



Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον
Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή
και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

Αξιοποίηση των Βιομηχανικών Παραπροϊόντων της
Χυμοποίησης Εσπεριδοειδών ως Πλούσια Πηγή
Καροτενοειδών και Άλλων Φυσικών Προϊόντων

Διπλωματική Εργασία

Ελένη Μύρτση

Αθήνα, 2021

Τριμελής Επιτροπή

Καθ. Σοφία Μητάκου

Καθ. Σέρκο Χαρουτουνιάν

Καθ. Αλέξιος Λέανδρος Σκαλτσούνης

Περίληψη

Μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες φρούτων στον κόσμο είναι αυτή των εσπεριδοειδών (γένος *Citrus*) με παγκόσμια παραγωγή 13.898.418 τόνων κατά το έτος 2018. Ένας βασικός σκοπός της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών είναι η παραγωγή χυμών. Τα τελευταία δέκα χρόνια ο μέσος όρος παραγωγής χυμού πορτοκαλιού είναι δύο εκατομύρια τόνοι.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι αντίστοιχα μεγάλος σε μέγεθος είναι και ο όγκος των παραπροϊόντων που παράγονται κατά τη διαδικασία της χυμοποίησης, αφού μόνο το 50% περίπου του καρπού αποτελεί τον χυμό του. Σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), τα οικονομικώς αξιοποιήσιμα παραπροϊόντα της χυμοποίησης εσπεριδοειδών είναι μικρότερος του 15, παραδείγματα αυτών αποτελούν η πηκτίνη, οι διατροφικές ίνες, οι αποξηραμένοι φλοιοί κ.ά., ενώ στον κατάλογο των αξιοποιημένων παραπροϊόντων δεν συμπεριλαμβάνονται τα αιθέρια έλαια ψυχρής έκθλιψης (Cold-Pressed Essential Oils - CPEOs). Τα τελευταία είναι μια κατηγορία παραπροϊόντων με σημαντικό δυναμικό αξιοποίησης, κυρίως, λόγω των καροτενοειδών που εμπεριέχουν, αλλά και άλλων δραστικών συστατικών τους, όπως τα φλαβονοειδή και οι κουμαρίνες. Αυτά αποτέλεσαν τα κύριο αντικείμενο διενέργειας της διπλωματικής μελέτης.

Αναλυτικότερα, τα CPEOs συνίστανται από δύο κλάσματα, το πτητικό, που αποτελεί και το κύριο μέρος των CPEOs, με κυρίαρχο συστατικό το D-λεμονένιο το οποίο ανιχνεύεται σε ποσοστά που υπερβαίνουν το 95%, και το μη πτητικό, που είναι σε πολύ μικρότερο ποσοστό και αποτελείται από μια πληθώρα συστατικών, όπως υδρογονάνθρακες, καροτενοειδή, φλαβονοειδή, κουμαρίνες κλπ.

Στο πλαίσιο υλοποίησης της διπλωματικής μελέτης μελετήθηκαν τα CPEOs από τέσσερα εσπεριδοειδή που χρησιμοποιούνται στη χυμοποίηση, δηλαδή πορτοκαλιού (*C. sinensis*), μανταρινιού (*C. reticulate*), λεμονιού (*C. limon*) και γκρέιπφρουτ (*C. paradisi*). Στόχος ήταν η μελέτη της απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος και η αξιολόγηση του υπολείμματος ως πλούσιας πηγής καροτενοειδών με στόχο τη χρησιμοποίησή του ως χρωστικού συμπληρώματος για τη διατροφή πτηνών και ιχθύων, αλλά και άλλων φυσικών προϊόντων, όπως τα φλαβονοειδή. Επιπλέον, στόχος ήταν και η παραγωγή μεμονωμένων φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Έτσι, πραγματοποιήθηκε ο ολικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας καροτενοειδών, φλαβονοειδών και φαινολικών και έγινε ο ποιοτικός και ποσοτικός

προσδιορισμός ορισμένων καροτενοειδών που εμπεριέχονται στο μη πτητικό κλάσμα. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με UPLC-MS/MS και HPLC-DAD (450nm), υποδεικνύοντας την παρουσία των μορίων, φουκοξανθίνη, ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη, λουτεΐνη, β-κρυπτοξανθίνη, λυκοπένιο, α-καροτένιο, β-καροτένιο και φυτοένιο.

Επιπλέον, έγινε η απομόνωση και η ταυτοποίηση ορισμένων φυσικών προϊόντων και συγκεκριμένα, των τεσσάρων πολυμεθοξυφλαβονών, νομπιλετίνη, 5,6,7,4'-τετρα-μεθοξυφλαβόνη, τανγκερετίνη και 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη και των φουρανοκουμαρινών, ερακλινόλη, μπεργκαμοττίνη, 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο, καθώς και της κουμαρίνης, αουραπτένιο. Η ταυτοποίηση της δομής τους έγινε με λήψη του φάσματος πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ και των φασμάτων 2D COSY, HMQC και HMBC.

Abstract

Citrus fruits are one of the most cultivated species. Their global production in 2018 was 13.898.418 tonnes. Citrus juicing process generates considerably large amounts of by-products, since only the 50% of the fresh fruit's mass is transformed into juice. The remaining residues, consisted of peel, pulp and seeds, are of limited economic interest, although their content in bioactive natural products is indicative of their potential for utilization as biorefinery raw materials.

Today from various by-products obtained during the juice-making process, only a few have been exploited in the market. The Cold Pressed Essential Oils (CPEOs) is a by-product, which has not found a market position, yet.

The citrus juicing CPEOs consist of two fractions, a thoroughly studied major volatile fraction, containing D-limonene as prevailing component, and a minor, non-volatile residue, which is composed of carotenoids, flavonoids, coumarins etc.

Endeavour herein refers to the exploitation of the less studied non-volatile fraction as a rich source of natural products and the assessment of their applicability as pigments in chicken's and fish' dietary supplements because of their carotenoid content. In this context, the CPEOs of four different *Citrus* species –namely orange (*C. sinensis*), mandarin (*C. reticulata*), lemon (*C. limon*), and grapefruit (*C. paradisi*) –were investigated in order to determine, mostly, their efficacy to act as carotenoids source, but also as source of other natural products, too.

For this purpose, the total carotenoid, phenolic and flavonoid content was determined in the CPEOs' non-volatile fraction and UPLC-MS/MS and HPLC-DAD (450nm) were used for the identification and quantitation of fucoxanthin, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, b-cryptoxanthin, lycopene, a-carotene, b-carotene and phytoene.

In addition to this, some polymethoxyflavones, coumarins and furanocoumarins were isolated and their structures were determined by ¹H-NMR and 2D NMR COSY, HMQC and HMBC.

Ευχαριστίες,

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο «Φυσιολογίας, Θρέψεως και Διατροφής» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και με την ολοκλήρωσή της, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή Σέρκο Χαρουτουνιάν, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την υποστήριξη και το ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Θα ήθελα να εκράσω τις ευχαριστίες μου και στην υπεύθυνη καθηγήτρια της διπλωματικής μελέτης, Σοφία Μητάκου για τις υποδείξεις της και την συμβολή της στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτούνη που είναι μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής αυτής της εργασίας.

Τα λόγια είναι περιττά και οι ευχαριστίες το λιγότερο που μπορώ να εκφράσω για την ΕΔΙΠ Σοφία Κουλοχέρη. Την ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες υποδείξεις της, την συμπαράστασή της, τη συνεχή της υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης, καθώς και την συνεχή προθυμία της να προσφέρει απλόχερα τη βοήθειά της. Χωρίς αυτήν όλα θα ήταν πιο δύσκολα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για την πολύτιμη βοήθεια του και τον χρόνο που μου αφιέρωσε για την ερμηνεία των φασμάτων NMR και τις διορθώσεις του, καθώς και τον μεταδιδάκτορα Επαμεινώνδα Ευεργέτη για τις ιδέες που μοιράστηκε μαζί μου και τις υποδείξεις του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προπτυχιακό φοιτητή Γκριγόρ Χεϊράνοβ για την συμβολή του σε μέρος αυτής της εργασίας, τους Διονύση Παυλόπουλο και Βασίλη Ηλιόπουλο, που με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και την υποψήφια διδάκτωρ Μόνικα Αντωνιάδη για την λήψη των φασμάτων NMR.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και τη Βιομηχανία Χυμών «Οικογένεια Χριστοδούλου» για αυτή την χορηγία των CPEOs, που αποτελούν την πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Σχημάτων	11
Κατάλογος Εικόνων	12
Κατάλογος Συντομεύσεων	16
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
1. Εισαγωγή	21
2. Καροτενοειδή	23
2.1. Βιοσύνθεση	23
2.1.1. Βιοσύνθεση των Τερπενοειδών	23
2.1.2. Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών	26
2.2. Αποκαροτενοειδή	30
2.3. Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών κατά την Ανάπτυξη των Καρπών	31
2.4. Ταξινομικά Συστήματα των Φρούτων με βάση την Περιεκτικότητά τους σε Καροτενοειδή	36
2.5. Τα Καροτενοειδή ως Αντιοξειδωτικά	37
2.6. Ο ρόλος των Καροτενοειδών στη Φωτοσύνθεση	38
2.7. Προσδιορισμός των Καροτενοειδών	42
3. Φλαβονοειδή	44
3.1. Παρουσία των φλαβονοειδών στα φρούτα	48
3.2. Τα Φλαβονοειδή ως Αντιοξειδωτικά	51
4. Εσπεριδοειδή	53
4.1. Προέλευση	55
4.2. Ταξινόμηση	56
4.3. Πορτοκάλια	61
4.4. Μανταρίνια	64
4.5. Λεμόνια	67
4.6. Γκρέιπφρουτ	69
4.7. Διαδικασία Χυμοποίησης των Εσπεριδοειδών & τα Παραπροϊόντα που παραλαμβάνονται	75
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
5. Πειραματική Διαδικασία	80
5.1. Απομάκρυνση των Πτητικών Κλασμάτων	80

5.2.	Ολική Περιεκτικότητα Καροτενοειδών	81
5.3.	Ολική Περιεκτικότητα Φλαβονοειδών.....	81
5.4.	Ολική Περιεκτικότητα Φαινολικών	82
5.5.	Ανάλυση Δειγμάτων	84
5.5.1.	Σαπωνοποίηση	84
5.5.2.	Ανάλυση Καροτενοειδών	85
5.6.	Απομόνωση & Ανίχνευση Φυσικών Προϊόντων.....	96
5.6.1.	Ανίχνευση Καροτενοειδών	97
5.6.2.	Απομόνωση Φλαβονοειδών.....	97
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
6.	Αποτελέσματα-Συζήτηση	101
6.1.	Επιλογή Μεθόδου Απομάκρυνσης του Πτητικού Κλάσματος	101
6.2.	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Καροτενοειδών	103
6.3.	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φλαβονοειδών.....	104
6.4.	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φαινολικών	104
6.5.	Αποτελέσματα Ανάλυσης Καροτενοειδών.....	105
6.6.	Απομόνωση Φυσικών Προϊόντων	107
6.6.1.	Ανίχνευση Καροτενοειδών	107
6.6.2.	Απομόνωση Φλαβονοειδών.....	111
6.7.	Συμπεράσματα-Συζήτηση	147
	ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ	152

Κατάλογος Πινάκων

Αρίθμηση Πίνακα	Τίτλος Πίνακα	Σελίδα
Πίνακας 1	Τρόπος ταξινόμησης των δευτερογενών μεταβολιτών	21
Πίνακας 2	Τύποι δεικτών DNA που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της ταξινόμησης των ειδών του γένους Citrus	59
Πίνακας 3	Περιεκτικότητα των καροτενοειδών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα β-καροτενίου ανά g ξηρού βάρους του εξωτερικού του φλοιού του Citrusaurantium και περιεκτικότητα φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά 100 g βάρους του εξωτερικού του φλοιού	63
Πίνακας 4	Περιεκτικότητα φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά 100 g βάρους Citrusaurantium	63
Πίνακας 5	Μέσοι όροι περιεκτικότητας των φλαβονοειδών σε μελέτη διαφόρων τμημάτων των καρπών 19 ποικιλιών μανταρινιών, εκπεφρασμένα σε ισοδύναμα mgρουτίνης ανά g ξηρού βάρους	65
Πίνακας 6	Περιεκτικότητα των Ολικών Φλαβονοειδών σε ισοδύναμα ρουτίνης μg / g νωπού βάρους	68
Πίνακας 7	Περιεκτικότητες των καροτενοειδών στους καρπούς των εσπεριδοειδών	72
Πίνακας 8	Παραγωγή εσπεριδοειδών κατά το έτος 2018	75
Πίνακας 9	Παρουσίαση των καροτενοειδών-στόχων, των ιόντων παρακολούθησης με την ενέργεια σύγκρουσης (σε eV), του ιοντισμού και του χρόνου έκλουσης (RT, RetentionTime) (σε min) του καθενός	85
Πίνακας 10	Παρουσίαση των συνθηκών χρωματογραφίας	93
Πίνακας 11	Παρουσίαση των συνθηκών του φασματομέτρου μάζας.	93
Πίνακας 12	Χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού σε ημιπαρασκευαστική HPLC.	99
Πίνακας 13	Χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού σε αναλυτική HPLC	99
Πίνακας 14	Αποδόσεις Μάζας	101
Πίνακας 15	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Καροτενοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg β-καροτενίου Eq β-car/100g CPEO	104
Πίνακας 16	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φλαβονοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνηςEqQ/100g CPEO	104
Πίνακας 17	Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φαινολικών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος EqC/100g CPEO	105
Πίνακας 18	Εξίσωση πρότυπης καμπύλης, R ² , ελάχιστο όριο ανίχνευσης (LOD) και ελάχιστο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) των αναλυτών	106
Πίνακας 19	Αποτελέσματα ανάλυσης καροτενοειδών εκφρασμένα σε mg καροτενοειδούς ανά 100 gCPEO (mg/100gCPEO) από την ανάλυση με LC-MS/MS. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις πριν από την σαπωνοποίηση (π.σ.) και μετά από	106

	αυτήν (μ.σ.)	
Πίνακας 20	Οι υποκαταστάτες R1, R2, R3 και R4 για τα φλαβονοειδή τανγκερετίνη (1), 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη (2), νομπιλετίνη (3) και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη (4).	116
Πίνακας 21	Τιμές ¹ H-NMR σε ppm των PMFs τανγκερετίνη, 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	126
Πίνακας 22	Τιμές ¹³ C-NMR των PMFs τανγκερετίνη, 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	127
Πίνακας 23	Τιμές ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ερακλινόλης από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	131
Πίνακας 24	Τιμές ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR του αουραπτενίου από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	136
Πίνακας 25	Τιμές ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της μπεργκαμοττίνης από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	141
Πίνακας 26	Τιμές ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR του μορίου 8-γερανυλοξυψωραλένιο από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN	145

Κατάλογος Σχημάτων

Αρίθμηση Σχήματος	Τίτλος Σχήματος	Σελίδα
Σχήμα 1	Τα Μεταβολικά Μονοπάτια της Βιοσύνθεσης των Τερπενοειδών. Για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών στα φυτά χρησιμοποιείται η MEP οδός	25
Σχήμα 2	Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών	28
Σχήμα 3	Βιοσύνθεση των Αποκαροτενοειδών	30
Σχήμα 4	Αντιπροσωπευτικό σχήμα της βιοσύνθεσης καροτενοειδών σε φρούτα. Κάθε καρπός τοποθετείται στο επίπεδο της οδού του κυρίαρχου καροτενοειδούς που είναι υπεύθυνο για τον χρωματισμό του.	34
Σχήμα 5	Διάγραμμα της βιοσυνθετικής οδού των φλαβονοειδών	46
Σχήμα 6	Αντιδράσεις παραγωγής γλυκοσιδών στα εσπεριδοειδή	49
Σχήμα 7	Απεικόνιση των σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους Citrus	58

Κατάλογος Εικόνων

Αρίθμηση Εικόνας	Τίτλος Εικόνας	Σελίδα
Εικόνα 1	Εξέλιξη της συνολικής περιεκτικότητας των καροτενοειδών σε διαφορετικούς ιστούς και είδη φρούτων κατά το στάδιο της ωρίμανσης	32
Εικόνα 2	Δομή των χλωροφυλλών a και b	39
Εικόνα 3	Φάσμα απορρόφησης των καροτενοειδών και χλωροφυλλών a και b	40
Εικόνα 4	Μεταφορά ενέργειας από τις επικουρικές χρωστικές στα κέντρα αντίδρασης	40
Εικόνα 5	Απεικόνιση των δύο ζωνών απορρόφησης των φλαβονοειδών.	43
Εικόνα 6	Φάσματα απορρόφησης (A) Εσπεριδίνης (Hesperidin), (B) Ναρινγίνης (Naringin)	44
Εικόνα 7	Δομές ορισμένων κατηγοριών φλαβονοειδών	45
Εικόνα 8	Υδροξυλιωμένες PMFs, PMFs, πολυμεθοξυφλαβόνες και πολυμεθοξυχαλκόνες που έχουν απομονωθεί από το φλοιό γλυκού πορτοκαλιού	50
Εικόνα 9	Οι δομικές ομάδες των φλαβονοειδών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες δραστικές ρίζες	51
Εικόνα 10	Οι περιοχές παραγωγής των εσπεριδοειδών σε παγκόσμια κλίμακα	52
Εικόνα 11	Η ανάγλυφη μετόπη του Ναού του Διός στην Αρχαία Ολυμπία	53
Εικόνα 12	Απεικόνιση του θεού Kuvera	54
Εικόνα 13	Τα κύρια μέρη των εσπεριδοειδών.	60
Εικόνα 14	Η εξωτερική και η εσωτερική όψη διαφορετικών ποικιλιών πορτοκαλιών	61
Εικόνα 15	Εξωτερική και εσωτερική όψη τριών ποικιλιών μανταρινιών	63

Εικόνα 16	Μέση περιεκτικότητα φλαβονοειδών, όπως προκύπτει από μελέτη διάφορων ειδών και ποικιλιών Citrus	66
Εικόνα 17	Απεικόνιση του ολόκληρου καρπού, σάρκας (κάθετη και οριζόντια τομή), φλοιού, χυμού και σπόρων τριών ποικιλιών <i>Citrus limon</i> (Feiminailao (FM), Pangdelusaningmeng (PD), Beijingningmeng (BJ))	68
Εικόνα 18	Η εξωτερική και η εσωτερική όψη των δύο βασικών ποικιλιών γκρέιπφρουτ, του λευκού Marsh και του κόκκινου Starruby	69
Εικόνα 19	Τα στάδια ανάπτυξης του καρπού του γκρέιπφρουτ	71
Εικόνα 20	Περιεκτικότητα του λυκοπενίου και του β-καροτενίου στον καρπό γκρέιπφρουτ κατά τα στάδια της ανάπτυξής του	71
Εικόνα 21	Περιεκτικότητα των καρπών του γκρέιπφρουτ σε ναρινγίνη, ναριρουτίνη, πονσιρίνη, διδυμίνη και νεοεσπεριδίνη κατά τα στάδια της ανάπτυξής του	72
Εικόνα 22	Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την παραγωγή εσπεριδοειδών κατά το έτος 2018	75
Εικόνα 23	Διαδικασία Παραγωγής Αιθέριου Ελαίου Ψυχρής Έκθλιψης	76
Εικόνα 24	Διαχωρισμός των δύο κλασμάτων	80
Εικόνα 25	96-θέσια πλακέτα με δείγματα μετά από την μέτρηση της απορρόφησης	81
Εικόνα 26	96-θέσια πλακέτα με δείγματα μετά από την μέτρηση της απορρόφησης.	82
Εικόνα 27	Διαχωρισμός των δύο φάσεων μετά από σαπωνοποίηση σε δείγμα με χλωροφύλλες και σε δείγμα CPEO	84
Εικόνα 28	Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων κατοτενοειδών με LC-MS/MS	95
Εικόνα 29	Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων λουτεΐνης και ζεαξανθίνης με HPLC-DAD (450nm)	96
Εικόνα 30	Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού των δύο κλασμάτων, πολικό και άπολο.	98
Εικόνα 31	Χρωματογράφημα GC-MS της αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του πτητικού	102

	κλάσματος.	
Εικόνα 32	Σύγκριση του φάσματος μάζας της κορυφής του D-λεμονενίου με την χρήση βιβλιοθήκης (NIST05) για την επιβεβαίωσή του	103
Εικόνα 33	Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικού HPLC του άπολου κλάσματος δείγματος μανταρινιού μετά από σαπωνοποίηση	107
Εικόνα 34	TLC των κλασμάτων που προέκυψαν από την ημιπαρασκευαστική HPLC του άπολου κλάσματος	108
Εικόνα 35	Χρωματογράφημα κορυφής A1 σε μήκος κύματος 450 nm	108
Εικόνα 36	Χρωματογράφημα κορυφής A2 σε μήκος κύματος 450 nm	108
Εικόνα 37	Χρωματογράφημα κορυφής A3 σε μήκος κύματος 450 nm	109
Εικόνα 38	Χρωματογράφημα κορυφής A4 σε μήκος κύματος 450 nm	109
Εικόνα 39	Χρωματογράφημα κορυφής A5 σε μήκος κύματος 450 nm	109
Εικόνα 40	Χρωματογράφημα κορυφής A6 σε μήκος κύματος 450 nm	109
Εικόνα 41	Χρωματογράφημα κορυφής A7 σε μήκος κύματος 450 nm	110
Εικόνα 42	Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικού HPLC του πολικού κλάσματος δείγματος μανταρινιού	110
Εικόνα 43	TLC των κλασμάτων που προέκυψαν από την ημιπαρασκευαστική HPLC του πολικού κλάσματος.	111
Εικόνα 44	Χρωματογράφημα κορυφής Π1 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	111
Εικόνα 45	Χρωματογράφημα κορυφής Π2 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	112
Εικόνα 46	Χρωματογράφημα κορυφής Π3 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	112
Εικόνα 47	Χρωματογράφημα της δεύτερης κορυφής, που φαίνεται στην Εικ. 45, σε μήκος κύματος 280 και 254nm.	113
Εικόνα 48	Χρωματογράφημα κορυφής Π4 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	113
Εικόνα 49	Χρωματογράφημα της δεύτερης κορυφής, που φαίνεται στην Εικ. 47, σε μήκος κύματος 280 και 254nm.	114
Εικόνα 50	Χρωματογράφημα κορυφής Π5 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	114
Εικόνα 51	Χρωματογράφημα κορυφής Π6 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	114
Εικόνα 52	Χρωματογράφημα κορυφής Π1 σε μήκος κύματος 280 και 254nm	115
Εικόνα 53	Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μορίου τανγκερετίνη	116

Εικόνα 54	Φάσμα COSY του μορίου τανγκερετίνη	117
Εικόνα 55	Φάσμα HMQC του μορίου τανγκερετίνη	118
Εικόνα 56	Φάσμα HMBC του μορίου τανγκερετίνη	119
Εικόνα 57	Φάσμα ^1H -NMR του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη	120
Εικόνα 58	Φάσμα COSY του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη	121
Εικόνα 59	Φάσμα HMQC του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη	121
Εικόνα 60	Φάσμα HMBC του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη	122
Εικόνα 61	Φάσμα ^1H -NMR των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη	123
Εικόνα 62	Φάσμα COSY των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη	124
Εικόνα 63	Φάσμα HMQC των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη	125
Εικόνα 64	Φάσμα HMBC των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη	126
Εικόνα 65	Φάσμα ^1H -NMR του μορίου ερακλινόλη	129
Εικόνα 66	Φάσμα COSY του μορίου ερακλινόλη	130
Εικόνα 67	Φάσμα HMQC του μορίου ερακλινόλη	130
Εικόνα 68	Φάσμα HMBC του μορίου ερακλινόλη	131
Εικόνα 69	Φάσμα ^1H -NMR του αουραπτενίου	133
Εικόνα 70	Φάσμα COSY του αουραπτενίου	134
Εικόνα 71	Φάσμα HMQC του αουραπτενίου	135
Εικόνα 72	Φάσμα HMBC του αουραπτενίου	135
Εικόνα 73	Φάσμα ^1H -NMR της μπεργκαμοττίνης	138
Εικόνα 74	Φάσμα COSY της μπεργκαμοττίνης	139
Εικόνα 75	Φάσμα HMQC της μπεργκαμοττίνης	140
Εικόνα 76	Φάσμα HMBC της μπεργκαμοττίνης	140
Εικόνα 77	Φάσμα ^1H -NMR του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο	143
Εικόνα 78	Φάσμα COSY του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο	144

Εικόνα 79	Φάσμα HMQC του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο	144
Εικόνα 80	Φάσμα HMBC του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο	145

Κατάλογος Συντομεύσεων

Συντόμευση	
4CL	Λιγάση του 4-κουμαροϋλ-συνενζύμου A
ACN	Ακετονιτρίλιο
AcOOEt	οξικός αιθυλεστέρας
AMPK	Ενεργοποιημένη Πρωτεϊνική Κινάση της 5'-μονοφωσφορικής Αδενοσίνης
APCI	Χημικός Ιονισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric pressure chemical ionization)
APPI	Φωτοϊοντισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photoionisation)
Arb	Αυθαίρετη Μονάδα Μέτρησης (Arbitrary unit)
AS	Συνθετάση της Ανθοκυανίνης
BJ	Ποικιλία λεμονιών Beijingningmeng
b-LCY	β-κυκλάση του Λυκοπενίου
Brs	ευρεία απλή (broad single) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
C4H	4-υδροξυλάση του Κινναμωμικού
CCD4	Διοξειγενάση Διάσπασης Καροτενοειδών Τύπου 4
CCDs	Οξυγενάσες Διάσπασης των Καροτενοειδών
CCS	Συνθάση της καψανθίνης-καφορουμπίνης
CE	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis)
CE	Ισοδύναμα β-καροτενίου
CHI	Ισομεράση της Χαλκόνης-Φλαβανόνης
CHS	Συνθάση της Χαλκόνης
CI	Χημικός Ιονισμός
CoA	Συνένζυμο A
COSY	Correlation Spectroscopy
CPEOs	Αιθέρια Έλαια Ψυχρής Έκθλιψης (Cold-Pressed Essential Oils)
Crt	Καροτενοειδή
CRTISO	Ισομεράση του Λυκοπενίου
CYCB/LCYβ2	β-κυκλάση του Λυκοπενίου 2
CYP97A, CYP97C	Υδροξυλάσες που περιέχονται στο κυτόχρωμα P450 και περιέχουν αίμη
D	διπλή (doublet) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
Dd	διπλή-διπλή (doublet-doublet) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
DFR	4-αναγωγή της Διυδροφλαβονόλης
DMAPP	Πυροφωσφορικό Διμεθυλ-αλλύλιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide)

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DXS	Συνθάσης της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-D-ξυλουλόσης
DOXP	5-φωσφορικής-1-δεοξυ-D-ξυλουλόσης, 5-P-δεοξυ-ξυλουλόσης
EI	Ιονισμός Ηλεκτρονίων
Eq β-car/100g	Ισοδύναμα β-καροτενίου (β-Carotene Equivalents)
EqQ	Ισοδύναμα Κερκετίνης (Quercetin Equivalents)
ESI	Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού (ElectroSpray Ionization)
F3H	3β-υδροξυλάση της Φλαβονόνης
FLS	Συνθάση της Φλαβονόλης.
FM	Ποικιλία λεμονιών Feiminailao
FPP	Πυροφωσφορικού Φαρνεσυλίου
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FRTA	Θεωρία Ελεύθερων Ριζών της Γήρανσης (Free Radical Theory of Aging)
FW	Νωπό Βάρος (Fresh Weight)
GC	Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)
GE	Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος (Gallic acid Equivalents)
GGPP	Πυροφωσφορικό Γερανύλ γερανύλιο
GPP	Πυροφωσφορικό Γερανύλιο
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography)
IFS	Συνθετάση του Ισοφλαβονοειδούς.
IPP	Ισοπεντύλιο
IspC	Αναγωγικοϊσομεράση της 1-δεόξυ-D-ξυλουλόσης
ISSR	Επανάληψη Απλής Ακολουθίας (Inter-Simple Sequence Repeat)
J	σταθερά σύζευξης εκφρασμένη σε Hz
LC	Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography)
LOD	Ελάχιστο Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection)
LOQ	Ελάχιστο Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation)
M	Πολλαπλή (multi) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
MeOH	Μεθανόλη
MEP	4-φωσφορική-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη
MPLC	Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography)
MRM	Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)
MS / MS	Διπλή Φασματομετρία Μάζας
MSn	Πολλαπλή Φασματομετρία Μάζας
MTBE	Methyl tert-butyl ether
MVA	Μεβαλονικό Οξύ
NI	Αρνητικός ιονισμός
NIRS	Φασματοσκοπία Αντικειμενικής Υπέρυθρης Αντανάκλασης (Near Infrared Reflectance Spectroscopy)
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance)
OR	Πρωτεΐνη Πορτοκαλιού
PAL	Αμμωνιαλυάση της Φαινυλαλανίνης

PAS	Φωτοακουστική Φασματοσκοπία Λέιζερ (PhotoAcoustic Spectroscopy)
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
PD	Ποικιλία λεμονιών Pangdelusaningmeng
PDS	Συνθάση-Αποκορεσμάση του Φυτοενίου
PDS	Αποκορεσμάση του Φυτοενίου,
PI	Θετικός Ιοντισμός
PMFs	Πολυμεθοξυφλαβόνες (Polymethoxyflavones)
PSY	Συνθάση του Φυτοενίου
QE	Ισοδύναμα Κερκετίνης
RAPD	Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RE	ισοδύναμα Ρουτίνης
RFLP	Περιοριστικά Θραύσματα Μήκους Πολυμορφισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNS	Δραστικά Είδη Αζώτου (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Δραστικά Είδη Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
RRLC	Υγρή Χρωματογραφία Ταχείας Ανάλυσης (Rapid Resolution Liquid Chromatography)
RT	Χρόνος Έκλουσης (Retention Time) ή Θερμοκρασία Δωματίου (Room Temperature)
S	Απλή (single) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
SCAR	Αλληλουχία που χαρακτηρίζεται από Ενισχυμένη Περιοχή (Sequence Characterized Amplified Region)
SIM	Επιλεγμένη Παρακολούθηση Ιόντων (Selected Ion Monitoring)
SRM	Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring)
T	τριπλή (triplet) αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών NMR
TCC	Ολική Περιεκτικότητα Καροτενοειδών (Total Carotenoid Content)
TFC	Ολική Περιεκτικότητα φλαβονοειδών (Total Flavonoids Content)
TLC	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin-Layer Chromatography)
TMS	Τετραμεθυλοσιλάνιο
TNF	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου (Tumor Necrosis Factor)
TPTZ	2,4,6-TriPyridyl-s-TriaZine
UF3GT, UDP γλυκόζη	3-O-γλυκοσυλοτρανσφεράση του Φλαβονοειδούς
UGTs	Γλυκοτρανσφεράσες
UHPLC	Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UHPSFC	Υπερ-κρίσιμη Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης (Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography)
UV-DAD	Ανιχνευτής Συστοιχίας Διόδων Υπεριώδους Ακτινοβολίας (UltraViolet spectroscopy-Diode Array Detector)
VDE	Δι-εποξειδάση της Βιολαξανθίνης
ZDS	Αποκορεσμάση του ζ-καροτενίου
ZISO, Z-ISO	Ισομεράση του ζ-καροτενίου,
βCHX	Υδροξυλάση του β-καροτενίου που δεν περιέχει αίμη
β-LCY1	β-κυκλάση του Λυκοπενίου 1

β-ΟΗάση	β-υδροξυλάση
Δ	χημικές μετατοπίσεις
ε-LCY	ε-κυκλάση του Λυκοπενίου
ε-ΟΗάση	ε- υδροξυλάση
ZEP	Εποξειδάση της Ζεαξανθίνης
μ.σ.	μετά από την σαπωνοποίηση
Mn/ Cu / ZnSOD	Υπεροξειδική Δισμουτάση του μαγγανίου/ χαλκού / ψευδαργύρου (SuperOxide Dismutase)
π.σ.	πριν από την σαπωνοποίηση

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Ο όρος «φυσικά προϊόντα» αναφέρεται κυρίως σε χημικά μόρια που είτε συνιστούν τους ζώντες οργανισμούς ή παράγονται από αυτούς, παρότι ετυμολογικά ως «φυσικά προϊόντα» θα ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν όλα τα οργανικά και ανόργανα μόρια που βρίσκονται στη φύση. Ο άνθρωπος, από τους προϊστορικούς χρόνους, ενδιαφερόταν για τα προϊόντα που παρήγαγε η φύση, ως απαραίτητο στοιχείο για την επιβίωσή του, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιεί ποικίλες χημικές ενώσεις που παραλαμβάνονται από τους φυτικούς κατά κύριο λόγο ιστούς, όπως χρωστικές, καρυκεύματα, αρώματα, φάρμακα κλπ.

Τα μόρια που εμπεριέχονται στους ζώντες οργανισμούς διακρίνονται σε:

Α) πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως οι υδατάνθρακες, τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα κλπ, που αποτελούν τα θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά τους (Ιγνατιάδου-Ραγκούση 2009) και εκτελούν μεταβολικούς ρόλους απαραίτητους για την επιβίωση και ανάπτυξή τους (Croteau, *et al.* 2000), και

Β) δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, τα τερπενοειδή, τα αλκαλοειδή κλπ, που χαρακτηρίζουν το είδος από το οποίο παράγονται, αλλά δεν συμμετέχουν άμεσα σε κάποια βασική οργανική του λειτουργία.

Ο ρόλος των πρωτογενών μεταβολιτών έχει πλήρως εξακριβωθεί και είναι όμοιος για όλους τους οργανισμούς. Όμως, ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν έχει διευκρινιστεί σε πολλές περιπτώσεις, ενώ συχνά έχει προσδιοριστεί ότι διαφέρει ανάλογα με το είδος.

Σήμερα, με τον όρο «φυσικά προϊόντα» έχει επικρατήσει να ονοματίζονται τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, τα οποία ανάλογα με την χημική τους δομή, τη φυσιολογική τους δράση, την πηγή από την οποία προέρχονται, αλλά και τη βιοσυνθετικό μονοπάτι από το οποίο σχηματίζονται κατηγοριοποιούνται σε διάφορες ομάδες (Πίνακας 1). Η μελέτη των φυσικών αυτών προϊόντων αποτελεί το επίκεντρο μιας σειράς επιστημών, όπως η Λαϊκή Ιατρική, η Εθνοφαρμακολογία και η Εθνοβοτανική (Ιγνατιάδου-Ραγκούση 2009).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των δευτερογενών μεταβολιτών (Ιγνατιάδου-Ραγκούση 2009).

Ταξινόμηση ανάλογα με τη(ν):	Ταξινομικές Ομάδες Δευτερογενών Μεταβολιτών
Χημική Δομή	Άκυκλες Αλειφατικές Ενώσεις (π.χ. λιπαρά οξέα) Ευθύγραμμες Ακόρεστες/Πολυακόρεστες ενώσεις (π.χ. λιπαρά οξέα) Αλεικυκλικές Ενώσεις (π.χ. τερπένια) Αρωματικές Ενώσεις (π.χ. φαινόλες) Ετεροκυκλικές Ενώσεις (π.χ. αλκαλοειδή)
Φυσιολογική Δράση	Αντιβιοτικά Φερομόνες Βιταμίνες Χρωστικές κ.ά.
Πηγή Προέλευσης	π.χ. αλκαλοειδή του οπίου, χολικά οξέα κ.ά.
Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	π.χ. τερεπνοειδή, στεροειδή, φλαβονοειδή κ.ά.

2. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή ανήκουν στην οικογένεια των τερπενοειδών ή ισοπρενοειδών, και συγκεκριμένα στην τάξη των τετρατερπενοειδών, αφού τα μόριά τους αποτελούνται από 40 άτομα άνθρακα. Είναι φυσικές χρωστικές ενώσεις που συντίθενται από τα φυτά και κάποιους μικροοργανισμούς, όπως τα άλγη, τα βακτήρια και οι μύκητες (Ross 2014). Όμως, τα μόρια αυτά βρίσκονται και σε θαλάσσια ζώα, όπως ο σολομός και οι γαρίδες, αλλά και σε ζωικά προϊόντα, π.χ. ο κρόκος του αυγού (Islam and Schweigert 2015). Όμως, ο άνθρωπος και τα περισσότερα ζώα, είναι απαραίτητο να προσλαμβάνουν αυτές τις χημικές ενώσεις μέσω της διατροφής τους, αφού δεν είναι σε θέση να τις συνθέτουν *de novo* (Rivera and Canela-Garayoa 2012) ενώ είναι απαραίτητες για ορισμένες βασικές λειτουργίες, όπως η βιοσύνθεση της βιταμίνης Α, της οποίας αποτελούν πρόδρομες ενώσεις (Bendich and Olson 1989).

Τα καροτενοειδή διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα καροτένια, που είναι υδρογονάνθρακες (η δομή τους αποτελείται μόνο από άτομα άνθρακα και υδρογόνου) και τις ξανθοφύλλες, οι οποίες εκτός από C και H περιέχουν και τουλάχιστον ένα άτομο οξυγόνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της πρώτης κατηγορίας αποτελεί το β-καροτένιο και της δεύτερης η ζεαξανθίνη (Britton 2004).

Σήμερα, τα καροτενοειδή βρίσκουν πολλές και σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές, αφού χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσικές χρωστικές από τη βιομηχανία τροφίμων. Επίσης, λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία (π.χ. αντιοξειδωτική δράση) χρησιμοποιούνται και από τις βιομηχανίες παραγωγής συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμάκων (Fraser and Bramley 2004).

2.1. Βιοσύνθεση

2.1.1. Βιοσύνθεση των Τερπενοειδών

Όπως όλα τα τερπενοειδή, και η δομή των καροτενοειδών απαρτίζεται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8). Πρόδρομα μόρια των τερπενοειδών είναι τα δύο ισομερή του ισοπρενίου, το πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το αλλυλικό ισομερές του πυροφωσφορικό διμεθυλ-αλλύλιο (DMAPP).

Η παραγωγή του IPP στα φυτά πραγματοποιείται μέσω δυο μεταβολικών οδών, του μεβαλονικού οξέος (MVA) (Miziorko 2011) και της 4-φωσφορική-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (MEP) (Rodriguez-Concepcion 2002; Eisenreich *et al.* 2004). Η δεύτερη αναφέρεται και ως μεταβολικό μονοπάτι της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-D-ξυλουλόσης (DOXP) ή/και ως το μη μεβαλονικό μονοπάτι των πλαστιδίων (Lichtenthaler 2000). Όμως, είναι γνωστό ότι για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών φυτά χρησιμοποιούν τα μόρια IPP και DMAPP, που προέρχονται από την οδό της MEP (Rodriguez-Concepcion 2002; Eisenreich *et al.* 2004).

Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι χρησιμοποιεί ως αρχικά υποστρώματα για τον σχηματισμό της 5-P-δεοξυ-ξυλουλόσης (DOXP) τα μόρια της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αντίδραση των μορίων αυτών λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια της συνθάσης της DOXP (DXS) η οποία συμβάλλει στη συμπύκνωση των δύο μορίων με ταυτόχρονη απελευθέρωση CO₂. Στη συνέχεια, η MEP σχηματίζεται μέσω της ενδομοριακής αναδιάταξης και μείωσης της DOXP με τη δράση του ενζύμου IsrC (είναι μια αναγωγικοϊσομεράση). Η παρουσία των δυο αυτών ενζύμων είναι σημαντική για την ρύθμιση της παραγωγής των καροτενοειδών (Estévez *et al.* 2001; Carretero-Paulet *et al.* 2006). Τέλος, το IPP σχηματίζεται με την πραγματοποίηση μιας σειράς σταδίων που καταλύονται ενζυματικά σύμφωνα με το Σχήμα 1 (Abdallah and Quax 2017). Το τελευταίο ένζυμο της οδού αυτής είναι γνωστό ως η συνθάση του IPP:DMAPP, γιατί μπορεί να παράγει ταυτόχρονα IPP και DMAPP σε αναλογία 85:15 IPP/DMAPP (Tritsch *et al.* 2010).

Στο μεβαλονικό μεταβολικό μονοπάτι η σύνθεση του IPP περιλαμβάνει 6 βήματα που ξεκινούν με την συμπύκνωση δύο μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α (ακετυλο-CoA) που δίνει το ακετοακετυλο-CoA (Σχήμα 1) (Abdallah and Quax 2017). Όπως είναι φανερό, και στην περίπτωση αυτή σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις παίζουν τα ένζυμα που συμμετέχουν (Kanehisa 2000).

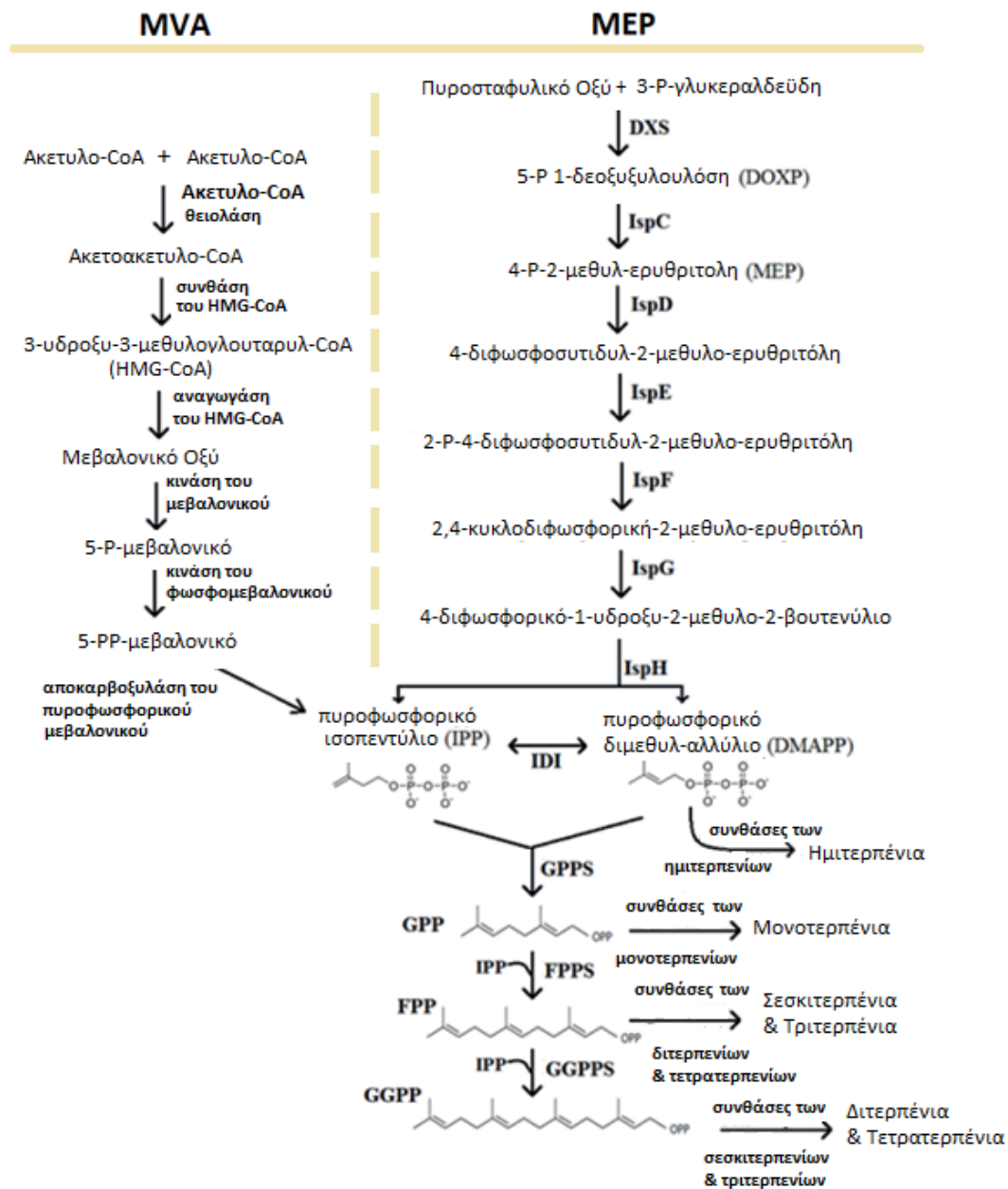
Μετά τον σχηματισμό των μορίων IPP και DMAPP, οι συνθετάσες του πυροφωσφορικού ισοπρενυλίου προσθέτουν μέσω της αντίδρασης κεφαλής-ουράς, διαδοχικά τρία μόρια της IPP σε αλληλικά μόρια πυροφωσφορικού, αρχίζοντας με DMAPP. Έτσι, παράγονται κατά σειρά τα πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP, C₁₀), πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP, C₁₅) και τελικά, το πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP, C₂₀). Τα τρία αυτά μόρια αποτελούν τους προδρόμους των περισσότερων ισοπρενοειδών ενώσεων. Όπως, παρατηρείται και στο παρακάτω σχήμα

(Σχήμα 1), το GPP είναι πρόδρομο μόριο των μονοτερπενίων, το FPP των σεσκιτερπενίων και τριτερπενίων και το GGPP των διτερπενίων και τετρατερπενίων.

Τα μονοτερπένια, που συναντώνται πρωτίστως ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών βρίσκονται, συνήθως, σε αφθονία στα αιθέρια έλαια των άνθων, των φύλλων και των καρπών του φυτικού οργανισμού, και σπανίως, στο φλοιό και τις ρίζες του. Εκτός από την ασύζευκτη πτητική τους μορφή, μπορούν να απαντιθούν και σε συζευγμένες μη πτητικές μορφές, όπως π.χ., στη μορφή των 3-D –γλυκοζιτών τους.

Το 1953, ο Ruzicka πρότεινε τον λεγόμενο «βιογενετικό κανόνα του ισοπρενίου», σύμφωνα με τον οποίο όλα τα φυσικά τερπενιοειδή προέρχονται είτε άμεσα είτε μέσω προβλέψιμων στερεοειδικών κυκλοποιήσεων, αναδιατάξεων και διμερισμών από τους ακυκλικούς προδρόμους C-10 (γερανιόλη), C-15 (φαρνεσόλη), C-20 (γερανυλγερανιόλη) και C-30 (σκουαλένιο). Ο κανонаς αυτός είναι πλέον αποδεκτός και αποδεικνύει την κοινή βιοσυνθετική οδό των τερπενίων (Chidambara Murthy *et al.* 2012, Abdallah and Quax 2017).

Μεταβολικά Μονοπάτια Βιοσύνθεσης Τερπενοειδών



Σχήμα 1 Τα Μεταβολικά Μονοπάτια της Βιοσύνθεσης των Τερπενοειδών. Για τη βιοσύνθεση των καροτενοειδών στα φυτά χρησιμοποιείται η MEP οδός (Abdallah and Quax 2017).

2.1.2. Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών

Η βιοσύνθεση των καροτενοειδών αρχίζει με τη συμπύκνωση δύο μορίων GGPP με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση του φυτοενίου (PSY) που δίνει ως προϊόν το 15-

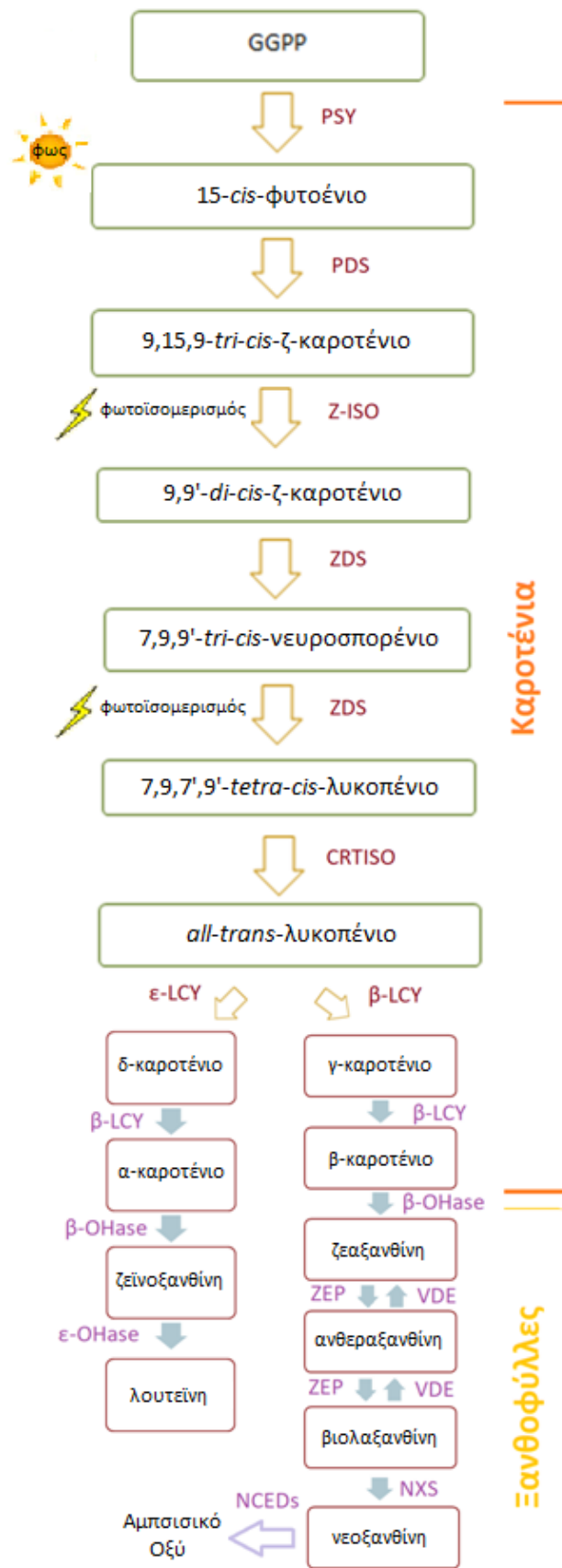
cis-φυτοένιο (Bramley 2002; Giorio *et al.* 2008). Ανάλογα με το είδος του φυτού, η διαδικασία αυτή ελέγχεται με την παρουσία πολλαπλών PSY (Cazzonelli *et al.* 2010). Στη συνέχεια, στο φυτοένιο εισάγονται τέσσερις διπλοί δεσμοί μέσω της δράσης των ενζύμων συνθετάση-αποκορεσμάση του φυτοενίου (phytoene desaturase-synthase, PDS) και αποκορεσμάση του ζ-καροτενίου (ζ-carotenene saturase, ZDS). Αυτά τα ένζυμα καταλύουν δύο συμμετρικές αντιδράσεις αφυδρογόνωσης μετατρέποντας το 15-*cis*-φυτοένιο σε *tetra-cis*-λυκοπένιο. Στα ανώτερα φυτά, ο σχηματισμός του *all-trans*-λυκοπενίου γίνεται με τη βοήθεια ειδικών ισομερασών, από το *tetra-cis*-λυκοπένιο με τη βοήθεια του ενζύμου CRTISO, η οποία είναι μια ισομεράση που έχει τη δυνατότητα να ισομεριώνει τους *cis* δεσμούς στις θέσεις 7, 9 και 7', 9' και να μετατρέπει το *tetra-cis*-λυκοπένιο σε *all-trans*-λυκοπένιο (Nisar *et al.* 2015). Το ένζυμο CRTISO δεν είναι η μοναδική καροτενοειδής ισομεράση στα φυτά γιατί σε *in vitro* πειράματα προσδιορίστηκε η παρουσία και μιας δεύτερης ισομεράσης, καθώς οι διπλοί δεσμοί C15-15' στο φυτοένιο δεν χρησιμοποίησαν το ένζυμο CRTISO ως υπόστρωμα για τον ισομερισμό τους (Isaacson *et al.* 2004).

Το ένζυμο Z-ISO είναι απαραίτητο για την μετατροπή των δεσμών *cis* σε *trans* και την παραγωγή του 9,15,9'-tri-*cis*-ζ-καροτενίου, που αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου ZDS (Nisar *et al.* 2015). Παρ' όλα αυτά, τόσο το ένζυμο CRTISO, όσο και το Z-ISO έχουν ξεχωριστούς ρόλους στον ισομερισμό των καροτενίων, παρότι η δραστηριότητα και των δύο αυτών ενζύμων μπορεί μερικώς να αντισταθμιστεί με το φωτοϊσομερισμό των *cis*-καροτενίων, που προηγούνται στη βιοσύνθεση του *all-trans*-λυκοπενίου στους φωτοσυνθετικούς ιστούς.

Στα φυτά, το *all-trans*-λυκοπένιο είναι το υπόστρωμα που προτιμούν οι κυκλάσες (Schnurr *et al.* 1996). Η κυκλοποίηση του λυκοπενίου είναι ένα κρίσιμο βήμα στον μεταβολισμό των καροτενοειδών και οδηγεί στη δημιουργία μιας ποικιλίας καροτενοειδών τα οποία διακρίνονται από τις διαφορετικές κυκλικές τελικές ομάδες τους: τον β-δακτύλιο ή/και τον ε-δακτύλιο, οι οποίοι παράγονται αντίστοιχα με τη δράση της β-κυκλάσης (b-LCY) ή της ε-κυκλάσης του λυκοπενίου (ε-LCY) (Pecker *et al.* 1996; Cunningham *et al.* 1996; Cunningham *et al.* 1993;). Ο σχηματισμός δύο β-δακτυλίων διαμορφώνει τον κλάδο β, β των καροτενοειδών που περιλαμβάνεται στο β-καροτένιο και τα παράγωγά του. Ο συνδυασμός των β- και ε-δακτυλίων διαμορφώνει τον κλάδο β, ε των καροτενοειδών που περιλαμβάνεται το α-καροτένιο και η λουτεΐνη, η οποία αποτελεί την κύρια ξανθοφύλλη στα πράσινα φύλλα. Το ένζυμο β-LCY έχει τη δυνατότητα να καταλύει την κυκλοποίηση και των δύο άκρων του λυκοπενίου, ενώ το ε-

LCY κυκλοποιεί μόνο το ένα άκρο, σχηματίζοντας το μονοκυκλικό d-καροτένιο. Τα καροτενοειδή με δύο δακτυλίους ε είναι σπάνια στα περισσότερα φυτά (Nisar *et al.* 2015). Άλλες δραστηριότητες των κυκλασών είναι η παραγωγή των κ-κυκλικών καροτενοειδών με ένα δακτύλιο κυκλοπεντανίου, όπως η καψανθίνη και η καψορουμπίνη, χρωστικών της οικογένειας του πιπεριού. Η παραγωγή τους καταλύεται από την συνθετάση της καψανθίνης-καψορουμπίνης (CCS) (Gómez-García and Ochoa-Alejo 2013; Mialoundama *et al.* 2010).

Τα μόρια α-καροτένιο και β-καροτένιο υδροξυλιώνονται περαιτέρω για να παράξουν ξανθοφύλλες, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη, οι οποίες συγκαταλέγονται μεταξύ των κύριων καροτενοειδικών χρωστικών στα φυτά. Η β-υδροξυλάση (β-ΟΗάση) καταλύει δύο αντιδράσεις υδροξυλίωσης, μετατρέποντας το β-καροτένιο σε ζεαξανθίνη μέσω της β-κρυπτοξανθίνης. Το α-καροτένιο υδροξυλιώνεται δύο φορές μέσω δύο διαφορετικών ενζυματικών αντιδράσεων που καταλύονται από τις ε- και β-υδροξυλάσες. Η εποξειδάση της ζεαξανθίνης (ZEP) υδροξυλιώνει τους β-δακτυλίους της σε δύο διαδοχικά στάδια για να παραχθεί η ανθεραξανθίνη και στη συνέχεια, η βιολαξανθίνη. Τελικά, η βιολαξανθίνη μετατρέπεται σε νεοξανθίνη με τη συνθετάση της νεοξανθίνης, η οποία αντιπροσωπεύει το τελευταίο στάδιο στη βιοσυνθετική οδό των καροτενοειδών. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2, από την νεοξανθίνη προκύπτει τελικά το αμπισικό οξύ (Nisar *et al.* 2015), μια φυτική ορμόνη που είναι σημαντική για τα φυτά, καθώς είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους όταν αυτά εκτίθενται σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως η ξηρασία και το κρύο. (J. Li *et al.* 2017).



Σχήμα 2 Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών (Nisar *et al.* 2015).

