγές N ή C για την ανάπτυξη σπόρων. Υπάρχει επίσης ένα κύκλο εργασιών υδατανθράκων (π.χ. ολιγοσακχαριτών) και λιπιδίων κατά τη διάρκεια βλάστησης. Η συγκέντρωση κάποιου μεταβολίτη, όπως κάποιων αλκαλοειδών και ορισμένων μονοτερπενίων, έχουν επίσης αποδειχθεί να μεταβάλλεται σε μια ημερήσια κλίμακα, γεγονός που υποδηλώνει μια αλληλεπίδραση μεταξύ της σύνθεσης και του κύκλου εργασιών, και την ενεργό μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται.

Αν και οι δευτερογενής μεταβολίτες έχουν χρησιμοποιηθεί για χιλιάδες χρόνια στην ιατρική, ως αρωματικά, ως διεγερτικά και παραισθησιογόνα, ως αρώματα

σε καλλυντικά και οικιακά αποσμητικά και ως θεραπευτικοί παράγοντες, η κύρια χρήση πολλών τέτοιων μεταβολιτών είναι πιθανώς για άμυνα των φυτών.⁴⁵



Εικόνα 17: βιοσύνθεση και αποθήκευση δευτερογενών μεταβολιτών⁴⁵

1.2.2 Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων

Στην κατηγορία των φυτοχημικών απαντώνται και οι ευρέως διαδεδομένοι οξειδοαναγωγικοί δευτερογενείς μεταβολίτες φαινολικής φύσεως.⁴⁶ Οι πολυφαινόλες δίνουν χρώμα στο μίσχο, τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, και οι ανθοκυανίνες αποτελούν το χρωστικό συστατικό των περισσότερων ερυθρών και κυανών μερών του φυτού. Βρίσκονται στα άνθη και τους ώριμους καρπούς και έχουν ρόλο έλξης και προσέλκυσης κατά τις περιόδους της επικονίασης και της διάδοσης των σπόρων. Συναντώνται, επίσης, πολύ συχνά σε νεαρά φύλλα, όπου πιθανότατα ασκούν απωθητική δράση στα φυτοφάγα έντομα. Είναι ευρέως

γνωστό ότι οι αντιοξειδωτικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των φυτών σχετίζονται με την παρουσία φαινολικών ενώσεων.

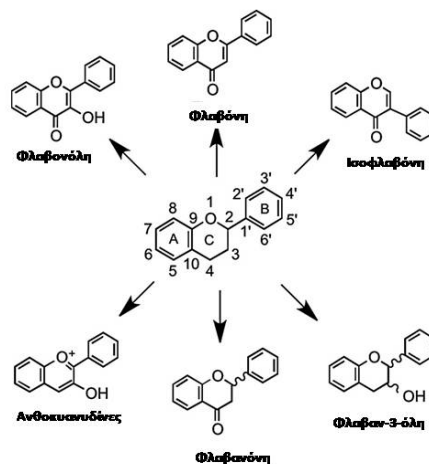
Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται συνήθως σε εδώδιμα και μη φυτά. Αυτές οι φυτοχημικές ενώσεις προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη και δεν περιέχουν καμία λειτουργική αζωτούχα ομάδα. Η δομή τους ποικίλει από χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις με μονό αρωματικό δακτύλιο έως τις μεγάλες και σύνθετες τανίνες, και τις πολυφαινόλες επίσης τα φαινολικά μόρια έχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες συνδεδεμένες υδροξυλικές ομάδες. Μερικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και τα δομικά στοιχεία τους.⁴⁷

48

Οι δύο κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων που διακρίνονται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή μόρια.

1.2.2.1 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

Τα φλαβονοειδή είναι υδατοδιαλυτά πολυφαινολικά μόρια που περιέχουν 15 άτομα άνθρακα. Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην οικογένεια των πολυφαινολών. μπορούν να απεικονιστούν ως δύο δακτυλίους βενζολίου οι οποίοι ενώνονται μαζί με μια μικρή αλυσίδα ανθράκων. Ένας από τους άνθρακες της βραχείας αλυσίδας είναι πάντα συνδεδεμένος με ένα άτομο άνθρακα ενός από τους δακτυλίους βενζολίου, είτε άμεσα είτε μέσω μιας γέφυρας οξυγόνου, σχηματίζοντας έτσι ένα



Εικόνα 18: Δομή των φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων⁴⁷

τρίτο μεσαίο δακτύλιο, που μπορεί να είναι πενταμελής ή εξαμελής και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της πλειοψηφίας των κίτρινων, κόκκινων και μπλε χρωμάτων στα φρούτα. Μαζί με τα καροτένια, τα φλαβονοειδή είναι επίσης υπεύθυνα για τον χρωματισμό των λαχανικών και βοτάνων.⁴⁶ Στα φυτά, τα φλαβονοειδή υπόκεινται σε γλυκοζυλίωση συνήθως με γλυκόζη και ραμνόζη,

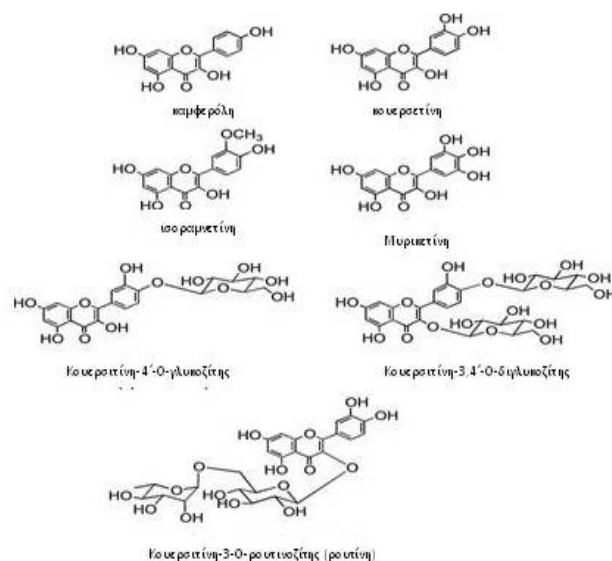
αλλά μπορούν επίσης να συνδεθούν με αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ ή άλλα σάκχαρα. Τα φλαβονοειδή ή βιοφλαβονοειδή βρίσκονται ευρέως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά, και αναγνωρίζονται ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Τα φλαβονοειδή έχουν επιδείξει ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών και προστασία κατά του οξειδωτικού στρες, λόγω του υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής και της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως χηλικοί συμπλοκοποιητές μετάλλων.⁴⁹ Με βάση τον τρόπο υποκατάστασης έχουμε τις κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών:

- Φλαβονόλες
- Φλαβόνες
- Φλαβανόνες
- φλαβαν-3-όλες
- ισοφλαβόνες
- ανθοκυανιδίνες

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι οι πιο εξαπλωμένες φλαβονοειδείς ενώσεις. Μια γνωστή φυσιολογική λειτουργία των φλαβονολών και των ανθοκυανινών είναι η πρόσληψη των επικοινωνιών και διασκορπιστώντων σπόρων. Επίσης για τη σύνθεση των φλαβονολών έχει προταθεί ότι έχει εξελιχθεί πρώτα για να παρέχουν

χημικούς “αγγελαφόρους” και στην συνέχεια για προστασία από την UV ακτινοβολία.⁵⁰ Οι φλαβονόλες, όπως για

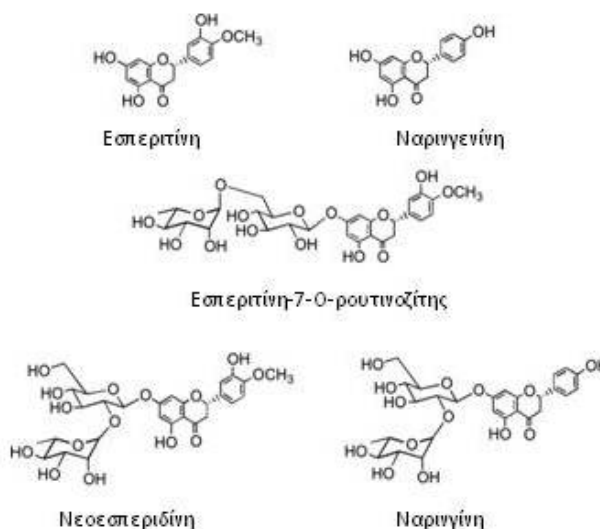


Εικόνα 19: Δομή φλαβονολών⁴⁷

παράδειγμα η μυρικετίνη, η κερκετίνη, η ισοραμνητίνη απαντώνται συνήθως ως γλυκοζίτες. Οι πιο κοινές φλαβονόλες, η καμφερόλη, η κοθρσιτίνη, η ισοραμνητίνη και η μυρικετίνη τυπικά έχουν βρεθεί ως γλυκοζίτες. Τα κίτρινα και τα κόκκινα κρεμμύδια είναι ιδιαίτερα πλούσια πηγή φλαβονολών.⁵¹

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες είναι μια ομάδα που αντιπροσωπεύεται κυρίως από ναρινγενίνης, εσπερετίνη και εριοδικτυόλη, ενώ αναφέρεται και μια σειρά από δευτερεύουσες ενώσεις. Στην πλειονότητα των φλαβονονών που απαντούνται φυσικά, το C-δακτύλιος συνδέεται με το B-δακτυλίου στο C2.⁵² Η δομή της



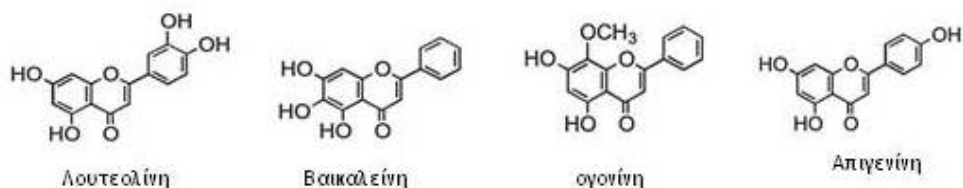
Εικόνα 20: Δομές φλαβονονών⁴⁷

φλαβανόνης είναι εξαιρετικά δραστική και έχει αναφερθεί ότι μπορεί να υποβληθούν σε υδροξυλίωση, γλυκοζυλίωση, και σε αντιδράσεις Ο-μεθυλίωσης και επίσης οι φλαβανόνες βρίσκονται αποκλειστικά στα εσπεριδοειδή ως γλυκοζίτες.^{50,51} Οι ρουτινοζίτες φλαβονονών είναι άγευστοι, ενώ τα προϊόντα σύζευξης όπως νεοεσπεριδοζίτης και ο εσπερετίνη-7-Ο-νεοεσπεριδοζίτης (νεοεσπεριδίνη) από το νεράντζι (*Citrus aurantium*) έχουν μια έντονα πικρή γεύση. Η ναρινγενίνη βρίσκεται επίσης σε ντομάτες και προϊόντα με βάση τις τομάτες.

Φλαβόνες

Οι Φλαβόνες, όπως η απιγενίνη, λουτεολίνη και βαϊκαλεΐνη, είναι παρόμοιες δομικά με τις φλαβονόλες, εκτός στερούνται οξυγόνωσης στο C-3. Ένα ευρύ φάσμα υποκαταστάσεων είναι δυνατόν να συμβεί στις φλαβόνες όπως

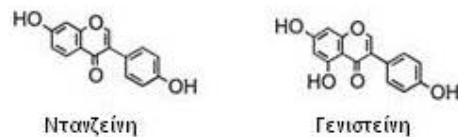
υδροξυλίωση, μεθυλίωση, Ο-και C-γλυκοζυλίωση, και αλκυλίωση.⁵¹ Οι φλαβόνες δεν είναι ευρέως διαδεδομένες, αν και σημαντικά ποσά έχουν ανιχνευθεί στο σέλινο (*Apium graveolens*), μαϊντανό (πετροσέλινο Ορτάνς), και κάποια βότανα.^{50,51}



Εικόνα 21: Δομές φλαβονών⁴⁷

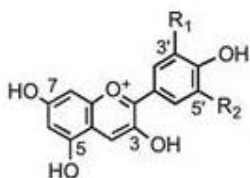
Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες είναι φυτοχημικά που βρίσκονται σε πολλά φυτά.⁵³ Λόγω της διαρθρωτικής τους ομοιότητας με Β-οιστραδιόλη, τα οφέλη των ισοφλαβονών για την υγεία έχουν αξιολογηθεί με βάση νόσους σχετιζόμενες με την ηλικία και



Εικόνα 22: Δομές ισοφλαβονών⁴⁷

ορμονο-εξαρτώμενες νόσους. Η γενιστεΐνη και η γλυκιτεΐνη υπάρχουν ως ελεύθερες μορφές ή παράγωγα στα τρόφιμα που περιέχουν σόγια ή πρωτεΐνη σόγιας.⁵⁴ Μερικές φυσιολογικές λειτουργίες τους αποδίδονται στις δομικές τους ομοιότητες με τις β-οιστραδιόλες, ενώ περιστασιακά αναφέρονται ως «φυτοοιστρογόνα». Η δομή αυτών των ισοφλαβονοειδών είναι τέτοια, που φαίνονται να μιμούνται τη στεροειδή ορμόνη οιστραδιόλη. Οι μη φλαβονοειδείς λιγνάνες, που είναι μια διαφορετική ομάδα ενώσεων ευρισκόμενες σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως σε δημητριακά, επίσης ταξινομούνται ως φυτοοιστρογόνα⁵¹



Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Πελαργονιδίνη	H	H
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Πεονιδίνη	OCH ₃	H
Πετουνιδίνη	OCH ₃	OH
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃

Εικόνα 23: Δομές ανθοκυανιδίων⁴⁷

ξυλόζη, αραβινόζη. Η ακυλίωση μπορεί επίσης να παρουσιαστεί, αποδίδοντας μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ανθοκυανίνων. Οι ανθοκυανίνες είναι ευρέως διαδεδομένα συστατικά της ανθρώπινης διατροφής, διότι είναι παρούσες σε μία ποικιλία από φρούτα και λαχανικά.

Αρκετές πιθανές επιδράσεις που προάγουν την υγεία έχουν αποδοθεί σε ανθοκυανίνες. αυτό συμβαίνει διότι παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και των φλεγμονών, ενεργούν ως αγγειοπροστατευτικά και παράγοντες κατά της παχυσαρκίας, έχει επιδράσεις στο διαβήτη και λειτουργούν σαν πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων και στη βελτίωση της λειτουργίας του εγκεφάλου και της όρασης.⁵⁶

Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι τα φλαβονοειδή που βρίσκονται συνήθως σε φυτικούς ιστούς και είναι υπεύθυνες για τα κόκκινα, μπλε και μοβ χρώματα των περισσότερων λουλουδιών και φρούτων. Μεταξύ των διαφόρων ανθοκυανιδίων που απαντώνται στα φυτά, έξι απαντώνται πιο συχνά και είναι αυτές με την μεγαλύτερη διατροφική σημασία: κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πελαργονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη.⁵⁵

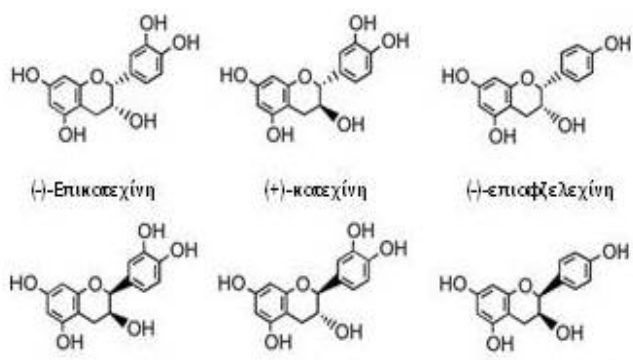
Οι ανθοκυανιδίνες δυνδύνονται με σάκχαρα όπως είναι η γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη,

φλαβαν-3-όλες

Οι φλαβαν-3-όλες(κατεχίνες) και τα πολυμερή προϊόντα συμπύκνωσης τους, οι προανθοκυανιδίνες,

θεωρούνται ως λειτουργικά συστατικά σε διάφορα ποτά, στα επεξεργασμένα τρόφιμα, βότανα και συμπληρώματα.

Η παρουσία τους στα τρόφιμα επηρεάζει τις παραμέτρους της ποιότητας των τροφίμων, όπως συστάδα, πικρία, ξινίλα, γλυκύτητα, το άρωμα, το και το σχηματισμό χρώματος.



Εικόνα 24: Δομές των μονομερών των φλαβαν-3-ολών⁴⁷

Η ικανότητα των φλαβαν-3-ολών να βοηθούν τη λειτουργικότητα των τροφίμων έχει συσταθεί από την άποψη της μικροβιακής σταθερότητας, της οξειδωτικής σταθερότητας και της θερμικής σταθερότητας.⁵⁷ Οι φλαβαν-3-όλες είναι η πιο σύνθετη υποομάδα των φλαβονοειδών που κυμαίνονται από τα απλά μονομερή [π.χ. (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη] στις ολιγομερείς και πολυμερείς προανθοκυανιδίνες. Η (+)-κατεχίνη και το ισομερές της, η (-)-επικατεχίνη, είναι διάχυτες παντού στη φύση ενώ η (-)-κατεχίνη και το ισομερές της, η (+)-επικατεχίνη είναι σχετικά σπάνιες. Οι προανθοκυανιδίνες, οι επονομαζόμενες επίσης συμπυκνωμένες τανίνες, μπορεί να βρεθούν ως πολυμερή των φλαβαν-3-ολων μέχρι τις 50 μονάδες.⁵¹ Επιπλέον, στη διαμόρφωση τέτοιων μεγάλων και σύνθετων δομών, οι φλαβαν-3-όλες υδροξυλιώνονται για να σχηματίσουν τις γαλλοκατεχίνες, και υφίστανται, επίσης, εστεροποίηση με το γαλλικό οξύ.

1.2.2.2 Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

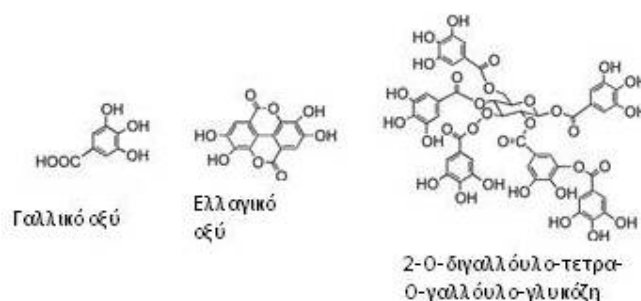
Στις μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις έχουμε τις εξής κατηγορίες:

- Φαινολικά οξέα

- Υδρολύμενες τανίνες
- Στιλβένια
- Λιγνάνες

Φαινολικά οξέα

Μεταξύ των μη φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων είναι τα C6-C1 φαινολικά οξέα. Το Γαλλικό οξύ είναι πιο σύνηθες φαινολικό οξύ, και εμφανίζεται ευρέως ως πολύπλοκοι εστέρες σακχάρων σε ταννίνες, όπως η 2-O-διγαλλούλο-τετρα-O-γαλλοϋλο-

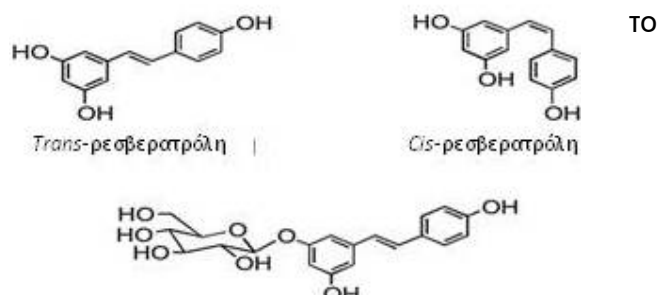


Εικόνα 25: Δομές φαινολικών οξέων⁴⁷

γλυκόζη. Τα πιο συνηθισμένα οξέα που απαντώνται στα φρούτα είναι το γαλλικό, βανιλλικό, ελλαγικό, και συριγγικό.⁵¹ Τα φαινολικά οξέα αντιστοιχούν στο ένα τρίτο των διαιτητικών φαινολών, και βρίσκονται σε φρούτα σε συζευγμένη μορφή. Οι ουσίες αυτές χωρίζονται σε δύο υποομάδες: τα βενζοϊκά και τα κινναμωμικά οξέα.⁵⁸ Σε αντίθεση με άλλες φαινολικές ενώσεις, παρουσιάζουν όξινο χαρακτήρα λόγω της παρουσίας μιας καρβοξυλικής ομάδας στο μόριο. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε διάφορα φρούτα, κυρίως ως εστέρες. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό, καφέϊκό και φερουλικό βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά, συχνά σε εστεροποιημένες μορφές ή συνδεδεμένα με πρωτεΐνες. Συχνά, συσσωρεύονται με τη μορφή των αντίστοιχων τρυγικών εστέρων τους, δηλαδή ως το κουρταρικό, καφταρικό και φερταρικό οξύ, αντίστοιχα, και αναφέρονται συλλογικά ως χλωρογενικά οξέα.⁵⁹

Στιλβένια

Τα στιλβένια έχουν μια δομή C6-C2-C6 και είναι φυτοαλεξίνες που παράγονται από τα φυτά ως απάντηση σε ασθένειες, τραυματισμούς, και άγχος.⁶⁰ Η κύρια μορφή των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-trihydroxystilbene), η οποία εμφανίζεται ως cis και trans ισομερή, καθώς και ως συζευγμένα παράγωγα,



Εικόνα 26: Δομές των πιο συνηθισμένων στιλβενίων⁴⁷

συμπεριλαμβανομένων των trans-ρεσβερατρόλη-3-O-γλυκοζίτης (trans-piceid). Η ξυλώδης ρίζα των επιβλαβών ζιζανίων *Polygonum cuspidatum* περιέχει ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της trans-ρεσβερατρόλης και του γλυκοζίτη της με συγκεντρώσεις μέχρι 377mg/100g ξηρού βάρους. Η πιο σημαντική πηγή στιλβενίων είναι τα σταφύλια το κρασί, η σόγια και τα φιστίκια.

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες αποτελούνται από δύο ομάδες φαινυλοπροπανοειδών που συνδέονται μέσω της πλευρικής C8 αλυσίδας, συνήθως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Οι λιγνάνες είναι μια από τις πιο σημαντικές τάξεις φυτοοιστρογόνων, δηλαδή χημικών όμοιων με τα οιστρογόνα. Στο γαστρεντερικό σύστημα, αυτά τα μόρια μετατρέπονται σε άλλες ενώσεις (εντεροδιόλη και εντερολακτόνη) και έχουν οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές ιδιότητες⁵¹. Τα φρούτα δεν είναι η κύρια διαιτητική πηγή των λιγνανών, και μικρές συγκεντρώσεις τους βρίσκονται στις φράουλες και τα κράνμπερι. Μεγάλες ποσότητες λιγνανών περιέχει ο λιναρόσπορος.⁶¹

1.2.3Αντιοξειδωτικές Ενώσεις

Τα φυτά παράγουν πολλές αντιοξειδωτικές ενώσεις. Ένα αντιοξειδωτικό είναι μια χημική ουσία η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις μειώνει το ποσοστό των αντιδράσεων οξείδωσης, όπου αντιδράσεις οξείδωσης είναι χημικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ουσία σε έναν οξειδωτικό παράγοντα γεγονός που συνήθως οδηγεί σε χημικές ουσίες με διαφορετικές ιδιότητες από τις αρχικές.

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστατικά σε συμπληρώματα διατροφής που χρησιμοποιούνται για λόγους υγείας, όπως για τη πρόληψη του καρκίνου και των καρδιακών παθήσεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών έχουν οφέλη για την υγεία⁶¹

Στην επιστήμη των τροφίμων, αντιοξειδωτικά θεωρούνται τα συστατικά που εμποδίζουν το τάγγισμα των λιπών στα τρόφιμα, καθώς και οι διαιτητικές αντιοξειδωτικές ουσίες που μειώνουν τις ανεπιθύμητες συνέπειες των δραστικών ειδών, όπως των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου, στη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.⁶²

Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες :

1. Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
2. Να μην έχει καμιά βλαβερή επίδραση στην υγεία τον ανθρώπου.
3. Να μην προσδίνει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
4. Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό
5. Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου.

Η δημιουργία ελεύθερων ριζών ή δραστικών ειδών οξυγόνου, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού ή άλλων λειτουργιών, πέρα από την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός βιολογικού συστήματος προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Μια ελεύθερη ρίζα περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια Σε μερικές περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν ουσιαστικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, είναι παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικά, σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, και μπορούν να εμποδίσουν τον κυτταρικό Θάνατο. Τα φυτικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν ως:

- αποσβέστες των ριζών οξυγόνου,
- καθαριστές ελεύθερων ριζών,
- αποικοδομητές των υπεροξειδίων
- αναχαιτιστές ενζύμων.

