



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Τομέας Φαρμακογνώσιας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιοποίηση των σπερμάτων του φυτού *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΠΑΠΑΔΗΜΑ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης:

Απομόνωση-Ανάπτυξη-Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας:

«Αξιοποίηση των σπερμάτων του φυτού *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων».

Φοιτήτρια:

Παπαδήμα Κωνσταντίνα

A.M: 1415-12

Επιβλέπων Καθηγητής:

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

“hay unos árboles en esta tierra que llaman nopalli, quiere decir tunal, ó árbol que lleva tunas; es monstruoso este árbol, el tronco se compone de las hojas y las ramas se hacen de las mismas hojas; las hojas son anchas y gruesas, tiene mucho zumo y son viscosas; tienen espinas las mismas hojas. La fruta que en estos árboles se hace, se llama tuna... son de buen comer; es fruta preciada...las hojas de este árbol comen las crudas y cocidas. En unos árboles de estos se dan tunas que son amarillas por dentro, otros las dan que por dentro son coloradas, o rosadas, y éstas son de muy buen comer; otros árboles de estos hay que tienen en las hojas vetas coloradas, y las tunas que se hacen de estas son por fuera y por dentro moradas...”.

Fray Bernardino de Sahagún *Historia General de la Nueva España*
(Velásquez, 1998 citado por Sáenz et al. 2006).



“A la izquierda de la colina, una hermosa ave con las alas extendidas se ha posado sobre un nopal y canta, según su pico abierto lo indica. Una gran serpiente de lengua bífida se levanta en dirección de la planta...”

“Así, el *tenochtli*, o *nopal* de *tunas* rojas, fue desde el principio, el árbol de los corazones humanos. La serpiente que emerge desde las entrañas de la tierra es la noche; el ave que canta sobre el nopal es el águila-sol...”

Gutierre Tibon *Historia del Nombre y de la Fundación de México*, 1993

*Αφιερωμένο στους γονείς μου Βαγγέλη, Κατερίνα
και στις αδερφές μου Ράνια, Χρύσα*

Ευχαριστίες

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη για την ανάθεση του πολύ ενδιαφέροντος θέματος, τη συνεργασία μας, την καθοδήγηση καθώς επίσης και για την κατανόηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Το Δρ. Νικόλαο Τσαφαντάκη για την ακούραστη καθοδήγησή του, την υπομονή του, την απλόχερη μετάδοση γνώσεων, την άψογη συνεργασία, το πάθος που επιδεικνύει στη δουλειά του, τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς για τις πολύ εποικοδομητικές συζητήσεις που μου έδιναν δύναμη να συνεχίσω.

Τη Δρ. Ειρήνη Μπαϊρα για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας.

Τη Δρ. Σταυρούλα Μαμούχα και την υποψήφια διδάκτορα κα Κατερίνα Γεωργουσάκη για τη διεξαγωγή των βιοδοκιμών.

Τον Παναγιώτη Γερολυμάτο για τις πολύτιμες συμβουλές του στη χρήση της τεχνικής FCPC καθώς και την ενδιαφέρουσα ανταλλαγή απόψεων.

Τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Λίνα Κοσμοπούλου για τη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές στο εργαστήριο για τη βοήθεια τους, τους φίλους που απέκτησα και το κλίμα συνεργασίας που αναπτύχθηκε εντός και εκτός του εργαστηρίου.

Τα φιλαράκια μου Μυρτώ, Τέα, Νίκο, Εύη, Βίκυ για την αγάπη τους, τις συμβουλές τους και την στήριξή τους.

Την οικογένειά μου, τους γονείς μου Βαγγέλη και Κατερίνα και τις αδερφές μου Ράνια, Χρύσα για την αγάπη τους, τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και την υπομονή τους.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vi
ABSTRACT.....	vii
A. Γενικό Μέρος.....	5
Σκοπός της Εργασίας.....	5
A.1 Εισαγωγή	6
A.2 Οικογένεια Cactaceae	7
A.2.1 Ταξινόμική Κατάταξη, Γεωγραφική Εξάπλωση & Βοτανικά Χαρακτηριστικά	7
A.2.2 Ανατομία και Βιοχημεία της οικογένειας.....	8
A.3 Το γένος <i>Opuntia</i> & το είδος <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Mill.	10
A.3.1 Ιστορικά στοιχεία, Καταγωγή, Εξημέρωση και Γεωγραφική Κατανομή	10
A.3.3 Αναπαραγωγή και Σπέρματα.....	14
A.3.4 Οικολογία και Οικονομική σημασία	15
A.3.5 Κύριες Χημικές Κατηγορίες.....	16
A.4 Μεταβολικό προφίλ της <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.....	18
A.4.1 Φαινολικά	18
A.4.2 Μπεταλαΐνες	27
A.5 Χημικό προφίλ των σπερμάτων της <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	29
A.7 Χρήσεις και Βιολογικές Δράσεις της <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	31
A.7.1 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Χρήσεις της <i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill.	31
B. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΥΛΙΚΑ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	37
B.1	37
B.1.1 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπέρηχους (UltraSound-Assisted Extraction-USAE)	37

B.1.2 Προσρόφηση σε ρητίνη Amberlite XAD-4	37
B.1.3 Αναλυτικές Χρωματογραφικές Μέθοδοι.....	38
B.1.4 Παρασκευαστικές Χρωματογραφικές Μέθοδοι.....	39
B.1.5 Φασματοσκοπικές Μέθοδοι.....	40
B.2 <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.....	45
B.2.1. Τυνησιακό και Ελληνικό προφίλ εκχυλίσματος	45
B.2.2. Εκχύλιση και Απολίπανση.....	46
B.3 Φυτοχημική Ανάλυση.....	47
B.3.1. Κλασμάτωση με Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (FCPC).....	47
B.3.3 FCPC/2.....	51
B.4 Βιολογικές Δοκιμές.....	54
B.5 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών.....	55
Γ. Αποτελέσματα-Συζήτηση	57
Γ.1 Φασματοσκοπικά & Φασματομετρικά Δεδομένα των Δευτερογενών Μεταβολιτών του Σπερμάτων του Φυτού <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	58
Γ.2 Βιολογικές δοκιμές στα ταυτοποιημένα μόρια	93
Γ.3 Συμπεράσματα	95
Δ. Βιβλιογραφία.....	101

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Opuntia ficus-indica* είναι ένα εξημερωμένο είδος κάκτου και αποτελεί σημαντικό εμπορικά φυτό για τις περισσότερες άνυδρες και ημιάνυδρες περιοχές του κόσμου. Στην Ελλάδα απαντάται κυρίως ως αυτοφυής θάμνος στις νότιες και νησιωτικές περιοχές, όπου το κλίμα είναι κυρίως ξηροθερμικό. Χρησιμοποιείται κυρίως για τους καρπούς της αλλά και τα κλαδώδιά της (κυρίως στο Μεξικό) ενώ τα σπέρματα αποτελούσαν μέχρι πολύ πρόσφατα ανεκμετάλλευτος φυτικός ιστός. Σήμερα, από τα σπέρματα γίνεται εξαγωγή του πλούσιου ελαίου και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των καλλυντικών λόγω του υψηλού ποσοστού του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Η δυνατότητα εκμετάλλευσης των σπερμάτων του φυτού είναι μεγάλη καθότι έρευνες έχουν αποδείξει ότι είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά (εξαιτίας των φαινολικών ενώσεων).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους (UAE) σε αρχικό δείγμα 550g σπερμάτων ελληνικής ποικιλίας *O. ficus-indica*. Ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος με χρήση χρωματογραφικών τεχνικών (TLC και HPLC) τόσο του υδροαλκοολικού (EtOH:H₂O) όσο και του εκχυλίσματος εξανίου των σπερμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός (αφαίρεση των σακχάρων) του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος με τη χρήση ρητίνης **XAD-4** και κλασμάτωση με Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (FCPC). Τα εκχυλίσματα καθώς επίσης και τα κλάσματα, ελέγχθηκαν για την αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και λευκαντική τους δράση με: τη μέθοδο DPPH, Kirby-Bauer και παρεμπόδισης του ενζύμου τυροσινάση. Η πορεία της εργασίας κατευθύνθηκε προς την απομόνωση των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος με τη χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (**preparative-HPTLC**). Η ταυτοποίηση των μορίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR 1D και 2D (¹H-NMR, **HSQC-DEPT**, **HMBC** και **COSY**). Τέλος, οι μεταβολίτες ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και λευκαντική τους δράση και επιβεβαιώθηκε η αρχική βιοκατευθυνόμενη απομόνωσή τους.

Συνολικά απομονώθηκαν **8 μεταβολίτες**: 4 διϋδροβενζο[b]φουρανικά νεολιγνάνια, 2 γλυκοσυλιωμένα παράγωγα του φερουλικού οξέος, 1 γλυκοσυλιωμένο παράγωγο του σιναπικού οξέος και 1 γλυκοσυλιωμένο της κωνιφεραλκοόλης. Τέλος, 4 απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τα σπέρματα του φυτού ενώ 2 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

ABSTRACT

Opuntia ficus-indica is a domesticated species of cactus and constitutes a plant of commercial importance in most arid and semi-arid areas of the world. In Greece it is found mainly as a native plant in southern areas and islands, where the climate is mostly xerothermic. It is used mainly for its fruits and cladodes (particularly in Mexico), while its seeds constituted an untapped plant resource/tissue until very recently. Today the seeds are utilized for the extraction of rich oil, which is used in the cosmetics industry due to the seeds' high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The seeds of this plant offer a high potential for exploitation, since research has proven that they are rich in antioxidants (due to phenolic compounds).

In the present research ultra sound assisted extraction (USAE) was conducted in an initial sample of 550g of seeds of a Greek variety, followed by quality control with the use of chromatographic methods (TLC and HPLC) both of the hydroalcoholic solution (EtOH:H₂O) and the hexane extraction. Following that, enrichment (sugar elimination) of the hydroalcoholic solution was conducted with the use of resin XAD-4, as well as fractionation with the use of Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). Both the extracts and fractions were tested for antioxidant, antimicrobial and bleaching activity with the use of the DPPH method, Kirby-Bauer and tyrosinase enzyme inhibition. The research then focused on the isolation of main secondary metabolites of the hydroalcoholic solution, which appeared with the use of thin-layer preparative high-performance liquid chromatography (preparative- HPTLC). The identification of molecules was achieved with the use of NMR 1 and 2D spectroscopy (¹H-NMR, HSQC-DEPT, HMBC and COSY). Finally, the metabolites were tested for their antioxidant and bleaching activity and their initial bio-assay guided isolation was confirmed.

In total, 8 metabolites were isolated: 4 dihydrobenzo[*b*]furan neolignans, 2 ferulic acid glucosides, 1 sinapic acid glucoside and 1 coniferyl glucoside. Finally, 4 metabolites were isolated for the first time from the seeds of *Opuntia ficus-indica*, while 2 constitute new natural products.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CHCl ₃	Chloroform
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Centrifugal Partition Chromatography
CP	Cactus Polysaccharides
DCG	DihydrodiConiferyl alcohol-4-β-D-Glucoside
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Ethanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IUCN	International Union for Conservation of Nature
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
TLC	Thin-Layer Chromatography
USAE	UltraSound Assisted Extraction

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

Γράφημα

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Γράφημα 1	Συγκριτική απεικόνιση της δράσης (IC50) του γαλλικού οξέος (πρότυπος αναστολέας) και της αμερικανίνης A	94

Εικόνες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Εικόνα 1	Προσαρμογή φωτοσύνθεσης CAM φυτών (Thomas B. <i>et al.</i> , 2016)	9
Εικόνα 2	Ίδρυση της <i>Tenochtitlán</i> , Codex Méndoz	10
Εικόνα 3	Άνθρωπος που συλλέγει <i>tunas</i> από <i>nopál</i> , Codex Florentino	10
Εικόνα 4	Γεωγραφική εξάπλωση •: Παρόν, •: Διαδεδομένο, •: Περιστασιακό ή μερικές αναφορές, •: Εντοπισμένο (http://www.cabi.org)	11
Εικόνα 5	Τυπική μορφολογία του φυτού <i>Opuntia ficus-indica</i>	12
Εικόνα 6	A: άτομο, B: κλαδώδιο, C: αρέολα κλαδωδίου, D: άνθος, E: areola άνθους, F: διαμήκης τομή άνθους, G: καρπός, H: πλευρική άποψη σπέρματος, I: εμπρόσθια άποψη σπέρματος (Reyes-Agüero J.A. <i>et al.</i> , 2005)	13
Εικόνα 7	(a) καρπός της <i>Opuntia ficus-indica</i> , (b) διαμήκης διατομή σπέρματος (Habibi Y. <i>et al.</i> , 2007)	15
Εικόνα 8	Μηχανισμός προσρόφησης XAD-4	37
Εικόνα 9	CAMAG TLC Visualizer	38
Εικόνα 10	CAMAG Linomat 5	39
Εικόνα 11	Τυπική εικόνα ενός FCPC (Marchal <i>et al.</i> , 2003)	39
Εικόνα 12	Φασματογράφος στα 600 MHz	40
Εικόνα 13	Φασματογράφος LTQ-Orbitrap	40
Εικόνα 14	Συγκριτικό χημικό προφίλ καρπών, κλαδωδίων και σπερμάτων τυνησιακής ποικιλίας	45
Εικόνα 15	Συγκριτικό χημικό προφίλ των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων σπερμάτων ελληνικής και τυνησιακής ποικιλίας με χρήση HPLC	45
Εικόνα 16	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (254nm)	48
Εικόνα 17	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (366nm)	49
Εικόνα 18	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (ορατό)	49
Εικόνα 19	Σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ (KPOFI/2:KPOFI/2 XAD-4:Waste)	51
Εικόνα 20	Σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ (KPOFI/3:KPOFI/4:Waste)	51
Εικόνα 21	Παρουσίαση των αρχικών συνενωμένων κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (254nm, 366nm, ορατό). Ανάπτυξη σε 10% MeOH	52
Εικόνα 22	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (254nm). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O)	52
Εικόνα 23	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (366nm). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O)	52
Εικόνα 24	Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (ορατό). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O)	52
Εικόνα 25	KPOFI/5	56
Εικόνα 26	KPOFI/6	56
Εικόνα 27	KPOFI/7	56
Εικόνα 28	KPOFI/8	56
Εικόνα 29	KPOFI/9	56
Εικόνα 30	KPOFI/10 και KPOFI/11	56
Εικόνα 31	KPOFI/12	56
Εικόνα 32	KPOFI/13	56
Εικόνα 33	KPOFI/14	56
Εικόνα 34	KPOFI/15	56
Εικόνα 35	Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 1	59
Εικόνα 36	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 1	59
Εικόνα 37	Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)	61
Εικόνα 38	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)	61
Εικόνα 39	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)	62
Εικόνα 40	Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 2	64

Εικόνα 41	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 2	65
Εικόνα 42	Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)	67
Εικόνα 43	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)	67
Εικόνα 44	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)	67
Εικόνα 45	Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 3	69
Εικόνα 46	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 3	70
Εικόνα 47	Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)	70
Εικόνα 48	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)	72
Εικόνα 49	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)	72
Εικόνα 50	Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 4	73
Εικόνα 51	Φάσμα ¹ H-NMR του φαινολοξέος στην αρωματική περιοχή	74
Εικόνα 52	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 4	75
Εικόνα 53	Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)	75
Εικόνα 54	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)	77
Εικόνα 55	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)	77
Εικόνα 56	Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 5	78
Εικόνα 57	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 5	79
Εικόνα 58	Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων ¹ H-NMR των μεταβολιτών 4 (FCPC/1 και FCPC/2) και 5	80
Εικόνα 59	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1)	81
Εικόνα 60	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1)	81
Εικόνα 61	Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 6	82
Εικόνα 62	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 6	83
Εικόνα 63	Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)	84
Εικόνα 64	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)	84
Εικόνα 65	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)	85
Εικόνα 66	Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 7	86
Εικόνα 67	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 7	87
Εικόνα 68	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1)	88
Εικόνα 69	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1)	88
Εικόνα 70	Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 8	90
Εικόνα 71	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 8	91
Εικόνα 72	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2)	92
Εικόνα 73	Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2)	

Πίνακες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Πίνακα 1	Ταξινομική κατάταξη της <i>Opuntia ficus-indica</i>	12
Πίνακα 2	Συνοπτικός πίνακας των οργανικών οξέων της <i>Opuntia ficus-indica</i>	17
Πίνακα 3	Κύριες χημικές κατηγορίες του γένους <i>Opuntia</i>	18
Πίνακα 4	Φαινολικά οξέα του καρπού	20
Πίνακα 5	Γλυκοσίδες φλαβονοειδών του φυτού <i>O.ficus-indica</i>	22
Πίνακα 6	Κυριότερα φλαβονοειδή στους διάφορους φυτικούς ιστούς της <i>O. ficus-indica</i>	23
Πίνακα 7	Μπεταλαΐνες της <i>O. ficus-indica</i>	28
Πίνακα 8	Φυτοστερόλες της <i>O. ficus-indica</i>	28
Πίνακα 9	Τα σημαντικότερα συστατικά ανά φυτικό ιστό (El-Mostafa K. <i>et al.</i> , 2014)	30
Πίνακα 10	Συστήματα διαλυτών για FCPC/1	47
Πίνακα 11	Αριθμός κλασμάτων ανά σύστημα διαλυτών	48
Πίνακα 12	Συγκεντρωτικός πίνακας 1 ^{ης} FCPC:συνενώσεις, βάρη και παρατηρήσεις	50
Πίνακα 13	Αποτελέσματα προσρόφησης σε XAD-4 σε μικρή και μεγάλη κλίμακα	51
Πίνακα 14	Συγκεντρωτικός πίνακας 2 ^{ης} FCPC: συνενώσεις, βάρη και παρατηρήσεις	53
Πίνακα 15	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών: μέθοδος DPPH και αντι-τυροσινάσης	54
Πίνακα 16	Συγκεντρωτικός πίνακας με τα τελικά βάρη από τις prep-TLC (με πράσινο: κύριος μεταβολίτης)	56
Πίνακας 17	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)	60
Πίνακας 18	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)	66
Πίνακας 19	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)	71
Πίνακας 20	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)	76
Πίνακας 21	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1)	80

Πίνακας 22	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)	84
Πίνακας 23	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1)	87
Πίνακας 24	Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2)	90
Πίνακας 25	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών στους ταυτοποιημένους μεταβολίτες	93
Πίνακας 26	Ποσοστό αναστολής της τυροσινάσης από την αμερικανίνη Α σε διάφορες συγκεντρώσεις	94
Πίνακας 27	Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες της <i>O. ficus indica</i> (με έντονο χρώμα παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν για πρώτη φορά στο φυτό)	99

Σχήματα

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Σχήμα 1	Πισιδικό οξύ	21
Σχήμα 2	Ευκομικό οξύ	21
Σχήμα 3	Χλωρογενικό οξύ	21
Σχήμα 4	Λιγνάνια	24
Σχήμα 5	Λιγνανολίδια	24
Σχήμα 6	Μονοεποξυλιγνάνια	24
Σχήμα 7	Δισεπολιγνάνια	24
Σχήμα 8	Τετραϋδروναφθαλίνη	24
Σχήμα 9	Ναφθαλίνη	24
Σχήμα 10	7S,8S-πρινσεπίνη	25
Σχήμα 11	7S,8S-ισοπρινσεπίνη	25
Σχήμα 12	3,3'-δισδεμεθυλοπινορεσινόλη	25
Σχήμα 13	Συμπυκνωμένη ταννίνη (κατεχίνη+επικατεχίνη)	26
Σχήμα 14	Υδρολύομενη ταννίνη	26
Σχήμα 15	Φλωροταννίνη	26
Σχήμα 16	Βετακυανίνες	27
Σχήμα 17	Βεταξανθίνες	27
Σχήμα 18	Ιντικαξανθίνη	27
Σχήμα 19	β-Σιτοστερόλη	28
Σχήμα 20	Μηχανισμός αντίδρασης DPPH με αντιοξειδωτικό παράγοντα	41
Σχήμα 21	Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης	42
Σχήμα 22	Μεταβολίτης 1 (KPOFI/6_1)	58
Σχήμα 23	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 1	62
Σχήμα 24	Σχηματισμός της διϋδροδικονιφερυλικής αλκοόλης μέσω διμερισμού	63
Σχήμα 25	Μεταβολίτης 2 (KPOFI/7_1)	63
Σχήμα 26	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 2	66
Σχήμα 27	Μεταβολίτης 3 (KPOFI/7_2)	68
Σχήμα 28	Μεταβολίτης 4 (KPOFI/10_1)	73
Σχήμα 29	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 4	76
Σχήμα 30	Μεταβολίτης 5 (KPOFI/13_1)	78
Σχήμα 31	Μεταβολίτης 6 (KPOFI/14_1)	82
Σχήμα 32	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 6	85
Σχήμα 33	Μεταβολίτης 7 (KPOFI/15_1)	86
Σχήμα 34	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 7	89
Σχήμα 35	Μεταβολίτης 8 (KPOFI/15_2)	89
Σχήμα 36	HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 8	91

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Γενικό Μέρος

Σκοπός της Εργασίας

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο πλαίσιο των ερευνητικών δραστηριοτήτων για την αξιοποίηση παραπροϊόντων από τη βιομηχανία αγροδιατροφής. Στόχος της πειραματικής διαδικασίας ήταν η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τα σπέρματα του φυτού *Opuntia ficus-indica* και τελικά η αξιοποίηση των σπερμάτων του φυτού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρόλο που το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από φυλές ιθαγενών της Κεντρικής και Νότιας Λατινικής Αμερικής, εξακολουθεί να είναι ένα είδος που δεν έχει πλήρως μελετηθεί. Επιπλέον, εξαιτίας της υψηλής προσαρμοστικότητάς του τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να ενταχθεί (εν μέρει έχει επιτευχθεί) στις εναλλακτικές καλλιέργειες της Ελλάδας, επομένως η συμβολή της παρούσας φυτοχημικής μελέτης των σπερμάτων του είδους είναι σημαντική.

A.1 Εισαγωγή

Οι ποσότητες αποβλήτων που παράγονται παγκόσμια ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών από τις βιομηχανίες τροφίμων και χυμοποιίας είναι τεράστιες. Μόνο στην Ευρώπη, υπολογίζεται ότι ξεπερνούν τα 190 εκατομμύρια τόνους ετησίως και είναι υπεύθυνα για το 20-30% των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν οι βιομηχανικές χώρες. **Απόβλητα** θεωρούνται οι απορριπτόμενες φλούδες φρούτων και λαχανικών, σπέρματα, πυρήνες, ή και ολόκληρα κομμάτια φυτικών ιστών, εφόσον αυτά δεν χρησιμοποιούνται. Εάν τα απόβλητα αυτά προορίζονται για περαιτέρω χρήση, τότε θεωρούνται **παραπροϊόντα** επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών (De Ancos B. *et al.*, 2015). Επομένως, η αξιοποίηση των παραπροϊόντων αποτελεί σημαντική επιστημονική πρόκληση από οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική σκοπιά.

Στην παρούσα εργασία μελετώνται τα σπέρματα της *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Η *O. ficus-indica* είναι ένα φυτό με υψηλή προσαρμοστικότητα που αναπτύσσεται σε ξηρές και ημίξηρες περιοχές της γης. Το Μεξικό φιλοξενεί τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών του γένους *Opuntia* ενώ η καλλιεργούμενη έκταση που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, μόνο στο Μεξικό, αγγίζει τα 10.000 εκτάρια. Η ετήσια παραγωγή μπορεί να φτάσει τους 50 τόνους ξηρού φυτικού υλικού ανά εκτάριο και η κατανάλωση στο Μεξικό υπολογίζεται σε 17g ανά άτομο ημερησίως (Bensadón S. *et al.*, 2010). Η κατανάλωση δεν περιορίζεται μόνο στο πλαίσιο του τροφίμου για τον άνθρωπο (κλαδώδια, καρπός) αλλά χρησιμοποιείται και ως φαρμακευτικό φυτό, κτηνοτροφή κ.ά..

Ως παραπροϊόντα για το φυτό θεωρούνται τα αγκάθια, ένα μεγάλο ποσοστό των γλωχιδίων, τα σπέρματα κ.ά. και υπολογίζονται σε ποσοστό 20%-45% του καθαρού βάρους των κλαδώδιων και των καρπών. Σήμερα, από τα σπέρματα, εξάγεται το έλαιο το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των καλλυντικών. Συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι, προηγούμενες φυτοχημικές μελέτες στα κλαδώδια και τα φρούτα του φυτού, κατέδειξαν υψηλή διατροφική αξία αλλά και αντιοξειδωτική δράση, μένει να απαντηθεί το ερώτημα εάν και κατά πόσο μπορεί να αξιοποιηθεί το επεξεργασμένο παραπροϊόν των σπερμάτων του φυτού.

Μορφολογικά, η *O. ficus-indica* είναι ένα φυτό που ανήκει στην κατηγορία των παχύφυτων. **Παχύφυτα** είναι ένας γενικός όρος που καλύπτει ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών με χαρακτηριστικά διογκωμένα βλαστικά τμήματα (παχιά σαρκώδη φυτικά όργανα) και είναι οποιοδήποτε φυτό διαθέτει τουλάχιστον έναν ιστό που μπορεί να αποθηκεύει νερό, γεγονός που καθιστά το φυτό προσαρμόσιμο σε καταστάσεις λειψυδρίας. Οι **κάκτοι** είναι παχύφυτα (παχύφυτα βλαστού) αλλά όλα τα παχύφυτα δεν είναι κάκτοι. Η λέξη κάκτος είναι αρχαία ελληνική και την ανέφερε για πρώτη φορά ο Θεόφραστος στο βιβλίο του “Περί φυτών” και εννοούσε το φυτό αγκινάρα που σημαίνει φυτό με αιχμηρές ακίδες. Η *O. ficus-indica* είναι ένας κάκτος. Παρακάτω δίνεται μια λεπτομερέστερη βοτανική και φυτοχημική περιγραφή του φυτού.

A.2 Οικογένεια Cactaceae

A.2.1 Ταξινόμική Κατάταξη, Γεωγραφική Εξάπλωση & Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Το 30% της παγκόσμιας ηπειρωτικής επιφάνειας καλύπτεται από ξηρές και ημίξηρες περιοχές και οι πιο αντιπροσωπευτικές οικογένειες που απαντώνται σε αυτές είναι οι ακόλουθες Asclepiadaceae, Aloaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae and Zygophyllaceae. Η πιο σημαντική από αυτές είναι η οικογένεια Cactaceae εξαιτίας των εκτεταμένων και ιδιόμορφων προσαρμογών της σε καταστάσεις λειψυδρίας.

Πρόκειται για μια από τις πιο γνωστές, εύκολα αναγνωρίσιμες και μορφολογικά διακριτές οικογένειες. Περιλαμβάνει περί τα 1600 είδη ενώ απαντάται από το δυτικό έως το νότιο Καναδά μέχρι την Παταγονία στη Χιλή αλλά και στην Αργεντινή. Η οικογένεια Cactaceae ανήκει στην τάξη Caryophyllales η οποία περιλαμβάνει μεταξύ άλλων, τις πορτουλάκες (Portulacaceae), τα γαρύφαλλα (Caryophyllaceae), τις βουκαμβίλιες (Nyctaginaceae), τους αμάραντους (Amaranthaceae) και φυτά της οικογένειας Chenopodiaceae. Η οικογένεια διαιρείται στις τρεις ακόλουθες υποοικογένειες: Pereskioideae, Opuntioideae και Cactoideae. Παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι μέλη της υποοικογένειας Opuntioideae βρίσκονται και στα δύο άκρα του γεωγραφικού πλάτους, η *Opuntia fragilis* στο βορά και τα *Maihueniopsis darwinii*, *Maihuenia patagonica*, *Pterocactus australis* στο νότο (Nobel P.S., 2002).

Αποτελείται από πολυετή παχύφυτα με στελέχη κιονοειδή, κυλινδρικά ή πεπλατυσμένα, συχνά αρθρωτά. Τα φύλλα απουσιάζουν ή είναι μικρά, οβελοειδή. Κλαδιά, αγκάθια, άνθη και μερικές φορές γλωχίδια αναπτύσσονται λιγότερο ή περισσότερο κυκλικά, δομές με μορφή σαν μαξιλάρι (areoles) βρίσκονται στις μασχάλες των φύλλων όταν αυτά δεν απουσιάζουν. Άνθη ερμαφρόδιτα, μονήρη, άμισχα. Καρπός ράγα (berry), συχνά αγκαθωτός ή με γλωχίδια, συχνά με πολλά σπέρματα (Tutin T.G. et al., 1964).

Τα φυτά επιδεικνύουν μεγάλη ποικιλομορφία από κανονικά δέντρα (*Pereskia* sp.) έως μεγάλα δενδροειδή Opuntioids (*Opuntia* sp.) και κιονοειδείς κάκτοι έως αναρριχητικά παχύφυτα (*Acanthocereus*, *Harrisia*, *Rathbunia*), κοντούς μέχρι αραιά κλαδωτούς θάμνους (*Echinocereus*, *Haageocereus*) και μη κλαδωτές κυλινδρικές-στρογγυλες μορφές (*Eriosyce*, *Mammillaria*) αλλά και γεώφυτα (*Pterocactus*) (Tutin T.G. et al., 1964).

Ουσιαστικά, η **μορφολογία των κάκτων** είναι όμοια με εκείνη των υπολοίπων φυτών που αναπαράγονται με σπέρματα: ο βλαστός αποτελείται από μεσογονάτια διαστήματα, κόμβους από τους οποίους αναπτύσσονται τα φύλλα (αν και τα φύλλα είναι φύλλα primordia-υποτυπώδη σε όλα τα Cactoideae) και βοηθητικοί κάλυκες (areoles). Το πιο σημαντικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό των κάκτων που αποτελεί ξεχωριστή οικογένεια και ουσιαστικά τους διαχωρίζει από τα υπόλοιπα παχύφυτα, είναι οι αρέολες (**areoles** = μικρή, ανατομική δομή, εξωτερικά του (φωτοσυνθετικού) βλαστού από την οποία εκφύονται τα τροποποιημένα φύλλα του φυτικού είδους). Όλοι οι κάκτοι, ανεξάρτητα από το σχήμα και το μέγεθός τους αναπτύσσουν αυτόν τον ιδιόμορφο ακραίο οφθαλμό, την αρέολα. Σε ορισμένα είδη δεν είναι εμφανής και συνήθως μοιάζει με ένα στρογγυλό ή μακρουλό εξόγκωμα που αποτελείται από ένα πυκνό χνούδι ή από σκληρά τριχίδια. Σε ορισμένα είδη όπως είναι η *Opuntia*, τα τριχίδια είναι οξύτατα, πολύ λεπτά και ξεκολλούν εύκολα από το φυτό μ' ένα άγγιγμα του χεριού. Αν τα τριχίδια αυτά έρθουν σε επαφή με το δέρμα, μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό. Στην πραγματικότητα η αρέολα

περιλαμβάνει δύο σημεία έκπτυξης, που συχνά είναι τοποθετημένα τόσο κοντά, ώστε να μοιάζουν με ένα. Η αρέολα εκπτύσσει τα αγκάθια (τις αιχμηρές ακίδες) από το κάτω μέρος και τον ανθοφόρο οφθαλμό από τα “κλαδιά” στο πάνω μέρος. Το άνθος τους βρίσκεται πάντα πάνω από την ωοθήκη.

Προφανώς, οι αρέολες έχουν εξελιχθεί ως αποτυχημένοι μασχαλιαίοι οφθαλμοί ενώ τα αγκάθια τους ως υποτυπώδη φύλλα. Σε κάκτους με διακλαδώσεις (κλαδώδια), όπως αυτοί της υπο-οικογένειας *Opuntioideae* και στους *saguaro*, καινούργιοι κλάδοι αναπτύσσονται από αρέολες επειδή εκεί υπάρχουν οι οφθαλμοί. Γενικά, η ανάπτυξη της αρέολας φαίνεται ότι έπαιξε σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των κάκτων σε ερημικά οικοσυστήματα.

Οι κάκτοι φύονται σε μια ποικιλομορφία βιότοπων που κυμαίνονται από το τροπικό δάσος ως την εξαιρετικά ξηρή έρημο Ατακάμα της Χιλής. Οι περισσότερες περιοχές που αναπτύσσονται οι κάκτοι έχουν τουλάχιστον εποχιακές βροχοπτώσεις, εντούτοις σε πολλές περιοχές των νοτιοδυτικών Ηνωμένων Πολιτειών και της Μπάχα Καλιφόρνια το ποσοστό βροχόπτωσης είναι ελάχιστο.

A.2.2 Ανατομία και Βιοχημεία της οικογένειας

Βασικά ανατομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Cactaceae* έχουν μελετηθεί ήδη από το 16ο αιώνα ενώ πιο πρόσφατα, άλλα χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί σε καλλιεργούμενα φυτά, όπως οι ποικίλλες παραλλαγές στο πάχος της επιδερμίδας, καθώς και το πάχος και ο αριθμός των υποδερμικών κυτταρικών στρωμάτων. Ο Boosfeld (1920) ήταν ο πρώτος που έδωσε έμφαση στη συσχέτιση μεταξύ της ανατομίας με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού, σημειώνοντας πως τα *taxa* που έχουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να έχουν επίσης διαφορετική εσωτερική δομή.

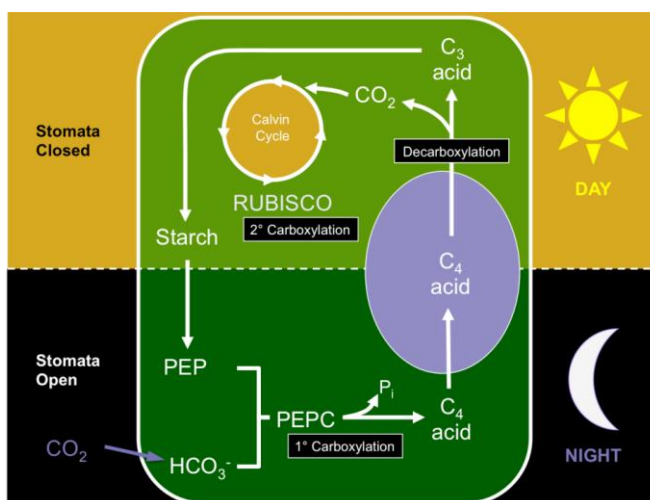
Τα φύλλα ορισμένων φυτών, κατά τη διάρκεια των ημερήσιων κύκλων, επιδεικνύουν εξαιρετικά μεγάλες μεταβολές στη συγκέντρωση των οξέων, κυρίως του μηλικού. Αυτές οι μεταβολές στην οξύτητα, παρατηρήθηκαν πρώτα στα φυτά της οικογένειας *Crassulaceae*, απ’ όπου έλαβε το όνομα CAM (**Crassulacean Acid Metabolism**). Τα φυτά που παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο ονομάζονται **CAM φυτά**. Ο μηχανισμός αυτός είναι μια προσαρμογή της φωτοσύνθεσης όταν υπάρχει περιοσμένη διαθεσιμότητα σε νερό ή CO_2 (Thomas B. *et al.*, 2016). Αριθμητικά, τα CAM φυτά είναι λιγότερα από τα C_4 φυτά (φυτά στα οποία το πρώτο προϊόν της καθήλωσης του CO_2 είναι το οξαλικό, ένα C_4 οξύ) και πολύ λίγα (ανανάς, βανίλια και διάφορα είδη κάκτου) έχουν οικονομική σημασία.

Η φωτοσυνθετική αυτή προσαρμογή εκτείνεται σε ένα μεγάλο αριθμό αγγειοσπέρμων, αποτελούμενο από τουλάχιστον 343 γένη και 34 οικογένειες. Μεγάλο μέρος της πρώιμης κατανόησης του μεταβολικού ελέγχου και της λειτουργικής σημασίας της CAM προήλθε από μελέτες σε είδη, πολλά από τα οποία ανήκουν στις οικογένειες *Crassulaceae* (π.χ. *Kalanchoe daigremontiana*) και *Cactaceae* (π.χ. *Opuntia basilaris* και *O. ficus-indica*) και θεωρείται ότι εκφράζεται πάντα σε ώριμους φωτοσυνθετικά ιστούς (Winter K. *et al.*, 2008).

Στα CAM φυτά, η καθήλωση και η αφομοίωση του CO_2 πραγματοποιείται στα κύτταρα του μεσοφύλλου, αλλά η καρβοξυλίωση και η αποκαρβοξυλίωση γίνονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της νύχτας αποδομείται μέρος των αποθηκευμένων υδατανθράκων, ώστε να παραχθεί το υπόστρωμα για την PEP καρβοξυλάση. Το CO_2 ενσωματώνεται στο PEP, το οποίο μετατρέπεται σε οξαλικό. Το οξαλικό, στη συνέχεια, μετατρέπεται σε μηλικό, από τη δράση της NAD-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του μηλικού. Το σύνολο αυτών των διαδικασιών **αναφέρεται ως καθήλωση του CO_2 απουσία φωτός**. Το μηλικό μεταφέρεται στα χυμοτόπια μέσω ενεργού μεταφοράς, όπου και συσσωρεύεται. Τα κύτταρα των CAM φυτών έχουν τεράστια χυμοτόπια. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα στομάτια των φύλλων είναι ανοιχτά, ώστε να υπάρχει σταθερή παροχή του ατμοσφαιρικού CO_2 . Προς το τέλος της νύχτας, η ενεργότητα της PEP καρβοξυλάσης μειώνεται, από την υψηλή συγκέντρωση του μηλικού (Κατινάκης Π., 2004).

Στις πρώτες πρωινές ώρες (τα στομάτια αρχίζουν να κλείνουν) αρχίζει η απελευθέρωση του μηλικού από τα χυμοτόπια και η αποκαρβοξυλίωσή του από τη δράση του κυτταροπλασματικού NADP-μηλικού ενζύμου. Έτσι η συγκέντρωση του CO_2 αρχίζει να αυξάνεται. Τα στομάτια έχουν ήδη κλείσει και έτσι δεν διαφεύγει το CO_2 . Ο κύκλος C_3 -CR έχει αρχίσει να λειτουργεί και η υψηλή συγκέντρωση του CO_2 επιτρέπει την καρβοξυλιωτική δράση της Rubisco. Το πυροσταφυλικό που παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση του μηλικού, μετατρέπεται σε φωσφονολοπυροσταφυλικό, το οποίο αποτελεί την πρώτη ύλη για τη σύνθεση φωσφορικών τριοζών. Οι φωσφορικές τριόζες εισάγονται, μέσω της ενεργούς μεταφοράς, στους χλωροπλάστες, όπου χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση αμύλου. Σημαντικό είναι ότι οι ενεργειακές απαιτήσεις των CAM φυτών φαίνεται ότι είναι αρκετά μεγαλύτερες από εκείνες των C_3 και C_4 φυτών (Κατινάκης Π., 2004).

Ανάμεσα στις τροποποιήσεις που συνοδεύουν την εξέλιξη των κάκτων από τους φυλλώδεις προγόνους τους που χρησιμοποιούν τον κύκλο C_3 -CR για την αφομοίωση του CO_2 (C_3 φυτά) έως τα **CAM φυτά** είναι και: στελέχη με αυξημένο αριθμό στοματίων, η μη διαπερατή επιδερμίδα, μια μεγάλη εσωτερική επιφάνεια με εκτεταμένα μεσοκυττάρια διαστήματα, οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, τροποποιήσεις στο ξύλο και μη τυπικά χαρακτηριστικά εντεριώνης. Το ξύλωμα, εκτός από τις τραχειίδες και τα αγγειακά στοιχεία, με βασική αποστολή τη μεταφορά νερού και αλάτων, επιτελεί και τα ρόλο της στήριξης και της διαμόρφωσης του σχήματος του φυτού. Αντίστοιχα, το σχήμα υπαγορεύει τις βιοχημικές ιδιότητες του ξύλου (Nobel P.S., 2002).



Εικόνα 1: Προσαρμογή φωτοσύνθεσης CAM φυτών (Thomas B. *et al.*, 2016)

A.3 Το γένος *Opuntia* & το είδος *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.

A.3.1 Ιστορικά στοιχεία, Καταγωγή, Εξημέρωση και Γεωγραφική Κατανομή

Η προέλευση του ονόματος του γένους *Opuntia* έχει τις ρίζες του στην ελληνική λέξη **Οπούς** (αρχαία ελληνική: Όπους) και χρησιμοποιήθηκε από τον άγγλο βοτανικό Philip Miller (1691-1771) για να περιγράψει παρόμοια παχύφυτα και κακτοειδή φυτά που αναπτύσσονταν κοντά στην πόλη Οπούς, κύρια πόλη της ανατολικής Λοκρίδας στην αρχαία Ελλάδα (Anaya-Pérez M.A. & Bautista-Zane R., 2008). Μερικές από τις πιο κοινές ονομασίες του φραγκόσυκου απεικονίζουν ξεκάθαρα την καταγωγή καθώς και την εξάπλωσή του (Indian-fig, Nopal, tuna cactus). **Nopal** είναι ένας μεξικάνικος όρος προερχόμενος από την λέξη "nopalli" της γλώσσας náhuatl των Αζτέκων, με τον οποίο ορίζονται είδη του γένους αλλά και τα νεαρά κλαδώδια (nopalitos) τα οποία καταναλώνονται νωπά στο Μεξικό και στις βόρειες Η.Π.Α. Στην Ελλάδα οι κοινές ονομασίες που χρησιμοποιούνται για το φρούτο και αντίστοιχα το φυτό είναι φραγκόσυκο-φραγκοσυκιά, παυλόσυκο-παυλοσυκιά και στην Κύπρο παπουτσόσυκο-παπουτσοσυκιά. Ο πλούτος των κοινών ονομασιών της *Opuntia ficus-indica* καταδεικνύει την τεράστια ιστορική, κοινωνική, οικονομική και οικολογική σημασία του φυτού για τους ανθρώπους.

Το φραγκόσυκο (prickly pear) είναι ένα καλλιεργούμενο φυτό, του οποίου η εξημέρωση θεωρείται ότι ξεκίνησε πριν από περίπου 8000 χρόνια από τους αρχαίους Μεξικανούς. Κατά τον Flannery (1985), μεταξύ του τέλους της πλειστοκαινου (100.000 χρόνια πριν) και των αρχών της 5^{ης} χιλιετίας μ.Χ., οι προϊστορικές φυλές των ημιάνυδρων περιοχών του Μεξικού (πολιτείες Hidalgo, Mexico, Morelos, Guerrero, Puebla και Oaxaca) άρχισαν να καλλιεργούν μια σειρά αυτοφυών φυτών, τα οποία αργότερα αποτέλεσαν τα βασικά είδη διατροφής για τους αρχαίους πολιτισμούς της Κεντρικής Αμερικής. Για πολλούς αιώνες, αυτές οι αυτόχθονες φυλές, ζούσαν ως νομάδες ανακαλύπτοντας, μεταξύ άλλων, πώς να συλλέγουν και να καταναλώνουν αυτοφυή φυτά όπως το φραγκόσυκο. Έτσι, η καλλιέργεια των φασολιών, της ντομάτας, του αβοκάντο και πιθανώς της *Opuntia* sp. αλλά και άλλων ημιτροπικών φυτών ξεκίνησε μεταξύ του 7.500 και 5.000 π.Χ. (Anaya-Pérez M.A. & Bautista-Zane R., 2008). Όμως, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν βοτανικά στοιχεία της αρχαϊκής εποχής που αποδεικνύουν τη



Εικόνα 2: Ίδρυση της Tenochtitlán, Codex Méndozza



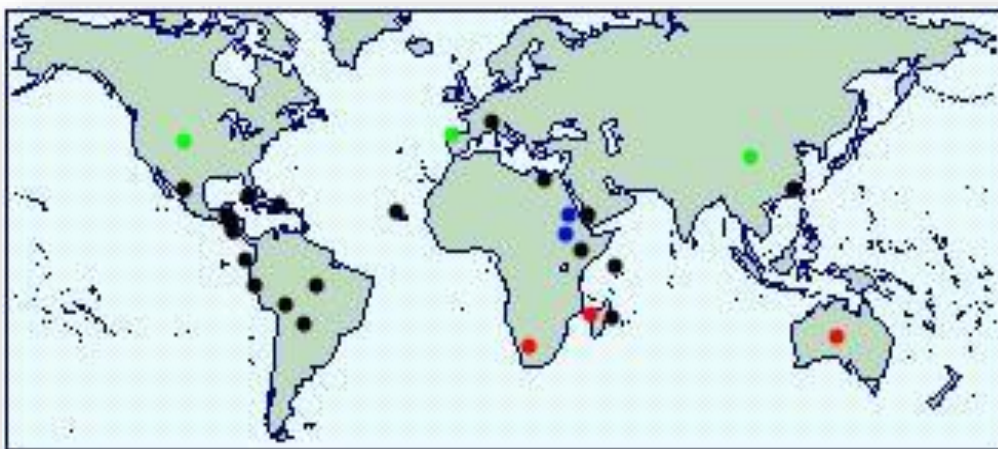
Εικόνα 3: Άνθρωπος που συλλέγει tunas από nopal, Codex Florentino

χρήση της *Opuntia* spp. από διάφορες εθνοτικές ομάδες, κανένα από αυτά δεν μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με την *O. ficus-indica* (Reyes-Agüero J.A. *et al.*, 2005).

Στην καταγεγραμμένη ιστορία του Παλαιού Κόσμου, η *O. ficus-indica* ήταν σίγουρα γνωστή στις αρχές του 16^{ου} αιώνα και θεωρείται ότι αυτό το είδος συνόδευσε τον Κολόμβο στο πρώτο του ταξίδι επιστροφής στη Λισαβόνα το 1493. Συγκεκριμένα, η καταγραφή των παραδόσεων και της ιστορίας μέσω κωδίκων, γραμμένων από αυτόχθονες πληθυσμούς αλλά και Ισπανών κονκισταδόρων, αποδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο του φυτού στη ζωή των ιθαγενών. Σύμφωνα με ένα θρύλο των Αζτέκων, η τοποθεσία όπου θεμελιώθηκε η Τενοτσιτλάν (στα ερείπιά της είναι χτισμένη σήμερα η πόλη του Μεξικού) επιλέχθηκε το 1323, όταν αξιωματούχοι των Μεσικά είδαν έναν αετό καθισμένο σε μια φραγκοσυκιά να τρώει ένα φίδι. Αυτή η εικόνα σήμερα φιγουράρει στη σημαία και στο εθνόσημο του Μεξικού. Αναφορές υπάρχουν ακόμη για τη χρήση του, εκτός από τους αυτόχθονες πληθυσμούς (π.χ. Aztec, Maya) της Κεντρικής Αμερικής, στην πόλη Nazca του Περού, γεγονός που τοποθετεί το φυτό στη Νότια Αμερική σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

Το γένος *Opuntia* αντιπροσωπεύεται από περίπου 300 είδη στον κόσμο. Συγκεκριμένα στο Μεξικό αναπτύσσονται τα 80, το 80% των οποίων είναι ενδημικά, γεγονός που καθορίζει το Μεξικό ως χώρα καταγωγής και εξάπλωσης του φυτού (Méndez S.J. & García J., 2006).

Κατά τη διάρκεια της εξημέρωσης από τα διπλοειδή άγρια είδη (2X), η *O. ficus-indica* απέκτησε υψηλότερο επίπεδο πλοειδίας (6X, 8X) (Felker *et al.*, 2005) μέσω του φυσικού υβριδισμού και πιθανά η καλλιεργούμενη ποικιλία του είδους (χωρίς αγκάθια) εισήχθη στην Ισπανία λίγα χρόνια μετά την ανακάλυψη της Αμερικής. Η επιτυχής εισαγωγή της *Opuntia* στη λεκάνη της Μεσογείου έχει αποδοθεί στον μηχανισμό CAM αυτών των φυτών (Erre P. *et al.*, 2008). Στην αρχή, καλλιεργήθηκε από περιέργεια στους κήπους των ευγενών, ενώ αργότερα εμφανίστηκε σε πιο ζεστές ζώνες της Ισπανίας, της Ιταλίας κ.α. και από εκεί σε άλλες χώρες της Μεσογείου (Kiesling R., 1998). Ο φυσικός υβριδισμός, σε συνδυασμό με την πολυπλοειδία, τη γεωγραφική απομόνωση αλλά και την ανθρώπινη επιλογή, οδήγησαν σε υψηλή γενοτυπική και φαινοτυπική παραλλακτικότητα (Griffith P., 2004). Συγκεκριμένα, στη λεκάνη της Μεσογείου, οι φυσικοί πληθυσμοί της Οπούντια παρουσιάζουν χαμηλότερη γενετική ετερογένεια σε σχέση με τις περιοχές καταγωγής της. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4) παρουσιάζεται η γεωγραφική εξάπλωση του είδους.



Εικόνα 4: ●: Παρόν, ●: Διαδεδομένο, ●: Περιστασιακό ή μερικές αναφορές, ●: Εντοπισμένο (<http://www.cabi.org>)

Α.3.2 Βοτανικά Χαρακτηριστικά & Ταξινόμική Κατάταξη

Το γένος *Opuntia*, ανήκει στα δικοτυλήδονα, στην τάξη των Caryophyllales, στην οικογένεια των Cactaceae (Πίνακας 1). Το φυτό φραγκόσυκο ανήκει στην οικογένεια Cactaceae, Υποοικογένεια Opuntioideae και είναι ένα ξηρόφυτο (xerophyte) το οποίο αποτελείται από περίπου 200-300 είδη, αναπτυσσόμενα κυρίως σε ξηρές (λιγότερο από 250mm ετήσιες βροχοπτώσεις) και



Εικόνα 5: Τυπική μορφολογία του φυτού *Opuntia ficus-indica*

ημίξηρες (250-450mm ετήσιες βροχοπτώσεις) ζώνες ενώ παρουσιάζει υψηλή προσαρμοστική ικανότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία, ξηρασία, ακτινοβολία UV). Είναι ενδημικό φυτό στο Μεξικό και τη Βόρεια Αμερική και παράγεται σε αφθονία στις ερημικές ζώνες των νοτίων περιοχών των Η.Π.Α. και στο Περού. Από εκεί μεταφέρθηκε σε διάφορες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένου της Αφρικής και της Ευρώπης. Ευδοκίμει σε υποτροπικά και ημιάνυδρα κλίματα και έχει προσαρμοστεί έτσι ώστε να αναπτύσσεται και να καρποφορεί σε συνθήκες έλλειψης νερού και φτωχών εδαφών (Nobel P.S., 2002).

Το γένος *Opuntia* χαρακτηρίζεται από την παρουσία γλωχιδίων στις αρέολες, την ανάπτυξη των στελεχών είτε ως πεπλατυσμένα τμήματα (κλαδώδια) ή ως κυλινδρικά, την παρουσία ποικίλων ακίδων, άνθη αναπτυσσόμενα πλευρικά, άμισχα, μονήρη και υπάνθιο με φύλλα, αρέολες, γλωχίδια και ακίδες (Kattermann F., 2010).