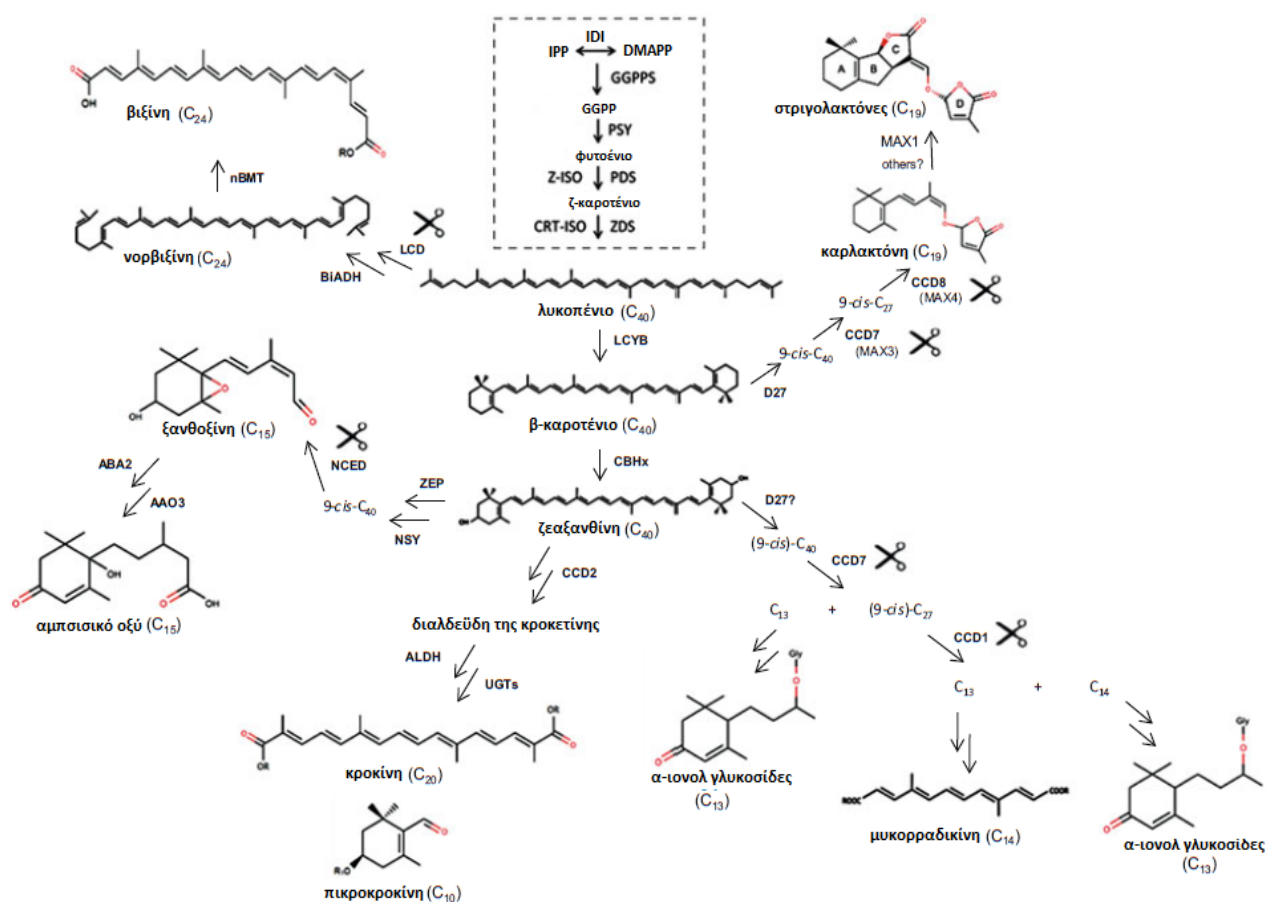
2.2. Αποκαροτενοειδή

Τα αποκαροτενοειδή ανήκουν και αυτά στις τερπενοειδείς ενώσεις και παράγονται κατά την οξειδωτική διάσπαση των καροτενοειδών. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, καθώς προέρχονται από έναν μεγάλο αριθμό πρόδρομων καροτενοειδών (έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 750), με διαφορές στις ειδικές θέσεις διάσπασης, αλλά και τροποποιήσεις μετά τη διάσπασή τους (Schwartz *et al.* 2001). Ανάλογα με το μέγεθος του χρωμοφόρου, τα αποκαροτενοειδή μπορούν να απορροφήσουν και το ορατό φως, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ως χρωστικές στην προσέλευση ερπυγιστών και ως παράγοντες διασποράς των σπόρων. Στα φυτά, τα αποκαροτενοειδή μπορούν να βρεθούν στον ετιοπλάστη, το λευκοπλάστη και το χρωμοπλάστη, αλλά και μεταξύ των διαφόρων φυτικών ιστών, όπως τα άνθη και οι ρίζες.

Η μετατροπή των καροτενοειδών σε αποκαροτενοειδή πραγματοποιείται με τη βοήθεια τοπικών οξυγενασών διάσπασης των καροτενοειδών (CCDs), οι οποίες στοχεύουν σε διαφορετικούς διπλούς δεσμούς της αλυσίδας του πολυενίου (Σχήμα 3). Οι πρόδρομοι των σημαντικότερων αποκαροτενοειδών είναι το λυκοπένιο, το β-καροτένιο και η ζεαξανθίνη. Δύο από τα πλέον σημαντικά αποκαροτενοειδή, λόγω της μεγάλης εμπορικής τους αξίας, είναι η βιξίνη και η κροκίνη. Η βιξίνη είναι ένα πολυένιο που προέρχεται από το κεντρικό τμήμα ενός λυκοπενίου μετά την ενζυματική διάσπαση των διπλών δεσμών 5-6 και 5'-6' και λαμβάνεται, κυρίως, από τους σπόρους της *Bixa orellana* (Κεντρική και Νότια Αμερική). Η κροκίνη είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή της κροκετίνης, η οποία συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες (μέχρι 8% σε ξηρό βάρος) στα στίγματα του σαφράν. Και οι δύο χρωστικές είναι υπεύθυνες για τον κόκκινο χρωματισμό των σιγμάτων του σαφράν, τα οποία περιέχουν και σειρά άλλων αποκαροτενοειδών, όπως η πικροκροκίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την πικρή του γεύση και η σαφρανάλη που είναι υπεύθυνη για το άρωμά του (Caballero-Ortega *et al.* 2007).

Όμως, στα αποκαροτενοειδή κατατάσσονται και κάποιες πολύ γνωστές φυτορμόνες, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της δομής και της ανάπτυξης των φυτών. Η γνωστότερη εξ αυτών είναι το αμπισισικό οξύ (ABA), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των σπόρων, της αντοχής στην ξηρασία κ.ά. (Schwartz *et al.* 2003; Taylor *et al.* 2005). Μια έτερη είναι η στριγγολακτόνη (strigolactone, SL), που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη των φυτών, η διακλάδωση των βλαστών τους, καθώς και ο συντονισμός της ανάπτυξης των φυτών και

της δομής των ριζών τους σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα φωσφορικών (Brewer *et al.* 2013; Ruyter-Spira *et al.* 2013; Rasmussen *et al.* 2013).



Σχήμα 3 Βιοσύνθεση των Αποκαροτενοειδών (Beltran and Stange 2016).

2.3. Βιοσύνθεση των Καροτενοειδών κατά την Ανάπτυξη των Καρπών

Τα καροτενοειδή αποτελούν τις κύριες χρωστικές στα περισσότερα φρούτα, προσδίδοντας χρώματα που κυμαίνονται από κίτρινο και ροζ έως βαθύ πορτοκαλί και κόκκινο. Το βρώσιμο τμήμα των φρούτων και τα παραγόμενα από αυτά προϊόντα καταναλώνεται ευρέως και αποτελούν σημαντικές πηγές τροφής για τους ανθρώπους και τα ζώα. Έτσι, οι χρωστικές αυτές αποτελούν κρίσιμες χημικές ενώσεις που συμβάλλουν αφενός στην αισθητική και τη διατροφική ποιότητα των φρούτων, και αφετέρου προσφέρουν προστατευτικές και οικοφυσιολογικές λειτουργίες για τα έγχρωμα φρούτα.

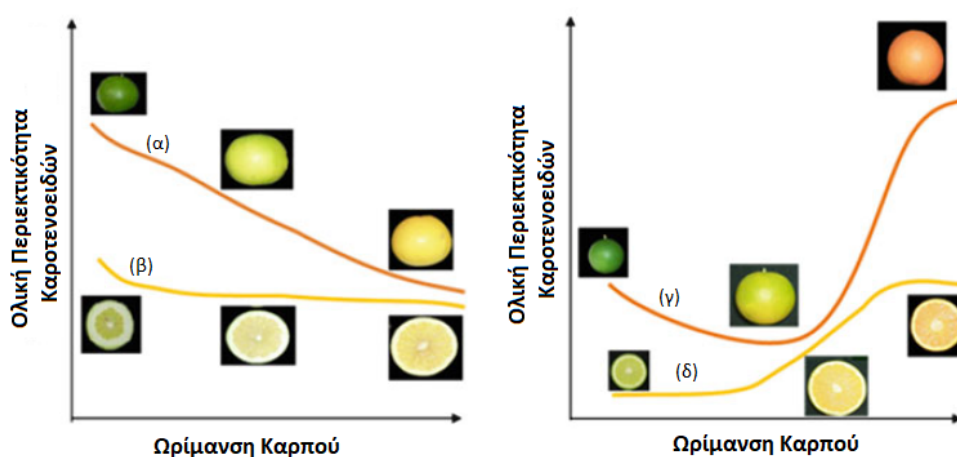
Η ρύθμιση των καροτενοειδών στους καρπούς είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, εξαιτίας των μεγάλων μεταβολών στο περιεχόμενο τους, αλλά και στη σύνθεσή τους κατά το στάδιο της ωρίμανσης των φρούτων. Οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται από τον ιστό και το στάδιο ανάπτυξης. Επιπλέον, η συσσώρευση καροτενοειδών είναι μια δυναμική διαδικασία που σχετίζεται με την ανάπτυξη των χρωμοπλαστών κατά την ωρίμανση. Όμως, είναι γενικός κανόνας ότι η συσσώρευση καροτενοειδών ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό κατά το μεταγραφικό επίπεδο των δομικών και βοηθητικών πρωτεϊνών των βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών οδών, και σε μικρότερη έκταση μέσω άλλων μηχανισμών, όπως οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες έχουν πρόσφατα αποκαλυφθεί ως κρίσιμοι παράγοντες για τον προσδιορισμό των επιπέδων και της σταθερότητάς τους.

Στους καρπούς απαντώνται ειδικές ισομορφές των βασικών ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση καροτενοειδών, όπως η συνθετάση του φυτοενίου, οι β-κυκλάσες του λυκοπενίου, οι διοξυγενάσες αποκοπής των καταβολικών καροτενοειδών κλπ. Έτσι, είναι δυνατή η ανεξάρτητη ρύθμιση της οδού στους ιστούς των φρούτων. Εκτός από τα βασικά γονίδια για τη σύνθεση των καροτενοειδών, οι μεταβολές στη συσσώρευσή τους θα μπορούσαν να επηρεαστούν άμεσα και από διαφορές στην έκφραση των γονιδίων ή την πρωτεϊνική δραστηριότητα στην οδό των καροτενοειδικών προδρόμων (Lado *et al.* 2016).

Το ενδιαφέρον για την έρευνα σχετικά με την περιεκτικότητα των καροτενοειδών στα φρούτα ενισχύθηκε ραγδαία εξαιτίας των διατροφικών ωφελειών τους στην υγεία και το ενδιαφέρον για τη χρήση τους ως απαραίτητα συστατικά της διατροφής (Berman *et al.* 2015). Όπως και σε άλλα φυτικά όργανα, έτσι και στους καρπούς, η περιεκτικότητα των καροτενοειδών επηρεάζεται άμεσα από το στάδιο ανάπτυξης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στο πρώιμο ή πράσινο στάδιο ανάπτυξης, η σύνθεση των καροτενοειδών εντοπίζεται στους ιστούς που περιέχουν χλωροπλάστες, με κύριο αντιπρόσωπο τη λουτεΐνη, ακολουθούμενη από τα β-καροτένιο, βιολαξανθίνη και νεοξανθίνη, και σε μικρότερο ποσοστό άλλα καροτενοειδή, όπως η ζεαξανθίνη και η ανθεραξανθίνη (Lado *et al.* 2016).

Το χαρακτηριστικό αυτό προφίλ των καροτενοειδών είναι παρόμοιο σε φρούτα που διαφέρουν χρωματικά ή ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Αρχικά, τα καροτενοειδή καλύπτονται από τη χλωροφύλλη. Όμως, καθώς εξελίσσεται η ωρίμανση των καρπών ανιχνεύονται αξιοσημείωτες ποιοτικές, αλλά και ποσοτικές διαφορές στα καροτενοειδή μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Είναι ενδιαφέρον ότι η περιεκτικότητα των

καροτενοειδών στα φρούτα μπορεί να διαφέρει ακόμα και στον φλοιό σε σχέση με την σάρκα του καρπού, με μεγαλύτερες, συνήθως, ποσότητες στο φλοιό. Για παράδειγμα, στα εσπεριδοειδή συσσωρεύονται περίπου 5-10 φορές περισσότερα καροτενοειδή στον φλοιό σε σύγκριση με τον πολτό (Alquézar *et al.* 2008), ενώ στα κόκκινα μούσμουλα το περιεχόμενο τους είναι από 5 έως και 70 φορές υψηλότερο στο φλοιό σε σχέση με τον πολτό (Fu *et al.* 2012). Αυτή η διαφορά της περιεκτικότητας των καροτενοειδών μεταξύ των διαφορετικών ιστών ενός φρούτου δείχνει ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης της βιοσύνθεσης τους, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο αποθηκεύονται στους ιστούς διαφέρει σημαντικά και πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες για τη διερεύνηση της διαδικασίας αυτής.



Εικόνα 1 Εξέλιξη της συνολικής περιεκτικότητας των καροτενοειδών σε διαφορετικούς ιστούς και είδη φρούτων κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Στο πρώτο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μεταβολές στη συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών σε φλοιό (α) και πολτό (β) λευκού γκρέιπφρουτ, ενώ στο δεύτερο, οι μεταβολές στη συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών σε φλοιό (γ) και πολτό (δ) γλυκού πορτοκαλιού (Lado *et al.* 2016).

Η λειτουργία των καροτενοειδών στους πράσινους ιστούς έχει περιγραφεί σε μεγάλο βαθμό, επειδή είναι απαραίτητες για τη φωτοσύνθεση. Στους χλωροπλάστες, οι λειτουργίες των καροτενοειδών επικεντρώνονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες, μια περιοχή έντονης βιοσυσσώρευσής τους (Nogueira *et al.* 2013). Τα κύτταρα του φλοιού των πράσινων καρπών περιέχουν ενεργούς φωτοσυνθετικούς χλωροπλάστες και η παρουσία των καροτενοειδών είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του φωτός, αφού ρυθμίζουν την αποτελεσματικότητα του φωτοσυστήματος II, λειτουργώντας ως βοηθητικές χρωστικές ή/και φωτοπροστατευτικές ενώσεις (Ma *et al.* 2003; Holleboom *et al.* 2013).

Οι λειτουργίες των καροτενοειδών σε χρωματισμένα (μη πράσινα) φρούτα έχουν διερευνηθεί σε μικρότερο βαθμό, παρότι παίζουν σημαντικό οικοφυσιολογικό ρόλο προσελκύοντας φυτοφάγους οργανισμούς που μπορούν να διασκορπίσουν τους σπόρους του φυτού. Επίσης, τα καροτενοειδή στα φρούτα εκτελούν και άλλες λειτουργίες, όπως η προστασία τους από τις επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η λειτουργία αυτή είναι λιγότερο μελετημένη και λαμβάνει χώρα μέσω της σταθεροποίησης των μεμβρανικών λιπιδίων η οποία με τη βοήθεια των καροτενοειδών ρυθμίζει τη ρευστότητά τους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Britton *et al.* 2004). Στο πλαίσιο αυτό, έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία του β-καροτενίου εντός των μεμβρανών ευνοεί το φυτό προσδίδοντας υψηλότερη ρευστότητα κατά τη διάρκεια των περιόδων με χαμηλή θερμοκρασία. Έτσι, προστατεύονται τα φρούτα από την ψυχρή καταπόνηση, ενώ οι ξανθοφύλλες που είναι προσανατολισμένες σχεδόν κάθετα προς την επιφάνεια της μεμβράνης συμβάλλουν στη χαμηλότερη ρευστότητα και υψηλότερη σταθερότητα, στις περιπτώσεις που ασκείται ελαφριά πίεση στον καρπό ή βρίσκεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Τέλος, τα καροτενοειδή δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά παρέχοντας προστασία στους καρπούς (Lado *et al.* 2016).

2.4. Ταξινομικά Συστήματα των Φρούτων με βάση την Περιεκτικότητά τους σε Καροτενοειδή

Το 2009 οι Britton και Khachik έθεσαν τα κριτήρια με βάση τα οποία είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατηγορίες τα φρούτα, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδή. Το κριτήριο διαχωρισμού των φρούτων σε κατηγορίες είναι η περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδή. Με βάση αυτό, τα καροτενοειδή κατατάσσονται σε:

- Χαμηλής περιεκτικότητας καροτενοειδών (0-1 $\mu\text{g/g}$ καρπού)
- Μέτριας περιεκτικότητας καροτενοειδών (1-5 $\mu\text{g/g}$ καρπού)
- Υψηλής περιεκτικότητας καροτενοειδών (5-20 $\mu\text{g/g}$ καρπού)
- Πολύ υψηλής περιεκτικότητας καροτενοειδών (πάνω από 20 $\mu\text{g/g}$ καρπού)

Ωστόσο, η μέτρηση της ολικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή δεν αποτελεί το μοναδικό κριτήριο ταξινόμησης των φρούτων, αφού το προφίλ των καροτενοειδών παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί οκτώ ταξονομικές κατηγορίες φρούτων με βάση τη σύνθεση των καροτενοειδών στο στάδιο της ωρίμανσής τους:

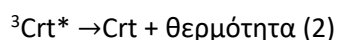
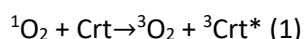
- Ομάδα I (Group I): Περιλαμβάνει φρούτα με ασήμαντες ποσότητες καροτενοειδών (π.χ. μπανάνα)
- Ομάδα II (Group II): Φρούτα με μοτίβο καροτενοειδών χλωροπλαστικού τύπου, δηλαδή όσα περιέχουν κυρίως λουτεΐνη, β -καροτένιο, βιολαξανθίνη και νεοξανθίνη (π.χ. ακτινίδιο, σταφύλι, πεπόνι)
- Ομάδα III (Group III): Φρούτα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες λυκοπενίου και συνοδεύονται από άλλα ακυκλικά πολυένια, όπως το φυτοένιο, το φυτοφλουένιο ή ζ -καροτένιο (π.χ. ντομάτα, καρπούζι)
- Ομάδα IV (Group IV): Φρούτα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες β -καροτενίου και υδροξυπαραγώγων του, όπως η β -κρυπτοξανθίνη και η ζεαξανθίνη (π.χ. μούσμουλο)
- Ομάδα V (Group V): Φρούτα με μέτριες προς μεγάλες ποσότητες εποξειδίων, όπως η βιολαξανθίνη, η αντεραξανθίνη και η λουτεοξανθίνη (π.χ. βερύκοκο)
- Ομάδα VI (Group VI): Φρούτα που περιέχουν μοναδικά καροτενοειδή, όπως η καψανθίνη (π.χ. κόκκινο πιπέρι)

- Ομάδα VII (Group VII): Φρούτα που περιέχουν πολύ-*cis*-καροτενοειδή (π.χ. μανταρίνι, πορτοκάλι, ανανάς)
- Ομάδα VIII (Group VIII): Φρούτα πλούσια σε αποκαροτενοειδή, όπως η β-σιτραουρίνη ή η 8-β-αποκαροτενάλη (π.χ. φλούδα μανταρινιού και του κόκκινου πιπεριού)

Οι παραπάνω κατηγορίες, μπορούν εύκολα να επικαλυφθούν ή να συγχωνευτούν μεταξύ τους και μελλοντικά να προταθεί μια περισσότερο απλοποιημένη ταξινόμηση σε σχέση με το προφίλ και το περιεχόμενο των καροτενοειδών (Lado *et al.* 2016).

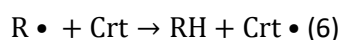
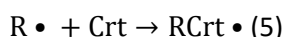
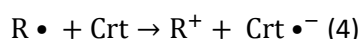
2.5. Τα Καροτενοειδή ως Αντιοξειδωτικά

Τα καροτενοειδή (Crt) συνιστούν μια κατηγορία πολύ ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών μορίων, λόγω των τριπλών ενεργειακών τους επιπέδων τα οποία είναι συγκρίσιμα με αυτά του $^1\text{O}_2$. Έτσι, ανήκουν στους πιο αποτελεσματικούς φυσικούς καταστολείς των $^1\text{O}_2$, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Η διαδικασία της απενεργοποίησης του $^1\text{O}_2$ έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική, ειδικά για τα καροτενοειδή που έχουν 11 συζευγμένους διπλούς δεσμούς. Γενικά, η απενεργοποίηση του $^1\text{O}_2$ βασίζεται στη μετατροπή της υπερβάλλουσας ενέργειας σε θερμότητα, μέσω του σχηματισμού ενός ενδιαμέσου του καροτενοειδούς με χαμηλότερη διεγερμένη τριπλή κατάσταση ($^3\text{Crt}^*$) (Εξισώσεις 1, 2). Οι πιθανές επιζήμιες επιδράσεις των διεγερμένων καροτενοειδών μπορεί να αγνοηθούν, κυρίως λόγω της χαμηλής ενέργειας και των μικρών χρόνων ζωής τους.



Επίσης, τα καροτενοειδή δρουν ως χημικοί καταστολείς του $^1\text{O}_2$, που υφίστανται τροποποιήσεις, όπως οξείδωση ή οξυγόνωση. Επιπλέον, απομακρύνουν αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες, παρέχοντας προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης σε φωτοσυνθετικούς, αλλά και μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Τρεις είναι οι βασικοί τύποι αντιδράσεων για τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών από τα καροτενοειδή:

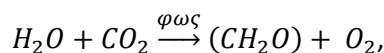
- i. μεταφορά ηλεκτρονίων από την ελευθέρη ρίζα ($R\bullet$) στο καροτενοειδές, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ριζικού κατιόντος ($Crt\bullet^+$) (Εξίσωση 3) ή ριζικού ανιόντος ($Crt\bullet^-$) (Εξίσωση 4)
- ii. σχηματισμός ριζικού προσαγωγού ($RCrt\bullet$) (Εξίσωση 5), και
- iii. μεταφορά ατόμων υδρογόνου, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μιας ουδέτερης ρίζας του καροτενοειδούς ($Crt\bullet$) (Εξίσωση 6)



Τα παραπάνω ριζικά προϊόντα των καροτενοειδών έχουν τη δυνατότητα να υποστούν περαιτέρω μετασχηματισμούς, οδηγώντας στη δημιουργία μιας ποικιλίας δευτερογενών καροτενοειδικών παραγώγων διαφορετικής δραστηριότητας. Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική λόγω του γεγονότος ότι τα νεοσύστατα προϊόντα των καροτενοειδών πλέον δεν είναι σε θέση να λειτουργούν ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά και πιθανά μετατρέπονται σε δυνητικά επιβλαβείς, προ-οξειδωτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι το Crt^{*+} , ένα από τα πλέον μελετημένα δραστικά παράγωγα των καροτενοειδών, λόγω των ισχυρών οξειδωτικών ιδιοτήτων του και της σχετικά μεγάλης διάρκειας ζωής του (τάξης των ms), είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια βιολογικής σημασίας, π.χ. τυροσίνη ή κυστεΐνη. Η *in vivo* αυτή οξείδωση των αμινοξέων μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμες δομικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να επηρεάσει σημαντικά την καλή λειτουργία τους (Fiedor and Burda 2014). Επιπλέον, η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τα καροτενοειδή αποδείχθηκε ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες (Polyakov 2001), οι οποίες μπορεί να τροποποιηθούν λόγω της παρουσίας αλάτων, όπως έχει αποδειχτεί για την ασταξανθίνη. Στην περίπτωση αυτή, μειώνεται η αντιοξειδωτική της ικανότητα καθώς μειώνεται το δυναμικό οξείδωσης. Τέλος, επηρεάζεται και η σταθερότητα των κατιοντικών της ριζών (Polyakov *et al.* 2010; Fiedor and Burda 2014).

2.6. Ο ρόλος των Καροτενοειδών στη Φωτοσύνθεση

Όλη η ελεύθερη ενέργεια που χρησιμοποιείται από τα βιολογικά συστήματα προκύπτει από την ηλιακή ενέργεια, η οποία δεσμεύεται κατά τη διεργασία της φωτοσύνθεσης. Παρότι η βασική εξίσωση της φωτοσύνθεσης είναι απλή:



(CH₂O): Συμβολίζει υδατάνθρακα, κυρίως σακχαρόζη και άμυλο

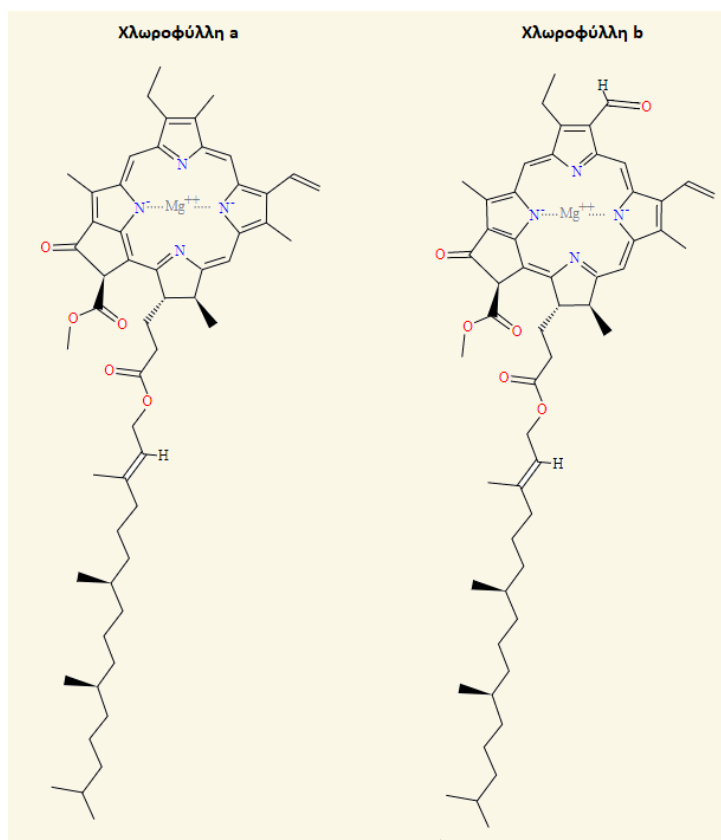
Εντούτοις ο μηχανισμός της είναι πολύπλοκος και εμπλέκει τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών και μικρών μορίων.

Η φωτοσύνθεση στα πράσινα φυτά πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, όπου η ενέργεια του φωτός συλλέγεται από τα μόρια των χρωστικών. Η κύρια χρωστική είναι η χλωροφύλλη α, όμως υπάρχουν και κάποιες επικουρικές χρωστικές που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή.

Ένα φωτοσυλλεκτικό σύστημα που θα βασιζόταν μόνο σε μόρια χλωροφύλλης θα ήταν μάλλον αναποτελεσματικό για δύο βασικούς λόγους: Α) τα μόρια χλωροφύλλης απορροφούν το φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, με αποτέλεσμα την ύπαρξη κενού στο μέσον του ορατού φάσματος (~450-650nm). Η περιοχή αυτή αποτελεί σχεδόν την κορυφή του ηλιακού φάσματος, επομένως η συλλογή του θα αποτελούσε χαμένη ενέργεια και Β) ακόμα και στις περιοχές του φάσματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες, πολλά φωτόνια θα διαπερνούσαν τους χλωροπλάστες χωρίς να απορροφούνται, λόγω της σχετικά χαμηλής πυκνότητας χλωροφύλλης στα κέντρα αντίδρασης. Έτσι, πλησίον αυτών των κέντρων εντοπίζονται επικουρικές χρωστικές, οι οποίες είναι είτε επιπρόσθετα μόρια χλωροφύλλης ή μόρια άλλων κατηγοριών. Οι χρωστικές αυτές απορροφούν το φως και το διοχετεύουν στο κέντρο της φωτοσυνθετικής αντίδρασης για να μετατραπεί σε χημική ενέργεια. Στο πλαίσιο αυτό, τα σημαντικότερα επικουρικά φωτοσυλλεκτικά μόρια είναι η χλωροφύλλη b και τα καροτενοειδή. Η χλωροφύλλη b διαφέρει από την a επειδή φέρει φορμυλομάδα στη θέση της μεθυλομάδας (Εικόνα 2). Η διαφορά αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των δύο κύριων κορυφών απορρόφησής της προς το κέντρο του ορατού φάσματος και την αποτελεσματική απορρόφηση του φωτός από τη χλωροφύλλη b σε μήκη κύματος μεταξύ 450-500nm (Εικόνα 3).

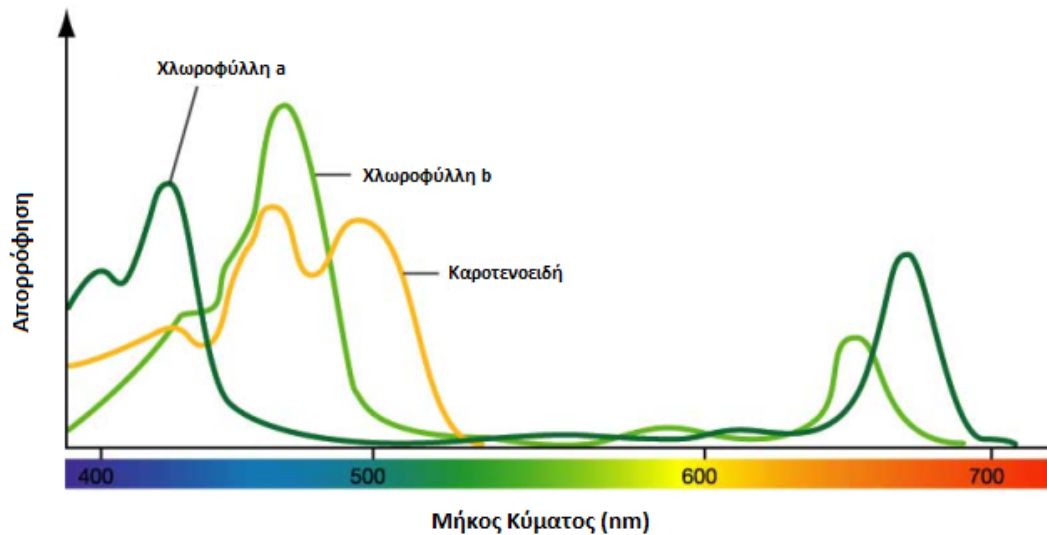
Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα καροτενοειδή απορροφούν το φως μεταξύ 400-500nm (Εικόνα 3) και είναι υπεύθυνα για τα κόκκινα και κίτρινα χρώματα των περισσότερων φρούτων και ανθέων, ενώ παρέχουν το χαρακτηριστικό καφέ-πορτοκαλί

χρώμα των φθινοπωρινών φύλλων, όταν αποικοδομούνται τα μόρια χλωροφύλλης και έτσι αποκαλύπτονται τα καροτενοειδή που εμπεριέχουν.

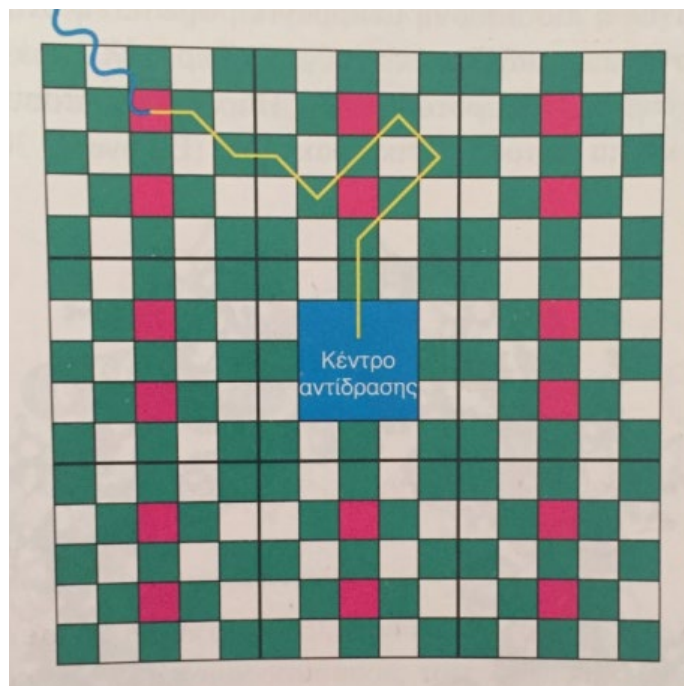


Εικόνα 2 Δομή των χλωροφυλλών α και β.

Εκτός από τον ρόλο τους στη μεταφορά ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης, τα καροτενοειδή λειτουργούν και ως μόρια προφύλαξης, αφού είναι σε θέση να καταστείλουν ποικίλες καταστρεπτικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το οξυγόνο και επάγονται από το έντονο ηλιακό φως. Πράγματι, τα φυτά που στερούνται καροτενοειδών νεκρώνονται πολύ γρήγορα μετά της έκθεσή τους στο φως και το οξυγόνο (Berg *et al.* 2004).



Εικόνα 3 Φάσμα απορρόφησης των καροτενοειδών και χλωροφυλλών a και b ("Photosynthesis Theory").



Εικόνα 4 Μεταφορά ενέργειας από τις επικουρικές χρωστικές στα κέντρα αντίδρασης. Η ενέργεια του φωτός που απορροφάται από τα επικουρικά μόρια χλωροφύλλης ή από άλλες χρωστικές μπορεί να μεταφερθεί σε κέντρα αντίδρασης, όπου ωθεί τον φωτοεπαγόμενο διαχωρισμό φορτίου. Τα πράσινα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τα επικουρικά μόρια χλωροφύλλης, ενώ τα κόκκινα τετράγωνα μόρια καροτενοειδών. Τα άσπρα δείχνουν πρωτεΐνη (Berg *et al.* 2004, σελ 609).

2.7. Προσδιορισμός των Καροτενοειδών

Το έντονο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα καροτενοειδή για εφαρμογές σε ποικίλες χρήσεις οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό τους. Με δεδομένο ότι τα κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καροτενοειδών είναι η λιπόφιλη τους φύση και οι πολυενικές αλυσίδες που εμπεριέχουν, ως ένα επίμηκες σύστημα εναλλασσόμενων διπλών και απλών δεσμών, το οποίο απορροφά στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (400-500 nm) (Britton 1995), έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από ποιοτικές και ποσοτικές μεθόδους για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών.

Η εκτίμηση της ολικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή (Total Carotenoid Content, TCC) είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται ως μια αρχική αξιολόγηση της παρουσίας τους, κυρίως όταν θα πρέπει να αξιολογηθεί ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων (Kimura *et al.* 2007). Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι υπολογισμού των καροτενοειδών με συνηθέστερη αυτήν που μετρά την απορρόφηση στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης τους. Οι υπόλοιπες αναλυτικές μέθοδοι αναφέρονται στη χρήση της Φασματοσκοπίας Αντικειμενικής Υπέρυθρης Αντανάκλασης (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) (Brenna and Berardo 2004; Aman *et al.* 2005; Bonierbale *et al.* 2009), σε φωτοθερμικά φαινόμενα και χρήση για τον προσδιορισμό καροτενοειδών σε τρόφιμα (Bicanic 2011), και στη φωτοακουστική φασματοσκοπία λέιζερ (PhotoAcoustic Spectroscopy, PAS) με τη χρήση της UV-Vis φασματοσκοπίας ως μεθόδου αναφοράς (Luterotti *et al.* 2011).

Η ποσοτική ανάλυση των καροτενοειδών βασίζεται στο χρωματογραφικό τους διαχωρισμό και αναγνώριση και τον εν συνεχεία ποσοτικό υπολογισμό της σύστασής τους. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα στάδια της προετοιμασίας του αναλυτικού δείγματος, της εκχύλισης, της ενδεχόμενης σαπωνοποίησης και φυσικά της ποσοτικοποίησης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.

Η πιο συνηθισμένη αναλυτική τεχνική είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με τη χρήση ανιχνευτών απορρόφησης υπεριώδους. Βασικό μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι λόγω των παρόμοιων δομών των καροτενοειδών, συνεκλούνται ποικίλες συναφείς ενώσεις με πανομοιότυπα UV-Vis φάσματα. Ένα επιπλέον μειονέκτημα είναι το κόστος των προτύπων καροτενοειδών που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης και τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των καροτενοειδών στα δείγματα. Τα πρότυπα αυτά

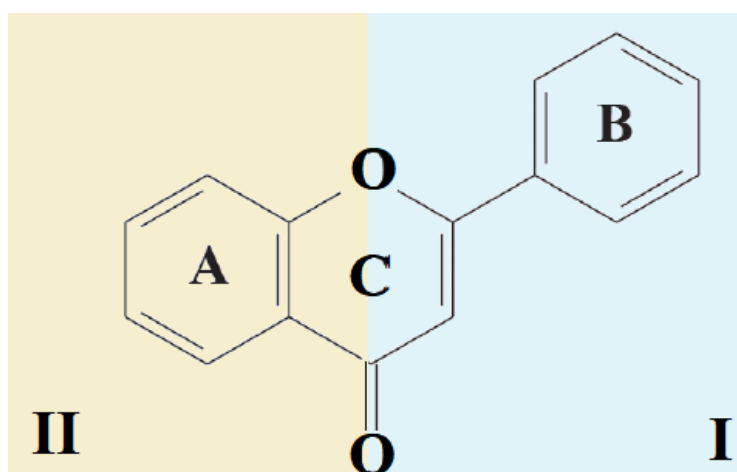
είναι δαπανηρά, ασταθή και μερικές φορές χαμηλής καθαρότητας ή μη διαθέσιμα στην αγορά. Έτσι, όπου είναι εφικτό προτιμάται η απομόνωσή τους και στην συνέχεια η χρήση τους ως προτύπων (Giuffrida *et al.* 2007). Ωστόσο, οι εξελίξεις στην τεχνολογία των χρωματογραφικών στηλών και του εξοπλισμού χρωματογραφίας έχουν οδηγήσει στην υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC), μια τεχνική με αρκετά προτερήματα, όπως οι ταχύτερες αναλύσεις και η υψηλότερη ευαισθησία (Rivera and Canela-Garayoa 2012). Επιπλέον, εκτιμάται ότι η UHPLC, συνήθως, εξοικονομεί τουλάχιστον το 80% της κινητής φάσης σε σύγκριση με την HPLC (Chen and Kord 2009). Παρ' όλα αυτά, είναι δύσκολη η προετοιμασία του δείγματος, η αντιπροσωπευτικότητά του και η εγγύηση των αναλύσεων λόγω των μικροποσοτήτων του αναλυτικού δείγματος.

Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και ορισμένες άλλες τεχνικές και μέθοδοι, όπως των Herrero-Martinez *et al.*, οι οποίοι, το 2016, ανέπτυξαν μέθοδο διαχωρισμού και προσδιορισμού για το β-καροτένιο, το λυκοπένιο και τη λουτεΐνη σε λαχανικά με τη χρήση τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας (Capillary Electrochromatography) (Herrero-Martínez *et al.* 2006). Επίσης, οι Berger *et al.* το 2013 χρησιμοποίησαν την υπερ-κρίσιμη υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography, UHPSFC) για να προσδιορίσουν τα καροτενοειδή της ελαιορητίνης (oleoresin) της πάπρικας (Berger and Berger 2013).

Ωστόσο, ακόμα και σήμερα η HPLC αποτελεί την πλέον συνηθισμένη χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών σε συνδυασμό είτε με ανιχνευτή απορρόφησης είτε με ανιχνευτή μάζας, ενώ η UHPLC αναφέρεται ως μια πιο βελτιωμένη εκδοχή της. Όσον αφορά το υλικό που χρησιμοποιείται για τους χρωματογραφικούς αυτούς διαχωρισμούς, η πλέον δημοφιλής μέθοδος είναι της ανάστροφης φάσης με τη χρήση στηλών με C30 ή C18 (Rivera and Canela-Garayoa 2012).

3. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία από τις κυριότερες κατηγορίες των δευτερογενών μεταβολιτών, με ευρύτατη διασπορά στο φυτικό βασίλειο. Συνολικά έχουν καταγραφεί περίπου 10.000 φλαβονοειδή, με αποτέλεσμα να αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα φυσικών προϊόντων, μετά τα αλκαλοειδή (12.000) και τα τερπενοειδή (30.000) (Dixon and Pasinetti 2010; Martens *et al.* 2010; Santos *et al.* 2017). Τα φλαβονοειδή συνιστούν μια κατηγορία πολυφαινολικών χημικών ενώσεων που αφθονούν στα σπερματόφυτα και σε άλλα ταξινομικά είδη, όπως τα βρυόφυτα, τα πτεριδόφυτα και τα άλγη. Εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία δομών με ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, ενώ χρησιμεύουν και ως χημειοταξινομικοί δείκτες (Santos *et al.* 2017).

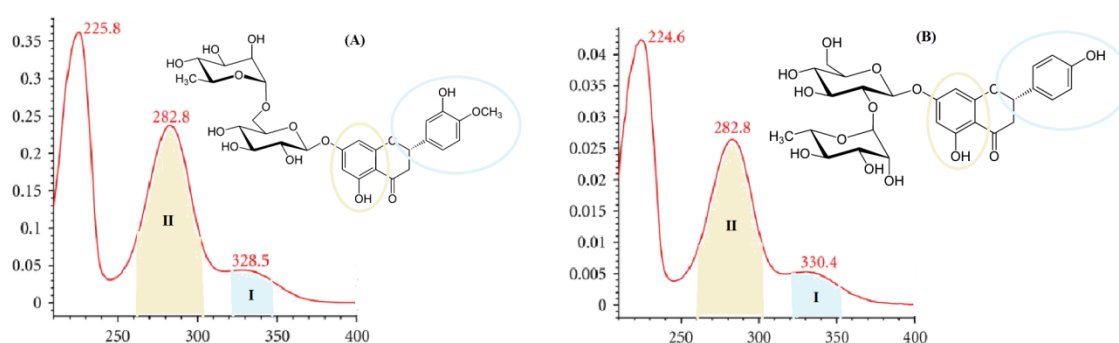


Εικόνα 5 Απεικόνιση των δύο ζωνών απορρόφησης των φλαβονοειδών. Η ζώνη II, που είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας του βενζοϋλικού συστήματος του δακτυλίου A και απορροφά σε μήκη κύματος 240-285 nm. Η ζώνη I είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης του κινναμοϋλικού συστήματος του δακτυλίου B που απορροφά στην περιοχή 300-400 nm (Santos *et al.* 2017).

Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Αποτελείται από δύο κύριους δακτυλίους, τον A και B, και το δακτύλιο C, ο οποίος σχηματίζεται τελευταίος κατά την βιοσύνθεση ορισμένων ειδών των φλαβονοειδών (π.χ. φλαβόνες). Από χημική άποψη, οι δομές των φλαβονοειδών ποικίλουν ανάλογα με τις υδροξυλομάδες και το βαθμό μεθυλίωσής τους, τον τρόπο σύζευξης των

αρωματικών δακτυλίων, τις γλυκοσιδικές ομάδες και την ενδεχόμενη παρουσία υποκαταστατών. Τα φλαβονοειδή περιέχουν συζευγμένους διπλούς δεσμούς και χαρακτηριστικές ομάδες (π.χ. OH ή και άλλους υποκαταστάτες), που είναι σε θέση μέσω συντονισμού να δώσουν ηλεκτρόνια και να σταθεροποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες (Santos *et al.* 2017).

Μελέτες σε φλαβονοειδή με φασματοσκοπία UV έδειξαν ότι τα περισσότερα από αυτά παρουσιάζουν δύο κύρια μέγιστα απορρόφησης: Τη ζώνη II (240-285 nm) που αντιστοιχεί στο βενζοϋλικό σύστημα του Α δακτυλίου και τη ζώνη I (300-400 nm), που αντιπροσωπεύει το κινναμοϋλικό σύστημα του δακτυλίου Β (Εικόνα 5 και 6). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και οι λειτουργικές ομάδες που συνδέονται με τον σκελετό των φλαβονοειδών μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση στην απορρόφηση (Havsteen 2002).

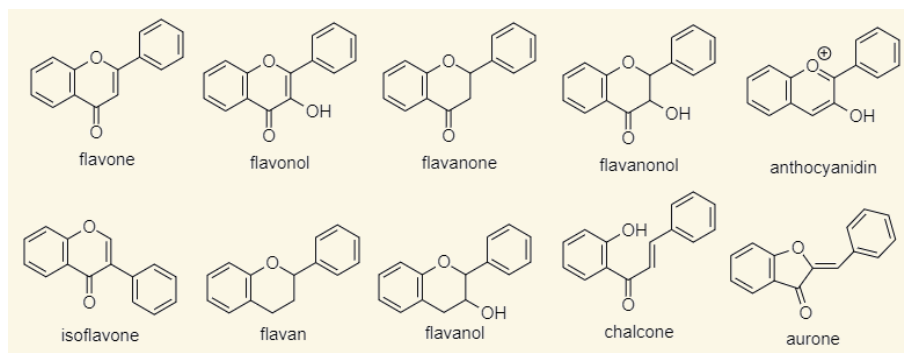


Εικόνα 6 Φάσματα απορρόφησης (Α) Εσπεριδίνης (Hesperidin), (Β) Ναρινγίνης (Naringin) (Fan *et al.* 2012).

Ο ρόλος ύπαρξης των φλαβονοειδών διαφέρει σημαντικά, ανάλογα με το φυτικό είδος. Ανάλογα με την περίπτωση έχουν προσδιοριστεί φλαβονοειδή που προστατεύουν τα φυτά από παράσιτα, φυτοφάγα ζώα, παθογόνους μικροοργανισμούς και την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Dixon and Pasinetti 2010). Επίσης, έχουν αναφερθεί φλαβονοειδή που δρουν ως συμβιωτικοί παράγοντες με αλληλοχημική, αντιμικροβιακή ή/και θεραπευτική δράση (Dixon and Pasinetti 2010; Harborne and Williams 2000). Ένας επιπλέον σημαντικός ρόλος των φλαβονοειδών είναι ότι αναγνωρίζονται από τους επικονιαστές (έντομα, πουλιά και ζώα), συμβάλλοντας στη γονιμοποίηση των φυτικών οργανισμών (Havsteen 2002).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που αναδεικνύουν τις σημαντικές βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις των φλαβονοειδών. Έτσι, έχει προκληθεί ένα

σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη των μορίων αυτών, κυρίως ως προς τις παρακάτω δράσεις: αντιοξειδωτική, κυτταροτοξική, αντικαρκινική, αντιική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδης, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, νευροπροστατευτική και ανθελονοσιακή (Santos *et al.* 2017).



Εικόνα 7 Δομές ορισμένων κατηγοριών φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή βιοσυντίθενται μέσω της οδού των φαινυλοπροπανοειδών, η οποία αποτελεί κοινό μονοπάτι της βιοσύνθεσης και των τανινών, των λιγνινών, των στυλβενίων και των κουμαρινών. Κοινός πρόδρομος της βιοσύνθεσης όλων των μορίων αυτών είναι το μόριο της φαινυλαλανίνης, με την αμμωνιαλυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) να αποτελεί το πρώτο ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση συμβάλλοντας στη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε κινναμωμικό οξύ (Winkel-Shirley 2001).

Παρότι το βασικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών (Σχήμα 5) είναι πανομοιότυπο για όλα τα φυτά, ανάλογα με το είδος του φυτού επενεργούν ένζυμα, τα οποία τροποποιούν το βασικό σκελετό των φλαβονοειδών οδηγώντας στη σύνθεση των διαφορετικών κατηγοριών τους (Martens *et al.* 2010; Mierziak *et al.* 2014).

Στους οργανισμούς, η παρουσία των φλαβονοειδών είναι είτε υπό τη μορφή γλυκοσίδη (μορφή συζευγμένη με σάκχαρα) ή ως απλό (άγλυκο) μόριο (Santos *et al.* 2017). Στα φυτά, η πλειονότητα των φλαβονοειδών βρίσκεται υπό τη μορφή γλυκοσίδη (Martens *et al.* 2010; Santos *et al.* 2017), με το γλυκοσιδικό δεσμό να σχηματίζεται στις θέσεις 3 ή 7 με υδατάνθρακες όπως η L-ραμνόζη, η D-γλυκόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη ή ο δισαχαρίτης ραμνόζη-γλυκόζη (Σχήμα 6) (Martens *et al.* 2010; Havsteen 2002). Παράλληλα, είναι συχνή η παρουσία και υδροξυλιωμένων παραγώγων των φλαβονοειδών στις θέσεις 3, 5, 7, 3', 4' και 5'. Σε πολλά από τα παράγωγα αυτά οι υδροξυλομάδες είναι υπό τη μορφή μεθυλο, ακετυλο ή θείο παραγώγων. Η πρενυλίωση

μετρήσεων που βασίζονται στην αντίδραση του φλαβονοειδούς με ένα αντιδραστήριο που οδηγεί στο σχηματισμό εγχρώμου προϊόντος. Πολύ συχνά, όμως, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του κάθε φλαβονοειδούς που περιέχεται στο δείγμα ανάλυσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη μία μέθοδος διαχωρισμού των αναλυτών-στόχων, που συνήθως είναι μια χρωματογραφική μέθοδος (π.χ. CE, TLC, LC (Corradini *et al.* 2011)), την οποία θα ακολουθεί μία μέθοδος ανίχνευσής τους, π.χ. μέσω φασματοφωτόμετρου υπεριώδους ακτινοβολίας UV (ή UV-DAD), όπου οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοσίδες τους, συνήθως, ανιχνεύονται σε μήκος κύματος 270 nm και 360-370 nm, άλλα έχει χρησιμοποιηθεί και η ανίχνευση στα 280 nm και 350 nm. Οι ισοφλαβόνες μπορούν να ποσοτικοποιηθούν αποτελεσματικά στα 236 nm, 260 nm και 280 nm, οι ανθοκυανίνες απορροφούν περίπου στα 510-520 nm, ενώ οι φλαβαν-3-ολες στα 280 nm. Ένα άλλο παράδειγμα ανίχνευσής αποτελεί η φασματομετρία μάζας με εφαρμογή, κυρίως, ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), και αρνητικού ιονισμού (negative-ion, NI), καθώς τα περισσότερα φλαβονοειδή παρέχουν καλύτερη ευαισθησία σε αυτόν, με εξαίρεση τις ανθοκυανιδίνες, για τις οποίες ο θετικός (positive-ion, PI) ιοντισμός παρέχει καλύτερη απόκριση (Corradini *et al.* 2011). Η επιλογή αυτών των μεθόδων εξαρτάται από την ευαισθησία που απαιτείται για την ανάλυση και την πολυπλοκότητα της βιολογικής μήτρας, που σχετίζεται με την προεπεξεργασία του δείγματος.

Η προεπεξεργασία του δείγματος, συνήθως, αναφέρεται στον τρόπο εκχύλισής του. Σημαντικό εδώ, είναι το ποιοι αναλύτες θα προσδιοριστούν, δηλαδή αν θα προσδιοριστούν τα φλαβονοειδή στην άγλυκη ή στην συζευγμένη με σάκχαρο μορφή τους. Στην πρώτη περίπτωση, θα πρέπει να γίνει υδρόλυση των γλυκοσιδικών φλαβονοειδών, η οποία πραγματοποιείται είτε με ενζυματικές είτε με χημικές επεξεργασίες. Για την εκχύλιση των φλαβονοειδών χρησιμοποιούνται πολικοί διαλύτες (Santos *et al.* 2017).

3.1. Παρουσία των φλαβονοειδών στα φρούτα

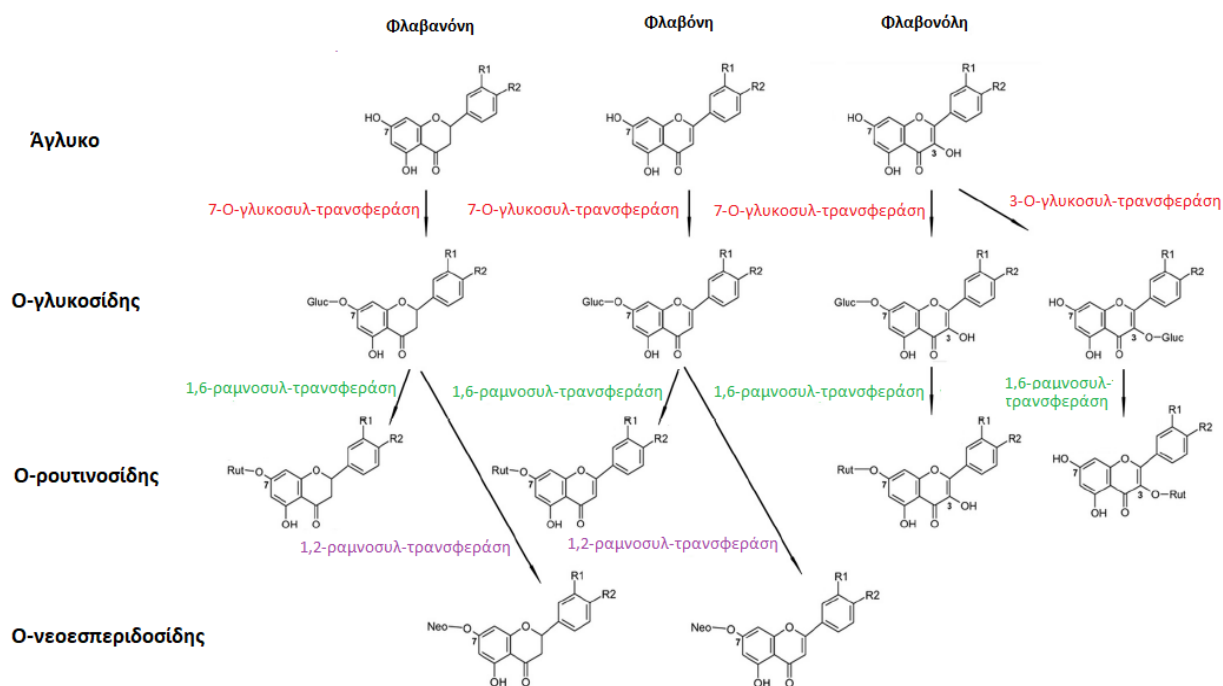
Σε έρευνες που έγιναν για την ανίχνευση της παρουσίας των φλαβονοειδών σε διάφορους καρπούς φρούτων, όπως γκρέιπφρουτ, ακτινίδιο, σταφύλι κλπ, παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητά τους είναι υψηλότερη στους φλοιούς, επειδή η σύνθεσή τους διεγείρεται από την έκθεσή τους στο φως (Duda-Chodak 2007; Ignat *et al.* 2011; Barros *et al.* 2012). Η σύνθεση των φλαβονοειδών σε καρπούς της οικογένειας

των κιτρωδών (*Citrus*) έχει προσδιοριστεί ότι ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη γενετική προέλευση του καρπού, την περίοδο συλλογής του (εποχικότητα), αλλά και το τμήμα του (φλοιός και βρώσιμο τμήμα) (Mansour 2019, Vanamala *et al.* 2006). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ τα φλαβονοειδή αφθονούν στο φυτικό βασίλειο, η παρουσία ορισμένων εξ αυτών είναι συχνή στα εσπεριδοειδή και σχετικά σπάνια στα άλλα φυτά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρησιμοποίηση ορισμένων φλαβονονών ως δεικτών για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών του πορτοκαλιού (Mansour 2019).

Τα εσπεριδοειδή είναι γνωστό ότι εμπεριέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, κυρίως υπό τη μορφή των γλυκοσιδών τους. Οι κύριοι γλυκοσίδες των φλαβονοειδών στα πορτοκάλια και τα μανταρίνια είναι η εσπεριδίνη και η ναριρουτίνη (Albertini *et al.* 2006). Η βιοσυνθετική οδός για τη γλυκοσιδίωση των φλαβονοειδών έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τα *Citrus*, με αποτέλεσμα να έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτά-μοντέλα τα περισσότερα από τα δομικά γονίδια που κωδικοποιούν τα κύρια ένζυμα (Tanaka *et al.* 2008).

Οι περισσότεροι γλυκοσίδες των φλαβονοειδών στα εσπεριδοειδή είναι υπό τη μορφή Ο-γλυκοσιδών, στις οποίες το σάκχαρο έχει συνδεθεί με το φλαβονοειδές (άγλυκο) μέσω δεσμού με το οξυγόνο. Οι συνηθέστεροι σακχαρίτες που συμμετέχουν στα παράγωγα αυτά είναι οι δισακχαρίτες ραμνοσυλ-α-1,2-γλυκόζη (νεοεσπερίδοση) και ραμνοσυλ-α-1,6-γλυκόζη (ρουτινόση). Αντίθετα, η παρουσία των C-γλυκοσιδιωμένων φλαβονοειδών στα είδη *Citrus* κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Αυτά σχηματίζονται μέσω δεσμού C-C μεταξύ του ανωμερικού άνθρακα του σακχάρου με τον άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου του φλαβονοειδούς στους καρπούς και τα φύλλα τους.

Η μετατροπή των άγλυκων των φλαβονοειδών σε Ο-ρουτινοσίδες ή Ο-νεοεσπεριδοσίδες στα εσπεριδοειδή πραγματοποιείται μέσω δύο αντιδράσεων γλυκοσιδίωσης και τη βοήθεια των γλυκοτρανσφερασών (UGTs) (Σχήμα 6) (X. Liu *et al.* 2018).