Στην πραγματικότητα οι όροι «φυτοχημικό» και «αντιοξειδωτικό» είναι συνώνυμοι στην αντίληψη των καταναλωτών και μερικών εμπορικών τμημάτων.⁶²

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος σχηματισμού των αντιοξειδωτικών ουσιών είναι η σύνθεσή τους από διάφορους μικροοργανισμούς και κατά βάση από τα φυτά. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται φυσικά αντιοξειδωτικά. Ένας άλλος τρόπος παραγωγής αντιοξειδωτικών είναι η σύνθεση ή η βιοσύνθεσή τους από ειδικούς στη βιομηχανία, και ονομάζονται συνθετικά αντιοξειδωτικά. Η τρίτη ομάδα ουσιών περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά όμοια με τους φυσικά, αλλά που συντίθενται στη βιομηχανία, και ονομάζονται αντιοξειδωτικά πανομοιότυπα των φυσικών.³⁸

1.2.3.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Στις λιπαρές ύλες υπάρχουν και φυσικά αντιοξειδωτικά όπως οι τοκοφερόλες. Είναι τέσσερα ομόλογα γνωστά η α,β,γ και δ-τοκοφερόλη που η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από τα α-ομόλογα προς το δ, αντίθετα με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται κατά την ίδια σειρά. Οι τοκοφερόλες δρουν ως βιολογικά αντιοξειδωτικά στα φυτά και τους ζωικούς ιστούς. Στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των ελαίων χάνεται ένα σημαντικό μέρος των τοκοφερολών. Αυτό που μένει όμως συμβάλλει στην αύξηση του ορίου συντήρησης του εξευγενισμένου ελαίου.⁶²

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δρουν μέσω τον μηχανισμού των ελεύθερων ριζών. Αντιδρούν δηλ. με τις τελευταίες και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να

παγιδεύουν ελεύθερες ρίζες εξαρτάται από τη δομή τους, ιδιαίτερα των ατόμων υδρογόνου της αρωματικής ομάδας που μπορεί να μεταφερθεί στις ελεύθερες ρίζες. Οι αντιριζικές ιδιότητες εξαρτώνται από την οξύτητα των φαινολικών υδροξυλικών ομάδων και από τη σταθερότητα της σχηματιζόμενης ρίζας. Επιπλέον, ο βαθμός της γλυκοζυλίωσης επηρεάζει άμεσα την αντιοξειδωτική ιδιότητα των φλαβονοειδών.¹⁰ Παραδείγματος χάριν, συνήθως, οι άγλυκες μορφές της μυρικετίνης και της κερκετίνης (φλαβονοειδείς ενώσεις) είναι πιο ενεργές από τις γλυκοζυλιωμένες. Οι ανθοκυανίνες καθώς και άλλα φαινολικά, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου σε πολύ δραστικές ρίζες, εμποδίζοντας έτσι τον περαιτέρω σχηματισμό ριζών.

Η δράση των φαινολικών ουσιών διαφέρει σημαντικά από εκείνη άλλων ενώσεων που χαρακτηρίζονται με την ευρύτερη έννοια του όρου επίσης σαν αντιοξειδωτικά. Το ασκορβικό οξύ π.χ. ως αναγωγικό μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες, που σχηματίζονται στην ενζυμική αμαύρωση των φαινολικών ουσιών κι αυτό παρέχει μια προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών. Το ασκορβικό οξύ, επίσης με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (για να είναι λιποδιαλυτό) πιστεύεται ότι αναγεννά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχοντας υδρογόνο στις φαινοξυ ρίζες, κι έτσι έχει μια έμμεση δράση, ως αντιοξειδωτικό.⁶³

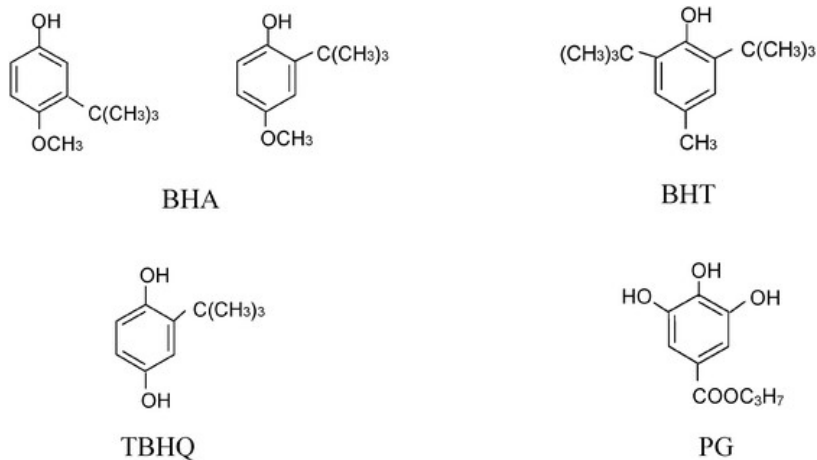
Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών μπορούν επίσης να συμπεριληφθούν αναγωγικές ενώσεις όπως το θειώδες οξύ και τα άλατά του, το κιτρικό οξύ και το EDTA. Το Θειώδες οξύ και τα Θειώδη άλατα αντιδρούν εύκολα με το οξυγόνο και δίνουν μια σχετική προστασία στα αποξηραμένα φρούτα και λαχανικά. Το EDTA και το κιτρικό οξύ σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με τα μέταλλα, κυρίως το σίδηρο και το χαλκό που προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

1.2.3.2 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα πιο γνωστά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία τροφίμων είναι:⁶⁴

1. Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη(BHA), μίγμα δύο ισομερών της 2- τριτ. - βουτυλο- 4- μεθόξυφαινόλης και 3- τριτ.-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης

2. Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT)
3. Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός (PG) ο οκτυλικός και ο δωδεκυλικός.
4. Η δι- τριτ.-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ)



Εικόνα 27: Δομές των BHA, BHT, TBHQ, PG

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι αρκετά πιο αποτελεσματικά από την α-τοκοφερόλη και άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία συνήθως είναι λιγότερο λιποδιαλυτά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι αρκετά πιο πολικά από τα συνθετικά, με εξαίρεση τα καροτένια, τις τοκοφερόλες και τους εστέρες τους, και τις λιγνάνες του σησαμιού. Επομένως, τα φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά δεν είναι συνήθως επαρκώς διαλυτά στη λιπιδική φάση των τροφίμων, και περιορίζεται ένεκα αυτού η αποτελεσματικότητά τους.⁶⁵ Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως προσθετικά για να συντηρήσουν και να σταθεροποιήσουν τροφές και ζωοτροφές, για φρεσκάδα, αύξηση της θρεπτικής αξίας, γεύση και χρώμα.

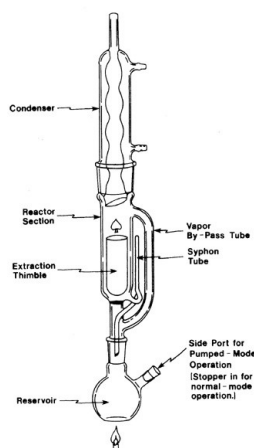
1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.

Οι πιο κοινές τεχνικές για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών περιλαμβάνουν διαλύτες, είτε οργανικούς είτε ανόργανους. Διάφορες παράμετροι μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση των φαινολικών,

συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου εκχύλισης, της θερμοκρασία, η αναλογία διαλύτη-προς-δείγμα, ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων εκχυλίσεων του δείγματος, καθώς και ο τύπος του διαλύτη. Επιπλέον, η βέλτιστη ανάκτηση των φαινολικών είναι διαφορετική από το ένα δείγμα στο άλλο και εξαρτάται από το είδος του φυτού και οι δραστικές ενώσεις του. Η επιλογή των διαλυτών εκχύλισης, όπως το νερό, ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα, αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη και προπανόλη) και τα μείγματα τους θα επηρεάσουν τις αποδόσεις των εξαγόμενων φαινολικών συστατικών.⁶⁶ Το υπόστρωμα του δείγματος και το μέγεθος των σωματιδίων, επίσης, επηρεάζουν έντονα την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από φυτικά υλικά. Τα φαινολικά συστατικά μπορεί να δεσμεύονται με άλλα στοιχεία του δείγματος, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Όλοι οι τρόποι εκχύλισης μπορούν συνδυαστούν με κάποιου είδους υδρόλυση (όξινη, βασική, ενζυμική) για να μπορέσουν τα φαινολικά συστατικά να αποδεσμευτούν από το υπόστρωμα.

Εκχύλιση soxhlet

Η Soxhlet είναι η θερμαινόμενη εκχύλιση με αναρροή είναι μία από τις συμβατικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάκτηση φαινολικών από στερεά δείγματα. Μια εκχύλιση Soxhlet απαιτείται μόνο όταν η επιθυμητή ένωση έχει περιορισμένη διαλυτότητα σε ένα διαλύτη και η Soxhlet εκτελείται κανονικά στους 90 ° C για αρκετές ώρες. Αυτή η μέθοδος είναι απλή,



απαιτεί σχετικά φθηνή συσκευή και δίνει αποτελέσματα με επαρκώς υψηλά ποσοστά εκχύλισης φαινολικών ουσιών.⁶⁷ Ενώ υπάρχουν πολλές θετικές πτυχές αυτής της μεθόδου, υπάρχουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τα εξής: (1) η ανάγκη για μεγάλες ποσότητες των επικίνδυνων οργανικών διαλυτών, που είναι περιβαλλοντικοί ρύποι και αποτελούν κίνδυνο για την υγεία (2) πολύωρες εκχυλίσεις (3) και η υποβάθμιση των συστατικών εξαιτίας τόσο των εσωτερικών όσο και των εξωτερικών παραγόντων, όπως το φως, ο αέρας, η υψηλές θερμοκρασίες και ενζυματικές αντιδράσεις.⁶⁸ Η Soxtec είναι μια τροποποιημένη μέθοδος εκχύλισης της Soxhlet. Τα πλεονεκτήματα αυτής της

τεχνικής έναντι της κανονικής Soxhlet είναι η χαμηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών και οι μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης, καθώς και η ικανότητα ανακύκλωσης των διαλυτών.⁶⁹

Εκχύλιση με την χρήση μικροκυμάτων -*Microwave-Assisted Extraction* (MAE)

Τα μικροκύματα έχουν εφαρμοστεί ευρέως στην έρευνα για τους δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών για δεκαετίες. Τα μικροκύματα προκαλούν μοριακή κίνηση σε υλικά ή διαλύτες με δίπολα, με αποτέλεσμα την θέρμανση του δείγματος. Η θέρμανση προκαλεί τα φυτικά κύτταρα να χάνουν την υγρασία μέσω της εξάτμισης. Ο ατμός που παράγεται διογκώνεται και τελικά σπάει τα κύτταρα, απελευθερώνοντας τα ενεργά συστατικά τους.⁷⁰ Εκτός από τα δίπολα μόρια του φυτικού κυττάρου, όπως το νερό, η περιστροφή των διπόλων των μορίων του διαλύτη υπό την ταχεία μεταβολή του ηλεκτρικού πεδίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή την εκχύλιση.

Εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων-Ultrasonic-Assisted Extraction(UAE)

Η υπερηχητική ακτινοβολία, η οποία έχει συχνότητες υψηλότερες από 20 kHz, διευκολύνει την εκχύλιση των οργανικών και ανόργανων ενώσεων από στερεά υποστρώματα χρησιμοποιώντας υγρούς διαλύτες. Η επεξεργασία με υπερήχους είναι η παραγωγή των ηχητικών κυμάτων που δημιουργούν φουσαλίδες κοντά στον ιστό του δείγματος, οι οποίες διασπώνται και διαταράζουν τα κυτταρικά τοιχώματα, απελευθερώνοντας έτσι τα περιεχόμενα των κυττάρων.⁷¹ Ένας κατάλληλος διαλύτης αναμιγνύεται με ένα δείγμα και η κατεργασία με υπερήχους γίνεται υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η ποιότητα του εκχυλίσματος επηρεάζεται όχι μόνο από το χρόνο κατεργασίας με υπερήχους, τη θερμοκρασία και την επιλογή του διαλύτη, αλλά και από τη συχνότητα των κυμάτων υπερήχων και διανομή κύματος.⁷² Οι δύο πιο κοινοί τρόποι εφαρμογής εκχύλισης με κύματα υπερήχων στα δείγματα είναι probe και bath.⁷³



Εικόνα 29: Συσκευή
δημιουργίας
υπερήχων⁷³

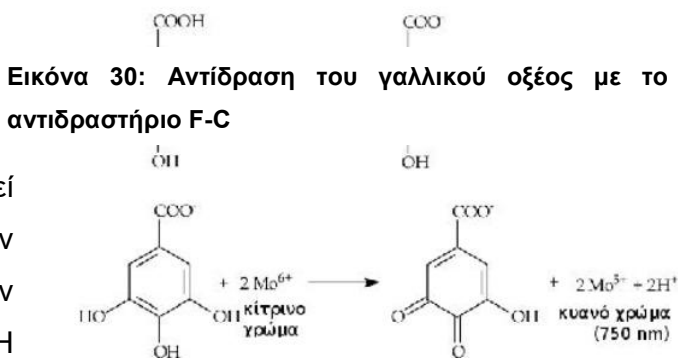


1.1. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού φαινολικών συστατικών- αντιοξειδωτική ικανότητα τροφίμων

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων από τα τρόφιμα υπολογίζεται με την μέθοδο Folin-Ciocalteu ((F-C). Το αντιδραστήριο F-C αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξείδια που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου που στην συγκεκριμένη

περίπτωση επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ.⁷⁴ Οι (DPPH •) δοκιμές εφαρμόζονται συχνά για να χαρακτηριστεί η ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών των φαινολικών ενώσεων. Η

DPPH • δεν διμερίζεται, δηλαδή, παραμένει στη μονομερή μορφή της σε διαλύματα, επιδεικνύει μια σταθερή απορρόφηση σε μία ευρεία περιοχή pH, και αντιστέκεται στην οξείδωση. Επιπλέον, οι συνθήκες αντίδρασης είναι ήπιες και τα αποτελέσματα παρέχουν βασικές πληροφορίες σχετικά με τη δραστητικότητα των ενώσεων σε σχέση με τη δομή τους.⁷⁵ Παρουσία ενός σαρωτή ελευθέρων ριζών η ρίζα δέχεται ένα ηλεκτρόνιο ή ένα υδρογόνο και έτσι το μόριο γίνεται διαμαγνητικό και από μωβ χρώμα γίνεται σταδιακά κίτρινο.





Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει η παραπάνω αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με την DPPH σε μια ισορροπία ποικίλει και εξαρτάται από από τις ενώσεις ή το μείγμα των ενώσεων.⁷⁶

1.4 ΕΝΟΡΓΑΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Με την τεχνική της HPLC επιτυγχάνουμε το διαχωρισμό των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μια χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην HPLC διακρίνουμε δυο φάσεις: I. Τη στατική φάση, που αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό, ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη II. Την κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης, ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά.

Επιλογή Κατάλληλων Φάσεων :

Επιλογή Στατικής Φάσης

Η επιλογή της στατικής φάσης και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι σημαντικά για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και καθορίζεται από τις επιμέρους παραμέτρους:

- i. Το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης
- ii. Η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης
- iii. Η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως
- iv. Ο τύπος του υποστρώματος το οποίο πρέπει να είναι χημικά αδρανές.
- v. Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

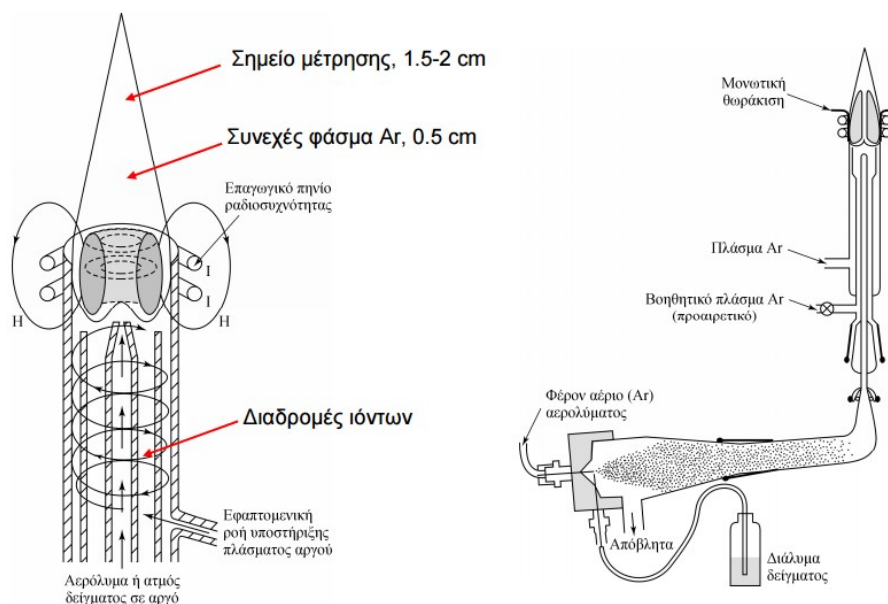
Επιλογή Κινητής Φάσης

Είναι γνωστό από τη χρωματογραφική θεωρία ότι η διακριτική ικανότητα R_s εξαρτάται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N , τον παράγοντα συγκράτησης k και τον παράγοντα διαχωρισμού α . Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων k και α γίνεται κυρίως με αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης. Έτσι, μετά την επιλογή της στατικής φάσης (βελτιστοποίηση του N), η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση έτσι ώστε: $1 < k < 20$. Εφαρμογές : Η HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μιγμάτων μοριακών, ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και πολικότητας, προσδιορίζοντας σε ιόντα ποσότητες της τάξης του ppb . Η μέθοδος HPLC έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων καθώς και των μεταβολιτών τους. Στην ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές με την αέρια χρωματογραφία.

Είδη HPLC : Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.⁷⁷

1.4.2 Φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS)

Φασματομετρία μάζας Επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) είναι ένας τύπος φασματομετρίας μάζας η οποία είναι ικανή να ανιχνεύει μέταλλα και μη-μέταλλα σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο το ένα μέρος στο 10^{15} (ανά τετράκις εκατομμύρια, ppb). Αυτό επιτυγχάνεται με τον ιονισμό του δείγματος με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα και στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο μάζας για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των εν λόγω ιόντων. Η τεχνική φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) αποτελεί μια σύγχρονη και αποτελεσματική μέθοδο πολυστοιχειακής ανάλυσης με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (ng/L). Η εκτίμηση της αβεβαιότητας και ο έλεγχος εγκυρότητας των αναλύσεων ιχνοστοιχείων καθορίζουν εκτός από τα όρια αξιοπιστίας, την πιθανότητα υπέρβασης των τιμών ασφαλείας.



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση ICP-MS⁷⁹

Σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, το ICP-MS έχει μεγαλύτερη ταχύτητα, ακρίβεια, και ευαισθησία. Ωστόσο, σε σύγκριση με άλλους

τύπους φασματομετρίας μάζας, όπως τη θερμικού ιονισμού φασματομετρία μάζας (TIMS), το ICP-MS έχει πολλούς παρεμποδιστικούς παράγοντες: αργό από το πλάσμα, τα αέρια συστατικά που διαρρέονται μέσω των στόμιων, και η μόλυνση από τα γυάλινα σκεύη.⁷⁸

Το επαγωγικώς συζευγμένο πλάσμα είναι ένα πλάσμα που ενεργοποιείται (ιονίζεται) με επαγωγική θέρμανση του αερίου με ένα ηλεκτρομαγνητικό πηνίο, και περιέχει μία επαρκή συγκέντρωση ιόντων και ηλεκτρονίων για να κάνουν το αέριο ηλεκτρικά αγώγιμο. Ακόμη και ένα μερικώς ιονισμένο αέριο μπορεί να έχει τα χαρακτηριστικά ενός πλάσματος (δηλαδή, απόκριση σε μαγνητικά πεδία και υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα). Τα πλάσματα που χρησιμοποιούνται στην φασματοφωτομετρική ανάλυση είναι ουσιαστικά ηλεκτρικά ουδέτερα, με κάθε θετικό φορτίο σε ένα ιόν να ισοσταθμίζεται με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Σε αυτά τα πλάσματα τα θετικά ιόντα είναι σχεδόν όλα μονού φορτίου και υπάρχουν λίγα αρνητικά ιόντα, οπότε υπάρχουν σχεδόν ίσες ποσότητες των ιόντων και ηλεκτρονίων σε κάθε μονάδα όγκου του πλάσματος. το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP) για φασματομετρία διατηρείται σε ένα δίαυλο που αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες, συνήθως από χαλαζία, αν και ο εσωτερικός σωλήνας (injector) μπορεί να είναι από ζαφείρι εάν χρησιμοποιείται υδροφθορικό οξύ. Το τέλος αυτού του δίαυλου τοποθετείται μέσα σε ένα πηνίο επαγωγής το οποίο τροφοδοτείται με ηλεκτρικό ρεύμα ραδιοσυχνοτήτων. Μια ροή αερίου αργού (συνήθως 13 έως 18 λίτρα ανά λεπτό) εισάγεται μεταξύ των δύο ιδιαίτερα απομακρυσμένων σωλήνων του δίαυλου και ένας ηλεκτρικός σπινθήρας εφαρμόζεται για σύντομο χρονικό διάστημα για να εισαγάγει ελεύθερα ηλεκτρόνια εντός του ρεύματος του αερίου.

Αυτά τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το μαγνητικό πεδίο ραδιοσυχνοτήτων του πηνίου επαγωγής και επιταχύνονται πρώτα σε μία κατεύθυνση, και μετά προς την άλλη, καθώς το πεδίο αλλάζει με μεγάλη συχνότητα (συνήθως 27,12 εκατομμύρια κύκλους ανά δευτερόλεπτο). Τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια συγκρούονται με άτομα αργού, και μερικές φορές μια τέτοια σύγκρουση προκαλεί ένα άτομο αργού να χωριστεί με ένα από τα ηλεκτρόνιά του. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την απότομη αλλαγή του μαγνητικού πεδίου. Η

διαδικασία συνεχίζεται έως ότου ο ρυθμός απελευθέρωσης των νέων ηλεκτρονίων στις συγκρούσεις εξισορροπείται από τον ρυθμό ανασυνδυασμού των ηλεκτρονίων με ιόντα αργού (τα άτομα που έχουν χάσει ένα ηλεκτρόνιο). Αυτή η διαδικασία παράγει μία 'μπάλα' που αποτελείται κυρίως από άτομα αργού με μικρό κλάσμα των ελεύθερων ηλεκτρονίων και των ιόντων αργού. Η θερμοκρασία του πλάσματος είναι πολύ υψηλή, της τάξης των 10.000 K. Μια δεύτερη ροή αργού (περίπου 1 λίτρο ανά λεπτό) εισάγεται συνήθως μεταξύ του κεντρικού σωλήνα και του ενδιάμεσου σωλήνα για να κρατήσει το πλάσμα μακριά από το άκρο του κεντρικού σωλήνα. Μια τρίτη ροή (και πάλι συνήθως περίπου 1 λίτρο ανά λεπτό) του αερίου εισάγεται εντός του κεντρικού σωλήνα του διαύλου. Αυτή η ροή αερίου περνά μέσα από το κέντρο του πλάσματος, όπου σχηματίζει ένα κανάλι που είναι πιο ψυχρό από το περιβάλλον πλάσμα αλλά εξακολουθεί να είναι πολύ θερμότερο από μια χημική φλόγα. Τα δείγματα προς ανάλυση εισάγονται σε αυτό το κεντρικό κανάλι, συνήθως ως 'ομίχλη' του υγρού, που σχηματίζεται με πέρασμα του υγρού δείγματος μέσα από έναν νεφελοποιητή.⁷⁹

1.5 ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ASPERGILLUS*

Στη φύση τα διάφορα είδη του *Aspergillus* είναι άφθονα και αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα κλιματικών και περιβαλλοντολογικών συνθηκών, όπως η ενεργότητα νερού, θερμοκρασία, pH και ανταγωνιστική μικροχλωρίδα. Τα σπόρια του *Aspergillus* μεταφέρονται εύκολα με τον αέρα και όταν αυτά βρεθούν σε επαφή με μια υγρή ή στερεή επιφάνεια και εφόσον οι συνθήκες υγρασίας το επιτρέπουν, αυτά βλαστάνουν. Είναι από καιρό γνωστό ότι οι Ασπέργιλλοι επιμολύνουν τρόφιμα και ζωοτροφές.⁸⁰

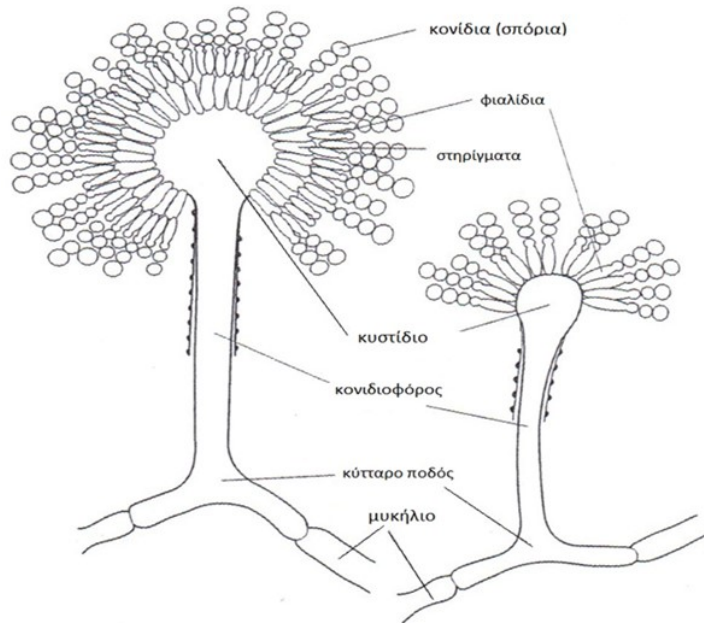
Επειδή αναπτύσσονται σε χαμηλή ενεργότητα νερού, αποτελούν κοινές προσμίξεις σε αρκετά δημητριακά. Στα προϊόντα κρέατος η επιμόλυνση οφείλεται συνήθως στα προστιθέμενα μπαχαρικά, τα οποία είναι επιμολυσμένα με αυτά τα ξηρόφιλα είδη. Η παρουσία των Ασπέργιλλων σε τροποποιημένα, αφυδατωμένα τρόφιμα οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε χαμηλότερες ενεργότητες νερού ($a_w=0,7-0,8$). Κάποιοι Ασπέργιλλοι εκκρίνουν

κάποια από τα κυριότερα ενζυμα βιομηχανικής χρήσης, όπως πρωτεάσες και αμυλάσες. Χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διαδικασίες και ζυμώσεις τροφίμων, όπως για παράδειγμα οι *A. oryzae* και *A. sojae*, που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή παραδοσιακών προϊόντων (σάκε, σάλτσα σόγιας) στην Ασία. Επίσης παράγουν σημαντικές ποσότητες οργανικών οξέων όπως κιτρικό και γλυκονικό οξύ (*A. niger*).⁸¹

Κύτταρο ποδός (footcell): κύτταρα με ενισχυμένα κυτταρικά τοιχώματα. Από κάθε τέτοιο κύτταρο προκύπτει μια κατακόρυφη κονιδιοφόρος. Μερικές φορές είναι δύσκολο να δούμε το κύτταρο ποδός. Όταν όμως είναι ορατό, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κάποιο είδος Ασπέργιλλου.