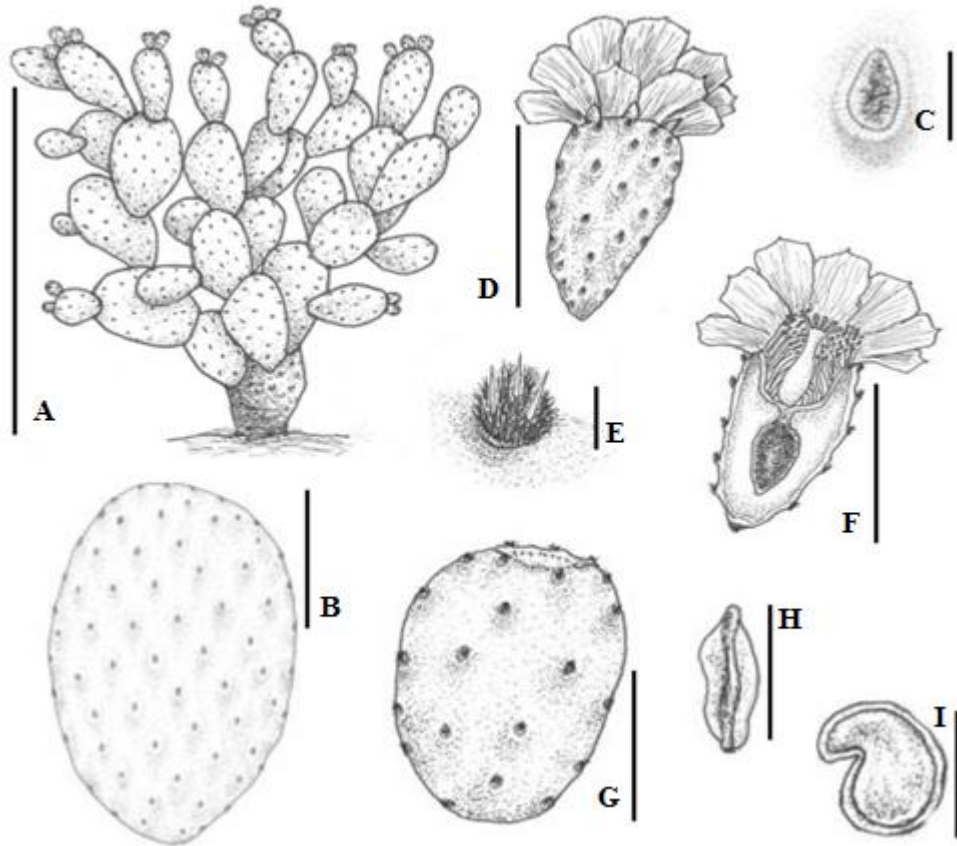
Βασίλειο	Φυτά
Υπεράθροισμα	Εμβριόφυτα
Αθροισμα	Αγγειόσπερμα
Κλάση	Δικοτυλήδονα
Τάξη	Caryophyllales
Οικογένεια	Cactaceae
Υποοικογένεια	Opuntioideae
Γένος	<i>Opuntia</i>
Είδος	<i>Opuntia ficus-indica</i> L., Miller.

Πίνακας 1: Ταξινόμική κατάταξη της *Opuntia ficus-indica*.

Σύμφωνα με την IUCN κόκκινη λίστα για τα επαπειλούμενα είδη, το είδος *Opuntia ficus-indica* ανήκει στην κατηγορία ειδών με ελλειπή στοιχεία, καθώς είναι άγνωστος ο αρχικός πληθυσμός επομένως, αν και ευρέως διαδεμένο (ως αποτέλεσμα των εισαγωγών του σε καινούργιες περιοχές) και άφθονο (εξαιτίας της ευρείας καλλιέργειάς του και των επεκτατικών του χαρακτηριστικών), η άγρια κατάστασή του δεν μπορεί να εκτιμηθεί (IUCN, 2013).

Φυτά πολυετή, θαμνώδη έως δενδρώδη, που μπορεί να φτάσουν μέχρι και τα 3m σε ύψος, με λιγνινοποιημένο και εμφανή βλαστό. **Βλαστός** χρώματος σκούρο καφέ, πράσινος ή

γκρι, κυλινδρικός, στυλοειδής ή αρθρωτός με διάμετρο έως 20cm και πολλά φυλλοκλάδια. **Κλαδώδια** (φυλλοκλάδια) πεπλατυσμένα, συνήθως ελλειπτικά, αλλά και ωοειδή, κυκλικά, επιμήκη ή ρομβοειδή, χρώμα απαλό πράσινο. **Αρέολες** των αναπτυγμένων κλαδωδίων ελλειπτικές, ωοειδείς, σπανίως κυκλικές ή ρομβικές.



Εικόνα 6: A: άτομο, B: κλαδώδιο, C: areola κλαδωδίου, D: άνθος, E: αρέολα άνθους, F: διαμήκης τομή άνθους, G: καρπός, H: πλευρική άποψη σπέρματος, I: εμπρόσθια άποψη σπέρματος (Reyes-Agüero J.A. et al., 2005).

Ακίδες συνήθως δεν υπάρχουν, μερικές φορές όμως λίγες αρέολες των κλαδωδίων φέρουν μία ακίδα. Οι λειτουργίες των ακίδων περιλαμβάνουν μηχανική προστασία από φυτοφάγα ζώα, αντανάκλαση του φωτός, σκίαση των κλαδωδίων και ως εκ τούτου μείωση των απωλειών νερού. **Γλωχίδια** συνήθως άφθονα στις αρέολες των κλαδωδίων ενώ μερικές φορές απουσιάζουν (Εικόνα 6). Τα γλωχίδια αποτελούνται από 100% κυτταρίνη και είναι το διαγνωστικό χαρακτηριστικό της υποοικογένειας *Opuntioideae*. Τα **άνθη** δημιουργούνται πάνω σε βλαστούς ηλικίας ενός έτους και είναι πάνω από 10 σε κάθε κλαδώδιο. Υπάνθιο (pericarpel) συνήθως κυλινδρικό, μερικές φορές ωοειδές ή κωνικό, αρέολες μερικές φορές με ακίδες, γλωχίδια χρώματος καφέ. Εξωτερικό περιάνθιο πράσινο έως πρασινοκίτρινο και εσωτερικό έντονο κίτρινο, μερικές φορές κόκκινο ή πορτοκαλί. Στήμονες πολυάριθμοι. **Καρπός** με σχήμα μακρόστενο, μερικές φορές σφαιρικό, κυλινδρικό ή ελλειψοειδές, χρώμα που ποικίλει, ανάλογα την ποικιλία, από ανοιχτό κίτρινο έως κοκκινοκόκκινο, λιγότερο συχνά ένας συνδυασμός από πρασινοκίτρινο ή κιτρινοκόκκινο, με μεγάλο αριθμό σπερμάτων (300 σπ./καρπό 160gr.) και βάρος 150-450gr. **Σάρκα** ίδιου χρώματος με τη φλούδα, ελαφρώς έως πολύ γλυκιά. **Σπέρματα** φακοειδή έως ελλειψοειδή (Reyes-Agüero J.A. et al., 2005). **Ρίζες** επιφανειακές, εκτεινόμενες και πλευρικά, με τον μεγαλύτερο όγκο να βρίσκεται σε βάθος μέχρι 30cm.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και κατά τους Reyes-Agüero *et al.*, 2005 κύριο διαγνωστικό χαρακτηριστικό της *O. ficus-indica* είναι η ολική ή μερική απουσία των ακίδων. Εξίσου σημαντική είναι η παρατήρηση των: κλαδώδιων, αρεόλων και υπανθίου καθώς επίσης και του μεγέθους των καρπών, της ευρύτερης ποικιλία των χρωμάτων τους, του μήκους των σπερμάτων, αλλά και του μήκους και βάρους της σάρκας τους. Είναι δύσκολο να διαγνωστούν με ακρίβεια οι συστηματικές σχέσεις της *O. ficus-indica*, επειδή τα είδη βρίσκονταν κάτω από ισχυρές πιέσεις τεχνητής (καλλιέργεια) και όχι φυσικής επιλογής (Reyes-Agüero J.A. *et al.*, 2005).

A.3.3 Αναπαραγωγή και Σπέρματα

Η εξελικτική και οικολογική επιτυχία των διαφόρων ομάδων των αγγειοσπέρμων, από την εποχή ακόμη του Δαρβίνου, είναι άμεσα συνυφασμένη με την αναπαραγωγική τους αποτελεσματικότητα, η οποία περιλαμβάνει μηχανισμούς: επικονίασης, διασποράς σπερμάτων και βλαστητικής εγκατάστασης. Η διασπορά των σπερμάτων μπορεί να γίνει είτε με τον άνεμο (anemochory), είτε με τα ζώα (zoochory) ή ακόμη και με το νερό (hydrochory), αν και στους κάκτους το νερό αποτελεί ίσως τον τελευταίο και λιγότερο πιθανό τύπο διασποράς. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην ανάλυση της επικονίασης των φυτών από ζώα, τα οποία έχουν συσχετισθεί άμεσα με τη συνακόλουθη επιτυχημένη διαφοροποίηση των αγγειοσπέρμων (Rojas-Arehchiga M.& Vahzquez-Yanes C., 1999).

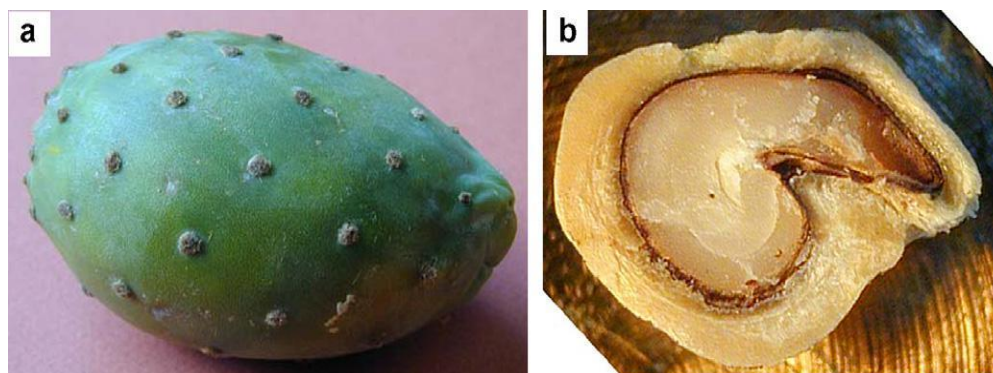
Παρόλο που υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός εντόμων στη φύση που δεν παρουσιάζει κάποιου είδους επιλεκτικότητα όσον αφορά τη συλλογή της γύρης εντούτοις, στο γένος *Opuntia*, υπάρχουν μέλισσες που παρουσιάζουν μια εξειδίκευση ως προς το γένος και συμβάλλουν στην υβριδοποίησή του. Μέλισσες του γένους *Lithurge* και *Diadasia* ξεχωρίζουν ανάμεσα σε άλλα, διότι θεωρείται ότι είναι τα πιο κοντινά που έχουν συνεξελιχθεί με το γένος, αλλά ακόμη και αυτά δεν παρουσιάζουν καμιά εξειδίκευση ως προς κάποιο είδος (Reyes-Agüero *et al.*, 2005).

Δύο είναι οι τύποι με τους οποίους αναπαράγεται η φραγκοσυκιά: η εγγενής και η αγενής αναπαραγωγή (Pimiento-Barrios & Del Castillo, 2002). Σε καλλιεργητικές συνθήκες τα πράγματα είναι πολύ πιο απλά, καθώς ο πολλαπλασιασμός μπορεί να γίνει είτε με σπέρματα είτε ευκολότερα, με μοσχεύματα που προέρχονται από βλαστούς ηλικίας ενός ή δύο ετών. Ακόμη και ένα μικρό τμήμα κλαδώδιου μπορεί να ριζοβολήσει και να αναπτυχθεί με την προϋπόθεση της ύπαρξης δύο τουλάχιστον αρέολων ενώ μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ακραίες συνθήκες ώσπου να βρει υγρασία. Ο πολλαπλασιασμός με σπέρματα είναι μια σημαντική μέθοδος, διότι επιτρέπει τη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών και των ειδών που πρέπει να διατηρηθούν στη φύση (Rojas-Arehchiga M.& Vahzquez-Yanes C., 1999).

Η αγενής αναπαραγωγή ενδέχεται να είναι ακόμη και απομικτική όταν η εμβρυογένεση πραγματοποιείται χωρίς προηγούμενη επικονίαση και στην *O. ficus-indica*, ένα ποσοστό 10.9-18.5% των σπερμάτων της παράγονται απομικτικά (Mondragon-Jacobo & Pimiento-Barrios, 1995). Ο αριθμός των βιώσιμων σπερμάτων ανά καρπό κυμαίνεται μεταξύ 177 έως 357. Ωστόσο, πολύ λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με τις βλαστητικές απαιτήσεις των σπερμάτων των κάκτων καθώς και για τη βιωσιμότητα και τη μακροζωία τους.

Τα σπέρματα της *O. ficus-indica* είναι μικρά και έχουν σχήμα ωοειδές ή φακοειδές ενώ η διαμήκης τομή τους δείχνει ότι αποτελούνται από τους παρακάτω ιστούς: το **ενδοσπέρμιο** και το **περικάρπιο** (Εικόνα 7). Συνολικά, η ποσότητα των σπερμάτων του καρπού ποικίλλει από

30% έως 40% επί του ξηρού βάρους. Το περικάρπιο καταλαμβάνει το 90-95% και αποτελείται κυρίως από ξυλάνη και κυτταρίνη ενώ τα αποτελέσματα της ανάλυσης των σακχάρων στο περικάρπιο και στο σύνολο του σπέρματος δείχνουν μια επικράτηση της ξυλόζης (42.7%) και της γλυκόζης (47.1%) (Habibi Y. *et al.*, 2007). Επιπλέον, στα σπέρματα περιέχονται υψηλές ποσότητες P, K, Mg και χαμηλές σε Ca, Na, Mn, Zn, Fe και Cu. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων κυμαίνεται στα 4.6-6.7%, με το λινολεϊκό σε μεγαλύτερη αφθονία (60.6-66.79%), ακολουθούμενο από το ολεϊκό (18.12-23.46%) και το παλμιτικό (12.18-12.80%). Τέλος, έντεκα αμινοξέα έχουν απομονωθεί με περισσότερο άφθονα την γλουταμίνη, την ασπαραγίνη και την αργινίνη (Reyes-Agüero J.A. *et al.*, 2005).



Εικόνα 7: (α) καρπός της *Opuntia ficus-indica*, (β) διαμήκης διατομή σπέρματος (Habibi Y. *et al.*, 2007)

Α.3.4 Οικολογία και Οικονομική σημασία

Η φραγκοσυκιά, απαιτεί αμμώδη, πετρώδη, ξηρά και άνυδρα εδάφη, ενώ προτιμά ξηροθερμικά κλίματα. Η επιβίωσή της βασίζεται στην αποταμίευση νερού, όπου μαζί με τις θρεπτικές ουσίες αποθηκεύει μεγάλες ποσότητες νερού μέσα στους ιστούς της, και στην μείωση διαπνοής. Είναι ενδημικό σε περιοχές με εύκρατο και υποτροπικό κλίμα, με τυπικά βροχερά καλοκαίρια και δροσερούς και ξηρούς χειμώνες. Κατάγεται από την κεντρική κοιλάδα του Μεξικού και από εκεί εισήχθει σε ολόκληρο τον κόσμο. Αποτελεί έναν διαδεδομένο και σημαντικό εμπορικά κάκτο, κτηνοτροφική καλλιέργεια αλλά και πιο πρόσφατα αποτελεί μέρος των δασικών και αγροδασικών έργων των αναπτυσσόμενων χωρών. Εντούτοις, έχει οδηγήσει σε περιβαλλοντικά προβλήματα και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις όπου το φυτό κατέστη επεκτατικό.

Τα φυτά δεν είναι ανεκτικά στην αλατότητα αλλά ευδοκιμούν σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη και λόγω της επιφανειακής εξάπλωσης του ριζικού τους συστήματος μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε βραχώδη υποστρώματα. Στη λεκάνη της Μεσογείου, από την Ισπανία μέχρι την Τουρκία μπορεί συχνά να αναπτυχθεί στις πλαγίες δρόμων και χωραφιών, σε βραχώδεις εκτάσεις και σε αλσύλλια ενώ η βλάστηση μπορεί να είναι πυκνή και να φτάνει σε πολλά μέτρα ύψος (Bekir E.A., 2006).

Σήμερα καλλιεργείται συστηματικά στο Μεξικό, την Αλγερία, το Μαρόκο, τις Η.Π.Α., την Τυνησία, τη Χιλή, τη Ν. Αφρική, το Ισραήλ, την Τουρκία, την Ιταλία κ.α. και αποτελεί σημαντικό πυλώνα των εξαγωγών τους. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να καλλιεργείται και στην Ελλάδα. Οι εν δυνάμει χρήσεις του είναι πάρα πολλές και θα πρέπει να ληφθεί μέριμνα για

την αξιοποίησή του. Συγκεκριμένα, μπορεί να φυτευτεί ως φυτό φράχτης, ενώ ταυτόχρονα κρατάει και τη φωτιά μακριά, καθώς τα πλούσια σε νερό φυτικά της μέρη καίγονται πολύ δύσκολα. Λόγω του ύψους της, προστατεύει από το δυνατό άνεμο και προσφέρει οπτική απομόνωση, ενώ η εξάπλωση του ριζικού της συστήματος προστατεύει το έδαφος από τη διάβρωση (Prieto-García *et al.*, 2006).

A.3.5 Κύριες Χημικές Κατηγορίες

Η εξημέρωση των φυτών είναι μια εξελικτική διαδικασία η οποία τροποποιεί μορφολογικά, φυσιολογικά, χημικά και γενετικά χαρακτηριστικά των άγριων ειδών και είναι το αποτέλεσμα της τεχνητής επιλογής. Στο γένος *Opuntia* έχει παρατηρηθεί μια σταδιακή εξημέρωση η οποία οδήγησε στη βελτίωση και κυριαρχία των χαρακτηριστικών που ξεκίνησαν να έχουν ενδιαφέρον για το ανθρώπινο είδος όπως για παράδειγμα τα εδώδιμα φρούτα και κλαδώδια, χαρακτηριστικά για φαρμακευτικούς και καλλυντικούς σκοπούς. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά που αναπτύχθηκαν οδήγησαν στη χρησιμοποίησή του ως κτηνοτροφή, στα οικοδομικά υλικά αλλά και ως πηγή φυσικών χρωστικών (Stintzing C. & Carle R., 2004).

Η φαρμακευτική δυναμική της *Opuntia* εξαρτάται από τη σύνθεση των ιστών της. Οι περισσότερες φαρμακευτικές έρευνες επικεντρώθηκαν και περιλαμβάνουν περισσότερο τα κλαδώδια και λιγότερο τον καρπό της φραγκοσυκιάς (κυρίως λόγω της κατανάλωσής τους στο Μεξικό και σε ισπανόφωνες περιοχές) και δείχνουν ότι η χημική σύνθεση των ‘nopals’ εξαρτάται από την ποικιλία, την κατάσταση της ωρίμανσης, τις περιβαλλοντικές και καλλιεργητικές συνθήκες (El Kossori R.L. *et al.*, 1998; Astello-Garcia M. G. *et al.*, 2015). Επομένως, η αντίστοιχη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά ποικίλλει ενώ κατηγοριοποιώντας τις χημικές ενώσεις που εμφανίζονται, αυτές είναι: **υδατάνθρακες, ίνες, τέφρα, πρωτεΐνες, λιπίδια και νερό**, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φρέσκα κλαδώδια. Οι υδατάνθρακες που επικρατούν είναι η γλυκόζη και το γαλακτουρονικό οξύ, ενώ η αραβινόζη, η γαλακτόζη, η μαννόζη, η ξυλόζη και η ραμνόζη υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες (Ginestra G. *et al.*, 2009). Όσον αφορά τα περιεχόμενα μεταλλικά στοιχεία το περισσότερο άφθονο είναι το K, ακολουθούμενο από το Ca, το Na, το P, το Fe και το Mn. Βασισμένοι σε αυτό το χημειοσυνθετικό πρότυπο και συγκρίνοντάς το με άλλα θρεπτικά φυτά, τα κλαδώδια κρίνονται περισσότερο πολύτιμα από το μαρούλι αλλά λιγότερο θρεπτικά σε σχέση με το σπανάκι (Stintzing C. & Carle R., 2004).

Με την εισαγωγή της *Opuntia* sp. στην Ευρώπη και έπειτα, και κυρίως από τη δεκαετία του '70, η κατανάλωση του φραγκόσυκου παγκοσμίως αυξήθηκε. Στις μελέτες που ακολούθησαν ο καρπός διακρίνεται και μελετάται στα επιμέρους μέρη: **περικόρπιο, σάρκα**, και **σπέρματα**. Οι πιο σημαντικοί μονοσακχαρίτες για τη σάρκα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, για το περικόρπιο είναι η γλυκόζη αλλά υπάρχουν και κάποιες μικρές ποσότητες σακχαρόζης και φρουκτόζης. Τα επίπεδα των σακχάρων αυτών είναι υπεύθυνα για τη γλυκιά γεύση της σάρκας. Τα δομικά συστατικά των ινών είναι η ημικυτταρίνη, η κυτταρίνη, η πηκτίνη και η λιγνίνη, με σημαντικότερη πηγή πηκτίνης την σάρκα, ενώ το περικόρπιο και τα σπέρματα συντίθενται από κυτταρίνη σε ποσοστό από 71% έως 83%. Όσον αφορά τα μεταλλικά στοιχεία η σάρκα αποτελεί σημαντική πηγή Ca, K και Mg, ωστόσο στο περικόρπιο οι συγκεντρώσεις των

στοιχείων αυτών είναι σημαντικά υψηλότερες (Jiménez-Aguilar M.D. *et al.*, 2014), ενώ τα σπέρματα είναι πλούσια σε P και Zn.

Η σάρκα του φραγκόσκου περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από ελεύθερα αμινοξέα με τη γλουταμίνη να κυριαρχεί, ακολουθούμενη από την προλίνη και την ταυρίνη. Συγκεκριμένα η ταυρίνη είναι ένας προληπτικός παράγοντας της ηπατικής στεάτωσης και η κατανάλωση 300 ml σάρκας φραγκόσκου μπορούν να συμβάλλουν με ένα ποσοστό 40% συνιστώμενης ταυρίνης (Jiménez-Aguilar M.D. *et al.*, 2014).

Οργανικά οξέα
Οξαλικό οξύ
Μηλικό οξύ
Κιτρικό οξύ
Μηλονικό οξύ
Σουκινικό οξύ
Ταρταρικό οξύ
Φορβικό οξύ
Πισιδικό οξύ
Ευκομικό οξύ

Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας των οργανικών οξέων της *Opuntia ficus-indica*.

Όσον αφορά τα οργανικά οξέα, στα νεαρά κλαδώδια το κιτρικό οξύ απαντάται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με το μηλονικό, στα ώριμα κλαδώδια το μηλονικό απουσιάζει παντελώς ενώ το κιτρικό είναι μειωμένο. Το ταρταρικό και το σουκινικό οξύ βρίσκονται σε ίχνη. Αντίστοιχα, σε ίχνη απαντώνται το **πισιδικό** και **φορβικό**, οξέα που σπανίως απαντώνται στη φύση και περιορίζονται μόνο στα CAM φυτά (Stintzing C. & Carle R., 2004). Στα σπέρματα απαντάται μικρότερος αριθμός οργανικών οξέων καθώς απουσιάζει το κιτρικό οξύ (ανιχνεύεται στα κλαδώδια και τα άνθη) και το ασκορβικό (απαντάται στα κλαδώδια) (Chahdoura H. *et al.*, 2014). Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 2) παρουσιάζονται συνοπτικά τα οργανικά οξέα της *O. ficus-indica*.

Σημαντικά ποσοστά βιταμινών παρατηρούνται στον καρπό με σημαντικότερη τη βιταμίνη C. Η βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ) εντοπίζεται σε σημαντικά επίπεδα σε διάφορες ποικιλίες της *O. ficus-indica*, σε συγκεντρώσεις στο χυμό μέχρι και 95mg/L. Έρευνα που έγινε σε υγιείς ενήλικες έδειξε ότι η κατανάλωση φραγκόσκου ενισχύει τη συνολική αντιοξειδωτική άμυνα, μειώνοντας την οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια και βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική κατάσταση σε υγιείς ανθρώπους (Tesoriere L. *et al.*, 2004). Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη της οποίας βασική λειτουργία –ως ισχυρό αντιοξειδωτικό– είναι να προστατεύει τους ιστούς του σώματος από τις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Στο έλαιο των σπερμάτων και στη σάρκα του φραγκόσκου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα τοκοφερολών (α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλη) με χαρακτηριστικότερη την υψηλότερη συγκέντρωση τοκοφερολών στο έλαιο των σπερμάτων (4030mg/kg) σε σχέση με το έλαιο σπερμάτων άλλων φυτών όπως η σόγια, το σουσάμι, ο ηλιάνθος, η ελιά, το αβοκάντο κ.ά. αλλά σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με το έλαιο argan (El-Mostafa K. *et al.*, 2014). Τέλος, το έλαιο των σπερμάτων και η σάρκα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε βιταμίνη K (Díaz Medina E.M. *et al.*, 2006)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρατίθενται οι κύριες χημικές κατηγορίες ενώσεων του γένους.

Κατηγορίες ενώσεων	Γένος <i>Opuntia</i>
Αλκαλοειδή	✓
Φλαβονοειδή και γλυκοσίδες	✓
Ταννίνες	✓
Στεροειδή	✓
Φαινολικά οξέα	✓
Λιπαρά οξέα	✓

Πίνακας 3: Κύριες χημικές κατηγορίες του γένους *Opuntia*.

A.4 Μεταβολικό προφίλ της *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Το φυτό *O. ficus-indica* είναι γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Προηγούμενες μελέτες στη χημική σύνθεσή του αποκαλύπτουν την παρουσία αλκαλοειδών, φλαβονοειδών, τερπενοειδών, πολυσακχαριτών και οργανικών οξέων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μπεταλαΐνες ιντικαξανθίνη και μπετανίνη καθώς και διάφορα φλαβονοειδή με τους γλυκοσίδες τους που είναι άφθονοι στα εκχυλίσματα των κλαδώδιων και στους οποίους αποδίδονται αντιδιαβητικές και αντιγλυκαιμικές δράσεις.

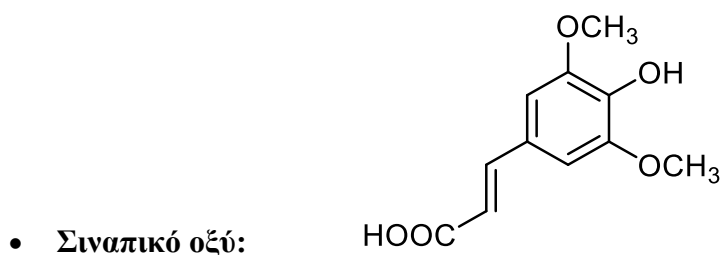
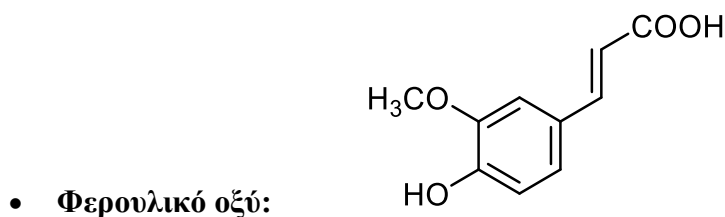
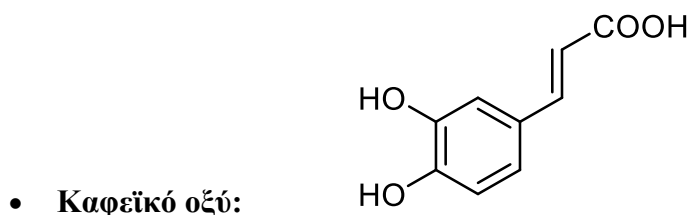
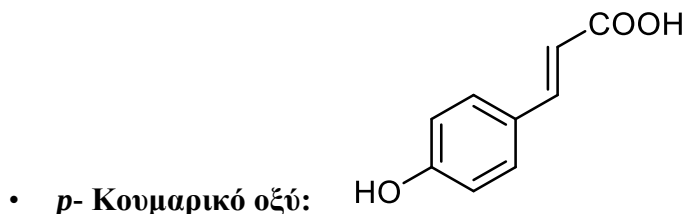
A.4.1 Φαινολικά

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, οι οποίες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες όπως τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, τις ανθοκυανιδίνες, τις προανθοκυανιδίνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόλες, τις ισοφλαβόνες, τα στιλβένια και τα λιγνάνια και εμφανίζονται σε ένα μεγάλο αριθμό φρούτων και λαχανικών καθώς και το κρασί, το τσάι, τη σοκολάτα και άλλα προϊόντα. Μπορεί να βρίσκονται στα φυτά ως γλυκοσίδες ή εστέρες με άλλα φυσικά προϊόντα όπως στερόλες, αλκοόλες, γλυκοσίδες και υδρόξυ λιπαρά οξέα. Η παρουσία των φαινολικών στην *O. ficus-indica* την καθιστά πολύ σημαντική όχι μόνο διατροφικά αλλά και για φαρμακευτικές χρήσεις.

A.4.1.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται από παρουσία καρβοξυλικής ομάδας που είτε είναι άμεσος υποκαταστάτης του δακτυλίου (υδροξυβενζοϊκά οξέα C₆-C₁) ή αποτελεί τελική χαρακτηριστική ομάδα της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας (φαινυλοξικά, C₆-C₂, φαινυλοπροπανοϊκά, κινναμωμικά οξέα, C₆-C₃). Ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν στο μόριό τους διακρίνονται επίσης οι τάξεις των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών (C₆-C₃-C₆), των στιλβενίων (C₆-C₂-C₆), των λιγνάνιων (C₆-C₃)₂, των συμπυκνωμένων ταννινών κ.ά. που ονομάζονται συχνά και πολυφαινόλες (Harborne A.J., 1989).

Η σημασία των υδροξυκινναμωμικών οξέων ως πρόδρομες ενώσεις υποδεικνύεται από το γεγονός ότι απαντούν σε όλα τα φρούτα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος και σχηματίζονται μέσω του αρωματικού αμινοξέος L-φαινυλαλανίνη. Τα σημαντικότερα **υδροξυκινναμωμικά οξέα** είναι τα εξής:



Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα ανιχνεύονται σπάνια σε ελεύθερη μορφή, συνήθως βρίσκονται με τη μορφή εστέρων και σπανιότερα με τη μορφή γλυκοσιδών, για παράδειγμα το χλωρογενικό οξύ είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος με το κινικό οξύ. Πολλές από τις κατηγορίες φυσικών προϊόντων όπως κουμαρίνες, φλαβονοειδή, ξανθόνες, στιλβένια κ.ά. προέρχονται από τα υδροξυκινναμωμικά οξέα.

Κατά τους Ginestra *et al.*, 2009 η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών οξέων στα κλαδώδια είναι μικρή (2.7μg/mg). Το **πισιδικό οξύ** (κατά IUPAC (2S,3R)-2,3-dihydroxy-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]butanedioic acid) είναι το κύριο απλό φαινολικό οξύ που παρατηρείται στα εκχυλίσματα της *O. ficus-indica* και αντιπροσωπεύει περίπου το 90% της συνολικής ποσότητας φαινολικών οξέων. Τα υπόλοιπα απλά φαινολικά όπως το **ευκομικό οξύ** (κατά IUPAC (2R)-2-hydroxy-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]butanedioic acid) (Stintzing C. & Carle R.,

2004, Ginestra *et al.*, 2009 & Astello-Garcia M. *et al.*, 2015) αλλά και ένα ακόμη άγνωστο, βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες. Ακόμη παρατηρούνται ίχνη **4-υδροξυ-βενζαλδεΐδης, trans *p*-κουμαρικού οξέος, trans-φερουλικού οξέος και cis-κουμαρικού οξέος** αλλά και **χλωρογενικό οξύ** και παράγωγά του, το οποίο (Astello-Garcia M. *et al.*, 2015) έχει αναφερθεί για την αντιδιαβητική του δράση.

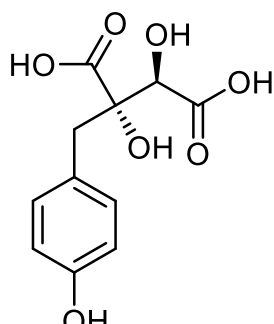
Κατά τους Guevara-Figueroa T. *et al.*, 2010 τα φαινολικά οξέα που ανιχνεύθηκαν στον καρπό της *Opuntia* spp. είναι τα εξής:

Φαινολικά Οξέα	Ονομασία κατά IUPAC
Βανιλλικό οξύ	3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζόλιο
Φερουλικό οξύ	3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ
<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	(E)-3(4-υδροξυφαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ
4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
Συριγγικό οξύ	4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ
Πρωτοκατεχικό οξύ	3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ
Καφεϊκό οξύ	3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ
Σαλικυλικό οξύ	2-υδροξυβενζοϊκό οξύ
Γαλλικό οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ
Σιναπικό οξύ	3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυκινναμωμικό οξύ

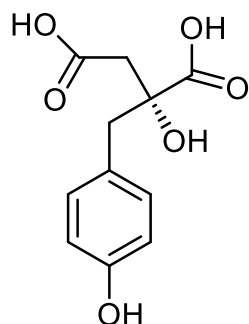
Πίνακας 4: Φαινολικά οξέα του καρπού

Οι μέχρι τώρα μελέτες ήταν κυρίως επικεντρωμένες στη χημική σύνθεση των κλαδώδιων και των καρπών (περικάρπιο, σάρκα) του φραγκόσυκου και ως εκ τούτου για τη χημειοσύνθεση των σπερμάτων έχουν γραφτεί τα λιγότερα (Chougui N. *et al.*, 2013) αλλά ακόμη και αυτά αναφέρονται στα ολικά φαινολικά και όχι σε μεμονωμένα φαινολικά οξέα. Πρόσφατα, η έρευνα κατευθύνθηκε προς τα φυσικά αντιοξειδωτικά που προέρχονται από σπέρματα (Cardador-Martínez A. *et al.*, 2010; Tlili N. *et al.*, 2011).

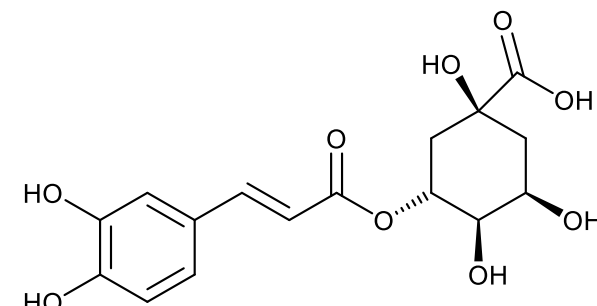
Μελέτη σε δύο κόκκινες ποικιλίες της *Opuntia*: *Opuntia macrorhiza* (Engelm.) και *Opuntia microdasys* (Lhem.) έδειξε ότι όλα τα φαινολικά οξέα που ανιχνεύθηκαν είναι υδροξυκινναμωμικά παράγωγα (Chahdoura H. *et al.*, 2014). Με βάση τα αποτελέσματα των Chahdoura H. *et al.*, 2014 τα προτεινόμενα παράγωγα είναι **γλυκοσυλιωμένα παράγωγα του καφεϊκού, του φερουλικού και του κουμαρικού οξέος**. Το φερουλικό οξύ ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα κυτταρικά τοιχώματα της οικογένειας Graminaceae των μονοκοτυλήδων και στις Solanaceae και Chenopodiaceae των δικοτυλήδων και προέρχεται βιοσυνθετικά μέσω της οδού του σικιμικού οξέος. Τέλος, όσον αφορά τα φαινολικά οξέα στα άνθη της *O.ficus-indica* οι πληροφορίες είναι και εδώ περιοσμένες καθώς δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, ενώ σύμφωνα με τους Ammar I. *et al.*, 2014 θα πρέπει να δοθεί έμφαση στην επίδραση των διαφορετικών διαλυτών και των διαφόρων μεθόδων εκχύλισης ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών οξέων.



Σχήμα 1: Πισιδικό οξύ



Σχήμα 2: Ευκομικό οξύ



Σχήμα 3: Χλωρογενικό οξύ

A.4.1.2 Φλαβονοειδή

A.4.1.2.1 Κατάταξη & Κύριες Χημικές Κατηγορίες

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ενώσεις, πολύ διαδεδομένες σε όλες τις οικογένειες των ανώτερων φυτών τόσο υπό μορφή γενινών όσο και υπό μορφή γλυκοσίδων. Το όνομά τους προέρχεται από τη λατινική λέξη *flavus* που σημαίνει κίτρινο, λόγω του ότι έχουν συχνά έντονο κίτρινο χρώμα, που ευθύνεται και για τον **χρωματισμό ανθέων και καρπών** στους φυτικούς οργανισμούς. Εκτός του **ρυθμιστικού τους ρόλου στο εσωτερικό των φυτών**, οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες με δράση **αντικαρκινική, καρδιαγγειοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική κ.ά.** (Ginestra G. *et al.*, 2009).

Τα φλαβονοειδή παράγονται βιοσυνθετικά από τις οδούς του σικιμικού και του οξικού οξέος. Είναι φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, που αποτελούνται από 15 τουλάχιστον άτομα άνθρακα, οι οποίες συνιστούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων. Ο βασικός σκελετός των ενώσεων αυτών αποτελείται, συγκεκριμένα, από δύο βενζολικούς πυρήνες που συνδέονται με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα και σχηματίζουν ένα σύστημα που είναι γνωστό ως C₆-C₃-C₆ (Pathak *et al.*, 1991).

Τα φλαβονοειδή μπορούν να ομαδοποιηθούν σε κατηγορίες, με βάση διάφορα κριτήρια. Έτσι χωρίζονται με βάση τον βαθμό κορεσμού, κατά τον οποίο διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, ανάλογα με το αν ο ετεροκυκλικός δακτύλιος είναι κορεσμένος ή όχι. Στην περίπτωση που είναι ακόρεστος τότε πρόκειται για ανθοκυάνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, ενώ όταν είναι κορεσμένος, μπορούμε να αναφερθούμε στις φλαβανόνες και τις φλαβάνες (Wink M., 2013).

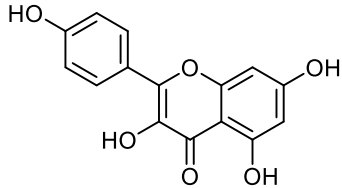
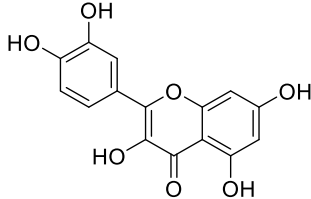
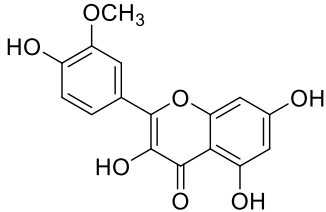
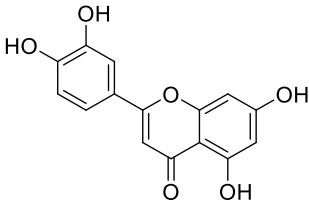
Το δεύτερο κριτήριο κατηγοριοποίησης των φλαβονοειδών είναι το μοριακό τους βάρος. Αν και τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι μονομερή υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός διμερών, τριμερών και γενικότερα πολυμερών π.χ. διφλαβονύλια. Παράλληλα κατηγοριοποιούνται και με βάση την βιοσυνθετική τους πορεία, αφού κάποια θεωρούνται ως κύρια προϊόντα π.χ. χαλκόνες, φλαβανόνες και άλλα ως παραπροϊόντα π.χ. ανθοκυάνες. Η θέση του Β δακτυλίου στη βενζο-γ-πυρόνη, είναι ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης και τέλος, η σύνδεση τους με τα σάκχαρα δημιουργούν τους γλυκοζίτες. Ανάλογα με τη θέση σύνδεσης του σακχάρου διαχωρίζονται σε Ο-γλυκοσίδες και C-γλυκοσίδες.

Στο γένος *Opuntia* spp. απαντώνται πολλά και διαφορετικά φλαβονοειδή. Η διακύμανση της ποσότητας των φλαβονοειδών οφείλεται στο **είδος**, στον **τύπο του ιστού** και στην **ωριμότητα**. Πρώτη αναφορά των φλαβονοειδών στο γένος έγινε με την απομόνωση της ισοραμνετίνης στα άνθη της *O. ficus-indica*. Παρόλο που οι πληροφορίες είναι ακόμη συγκεχυμένες λόγω των λιγοστών ερευνών, η **ισοραμνετίνη** αποτελεί το κύριο φλαβονοειδές για τα κλαδώδια της *O. ficus-indica* (Guevara-Figueroa T. *et al.*, 2010; Santos-Zea L. *et al.*, 2011). Όσον αφορά τον καρπό, οι Galati E.M. *et al.*, 2003 αναφέρουν ότι το βασικό φλαβονοειδές στη σάρκα είναι *γλυκοσίδης της ισοραμνετίνης* (ανιχνεύουν επίσης μικρές ποσότητες της φλαβόνης *λουτεολίνη*), εντούτοις κατά τον Kutí J.O, 2004 η *κερκετίνη* αποτελεί το κυριότερο φλαβονοειδές και ακολουθούν μικρές ποσότητες *καιμπεροόλης* και *ισοραμνετίνης*. Για τα σπέρματα οι πληροφορίες περιορίζονται μόνο στην ολική συγκέντρωση φλαβονοειδών χωρίς εξειδικευμένες αναφορές σε φλαβονοειδή. Ακόμη, έχουν απομονωθεί από γένη της οικογένειας Cactaceae 3-O-γλυκοσυλιωμένες φλαβονόλες (κερκετίνη, καιμπεροόλη, ισοραμνετίνη), διϋδροφλαβονόλες, φλαβονόλες και φλαβανόλες (Kutí J.O, 2004; Santos-Zea L. *et al.*, 2011; Moussa-Ayoub T. E. *et al.*, 2014).

Γλυκοσίδες φλαβονοειδών

Quercetin 3-O-rhamnosyl-glucoside	Isorhamnetin 3-O-rutinoside
Quercetin 3-O-xylosyl-rhamnosyl-glucoside	Kaempferol 3-O-rutinoside
Quercetin 3-O-dirhamnoside	Quercetin 3-O- arabinofuranoside
Kaempferol 3-O-(rhamnosyl -galactoside)-7-O-rhamnoside	Kaempferol 3-O-glucoside
Kaempferol 3-O-(rhamnosyl- glucoside)-7-O-rhamnoside	Kaempferol 7-O- neohesperidoside
Kaempferol 3-O-robinobioside-7-O-arabinofuranoside	Isorhamnetin 3-O-galactoside
Isorhamnetin 3-O-rhamnoside-7-O-(rhamnosyl-hexoside)	Isorhamnetin 3-O-glucoside
Quercetin 3-O-rutinoside	Kaempferol 3-O- arabinofuranoside
Quercetin 3-O-glucoside	Isorhamnetin+Xylose/Arabinose

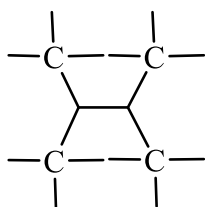
Πίνακας 5: Γλυκοσίδες φλαβονοειδών του φυτού *O.ficus-indica*

Φλαβονοειδή	Ονομασία κατά IUPAC	Φλαβόνες	Φλαβονόλες	Φυτικός ιστός
Καιμπφερόλη	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one			Περικάρπιο, Άνθη, Σάρκα
Κερκετίνη	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one			Άνθη, Σάρκα
Ισοραμνετίνη	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one			Άνθη, Κλαδώδια, Περικάρπιο, Σάρκα
Λουτεολίνη	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one			Σάρκα

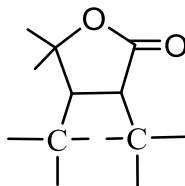
Πίνακας 6: Κυριότερα φλαβονοειδή στους διάφορους φυτικούς ιστούς της *O. ficus-indica*

A.4.1.2.2 Λιγνάνια

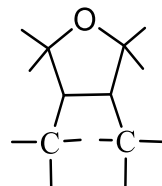
Τα *λιγνάνια* αποτελούν μια κλάση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στην ομάδα των διφαινολικών ενώσεων και προέρχονται από το συνδυασμό δύο μονάδων φαινυλοπροπανοειδών C₆-C₃ στα β και β' άτομα άνθρακα (Durazzo A. *et al.*, 2013). Τα διμερή που απαντώνται στη φύση και παρουσιάζουν άλλους τύπους δεσμών (εκτός β-β') ονομάζονται *νεολιγνάνια* (MacRae W.D. *et al.*, 1984). Τα λιγνάνια και τα νεολιγνάνια έχουν βρεθεί σ' ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών και είναι υπεύθυνα τόσο για τις φαρμακολογικές δράσεις όσο και για τους αμυντικούς μηχανισμούς που επάγουν. Προέρχονται από τη βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος ενώ σύμφωνα με τον τρόπο με τον οποίο ενσωματώνεται το οξυγόνο στο σκελετό μπορούν να αναγνωριστούν τέσσερις δομικές ομάδες γραμμικών λιγνανίων: Α) λιγνάνια (Σχήμα 4), Β) λιγνανολίδια (Σχήμα 5), C) μονοεποξυλιγνάνια (Σχήμα 6) και D) διεπολιγνάνια (Σχήμα 7). Περαιτέρω κυκλοποίηση οδηγεί σε μια μεγαλύτερη κατηγορία ενώσεων γνωστές ως κυκλολιγνάνια και απαντώνται είτε ως παράγωγα Ε) τετραϋδروναφθαλίνης (Σχήμα 8) είτε ως παράγωγα F) ναφθαλίνης (Σχήμα 9).



Σχήμα 4: Λιγνάνια



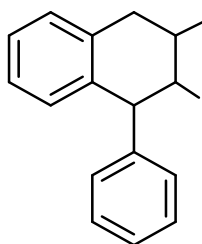
Σχήμα 5: Λιγνανολίδια



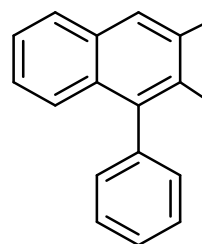
Σχήμα 6: Μονοεποξυλιγνάνια



Σχήμα 7: Διεπολιγνάνια



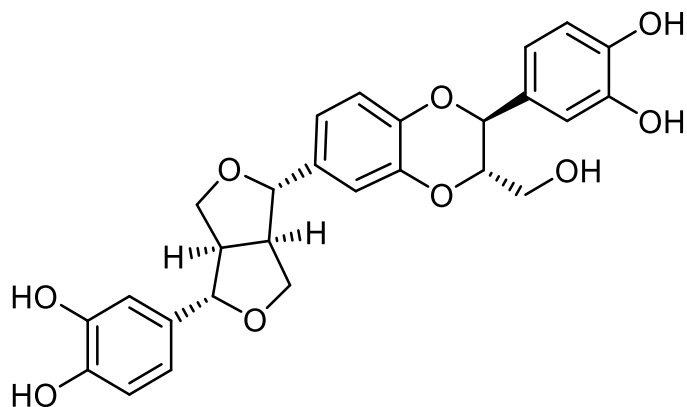
Σχήμα 8: Τετραϋδروναφθαλίνη



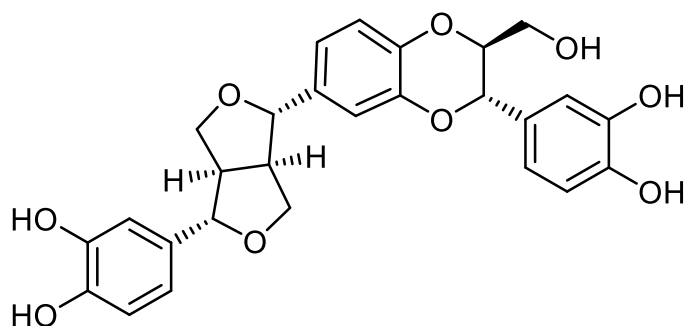
Σχήμα 9: Ναφθαλίνη

Οι κύριες πηγές λιγνανίων είναι τα έλαια των σπερμάτων (π.χ. λιναρόσπορος, σόγια, σπέρματα σταφυλιού, σουσάμι), δημητριακά (σιτάρι, σίκαλη, βρώμη, κριθάρι), όσπρια και διάφορα φρούτα και λαχανικά και παρουσιάζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω των δυνητικά **αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, οιστρογονικών** αλλά και **αντιοιστρογονικών** ιδιοτήτων τους.

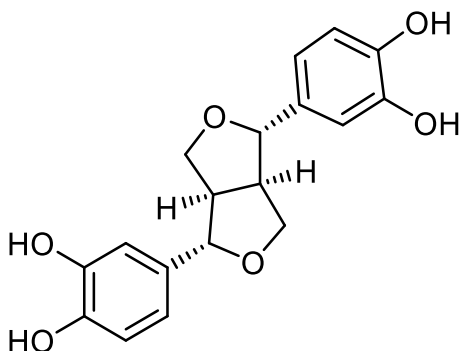
Από το συγγενικό είδος *Opuntia soehrensii* μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί τα ακόλουθα λιγνάνια: η [+-]-διϋδροδικωνιφεριόλη, η βαλανοφονίνη, η [+-]-λαρικισινόλη και η 1,2-δισ-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ-προπανο-1,3-διόλη (Shirota O. *et al.*, 1997) ενώ πρόσφατες μελέτες για την ηπατοπροστατευτική δράση των σπερμάτων της *O. ficus-indica* οδήγησαν στην απομόνωση των ακόλουθων λιγνανίων: 7S,8S-ισοαμερικανίνη Α, 7R,8R-ισοαμερικανοϊκό οξύ Α, 7R,8R-9'-Ο-μεθυλισοαμερικανόλη Α, 3,3'-δισδεμεθυλοπινореσινόλη, 7S,8S-ισοπρινσεπίνη και 7S,8S-πρινσεπίνη (Kim J.W. *et al.*, 2016).