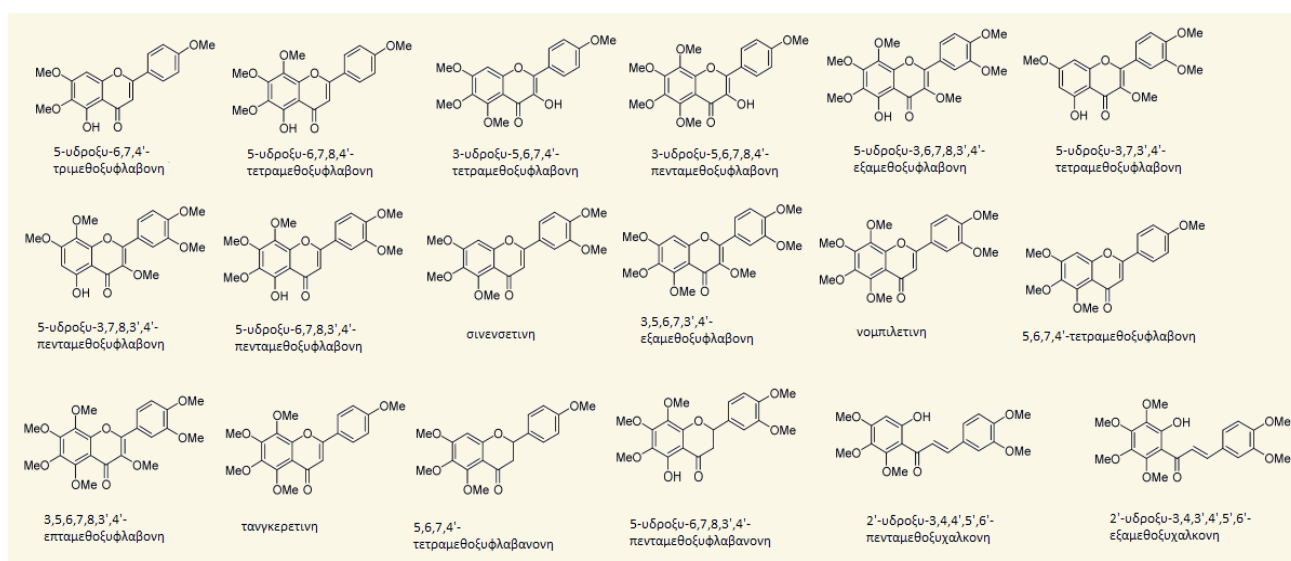


Σχήμα 6 Αντιδράσεις παραγωγής γλυκοσιδών στα εσπεριδοειδή (Liu *et al.* 2018).

Στους καρπούς *Citrus*, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυμεθοξυφλαβόνες (polymethoxyflavones, PMFs), οι οποίες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως αντικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.ά. ιδιότητες. Έχει διαπιστωθεί ότι αναστέλουν την έκφραση του παράγοντα R νέκρωσης όγκου (TNFR), και ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των μυελοειδών λευχαιμικών κυττάρων. Επιπλέον, καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ενώ προάγουν την απόπτωση και μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Επίσης, μπορούν να καταστέλλουν τις αιμορραγικές βλάβες που προκαλούνται από αιθανόλη ενώ προάγουν την έκκριση χλωρίου από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου κ.ά. Λόγω της υδρόφοβης φύσης των μεθοξυ ομάδων σε σύγκριση με τις υδροξυλομάδες, οι PMFs είναι περισσότερο λιπόφιλα μόρια σε σύγκριση με τα πολυυδροξυλιωμένα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η ναριγενίνη κ.ά. και έτσι απορροφώνται καλύτερα στο σύστημα κυκλοφορίας του αίματος του ανθρώπινου σώματος.

Οι PMFs υπάρχουν σχεδόν αποκλειστικά στο γένος *Citrus*, και έχουν εντοπιστεί κυρίως στο φλοιό των γλυκών πορτοκαλιών (*C. sinensis*) και των μανταρινιών (*C. reticulata*). Έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί αρκετοί τύποι PMF από διαφορετικούς ιστούς εσπεριδοειδών και έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζεται μια ποικιλία αυτών των

τύπων χημικών ενώσεων που διαφέρει ανάλογα με το είδος *Citrus*, κάτι που μπορεί να εξυπηρετήσει και ταξονομικούς σκοπούς (S. Li, *et al.* 2006).



Εικόνα 8 Υδροξυλιωμένες PMFs, PMFs, πολυμεθοξυφλαβόνες και πολυμεθοξυχαλκόνες που έχουν απομονωθεί από το φλοιό γλυκού πορτοκαλιού (S. Li, *et al.* 2006).

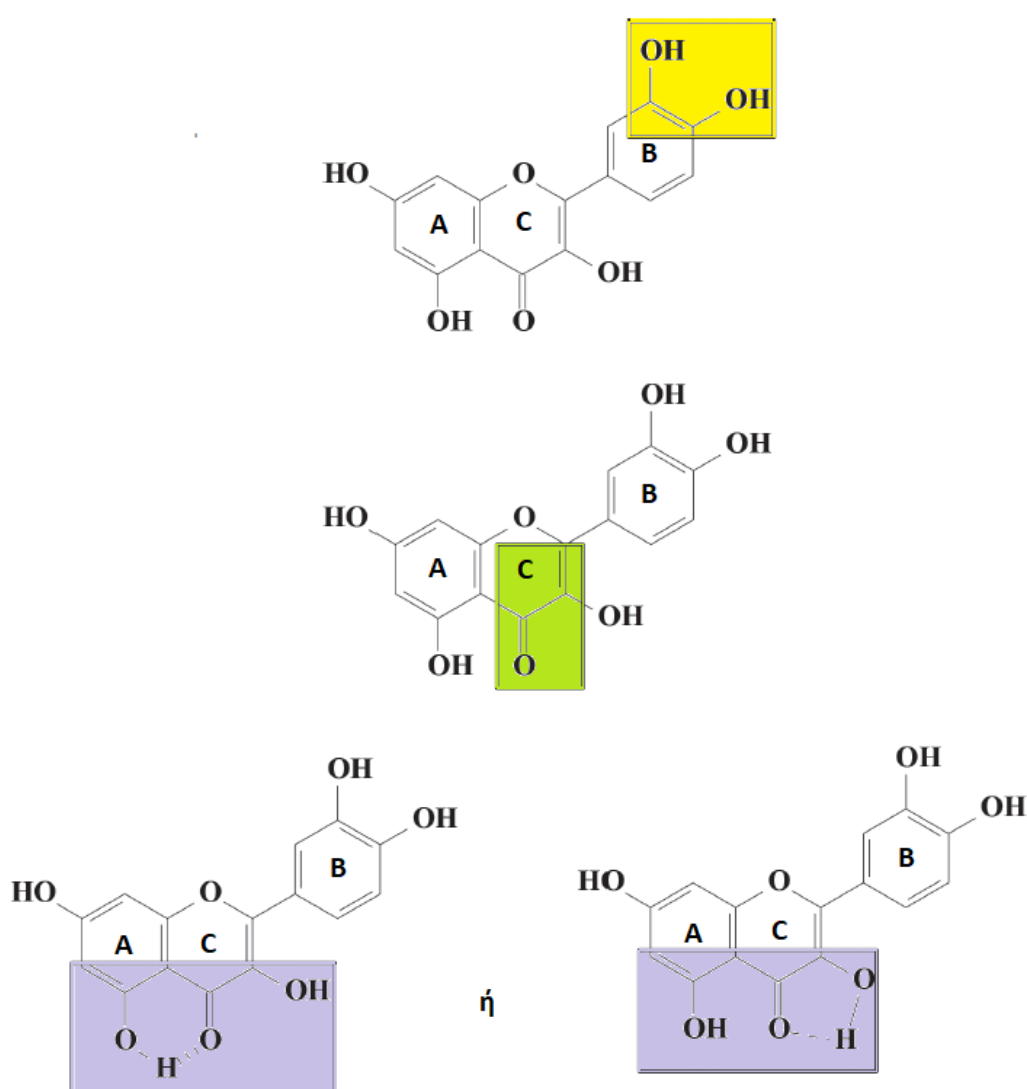
3.2. Τα Φλαβονοειδή ως Αντιοξειδωτικά

Τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, δηλαδή δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, αφού προέρχονται από τα φυτά και προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής (Santos *et al.* 2017). Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αντιοξειδωτική δράση μπορούν να καθοριστούν ως τρεις θεμελιώδεις παράγοντες:

1. μία δομή, η 3',4'-διυδροξυ (κατεχόλη) στον δακτύλιο B, η οποία ευνοεί την μετακίνηση των ηλεκτρονίων (Εικόνα 10, κίτρινο),
2. ένας ακόρεστος 2-3 δεσμός σε σύζευξη με μια 4-κετο ομάδα, ο οποίος συμβάλλει στη μετακίνηση των ηλεκτρονίων από τον δακτύλιο B (Εικόνα 10, πράσινο) και
3. οι ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 3 και 5, οι οποίες σχηματίζουν την ενδομοριακή σύνδεση υδρογόνου με την κετο-ομάδα (Εικόνα 10, μωβ).

Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν στην αυξημένη δέσμευση των ριζών, μέσω της μετακίνησης των ηλεκτρονίων ή της μεταφοράς του υδρογόνου (Croft 1998).

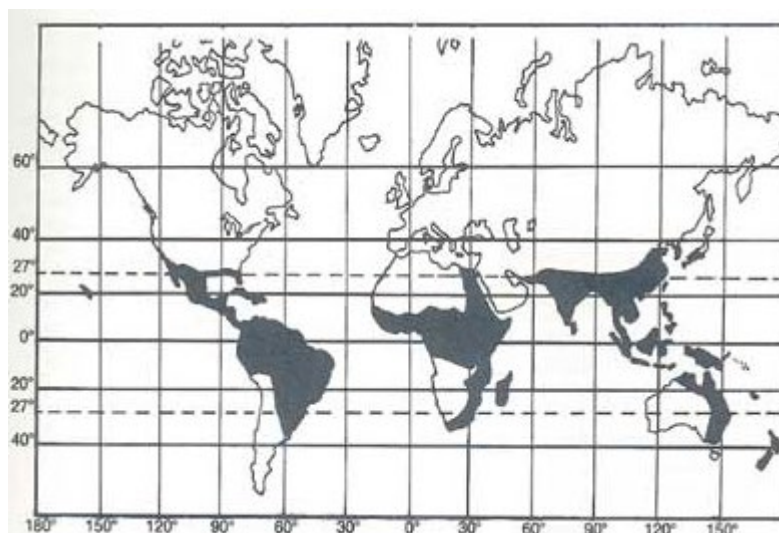
Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών εκφράζεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως η δέσμευση των ελευθέρων ριζών, η αδρανοποίηση των υπεροξειδίων και άλλων δραστικών ειδών οξυγόνου, η χηλίωση των μετάλλων και η απενεργοποίηση των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων (Santos *et al.* 2017). Η ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, η οποία σχετίζεται με τη δομή τους, συμβάλλει στην προστασία από το οξειδωτικό στρες, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων ή καρκίνων. Επίσης, επιβραδύνει τις διαδικασίες γήρανσης των κυττάρων, διαδικασίας που ευθύνεται για την πρόκληση εκφυλιστικών ασθενειών (Croft 1998; Santos *et al.* 2017).



Εικόνα 9 Οι δομικές ομάδες των φλαβονοειδών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες δραστικές ρίζες (Santos *et al.* 2017).

4. Εσπεριδοειδή

Μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες φρούτων στον κόσμο είναι τα εσπεριδοειδή (γένος *Citrus*, οικογένεια *Rutaceae*), τα οποία καλλιεργούνται σε δύο ζώνες στις δύο πλευρές του ισημερινού σε γεωγραφικά πλάτη από 20 έως 40 μοίρες (Εικόνα 11) (“CHAPTER 11: PRACTICAL ASPECTS OF CITRUS JUICE PROCESSING”).

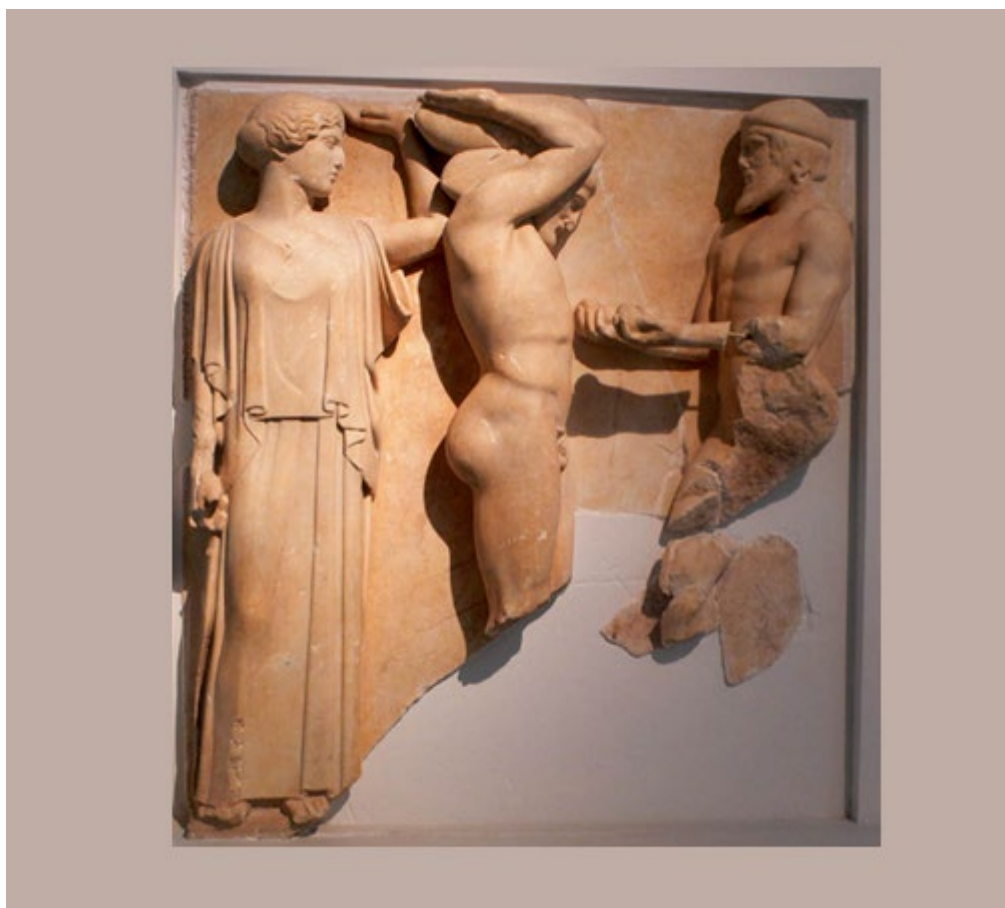


Εικόνα 10 Οι περιοχές παραγωγής των εσπεριδοειδών σε παγκόσμια κλίμακα (“CHAPTER 11: PRACTICAL ASPECTS OF CITRUS JUICE PROCESSING”).

Τα εσπεριδοειδή είναι χαμηλά και αειθαλή δέντρα που ευδοκιμούν σε τροπικές ή ημιτροπικές και εύκρατες χώρες. Το κλίμα που τα ευνοεί είναι το ζεστό, με κάποια υγρασία και το παραθαλάσσιο, ενώ τα καταστρέφει η απότομη και παρατεταμένη πτώση της θερμοκρασίας (“Φυτώριο Γιαντσάκη”). Τα φύλλα και τα άνθη τους ευωδιάζουν, ενώ οι καρποί τους είναι γευστικοί και ωφέλιμοι για την υγεία. Αρχικά, τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνταν μόνο σε Ινδία, Κίνα και Ιαπωνία, από όπου εξαπλώθηκαν σε όλες τις χώρες που έχουν κατάλληλο κλίμα και έδαφος, δηλ. δροσερό και αμμοαργιλώδες. Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια των εσπεριδοειδών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη, ιδίως στις παράλιες περιοχές και τα νησιά με αποτέλεσμα να αποτελούν σημαντικό εξαγωγίμο είδος. Μεγάλες φυτείες εσπεριδοειδών υπάρχουν σε Άρτα, Μαγνησία, Αργολίδα, Κορινθία, Εύβοια, νησιά του Αιγαίου κλπ (“OrangeDream”).

Στην αρχαία Ελλάδα δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές για τα εσπεριδοειδή, τα οποία ήταν γνωστά σε όσους ταξίδευαν σε μακρινούς τόπους. Κάπως έτσι,

δημιουργήθηκε και ο μύθος των Εσπερίδων, που δείχνει την επιθυμία των Ελλήνων να αποκτήσουν αυτούς τους καρπούς. Σύμφωνα με τον μύθο, τα χρυσά μήλα βρίσκονταν στον κήπο των θεών και προστατεύονταν από τις Εσπερίδες, αφού η κατοχή τους ήταν προνόμιο μονάχα των θεών (Paul Decharme 1996).



Εικόνα 11 Η ανάγλυφη μετόπη του Ναού του Διός στην Αρχαία Ολυμπία. Απεικονίζονται η θεά Αθηνά, ο Ηρακλής και ο Άτλαντας κατά την αρπαγή των χρυσών μήλων των Εσπερίδων από τον κήπο της Ήρας (Αρχαιολογικό Μουσείο Ολυμπίας). Κατά την μυθολογία, τα δέντρα που έφεραν τα χρυσά μήλα φύτρωναν στον κήπο των θεών και αποτελούσαν το πολύτιμο δώρο της θεάς Γης προς την Ήρα για τον γάμο της με τον Δία. Στον κήπο έμεναν οι τρεις Εσπερίδες, κόρες της Νύχτας, οι οποίες προστάτευαν τα χρυσά μήλα, αλλά, ταυτόχρονα, μη μπορώντας να αντισταθούν στον πειρασμό, τα έκοβαν. Η Ήρα για να τα προστατέψει όρισε ως φύλακα τους τον Λάδωνα, ένα φοβερό φίδι. Αυτός, λοιπόν, θεωρήθηκε από τον Ευρυσθέα, ένας πολύ δυνατός αντίπαλος για τον Ηρακλή και έτσι, ο ενδέκατος άθλος που του υπέδειξε ήταν η αρπαγή των μήλων. Κατά τον μύθο, λοιπόν, ο Ηρακλής ξεκίνησε για τη νέα του αποστολή, πηγαίνοντας στην Αφρική, και διασχίζοντας την Λιβύη και την Αίγυπτο, πέρασε στην Αραβία πηγαίνοντας συνεχώς βόρεια, έφτασε, τελικά, στον Καύκασο. Στον Καύκασο, ο Ηρακλής συνάντησε τον Προμηθέα, ο οποίος σε αντάλλαγμα που τον έσωσε από τα δεσμά του, του πρότεινε έναν τρόπο για να πάρει τα μήλα με τη βοήθεια του Άτλαντα. Ο Ηρακλής πήρε για λίγο στους ώμους του το βάρος του ουρανού και ο Άτλαντας με τη βοήθεια των Εσπερίδων, που παρασκεύασαν ένα γλυκό ποτό με υπνωτικά βότανα για τον Λάδωνα, άρπαξε τα μήλα. Τελικά, ο Ηρακλής μετά από δόλο που χρησιμοποίησε για να ξεγελάσει τον Άτλαντα, πήρε στα χέρια του τα χρυσά μήλα και επέστρεψε τον ουρανό στους ώμους του (Paul Decharme 1996).

4.1. Προέλευση

Η παλαιότερη αναφορά για τα εσπεριδοειδή (*Citrus*) εμφανίζεται στην Σανσκριτική βιβλιογραφία, και συγκεκριμένα στο Vajasaneyi Samihita, μια συλλογή τελετουργικών και λατρευτικών κειμένων. Σε αυτήν, η οποία χρονολογείται πριν από το 800 π.Χ., το όνομα με το οποίο αναφέρεται ο καρπός των *Citrus* είναι *jambhila*. Στην Κίνα, η παλαιότερη αναφορά για τα εσπεριδοειδή βρίσκεται στο βιβλίο «Tribute of Yu» που αποτελεί μέρος του «ShuChing», το οποίο θεωρείται το αρχαιότερο πλήρες έργο, που αποτελεί μια πρωτογενή πηγή που καλύπτει περίπου 1.700 χρόνια κινεζικής ιστορίας και μύθου (2357 έως το 631 π.Χ.) (James *et al.* 1990). Κατά τον 5^ο π.Χ. αιώνα ο Κομφούκιος αναγνώριζε δύο είδη εσπεριδοειδών, το Yu και Chü, ενώ στον 3^ο π.Χ. αιώνα στο έργο Chunqiu περιγράφεται η ομορφιά και των δύο αυτών ειδών. Όμως, η πρώτη εκτεταμένη περιγραφή των εσπεριδοειδών εμφανίζεται στον κύκλο ποίησης του ChiuChang, ο οποίος σε ένα ποίημά του, εγκωμιάζει μια νέα σύγκρίνοντάς την με ένα δέντρο μανταρινιού (χρονολογείται περίπου στα 250-300 π.Χ.)



Εικόνα 12. Απεικόνιση του θεού Kuvera. Στο δεξί του χέρι κρατάει ένα κίτρο (“Envis Centre, Ministry of Environment & Forest, Govt. of India-Mongoose”).

Το 1.179 μ.Χ., ο HaliYen-Chih ονόμασε και περιέγραψε 27 ποικιλίες πορτοκαλιού και μανταρινιού στο ChüLu, που αποτελεί την παλαιότερη έως τώρα γνωστή μονογραφία για τα *Citrus*. Στην Ινδία, το κίτρο (*Citru smedica* L.) αποτελούσε ιερό καρπό που ήταν αφιερωμένος στον Ganesha, το θεό της γνώσης και της σοφίας, ενώ στη βουδιστική τέχνη Java απεικονίζεται ο θεός Kuvera, θεός του πλούτου να κρατάει ένα κίτρο στα χέρια του (Εικόνα 13). Έως σήμερα, δεν έχει ανακαλυφθεί κάποιο ταυτοποιημένο είδος *Citrus* στην αρχαία πολιτιστική κληρονομιά της Αιγύπτου, των Σουμερίων και των Ασσύριων.

Όταν ο καρπός αυτός εξαπλώθηκε στην ελληνιστική Εγγύς Ανατολή, αποτέλεσε ένα σημαντικό μέρος της εβραϊκής γιορτής των Tabernacles και στη συνέχεια, μέσα από τις εβραϊκές κοινότητες το φρούτο αυτό μεταφέρθηκε σε όλη την περιοχή της Μεσογείου. Η ιερότητά του, η ευχάριστη οσμή και η ωραία όψη του οδήγησαν στην εξάπλωσή του στη Δύση. Ο πρώτος καρπός που ήλθε στην Ευρώπη ήταν το κίτρο (*Citrus medica*) και η καλλιέργειά του επεκτάθηκε σε Εγγύς Ανατολή και Ευρώπη μετά την

εκστρατεία του Μεγάλου Αλεξάνδρου. Το κίτρο ήταν γνωστό στους Αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Σημαντική είναι και η αναφορά του Διοσκουρίδη, που αναφέρει τα κίτρα ως «περσικά μήλα». Επίσης, οι Ρωμαίοι φαίνεται ότι γνώριζαν τα λεμόνια και τα ξινά πορτοκάλια. Πολλά εσπεριδοειδή, ωστόσο, εξαφανίστηκαν μαζί με τη Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία.

Η επόμενη περίοδος προώθησης της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών στη Δύση έγινε με την άνοδο του Ισλάμ και της Αραβικής αυτοκρατορίας. Το 1.150 μ.Χ., οι Άραβες έφεραν την καλλιέργεια του κίτρου, του ξινού πορτοκαλιού, του λεμονιού και της φράπας στην Βόρεια Αφρική και την Ισπανία. Μετά την αραβική επιρροή, οι σταυροφορίες έφεραν τους φεουδαρχικούς Ευρωπαίους σε επαφή με τον πολιτισμό και τις πολυτέλειες της Ανατολής. Έτσι, μετά τις Σταυροφορίες άρχισαν να αναφέρονται από τους Ευρωπαίους ιστορικούς τα λεμόνια, τα λάιμ και τα ξινά πορτοκάλια. Όταν αργότερα (~1490 μ.Χ.), οι Τούρκοι εμπόδισαν τις χερσαίες και θαλάσσιες συνδέσεις στη Μεσόγειο, οι Πορτογάλοι κατάφεραν ταξιδεύοντας περιμετρικά από την νότια Αφρική να φέρουν στην Ευρώπη καλύτερα γλυκά πορτοκάλια από την Ινδία ή την Άπω Ανατολή και πιθανολογείται ότι σε αυτούς οφείλει το όνομά τους (ελληνικά: πορτοκάλι, βουλγαρικά: πορτοκαν ή πορτοκαλ, ρουμανικά: portocala, ακόμη και στα περσικά: porteghal). Αντίθετα, στις Αγγλοσαξωνικές γλώσσες το όνομα του φρούτου προέρχεται από παραφθορά της σανσκριτικής λέξης *maranga* (orange), που σημαίνει ευώδες (“OrangeDream”).

Κατά τον 16^ο αιώνα, τα γλυκά πορτοκάλια είχαν αποκτήσει σημαντική εμπορική σημασία στην Ευρώπη, ενώ το μανταρίνι, που προέρχεται από την Κίνα, εισήχθη στην Ευρώπη πολύ πρόσφατα, το 1805. Από την Ευρώπη, τα εσπεριδοειδή εξαπλώθηκαν και στον Νέο Κόσμο. Σύμφωνα με τον LasCasas, Ισπανό άποικο και ιστορικό του Νέου Κόσμου, ο Κολόμβος έφερε τους πρώτους σπόρους κατά το δεύτερο ταξίδι του στην Αϊτή.

Έτσι, είναι εύκολο να αξιολογηθεί η εξάπλωση των ειδών *Citrus* ως απόρροια των ταξιδιών, της εξερεύνησης, του πολέμου και της πολιτικής (Scora 1975).

4.2. Ταξινόμηση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τόσο στην Ευρώπη όσο και στον Νέο Κόσμο, δεν υπάρχουν ενδημικά είδη *Citrus*. Η πλειοψηφία τους προέρχεται από τη νοτιοανατολική Ασία, τη Νέα Γουινέα, την Αυστραλία, το ανατολικό Ινδικό αρχιπέλαγος,

τη Νέα Καληδονία και τη Μελανησία. Όμως, το γεγονός ότι μια άλλη ομάδα συγγενικών ειδών *Citrus* εμφανίζεται και στην τροπική Αφρική έχει προκαλέσει σύγχυση στους ταξινομιστές με αποτέλεσμα να γίνονται υποθέσεις περί της ξεχωριστής τους προέλευσης ή της μετανάστευσής τους από την Ασία στην τροπική Αφρική, ή ότι τα πέντε αυτά γένη αποτελούν υπολείμματα της αρχαίας χλωρίδας πριν χωριστούν οι δύο ήπειροι.

Έως τα μέσα της δεκαετίας του 1970, οι ταξινομιστές *Citrus* έβγαζαν τα συμπεράσματά τους βασιζόμενοι σε μορφολογικά και γεωγραφικά δεδομένα. Η πρακτική αυτή οδήγησε σε σοβαρές διαφωνίες σχετικά με την ταξινόμηση των ειδών στο υπογένος *Citrus*. Μερικοί ταξινομιστές παρατηρώντας ότι όλοι οι τύποι *Citrus* είναι συμβατοί μεταξύ τους και δεν υπάρχουν αναπαραγωγικά εμπόδια, όπως περιγράφεται παρακάτω, χρησιμοποίησαν τον ορισμό ότι οι οργανισμοί του ίδιου είδους μπορούν να αναπαραχθούν μεταξύ τους δίνοντας γόνιμο απόγονο, με αποτέλεσμα να θεωρήσουν ότι όλοι οι τύποι *Citrus* ανήκουν σε ένα μεγάλο είδος.

Ο W.T. Swingle, το 1943, σχεδίασε ένα σύστημα για τα εσπεριδοειδή με βάση το οποίο αναγνωρίστηκαν δέκα είδη στο υπογένος *Citrus*. Το 1954 ο C. Tanaka, που θεωρείται ως ο τελικός «διαχωριστής» των *Citrus* όρισε 147 διαφορετικά είδη. Μια σημαντική διαφορά στα δύο αυτά συστήματα ήταν ο τρόπος με τον οποίο αντιμετωπίστηκαν τα μανταρίνια. Ο πρώτος έβαλε όλα τα μανταρίνια, εκτός του *C. Tachibana*, ένα άγριο είδος της Ιαπωνίας, και του *C. Indica*, ένα άγριο είδος της Ινδίας, στο *C. reticulata*. Αντίθετα, ο δεύτερος, διαχώρισε τα μανταρίνια σε 36 είδη. Η τεράστια αυτή διαφορά στον αριθμό των ειδών που αναγνωρίζουν τα δύο συστήματα αντικατοπτρίζει τις αντιφατικές θεωρίες σχετικά με το βαθμό μορφολογικής διαφοροποίησης, η οποία προσδιορίζει το είδος και κατά πόσο τα υβρίδια, μεταξύ των φυσικά απαντώμενων μορφών, θα πρέπει να θεωρηθούν ξεχωριστά είδη.

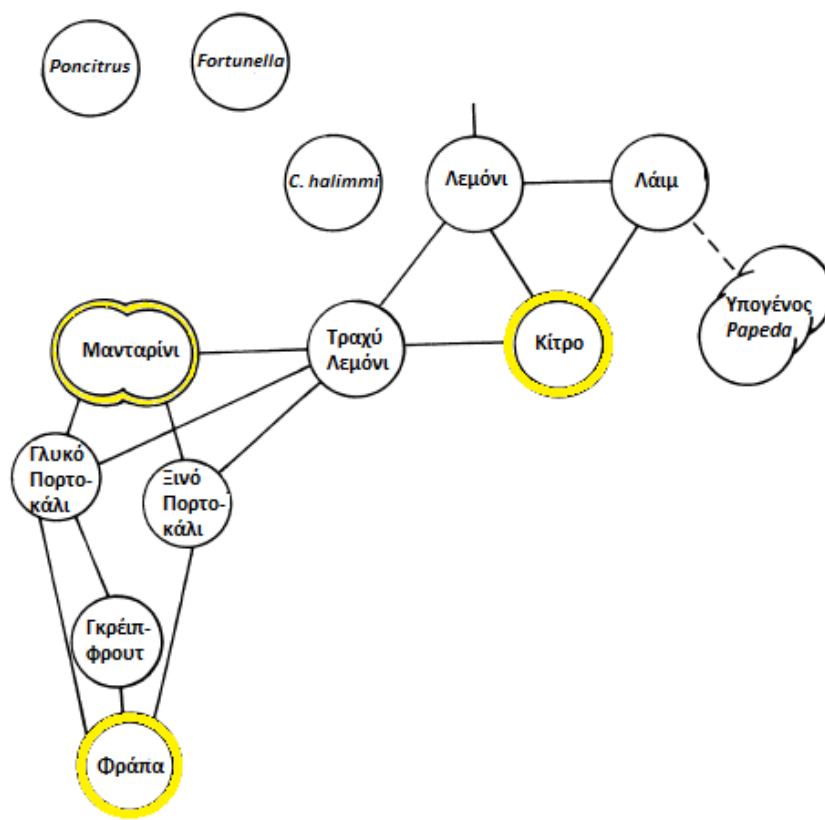
Ένας, λοιπόν, σημαντικός παράγοντας, που καθιστά δύσκολη την ταξινόμηση αποτελεί και η αναπαραγωγική βιολογία του γένους. Πολλοί τύποι εσπεριδοειδών αναπαράγονται μονογονικά από τους σπόρους, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται nucellar embryony (μη γαμετική εκβλάστηση). Το nucellus (απομικτικός σπόρος) είναι ένας προσωρινός θρεπτικός ιστός στην ανάπτυξη των σπόρων, ο οποίος δημιουργεί απομικτικά έμβρυα, τα οποία είναι γενετικά ταυτόσημα με το φυτό στο οποίο αναπτύσσονται οι καρποί. Μπορεί να είναι παρόντα πολλά απομικτικά έμβρυα, όμως αναπτύσσονται συνήθως μόνο δύο ή τρία από αυτά. Οι τύποι *Citrus* που εμφανίζουν το χαρακτηριστικό αυτό αναφέρονται ως πολυεμβρυϊκοί. Πολύ συχνά τα έμβρυα αυτά

«εξουδετερώνουν» το απλό ζυγωτικό έμβρυο, τόσο ως προς το χώρο, όσο και τα θρεπτικά συστατικά του ωαρίου. Έτσι, όταν φυτευτεί ένας σπόρος *Citrus* συχνά προκύπτει φυτό με την ίδια γενετική σύνθεση με το δέντρο από το οποίο προέκυψε.

Αυτή η πτυχή της αναπαραγωγής των *Citrus* περιπλέκει σε μεγάλο βαθμό τις ταξονομικές αναλύσεις του γένους. Έτσι, τα *Citrus* εμφανίζουν σε μεγάλο βαθμό ποικιλότητα με άφθονο φυσικό υβριδισμό που δημιουργεί ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων, γεγονός που υποδεικνύει ένα είδος με πολλά υποείδη. Παράλληλα, επειδή αυτός ο τύπος της αναπαραγωγής είναι τόσο διαδεδομένος στο γένος, συχνά εμποδίζεται η ανταλλαγή γονιδίων, οδηγώντας σε αναπαραγωγική απομόνωση, η οποία αποτελεί την κύρια απαίτηση για την περιγραφή του είδους. Τέλος, υπάρχει ένα εξαιρετικά υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων των οφθαλμών (bud) και των κλώνων (limb) στο γένος. Ως αποτέλεσμα, η βιολογική έννοια της ειδικεύσης κατά την οποία λαμβάνει χώρα ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ μελών ενός είδους είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στο γένος *Citrus*.

Οι περισσότεροι ταξονομιστές, στο υποτήμα των «πραγματικών δέντρων εσπεριδοειδών» (True Citrus Fruit Trees), περιλαμβάνουν τα παρακάτω έξι στενά συγγενικά γένη: *Citrus*, *Potcirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* και *Clymenia*. Το γένος *Citrus* χωρίζεται στα υπογένη *Citrus* (*Eucitrus*) και *Papeda*, εκ των οποίων το δεύτερο δεν φέρει βρώσιμους καρπούς (Moore 2001).

Μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί η παρουσία ενός μεγάλου αριθμού χημικών συστατικών, με στόχο να συμβάλει στην ανακάλυψη διακριτών ταξινομικών σχέσεων. Στο πλαίσιο αυτό, το 1974 μελετήθηκε από τους Esen και Soost η ενζυματική αμαύρωση των ομογενοποιημένων βλαστών, η οποία αποδόθηκε στην παρουσία ενός υποστρώματος πολυφαινόλης και του αντίστοιχου ενζύμου. Τα στενά συγγενικά γένη των δέντρων των εσπεριδοειδών δεν έχουν αυτό το ένζυμο, ούτε το υπόστρωμά του. Το ίδιο ισχύει και για κίτρα, λάιμ και λεμόνια (υβριδοποίηση κίτρου με λάιμ), ενώ τα ξινά πορτοκάλια, τα γλυκά πορτοκάλια και τα μανταρίνια διαθέτουν το ένζυμο και το υπόστρωμα. Η φράπα στερείται και των δύο, ενώ το γκρέιπφρουτ έχει το υπόστρωμα. Η διανομή της ενζυματικής αμαύρωσης στα εσπεριδοειδή ταιριάζει με το σχέδιό του Scora (1975) (Σχήμα 7), αφού τα βασικά είδη *C. medica* και *C. grandis* δεν έχουν το υπόστρωμα και το ένζυμο και το *C. reticulata* διαθέτει και τα δύο (Scora 1975). Η παρουσία ή απουσία της πολυφαινόλης και του αντίστοιχου ενζύμου οξειδάσης ταιριάζει με ένα προτεινόμενο πρότυπο κληρονομικότητας, το οποίο επίσης ταιριάζει με τις προτεινόμενες ταξονομικές σχέσεις.



Σχήμα 7 Απεικόνιση των σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Citrus*. Οι κίτρινοι κύκλοι δείχνουν τα βασικά είδη (Scora 1975).

Άλλα χημικά συστατικά που έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ταξινομιστές για τον προσδιορισμό των διακριτών σχέσεων των εσπεριδοειδών είναι τα αιθέρια έλαια. Τα αιθέρια έλαια του φλοιού σε κίτρο, λάιμ και λεμόνια είναι παρόμοια, ενώ υπάρχει μικρή ομοιότητα στην ταξινομική ομάδα *Rapeda*. Καλή συγγενική σχέση υπάρχει μεταξύ του *C. halimii*, του γλυκού και ξινού πορτοκαλιού και του μανταρινιού, κυρίως, όσον αφορά την υψηλή περιεκτικότητά τους σε D-λεμονένιο (80-90%). Τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από τα φύλλα των φυτών ποικίλλουν πολύ περισσότερο από αυτά των φλοιών και έχουν παρόμοια μοτίβα σε κίτρο, λάιμ και λεμόνι. Τα σημαντικά συστατικά που συνδέουν τα εν λόγω είδη είναι η νεράλη, η κιτρνελλόλη και η γερανιόλη (Scora 1975).

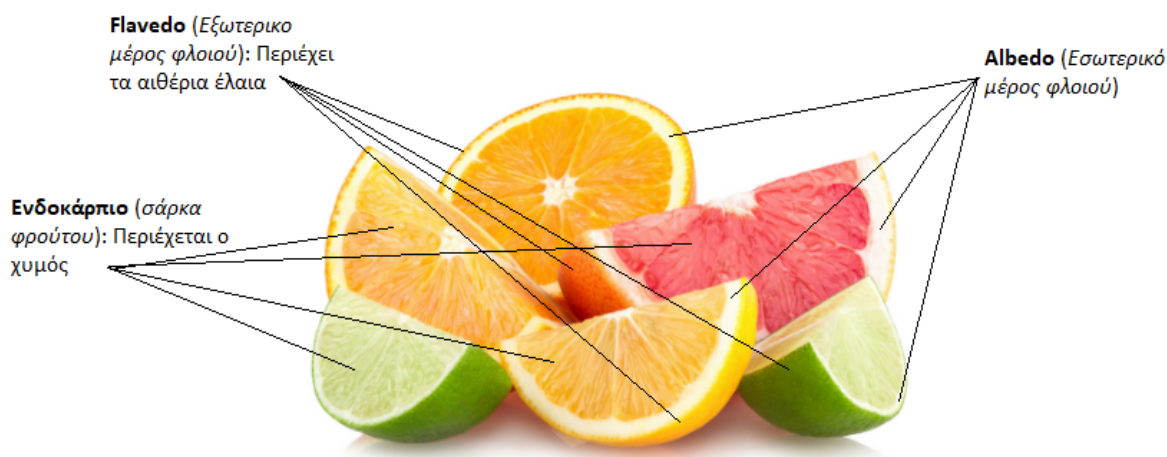
Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, το 1975 ο Scora πρότεινε ότι υπάρχουν δύο περιοχές προέλευσης των εσπεριδοειδών, οι τροπικές και οι υποτροπικές για τα υπογένη *Rapeda* και *Citrus*, αντίστοιχα. Επιπλέον, πρότεινε τρία βασικά είδη στα υπογένη *Citrus*, το *C. grandis* (φράπα), το *C. medica* (κίτρο) και το *C. Reticulate*

(μανταρίνι). Μορφολογικά, γενετικά και φυτοχημικά στοιχεία δείχνουν ότι όλα τα άλλα είδη φαίνεται να είναι σταθεροποιημένοι συνδυασμοί, κυρίως μεταξύ των τριών αυτών βασικών βιοτύπων.

Η ανάπτυξη σύγχρονων τεχνικών συμβάλλει σημαντικά στην αποκρυπτογράφηση της ταξονομικής κατάστασης στα είδη *Citrus*. Στα μέσα της δεκαετίας του '70, οι Barrett και Rhodes πραγματοποίησαν μια ολοκληρωμένη φυλογενετική μελέτη που αξιολόγησε 146 μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά σε δένδρα, φύλλα, άνθη και καρπούς. Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε τα ευρήματα του Scora (1975) αναδεικνύοντας ως βασικά είδη τους ίδιους τρεις τύπους *Citrus*, ενώ η εξέλιξη της τεχνολογίας και της επιστήμης, οδήγησε στην ανάπτυξη διαφόρων βιοχημικών και μοριακών δεικτών, όπως οι δείκτες DNA, που απεικονίζονται στον Πίνακα 2 με αποτέλεσμα την αποκρυπτογράφηση της ανάπτυξης των υπόλοιπων ειδών (Moore 2001).

Πίνακας 2 Τύποι δεικτών DNA που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της ταξινόμησης των ειδών του γένους *Citrus* (Moore 2001).

Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Επανάληψη Απλής Ακολουθίας: Η PCR ενίσχυση του DNA χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό εκκινητή αποτελούμενο από μια ακολουθία μικροδορυφορικών όπως η αγκυρωμένη (CA)₈ στο 5' ή 3' τελικό άκρο με δύο έως τέσσερα αυθαίρετα νουκλεοτίδια.
Microsatellite probes, Ανιχνευτές μικροδορυφόρων: Μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (π.χ. GTG₅), που χρησιμοποιούνται είτε ως ραδιοεπισημασμένοι ανιχνευτές για υβριδισμό με περιορισμένο DNA εσπεριδοειδών είτε ως απλοί εκκινητές σε PCR αντιδράσεις
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA: Παραγωγή ενός τυπικά κύριου δείκτη διαμέσου της χρήσης ενός απλού, μικρού, τυχαίας αλληλουχίας εκκινητή σε αντίδραση PCR.
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Περιοριστικά Θραύσματα Μήκους Πολυμορφισμού: Μεταβολή του μεγέθους της ζώνης μετά την κοπή του DNA με ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, ηλεκτροφόρηση και υβριδισμός με έναν συγκεκριμένο ανιχνευτή.
Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), Αλληλουχία που χαρακτηρίζεται από Ενισχυμένη Περιοχή: Μια πολυμορφική ζώνη, π.χ. από μια αντίδραση RAPD, η οποία προσδιορίζεται ως προς την αλληλουχία, έτσι ώστε να μπορούν να σχεδιαστούν για αυτή συγκεκριμένοι εκκινητές PCR.



Εικόνα 13 Τα κύρια μέρη των εσπεριδοειδών.

4.3. Πορτοκάλια

Δύο είναι οι κύριες κατηγορίες πορτοκαλιών, τα γλυκά που ανήκουν στο είδος *C. Sinensis* Osbeck και τα ξινά που ανήκουν στο είδος *C. aurantium* L.

Το γλυκό πορτοκάλι αποτελεί τον πλέον καλλιεργούμενο τύπο εσπεριδοειδών, το οποίο έχει και τη μεγαλύτερη εμπορική αξία. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι τέσσερις κατηγορίες πορτοκαλιών: α) το κοινό ή ξανθό πορτοκάλι (είναι το σημαντικότερο και περιλαμβάνει πολλές ποικιλίες), β) το χαμηλής περιεκτικότητας οξέων πορτοκάλι (με μηδαμινή εμπορική σημασία), γ) το σαγκουίνι (έχει κόκκινη σάρκα λόγω συσσώρευσης ανθοκυανινών), και δ) το navel πορτοκάλι (κυρίως καλλιεργείται για νωπή κατανάλωση).

Στα ξινά πορτοκάλια αναγνωρίζονται οι παρακάτω τρεις κατηγορίες: α) ο κοινός τύπος (κυρίως χρησιμοποιείται σε γλυκά και την παρασκευή μαρμελάδας, στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γνωστά πορτοκάλια της Σεβίλλης), β) το γλυκόπικρο πορτοκάλι (ο καρπός του είναι παρόμοιος με τον κοινό τύπο, αλλά λιγότερο όξινος), και γ) τα παραλλαγμένα πικρά πορτοκάλια (καλλιεργούνται πρωτίστως ως διακοσμητικά, αλλά και για τα λουλούδια τους, από τα οποία εξάγεται το λάδι neroli) (Moore 2001).

Το χρώμα των πορτοκαλιών διαφέρει από το ανοιχτό πορτοκαλί των καρπών της ποικιλίας Valencia έως το έντονο πορτοκαλί που συναντάται στα Navelina. Όμως, έχουν αναφερθεί και πολλές περιπτώσεις υβριδίων με κίτρινο ή και κόκκινο χρώμα. Με εξαίρεση το σαγκουίνι, του οποίου το κόκκινο χρώμα οφείλεται στις ανθοκυανίνες (Lee 2002; Alquézar *et al.* 2008), το χρώμα των πορτοκαλιών είναι αποτέλεσμα της

παρουσίας καροτενοειδών με την συγκέντρωσή τους να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία τους. Η περιεκτικότητα των διαφόρων ποικιλιών προτοκαλιών σε καροτενοειδή κυμαίνεται από 38 μg/g ξηρού βάρους στον πολτό έως 40-120 μg/g ξηρού βάρους στο φλοιό. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των καροτενοειδών σε γνωστές ποικιλίες πορτοκαλιών.

Στα ώριμα πορτοκάλια, τα επικρατέστερα καροτενοειδή είναι οι β,β-ξανθοφύλλες με υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιολαξανθίνη και κυρίως το 9-*cis*-ισομερές της (Rodrigo *et al.* 2004; Alquézar *et al.* 2008). Η βιολαξανθίνη είναι κίτρινη, ενώ η β-κρυπτοξανθίνη και η β-κιτραουρίνη που επίσης εμπεριέχονται έχουν πορτοκαλί χρώμα. Η αναλογία τους διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, με αποτέλεσμα καθεμία να έχει διαφορετική απόχρωση του πορτοκαλί. Έτσι, στα πορτοκάλια Navel το έντονο πορτοκαλί χρώμα οφείλεται στη χαμηλότερη συγκέντρωση βιολαξανθίνης σε σχέση με την β-κιτραουρίνη, ενώ στα πορτοκάλια Valencia, τα οποία έχουν πιο ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα η αναλογία είναι αντίστροφη (Oberholster *et al.* 2001; Alquézar *et al.* 2008).



Εικόνα 14 Η εξωτερική και η εσωτερική όψη διαφορετικών ποικιλιών πορτοκαλιών (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Alquézar *et al.* 2008).

Το λυκοπένιο, το οποίο είναι μια κόκκινη χρωστική ουσία, δεν απαντάται συχνά στα πορτοκάλια, αν και έχει αναφερθεί σε κάποια υβρίδια όπως το πορτοκάλι Shara που έχει αναπτύξει ροζ χρωματισμό στο εσωτερικό μεσοκάρπιο ως αποτέλεσμα της παρουσίας του λυκοπενίου. Στο πορτοκάλι Cara Cara της Βενεζουέλας που έχει κόκκινη σάρκα και πορτοκαλί φλοιό (Εικόνα 15), ο χρωματισμός οφείλεται στη συσσώρευση του λυκοπενίου. Εκτός της ποικιλίας Cara Cara, πλέον διατίθεται με την ονομασία Hong Anliu ένα επιπλέον υβρίδιο πορτοκαλιού με υψηλή περιεκτικότητα σε λυκοπένιο. Το υβρίδιο αυτό που περιέχει και τα καροτενοειδή φυτοένιο και φυτοφλουένιο, δεν συσσωρεύει πρόδρομα καροτενοειδή, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μιας διαφορετικής μεταβολικής διαδρομής στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του καροτενοειδούς.

Οι μεταβολές σε περιεκτικότητα και σύνθεση των καροτενοειδών κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών έχουν μελετηθεί εκτενώς, δείχνοντας ότι κατά τη

διάρκεια του πράσινου σταδίου ανάπτυξης, ο φλοιός των πορτοκαλιών έχει το προφίλ καροτενοειδών που είναι χαρακτηριστικό ενός ιστού που περιέχει χλωροπλάστες, δηλαδή περιέχει ως κύρια καροτενοειδή τα μόρια λουτεΐνη, *trans*-βιολαξανθίνη, β-καροτένιο και νεοξανθίνη. Κατά τη μετάβαση από τον χλωροπλάστη σε χρωμοπλάστη, υποβαθμίζονται σταδιακά οι χλωροφύλλες και μειώνονται τα καροτενοειδή, ώστε να επιτευχθεί ένα ελάχιστο επίπεδο στο οποίο ο καρπός να αναπτύσσει έναν κίτρινο χρωματισμό λίγο πριν τη μαζική συσσώρευση καροτενοειδών.

Στις περισσότερες ποικιλίες πορτοκαλιών συσσωρεύονται β,β-ξανθοφύλλες, με κυριότερητη 9-*cis*-βιολαξανθίνη στο φλοιό των ώριμων καρπών (Πίνακας 7). Η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή στον πολτό του πρώιμου καρπού είναι πολύ χαμηλή και συσσωρεύονται σχεδόν αποκλειστικά λουτεΐνη και *trans*-βιολαξανθίνη. Κατά την ωρίμανση των καρπών αυξάνεται συνεχώς η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, αλλά καθ' όλη την διάρκεια ωρίμανσης είναι μικρότερη στον πολτό σε σύγκριση με το φλοιό. Και στην περίπτωση αυτή η 9-*cis*-βιολαξανθίνη αποτελεί την κύρια ξανθοφύλλη, η οποία φτάνει στο μέγιστο στάδιο πλήρους χρώματος (Alquézar *et al.* 2008).

Οι καρποί του *C. sinensis* περιέχουν και υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών που διαθέτουν επωφελείς για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες. Στα φρούτα αυτά συσσωρεύονται κατά κύριο λόγο Ο-γλυκοσυδιωμένα φλαβονοειδή, των οποίων τα σάκχαρα είναι κυρίως δισακχαρίτες, όπως η νεοεσπερίδοση ή η ρουτινόση, οι οποίες συνδέονται με τα άγλυκα φλαβονοειδή στις θέσεις 3- ή 7- των υδροξυλομάδων τους (Liu *et al.* 2018).

Σε μελέτη που έγινε σε καρπούς του *C. aurantium* παρατηρήθηκε ότι κατά την ωρίμανση του φρούτου μειώνεται η περιεκτικότητα των φλαβονοειδών και αυξάνει η συγκέντρωση των καροτενοειδών (Πίνακας 3). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στον φλοιό ήταν υψηλότερη σε σχέση με τον πολτό και τον χυμό του (Πίνακας 4) (Mansour 2019).

Ο κύριος γλυκοσίδης των φλαβανών στα γλυκά πορτοκάλια (*C. sinensis*) είναι η εσπεριδίνη, ενώ στο ξινό πορτοκάλι (*C. aurantium*) κυριαρχούν η ναρινγίνη, η νεοεσπεριδίνη και η νεοεριοσιτρίνη. Η ναρινγίνη είναι αυτή που προσδίδει την πικρή γεύση στα εσπεριδοειδή. Έτσι, ανάλογα με την παρουσία ή απουσία της στον πολτό τους, οι καρποί διαχωρίζονται σε γλυκείς ή ξινούς (Peterson *et al.* 2006).

Πίνακας 3 Περιεκτικότητα των καροτενοειδών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα β-καροτενίου ανά g ξηρού βάρους του εξωτερικού του φλοιού του *Citrus aurantium* και περιεκτικότητα φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά 100 g βάρους του εξωτερικού του φλοιού (Mansour 2019).

Στάδιο Ωρίμανσης Φρούτου (Flavedo) <i>C. aurantium</i>	Περιεκτικότητα Καροτενοειδών (mg β-καροτενίου/g)	Περιεκτικότητα Φλαβονοειδών (mg κερκετίνης/100g)
Πράσινο (πρώιμο στάδιο)	0,48 ± 0,01	77,70 ± 0,53
Κίτρινο (πρώιμο στάδιο)	0,59 ± 0,04	69,60 ± 0,58
Πορτοκαλί (ώριμο στάδιο)	0,81 ± 0,03	62,10 ± 1,00

Πίνακας 4 Περιεκτικότητα φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης ανά 100 g βάρους *Citrus aurantium* (Mansour 2019).

Στάδιο Ωρίμανσης Φρούτου <i>C. aurantium</i>	Εξωτερικό του Φλοιού (Flavedo)	Εσωτερικό του Φλοιού (Albedo)	Υπόλοιπο μετά την σύνθλιψη του φρούτου	Χυμός
Πράσινο (πρώιμο στάδιο)	77,70 ± 0,53	81,20 ± 0,81	48,80 ± 0,61	39,70 ± 0,44
Κίτρινο (πρώιμο στάδιο)	69,60 ± 0,58	71,70 ± 0,81	43,60 ± 0,56	35,00 ± 0,32
Πορτοκαλί (ώριμο στάδιο)	62,10 ± 1,00	64,70 ± 2,70	36,10 ± 3,50	29,80 ± 0,67

4.4. Μανταρίνια

Τα μανταρίνια (*C. Reticulata* Blanco) είναι φαινοτυπικά η πιο ετερογενής ομάδα των εσπεριδοειδών. Τα γλυκά μανταρίνια χρησιμοποιούνταν ως επιδόρπια από την αρχαιότητα, ενώ οι ξινοί τύποι των μανταρινιών χρησιμοποιούνταν για τα αρώματά τους και ως φάρμακα (Moore 2001).

Τα μανταρίνια είναι τα πλέον έντονα χρωματισμένα εσπεριδοειδή, καθώς απαντώνται σε χρωματισμούς από έντονο πορτοκαλί έως κοκκινωπό χρώμα. Τα μανταρίνια περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα γενετικά διαφορετικών ειδών και μεταλλάξεων. Η Εικόνα 16 δείχνει την εξωτερική και εσωτερική εμφάνιση ώριμων φρούτων από τρεις τυπικές ποικιλίες μανταρινιών της ταξινομικής ομάδας Clementine: Clemenule, Fortune και Nova, οι οποίες παρουσιάζουν σαφή διαφοροποίηση στο χρώμα των φρούτων τους.



Εικόνα 15 Εξωτερική και εσωτερική όψη τριών ποικιλιών μανταρινιών (*C. Reticulata* Blanco) (Alquizar et al. 2008).

Το πρότυπο συσσώρευσης των καροτενοειδών στα μανταρίνια είναι παρόμοιο, αλλά πιο περίπλοκο σε σύγκριση με τα πορτοκάλια. Στο στάδιο της ωρίμανσής τους ανιχνεύεται η παρουσία περισσότερων των είκοσι διαφορετικών καροτενοειδών στο φλοιό και τον πολτό του καρπού τους. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι η περιεκτικότητα των μανταρινιών σε καροτενοειδή είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τα πορτοκάλια.

Στον Πίνακα 7 συνοψίζεται η περιεκτικότητα των καροτενοειδών σε φλοιό και πολτό καρπών από επιλεγμένες ποικιλίες μανταρινιών. Η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ποικίλει ευρέως μεταξύ των ποικιλιών, π.χ. ο φλοιός του μανταρινιού Clementine περιέχει τέσσερις φορές λιγότερα καροτενοειδή σε σύγκριση με το φλοιό του μανταρινιού της ποικιλίας Satsuma. Αντίστοιχα μετά πορτοκάλια, και τα μανταρίνια συσσωρεύουν τα καροτενοειδή στον φλοιό τους, με τις ξανθοφύλλες να επικρατούν αποτελώντας το 68-90% του συνόλου. Η σχετική συγκέντρωση της βιολαξανθίνης ποικίλει μεταξύ των ποικιλιών και των ιστών των μανταρινιών, με το *cis*-ισομερές να συναντάται σε υψηλότερη περιεκτικότητα σε σύγκριση με το *trans*-ισομερές της.

Η εξέλιξη της περιεκτικότητας και της σύνθεσης των καροτενοειδών κατά την ωρίμανση των μανταρινιών είναι παρόμοια με αυτή των πορτοκαλιών. Στο φλοιό των πρώιμων (πράσινων) φρούτων, τα χλωροπλαστικά καροτενοειδή είναι τα πιο άφθονα, ενώ κατά την ωρίμανση αυξάνεται η συγκέντρωση των β,β-ξανθοφυλλών τόσο στο φλοιό όσο και στον πολτό των καρπών. Η διαφορά στα καροτενοειδή μεταξύ των μανταρινιών και των πορτοκαλιών αφορά την υψηλότερη συσσώρευση της β-κρυπτοξανθίνης και των αποκαροτενοειδών στα πρώτα. Η β-κρυπτοξανθίνη συσσωρεύεται τόσο στο φλοιό των μανταρινιών, όσο και τον πολτό τους, συμβάλλοντας στον έντονο χρωματισμό των ιστών. Επίσης, στον φλοιό τους αφθονούν τα C30-αποκαροτενοειδή β-κιτραουρίνη και β-κιτραουρινένιο, δίνοντας τη χαρακτηριστική πορτοκαλί χροιά των μανταρινιών. Η σχετική αναλογία της ερυθράς β-κιτραουρίνης και της πορτοκαλόχρου β-κρυπτοξανθίνης θεωρείται ότι είναι ο βασικός παράγοντας που συμβάλλει στο χρώμα του μανταρινιού Dancy, παρότι η βιολαξανθίνη περιέχεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το ήμισυ των συνολικών καροτενοειδών. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαφορές στη σύνθεση των καροτενοειδών μεταξύ του εξωτερικού μέρους του φλοιού (flavedo) και του ενδοκάρπιου είναι μεγαλύτερες στο μανταρίνι σε σχέση με το πορτοκάλι (Πίνακας 7) (Alquézar *et al.* 2008).