Κυστίδιο (vesicle): μια σφαιροειδής ή ελλειπτική δομή στην απόληξη του κονιδιοφόρου. Αναπτύσσει στην επιφάνειά του κύτταρα που φέρουν σπόρια.

Στηρίγματα (metulae): ένα στρώμα κυττάρων που αναπτύσσονται στην επιφάνειά των κυστιδίων και παράγουν κονίδια. Το σχήμα και το μέγεθος των στηριγμάτων είναι χαρακτηριστικό του γένους *Aspergillus*. Τα στηρίγματα είναι κυλινδρικά και αφού φτάσουν σε κατάλληλο μήκος στενεύουν στην άκρη σε ένα σωλήνα που παράγει κονίδια.



Εικόνα 32: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Aspergillus*⁸⁰

Κονιδιοφόρος ή στέλεχος (stalk): μη διακλαδισμένες υφές με κονιδιοκεφαλές. Η κονιδιοφόρος σε σπάνιες περιπτώσεις φέρει εγκάρσια τοιχώματα.

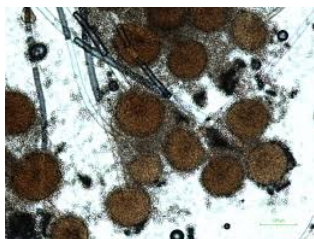
Κονίδια (conidia): ονομάζονται τα σπόρια με τα οποία πολλαπλασιάζεται αγενώς ο μύκητας. Ο πυρήνας του στηρίγματος διαιρείται και ένας από τους θυγατρικούς

πυρήνες περνά στον ακριανό σωλήνα και διαχωρίζεται από το στήριγμα. Εάν αυτό επαναληφθεί πολλές φορές, παράγονται συνεχώς νέα κονίδια και τα παλαιότερα προωθούνται προς τα πάνω με τελικό αποτέλεσμα, τη δημιουργία αλυσίδων αποτελούμενων από αριθμό κονιδίων μικρότερο ή ίσο του 100, αποκομμένων από την άκρη του ίδιου του στηρίγματος. Τα κονίδια κατά μέσο όρο είναι μονοπυρηνικά και όταν ωριμάσουν διαχωρίζονται τελείως από το μητρικό κύτταρο με δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα που τους προσδίδει χαρακτηριστικό χρώμα και υφή. Το χρώμα των κονιδίων καθορίζει το χρώμα της κονιδιακής κεφαλής. Το χρώμα των κονιδίων για το γένος *Aspergillus* κυμαίνεται από πράσινο διαφόρου τόνου και φτάνει ως το μαύρο.

Σκληρώτια (sclerotia): πρόκειται για σώματα σφαιροειδή, πολυκύτταρα, σκληρής σύστασης που σχηματίζονται από πλεκτεγχηματικές (μεγάλοι σχηματισμοί υφών παραγόμενοι από νηματοειδείς μύκητες) διαφοροποιήσεις υφών, τα οποία βρίσκονται συνήθως σε κατάσταση λήθαργου. Χρησιμεύουν αποθησαυριστικά, αφού περιέχουν γλυκογόνο και αποταμιευτικές ουσίες. Επιτρέπουν επίσης στο μύκητα να επιβιώνει σε δυσμενείς συνθήκες. Σε ευνοϊκές συνθήκες βλαστάνουν και σχηματίζουν ένα μυκήλιο. Το χρώμα τους ποικίλει από κίτρινο έως καφέ ή μαύρο και εξαρτάται από το είδος.^{78,82}

Κλειστοθήκια (cleistothecia): σφαιρικά κλειστά ασκοκάρπια που όταν ωριμάζουν σπάνε και ελευθερώνονται ασκοσπόρια.

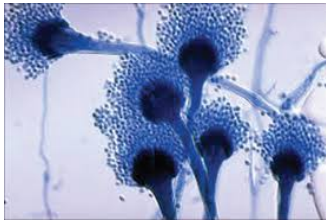
1.5.1 *Aspergillus Carbonarius*



Εικόνα 33: *Aspergillus Carbonarius*

Ο *Aspergillus Carbonarius*, που ανήκει στους μαύρους Ασπέργιλλους, είναι η κύρια πηγή Ωχρατοξίνης Α στο κρασί, στα σταφύλια και αποξηραμένα φρούτα. Υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τον τρόπο ανάπτυξης των μυκήτων *A.niger* και *A.ochraceus*. Οι περισσότερες πληροφορίες που έχουμε για την φυσιολογία του είναι υποθέσεις βασιζόμενες στον *A.niger* εξαιτίας της ομοιότητας των δύο μυκήτων. Ο *Aspergillus Carbonarius* διαφέρει από τον *A.niger* κυρίως στην παραγωγή μεγαλύτερων σπορίων.⁸³

1.5.2 *Aspergillus Parasiticus*



Εικόνα 34: *Aspergillus Parasiticus*

Ο *Aspergillus Parasiticus* μαζί με τον μύκητα *Aspergillus flavus* είναι από τα πιο διαδεδομένα είδη του γένους *Aspergillus*. Παράγει τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁ και G₂. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες 12 – 42°C και ενεργότητα νερού μεγαλύτερη ή ίση του 0,80.⁸⁴ Η βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών για την ανάπτυξη τους είναι 25-42°C. Η μικροβιακή ανάπτυξη και η βλάστηση των κονιδίων είναι ιδανικές σε $a_w > 0,90$ και αναστέλλονται πλήρως για $a_w < 0,75$.⁸⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δείγματα

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν τρόφιμα που κατέχουν λειτουργικές ιδιότητες και έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία πέρα από τη θρεπτική τους αξία οι λεγόμενες υπέρτροφες (superfoods –superherbs). Αυτά τα τρόφιμα περιέχουν θρεπτικά συστατικά και φυσικά αντιοξειδωτικά που μπορούν να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα από βλάβες που προκύπτουν από χρόνιο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Για την παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τα εξής τρόφιμα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας: goji berries (*Lycium barbarum*), ιπποφαές ραμνοειδές (*Hippophae rhamnoides*), αρώνια (chokeberries), golden berries (*Physalis peruviana*), αγριοτριανταφυλλιά (*Rosa canina*), κίστος (*Cistus incanus*), Εχινάκεια (*Echinacea*), κράταιγος (*Crataegus*), Βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum*), τριβόλι (*Tribulus terrestris*), γαΐδουράγκαθο (*Onopordum acanthium*), λευκό μούρο (*Morus alba*), μύρτιλο (*Vaccinium myrtillus*), βατόμουρο (*Rubus*), κράνα (*Cornus mas*), περδικάκι το μελισσοκομικό (*Satureja montana*) και κούμαρα (*Arbutus Unedo*).

Τα παραπάνω δείγματα προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, σε διάφορα υψόμετρα, παρελήφθησαν από παραγωγούς της εκάστοτε περιοχής και είναι προϊόντα βιολογικής καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα:

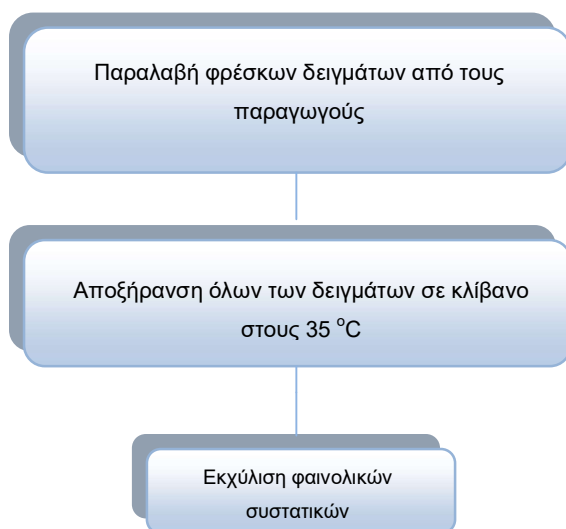
Δείγματα ιπποφαούς τριών ποικιλιών (Leikora, Hergo, Askola) προέρχονται από την Νέα Γωνιά Χαλκιδικής, την Αιανή Κοζάνης και την Κόνιτσα Ιωαννίνων τόσο οι καρποί όσο και τα φύλλα.

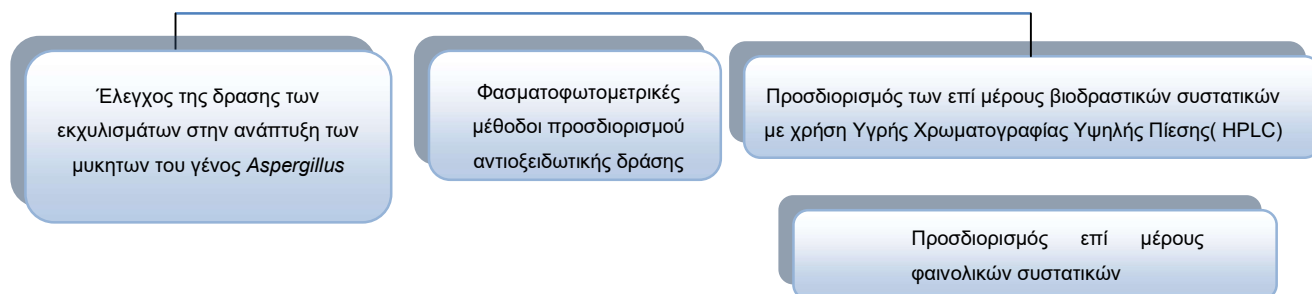
Αναφορικά με τα δείγματα goji berry συλλέχτηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Κοζάνης καθώς επίσης από την περιοχή του Κιλκίς, της Καρδίτσας, και των Τρικάλων. Επίσης τα δείγματα goji berry εκτός από διαφορετικές περιοχές συλλέχθηκαν και από διαφορετικά υψόμετρα έτσι ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των πεδοκλιματικών συνθηκών στην βιοσύνθεση των βιοδραστικών συστατικών.

Δείγματα φύλλων και καρπών goji berry και ιπποφαούς συλλέχθηκαν από την περιοχή της Κοζάνης για δύο εσοδείες ήτοι 2014 και 2015, για να εκτιμηθεί η επίδραση της εποχικής συλλογής ως προς τα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά.

Τέλος τα κούμαρα και το περδικάκι προέρχονται από ορεινή περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας, τα βατόμουρα και τα κράνα από την περιοχή του Καπερνησίου, τα golden berries, τα λευκά μούρα και τα μύρτιλα από τη Δράμα. Τα δείγματα κράταιγου, κυνόροδου, σπαθόχορτου, κίστου, εχινάκειας και τριβολιού προέρχονται από την Νέα Γωνιά Χαλκιδικής.

Διάγραμμα πειραματικής πορείας





2.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Αφού έγινε η παραλαβή των νωπών δειγμάτων από τους παραγωγούς, μετά από 1-3 μέρες άρχισε η επεξεργασία τους και η παρασκευή εκχυλισμάτων. Όλες οι διεργασίες των δειγμάτων έγιναν όσο το δυνατόν ταχύτερα και σε σκιερό και δροσερό περιβάλλον. Οι φρέσκοι καρποί καταψύχθηκαν και τα αποξηραμένα φύλλα και καρποί αποθηκεύτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος. Το πρώτο κομμάτι της επεξεργασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την αποξήρανση τους. Όλοι οι φρέσκοι καρποί και τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 35 °C έως ότου αποξηρανθούν. Σκοπός αυτού ήταν να γίνει η αποξήρανση σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των βιοδραστικών συστατικών είναι και η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την αποξήρανση του τροφίμου. Το δεύτερο κομμάτι της επεξεργασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και των μετάλλων κι ιχνοστοιχείων. Τέλος έλαβε χώρα ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης και των επί μέρους φαινολικών συστατικών των αποξηραμένων φύλλων και καρπών καθώς επίσης και το περιεχόμενο αυτών σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία.

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τις συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα καθώς και την περιοχή προέλευσης.

Πίνακας 1: Κατάλογος δειγμάτων και οι συντομογραφίες τους

Δείγμα	Περιοχή/ Υψόμετρο	συντομογραφία	Εσοδεία
Βατόμουρα		rashberries	2015
Κράνα	Καρπενήσι/	Cornelian cherry	
Κυνόροδο	Χαλκιδική/350 m	Rosehip	
Μύρτιλα		blueberries	
Λευκό μούρο	Δραμα	Mulberries	
golden berries	Δραμα	golden berries	
Κράταιγος	Χαλκιδική/350 m	Crataegus	
Κούμαρα	Αιτωλοακαρνανία/ 800 m	Strawberry Tree	
Γαϊδουράγκαθο	Χαλκιδική/350 m	Silybum marianum	
Αρώνια	Τρίκαλα/ 100 m	Chokeberries	
Περδικάκι το μελισσοκομικό	Αιτωλοακαρνανία/ 800 m	Winter savory	
Σπαθόχορτο	Χαλκιδική/350 m	St John's-wort	
Κίστος	Χαλκιδική/350 m	Cistus incanus	
Τριβόλι	Χαλκιδική/350 m	Tribulus terrestris	
Εχινάκεια	Χαλκιδική/350 m	Echinacea	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)καρπός	Χαλκιδική/350 m	Hip. R./F/350/Hergo/Cha.	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)φύλλα	Χαλκιδική/350 m	Hip. R/L/350/Hergo/Chal.	

Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)φύλλα	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)καρπός	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Askola)καρπός	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R /F/450/Askola/Aiani	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Askola)φύλλα	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R/L/450/Askola/Aiani	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Leikora)Φύλλα	Κονίτσα/350 m	Hip. R /L/350/Leikora/Kon.	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Leikora)καρπός	Κονίτσα/350 m	Hip. R/F/350/Leikora/Kon.	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)καρπός	Αιανή Κοζάνης/550 m	Hip. R /F/550/Hergo/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/450 m	Goji berry/F/450/T/Koz.	
Goji berry (Φύλλα)	Κοζάνη/450 m	goji berry /L/450/T/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Καρδίτσα/100 m	Goji berry/F/100/Kard.	
Goji berry (καρπος)	Τρίκαλα/100 m	Goji berry/F/100/Trik.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/450 m	goji berry/F/450/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κιλκίς/60 m	goji berry /F/60/Kilkis.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/300 m	goji berry /F/300/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/650 m	goji berry/F/650/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/550 m	goji berry /F/550/Koz.	

Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/350 m	goji berry/F/350/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/550 m	goji berry /F/550/M/Koz	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)φύλλα	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	2014
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Hergo)καρπός	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	
Ιπποφαές.Ραμνοειδές(Askola)καρπός	Αιανή Κοζάνης/450 m	Hip. R /F/450/Askola/Aiani	
Goji berry (Φύλλα)	Κοζάνη/450 m	goji berry /L/450/T/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Τρίκαλα/100 m	Goji berry/F/100/Trik.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/450 m	Goji berry/F/450/T/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/300 m	goji berry /F/300/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κοζάνη/650 m	goji berry/F/650/Koz.	
Goji berry (καρπος)	Κιλκίς/60m	goji berry /F/60/Kilkis.	

2.2.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Αντιδραστήρια –Όργανα

Δείγματα

Μεθανόλη HPLC

Μεθανόλη για προ ανάλυση

Υδροχλωρικό οξύ 37% v/v

Πορσελάνινο γουδί

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αναδευτήρας VORTEX (VELP SCIENTIFICA)

Λουτρό υπερήχων Elma, S 60, Elmasonic

Αυτόματη Πιπέττα (100-1000 μ L)

Tips

Περιστροφικός εξατμιστήρας (HEIDOLPH LABORATA 4000 EFFICIENT)

Ογκομετρικοί σωλήνες όγκου 10 mL

Κωνικές φιάλες όγκου 50 mL

Ποτήρια ζέσεως 10 mL και 100 mL

Σφαιρικές φιάλες όγκου 50 mL

Σπάτουλα ζυγίσεως μικροποσοτήτων.

Πειραματική πορεία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των βιοδραστικών συστατικών από το υπόστρωμα του τροφίμου. Η παρακάτω μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε έπειτα από βελτιστοποίηση που έγινε αναφορικά με το διαλύτη, το χρόνο, και την μέθοδο εκχύλισης.⁸⁶ Πιο συγκεκριμένα, αφού έγινε η αποξήρανση, περίπου 10g από το κάθε δείγμα αλέστηκαν προσεκτικά σε πορσελάνινο γουδί έτσι ώστε να ζυγιστούν για τις εκχυλίσεις. Εν συνεχεία, 3g από το κάθε αλεσμένο δείγμα ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες όπου προστέθηκαν 10mL οξινισμένης υδατικής μεθανόλης 80%V/V(80/20 μεθανόλη/νερό, 0,1%HCl). Τα διαλύματα που προέκυψαν αφέθηκαν να εκχυλισθούν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 24h τα δείγματα εκχυλίστηκαν εις τριπλούν, με 10mL οξινισμένης υδατικής μεθανόλης 80%V/V(80/20 μεθανόλη/νερό, 0,1%HCl) κάθε φορά, σε λουτρό υπερήχων για την ποσοτική παραλαβή των φαινολικών

συστατικών. Αφού συλλέχθηκαν τα εκχυλίσματα με χωνί buchner τοποθετήθηκαν σε σφαιρικές φιάλες όπου εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή και το στερεό υπόλειμα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 mL μεθανόλης για HPLC. Τα τελικά εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.⁸⁷

2.3 Φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί

Οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί που επιλέχθηκαν να γίνουν για την παρούσα εργασία είναι οι εξής:

- Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (TPC)
- Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με την χρήση της DPPH μεθόδου

Η αντιριζική δράση χαρακτηρίζει την ικανότητα των ενώσεων να αντιδράσουν με μία ρίζα *in vitro* ενώ η αντιοξειδωτική δράση είναι η ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν την διαδικασία οξείδωσης σε ένα σύστημα *in vivo*.⁸⁸ Μέσω της φασματοφωτομετρίας προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα των όλων των δειγμάτων όπως επίσης η ικανότητά τους να δεσμεύουν τη ρίζα DPPH.⁸⁹

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την προκατεργασία των δειγμάτων και κατά την διάρκεια των φασματοφωτομετρικών αναλύσεων είναι τα εξής:

- Ζυγός ηλεκτρονικός ακρίβειας στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου, AB204-S/FACT, Mettler Toledo, Switzerland
- Κυψελίδες πλαστικές για μέτρηση στο ορατό φάσμα, χωρητικότητας 2,5 mL, l=0,1 dm, Karfell, Italy
- Υδρόλουτρο με θερμοστάτη, Memmert, Germany
- Φασματοφωτόμετρο UV—Vis: Novaspek III visible spectrophotometer, Product code: 80-2118-00, Amersham Biosciences, USA

2.3.1 Συνολικά Φαινολικά Συστατικά (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin—Ciocalteu

Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Απεσταγμένο νερό (H₂O)

Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃): Sodium Carbonate anhydrous, Assay 99,5-100,5%, MW=105,99 g/mol, CAS: 497-19-8, Carlo EΓ eagents, Italy

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu: Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 3H₂O·P₂O₅·14WO₃·4MoO₃·10H₂O & 3H₂O·P₂O₅·13WO₃·5MoO₃·10H₂O, Merck KGaA, Germany

Γαλλικό οξύ (Ολ): 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, C₇H₆O₅, MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

Για όλα τα εκχυλίσματα των δειγμάτων εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τις ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίων. Αρχικά, παρασκευάζεται το κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃ ως εξής: Σε 80,0 mL απεσταγμένου H₂O διαλύονται 20,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) με τη βοήθεια του βρασμού. Αφού το διάλυμα του ανθρακικού νατρίου επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 8 g περίσσειας Na₂CO₃, και το διάλυμα αφήνεται για 24 h στο σκοτάδι και καλά σφραγισμένο. Τέλος, φιλτράρεται με πτυχωτό ηθμό και αραιώνεται μέχρι τα 100 mL απεσταγμένου H₂O σε ογκομετρική φιάλη. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ως πρότυπη φαινολική ουσία για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ.

Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος (stock) συγκέντρωσης 5g GA/L δηλαδή ζυγίστηκε 0,5 g γαλλικού οξέος και διαλυτοποιήθηκαν πλήρως σε 10 mL αιθανόλης και έπειτα αραιώθηκαν στα 100,0 mL σε ογκομετρική φιάλη με απιονισμένο νερό. Το πυκνό διάλυμα μπορεί να διατηρείται στο ψυγείο για δύο εβδομάδες. Από το πυκνό διάλυμα παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων 25 έως 600 mg GA/L.

Αφού τα δείγματα του ιπποφαούς και της λουίζας αραιωθούν κατάλληλα όπως φαίνεται στον πίνακα , σε πλαστικές κυψελίδες των 2,5 mL, με τη χρήση ηλεκτρονικών πιπετών τοποθετούνται 20,0 μL προτύπου ή αραιωμένου δείγματος, 1500,0 μL απεσταγμένου H_2O και 100,0 μL αντιδραστηρίου F-C (βιομηχανικά παρασκευασμένο). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και μετά από αναμονή 8min, προστίθονται 300,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και το μείγμα σφραγίζεται με parafilm και αναδεύεται ισχυρά ξανά.Επειτα, οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 min σε υδρόλουτρο σταθερής Θερμοκρασίας 40°C, σε συνθήκες σκότους. Αφού αναπτυχθεί το μπλε χρώμα και το περιεχόμενο των κυψελίδων αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε μετράται σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση στα 750 nm (A_{750}) για κάθε δείγμα ή πρότυπο. Η διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης εξαιτίας του διαλύτη των δειγμάτων και των προτύπων γίνεται με "τυφλό" δείγμα. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

2.3.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2- diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Μεθανόλη 98%

DPPH ρίζα: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical) 95% powder, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, MW=394,32 g/mol, CAS: 1898-66-4, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C): L-Ascorbic acid, Analytical reagent grade, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, MW=176,12 g/mol, CAS: 50-81-7, Fischer Chemical, UK

Αρχικά η ριζική μορφή της DPPH που είναι σε στερεή μορφή διαλύεται σε μεθανόλη και και παρασκευάζεται ένα πυκνό (stock) διάλυμα 0.001M από το οποίο παρασκευάζεται ένα αραιωμένο διάλυμα 100 μM το οποίο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της αντιριζικής ικανότητας των δειγμάτων. Όπως

έχει ανφερθεί από προηγούμενες μελέτες η μεγαλύτερη απορρόφηση σε μεθανολικά διαλύματα συνεπάγεται καλύτερη ευαισθησία της DPPH.⁹⁰

Επειτα παρασκευάζονται οι αραιώσεις των δειγμάτων που αναφέρονται στον πίνακα , και έχουν προκύψει από δοκιμές αραιώσεων και έχουν επιλεγθεί οι βέλτιστες.

Σε πλαστικές κυψελίδες, για κάθε δείγμα, τοποθετούνται 20,0 μL από τα αραιωμένα δείγματα μαζί με 1500,0 μL από το διάλυμα DPPH' 100 μM , Γίνεται ανακίνηση στο σκοτάδι για 1 min και έπειτα μετράται η απορρόφηση στα 516 nm (A516) ανα 10min μέχρι να σταθεροποιηθεί η απορρόφηση σε μια ελάχιστη τιμή στο plateau χρόνου.

Ο χρόνος για να φθάσει η αντίδραση το σημείο αυτό, που συμβολίζεται ως T_{plateau} , εξαρτάται από το είδος του δείγματος, τη συγκέντρωσή του, τις συνθήκες περιβάλλοντος (Θερμοκρασία και φως) και προφανώς τη συγκέντρωση του DPPH. Παράλληλα, σε κάθε χρονική στιγμή, μετράται η απορρόφηση του καθαρού διαλύματος DPPH ώστε να γίνει ο υπολογισμός του ποσοστού ανάσχεσής της στο plateau χρόνου .