Σχήμα 10: 7S,8S-πρινσεπίνη



Σχήμα 11: 7S,8S-ισοπρινσεπίνη

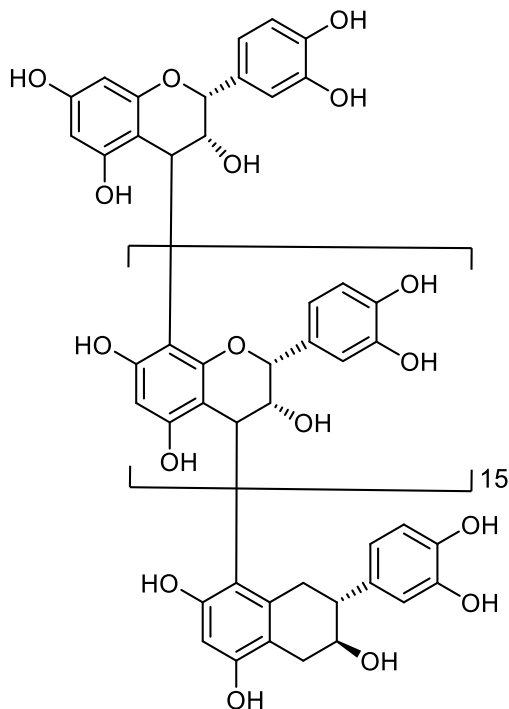


Σχήμα 12: 3,3'- δισδεμεθυλοπινореσινόλη

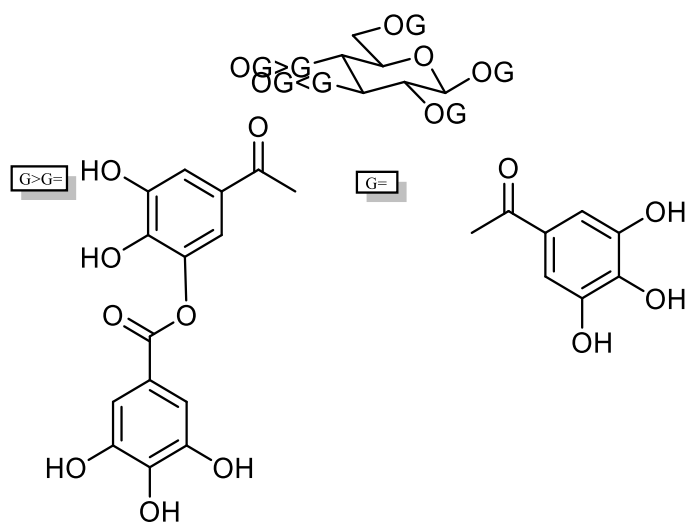
Τα λιγνάνια αποτελούν ξεχωριστές, δομικά και λειτουργικά, φυτοχημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως συστατικά καινοτόμων φαρμάκων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και για μια ισορροπημένη διατροφή, ενώ παράγονται σε μικρές ποσότητες στα φυτά (*Linum*, *Forsythia*, *Podophylum*, *Sesamum*), μερικά από τα οποία είναι απειλούμενα είδη (Chang T. S. 2012).

A.4.1.2.3 Ταννίνες

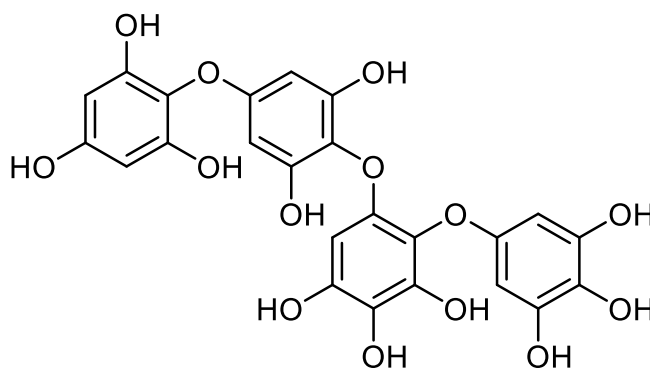
Οι ταννίνες είναι μεγάλου μοριακού βάρους μόρια ($MB > 500$) που απαντώνται στη φύση και έχουν πολλές φαινολικές ομάδες. Στα παρακάτω σχήματα απεικονίζεται η χημική ετερογένεια μεταξύ των ταννινών. Μερικές από τις τυπικές ενώσεις των τριών βασικών ομάδων των ταννινών είναι οι συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες) (Σχήμα 13), οι υδρολυόμενες ταννίνες (Σχήμα 14) και οι φλωροταννίνες (Σχήμα 15) (Hagerman A. *et al.*, 1998). Οι φλωροταννίνες βρίσκονται μόνο στα θαλάσσια καφέ φύκη και δεν καταναλώνονται ευρέως από τον άνθρωπο.



Σχήμα 13: Συμπυκνωμένη ταννίνη (κατεχίνη+επικατεχίνη)



Σχήμα 14: Υδρολυόμενη ταννίνη

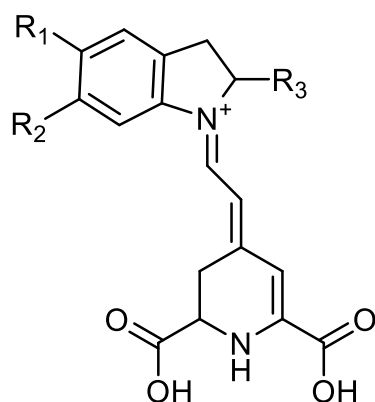


Σχήμα 15: Φλωροταννίνη

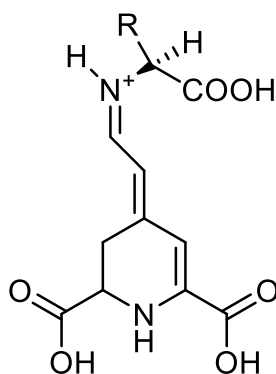
A.4.2 Μπεταλαΐνες

Οι **μπεταλαΐνες** είναι φυσικές χρωστικές που απαντώνται στα φυτά της τάξης Caryophyllales και τα χρώματά τους ποικίλουν από **κίτρινο** έως **ιώδες**. Τα φυτά που συσσωρεύουν μπεταλαΐνες δεν παράγουν ανθοκυάνες (Stintzing F.C. & Carle R., 2004) πιθανά λόγω της έλλειψης του ενζύμου συνθάση της ανθοκυανιδίνης, το οποίο συμμετέχει στο τελευταίο στάδιο του μονοπατιού των φλαβονοειδών. Εκτός από τα φυτά οικογενειών όπως οι Cactaceae, Chenopodiaceae κ.ά., μπεταλαΐνες παράγουν και μερικοί ανώτεροι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Amanita* και *Hygrocybe* (Vasil Georgiev *et al.*, 2008). Οι φυσικές αυτές χρωστικές χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα (βαφή ρούχων, ζωγραφική, καλλυντικά) αλλά και σήμερα στα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά καθώς και για την πρόσφατα αποδεδειγμένη υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση.

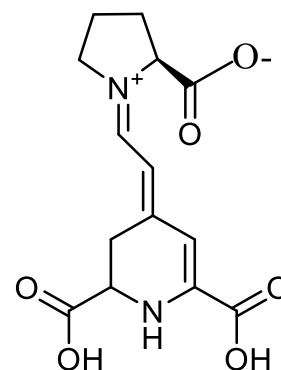
Η χημική δομή των μπεταλαΐνών βασίζεται στο **μπεταλαμικό οξύ** και ανάλογα με τα συστατικά που είναι συνδεδεμένα στην κύρια δομή προκύπτουν οι **μπετακυανίνες** και οι **μπεταξανθίνες**. Οι μπεταξανθίνες είναι προϊόντα συμπύκνωσης του μπεταλαμικού οξέος με αμινοξέα ή αμίνες και οι μπετακυανίνες είναι προϊόντα ένωσης του μπεταλαμικού οξέος και της 3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνης (DOPA) (Castellar R. *et al.*, 2003). Οι κύριες εμπορικές πηγές μπεταλαΐνών είναι κόνεις και ξηρά εκχυλίσματα του *Beta vulgaris* και εκχυλίσματα της *Opuntia ficus-indica*.



Σχήμα 16: Μπετακυανίνες



Σχήμα 17: Μπεταξανθίνες



Σχήμα 18: Ιντικαξανθίνη

Στην *O. ficus-indica* μπεταλαΐνες απομονώνονται από το **περικάρπιο** και τη **σάρκα** του καρπού, το χρώμα των οποίων είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού δύο μπεταλαΐνών, της μωβ-κόκκινης **μπετανίνης** και της κιτρινο-πορτοκαλί **ιντικαξανθίνης** (Butera D. *et al.*, 2002). Παρακάτω δίνεται πίνακας με τις πιο σημαντικές μπεταλαΐνες που έχουν απομονωθεί από το φραγκόσυκο.

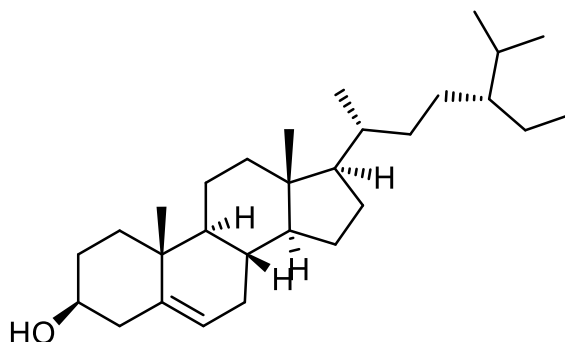
Μπεταξανθίνες		Μπετακυανίνες	
Κοινή ονομασία	IUPAC	Κοινή ονομασία	IUPAC
Πορτουλαξανθίνη i	Hydroxiprolin-Bx	Μπετανίνη	Betanidin-5-O--glucoside
Πορτουλαξανθίνη iii	Glycine-Bx	Ισομπετανίνη	Isobetanidin-5-O--glucoside
Βουλγαξανθίνη I	Glutamine-Bx	Φυλλοκακτίνη	6'-O-malonylbetanin
Ιντικαξανθίνη	Proline-Bx	Γκομφρενίνη I	Betanidin-6-O--glucoside
Μουσκαουρίνη VII	Histidine-Bx	Νεομπετανίνη	14,15-dehydrobetanin
Βουλγαξανθίνη iv	Leucine-Bx		

Πίνακας 7: Μπεταλαΐνες της *O. ficus-indica*

A.4.3 Φυτοστερόλες

Οι φυτοστερόλες προέρχονται από την οδό του μεβαλονικού οξέος, αποτελούν μόρια παρόμοια δομικά με τη χοληστερόλη, εκτός από το γεγονός ότι περιέχουν πάντοτε κάποιο υποκαταστάτη στη θέση C-24 (Ling W.H. & Jones P.J.H., 1995). Έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πρόσφατα, εξαιτίας του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν, οι στερόλες προστέθηκαν στα φυτικά έλαια και αυτός ο τύπος προϊόντος είναι τώρα διαθέσιμος και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την αρτηριακή LDL-χοληστερόλη κατά 10-15% (Jones P.J.H. *et al.*, 2000). Η περιεκτικότητα σε φυτοστερόλες στα φυτικά έλαια χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό της ποιότητας των ελαίων (El Mannoubi I. *et al.*, 2009).



Σχήμα 19: β-Σιτοστερόλη

Φυτοστερόλες	
Χοληστερόλη	Σιτοστανόλη
Καμπεστερόλη	Δ5-Αβεναστερόλη
Στιγμαστερόλη	Δ7-Αβεναστερόλη
β-Σιτοστερόλη	Λανοστερόλη

Πίνακας 8: Φυτοστερόλες της *O. ficus-indica*

A.5 Χημικό προφίλ των σπερμάτων της *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Τα σπέρματα της *O. ficus-indica* καταλαμβάνουν το 10-15% περίπου της σάρκας του καρπού και αποτελούν σημαντική πηγή *φυτικών ινών*, *φαινολικών ενώσεων*, *φλαβονοειδών*, *πολυακόρεστων λιπαρών οξέων* (PUFAs) και *τοκοφερολών*. Συνήθως απορρίπτονται ως απόβλητα μετά την εξαγωγή του πολτού του καρπού αλλά η χημική τους σύνθεση έδειξε ότι υπάρχουν δυνατότητες για περαιτέρω χρησιμοποίησή τους ως **συμπλήρωμα διατροφής**, στη **βιομηχανία των καλλυντικών** αλλά και σε άλλα προϊόντα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην **αγροβιομηχανία** (Pantaleón *et al.*, 2009; Prieto-García *et al.*, 2006). Επιπλέον, τα σπέρματα αποτελούν **πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή του ελαίου τους (Cardador-Martínez *et al.*, 2011; Magloire *et al.*, 2006).

A. Το έλαιο των σπερμάτων

Το έλαιο αποτελεί το 7-15% του συνολικού βάρους των σπερμάτων (Stintzing C. *et al.*, 2000) ενώ ο υψηλός βαθμός ακορεστότητας εξηγείται από το υψηλό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (80%). Η περιεχόμενη ποσότητα σε έλαιο είναι μικρότερη σε σχέση με την ποσότητα ελαίου που παραλαμβάνεται από τα σπέρματα βαμβακιού (15-24%), σόγιας (17-21%), σταφυλιού (6-20%) και ελιάς (20-25%) (Matthäus B. & Özcan M. M., 2011).

Η ιδιαίτερη σύνθεση του ελαίου σε λιπαρά οξέα καθιστά την αξία των σπερμάτων του γένους *Opuntia* συγκρίσιμη με τα σπέρματα του σταφυλιού, του καλαμποκιού και του ηλίανθου, η αξία των οποίων είναι μεγαλύτερη από αυτή του αμύγδαλου (Labuschagne M.T. & Hugo A., 2010; Feugang J.M. *et al.*, 2006; Carreras M.E. *et al.*, 1997). Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα είναι το λινολεϊκό (56-77%), το παλμιτικό, το ελαϊκό και οι στερόλες του η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη και η στιγμαστερόλη (Ramadan M.F. & Mörsel J.T., 2003; El Mannoubi I. *et al.*, 2009), η παρουσία των οποίων καταδεικνύει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα καλλυντικών αλλά και ως πηγή βρώσιμου ελαίου (Matthäus B. & Özcan M.M., 2011; Labuschagne M.T. & Hugo A., 2010). Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται είναι μυριστικό, παλμιτικό, παλμιτολεϊκό, στεαρικό, νεοδεκανοϊκό, αραχιδονικό (Tekin A. *et al.*, 2003).

Οι τοκοφερόλες είναι βιολογικά πολύ ενεργά φυσικά αντιοξειδωτικά ενώ η κύρια βιοχημική τους λειτουργία πιστεύεται ότι είναι η προστασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα παράγωγα τοκοφερόλης που εντοπίζονται στο έλαιο των σπερμάτων είναι οι α-, γ- και δ- τοκοφερόλες με την β-τοκοφερόλη να είναι απύσασα. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε αντιπροσωπεύει το 0.04% του ελαίου με την γ-τοκοφερόλη να αποτελεί το κύριο συστατικό, αντιπροσωπεύοντας το 94% της συνολικής περιεκτικότητας σε βιταμίνη Ε και τη δ-τοκοφερόλη μόλις το 3.4% (El Mannoubi I. *et al.*, 2009). Συγκριτικά με τα αντίστοιχα ποσοστά τοκοφερολών στα άνθη και τα κλαδώδια, τα ποσοστά στα σπέρματα είναι πολύ μεγαλύτερα και αυτό ίσως οφείλεται στην βιοχημική απάντηση που ενεργοποιείται από τα υψηλά ποσοστά PUFA (εφόσον οι τοκοφερόλες θεωρούνται αποτελεσματικά λιπόφιλα αντιοξειδωτικά) (Chahdoura H. *et al.*, 2014).

B. Δευτερογενείς μεταβολίτες των σπερμάτων

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα απολιπανθέντα σπέρματα της *O. ficus-indica* περιλαμβάνουν κυρίως *παράγωγα φαινολικών οξέων* και *φλαβονοειδή*. Υψηλές είναι οι συσχετίσεις μεταξύ του φαινολικού περιεχομένου των απολιπανθέντων εκχυλισμάτων των σπερμάτων και της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Chougui N. *et al.*, 2013; Ennouri M. *et al.*,

2006). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι τα απόβλητα των απολιπανθέντων σπερμάτων εξακολουθούν να αποτελούν σημαντική πηγή δραστικών συστατικών (Πίνακας 9).

A.6 Συγκεντρωτικός πίνακας σημαντικότερων συστατικών της *O. ficus-indica*

Φυτικός ιστός	Κύριο συστατικό	Βιολογική δράση
Άνθη	Gallic acid	
	Quercetin 3-O-Rutinoside	
	4 Kaempferol 3-O-Rutinoside	Αντιοξειδωτική
	5 Quercetin 3-O-Glucoside	Αντιφλεγμονώδης
	6 Isorhamnetin 3-O-Robinoside	
	7 Isorhamnetin 3-O-Galactoside	
	8 Isorhamnetin 3-O-Glucoside	
	9 Kaempferol 3-O-Arabinoside	
Σάρκα	Quercetin	
	Isorhamnetin	Αντιοξειδωτική
	Kaempferol	Νευροπροστατευτική
	Luteolin	Ηπατοπροστατευτική
	Isorhamnetin glycosides	Υπογλυκαιμική
Σπέρματα	Kaempferol	Κατά του έλκους
	Feruloyl-sucrose isomer 1	Υποχοληστερολαιμική
	Feruloyl-sucrose isomer 2	Αντιοξειδωτική
Περικάρπιο	Sinapoyl-diglucoside	Ηπατοπροστατευτική
	Kaempferol	
	Quercetin	
	Isorhamnetin	
Κλαδώδια	Gallic acid	
	Coumaric acid	
	3,4-dihydroxybenzoic acid	
	4-hydroxybenzoic acid	
	Ferulic acid	Αντιοξειδωτική
	Salicylic acid	Αντιμικροβιακή
	Isoquercetin	Αντιφλεγμονώδης
		Υπογλυκαιμική
	Isorhamnetin-3-O-glucoside	
	Nicotiflorin	
	Rutin	
	Narcissin	

Πίνακας 9: Τα σημαντικότερα συστατικά ανά φυτικό ιστό (El-Mostafa K. *et al.*, 2014)

A.7 Χρήσεις και Βιολογικές Δράσεις της *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

A.7.1 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Χρήσεις της *O. ficus-indica* (L.) Mill.

Η *O. ficus indica* είναι ένα σημαντικό είδος κάκτου παγκοσμίως με μακρά ιστορία ανθρώπινης χρήσης. Χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια στο Μεξικό όπου τα νεαρά κλαδώδια (*nopalitos*) και τα φρούτα καταναλώνονται ως *τρόφιμα*, χρησιμοποιούνται ως *φάρμακο*, ως *βαφή* αλλά και ως *αντικείμενο θρησκευτικών και μαγικών τελετών* (Mondragon C. & Pere S., 2003). Η ιθαγενική φυλή Sonora χρησιμοποιούσε τη σάρκα των φρούτων για την αντιμετώπιση επίμονων διαρροιών, αγρότες της Χαβάη έχουν χρησιμοποιήσει τη γέλη ως καθαρτικό (Pimienta-Barrios E., 1992) αλλά και αρκετοί άλλοι, όπως οι Αζτέκοι, τη χρησιμοποίησαν για ιατρικούς σκοπούς. Από τις αρχές της δεκαετίας του '50, η φραγκοσυκιά έχει εξαπλωθεί και σήμερα καλύπτει περίπου 66.000 εκτάρια των εμπορικών φυτειών στο Μεξικό ενώ καλλιεργείται σε περίπου 20 χώρες ανά την υφήλιο.

Παρά το γεγονός ότι τα είδη του γένους *Opuntia* καταναλώνονται σήμερα κυρίως για τις θρεπτικές τους ιδιότητες (Stintzing F.C. & Carle R., 2005; Feugang J.M. *et al.*, 2006), τα φρούτα και τα κλαδώδια έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική για την αντιμετώπιση του πυρετού, εγκαυμάτων, τραυμάτων, οιδημάτων αλλά και για το βρογχικό άσθμα, την υπέρταση, τη δυσπεψία και το διαβήτη τύπου II. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε στη βιομηχανία καλλυντικών, ως πηγή για τα φυσικά χρώματα αλλά και για την παραγωγή οικοδομικών υλικών και ζωοτροφών (Matsuhiro B. *et al.*, 2006).

Μια άλλη σημαντική παραδοσιακή χρήση των κλαδωδίων της *Opuntia* sp. είναι η *παραγωγή του καρμινικού οξέος*, μία φυσική χρωστική που χρησιμοποιήθηκε από τους ιθαγενείς του Μεξικού (López-González, 2011). Το καρμινικό οξύ παράγεται από ένα έντομο (*Dactylopius coccus*) που είναι γνωστό ως *κοχινεάλη cochineal* ή *cochinilla de nopal* και είναι ένα παράσιτο που προσβάλλει πολλά είδη κάκτων που ανήκουν σε δύο στενά συνδεδεμένα γένη, τα *Opuntia* και *Nopalea*. Τα θηλυκά αποξηραμένα έντομα που αποτελούν και τη δρόγη κοχινεάλη έχουν αναγνωριστεί σε όλο τον κόσμο από το 16^ο αιώνα αποτελούν την πηγή της πολύτιμης κόκκινης χρωστικής ουσίας, της οποίας το κύριο συστατικό είναι το *καρμινικό οξύ* (Donkin R.A., 1977). Η κοχινεάλη ήταν γνωστή στην εποχή της αποικιοκρατίας ως *nochestli* ή *grana* στην Ισπανία και ως *macno* ή *magno* στις Άνδεις. Το 19^ο αιώνα η παραγωγή του καρμινικού οξέος αντιπροσώπευε το 90% των συνολικών εξαγωγών των Κανάριων Νήσων, γεγονός που μειώθηκε σημαντικά μέχρι τη δεκαετία του '80 ως αποτέλεσμα της παραγωγής φθηνότερων συνθετικών χρωστικών.

Ένα άλλο κοκκοειδές που αναπτύσσεται στη φραγκοσυκιά, αποξηραίνεται και γίνεται σκόνη με κόκκινο χρώμα είναι το *Coccus cacti*. Η χρωστική αυτή είναι η μόνη χρωστική τροφίμων (E120) που επιτρέπεται στην παραγωγή λουκάνικων, ποτών, ειδών ζαχαροπλαστικής κτλ. Επιπλέον, η κίτρινη χρωστική ινδικαξανθίνη και η ερυθρο-ιώδης βετανίνη χρησιμοποιούνται σαν χρωστικές στη βιομηχανία τροφίμων.

Σήμερα, τα φρούτα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων όπως χυμοί, αλκοολούχα ποτά, μαρμελάδες, για την παραγωγή φυσικών γλυκαντικών αλλά και για την παραγωγή πρωτεΐνης σε στερεό υπόστρωμα ζύμωσης (Ennouri M. *et al.*, 2005).

Επιπροσθέτως, στην κοσμητολογία ο χυμός των κλαδωδίων αποτελεί πλέον συστατικό σε σαμπουάν, λοσιόν, σαπούνια και αντιηλιακά και είναι γνωστό για τη βελτίωση της ανάπτυξης

των μαλλιών. Ακόμη, η πηκτίνη που εξάγεται από τα φρούτα περιέχει αρκετό γαλακτουρονικό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα καλλυντικά. Τέλος, η υψηλή ικανότητα συγκρατήσεως νερού τον καθιστά σημαντικό γαλακτωματοποιητή (Gupta R.C., 2012).

A.7.2 Βιολογικές δράσεις

➤ Αντιοξειδωτική δράση

Οι πολυφαινόλες και κυρίως τα φλαβονοειδή είναι σημαντικές λόγω της συμβολής τους στην οργανοληπτική ποιότητα των φρούτων και λόγω των θρεπτικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους. Ο χυμός φραγκόσυκου είναι καλή πηγή βιταμίνης C και αντιοξειδωτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένου των βεταλαϊνών, του φερουλικού οξέος και μερικών φλαβονολών όπως η ρουτίνη και τα παράγωγα της ισοραμεντίνης. Αυτά τα συστατικά είναι κυρίως υδατοδιαλυτοί γλυκοσίδες και ως εκ τούτου ο χυμός και το υδατικό κλάσμα έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το οργανικό κλάσμα (Galati E.M. *et al.*, 2003). Παρόλο που δεν υπάρχει συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη για φαινολικές ενώσεις, η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία επέδειξε τα 100mg φλαβονοειδών/ημέρα ως την κατάλληλη δόση για την πρόληψη του καρκίνου και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Με βάση την παραπάνω συνιστώμενη δόση η κατανάλωση του φραγκόσυκου συνεισφέρει σε ποσοστό 43% και 68% ασκορβικού οξέος και ολικών φαινολικών αντίστοιχα. Όσον αφορά τα ιχνοστοιχεία, το Mn και το Cr έχουν συσχετισθεί με την προστασία κατά της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μεμβρανών λόγω της παρουσίας των ελεύθερων ριζών (Medina Díaz E.M. *et al.*, 2006).

Επιπλέον, το αιθανολικό εκχύλισμα των κλαδωδίων της *Opuntia ficus indica* var. *saboten* επέδειξε μία εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αναστολή του λινολεϊκού οξέος σε διαφορετικά συστήματα προσδιορισμού (ρίζες DPPH, ανιόντα υπεροξειδίου $O_2^{\cdot-}$, ρίζες υδροξυλίου $OH^{\cdot}$). Επίσης, βρέθηκε αποτελεσματικό στην προστασία του πλασμιδιακού DNA και στην προστασία κυττάρων σπλήνας ποντικού έναντι της οξειδάσης της γλυκόζης. Επιπροσθέτως, το αιθανολικό εκχύλισμα των κλαδωδίων χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε φαινολικά (180.3 mg/g), στα οποία δραστηρικά συστατικά πιθανών να οφείλονται και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος (Lee E.H. *et al.*, 2003). Τέλος, ο αποπολυμερισμός των πολυσακχαριτών επέδειξε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Chaouch M. *et al.*, 2015).

Όσον αφορά τα σπέρματα της *Opuntia* spp., τα υψηλά επίπεδα λινολεϊκού οξέος, -τοκοφερολών και φαινολικών οξέων και η αντίστοιχη υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση είναι χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν εισαχθούν σε καινοτόμες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (Chahdoura H. *et al.*, 2014).

➤ Δράση κατά του έλκους

Τα κλαδώδια χρησιμοποιούνται από τη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών του γαστρικού βλεννογόνου. Σε μελέτη που έγινε, τα ποντίκια που έλαβαν λυοφιλοποιημένα κλαδώδια παρουσίασαν σημαντικά προστατευτικά αλλά και θεραπευτικά αποτελέσματα έναντι της βλάβης που προκαλεί η αιθανόλη. Η κολλώδης ουσία των κλαδωδίων αποτελείται κυρίως από αραβινογαλακτάνη και γαλακτουρονικό οξύ τα οποία δρουν συνεργιστικά με άλλους αμυντικούς παράγοντες του γαστρικού βλεννογόνου (Galati E.M. *et al.*, 2001).

Σε διαφορετικά πειράματα χορηγήθηκε προληπτικά σε ποντίκια χυμός φραγκόσυκου έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί το επαγόμενο από αιθανόλη έλκος και παρατηρήθηκε κανονική διάταξη

της βλέννας και όχι κατεστραμμένα κύτταρα. Το πολυφαινολικό κλάσμα που είναι υπεύθυνο γι' αυτή τη δράση αποτελείται από ρουτίνη και παράγωγα ισοραμνετίνης. Η απορρόφησή τους εξηγεί την προστατευτική τους δράση καθώς τα παράγωγα γλυκοσιδών δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο εξαιτίας της υδρόφιλης φύσης τους και του σχετικά υψηλού μοριακού τους βάρους. Επιπλέον, τα άγλυκα μπορούν να απελευθερωθούν από την εντερική μικροχλωρίδα, η οποία μπορεί να διασπάσει τον δακτύλιο της πυρόνης παράγοντας φαινυλοξικό, φαινυλοπροπιονικό οξύ και άλλα παράγωγα ενώ η ρουτίνη μεταβολίζεται σε κερκετίνη. Τα φλαβονοειδή διεγείρουν την παραγωγή προσταγλανδινών σε απομονωμένα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου και ως εκ τούτου οι φλαβονόλες του χυμού ασκούν προστατευτική δράση μέσω αυτών (Galati E.M. *et al.*, 2003; Kim S.H. *et al.*, 2012).

Εκτός από τα φρούτα και τα κλαδώδια που χρησιμοποιούνταν στη μεξικάνικη λαϊκή ιατρική, πρόσφατα ερευνήθηκε και το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών της *O. ficus-indica f.inermis* ως προς το περιεχόμενό της σε φαινολικά και φλαβοειδή αλλά και τις γαστροπροστατευτικές της δράσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν δράση κατά του έλκους η οποία φαίνεται να οφείλεται στα φαινολικά και τα φλαβονοειδή (Alimi H. *et al.*, 2010).

➤ Επουλωτική δράση

Η επουλωτική δράση του κλαδώδιων της *Opuntia ficus-indica* είναι γνωστή από την παραδοσιακή ιατρική. Το μεθανολικό, το υδατικό κ.ά. (βουτανολικό, εξάνιου, οξικού αιθυλεστέρα) εκχυλίσματα των κλαδώδιων μελετήθηκαν για την επουλωτική τους δράση και έδωσαν αξιόλογα αποτελέσματα (Park E.H. & Chun M.J., 2000). Σε πειράματα που έγιναν για τη δράση κατά του έλκους αλλά και σε συγκεκριμένο πείραμα για την επουλωτική δράση των πολυσακχαριτών των κλαδώδιων τα αποτελέσματα έδειξαν ευεργετική επίδραση και ανάπλαση των δερματικών κυτταρικών αλλοιώσεων. Επισημαίνεται ότι η δράση είναι πιο έντονη για τους πολυσακχαρίτες με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 10^4 – 10^6 Da απ'ότι αυτών με μοριακό βάρος $>10^6$ Da. Υποθέτει κανείς ότι η λεπτή δομή των πολυσακχαριτών αυτών καθώς επίσης και οι ιδιαίτερες υγροσκοπικές, ρεολογικές και ιξωδοελαστικές ιδιότητές τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση (Trombetta D. *et al.*, 2006).

➤ Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα πειράματα των Park *et al.* (2001) έδειξαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα των καρπών και κλαδώδιων της *O. ficus-indica* έχουν αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση έναντι γαστρικών βλαβών ποντικών. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα κατέστειλαν τις συσπάσεις που προκλήθηκαν από τη χορήγηση οξικού οξέος καθώς επίσης και του οιδήματος των ποντικών. Συγκρινόμενα με τη δράση της ασπιρίνης τα αιθανολικά εκχυλίσματα επέδειξαν ισάξια αποτελεσματική δράση. 300 mg/kg και 600mg/kg αιθανολικού εκχυλίσματος φραγκόσκου προκάλεσαν 58.1% μείωση του αριθμού των συσπάσεων. Στις αντίστοιχες δόσεις αιθανολικού εκχυλίσματος κλαδώδιων η μείωση των συσπάσεων άγγιξε τα ποσοστά 37.9% και 56.3% ενώ για την ασπιρίνη το ποσοστό μείωσης των συσπάσεων ανέρχεται στο 40%. Τέλος, τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων και κατέστειλαν την απελευθέρωση β-γλυκουρονιδάσης, ενός λυσοσωμικού ενζύμου.

➤ **Νευροπροστατευτική δράση**

Κατά τον Dok-Go H. *et al.*, 2002 τα φλαβονοειδή των φρούτων και κλαδώδιων κερκετίνη, διϋδροκερκετίνη και η ισοραμνετίνη εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση έναντι οξειδωτικών βλαβών που προκαλούνται σε καλλιέργειες κυττάρων. Επιπλέον, η ισοραμνετίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη νευροπροστατευτική δράση σε σχέση με τα δύο άλλα δραστικά αντιοξειδωτικά.

Οι πολυσακχαρίτες των κάκτων (CP) είναι μερικά από τα πιο δραστικά συστατικά των *Opuntia* spp. Αποτελέσματα ερευνών (Huang X. *et al.*, 2008; Huang X. *et al.*, 2009) έδειξαν ότι οι CP προστατεύουν από οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς και από βλάβες στον εγκέφαλο ποντικών λόγω έλλειψης οξυγόνου ή γλυκόζης. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι ο μηχανισμός νευροπροστασίας από CP βασίζεται στην αναστολή του οξειδωτικού στρες λόγω ελεύθερων ριζών και μείωση της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων.

➤ **Αντι-ϊική δράση**

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από τον Ahmad *et al.*, 1995 έδειξε ότι χορήγηση εκχυλίσματος κλαδώδιων *O. streptacantha* σε ποντίκια, άλογα και ανθρώπους αναστέλλει την αντιγραφή DNA και RNA ιών όπως ο ιός του έρπητα, ο ιός της γρίπης τύπου A και ιός HIV-1. Από τους ίδιους ερευνητές αναφέρθηκε και η αδρανοποίηση των εξωκυτταρικών ιών, ωστόσο, τα δραστικά ανασταλτικά συστατικά του εκχυλίσματος του συγκεκριμένου είδους κάκτου δεν έχουν μέχρι στιγμής διερευνηθεί περαιτέρω (Feugang J.M. *et al.*, 2006).

➤ **Αντικαρκινική δράση**

Υδατικά εκχυλίσματα φραγκόσυκου χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα με κύτταρα αλλά και σε ποντίκια για να διερευνηθεί η αντικαρκινική τους δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα (επιθηλιακά και καρκινικά) είχαν μια σημαντική αύξηση απόπτωσης και αναστολής της ανάπτυξής τους με τρόπο δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο. Το εκχύλισμα επηρέασε τον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας τη φάση G1 και μειώνοντας τις φάσεις G2 και S (Zou D.M. *et al.*, 2005; Feugang J.M. *et al.*, 2006).

➤ **Αντιδιαβητική δράση**

Τα πρώτα συμπεράσματα για την υπογλυκαιμική δράση κάκτου του γένους *Opuntia* (*O. streptacantha*) δόθηκαν από τους Ibanez-Camacho R. & Roman-Ramos R. το 1978. Τα αποτελέσματα μιας κλινικής έρευνας σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη μη ινσουλινοεξαρτώμενους, μετά από χορήγηση κλαδώδιων *O. ficus-indica* παρουσίασαν μια σημαντική μείωση της γλυκόζης του αίματος (Frati A. *et al.*, 1990). Τέτοιου είδους αποτελέσματα ερευνών θα μπορούσαν να εξηγηθούν από ένα μηχανισμό που μειώνει την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης (fiber effect). Στόχος μιας άλλης έρευνας των Alarcon-Aguilar F.J. *et al.*, 2003 ήταν να προσδιορίσει εάν οι πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από την *O. ficus-indica* και την *O. streptacantha* παρουσιάζουν υπογλυκαιμική δράση σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν πολυσακχαρίτες της *O. ficus-indica* χορηγηθούν ενδοπεριτοναϊκά σε υγιείς ποντικούς ή σε ασθενικούς (προκαλούμενος σακχαρώδης διαβήτης με alloxan) δεν δείχνουν υπογλυκαιμική δράση. Ωστόσο, η ενδοφλέβια χορήγηση πολυσακχαριτών της *O. ficus indica* σε ποντικούς με προσωρινή υπεργλυκαιμία υπέδειξε αντιυπεργλυκαιμική δράση (El Razek F.H.A. *et al.*, 2012).

➤ **Ηπατοπροστατευτική**

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Ncbi S. *et al.*, 2007 χορηγήθηκε εκχύλισμα κλαδώδιων σε ποντικούς με ήπαρ που είχε υποστεί βλάβες από το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos. Τα συμπεράσματα αποκαλύπτουν ότι το ήπαρ, παρουσία του εκχυλίσματος κλαδώδιων *O. ficus-indica*, προστατεύεται από το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΥΛΙΚΑ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ

B.1

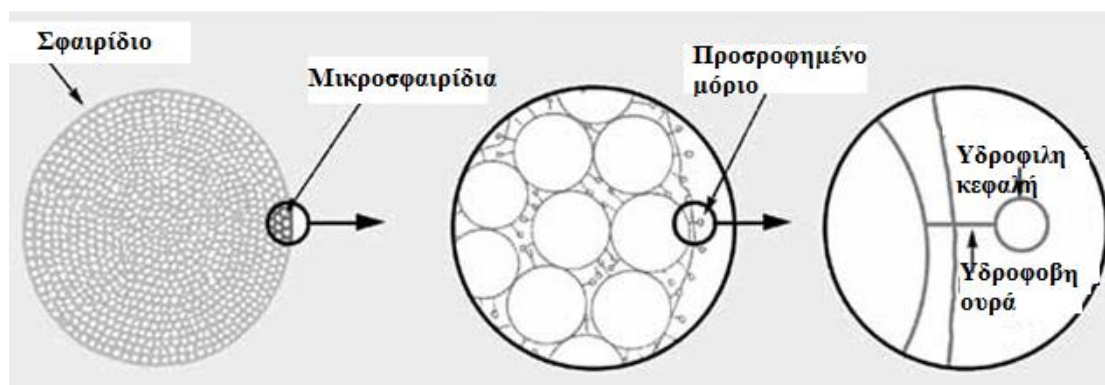
B.1.1 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπέρηχους (UltraSound-Assisted Extraction-USAE)

Ο μηχανισμός της εκχύλισης με υπερήχους περιλαμβάνει δύο κύριους τύπους φαινομένων: α) τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και β) τη διάχυση των περιεχομένων του κυττάρου στον διαλύτη. Ο υπέρηχος είναι ένας ειδικός τύπος ηχητικού κύματος που δεν γίνεται αντιληπτό από την ανθρώπινη ακοή (20kHz-100MHz) (Azmir J. *et al.*, 2013). Το προς υπό μελέτη δείγμα τοποθετείται με τον κατάλληλο διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Ο τρόπος δράσης των υπερήχων περιλαμβάνει τη δημιουργία φυσαλίδων και την κατάρρευσή τους. Η αναταραχή που ακολουθεί την κατάρρευση των φυσαλίδων δημιουργεί διάβρωση στα υλικά που βρίσκονται μέσα στο διαλύτη (Mason T.J. & Peters D., 2011). Οι πιο κοινοί παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της εκχύλισης είναι οι ιδιότητες του τμήματος του προς εκχύλιση φυτού, ο διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος (Hernández Y. *et al.*, 2009).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων αποτελούμενο από ένα δοχείο inox, με εσωτερικές διαστάσεις $23 \times 13,7$ εκατοστά και μέγιστη χωρητικότητα των 3 L, εξοπλισμένη με ένα μετατροπέα στη βάση της κανάτας που λειτουργεί σε συχνότητα 25 KHz, με μέγιστη ισχύ εισόδου 150 W.

B.1.2 Προσρόφηση σε ρητίνη Amberlite XAD-4

Οι ρητίνες προσροφήσεως είναι υψιμοριακές πολυμερείς οργανικές ενώσεις, αδιάλυτες στο νερό και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Αποτελούνται από σκληρά σφαιρίδια με ποικίλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος των σφαιριδίων, η πολικότητα, η χημική συγγένεια και η χωρητικότητα. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την απομάκρυνση χημικών και φαρμακευτικών ουσιών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε XAD-4 για την απομάκρυνση των σακχάρων και τον εμπλουτισμό του αρχικού υδραλκοολικού εκχύλισματος.



Εικόνα 8: Μηχανισμός προσρόφησης XAD-4.

Η Amberlite XAD-4 είναι μια μη ιονική πολυμερική ρητίνη που αποτελείται από αλυσίδες πολυστυρενίου με σταυροειδείς δεσμούς με διβινυλοβενζόλιο και στην επιφάνειά της προσροφώνται τα φαινολικά συστατικά σχετικά μικρού μοριακού βάρους. Ο μηχανισμός της (Εικόνα 8) έγκειται στην προσρόφηση του μη ιονικού (υδρόφοβου) τμήματος της διαλυμένης οργανικής ουσίας στην επιφάνεια της ρητίνης με δυνάμεις αλληλεπίδρασης van der Waals (Ku Y. & Lee K.C., 2000). Μετά τη δέσμευση (προσρόφηση) των φαινολικών συστατικών ακολουθεί αποδέσμευση (εκρόφηση) με κατάλληλους πολικούς διαλύτες. Σημαντικό πλεονέκτημα των ρητινών έναντι άλλων προσροφητικών μέσων είναι η επαναχρησιμοποίησή τους μετά από αναγέννηση.

B.1.3 Αναλυτικές Χρωματογραφικές Μέθοδοι

Για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων και των καθαρών ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χρωματογραφικές τεχνικές.

➤ **Η Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC)** είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για τον γρήγορο έλεγχο μιγμάτων και καθαρών ουσιών. Χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με γέλη πυριτίου πάχους στιβάδας 0.1 mm (Silica gel 60 F₂₅₄-Merck), η οποία αποτελεί τη στατική φάση. Το προς εξέταση δείγμα τοποθετείται λίγο πάνω από τη βάση της πλάκας σε μορφή κηλίδας και στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται μέσα σε ένα θάλαμο ανάπτυξης, με τέτοιο τρόπο ώστε μόνο η βάση της να βρίσκεται σε επαφή με το σύστημα ανάπτυξης, που είναι συνήθως μίγμα οργανικών διαλυτών. Το διάλυμα ανάπτυξης αποτελεί την κινητή φάση και οι ουσίες μετακινούνται προς τα επάνω μέσω τριχοειδών φαινομένων. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται σε διαφορετική απόσταση λόγω της διαφορετικής συγγενείας τους ως προς τη στατική φάση. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε συστατικού (R_f) στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του (Watson D.G., 2005).

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση μετακίνησης του συστατικού}}{\text{Απόσταση μετακίνησης του διαλύτη}}$$

Τέλος, τα χρωματογραφήματα ελέγχονται με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm και ακολουθεί ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμαθειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος με τη μορφή έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό χρησιμοποιείται CAMAG TLC Visualizer (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: CAMAG TLC Visualizer

➤ **Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography).** Αποτελεί χρωματογραφία σημαντικά εξελιγμένη της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Kazakevich Y. & Lobrutto R., 2007).

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan που αποτελείται από: 1) αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία, 2) απαερωτή SpectraSystem 1000, 3) αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000, 4) ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000, 5) HS C18 column (5 μ m, 250 mm X 4.6 mm, ID) (Supelco), 6) λογισμικό ChromQuestTM 4.1.

B.1.4 Παρασκευαστικές Χρωματογραφικές Μέθοδοι

➤ **Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Prep-HPTLC).** Είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ουσιών από μίγματα μικρού βάρους (συνήθως 5-100mg) και μικρό αριθμό περιεχόμενων ουσιών, οι οποίες διαχωρίζονται ικανοποιητικά από ένα συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών (Nyiredy S., 2000). Χρησιμοποιούνται υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Το προς εξέταση δείγμα ψεκάζεται με πεπιεσμένο αέρα στις υάλινες πλάκες με CAMAG Linomat 5 και εμφανίζεται ως λωρίδα σε απόσταση 2cm από τη βάση της πλάκας.



Εικόνα 10: CAMAG Linomat 5

➤ **Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (Centrifugal Partition Chromatography)**

Η τεχνική Fast Centrifugal Partition Chromatograph (FCPC) αποτελεί μέθοδο πολλαπλών εκχυλίσεων υγρού-υγρού, με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ουσιών που διαφέρουν ως προς το λόγο κατανομής στο διφασικό σύστημα. Ο διαχωρισμός των ουσιών του εκάστοτε μείγματος, εξαρτάται από τους συντελεστές κατανομής τους στις δύο φάσεις. Ο συντελεστής κατανομής (K_D) είναι ο λόγος της διαλυμένης ουσίας που διανέμεται μεταξύ των δύο εξισορροπημένων φάσεων. Συνήθως εκφράζεται από τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στη στατική φάση προς τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην κινητή φάση (K_o/w). Οι κατάλληλες τιμές K_D για το FCPC είναι $0.5 \leq K_D \leq 1.0$.



Εικόνα 11: Τυπική εικόνα ενός FCPC (Marchal et al., 2003).

Η λειτουργία της βασίζεται στις συνδυασμένες έννοιες της *περιστροφικής κίνησης* και του *διφασικού συστήματος* διαχωρισμού των ουσιών. Εν αντιθέσει με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές για την ανάκτηση φυσικών προϊόντων, η συγκεκριμένη τεχνική προτιμάται, καθώς η υγρή στατική φάση επιτρέπει την πλήρη ανάκτηση των φυσικών προϊόντων σε σύγκριση με τις συμβατικές χρωματογραφίες που χρησιμοποιούν στερεές στατικές φάσεις (Khurana S., 2013). Επιπροσθέτως, χρησιμοποιεί ένα πεδίο σταθερής βαρύτητας το οποίο παράγεται από ένα μηχανισμό περιστροφής ενός άξονα και δύο περιστροφικές αρθρώσεις για την είσοδο και έξοδο της κινητής φάσης (Foucault A.P. & Chevolot L., 1998).

Το μηχάνημα (στήλη) CPC έχει κυλινδρικό σχήμα και διαθέτει έναν κεντρικό άξονα στον οποίο εφαρμόζεται περιστροφική κίνηση. Στο εσωτερικό η στήλη περιέχει κυψελίδες οβαλ σχήματος, οι οποίες κατανέμονται εντός αυτής σε επίπεδα και επικοινωνούν μεταξύ τους διαδοχικά με σωληνάκια. Η κίνηση του άξονα υποβάλλει την παρούσα διάταξη σ' ένα σταθερό

πεδίο φυγοκέντρωσης με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της στατικής φάσης, επιτρέποντας στην κινητή φάση να τη διαπερνά χωρίς να την παρασύρει (Marchal L. *et al.*, 2003).

Οι μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να γίνει η έκλουση είναι πέντε: a) έκλουση κανονικής φάσης (normal mode), b) έκλουση κανονικής και αντιστρόφου φάσης (dual mode), c) διαδοχική διαδικασία έκλουσης-εξώθησης (elution extrusion), d) βαθμιδωτή έκλουση και e) έκλουση μεταβαλλόμενου pH (pH zone refining). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην ανάλυση φυσικών ή άλλων εκχυλισμάτων που περιέχουν μεγάλο αριθμό ουσιών είναι η βαθμιδωτή έκλουση. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η χρήση πολλών συστημάτων με σκοπό τον διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν τόσο στην πολικότητα, όσο και στην δομή τους. Τα συστήματα της κινητής φάσης αποτελούνται από τους ίδιους διαλύτες μεταβάλλοντας τις αναλογίες τους (Renault J.H. *et al.*, 2002). Η μέθοδος FCPC εφαρμόστηκε σε μηχανήμα FCPC[®] Rousselet-Robatel Kromaton που περιλαμβάνει στήλη χωρητικότητας 200 mL, αντλία Lab Alliance, σύστημα εισαγωγής, σύστημα περιστροφής και συλλέκτη Buchi fraction collector B-684.

B.1.5 Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

➤ **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).** Για τη λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκαν ο φασματογράφος Advance III Bruker BioSpin με 5 mm BBI probe στα 600 MHz (Εικόνα 10). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην λήψη φασμάτων ήταν:

Δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξίδιο-d₆ DMSO (2.50 ppm/¹H-NMR, 39.51 ppm/¹³C-NMR)

Δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD (3.33 ppm/¹H-NMR, 49.0 ppm/¹³C-NMR)

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης J σε Hertz (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως s (single): απλή, brs (broad singlet): ευρεία απλή, d (double): διπλή, t (triple): τριπλή, q (quintuplet): τετραπλή, dd (double of doublets): διπλή διπλής m (multiple): πολλαπλή. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης ¹H-NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων: COSY (Correlation spectroscopy), HSQC-DEPT (gradient selected ¹H-¹³C multiplicity-edited heteronuclear single quantum coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence).

➤ **Φασματοσκοπία Μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.** Για την λήψη φασμάτων μάζας HR-ESI-MS χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος LTQ-Orbitrap Discovery (ThermoFinnigan) Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml για αρχικά κλάσματα και ολικά εκχυλίσματα και σε συγκέντρωση 100μg/ml για καθαρά μόρια.



Εικόνα 12: Φασματογράφος στα 600 MHz.



Εικόνα 13: Φασματογράφος LTQ-Orbitrap

B.1.6 Προσδιορισμός στροφικής ικανότητας ($[\alpha]_D$)

Η μέτρηση της στροφικής ικανότητας πραγματοποιείται με το πολωσίμετρο και η αρχή λειτουργίας του είναι η εξής: όταν μια δέσμη πολωμένου στο επίπεδο φωτός διέλθει από ένα διάλυμα ορισμένων οργανικών μορίων (π.χ. ζάχαρη) τότε το επίπεδο της πόλωσης στρέφεται. Την ιδιότητα αυτή την εκδηλώνουν μόνο οι **οπτικά ενεργές** οργανικές ουσίες.

Το πολωσίμετρο αποτελείται από τον *πολωτή*, τον *αναλυτή* και την *κυψελίδα* που περιέχει διάλυμα μιας οπτικά ενεργής ένωσης. Το πολωμένο φως διέρχεται από την κυψελίδα (τότε παρατηρείται στροφή του επιπέδου της πόλωσης) και στη συνέχεια το φως διέρχεται από τον αναλυτή (περιστρέφοντάς τον μπορούμε να προσδιορίσουμε το νέο επίπεδο πόλωσης και επομένως τη στροφή). Ως **ειδική στροφή**, $[\alpha]_D$ μιας ένωσης ορίζεται η παρατηρούμενη στροφή, όταν το μήκος κύματος του φωτός είναι 589nm, το μήκος της κυψελίδας του δείγματος l είναι 1 δεκατόμετρο (1dm=10cm) και η συγκέντρωση του δείγματος C είναι 1g/ml (Carey F. A., & Sundberg R. J., 2007).

$$[\alpha_D] = \beta \times \frac{1}{l \times C}$$

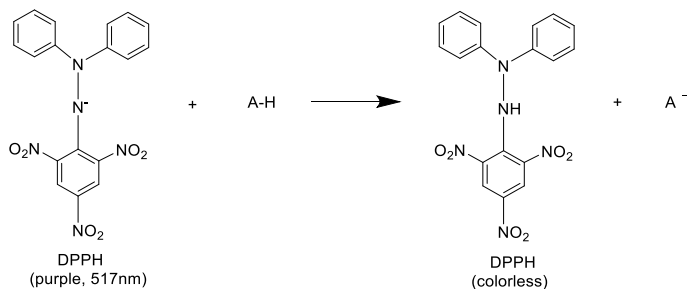
Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση εκφράστηκε σε g/100ml επομένως ο τύπος μετατρέπεται

$$[\alpha_D] = \beta \times \frac{100}{l \times C}$$

B.1.7 Βιολογικές Δοκιμές

B.1.7.1 Αντιοξειδωτικός Έλεγχος

Η μέθοδος DPPH θεωρείται μια πρότυπη και εύκολη χρωματογραφική μέθοδος για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών μορίων. Το DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλνυδραζύλιο) αποτελεί μια σταθερή ρίζα αζώτου με έντονα ιώδες χρώμα. Ο μηχανισμός δράσης της μεθόδου βασίζεται στον αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ιώδες σε υποκίτρινο μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH από την αντιοξειδωτική ουσία (Σχήμα 20). Η αλλαγή του χρώματος παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά, όπου παρατηρείται αλλαγή χρώματος και ταυτόχρονη μείωση της απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας.