Όσον αφορά την παρουσία των φαλβονοειδών στα μανταρίνια, είναι και στην περίπτωση αυτή υπό τη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή, με σημαντικότερη την

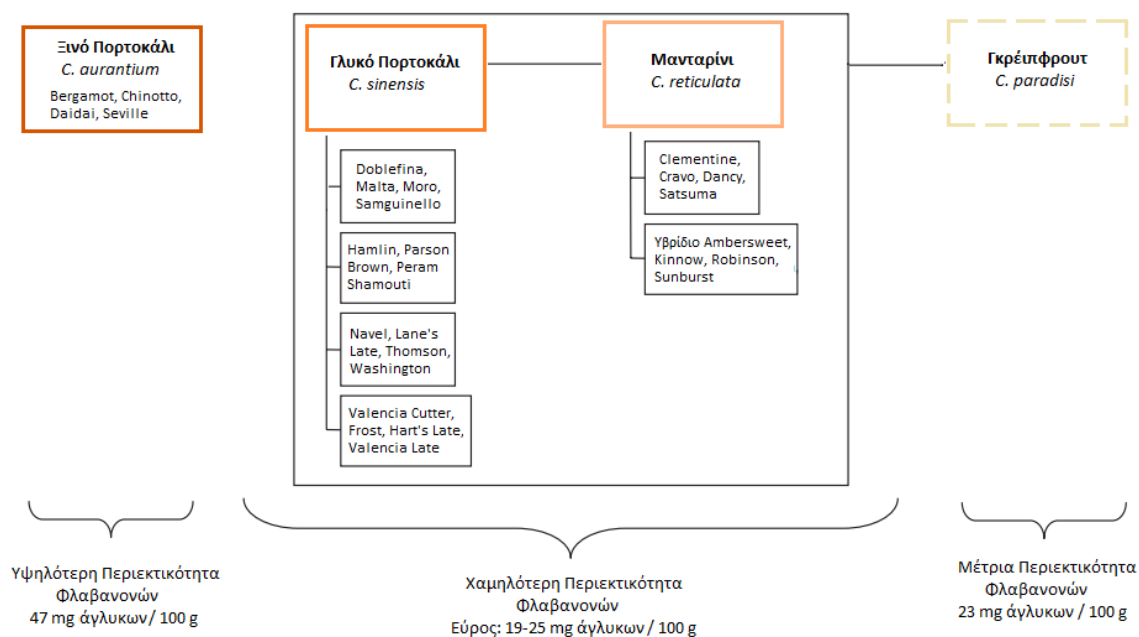
εσπεριδίνη, η οποία έχει αποδειχτεί ότι στα μανταρίνια βρίσκεται σε σχετικά υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα γλυκά πορτοκάλια (Peterson *et al* 2006).

Σε έρευνα του 2018 των Zhang *et al* μελετήθηκαν ιστοί καρπών (φλοιός, υπολείμματα πολτού, σπόροι και χυμός) από 19 γονότυπους του *C. reticulata* Blanco. όπως ήταν αναμενόμενο, ο φλοιός περιείχε τον υψηλότερο μέσο όρο των συνολικών φλαβονοειδών (38,97 mg ισοδύναμαρουτίνης (RE) / g ξηρού βάρους) σε σύγκριση με τα υπολείμματα πολτού, των σπόρων και του χυμού (10,34, 10,48 και 31,32 mg ισοδύναμα RE / g ξηρού βάρους, αντίστοιχα).

Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι οι: Avanaapireno, Chazhigan, Shagan, Parson's special mandarin, Zaoju 79-6, Cleopatramandarin, Jinju, Yuanhongxianggan, Hayaka, Daxianggan, Shihuidahongju, Parsonspecialmandarin, Manju, Baiju, Shinamanatsu (Japan-No. 1), Tankantangor, Karamandarin, Miho-core, Page. Η υψηλότερη περιεκτικότητα φλαβονοειδών στον φλοιό παρατηρήθηκε για το Zaoju 79-6 (56,52 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους) και η χαμηλότερη στο Parson's special mandarin (23,29 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους), ενώ στην περίπτωση των υπολειμμάτων πολτού και στους σπόρους, η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στις ποικιλίες Shinamanatsu (Japan-No. 1) (16,74 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους) και Karamandarin (18,23 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους), αντίστοιχα, και η χαμηλότερη στην Avanaapireno (6,38 mg και 5,96 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους, αντίστοιχα). Η περιεκτικότητα φλαβονοειδών στον χυμό των μανταρινιών ήταν μεγαλύτερη στα φρούτα Karamandarin (48,13 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους) και μικρότερη στα Shagan (9,88 mg ισοδύναμα RE/g ξηρού βάρους). Οι μέσοι όροι που προκύπτουν και από τους 19 γονότυπους για την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή φαίνεται στον Πίνακα 5 (Zhang *et al.* 2018).

Πίνακας 5 Μέσοι όροι περιεκτικότητας των φλαβονοειδών σε μελέτη διαφόρων τμημάτων των καρπών 19 ποικιλιών μανταρινιών, εκπεφρασμένα σε ισοδύναμα mgρουτίνης ανά g ξηρού βάρους (Zhang *et al.* 2018).

	Φλοιός	Υπολείμματα Πολτού	Σπόροι	Χυμός
M.O. σε mg RE / g ξηρού βάρους	38,97	10,34	10,48	31,32



Εικόνα 16 Μέση περιεκτικότητα φλαβονοειδών, όπως προκύπτει από μελέτη διάφορων ειδών και ποικιλιών *Citrus* (Peterson *et al.* 2006).

4.5. Λεμόνια

Τα λεμόνια (*C. limon* (L.) Burm. F.) αποτελούνται κατά κύριο λόγο από όξινες ποικιλίες, αν και υπάρχουν λίγοι τύποι λεμονιών με γλυκό ή χωρίς οξύ καρπό. Στην αρχαιότητα, τα λεμόνια χρησιμοποιούνταν πρωτίστως στην ιατρική, ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως, για τον χυμό και το άρωμά του. Η μελέτη των μοριακών δεικτών αποδεικνύει ότι το λεμόνι έχει δημιουργηθεί ως υβρίδιο του κίτρου με το ξινό πορτοκάλι (Moore 2001).

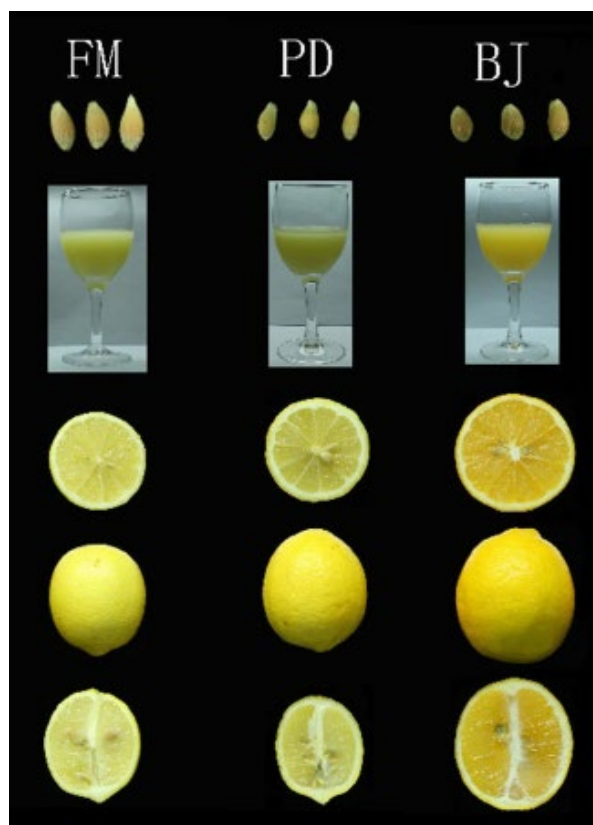
Το είδος *C. limon* περιέχει πολλά σημαντικά φυσικά θρεπτικά συστατικά, όπως φαινολικές ενώσεις, διαιτητικές ίνες, αιθέρια έλαια και καροτενοειδή (Del Río *et al.* 2004). Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι οι καρποί λεμονιού έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ότι η πρόσληψή του συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και ορισμένων μορφών καρκίνου (Benavente-García and Castillo 2008).

Τα λεμόνια χαρακτηρίζονται από ένα τυπικό κίτρινο χρώμα, το οποίο ποικίλει από ένα πράσινο-κιτρίτινο χρώμα, όπως στον πολτό της ποικιλίας Eureka έως το έντονο κίτρινο στο φλοιό της ποικιλίας Verna (Nicolosi *et al.* 2000; Alquézar *et al.* 2008). Κατά τη μετάβαση από το πράσινο στο κίτρινο στάδιο ανάπτυξής του, η συνολική

περιεκτικότητα σε καροτενοειδή μειώνεται στο εξωτερικό μέρος του φλοιού (flavedo) και τον πολτό των λεμονιών. Τα γραμμικά άχρωμα καροτένια είναι οι κύριες χρωστικές στο φλοιό των λεμονιών, για παράδειγμα το φυτοφλουένιο αντιπροσώπευει περίπου το 18 και το 22% των συνολικών καροτενοειδών στα λεμόνια Eureka στο flavedo και στον πολτό, αντίστοιχα, ενώ το φυτοένιο φθάνει μέχρι και το 86% των συνολικών καροτενοειδών στην ποικιλία Lisbon. Τα χλωροπλαστικά καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη (περίπου 15 $\mu\text{g/g}$ FW), το β -καροτένιο (περίπου 8 $\mu\text{g/g}$ FW) και το α -καροτένιο (περίπου 5 $\mu\text{g/g}$ FW), εμφανίζονται σε μικρές αναλογίες. Στον πολτό, η συγκέντρωση των καροτενοειδών είναι σχεδόν αμελητέα (Πίνακας 7) (Alquézar *et al.* 2008).

Σε άλλες ποικιλίες λεμονιών, όπως τα Meyer, Eureka Fr. και Volkamer, το πλέον άφθονο καροτενοειδές είναι η β -κρυπτοξανθίνη (Πίνακας 7). Παρότι δεν είναι κατανοητό το φαινόμενο αυτό, μια εξήγηση είναι ότι οι ποικιλίες αυτές δεν είναι αληθινά λεμόνια και μπορεί να προέρχονται από διασταυρώσεις με μανταρίνια ή πορτοκάλια (Nicolosi *et al.* 2000; Alquézar *et al.* 2008).

Όπως στα υπόλοιπα εσπεριδοειδή, και το είδος *C. limon* περιέχει φλαβονοειδή, με κύρια υποκατηγορία τις φλαβανόνες περιέχοντας ποσότητες ναρινγενίνης και εσπεριδίνης (González-Molina *et al.* 2010). Σε μελέτη των Khatiwora *et al* σε πρώιμους και ώριμους καρπούς λεμονιού, παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή ήταν ελαφρώς υψηλότερη στα ώριμα λεμόνια (Khatiwora *et al.* 2017). Άλλη μελέτη του 2017 για την αξιολόγηση της περιεκτικότητας των φλαβονοειδών σε τρεις ποικιλίες λεμονιών (Feiminailao (FM), Pangdelusaningmeng (PD), Beijingningmeng (BJ) σε ολόκληρο καρπό, πολτό, φλοιό, χυμό και σπόρους (Εικόνα 18), προσδιορίστηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών βρίσκεται στους σπόρους, ενώ η χαμηλότερη στο χυμό των φρούτων (Πίνακας 6) (Xi *et al.* 2017).



Εικόνα 17 Απεικόνιση του ολόκληρου καρπού, της σάρκας (κάθετη και οριζόντια τομή), του φλοιού, του χυμού και των σπόρων τριών ποικιλιών *Citrus limon* (Feiminailao (FM), Pangdelusaningmeng (PD), Beijingningmeng (BJ)) (Xi *et al.* 2017).

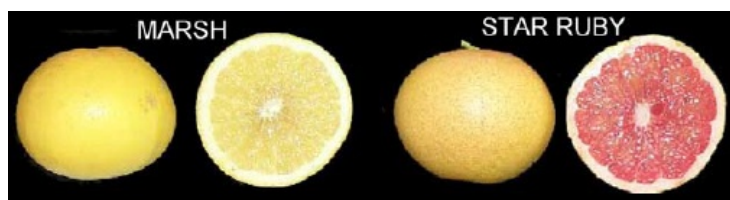
Πίνακας 6 Περιεκτικότητα των Ολικών Φλαβονοειδών σε ισοδύναμα ρουτίνης $\mu\text{g/g}$ νωπού βάρους (Xi *et al.* 2017).

Ποικιλίες	Ολόκληρος Καρπός	Φλοιός	Πολτός	Χυμός	Σπόροι
FM	$9,27 \pm 0,19$	$7,12 \pm 0,29$	$4,41 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,00$	$22,16 \pm 0,12$
PD	$5,96 \pm 0,37$	$8,30 \pm 0,33$	$5,38 \pm 0,23$	$0,44 \pm 0,01$	$18,61 \pm 0,09$
BJ	$4,58 \pm 0,24$	$5,12 \pm 0,29$	$4,16 \pm 0,22$	$0,33 \pm 0,00$	$22,63 \pm 0,17$

4.6. Γκρέιπφρουτ

Το γκρέιπφρουτ (*C. Paradisi* Macf.) αποτελεί το βιότυπο των *Citrus* με την καλύτερα τεκμηριωμένη υβριδική προέλευση. Τα δεδομένα των δεικτών RAPD και SCAR υποδηλώνουν ότι το γκρέιπφρουτ προέρχεται από γλυκό πορτοκάλι και φράπα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από ιστορικά και μορφολογικά δεδομένα (Moore 2001). Θεωρείται φυσικό υβρίδιο που είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριες ομάδες με βάση το χρώμα της σάρκας των καρπών: Α) σε χρώμα σάρκας ανοιχτό προς

κίτρινο, και Β) σε χρωματισμένη σάρκα. Στη δεύτερη περίπτωση, το χρώμα ποικίλλει σημαντικά από απαλό ροζ έως βαθύ κόκκινο (Εικόνα 19). Και ο φλοιός του καρπού μπορεί να εμφανίζει κόκκινους χρωματισμούς, οι οποίοι όμως είναι πολύ χαμηλότερης έντασης σε σχέση με το εσωτερικό του καρπού.



Εικόνα 18 Η εξωτερική και η εσωτερική όψη των δύο βασικών ποικιλιών γκρέιπφρουτ, του λευκού Marsh και του κόκκινου Starruby (Alquézar *et al.* 2008).

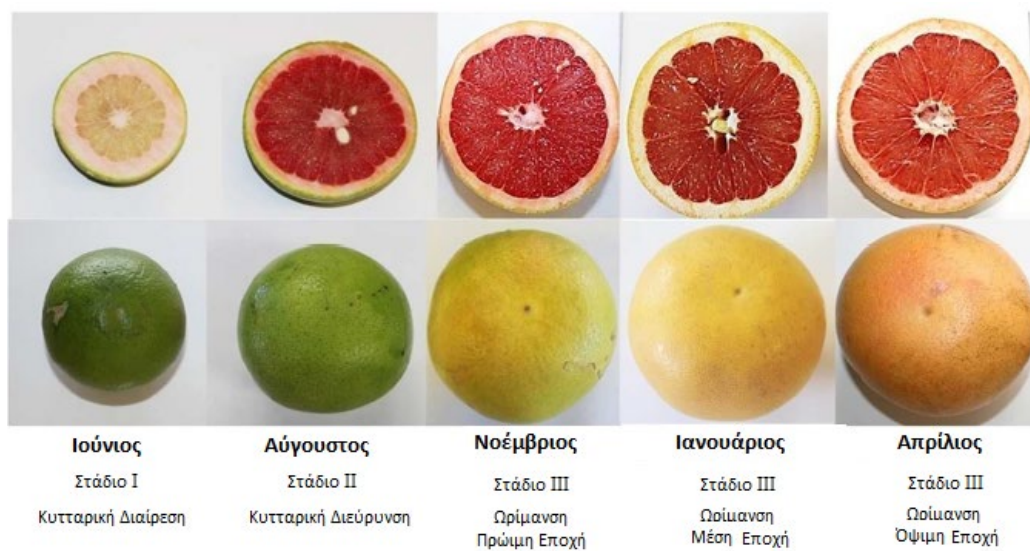
Οι μελέτες στα γκρέιπφρουτ, ως προς το περιεχόμενό τους σε καροτενοειδή, έχουν επικεντρωθεί, κυρίως, στα ώριμα φρούτα, με τη διακύμανση της περιεκτικότητάς τους κατά την ωρίμανση να έχει λάβει λιγότερη προσοχή. Στην πλέον καλλιεργούμενη ποικιλία γκρέιπφρουτ στον κόσμο (Marsh), κατά τη διάρκεια της μετάβασης από χλωροπλάστη σε χρωμοπλάστη, η περιεκτικότητα σε συνολικά καροτενοειδή στο εξωτερικό μέρος του φλοιού (flavedo) μειώνεται, ενώ αυξάνεται η συγκέντρωση των φυτοενίου και φυτοφλουένιου. Στον πολτό, το φυτοένιο και το φυτοφλουένιο αυξάνονται επίσης, και μπορούν να φτάσουν στο στάδιο ωρίμανσης έως και το 75% του συνόλου των ολικών καροτενοειδών. Επιπλέον, στα Marsh ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα ζ- και β-καροτενίων και ορισμένων ξανθοφύλλων, όπως η 9-*cis*-βιολαξαθίνη και η ουροξανθίνη (Πίνακας 7).

Οι πρώτες έρευνες για το περιεχόμενο των καροτενοειδών στα κόκκινα γκρέιπφρουτ τεκμηρίωσαν την παρουσία λυκοπενίου και β-καροτενίου ως υπεύθυνων για τον χρωματισμό ουσιών, με έντονη συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε λυκοπένιο και της έντασης του κόκκινου χρωματισμού στην σάρκα. Εκτός από το λυκοπένιο και το β-καροτένιο, που αντιπροσωπεύουν το 70 έως 95% των συνολικών καροτενοειδών, στο εσωτερικό διαφορετικών κόκκινων ποικιλιών γκρέιπφρουτ έχει ανιχνευθεί φυτοένιο, φυτοφλουένιο και ζ-καροτένιο. Στο εξωτερικό των φλοιών κυριαρχούν τα άχρωμα καροτένια (64-95% του συνόλου), με μειωμένα επίπεδα ξανθοφύλλων, κυρίως βιολαξαθίνης και ζεαξανθίνης (Alquézar *et al.* 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μερικές κόκκινες ποικιλίες, τα μέρη των καρπών που συνήθως δεν συσσωρεύουν καροτενοειδή, όπως το εσωτερικό του φλοιού (albedo), είναι επίσης

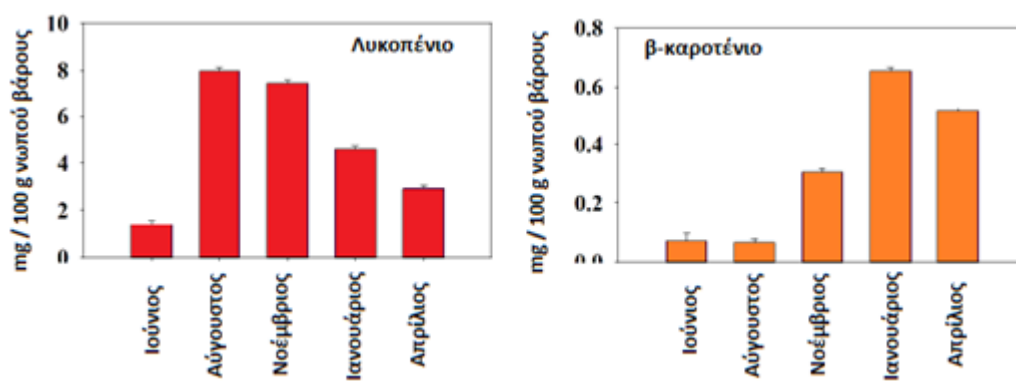
χρωματισμένα λόγω της παρουσίας λυκοπενίου και β-καροτενίου (Xu *et al.* 2006). Η περιεκτικότητα των καροτενοειδών στο γκρέιπφρουτ είναι παρόμοια με αυτή της φράπας (Xu *et al.* 2006; Alquézar *et al.* 2008).

Τα τελευταία χρόνια, το λευκό και το ροζ γκρέιπφρουτ έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω της περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά και αντιοξειδωτικά συστατικά (Kelebek 2010). Έως σήμερα έχει αναφερθεί η παρουσία υψηλών επιπέδων των γλυκοσυλομένων φλαβονονών, ναρινγίνη και ναριρουτίνη, με το λευκό γκρέιπφρουτ να περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονοειδών (Castro-Vazquez *et al.* 2016). Οι Chaudhary *et al.*, προσδιόρισαν τα επίπεδα των φλαβονοειδών (Εικόνα 22) και των καροτενοειδών, λυκοπένιο και β-καροτένιο (Εικόνα 21), στους καρπούς του γκρέιπφρουτ σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (Εικόνα 20). Στο γκρέιπφρουτ περιέχονται κυρίως φλαβανόνες με τη μορφή ρουτινοσίδων και νεοεσπεριδόσων. Οι ρουτινοσίδες είναι άγευστες χημικές ενώσεις, ενώ οι νεοεσπεριδόσες προσδίδουν την πικρή γεύση. Στο γκρέιπφρουτ, η ναρινγίνη, η πομσιρίνη και η νεοεσπεριδίνη είναι νεοεσπεριδόσες, ενώ η ναριρουτίνη και η διδυμίνη είναι ρουτινοσίδες, με τις συγκεντρώσεις ναριρουτίνης, διδυμίνης και νεοεσπεριδίνης να είναι υψηλότερες στον πολτό των πρώιμων καρπών. Και σε αυτή την μελέτη, αποδείχτηκε ότι η ναρινγίνη είναι το αφθονότερο φλαβονοειδές, σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των ολικών φλαβονοειδών.

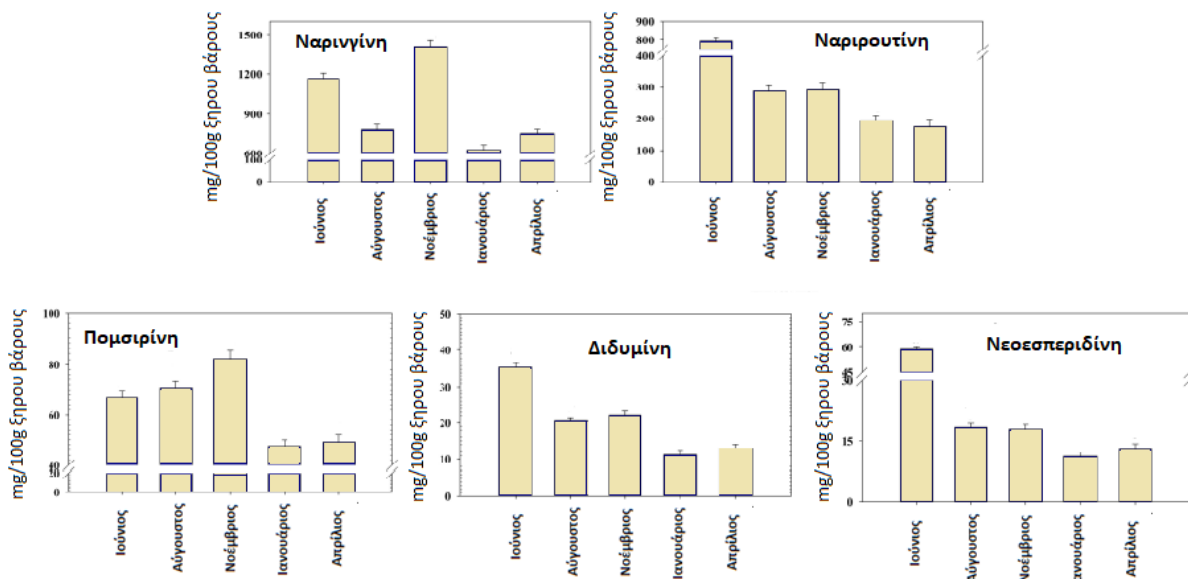
Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των καροτενοειδών και φλαβονοειδών είναι αλληλένδετα στα κόκκινα εσπεριδοειδή. Στο πρώιμο στάδιο ανάπτυξής τους περιέχουν υψηλότερα επίπεδα φλαβονοειδών, τα οποία όμως μειώνονται καθώς οι καρποί τους ωριμάζουν, και η περιεκτικότητα καροτενοειδών αυξάνεται. Αυτή η σχέση μεταξύ των δύο ειδών μεταβολιτών αποτελεί ένα εύρημα που θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω (Chaudhary *et al.* 2016).



Εικόνα 19 Τα στάδια ανάπτυξης του καρπού του γκρέιπφρουτ (Chaudhary *et al.* 2016).



Εικόνα 20 Περιεκτικότητα του λυκοπενίου και του β-καροτενίου στον καρπό γκρέιπφρουτ κατά τα στάδια της ανάπτυξής του (Chaudhary *et al.* 2016).



Εικόνα 21 Περιεκτικότητα των καρπών του γκρέιπφρουτ σε ναρινγίνη, ναριρουτίνη, πονσιρίνη, διδυμίνη και νεοεσπεριδίνη κατά τα στάδια της ανάπτυξής του (Chaudhary *et al.* 2016).

Πίνακας 7 Περιεκτικότητες των καροτενοειδών στους καρπούς των εσπεριδοειδών (Alquézar *et al.* 2008).

Καρπός	Ποικιλία	Μέρος Καρπού	Περιεκτικότητα Καροτενοειδών (μg/γξηρού βάρους)	Ποσοστά Καροτενοειδών
ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ	Valencia	Φλοιός	90.0-120.0	44-55% βιολαξανθίνη
		Πολτός	6.0-19.0	2-65% βιολαξανθίνη 4-15% β-κρυπτοξανθίνη 6-40% αντεραξανθίνη
	Navel	Φλοιός	60.0-75.0	26-52% βιολαξανθίνη 12% φυτοένιο
		Πολτός	4.0-23.0	48% βιολαξανθίνη 11% αντεραξανθίνη
	Navelina	Φλοιός	94.2	31% βιολαξανθίνη 18% φυτοένιο
	Cara Cara	Φλοιός	62.3	36% φυτοένιο 21% αουροξανθίνη
		Πολτός	24.0-38.0	34-40% φυτοένιο 8-14% βιολαξανθίνη

MANTAPINI				5-16% λυκοπένιο
	Clementine	Φλοιός	74.6	32% β-σιτραουρίνη 16% β-σιτραουρινίνη
		Πολτός	24.9	36% β-κρυπτοξανθίνη 35% βιολαξανθίνη
	Satsuma	Φλοιός	250.0-300.0	44% φυτοένιο 19% β-κρυπτοξανθίνη
		Πολτός	21.0-34.0	19% βιολαξανθίνη 55% β-κρυπτοξανθίνη 13% ζεαξανθίνη
	Dancy	Φλοιός	295.0	51% βιολαξανθίνη 8% β-σιτραουρίνη
		Πολτός	18.5	32% αντεραξανθίνη 23% β-κρυπτοξανθίνη
	Eureka	Φλοιός	1.4	18% φυτοφλουένιο 17% ζ-καροτένιο
		Πολτός	0.6	30% β-κρυπτοξανθίνη 22% φυτοφλουένιο
	Lisbon	Φλοιός	90.0	86% φυτοένιο
		Πολτός	ίχνη	
	Meyer	Πολτός	1.3	68% β- κρυπτοξανθίνη 15% β- καροτένιο
ΛΕΜΟΝΙ	Volkamer	Πολτός	6.5	38% β- κρυπτοξανθίνη 15% βιολαξανθίνη
	Chandler	Φλοιός	19.3	32% λουτεΐνη 22% βιολαξανθίνη
		Πολτός	13.2	90% λυκοπένιο 5% β-καροτένιο
	ChuzhouEarly	Φλοιός	4.8	31% φυτοένιο

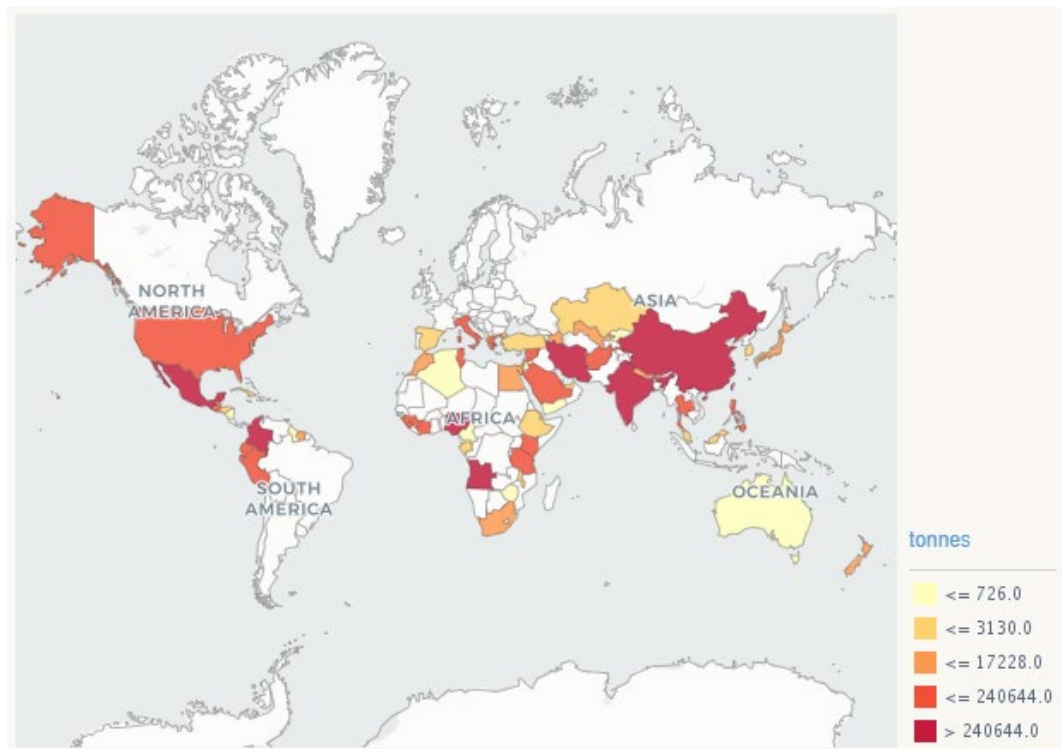
ΓΚΡΕΪΠΦΡΟΥΤ	Red			25% φυτοφλουένιο
	Πολτός	5.3		51% λυκοπένιο 20% β-καροτένιο
	Goliath	Φλοιός	5.0	67% φυτοφλουένιο
	Πολτός	0.4		23% λουτεΐνη 19% φυτοφλουένιο 12% β-καροτένιο
	Yuhuan	Πολτός	ίχνη	35% φυτοένιο 35% λουτεΐνη

4.7. Διαδικασία Χυμοποίησης των Εσπεριδοειδών & τα Παραπροϊόντα που παραλαμβάνονται

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations) η παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών ανήλθε το 2019 στους 157.979.260 τόνους. Στον Πίνακα 8 παρατίθενται ξεχωριστά η παγκόσμιες παραγωγές πορτοκαλιών, μανταρινιών, λεμονιών (περιλαμβάνονται και τα λάιμ) και γκρέιπφρουτ (περιλαμβάνεται και η φράπα) για το 2019, όπως και οι αντίστοιχες παραγωγές τους σε Ευρωπαϊκή Ένωση και Ελλάδα ("Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)"). Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή εσπεριδοειδών είναι κατά σειρά η Βραζιλία, η Κίνα, οι Η.Π.Α. και το Μεξικό ("Citrus: World Markets and Trade"). Τα εσπεριδοειδή αποτελούν τα φρούτα με τη μεγαλύτερη εμπορική αξία, καθώς για αυτά υπάρχουν δύο κύριες αγορές: η αγορά νωπών φρούτων και η αγορά χυμών, με κυριότερη το χυμό πορτοκαλιού (Alquézar *et al.* 2008). Υπολογίζεται   τι περισσότερο   π   το 30% της παραγωγής εσπεριδοειδών προορίζεται προς χυμοποίηση (Kapsaski-Kanelli *et al.* 2017).

Πίνακας 8 Παραγωγή εσπεριδοειδών κατά το έτος 2019 (σε τόνους)
("Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)").

	Παγκόσμια	ΕΕ	Ελλάδα
Πορτοκάλια	78.699.604	6.096.740	849.080
Μανταρίνια	35.444.080	2.893.230	150.640
Λεμόνια	20.049.630	1.445.840	82.260
Γκρέιπφρουτ	9.289.462	103.190	3.100



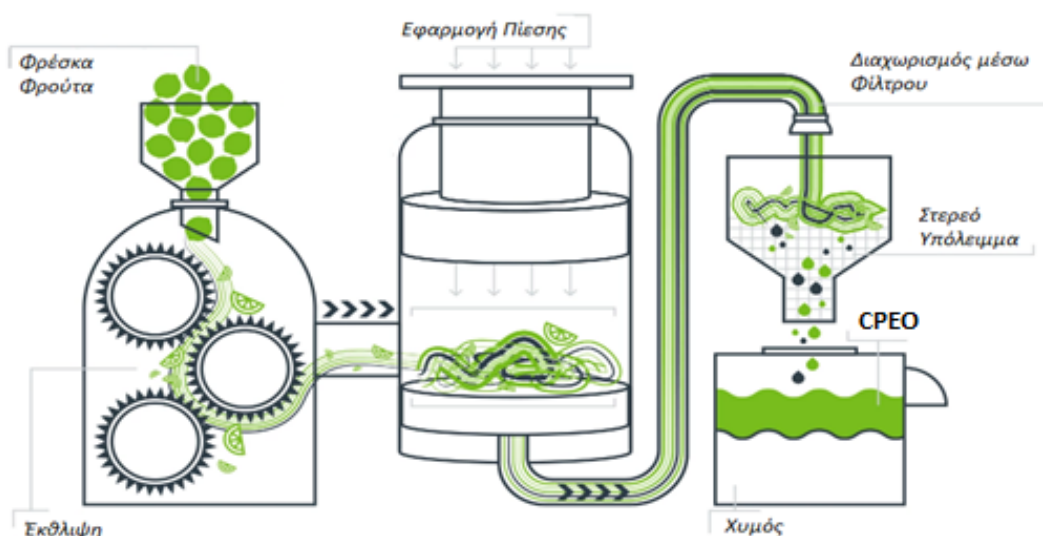
Εικόνα 22 Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την παραγωγή εσπεριδοειδών κατά το έτος 2019 (σε τόνους) ("Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)").

Ο Πίνακας 8 αναδεικνύει ότι τα πορτοκάλια αποτελούν το σημαντικότερο καλλιεργούμενο εσπεριδοειδές με μεγάλο ποσοστό της παραγωγής του να αφορά τη χυμοποίησή του. Σύμφωνα με στοιχεία του USDA (United States Department of Agriculture), την τελευταία δεκαετία ο μέσος όρος της παγκόσμιας παραγωγής χυμών πορτοκαλιού κυμαίνεται στα 2 εκατομμύρια τόνους ("Citrus: World Markets and Trade"). Παράλληλα, θα πρέπει να επισημανθεί ότι είναι αντίστοιχα μεγάλος σε μέγεθος και ο όγκος των παραπροϊόντων που παράγονται κατά τη διαδικασία της χυμοποίησης, αφού για την παραγωγή χυμών χρησιμοποιείται το ενδοκάρπιο των καρπών.

Σύμφωνα με στοιχεία του FAO, τα οικονομικώς αξιοποιήσιμα παραπροϊόντα της χυμοποίησης εσπεριδοειδών ξεπερνούν τα 400. Όμως, ο αριθμός αυτών που σήμερα αξιοποιούνται είναι μικρότερος του 15, με κυριότερη την πηκτίνη, τις διατροφικές ίνες και τους αποξηραμένους φλοιούς (“CHAPTER 11: PRACTICAL ASPECTS OF CITRUS JUICE PROCESSING”). Στον κατάλογο των παραπροϊόντων που αξιοποιούνται δεν συμπεριλαμβάνονται τα αιθέρια έλαια ψυχρής έκθλιψης (Cold-Pressed Essential Oils, CPEOs), μια κατηγορία παραπροϊόντων με σημαντικό δυναμικό αξιοποίησης, κυρίως λόγω των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν.

Αναλυτικότερα, τα CPEOs που αποτελούν τα παραπροϊόντα της έκθλιψης των εσπεριδοειδών κατά την άσκηση υψηλής πίεσης (Εικόνα 23) συνίστανται από δύο κλάσματα:

1. το πτητικό που αποτελεί και το κύριο μέρος των CPEOs, με κυρίαρχο συστατικό το D-λεμονένιο, το οποίο ανιχνεύεται σε ποσοστά που υπερβαίνουν το 95%, και
2. το μη πτητικό που είναι σε πολύ μικρότερο ποσοστό και αποτελείται από μια πληθώρα συστατικών, όπως κηροί, υδρογονάνθρακες, κουμαρίνες, καροτενοειδή, φλαβονοειδή κλπ (Bicchi 2012).



Εικόνα 23 Διαδικασία Παραγωγής Αιθέριου Ελαίου Ψυχρής Έκθλιψης (Organic Serums).

Έτσι, από τα CPEOs μπορεί να διαχωριστεί το καθαρό αιθέριο έλαιο των *Citrus*, σε αποδόσεις που κυμαίνονται από 0,4 έως 0,6 mL/kg (Karsaski-Kanelli *et al* 2017) για να χρησιμοποιηθεί από τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, ως παράγοντας αρώματος λόγω του χαρακτηριστικού αρωματικού του προφίλ (Perez-Cacho and Rouseff 2008). Όμως, τα μη πτητικά υπολείμματα που εμπεριέχονται στα

CPEOs παραμένουν αναξιοποίητα, η περαιτέρω χρήση των οποίων από τις παραπάνω βιομηχανίες έχει δημιουργήσει για αυτά μια αγορά με τιμές που κυμαίνονται από 6 έως 7€/kg για το CPEO του γκρέιπφρουτ, 8 -12€/kg για το πορτοκάλι, 12-15€/kg για το μανταρίνι και 30-35€/kg για το λεμόνι (Kapsaski-Kanelli *et al.* 2017).

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Πειραματική Διαδικασία

Στο πλαίσιο διενέργειας της μεταπτυχιακής μελέτης μελετήθηκαν τα CPEOs των παρακάτω τεσσάρων εσπεριδοειδών που χρησιμοποιούνται στη χυμοποίηση: πορτοκαλιού (*C. sinensis*), μανταρινιού (*C. reticulate*), λεμονιού (*C. limon*) και γκρέιπφρουτ (*C. paradise*). Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν από την Βιομηχανία χυμών «Οικογένεια Χριστοδούλου». Στόχος ήταν η μελέτη της διαδικασίας απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος και η αξιολόγηση του υπολείμματος ως πλούσιας πηγής καροτενοειδών με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους ως χρωστικού συμπληρώματος στη διατροφή ορνίθων και ιχθύων, αλλά και τη διερεύνηση της παραγωγής μεμονωμένων φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας που περιλαμβάνονται σε αυτά (καροτενοειδή και φλαβονοειδή).

5.1. Απομάκρυνση των Πτητικών Κλασμάτων

Για την απομάκρυνση των πτητικών κλασμάτων μελετήθηκαν οι παρακάτω τρεις διαφορετικές διαδικασίες: Α) κλασσική υδροαπόσταξη ($T \sim 100^{\circ}\text{C}$) σε ύδωρ και χρήση τροποποιημένης συσκευής Clevenger για 3h, όπου ακολούθησε η υγρή-υγρή εκχύλιση του υπολείμματος με εξάνιο και διχλωρομεθάνιο για την παραλαβή των καροτενοειδών, Β) εξάτμιση υπό κενό ($T \sim 80^{\circ}\text{C}$), και Γ) εξάτμιση υπό κενό ($T < 35^{\circ}\text{C}$) με την προσθήκη διαφόρων αλκοολών (αιθανόλη, ισοπροπανόλη, μεθανόλη) με στόχο το σχηματισμό ενός αζεοτροπικού τους μίγματος με το D-λεμονένιο (Berg, 1997). Η Τρίτη διαδικασία αντιπροσωπεύει έναν καινοτόμο τρόπο απομάκρυνσης του αιθέριου ελαίου σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 35°C σε συνθήκες μειωμένης πίεσης. Η εξάτμιση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό τύπου BUCHI (*Rotavapor R-210*, *Vacuum Controller V-850*, *Heating Bath B-491*, *Vacuum Pump V-700*). Όλοι οι πειραματισμοί έλαβαν χώρα στο σκοτάδι για να αποφευχθεί η άμεση έκθεση των δειγμάτων στο φως. Στόχος της διαδικασίας ήταν η ποιοτική και οικονομική αξιολόγηση της απομάκρυνσης του αιθέριου ελαίου υπό ήπιες συνθήκες στις οποίες δεν επηρεάζονται τα καροτενοειδή, που αποτελούν τον κύριο στόχο.



Εικόνα 24 Διαχωρισμός των δύο κλασμάτων.

5.2. Ολική Περιεκτικότητα Καροτενοειδών

Για την μέτρηση της ολικής περιεκτικότητας των καροτενοειδών (Total Carotenoids Content, TCC), κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης για το β-καροτένιο (1,4 2,3, 4,6, 6,8, 13,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και τα αποτελέσματα των δειγμάτων εκφράστηκαν σε μg ισοδύναμα β-καροτενίου (β-Carotene Equivalents, CE) /100g CPEO. Όπως η πρότυπη χημική ένωση, β-καροτένιο (*Sigma-Aldrich*), έτσι και τα δείγματα, διαλύθηκαν σε διχλωρομεθάνιο (*Fisher*) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450nm τρεις φορές. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα παρακαταθήκης, διάλυμα πρότυπου β-καροτενίου σε διχλωρομεθάνιο, συγκέντρωσης 136 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις για την παρασκευή των διαλυμάτων της καμπύλης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο human CORPORATION (*x-ma 1000*).

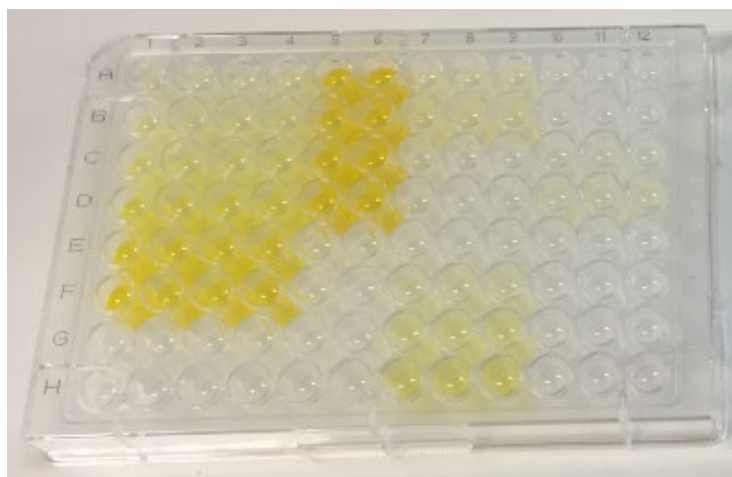
5.3. Ολική Περιεκτικότητα Φλαβονοειδών

Η μέτρηση της ολικής περιεκτικότητας των φλαβονοειδών (Total Flavonoids Content, TFC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας παραλλαγή της μεθόδου του

χλωριδίου του αργιλίου (AlCl_3), η οποία για την περίπτωση της διατριβής τροποποιήθηκε-προσαρμόστηκε σε μικρομέθοδο έτσι ώστε να γίνει δυνατή η χρήση του φασματοφωτομέτρου TECAN (*NanoQuant, infiniteM200PRO*) σε 96πλή υποδοχή για ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη χημική ένωση κερκετίνη (*Sigma-Aldrich, HPLC>95%*) για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης (5, 10, 15, 30, 50, 70, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$) για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 617,5 $\mu\text{g/mL}$ σε MeOH και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις με μίγμα διαλυτών MeOH-DMSO (*Sigma-Aldrich, >99,9%*). Για τις αραιώσεις, χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών MeOH-DMSO, έτσι ώστε οι δύο διαλύτες να βρίσκονται πάντα σε περιεκτικότητα MeOH-DMSO 60:40, καθώς τα δείγματα διαλύθηκαν σε DMSO και έγιναν και σε αυτά κατάλληλες αραιώσεις με το μίγμα διαλυτών MeOH-DMSO, έτσι ώστε η τελική αναλογία να είναι πάντα 60:40.

Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό προστέθηκαν 100 μL δείγματος σε κάθε οπή. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις οπές. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μL AlCl_3 ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: *Fluca Analytical, >99,0%*) 2% w/v και 50 μL διαλύματος CH_3COONa ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: *MERCK, >99%*) (1M) και έγινε επώαση για 40min σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 415nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων κερκετίνης, (Quercetin Equivalents, QE) /100g CPEO (Pękal and Pyrzynska 2014).



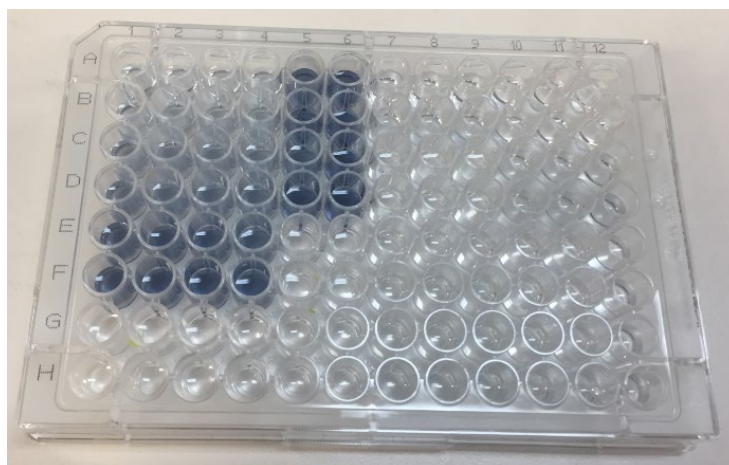
Εικόνα 25 96-θέσια πλακέτα με δείγματα μετά από την μέτρηση της απορρόφησης.

5.4. Ολική Περιεκτικότητα Φαινολικών

Η μέτρηση της ολικής περιεκτικότητας των Φαινολικών (Total Phenolics Content, TFC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μία παραλλαγή της μεθόδου Folin-Ciocalteu, η οποία για την περίπτωση της μελέτης τροποποιήθηκε σε μικρομέθοδο έτσι ώστε να γίνει δυνατή η χρήση του φασματοφωτομέτρου TECAN (*NanoQuant, infinite M200PRO*) σε 96πλή υποδοχή για ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε, αρχικά, το 1927, αλλά από τότε έχει υποστεί αλλαγές (Singleton *et al.* 1999).

Για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη χημική ένωση γαλλικό οξύ (*Fluka Analytical*) για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης (15, 25, 35, 45, 55, 65, 75μg/mL) για την οποία χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 300μg/mL και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Αρχικά, προστέθηκαν 10μL δείγματος σε κάθε οπή. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις οπές. Έπειτα, προστέθηκαν 100μL απιονισμένου H₂O και 10μL διαλύματος Folin-Ciocalteu (*Sigma-Aldrich, 2N*). Μετά από 3min αναμονής, προστέθηκαν 20μL Na₂CO₃ (*ChemLam, ≥99,8%*) 7,5% w/v και επιπλέον 60μL απιονισμένου H₂O. Ακολούθησε επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 765nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GE) /100g CPEO.



Εικόνα 26 96-θέσια πλακέτα με δείγματα μετά από την μέτρηση της απορρόφησης.

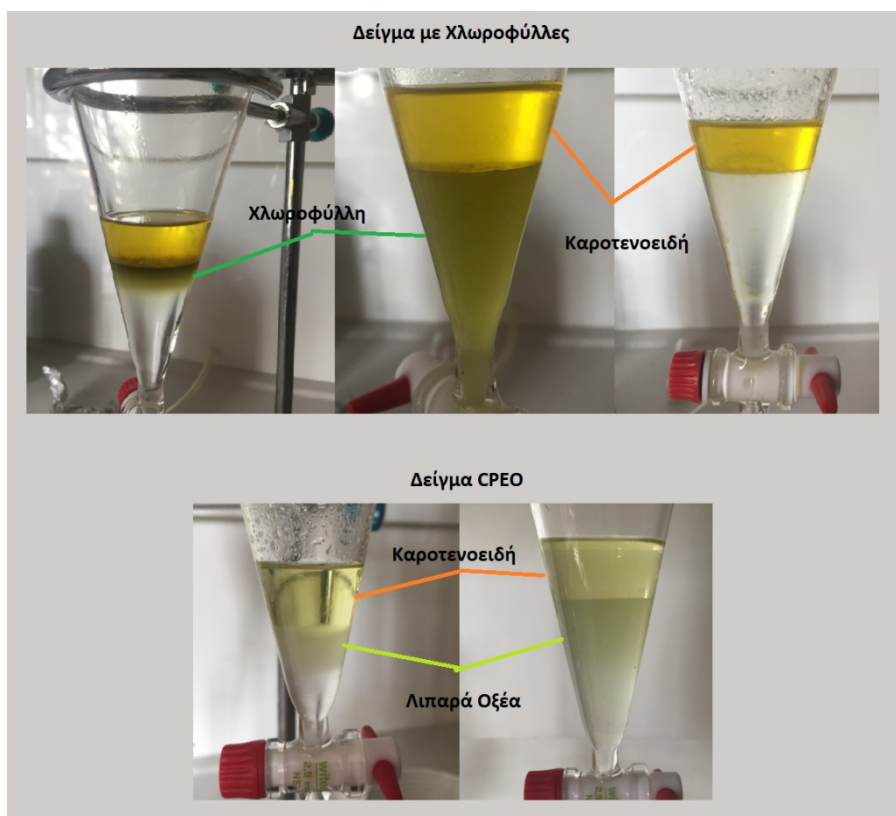
5.5. Ανάλυση Δειγμάτων

Εφόσον ο κύριος στόχος της διατριβής είναι η περιεκτικότητα των χρωστικών-καροτενοειδών των CPEO, στο πλαίσιο του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της παρουσίας μεμονωμένων βιοδραστικών καροτενοειδών στα δείγματα της διατριβής αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος ανάλυσης σε UPLC-MS-MS και HPLC-DAD.

5.5.1. Σαπωνοποίηση

Πριν από την ανάλυση των καροτενοειδών είναι σημαντική η σαπωνοποίηση των δειγμάτων. Σε δείγματα με χλωροφύλλες είναι απαραίτητη για την απομάκρυνσή τους, αλλά και σε δείγματα που δεν περιέχουν χλωροφύλλες, είναι, επίσης, σημαντική διαδικασία για την απομάκρυνση λιπιδίων και την υδρόλυση εστέρων των καροτενοειδών.

Για την σαπωνοποίηση των δειγμάτων έγινε διάλυση του υπολείμματος της συμπύκνωσης με αλκοόλη των CPEO σε μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα (*Petroleum ether 40-60 °C for analysis, CarloErba*) / διεθυλαιθέρα (*Sigma-Aldrich*) (50:50) και προσθήκη ίσης ποσότητας διαλύματος KOH 10% w/v σε μεθανόλη (*CarloErba, for analysis*) (Kimura *et al.* 1990). Το μίγμα έμεινε υπό μαγνητική ανάδευση όλο το βράδυ (overnight) και την επόμενη μέρα έγινε ο διαχωρισμός των δύο φάσεων με τη βοήθεια εκχυλιστικής χοάνης και έγινε μία πλύση του μίγματος πετρελαϊκού αιθέρα/διεθυλαιθέρα με H₂O για την απομάκρυνση της βάσης (έλεγχος pH). Έπειτα έγινε συμπύκνωση του μίγματος αιθέρων και το υπόλειμμα φυλάχτηκε στην κατάψυξη, αφού πρώτα προστέθηκε αργό, μέχρι την ανάλυσή του.



Εικόνα 27 Διαχωρισμός των δύο φάσεων μετά από σαπωνοποίηση σε δείγμα με χλωροφύλλες και σε δείγμα CPEO.

5.5.2. Ανάλυση Καροτενοειδών

Ο προσδιορισμός των καροτενοειδών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης Accela της Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), το οποίο αποτελείται από σύστημα παροχής διαλυτών με ανάμιξη υπό υψηλή πίεση και τη χρήση δυαδικής αντλίας (binary pump), έχει δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης, είναι εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη με δυνατότητα ρύθμισης του όγκου ένεσης και διαθέτει θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης.

Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 100 mm, 1.9μm, narrow bore LC column με προσθήκη την InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 5 mm, 2.7 μm της Agilent και οι συνθήκες χρωματογραφίας φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 10.

Το παραπάνω υγροχρωματογραφικό σύστημα ήταν συνδεδεμένο με σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (MS/MS) τριπλού τετραπόλου TSQ Quantum Access της ίδιας εταιρείας. Η πηγή ιοντισμού που επιλέχθηκε ήταν η APCI με δυνατότητα

εναλλαγής της πολικότητας του ιονισμού (θετικός ή αρνητικός ιονισμός) και εφαρμογή της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, SRM). Η συγκεκριμένη τεχνική εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με την SIM, καθώς παρακολουθείται ένα ζευγάρι ιόντων (parent / product).

Οι παραπάνω παράμετροι, όπως και οι προσδιορισμοί αφενός των μεταβολών των μοριακών ιόντων και αφετέρου της θραυσμάτωσης των ιόντων των αναλυτών, επιτεύχθηκαν μέσω της άμεσης έγχυσης σειράς προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών. Τα αέρια του φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιήθηκαν είναι το άζωτο από αντλία αζώτου (PeakScientific) και το αργό από φιάλη υψηλής καθαρότητας. Αναλυτικά, οι συνθήκες του φασματομέτρου μάζας φαίνονται στον πίνακα 11 και τα ιόντα παρακολούθησης των καροτενοειδών-στόχων με την ενέργεια σύγκρουσης, του ιοντισμού και του χρόνου έκλυσης του καθενός στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 Παρουσίαση των καροτενοειδών-στόχων, των ιόντων παρακολούθησης με την ενέργεια σύγκρουσης (σε eV), του ιοντισμού και του χρόνου έκλυσης (RT, Retention Time) (σε min) του καθενός.

Καροτενοειδή	Ιόντα (Ενέργεια Σύγκρουσης*, eV)	Ιοντισμός	Χρόνος Έκλυσης, RT (min)
Φουκοξανθίνη	658,797>641,205 (27) / 657,694 (18)	(-)	1,29
Ασταξανθίνη	597,057> 118,834 (46) / 146,836 (33)	(+)	1,90
Ζεαξανθίνη	569,055> 118,865 (31) / 551,119 (18)	(+)	2,40
Λουτεΐνη	568,885> 118,938 (37)/ 135,145 (33)	(+)	2,40
β-Κρυπτοξανθίνη	553,032> 120,660 (38) / 144,754 (30)	(+)	6,30
Λυκοπένιο	537,083> 156,830 (37) / 248,643 (34)	(+)	9,55
α-Καροτένιο	537,207> 176,649 (20)/ 536,453 (5)	(+)	14,46
β-Καροτένιο	536,961> 118,820 (38) / 176,714 (22)	(+)	15,30
Φυτοένιο (E-/Z-)	545,041>94,978 (34) /108,981 (29)	(+)	17,76 / 18,38

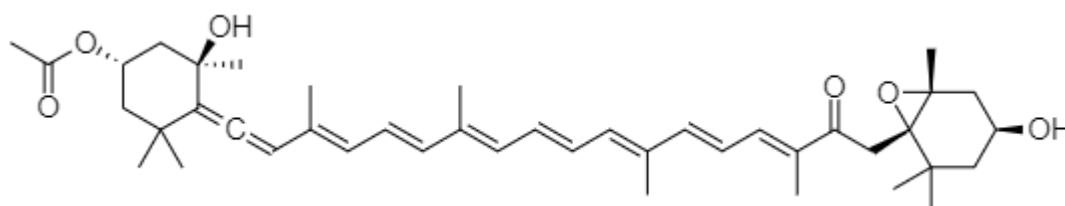
*Collision Energy

Φουκοξανθίνη

Μοριακός Τύπος: C₄₂H₅₈O₆

Μοριακό Βάρος: 658,9 g/mol

Δομή:



Η φουκοξανθίνη είναι από τα πιο άφθονα καροτενοειδή στην φύση, καθώς συνεισφέρει σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 10% της εκτιμώμενης συνολικής παραγωγής καροτενοειδών (Dembitsky and Maoka 2007). Πρόκειται για μια χρωστική που περιέχεται κυρίως σε καστανά φύκια, αλλά και σε μικροφύκη και διάτομα, τα οποία απορροφούν μεγάλες ποσότητες φωτός σε βαθιά θάλασσα (Peng *et al.* 2011).