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε το L-ασκορβικό οξύ (L-ascorbic acid, AA), επειδή αντιδρά πλήρως και ταχύτατα με το DPPH και χρειάζεται μόνο μια καταγραφή της τιμής της απορρόφησης. Το stock διάλυμα συγκέντρωσης 1,00 mg/mL παρασκευάζεται από τη διάλυση 0,100 g ασκορβικού οξέος σε 100,00 mL μεθανόλης. Επειτα παρασκευάζονται τα αραιωμένα διαλύματα του ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων από 800 έως 1800 $\mu\text{g AA/mL}$. Τα διαλύματα του ασκορβικού οξέος παρασκευάζονται την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά.

2.4 Προσδιορισμός Ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των ανθοκυανινών χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τους φασματοφωτομετρικούς προσδιορισμούς. Η

ανάλυση των ανθοκυανινών έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC (Agilent Technologies, μοντέλο 1050, Waldbronn, Γερμανία). Για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σε επιμέρους ανθοκυανίνες, χρησιμοποιήθηκε σύστημα δύο διαλυτών, αποτελούμενο από 10% v/v HCOOH και μεθανόλη, με βαθμωτή έκλυση και ροή κινητής φάσης 0,8 mL/min. Η βαθμωτή έκλυση είχε ως εξής: αρχικά 18% μεθανόλη, ισοκρατικά για 1 min, 50% μεθανόλη έως το 25^ο min, 90% μεθανόλη εντός 7 min, 95% μεθανόλη εντός 2 min, 100% μεθανόλη για 5 min και τελικά το σύστημα επανήρθε στις αρχικές συνθήκες σε 3 min και αφέθηκε να ισορροπήσει σε αυτές τις συνθήκες για 10 min. Ο όγκος έγχυσης δείγματος ήταν 20 μ L και η ανίχνευση έγινε στα 280 και 520 nm. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση εξωτερικών προτύπων ανθοκυανινών σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των 3-O-γλυκοζιτών της κυανιδίνης, δελφινιδίνης, πελαργονιδίνης, πεονιδίνης, πετουνιδίνης και μαλβιδίνης, με RSDs (%), αντίστοιχα, 6,34, 6,50, 2,37, 4,61, 4,01, 3,20.⁵⁶

2.5 Προσδιορισμός μετάλλων κι ιχνοστοιχείων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευμένο πλάσμα (ICP-MS)

2.5.1 Προκατεργασία δειγμάτων

Αντιδραστήρια- Συσκευές- όργανα

- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών
- Συσκευή MilliQ- υπερκάθαρο νερό
- Περιέκτες Teflon
- Θερμαντική πλάκα
- Ογκομετρική φιάλη 20 mL
- Πυκνό HNO₃
- H₂O₂
- ICP-MS

Για όλα τα δείγματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χώνευσης. Αρχικά ζυγίστηκε μια ποσότητα περίπου 0,15 g από το κάθε δείγμα σε περιέκτες Teflon. Έπειτα ακολούθησε η κατεργασία τους με πυκνό νιτρικό οξύ κι υπεροξειδίο του υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα 5 mL νιτρικού οξέος προστέθηκαν σε κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε θερμαντική πλάκα στους 100 °C για να γίνει η εξάτμιση του οξέος μέχρι τελικού όγκου 1 mL. Στη συνέχεια οι περιέκτες αποσύρθηκαν από την πλάκα κι αφού ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκε σιγά σιγά υπεποξειδίο του υδρογόνου.

Έπειτα οι περιέκτες τοποθετήθηκαν ξανά στην θερμαντική πλάκα όπου κι έγινε η εξάτμισή μέχρι ξηρού. Το περιεχόμενο σε μέταλλα κι ιχνοστοιχεία παρελήφθηκε με 20 mL υπερκάθαρου νερού.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε κι για τα αφεψήματα. Αναλυτικά, 15 mL από το κάθε αφέψημα εξατμίστηκαν στη θερμαντική πλάκα έως τελικού όγκου περίπου 5 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL πυκνού νιτρικού οξέος κι ακολούθησε εξάτμιση έως τελικού όγκου 1 mL. Στη συνέχεια οι περιέκτες αποσύρθηκαν από την πλάκα κι αφού ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκε σιγά σιγά υπεποξειδίο του υδρογόνου. Έπειτα οι περιέκτες τοποθετήθηκαν ξανά στην θερμαντική πλάκα όπου κι έγινε η εξάτμισή μέχρι ξηρού. Το περιεχόμενο σε μέταλλα κι ιχνοστοιχεία παρελήφθηκε με 20 mL υπερκάθαρου νερού.

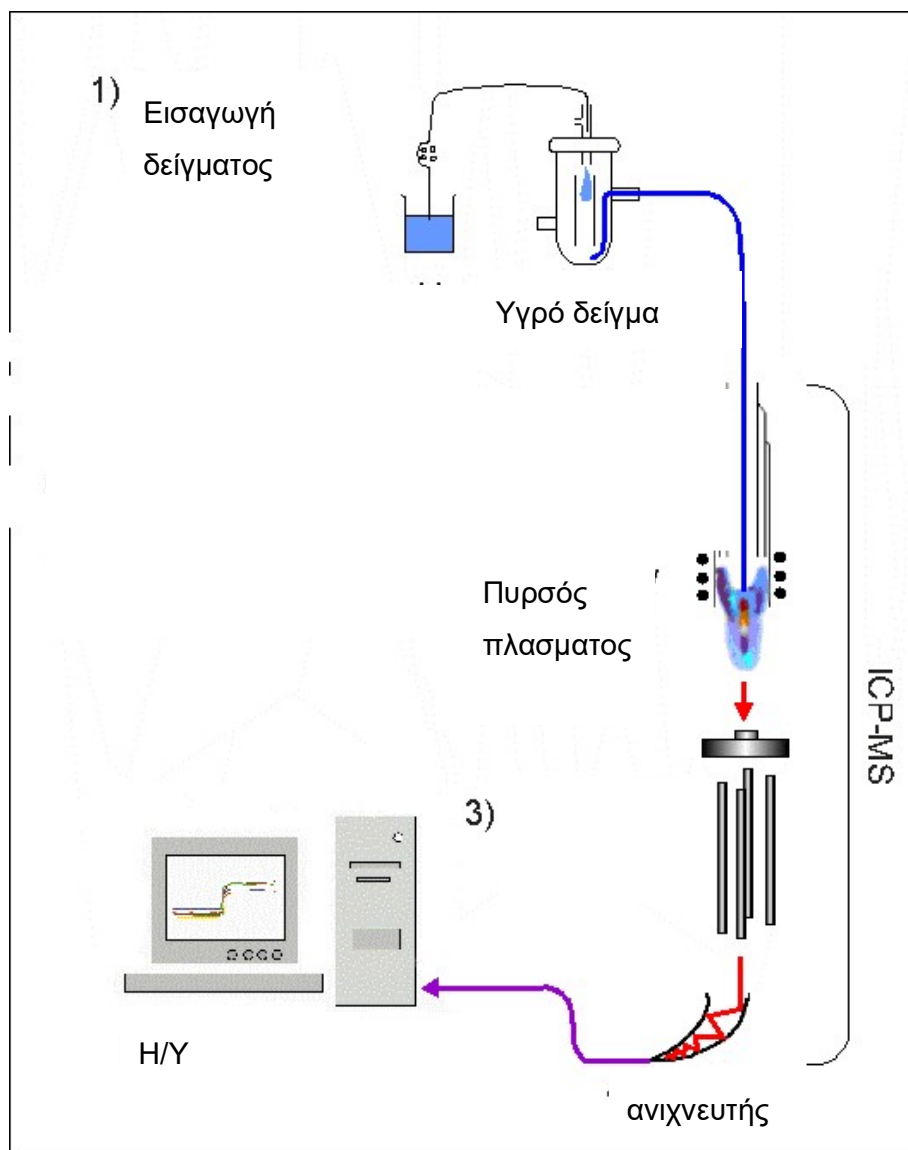
2.5.2 Ανάλυση των δειγμάτων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS)

Όλα τα χωνευμένα δείγματα αραιώθηκαν 1/10 για την ανάλυση με ICP-MS. Πριν τη μέτρηση των δειγμάτων κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς των μετρούμενων μετάλλων. Πιο αναλυτικά τα μέταλλα που μετρήθηκαν ήταν τα :

- Μαγγάνιο
- Σίδηρος
- Ψευδάργυρος
- Χαλκός

- Μόλυβδος
- Κάδμιο
- Αρσενικό

Σχηματικά η ανάλυση του δείγματος δίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης του δείγματος με ICP-MS

2.6 Μικροβιολογικό μέρος

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Laminar flow Telstar Bio-II-A
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας +0,0001, Mettler Delta Trak
- Μαγνητικός αναδευτήρας HI 200m Hanna
- Κωνικές φιάλες pyrex των 50, 100, 250 και 500 ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50, 100 και 250 ml
- Μεταλλική σπάτουλα
- Πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 9 cm (αποστειρωμένα)
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια Universal των 20 ml
- Ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Γάζες
- Αυτόματη πιπέτα των 25-250 μ l, 100-1000 μ l και των 10-100 μ l Transferpette (Brand)
- Πλαστικά tips
- Πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 9cm (αποστειρωμένα)
- Κλίβανος επώασης WTB binder
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια των 20ml (universal)
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Λύχνος Bunsen
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Υάλινες πιπέτες Pasteur
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (κεφαλή HS-4 7000 rev/min max, θήκες sorvall 00480)

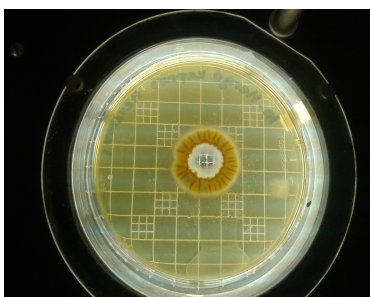
- Περιστροφικός εξατμιστής, Heidolph, Laborota 4000 efficient, WB eco
- Σωλήνες φυγοκέντρου από polycarbonate των 50ml (2,5 x 10), αποστειρωμένοι στους 121°C για 15min
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Κωνικές φιάλες των 50ml με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Πλαστικά διάφανα φιαλίδια των 50 ml (Corning)

Αντιδραστήρια

- Εκχύλισμα ζύμης, Yeast extract (Oxoid)
- Άλας κιτρικών με ιόντα σιδήρου και αμμωνίου, Ammonium iron citrate, 18% Fe (Merck)
- 2,6- δίχλωρο-4- νιτροανιλίνη, Dichloran, C₆H₄Cl₂N₂O₂ (Fluka)
- Χλωραμφαινικόλη, Chloramphenicol, C₁₀H₁₁N₂O₅Cl₂ (Oxoid)
- Άγαρ βακτηριολογικό (Oxoid)
- Σακχαρόζη (Sucrose for microbiology), C₁₂H₂₂O₁₁
- Νιτρικό νάτριο, NaNO₃ (Merck)
- Χλωριούχο κάλιο, KCl (Merck)
- Θειικό μαγνήσιο, MgSO₄·7H₂O (Merck)
- Θειικός σίδηρος (II), FeSO₄·7H₂O (Merck)
- Όξινο φωσφορικό κάλιο, K₂HPO₄ (Merck)
- Θειικός ψευδάργυρος, ZnSO₄·7H₂O (Merck)
- Θειικός χαλκός, CuSO₄·5H₂O (Merck)
- Απεσταγμένο νερό
- Λυοφιλωμένο στέλεχος *Aspergillus parasiticus* Spreare IMI 283883
- NaOCl 3,5% v/v (αραίωση χλωρίνης εμπορίου περιεκτικότητας 4,5% σε ενεργό χλώριο)

- Αιθανόλη (C₂H₅OH), extra pure
- Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα Tween 80 0,05% v/v (σε αποστειρωμένο νερό), αποστειρωμένο στους 121oC για 15min
- Θρεπτικό υλικό AFPA
- Θρεπτικό υλικό CzA
- Θρεπτικό υλικό YES
-

2.6.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών



Εικόνα 36: χαρακτηριστική αποικία *A. parasiticus* σε AFPA

Για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus* στα διάφορα στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό AFPA (*Aspergillus Flavus* and *parasiticus* Agar), το οποίο είναι κατάλληλο για την ταχεία ανίχνευση των

μυκήτων *A. parasiticus* και *A. flavus*. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού AFPA είναι τέτοια που να εμποδίζει την ανάπτυξη άλλων μυκήτων

επιτρέποντας την ικανοποιητική ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων χάρη στην παρουσία του dichloran (2,6 διχλωρο-4-νιτροανιλίνη) μίας ένωσης που χρησιμοποιείται ευρέως ως παρασιτοκτόνο, η οποία παρεμποδίζει τους γρήγορα αναπτυσσόμενους μύκητες, ενώ παράλληλα ένα άλλο συστατικό του η χλωραμφαινικόλη, αποτελεί αντιβιοτικό που αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Βασικό συστατικό του θρεπτικού υλικού αποτελεί επίσης ο κιτρικός σίδηρος (ferric ammonium citrate), στην παρουσία του οποίου οφείλεται η εμφάνιση χαρακτηριστικών ακτινωτών αποικιών χρώματος καφέ πορτοκαλί των μυκήτων *A. parasiticus* και *A. flavus* που παρατηρούνται στη ανεστραμμένη όψη τους.

Για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus carbonarius* στα διάφορα στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το γενικής φύσης θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar).

AFPA	PDA
Yeast 2g/100mL H ₂ O	39 g/ 1000mL H ₂ O
Peptone bacteriological 1g/100mL H ₂ O	
Ferric ammonium citrate 0.05 g/100mL H ₂ O	
Dichloran 0,1 mL	
Chloramphenicol 0,01 g/100mL H ₂ O	

Σε κωνική φιάλη προστίθενται τα $\frac{3}{4}$ του αποσταγμένου νερού που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί προσθήκη των συστατικών του θρεπτικού υλικού στις κατάλληλες αναλογίες υπό συνεχή ανάδευση μέσω μαγνητικού αναδευτήρα. Τέλος, προστίθεται η υπόλοιπη ποσότητα νερού και πωματίζεται η φιάλη με γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι. Η κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121⁰C για 15 min. Αφού τελειώσει η αποστείρωση, το θρεπτικό υλικό αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 40-50 ⁰C, οπότε και μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα τρυβλία petri. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται περίπου 20-25 ml θρεπτικό υλικό, ώστε το πάχος του να είναι τουλάχιστον 4 mm και να εξασφαλίζεται με αυτόν τον τρόπο η επαρκής ανάπτυξη των μυκήτων. Τα τρυβλία τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο, για την αποφυγή σχηματισμού υδρατμών και αφήνονται να κρυώσουν. Αφού περάσουν 4 ώρες και το περιεχόμενο θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί επαρκώς, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ή να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να χρησιμοποιηθούν (όχι περισσότερο από 4-5 ημέρες), αφού κλεισθούν με parafilm, ώστε να διατηρείται η υγρασία τους και να μην επιμολύνονται.

2.6.2 Παρασκευή εναιωρήματος κονιδίων των μυκήτων *Aspergillus Parasiticus* και *Aspergillus Carbonarius*

Στο slant, που περιέχει το ώριμο μυκήλιο του εκάστοτε μύκητα 7 ημερών, προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες μικρή ποσότητα (~ 10 ml) αποστειρωμένου διαλύματος Tween 80 0,05%v/v. Ανακινείται με ήπιες κινήσεις για να μεταφερθεί μικρή ποσότητα κονιδίων από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο Tween και το προκύπτον διάλυμα κονιδίων μεταφέρεται ασηπτικά σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγόκεντρου και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 2500 r.p.m. για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται προσεκτικά με αποστειρωμένη πιπέτα μιας χρήσεως σε διάλυμα 3,5% NaOCl. Τα κονίδια αναδιαλύονται σε διάλυμα Tween 80 0,05%v/v και πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντρηση και απόχυση του υπερκείμενου. Τελικά τα κονίδια παραλαμβάνονται από το φυγοκεντρικό σωλήνα με διάλυμα Tween 80 0,05%v/v και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο (121°C για 15 min) φιαλίδιο «Universal». Το διάλυμα αυτό αποτελεί το πυκνό διάλυμα κονιδίων, στο οποίο υπό ασηπτικές συνθήκες γίνονται οι αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1.000 και 1:10.000. Για το σκοπό αυτό έχουν ήδη αποστειρωθεί στους 121°C για 15 min 4 φιαλίδια «Universal» που περιέχουν από 10 ml διαλύματος Tween 80 0,05%v/v. Από το πυκνό διάλυμα κονιδίων, αφού το αναδεύσουμε στο vortex για 2 min παραλαμβάνουμε 1 ml και το προσθέτουμε σε 1 φιαλίδιο «Universal» για να παρασκευάσουμε την πρώτη αραιώση 1:10 και στη συνέχεια ακολουθώντας την ίδια διαδικασία παρασκευάζουμε διαδοχικά και τις υπόλοιπες αραιώσεις.

Από καθένα από τα παραπάνω διαλύματα (πυκνό και 4 αραιώσεις), αφού αναδευτεί 30 s με vortex, λαμβάνεται 0,1 ml με πιπέτα και εμβολιάζονται, υπό ασηπτικές συνθήκες, 3 τρυβλία για τον κάθε μύκητα με θρεπτικό υλικό και για κάθε αραιώση. Το εμβόλιο απλώνεται ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur, κατάλληλα μορφοποιημένη με τη

βοήθεια του λύχνου. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C, στο σκοτάδι, για 42-48 ώρες. Μετά την επώαση καταμετρούνται οι αποικίες του μύκητα. Η καταμέτρηση βασίζεται στην αρχή ότι κάθε αποικία αντιστοιχεί σε ένα κονίδιο. Επιλέγονται τα τρυβλία της αραίωσης εκείνης, όπου ο αριθμός των αποικιών cfu (colony forming units) είναι 10-100. Βάσει αυτού του αριθμού αποικιών από τον παρακάτω τύπο υπολογίζεται ο όγκος του εμβολίου που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα, ώστε κάθε καλλιέργεια να περιέχει την επιθυμητή ποσότητα κονιδίων x . (Στο συγκεκριμένο πείραμα $x=10^2$ κονίδια).

$$V = (0.1 * x) / A$$

Όπου:

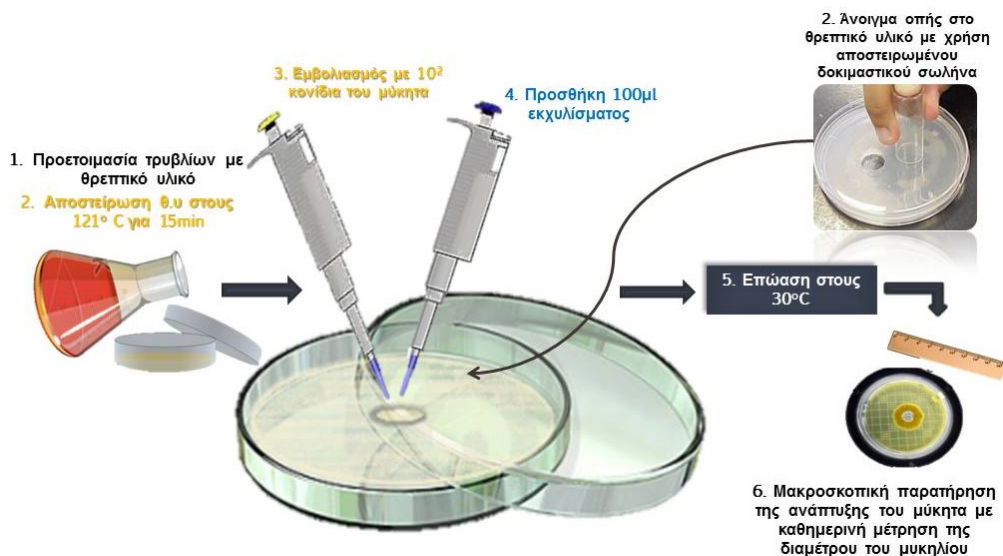
- ✓ V = ο όγκος του εμβολίου (ml)
- ✓ A = αριθμός αποικιών στο τρυβλίο (μέσος όρος από 3 τρυβλία της επιθυμητής αραίωσης)
- ✓ 0.1 = όγκος εμβολίου στο τρυβλίο (ml)
- ✓ x = ο εκάστοτε επιθυμητός αριθμός κονιδίων του εμβολίου εργασίας.

Για τον μύκητα *AspergillusParasiticus* επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η αραίωση 10^{-2} ($V=80\mu\text{l}$), ενώ για τον *AspergillusCarbonarius* η 10^{-3} ($V=200\mu\text{l}$).

2.6.32.5.3. Εμβολιασμός τρυβλίων θρεπτικού υλικού PDA κι AFPA για την μακροσκοπική παρατήρηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων πάνω στην ανάπτυξη των μυκήτων *AspergillusParasiticus* και *AspergillusCarbonarius*

Με τη βοήθεια αποστειρωμένου δοκιμαστικού σωλήνα, στη μέση κάθε τρυβλίου, ανοίγεται μια κυκλική οπή, μέσα στην οποία γίνεται έγχυση του εμβολίου των κονιδίων. Αμέσως μετά περιμετρικά της οπής γίνεται προσθήκη 80μl από κάθε εκχύλισμα. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα τρυβλία control στα οποία προστέθηκε μόνο το εμβόλιο του εκάστοτε μύκητα. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 30°C για 5 ημέρες και καθημερινή μέτρηση της διαμέτρου του

αναπτυσσόμενου μυκηλίου σε (cm) καθώς και λήψη φωτογραφιών όλων των τρυβλίων.



Εικόνα 37 Πειραματική πορεία για την μελέτη της επίδρασης τωνεκχυλισμάτων στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus*και του *A.Carbonarius*(Πηγή:Κόλλια Ελένη, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, 2014)

Πίνακας 2: Πίνακας με τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μικροβιολογικό έλεγχο.

Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μικροβιολογικό έλεγχο
Βατομουρο (<i>Rubus idaeus</i> L)
Μυρτίλο (<i>Vaccinium myrtillus</i>)
Λευκό μουρο (<i>Morus alba</i> L)
Φυσαλίσ (<i>physalis peruviana</i>)
Ιπποφαές ραμνοειδές καρπός (<i>Hipporphae</i> R)- Hergo
Ιπποφαές ραμνοειδές φύλλα (<i>Hipporphae</i> R)- Hergo

Κράνα (Cornus mas)
Σπαθόχορτο (Hypericum perforatum)
Κίστος (Cistus incanus)
Κυνόροδο (Rosa canina)
Εχινάκεια (Echinacea)
Κράταιγος (Crataegus)
Goji berry (Lycium barbarum)
Περδικάκι (<i>Satureja montana</i>)
Αρώνια (Photinia melanocarpa)
Τριβόλι (Tribulus terrestris)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας των Δειγμάτων

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων ήταν η Folin—Ciocalteu (FC) για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και εκτιμήθηκε η αντιριζική ικανότητα των δειγμάτων μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.

3.1.1 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH των δειγμάτων

Η εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH των δειγμάτων των υπερτροφών και των δύο σοδειών είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων δειγμάτων φυτικής προέλευσης. Για να γίνει η εκτίμηση της αντιριζικής ικανότητας των δειγμάτων υπολογίστηκαν τα ισοδύναμα mg ασκορβικού οξέος ανά g ξηρού υπολείμματος με βάση μια πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος η οποία παρατίθεται στο παράρτημα 1.