Σχήμα 20: Μηχανισμός αντίδρασης DPPH με αντιοξειδωτικό παράγοντα

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το ακόλουθο:

Αρχικά, παρασκευάστηκαν το αντιδραστήριο και τα δείγματα:

- Διάλυμα DPPH : 1,24 mg αντιδραστηρίου DPPH + 10 mL EtOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης.
- Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=4\text{mg/mL}$.

Σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL με συγκέντρωση $c=0,2\text{ mg/mL}$. Για το διαλύτη του κάθε δείγματος δημιουργήθηκε “control” δείγμα με 10 μL διαλύτη και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Επίσης, δημιουργήθηκε πηγάδι για τον αναστολέα, το γαλλικό οξύ (10 μL GA + 190 μL διαλύματος DPPH) με συγκέντρωση $c=0,1\text{ mg/mL}$ (Koleva *et al.*, 2002).

Για όλα τα δείγματα, τον αναστολέα αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά “blank” που αποτελούνταν από 10 μL δείγματος και 190 μL EtOH. Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας, ενώ σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm.

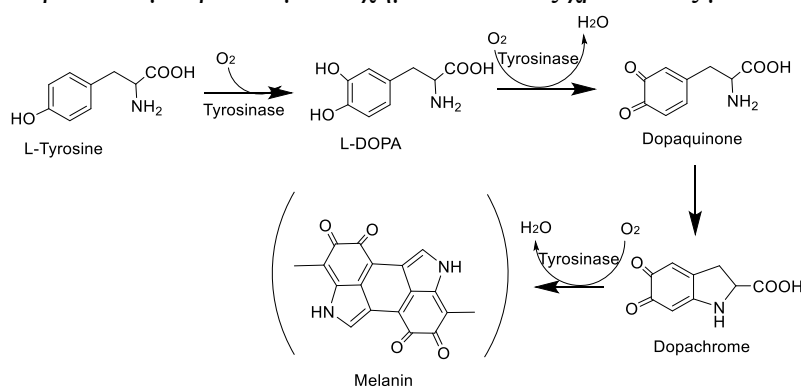
Το ποσοστό δέσμευσης της DPPH ρίζας υπολογίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\{[(A-B)-(C-D)] / (A-B)\} \times 100$$

όπου A: Control (χωρίς δείγμα), B: “blank” του “control” (χωρίς δείγμα, χωρίς DPPH), C: δείγμα, D: “blank” δείγματος (χωρίς DPPH).

B.1.7.2 Λευκαντικός Έλεγχος

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση της μελανίνης ευρέως διαδεδομένο σε μικροοργανισμούς, ζώα και φυτά. Ο μηχανισμός δράσης της οφείλεται στην κατάλυση της υδροξυλίωσης της τυροσίνης σε 3,4 διϋδροξυφαινυλαλανίνη ή σε L-DOPA. Στη συνέχεια η οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακουϊνόνη μέσω μιας σειράς ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων μπορεί να μετασχηματιστεί στις χρωστικές μελανίνες.



Σχήμα 21: Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για την παρασκευή των αντιδραστηρίων και δειγμάτων είναι το ακόλουθο:

- **Ρυθμιστικό Διάλυμα** : 49,4g NaH_2PO_4 + 82,6 g Na_2HPO_4 + 1L dH_2O . Μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα και μέτρηση $\text{pH}=6,7\pm0,02$. Διατήρηση στους 4°C .
- **L-DOPA** : 5 mg + 10 mL dH_2O (σε σκοτάδι). Το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2900rpm, για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Τυροσινάσης: 92 u/mL Τυροσινάση μανιταριού (L-Tyrosine, 25.000units, Sigma- Aldrich) διαλυμένη σε Potassium Buffer.
- Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=1,5 \text{ mg/mL}$.

Σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας τοποθετήθηκαν 40 μL δείγματος, 80 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL τυροσινάσης. Για το κάθε δείγμα δημιουργήθηκε και ένα πηγάδι με το αντίστοιχο blank (120 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL δείγματος). Επίσης δημιουργήθηκε και ένα δείγμα control (120 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL τυροσινάσης) με το αντίστοιχο blank (blank control=160 mL ρυθμιστικού διαλύματος). Σαν πρότυποι αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν το κοζικό οξύ ($\text{IC}_{50}=2\mu\text{g/ml}$) και το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών γλυκόριζας ($\text{IC}_{50}=5\mu\text{g/ml}$), ενώ σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν σε όλα τα πηγάδια 40 μL L-DOPA. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL . Ακολούθησε επώαση, στο σκοτάδι, για 5 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 475 nm. Μετρήθηκε η παραγόμενη ποσότητα ντοπαχρώμης και υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης της τυροσινάσης όπως και στη μέθοδο DPPH.

B.1.7.3 Αντιμικροβιακός Έλεγχος

Η μελέτη αντιμικροβιακής δράσης πραγματοποιήθηκε με τη **Μέθοδο Διάχυσης Βιοενεργούς ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Diffusion assay-A.D.A.)**

Προετοιμασία εναιωρήματος

Το εναιώρημα με το μικροοργανισμό ετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες από τα Πρότυπα του Συμβουλίου των Κλινικών Εργαστηρίων, Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) ως εξής: με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού των 10 μL επιλέχθηκαν 4-5 αποικίες από καθαρή καλλιέργεια και αραιώθηκαν σε 2ml φυσιολογικό ορό μέσα σε γυάλινο αποστειρωμένο σωληνάριο. Το εναιώρημα (0.5 της κλίμακας MacFarland ή 10^8 βακτήρια mL^{-1}) χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια της δοκιμασίας. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Πρωτόκολλο εφαρμογής

Από το εναιώρημα επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton 500 μL με τη βοήθεια βαμβakoφόρου στυλεού (σε τρεις διαφορετικές κάθετες διευθύνσεις προκειμένου να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού). Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετήθηκαν αποστειρωμένα, κυκλικά τεμαχίδια διηθητικού χαρτιού Whattman (δισκία διαμέτρου 6mm). Η αποστείρωση είχε γίνει σε Θάλαμο Ροής υπό U.V. ακτινοβολία για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δισκία εμποτίστηκαν με 10 μL από το εκάστοτε φυτικό εκχύλισμα (Μαμούχα Σ. *et al.*, 2014). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα εξανίου και το υδροαλκοολικό εκχύλισμα των σπερμάτων της *Opuntia ficus-indica*.

Ανάγνωση

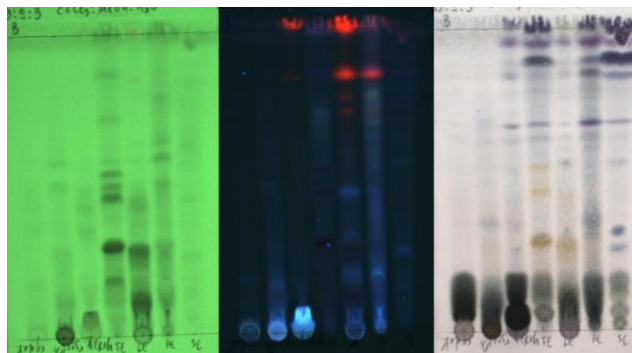
Τα τρυβλία επώαστηκαν σε κλίβανο 37°C για 24 ώρες και ακολούθησε έλεγχος αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής μετρήθηκε σε mm.

***Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.**

B.2 *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

B.2.1. Τυνησιακό και Ελληνικό προφίλ εκχυλίσματος

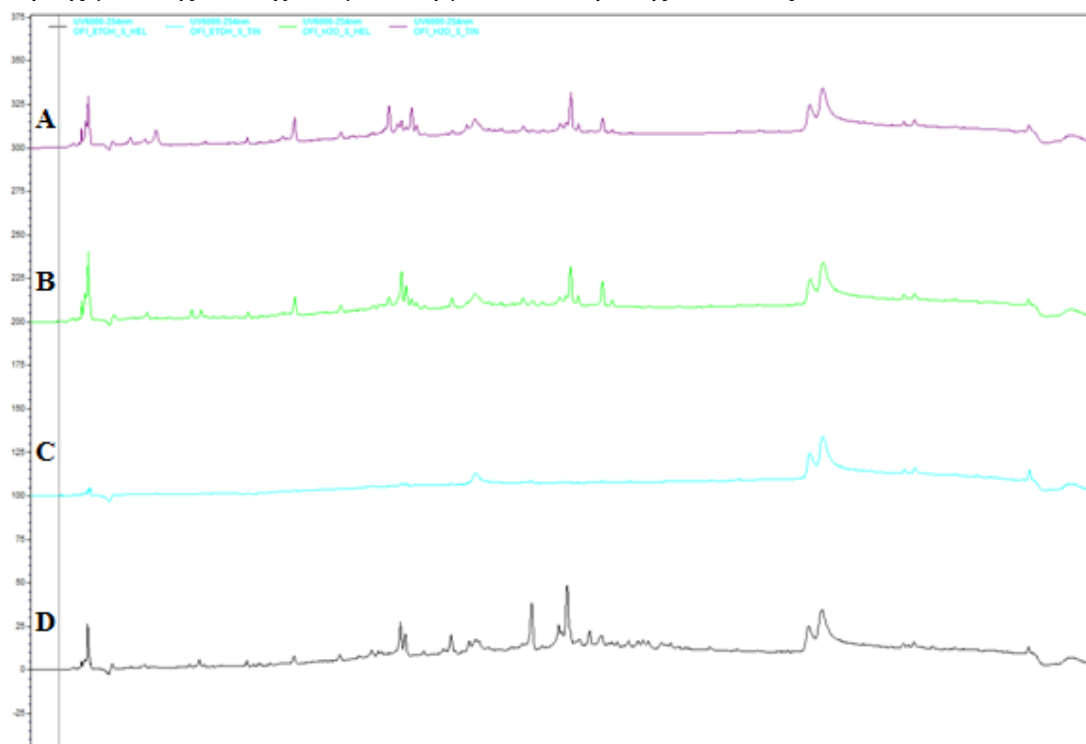
Στην παρούσα εργασία αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων του καρπού (περικάρπιο, σάρκα, σπέρματα), των κλαδώδιων και των ανθέων της τυνησιακής ποικιλίας της *Opuntia ficus-indica* σε διάφορα συστήματα διαλυτών. Καλύτερα αποτελέσματα



Εικόνα 14: Συγκριτικό χημικό προφίλ καρπών, κλαδώδιων και σπερμάτων τυνησιακής ποικιλίας

διαχωρισμού των ουσιών για τα σπέρματα έδωσε το σύστημα 13:9:3 (CHCl_3 :MeOH:H₂O), το οποίο και χρησιμοποιείται στις περαιτέρω

χρωματογραφικές αναλύσεις. Συγκεκριμένα, για τα σπέρματα ακολούθησε σύγκριση της ελληνικής και τυνησιακής ποικιλίας για τα αιθανολικά και υδατικά τους εκχυλίσματα με χρήση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για τη συνέχιση της μελέτης σε εκχύλιση σπερμάτων ελληνικής ποικιλίας.



Εικόνα 15: Συγκριτικό χημικό προφίλ των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων σπερμάτων ελληνικής και τυνησιακής ποικιλίας με χρήση HPLC. **A)** υδατικό τυνησιακής, **B)** υδατικό ελληνικής, **C)** αιθανολικό τυνησιακής, **D)** αιθανολικό ελληνικής

B.2.2. Εκχύλιση και Απολίπανση

Το φυτικό υλικό (σπέρματα *O. ficus-indica* ελληνικής ποικιλίας), συγκεκριμένα 550g κονιοποιημένων σπερμάτων εκχυλίστηκαν έτσι ώστε να παραληφθεί το πλούσιο σε φαινολικά εκχύλισμα. Αρχικά, τα 550g κονιοποιημένου δείγματος τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων που αποτελούνταν από ένα δοχείο inox με μέγιστη χωρητικότητα 3 L, και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις, 2 φορές σε 2 L εξανίου (2×2 L) για 30 min κάθε φορά, σε θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) για την απομάκρυνση του ελαίου. Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (Chougui N. *et al.*, 2013; Khoo H.E. *et al.*, 2012), η διαδικασία της απολίπανσης δεν επηρεάζει γενικά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές παρατήρησαν μια αύξηση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των φαινολικών μετά την απομάκρυνση του ελαίου στο φυστίκι και το σόργο, που εξηγήθηκε από την υψηλότερη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της θέρμανσης. Στο εκχύλισμα του εξανίου πραγματοποιήθηκε διήθηση (×2) υπό κενό με χρήση Büchner και ακολούθησε συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα με θέρμανση υπό κενό (Rotavapor). Το τελικό βάρος του εκχυλίσματος εξανίου ανήλθε στα 21.65g, 3.93% του συνολικού βάρους των σπερμάτων (βιβλιογραφικά (Stintzing C. *et al.*, 2000) το ποσοστό ανέρχεται στα 7-15%).

Κατά τους Lucia *et al.*, 2010 η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από φυσικά προϊόντα επηρεάζεται έντονα από το διαλύτη που χρησιμοποιείται, με την έννοια ότι όσο μεγαλύτερη είναι η πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που εξάγεται. Η παρουσία του νερού αυξάνει τη διηλεκτρική σταθερά και μπορεί να ευνοήσει την εκχύλιση ουσιών ενδιάμεσου πολικότητας (Souza C.M.P. *et al.*, 2014). Επομένως, για την παραλαβή των φαινολικών, το δείγμα εκχυλίστηκε εκ νέου, χρησιμοποιώντας διαλύτες 1.5 L αιθανόλη:νερό σε αναλογία 50:50. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για 30 min, ακολουθούμενη κάθε φορά από διήθηση υπό κενό με χωνί Büchner. Τέλος, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε συσκευή Rotavapor και αφέθηκε σε καμπάνα κενού υπό την παρουσία ξηραντικού υλικού. Το τελικό ξηρό βάρος ανήλθε στα 10.49g, 1.91% του συνολικού βάρους των σπερμάτων.

$\text{KPOFI}/1=10.49\text{g}$

B.3 Φυτοχημική Ανάλυση

B.3.1. Κλασμάτωση με Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (FCPC)

B.3.1.1. FCPC/1

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι η βαθμιδωτή έκλυση, σε ανιούσα λειτουργία (ascending mode), και τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 10:

Συστήματα	Heptane	EtOAc	n-BuOH	EtOH	H ₂ O	Όγκος διαλυτών (ml)
A	10	5	0	5	10	900
B	5	10	0	5	10	700
Γ	1	14	0	5	10	700
Δ	1	12	2	5	10	700
E	1	9	5	5	10	700

Πίνακας 10: Συστήματα διαλυτών για FCPC/1

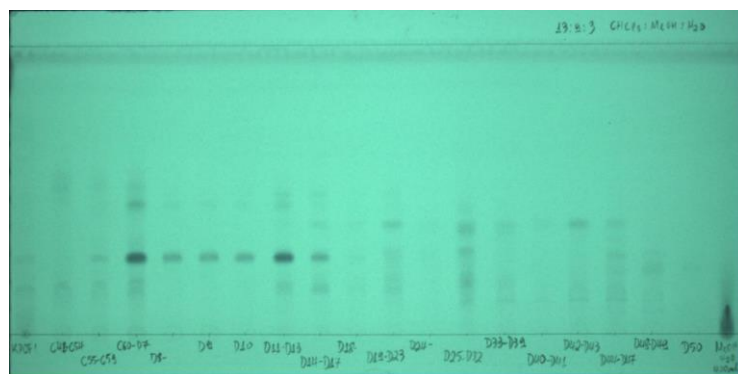
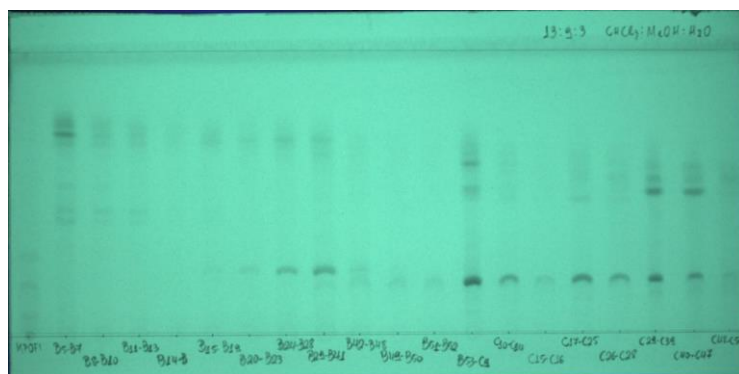
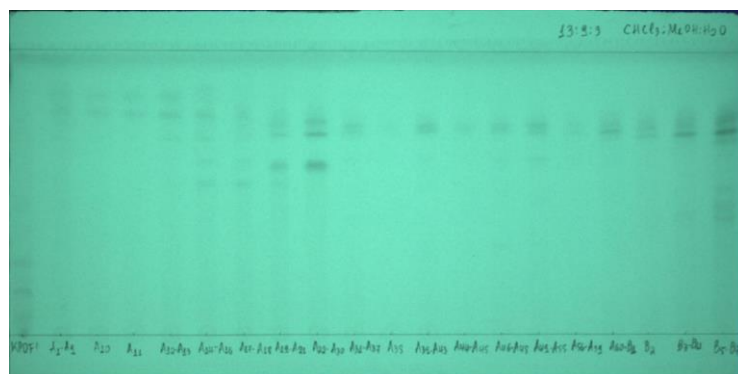
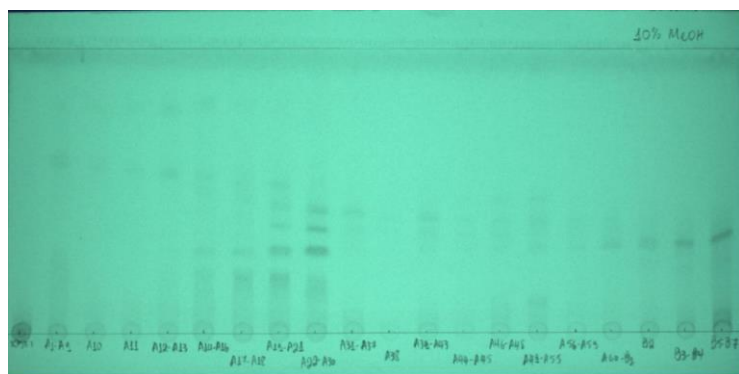
Για τη δημιουργία των συστημάτων A, B, Γ, Δ, E τα: **επτάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόλη, αιθανόλη και νερό** αναμείχθηκαν σε μεγάλη διαχωριστική χοάνη και μετά από ανάδευση και εκτόνωση αφέθηκαν για μερικά λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός. Σε κάθε σύστημα διαχωρίζεται η πάνω από την κάτω φάση. Για το A σύστημα χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτών (900ml) διότι με την κάτω (πολική, στατική) φάση πληρώνεται η στήλη.

Το δείγμα, 1g ξηρού εκχυλίσματος KPOFI/1, διαλύθηκε σε 8ml, με αναλογία 50:50 πάνω και κάτω φάσης του A συστήματος με τη βοήθεια υπερήχων. Ακολούθησε προετοιμασία του μηχανήματος FCPC200® Kromaton κατά την οποία πληρώθηκε η στήλη με την πολική κάτω φάση του A συστήματος (n-BuOH, H₂O). Η ταχύτητα περιστροφής της στήλης συντονίστηκε στις 200rpm και η ροή των διαλυτών στα 20ml/min. Ακολούθησε εξισορρόπηση του συστήματος με εισαγωγή της κινητής φάσης του A συστήματος (Heptane, EtOAc, EtOH) ($S_f=60-80\%$) με τον όγκο της στατικής φάσης να υπολογίζεται στα 69ml και έπειτα ενέθηκαν στο βρόγχο τα 8ml του δείγματος (KPOFI/1). Στη συνέχεια διαβιβάστηκαν τα 5 συστήματα σε ανιούσα λειτουργία με ροή 5ml/min, όπου οι κινητές φάσεις διηθούνταν μέσα από τη στατική στήλη και συλλέχθηκαν 200 σωληνάκια όγκου 5ml το καθένα (40 σωληνάκια για το κάθε σύστημα) (Πίνακας 11). Τέλος, μετά την εφαρμογή των 5 συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη μέρος της στατικής φάσης (extrusion).

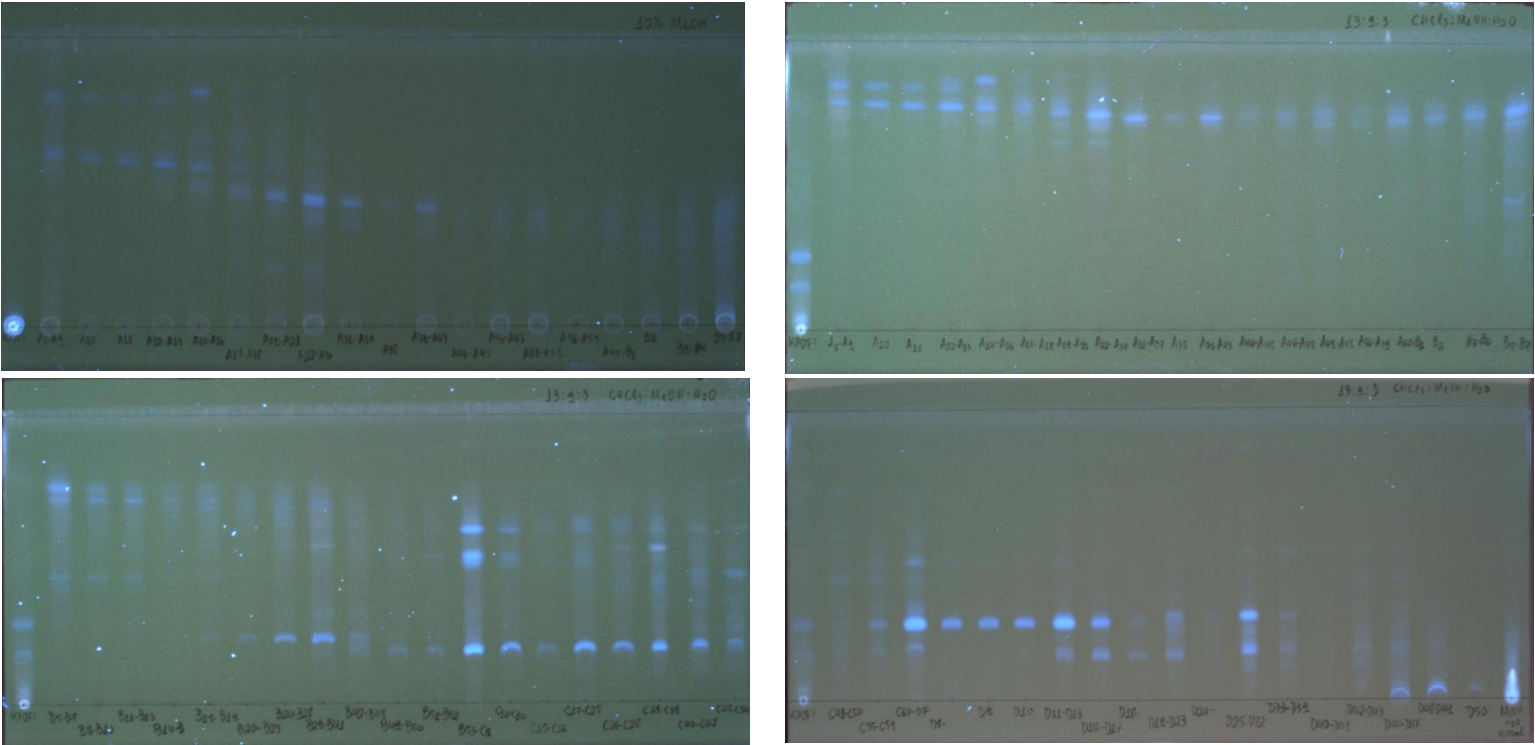
Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών CHCl₃:MeOH αναλογίας 90:10 και CHCl₃:MeOH:H₂O σε αναλογία 13:9:3. Τέλος, ακολούθησαν οι απαραίτητες συνενώσεις με τα τελικά κλάσματα (Εικόνα 14) να ανέρχονται στα **53**.

Συστήματα	Αριθμός κλασμάτων/σύστημα
A	1-40
B	41-60
Γ	61-80
Δ	81-120
E	121-140
extrusion	141-200

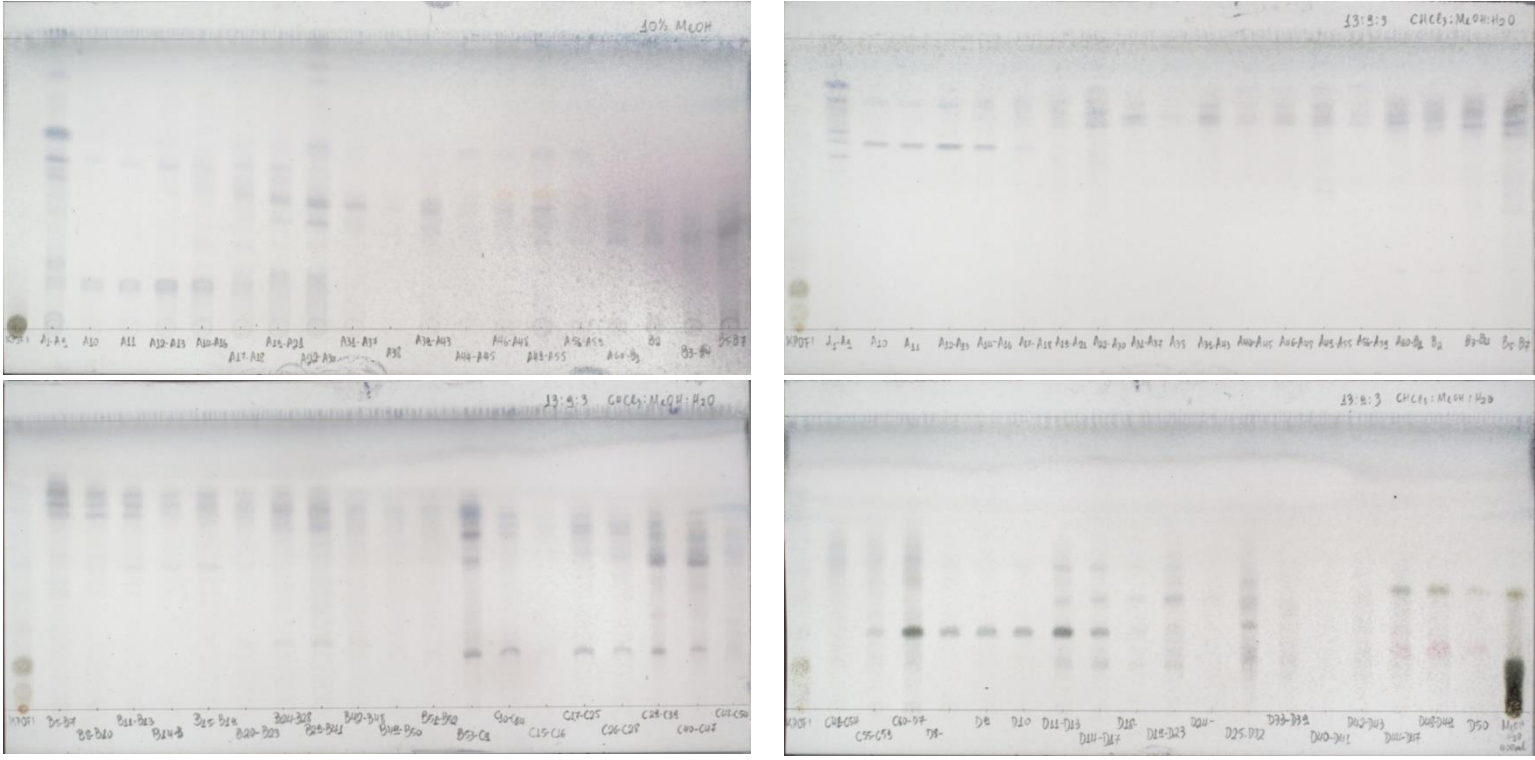
Πίνακας 11: Αριθμός κλασμάτων ανά σύστημα διαλυτών



Εικόνα 16: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (254nm)



Εικόνα 17: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (366nm)



Εικόνα 18: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/1 μέσω TLC (ορατό)

Συγκεντρωτικός πίνακας FCPC/1

1 ^ο CPC							
No	Συνενώσεις	Καθαρό Βάρος (mg)	Κωδικός	No	Συνενώσεις	Καθαρό Βάρος (mg)	Κωδικός
1	A1-A9	4.31		29	B51-B52	1.1	
2	A10	0.72		30	B53-C9	8.87	
3	A11	0.89		31	C10-C14	2.01	
4	A12-A13	1.25		32	C15-C16	0.96	
5	A14-A16	1.03		33	C17-C25	4.18	KPOFI/5
6	A17-A18	0.77		34	C26-C28	1.64	KPOFI/5
7	A19-A21	1.18		35	C29-C39	6.87	KPOFI/5
8	A22-A30	3.00		36	C40-C47	4.22	
9	A31-A37	1.72		37	C48-C54	3.00	
10	A38	0.45		38	C55-C59	2.54	
11	A39-A43	6.79		39	C60-D7	26.17	
12	A44-A45	0.96		40	D8	2.67	NMR
13	A46-A48	0.87		41	D9	2.78	NMR
14	A49-A55	1.51		42	D10	10.17	NMR
15	A56-A59	1.27		43	D11-D13	22.71	
16	A60-B1	0.89		44	D14-D17	148.92	
17	B2	0.76		45	D18	1.13	
18	B3-B4	1.26		46	D19-D23	9.03	
19	B5-B7			47	D24	0.66	
20	B8-B10	2.06		48	D25-D32	4.18	
21	B11-B13	1.56		49	D33-D39	50.23	
22	B14	0.86		50	D40-D41	1.13	
23	B15-B19	2.32		51	D42-D43	2.78	
24	B20-B23	1.52		52	D44-D47	9.01	
25	B24-B28	1.49		53	D50	1.03	
26	B29-B41	3.21			MeOH:H ₂ O	1.99+ίζη	
					400ml	μα	
27	B42-B48	1.97			Ανάκτηση	0.5366g	
28	B49-B50	1.19					

Πίνακας 12: Συγκεντρωτικός πίνακας 1^{ης} FCPC:συνενώσεις, βάρη και κωδικοί

B.3.2 Απομάκρυνση σακχάρων με τη βοήθεια ρητίνης XAD-4

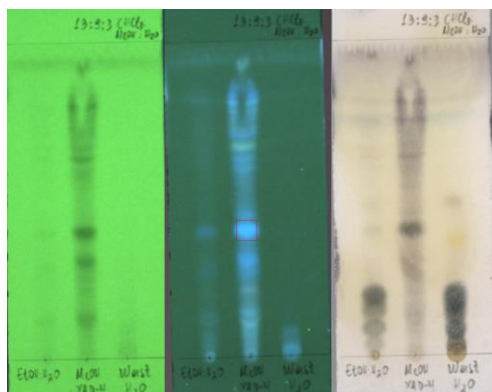
Τα αποτελέσματα του πρώτου CPC κατέδειξαν ότι θα μπορούσε να γίνει εμπλουτισμός του εκχυλίσματος με την απομάκρυνση των σακχάρων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσρόφηση σε ρητίνη XAD-4 σε ποσότητα αρχικού δείγματος $KPOFI/2=207.3 \text{ mg}$

Η στήλη πληρώθηκε με όγκο ρητίνης ίσο με 25 ml. Το δείγμα διαλύθηκε σε 100ml H₂O dist. και στη συνέχεια προστέθηκε στη στήλη με χαμηλή ροή για περίπου 45min-1h έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η δέσμευση. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με μεγάλη ροή και όγκο H₂O dist. ίσο με 220ml. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκλουση με μεθανόλη όγκου 100 ml (αποδέσμευση).

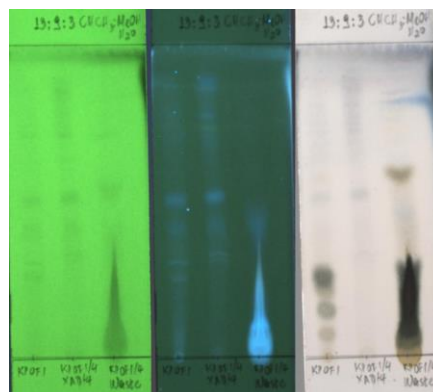
Η σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ μεταξύ του αρχικού εκχυλίσματος και του προσροφημένου σε XAD-4 κατέδειξε μεγάλη συγκέντρωση του κλάσματος μετά από την XAD σε δευτερογενείς μεταβολίτες μετά την απομάκρυνση των σακχάρων επομένως ακολούθησε προσρόφηση σε XAD-4 σε όλο το υδροαλκοολικό εκχύλισμα $KPOFI/3=9.1 \text{ g}$

	Βάρος (mg)		Βάρος (g)
KPOFI/2	207.3	KPOFI/3	9.1
KPOFI/2 XAD-4	42.3	KPOFI/4	2.56
Waste H₂O dist.	135.7	Waste H₂O dist.	6.07
Ανάκτηση	178 (85.8%)	Ανάκτηση	8.63 (94.83%)

Πίνακας 13: Αποτελέσματα προσρόφησης σε XAD-4 σε μικρή και μεγάλη κλίμακα



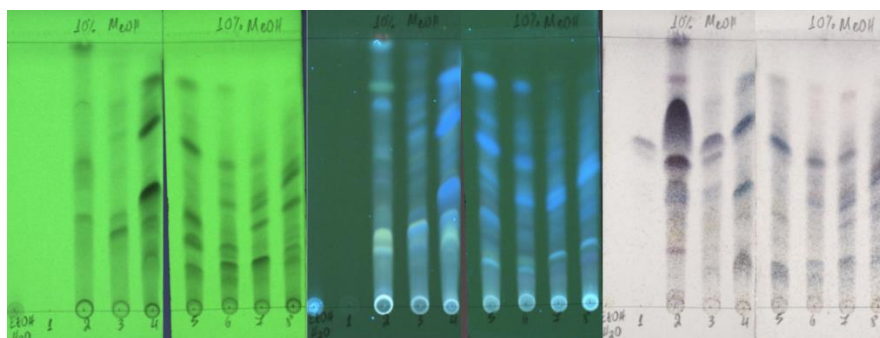
Εικόνα 19: Σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ στα 254nm, 366nm και το ορατό (KPOFI/2:KPOFI/2 XAD-4:Waste)



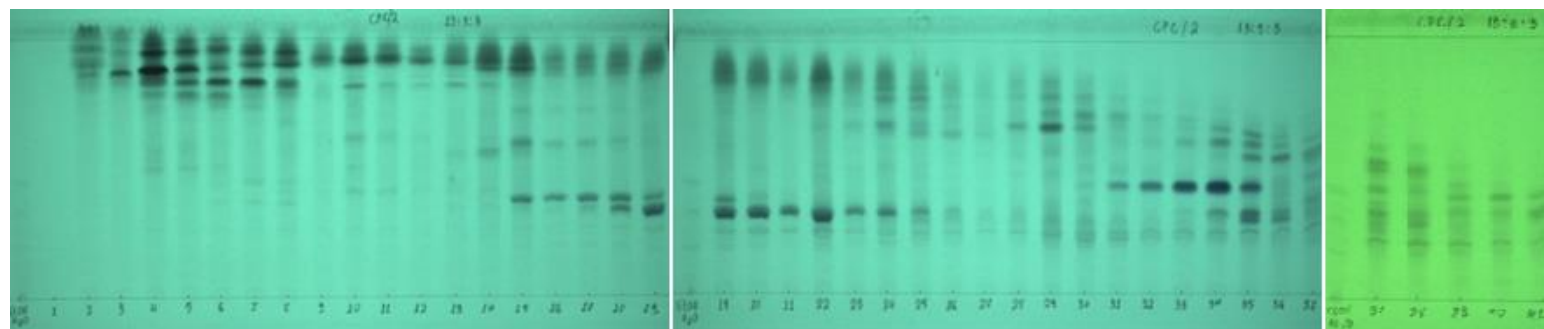
Εικόνα 20: Σύγκριση του χρωματογραφικού προφίλ στα 254nm, 366nm και το ορατό (KPOFI/3:KPOFI/4:Waste)

B.3.3 FCPC/2

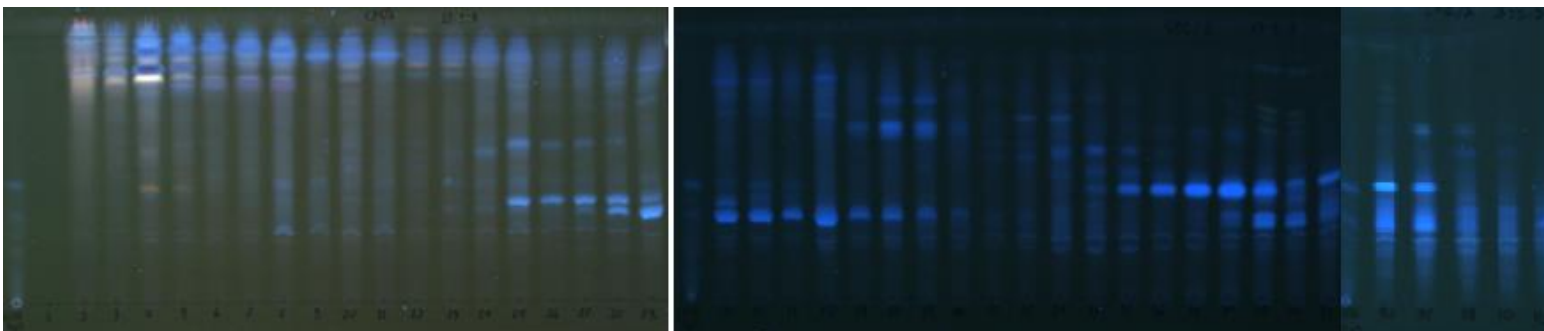
Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι η ίδια με την προηγούμενη (FCPC/1) (σελ. 52). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε **1 g KPOFI/4**. Μετά από προσεκτικό χρωματογραφικό έλεγχο (TLC) όλων των κλασμάτων ακολούθησαν συνενώσεις (Εικόνα 21, 22, 23, 24), καταλήγοντας σε **41 τελικά κλάσματα** (Πίνακας 14).



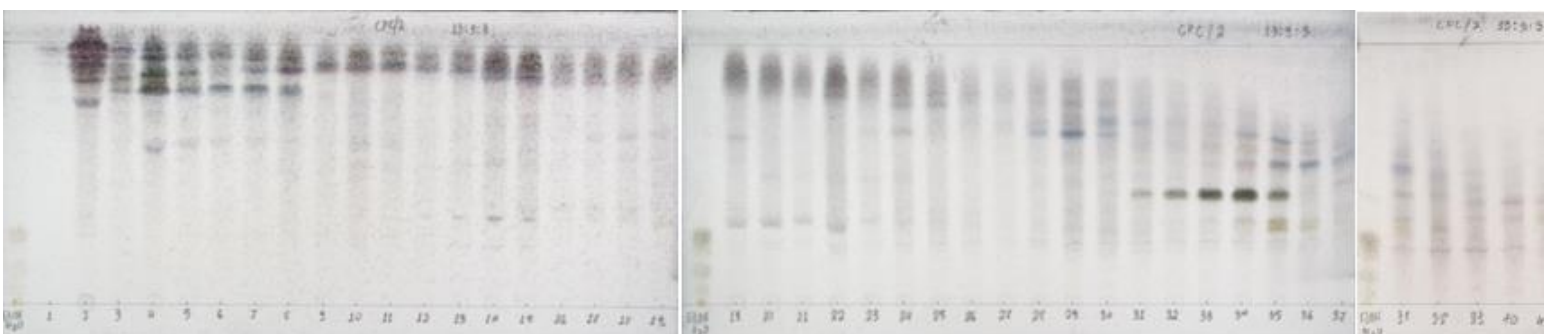
Εικόνα 21: Παρουσίαση των αρχικών συνενωμένων κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (254nm, 366nm, ορατό). Ανάπτυξη σε 10%MeOH



Εικόνα 22: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (254nm). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl₃:MeOH:H₂O)



Εικόνα 23: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (366nm). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl₃:MeOH:H₂O)



Εικόνα 24: Παρουσίαση των συνενώσεων των κλασμάτων της FCPC/2 μέσω TLC (ορατό). Ανάπτυξη σε σύστημα 13:9:3 (CHCl₃:MeOH:H₂O)

Συγκεντρωτικός πίνακας FCPC/2

2 ^ο CPC							
KPOFI/4_ No	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κωδικός	KPOFI/4_ No	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κωδικός
1	A1-A5	0.45	KPOFI/15	23	B52-B54	8.45	KPOFI/7
2	A6-A8	27.86		24	B55-C5	27.58	
3	A9-A10	5.41		25	C6-C16	20.00	
4	A11-A15	21.84		26	C17-C26	11.19	
5	A16-A19	12.92		27	C27-C30	7.14	
6	A20-A23	10.06		28	C31-C35	15.02	
7	A24-A28	11.88		29	C36-C45	28.78	
8	A29-A36	13.98		30	C46-C53	17.20	
9	A37-A39	3.95		31	C54-C58	10.81	
10	A40-A46	9.35		32	C59-D3	13.74	
11	A47-A54	10.19		33	D4-D9	26.04	
12	A55-A60	6.81		34	D10-D13	45.00	
13	B1-B3	7.88	KPOFI/6	35	D14-D18	37.43	KPOFI/10, KPOFI/11 KPOFI/8 KPOFI/9 KPOFI/13 KPOFI/12 KPOFI/14
14	B4-B6	29.72		36	D19-D21	14.16	
15	B7-B10	32.92		37	D22-D27	19.23	
16	B11	6.89		38	D28-D41	28.79	
17	B12-B13	12.67		39	D42-D50	12.28	
18	B14-B16	17.63		40	D51-D57	7.57	
19	B17-B21	25.53		41	D58-D60	6.34	
20	B22-B26	19.87		MeOH:H ₂ O 400ml		225.63	
21	B27-B31	15.45		Ανάκτηση		924.93	
22	B32-B51	39.29				92.4%	

Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας 2^{ης} FCPC: συνενώσεις, βάρη και κωδικοί

B.4 Βιολογικές Δοκιμές

Τα κλάσματα της FCPC/2 ελέγχθηκαν ως προς την **αντιοξειδωτική** και **λευκαντική** τους δράση με τη μέθοδο DPPH και με τη μέθοδο παρεμπόδισης της δράσης του ενζύμου τυροσινάση. Επιλέχθηκαν συνολικά 11 κλάσματα έτσι ώστε να καλυφθεί το μεγαλύτερο δυνατό φάσμα ουσιών που κλασματώθηκαν από το δείγμα ενώ συμπεριλήφθηκε και το αρχικό εκχύλισμα. Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αρχική συγκέντρωση (C) 4 mg/ml και με τις κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις στον αντίστοιχο διαλύτη για κάθε μέθοδο, η τελική συγκέντρωση στο πηγάδι για τη μέθοδο DPPH ανήλθε σε 0.2 mg/ml και για τη μέθοδο αντι-τυροσινάσης σε 0.3 mg/ml. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15). Τα κελιά με έντονο χρώμα υποδηλώνουν την αντίστοιχη δράση. Στη συνέχεια, ακολούθησε στοχευμένη προσπάθεια απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών έτσι ώστε να εντοπιστούν αυτοί στους οποίους οφείλεται η δράση τόσο στο ολικό εκχύλισμα όσο και στα επιμέρους κλάσματα.

	DPPH 200ug/ml				Anti-TYR 300ug/ml			
	Παρεμπόδιση %		Τυπική Απόκλιση		Παρεμπόδιση %		Τυπική Απόκλιση	
Υδροαλκοολικό εκχύλισμα	72.54		0.33		43.29		0.47	
Κλάσματα	200ug/ml		100ug/ml		300ug/ml		50ug/ml	
	AVG	STDEV	AVG	STDEV	AVG	STDEV	AVG	STDEV
KPOFI/4_2	52.83	1.27	33.48	0.96	23.28	2.19	3.02	3.63
KPOFI/4_4	94.77	0.06	94.67	0.06	43.81	2.01	64.82	3.08
KPOFI/4_7	94.79	0.06	94.24	0.04	14.65	3.38	19.05	3.22
KPOFI/4_10	89.72	0.10	60.91	0.42	36.32	2.92	16.76	1.96
KPOFI/4_18	66.68	0.36	46.13	0.64	30.62	1.65	9.13	3.38
KPOFI/4_22	59.34	0.52	39.64	2.85	23.10	2.96	-0.40	2.54
KPOFI/4_32	58.69	0.43	40.78	1.32	31.11	1.88	2.49	4.43
KPOFI/4_35	50.49	0.38	33.15	0.21	24.76	3.21	1.41	1.92
KPOFI/4_37	46.88	0.28	27.12	0.32	20.47	2.66	-2.48	3.08
KPOFI/4_40	40.94	0.38	23.11	1.22	24.27	2.19	-0.58	1.39
KPOFI/4_41	30.29	0.33	16.88	0.70	43.29	0.47	-4.88	3.65

Πίνακας 15: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών: μέθοδος DPPH και αντι-τυροσινάσης.

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης στο υδροαλκοολικό και το εκχύλισμα εξανίου δεν σημείωσαν καμία δράση.

B.5 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την κατάλληλη επεξεργασία των συνενωμένων κλασμάτων της τεχνικής FCPC/1 και FCPC/2 ήταν η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (prep-HPTLC). Για τα επιλεγθέντα κλάσματα πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά το προς μελέτη δείγμα διαλύθηκε σε μεθανόλη και επιστρώθηκε με τη βοήθεια της συσκευής CAMAG-Linomat 5 σε υάλινη πλάκα (Silica gel 60 F254-Merck, 20x20) κανονικής φάσης. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε σε θάλαμο κορεσμένο με 100ml συστήματος 13:9:3 (CHCl₃:MeOH:H₂O) και αφού στεγνώθηκε η πλάκα, παρατηρήθηκε στα 254nm και 366nm όπου οι ουσίες εμφανίζονται ως σκουρόχρωμες λωρίδες. Τέλος, κάθε ζώνη απομακρύνθηκε με τη βοήθεια αιχμηρού κοπιδιού, συλλέχθηκε χωριστά, τοποθετήθηκε σε ηθμό Por.3 και εκχυλίστηκε με σύστημα 14:6:1 (MeOH:CHCl₃:H₂O) έτσι ώστε να αποδεσμευτεί η περιεχόμενη ουσία από τη silica. Ακολούθησε συμπύκνωση, καταγραφή βάρους καθώς και λήψη φασμάτων LC-MS και ¹H-NMR για όλα τα μόρια.

B.5.1 KPOFI/5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

Μετά από προσεκτική παρατήρηση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας της FCPC/1 αποφασίστηκε η συνένωση 3 κλασμάτων, των 33, 34 και 35 τα οποία και μετονομάστηκαν στο προς εξέταση δείγμα KPOFI/5 με τελικό βάρος μετά τη συνένωση 12.69 mg, όπου και πραγματοποιήθηκε prep-HPTLC με βάση την προαναφερόμενη διαδικασία.

Για την FCPC/2 αποφασίστηκε η συνένωση των κλασμάτων KPOFI/4_16 και 17, τα οποία διαλύθηκαν σε 800 μl μεθανόλης και μετονομάστηκαν σε KPOFI/6. Από την ανάλυση απομονώθηκε ο **μεταβολίτης 1 (KPOFI/6_1)** ο οποίος εμφάνισε τη μεγαλύτερη καθαρότητα.

Από το κλάσμα KPOFI/4_29 παραλήφθηκαν 20 mg. Το δείγμα φέρει κωδικό KPOFI/7 και αναλύθηκε με prep-HPTLC. Η πλάκα αναπτύχθηκε σε σύστημα 13:7:3 (CHCl₃:MeOH:H₂O). Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ο **μεταβολίτης 2 (KPOFI/7_1)** και ο **μεταβολίτης 3 (KPOFI/7_2)**.

Δείγμα 20 mg παρελήφθη προς ανάλυση από το κλάσμα KPOFI/4_35, μετονομάστηκε σε KPOFI/8 και διαλύθηκε σε όγκο 640 μl MeOH.

Το κλάσμα KPOFI/4_36 βάρους 14.36 mg με κωδικό KPOFI/9, διαλύθηκε σε 650μl μεθανόλης και χρωματογραφήθηκε (prep-HPTLC).

Από το κλάσμα KPOFI/4_34, λόγω του ικανοποιητικού βάρους του (45.00mg) και για μεγαλύτερη ανάλυση, παραλήφθηκαν δύο δείγματα των 20 mg τα οποία και επιστρώθηκαν σε ξεχωριστές υάλινες πλάκες. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε 700 μl μεθανόλης το καθένα και μετονομάστηκαν σε KPOFI/10 και KPOFI/11 αντίστοιχα. Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας οδήγησε στην απομόνωση του **μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1 και KPOFI/11_1)** ο οποίος είναι και ο κύριος μεταβολίτης για το εκχύλισμα καθώς βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα. Ο ίδιος μεταβολίτης απομονώθηκε και από τα κλάσματα 40, 41 και 42 (D8-D10 = 15.62 mg) της FCPC/1 αλλά και από διπλανό κλάσμα KPOFI/4_35 (μόριο KPOFI/8_3).

Στη συνέχεια, 20 mg από το κλάσμα KPOFI/4_38 υποβλήθηκαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ενώ στο δείγμα δόθηκε κωδικός KPOFI/12.

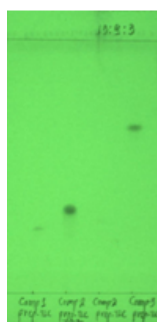
Επιπλέον, αναλύθηκε το κλάσμα KPOFI/4_37 ακριβώς όπως παραπάνω και μετονομάστηκε σε KPOFI/13. Ενδιαφέρον παρουσίασε η ένωση **KPOFI/13_1** η οποία και ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 5**.

Το κλάσμα KPOFI/4_39 συνενώθηκε με το KPOFI/4_40 και φέρει κωδικό KPOFI/14. Η ανάλυση οδήγησε στην απομόνωση του **μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)** με τελικό βάρος 0.78 mg.

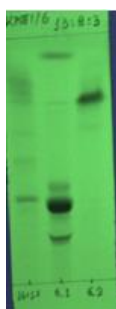
Από τα κλάσματα που εμφάνισαν βιολογική δράση αναλύθηκε το κλάσμα KPOFI/4_4 το οποίο μετονομάστηκε σε KPOFI/15 και απομονώθηκαν οι **μεταβολίτες 7 (KPOFI/15_1)** και **8 (KPOFI/15_2)**. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα βάρη των απομονωθέντων ουσιών (Πίνακας 16) και οι TLC στα 254 nm (Εικόνα 25-34).