Λόγω της μοναδικής μοριακής δομής του, δηλαδή του 5,6-μονοεποξειδίου, του ασυνήθιστου αλλενικού δεσμού, αλλά και της πολυενικής αλυσίδας, αυτό το καροτενοειδές έχει αξιοσημείωτες βιολογικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική (Hu *et al.* 2010), αντιφλεγμονώδης (Shiratori *et al.* 2005), αντιδιαβητική (Maeda 2015), και αντικαρκινική δράση (Martin 2015; Satomi 2017), επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση (Hosokawa *et al.* 2004) και έχει αποδειχτεί ότι μειώνει το βάρος σε παχύσαρκα μοντέλα και μπορεί να μειώσει και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και της ινσουλίνης και των λιπιδίων στο ανθρώπινο πλάσμα (Gammone and D’Orazio 2015; Maeda 2015). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι προστατεύει με εξαιρετική αποτελεσματικότητα τα οστά, το δέρμα, τους οφθαλμούς και το καρδιαγγειακό σύστημα. Στα θηλαστικά, η διαιτητική φουκοξανθίνη αποακετυλιώνεται σε φουκοξανθινόλη στην εντερική οδό μέσω ενζύμων και προωθείται στο κυκλοφορικό σύστημα (Peng *et al.* 2011).

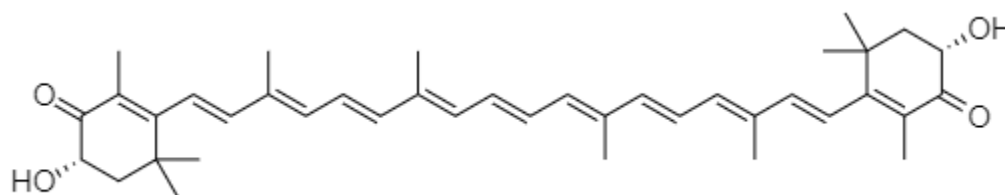
Η μεγάλη βιολογική δραστηριότητά της αξίζει την εμπλοκή της στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων και αρκετά προϊόντα έχουν, ήδη, παρασκευαστεί, όπως ένα προϊόν ζυμαρικών που αναπτύχθηκε το 2010 από τους Kadam και Prabhasankar , το οποίο περιείχε σκόνη του εδώδιμου φύκους, wakame (*Undaria pinnatifida*), που είναι πολύ δημοφιλές στην Ιαπωνία και περιέχει 5-10% φουκοξανθίνη (Kadam and Prabhasankar 2010).

Ασταξανθίνη

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{52}O_4$

Μοριακό Βάρος: 596,8 g/mol

Δομή:



Η ασταξανθίνη είναι η κόκκινη ξανθοφύλλη που προσδίδει το χρώμα του σε κάποια θαλάσσια καρκινοειδή, όπως οι καραβίδες και οι γαρίδες, αλλά και σε ψάρια, όπως ο σολομός. Η χημική δομή της μοιάζει με αυτή του β-καροτενίου με τη διαφορά ότι η ασταξανθίνη έχει επιπλέον μία υδροξυλ- και μία κετο-ομάδα σε κάθε πλευρά του μορίου, όμως δεν έχει δράση προβιταμίνης Α, αν και αποτελεί είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό.

Μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση ασταξανθίνης με θετικές επιδράσεις στην υγεία, όπως η βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας, η μείωση της μυϊκής κόπωσης, η βελτίωση της χρόνιας φλεγμονής κ.ά. Ο μηχανισμός δράσης της σε αυτές τις περιπτώσεις δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά είναι πιθανώς αποτέλεσμα της ικανότητάς της να δεσμεύει ρίζες οξυγόνου, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τις κυτταρικές μεμβράνες από την υπεροξειδωση (Higuera-Ciara *et al.* 2006).

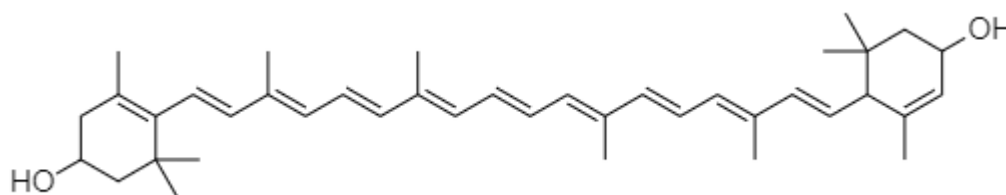
Σε αντίθεση με τα περισσότερα καροτενοειδή, η ασταξανθίνη δεν απαντάται, συνήθως, στα χερσαία φυτά και τα ζώα, αλλά, κυρίως, σε υδάτινους οργανισμούς (Bhosale and Bernstein 2005), παρ' όλα αυτά υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις, όπως τα φλαμίγκος (Fox *et al.* 1967). Οι κύριοι παραγωγοί στη φύση είναι τα υδρόβια οστρακόδερμα, αλλά και τα άλγη και συντίθεται από άλλα πρόδρομα καροτενοειδή, όπως το β-καροτένιο. Υπάρχουν, ωστόσο, μερικά είδη φυκιών, ζυμομυκήτων και βακτηρίων που είναι ικανά να συνθέσουν ασταξανθίνη *de novo* και τα είδη αυτά χρησιμοποιούνται για εμπορική, μεγάλης κλίμακας παραγωγή φυσικής ασταξανθίνης, η οποία χρησιμοποιείται για συμπληρώματα διατροφής, ζωοτροφές και προϊόντα ομορφιάς (Higuera-Ciara *et al.* 2006).

Λουτεΐνη

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}O_2$

Μοριακό Βάρος: 568,9 g/mol

Δομή:



Η λουτεΐνη είναι μία ξανθοφύλλη που έχει συσχετιστεί έντονα με την ωχρά κηλίδα του αμφιβληστροειδούς, καθώς απορροφά την επιβλαβή μπλε ακτινοβολία και

με αυτό τον τρόπο την προστατεύει. Επιπλέον, προστατεύει τον αμφιβληστροειδή από το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή. Αυτό το καροτενοειδές δεν μπορεί να συντεθεί από τον άνθρωπο και για αυτό πρέπει να λαμβάνεται από τη διατροφή του μέσω π.χ. των πράσινων λαχανικών και του κρόκου του αβγού (Nian and Lo 2018). Η λουτεΐνη μπορεί να βρεθεί στο αίμα και το πλάσμα (Meléndez-Martínez *et al.* 2019) και είναι το κύριο καροτενοειδές στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Η κατάσταση της λουτεΐνης συνδέεται με τη γνωστική λειτουργία σε ενήλικες (Vishwanathan *et al.* 2016).

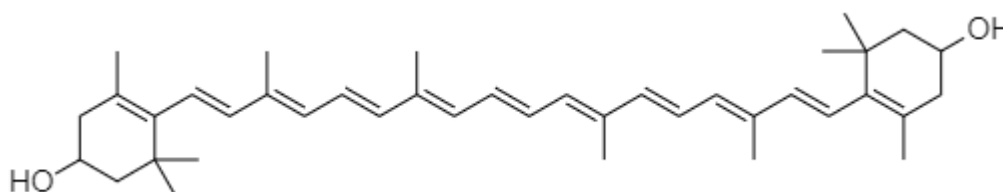
Με δεδομένο ότι η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου της στεφανιαίας αρτηρίας (Coronary Artery Disease-CAD), το 2017 στην Σουηδία, έγινε μία κλινική μελέτη σε 134 ασθενείς, όπου μελετήθηκαν καροτενοειδή, λόγω της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής τους ιδιότητας, στο πλάσμα των ασθενών. Τα κλινικά ευρήματα έδειξαν την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της λουτεΐνης και της ιντερλευκίνης (Interleukin-IL-6), που αποτελεί βιοδείκτη της φλεγμονής, στους ασθενείς. Αυτό, μαζί με το ότι οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της λουτεΐνης λειτούργησαν θετικά και σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells- PBMCs) σε *ex vivo* πειράματα, είναι ενθαρρυντικό, στο να έχει τη δυνατότητα η λουτεΐνη να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στην επίλυση της χρόνιας φλεγμονής σε ασθενείς με CAD (Chung *et al.* 2017).

Ζεαξανθίνη

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}O_2$

Μοριακό Βάρος: 568,9 g/mol

Δομή:



Η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και η *meso*-ζεαξανθίνη, συσσωρεύονται στην ωχρά κηλίδα, και αναφέρονται και οι τρεις μαζί ως χρωστική της ωχράς κηλίδας (Macular Pigment-MP). Οι δύο πρώτες λαμβάνονται από τη διατροφή, και συγκεκριμένα από πηγές, όπως τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, το πορτοκάλι, τα κίτρινα φρούτα κ.ά. (Bernstein *et al.* 2016), ενώ η *meso*-ζεαξανθίνη σχηματίζεται στην κηλίδα από την λουτεΐνη με μεταβολικούς μετασχηματισμούς. Τα τρία αυτά καροτενοειδή

προστατεύουν τους οφθαλμούς χάρις των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και προστατεύοντάς τους από την επιβλαβή μπλε ακτινοβολία (Vishwanathan *et al.* 2016).

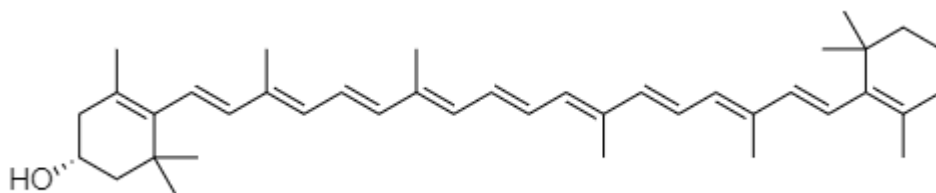
Με την πάροδο του χρόνου, ο κίνδυνος οφθαλμικών ασθενειών, όπως ο ηλικιακός εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας (Age-related Macular Degeneration-AMD) και ο καταρράκτης αυξάνονται. Το σύμπλεγμα MP έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την οπτική λειτουργία σε νοσούντες και μη οφθαλμούς και μειώνει τον κίνδυνο απώλειας της όρασης, καθώς και της εξέλιξης της AMD. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν επιδείξει ότι η κατανάλωση συμπληρωμάτων των τριών χημικών ενώσεων ενισχύει την οπτική λειτουργία (Bernstein *et al.* 2016).

β-Κρυπτοξανθίνη

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}O$

Μοριακό Βάρος: 552,8 g/mol

Δομή:



Η β-κρυπτοξανθίνη είναι μια ξανθοφύλλη λόγω της υδροξυλομάδας στη μία πλευρά του μορίου. Είναι ένα από τα οκτώ καροτενοειδή που βρίσκονται στο ανθρώπινο αίμα, και μπορεί να εντοπιστεί στο πλάσμα, στο μητρικό γάλα και σε διάφορους ιστούς (Meléndez-Martínez *et al.* 2019).

Διατροφικά, η β-κρυπτοξανθίνη παίζει τον ρόλο της προβιταμίνης Α, λόγω του δακτυλίου βιονόνης στη δομή της, που μπορεί να μετατραπεί σε ενεργή ρετινόλη ή βιταμίνη Α στο σώμα. Δρα, επίσης, ως αντιοξειδωτικό, προστατεύοντας τα όργανα και τους ιστούς από οξειδωτική βλάβη, και έτσι, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η β-κρυπτοξανθίνη βελτιώνει την αναπνευστική λειτουργία και μειώνει τον κίνδυνο για τον καρκίνο του πνεύμονα, ενώ σε ιστοκαλλιέργεια, η β-κρυπτοξανθίνη έδειξε άμεσο διεγερτικό αποτέλεσμα επί του σχηματισμού οστού και, ταυτόχρονα, ανασταλτική επίδραση στην επανα-απορρόφηση των οστών (Gammone *et al.* 2015). Το 2008, οι Sugiura *et al.*, σε μελέτη τους παρατήρησαν ότι η υψηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών, που είναι πλούσιες σε β-κρυπτοξανθίνη και β-καροτένιο μπορεί να

προσφέρει οφέλη στην υγεία των οστών σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (Sugiura *et al.* 2008).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το μήκος των τελομερών αποτελεί έναν βιοδείκτη της γήρανσης και έχει παρατηρηθεί ότι η β-κρυπτοξανθίνη είναι ένα από τα καροτενοειδή που προστατεύει τα άκρα των τελομερών. Συγκεκριμένα, σε ενήλικες που στο αίμα τους η περιεκτικότητα σε α-καροτένιο, β-καροτένιο και β-κρυπτοξανθίνη ήταν σε διπλάσια επίπεδα παρατηρήθηκαν σχεδόν 2% μεγαλύτερα σε μήκος τελομερή (Min and Min 2017).

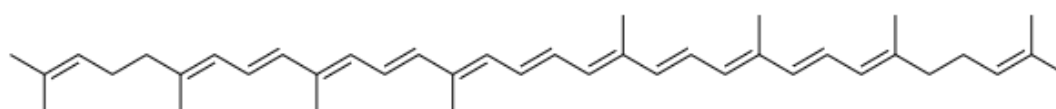
Κύριες διατροφικές πηγές β-κρυπτοξανθίνης είναι τα εσπεριδοειδή, κυρίως, τα πορτοκάλια και τα μανταρίνια, τα ροδάκινα, αλλά και τροπικά φρούτα, όπως η παπάγια (Gammone *et al.* 2015).

Λυκοπένιο

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}$

Μοριακό Βάρος: 536,9 g/mol

Δομή:



Το κόκκινο χρώμα της ντομάτας είναι το αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης λυκοπενίου (Javanmardi and Kubota 2006), και το όνομα του προέρχεται από την λατινική ονομασία αυτού του είδους, *Lycopersicum esculentum*. Μπορεί να βρεθεί, όμως, σε υψηλές συγκεντρώσεις και σε άλλα φρούτα, όπως το καρπούζι, η παπάγια, το κόκκινο γκρέιπφρουτ κ.ά. Στα φυτά, το λυκοπένιο εμφανίζεται, κυρίως, με την μορφή του all-trans ισομερές (Mozos *et al.* 2018), ενώ στο αίμα του ανθρώπου ως cis-ισομερές (Petyaev 2016).

Όπως φαίνεται και από τη χημική δομή του, το λυκοπένιο είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί να προστατεύσει το σώμα μας από τις επιβλαβείς επιδράσεις των ριζών οξυγόνου (Javanmardi and Kubota 2006) και, επιπλέον, παρουσιάζει και αντιφλεγμονώδη δράση (Mozos *et al.* 2018). Η πρόσληψη ντομάτας, και των προϊόντων της, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Javanmardi and Kubota 2006). Επίσης, το λυκοπένιο αποτελεί ένα από τα καροτενοειδή που παίζουν τον ρόλο της προβιταμίνης Α.

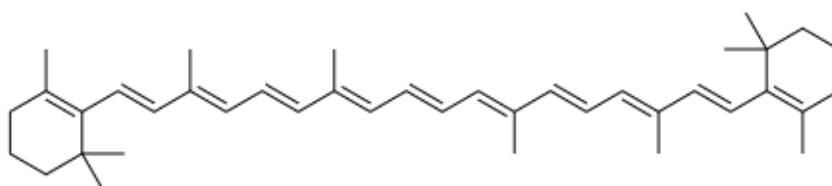
Όσον αφορά την θετική του επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα, φαίνεται ότι αυτό σχετίζεται και με τις υπόλοιπες δράσεις του, αφού έχει επιδείξει *in vivo* αντιαιμοπεταλιακή, αντιυπερτασική, αντιθεροσκληρωτική και αντιπαχυσαρκική δράση, καθώς και μείωση της περιεκτικότητας των λιπιδίων (Mozos *et al.* 2018).

α-Καροτένιο

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}$

Μοριακό Βάρος: 536,9 g/mol

Δομή:



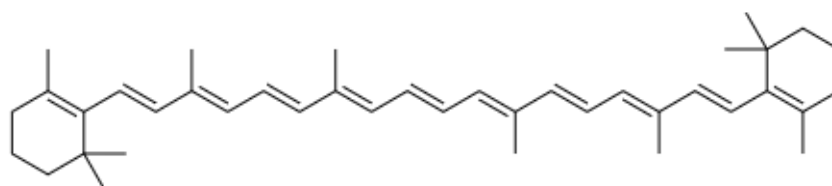
Το α-καροτένιο είναι ένα από τα καροτενοειδή που αποτελούν πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης της βιταμίνης Α, που είναι απαραίτητη για την υγεία των οφθαλμών (Sommer 2001) και του ανοσοποιητικού συστήματος (Stephensen 2001). Όπως και τα υπόλοιπα καροτενοειδή, έτσι και το α-καροτένιο δρα ως αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες και αποτελεί ένα από τα καροτενοειδή που μπορούν να βρεθούν στο πλάσμα του αίματος του ανθρώπου (Polidori *et al.* 2001). Ο συνδυασμός των παραπάνω ιδιοτήτων αυτού του μορίου έχει επιφέρει τον συσχετισμό του με την μακροζωία (Mecocci *et al.* 2000). Τροφές που είναι πλούσιες σε α-καροτένιο είναι το καρότο, η κολοκύθα (Burri *et al.* 2011), το πορτοκάλι κ.ά. (Yokoyama and Vandercook 1967).

β-Καροτένιο

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{56}$

Μοριακό Βάρος: 536,9 g/mol

Δομή:



Το β-καροτένιο αποτελεί το πιο γνωστό καροτενοειδές και το όνομά του σχετίζεται με πολλά οφέλη για την υγεία, αλλά και πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Μέχρι τώρα, έχει αποδειχτεί η αντιοξειδωτική, η αντιβακτηριακή (Lacatusu *et al.* 2012), η αντιφλεγμονώδης (Kawata *et al.* 2018), και η αντινεοπλασματική του δράση (Mathews-Roth 1982), καθώς και η θετική του επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, επειδή αποτελεί ένα από τα πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α (Sommer 2001), περιλαμβάνεται συχνά στον σχεδιασμό τροφίμων ως χρωστική.

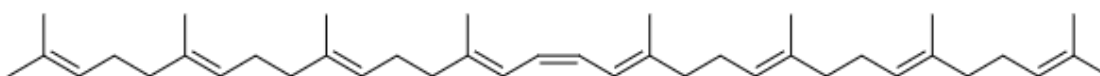
Η πρώτη επιτυχημένη παραγωγή χρωστικών από μικροοργανισμούς στην Ευρώπη ήταν αυτή του β-καροτενίου από τον μύκητα *Blakeslea*, το 1995 (Dufossé *et al.* 2005). Σήμερα, η παραγωγή του είναι, κυρίως από μικροάλγη, με πιο γνωστή πηγή την *Dunaliella salina* (Xu *et al.* 2018).

Φυτοένιο

Μοριακός Τύπος: $C_{40}H_{64}$

Μοριακό Βάρος: 544,9 g/mol

Δομή:



Το φυτοένιο συγκαταλέγεται στα άχρωμα καροτενοειδή, καθώς περιέχει τρεις συζυγιακούς δεσμούς και απορροφά σε μικρότερα μήκη κύματος. Συγκεκριμένα, απορροφά στην περιοχή UV-B (260-320 nm) (Pollmann *et al.* 2017).

Το φυτοένιο, όπως και το φυτοφλουένιο, απαντάται σε πολλά τρόφιμα, όπως οι ντομάτες, τα καρότα, τα εσπεριδοειδή κλπ, και μπορεί να ανιχνευτεί στο πλάσμα του ανθρώπου, στους ιστούς και στο δέρμα (Havas *et al.* 2018), όμως, είναι από τα καροτενοειδή, που συνήθως, παραλείπεται η μελέτη του, αν και είναι πολύ σημαντικό, αφού αποτελεί το ενδιάμεσο προϊόν για τη βιοσύνθεση των υπολοίπων (Nisar *et al.* 2015).

Το φυτοένιο, μόνο του ή και μαζί με το φυτοφλουένιο, ή ακόμα και με άλλες χημικές ενώσεις έχει επιδείξει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντινεοπλασματική δράση και σε έρευνα που έγινε σε αρουραίους που η διατροφή τους περιελάμβανε συμπλήρωμα εκχυλίσματος ντομάτας με υψηλότερη περιεκτικότητα φυτοενίου-φυτοφλουενίου σε σχέση με την περιεκτικότητά του σε λυκοπένιο, παρατηρήθηκε μειωμένη συγκέντρωση ολικής χολιστερόλης στο πλάσμα τους. Επιπλέον, φαίνεται να

επιδρά αποτελεσματικά στην επιδερμίδα, προσδίδοντας οφέλη είτε για την υγεία, αφού το προστατεύει από το ερύθημα που επάγεται από την έκθεσή του στο φως, αλλά βελτιώνει και την ποιότητα του δέρματος, καθώς ερπιδρά θετικά σε χαρακτηριστικά, όπως η ελαστικότητα, η υγρασία, η ξηρότητα κ.ά. και έχει επιδείξει και αντιρυτιδική δράση (Miras-Moreno *et al.* 2019).

Πίνακας 10 Παρουσίαση των συνθηκών χρωματογραφίας.

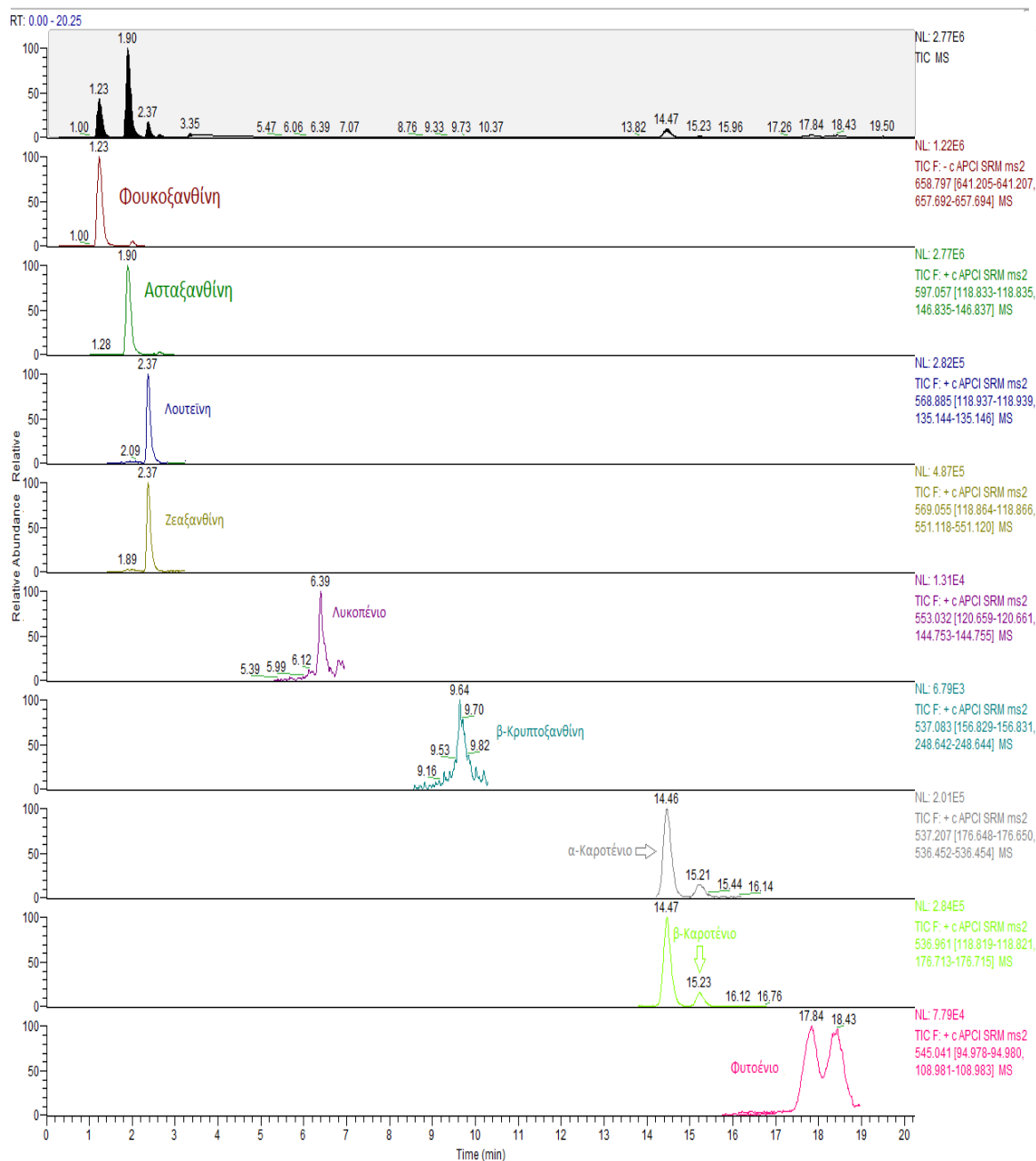
Συνθήκες Χρωματογραφίας					
Στήλη:	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1x100 mm, 1,9 μm (προστήλη:InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1x5mm, 2.7 μm)				
Θερμοκρασία Δείγματος:	10°C				
Θερμοκρασία Στήλης:	42°C				
Όγκος Ένεσης:	10 mL				
Διαλύτης Α:	ACN (Baker, LC-MS grade)				
Διαλύτης Β:	H ₂ O (Baker, LC-MS grade)				
Διαλύτης Γ:	MeOH (Baker, LC-MS grade)				
Βαθμιδωτή Έκλυση:					Ροή
	t (min)	A(%)	B (%)	Γ (%)	(μL/min)
	0,0	62	10	28	450
	0,5	62	10	28	450
	2,0	75	0	25	450
	5,0	75	0	25	450
	7,0	75	0	25	600
	8,0	100	0	0	600
	12,0	100	0	0	600
	14,0	75	0	25	600
	16,0	75	0	25	450
	18,0	62	10	28	450
	25,0	62	10	28	450

Πίνακας 11 Παρουσίαση των συνθηκών του φασματομέτρου μάζας.

Συνθήκες Φασματομέτρου Μάζας	
Πηγή Ιόντων:	APCI
Δυναμικό Ψεκασμού (Spray Voltage):	3500 V (-), 3000 V(+)
Πίεση Αερίου Σύγκρουσης (Collision Gas):	1,5mTorr
Θερμοκρασία Τριχοειδούς (Capillary):	340°C
Θερμοκρασία Εξάτμισης (Vaporizer):	450°C
Κύριο Αέριο (Sheath Gas):	30Arb
Βοηθητικό Αέριο (Auxiliary Gas):	5Arb

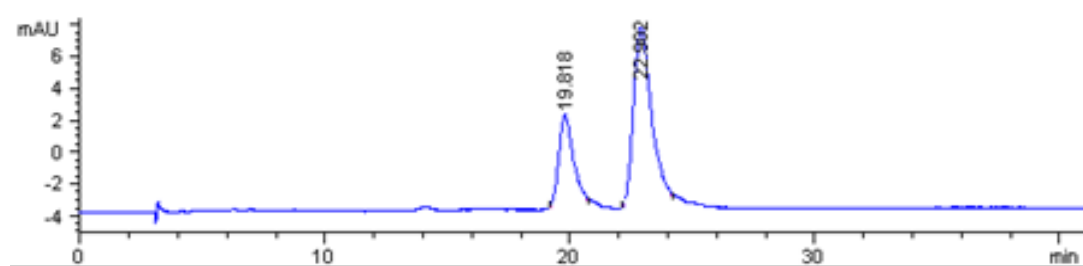
Για την εύρεση των ιόντων του Πίνακα 12, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα, φουκοξανθίνη (*Sigma-Aldrich*, ≥95%), ασταξανθίνη (*United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard*), ζεαξανθίνη (*ExtraSynthese*, ≥98%), λουτεΐνη

(ExtraSynthese, $\geq 95\%$), β -κρυπτοξανθίνη (ExtraSynthese, $\geq 97\%$), λυκοπένιο (Sigma-Aldrich), α -καροτένιο (CaroteNature, $\geq 95\%$), β -καροτένιο (Sigma-Aldrich), φυτοένιο (E-/Z-) (CaroteNature, $\geq 95\%$). Τα ίδια πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα προτύπων συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις για την παρασκευή των διαλυμάτων της πρότυπης καμπύλης.



Εικόνα 28 Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων καροτενοειδών με LC-MS/MS.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 9, αλλά και στο χρωματογράφημα (Εικόνα 26), η ζεαξανθίνη και η λουτεΐνη έχουν ίδιο χρόνο έκλουσης και παρόμοια ιόντα. Αυτό έκανε δύσκολο τον διαχωρισμό τους με αυτή την μέθοδο ανάλυσης και για αυτό χρησιμοποιήθηκε, μία επιπλέον, ανάλυση με HPLC-DAD για την ανάλυση των δύο αυτών χημικών ενώσεων με παρόμοια δομή και χημική συμπεριφορά. Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα HPLC (*Hewlett Packard, series 1100*) με χειροκίνητη ένεση (Loop: 20μL) και μήκος κύματος 450nm (*DAD: Hewlett Packard, series 1050*). Η στατική φάση ήταν η στήλη Nucleosil 100-5 C18, 4.6x250mm, 5 μm σε θερμοκρασία 35 °C και η κινητή φάση ήταν ισοκρατική με διαλύτη το ακετονιτρίλιο και ροή 1000μL/min. Ο συνολικός χρόνος χρωματογραφίας ήταν 35 min. Σε αυτές τις συνθήκες η λουτεΐνη εκλούστηκε πρώτη (19,8 min) και ακολούθησε η ζεαξανθίνη (23,0 min) (Εικόνα 27).



Εικόνα 29 Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων λουτεΐνης και ζεαξανθίνης με HPLC-DAD (450nm).

5.6. Απομόνωση & Ανίχνευση Φυσικών Προϊόντων

Για την απομόνωση των φυσικών προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν τρεις χρωματογραφικοί μέθοδοι διαχωρισμού, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η ημι-παρασκευαστική και η αναλυτική χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Για την TLC, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες χρωματογραφίας με silica (Merck, TLC Silica gel 60 F254) για την HPLC, χρησιμοποιήθηκε ημιπαρασκευαστική στήλη Kromasil C18 250 x 10 mm της MZ Analysentechnik, 5μm και η αναλυτική στήλη Nucleosil 100-5 C18, 4.6x250mm, 5 μm της Macherey-Nagel. Η ταυτοποίηση των χημικών ενώσεων έγινε με λήψη φάσματος Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Συγκεκριμένα, έγινε η λήψη του φάσματος πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ και των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC

(Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Τα φάσματα λήφθηκαν σε φασματογράφους BrukerDRX 400 και BrukerAvanceIII 600 (400 MHz και 600 MHz). Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις η ταυτοποίηση έγινε με τη χρήση προτύπων και με λήψη φάσματος μάζας.

5.6.1. Ανίχνευση Καροτενοειδών

Για την απομόνωση των καροτενοειδών πραγματοποιήθηκε αρχικά η σαπωνοποίηση του δείγματος και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε αυτό οι τεχνικές χρωματογραφίας που αναφέρονται παραπάνω.

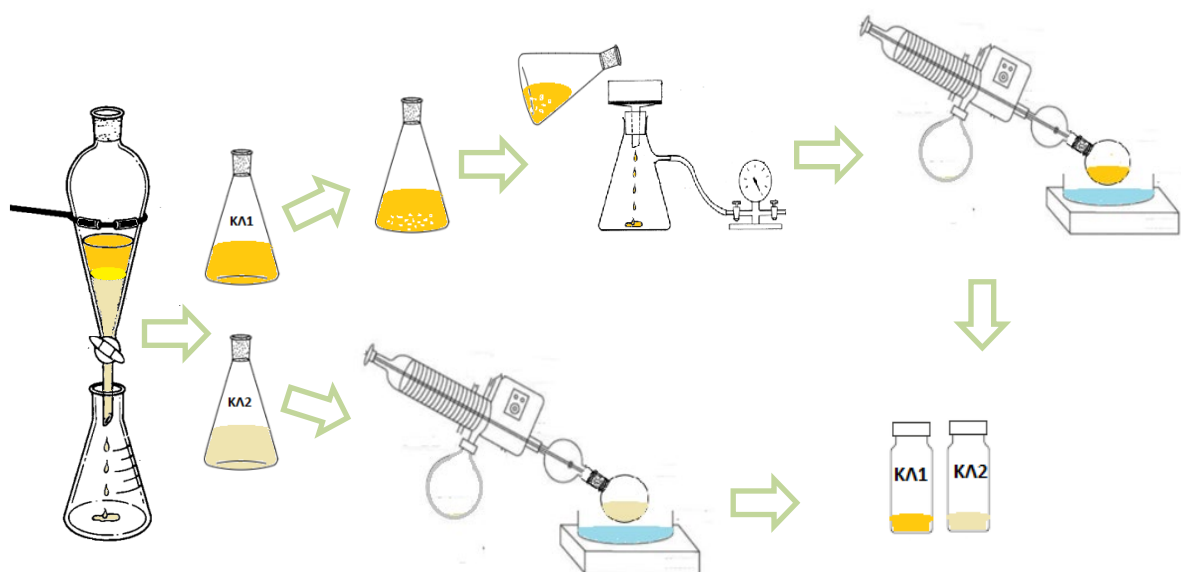
Για την ημιπαρασκευαστική HPLC, χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση το ισοκρατικό σύστημα ACN (*MacronFine Chemocals, HPLC grade*) /MTBE (*CarloErba, HPLC grade*) (70:30) ($t=90\text{min}$, RT, ροή: 1,2mL/min) ενώ η κινητή φάση της αναλυτικής HPLC ήταν το ισοκρατικό σύστημα των ACN:MeOH:AcOOEt (*Fisher, HPLC grade*) (60:20:20) ($t=30\text{min}$, $T=30^\circ\text{C}$, ροή: 1,0mL/min). Και στις δύο χρωματογραφίες ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ο DAD, που αναφέρεται και παραπάνω, με μήκος κύματος 450nm.

Το πρώτο στάδιο ήταν η ένεση 50μL του υπολείμματος της συμπύκνωσης με αλκοόλη του CPEO και η συλλογή των κορυφών της, ως ένας πρώτος διαχωρισμός. Έπειτα, έγινε ο έλεγχος της καθαρότητας των κορυφών με TLC σε διάφορα συστήματα και συνεχίστηκε ο έλεγχος της καθαρότητας ή η περαιτέρω διαδικασία καθαρισμού με την αναλυτική HPLC.

5.6.2. Απομόνωση Φλαβονοειδών

Από τον έλεγχο της περιεκτικότητας σε Ολικά Φλαβονοειδή, φάνηκε ότι τα CPEO, περιέχουν κάποιες ποσότητες φλαβονοειδών και για αυτό τον λόγο έγινε η προσπάθεια απομόνωσης ορισμένων εξ αυτών.

Ο πρώτος διαχωρισμός σε αυτή την περίπτωση ήταν ο διαχωρισμός πολικού-άπολου κλάσματος, καθώς σε αυτή την περίπτωση δεν προηγείτο η διαδικασία της σαπωνοποίησης, όμως, ο διαχωρισμός έγινε με παρόμοια μέθοδο, καθώς έγινε αρχικά διάλυση του δείγματος σε μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα/διεθυλαιθέρα (50:50) (Κλάσμα 1-ΚΛ1) και στην συνέχεια προστέθηκε ίση ποσότητα μίγματος MeOH/H₂O (70:30) (Κλάσμα 2-ΚΛ2). Το μίγμα διαχωρίστηκε στις δύο φάσεις του με τη βοήθεια εκχυλιστικής χοάνης. Έπειτα έγινε συμπύκνωση των κλασμάτων και το υπόλειμμα φυλάχτηκε στην κατάψυξη, αφού πρώτα προστέθηκε αργό, μέχρι την ανάλυσή του.



Εικόνα 30 Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού των δύο κλασμάτων, πολικό και άπολο.

Στη συνέχεια, έγινε η ανάλυση του ΚΛ2 με την ημιπαρασκευαστική HPLC. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες MeOH (*Fisher, HPLC grade*) και H₂O (*Fisher, HPLC grade*) με 0,1% φορμικό οξύ (*Fisher, LC-MS grade*) σε βαθμιδωτό σύστημα, που παρουσιάζεται στον Πίνακα 12 ($t=80\text{min}$, RT, ροή: 1,0 mL/min). Η παρακολούθηση τους έγινε με τον ανιχνευτή DAD σε μήκος κύματος 280nm. Από αυτή την ανάλυση περισυλλέχτηκαν οι κορυφές και ελέχθηκαν για την καθαρότητά τους με TLC σε διάφορα συστήματα.

Ακολούθησε η περαιτέρω ανάλυση των κορυφών με αναλυτική HPLC για τον έλεγχο της καθαρότητάς τους και τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών τους. Το βαθμιδωτό χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα 13. Ο συνολικός χρόνος της χρωματογραφίας είναι $t=20\text{min}$ με ροή: 1,0mL/min και η θερμοκρασία της στήλης $T=30^\circ\text{C}$.

Πίνακας 12 Χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού σε ημιπαρασκευαστική HPLC.

t (min)	A % (MeOH)	B % (H ₂ O 0,1% FA)
0,0	60	40
5,0	60	40
25,0	80	20
30,0	80	20
45,0	90	10
50,0	90	10
65,0	100	0
75,0	100	0
80,0	60	40

Πίνακας 13 Χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού σε αναλυτική HPLC.

t (min)	A % (MeOH)	B % (H ₂ O)
0,0	80	20
17,5	100	0
17,6	80	20
20,0	80	20

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. Αποτελέσματα-Συζήτηση

6.1. Επιλογή Μεθόδου Απομάκρυνσης του Πτητικού Κλάσματος

Για την επιλογή του καλύτερου τρόπου απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος έγινε η σύγκριση των αποτελεσμάτων από την Περιεκτικότητα Ολικών Καροτενοειδών (Πίνακας 15) και τις αποδόσεις της τελικής μάζας του δείγματος (Πίνακας 14) στο τέλος της κάθε κατεργασίας.

Πίνακας 14 Αποδόσεις Μάζας.

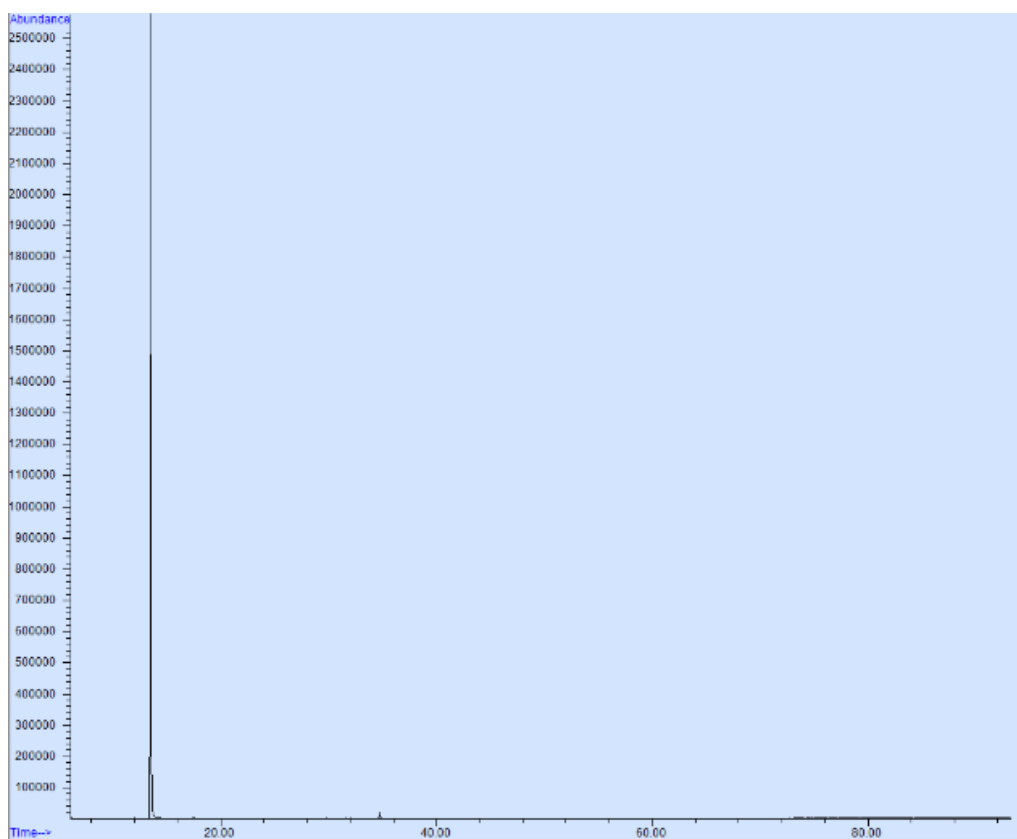
Αποδόσεις Μάζας μετά την Απομάκρυνση του Πτητικού Κλάσματος					
CPEO	Απόσταξη (~100°C)		Συμπύκνωση (~80°C)	Συμπύκνωση με Αλκοόλη (<35 °C)	
	Hex	DCM		Αιθανόλη	Ισοπροπανόλη
Μανταρίνι	3,7%	0,2%	5,8%	5,6%	5,4%
Πορτοκάλι	2,5%	0,8%	3,9%	3,8%	3,9%
Λεμόνι	1,4%	0,7%	5,0%	4,1%	3,2%
Γκρέιπφρουτ	-	-	-	14,6%	14,2%

Για την απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος πραγματοποιήθηκαν οι τρεις διαδικασίες που αναφέρονται παραπάνω και στον πίνακα 14 φαίνονται οι αποδόσεις που προέκυψαν για τα CPEO μανταρινιού, πορτοκαλιού και λεμονιού, καθώς και γκρέιπφρουτ (μόνο για την συμπύκνωση με τις αλκοόλες). Είναι προφανές ότι η καλύτερη απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος γίνεται με την απόσταξη (μικρότερη απόδοση), όμως, όπως και στην περίπτωση της συμπύκνωσης με θερμοκρασία ~80°C, η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή είναι χαμηλότερη (Πίνακας 15) λόγω της καταστροφής τους από την υψηλή θερμοκρασία και εφόσον ο στόχος της διατριβής είναι η χρήση του ως διατροφικό πρόσθετο σε συμπληρώματα διατροφής ζώων λόγω της περιεκτικότητάς τους σε καροτενοειδή, ο καλύτερος τρόπος απομάκρυνσης του είναι με προσθήκη αλκοόλης και συμπύκνωση.

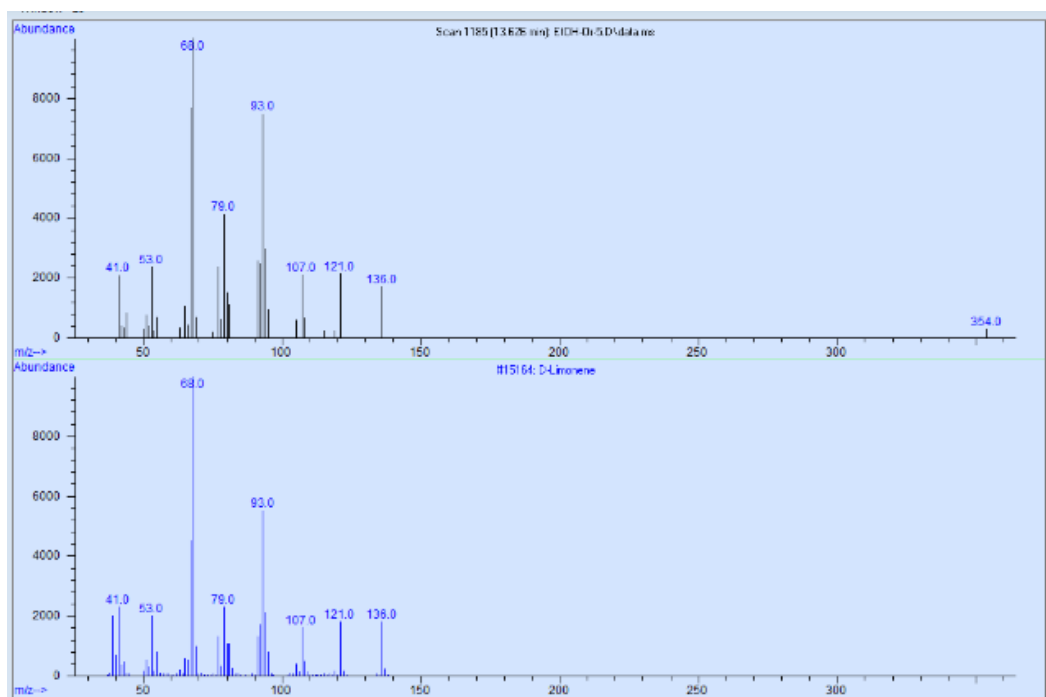
Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι αλκοόλες μεθανόλη, αιθανόλη και ισοπροπανόλη. Η μεθανόλη, εκτός από το ότι απαγορεύεται να χρησιμοποιηθεί λόγω

τοξικότητας, είχε και μικρή απόδοση απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος, αφού οι ποσότητες που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ήταν πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της ισοπροπανόλης και της αιθανόλης. Στην περίπτωση των άλλων δύο αλκοολών, ενώ η απόδοση ήταν περίπου η ίδια (Πίνακας 14) (για την απομάκρυνση 1g πτητικού κλάσματος ήταν απαραίτητη η ποσότητα περίπου 10 mL αλκοόλης), θεωρήθηκε καλύτερη επιλογή η ισοπροπανόλη ως οικονομικότερο μέσο λόγω της υψηλής φορολογίας της αιθανόλης.

Στην αλκοόλη, που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος, έγινε η ανάλυσή της με GC-MS (*Agilent Technologies GC System 7890A, Mass Detector 5975C*). Όπως ήταν αναμενόμενο η κύρια χημική ένωση που παρατηρήθηκε ήταν το D-λεμονένιο, καθώς αποτελεί το 90-95% του πτητικού κλάσματος του CPEO, ενώ υπήρχαν και μικρές περιεκτικότητες και άλλων πτητικών ενώσεων, όπως το β-μυκρένιο.



Εικόνα 31 Χρωματογράφημα GC-MS της αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος.



Εικόνα 32 Σύγκριση του φάσματος μάζας της κορυφής του D-λεμονενίου με την χρήση βιβλιοθήκης (NIST05) για την επιβεβαίωσή του.

6.2. Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Καροτενοειδών

Όπως ήταν αναμενόμενο, η περιεκτικότητα των καροτενοειδών είναι υψηλότερη στο αρχικό δείγμα CPEO. Είναι προφανές, πως η υψηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή μεγάλου μέρους των καροτενοειδών που περιέχοναν στο αρχικό δείγμα.

Αυτό που είναι ενδιαφέρον, είναι ότι η συμπύκνωση στους 80°C , έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη περιεκτικότητα καροτενοειδών σε σύγκριση με την περιεκτικότητα των από την απόσταξη ($\sim 100^{\circ}\text{C}$). Αυτό πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι η απόσταξη έλαβε χώρα μόνο για 3h, ενώ στην περίπτωση της συμπύκνωσης η κατεργασία του δείγματος διήρκεσε περίπου 24h.

Από τα αποτελέσματα της TCC φαίνεται ότι το πιο πλούσιο σε καροτενοειδή δείγμα είναι το πορτοκάλι, ενώ το πιο φτωχό είναι το γκρέιπφρουτ.

Πίνακας 15 Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Καροτενοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg β-καροτενίου Eq β-car/100g CPEO ($y = 67,2827x + 0,0175976$, $R^2 = 0,9989$).

CPEO	Χωρίς κατεργασία CPEO	Απόσταση (≈100°C)		Συμπύκνωση (≈80°C)	Συμπύκνωση με Αλκοόλη (<35 °C)
		Hex	DCM		
Μανταρίνι	1,049±0,001	0,221±0,000	0,060±0,000	0,043±0,001	0,714±0,002
Πορτοκάλι	1,256±0,007	0,471±0,005	0,073±0,010	0,127±0,001	1,063±0,004
Λεμόνι	0,075±0,001	0,011±0,000	0,025±0,000	0,012±0,000	0,039±0,001
Γκρέιπφρουτ	<i>nf</i>	-	-	-	<i>nf</i>

**nf*: not found, δεν βρέθηκε στο δείγμα.

6.3. Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φλαβονοειδών

Μετά από την κατεργασία των CPEO με την αλκοόλη για την παρασκευή αζεοτροπικού μίγματος με το D-λεμονένιο και την απομάκρυνσή του έγινε η μέτρηση της Περιεκτικότητας των Ολικών Φλαβονοειδών του CPEO. Πριν από την μέτρηση της περιεκτικότητας, προηγήθηκε ο διαχωρισμός πολικού-άπολου κλάσματος, όπως περιγράφεται παραπάνω (Εκόνα 28). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16 Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φλαβονοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης EqQ/100g CPEO ($y = 0,012637x + 0,068866$, $R^2 = 0,9994$).

CPEO	Συμπύκνωση με Αλκοόλη (<35°C)
Μανταρίνι	1,387±0,010
Πορτοκάλι	0,421±0,005
Λεμόνι	0,274±0,005
Γκρέιπφρουτ	Nf

**nf*: not found, δεν βρέθηκε στο δείγμα.

6.4. Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φαινολικών

Στο πολικό κλάσμα που προέκυψε μετά από την κατεργασία των CPEO με την αλκοόλη και την υγρή-υγρή εκχύλιση που ακολούθησε με το μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-διαιθυλεθέρα και το μίγμα MeOH-H₂O, έγινε και η μέτρηση της περιεκτικότητας των Ολικών Φαινολικών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17 Αποτελέσματα Ολικής Περιεκτικότητας Φαινολικών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος GAE/100g CPEO ($y = 0,0052231x + 0,074199, R^2 = 0,9998$).

CPEO	Συμπύκνωση με Αλκοόλη (<35°C)
<i>Μανταρίνι</i>	4,468 ± 0,032
<i>Πορτοκάλι</i>	3,882 ± 0,023
<i>Λεμόνι</i>	2,501 ± 0,013
<i>Γκρέιπφρουτ</i>	0,833 ± 0,125

6.5. Αποτελέσματα Ανάλυσης Καροτενοειδών

Από τις αναλύσεις LC-MS/MS και HPLC-DAD, που περιγράφονται παραπάνω, προέκυψαν μετά από στατιστική ανάλυση με την μέθοδο ANOVA, τα αποτελέσματα του πίνακα 19. Σε όλες τις περιπτώσεις η τιμή p της στατιστικής ανάλυσης ήταν μικρότερη του 0,05, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ των μεταβλητών x και y με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Επιπλέον, το RSD% των αναλύσεων των αναλυτών ήταν μικρότερο του 20%.

Πριν από την μέτρηση των δειγμάτων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης των αναλυτών. Οι αναλύτες διαλύθηκαν, αρχικά, σε διαλύτες για την παρασκευή διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης (διαλύματα παρακαταθήκης), τα οποία φυλάχτηκαν στους -20°C, αφού πρώτα σφραγίστηκαν με αργό. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκε ένα ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης που περιείχε τους αναλύτες φουκοξανθίνη (DMSO, 2000μg/mL), ασταξανθίνη (χλωροφόρμιο, 96μg/mL), β-κρυπτοξανθίνη (χλωροφόρμιο, 970μg/mL), α-καροτένιο (χλωροφόρμιο, 490μg/mL), β-καροτένιο (χλωροφόρμιο, 90μg/mL) και φυτοένιο (χλωροφόρμιο, 1225μg/mL) σε συγκέντρωση 20μg/mL. Η αραιώση έγινε με μεθανόλη (διάλυμα Α). Ένα ακόμα ενδιάμεσο διάλυμα λουτεΐνης (χλωροφόρμιο-μεθανόλη, 38μg/mL) και ζεαξανθίνης (χλωροφόρμιο-μεθανόλη, 27,5μg/mL) συγκέντρωσης 20μg/mL, επίσης, σε μεθανόλη (διάλυμα Β) και ένα διάλυμα λυκοπενίου συγκέντρωσης 0,78μg/mL σε χλωροφόρμιο (διάλυμα Γ).

Για την παρασκευή του διαλύματος λυκοπενίου, η πρότυπη ένωση διαλύθηκε σε χλωροφόρμιο και μετά φιλτραρήστηκε με φίλτρο σύριγγας PTFE (μέγεθος πορου

0,45μm), καθώς αντιμετωπίστηκε πρόβλημα δυσδιαλυτότητας. Έπειτα, το διάλυμα μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο human CORPORATION (*x-ma 1000*) σε μήκος κύματος 484,5nm ($\epsilon=164 \times 10^3 \text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ σε χλωροφόρμιο) (Takehara *et al.* 2014) και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σύμφωνα με τον νόμο Beer–Lambert.

Για τους αναλύτες που προσδιορίστηκαν με το σύστημα LC-MS/MS, η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε για τις συγκεντρώσεις 0,050, 0,150, 0,300, 0,500, 0,800μg/mL για τους αναλύτες του διαλύματος Α, ενώ για το λυκοπένιο οι συγκεντρώσεις ήταν 0,026, 0,039, 0,065, 0,130, 0,390μg/mL. Για τους αναλύτες που προσδιορίστηκαν με το σύστημα HPLC-DAD, η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε για τις συγκεντρώσεις 0,100, 0,250, 0,500, 1,000μg/mL.

Πίνακας 18 Εξίσωση πρότυπης καμπύλης, R^2 , ελάχιστο όριο ανίχνευσης (LOD) και ελάχιστο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) των αναλυτών.

Καροτενοειδή	Εξίσωση	R^2	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Φουκοξανθίνη	$y = -17817,2 + 4404190x$	0,9999	0,047	0,142
Ασταξανθίνη	$y = 162650 + 10238800x$	0,9995	0,172	0,522
β-Κρυπτοξανθίνη	$y = -2616,07 + 40714,9x$	0,9996	0,138	0,418
Λυκοπένιο	$y = -4003,79 + 166207x$	0,9996	0,016	0,047
α-Καροτένιο	$y = -30039,5 + 972849x$	0,9999	0,073	0,220
β-Καροτένιο	$y = -2161,51 + 205275x$	0,9995	0,135	0,411
Φυτοένιο (E-/Z-)	$y = -18076,6 + 1310840x$	0,9997	0,043	0,131
Λουτεΐνη	$y = -0,935207 + 24,2383x$	0,9994	0,065	0,197
Ζεαξανθίνη	$y = -1,06364 + 60,1119x$	0,9983	0,080	0,242

Πίνακας 19 Αποτελέσματα ανάλυσης καροτενοειδών εκφρασμένα σε mg καροτενοειδούς ανά 100g CPEO (mg/100g CPEO) από την ανάλυση με LC-MS/MS και HPLC-DAD. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις πριν από την σαπωνοποίηση (π.σ.) και μετά από αυτήν (μ.σ.).

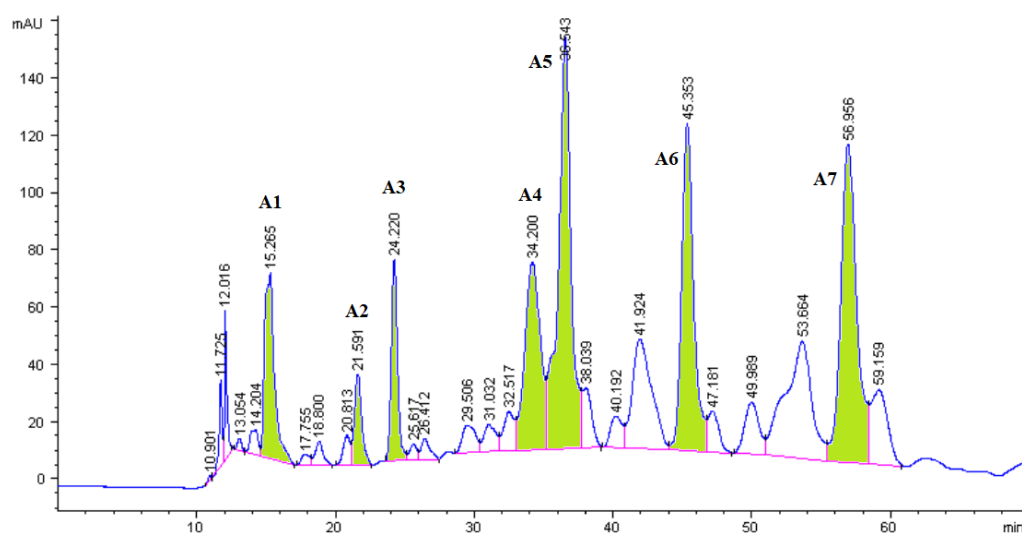
Καροτενοειδή	Πορτοκάλι		Μανταρίνι		Λεμόνι		Γκρέιπφρουτ	
	π.σ.	μ.σ.	π.σ.	μ.σ.	π.σ.	μ.σ.	π.σ.	μ.σ.
Φουκοξανθίνη	NF	NF	NF	NF	T	NF	T	NF
Ασταξανθίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
β-Κρυπτοξανθίνη	2,60±1,23	14,53±1,06	0,10±0,00	27,53±6,99	0,24±0,00	0,40±0,05	NF	0,11±0,05
Λυκοπένιο	0,04±0,04	0,59±0,48	0,04±0,00	0,65±1,26	NF	0,22±0,03	0,09±0,00	0,11±0,04
α-Καροτένιο	0,30±0,00	T	t	t	T	T	T	t
β-Καροτένιο	T	T	NF	NF	T	T	T	NF
Φυτοένιο (E-)	NF	0,22±0,07	NF	0,57±0,35	NF	0,20±0,03	T	NF
Φυτοένιο (Z-)								
Λουτεΐνη	T	12,43±2,23	NF	2,14±0,15	NF	0,36±0,01	NF	0,30±0,02
Ζεαξανθίνη	NF	4,49±1,73	NF	NF	NF	T	NF	NF

6.6. Απομόνωση Φυσικών Προϊόντων

6.6.1. Ανίχνευση Καροτενοειδών

Σύμφωνα με την Ολική Περιεκτικότητα Καροτενοειδών και μετά από την ανάλυση των δειγμάτων με LC-MS/MS, φαίνεται ότι τα πιο πλούσια σε καροτενοειδή δείγματα είναι το μανταρίνι και το πορτοκάλι.