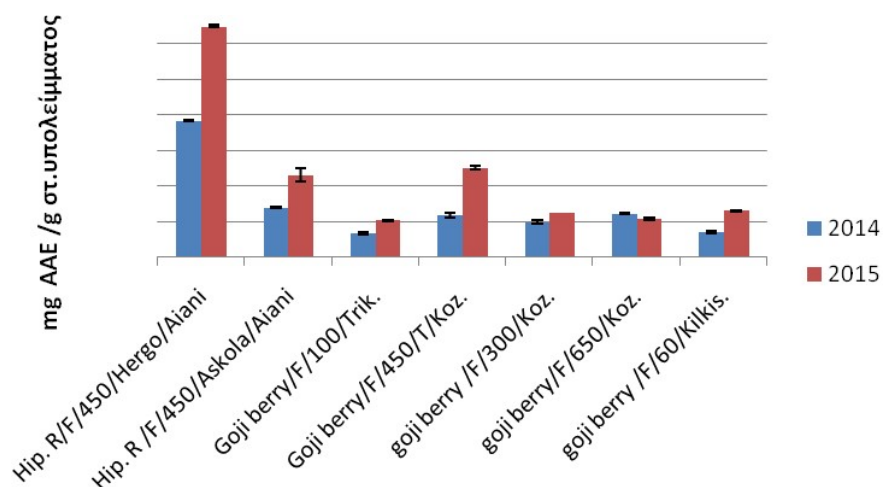
Παρακάτω δίνεται ο συγκεντρωτικός πίνακας με τα ισοδύναμα ασκορβικού οξέος για κάθε δείγμα

Πίνακας 3: Συγκρενωτικός πίνακας(AAE mg/g στερεού υπολείμματος)

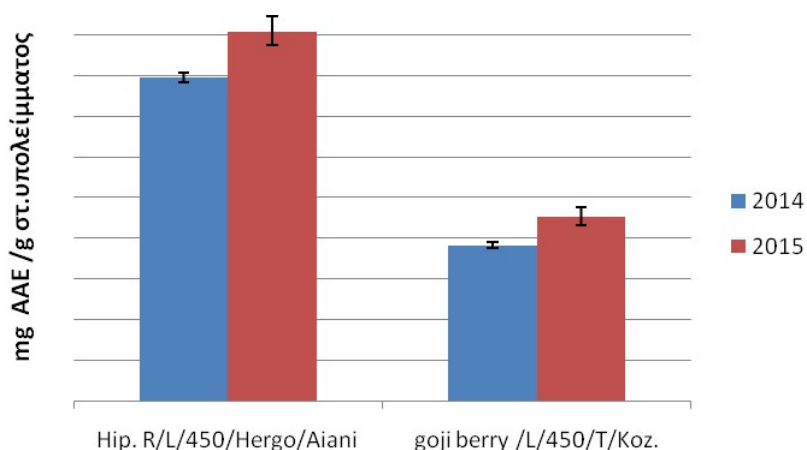
Δείγμα	AAE mg/g στ. υπολείμματος	SD	2015
rashberries	39,6	0,2	
Cornelian cherry	35,9	0,3	
rosehip	45,8	0,3	
blueberries	6,5	0,1	
Mulberries	4,8	0,4	

golden berries	5,3	0,2	
Crataegus	336,3	1,2	
Strawberry Tree	19,3	0,3	
Silybum marianum	39,2	0,3	
chokeberries	11686,6	7,5	
winter savory	322,9	2,3	
St John's-wort	335,6	1,7	
Cistus incanus	838,7	2,4	
Tribulus terrestris	33,8	0,3	
Echinacea	75,2	1,3	
Hip. R./F/350/Hergo/Chal.	73,0	0,7	
Hip. R/L/350/Hergo/Chal.	912,4	0,8	
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	454,1	17,9	
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	64,7	0,3	
Hip. R /F/450/Askola/Aiani	23,2	1,7	
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	330,8	2,6	
Hip. R /L/350/Leikora/Kon.	313,6	1,9	
Hip. R/F/350/Leikora/Kon.	38,2	0,5	
Hip. R /F/550/Hergo/Koz.	71,9	0,2	
Goji berry/F/450/T/Koz.	25,1	0,5	
goji berry /L/450/T/Koz.	226,3	11,6	
Goji berry/F/100/Kard.	26,2	0,3	
Goji berry/F/100/Trik.	10,4	0,1	
goji berry/F/450/Koz.	7,2	0,6	
goji berry /F/60/Kilkis.	13,1	1,1	
goji berry /F/300/Koz.	12,4	1	
goji berry/F/650/Koz.	10,8	0,4	
goji berry /F/550/Koz.	16,2	1,5	
goji berry/F/350/Koz.	16,4	0,8	
goji berry /F/550/M/Koz	11,2	1,6	
			2014
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	397,3	5,9	
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	38,4	0,3	
Hip. R /F/450/Askola/Aiani	13,9	0,3	
goji berry /L/450/T/Koz.	191,4	3,7	
Goji berry/F/100/Trik.	6,8	0,4	
Goji berry/F/450/T/Koz.	11,8	0,8	
goji berry /F/300/Koz.	10,0	0,5	
goji berry/F/650/Koz.	12,4	0,1	
goji berry /F/60/Kilkis.	7,1	0,2	

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα όλα τα δείγματα εμφανίζουν καλή αντιριζική ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα για τα δείγματα της εσοδείας 2015, ο κρτάιγος, τα αρωνια, το περδικάκι, το μελισσόχορτο, ο κίστος, τα φύλλα ιπποφαούς και τα φύλλα του Goji berry εμφανίζουν ισχυρή αντιριζική ικανότητα καθώς για τα παραπάνω δείγματα τα ΑΑΕ mg/g στ. υπολείμματος ξεπερνούν τα 300.0mg/g στ. υπολείμματος. Για τα δείγματα της σοδειάς 2014 μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα εμφάνισαν τα φύλλα του ιπποφαούς της ποικιλίας Hergo από την Αιανή Κοζάνης, με 454.1 ΑΑΕ mg/g στ. υπολείμματος.

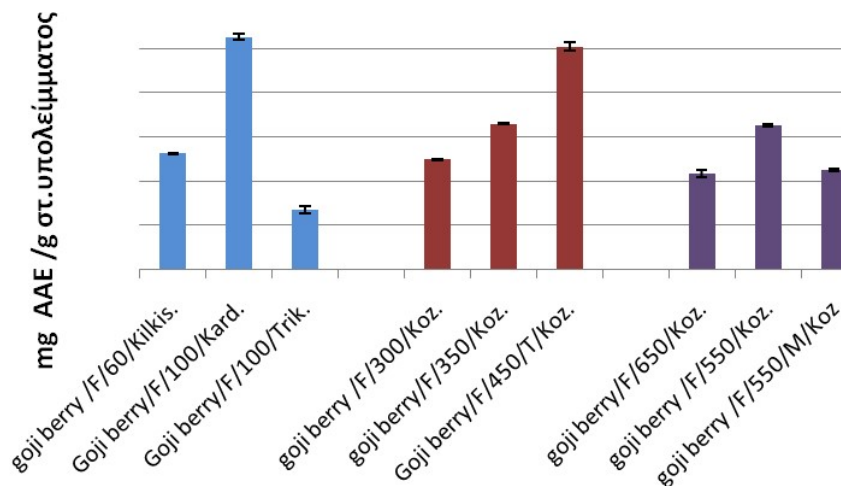


Σχήμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα για τα δείγματα εσοδείας 2014 και 2015



Σχήμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα των φυλλων ιπποφαούς και Goji B. για τις εσοδείες 2014-2015

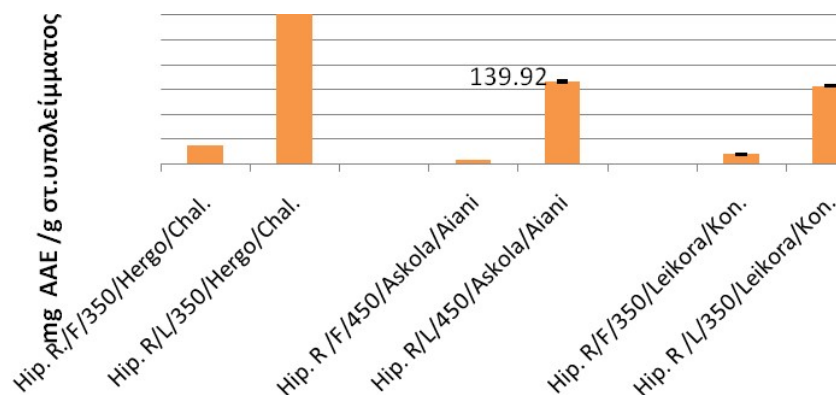
Στα δύο παραπάνω διαγράμματα φαίνεται η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων για τις εσοδείες 2014-2015. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα η εσοδεία 2015 εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα δείγματα Goji berry (καρποί) τα οποία έχουν συλλεχθεί από 450m και στα δείγματα ιπποφαούς (τόσο τα φύλλα όσο κι οι καρποί). Τα δείγματα της εσοδείας 2015 κατά μέσο όρο έχουν πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των αντίστοιχων δειγμάτων της εσοδείας 2014 γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, ηλιοφάνεια, βροχοπτώσεις), συγκομιδής και αποθήκευσης των φυτών.



Σχήμα 3: Σύγκριση δειγμάτων goji berry που έχουν συλλεχθεί από διάφορα υψόμετρα

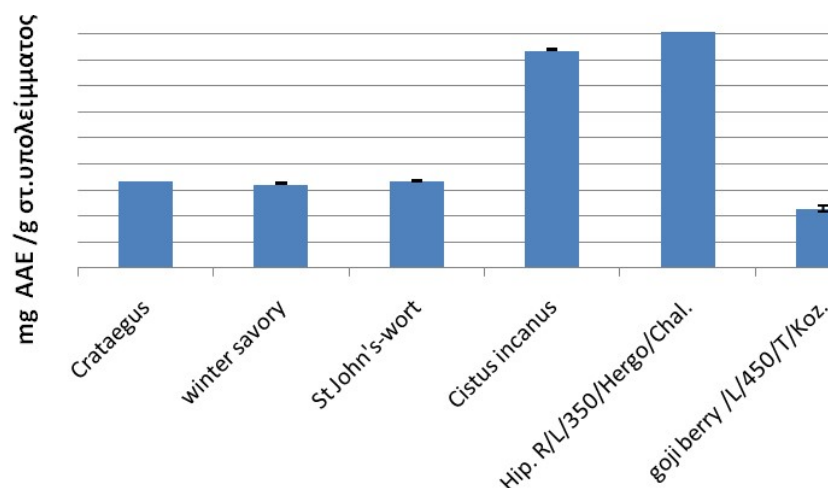
Δείγματα Goji berry της εσοδείας 2015 συλλέχθηκαν από διαφορετικά υψόμετρα για να εκτιμηθεί η επίδραση των πεδοκλιματικών αλλαγών στην βιοσύνθεση των βιοδραστικών μικροσυστατικών των φυτών. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: πεδινά (60-100m), ημιορεινά (300-450m) και ορεινά (550-650m) υψόμετρο αντίστοιχα. Τα mg AAE /g στ. υπολείμματος για τα εν λόγω δείγματα φαίνονται στο παραπάνω διάγραμμα, όπου τα δείγματα από ημιορεινές περιοχές εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα έναντι των άλλων περιοχών. Επόμενα στην αντιοξειδωτική ισχύ είναι τα δείγματα που συλλέχθηκαν από πεδινές περιοχές και τέλος έρχονται τα δείγματα από ορεινές περιοχές.

Σχετικά με τα δείγματα του Ιπποφαούς όπως αναφέρθηκε πιο πάνω συλλέχθηκαν τρεις ποικιλίες του που αναπτύσσονται στον Ελλαδικό χώρο. Πιο συγκεκριμένα οι ποικιλίες που μετρήθηκαν ήταν οι HERGO, ASKOLA και LEIKORA τόσο καρποί όσο και φύλλα.



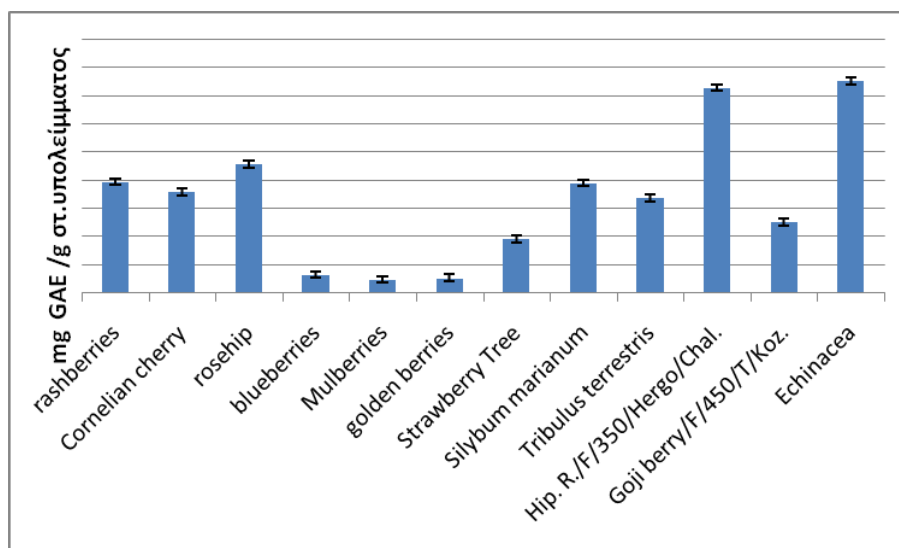
Σχήμα 4: Σύγκριση δειγμάτων των ποικιλιών του Ιπποφαούς

Από τις τρεις ποικιλίες του ιπποφαους μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα εμφανίζει η ποικιλία Hergo με τα φύλλα της συγκεκριμένης ποικιλίας να εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα συγκριτικά με τα δείγματα και των τριών ποικιλιών. Αναφορικά με τους καρπούς μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα επίσης έχει ο καρπός της ποικιλίας Hergo.



Σχήμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα μεταξύ όλων των υπερτροφών(1)

Όπως αναφέρθηκε κι πιο πάνω δείγματα υπερτροφών εμφάνισαν ισχυρή αντιριζική ικανότητα με τιμές που ξεπερνούν τα 300.0 AAE mg/g στ. υπολείμματος. Τα φύλλα του ιπποφαούς και ο κίστος εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές και τέλος τα δείγματα κράταιγος, περδικάκι, σπαθόχορτο κι φυλλα Goji berry να ακολουθούν σε δραστηκότητα.



Σχήμα 6 :Συγκριτικό διάγραμμα όλων των υπερτροφών (2)

Τέλος, τα δείγματα κρίνα, βατόμουρα, κυνороδο, κούμαρα, η εχινάκεια και καρπός ιπποφαούς εμφανίζουν μέτρια αντιριζική ικανότητα με τιμές άνω των 40 AAE mg/g στ. υπολείμματος ενώ τα golden berries, λευκό μούρο κι μύρτιλα εμφάνισαν την χαμηλότερη αντιριζική ικανότητα.

3.1.2 Εκτίμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (total phenolic content, TPC) που προσδιορίστηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Όπως αναφέρθηκε κι πιο πάνω η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε γραφικά πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE). Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη γαλλικού οξέος παρατίθεται στο παράρτημα 1.

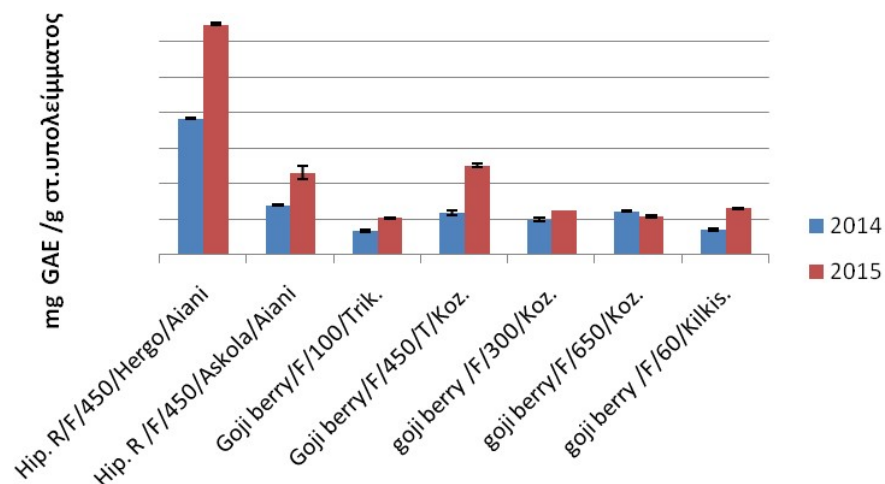
Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος ανά g στερεού υπολείμματος.(Gallic Acid Equivalents ,mgGAE/ g στερεού υπολείμματος)

Πίνακας 4: Συγκρεντρωτικός πίνακας(GAE mg/g g στερεού υπολείμματος)

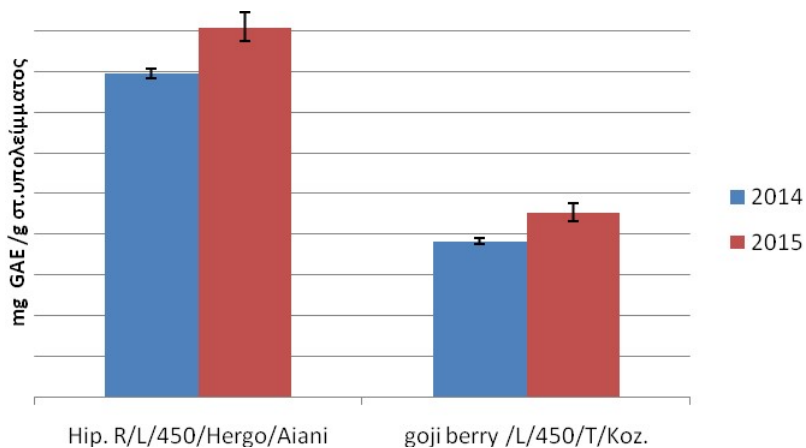
Δείγμα	mg GAE /g στ. υπολείμματος	SD	2015
rashberries	57,1	6,3	
Cornelian cherry	57,2	2,1	
rosehip	67,7	2,5	
blueberries	20,2	2,9	
Mulberries	13,8	5,4	
golden berries	16	2,6	
Crataegus	588,4	3,8	
Strawberry Tree	58,3	1,6	
Silybum marianum	34,8	0,1	
Echinacea	68,9	4,2	
chokeberries	721,2	0,4	
winter savory	785,2	4,9	
St John's-wort	636,1	0,8	
Cistus incanus	839,1	9,2	
Tribulus terrestris	111,4	0,4	

Hip. R./F/350/Hergo/Chal.	104,5	1,7	
Hip. R/L/350/Hergo/Chal.	1238,7	3,8	
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	681,6	76,4	
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	199,9	1,6	
Hip. R /F/450/Askola/Aiani	85,6	2,8	
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	514,3	3,9	
Hip. R /L/350/Leikora/Kon.	522,9	19,0	
Hip. R/F/350/Leikora/Kon.	26,4	2,0	
Hip. R /F/550/Hergo/Koz.	102,7	3	
Goji berry/F/450/T/Koz.	46	0,8	
goji berry /L/450/T/Koz.	553,6	15	
Goji berry/F/100/Kard.	13,9	2,1	
Goji berry/F/100/Trik.	26,3	1,6	
goji berry/F/450/Koz.	28,7	0,7	
goji berry /F/60/Kilkis.	17,7	0,9	
goji berry /F/300/Koz.	32,6	1,3	
goji berry/F/650/Koz.	27,6	2,5	
goji berry /F/550/Koz.	20,7	0,8	
goji berry/F/350/Koz.	50,1	2,5	
goji berry /F/550/M/Koz	28,1	0,2	
			2014
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	440,8	8,1	
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	94,7	0,9	
Hip. R /F/450/Askola/Aiani	21,7	1,7	
goji berry /L/450/T/Koz.	515,7	30,5	
Goji berry/F/100/Trik.	18,9	0,2	
Goji berry/F/450/T/Koz.	20,9	0,1	
goji berry /F/300/Koz.	17,7	0,8	
goji berry/F/650/Koz.	27,5	1,6	
goji berry /F/60/Kilkis.	11,5	1,2	

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις φαίνεται να έχουν τα δείγματα των φύλλων του ιπποφαούς ασχέτου ποικιλίας, με τα φύλλα του ιπποφαούς που συλλέχθηκαν από τη Νέα Γωνιά Χαλκιδικής σε υψόμετρο 350m της ποικιλίας Hergo, να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις με 1238.7 mg GAE/g στ. υπολείμματος.



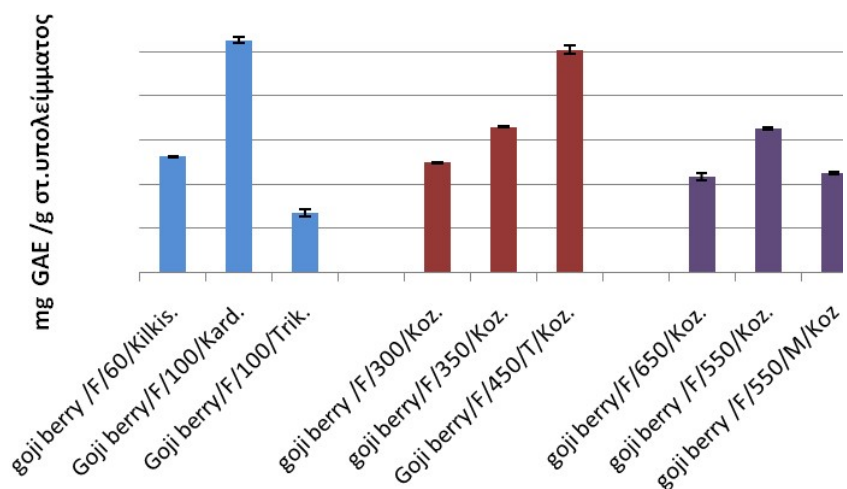
Σχήμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων των δύο σοδειών 2014-2015(1)



Σχήμα 8: Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων των δύο σοδειών 2014-2015(2)

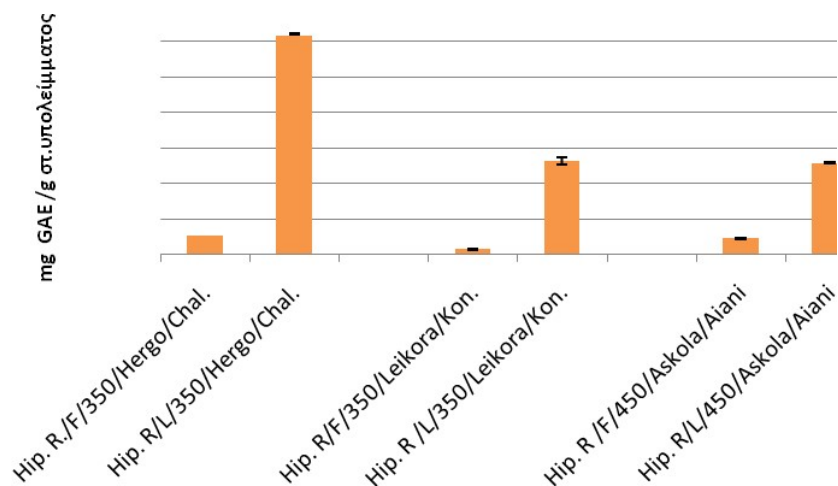
Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται η σύγκριση μεταξύ της εσοδείας 2014 με την εσοδεία 2015. Τα δείγματα της εσοδείας 2015 παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της εσοδείας 2014. Πιο συγκεκριμένα στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζουν τα δείγματα των καρπών του ιπποφαούς κι των δύο ποικιλιών (Hergo και Askola) και το δείγμα

των φύλλων του ιπποφαούς της ποικιλίας Hergo που έχουν συλλεχθεί από την Αιανή Κοζάνης σε υψόμετρο 450m.



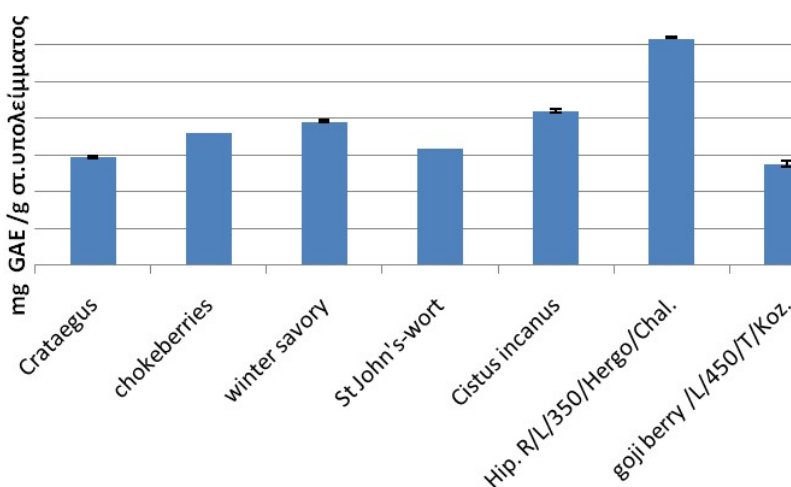
Σχήμα 9: Συγκριτικό διάγραμμα των δειγμάτων goji berry από διαφορα υψόμετρα

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η σύγκριση των δειγμάτων Goji berry που συλλέχθηκαν από διαφορετικά υψόμετρα για να εκτιμηθεί η επίδραση των πεδοκλιματικών αλλαγών στη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH όπου μετρήθηκε η αντιριζική ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα των ημιορεινών περιοχών, που εμφάνισαν την μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα, παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις. Έπειτα κατά φθίνουσα σειρά περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις έρχονται τα δείγματα από τις ορεινές περιοχές και τέλος έρχονται τα δείγματα των πεδινών περιοχών.



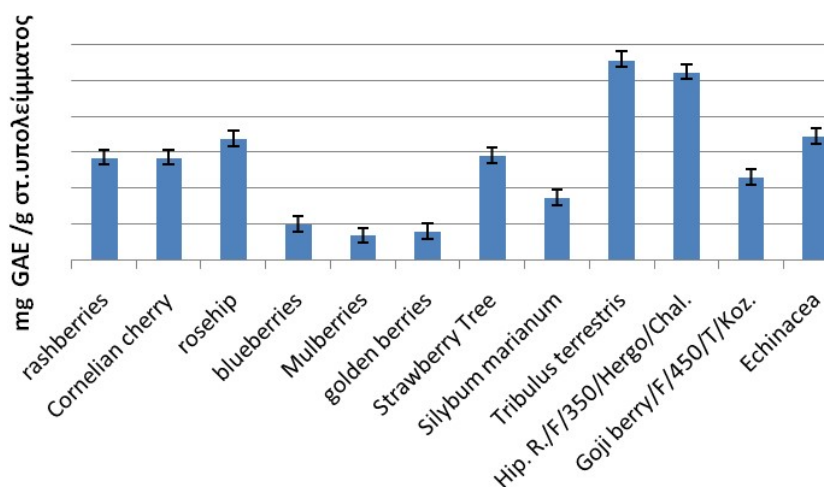
Σχήμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα mg GAE/g στ. υπολείμματος των ποικιλιών του ιπποφαούς.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα τα δείγματα του Ιπποφαούς της ποικιλίας Hergo έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών τόσο τα φύλλα όσο κι οι καρποί έναντι των δύο άλλων ποικιλιών που μελετήθηκαν. Για τις άλλες δύο ποικιλίες Askola και Leikora δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις.