Μεταβολίτης (κωδικός)	Κλάσμα	Τελικό Βάρος (mg)	Μεταβολίτης (κωδικός)	Κλάσμα	Τελικό Βάρος (mg)
1 (KPOFI/6_1)	16+17	2.72	5 (KPOFI/13_1)	37	1.38
2 (KPOFI/7_1)	29	1.53	6 (KPOFI/14_1)	39+40	0.78
3 (KPOFI/7_2)	29	2.76	7 (KPOFI/15_1)	4	2.15
4 (KPOFI/10_1)	34	27.69	8 (KPOFI/15_2)	4	1.42

Πίνακας 16: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα τελικά βάρη των απομονωθέντων μεταβολιτών (με πράσινο: κύριος μεταβολίτης)



Εικόνα 25: KPOFI/5



Εικόνα 26: KPOFI/6



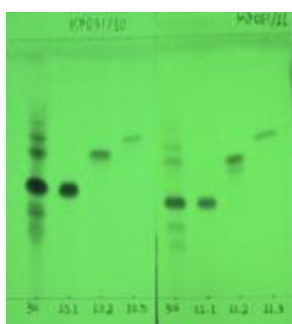
Εικόνα 27: KPOFI/7



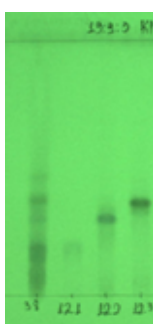
Εικόνα 28: KPOFI/8



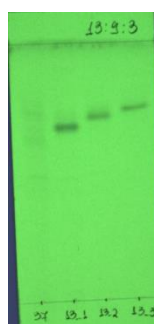
Εικόνα 29: KPOFI/9



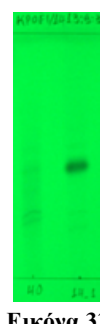
Εικόνα 30: KPOFI/10 και KPOFI/11



Εικόνα 31: KPOFI/12



Εικόνα 32: KPOFI/13



Εικόνα 33: KPOFI/14



Εικόνα 34: KPOFI/15

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

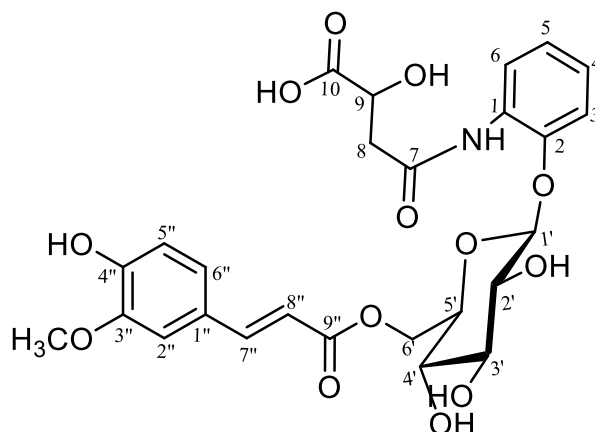
Γ.1 Φασματοσκοπικά & Φασματομετρικά Δεδομένα των Δευτερογενών Μεταβολιτών του Σπερμάτων του Φυτού *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων ουσιών πραγματοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Η παραγωγή ιόντων έγινε με ηλεκτροψεκασμό. Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform, που δίνει μετρήσεις μοριακού βάρους με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων, παρέχοντας τη δυνατότητα απόδοσης των μοριακών τύπων και των βαθμών ακορεστότητας με μεγάλη ακρίβεια. Τα φάσματα MS/MS προσέδωσαν μεγαλύτερη ακρίβεια. Όλα τα δείγματα διαλύθηκαν σε μεθανόλη, σε συγκέντρωση 100μg/ml.

Η τεχνική NMR που χρησιμοποιήθηκε παρέδωσε τις περισσότερες πληροφορίες για τον προσδιορισμό της δομής των μορίων. Λήφθηκαν φάσματα $^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC και HMBC. Η προετοιμασία όλων των δειγμάτων για τα πειράματα περιλαμβάνει διάλυση της ουσίας σε 550-600μl δευτεριωμένης μεθανόλης (CDOD_3) ή διμεθυλοσουλφοξίδιο (DMSO-d_6) και μετάγγιση σε στενούς υάλινους σωλήνες NMR. Η ανάλυση των δειγμάτων σε δευτεριωμένους διαλύτες εξασφαλίζει ότι δεν θα υπάρχει παρεμπόδιση του σήματος των δειγμάτων από τα πρωτόνια του διαλύτη.

Γ.1.1 Μεταβολίτης 1: 2-(6-O-φερουλοϋλογλυκοκυρανοσυλοξυ) φαινυλο σουκιναμίδιο

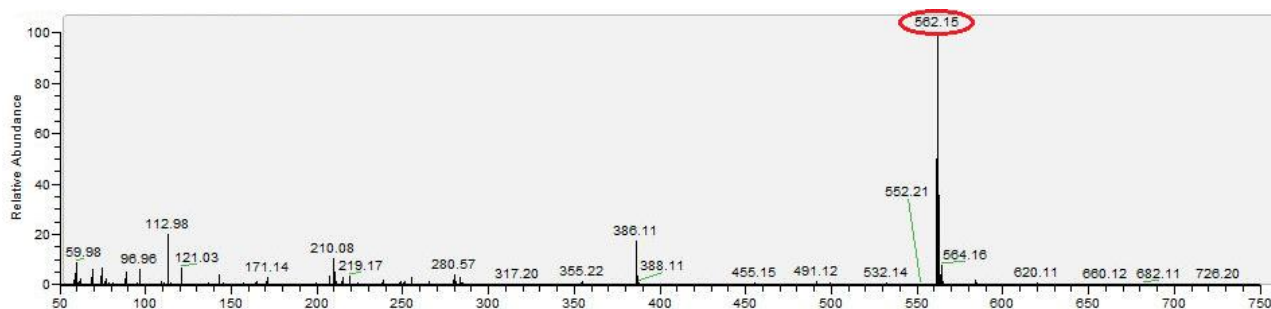
Ο μεταβολίτης 1 απομονώθηκε από τα κλάσματα KPOFI/4_16 και KPOFI/4_17 (μετονομάστηκαν KPOFI/6) και αποτελεί ένα νέο φυσικό προϊόν.



Σχήμα 22: Μεταβολίτης 1 (KPOFI/6_1)

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = -5.45$ ($c = 0.22$, MeOH).

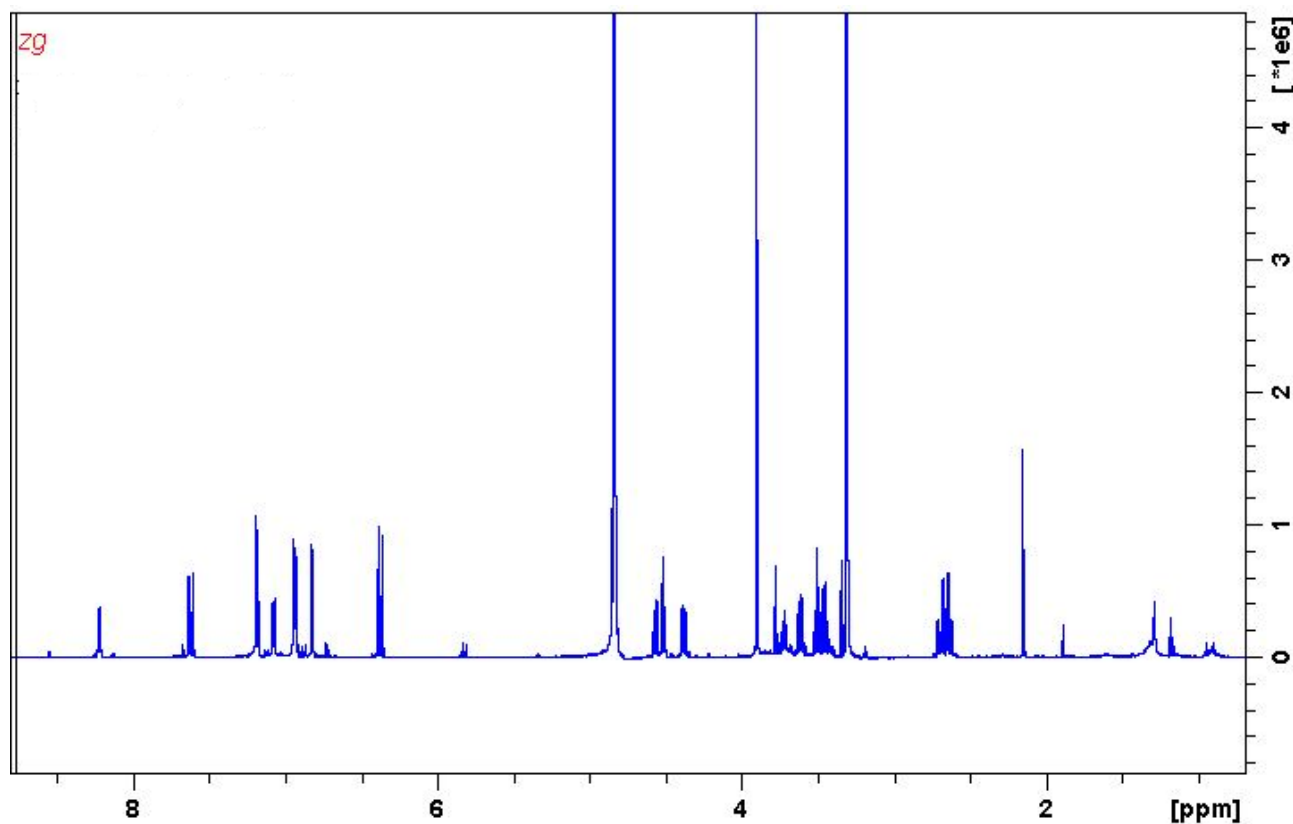
Το φάσμα μάζας του μορίου λήφθηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το μόριο εμφανίζεται με ψευδομοριακό ιόν $[\text{M-H}]^-$ 562.15 και μοριακό τύπο $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_{12}$. Από τον άρτιο αριθμό ψευδομοριακού ιόντος εικάζεται η παρουσία αζώτου. Η δομή του μεταβολίτη 1 προσδιορίστηκε με βάση την φασματοσκοπία NMR ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY).



Εικόνα 35: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 1

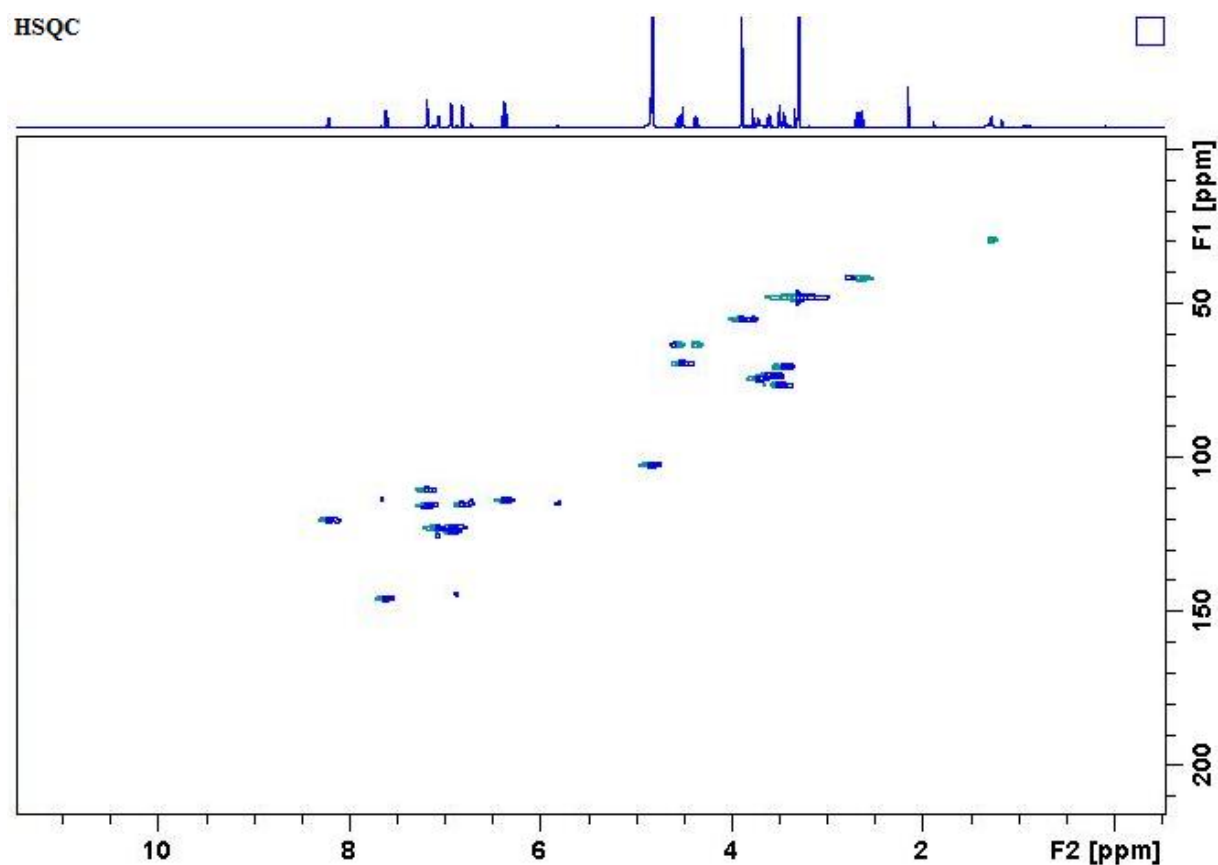
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται οχτώ σήματα τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δύο αρωματικών δακτυλίων και στα ολεφινικά πρωτόνια (δ_{H} 7.62, d, H-7 και δ_{H} 6.37, d, H-6) σε *trans* σύζευξη ($J=15.80\text{Hz}$).

Η ύπαρξη και θέση του σακχάρου επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC στο οποίο παρατηρείται η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου (δ_{H} 4.85) με τον άνθρακα C-1' του αρωματικού δακτυλίου καθώς και από τη συσχέτιση των μεθυλενικών πρωτονίων του σακχάρου στα δ_{H} 4.57 (dd, $J=12.0/2.30\text{Hz}$, H-6'a) και δ_{H} 4.38 (dd, $J=12.0/7.0\text{Hz}$, H-6'b) με τους άνθρακες C-9 και τον C-5' αντίστοιχα. Η γλυκοπυρανόζη χαρακτηρίζεται ως β -D-γλυκόζη καθώς το ανωμερικό πρωτόνιο παρουσιάζει σταθερά σύζευξης ($J=9.11\text{Hz}$) από την οποία εξάγεται το συμπέρασμα ότι βρίσκεται σε θέση αξονική (ax) και επομένως β -γλυκόζη και ο ογκώδης υποκαταστάτης σε θέση ισημερινή (eq) και πάνω από το επίπεδο, άρα D-γλυκόζη.

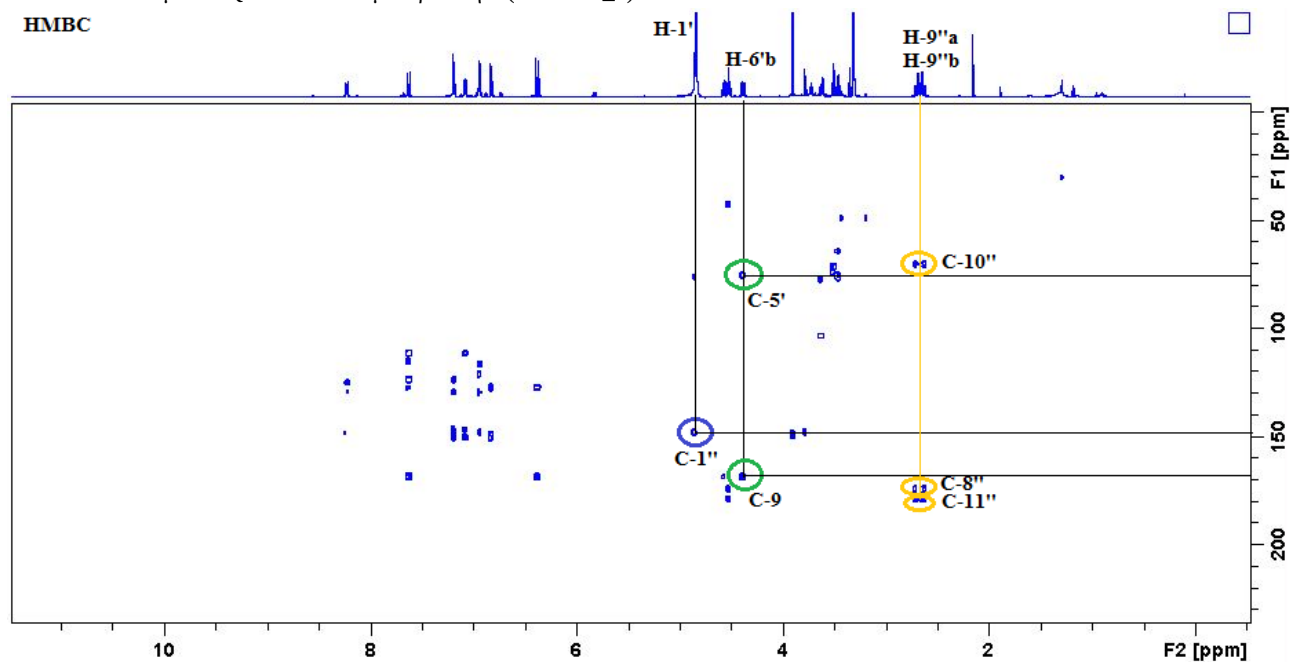
Εικόνα 36: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη 1

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
1"	-	-	-	-	127.40	
2"	7.19	d	1.80	1H	161.50	C-6"/C-3"
3"	-	-	-	-	149.21	
3"-OCH ₃	3.90	s	-	3H	56.16	C-3"
4"	-	-	-	-	154.57	
5"	6.82	d	8.30	1H	116.28	C-1"/C-3"
6"	7.08	dd	8.30/1.80	1H	123.80	C-4"/C-7"/C-8"
7"	7.62	d	15.80	1H	146.76	C-8"/C-2"/C-9"
8"	6.37	d	15.80	1H	114.94	C-1"/C-9"
9"	-	-	-	-	168.8	
1'	4.85	-	-	1H	103.30	C-1'
2'	3.62	t	9.11	1H	74.31	
3'	3.51	t	9.11	1H	77.30	C-4'
4'	3.47	t	9.11	1H	71.50	C-5'/C-6'
5'	3.73	m	-	1H	75.45	
6'a	4.57	dd	12.0/2.30	1H	64.32	
6'b	4.38	dd	12.0/7.0	1H	64.32	C-9"/C-5'
1	-	-	-	-	129.70	
2	-	-	-	-	147.0	
3	7.18	dd	8.0/2.0	1H	116.60	
4	6.93	m	-	1H	128.06	
5	6.93	m	-	1H	123.43	
6	8.22	m	-	1H	121.20	
7	-	-	-	-	174.33	
8a	2.69	dd	9.65/6.88		42.40	C-7/C-9/C-10
8b	2.63	dd	9.65/6.50		42.40	C-7/C-9/C-10
9	4.52	dd	13.15/6.50		70.10	C-7/C-8
10	-	-	-	-	178.0	

Πίνακας 17: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)

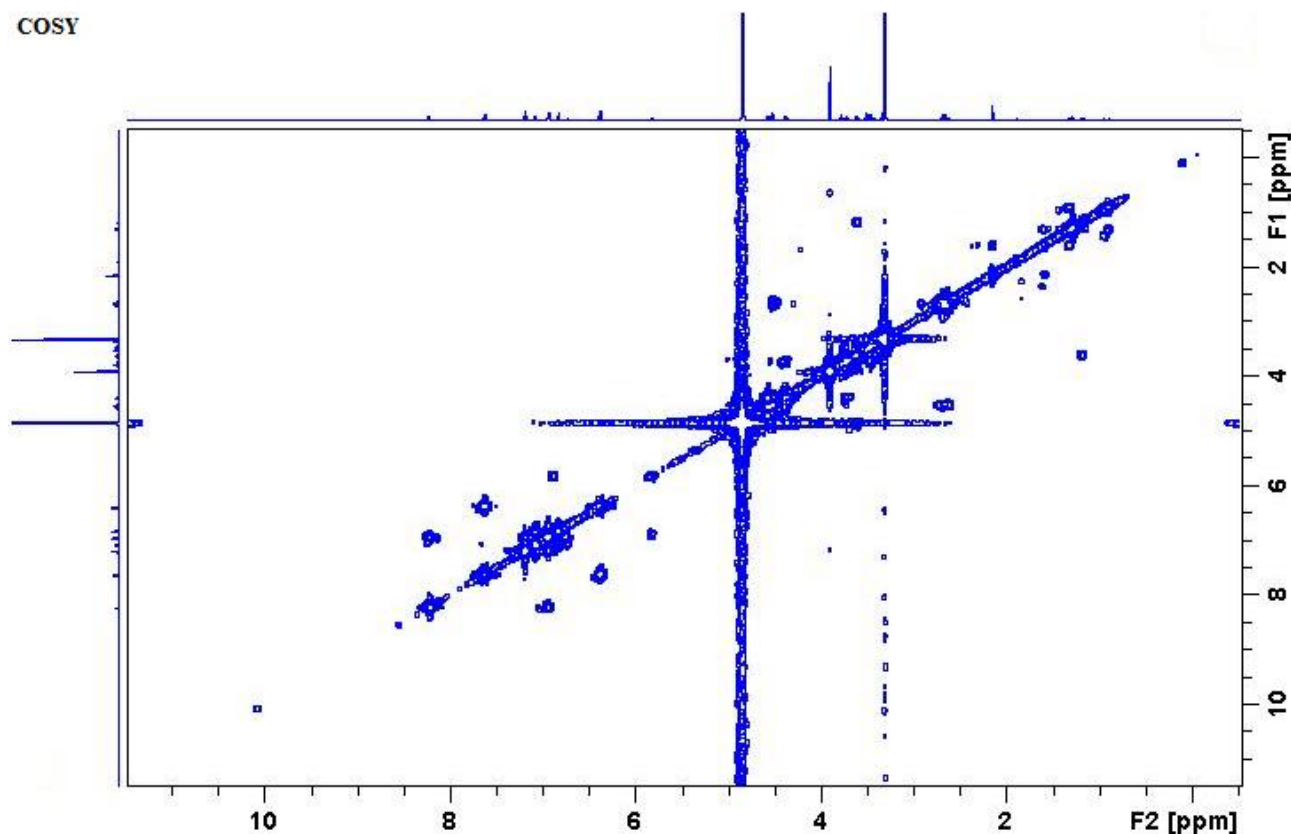


Εικόνα 37: Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)

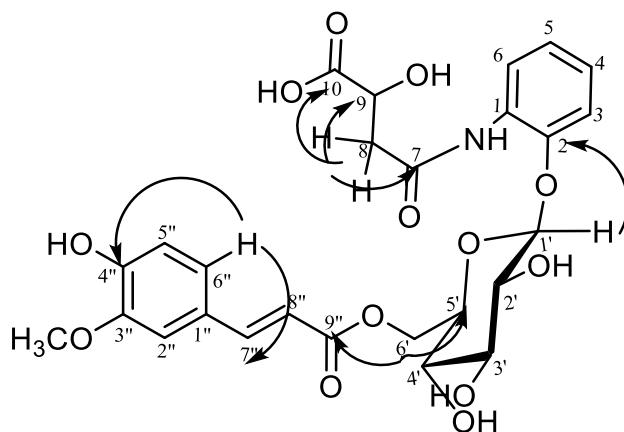


Εικόνα 38: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)

COSY



Εικόνα 39: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 1 (KPOFI/6_1)

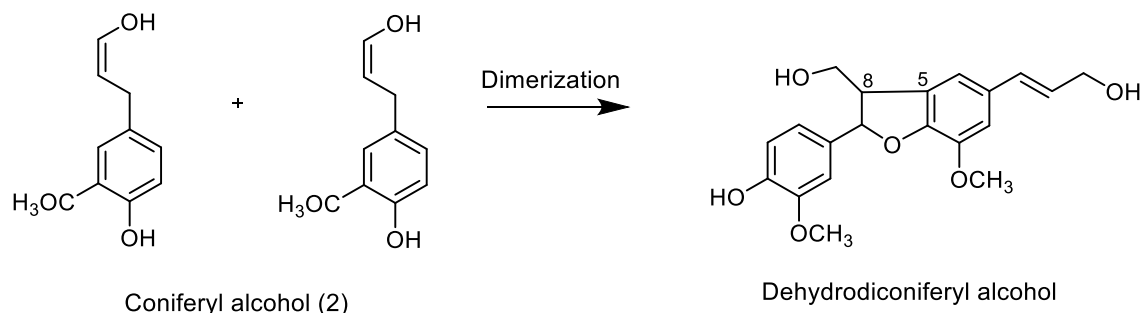


Σχήμα 23: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 1

Γ.1.2 Μεταβολίτης 2: 4-O-β-D-γλυκοσίδης της διϋδροδικωνιφερυλοαλκοόλης (DCG)

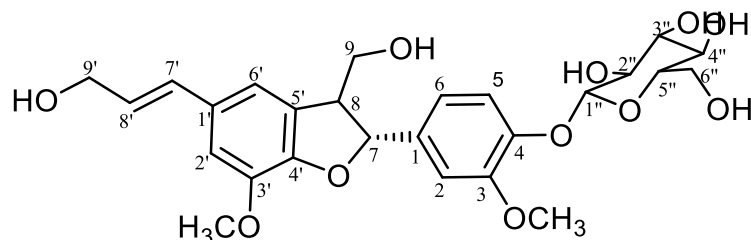
Ο μεταβολίτης 2 απομονώθηκε από το κλάσμα KPOFI/4_29 της FCPC/2 και αποτελεί νεολιγάνιο το οποίο έχει απομονωθεί για πρώτη φορά από τα φυτά *Euphrasia rostkoviana* (Salama O. *et al.*, 1981). Ακολούθως, απομονώθηκε από το φυτό *Pedicularis torta* (Changzeng W. & Zhongjian J., 1997), από το *Linum usitatissimum* (Attoumbre J. *et al.*, 2005) ενώ από το συγγενικό είδος *Opuntia soehrensii* έχει απομονωθεί το άγλυκό του [+-]διϋδροδικωνιφεριόλη (Shirota O. *et*

al., 1997). Τέλος, απομονώθηκε από καλλιέργεια κάλλου (τεχνική ιστοκαλλιέργειας) από το φυτό *Lactuca aculeata* (Stojakowska A. & Malarz J., 2017).



Σχήμα 24: Σχηματισμός της διϋδροδικωνιφερυλικής αλκοόλης μέσω διμερισμού

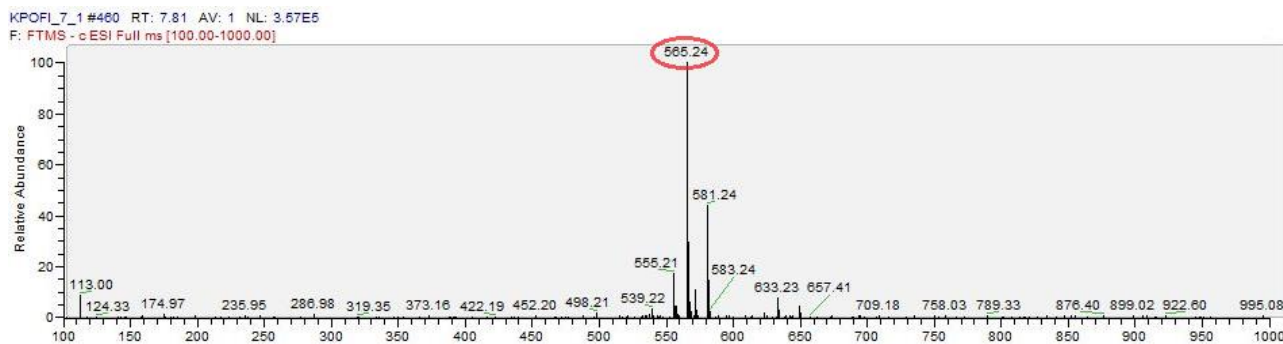
Ο γλυκοσίδης της διϋδροδικωνιφερυλοαλκοόλης (DCG) ανήκει στην οικογένεια των φαινυλκουμαρανών και είναι ένα διϋδροβενζο[*b*]φουρανικό νεολιγνάνιο που απαρτίζεται από το τμήμα της φερουλικής αλδεΐδης και της διϋδροδικωνιφερυλοαλκοόλης. Βιοσυνθετικά, όπως όλα τα λιγνάνια και τα νεολιγνάνια, προέρχεται από την οδό του σικιμικού οξέος και σχηματίζεται με διμερισμό δύο μονάδων κωνιφερυλικής αλκοόλης. Η κατηγορία την οποία αντιπροσωπεύει, των φαινυλοπροπανοειδών, ανήκει στην ευρεία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών που εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό, συγκεκριμένα το άγλυκο της DCG αποτελεί το υπόστρωμα της PCBER (benzylic ether reductase). Τα λιγνάνια και τα νεολιγνάνια παρουσιάζουν διάφορες βιολογικές δράσεις συμπεριλαμβανομένου και της εντομοκτονίας. Η DCG μελετήθηκε για την εντομοκτόνο ιδιότητά της, η οποία αξιολογήθηκε από την αφίδα *Myzus persicae* και έδειξε σημαντικά αυξημένη θνησιμότητα σε ποσοστό τουλάχιστον 25% (Saguez J. et al., 2013).



Σχήμα 25: Μεταβολίτης 2 (KPOFI/7_1)

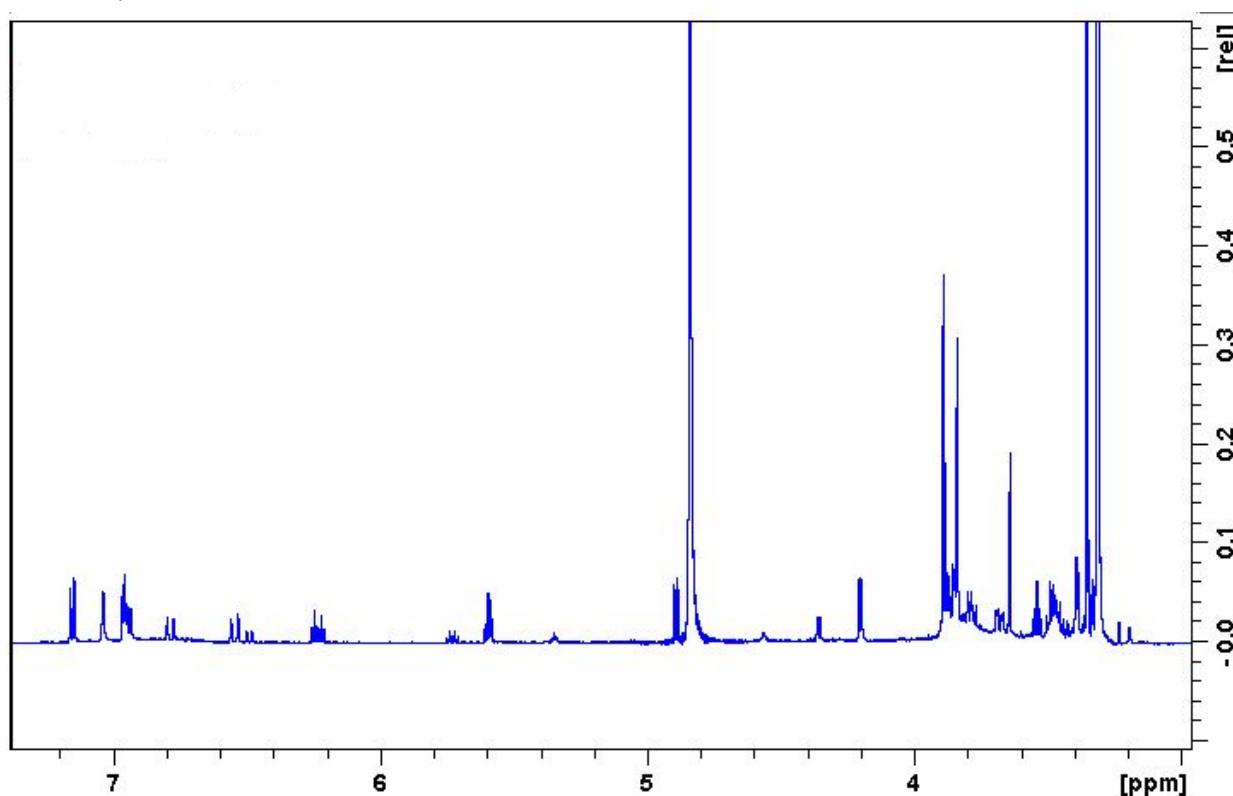
Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = -12.5$ ($c = 0.12$, MeOH).

Το φάσμα μάζας του μορίου λήφθηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το μόριο εμφανίζεται με $R_t = 7.98 \text{ min}$, ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ 565.24 και μοριακό τύπο $C_{26}H_{32}O_{11}$. Η δομή του μεταβολίτη 4 προσδιορίστηκε με βάση την φασματοσκοπία NMR ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY).



Εικόνα 40: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 2

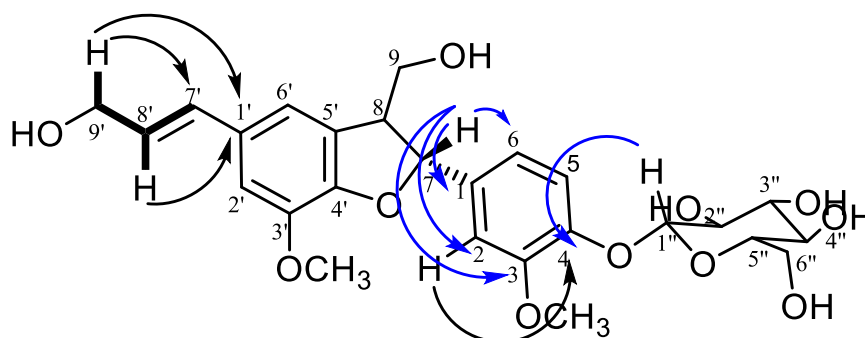
Από το φάσμα ^1H -NMR παρατηρούνται πέντε αρωματικά πρωτόνια σε δ_{H} 7.03 (d, $J=2.3\text{Hz}$, H-2'), σε δ_{H} 7.14 (d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5), σε δ_{H} 6.93 (dd, $J=8.5/2.24\text{Hz}$, H-6) και άλλα δύο σε δ_{H} 6.95 (H-2 και H-6') που υποδηλώνουν την παρουσία δύο αρωματικών δακτυλίων, ενός τρισυποκατεστημένου και ενός τετραυποκατεστημένου. Σε δ_{H} 4.88 παρατηρείται μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J=7.42\text{Hz}$ που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης στη θέση 1". Από τη μεγάλη σταθερά σύζευξης εξάγεται το συμπέρασμα ότι το ανωμερικό βρίσκεται σε αξονική θέση και άρα είναι β -γλυκόζη. Αντίστοιχα, σε δ_{H} 5.58 εντοπίζεται διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 1H με $J=6.3\text{Hz}$ και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του φουρανικού δακτυλίου στη θέση 7. Τα ολεφινικά πρωτόνια του διπλού δεσμού της αλυσίδας που βρίσκονται σε *trans* σύζευξη παρατηρούνται σε δ_{H} 6.54 (d, $J=16.0\text{Hz}$, H-7') και δ_{H} 6.23 (dt, $J=16.0/5.0\text{Hz}$, H-8'). Τέλος, σε υψηλότερα πεδία δ_{H} 3.83 και δ_{H} 3.88 παρατηρούνται δύο απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3H η καθεμία και αντιστοιχούν στις δύο μεθόξυ ομάδες των αρωματικών δακτυλίων.

Εικόνα 41: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 2

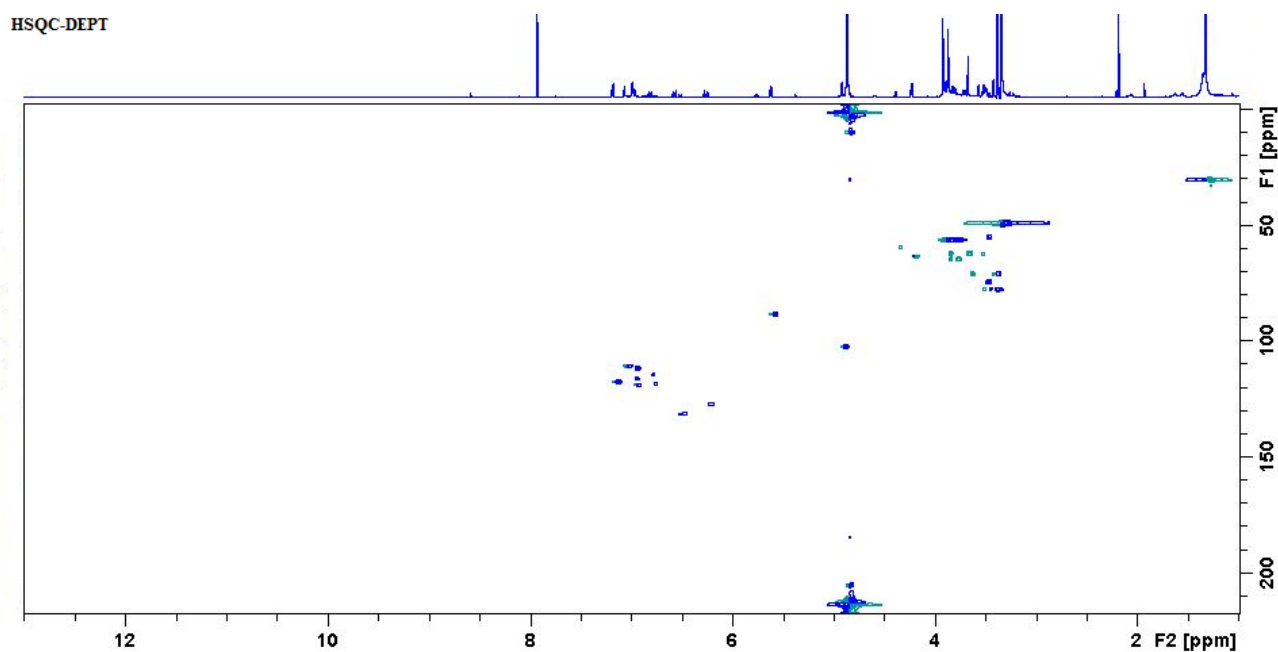
Η δομή επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων (HSQC, HMBC και COSY). Από το φάσμα HMBC παρατηρείται η συσχέτιση μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου (H-1'') και ενός τεταρτοταγή άνθρακα που συντονίζεται σε δ_C 147.4 και υποδηλώνει τη σύνδεση της γλυκόζης στη θέση 4 καθώς και η σύζευξη του πρωτονίου στη θέση 7 του φουρανικού δακτυλίου με τον τεταρτοταγή άνθρακα στη θέση 1. Το φάσμα COSY έδειξε τη συσχέτιση των ολεφινικών πρωτονίων H-7' και H-8'.

Atom	¹ H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-					137.9	
2 (κ 6')	6.95	6.93	d	3.5	2.0	2H		C-4/(⁴ J)C-5
3	-	-	-	-	-	-	151.0	
4	-	-	-	-	-	-	147.4	
5	7.14	7.07	d	8.5	8.5	1H		C-1/C-3/(² J)C-4
6	6.93	6.84	dd	8.5/2.24	8.5/2.0	1H		C-4
7	5.58	5.51	d	6.3	6.6	1H		C-1/C-2/(⁴ J)C-3/C-6/(⁴ J)C-3'
8			-	-		-		
9		3.44						
3-OCH ₃	3.88	3.82	s			3H		
1'	-		-	-		-		
2'	7.03	6.96	d	2.28	2.0	1H		(² J)C-3'
3'	-							
4'	-		-	-		-		
5'	-							
6'			-	-		-		
7'	6.54	6.47	d	16.0	16.0	1H		H-7'/H-8' (COSY)
8'	6.23	6.23	dt	16.0/5.0	16.0/5.0	1H		C-1'
9'		3.65						C-1'/C-7'
3'-OCH ₃	3.83?	3.75	s			3H		
1''	4.88	4.88	d	7.5	7.5			C-4
2''								
3''								
4''			-	-		-		
5''								
6''								

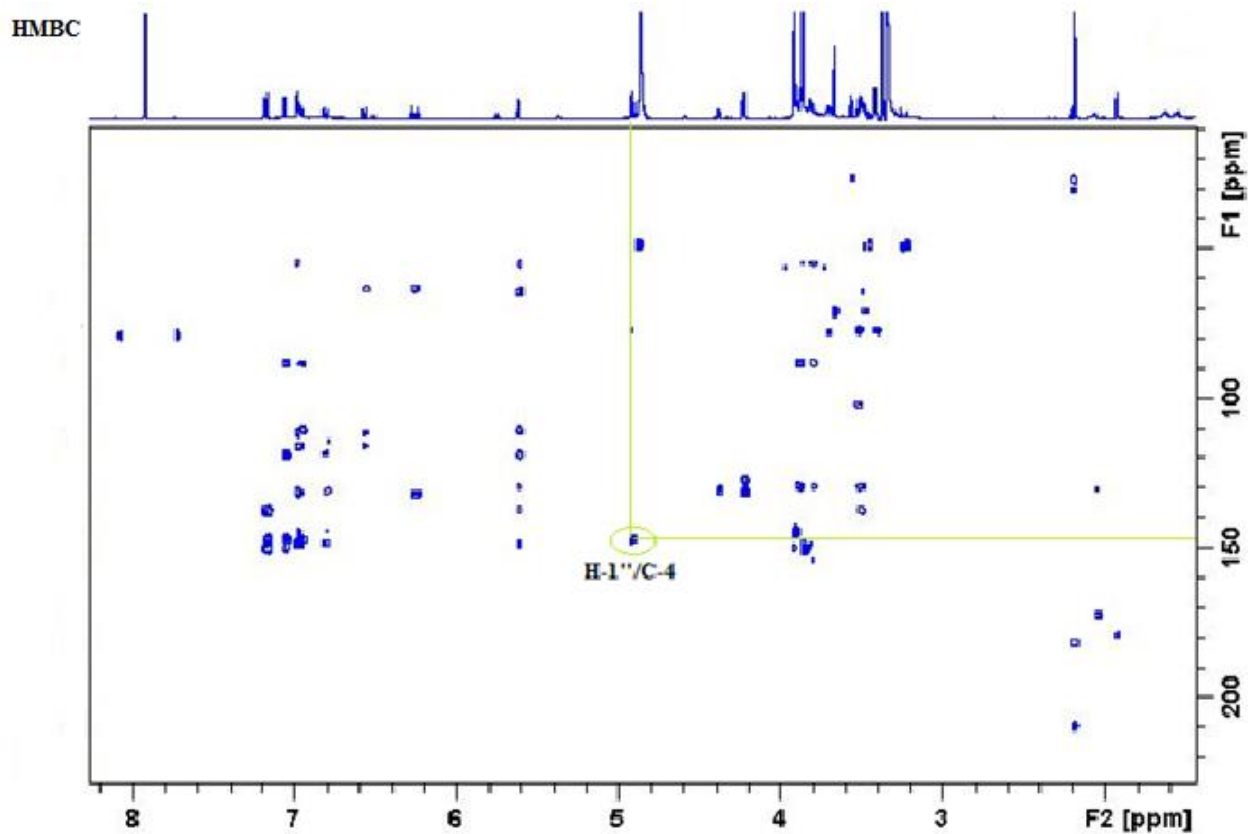
Πίνακας 18: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1) *Attoumbre J. *et al.*, 2005



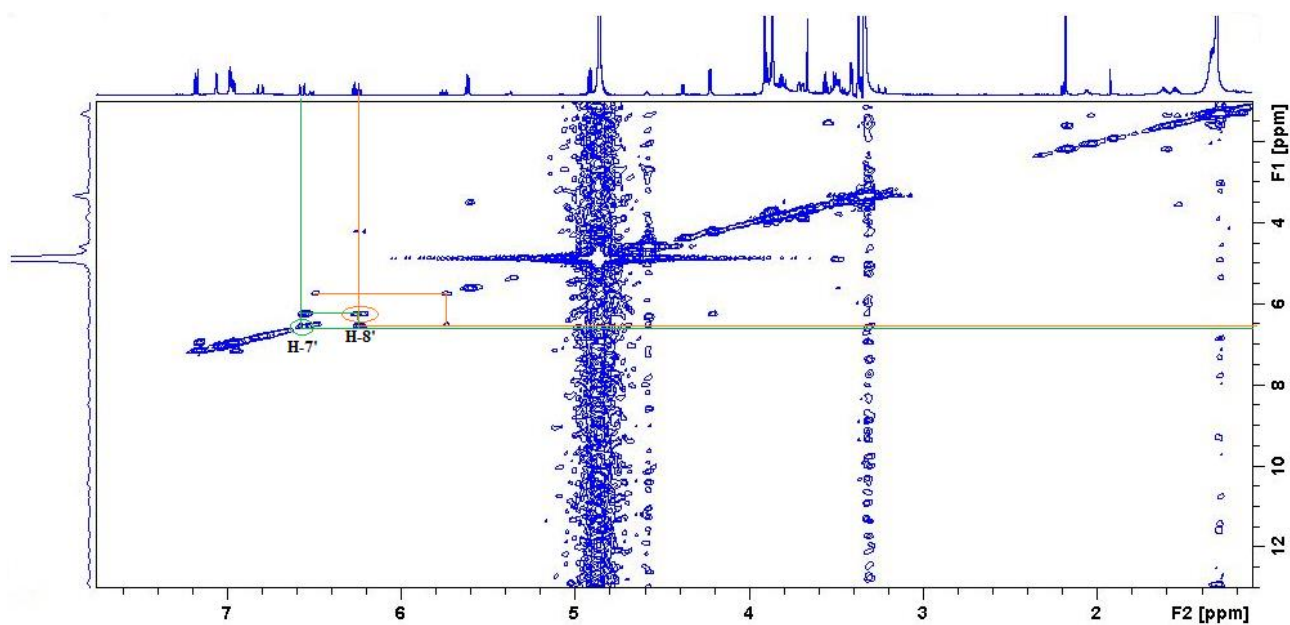
Σχήμα 26: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 2



Εικόνα 42: Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)



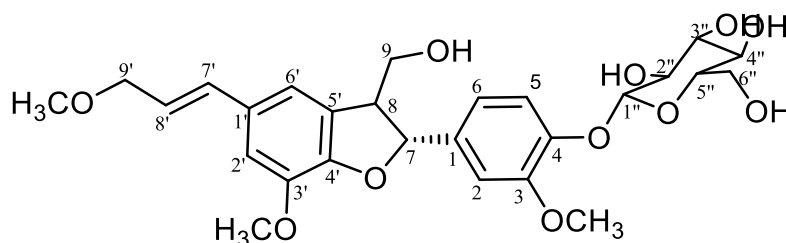
Εικόνα 43: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)



Εικόνα 44: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 2 (KPOFI/7_1)

Γ.1.3 Μεταβολίτης 3: 9'-O-μεθυλο-4-O-β-D-γλυκοσίδης της διϋδροδικωνιφερυλοαλκοόλης

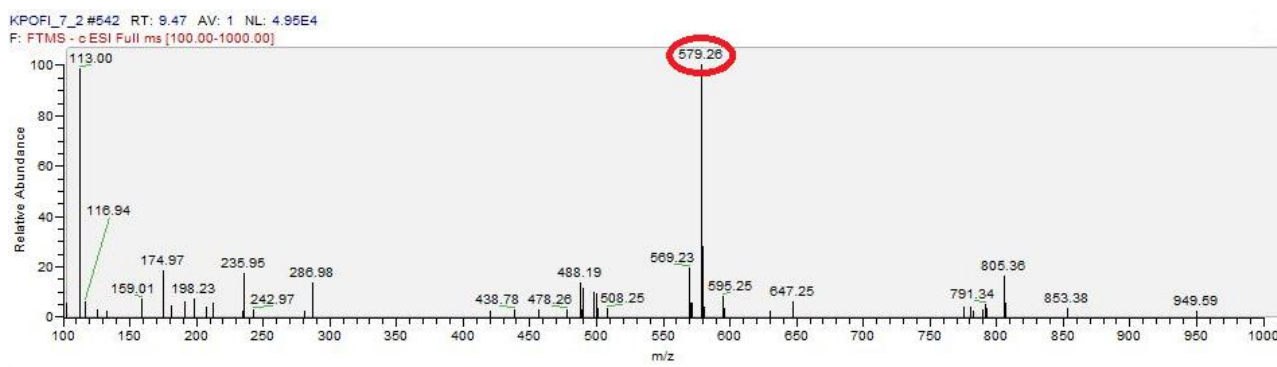
Ο μεταβολίτης 3 (όπως και ο 2) απομονώθηκε από το κλάσμα KPOFI/4_29 και αποτελεί έναν γλυκοσίδη λιγνανίου. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από βολβούς του φυτού *Urginea maritima* (Iizuka M. *et al.*, 2001). Είναι ένα διϋδροβενζο[*b*]φουρανικό νεολιγνάνιο και η δομή του είναι παρόμοια με τη DCG με τη διαφορά της μίας επιπλέον μεθόξυ ομάδας στη θέση 9' του υδροξυλίου της πλευρικής αλυσίδας.



Σχήμα 27: Μεταβολίτης 3 (KPOFI/7_2)

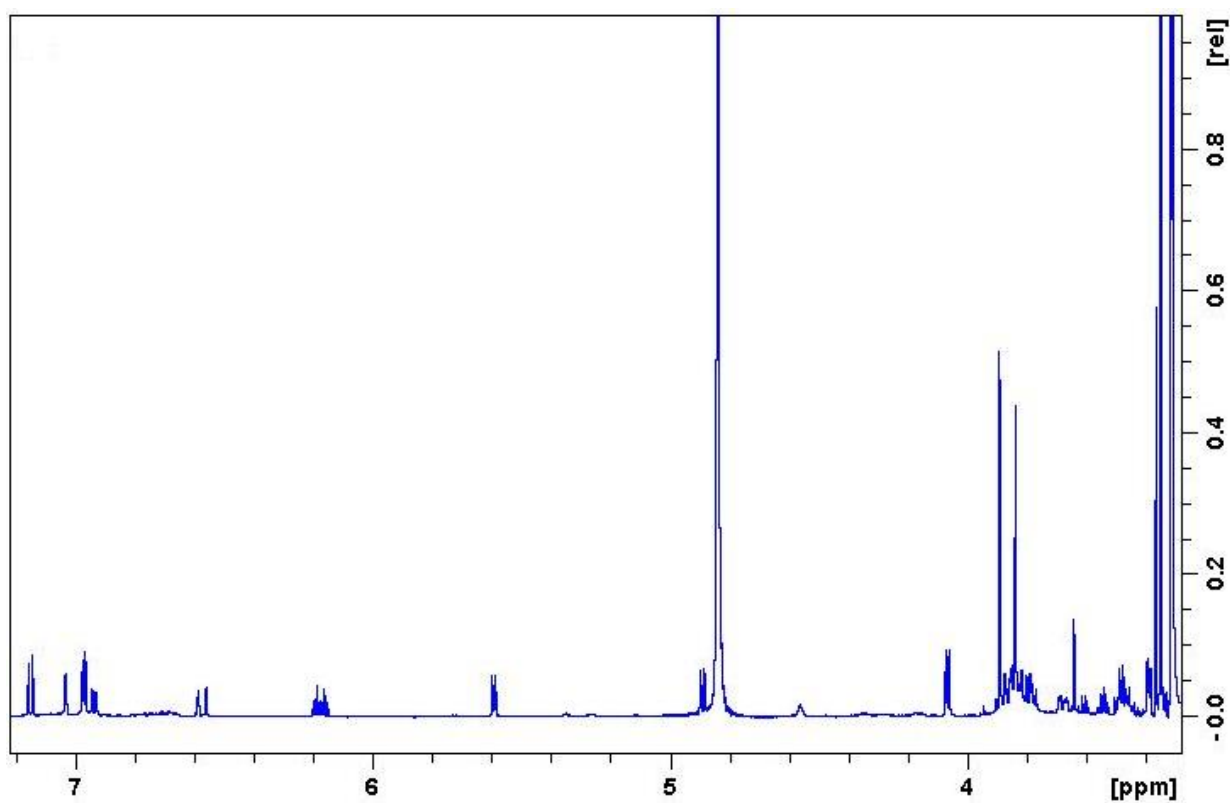
Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = -8.2$ ($c = 0.23$, MeOH).