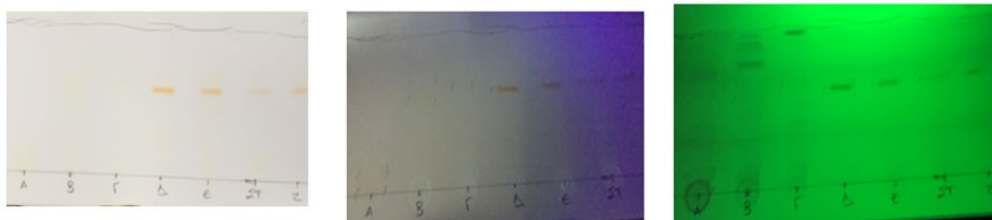
Έτσι, το υπόλειμμα του CPEO_{μανταρίνι} που προέκυψε μετά από την επεξεργασία του με προσθήκη αλκοόλης (ισοπροπανόλη) και συμπύκνωση υπό κενό, αναλύθηκε στην ημιπαρασκευαστική στήλη C18 με το ισοκρατικό σύστημα ACN/MTBE (70:30), που αναφέρεται παραπάνω, και προέκυψε το χρωματογράφημα:



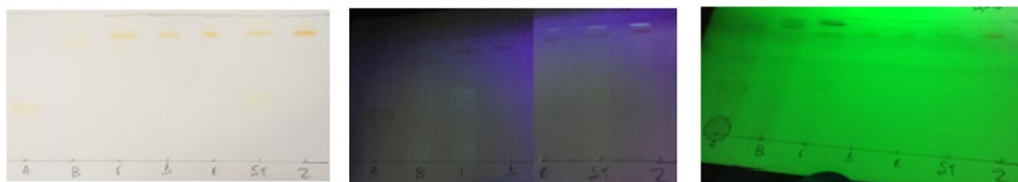
Εικόνα 33 Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικού HPLC του άπολου κλάσματος δείγματος μανταρινιού μετά από σαπωνοποίηση.

Οι 7 κορυφές (A1, A2, A3, A4, A5, A6 και A7) του μανταρινιού περισυλλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν TLC σε διάφορα συστήματα, κάποια από αυτά εμφανίζονται παρακάτω, όπου γίνεται η παρατήρησή τους Α) στο ορατό, Β) σε UV 365nm και Γ) σε UV 254nm:

Σύστημα 20%EthylAcetate – 80% Hexane:



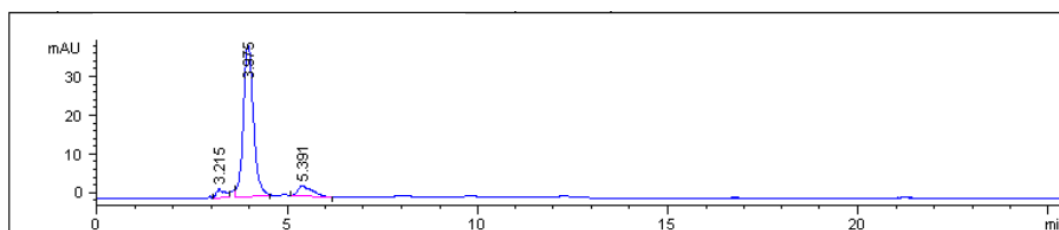
Σύστημα 31,7%EthylAcetate – 68,3% Hexane:



Εικόνα 34 TLC των κλασμάτων που προέκυψαν από την ημιπαρασκευαστική HPLC του άπολου κλάσματος.

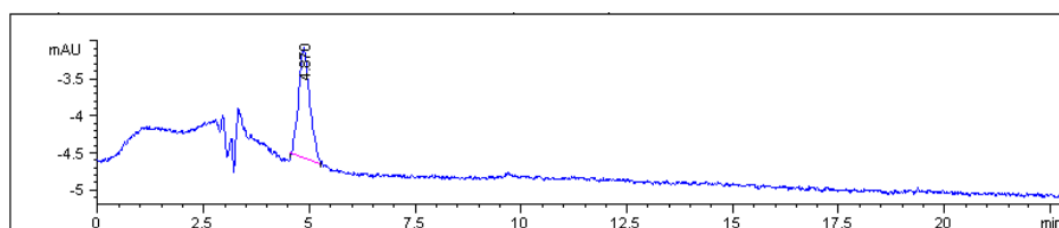
Έπειτα οι κορυφές αναλύθηκαν με αναλυτικό HPLC με στατική φάση C18 και κινητή φάση το ισοκρατικό σύστημα ACN:MeOH:AcOOEt (60:20:20) και προέκυψαν τα χρωματογράφημα:

Κορυφή A1:



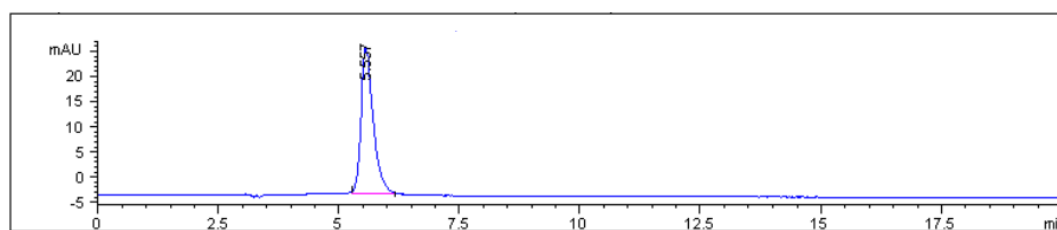
Εικόνα 35 Χρωματογράφημα κορυφής A1 σε μήκος κύματος 450 nm (19,4mg/100g CPEO).

Κορυφή A2:



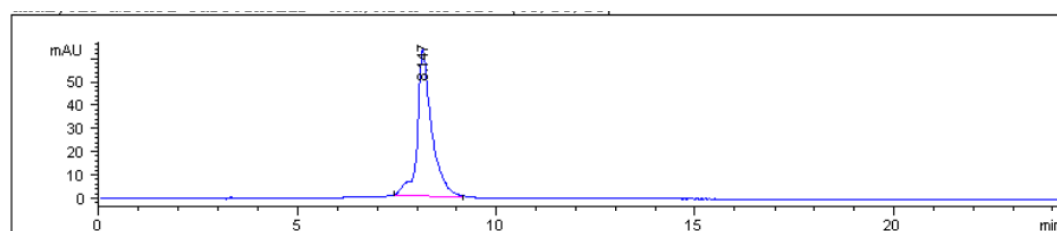
Εικόνα 36 Χρωματογράφημα κορυφής A2 σε μήκος κύματος 450 nm (36,9mg/100g CPEO).

Κορυφή A3:



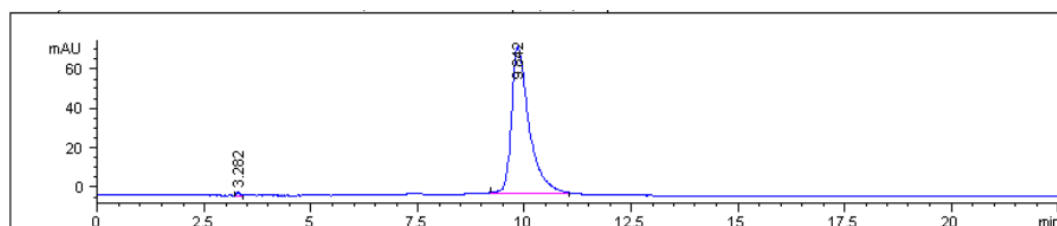
Εικόνα 37 Χρωματογράφημα κορυφής A3 σε μήκος κύματος 450 nm (7,1mg/100g CPEO).

Κορυφή A4:



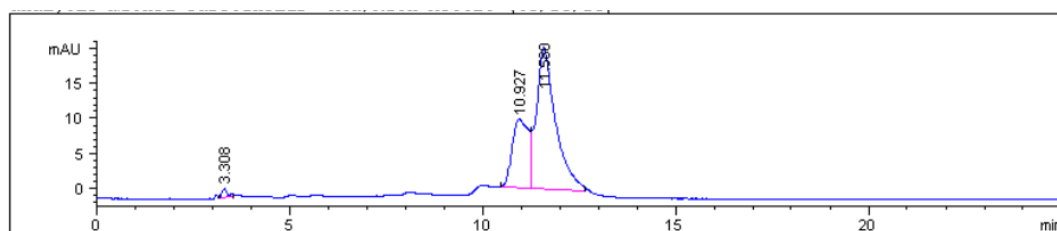
Εικόνα 38 Χρωματογράφημα κορυφής A4 σε μήκος κύματος 450 nm (1,8mg/100g CPEO).

Κορυφή A5:



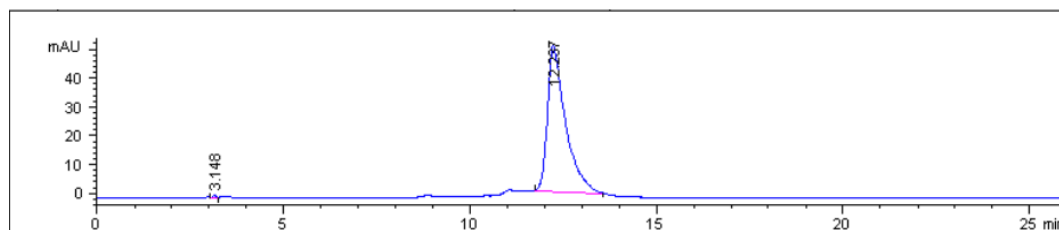
Εικόνα 39 Χρωματογράφημα κορυφής A5 σε μήκος κύματος 450 nm (15,3mg/100g CPEO).

Κορυφή A6:



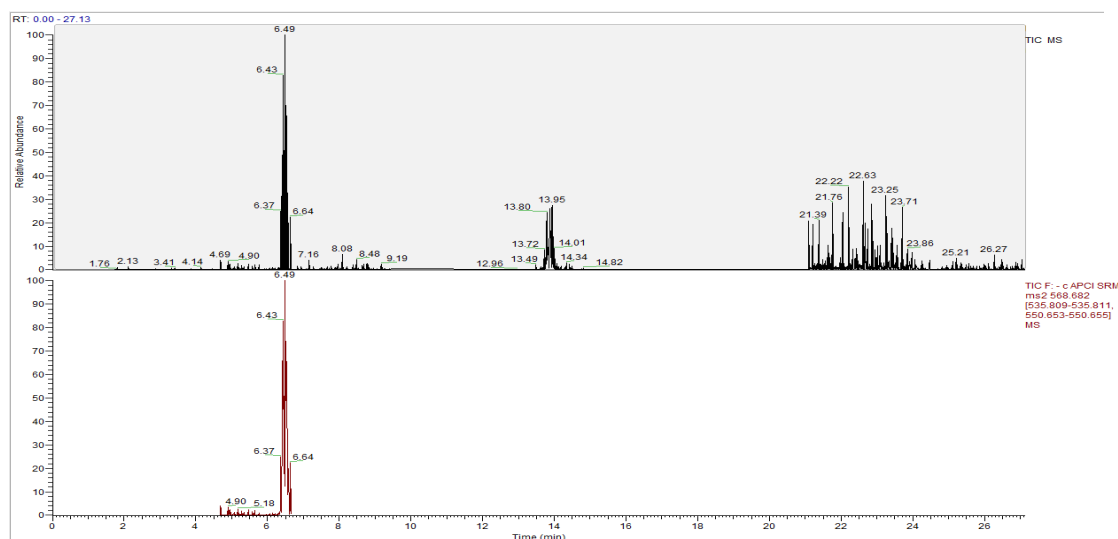
Εικόνα 40 Χρωματογράφημα κορυφής A6 σε μήκος κύματος 450 nm (12,3mg/100g CPEO).

Κορυφή A7:

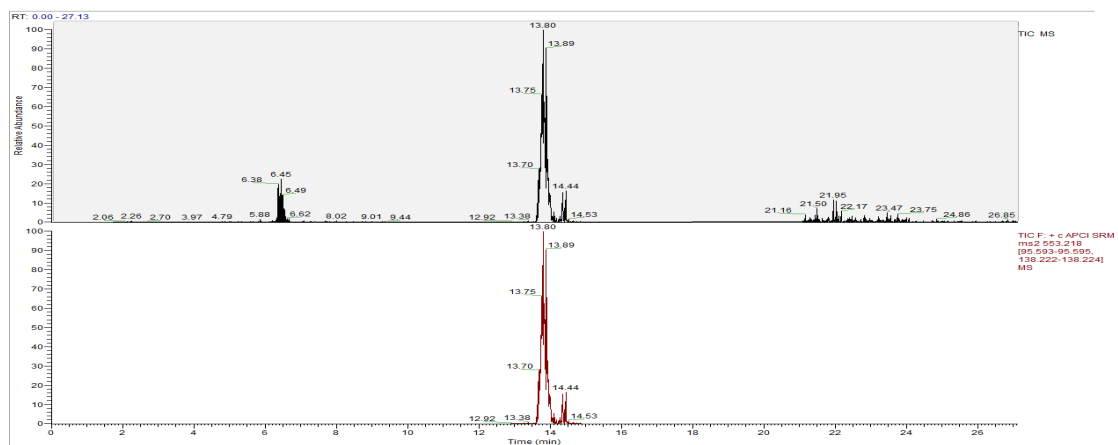


Εικόνα 41 Χρωματογράφημα κορυφής A7 σε μήκος κύματος 450 nm (21,1mg/100g CPEO).

Από τις παραπάνω κορυφές μόνο δύο μπόρεσαν να προσδιοριστούν, οι κορυφές A4 και A5, οι οποίες αναλύθηκαν με το σύστημα LC-MS/MS Accela της Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), σε μέθοδο με SRM mode, η οποία είχε αναπτυχθεί με τη βοήθεια προτύπων και προέκυψαν τα χρωματογραφήματα των εικόνων 42 και 43.

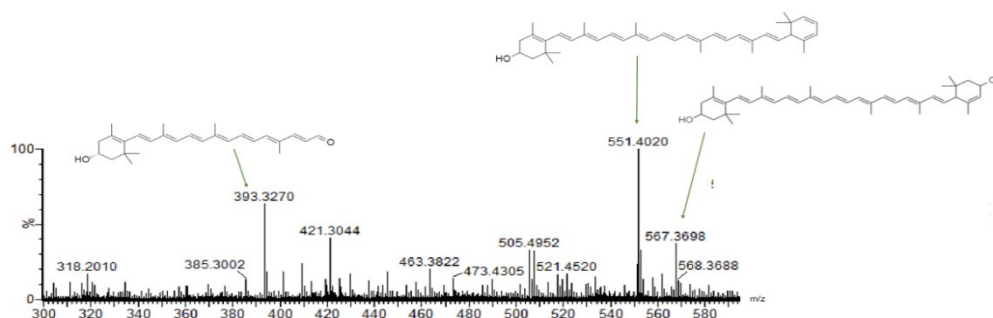


Εικόνα 42 Στο χρωματογράφημα εμφανίζεται ως κύρια κορυφή αυτή της λουτεΐνης (ms/ms (-): 568,682/535,810 & 568,682/550,654).

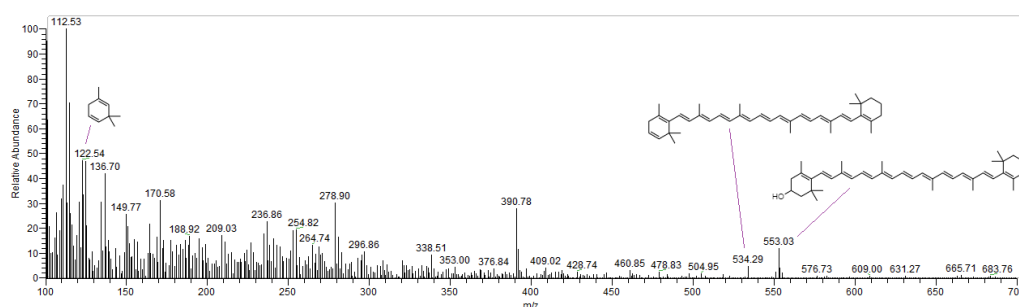


Εικόνα 43 Στο χρωματογράφημα εμφανίζεται ως κύρια κορυφή αυτή της β-κρυπτοξανθίνης (ms/ms (+): 553,218/95,594 & 553,218/138,223).

Επιπλέον, έγινε η λήψη φάσματος μάζας και επιβεβαιώθηκε και με αυτόν τον τρόπο η ανίχνευση της λουτεΐνης και της β-κρυπτοξανθίνης στις κορυφές A4 και A5, αντίστοιχα.



Εικόνα 44 Φάσμα μάζας της κορυφής A4.



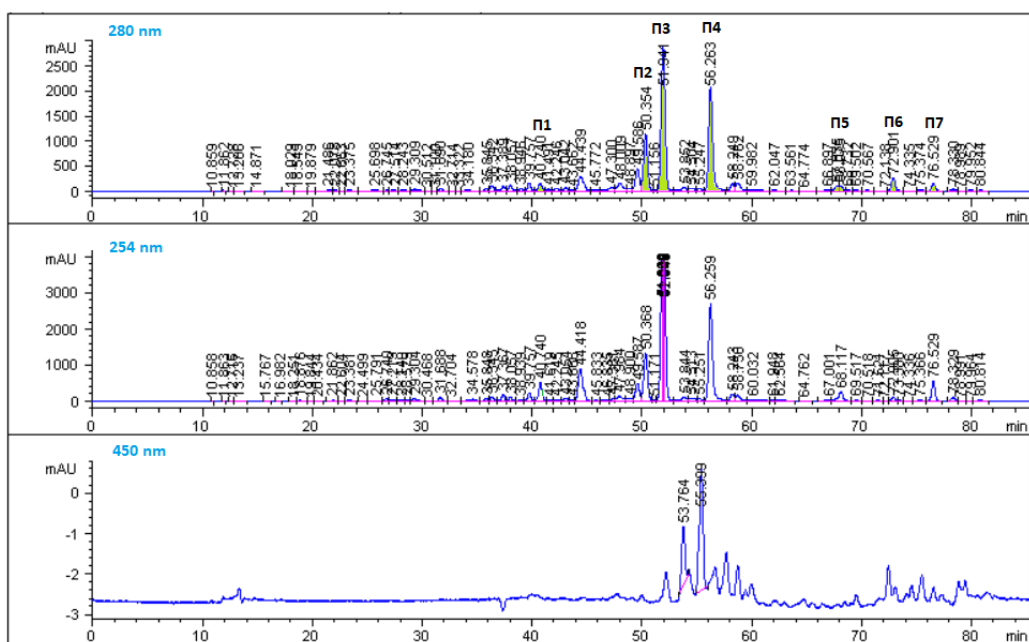
Εικόνα 45 Φάσμα μάζας της κορυφής A5.

6.6.2. Απομόνωση Φλαβονοειδών

Για την απομόνωση φλαβονοειδών, το πρώτο βήμα ήταν ο αρχικός διαχωρισμός πολικού και άπολου κλάσματος του υπολείμματος CPEO. Στην περίπτωση των καροτενοειδών αυτό το βήμα γίνεται με την σαπωνοποίηση, από την οποία παραλαμβάνεται μόνο το άπολο κλάσμα.

Το υπόλειμμα του CPEO_{μανταρίνι} αναλύθηκε στην ημιπαρασκευαστική στήλη C18 σε διάφορα συστήματα ώστε να βρεθεί ο καλύτερος διαχωρισμός. Από αυτή την διαδικασία προέκυψε ότι ο καλύτερος διαχωρισμός κορυφών γίνεται με βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης με MeOH/H₂O με 0,1% φορμικό οξύ. Το σύστημα έκλουσης απεικονίζεται στον Πίνακα 12. Ο ανιχνευτής είναι ο DAD με μήκος κύματος 280nm, 254nm και 450nm.

Από την παραπάνω ανάλυση προέκυψε το χρωματογράφημα:



Εικόνα 46 Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικού HPLC του πολικού κλάσματος δείγματος μανταρινιού.

Για ορισμένες από τις κορυφές που φαίνονται στο χρωματογράφημα πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε διάφορα συστήματα με παρατήρησή τους σε UV στα Α) 365 nm Β) 254 nm, ένα από αυτά φαίνεται παρακάτω:

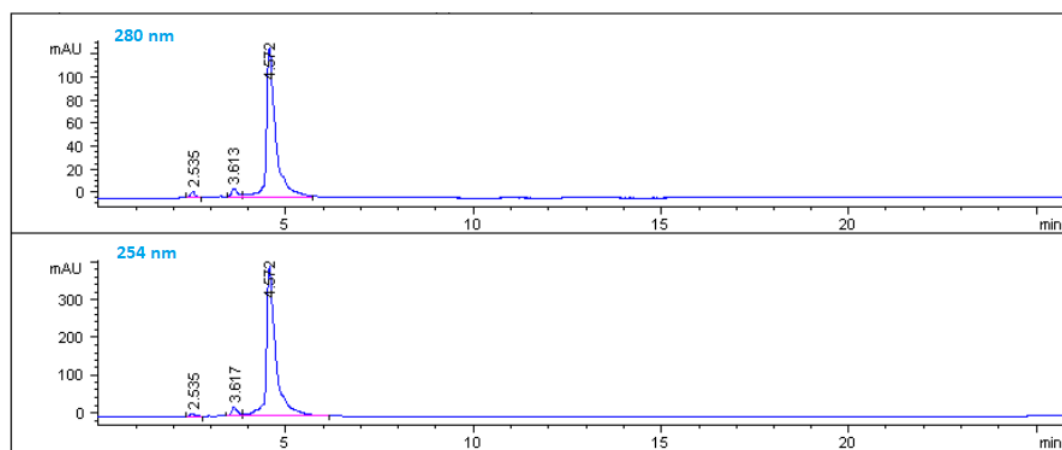
Σε σύστημα MeOH-H₂O 25:75:



Εικόνα 47 TLC των κλασμάτων που προέκυψαν από την ημιπαρασκευαστική HPLC του πολικού κλάσματος (365 και 254 nm).

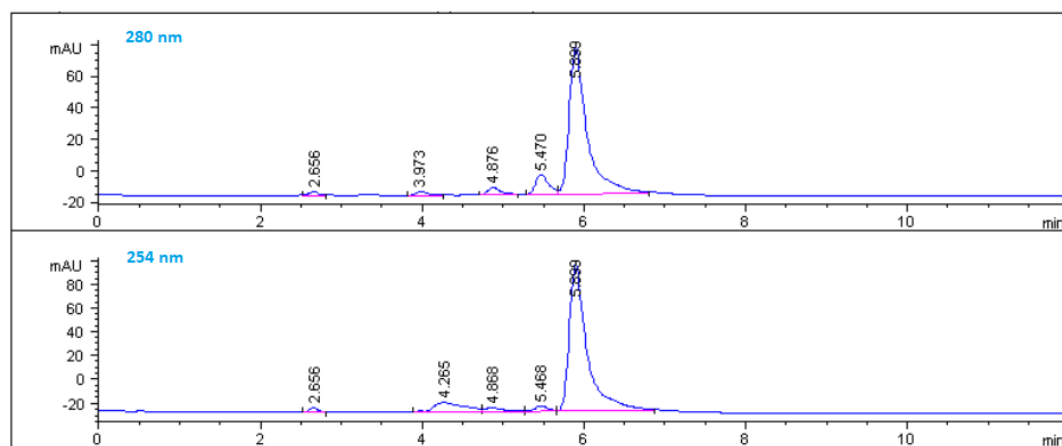
Για περαιτέρω καθαρισμό, ακολούθησε η χρωματογραφία HPLC σε αναλυτική στήλη C18 και με βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Ο ανιχνευτής ήταν και σε αυτή την ανάλυση ο DAD με μήκη κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π1:



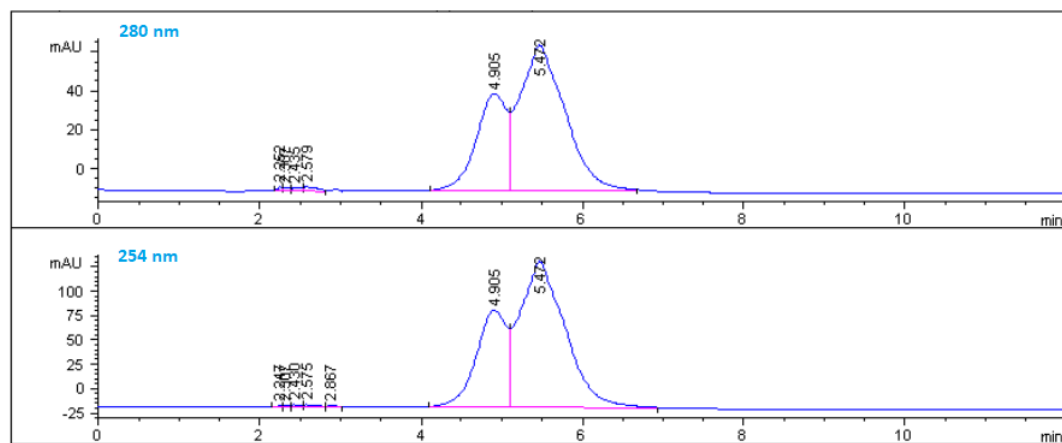
Εικόνα 48 Χρωματογράφημα κορυφής Π1 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π2:



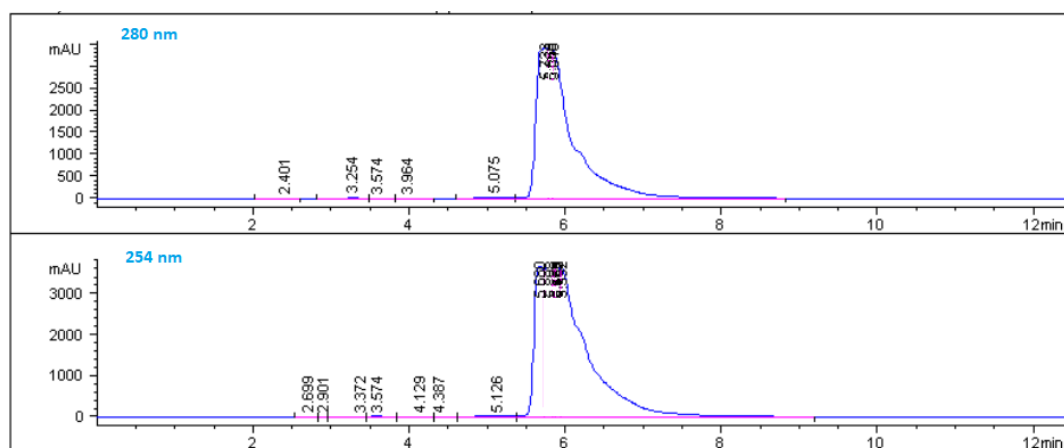
Εικόνα 49 Χρωματογράφημα κορυφής Π2 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π3:



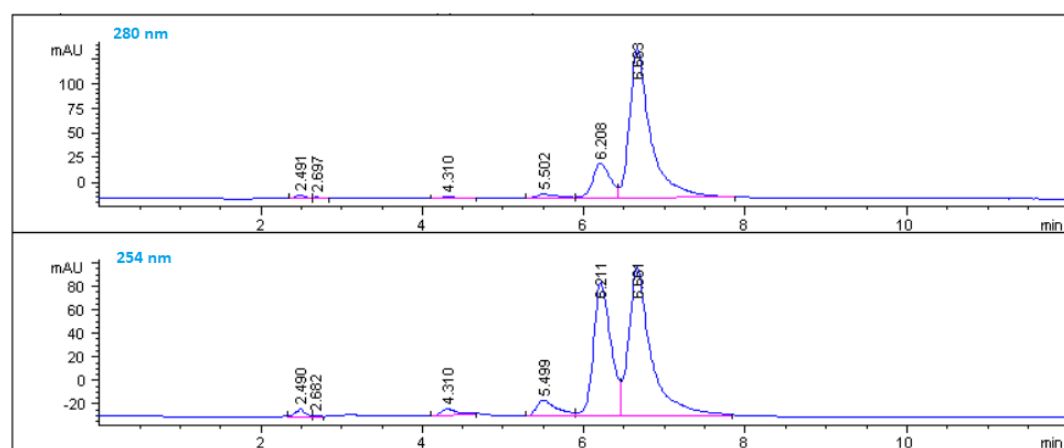
Εικόνα 50 Χρωματογράφημα κορυφής Π3 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Όπου όταν συλλέχτηκε αρκετή ποσότητα έγινε περαιτέρω καθαρισμός και προέκυψε το χρωματογράφημα:



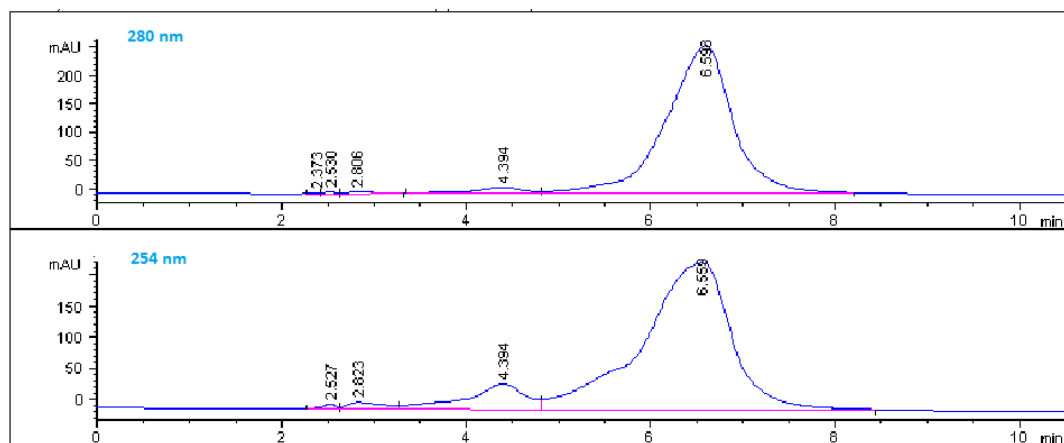
Εικόνα 51 Χρωματογράφημα της δεύτερης κορυφής, που φαίνεται στην Εικ. 45, σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π4:



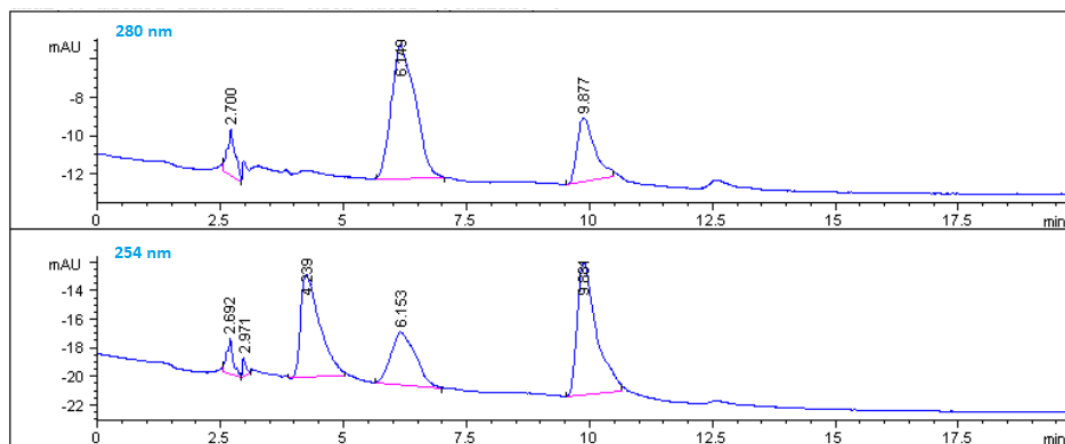
Εικόνα 52 Χρωματογράφημα κορυφής Π4 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Όπου όταν συλλέχτηκε αρκετή ποσότητα έγινε περαιτέρω καθαρισμός έγινε περαιτέρω καθαρισμός και προέκυψε το χρωματογράφημα:



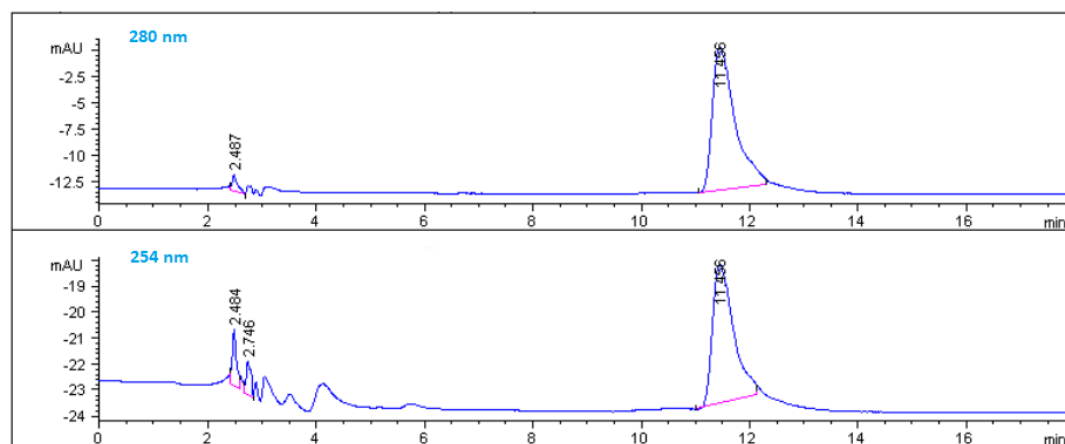
Εικόνα 53 Χρωματογράφημα της δεύτερης κορυφής, που φαίνεται στην Εικ. 47, σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π5:



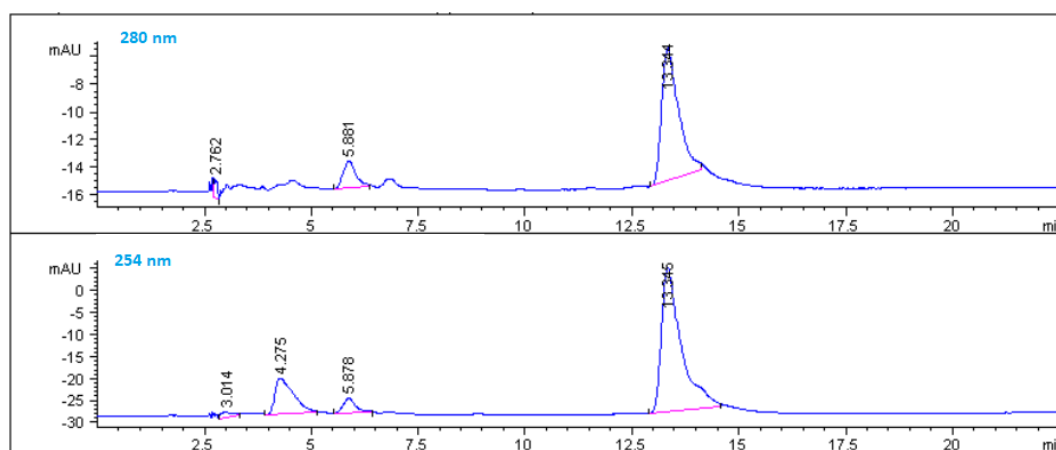
Εικόνα 54 Χρωματογράφημα κορυφής Π5 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π6:



Εικόνα 55 Χρωματογράφημα κορυφής Π6 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Κορυφή Π7:

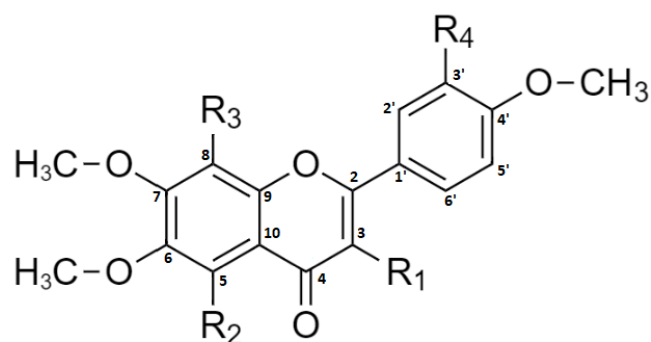


Εικόνα 56 Χρωματογράφημα κορυφής Π7 σε μήκος κύματος 280 και 254nm.

Στη συνέχεια, έπρεπε να γίνει η ταυτοποίηση των δομών που απομονώθηκαν από το αρχικό δείγμα. Η πρώτη προσπάθεια ήταν με τα διαθέσιμα πρότυπα του εργαστηρίου, δυστυχώς, όμως, κανένα από αυτά δεν ήταν ταυτόσημο με κάποιο από τα παραπάνω. Επομένως, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Συγκεκριμένα, για κάθε απομόνωση που προέκυψε από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, έγινε, αρχικά, η λήψη του φάσματος πρωτονίου ^1H -NMR, και στη συνέχεια, όπου ήταν απαραίτητο, έγινε και η λήψη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Τα φάσματα λήφθηκαν σε φασματογράφους BrukerDRX 400 και BrukerAvanceIII 600 (400 MHz και 600 MHz), Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz, Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *multi* (πολλαπλή), ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν για τις κορυφές A1-7 η δευτεριωμένη ακετόνη, ενώ για τις κορυφές Π1-7, το δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο.

Για τις ενώσεις που περιέχονται στις κορυφές Π1-7, πραγματοποιήθηκε η λήψη όλων των παραπάνω φασμάτων NMR και τελικά έγινε και η απόδοση της δομής τους.

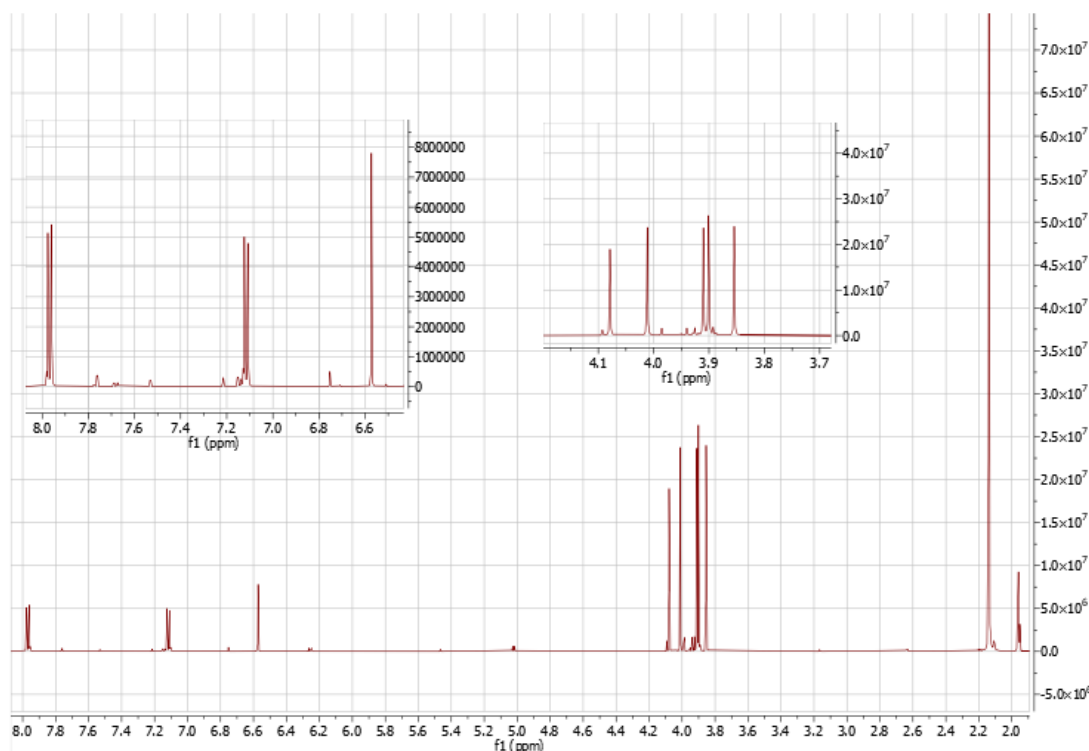
Οι δομές των χημικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν είναι οι ακόλουθες:



Πίνακας 20 Οι υποκαταστάτες R₁, R₂, R₃ και R₄ για τα φλαβονοειδή τανγκερετίνη (1), 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη (2), νομπιλετίνη (3) και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη (4).

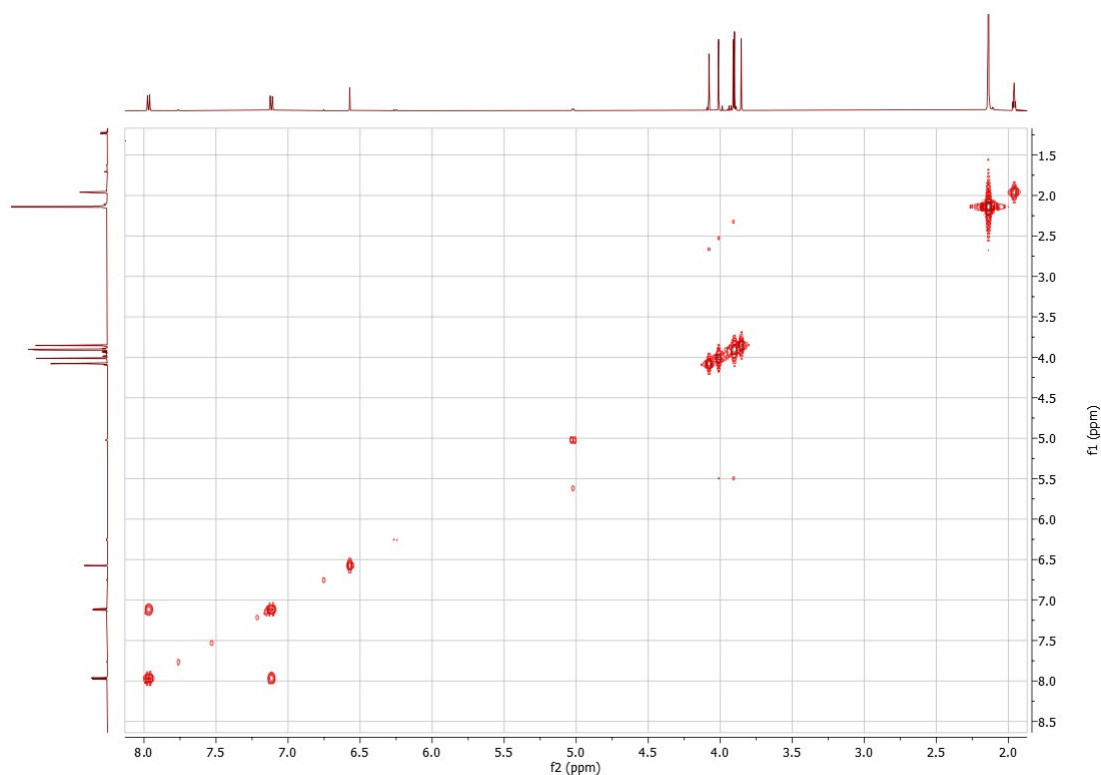
No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Όνομα
1	H	CH ₃ O	CH ₃ O	H	Τανγκερετίνη
2	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	3,5,6,7,8,3',4'- Επταμεθοξυφλαβόνη
3	H	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	Νομπιλετίνη
4	H	CH ₃ O	H	H	5,6,7,4'-τετρα- Μεθοξυφλαβόνη

Χημική Ένωση 1: Τανγκερετίνη (1)



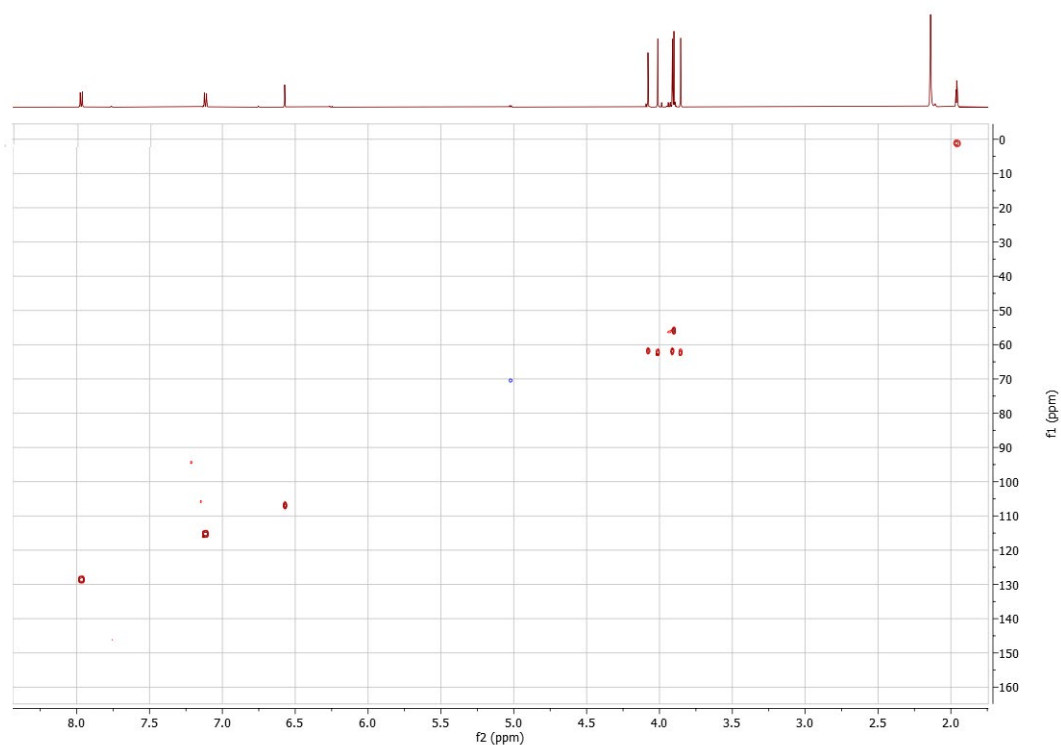
Εικόνα 57 Φάσμα ¹H-NMR του μορίου τανγκερετίνη.

Στο φάσμα ^1H -NMR του μορίου παρατηρείται η ύπαρξη των 5 μεθοξυ-ομάδων στην περιοχή 3,80-4,10ppm, ενώ στην περιοχή 7,00-8,00ppm φαίνεται η 1,4-υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου Β. Επιπλέον, εμφανίζεται η απλή κορυφή (s) του H-3 στα 6,56ppm.



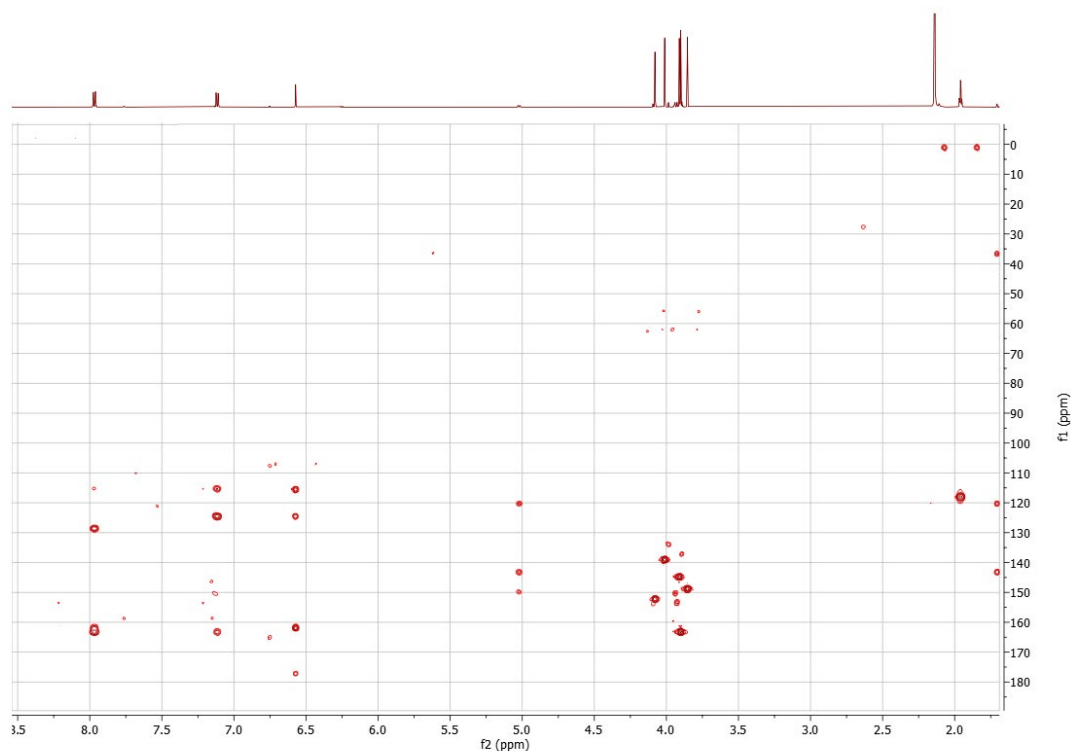
Εικόνα 58 Φάσμα COSY του μορίου τανγκερετίνη.

Αυτό που φαίνεται καθαρά από το φάσμα COSY είναι η γειτονική θέση των υδρογόνων στις θέσεις 2' και 3', καθώς και των υδρογόνων στις θέσεις 5' και 6' του δακτυλίου Β.



Εικόνα 59 Φάσμα HMQC του μορίου τανγκερετίνη.

Από το φάσμα HMQC, έγινε ο προσδιορισμός των ανθράκων 3, 2', 3', 5', 6' και του άνθρακα της μεθοξυ-ομάδας που βρίσκεται συνδεδεμένη με τον άνθρακα 4' του δακτυλίου B. Επίσης, με τον συνδυασμό του φάσματος HMQC και με τη βιβλιογραφία που είναι διαθέσιμη, προσδιορίστηκαν και οι άνθρακες των μεθοξυ-ομάδων του δακτύλιου A στις θέσεις 5, 6, 7 και 8 (Han *et al.* 2010).

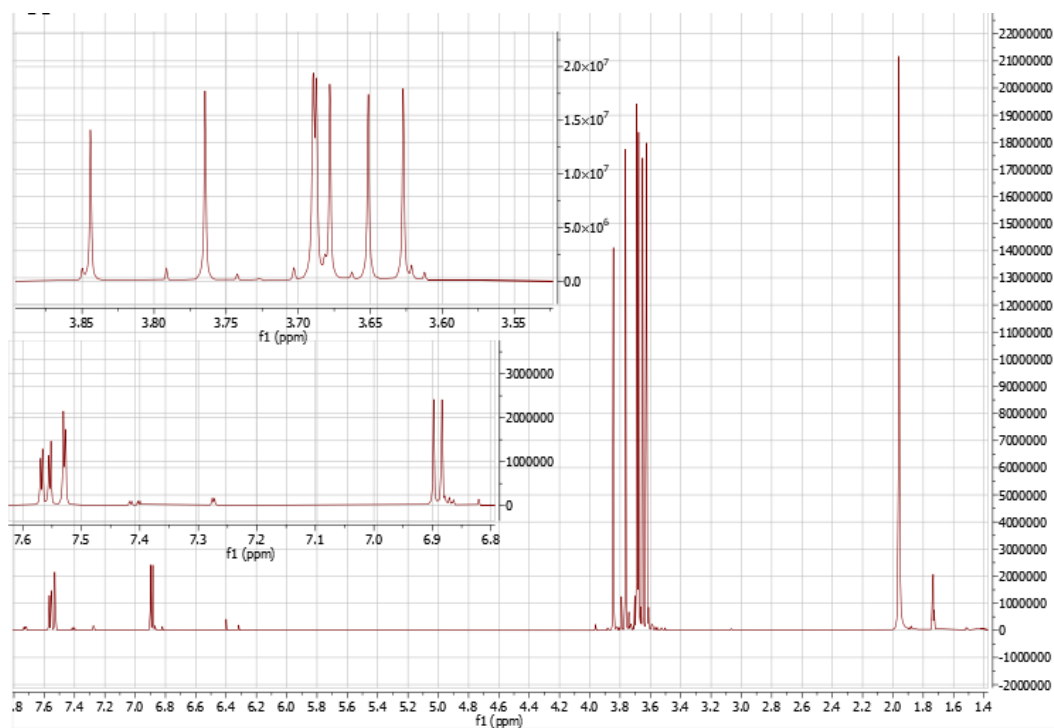


Εικόνα 60 Φάσμα HMBC του μορίου τανγκερετίνη.

Τέλος, με τη βοήθεια του φάσματος HMBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες της τανγκερετίνης. Η μόνη αδυναμία ήταν στον προσδιορισμό του άνθρακα 9, ο οποίος σύμφωνα με τη υπάρχουσα βιβλιογραφία, θα πρέπει να εμφανίζεται στα ~147,7ppm (Han *et al.* 2010; Wang *et al.* 2007).

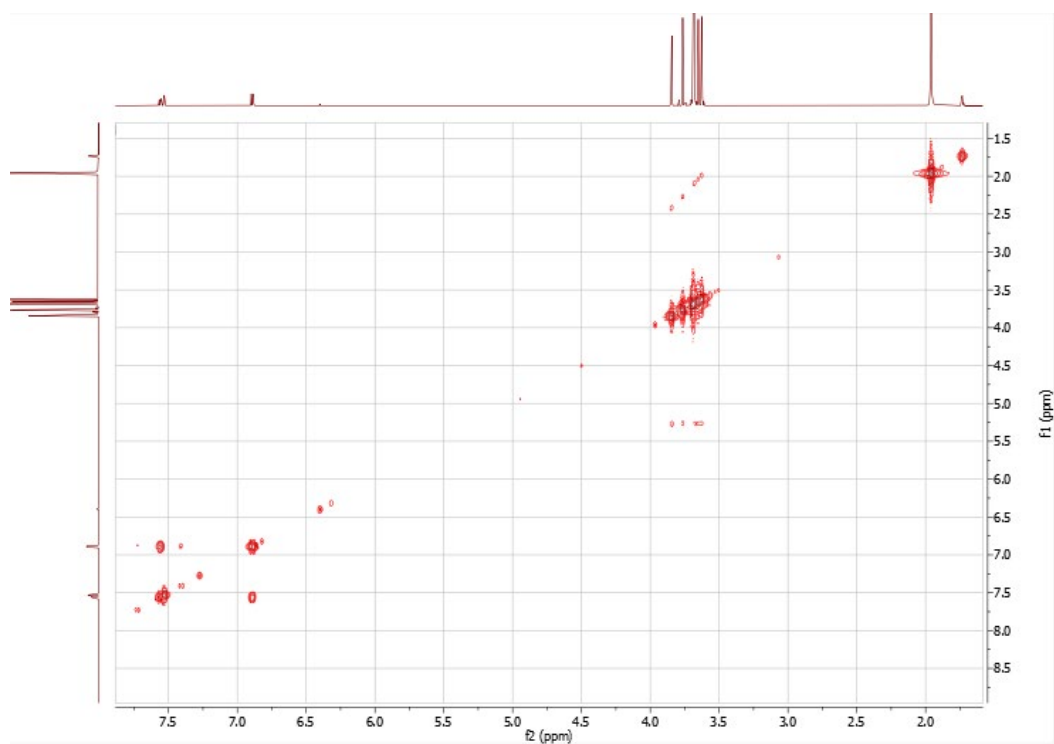
Χημική Ένωση 2: 3,5,6,7,8,3',4'-Επταμεθοξυφλαβόνη (2)

Παρόμοια δομή παρουσιάζει και η 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, όπου ο προσδιορισμός της δομής της έγινε με παρόμοιο τρόπο και με τη βοήθεια των φασμάτων NMR.



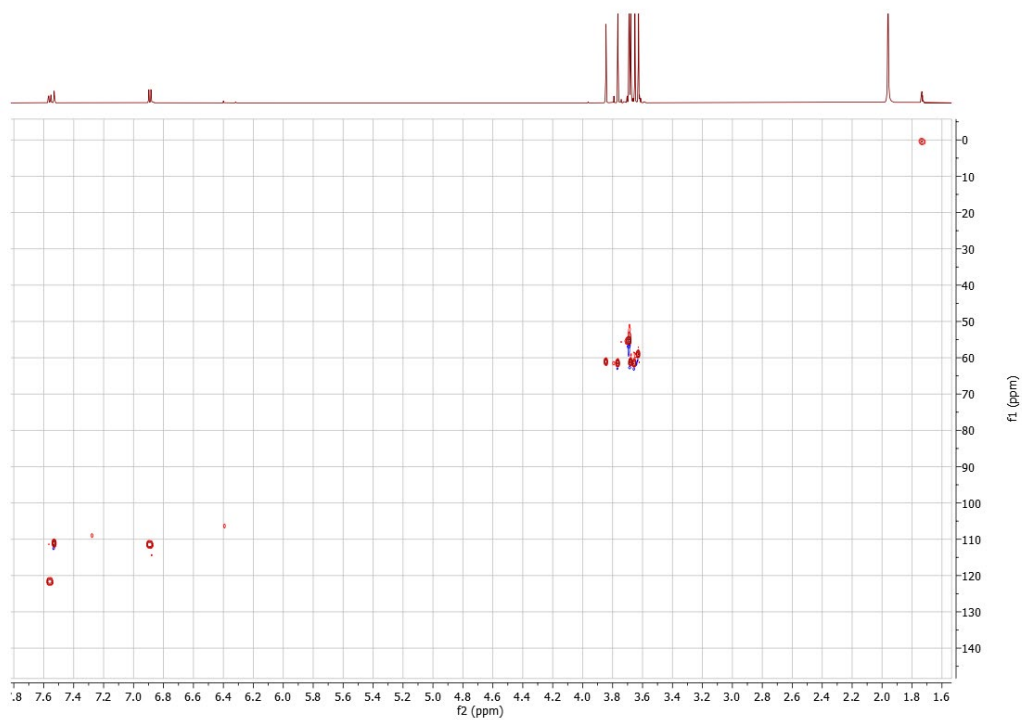
Εικόνα 61 Φάσμα ^1H -NMR του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-Επταμεθοξυφλαβόνη.