Σχήμα 11: Συγκριτικό διάγραμμα mg GAE/g στ. υπολείμματος των υπερτροφών(1)

Αναφορικά με όλα τα είδη των υπερτροφών που μελετήθηκαν υπάρχουν μερικά δείγματα τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα ο κράταιγος, τα αρώνια, το περδικάκι, το σπαθόχορτο, ο κίστος, τα φύλλα Goji berry και τα φύλλα του ιπποφαούς έχουν συγκεντρώσεις άνω των 500 mg GAE/g στ. υπολείμματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.



Σχήμα 12: Συγκριτικό διάγραμμα mg GAE/g στ. υπολείμματος των υπερτροφών(2)

Τέλος, μέτριες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων εμφανίζουν τα δείγματα του τριβολιού και των καρπών του ιπποφαούς με περιεκτικότητες που ξεπερνούν τα 100 mg GAE/g στ. υπολείμματος, επόμενα σε συγκέντρωση είναι τα δείγματα των βατόμουρων, των κράνων, του κυνόροδου, των κούμαρων, του goji berry και της εχινάκειας, ενώ τελευταία σε περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών είναι τα δείγματα των μύρτιλων, των λευκών μούρων και των Golden berries.

3.2 Προσδιορισμός ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής απόδοσης (HPLC).

Όλα τα δείγματα που επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία μετρήθηκαν ως προς το περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τεταρτοταγή αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη, ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HP-1050), ανιχνευτή φθορισμού (HP-1046A), και λογισμικό ανάλυσης δεδομένων. Η ταυτοποίηση κι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επί μέρους ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκε βάση των πρότυπων καμπύλων αναφοράς των πρότυπων ενώσεων που παρατίθενται στο παράρτημα.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν επί μέρους ανθοκυανίνες.

Πίνακας 5: Πίνακας με τις επί μέρους ανθοκυανίνες που ανιχνεύθηκαν στα Δείγματα (μg/g στ.υπολείμματος).

retention time	10,5	11,9	12,8	14,1	15,3	15,9	16,7	17,8	19,2
	Δελφινιδίν η-3-O-	Άγνωσ το(1)	Κυανιδίνη- 3-O-	Άγνωσ το(2)	Πετουνιδίν η-3-O-	Άγνωσ το(3)	Πεονιδίνη- 3-O-	Μαλβιδίνη- 3-O-	Άγνωσ το(4)
Rashberries	3,30		3,50						
blueberries							1,34		
Cornelian cherry		44,51	3,80	74,67	6,15				
chokeberries		476,69	52,40	166,12		12,88	7,57		60,43
St John's- wort			43,36		4,98			554,47	
cistus incanus			47,03						
echinacea			292,51		20,39				329,83
Silybum marianum					52,80				

Στα δείγματα των βατόμουρων , των μύρτιλων, των κρίνων, των αρωνιών, της εχινάκειας, του σπαθόχορτου κι του γαιδουράγκαθου ανιχνεύθηκαν επιμέρους ανθοκυανίνες.

Πιο συγκεκριμένα, στα βατόμουρα ανιχνεύθηκαν οι 3-O-γλυκοζίτες της δελφινιδίνης (Delphinidin-3-O-glucoside) κι της κυανιδίνης (Cyanidin-3-O-

glucosid) με 3,30 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και 3,50 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος αντίστοιχα. Από τη βιβλιογραφία ξέρουμε ότι η κύρια ανθοκυανίνη που ανιχνεύεται είναι ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης κι ο γλυκοζίτης της πελαργονιδίνης.^{91,92}

Στα μύρτιλα όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα ανιχνεύθηκε ο γλυκοζίτης της πεονιδίνης σε ποσότητα 1,30 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία καθώς τα μύρτιλα έχει βρεθεί ότι περιέχουν γλυκοζίτες μαλβινιδίνης, πεονιδίνης, δελφινιδίνης και πετουινιδίνης.⁸⁹

Τα κράνα από τη βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι περιέχουν γλυκοζίτες κυανιδίνης, πελαργονιδίνης και δελφινιδίνης.⁹³ Στα κράνα όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα ανιχνεύθηκαν ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης σε ποσότητα 3,77 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και ο γλυκοζίτης της πετουινιδίνης σε ποσότητα 6,08 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος.

Τα αρώνια είναι μούρα με πλούσιο μωβ χρώμα που το οφείλουν όπως φαίνεται και από τη βιβλιογραφία στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε ανθοκυανίνες όπως η κυανιδίνη κι η πεονιδίνη. Από τον παραπάνω πίνακα βλέπουμε ότι στα δείγματα των αρωνιών ανιχνεύθηκαν οι εν λόγω επί μέρους ανθοκυανίνες σε ποσότητες 59,72 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και 8,61 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος αντίστοιχα.⁹⁴

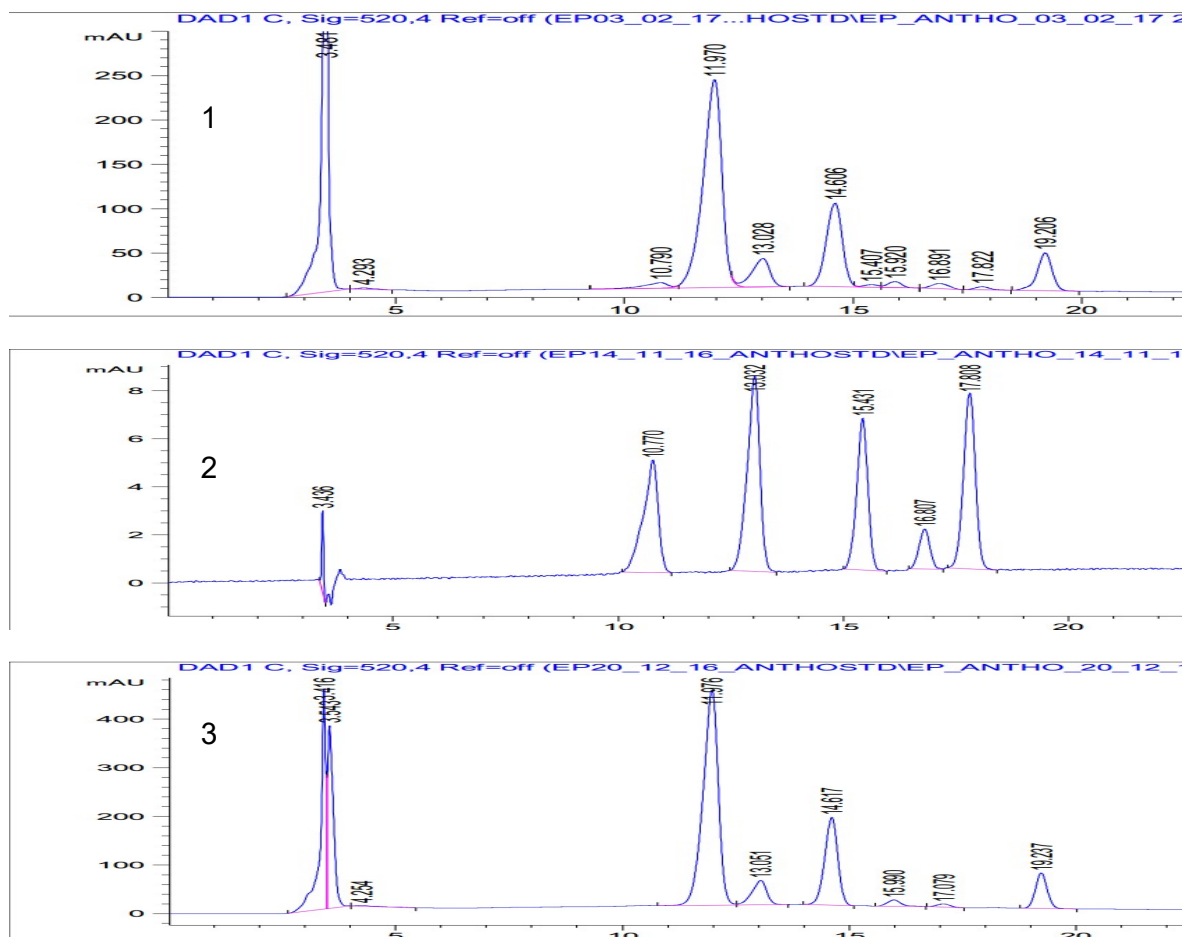
Στο δείγμα του σπαθόχορτου ανιχνεύθηκαν οι γλυκοζίτες της κυανιδίνης, πετουινιδίνης κι της μαλβιδίνης, με κύριο συστατικό την μαλβιδίνη με περιεκτικότητα που ανέρχεται σε 554,58 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος. Ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης είναι το δεύτερο κύριο συστατικό που ανιχνεύθηκε με 43,36 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος κι τέλος ο γλυκοζίτης της πετουινιδίνης.⁹⁵

Στην εχινάκεια η κύρια ανθοκυανίνη που ανιχνεύθηκε είναι ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης με ποσότητα που ανέρχεται στα 292,50 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος. Επίσης ανιχνεύθηκε κι ο γλυκοζίτης της πετουινιδίνης σε ποσότητα 20,45 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος. Τέλος στο δείγμα του γαϊδουράγκαθου ανιχνεύθηκε ο γλυκοζίτης της πετουινιδίνης σε ποσότητα 27,94 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος.

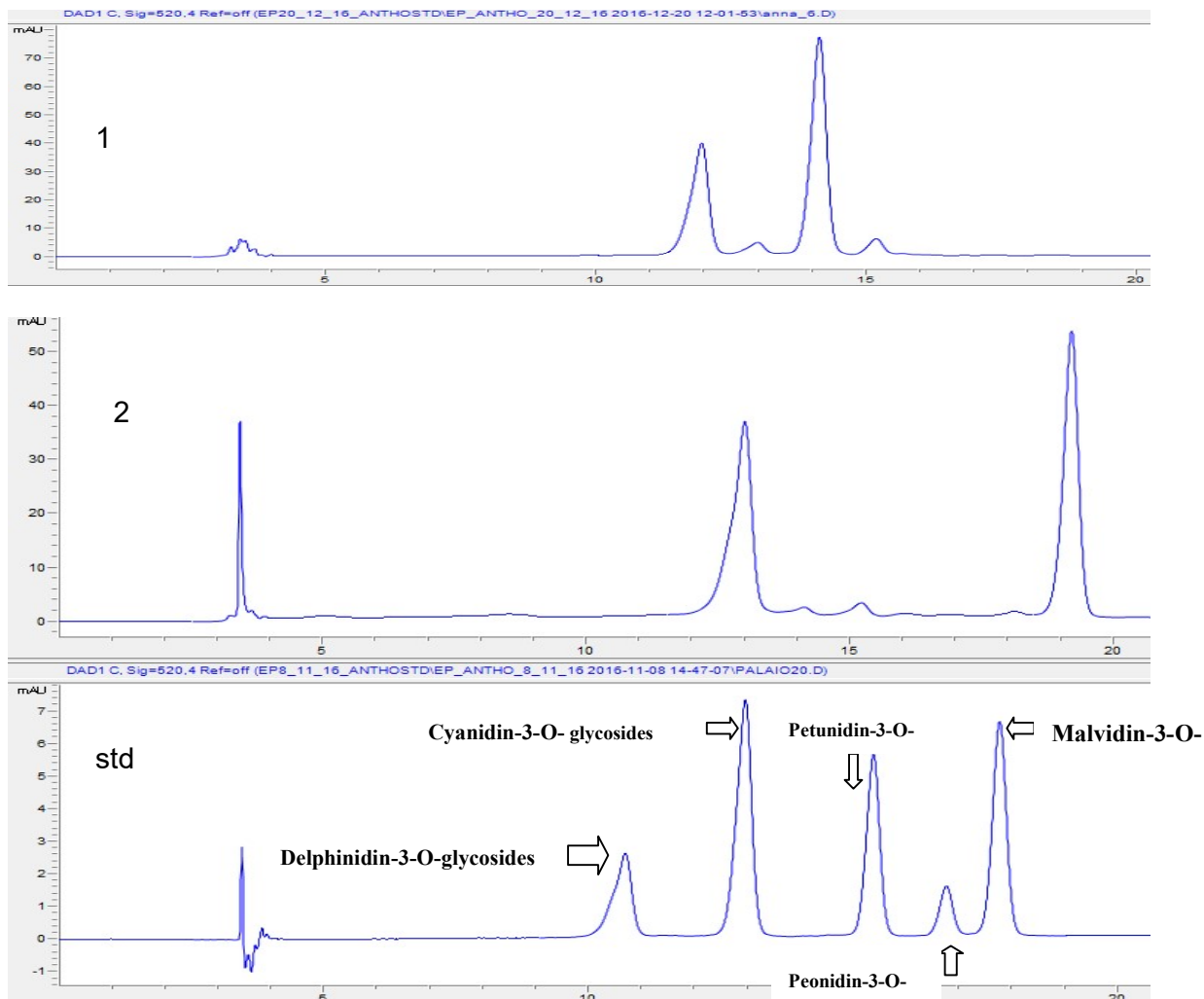
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, στα Αρώνια κι στα κράνα ανιχνεύθηκαν επί μέρους ανθοκυανίνες για τις οποίες δεν είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους καθώς δεν ήταν διαθέσιμα οι πρότυπες ουσίες, γι αυτό το λόγο

η ποσοτικοποίηση αυτών των κορυφών έγινε ως προς τον γλυκοζίτη της κυανιδίνης.

Παρακάτω παρατίθενται μερικά χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα των επί μέρους ανθοκυανινών που μετρήθηκαν σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 38: (1) Chokeberries (2) πολυπρότυπο ανθοκυανινών (3) πολυπρότυπο ανθοκυανινών και δείγμα.



Εικόνα 39: (1) cornellian cherry (2)echinacea, (std) πολυπρότυπο ανθοκυανινών.

3.3 Προσδιορισμός μετάλλων κι ιχνοστοιχείων με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS)

Σε όλα τα δείγματα που επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία μετρήθηκαν μέταλλα και ιχνοστοιχεία με χρήση Φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS). Παρακάτω παρατίθενται σε πίνακα τα

αποτελέσματα των μετρήσεων εκφρασμένα σε µg μετάλλου/g dried sample τα οποία έχουν υπολογιστεί με βάση τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς των μετάλλων. Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς δίνονται στο παράρτημα.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων ICP-MS

Δείγμα	Mn (µg/g)	Fe (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu (µg/g)
rashberries	10,44	4,44	7,88	2,74
Cornelian cherry	1,55	4,05	4,10	1,36
rosehip	32,72	1,65	6,91	1,56
blueberries	13,87	4,54	3,24	2,02
Mulberries	3,70	8,47	7,04	2,05
golden berries	7,38	12,90	14,04	5,68
Crataegus	18,37	6,42	7,08	1,74
Strawberry Tree	3,64	9,19	9,30	1,97
Silybum marianum	19,94	31,08	31,66	9,78
chokeberries	6,68	11,0	5,75	2,13
winter savory	6,27	4,90	6,26	2,34
St John's-wort	36,84	28,75	26,70	7,26
Cistus incanus	28,53	91,19	75,81	7,89
Tribulus terrestris	53,98	193,27	119,78	9,49
echinacea	8,19	12,34	19,59	8,19
Hip. R./F/350/Hergo/Chal.	11,01	7,69	15,86	3,89
Hip. R/L/350/Hergo/Chal.	64,95	19,41	8,21	1,71
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	110,52	36,90	10,72	2,72
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	12,86	8,75	17,43	3,71
Hip. R /F/450/Askola/Aiani	8,10	4,59	11,58	5,09
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	110,34	71,14	28,03	7,25
Hip. R /L/350/Leikora/Kon.	80,59	38,81	16,89	4,07
Hip. R/F/350/Leikora/Kon.	10,54	6,04	10,44	8,11
Hip. R /F/550/Hergo/Koz.	15,82	7,05	17,19	4,49
Goji berry/F/450/T/Koz.	6,33	3,80	15	9,36
goji berry /L/450/T/Koz.	224,26	43,81	22,50	9,20
Goji berry/F/100/Kard.	7,15	8,92	17,38	9,62
Goji berry/F/100/Trik.	11,56	8,64	9,30	10,25
goji berry/F/450/Koz.	13,47	17,10	17,61	13,30
goji berry /F/60/Kilkis.	10,11	8,01	29,56	12,59
goji berry /F/300/Koz.	10,22	5,83	22,58	7,62
goji berry/F/650/Koz.	11,16	6,80	18,16	7,73
goji berry /F/550/Koz.	6,43	4,30	17,19	7,00
goji berry/F/350/Koz.	2,17	4,32	4,34	2,06
goji berry /F/550/M/Koz	6,18	6,84	12,95	5,23

Μαγγάνιο (Mn)

Ένα από τα μέταλλα που μετρήθηκαν είναι το μαγγάνιο το οποίο επιτελεί διάφορες λειτουργίες στον οργανισμό, είναι ενεργοποιητής ενζύμων και συστατικό μέταλλο-ενζύμων, συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Οι ημερήσιες συνιστώμενες ποσότητες πρόσληψης μαγγανίου είναι οι εξής⁹⁶:

Πίνακας 7: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Mn

Βρέφη	4 μέχρι 12 μηνών	0,6-1,0 mg
Παιδιά	1 μέχρι 4 χρόνων	1,0-1,5 mg
Παιδιά	4 μέχρι 7 χρόνων	1,5-2 mg
Παιδιά	7 μέχρι 10 χρόνων	2 - 3 mg
Παιδιά άνω των 10 χρόνων, έφηβοι και ενήλικες		2 - 5 mg

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι περιεκτικότητες σε μαγγάνιο των δειγμάτων ανά 100g τροφίμου ή ανά 100mL αφεψήματος για τα δείγματα που καταναλώνονται με την μορφή αφεψήματος.

Πίνακας 8: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε μαγγάνιο.

Δείγμα	mg/100g	mg/100mL
rashberries	1,04	-
blueberries	1,87	-
golden berries	0,74	-
Hip. R /F/550/Hergo/Koz.	1,58	-
goji berry/F/450/Koz.	1,35	-
Hip. R/L/450/Hergo/Aiani	-	66,6
goji berry /L/450/T/Koz.	-	7,94
rosehip	-	5,34
St John's-wort	-	4,4
Cistus incanus	-	9,14

Το μαγγάνιο παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό οστών, ανάπτυξη του συνδετικού ιστού και στην πήξη του αίματος. Απο τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι το αφέψημα από φύλλα ιπποφαούς περιέχει περίπου 66 mg/100mL μαγγάνιο, δηλαδή 13 φορές περισσότερο από την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα γεγονός που το καθιστά πλούσια πηγή μαγγανίου. Επίσης, τα

αφεψήματα απο τα φύλλα goji berry, το κυνόροδο το σπαθόχορτο κι τον κίστο περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες μαγγανίου.

Σίδηρος (Fe)

Ο σίδηρος του οργανισμού είναι σχεδόν αποκλειστικά συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες του αίματος που ονομάζονται αιμοπρωτεΐνες. Η απορρόφηση γίνεται κυρίως από το δωδεκαδάκτυλο και το αρχικό μισό της νήστιδας. Από το σίδηρο της διαίτας απορροφάται περίπου το 10%. Οι ημερήσιες συνιστώμενες ποσότητες πρόσληψης Σιδήρου είναι οι εξής⁹⁶:

Πίνακας 9: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Fe

Βρέφη	0 - 4 μηνών	0,5 mg
Βρέφη	4 -12 μηνών	8 mg
Παιδιά	1 -10 ετών	10 mg
Έφηβοι αγόρια	10 -19 ετών	12 mg
Έφηβοι κορίτσια	10 -19 ετών	15 mg
Ενήλικες άνδρες	10 mg	
Ενήλικες γυναίκες μέχρι 51 χρόνων και μετά αντίστοιχα	15 mg και 10 mg	
Έγκυες από τον 4 μήνα και θηλάζουσες αντίστοιχα	30 mg και 20 mg	

Στον επόμενο πίνακα δίνονται οι ποσότητες σιδήρου που περιέχονται ανά 100g τροφίμου ή ανά 100mL αφεψήματος για τα δείγματα που καταναλώνονται με την μορφή αφεψήματος.

Πίνακας 10:Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε σίδηρο

Δείγμα	mg/100mL
goji berry /L/450/T/Koz.	6,7
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	21,5
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	8,2
Cistus incanus	3,5
Tribulus terrestris	4,2
echinacea	3,5

Από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν αξιοσημείωτες ποσότητες σιδήρου περιέχουν τα αφεψήματα που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Πιο συγκεκριμένα το αφέψημα των φύλλων του Ιπποφαούς έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο κι θα μπορούσε να θεωρηθεί πλούσια πηγή. Τα αφεψήματα των φύλλων goji berry,κίστου, τριβολιού και εχινάκειας περιέχουν μέτριες ποσότητες σιδήρου.

Ψευδάργυρος (Zn)

Ο Ψευδάργυρος είναι ένα μέταλλο πολύ σημαντικό για την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης είναι συστατικό πολλών ενζύμων στο μεταβολισμό του ανθρώπου.

Πίνακας 11: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Zn⁹⁶

Βρέφη	από 0 μέχρι 4 μηνών	1 mg
Βρέφη	από 4 μέχρι 12 μηνών	2 mg
Παιδιά	από 4 μέχρι 10 χρονών	3-7 mg
Έφηβοι αγόρια	από 10 μέχρι 19 χρονών	9 mg
Έφηβοι κορίτσια	από 10 μέχρι 19 χρονών	7 mg
Ενήλικες: άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα		10 mg και 7 mg
Έγκυες και θηλάζουσες αντίστοιχα		10 mg και 11 mg

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι περιεκτικότητες σε Ψευδάργυρο των δειγμάτων ανά 100g τρόφιμου ή ανά 100mL αφεψήματος για τα δείγματα που καταναλώνονται με την μορφή αφεψήματος.

Πίνακας 12: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε ψευδάργυρο

Δείγμα	mg/100g	mg/100mL
goji berry /F/60/Kilkis.	2,95	-
Hip. R/F/450/Hergo/Aiani	1,8	-
golden berries	1,4	-
Hip. R /L/350/Leikora/Kon.	-	15,3
Tribulus terrestris	-	23,3
echinacea	-	6,77
Silybum marianum	-	9,5

Πλούσιες διαιτητικές πηγές Ψευδαργύρου μπορούν να θεωρηθούν τα αφεψήματα του ιπποφαούς και του τριβολιού καθώς περιέχουν ποσότητες ψευδαργύρου που υπερβαίνουν την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα. Μέτριας περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο είναι τα goji berry, ο καρπός του ιπποφαούς κι τα golden berries καθώς επίσης κι το αφέψημα εχινάκειας.

Χαλκός (Cu)

Ο χαλκός επιτελεί μια σειρά λειτουργιών στον οργανισμό. Είναι συστατικό πολλών μέταλλο-ενζύμων καθώς επίσης επηρεάζει το σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης (οξειδωση δισθενούς σιδήρου προς τρισθενή) μέσω της ενώσεως

του με την α_2 -σφαιρίνη.

Πίνακας 13: Ημερησίως συνιστώμενες ποσότητες Cu⁹⁶

Βρέφη	από 6 μέχρι 11 μηνών	0,5 mg
Παιδιά	από 1 μέχρι 7 χρονών	0,5 – 1,0 mg
Παιδιά 7-15 χρόνων, έφηβοι και ενήλικες		1,0 – 1,5 mg

Στη συνέχεια δίνονται οι περιεκτικότητες σε Χαλκό των δειγμάτων ανά 100g τρόφιμου ή ανά 100mL αφεψήματος για τα δείγματα που καταναλώνονται με την μορφή αφεψήματος.

Πίνακας 14: Δείγματα με τις μέγιστες περιεκτικότητες σε χαλκό

Δείγμα	mg/100g	mg/100mL
goji berry/F/450/Koz.	1,33	-
Hip. R/F/350/Leikora/Kon.	0,8	-
winter savory	-	2,9
St John's-wort	-	3,3
Cistus incanus	-	1,7
Tribulus terrestris	-	4,3
rosehip	-	2,6
Crataegus	-	2,2
echinacea	-	3,98
Hip. R/L/450/Askola/Aiani	-	4,9

Όπως φαίνεται κι από τον παραπάνω πίνακα τα αφεψήματα είναι πλούσιες πηγές χαλκού καθώς υπερβαίνουν σε περιεκτικότητα τις ημερήσιες συνιστώμενες ποσότητες. Αναλυτικά, τα αφεψήματα των φύλλων ιπποφαούς, της echinaceias, του τριβολιού και του σπαθόχορτου έχουν περιεκτικότητα σε χαλκό σχεδόν διπλάσια από την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα με τιμές που υπερβαίνουν τα 3 mg/100mL αφεψήματος, επόμενα σε περιεκτικότητα χαλκού είναι τα αφεψήματα του κράταιγου, του κυνόροδου και του κίστου. Τέλος από τα δείγματα των μούρων που μελετήθηκαν τα Goji berry από την Κοζάνη και ο καρπός του Ιπποφαούς της ποικιλίας Leikora περιέχουν ποσότητες χαλκού ικανές να καλύψουν μέρος της ημερήσιας συνιστώμενης ποσότητας σε χαλκό για τους ενήλικες.