Τα φάσματα μάζας του μορίου λήφθηκαν με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν αντιστοιχεί σε $[M-H]^-$ 579.26 ($[M-CH_2O_2]^-$ ($M-FA=534$) που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{27}H_{34}O_{11}$.

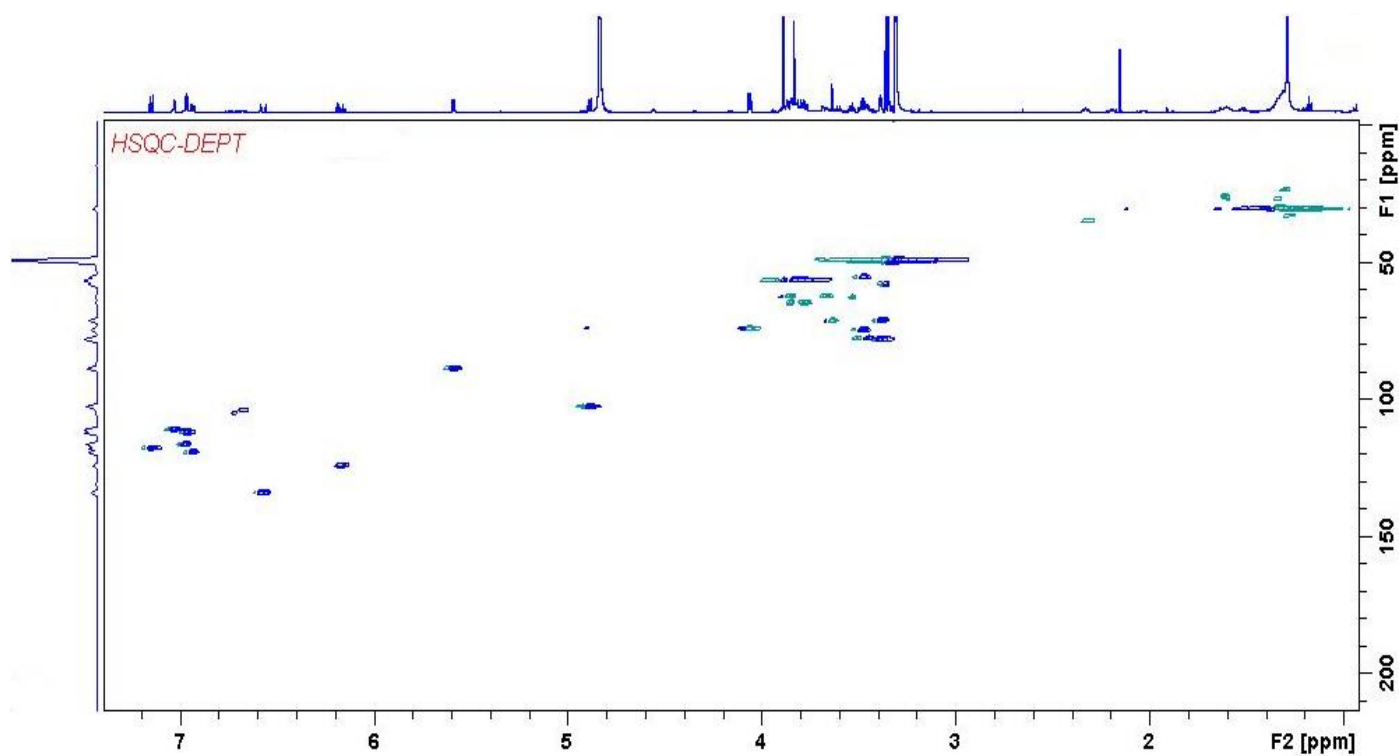


Εικόνα 45: Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 3

Στο φάσμα 1H -NMR παρατηρείται η παρουσία πέντε αρωματικών πρωτονίων με χαρακτηριστικά τα H-5 σε δ_H 7.15 (d, $J=8$ Hz), H-2 σε δ_H 7.03 (d, $J=2$ Hz), H-6' σε δ_H 6.97 (s) και H-6 σε δ_H 6.93 (dd, $J=8/2$ Hz). Τα σήματα των δύο *trans* ολεφινικών πρωτονίων της αλυσίδας εντοπίζονται σε δ_H 6.57 (d, $J=16$ Hz, H-7') και δ_H 6.16 (dt, $J=16/6$ Hz, H-8') ενώ οι τρεις μεθόξυ ομάδες σε υψηλότερα πεδία σε δ_H 3.88 (s, 3H, 3'-OCH₃), δ_H 3.83 (s, 3H, 3-OCH₃) και δ_H 3.36 (s, 3H, 9'-OCH₃). Τέλος η διπλή κορυφή ($J=7.5$ Hz) του ανωμερικού H-1'' συντονίζεται σε δ_H 4.89 και τα πρωτόνια (H-2''-H-6'') του σακχάρου στα 3-4ppm. Από τη μεγάλη σύζευξη του ανωμερικού καθώς και από τις συζεύξεις των πρωτονίων του σακχάρου χαρακτηρίζεται ως β-D-γλυκόζη. Η δομή, όπως και στην περίπτωση της DCG επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων (HSQC, HMBC και COSY).



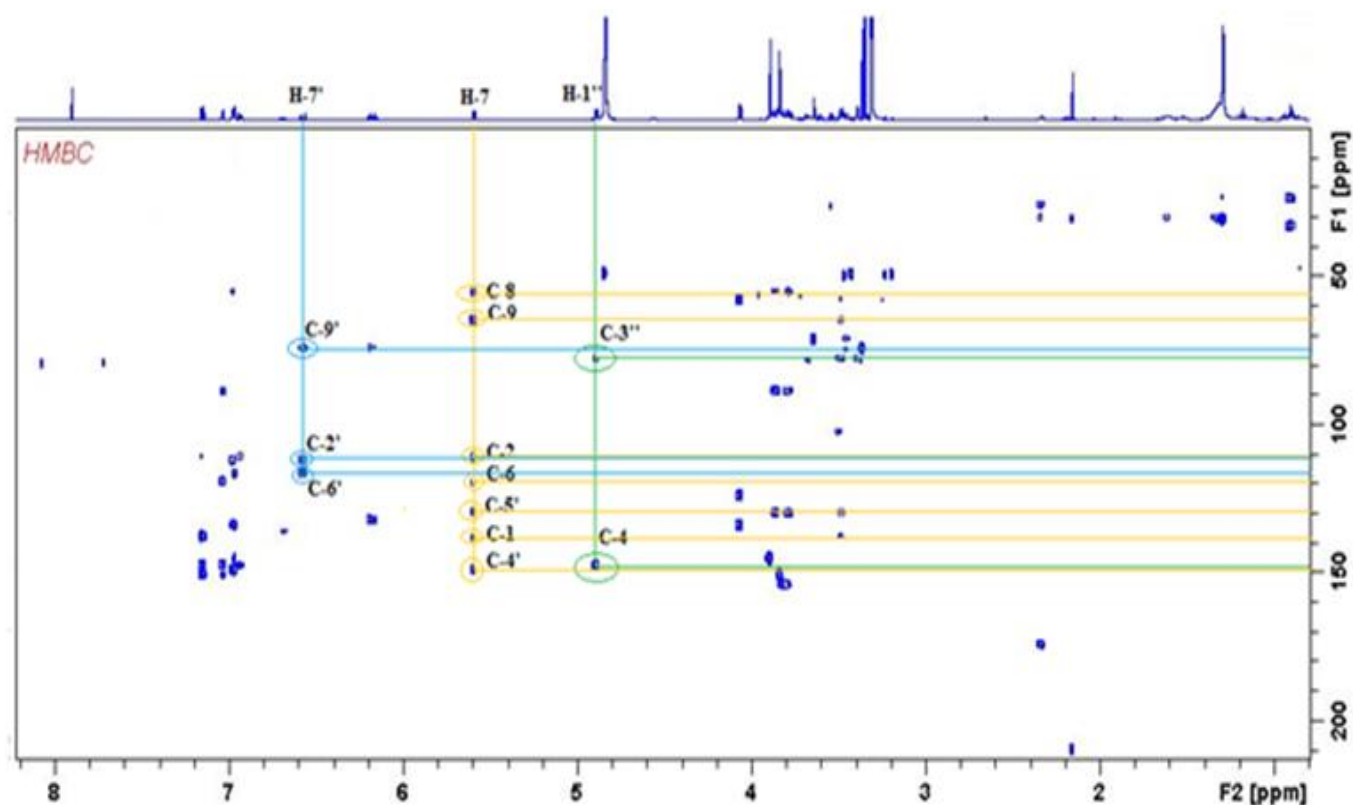
Εικόνα 46: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 3



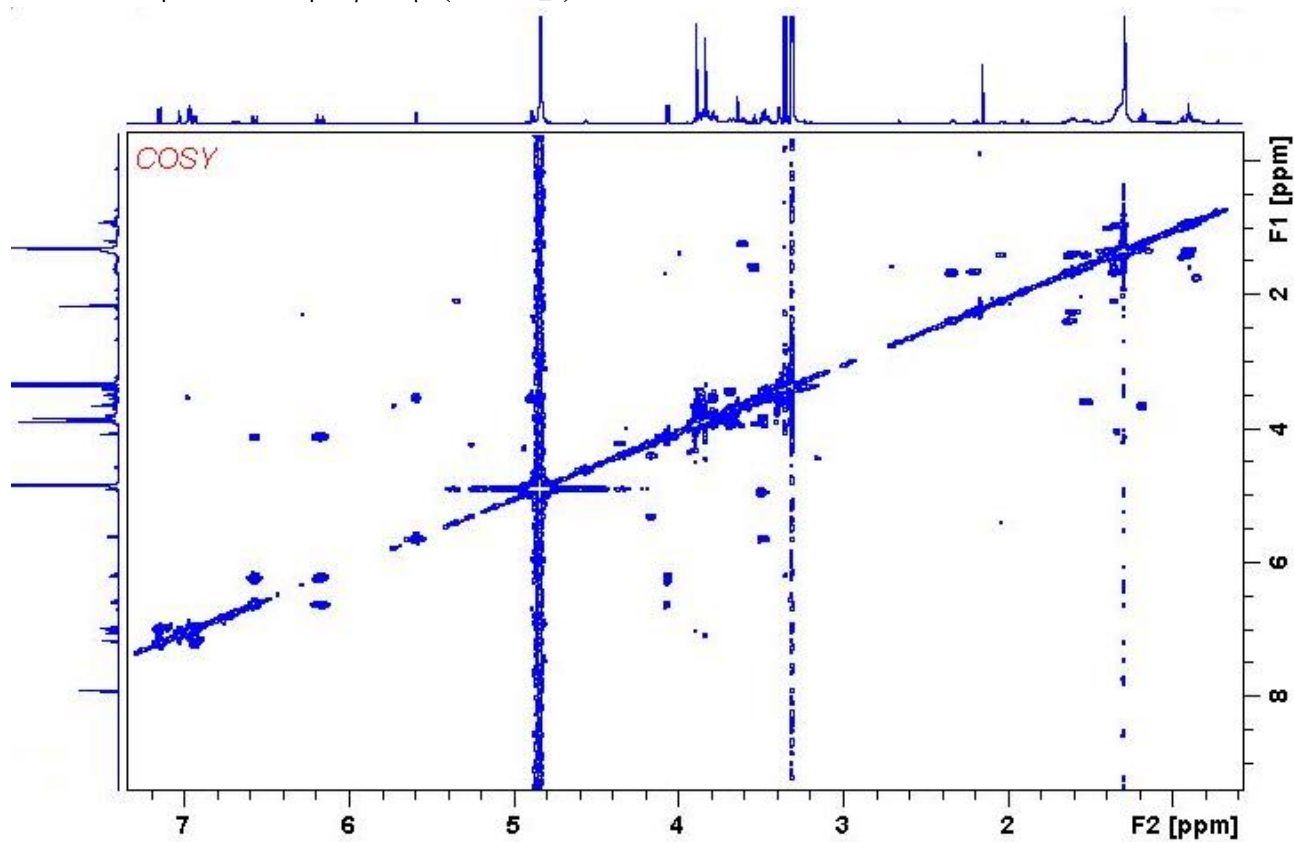
Εικόνα47: Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)

Atom	¹ H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-					137.86	
2	7.03	7.03	d	2.0	2.0	1H	111.09	C-7/C-6/C4/(² J)C-3
3	-	-	-	-	-	-	150.80	
4	-	-	-	-	-	-	147.90	
5	7.15	7.15	d	8.5	8.0	1H	118.03	C-1/C-3/(² J)C-4
6	6.93	6.93	dd	8.5/2.0	8.0/2.0	1H	119.22	C-2/C-4
		5.58			7.0		88.74	(² J)C-8/C-9/C-2/C-6/C-5'/(² J)C-1/C-4'
7	5.59		d	6.0		1H		
8		3.48	m	-		-	55.17	
9		3.85					64.77	C-7/(² J)C-8/C-5'
		3.78	dd		11.0/7.0			
3-OCH ₃	3.83	3.83	s	-	-	3H	56.54	
1'	-		-	-	-	-		
2'	6.96	6.95	s	-	-		112.13	
3'-OCH ₃	3.88	3.89	s	-	-	3H	56.60	
4'	-	-	-	-	-	-	149.50	
5'	-	-	-	-	-	-	129.82	
6'	6.97	6.97	s	-	-	1H	116.48	C-8/C-2'/C-6'/C-7'/C-4'
7'	6.57	6.56	d	16.0	16.0	1H	134.14	C-9'/C-2'/C-6'
8'	6.16	6.16	dt	16.0/6.0	16.0/6.0	1H	124.17	(² J)C-9'/C-1'
9'	4.06	4.05	dd	6.30/1.30	6.0/1.5	1H	74.12	C-8'/C-7'
		4.05	dd		6.0/1.5	1H		
9'-OCH ₃	3.36	3.36	s			3H	57.89	
1''	4.89	4.88	d	7.5	7.5	1H	102.67	C-3''/C-4
2''	3.48	3.48	d	7.5				
3''		3.47					77.87	
4''		3.39	-	-		-		
5''		3.38						
6''	3.87	3.87	m	m				
		3.68						

Πίνακας 19: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2) *Iizuka M. *et al.*, 2001



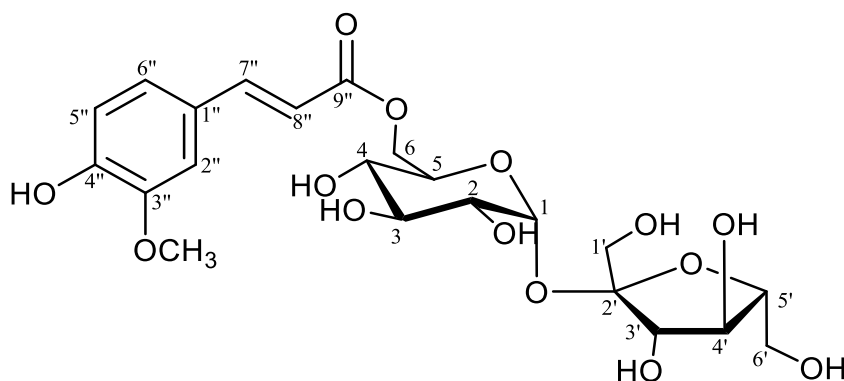
Εικόνα48: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)



Εικόνα49: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 3 (KPOFI/7_2)

Γ.1.4 Μεταβολίτης 4: β -D-φρουκτοφουρανοσυλο- α -D-(6-O-(E)-φερουλοϋλογλυκοπυρανοσίδης

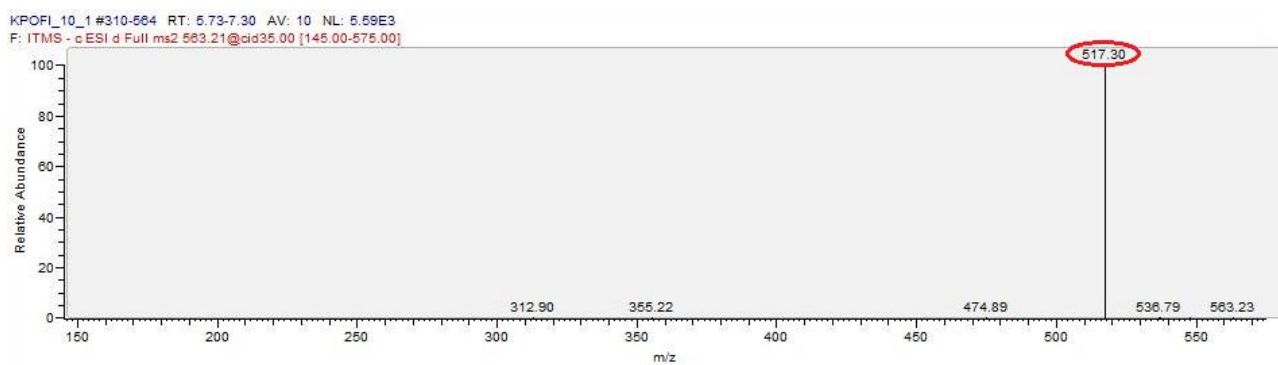
Ο **μεταβολίτης 4** απομονώθηκε σε καθαρή μορφή και σε μεγάλη ποσότητα από τα κλάσματα 40, 41 και 42 της CPC/1 (15.62 mg) αλλά και από τα κλάσματα KPOFI/4_34 (**KPOFI/10_1** και **KPOFI/11_1**) και KPOFI/4_35 (**KPOFI/8_3**) της CPC/2 (37.46 mg). Είναι ο πιο γνωστός εστέρας φερουλικού οξέος που έχει απομονωθεί από το φλοιό της ρίζας του ζαχαρότευτλου (*Beta vulgaris*) (Kujala T. *et al.*, 2000). Βιβλιογραφικά, στα σπέρματα της *O. ficus-indica* έχουν καταγραφεί μέσω πειραμάτων HPLC-MSⁿ και HPLC-NMR 3 ισομερή του φερουλικού με m/z 518 (MS⁻ 517.15) και απορρόφηση στα 330nm (Chougui N. *et al.*, 2013).



Σχήμα 28: Μεταβολίτης 4 (KPOFI/10_1)

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D^{25} = +54$, ($c = 0.24$, MeOH).

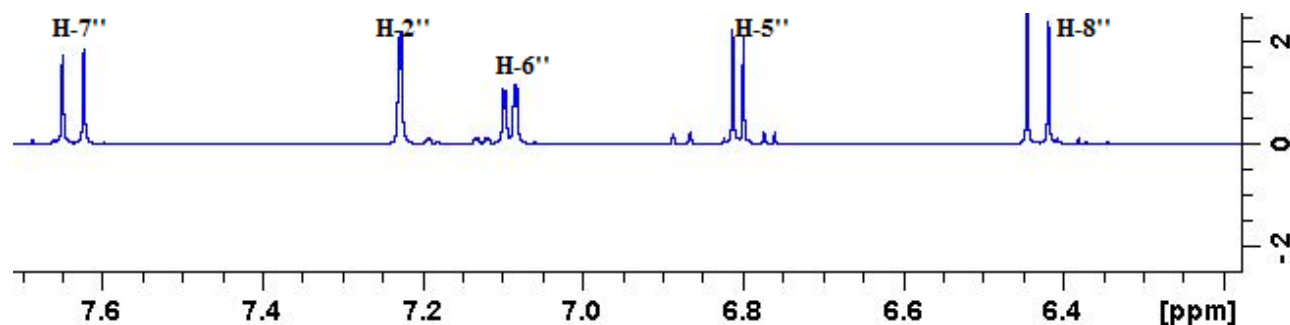
Το φάσμα μάζας του μορίου λήφθηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το μόριο εμφανίζεται με $R_t = 6.97$ min και καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 517.29 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{22}H_{45}O_{13}$. Η δομή του μεταβολίτη 4 προσδιορίστηκε με βάση την φασματοσκοπία NMR (1H -NMR, HSQC, HMBC, COSY).



Εικόνα 50: Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 4.

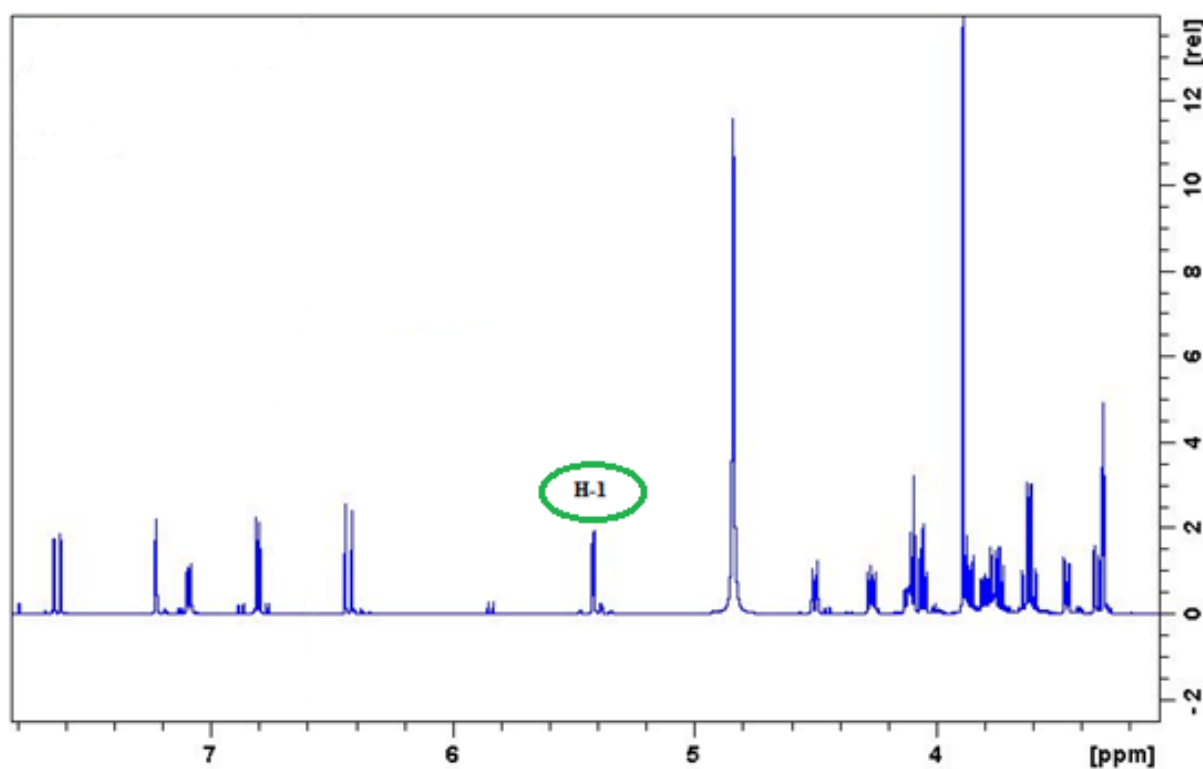
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H -NMR εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των πρωτονίων H-7'', H-8'' της αλυσίδας του φερουλικού οξέος που βρίσκονται σε *trans* σύζευξη σε δ_H 7.63 (1H, d, $J=15$ Hz) και δ_H 6.43 (1H, d, $J=15$ Hz) αντίστοιχα. Η παρουσία τριών ακόμη σημάτων στην ίδια περιοχή σε δ_H 6.80 (1H, d, $J=8$ Hz), δ_H 7.09 (1H, dd, $J=8/2$ Hz) και δ_H 7.23 (1H, d, $J=2$ Hz) αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5'', H-6'' και H-2'' και (λαμβάνοντας υπ'όψιν και τις συσχετίσεις από το φάσμα HMBC) υποδηλώνουν τρισυποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο.

Επιπλέον, στην οξυγονωμένη περιοχή και σε δ_H 3.91 παρατηρείται απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3H και αντιστοιχεί στη μεθόξυ ομάδα.



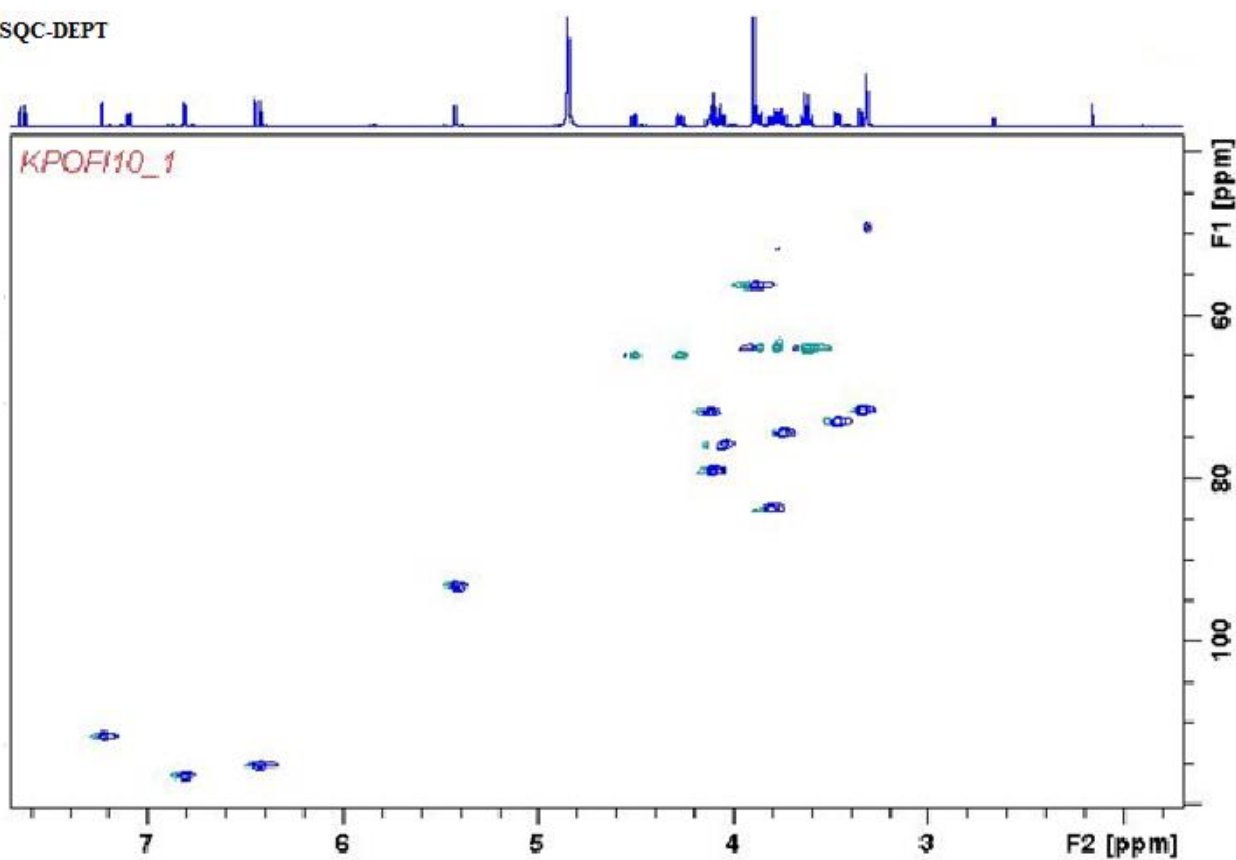
Εικόνα 51: Φάσμα ^1H -NMR του φαινολοξέος στην αρωματική περιοχή

Σε δ_H 5.42 παρατηρείται χαρακτηριστική διπλή κορυφή με $J=3.8\text{Hz}$ η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (σε θέση ισημερινή λόγω της μικρής σταθεράς σύζευξης J) της γλυκόζης του δισακχαρίτη σουκρόζη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η γλυκόζη χαρακτηρίζεται ως α (λόγω της μικρής σταθεράς σύζευξης J) και D καθώς το υδροξύλιο του άνθρακα στη θέση 6 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, σε ισημερινή θέση. Σε δ_H 4.5 και δ_H 4.29 παρατηρούνται δύο διπλές διπλών κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα geminal πρωτόνια του ογκώδη υποκαταστάτη της γλυκόζης. Τα υπόλοιπα σήματα των σακχάρων είναι δυσδιάκριτα και παρατηρούνται σε χημικές μετατοπίσεις μεταξύ 3-4ppm. Η σύνδεση της γλυκόζης με το φερουλικό οξύ στη θέση 6 του άνθρακα του ογκώδους υποκαταστάτη επιβεβαιώθηκε από το φάσμα HMBC όπου τα πρωτόνια H-6a και H-6b παρουσιάζουν συσχέτιση με τον C-9'' της αλδεϋδομάδας του φερουλικού οξέος και τον C-4 της γλυκόζης. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kujala T. *et al.*, 2000). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη δίνονται στον παρακάτω πίνακα.



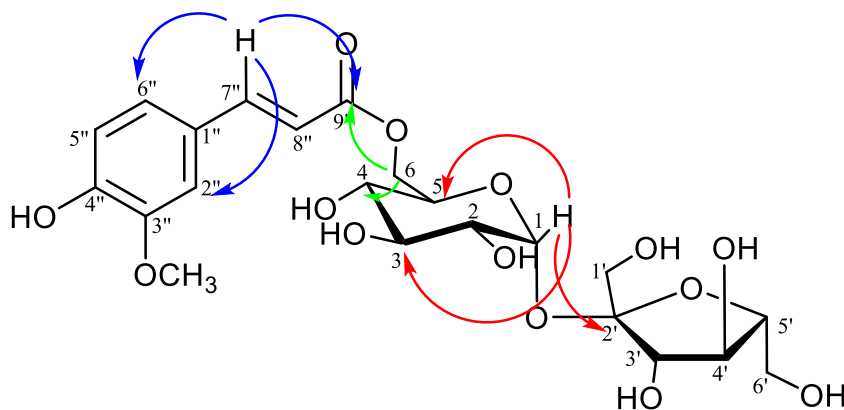
Εικόνα 52: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 4

HSQC-DEPT



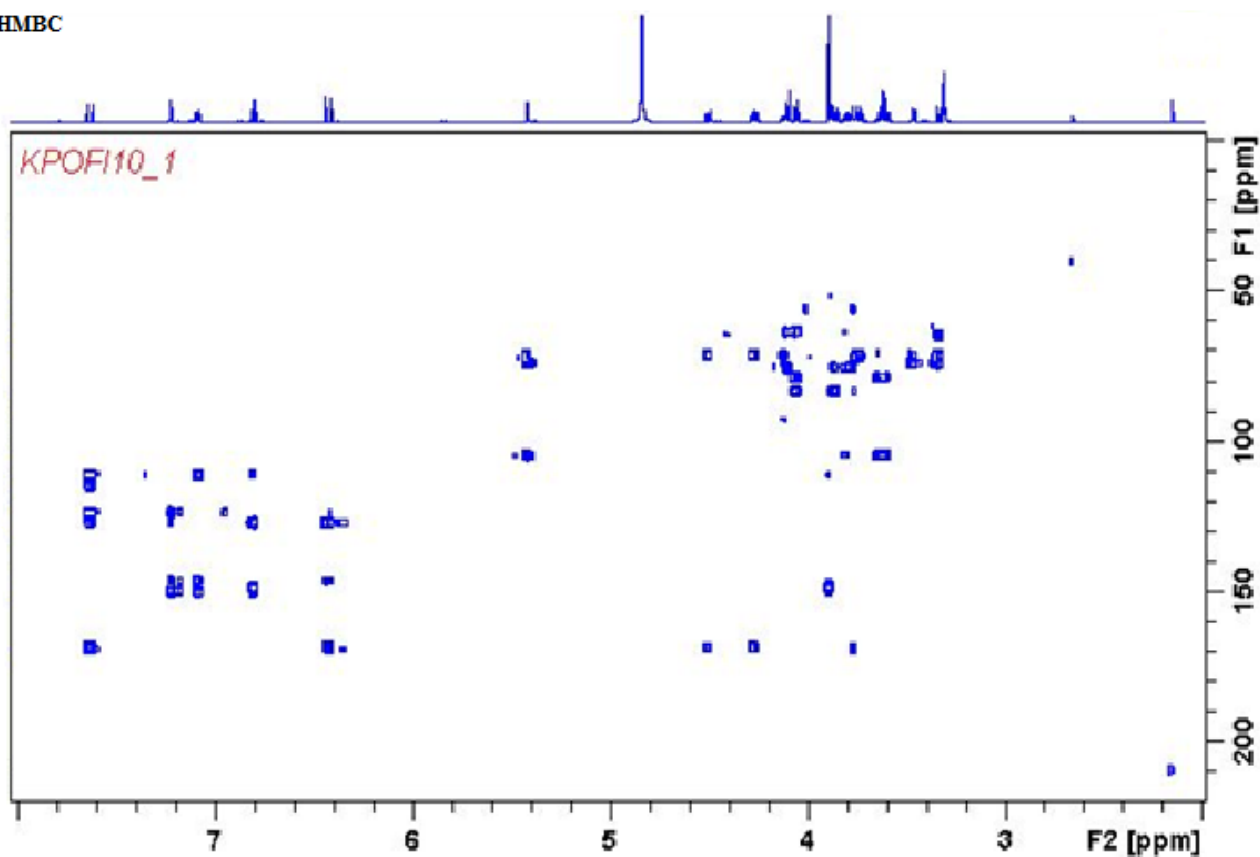
Εικόνα 53: Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)

Atom	¹ H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Type	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
1	5.42	5.41	d	3.8	3.8		1H	92.96	C-2'/C-3/C-5
2		3.45	dd		9.8/3.8				
3		3.88-3.71	m	-		-	-	74.50	-
4	-		-	-		-	-	71.70	-
5		4.11	ddd		10.1/6.1/1.9	-	-	71.90	-
6a	4.5	4.49	dd	11.2/2.0	11.9/2.0		1H	64.80	C-9''/C-4
6b	4.29	4.26	dd	11.2/6.0	11.9/6.2		1H	64.80	C-9''/C-4
1'a	-	3.62	d	-	12.3	-	-		
1'b		3.59	d		12.3				
2'								105.0	
3'	-	4.09	d	-	8.4	-	-		-
4'		4.05	dd		8.4/7.5				
5'		3.88-3.71	m						
6'a		3.88-3.71	m	-		-	-		-
6'b		3.88-3.71	m						
1''	-		-	-		-	-	-	-
2''	7.23	7.23	d	2.0	1.9	CH	1H	111.60	C-7''/C-6''/C-5''/C-8''
3''-OCH ₃	3.91	3.89	s	-	-	-	3H	-	-
4''-OH									
5''	6.80	6.80	d	8.0	8.2	CH	1H	116.19	(C-2''/C-6'')/C-7''
6''	7.09	7.09	dd	8.0/2.0	8.4/1.9	CH	1H	124.08	C-2''/C-8''/(C-5''/C-7'')
7''	7.63	7.63	d	15.0	15.9	CH	1H	146.86	C-9''/C-6''/C-2''/(C-1'')
8''	6.43	6.43	d	15.0	15.9	CH	1H	115.09	C-9''/C-7''
9''	-		-	-		-	-	168.80	C-6/C-7''/C-8''

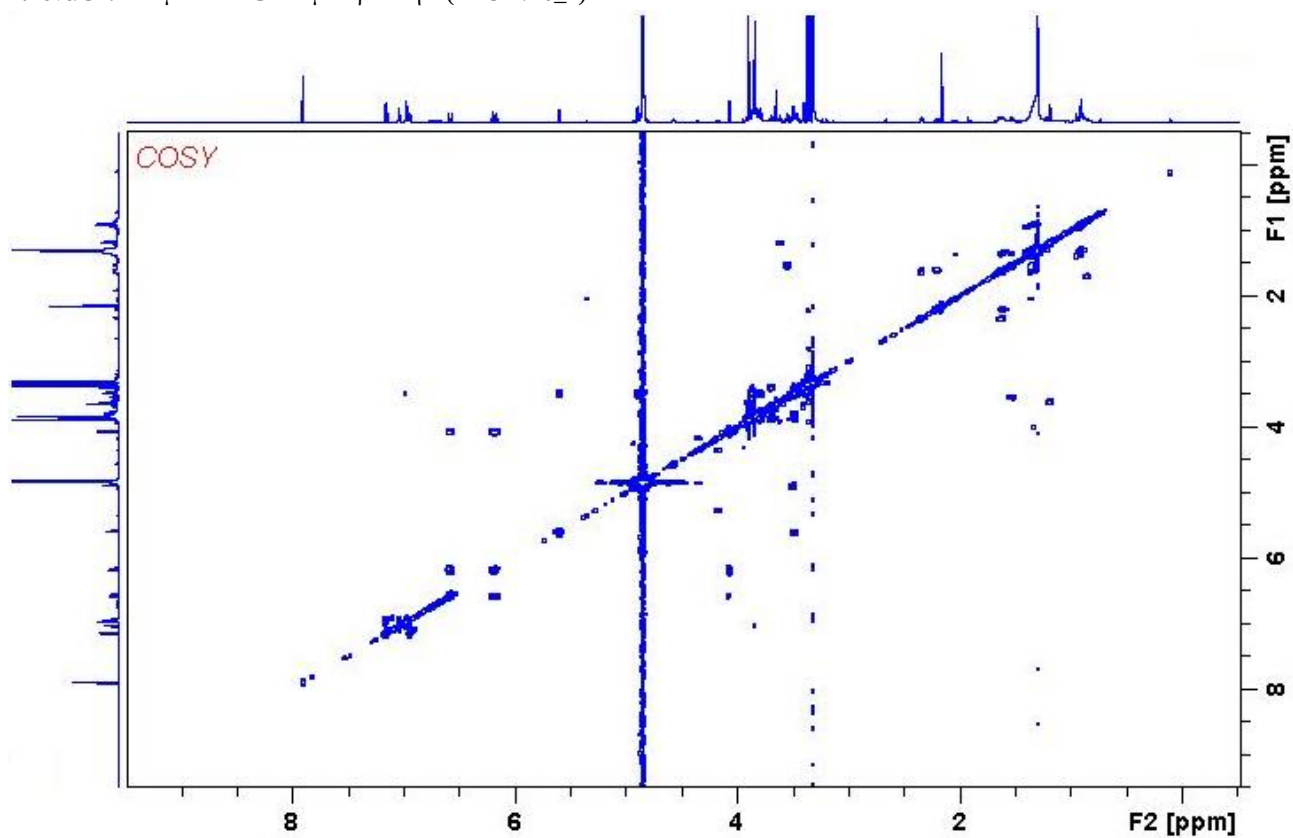
Πίνακας 20: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1) *Kujala T. *et al.*, 2000

Σχήμα 29: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 4

HMBC



Εικόνα 54: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)

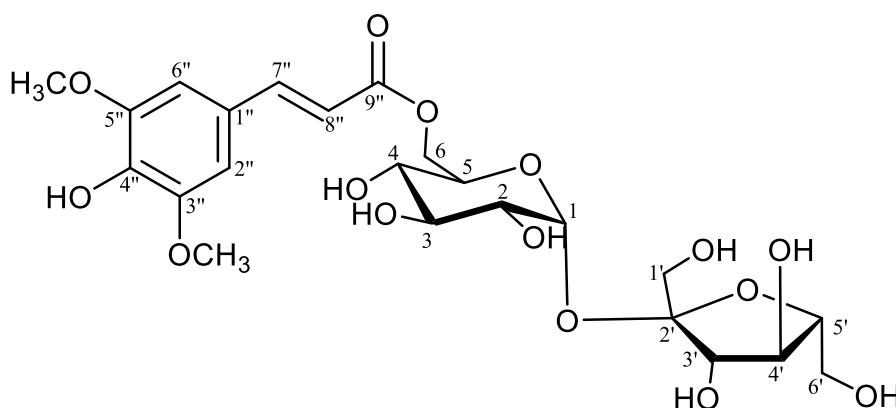


Εικόνα 55: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4 (KPOFI/10_1)

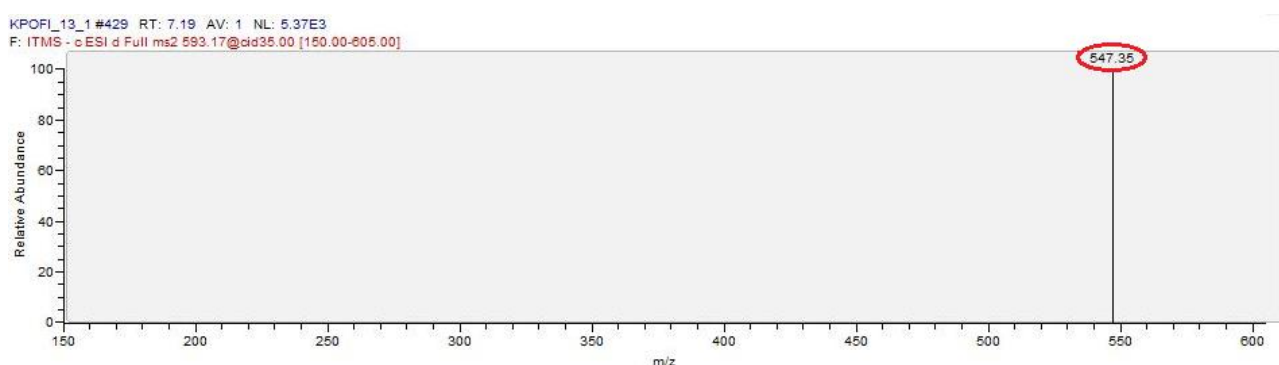
Γ.1.5 Μεταβολίτης 5: β -D-φρουκτοφουρανοσυλο-(2 $\rightarrow$ 1)-(6-O-σιναποϋλο)- α -D-γλυκοπυρανοσίδης (sibiricose A1)

Ο μεταβολίτης 5 απομονώθηκε από το κλάσμα KPOFI/4_37 και αποτελεί έναν εστέρα του σιναπικού οξέος. Η ειδοποιός διαφορά με το μεταβολίτη 4 είναι στην ύπαρξη της επιπλέον μεθόξυ ομάδας σε δ_H 6.80 στη θέση 5 του σιναπικού οξέος. Οι εστέρες του σιναπικού οξέος προσδίδουν πικρή γεύση και θεωρούνται αντιθρεπτικοί παράγοντες λόγω της στυπτικότητάς τους, η οποία οδηγεί σε μειωμένη πέψη των πρωτεϊνών (Wolfram K. *et al.*, 2010; Naczki M. *et al.*, 1998).

Ο μεταβολίτης **sibiricose A1** (Jin H. G. *et al.*, 2016) έχει προηγουμένως απομονωθεί από τις ρίζες του φυτού *Polygala sibirica* οι οποίες χρησιμοποιούνται ως παραδοσιακό φάρμακο στην Κίνα (Miyase, T. *et al.*, 1999) και από τα σπέρματα του φυτού *Raphanus sativus* (Jin H. G. *et al.*, 2016). Στα σπέρματα του μελετηθέντος φυτού απομονώνεται και ταυτοποιείται για πρώτη φορά ενώ οι Chougui N. *et al.*, 2013 κάνουν μία υπόθεση για παρουσία σιναπικού διγλυκοσίτη με m/z 548 χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί με NMR ανάλυση εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσης του μορίου στο εκχύλισμα.



Σχήμα 30: Μεταβολίτης 5 (KPOFI/13_1)

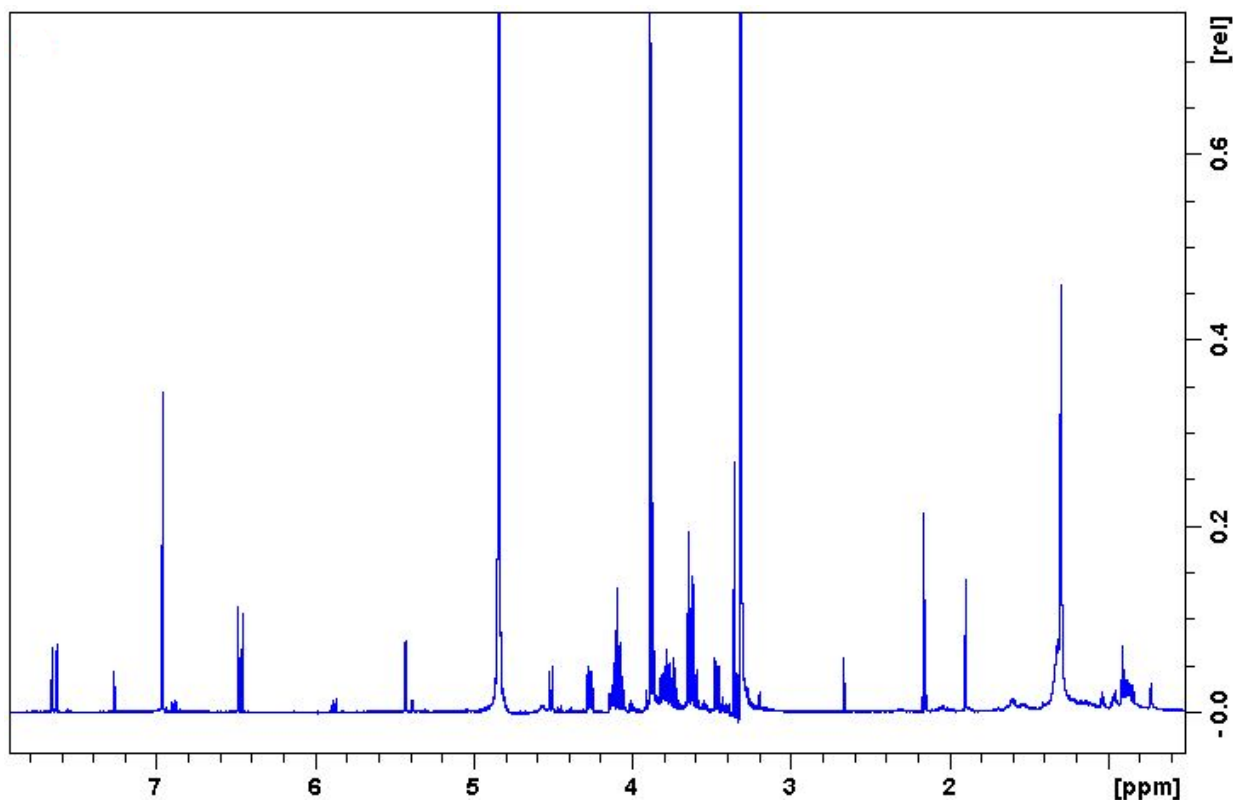


Εικόνα 56: Φάσμα MS/MS του μεταβολίτη 5

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = +32.6$ ($c = 0.11$, MeOH).

Το μόριο εμφανίζεται με $R_t = 7.12$ min και καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 548 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{23}H_{32}O_{15}$. Από το φάσμα 1H -NMR παρατηρούνται τα ολεφινικά πρωτόνια σε *trans* σύζευξη H-7'' (δ_H 7.63, d, $J = 16$ Hz) και H-8'' (δ_H 6.46, d, $J = 16$ Hz),

ένας τετραϋποκατεστημένος αρωματικός δακτύλιος με δύο ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια σε δ_H 6.95 που εμφανίζονται ως απλή κορυφή και δύο μεθόξυ ομάδες σε δ_H 3.87 που εμφανίζονται ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 6H. Η δομή του μεταβολίτη 5 αποδόθηκε με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων. Συγκεκριμένα, η σύνδεση της γλυκόζης με το σιναπικό στη θέση 6 παρατηρείται από το φάσμα HMBC. Το φάσμα COSY απέδωσε τη συσχέτιση των πρωτονίων H-7'' και H-8'' σε 3J .