Στο φάσμα ^1H -NMR του μορίου παρατηρείται η ύπαρξη των 7 μεθοξυ-ομάδων στην περιοχή 3,80-4,10ppm, ενώ στην περιοχή 7,00-7,80ppm φαίνεται η 1,3,4-υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου B.



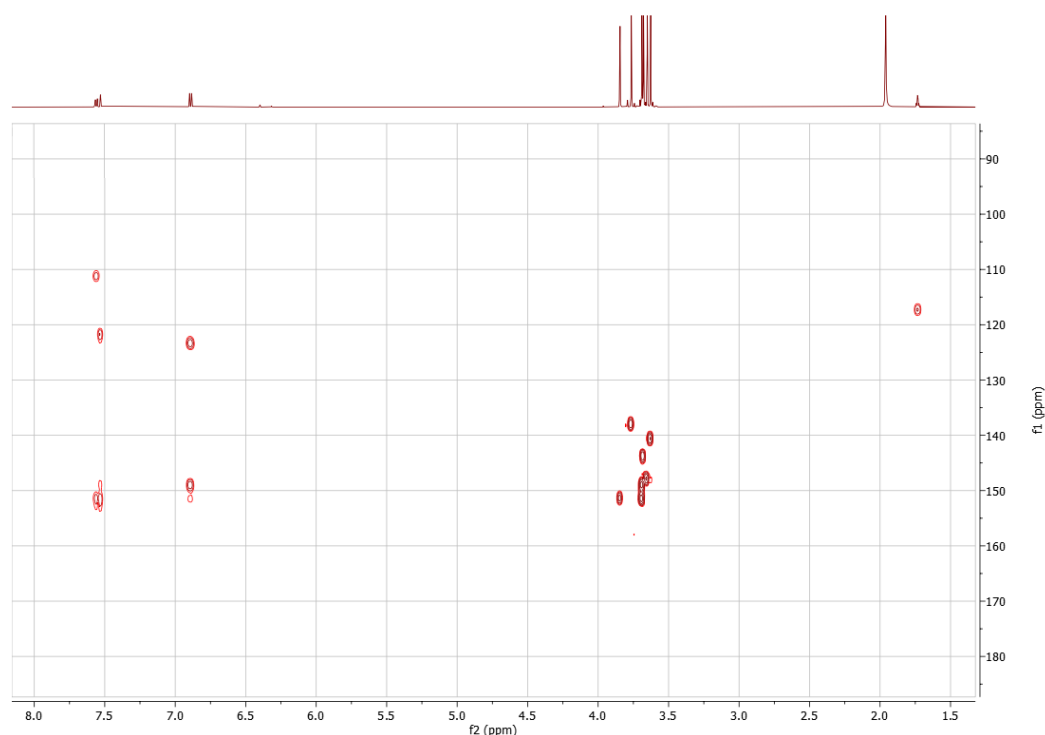
Εικόνα 62 Φάσμα COSY του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-Επταμεθοξυφλαβόνη.

Στο φάσμα COSY αυτού του μορίου φαίνεται καθαρά η γειτονική θέση των υδρογόνων στις θέσεις 5' και 6' του δακτυλίου Β.



Εικόνα 63 Φάσμα HMQC του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-Επταμεθοξυφλαβόνη.

Από το φάσμα HMQC, έγινε ο προσδιορισμός μόνο τριών ανθράκων πάνω στον κύριο σκελετό του μορίου και συγκεκριμένα των ανθράκων 2', 5', και 6'. Έγινε, όμως, ο προσδιορισμός όλων των ανθράκων των επτά μεθοξυ-ομάδων που βρίσκονται συνδεδεμένες με τους άνθρακες 3, 5, 6, 7, 8, 3' και 4'.

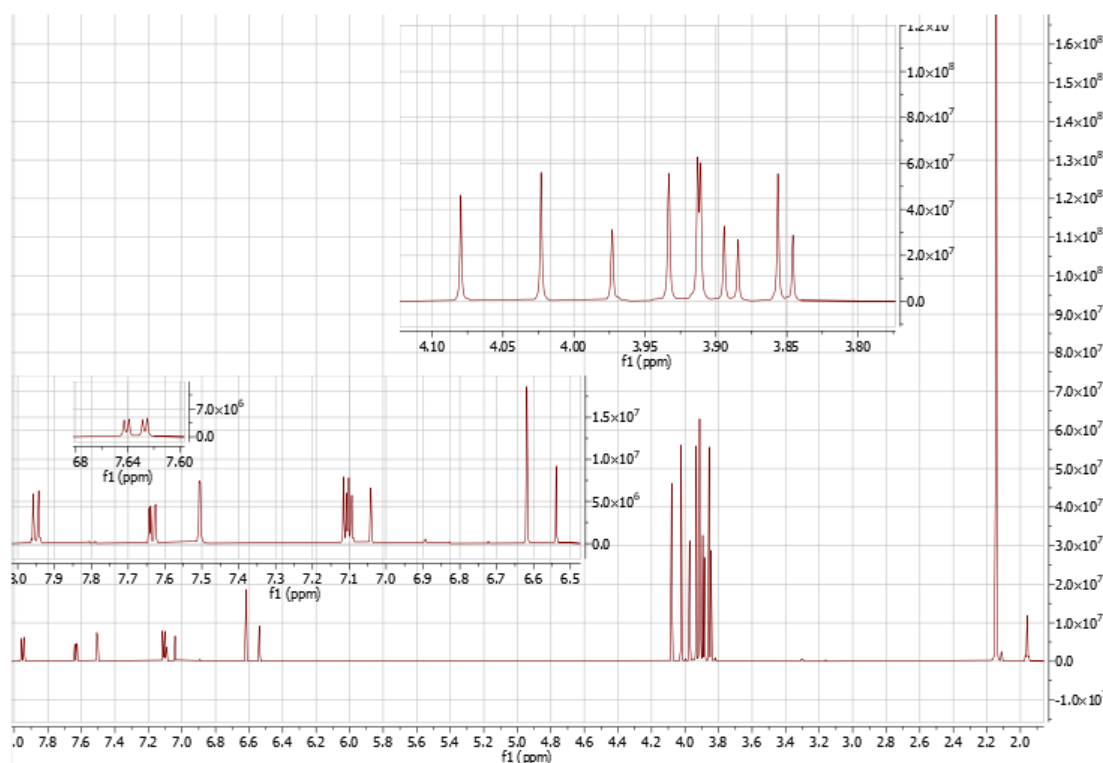


Εικόνα 64 Φάσμα HMQC του μορίου 3,5,6,7,8,3',4'-Επταμεθοξυφλαβόνη.

Τέλος, με τη βοήθεια του φάσματος HMQC, προσδιορίστηκαν και οι άνθρακες 2, 3, 5, 6, 7, 8, 1', 2', 3', 4', 5' και 6', αλλά ήταν αδύνατο να προσδιοριστούν οι άνθρακες 4, 9 και 10, οι οποίοι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θα πρέπει να εμφανίζονται στα ~172,3, 147,9 και 114,4ppm, αντίστοιχα (Han *et al.* 2010).

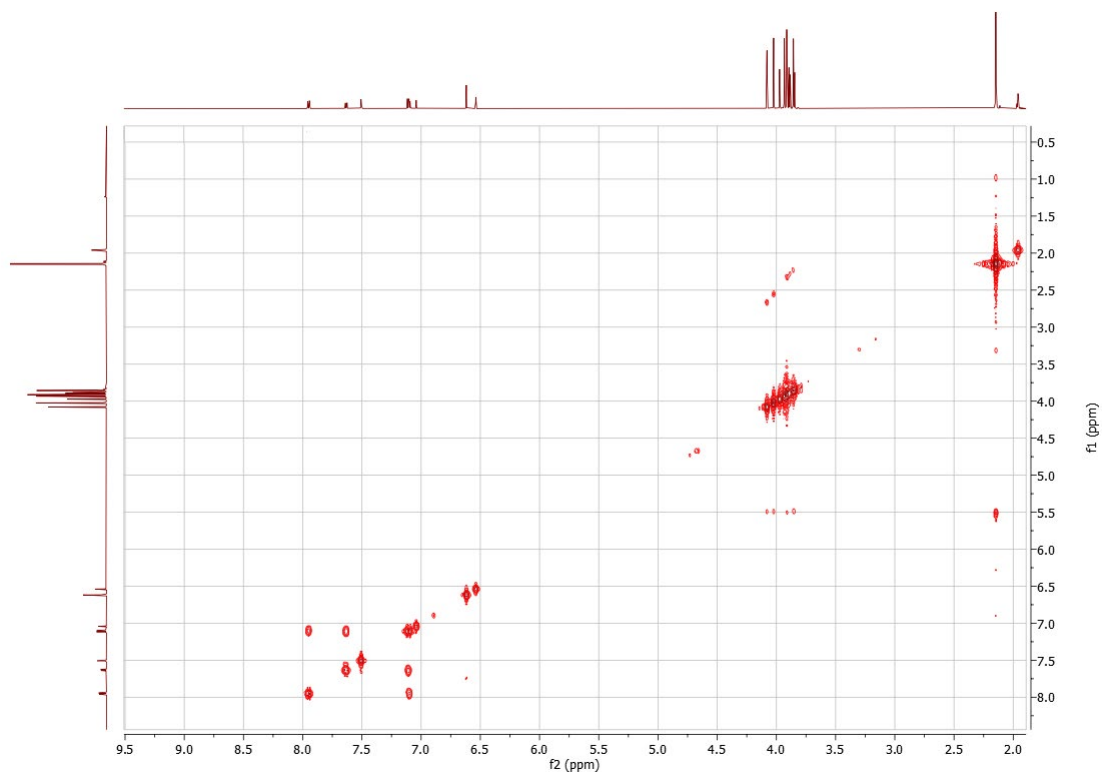
Χημική Ένωση 3 & 4: Νομπιλετίνη (3) & 5,6,7,4'-Τετραμεθοξυφλαβόνη (4)

Από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό προέκυψε και το μίγμα των μορίων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη, τα φάσματα των οποίων παρατίθενται παρακάτω και προκύπτει ότι το ποσοστό συμμετοχής τους στο μίγμα είναι της τάξεως του ~65% για την νομπιλετίνη και ~35% για την 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη,



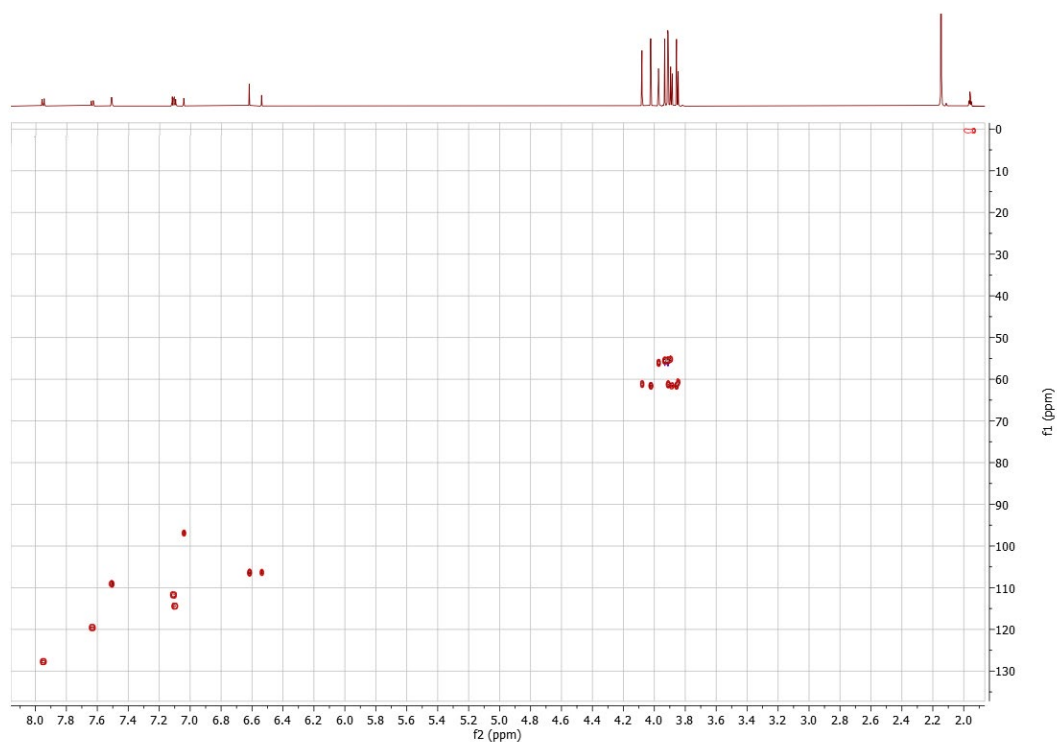
Εικόνα 65 Φάσμα ^1H -NMR των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη.

Αρχικά, στο φάσμα ^1H -NMR του μίγματος έγινε η απόδοση των κορυφών στο κάθε ένα από τα δύο μόρια του μίγματος. Τα σήματα με χαμηλότερη ένταση αποδόθηκαν στην 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη, ενώ τα μόρια με την υψηλότερη ένταση στην νομπιλετίνη. Έτσι, από την περιοχή των μεθοξυ-ομάδων (3,80-4,10ppm), οι 4 χαμηλότερες κορυφές (3,88 , 3,85 , 3,89 και 3,97ppm) αντιστοιχούν στις μεθοξυ-ομάδες της 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη και οι υπόλοιπες 6 (3,86 , 3,91 , 3,91 , 3,93 , 4,02 και 4,08ppm) στο μόριο της νομπιλετίνης. Στην αρωματική περιοχή, παρατηρείται το σύστημα των δύο διπλών διπλών (dd) κορυφών (7,08 και 7,95ppm) για την 1,4-υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου Β, που αντιστοιχεί στην 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη και οι κορυφές 7,09 d (8,5 Hz), 7,49 d (2,2Hz) και 7,62 dd (8,5 / 2,2 Hz), που οφείλονται στον δακτύλιο Β της νομπιλετίνης και αντιστοιχούν στους άνθρακες 5' , 2' και 6' , αντίστοιχα. Επιπλέον, εμφανίζονται οι δύο απλές κορυφές (s) στα 6,54 και 6,62ppm για την 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη και για την νομπιλετίνη, αντίστοιχα.



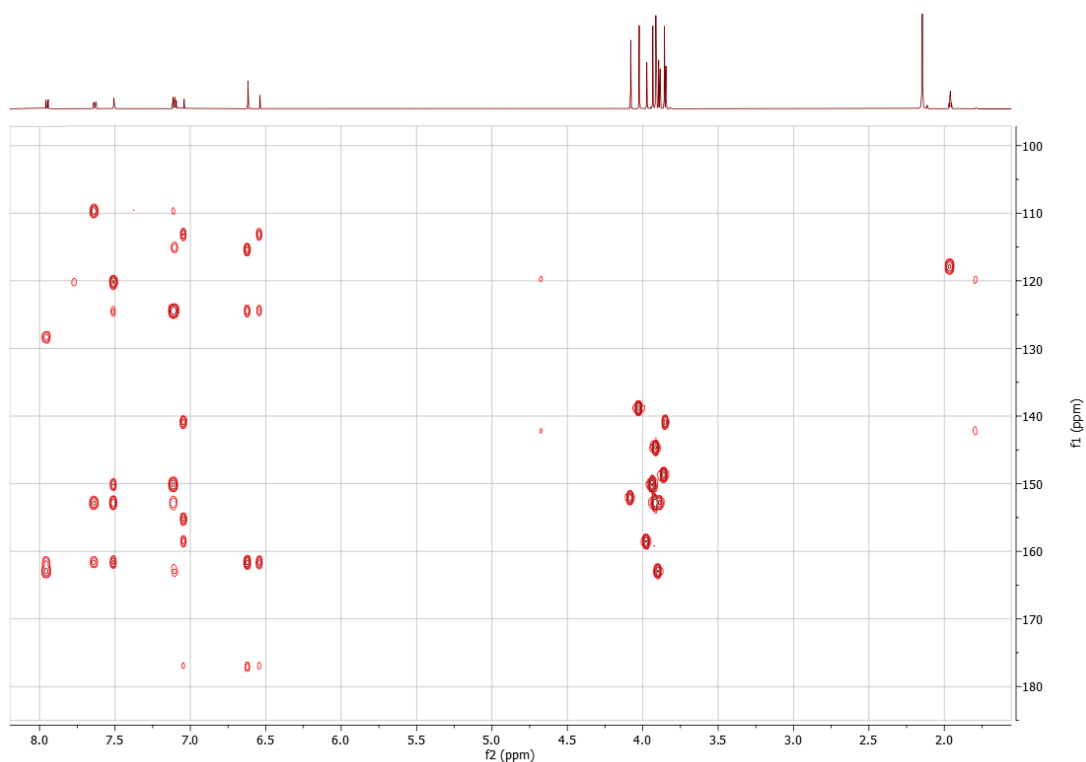
Εικόνα 66 Φάσμα COSY των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη.

Και στην περίπτωση αυτών των δύο μορίων, το φάσμα COSY, δείχνει καθαρά τις γειτονικές σχέσεις των υδρογόνων στα 7,08 (3'-H / 5'-H) και 7,95 (2'-H / 6'-H) ppm της 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνης και των υδρογόνων 7,09 (5'-H) και 7,62 (6'-H) ppm της νομπιλετίνης.



Εικόνα 67 Φάσμα HMQC των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη.

Από το φάσμα HMQC, έγινε ο προσδιορισμός των ανθράκων, που είναι συνδεδεμένα τα υδρογόνα που έχουν ήδη προσδιοριστεί με τη βοήθεια του $^1\text{H-NMR}$. Επίσης, με τον συνδυασμό του φάσματος HMQC και με τη βιβλιογραφία που είναι διαθέσιμη, προσδιορίστηκαν και οι άνθρακες των μεθοξυ-ομάδων (Han *et al.* 2010).



Εικόνα 68 Φάσμα HMBC των χημικών ενώσεων νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη.

Τέλος, με τη βοήθεια του φάσματος HMBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες των δύο μορίων του μίγματος. Στην περίπτωση της 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνης ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του C-9, ο οποίος εμφανίζεται στα 155,2ppm, ενώ για τον προσδιορισμό του στο μόριο της νομπιλετίνης, παρουσιάστηκε η ίδια αδυναμία με αυτή της περίπτωσης της τανγκερετίνης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, λοιπόν, αυτός ο άνθρακας εμφανίζεται στα ~147,6ppm (Han *et al.* 2010; Wang *et al.* 2007).

Πίνακας 21 Τιμές ^1H -NMR σε ppm των PMFs τανγκερετίνη, 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN.

No	Τανγκερετίνη	3,5,6,7,8,3',4'- Επταμεθοξυφλαβόνη	Νομπιλετίνη	5,6,7,4'-τετρα- μεθοξυφλαβόνη
H-3	6,56 s	-	6,62 s	6,54 s
H-8	-	-	-	7,03 s
H-2'	7,95 dd (J=6.9/2.1Hz)	7,53 d (J=2,1 Hz)	7,49 d (J=2,2 Hz)	7,95 dd (J=6,4 / 2,2 Hz)
H-3'	7,10	-	-	7,08 dd (J=6,4 / 2,2 Hz)

	dd (J=6.9/2.1Hz)			
H-5'	7,10 dd (J=6.9/2.1Hz)	6,89 d (J=8,4 Hz)	7,09 d (J=8,5 Hz)	7,08 dd (J=6,4 / 2,2 Hz)
H-6'	7,95 dd (J=6.9/2.1Hz)	7,56 dd (J=8,4 / 2,1 Hz)	7,62 dd (J=8,5/2,2 Hz)	7,95 dd (J=6,4 / 2,2 Hz)
3-OMe	-	3,65 s	-	-
5-OMe	4,01 s	3,76 s	4,02 s	3,88 s
6-OMe	3,91 s	3,67 s	3,91 s	3,85 s
7-OMe	4,08 s	3,84 s	4,08 s	3,97 s
8-OMe	3,85 s	3,63 s	3,85 s	-
3'-OMe	-	3,69 s	3,93 s	-
4'-OMe	3,89 s	3,68 s	3,91 s	3,89 s

Πίνακας 22 Τιμές ^{13}C -NMR σε ppm των PMFs τανγκερετίνη, 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, νομπιλετίνη και 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνη από φάσματα με διαλυτή δευτεριωμένο ACN.

No	Τανγκερετίνη	3,5,6,7,8,3',4'- Επταμεθοξυφλαβόνη	Νομπιλετίνη	5,6,7,4'-τετρα- Μεθοξυφλαβόν η
C-2	161,8	151,5	161,7	161,7
C-3	107,2	147,8	106,4	106,4
C-4	177,1	172,3*	177,0	176,9
C-5	139,2	137,9	138,9	152,8
C-6	144,8	143,8	152,9	140,9
C-7	152,3	151,4	152,2	158,6
C-8	148,7	140,6	148,7	96,9
C-9	147,7*	147,9*	147,6*	155,2
C-10	115,6	114,4*	115,4	113,1
C-1'	124,5	123,5	124,5	124,4
C-2'	128,3	111,1	109,1	127,7
C-3'	115,9	151,3	150,2	144,4
C-4'	163	149,9	144,6	163
C-5'	115,9	111,5	111,8	144,4
C-6'	128,3	121,7	119,5	127,7

5-OMe	62,3	61,5	61,6	61,5
6-OMe	61,9	61,2	61,4	61,5
7-OMe	61,8	61,1	61,2	56,1
8-OMe	62,2	59,0	61,6	-
3'-OMe	-	55,3	55,6	-
4'-OMe	55,9	53,5	55,6	55,2

*Τιμή βιβλιογραφίας

Πολυμεθοξυφλαβόνες-PMFs

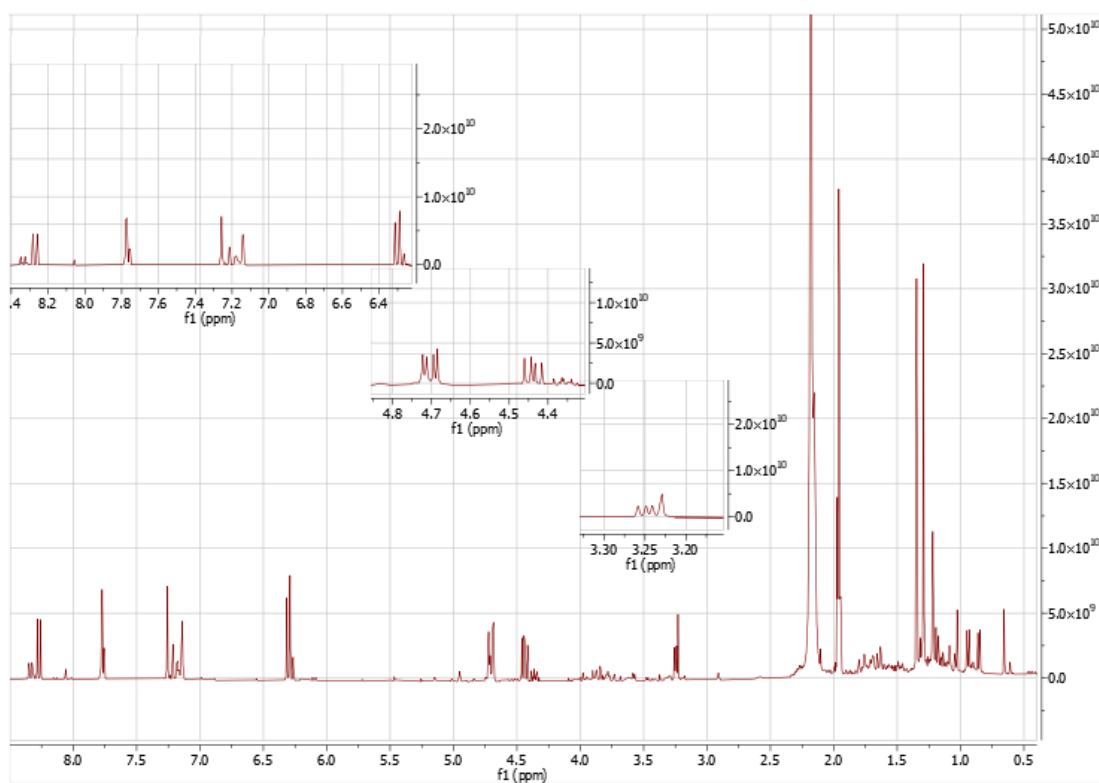
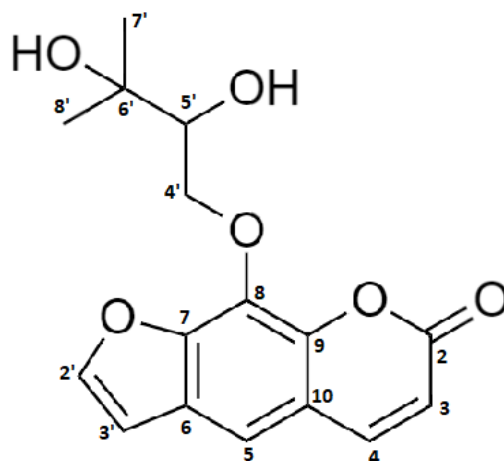
Οι πολυμεθοξυφλαβόνες που προέρχονται από τα εσπεριδοειδή έχουν μελετηθεί, κυρίως, για την αντικαρκινική τους δράση, καθώς έχει αποδειχτεί πως έχουν καλύτερη δράση σε σύγκριση με τις φλαβανόνες, π.χ., έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του καρκίνου του στομάχου μέσω της επαγωγής απόπτωσης που προέρχεται από την ρύθμιση του RARβ, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* (Y. Wang *et al.* 2020).

Η 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, για παράδειγμα, έχει πολύ καλή αντικαρκινική δράση και μάλιστα, υψηλότερη από αυτή της νομπιλετίνης. Επιπλέον, παρουσιάζει και χημειοπροστατευτική δράση (Ju-Ichi 2005).

Πέρα, όμως, από αυτή τη δράση, οι PMFs παρουσιάζουν και άλλες, όπως για παράδειγμα, η τανγκερετίνη, που εμφανίζει νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση έναντι του εγκεφαλικού τραυματισμού που προκαλείται από ισχαιμικό επεισόδιο (Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury) σε αρουραίους (Yang *et al.* 2020), ενώ η κατανάλωση νομπιλετίνης πριν από τον τραυματισμό των νεφρών από ισχαιμικό επεισόδιο μπορεί να μειώσει σημαντικά τη νεφρική βλάβη (ischemia/reperfusion injury in the kidney) δρώντας στη μεταβολική οδό PI3K/AKT. Κατά τον τραυματισμό φαίνεται ότι αναστέλλει την αυξημένη ER S που σχετίζεται με την απόπτωση και αυξάνει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στο μονοπάτι PI3K/AKT, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο, την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (B. Liu *et al.* 2020).

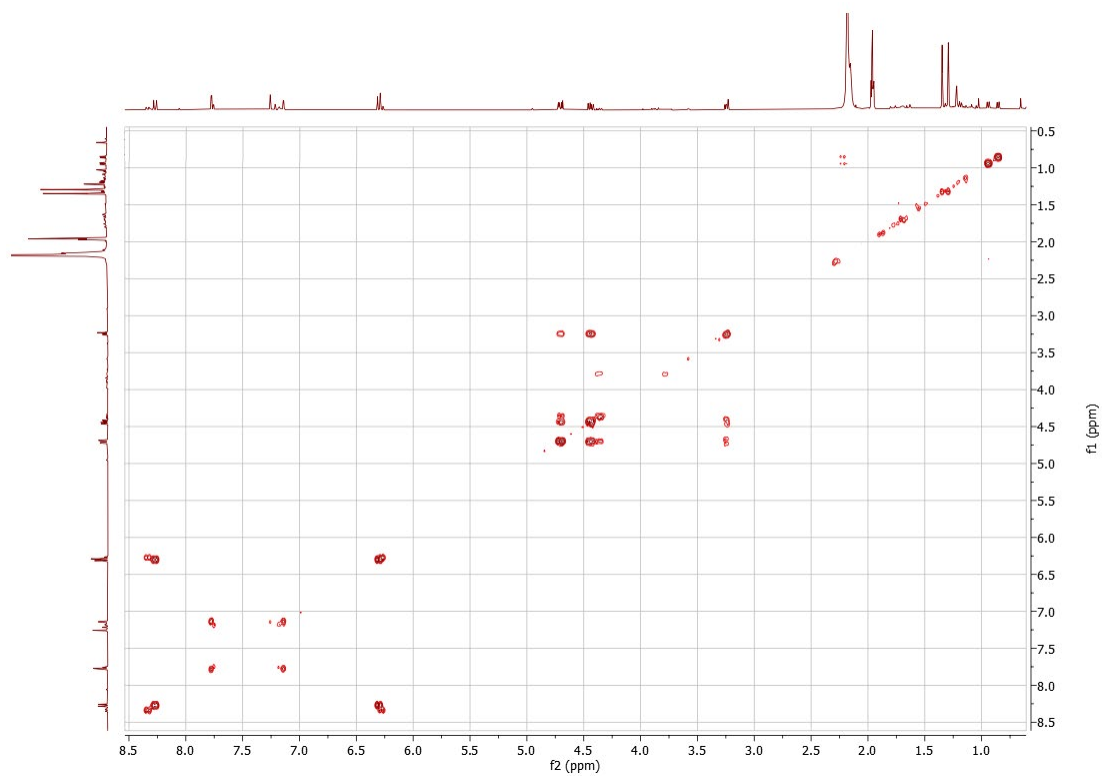
Άλλη μία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που είναι ευρέως διαδεδομένη στα φυτά *Citrus* είναι οι κουμαρίνες, από τις οποίες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις:

Χημική Ένωση 5: Ερακλινόλη



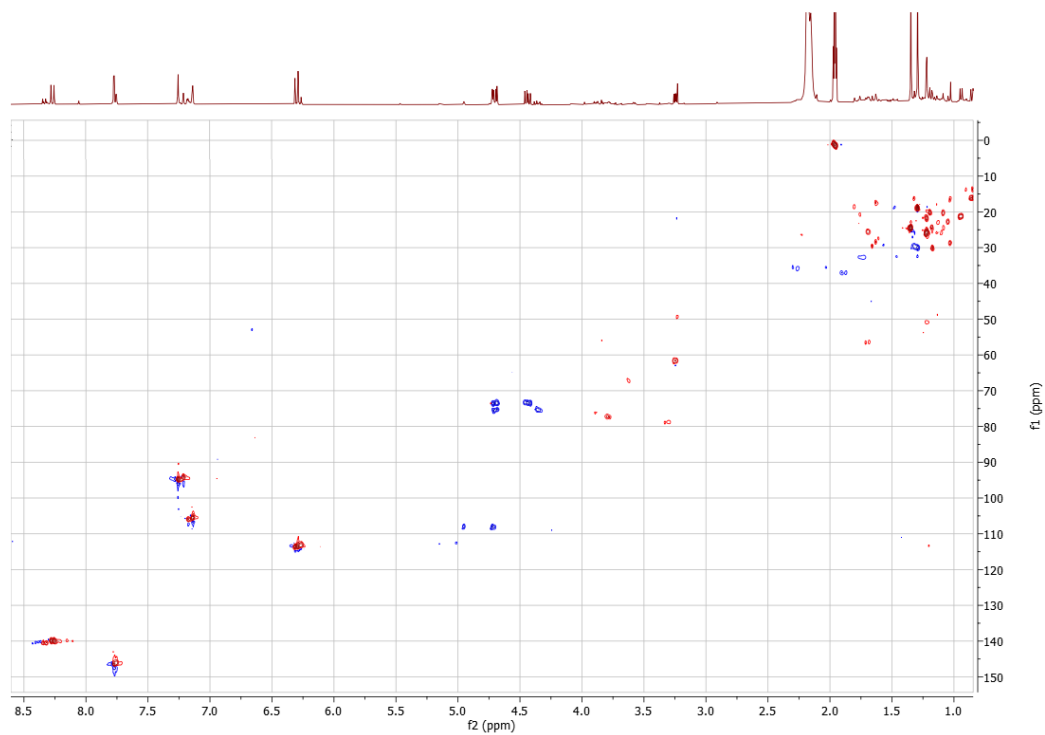
Εικόνα 69 Φάσμα ^1H -NMR του μορίου ερακλινόλη.

Στο φάσμα ^1H -NMR του μορίου παρατηρείται η ύπαρξη των 2 μεθυλομάδων στις θέσεις 7' (1,29ppm) και 8' (1,35ppm) και στην περιοχή 3,00-5,00ppm οι κορυφές συντονισμού των υδρογόνων στις θέσεις 4' και 5', ενώ στην περιοχή 6,00-8,50ppm εμφανίζονται τα υδρογόνα του συστήματος της φουρανοκουμαρίνης.

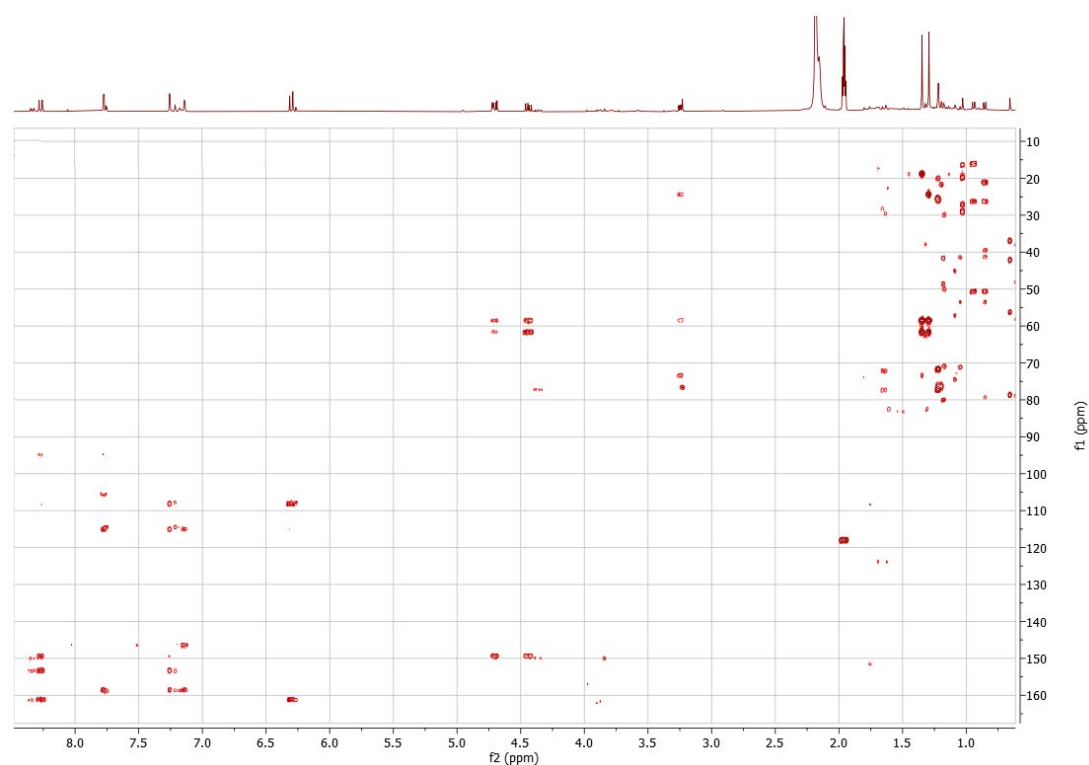


Εικόνα 70 Φάσμα COSY του μορίου ερακλινόλη.

Στο φάσμα COSY, παρατηρούνται τα υδρογόνα H-3 και H-4, H-2' και H-3', H-4' και H-5', που είναι συνδεδεμένα με γειτονικούς άνθρακες.



Εικόνα 71 Φάσμα HMQC του μορίου ερακλινόλη.



Εικόνα 72 Φάσμα HMBC του μορίου ερακλινόλη.

Με τη βοήθεια του φάσματος HMQC προσδιορίστηκαν αρχικά οι άνθρακες 3, 4, 5, 2', 3', 4', 5', 7' και 8' και στη συνέχεια με το φάσμα HMBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες του μορίου.

Πίνακας 23 Τιμές ^1H -NMR και ^{13}C -NMR της ερακλινόλης από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN.

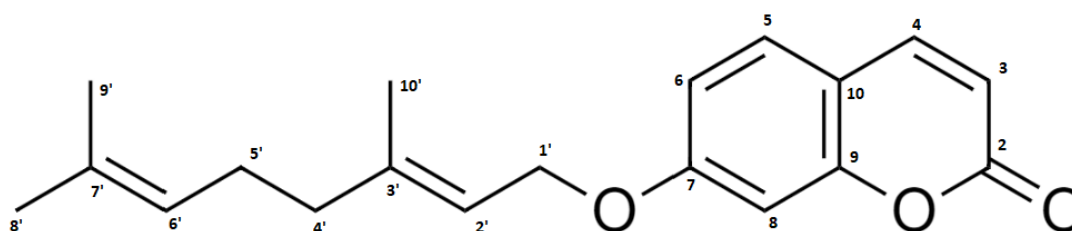
Ερακλινόλη

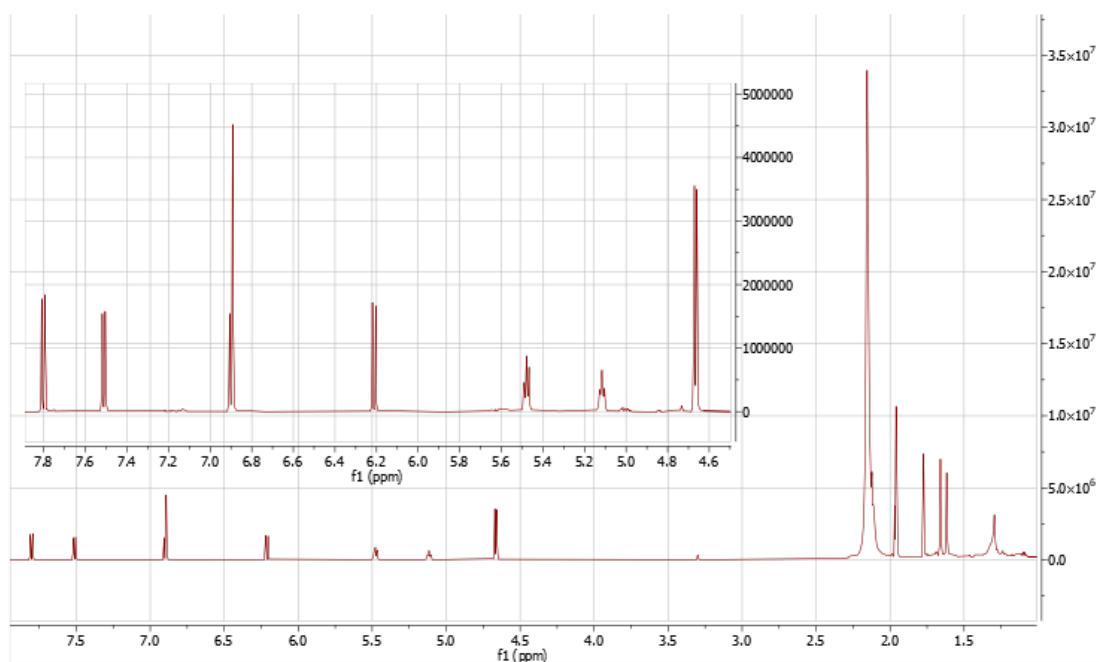
No	Ppm	No	ppm
H-3	6,30 d ($J=9,9\text{Hz}$)	C-2	161,6
H-4	8,27 d ($J=9,9\text{Hz}$)	C-3	113,5
H-5	7,26 s	C-4	139,9
H-2'	7,14 d ($J=2,4\text{Hz}$)	C-5	94,9
H-3'	7,77 d ($J=2,4\text{Hz}$)	C-6	115,0
H-4'	4,66 m	C-7	158,6
H-5'	3,30 m	C-8	149,4
H-7'	1,35 s	C-9	153,3
H-8'	1,29 s	C-10	108,1

	C-2'	105,5
	C-3'	146,4
	C-4'	73,4
	C-5'	61,6
	C-6'	58,5
	C-7'	24,2
	C-8'	19,0

Η ερακλινόλη έχει εντοπιστεί σε διάφορα είδη όπως είναι τα *Angelica* spp., *Citrus* spp., *Heracleum* spp., *Oropanax chironium*, *Magydaris pastinacea*, *Selinum tenuifolium* κ.ά. Έχει μελετηθεί για την αντιφλεγμονώδη της δράση σε μοντέλα ποντικών TPA (García-Argáez *et al.* 2000) και ως παράγοντας κατά της συσσώρευσης αιμοπεταλίων με αρκετά καλά αποτελέσματα (Curini *et al.* 2006). Επιπλέον, έχει σημαντική αντική δράση και έχει εμφανίσει ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της αντιγραφής του ιού HIV *in vitro* (Filho *et al.* 2018). Πρόσφατα, μελετήθηκε και η δράση της έναντι του ιού SARS-CoV-2 μέσω ψηφιακής μοντελοποίησης και φάνηκε πως αποτελεί ένα σημαντικό αναστολέα της κύριας πρωτεάσης του (PDBID: 5N5O) (Chidambaram *et al.* 2020).

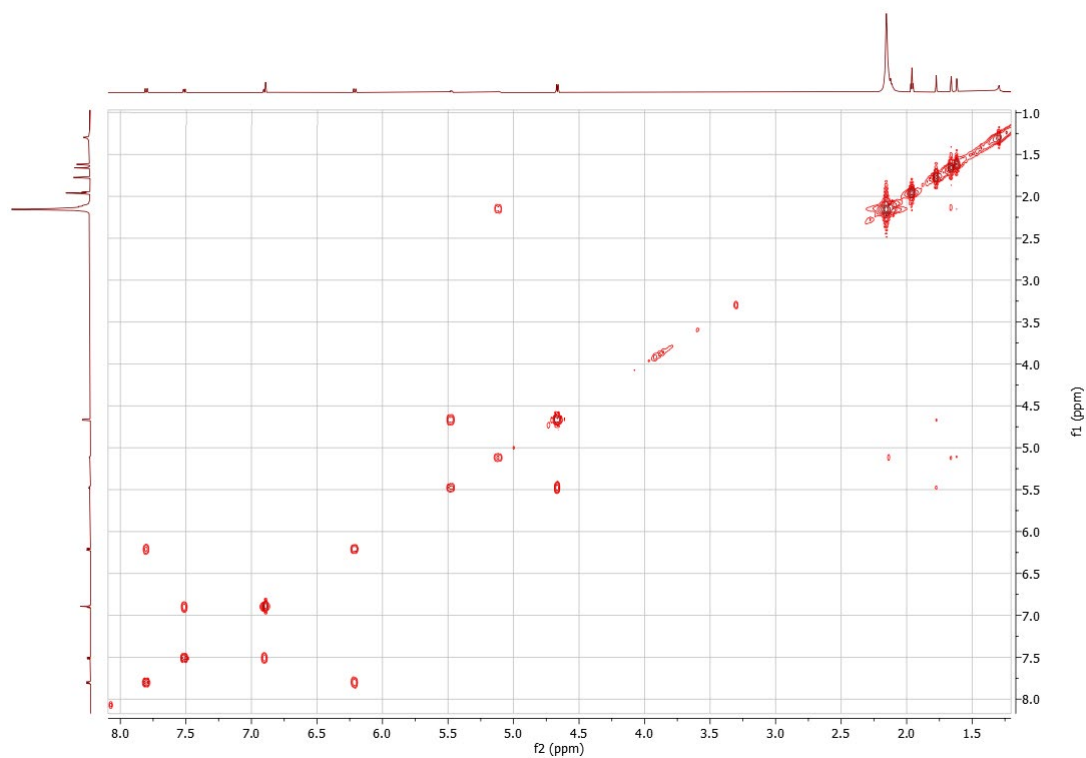
Χημική Ένωση 6: Αουραπτένιο





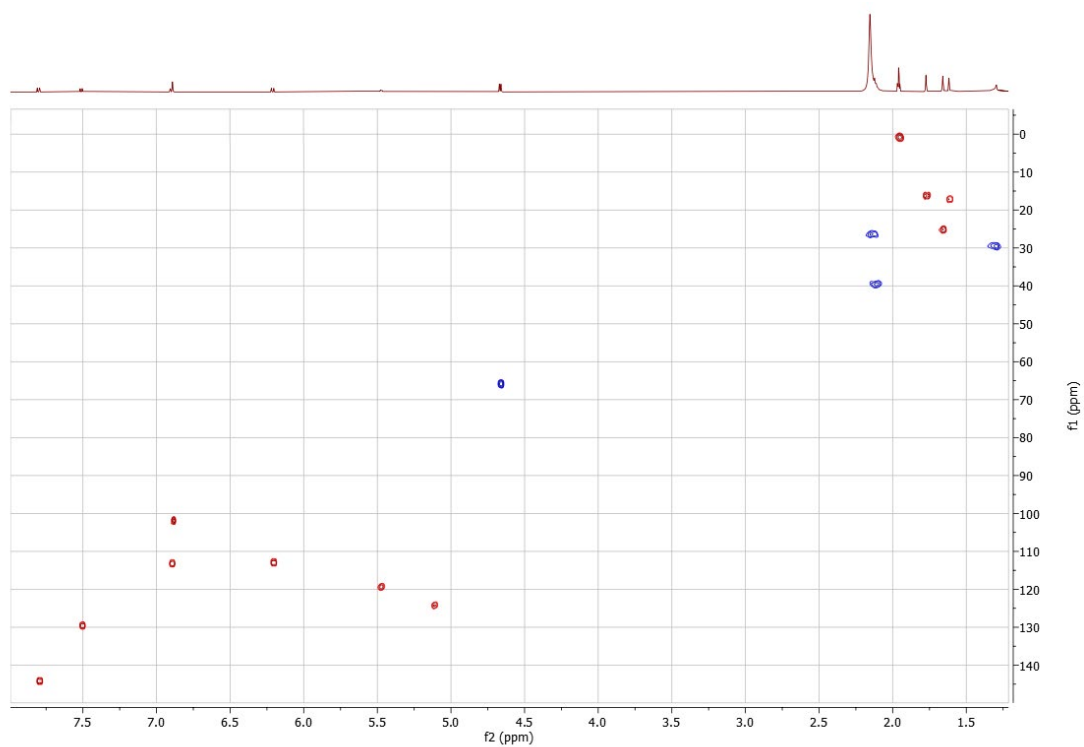
Εικόνα 73 Φάσμα ^1H -NMR του αουραπτενίου.

Στο φάσμα ^1H -NMR του αουραπτενίου παρατηρείται η ύπαρξη των 3 μεθολο- ομάδων στις θέσεις 8', 9' και 10' στην περιοχή 1,50-2,00ppm, ενώ μέσα στο σήμα που προέρχεται από την υγρασία του διαλύτη (περίπου στα 2,00ppm) εμφανίζονται και οι κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα των ανθράκων 4' και 5'. Επιπλέον, στην περιοχή 4,60-5,60ppm παρατηρούνται οι κορυφές των υδρογόνων των ανθράκων C-2' και C-6', όπως επίσης, και τα H-1', που βρίσκονται κοντά σε οξυγόνο. Τέλος, στην περιοχή 6,20-7,80ppm εμφανίζονται τα υδρογόνα του συστήματος της κουμαρίνης.

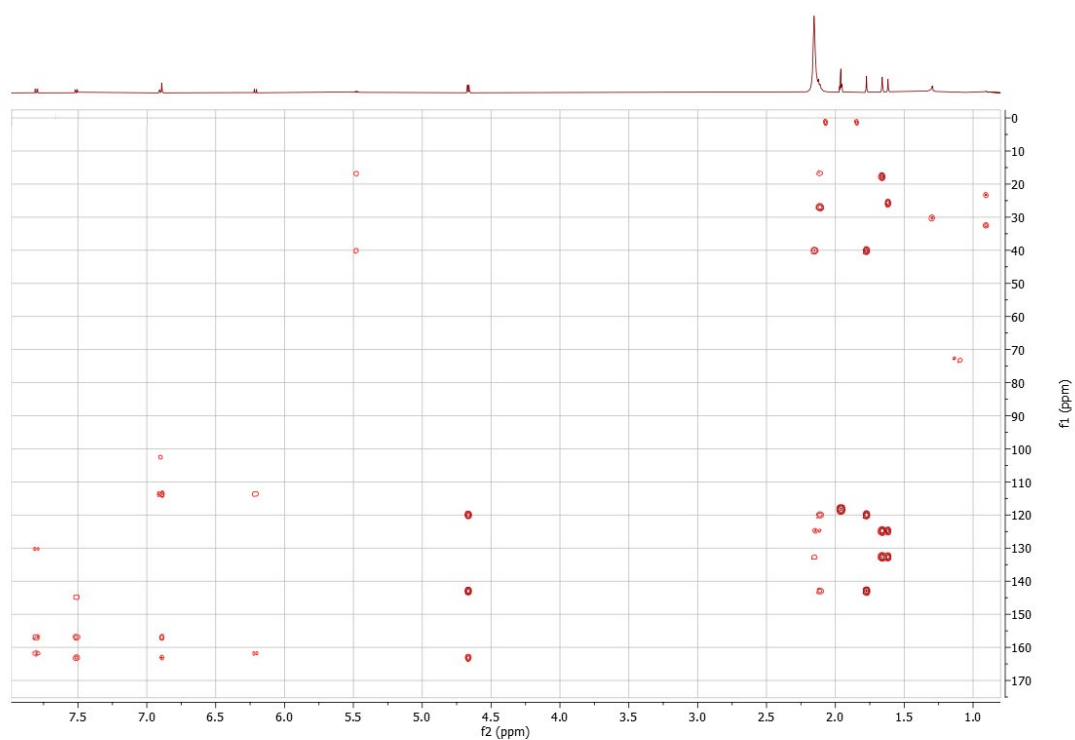


Εικόνα 74 Φάσμα COSY του αουραπτενίου.

Το φάσμα COSY, δείχνει τις γειτονικές σχέσεις των υδρογόνων της ανθρακικής αλυσίδας (H (4,66ppm) – H (5,48ppm) και H (2,13ppm) – H (5,11ppm)), αλλά και αυτές στους δακτυλίους της κουμαρίνης (H (6,90ppm) – H (7,51ppm) και H (6,21ppm) – H (7,80ppm)).



Εικόνα 75 Φάσμα ΗΜQC του αυραπτενίου.



Εικόνα 76 Φάσμα ΗΜΒC του αυραπτενίου.

Το φάσμα HMQC βοήθησε στον προσδιορισμό των ανθράκων που είναι άμεσα συνδεδεμένα με υδρογόνα και στον εντοπισμό των μεθυλενίων, ενώ με το φάσμα HMBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες του μορίου.

Πίνακας 24 Τιμές ^1H -NMR και ^{13}C -NMR του αουραπτενίου από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN.

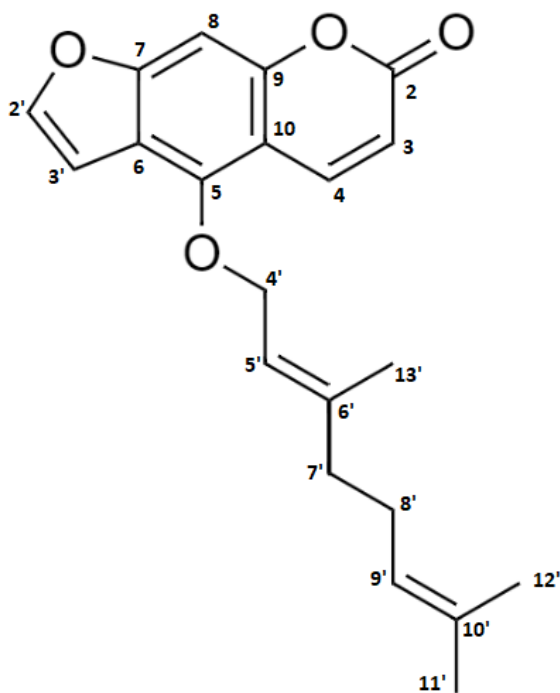
Αουραπτένιο

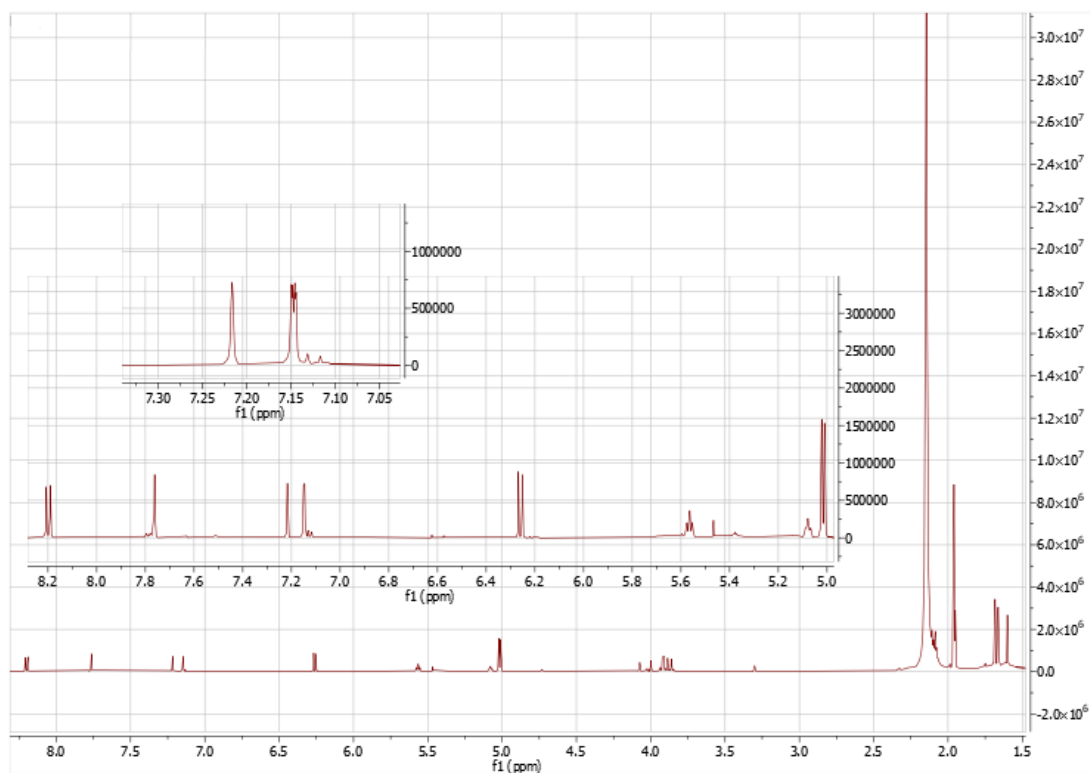
No	Ppm	No	ppm
H-3	6,21 d (J=9,5 Hz)	C-2	161,6
H-4	7,80 d (J=9,5 Hz)	C-3	112,9
H-5	7,51 d (J=8,9Hz)	C-4	144,2
H-6	6,90 dd (J=8,9/ 2,3 Hz)	C-5	129,5
H-8	6,89 d (J=2,3 Hz)	C-6	113,1
H-1'	4,66 brd (J=6,5Hz)	C-7	163,1
H-2'	5,48 t (J=6,6 Hz)	C-8	101,9
H-4'	2,10 m	C-9	156,9
H-5'	2,13 m	C-10	113,8
H-6'	5,11 t (J=6,8 Hz)	C-1'	65,8
H-8'	1,62 s	C-2'	119,4
H-9'	1,66 s	C-3'	143,0
H-10'	1,77 s	C-4'	39,6
		C-5'	26,4
		C-6'	124,2
		C-7'	132,7
		C-8'	17,2
		C-9'	25,2
		C-10'	16,3

Το αουραπτένιο είναι μια κουμαρίνη που εμφανίζει πολλαπλές προστατευτικές δραστηριότητες στον εγκέφαλο. Σε πρόσφατη έρευνα βρέθηκε πως σε μοντέλα αρουραίων με Alzheimer, το αουραπτένιο ενίσχυσε την μνήμη και έδρασε και νευροπροστατευτικά (Joghataee *et al.* 2020). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες και μάλιστα, έχει αποπτωτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων του παχέως εντέρου (σειρά κυττάρων: HT-29) (Jalilzadeh *et al.* 2020). Επίσης, μελέτη έδειξε ότι πιθανά να μπορεί να αποτελέσει πιθανό παράγοντα βελτίωσης της

ωρίμανσης των ωαρίων και του ποσοστού γονιμοποίησης, αλλά και να δρα θετικά έναντι του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών σε μοντέλα ποντικών (Abizadeh *et al.* 2020).