Τέλος για όλα τα δείγματα μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, παρακάτω φαίνονται τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα στα τρόφιμα.

Τμήμα 3: Μέταλλα		
Τρόφιμα ⁽¹⁾		Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (mg/kg νωπού προϊόντος)
3.1	Μόλυβδος	
3.1.13	Λαχανικά εκτός από φυλλώδεις κράμβες, λαγόχορτο, φυλλώδη λαχανικά και νωπά αρωματικά φυτά, μανιτάρια, φύκια και καρποφόρα λαχανικά ⁽²⁷⁾ ⁽⁵³⁾	0,10
3.1.14	Φυλλώδεις κράμβες, λαγόχορτο, φυλλώδη λαχανικά εκτός από τα νωπά αρωματικά φυτά και τα εξής μανιτάρια: <i>Agaricus bisporus</i> (κοινό μανιτάρι), <i>Pleurotus ostreatus</i> (πλευρωτός ο οστρεώδης), <i>Lentinula edodes</i> (μανιτάρι shiitake) ⁽²⁷⁾	0,30
3.1.16	Φρούτα, εκτός από τα μακρόκαρπα μύρtilλα, τα φραγκοστάφυλα, τους καρπούς της κουφοξυλιάς και τους καρπούς της κουμαριάς ⁽²⁷⁾	0,10
3.1.17	Μύρtilλα μακρόκαρπα, φραγκοστάφυλα, καρποί της κουφοξυλιάς και καρποί της κουμαριάς ⁽²⁷⁾	0,20
3.2	Κάδμιο	
3.2.15	Λαχανικά και φρούτα, εξαιρουμένων των φυλλωδών λαχανικών, των νωπών αρωματικών φυτών, των μανιταριών, των λαχανικών με στέλεχος, των ριζωδών λαχανικών και της πατάτας ⁽²⁷⁾	0,050
3.2.17	Φυλλώδη λαχανικά, νωπά αρωματικά φυτά, σελινόριζα και τα εξής μανιτάρια ⁽²⁷⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (κοινό μανιτάρι), <i>Pleurotus ostreatus</i> (πλευρωτός ο οστρεώδης), <i>Lentinula edodes</i> (μανιτάρι shiitake)	0,20

Εικόνα 40: Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα βαρέων μετάλλων στα τρόφιμα σύμφωνα με την οδηγία 1881/2006 και ΕΕ 1005/2015.⁹⁷

Στο περιβάλλον έχουν ανιχνευθεί άνω των 40 στοιχείων που ανήκουν στην κατηγορία των μετάλλων. Επικίνδυνα είναι τα αποκαλούμενα βαρέα μέταλλα όπως βηρύλλιο, κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος, νικέλιο, άργυρος, χρυσός, χρώμιο, ψευδάργυρος και χαλκός. Θεωρούνται τοξικά όσα μέταλλα έχουν

δυσμενή επίδραση στους οργανισμούς ακόμη και όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Για όλα τα δείγματα μετρήθηκαν με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα οι περιεκτικότητες σε βαρέα μέταλλα, πιο συγκεκριμένα μετρήθηκε η ποσότητα αρσενικού, μόλυβδου και καδμίου.

Για κάποια από τα δείγματα οι περιεκτικότητες σε αυτά τα τρία μέταλλα ήταν πολύ μικρές, για κάποια οι περιεκτικότητες ήταν μικρότερες του ορίου ανίχνευσης ενώ για κάποια άλλα δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία κανενός από τα παραπάνω μέταλλα. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

3.4 Μικροβιολογικός έλεγχος

Όπως αναφέρθηκε κι στο προηγούμενο κεφάλαιο ορισμένα δείγματα επιλέχθηκαν για να γίνει μικροβιολογικός έλεγχος. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν δείγματα που είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση αυτών στην ανάπτυξη των μυκήτων *A.parasiticus* και *A.carbonarius*. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ανάσχεσης ή διέγερσης της μυκηλιακής ανάπτυξης.

Πίνακας 15: Ποσοστά αναστολής ή διέγερσης της μυκηλιακής ανάπτυξης παρουσία των εκχυλισμάτων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	% Ποσοστό αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης		% Ποσοστό διέγερσης της μυκηλιακής ανάπτυξης	
	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.carbonarius</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.carbonarius</i>
Hip.R/L/350/Hergo/Chal	5,7%	3,2%	-	-
Hip.R./F/350/Hergo/Cha.	-	-	17,0%	4,3%
St John's-wort	9,4%	14,0%	-	--

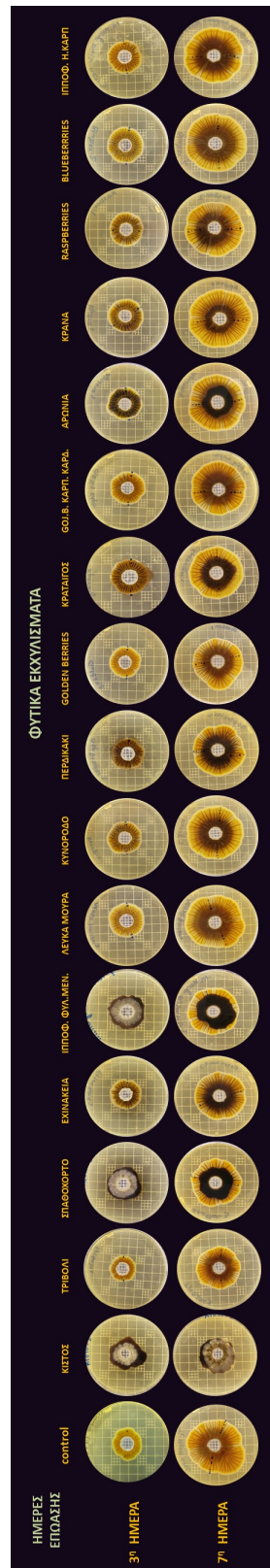
Tribulus terrestris	32,1%	22,6%	-	-
Cistus incanus	45,9%	30,7%	-	-
Mulberries	3,1%	-	-	7,5%
Echinacea	6,9%	10,8%	-	-
Golden berries	0,6%	-	-	6,5%
Rosehip	1,9%	6,5%	-	-
Winter savory	0,6%	-	-	3,2%
Raspberries	-	21,5%	14,5%	-
Chokeberries	-	3,2%	9,4%	-
Crataegus	-	7,8%	5,7%	-
Goji berry/F/100/Trik	-	17,2%	5,7%	-
Blueberries	-	-	19,5%	10,8%
Cornelian cherry	-	1,1%	12,0%	-

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 12, παρατηρείται ότι η παρουσία των εκχυλισμάτων προκαλεί τόσο αναστολή όσο και διέγερση στην ανάπτυξη των μυκήτων *A.parasiticus* και *A.carbonarius*, στην έβδομη μέρα ανάπτυξης.

Τη μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα *A.parasiticus* φαίνεται πως έχει το εκχύλισμα κίστου, το οποίο προκαλεί μια αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα της τάξεως του 45,9% για τις 7 ημέρες επώασης ενώ ακολουθεί το εκχύλισμα από το τριβόλι με αναστολή της τάξεως του 32,1%. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και για την περίπτωση του *A.carbonarius* όπου ο κίστος προκάλεσε αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης κατά 30,7% ενώ το τριβόλι 22,6%.

Ωστόσο μεταξύ των εκχυλισμάτων εκείνο που προκάλεσε και στους δύο μύκητες διέγερση της ανάπτυξης τους ήταν τα blueberries, τα οποία διέγειραν τον *A.parasiticus* κατά 19,5% και τον *A.carbonarius* κατά 10,8%.

Στη συνέχεια ακολουθούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του πειράματος, στις οποίες φαίνεται η δράση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των μυκήτων. Στην φωτογραφία απεικονίζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά τρυβλία από κάθε περίπτωση, καθώς και τα τρυβλία control.



Εικόνα 41: Δράση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των μυκήτων

3.5 Συμπεράσματα

- Τα δείγματα της εσοδείας 2015, ο κράταιγος, το περδικάκι, το μελισσόχορτο, ο κίστος, τα φύλλα ιπποφαούς και τα φύλλα του Goji berry εμφανίζουν ισχυρή αντιριζική ικανότητα καθώς για τα παραπάνω δείγματα τα ΑΑΕ mg/g στ. υπολείμματος ξεπερνούν τα 300.0mg/g στ. υπολείμματος.
- Τα δείγματα της εσοδείας 2015 κατά μέσο όρο έχουν πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των αντίστοιχων δειγμάτων της εσοδείας 2014 γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, ηλιοφάνεια, βροχοπτώσεις), συγκομιδής και αποθήκευσης των φυτών.
- Τα δείγματα από ημιορεινές περιοχές εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα έναντι των άλλων περιοχών.
- Από τις τρεις ποικιλίες του ιπποφαούς μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα εμφανίζει η ποικιλία Hergo με τα φύλλα της συγκεκριμένης ποικιλίας να εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα.
- Τα φύλλα του ιπποφαούς που συλλέχθηκαν από τη Νέα Γωνιά Χαλκιδικής σε υψόμετρο 350m της ποικιλίας Hergo, να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις.
- Τα δείγματα της εσοδείας 2015 παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της εσοδείας 2014.
- Ο κράταιγος, το περδικάκι, το σπαθόχορτο, ο κίστος, τα φύλλα Goji berry και τα φύλλα του ιπποφαούς έχουν συγκεντρώσεις άνω των 500 mg GAE/g στ. υπολείμματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.
- Στην εχινάκεια η κύρια ανθοκυανίνη που ανχνεύθηκε είναι ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης με ποσότητα που ανέρχεται στα 292,50 μg/g στ. υπολείμματος.

- Στα βατόμουρα ανιχνεύθηκαν οι γλυκοζίτες της δελφινιδίνης (Delphinidin-3-O-glucoside) και της κυανιδίνης (Cyanidin-3-O-glucosid) με 3,30 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και 3,50 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος αντίστοιχα.
- Στα μύρτιλα όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα ανιχνεύθηκε ο γλυκοζίτης της πεονιδίνης σε ποσότητα 1,30 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος
- Στα κράνα όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα ανιχνεύθηκαν ο γλυκοζίτης της κυανιδίνης σε ποσότητα 3,77 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και ο γλυκοζίτης της πετουινιδίνης σε ποσότητα 6,08 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος.
- Στα δείγματα των αρωνιών ανιχνεύθηκαν οι εν λόγω επί μέρους ανθοκυανίνες σε ποσότητες 59,72 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος και 8,61 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος αντίστοιχα.
- Στο δείγμα του σπαθόχορτου ανιχνεύθηκαν οι γλυκοζίτες της κυανιδίνης, πετουινιδίνης και της μαλβιδίνης, με κύριο συστατικό την μαλβιδίνη με περιεκτικότητα που ανέρχεται σε 554,58 $\mu\text{g/g}$ στ. υπολείμματος.
- Το αφέψημα από φύλλα ιπποφαούς περιέχει περίπου 66 $\text{mg}/100\text{mL}$ μαγγάνιο, δηλαδή 13 φορές περισσότερο από την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα γεγονός που το καθιστά πλούσια πηγή μαγγανίου. Επίσης, το αφέψημα των φύλλων του Ιπποφαούς έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο και θα μπορούσε να θεωρηθεί πλούσια πηγή.
- Πλούσιες διαιτητικές πηγές Ψευδαργύρου μπορούν να θεωρηθούν τα αφεψήματα του ιπποφαούς και του τριβολιού καθώς περιέχουν ποσότητες ψευδαργύρου που υπερβαίνουν την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα.
- Τα αφεψήματα των φύλλων ιπποφαούς, της εχινάκειας, του τριβολιού και του σπαθόχορτου έχουν περιεκτικότητα σε χαλκό σχεδόν διπλάσια από την ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα με τιμές που υπερβαίνουν τα 3 $\text{mg}/100\text{mL}$ αφεψήματος.
- Για όλα τα δείγματα μετρήθηκαν με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα οι περιεκτικότητες σε βαρέα μέταλλα, πιο συγκεκριμένα μετρήθηκε η ποσότητα αρσενικού, μόλυβδου και καδμίου. Για κάποια από τα δείγματα οι περιεκτικότητες σε αυτά τα τρία

μέταλλα ήταν πολύ μικρές, για κάποια οι περιεκτικότητες ήταν μικρότερες του ορίου ανίχνευσης ενώ για κάποια άλλα δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία κανενός από τα παραπάνω μέταλλα. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι τα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

- Τη μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα *A.parasiticus* φαίνεται πως έχει το εκχύλισμα κίστου, το οποίο προκαλεί μια αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα της τάξεως του 45,9% για τις 7 ημέρες επώασης
- Η ίδια εικόνα παρατηρείται και για την περίπτωση του *A.carbonarius* όπου ο κίστος προκάλεσε αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης κατά 30,7% ενώ το τριβόλι 22,6%.
- Ωστόσο μεταξύ των εκχυλισμάτων εκείνο που προκάλεσε και στους δύο μύκητες διέγερση της ανάπτυξης τους ήταν τα blueberries, τα οποία διέγειραν τον *A.parasiticus* κατά 19,5% και τον *A.carbonarius* κατά 10,8%.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 16: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
ICP-MS	Δασματομετρία μάζας μς επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα
HPLC	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Ferric ammonium citrate	κιτρικός σίδηρος
AFPA	<i>Aspergillus Flavus and parasiticus</i> Agar Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης αφλατοξινογόνων μυκήτων.
Dichloran	2,6 διχλωρο-4-νιτροανιλίνη
PDA	Potato Dextrose Agar/ γενικής φύσης θρεπτικό υλικό

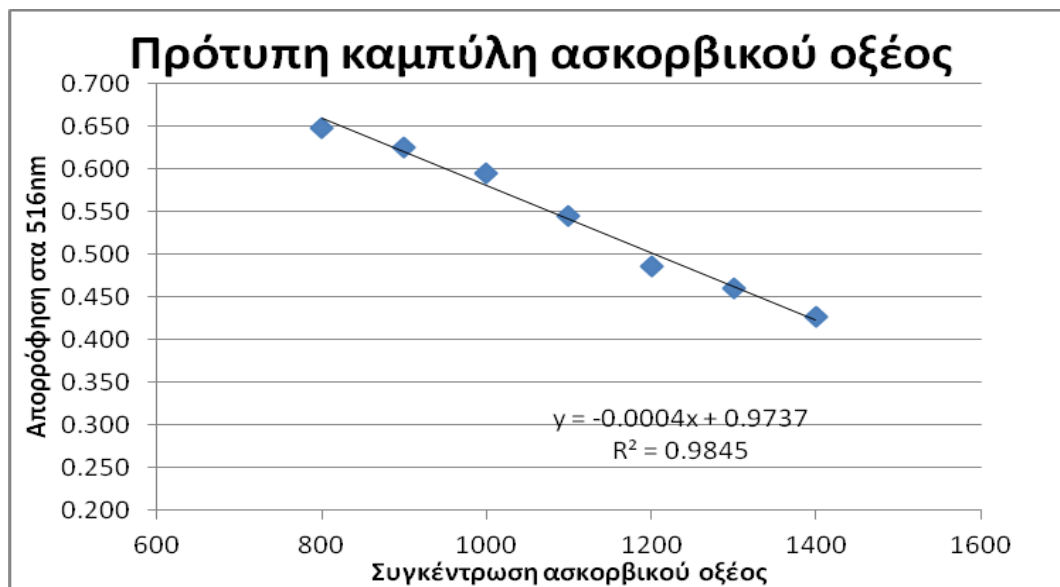
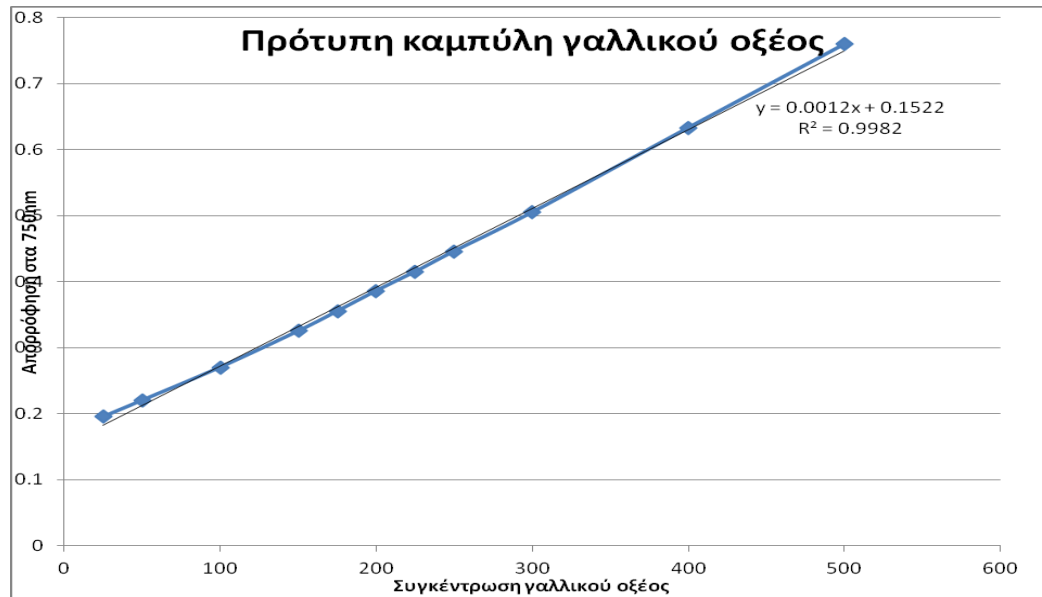
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

TPC	Total phenolic content
FC	Folin-Ciocalteu
GAE	Gallic acid Equivalence
AAE	Ascorbic Acid Equivalence
DPPH	2,2- diphenyl-2-picryl-hydrazyl
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
AFPA	<i>Aspergillus Flavus</i> and <i>parasiticus</i> Agar
PDA	Potato Dextrose Agar

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

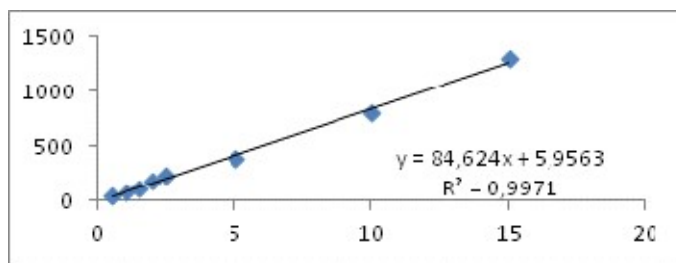
Καμπύλες αναφοράς για τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους



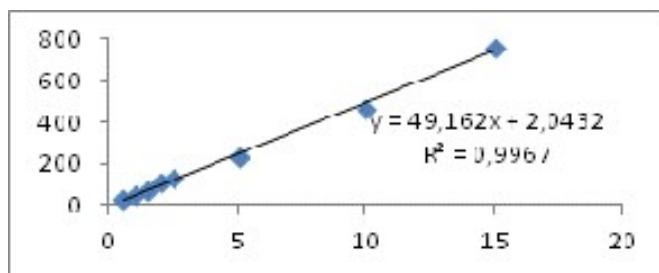
Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τις πρότυπες ανθοκυανίνες

(Αξονας y: Απορρόφηση στα 520nm Αξονας x: συγκέντρωση ανθοκυανίνης)

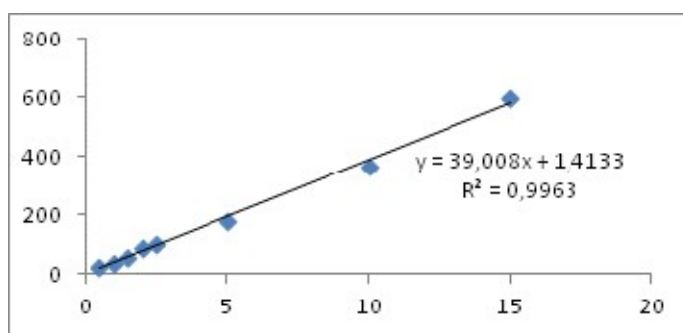
delphinidin-3-O-glucoside



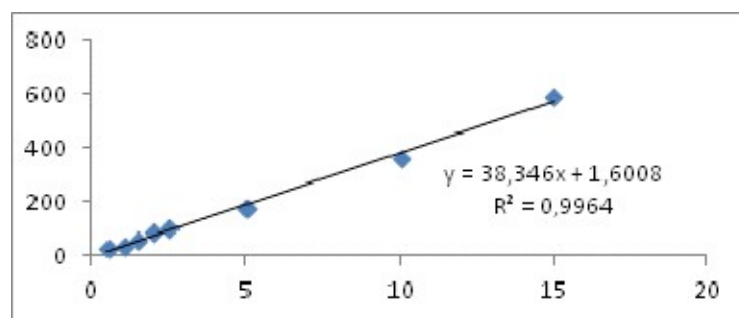
Cyanidin-3-O- glucoside



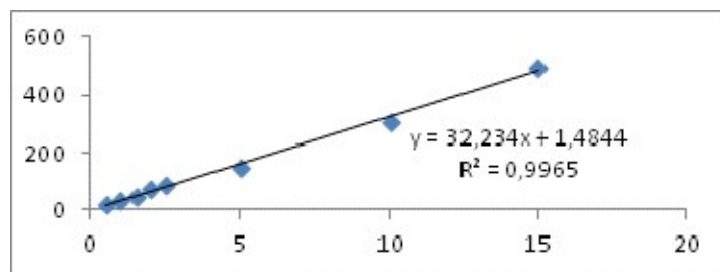
Petunidin-3-O- glucoside



Peonidin-3-O- glucoside



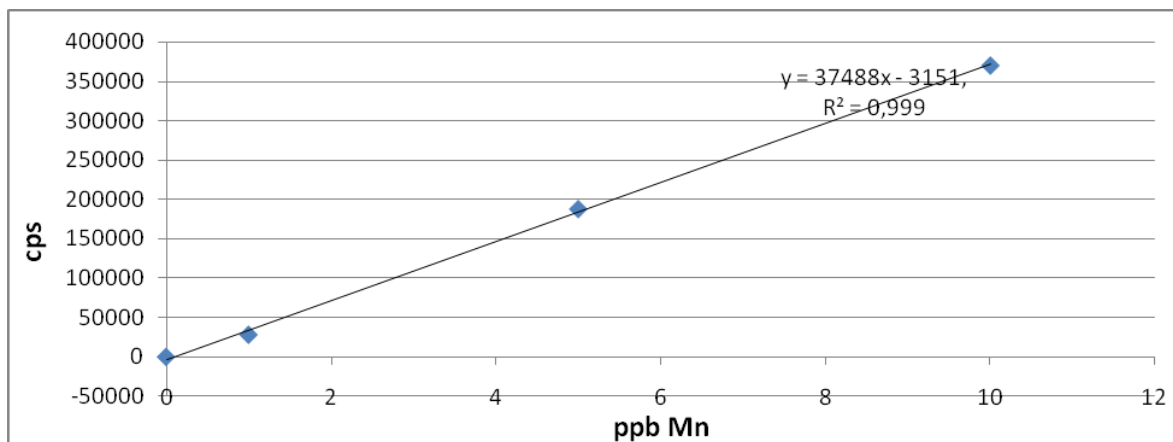
Malvidin-3-O- glucoside



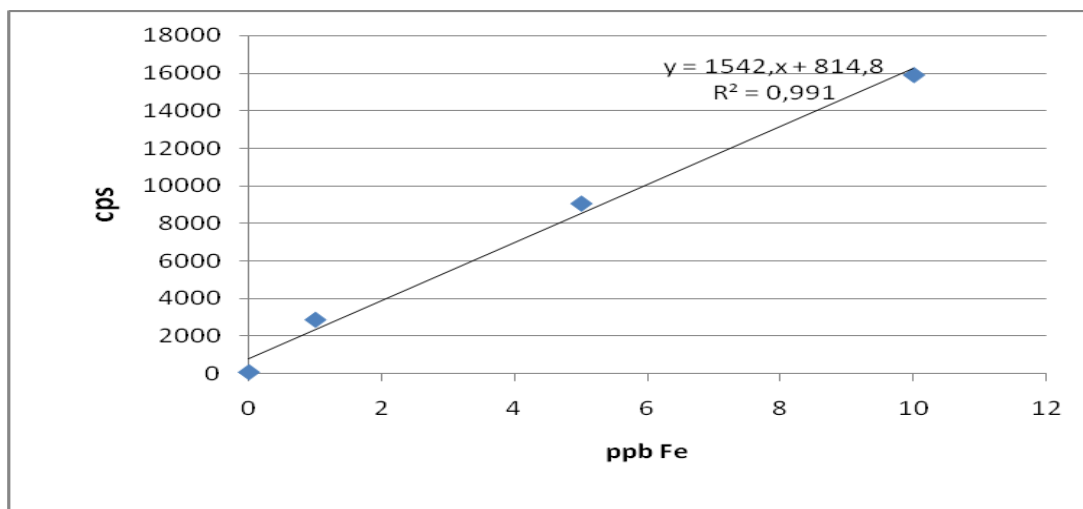
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα μέταλλα κι τα ιχνοστοιχεία