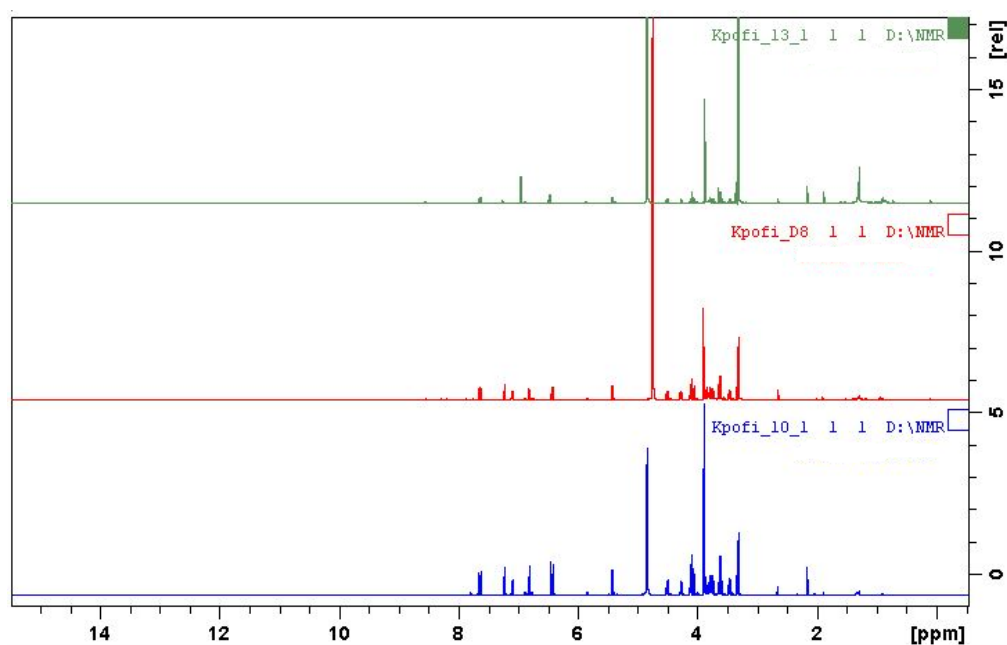


Εικόνα 57: Φάσμα 1H -NMR του μεταβολίτη 5

Atom	1H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	5.42	5.42	d	3.82	3.5	1H	93.2	C-2'
2		3.46	dd		9.5/4.0	1H	73.3	
3	-	3.74	dd		10.0/9.5	1H	74.8	-
4	-	3.33	dd	-	9.5/9.0	1H	71.70	-
5	-	4.14	m	-		-	71.90	-
6a	4.5	4.51	dd	11.9/2.0	12.0/1.5	1H	64.80	
6b	4.26	4.25	dd	12.0/6.43	12.0/6.5	1H	64.80	C-9''/C-4
1'a	-	3.61	d	-	12.5	1H	65.3	
1'b		3.62	d	12.5		1H		
2'	-	-	-	-	-	-	105.0	
3'	-	4.08	d		8.0	1H	79.3	-
4'		4.06	dd		8.0/8.0	1H		

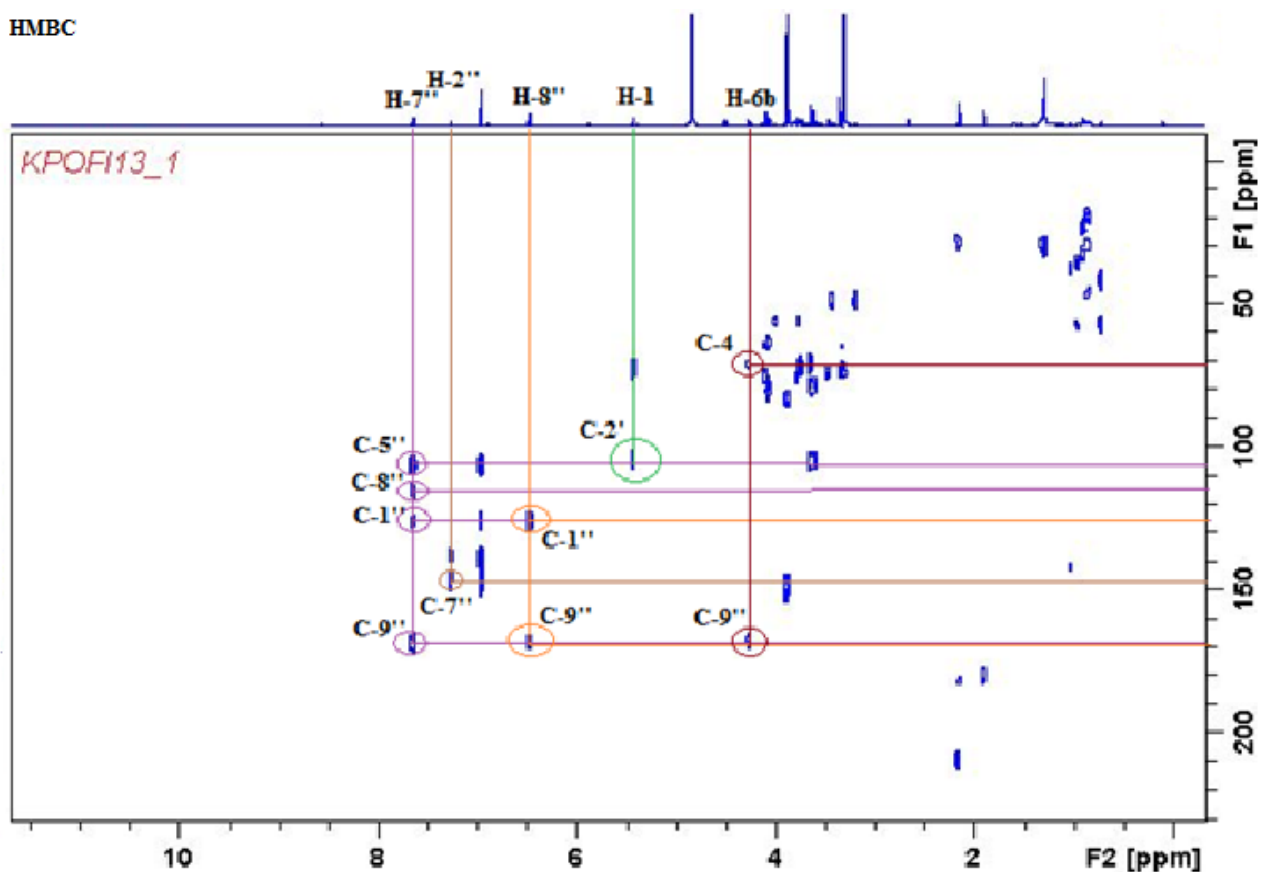
5'									
6'a	-	3.76- 3.81	m	-	-	-	64.4	-	-
6'b									
1"	-		-	-	-	-	-	-	-
2"(6")		6.95	s		-	2H	109.88	C-7"	
3"-OCH ₃	3.87	3.87	s	-	-	6H	56.70	-	-
4"-OH									
5"-OCH ₃		3.87		-			64.0		
6"(2")		6.95			-				
7"	7.63	7.63	d	15.78	16.0	1H	147.2	C-5"/C-8"/(² J)C-1"/C-9"	
8"	6.46	6.46	d	15.86	16.0	1H	115.5	C-1"/C-9"	
9"	-	-	-	-	-	-	168.80	H-6b/H-8"/H-7"	

Πίνακας 21: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1) * Jin H. G. *et al.*, 2016

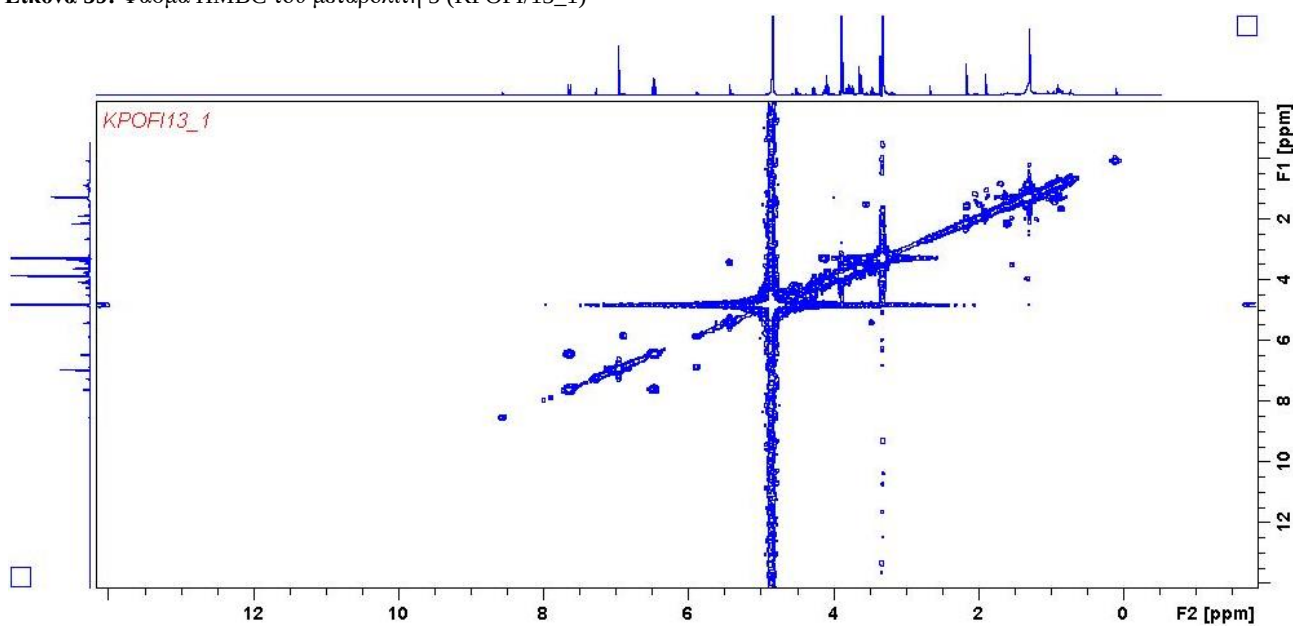


Εικόνα 58: Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων ¹H-NMR των μεταβολιτών 4 (FCPC/1 και FCPC/2) και 5

HMBC



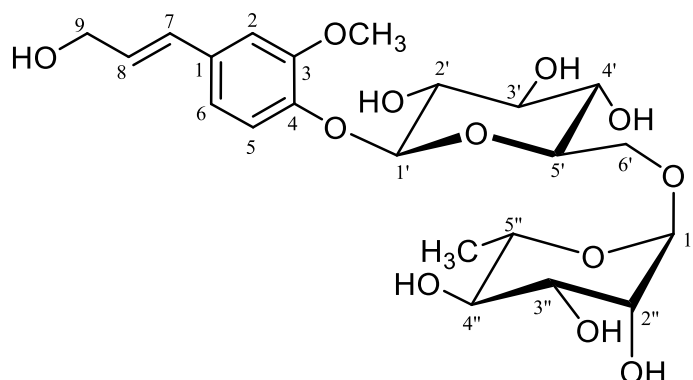
Εικόνα 59: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1)



Εικόνα 60: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5 (KPOFI/13_1)

Γ.1.6 Μεταβολίτης 6: 4-O-ρουτινοσίδης της κωνιφεραλκοόλης

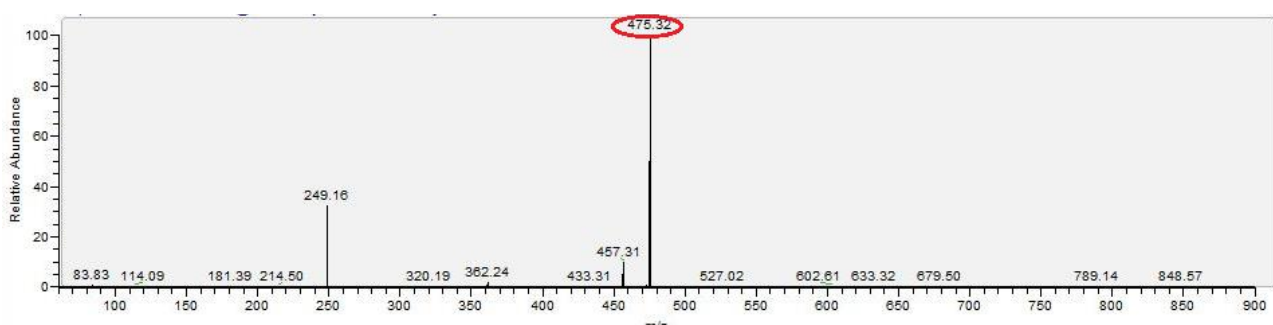
Ο μεταβολίτης 6 απομονώθηκε από το κλάσμα KPOFI/4_39 και είναι ένας διγλυκοσίδης της κωνιφεραλκοόλης. Αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.



Σχήμα 31: Μεταβολίτης 6 (KPOFI/14_1)

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = -12.3$ ($c = 0.065$, MeOH).

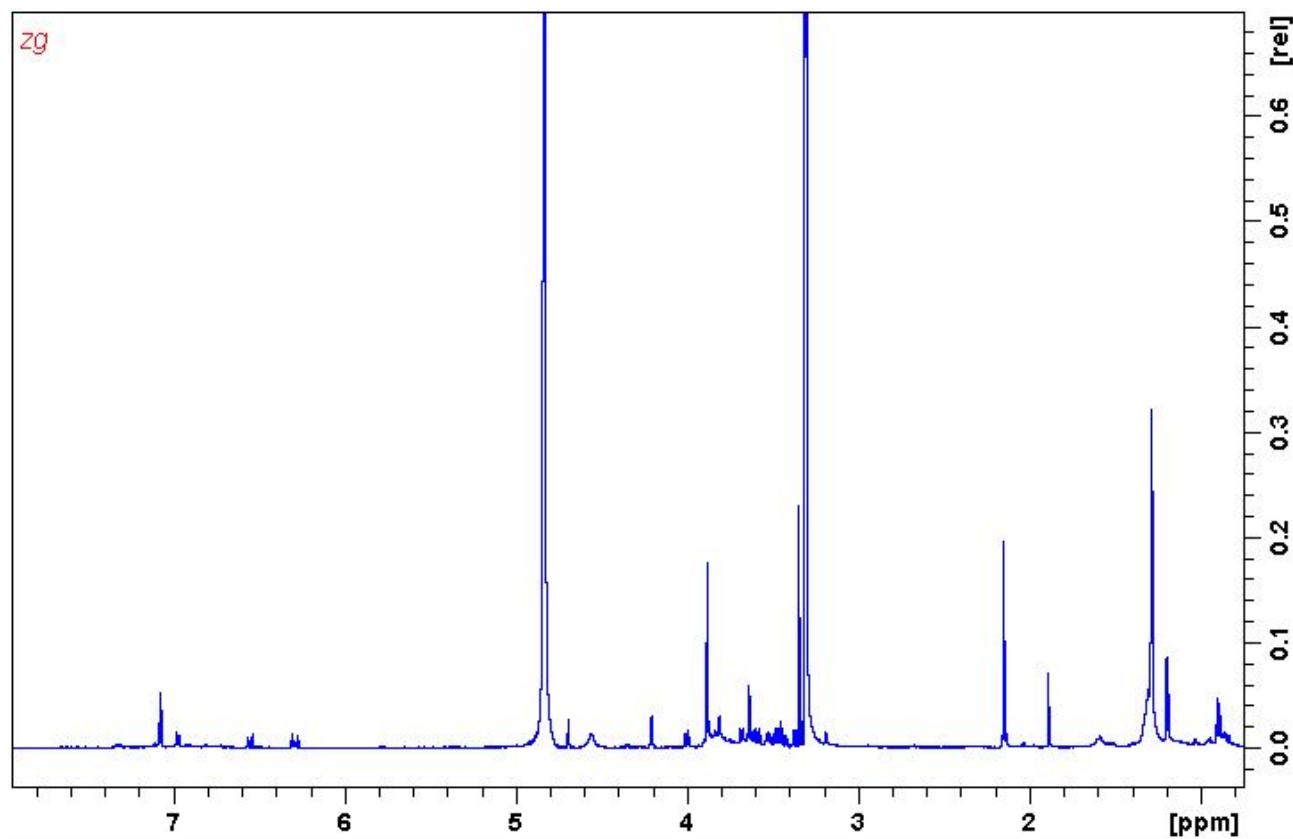
Το φάσμα μάζας του μορίου λήφθηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε θετικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν του μορίου αντιστοιχεί σε $[M+H]^+$ 475.32. Η δομή του μεταβολίτη 6 προσδιορίστηκε με βάση την φασματοσκοπία NMR ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY).



Εικόνα 61: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 6

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται πέντε χαρακτηριστικά σήματα που αντιστοιχούν στο κομμάτι του μορίου που ανήκει στην κωνιφεραλκοόλη. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται τρία σήματα του αρωματικού δακτυλίου, σε δ_H 7.11 (d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5), δ_H 7.08 (d, $J=2.0\text{Hz}$, H-2), δ_H 6.98 (dd, $J=8.5/2.0\text{Hz}$, H-6) και άλλα δύο ολεφινικά πρωτόνια σε *trans* σύζευξη, σε δ_H 6.55 (d, $J=15.8\text{Hz}$, H-7) και δ_H 6.30 (dt, $J=15.8/5.60\text{Hz}$, H-8). Το υπόλοιπο κομμάτι του μορίου αποτελείται από δύο σάκχαρα με χαρακτηριστικά σήματα στα 3-4 ppm. Σε δ_H 4.69 (d, $J=1.5\text{Hz}$, H-1'') εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης ενώ το ανωμερικό της γλυκόζης δεν παρουσιάζεται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λόγω της επικάλυψης του σήματος από το σήμα του διαλύτη. Η μικρή σταθερά σύζευξης του ανωμερικού ($J=1.5\text{Hz}$) καθώς και η χαρακτηριστική κορυφή σε δ_H 1.20 (d, 6.20, 5''-CH₃), που υποδηλώνει την παρουσία του μεθυλίου της ραμνόζης σε αξονική θέση, χαρακτηρίζουν την α-L-ραμνόζη. Από τα φάσματα HMQC, HMBC και COSY ολοκληρώνεται η δομή του μορίου με χαρακτηριστικές τις μετατοπίσεις του άνθρακα τις γλυκόζης

και της ραμνόζης, σε δ_C 102.47 και δ_C 101.80 αντίστοιχα, και τις συζεύξεις τις α -D-γλυκόζης με την κωνιφεραλκοόλη (H-1'/C-4) και τη ραμνόζη (H-1''/C-6').

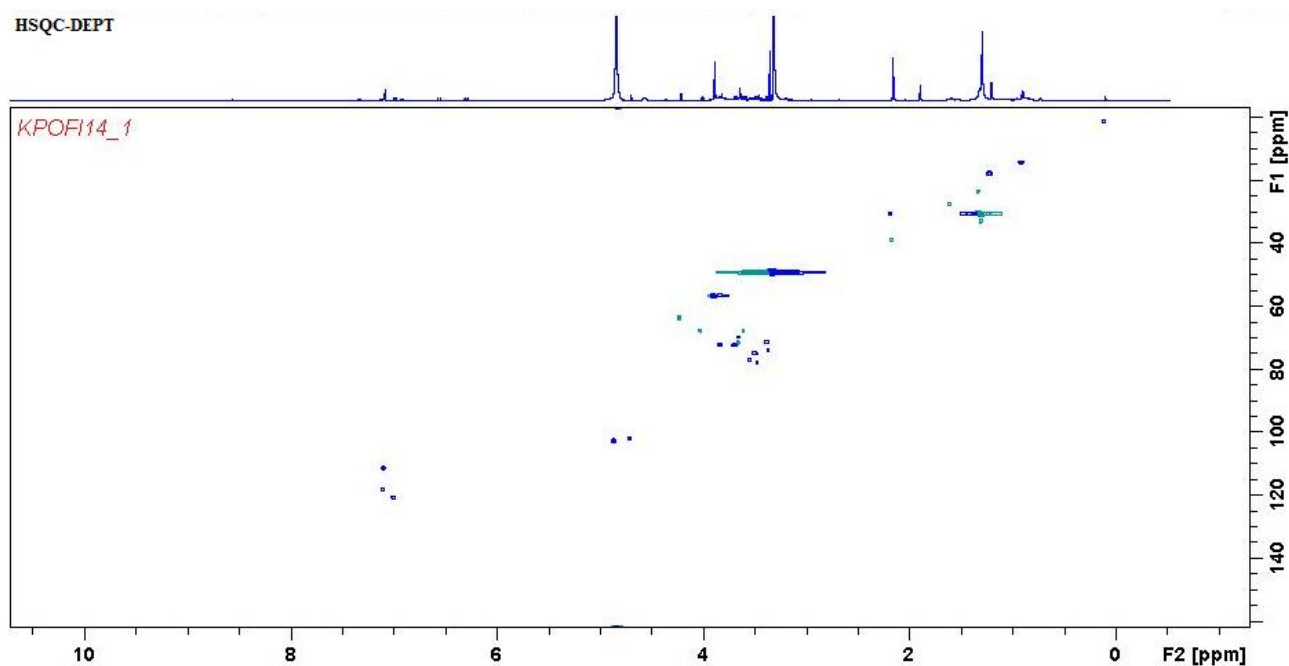


Εικόνα 62: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 6

Atom	^1H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-	-	-	133.60	
2	7.08	d	2.0	1H	111.20	
3	-	-	-	-	150.08	
OCH ₃	3.90	s	-	3H	56.36	C-3
4	-	-	-	-	147.57	
5	7.11	d	8.5	1H	117.60	(2J)C-6/C-1/(2J)C-4/C-3
6	6.98	dd	8.5/2.0	1H	120.50	
7	6.55	d	15.8	1H	131.05	
8	6.30	dt	15.8/5.6	1H	128.74	C-1/(2J)C-9
9a	4.24	dd	5.8/1.5		63.43	(2J)C-8/C-7
9b	4.24	dd	5.8/1.5		63.43	(2J)C-8/C-7
1'	4.84	d	1.5	1H	102.47	
2'					74.80	
3'					78.0	
4'					71.40	

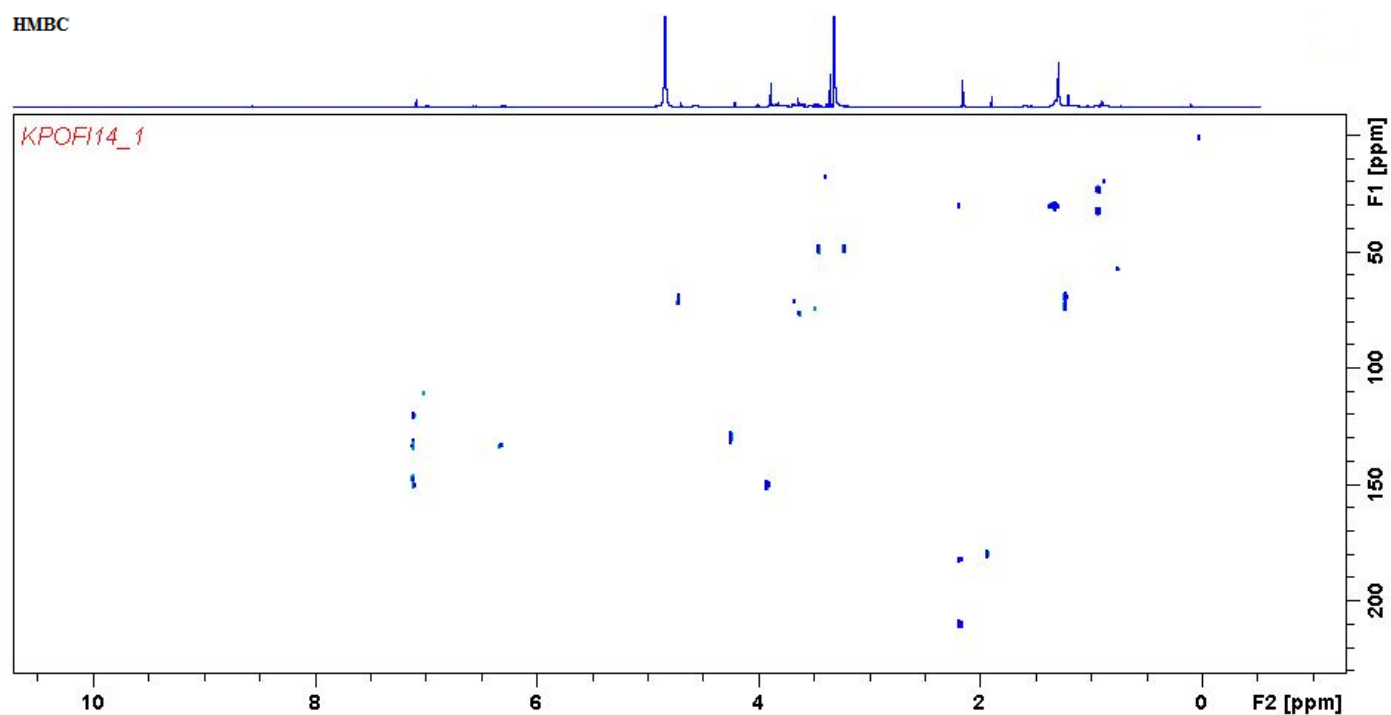
5'					77.0	
6'a	4.00	dd	11.04/1.9	1H	67.90	
6'b	3.60	dd	11.04/(1.9)		67.90	
1"	4.69	d	1.5		101.80	C-6'/(² J)C-2"
2"	3.85				72.20	
3"					72.40	
4"	3.35	t	1.5/1.5	1H	73.50	
5"	3.66	dd	9.7/3.5	1H	69.64	
5"-CH ₃	1.20	d	6.2	3H	17.50	C-4"/C-5"

Πίνακας 22: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)



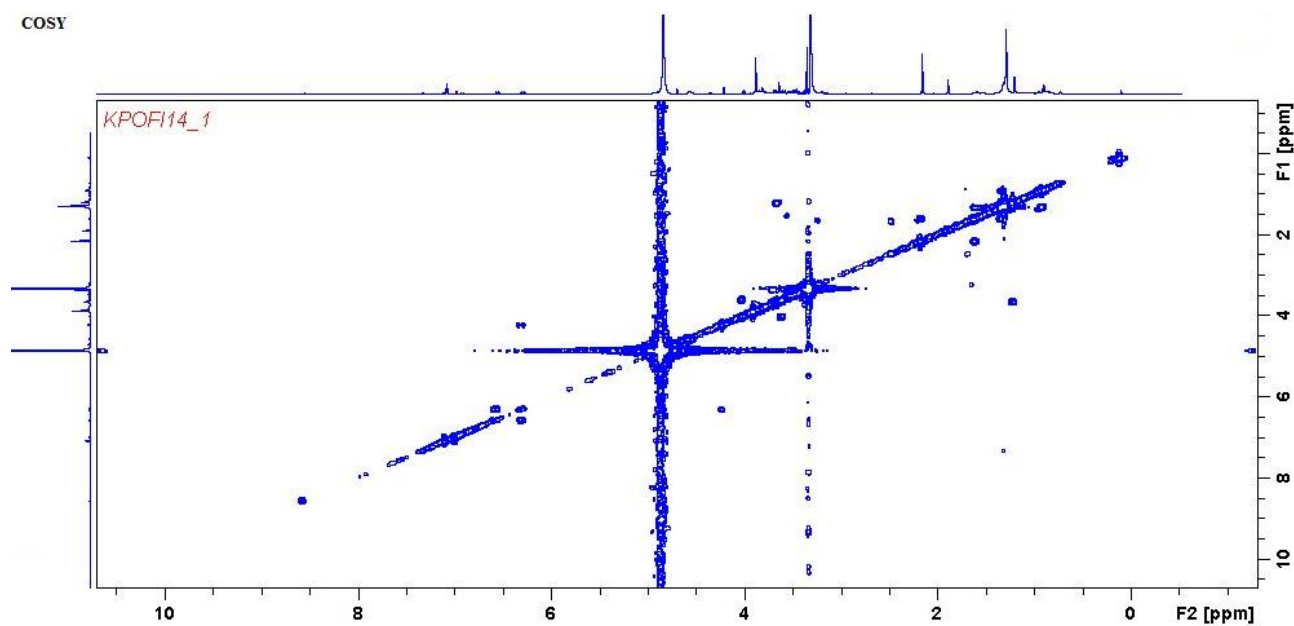
Εικόνα 63: Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)

HMBC

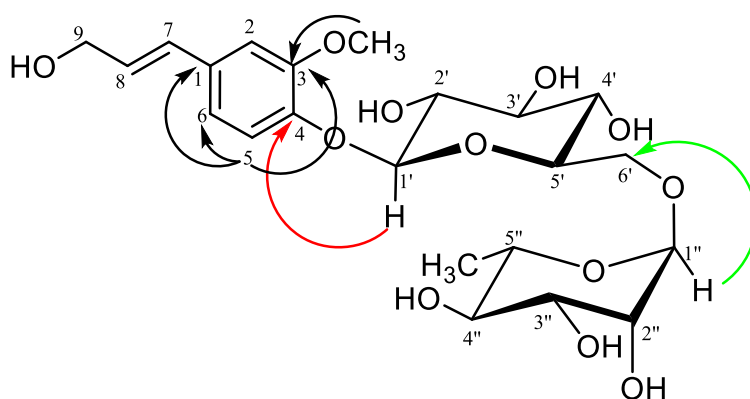


Εικόνα 64: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)

COSY



Εικόνα 65: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6 (KPOFI/14_1)

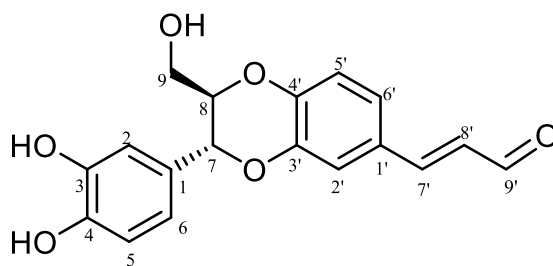


Σχήμα 32: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 6

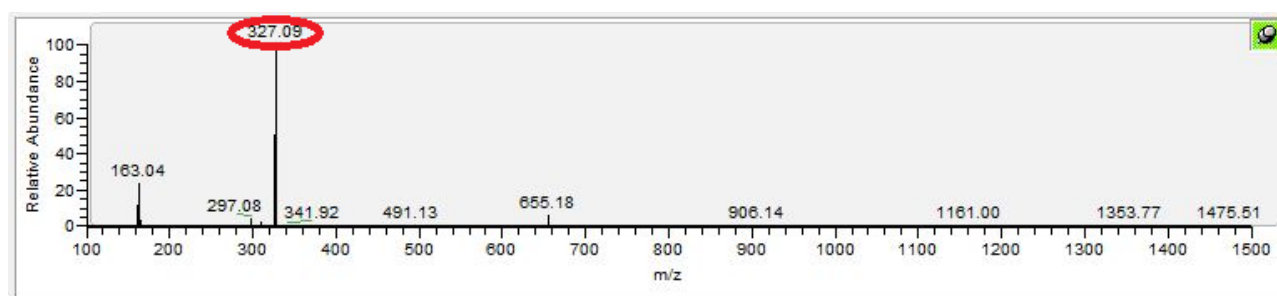
Γ.1.7 Μεταβολίτης 7: Ισομερικανίνη A

Οι 1,4- βενζοδιοξάνες και συγκεκριμένα αυτές με μια 9- υδροξυλομάδα, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν ποικίλλες φαρμακολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένου της κυτταροτοξικής, αντιμικροβιακής και ηπατοπροστατευτικής, γεγονός που τις καθιστά πολύ σημαντικούς στόχους μελέτης (Pilkington L. I. & Barker D., 2014). Το σεσκινεολιγνάνιο αμερικανίνη A μαζί με την αμερικανίνη B και D απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα σπέρματα του φυτού *Phytolacca americana*. Είναι ένα εναντιομερές μόριο με ηπατοπροστατευτική δράση (Woo W.S. *et al.*, 1980). Η επιβεβαίωση της ισομέρειας ήρθε λίγα χρόνια αργότερα από τους Fukuyama Y. *et al.*, 1991, απομονώνοντάς το από το ίδιο πάλι φυτό. Οι Tanaka H. *et al.*, 1987 συνέθεσαν και επιβεβαίωσαν τη δομή της αμερικανίνης A και του ισομερούς της, ισομερικανίνη A. Επιπλέον μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση της ισοαμερικανίνης A από το μεθανολικό εκχύλισμα των σπερμάτων του ευρέως διαδεδομένου δέντρου της Βραζιλίας *Joannesia princeps* (παραδοσιακά χρησιμοποιούνταν ως καθαρτικό στον κτηνιατρικό τομέα) (Fukuyama Y. *et al.*, 1991; Waibel R. *et al.*, 2003). Το 2012 απομονώθηκε και από το seed cake του φυτού *Jatropha curcas* (Yao L. *et al.*, 2012). Κατά τους Fukuyama Y. *et al.*, 1991 η ισοαμερικανίνη είναι ένας εκκινητής της προσταγλανδίνης I₂ (προστακυκλίνη). Αργότερα, οι Jing *et al.*, 2004 συνέθεσαν εκ νέου στο εργαστήριο την ισοαμερικανίνη A. Οι Lin C.F. *et al.*, 2007 αναφέρουν την παρουσία της αμερικανίνης A και στον καρπό του φυτού *Morinda citrifolia*. Πολύ πιο πρόσφατα η 7S,8S-ισοαμερικανίνη A απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα σπέρματα της *Opuntia ficus-indica* (Kim J.W. *et al.*, 2016).

Το ισομερές της ισοαμερικανίνης A, η αμερικανίνη A, εκτός από την ηπατοπροστατευτική της δράση έχει βρεθεί ότι ενισχύει τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης (Fukuyama Y. *et al.*, 1991), έχει αντιοξειδωτική δράση (Su B. N. *et al.*, 2005; Shoeb M. *et al.*, 2006) και αιμοστατική ως αναστολέας της θρομβίνης (Zhu K. *et al.*, 1997; Chmelar J. *et al.*, 2012). Τέλος, το νεολιγνάνιο αμερικανίνη A έχει μελετηθεί και για τις αντικαρκινικές του ιδιότητες. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε για τη δράση του σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου με αποτέλεσμα την αναστολή των καρκινικών κυττάρων τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα (Jung C. *et al.*, 2015).



Σχήμα 33: Μεταβολίτης 7 (KPOFI/15_1)

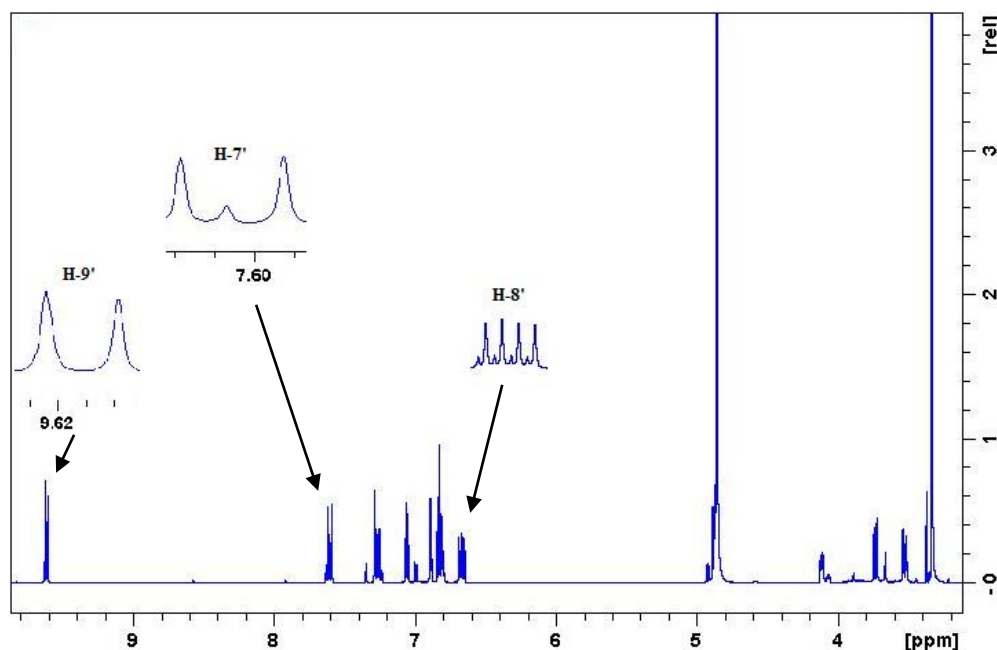


Εικόνα 66: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 7

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = +0.0$ ($c = 0.18$, MeOH).

Το φάσμα μάζας του μορίου εμφανίζει ψευδομοριακό ιόν στα 327 με μοριακό τύπο $C_{18}H_{16}O_6$.

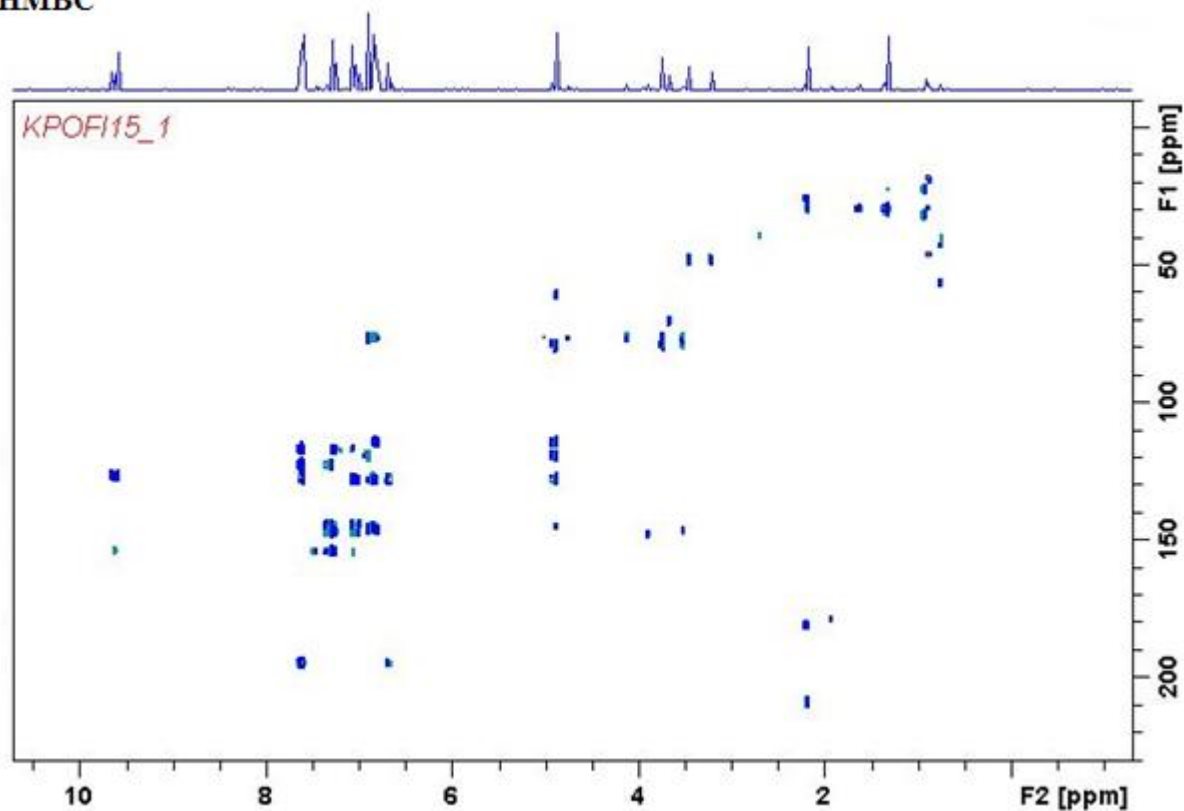
Στο φάσμα 1H -NMR της ισοαμερικανίνης Α παρατηρείται το χαρακτηριστικό σήμα της αλδεϋδης που συντονίζεται σε δ_H 9.61 με διπλή κορυφή και $J=7.86\text{Hz}$. Σε λίγο υψηλότερα πεδία εμφανίζονται μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.60 και μια διπλή διπλής κορυφή σε δ_H 6.69 με $J=15.8\text{Hz}$ και $J=15.8/7.80\text{Hz}$ που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του διπλού δεσμού της αλυσίδας του Β δακτυλίου ($H-7'$ και $H-8'$). Ακολουθούν τα πρωτόνια του Β δακτυλίου $H-2'$, $H-6'$ και $H-5'$ και τα πρωτόνια $H-2$ (d, $J=2.5\text{Hz}$), $H-5$ (d, $J=8.5\text{Hz}$) και $H-6$ (dd, $J=8.5/2.5\text{Hz}$) του Α αρωματικού δακτυλίου. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα πρωτόνια των θέσεων 7 (δ_H 4.85, d, $J=8.5\text{Hz}$) και 8 (δ_H , ddd, $J=8/4.5/3\text{Hz}$) του διπλά οξυγονωμένου βασικού σκελετού της ισοαμερικανίνης Α. Τέλος, τα geminal πρωτόνια του υποκαταστάτη του C δακτυλίου συντονίζονται σε υψηλότερα πεδία (δ_H 3.52, dd, $J=12.5/4.5\text{Hz}$, $H-9a$) και (δ_H 3.73, dd, $J=12.5/3\text{Hz}$, $H-9b$) λόγω του ότι βρίσκονται πάνω σε άνθρακα με μια υδροξυλομάδα.

Εικόνα 67: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 7

Atom	^1H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Integration	^{13}C (ppm)	*paper	HMBC Correlations
1	-	-	-	-	-		127.90	129.60	
2	6.91	6.87	d	2.5	2.5	1H	115.56	115.50	
3	-	-	-	-	-			146.60	
4	-	-	-	-	-			147.20	
5	6.85	6.81	d	8.5	8.5	1H	116.44	116.40	C-1/C-3
6	6.83	6.78	dd		8.5/2.5	1H	120.37	120.40	C-1/C-2/C-4
7	4.90	4.85	d	8.0	8.0	1H	77.43	77.70	C-9/C-8/C-2/C-6/C-1
8	4.11	4.08	m		8/4.5/3	1H	80.36	80.0	C-7
9a	3.52	3.50	dd	12.3/4.0	12.5/4.5	1H	61.84	62.10	
9b	3.73	3.71	dd	12.3/2.0	12.5/3	1H	61.84	62.10	C-7
1'	-	-	-	-	-		127.90	132.20	
2'	7.30	7.25	d	2.5	2.5	1H	118.15	115.60	C-6'/ C-4'/C-3'
3'	-	-	-	-	-			144.90	
4'	-	-	-	-	-		145.0	145.0	
5'	7.06	7.03	d	8.5	8.5	1H	118.56	117.90	
6'	7.28	7.23	dd		8.5/2.5	1H	123.91	120.70	
7'	7.60	7.57	d	15.8	16	1H		131.40	C-2'/C-6'
8'	6.69	6.64	dd	15.8/7.8	16/8	1H	127.78	128.20	
9'	9.61	9.58	d	7.8	8	1H		195.50	

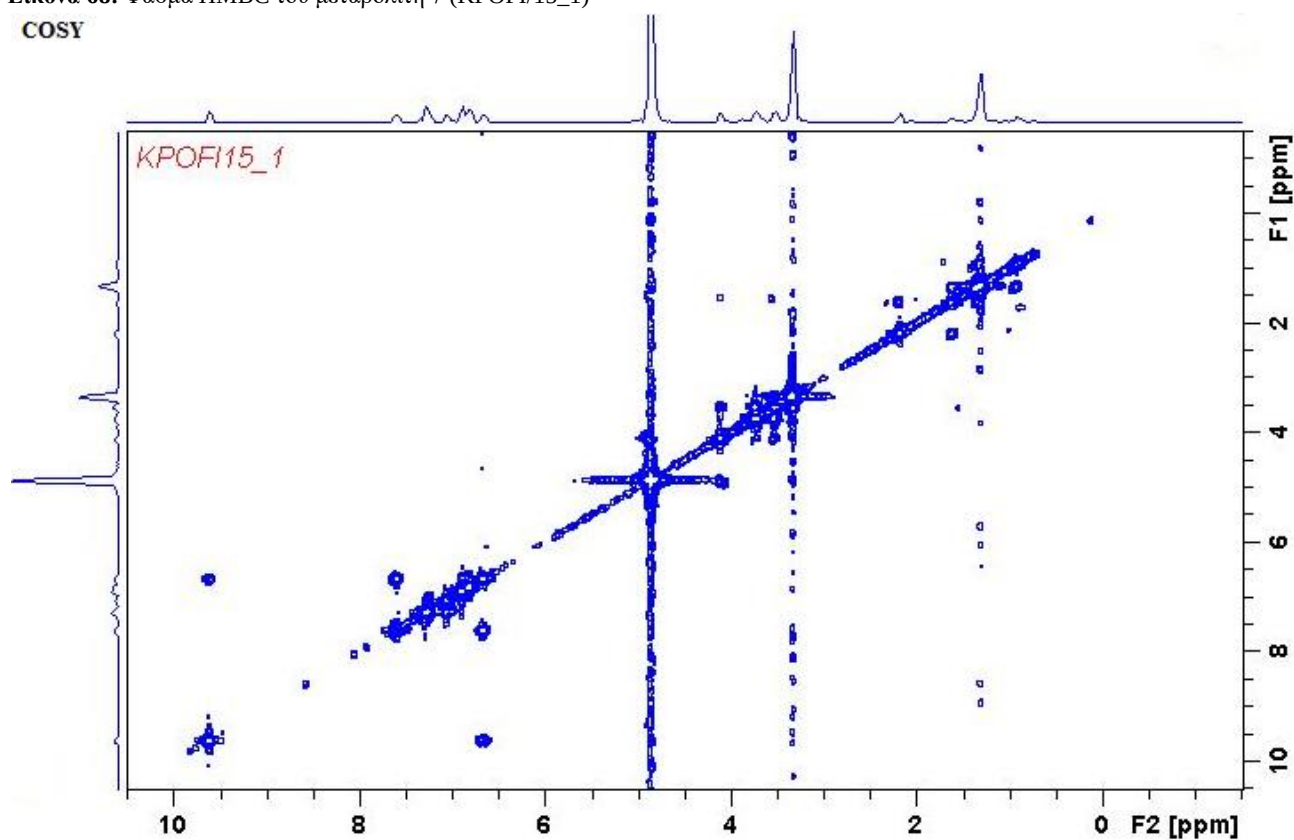
Πίνακας 23: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1) * Waibel R. *et al.*, 2003

HMBC

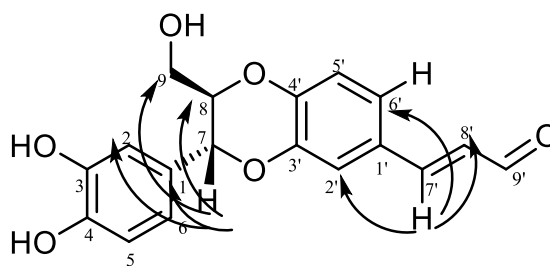


Εικόνα 68: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1)

COSY



Εικόνα 69: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7 (KPOFI/15_1)

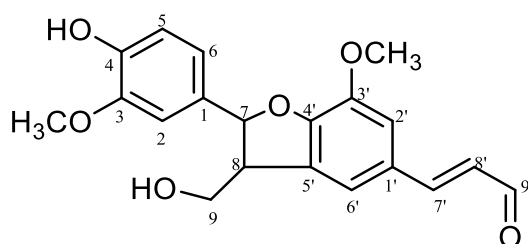


Σχήμα 34: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 7

Γ.1.8 Μεταβολίτης 8: Βαλανοφονίνη

Ο δευτερογενής μεταβολίτης βαλανοφονίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το παρασιτικό φυτό *Balanophora japonica* (春名光昌 *et al.*, 1982) και στη συνέχεια από το συγγενικό είδος της *Opuntia ficus-indica*, την *O. soehrensii* (Shirota O. *et al.*, 1997). Πιο πρόσφατα απομονώθηκε από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των σπερμάτων του φυτού *Dipteryx odorata* (Jang D.S. *et al.*, 2003) και από το φυτό (παρασιτικό ριζών) *Aeginetia indica* που είναι ευρέως διαδεδομένο στην Ταϊβάν (Ho J.C. *et al.*, 2003). Απομονώνεται για πρώτη φορά από το είδος.

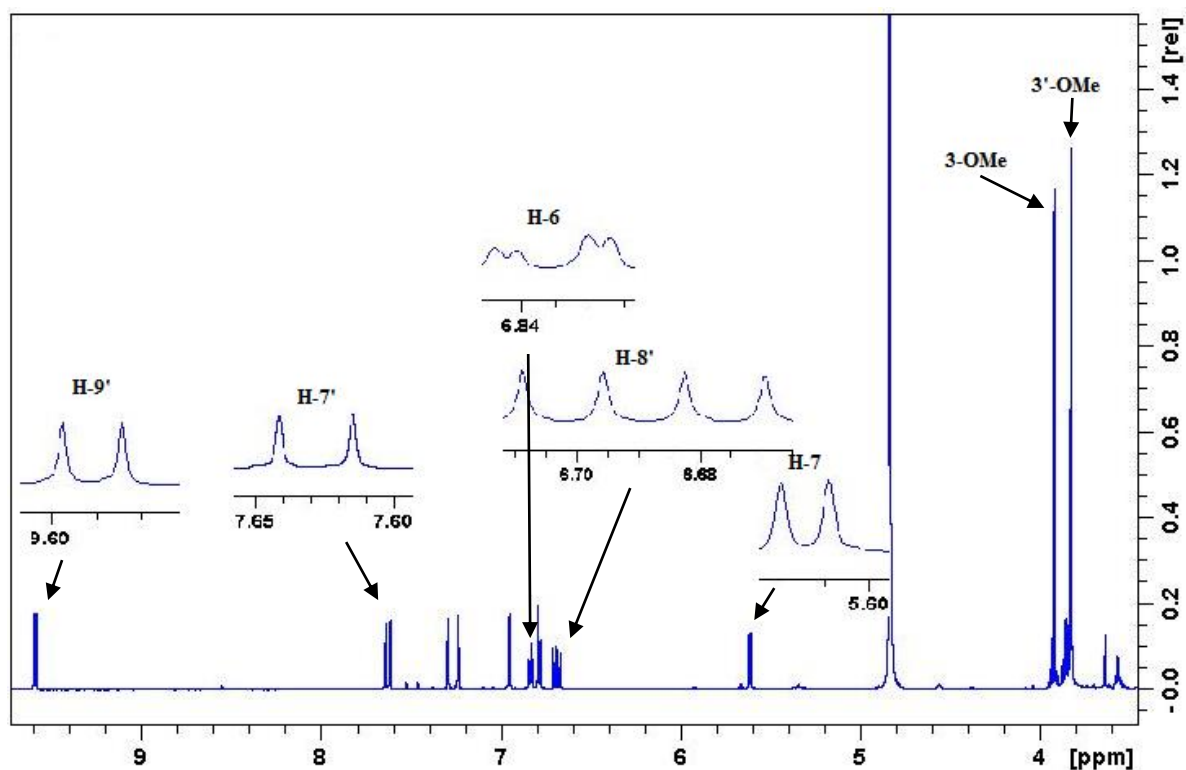
Το βιοδραστικό μόριο ανήκει στα διϋδροβενζο[b]φουρανικά νεολιγνάνια και απαρτίζεται από το τμήμα της φερουλικής αλδεϋδης και της διϋδροκονιφερουλικής αλκοόλης. Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Pieters L. *et al.*, 1999 για τη σύνθεση των διϋδροβενζο[b]φουρανικών νεολιγνάνων αλλά και για την αξιολόγηση της βιολογικής τους δραστηριότητας ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, έδειξε ότι το προϊόν διμερισμού, μεθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος, επέδειξε την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ο μηχανισμός του φαίνεται να οφείλεται στην αναστολή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης της μιτωτικής ατράκτου. $C_{20}H_{20}O_6$



Σχήμα 35: Μεταβολίτης 8 (KPOFI/15_2)

Η ειδική στροφική ικανότητα του μορίου αντιστοιχεί σε $[\alpha]_D = -2.5$ ($c = 0.12$, MeOH).

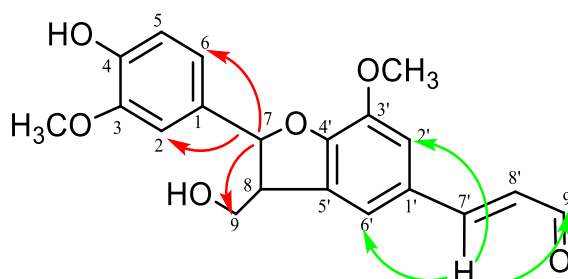
Στο φάσμα 1H -NMR της βαλανοφονίνης παρατηρείται χαρακτηριστική διπλή κορυφή σε δ_H 9.61 και $J=7.87\text{Hz}$ που αντιστοιχεί στο H-9' της αλδεϋδης. Τα υπόλοιπα σήματα του τμήματος της φερουλικής αλδεϋδης συντονίζονται σε δ_H 7.65 για το H-7' (d, $J=18.8\text{Hz}$) και δ_H 6.71 (dd, $J=15.8/7.74\text{Hz}$) για το H-8' του διπλού δεσμού. Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου αποτελείται από την διϋδροκονιφερουλική αλκοόλη. Τα διϋδροβενζοφουρανικά σήματα συντονίζονται σε δ_H 5.54 (d, $J=6.38\text{Hz}$, H-7) και δ_H 3.5-4 (3H, m, H-8, H-9a, H-9b) και τέλος οι δύο μεθόξυ ομάδες εμφανίζονται ως απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3H η καθεμία στην οξυγονωμένη περιοχή σε δ_H 3.94 (3H, s, 3-OMe) και δ_H 3.84 (3H, s, 3'-OMe).

Εικόνα 71: Φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη 8

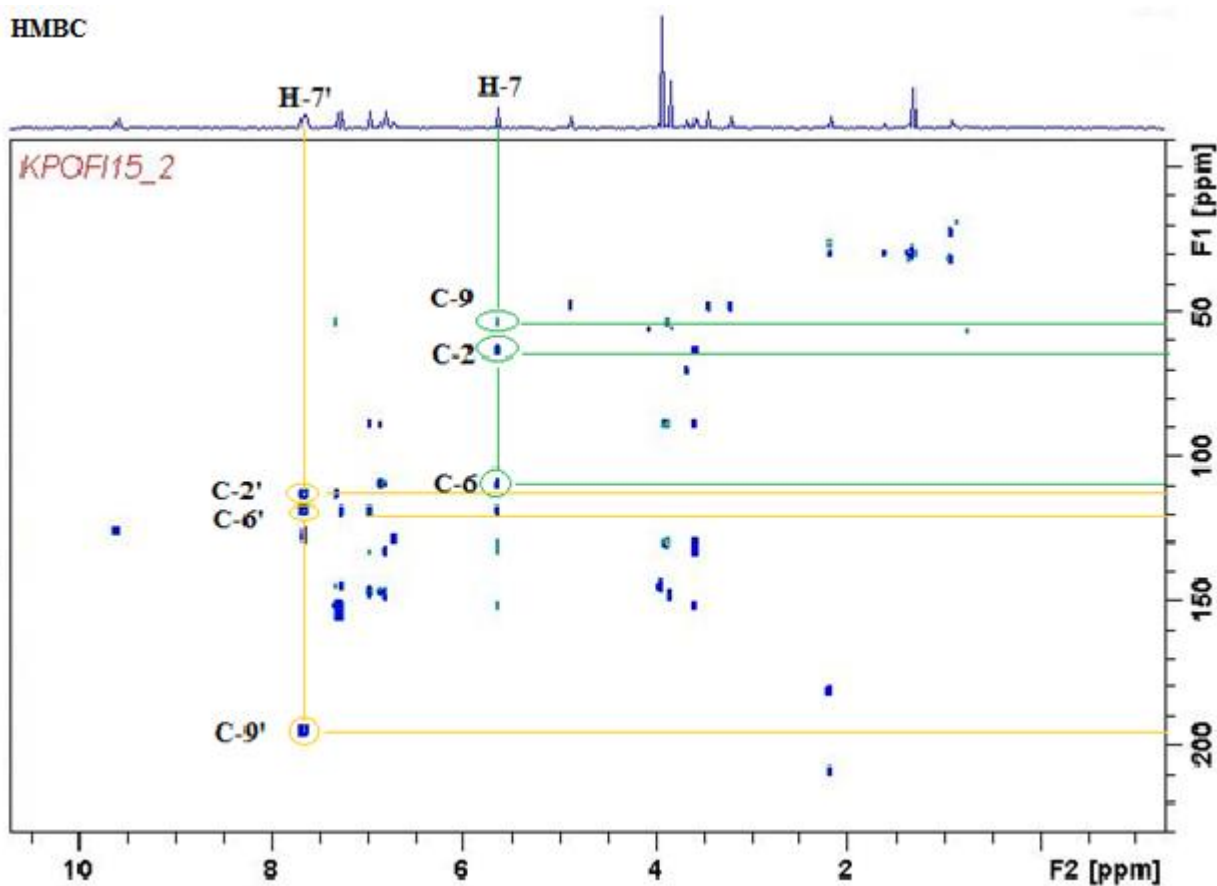
Atom	^1H (ppm)	*paper	Mult/ty	J (Hz)	*paper	Type	Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-							
2	6.97	7.22	d		1.9		1H	109.4	
3	-	-							
4	-	-							
5	6.80	7.35	d	8.2	8.4	CH	1H	116.4	-
6	6.83	7.13	dd	8.2/1.8	8.4/1.9	CH	1H	118.6	-
7	5.61	5.86	d	6.3	6.1	CH	1H	89.7	C-9/C-6/C-2
8	3.58	3.66	m			CH	1H	54.9	
CH ₂ -9a	3.84	4.10	m				1H	63.3	
CH ₂ -9b		4.05	dd	-	13.1/5.0	CH ₂	1H		
1'	-	-	-	-	-				
2'	7.25	7.44	d		1.0		1H	114.9	
3'	-	-	-	-	-				
4'	-	-	-	-	-				
5'	-	-	-	-	-				
6'	7.31	7.47	d		1.0	CH	1H	119.3	-
7'	7.65	7.82	d	15.8	15.8	CH	1H	156.3	C-9'/C-6'/C-2'
8'	6.69	6.69	dd	15.8/7.7	15.8/8.0	CH	1H	127.2	
9'	9.60	9.79	d	7.7	8.0	CHO	1H	195.5	-
3-OMe	3.94		s				3H		
3'-OMe	3.84		s				3H		

Πίνακας 24: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600MHz, MeOD) του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2) *Ho *et al.*, 2003

Η δομή επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC και COSY). Συγκεκριμένα από το φάσμα HMBC επιβεβαιώθηκε η σύνδεση του πρωτονίου του φουρανικού δακτυλίου στη θέση 7 με τον αρωματικό δακτύλιο στη θέση 1 καθώς και η συσχέτιση του H-7' με τους C-9'/C-6'/C-2'.

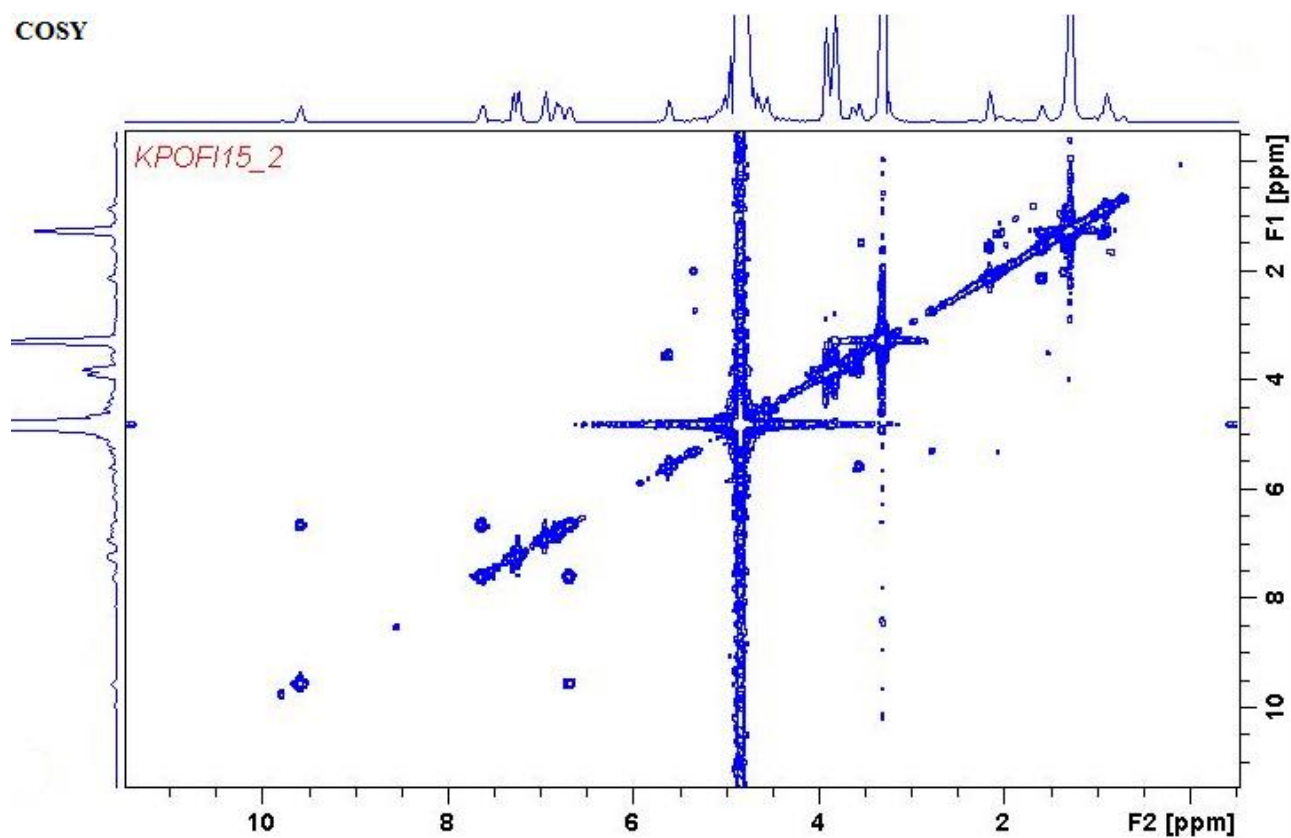


Σχήμα 36: HMBC συζεύξεις του μεταβολίτη 8



Εικόνα72: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2)

COSY



Εικόνα 73: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8 (KPOFI/15_2)

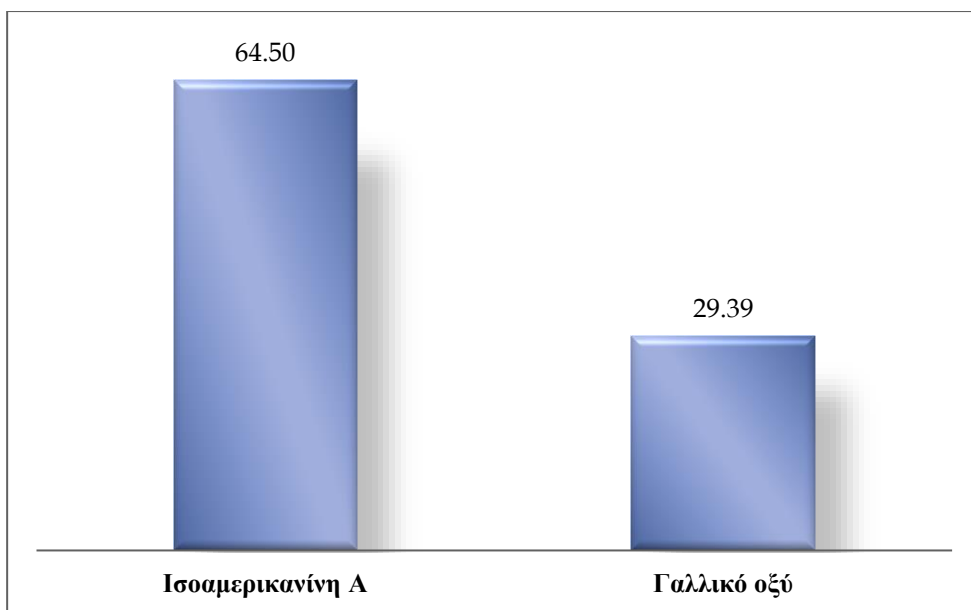
Γ.2 Βιολογικές δοκιμές στα ταυτοποιημένα μόρια

Οι ταυτοποιημένοι δευτερογενείς μεταβολίτες ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και λευκαντική τους δράση με τη μέθοδο DPPH και με τη μέθοδο παρεμπόδισης της δράσης του ενζύμου τυροσινάση. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25).

Μεταβολίτες (κλάσμα)	DPPH		IC50 μM	Anti-TYR	
	100 μM Παρεμπόδιση %	Τυπική Απόκλιση		100 μM Παρεμπόδιση %	Τυπική Απόκλιση
1 (16+17)	16.27	5.32	-	1.89	4.37
2 (29)	-0.58	2.49	-	-9.02	1.87
3 (29)	1.67	0.31	-	-18.57	1.56
4 (34)	22.40	0.13	-	-6.67	1.49
5 (37)	13.86	3.16	-	-19.83	4.59
6 (39+40)	2.81	0.91	-	-11.81	1.75
7 (4)	76.76	0.48	64.50	72.82	0.85
8 (4)	9.98	0.32	-	-14.85	0.88

Πίνακας 25: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών στους ταυτοποιημένους μεταβολίτες

Αξιοσημείωτα και ενθαρρυντικά εμφανίζονται τα αποτελέσματα για το μεταβολίτη 7, την **ισοαμερικανίνη Α**, καθώς επέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση, με IC50 64.50 μM (Γράφημα 1) και εξαιρετικά ισχυρή λευκαντική δράση. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη **λευκαντική δράση** δεν κατέστη δυνατή η εύρεση του αντίστοιχου IC50 αναστολής της τυροσινάσης διότι ακόμη και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (C=5 μM) η παρεμπόδιση του ενζύμου τυροσινάση εξακολουθούσε να βρίσκεται σε υψηλό ποσοστό (76.54%). Το αντίστοιχο IC50 για το κοζικό οξύ είναι 14.07 μM δηλαδή σε τριπλάσια συγκέντρωση το ποσοστό αναστολής του ενζύμου τυροσινάση είναι 50% για τον πρότυπο αναστολέα και 76.54% για την ισοαμερικανίνη Α. Η τόσο **ισχυρή λευκαντική δράση** (φαίνεται μεγαλύτερη από τον πρότυπο αναστολέα) υποδηλώνει ότι κατά ένα μεγάλο ποσοστό τα θετικά αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών στο αρχικό υδροαλκοολικό εκχύλισμα (παραπροϊόν επεξεργασίας των σπερμάτων) οφείλονται πιθανά σε αυτόν τον μεταβολίτη.



Γράφημα 1: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης (IC50) του γαλλικού οξέος (πρότυπος αναστολέας) και της αμερικανίνης A

Ισοαμερικανίνη A	
C (μM)	% αναστολή από την ισοαμερικανίνη A
35	73.47
25	77.71
10	78.70
5	76.54

Λευκαντική δράση πιο ισχυρή και από τον πρότυπο αναστολέα (IC50 κοζικού οξέος 14.07μM).

Πίνακας 26: Ποσοστό αναστολής της τυροσινάσης από την ισοαμερικανίνη A σε διάφορες συγκεντρώσεις

Γ.3 Συμπεράσματα

Η **απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών** από φυτά, μικροοργανισμούς και ζώα αποτελεί ένα ελπιδοφόρο επιστημονικό πεδίο από το οποίο μπορούν να αντληθούν δραστικά συστατικά για την αντιμετώπιση ασθενειών, ως φυσικά αντιοξειδωτικά, αλλά και άλλες ουσίες για την εν γένει καλυτέρευση της ποιότητας της ζωής. Συγκεκριμένα, τα σπέρματα φυτών λόγω του υψηλού επιπέδου φαινολικών, αποτελούν σημαντική πηγή φυτοχημικών ουσιών και βρίσκουν διατροφικές, φαρμακευτικές και βιομηχανικές εφαρμογές. Επιπροσθέτως, **η ολική ή μερική ανάκτηση αποβλήτων ή παραπροϊόντων**, που παράγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών ή σε άλλα στάδια της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων, περιλαμβάνει σημαντικά πλεονεκτήματα από οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική άποψη.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η **βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών** από τα σπέρματα του φυτού *Opuntia ficus-indica*. Το μεγαλύτερο κομμάτι των μέχρι τώρα ερευνών ήταν κυρίως επικεντρωμένο στα κλαδώδια και τους καρπούς του φυτού ενώ για τα σπέρματα οι πληροφορίες είναι λιγοστές. Παρόλα αυτά οι αναφορές για αντιοξειδωτικές, αντιελκωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες είναι πολλές. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε το υδροαλκοολικό εκχύλισμα των σπερμάτων ελληνικής ποικιλίας *O. ficus-indica* (αφού προηγήθηκε απολίπανση) με σκοπό τον προσδιορισμό, την απομόνωση και ταυτοποίηση των φαινολικών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών με βιολογική δράση. Οι περιορισμένες πληροφορίες παλαιότερων επιστημονικών μελετών είχαν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι, πέραν του ελαίου που χρησιμοποιείται ήδη στη βιομηχανία των καλλυντικών, οι προσδοκώμενες ουσίες ανήκουν στις κατηγορίες καφεόυλ, φερουλόυλ και κουμαρόυλ παραγώγων συζευγμένων με ένα ή δύο σάκχαρα. Επιπλέον, βάσει βιβλιογραφίας, οι δευτερογενείς μεταβολίτες των σπερμάτων στις οποίες αποδίδονται ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες, ανήκουν στην κατηγορία των λιγνανίων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαίωσαν τις παραπάνω μελέτες και προσδοκίες, και οδήγησαν στην απομόνωση και ταυτοποίηση **8 δευτερογενών μεταβολιτών**, δύο εκ των οποίων είναι γλυκοσυλιωμένα φερουλικά παράγωγα, ένας γλυκοσυλιωμένο σιναπικό παράγωγο, ένας γλυκοσυλιωμένο παράγωγο της κωνιφεραλκοόλης και τέσσερα διϋδροβενζο[*b*]φουρανικά νεολιγνάνια. **4** από αυτούς απομονώνονται για **πρώτη φορά από το είδος** ενώ **2** αποτελούν **νέα φυσικά προϊόντα**. Όσον αφορά την επίτευξη του αρχικού στόχου ως προς την απομόνωση βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών, το κλάσμα με τη μεγαλύτερη βιολογική δράση οδήγησε στην απομόνωση της **ισοαμερικανίνης Α**, η οποία επέδειξε εντυπωσιακή **λευκαντική δράση** καθώς, ακόμη και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, το ποσοστό αναστολής της τυροσινάσης εξακολούθησε να είναι πολύ υψηλό (76.54%). Πέραν της λευκαντικής, αξιοσημείωτη είναι και η αντιοξειδωτική δράση.

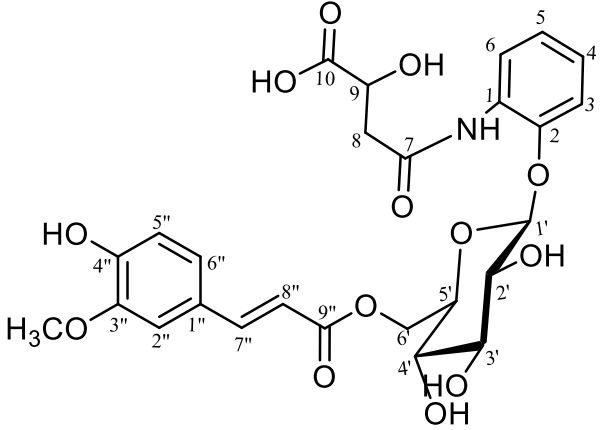
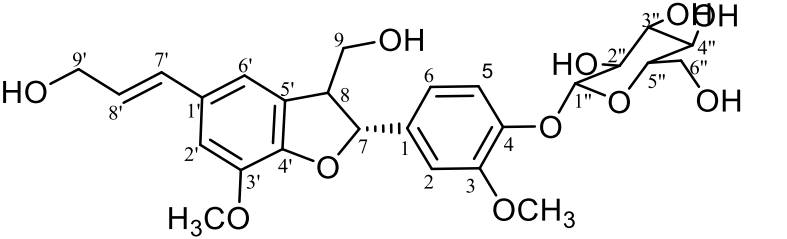
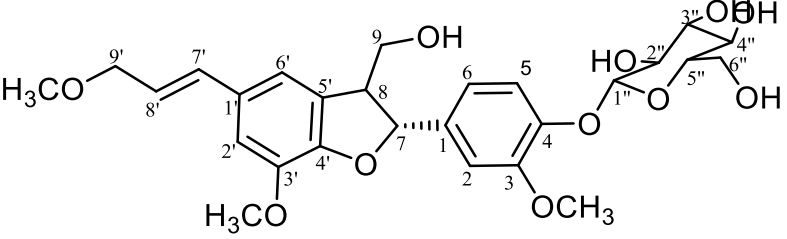
Από επιστημονική και φαρμακολογική σκοπιά τα ευρήματα της μελέτης είναι ενθαρρυντικά διότι αποδεικνύουν ότι στο υδροαλκοολικό εκχύλισμα των επεξεργασμένων σπερμάτων εντοπίζονται ποικίλα φαινολικά και νεολιγνάνια που πιθανά προσδίδουν αντιοξειδωτική, ηπατοπροστατευτική, αντιϋπεργλυκαιμική και αντικαρκινική δράση και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Συγκεκριμένα, τα λιγνάνια αποτελούν ξεχωριστές, δομικά και λειτουργικά, φυτοχημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως συστατικά καινοτόμων φαρμάκων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και για μια ισορροπημένη διατροφή, ενώ παράγονται σε μικρές ποσότητες στα φυτά (*Linum*, *Forsythia*, *Podophylum*, *Sesamum*), μερικά από τα οποία είναι απειλούμενα είδη. Η στροφή των επιστημονικών μελετών

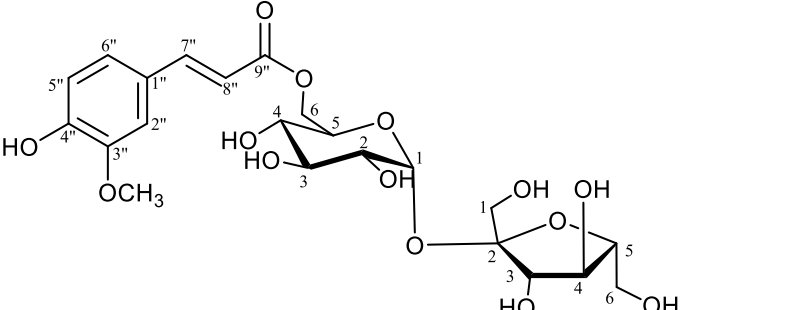
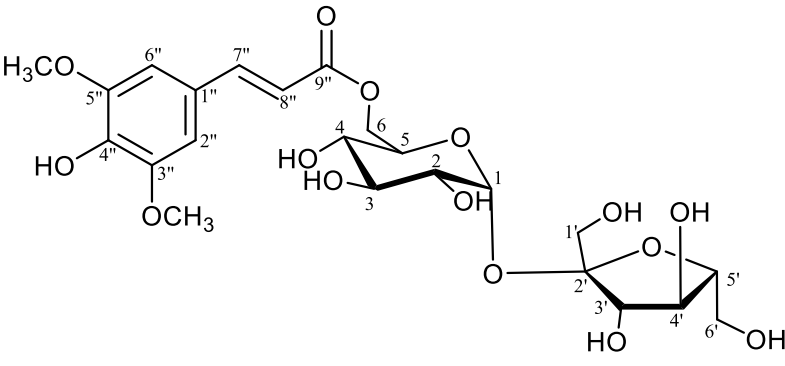
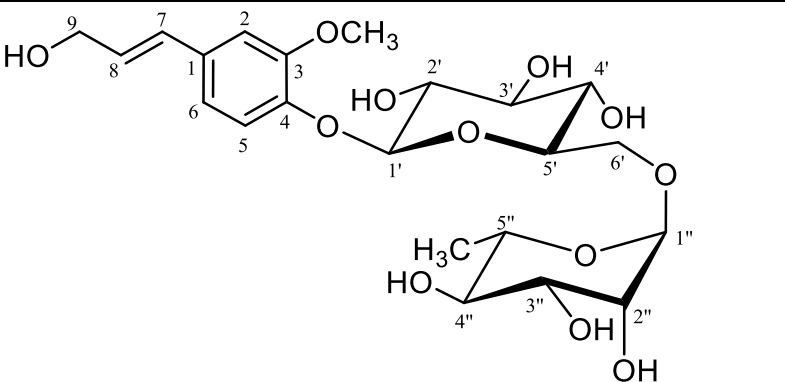
προς την κατεύθυνση της εύρεσης νέων λιγνανίων καθιστά την περαιτέρω πιθανή απομόνωση λιγνανίων από τα σπέρματα της *O. ficus-indica* επιθυμητή και δυνατή.

Όσον αφορά τις προοπτικές της παρούσας εργασίας, αποτελεί πρόκληση η περαιτέρω διερεύνηση και απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών του των σπερμάτων της *O. ficus-indica* όπως επίσης και η πρακτική πλέον εφαρμογή των αποτελεσμάτων. Η ισχυρή λευκαντική δράση της ισοαμερικανίνης Α αποτελεί ένα ελπιδοφόρο εύρημα διότι παρόλο που η μελανίνη έχει κυρίως φωτοπροστατευτική λειτουργία στο ανθρώπινο δέρμα, η υπερβολική παραγωγή μελανίνης ή η ανώμαλη κατανομή μελανίνης μπορεί να προκαλέσει ακανόνιστο υπερχρωματισμό του δέρματος. Η έκθεση σε συγκεκριμένα φάρμακα και χημικές ουσίες καθώς και η ύπαρξη ορισμένων καταστάσεων, όπως οι κηλίδες μελάσματος (ή πανάδες) μπορεί να οδηγήσουν σε υπερχρωματισμό. Επιπλέον, η πρόσφατη έρευνα υποδηλώνει ότι πολλές διαταραχές μελανογένεσης έχουν αναφερθεί ότι συνδέονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Parkinson και το Alzheimer (Chang T. S. 2012). Επομένως, είναι μεγάλη η ζήτηση σε αναστολείς μελανογένεσης έτσι ώστε να αναπτυχθούν θεραπείες ή να αποφευχθούν διαταραχές υπερχρωματισμού.

Η επιστημονική έρευνα έχει δείξει ότι το φυτοχημικό προφίλ των φυτών επηρεάζεται και καθορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο γενότυπος, οι κλιματικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές πρακτικές, ο χρόνος συγκομιδής αλλά και από μετασυλλεκτικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου των συνθηκών αποθήκευσης και των τεχνικών επεξεργασίας. Η παρούσα μελέτη στα σπέρματα ελληνικής ποικιλίας συμβάλλει, εκτός των άλλων, στην πληρέστερη εικόνα της δυναμικής της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (ποιοτικό προφίλ) εντός του είδους και σε σύγκριση με τις περισσότερες μελετημένες μεξικάνικες, τυνησιακές και μαροκινές ποικιλίες.

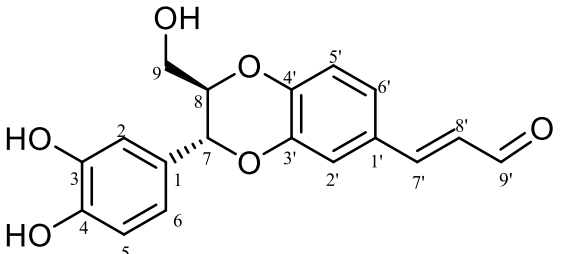
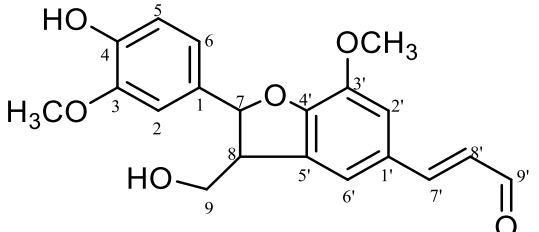
Τέλος, η απομόνωση δραστικών ουσιών από φυτά μειωμένου κόστους παραγωγής είναι επιθυμητή. Περιβαλλοντικά και οικονομικά, η *O. ficus-indica* πλεονεκτεί εξαιτίας της υψηλής προσαρμοστικής ικανότητάς της καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες λειψυδρίας, ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών και σε φτωχά εδάφη. Μοναδικό, ίσως, μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι είναι ένα επεκτατικό είδος.

Μεταβολίτες	Κλάσμα απομόνωσης	Δομή	Κατηγορία ένωσης	Δράση
1 (ΚΡΟΦΙ/6_1) Νέο Φυτικό Προϊόν	ΚΡΟΦΙ/4_16		Εστέρας φερουλικού οξέος	
2 (ΚΡΟΦΙ/7_1)	ΚΡΟΦΙ/4_29		Διϋδροβενζο[b] φουρανικό Νεολιγνάνιο	
3 (ΚΡΟΦΙ/7_2)	ΚΡΟΦΙ/4_29		Διϋδροβενζο[b] φουρανικό Νεολιγνάνιο	

4 (KPOFI/10_1)	40,41,42 (CPC/1) και KPOFI/4_34, KPOFI/4_35		Εστέρας φερουλικού οξέος	
5 (KPOFI/13_1)	KPOFI/4_37		Εστέρας σιναπικού οξέος	
6 (KPOFI/14_1) Νέο Φυσικό Προϊόν	KPOFI/4_39		Ρουτινοσίδης της κωνιφεραλκοό λης	

Opuntia ficus-indica (L.) Mill.

Αποτελέσματα-Συζήτηση

7 (KPOFI/15_1)	KPOFI/4_4		Διϋδροβενζο[b] φουρανικό Σεσκινεολιγνάν ιο	Αντιοξειδωτική, Λευκαντική, Αντιφλεγμονώδης
8 (KPOFI/15_2)	KPOFI/4_4		Διϋδροβενζο[b] φουρανικό Νεολιγνάνιο	Αντικαρκινική

Πίνακας 27: Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες της *O. ficus indica* (με έντονο χρώμα παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν για πρώτη φορά στο φυτό

Δ. Βιβλιογραφία

- Ahmad, A., Davies, J., Randall, S., & Skinner, G. R. B. (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral research*, 30(2-3), 75-85.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Valdes-Arzate, A., Santiago Xolalpa-molina, T. B., Jimenez-estrada, M., Hern, E., & Roman-ramos, R. (2003). Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*.
- Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Hfaiedh, M., Sakly, M., Zourgui, L., & Rhouma, K. B. (2010). Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats. *Phytomedicine*, 17(14), 1120-1126.
- Anaya-Pérez, M. A. (2001). History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
- Anaya-Pérez, M. A., & Bautista-Zane, R. (2008). El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 5(2), 167-183.
- Astello-Garcia, M. G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Diaz, M., Reyes-Agueero, A., Gueraud, F., ... & de la Rosa, A. P. B. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130.
- Attoumbre, J., Hano, C., Mesnard, F., Lamblin, F., Bensaddek, L., Raynaud-Le Grandic, S., ... & Baltora-Rosset, S. (2006). Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydrodiconiferyl alcohol-4-β-d-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures. *Comptes Rendus Chimie*, 9(3), 420-425.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Barbera, G., Inglese, P., & La Mantia, T. (1994). Seed content and fruit characteristics in cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *Scientia horticultrae*, 58(1-2), 161-165.
- Bárcenas, R. T., Yesson, C., & Hawkins, J. A. (2011). Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics*, 27(5), 470-489.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Hano, C., Pilard, S., Grand, E., Lesur, D., ... & Fliniaux, M. A. (2007). Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells. *Phytochemistry*, 68(22), 2744-2752.
- Bensadón, S., Hervet-Hernández, D., Sáyo-Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 210-216.
- Berthod, A., Maryutina, T., Spivakov, B., Shpigun, O., & Sutherland, I. A. (2009). Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied chemistry*, 81(2), 355-387.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaui, A. M., ... & Livrea, M. A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6895-6901.
- Callegas-Juárez, N., Matus-Gardea, J. A., García-Salazar, J. A., Martínez-Damián, M. Á., & Salas-González, J. M. (2009). Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México, 2006. *Agrociencia*, 43(1), 73-82.
- Cardador-Martínez, A., Jiménez-Martínez, C., & Sandoval, G. (2011). Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp.) wastes as a source of antioxidants. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31(3), 782-788.
- Carey, F. A., & Sundberg, R. J. (2007). *Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms*. Springer Science & Business Media.
- Carreras, M. E., Fuentes, E., & Merino, E. F. (1997). Seed protein patterns of nine species of Cactaceae. *Biochemical systematics and ecology*, 25(1), 43-49.
- Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2772-2776.
- Chahdoura, H., Barreira, J. C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., & Achour, L. (2015). Seeds of *Opuntia* spp. as a novel high potential by-product: Phytochemical characterization and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 65, 383-389.
- Chang, T. S. (2012). Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*, 5(9), 1661-1685.

- Changzeng, W., & Zhongjian, J. (1997). Lignan, phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis tortuosa*. *Phytochemistry*, 45(1), 159-166.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J. H., Francischetti, I. M., & Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of proteomics*, 75(13), 3842-3854.
- Choudhary, M. I., Begum, A., & Abbaskhan, A. (2006). Cinnamate derivatives of fructo-oligosaccharides from *Lindelfia stylosa*. *Carbohydrate research*, 341(14), 2398-2405.
- Chougui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A., Richard, T., & Larbat, R. (2013). Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food chemistry*, 139(1), 796-803.
- Cruz-Hernandez, A., & Paredes-Lopez, O. (2010). Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 110-126.
- De Ancos, B., Colina-Coca, C., González-Peña, D., & Sánchez-Moreno, C. (2015). Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*, 1.
- Dhaouadi, K., Raboudi, F., Funez-Gomez, L., Pamies, D., Estevan, C., Hamdaoui, M., & Fattouch, S. (2013). Polyphenolic extract of Barbary-Fig (*Opuntia ficus-indica*) syrup: RP-HPLC-ESI-MS analysis and determination of antioxidant, antimicrobial and Cancer-Cells cytotoxic potentials. *Food Analytical Methods*, 6(1), 45-53.
- Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee, J., Song, Y. S., ... & Cho, J. (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain research*, 965(1), 130-136.
- Durazzo, A., Turfani, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2013). Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food chemistry*, 140(4), 666-671.
- Duret, P., Fakhfakh, M. A., Herrenknecht, C., Fournet, A., Franck, X., Figadère, B., & Hocquemiller, R. (2003). Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1011(1), 55-65.
- El Mannoubi, I., Barrek, S., Skanji, T., Casabianca, H., & Zarrouk, H. (2009). Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia. *Chemistry of natural compounds*, 45(5), 616.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbab, M., ... & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
- El Kossori, R. L., Villaume, C., El Boustani, E., Sauvaire, Y., & Méjean, L. (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 263-270.
- El-Razek, F. H. A., El-Metwally, E. M., Shehab, G. M., Hassan, A. A., & Gomaa, A. M. (2012). Effects of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice on oxidative stress in diabetic cataract rats. *Saudi Journal for Health Sciences*, 1(1), 23.
- Ennouri, M., Evelyne, B., Laurence, M., & Hamadi, A. (2005). Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chemistry*, 93(3), 431-437.
- Ennouri, M., Fetoui, H., Hammami, M., Bourret, E., Attia, H., & Zeghal, N. (2007). Effects of diet supplementation with cactus pear seeds and oil on serum and liver lipid parameters in rats. *Food Chemistry*, 101(1), 248-253.
- Erre, P., Chessa, I., Nieddu, G., & Jones, P. G. (2009). Diversity and spatial distribution of *Opuntia* spp. in the Mediterranean Basin. *Journal of Arid Environments*, 73(12), 1058-1066.
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C., & Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*, 11(1), 2574-2589.
- Foucault, A. P., & Chevolot, L. (1998). Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, 808(1), 3-22.
- Fрати, A. C., Jiménez, E., & Ariza, C. R. (1990). Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus indica* in non insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Phytotherapy research*, 4(5), 195-197.
- Fukuyama, Y., Hasegawa, T., Miki, T. O. D. A., Kodama, M., & Okazaki, H. (1992). Structures of americanol A and isoamericanol A having a neurotrophic property from the seeds of *Phytolacca americana*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(1), 252-254.
- Galati, E. M., Monforte, M. T., Tripodo, M. M., d'Aquino, A., & Mondello, M. R. (2001). Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.(Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 1-9.

- Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., Miceli, N., & Monforte, M. T. (2002). Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.(Cactaceae) waste matter: Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 17-21.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., & Taviano, M. F. (2003). Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4903-4908.
- Ganopoulos, I., Kalivas, A., Kavroulakis, N., Xanthopoulou, A., Mastrogianni, A., Koubouris, G., & Madesis, P. (2015). Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. *Plant Gene*, 2, 29-33.
- García-Pantaleón, D. M., Flores-Ortiz, M., Moreno-Álvarez, M. J., Belén-Camacho, D. R., Medina-Martínez, C. A., Ojeda-Escalona, C. E., & Padrón-Pereira, C. A. (2009). Chemical, biochemical, and fatty acids composition of seeds of *Opuntia boldinghii* Britton et Rose. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11, 45-52.
- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008). Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581-593.
- Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., ... & Waldron, K. W. (2009). Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10323-10330.
- Griffith, M. P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany*, 91(11), 1915-1921.
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., ... & de la Rosa, A. P. B. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525-532.
- Ha, Y. W., & Kim, Y. S. (2009). Preparative isolation of six major saponins from *Platycodi Radix* by high-speed counter-current chromatography. *Phytochemical Analysis*, 20(3), 207-213.
- Habibi, Y., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2005). Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate polymers*, 60(3), 319-329.
- Habibi, Y., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2005). d-Xylans from seed endosperm of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Comptes Rendus Chimie*, 8(6), 1123-1128.
- Habibi, Y., Heux, L., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2008). Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 102-112.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887-1892.
- Heyduk, K., McKain, M. R., Lalani, F., & Leebens-Mack, J. (2016). Evolution of a CAM anatomy predates the origins of Crassulacean acid metabolism in the Agavoideae (Asparagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 102-113.
- Ho, J. C., Chen, C. M., & Row, L. C. (2003). Neolignans from the parasitic plants. Part 1. *Aeginetia indica*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 50(6), 1271-1274.
- Huang, X., Li, Q., Li, H., & Guo, L. (2009). Neuroprotective and antioxidative effect of cactus polysaccharides in vivo and in vitro. *Cellular and molecular neurobiology*, 29(8), 1211-1221.
- Ibanez-Camacho, R., & Roman-Ramos, R. (1978). Hypoglycemic effect of *Opuntia cactus*. *Archivos de investigacion medica*, 10(4), 223-230.
- Iizuka, M., Warashina, T., & Noro, T. (2001). Bufadienolides and a New Lignan from the Bulbs of *Urginea maritima*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(3), 282-286.
- Ishurd, O., Zgheel, F., Elghazoun, M., Elmabruk, M., Kermagi, A., Kennedy, J. F., & Knill, C. J. (2010). A novel (1→4)- α -d-glucan isolated from the fruits of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 848-853.
- Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145-168.
- MacRae, W. D., & Towers, G. N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23(6), 1207-1220.
- M Jimenez-Aguilar, D., Mújica-Paz, H., & Welte-Chanes, J. (2014). Phytochemical characterization of prickly pear (*Opuntia* spp.) and of its nutritional and functional properties: a review. *Current Nutrition & Food Science*, 10(1), 57-69.

- Jang, D. S., Park, E. J., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., ... & Pezzuto, J. M. (2003). Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). *Journal of natural products*, 66(5), 583-587.
- Jin, H. G., Ko, H. J., Chowdhury, M. A., Lee, D. S., & Woo, E. R. (2016). A new indole glycoside from the seeds of *Raphanus sativus*. *Archives of pharmacal research*, 39(6), 755-761.
- Jing, X., Shi, Y., Liu, Y., Han, Y., Yan, C., & Wang, L. (2004). One Step of Palladium Catalyzed Benzodioxane Ring C–O Bond Formation, Synthesis of Isoamericanol A and Isoamericanin A. *Synthetic communications*, 34(9), 1723-1727.
- Jung, C., Hong, J. Y., Bae, S. Y., Kang, S. S., Park, H. J., & Lee, S. K. (2015). Antitumor Activity of Americanin A Isolated from the Seeds of *Phytolacca americana* by Regulating the ATM/ATR Signaling Pathway and the Skp2–p27 Axis in Human Colon Cancer Cells. *Journal of natural products*, 78(12), 2983-2993.
- Kattermann, F. (2010). Observations of Chilean Opuntioideae. *Cactus and Succulent Journal*, 82(4), 168-171.
- Kaur, M., Kaur, A., & Sharma, R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A review.
- Kazakevich, Y. V., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons.
- Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D., & Hasib, A. (2016). Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S278-S281.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Ismail, A., & Abas, F. (2012). Antioxidative properties of defatted dabai pulp and peel prepared by solid phase extraction. *Molecules*, 17(8), 9754-9773.
- Kiesling, R. (1998). Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3, 50-59.
- Kim, J. W., Yang, H., Kim, H. W., Kim, H. P., & Sung, S. H. (2017). Lignans from *Opuntia ficus-indica* seeds protect rat primary hepatocytes and HepG2 cells against ethanol-induced oxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(1), 181-183.
- Ku, Y., & Lee, K. C. (2000). Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin. *Journal of Hazardous Materials*, 80(1), 59-68.
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5338-5342.
- Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia cactus* pear fruit varieties. *Food chemistry*, 85(4), 527-533.
- Κατινάκης Π., (2004). *Βιοχημεία*.
- Labuschagne, M. T., & Hugo, A. (2010). Oil content and fatty acid composition of cactus pear seed compared with cotton and grape seed. *Journal of food biochemistry*, 34(1), 93-100.
- Lee, E. H., Kim, H. J., Song, Y. S., Jin, C., Lee, K. T., Cho, J., & Lee, Y. S. (2003). Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Archives of pharmacal research*, 26(12), 1018-1023.
- Lee, S. Y., Choi, S. U., Lee, J. H., Lee, D. U., & Lee, K. R. (2010). A new phenylpropane glycoside from the rhizome of *Sparganium stoloniferum*. *Archives of Pharmacal Research (Seoul)*, 33(4), 515.
- Ling, W. H., & Jones, P. J. H. (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life sciences*, 57(3), 195-206.
- Liu, W., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Tong, M. H., Wu, N., Liu, X. L., & Zhang, S. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114(1), 334-339.
- Marchal, L., Legrand, J., & Foucault, A. (2003). Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *The Chemical Record*, 3(3), 133-143.
- Mason, T. J., & Peters, D. (2002). *Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications*. Woodhead Publishing.
- Masuda, M., Murata, K., Fukuhama, A., Naruto, S., Fujita, T., Uwaya, A., ... & Matsuda, H. (2009). Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. *Journal of natural medicines*, 63(3), 267-273.
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), 59-83.
- Matsuhiro, B., Lillo, L. E., Sáenz, C., Urzúa, C. C., & Zárate, O. (2006). Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 263-267.

- Matthäus, B., & Özcan, M. M. (2011). Habitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oils. *Scientia Horticulturae*, 131, 95-98.
- McMurry, J. (2000). *Οργανική χημεία*.
- Medina, E. D., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food chemistry*, 103(1), 38-45.
- Miyase, T., Noguchi, H., & Chen, X. M. (1999). Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Polygala sibirica*. *Journal of natural products*, 62(7), 993-996.
- Mondragon-Jacobo, C., & Perez-Gonzalez, S. (2003). *El nopal (Opuntia spp.) como forraje* (Vol. 169). C. Mondragón-Jacobo, S. P. González, E. Arias, S. G. Reynolds, & M. D. Sanchez (Eds.). Food & Agriculture Org..
- Morán-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., López-Romero, P., & Torres, N. (2012). *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats. *The Journal of nutrition*, 142(11), 1956-1963.
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Hady, E. S. A. A., Omran, H. T., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2014). Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food research international*, 64, 864-872.
- do Nascimento Santos, T., Dutra, E. D., do Prado, A. G., Leite, F. C. B., de Souza, R. D. F. R., dos Santos, D. C., ... & Menezes, R. S. C. (2016). Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass and Bioenergy*, 85, 215-222.
- Naczek, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., & Shahidi, F. (1998). Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 489-502.
- Ncibi, S., Othman, M. B., Akacha, A., Krifi, M. N., & Zourgui, L. (2008). *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 797-802.
- Nharingo, T., & Moyo, M. (2016). Application of *Opuntia ficus-indica* in bioremediation of wastewaters. A critical review. *Journal of environmental management*, 166, 55-72.
- Nobel, P. S. (2002). *Cacti: biology and uses*. Univ of California Press.
- Nyiredy, S. (2000). Preparative thin-layer (planar) chromatography. *Encyclopedia of separation science*. Academic Press, San Diego-San Francisco-New York-Boston-London-Sydney-Tokio, 888-899.
- Osorio-Esquivel, O., Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M. M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2160-2168.
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Owen, N. A., & Griffiths, H. (2014). Marginal land bioethanol yield potential of four crassulacean acid metabolism candidates (*Agave fourcroydes*, *Agave salmiana*, *Agave tequilana* and *Opuntia ficus-indica*) in Australia. *Gcb Bioenergy*, 6(6), 687-703.
- Panico, A. M., Cardile, V., Garufi, F., Puglia, C., Bonina, F., & Ronsisvalle, S. (2007). Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 315-321.
- Park, E. H., Kahng, J. H., & Paek, E. A. (1998). Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Archives of pharmacal research*, 21(1), 30-34.
- Park, E. H., & Chun, M. J. (2001). Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia*, 72(2), 165-167.
- Pieters, L., Van Dyck, S., Gao, M., Bai, R., Hamel, E., Vlietinck, A., & Lemiere, G. (1999). Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization. *Journal of medicinal chemistry*, 42(26), 5475-5481.
- Pilkington, L. I., & Barker, D. (2014). Total Synthesis of (–)-Isoamericanin A and (+)-Isoamericanol A. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(5), 1037-1046.
- Pilkington, L. I., & Barker, D. (2015). Synthesis and biology of 1, 4-benzodioxane lignan natural products. *Natural product reports*, 32(10), 1369-1388.
- Pimienta-Barrios, E. (1994). Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments*, 28(1), 1-11.
- Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003). Lipid profile of prickly pear pulp fractions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1, 66-70.

- Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003). Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food chemistry*, 82(3), 339-345.
- Renault, J. H., Nuzillard, J. M., Intes, O., & Maciuk, A. (2002). Solvent systems. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 38, 49-83.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Hernández, H. M. (2005). Systematic notes and a Detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(CACTACEAE).
- Reyes-Agüero, J. A., & Valiente-Banuet, A. (2006). Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *Journal of arid environments*, 64(4), 549-585.
- Saguez, J., Attoumbré, J., Giordanengo, P., & Baltora-Rosset, S. (2013). Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Arthropod-Plant Interactions*, 7(2), 225-233.
- Salama, O., Chaudhuri, R. K., & Sticher, O. (1981). A lignan glucoside from *Euphrasia rostkoviana*. *Phytochemistry*, 20(11), 2603-2604.
- Saleem, M., Kim, H. J., Han, C. K., Jin, C., & Lee, Y. S. (2006). Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Phytochemistry*, 67(13), 1390-1394.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(13), 7054-7061.
- Shirora, O., Kumakura, M., Sekita, S., & Satake, M. (1997). Lignans from a cactus, *Opuntia soehrensii* (Natural Medicine Note). *生薬学雑誌*, 51(3), 281.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P. K., ... & Sarker, S. D. (2006). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*, 67(21), 2370-2375.
- Souza, C. M. P., Almeida, F. S., Junior, V. F. V., & de Lima, B. P. G. (2014). Characterization of atomized extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. and assessment of its pharmaceutical potential. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35(2), 195-203.
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2302-2307.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular nutrition & food research*, 49(2), 175-194.
- Stojakowska, A., & Malarz, J. (2017). Bioactive phenolics from in vitro cultures of *Lactuca aculeata* Boiss. et Kotschy. *Phytochemistry Letters*, 19, 7-11.
- Su, B. N., Pawlus, A. D., Jung, H. A., Keller, W. J., McLaughlin, J. L., & Kinghorn, A. D. (2005). Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. *Journal of Natural Products*, 68(4), 592-595.
- Tanaka, H., Kato, I., & Ito, K. (1987). Total synthesis of neolignans, americanin A and isoamericanin A. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 35(9), 3603-3608.
- Tekin, A. (2003). Monitoring of seed composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) fruits during maturation period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 846-849.
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 391-395.
- Thomas, B., Murphy, D. J., & Murray, B. G. (2016). *Encyclopedia of applied plant sciences*. Academic Press.
- Tlili, N., Bargougui, A., Elfalleh, W., Triki, S., & Nasri, N. (2011). Phenolic compounds, protein, lipid content and fatty acids compositions of cactus seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4519-4524.
- Tounsi, M. S., Ouerghemmi, I., Ksouri, R., Wannes, W. A., Hammrouni, I., & Marzouk, B. (2011). HPLC-determination of phenolic composition and antioxidant capacity of cactus prickly pears seeds. *Asian Journal of Chemistry*, 23(3), 1006.
- Trombetta, D., Puglia, C., Perri, D., Licata, A., Pergolizzi, S., Lauriano, E. R., ... & Bonina, F. P. (2006). Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomedicine*, 13(5), 352-358.

- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb, D. A. (1964). *Flora Europaea*. II Rosaceae to Umbelliferae.
- Waibel, R., Benirschke, G., Benirschke, M., & Achenbach, H. (2003). Sesquieolignans and other constituents from the seeds of *Joannesia princeps*. *Phytochemistry*, 62(5), 805-811.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Winter, K., Garcia, M., & Holtum, J. A. (2008). On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1829-1840.
- Wolfram, K., Schmidt, J., Wray, V., Milkowski, C., Schliemann, W., & Strack, D. (2010). Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry*, 71(10), 1076-1084.
- Woo, W. S., Kang, S. S., Seligmann, O., Chari, V. M., & Wagner, H. (1980). The structure of new lignans from the seeds of *Phytolacca americana*. *Tetrahedron Letters*, 21(44), 4255-4258.
- Yahia, E. M. (2011). Prickly pear fruit and cladodes.
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J. A., Cushman, J. C., Tian, E., & Lin, H. (2015). Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43-53.
- Yao, L., Han, C., Chen, G., Song, X., Chang, Y., & Zang, W. (2012). A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L. *Fitoterapia*, 83(8), 1318-1321.
- Yeddes, N., Chérif, J. K., Guyot, S., Baron, A., & Trabelsi-Ayadi, M. (2014). Phenolic profile of Tunisian *Opuntia ficus indica* thornless form flowers via chromatographic and spectral analysis by reversed phase-high performance liquid chromatography-UV-photodiode array and electrospray ionization-mass spectrometer. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 741-751.
- Yuen, M. S., Xue, F., Mak, T. C., & Wong, H. N. (1998). On the absolute structure of optically active neolignans containing a dihydrobenzo [b] furan skeleton. *Tetrahedron*, 54(41), 12429-12444.
- Zhu, K., Bowman, A. S., Brigham, D. L., Essenberg, R. C., Dillwith, J. W., & Sauer, J. R. (1997). Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Experimental parasitology*, 87(1), 30-38.
- Zorgui, L., Ayed-Boussema, I., Ayed, Y., Bacha, H., & Hassen, W. (2009). The antigenotoxic activities of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes against the mycotoxin zearalenone in Balb/c mice: prevention of micronuclei, chromosome aberrations and DNA fragmentation. *Food and chemical toxicology*, 47(3), 662-667.
- Zou, D. M., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J. M., Wang, J., Zang, R., ... & Zou, C. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition journal*, 4(1), 25.
- 春名光昌, 河辺智子, 伊藤一男, & 村田弘之. (1982). Balanophonin, a new neo-lignan from *Balanophora japonica* Makino. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(4), 1525-1527.