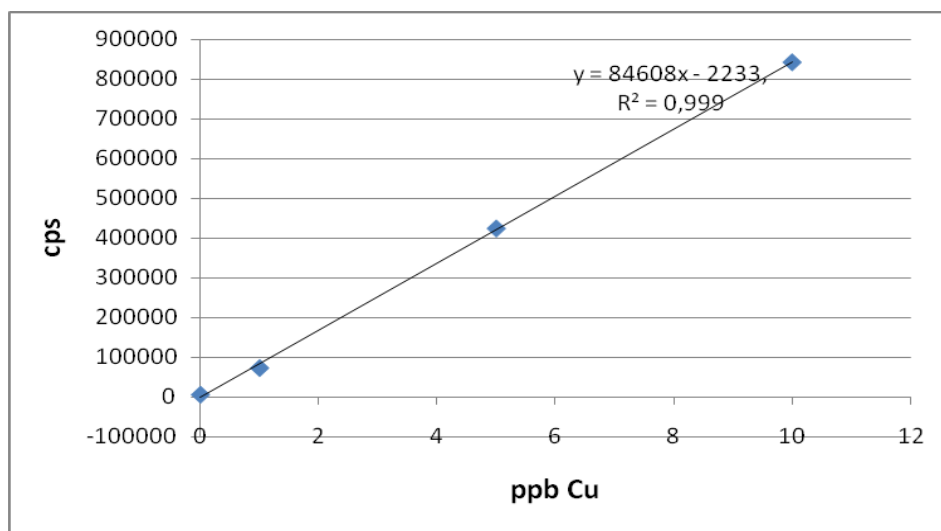
Μαγγάνιο



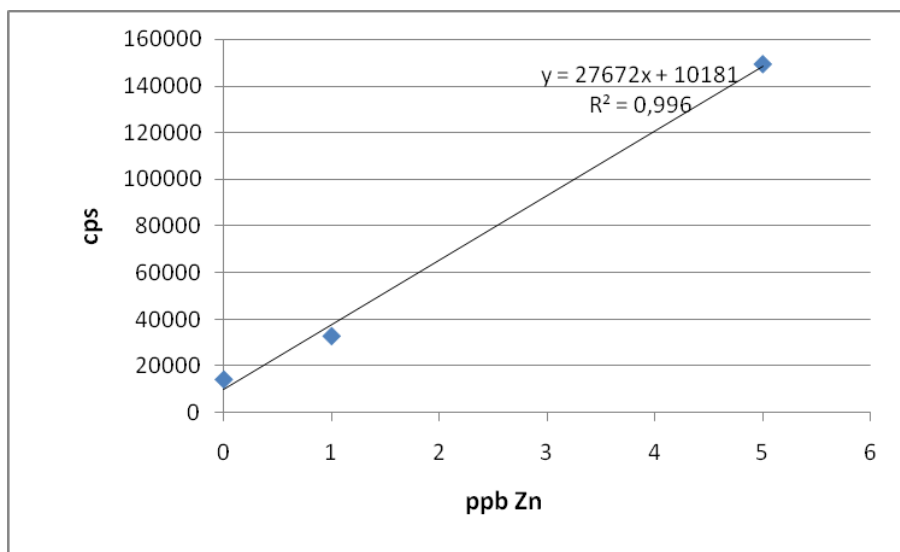
Σίδηρος



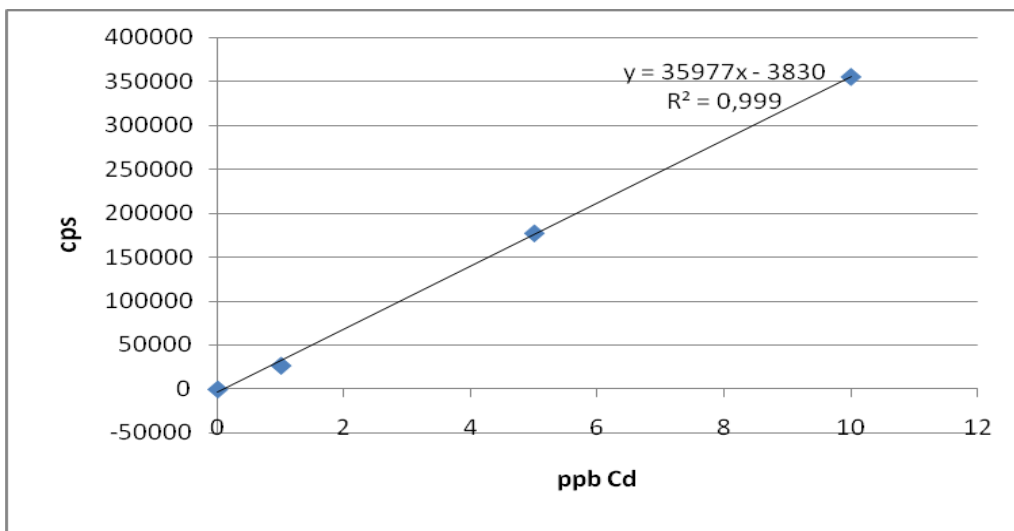
Χαλκός



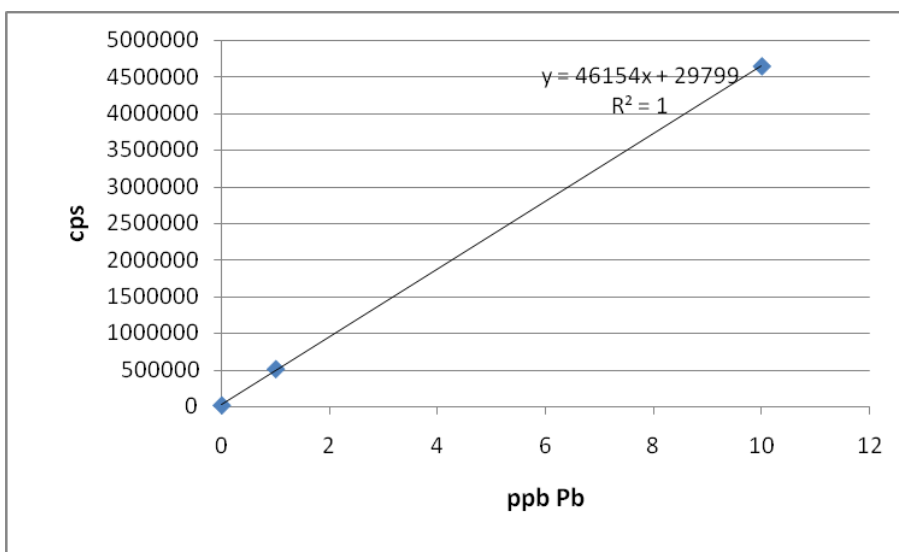
Ψευδάργυρος



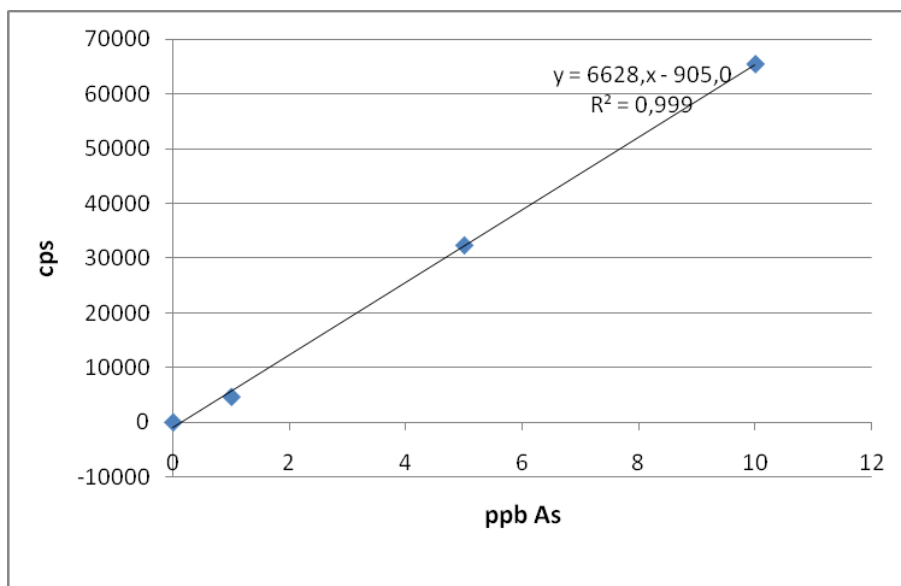
Κάδμιο



Μόλυβδος



Αρσενικό



ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1 . **Sindhu Mathew, Carl Grey, Kimmo Rumpunen, Patrick Adlercreutz**, Analysis of carbonyl compounds in sea buckthorn for the evaluation of triglyceride oxidation, by enzymatic hydrolysis and derivatisation methodology, Food Chemistry 2011, 126, p.p 1399–1405
- 2 **Erlend Hvattum**, Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection, Rapid Communications in Mass Spectrometry, Volume 16, Issue 7, pages 655–662, 15 April 2002
3. **Thomas H.J Beveridge**, Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.): Production and Utilization, Ottawa 2003, p.p. 79-88
- 4 . **Dong-Rui Jia, Richard J. Abbott, Teng-Liang Liu, Kang-Shan Mao, Igor V. Bartish and Jian-Quan Liu**, Out of the Qinghai–Tibet Plateau: evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) New Phytologist , 2012, 194: 1123–1133
- 5 . **Swenson U. & Bartish. I. V.**, Taxonomic synopsis of *Hippophae*, Nordic Journal of Botany, Copenhagen, 2003, 22, p.p. 369-374
- 6 . **Vahid Bilaloglu Guliyev, Mustafa Gul, Ali Yildirim**, Review *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects, Department of Chemistry, Faculty of Education, Ataturk University, Turkey, Journal of Chromatography B ,2004, 812, p.p. 291-307
- 7 **Barrajón-Catalán, E.; Fernández-Arroyo, S.; Roldán, C.; Guillén, E.; Saura, D.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.** A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. Phytochemical Analysis, 2011, 22, pp 303–312
- 8 **Santagati, N.A.; Salerno, L.; Attaguile, G.; Savoca, F.; Ronsisvalle, G.** Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species

extracts by HPLC with diode array detection. Journal of chromatographic science, 2008, 46, pp 150–156

9 Ulrich Kalusa, Alexandre Grigoroa, Oliver Kadeckib, Jan-Peter Jansenc, Holger Kieseewettera, Hartmut Radtkea, Cistus incanus (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study, Antiviral Research 84 (2009) 267–271

10 Cheikh-Affene, Z. B., Haouala, F., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Ksouri, R., & Harzallah- Skhiri, F.. Pomological description and chemical composition of rose hips gathered on four Rosa species section Caninae growing wild in Tunisia. International Journal of Agricultural Science and Technology 2013, 1, pp 43–50

11 Anna Dudra, Paulina Strugała, Katarzyna Pyrkosz-Biardzka, Zbigniew Sroka, Janina Gabrielska, a study on biological activity of the polyphenol Fraction from fruits of rosa rugosa thumb, Journal of food biochemistry, 2016, 40, pp 411-419

12 Chrubasik, C., Roufogalis, B. D., Muller-Ladner, U., & Chrubasik, S. A systematic review on the Rosa canina effect and efficacy profiles. Phytotherapy Research 2008, 22, pp 725–733.

13 Joanne Barnes, Linda A. Anderson, Simon Gibbons, J. David Phillipson, Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties, journal of pharmacy and pharmacology, 57: 929–954

14 Suwen Liu, Xuedong Chang, Xiufeng Liu, Zhanwei Shen, Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (Crataegus pinnatifida) drink, Food Chemistry 2016, 212, pp 87-95

15 P.Z. Liu, H. Kallio, D. Lu, C.S. Zhou, B. Yao Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (Crataegus spp.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry Food Chemistry, 127 (2011), pp. 1370–1377

-
- 16 St. John's Wort** **SILVANA LAWVERE, PH.D., and MARTIN C. MAHONEY, M.D., PH.D.** Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, 2002, pp 126-130, New York
- 17 Emily J. Hunt, Cynthia E. Lester, Elizabeth A. Lester, Randall L. Tackett**, Effect of St. John's wort on free radical production, *Life Sciences*, 2001, 69(2), pp 181-190
- 18 Kalamegam Gauthaman, , Adaikan P. Ganesan**, The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction – an evaluation using primates, rabbit and rat, *Phytomedicine*, Volume 15, Issues 1–2, 2008
- 19 Rune Slimestad, Kjell Torskangerpoll, Haavard S. Nateland, Tina Johannessen, Nils H. Giske**, Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*, Volume 18, Issue 1, 90-95, 2005
- 20 M.P. Kahkonen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen**, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999), pp. 3954–3962
- 21 Qiuyun Zhang, Weiwei Chen, Jianhua Zhao , Wanpeng Xi**, Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes, *Food chemistry*, 2016, 200, pp 230-236
- 22 Maja Mikulic-Petkovsek, , Ana Slatnar, Franci Stampar, Robert Veberic**, HPLC–MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species, *Food Chemistry*, Volume 135, Issue 4, 2012
- 23 Ramadan MF, Mörsel JT (2003)**. "Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (4), pp 969–74

-
- 24 Shioh Y. Wang , Hsin-Shan Lin,** Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, 48 (2), pp 140–146
- 25 Jules Beekwilder , Harry Jonker , Patrick Meesters , Robert D. Hall , Ingrid M. van der Meer , C. H. Ric de Vos,** Antioxidants in Raspberry: On-Line Analysis Links Antioxidant Activity to a Diversity of Individual Metabolites, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53 (9), pp 3313–3320
- 26 Eva M. Sánchez-Salcedo, Michele Tassott, Daniele Del Rio, Francisca Hernández, Juan José Martínez, Pedro Mena,** (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach, *Food Chemistry* 212 (2016) 250–255
- 27 Sánchez-Salcedo, E. M., Mena, P., García-Viguera, C., Hernández, F., & Martínez, J.** (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18, pp 1039–1047.
- 28 Sánchez-Salcedo, E. M., Mena, P., García-Viguera, C., Martínez, J. J., & Hernández, F.** Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12, 399–408.
- 29 Juana I. Mosele, Alba Macià, Mari-Paz Romero, María-José Motilva,** Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation, *Food Chemistry*, 2016, 201, pp 120–130
- 30 Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D.** *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties, *Molecules*, 2014, 19, pp 15799–15823
- 31 Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C ,** Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 2012, 47, 45–50.

-
- 32 Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R.,** Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 2013, 141, pp 3721–3730
- 33 Bianca Moldovan , Adriana Filip , Simona Clichici , Ramona Suharoschi , Pompei Bolfa, Luminita David,** Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects, *Journal of functional foods*, 2016, 26, pp 77-87
- 34 Moldovan, B., & David, L.,** Influence of temperature and preserving agents on the stability of Cornelian cherries anthocyanins. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. [electronic resource], 2014, 19, pp 8177–8188
- 35 Ioana Anamaria Sima & Costel Sarbu,** Evaluation of polyphenolic fingerprints and antioxidant profiles of wild fruits, *International Journal of Food Science and Technology* 2016, 51, pp 1433–1440
- 36. Primary and Secondary Metabolites:** Primary and secondary metabolites are often used in industrial microbiology for the production of food, amino acids, and antibiotics, *Industrial microbiology*.
- 37. Α.Βαλαβανίδης, Θ. Βλαχογιάννη, Κ. Φιωτάκης, Α. Ψωμάς , Α. Ζοβοίλη,** Φυτοχημικές ουσίες της διατροφής με αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση, Μηχανισμοί πρόληψης και αναστολής της καρκινογένεσης, *ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ*, 2007, 20, III, p.p. 98-109
- 38. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Bono, A.** Phytochemical antioxidants for health and medicine -A move towards nature, 2007, 1, p.p. 97-104
- 39. Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Saez-Plaza, P., Munoz, A. M., Jose Navas, M., & Asuero, A. G. ,** Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, 42(2), p.p. 102-125.

-
- 40. Acamovic, T., & Brooker, J. D.** Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2007, 64(3), p.p. 403-412
- 41. Athanasiadou S & Kyriazakis I,** Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004, 63, p.p. 631–639.
- 42 M.E. Pascual , K. Slowing , E. Carretero , D.Sánchez Mata , A.Villar,** Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review , *Journal of Ethnopharmacology* 2001, 76, p.p. 201–214
- 43. Acamovic, T., & Brooker, J. D.** Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2007, 64(3), p.p. 403-412
- 44. Michael Wink,** Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, *annual plant reviews*, 2 , p.p 2-11
- 45. Friedrich Constabel, Indra K.Vasil,** Cell Culture and somatic cell genetics of plants, *Cell Culture in Phytochemistry*, Τόμος 4 pp 17-34
- 46 Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Saez-Plaza, P., Munoz, A. M., Jose Navas, M., & Asuero, A. G. ,** Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, 42(2), p.p. 102-125.
- 47 Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H.,** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, 2007, pp. 1-372.
- 48. Özlem Tokus_oglu,** Fruit and Cereal Bioactives Sources, *Chemistry and Applications* , Clifford Hall III, pp 83-107
- 49. Ioana Ignat, Irina Volf, Valentin I. Popa:** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, 126, (4), 2011, Pages 1821–1835

-
- 50. Brenda Winkel-Shirley**, Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology, Department of Biology, Virginia Tech, 2001, pp 485-493
- 51. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A.**, Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(14), p.p. 1818–1892
- 52. Cesar G. Fraga**, Plant Phenolics And Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology, John Wiley & Sons Publications, 2010, pp 185-197
- 53 Estefanía Cordisco, Carla N. Haidar, Ezequiel R. Coscueta, Bibiana B. Nerli, Luciana P. Malpiedi**, Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems, *Food Chemistry*, 2016, 213, pp 514–520
- 54. Delmonte P , Rader JI**, Analysis of isoflavones in foods and dietary supplements. *Journal of AOAC International*, 2006, 89(4), pp 1138-1146.
- 55 Jing-Rong Cheng , Xue-Ming Liu , Zhi-Yi Chen, You-Sheng Zhang, Ye-Hui Zhang**, Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics, *Food Chemistry*, 2016, 213, pp 721-727
- 56. Antonia Chiou, Eirini A. Panagopoulou, Fotini Gatzali, Stephania De Marchi, Vaios T. Karathanos**, Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena), Laboratory of Chemistry, Department of Dietetics and Nutrition, Harokopio University, *Food Chemistry*, 2014, pp 146-157
- 57. Aron PM1, Kennedy JA**. Review Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008 ,52(1), pp 79-104
- 58. Naczki, M., & Shahidi, F.**, Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054(1-2), p.p. 95-111
- 59. Stalmach A, Edwards CA, Wightman JD, Crozier A**, Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012 , 56(3) p.p. 497-509

-
- 60. Langcake P, Pryce RJ**, A new class of phytoalexins from grapevines, *Experientia*. 1977, 15;33(2), p.p.51-2.
- 61 Giuseppina Marrazzo , Ignazio Barbagallo , Fabio Galvanoa, Michele Malaguarneraa, Diego Gazzolobc, Alessandro Frigiolac, Nicolantonio D’Oraziod & Giovanni Li Voltiac** Role of Dietary and Endogenous Antioxidants in Diabetes *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(12), pp 1599–1616
- 62. Μπόσκου Δ.**, καθηγητής Α.Π.Θ Χημεία τροφίμων, εκδόσεις Γαρταγάνη Θεσσαλονίκη, pp 235-239
- 63 Nedyalka V. Yanishlieva , Emma Marinova and Jan Pokorný**, Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, 108(9), pp 776-793
- 64 Jae-Min Kim , Seung-Hyun Choi , Gi-Hae Shin , Jin-Ha Lee , Seong-Ran Kang , Kyun-Young Lee , Ho-Soo Lim , Tae Seok Kang , Ok-Hwan Lee**, Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea, *Food Chemistry*, 2016, 213, pp 19-25
- 65 Pereira, X, & Federal, U.**, Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products *Phytochemicals as Nutraceuticals*, 2006, p.p.1-21.
- 66 . Patricia Garcia-Salas , Aranzazu Morales-Soto , Antonio Segura-Carretero and Alberto Fernández-Gutiérrez** Review Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and vegetables , *Molecules* 2010, 15(12) , pp 8813-8826
- 67. Biesaga, M.**, Influence of extraction methods on stability of flavonoids, *Journal of Chromatography A* , 2011, 1218, p.p. 2505–2512.
- 68 . Cristina Mahugo Santana, Zoraida Sosa Ferrera, M. Esther Torres Padrón and José Juan Santana Rodríguez**, Review Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches *Molecules*, 2009, 14, p.p. 298-320
- 69 .Lutria, D.L.**, Application of green chemistry principles for extraction of polylipids and phenolic compounds, *Indian Journal of Chemistry*, 2006, 45, p.p. 2291–2296

70 .Wang, L.; Weller, C.L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17,p.p. 300–312.

71. Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, T., Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8, p.p. 137–142

72. Vinatoru, M., An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8, p.p. 303–313.

73. Soumen Dey, Virendra K. Rathod, Ultrasound assisted extraction of b-carotene from *Spirulina platensis*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20, p.p. 271–276

74. Craft, B.D. et al., Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11(2), pp.148- 173

75. Nikolaos Nenadis and Maria Tsimidou, Observations on the Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using Rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) Tests, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002, 79(12) p.p.1191-1195

76. Brand Williams, M.ECuvelier and C Berset, Use of a free radical method to evaluate the antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 1995,28(1), p.p. 25-30

77 Tomoko Yamaguchi, Hitoshi Takamura, Teruyoshi Matoba, Junji Teraoc HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 62, Issue 6, 1998

78 Adrian A. Ammann, Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *journal of mass spectrometry*,2007(42), pp 419-427

79 Simon M. Nelms, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, 2009, pp 1-25

80 Μπαλατσούρας Γ. , Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα (2006) 255,261

-
- 81 Klich M.A. & Pitt J.I.**, Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs, North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Science and Technology(1988) 1-116
- 82 Gourama H. & Bullerman L.B.**, *A.flavus* and *A.parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds, *Journal of Food Protection*, 1995, 58(12) , pp 1395- 1404
- 83 Abarca ML1, Accensi F, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ**, *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market, *J Food Prot.*(2003) Mar;66(3):504-6
- 84 Hudson H**, *Fungal biology*, Edward Arnold London, 1986, pp 53-6
- 85 Cryssa Tzanidi, Charalampos Proestos, Panagiota Markaki**, Saffron (*Crocus sativus* L.) Inhibits Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus parasiticus*, *Advances in Microbiology*, 2012, 2, pp 310-316
- 86 Roidaki A, Zoumpoulakis PG and Proestos C**, Comparison of Extraction Methods for the Determination of Antioxidant Activity in Extracts of *Hippophae Rhamnoides* L. and *Lippia Citriodora*. The Effect of Seasonal Collection, 2015, *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(1), pp 1057(1-8)
- 87 Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, E., Rodríguez, J. A., Andrés Galán-Vidal, C.**. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 2009, 113, pp 859–871.
- 88. Jean Albert Michiels, Claire Keversb, Joel Pincemailc, Jean Olivier Defraignec, Jacques Dommesb**, Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices, *Food Chemistry*, 2012, 130 (4), p.p. 986–993
- 89. Ruth Martínez a, Paulina Torres a, Miguel A. Meneses a, Jorge G. Figueroa a, José A. Pérez-Álvarez b, Manuel Viuda-Martos**, Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate, *Food Chemistry*, 2012, 135, p.p. 1520–1526
- 90. Om P. Sharma, Tej K. Bhat**, DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 2009, 113(4), p.p. 1202–1205

-
- 91 Robert Veberic, Ana Slatnar, Jan Bizjak, Franci Stampar, Maja Mikulic-Petkovsek**, Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry Species, Food Science and Technology, 2015,60, p.p.509-517
- 92 Jungmin Lee**, Rosaceae products: Anthocyanin quality and comparisons between dietary supplements and foods, NFS Journal, 2016, 4,p.p 1–8
- 93 Alicja Z. Kucharska , Antoni Szumny , Anna Sokołowska , Narcyz Piorecki, Svitlana V. Klymenko**, Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (Cornus mas L.) cultivars, Journal of Food Composition and Analysis,2015 (40) p.p. 95–102
- 94 wiesław wickowski,* ewa romaszko, and mariusz k. Piskula**, Bioavailability of Cyanidin Glycosides from Natural Chokeberry (Aronia melanocarpa) Juice with Dietary-Relevant Dose of Anthocyanins in Humans,Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58, p.p. 12130–12136
- 95 Nick Kalogeropoulos, Konstantina Yannakopoulou , Aristeia Gioxari, Antonia Chiou ,Dimitris P. Makris**, Polyphenol characterization and encapsulation in b-cyclodextrin of a flavonoid-rich Hypericum perforatum (St John's wort) extract, Food Science and Technology 43 (2010) 882–889
- 96 USDA National Nutrient Database for Standard Reference**
- 97 Ευρωπαϊκή οδηγία EE 1881/2006 και EE 1005/2015.**