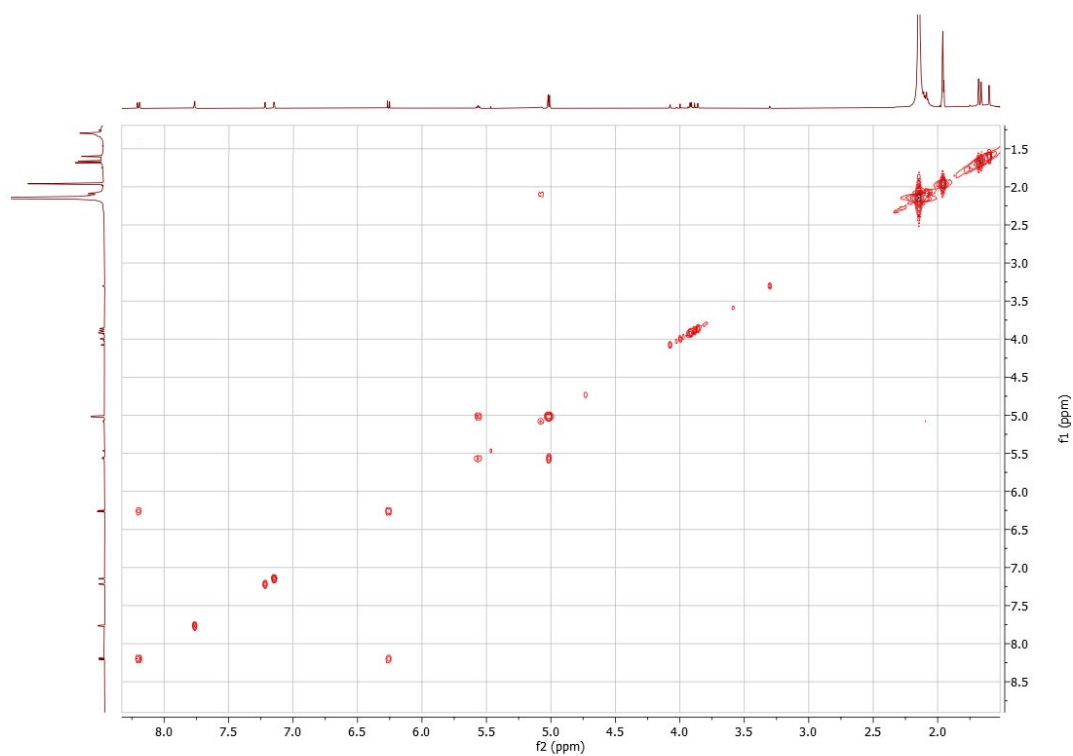
Χημική Ένωση 7: Μπεργκαμοτίνη





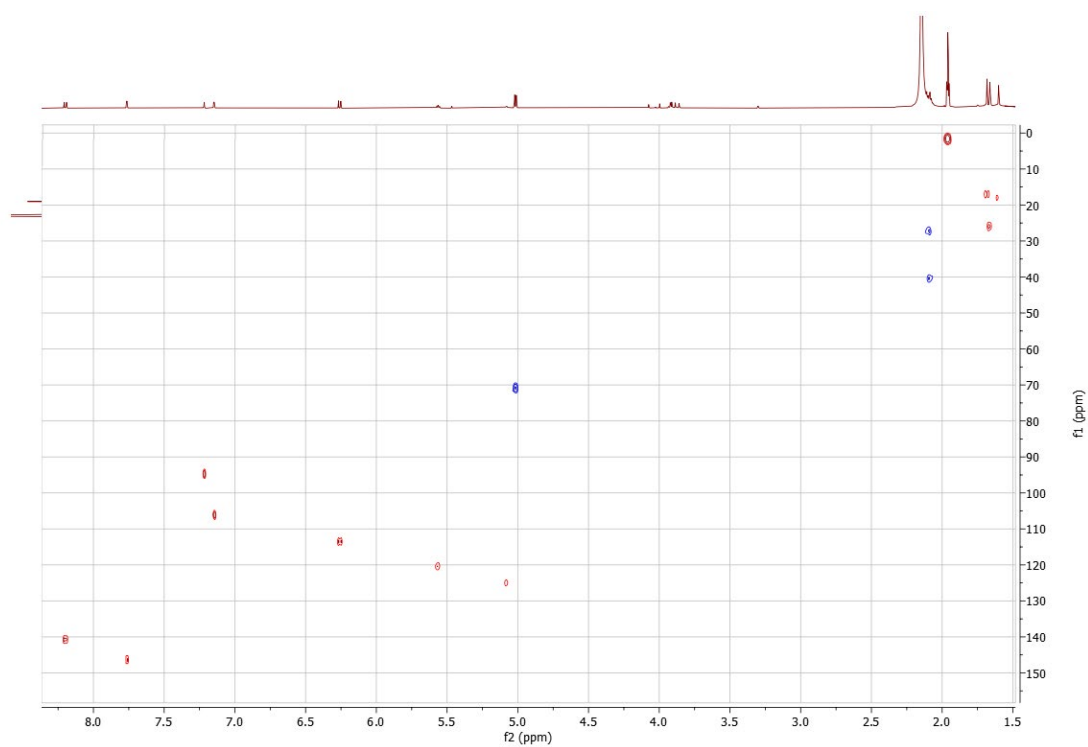
Εικόνα 77 Φάσμα ^1H -NMR της μπεργκαμοτίνης.

Όπως στην περίπτωση του αουραπτενίου, έτσι και στο μόριο της μπεργκαμοτίνης, στο φάσμα ^1H -NMR παρατηρείται η ύπαρξη των 3 μεθoxy-ομάδων στις θέσεις 11', 12' και 13' στην περιοχή 1,50-2,00ppm, ενώ μέσα στο σήμα που προέρχεται από την υγρασία του διαλύτη (περίπου στα 2,00ppm) εμφανίζονται και οι κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα των ανθράκων 7' και 8'. Επιπλέον, στην περιοχή 5,00-5,60ppm παρατηρούνται οι κορυφές των υδρογόνων των διπλών δεσμών (H-5' και H-9'), όπως επίσης, και τα H-4', που βρίσκονται κοντά σε οξυγόνο. Τέλος, στην περιοχή 6,20-8,20ppm εμφανίζονται τα υδρογόνα της φουρανοκουμαρίνης.

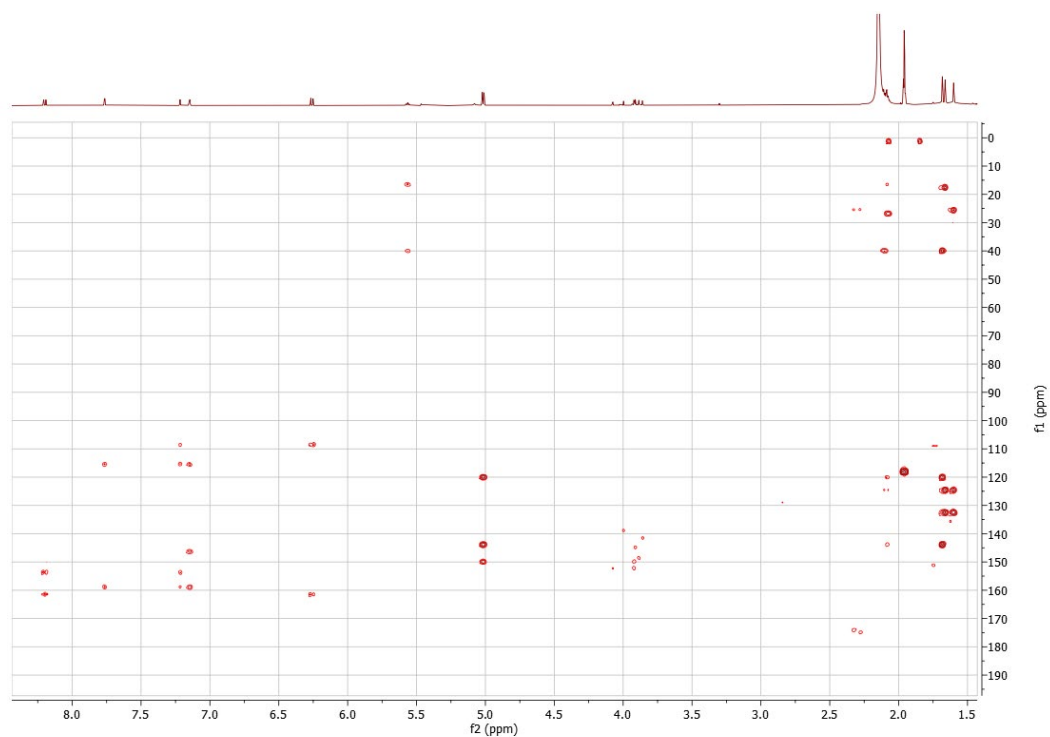


Εικόνα 78 Φάσμα COSY της μπεργκαμοτίνης.

Το φάσμα COSY, δείχνει τις γειτονικές σχέσεις των υδρογόνων της ανθρακικής αλυσίδας (H (5,00 ppm) – H (5,55 ppm) και H (2,08 ppm) – H (5,07 ppm)), αλλά και αυτές στο σύστημα της φουρανοκουμαρίνης (H (6,25ppm) – H (8,18 ppm) και H (7,13 ppm) – H (7,75 ppm)).



Εικόνα 79 Φάσμα ΗΜQC της μπεργκαμοτίνης.



Εικόνα 80 Φάσμα ΗΜBC της μπεργκαμοτίνης.

Το φάσμα ΗΜQC βοήθησε στον προσδιορισμό των ανθράκων που είναι άμεσα συνδεδεμένα με υδρογόνα και στον εντοπισμό των μεθυλενίων, ενώ με το φάσμα ΗΜBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες του μορίου.

Πίνακας 25 Τιμές ¹H-NMR και ¹³C-NMR της μπεργκαμοττίνης από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN.

Μπεργκαμοττίνη

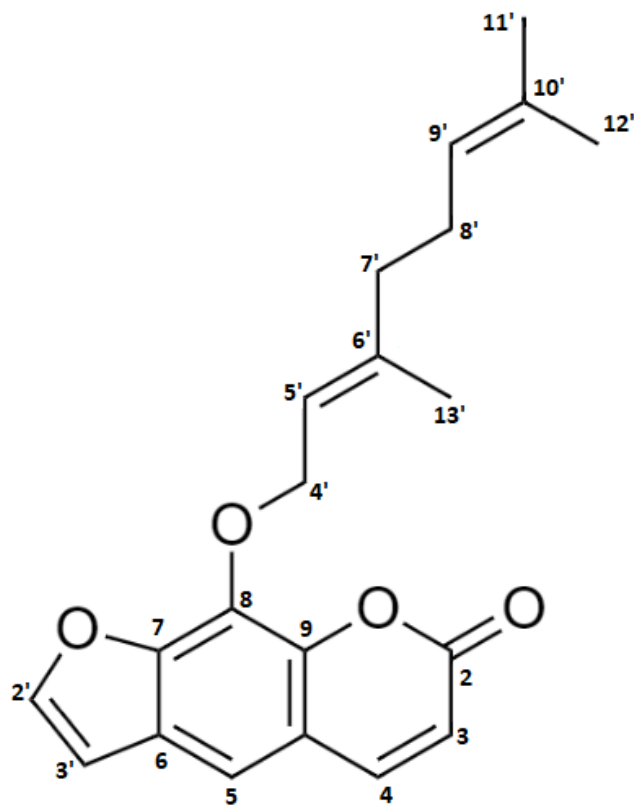
No	Ppm	No	Ppm
H-3	6,25 d (J=9,8 Hz)	C-2	161,4
H-4	8,18 d (J=9,8 Hz)	C-3	113,8
H-8	7,20 s	C-4	140,7
H-2'	7,13d (J=2,3 Hz)	C-5	150,1
H-3'	7,75d (J=2,3 Hz)	C-6	115,5
H-4'	5,00brd (J=6,9 Hz)	C-7	158,6
H-5'	5,55 t (J=7,1 Hz)	C-8	94,7
H-7'	2,10 m	C-9	153,7
H-8'	2,08 m	C-10	108,6
H-9'	5,07 t (J=6,8 Hz)	C-2'	106,1
H-11'	1,66 s	C-3'	146,2
H-12'	1,60 s	C-4'	70,8
H-13'	1,68 s	C-5'	120,4
		C-6'	143,9
		C-7'	40,3
		C-8'	27,2
		C-9'	125,0
		C-10'	133,2
		C-11'	25,8
		C-12'	17,9
		C-13'	17,0

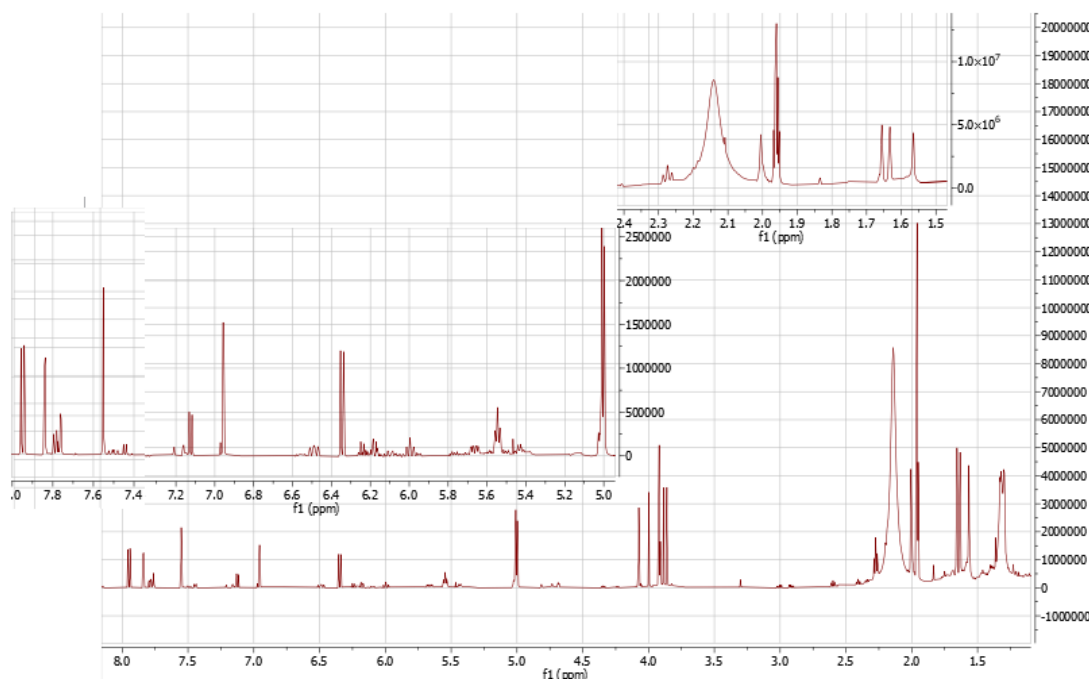
Η μπεργκαμοττίνη είναι μια φουρανοκουμαρίνη που βρίσκεται σε φυτά *Citrus*, η οποία δρα ως ισχυρός αναστολέας του κύριου ενζύμου του ανθρώπινου μεταβολισμού, του κυτοχρώματος P450 3A4 (CYP3A4) (Rossi *et al.* 2020).

Ενώ το ψωραλένιο και κάποια παράγωγά του, όπως το 5-μεθοξυψωραλένιο, είναι γνωστά για τις φωτοτοξικές, και φωτοκαρκινογόνες ιδιότητές τους, η μπεργκαμοττίνη έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει σημαντική φωτο-μεταλλαξικένηση. Η μελέτη αυτή έγινε σε κύτταρα V79 χρησιμοποιώντας το 5-μεθοξυψωραλένιο ως ένωση αναφοράς. Επίσης, έχουν γίνει

αρκετές έρευνες που μελετούν την πιθανή επίδρασή της σε διάφορους τύπους καρκίνου. Έτσι, σε *in vitro* πειράματα, έχει αποδειχτεί ότι, δρώντας συνεργιστικά με την συμβαστατίνη επηρεάζουν την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τον παράγοντα TNF και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (KBM-5) στην περίπτωση της λευχαιμίας. Επίσης, στις περιπτώσεις του καρκίνου του στομάχου (BGC-823) και του προστάτη (DU145) η μπεργκαμοττίνη δρα αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Ko *et al.* 2018).

Χημική Ένωση 8: 8-Γερανυλοξυ-ψωραλένιο

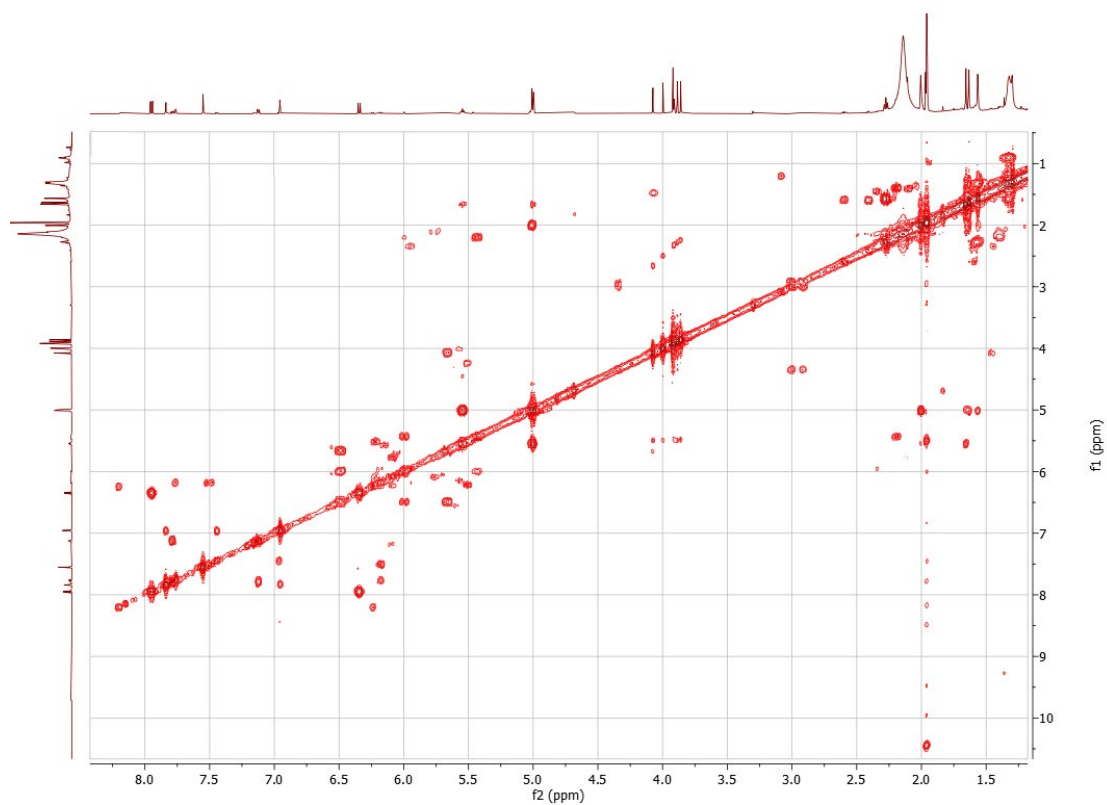




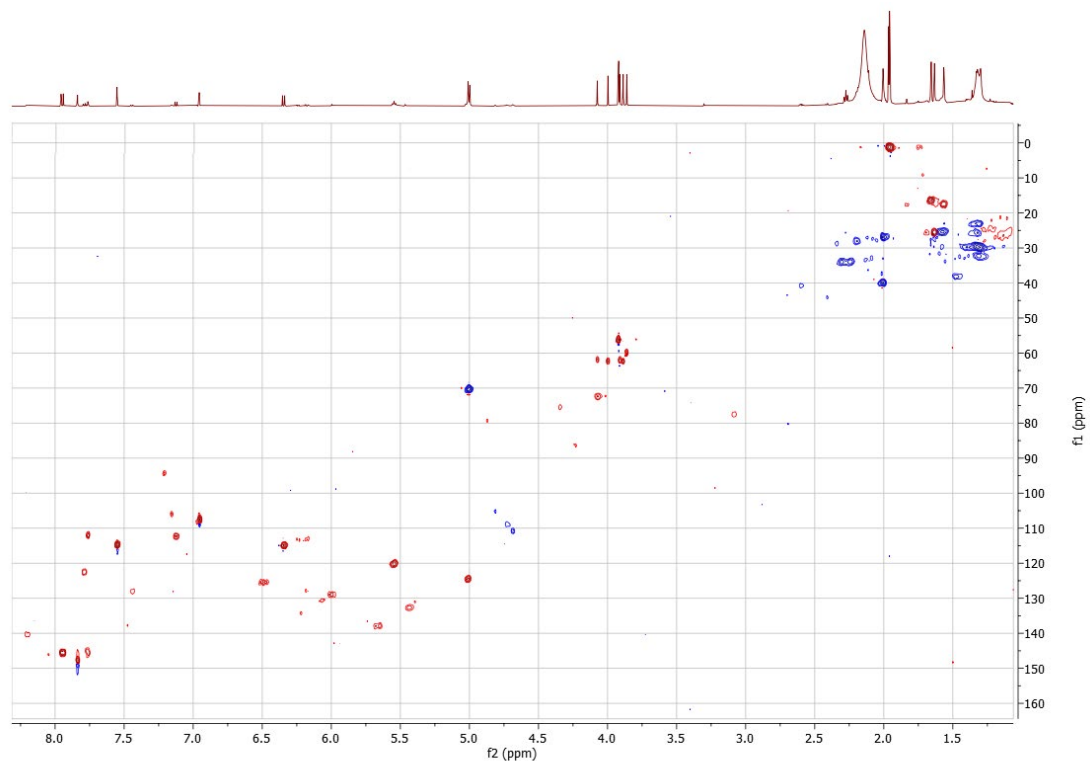
Εικόνα 81 Φάσμα ^1H -NMR του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο.

Από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό προέκυψε και το μίγμα των μορίων 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνη, που απομονώθηκε και ως καθαρή χημική ουσία και τα φάσματά της φαίνονται παραπάνω, και το 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο. Στο φάσμα ^1H -NMR του μίγματος φαίνεται ότι το ποσοστό συμμετοχής των δύο αυτών μορίων είναι περίπου 50%-50%. Εφόσον, η απόδοση της δομής του πρώτου μορίου έγινε και παραπάνω, σε αυτό το μίγμα έγινε η απόδοση της δομής του δεύτερου.

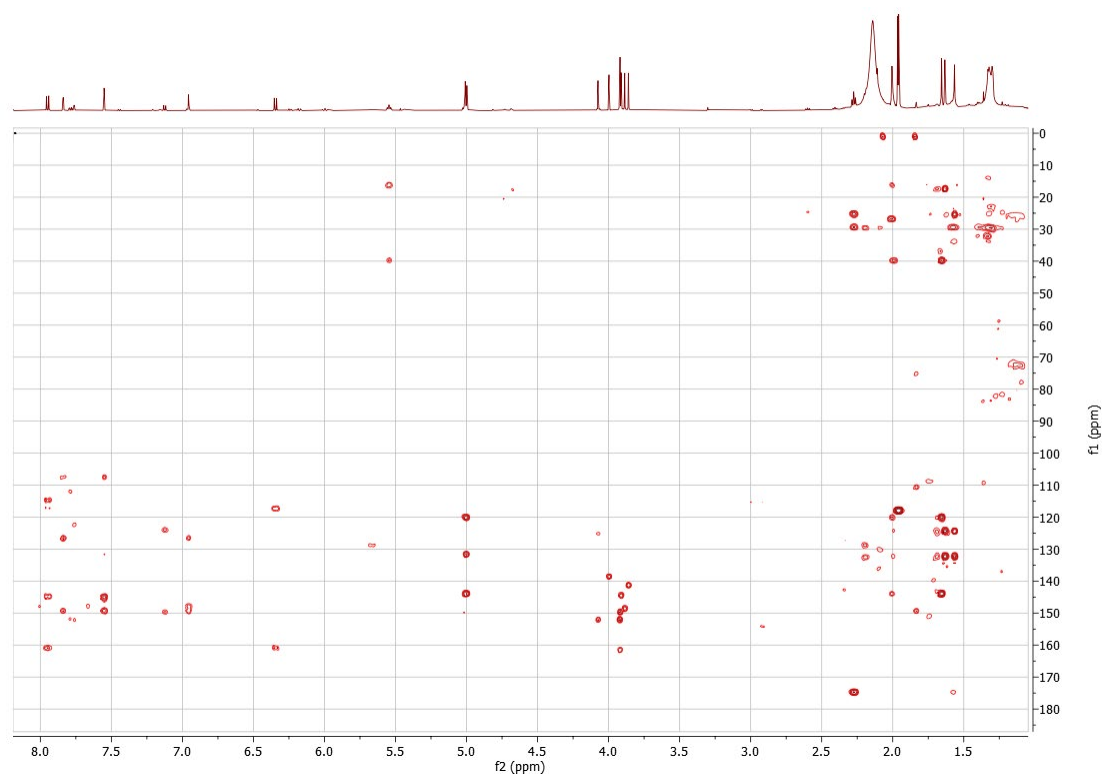
Στο φάσμα ^1H -NMR του μίγματος, παρατηρείται η ύπαρξη των 3 μεθοξυομάδων στις θέσεις 11', 12' και 13' στην περιοχή 1,50-2,00ppm, ενώ σε αυτή την περίπτωση έχει διαχωριστεί μία κορυφή στα 2,04ppm που αντιστοιχεί στα υδρογόνα του ανθράκα 7' και 8'. Οι κορυφές των υδρογόνων των διπλών δεσμών (C-5' και C-9'), όπως, επίσης, και του C-4', που βρίσκονται κοντά σε οξυγόνο εμφανίζονται στην περιοχή 5,00-5,60ppm και στην περιοχή 6,00-8,20ppm εμφανίζονται τα υδρογόνα της φουρανοκουμαρίνης.



Εικόνα 82 Φάσμα COSY του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο.



Εικόνα 83 Φάσμα HMQC του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο.



Εικόνα 84 Φάσμα HMBC του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο.

Το φάσμα COSY, αποκάλυψε τα γειτονικά υδρογόνα της ανθρακικής αλυσίδας H-4' και H-5', H-7' και H-8', H-8' και H-9' αλλά και αυτά στους δακτυλίους της φουρανοκουμαρίνης, δηλαδή τα H-3 και H-4 και τα H-2' και H-3', ενώ το φάσμα HMQC βοήθησε στον προσδιορισμό των ανθράκων που είναι άμεσα συνδεδεμένα με υδρογόνα και έγινε σαφές ότι τα H-4' H-5' και H-9', όπως και τα H-7' και H-8' εμφανίζονται με την ίδια τιμή μετατόπισης στο ^1H -NMR, αλλά συνδέονται με διαφορετικούς άνθρακες, ενώ με το φάσμα HMBC, προσδιορίστηκαν και οι υπόλοιποι άνθρακες του μορίου.

Πίνακας 26 Τιμές ^1H -NMR και ^{13}C -NMR του μορίου 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο από φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο ACN.

8-Γερανυλοξυ-ψωραλένιο

No	ppm	No	Ppm
H-3	6,35 d (J=9,6 Hz)	C-2	161,0
H-4	7,95 d (J=9,6 Hz)	C-3	114,9
H-5	7,55 s	C-4	145,0
H-2'	7,84 d (J=2,2 Hz)	C-5	114,7

H-3'	6,96 d (J=2,2 Hz)	C-6	126,6
H-4'	5,00d (J=9,6 Hz)	C-7	149,1
H-5'	5,55 t (J=7,2 Hz)	C-8	131,4
H-7'	2,04 m	C-9	144,4
H-8'	2,04 m	C-10	117,4
H-9'	5,00 d (J=9,6 Hz)	C-2'	147,7
H-11'	1,57 s	C-3'	107,5
H-12'	1,63 s	C-4'	70,4
H-13'	1,66 s	C-5'	120,2
		C-6'	143,0
		C-7'	34,8
		C-8'	26,9
		C-9'	124,4
		C-10'	132,3
		C-11'	17,4
		C-12'	25,4
		C-13'	16,4

Αν και το 8-γερανυλοξυ-ψωραλένιο εμφανίζει πολύ χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, τόσο η αντιμικροβιακή του δράση έναντι του *Staphylococcus epidermidis*, όσο και η αντιμυκητιασική του δράση έναντι των *Candida kruzei* και *Candida kefyr* είναι ιδιαίτερα υψηλή (Razavi *et al.* 2009). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι παρουσιάζει νηματοκτόνο δράση έναντι του *Bursaphelenchus xylophilus* (Razavi 2010).

6.7. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη για την πιθανή αξιοποίηση των *Citrus* CPEOs, που αποτελούν ένα από τα παραπροϊόντα της χυμοποίησης των εσπεριδοειδών, ως πλούσια πηγή καροτενοειδών για τη χρήση τους σε συμπληρώματα διατροφής. Σήμερα, το πτητικό κλάσμα από τα *Citrus* CPEOs αξιοποιείται μονάχα για το αιθέριο έλαιό τους, σε βιομηχανίες τροφίμων, ποτών, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων λόγω του χαρακτηριστικού αρώματός του ως βελτιωτικό οσμής και γεύσης. Αντίθετα το μη πτητικό κλάσμα τους, που είναι αρκετά

πλούσιο τόσο σε καροτενοειδή, όσο και σε φλαβονοειδή και ιδιαίτερα αυτά του μανταρινιού και του πορτοκαλιού, δεν έχουν βρει ακόμα μία θέση στην αγορά. Χρησιμοποιώντας και το δεύτερο κλάσμα τους, τα *Citrus* CPEOs, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν πλήρως, έτσι ώστε από μία σχετικά φθηνή πρώτη ύλη, καθώς τα δύο πλουσιότερα CPEOs κοστίζουν περίπου 8-12 €/kg το CPEO_{πορτοκάλι} και 12-15 €/kg το CPEO_{μανταρίνι} (Karsaski-Kanelli et al. 2017), να είναι δυνατή η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Συγκεκριμένα, από την ανάλυση των καροτενοειδών των υπολειμμάτων των CPEOs παρατηρήθηκε ότι στο πορτοκάλι, η περιεκτικότητα σε β-κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη είναι $14,53 \pm 1,06$, $12,43 \pm 2,23$ και $4,49 \pm 1,73$ mg/100g CPEO αντίστοιχα, ενώ στο μανταρίνι, η περιεκτικότητα των δύο πρώτων καροτενοειδών είναι $27,53 \pm 6,99$ και $2,14 \pm 0,15$ mg/100g CPEO, αντίστοιχα. Η τιμή των καθαρών αυτών καροτενοειδών στην αγορά σήμερα είναι αρκετά υψηλή δεδομένου ότι η απομόνωση τους είναι πολύ δύσκολη, καθώς πρόκειται για ασταθή μόρια. Επιπλέον, οικονομικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν και κυρίως τα μόρια ερακλινόλη, 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβονη, 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβονη και νομπιλετίνη. Φυσικά, δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι τα παραπάνω είναι αποτελέσματα των συγκεκριμένων CPEOs που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες αυτής της μελέτης, καθώς τα εσπεριδοειδή που χρησιμοποιούνται κάθε φορά για την παραγωγή χυμών είναι διαφορετικά, αφού ανάλογα με την εποχή χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποικιλίες. Επίσης, η σύσταση μπορεί να διαφέρει, κυρίως ποσοτικά, αλλά και ποιοτικά, μεταξύ των ίδιων ποικιλιών, αλλά διαφορετικής περιόδου συλλογής.

Για να επιτευχθεί, όμως, η παραγωγή των πλούσιων σε βιοδραστικά μόρια υπολειμμάτων, θα έπρεπε, αρχικά, να γίνει η απομάκρυνση του καθαρού αιθέριου ελαίου. Μέρος της μελέτης, λοιπόν, ήταν και η εύρεση του καλύτερου τρόπου απομάκρυνσης του μεγαλύτερου σε ποσοστό πτητικού κλάσματος χωρίς την καταστροφή των μορίων αυτών. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η κλασική υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger που είναι μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές παραγωγής αιθέριου ελαίου. Όμως, από την αρχή, υπήρχε η αμφιβολία για την επίπτωση αυτών των έντονων συνθηκών στα καροτενοειδή, που αποτέλεσε τον πρωταρχικό στόχο. Η επόμενη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για αυτό τον σκοπό ήταν η συμπύκνωση υπό κενό, η οποία ξεκίνησε από χαμηλή θερμοκρασία (35°C) με σταδιακή αύξησή της ανά 5°C, όμως, η απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος ξεκίνησε στους 75-80°C. Επομένως, έπρεπε να βρεθεί κάποιος άλλος τρόπος διαχωρισμού των δύο

κλασμάτων με πιο ήπιες συνθήκες. Αυτός, ο τρόπος ήταν η χρήση των αλκοολών, MeOH, EtOH και i-PrOH για τη δημιουργία αζεοτροπικού μίγματος με το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου *Citrus*, το D-λεμονένιο, στους 30-35°C υπό κενό. Από αυτές η MeOH είχε την μικρότερη απόδοση απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος, αφού οι ποσότητες που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ήταν πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της EtOH και i-PrOH, οι οποίες για την απομάκρυνση 1 g πτητικού κλάσματος χρειαζόταν περίπου 10 mL αλκοόλης. Επίσης, η σύγκριση των αποδόσεων μάζας μεταξύ αυτής της τεχνικής και της υδροαπόσταξης, που αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο απομάκρυνσης του πτητικού κλάσματος, δείχνει ότι ένα μικρό ποσοστό, της τάξεως του 1,5-2,0%, του πτητικού κλάσματος παραμένει στο υπόλειμμα.

Σε δεύτερο στάδιο, έπρεπε να γίνει ο προσδιορισμός της αξίας του υπολείμματος ως προς την περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδή και έτσι έγινε η μέτρηση των ολικών καροτενοειδών, όπου αποδείχτηκε ότι η περιεκτικότητά τους ήταν υψηλότερη στην περίπτωση της εφαρμογής της τελευταίας τεχνικής και έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός ως προς την περιεκτικότητά τους σε φουκοξανθίνη, ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη, λουτεΐνη, β-κρυπτοξανθίνη, λυκοπένιο, α-καροτένιο, β-καροτένιο και φυτοένιο.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των καροτενοειδών αναπτύχθηκε μία νέα αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα σύστημα LC-MS/MS με το οποίο γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των παραπάνω καροτενοειδών, εκτός των μορίων ζεαξανθίνη και λουτεΐνη. Η αδυναμία διαχωρισμού των δύο αυτών μορίων έγκειται στην ομοιότητά τους ως προς τη δομή τους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα και την σύγχρονη έκλουσή τους, αλλά και την αδυναμία προσδιορισμού με τη βοήθεια του φασματογράφου μάζας, αφού και τα θραύσματά τους ήταν ταυτόσημα. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευσή τους ήταν η SRM, η οποία χρησιμοποιεί ένα ζεύγος ιόντων (parent mass / product mass) για την αύξηση της ευαισθησίας της μέτρησης, αλλά και με αυτόν τον τρόπο δεν βρέθηκε κάποιο ζεύγος ιόντων που να διαφέρει για αυτά τα δύο μόρια. Έτσι, έγινε η προσπάθεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού με αλλαγές στην σύσταση και την ροή της κινητής φάσης και στη θερμοκρασία της στήλης, όμως, καμία από αυτές τις αλλαγές δεν ήταν ικανή να διαχωρίσει τα δύο μόρια. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική, η μέθοδος HPLC-DAD, όπου χρησιμοποιήθηκε μία στήλη C18 με μεγαλύτερο μήκος, η οποία βοήθησε στον χρωματογραφικό διαχωρισμό των δύο μορίων.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των καροτενοειδών πριν και μετά την σαπωνοποίηση, φαίνεται ξεκάθαρα πόσο σημαντικό βήμα είναι η σαπωνοποίηση ώστε να ελευθερωθούν τα καροτενοειδή από τις συζευγμένες μορφές τους. Στην περίπτωση των ειδών του γένους *Citrus*, πολλά καροτενοειδή βρίσκονται υπό την μορφή εστέρων και για αυτό, όπως αποδείχτηκε, ήταν απαραίτητο βήμα για την ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων ενώσεων. Επίσης, η ανάπτυξη αυτής της μεθόδου ανάλυσης ήταν αρκετά δύσκολη λόγω του χαμηλού σήματος ορισμένων καροτενοειδών, όπως το β-καροτένιο, άλλα και λόγω της μεγάλης αστάθειας των προτύπων. Όλη η διαδικασία έγινε με υποφωτισμό και με όσο το δυνατόν πιο γρήγορες κινήσεις, ώστε να αποφευχθεί η διαρκής έκθεσή τους τόσο στο ελάχιστο φως του εργαστηρίου, όσο και στο οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Τα πρότυπα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -18°C σε ατμόσφαιρα Ar . Ιδιαίτερο πρόβλημα παρουσιάστηκε λόγω της δυσδιαλυτότητας του λυκοπενίου, όπου ήταν σχεδόν αδύνατη η παρασκευή πυκνού διαλύματος.

Εκτός, όμως, από την περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδή, βρέθηκε ότι και η περιεκτικότητα των CPEOs σε φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα υψηλή και μάλιστα, έγινε η απομόνωση ορισμένων εξ αυτών και συγκεκριμένα τεσσάρων πολυμεθοξυφλαβονών, της τανγκερετίνης, της 3,5,6,7,8,3',4'-επταμεθοξυφλαβόνης της νομπιλετίνης και της 5,6,7,4'-τετραμεθοξυφλαβόνης. Αυτά τα μόρια είναι ιδιαιτέρως διαδεδομένα στο γένος *Citrus* και παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως προς τη βιολογική τους δράση. Επιπλέον, απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η κουμαρίνη αουραπτένιο και οι φουρανοκουμαρίνες ερακλινόλη και μπεργαμοτίνη, οι οποίες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα βιολογική δράση.

Ο αρχικός στόχος της μελέτης ήταν η αναζήτηση ενός προϊόντος με υψηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο, κυρίως, σε σιτηρέσια, καθώς σε αρκετές εκτροφές, όπως π.χ. σε εκτροφές πτηνών και ιχθύων, χρησιμοποιούνται πρόσθετα καροτενοειδών. Αυτός ο αρχικός στόχος επετεύχθη με επιτυχία, αφού, όντως, η περιεκτικότητα των CPEO πορτοκαλιού και μανταρινιού σε καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα υψηλή, μάλιστα, βρέθηκε πως εκτός από υψηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, είναι πλούσια και σε φλαβονοειδή, που αποτελούν, επίσης, ενδιαφέροντα μόρια ως πρόσθετα σε συμπληρώματα διατροφής.

Στις μελλοντικές προοπτικές είναι η προσθήκη των υπολειμμάτων CPEO, δηλαδή των CPEOs μετά την απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος, σε σιτηρέσια με τρόπο που θα γίνει εύκολα αποδεκτή από τους ζωικούς οργανισμούς, καθώς και η περαιτέρω μελέτη της βιολογικής δράσης, τόσο για το αρχικό μίγμα, όσο και για το άπολο και

πολικό κλάσμα, αλλά και τα απομονωμένα μόρια, σε άλλους φαρμακολογικούς στόχους.

BIBΛΙΟΦΡΑΦΙΑ

- Abdallah, Ingy I., and Wim J. Quax. 2017. "A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids." *KnE Life Sciences* 3 (5): 81. <https://doi.org/10.18502/cls.v3i5.981>.
- Abizadeh, Marzieh, Marefat Ghaffari Novin, Fardin Amidi, Seyed Ali Ziaei, Mohammad Amin Abdollahifar, and Hamid Nazarian. 2020. "Potential of Auraptene in Improvement of Oocyte Maturation, Fertilization Rate, and Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome Mouse Model." *Reproductive Sciences* 27 (9): 1742–51. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00168-9>.
- Albertini, Marie-Vincente, Elodie Carcouet, Olivier Pailly, Claude Gambotti, François Luro, and Liliane Berti. 2006. "Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (21): 8335–39. <https://doi.org/10.1021/jf061648j>.
- Alquézar Berta, Rodrigo María Jesús, and Lorenzo Zacarías. 2008. "Carotenoid Biosynthesis and Their Regulation in Citrus Fruits." In , 2 Special Issue 1 CITRUS I:23–35.
- Aman, R, J Biehl, R Carle, J Conrad, U Beifuss, and A Schieber. 2005. "Application of HPLC Coupled with DAD, APCI-MS and NMR to the Analysis of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in Thermally Processed Vegetables." *Food Chemistry* 92 (4): 753–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.031>.
- Barros, Helena Rudge de Moraes, Tânia Aparecida Pinto de Castro Ferreira, and Maria Inés Genovese. 2012. "Antioxidant Capacity and Mineral Content of Pulp and Peel from Commercial Cultivars of Citrus from Brazil." *Food Chemistry* 134 (4): 1892–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.090>.
- Benavente-García, O., and J. Castillo. 2008. "Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (15): 6185–6205. <https://doi.org/10.1021/jf8006568>.
- Bendich, A., and J. A. Olson. 1989. "Biological Actions of Carotenoids." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (8): 1927–32.
- Berg, Jeremy Mark, John L Tymoczko, Lubert Stryer, Alexēs Aletras, Azarias Karamanlidēs, and Giōrgos K Papadopoulos. 2004. *BIOXHMEIA*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Berger, Terry A., and Blair K. Berger. 2013. "Separation of Natural Food Pigments in Saponified and Unsaponified Paprika Oleoresin by Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC)." *Chromatographia* 76 (11–12): 591–601. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2466-y>.
- Berman, Judit, Uxue Zorrilla-López, Gemma Farré, Changfu Zhu, Gerhard Sandmann, Richard M. Twyman, Teresa Capell, and Paul Christou. 2015. "Nutritionally Important Carotenoids as Consumer Products." *Phytochemistry Reviews* 14 (5): 727–43. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9373-1>.
- Bernstein, Paul S., Binxing Li, Preejith P. Vachali, Aruna Gorusupudi, Rajalekshmy Shyam, Bradley S. Henriksen, and John M. Nolan. 2016. "Lutein, Zeaxanthin, and Meso-Zeaxanthin: The Basic and Clinical Science Underlying Carotenoid-Based Nutritional Interventions against Ocular Disease." *Progress in Retinal and Eye Research* 50 (January): 34–66. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.10.003>.
- Bhosale, Prakash, and Paul S. Bernstein. 2005. "Microbial Xanthophylls." *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (4): 445–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0032-8>.

- Bicanic, Dane Danijel. 2011. "On the Photoacoustic, Photothermal and Colorimetric Quantification of Carotenoids and Other Phytonutrients in Some Foods: A Review." *Journal of Molecular Structure* 993 (1–3): 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.12.061>.
- Bicchi, Carlo. 2012. "CITRUS OILS: COMPOSITION, ADVANCED ANALYTICAL TECHNIQUES, CONTAMINANTS AND BIOLOGICAL ACTIVITY, Edited by Giovanni Dugo and Duigi Mondello. Volume 49 of the Book Series Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, Series Editor: Roland Hardman. CR." *Flavour and Fragrance Journal* 27 (3): 260–61. <https://doi.org/10.1002/ffj.3089>.
- Bonierbale, Merideth, Wolfgang Grüneberg, Walter Amoros, Gabriela Burgos, Elisa Salas, Eduardo Porras, and Thomas zum Felde. 2009. "Total and Individual Carotenoid Profiles in Solanum Phureja Cultivated Potatoes: II. Development and Application of near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Calibrations for Germplasm Characterization." *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (6): 509–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.08.009>.
- Bramley, P. M. 2002. "Regulation of Carotenoid Formation during Tomato Fruit Ripening and Development." *Journal of Experimental Botany* 53 (377): 2107–13. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf059>.
- Brenna, Oreste V., and Nicola Berardo. 2004. "Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the Evaluation of Carotenoids Content in Maize." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (18): 5577–82. <https://doi.org/10.1021/jf0495082>.
- Brewer, Philip B., Hinanit Koltai, and Christine A. Beveridge. 2013. "Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development." *Molecular Plant* 6 (1): 18–28. <https://doi.org/10.1093/mp/sss130>.
- Britton, G. 1995. "Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (15): 1551–58.
- Britton, George, ed. 2004. *Carotenoids: Handbook*. Basel: Birkhäuser.
- Britton, George, Synnøve Liaaen-Jensen, and Hanspeter Pfander. 2004. *Carotenoids: Handbook*. Basel: Birkhäuser Basel : Imprint : Birkhäuser. <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3086414>.
- Burri, Betty J., Jasmine S. T. Chang, and Terry R. Neidlinger. 2011. "β-Cryptoxanthin- and α-Carotene-Rich Foods Have Greater Apparent Bioavailability than β-Carotene-Rich Foods in Western Diets." *British Journal of Nutrition* 105 (2): 212–19. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003260>.
- Caballero-Ortega, Heriberto, Rogelio Pereda-Miranda, and Fikrat I. Abdullaev. 2007. "HPLC Quantification of Major Active Components from 11 Different Saffron (Crocus Sativus L.) Sources." *Food Chemistry* 100 (3): 1126–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.020>.
- Carretero-Paulet, Lorenzo, Albert Cairó, Patricia Botella-Pavía, Oscar Besumbes, Narciso Campos, Albert Boronat, and Manuel Rodríguez-Concepción. 2006. "Enhanced Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis Plants Overexpressing Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase." *Plant Molecular Biology* 62 (4–5): 683–95. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9051-9>.
- Castro-Vazquez, Lucia, María Elena Alañón, Virginia Rodríguez-Robledo, María Soledad Pérez-Coello, Isidro Hermosín-Gutierrez, María Consuelo Díaz-Maroto, Joaquín Jordán, María Francisca Galindo, and María del Mar Arroyo-Jiménez. 2016. "Bioactive Flavonoids, Antioxidant Behaviour, and Cytoprotective Effects of Dried

- Grapefruit Peels (*Citrus Paradisi* Macf.).” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8915729>.
- Cazzonelli, C. I., N. Nisar, D. Hussain, M. E. Carmody, and B. J. Pogson. 2010. “Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in Plants—Micronutrients, Vitamins and Health Benefits.” In *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, edited by Eng Chong Pua and Michael R. Davey, 117–37. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_7.
- “CHAPTER 11: PRACTICAL ASPECTS OF CITRUS JUICE PROCESSING.” n.d. <http://www.fao.org/3/y2515e/y2515e13.htm>.
- Chaudhary, Priyanka R., Haejeen Bang, Guddadarangavvanahally K. Jayaprakasha, and Bhimanagouda S. Patil. 2016. “Variation in Key Flavonoid Biosynthetic Enzymes and Phytochemicals in ‘Rio Red’ Grapefruit (*Citrus Paradisi* Macf.) during Fruit Development.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (47): 9022–32. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02975>.
- Chen, Shujun, and Alireza Kord. 2009. “Theoretical and Experimental Comparison of Mobile Phase Consumption between Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 1216 (34): 6204–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.084>.
- Chidambara Murthy, Kotamballi N., G. K. Jayaprakasha, Shivappa M. Mantur, and Bhimanagouda S. Patil. 2012. “Citrus Monoterpenes: Potential Source of Phytochemicals for Cancer Prevention.” In *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease*, edited by Bhimanagouda S. Patil, Guddadarangavvanahally K. Jayaprakasha, Kotamballi N. Chidambara Murthy, and Navindra P. Seeram, 1093:545–58. Washington, DC: American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1093.ch031>.
- Chidambaram, Sathish Kumar, Daoud Ali, Saud Alarifi, Surendrakumar Radhakrishnan, and Idhayadhulla Akbar. 2020. “In Silico Molecular Docking: Evaluation of Coumarin Based Derivatives against SARS-CoV-2.” *Journal of Infection and Public Health* 13 (11): 1671–77. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.09.002>.
- Chung, Rosanna W.S., Per Leanderson, Anna K. Lundberg, and Lena Jonasson. 2017. “Lutein Exerts Anti-Inflammatory Effects in Patients with Coronary Artery Disease.” *Atherosclerosis* 262 (July): 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.008>.
- “Citrus: World Markets and Trade.” 2019. *United States Department of Agriculture Economics, Statistics and Market Information System* (blog). July 2019. <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>.
- Corradini, Eleonora, Patrizia Foglia, Piero Giansanti, Riccardo Gubbiotti, Roberto Samperi, and Aldo Laganà. 2011. “Flavonoids: Chemical Properties and Analytical Methodologies of Identification and Quantitation in Foods and Plants.” *Natural Product Research* 25 (5): 469–95. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.482054>.
- Croft, Kevin D. 1998. “The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 854 (1 TOWARDS PROLO): 435–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>.
- Croteau, Rodney, Toni M. Kutchan, and Norman G. Lewis. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Edited by Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, and Russell L. Jones. CHAPTER 24 vols. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.

- Cunningham, F X, B Pogson, Z Sun, K A McDonald, D DellaPenna, and E Gantt. 1996. "Functional Analysis of the Beta and Epsilon Lycopene Cyclase Enzymes of Arabidopsis Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation." *The Plant Cell* 8 (9): 1613–26. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1613>.
- Cunningham, Francis X., Daniel Chamovitz, Norihiko Misawa, Elisabeth Gantt, and Joseph Hirschberg. 1993. "Cloning and Functional Expression in *Escherichia Coli* of a Cyanobacterial Gene for Lycopene Cyclase, the Enzyme That Catalyzes the Biosynthesis of β -Carotene." *FEBS Letters* 328 (1–2): 130–38. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80980-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80980-9).
- Curini, Massimo, Giancarlo Cravotto, Francesco Epifano, and Giovanni Giannone. 2006. "Chemistry and Biological Activity of Natural and Synthetic Prenyloxycoumarins †." *Current Medicinal Chemistry* 13 (2): 199–222. <https://doi.org/10.2174/092986706775197890>.
- Del Río, J.A., M.D. Fuster, P. Gómez, I. Porras, A. García-Lidón, and A. Ortuño. 2004. "Citrus Limon: A Source of Flavonoids of Pharmaceutical Interest." *Food Chemistry* 84 (3): 457–61. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00272-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00272-3).
- Dembitsky, Valery M., and Takashi Maoka. 2007. "Allenic and Cumulenenic Lipids." *Progress in Lipid Research* 46 (6): 328–75. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.07.001>.
- Dixon, Richard A., and Giulio M. Pasinetti. 2010. "Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience." *Plant Physiology* 154 (2): 453–57. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161430>.
- Duda-Chodak, Aleksandra Duda, Aleksandra. 2007. "Antioxidant Properties of Different Fruit Seeds and Peels." *ACTA Scientiarum Polonorum* 6 (January).
- Dufossé, Laurent, Patrick Galaup, Anina Yaron, Shoshana Malis Arad, Philippe Blanc, Kotamballi N. Chidambara Murthy, and Gokare A. Ravishankar. 2005. "Microorganisms and Microalgae as Sources of Pigments for Food Use: A Scientific Oddity or an Industrial Reality?" *Trends in Food Science & Technology* 16 (9): 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>.
- Eisenreich, W., A. Bacher, D. Arigoni, and F. Rohdich. 2004. "Biosynthesis of Isoprenoids via the Non-Mevalonate Pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (12). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3381-z>.
- Estévez, Juan M., Araceli Cantero, Andreas Reindl, Stuart Reichler, and Patricia León. 2001. "1-Deoxy-d-Xylulose-5-Phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants." *Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 22901–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100854200>.
- Fan, Rong, Xi Huang, Yang Wang, Xiao Chen, Ping Ren, Hui Ji, Ying Xie, et al. 2012. "Ethnopharmacokinetic- and Activity-Guided Isolation of a New Antidepressive Compound from Fructus Aurantii Found in the Traditional Chinese Medicine Chaihu-Shugan-San: A New Approach and Its Application." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/607584>.
- Fiedor, Joanna, and Květoslava Burda. 2014. "Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease." *Nutrients* 6 (2): 466–88. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
- Filho, Carlos Lacerda De Moraes, Emanuelle Machado Marinho, Leonardo Paes Da Silva, Marcia Machado Marinho, and Emmanuel Silva Marinho. 2018. "Quantum Study Of Geometric Properties Of The Antihivcoumarin Heraclenol: A Study Of Density Functional Theory (Dft)," March. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1188394>.
- "Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)." n.d. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

- Fox, Denis L., V.Elliott Smith, and Arthur A. Wolfson. 1967. "Carotenoid Selectivity in Blood and Feathers of Lesser (African), Chilean and Greater (European) Flamingos." *Comparative Biochemistry and Physiology* 23 (1): 225–32. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(67\)90490-2](https://doi.org/10.1016/0010-406X(67)90490-2).
- Fraser, P, and Bramley PM. 2004. "The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids." *Progress in Lipid Research* 43 (3): 228–65. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>.
- Fu, Xiumin, Wenbin Kong, Gang Peng, Jingyi Zhou, Muhammad Azam, Changjie Xu, Don Grierson, and Kunsong Chen. 2012. "Plastid Structure and Carotenogenic Gene Expression in Red- and White-Fleshed Loquat (*Eriobotrya Japonica*) Fruits." *Journal of Experimental Botany* 63 (1): 341–54. <https://doi.org/10.1093/jxb/err284>.
- Gammone, Maria, and Nicolantonio D'Orazio. 2015. "Anti-Obesity Activity of the Marine Carotenoid Fucoxanthin." *Marine Drugs* 13 (4): 2196–2214. <https://doi.org/10.3390/md13042196>.
- Gammone, Maria, Graziano Riccioni, and Nicolantonio D'Orazio. 2015. "Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health." *Marine Drugs* 13 (10): 6226–46. <https://doi.org/10.3390/md13106226>.
- García-Argáez, Aída, Teresa Ramírez Apan, Hortensia Delgado, Guillermo Velázquez, and Mariano Martínez-Vázquez. 2000. "Anti-Inflammatory Activity of Coumarins from *Decatropis Bicolor* on TPA Ear Mice Model." *Planta Medica* 66 (03): 279–81. <https://doi.org/10.1055/s-2000-14894>.
- Giorio, Giovanni, Adriana Lucia Stigliani, and Caterina D'Ambrosio. 2008. "Phytoene Synthase Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - New Data on the Structures, the Deduced Amino Acid Sequences and the Expression Patterns: Tomato Colours - Why the Flower Is Yellow and the Fruit Is Red?" *FEBS Journal* 275 (3): 527–35. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x>.
- Giuffrida, Daniele, Francesco Salvo, Andrea Salvo, Lara La Pera, and Giacomo Dugo. 2007. "Pigments Composition in Monovarietal Virgin Olive Oils from Various Sicilian Olive Varieties." *Food Chemistry* 101 (2): 833–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.030>.
- Gómez-García, María, and Neftalí Ochoa-Alejo. 2013. "Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* Spp.)." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (9): 19025–53. <https://doi.org/10.3390/ijms140919025>.
- González-Molina, E., R. Domínguez-Perles, D.A. Moreno, and C. García-Viguera. 2010. "Natural Bioactive Compounds of Citrus Limon for Food and Health." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2): 327–45. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.027>.
- Han, Saem, Hye Min Kim, Jeong Min Lee, So-Youn Mok, and Sanghyun Lee. 2010. "Isolation and Identification of Polymethoxyflavones from the Hybrid Citrus, Hallabong." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (17): 9488–91. <https://doi.org/10.1021/jf102730b>.
- Harborne, Jeffrey B, and Christine A Williams. 2000. "Advances in Flavonoid Research since 1992." *Phytochemistry* 55 (6): 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1).
- Havas, Fabien, Shlomo Krispin, Antonio J. Meléndez-Martínez, and Liki von Oppen-Bezalel. 2018. "Preliminary Data on the Safety of Phytoene- and Phytofluene-Rich Products for Human Use Including Topical Application." *Journal of Toxicology* 2018: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/5475784>.

- Havsteen, Bent H. 2002. "The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids." *Pharmacology & Therapeutics* 96 (2–3): 67–202. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X).
- Herrero-Martínez, José M., Sebastiaan Eeltink, Peter J. Schoenmakers, Wim Th. Kok, and Guillermo Ramis-Ramos. 2006. "Determination of Major Carotenoids in Vegetables by Capillary Electrochromatography." *Journal of Separation Science* 29 (5): 660–65. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500427>.
- Higuera-Ciapara, I., L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea. 2006. "Astaxanthin: A Review of Its Chemistry and Applications." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (2): 185–96. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>.
- Holleboom, Christoph-Peter, Sunny Yoo, Pen-Nan Liao, Ian Compton, Winfried Haase, Helmut Kirchhoff, and Peter Jomo Walla. 2013. "Carotenoid–Chlorophyll Coupling and Fluorescence Quenching Correlate with Protein Packing Density in Grana-Thylakoids." *The Journal of Physical Chemistry B* 117 (38): 11022–30. <https://doi.org/10.1021/jp311786g>.
- Hosokawa, Masashi, Masahiro Kudo, Hayato Maeda, Hiroyuki Kohno, Takuji Tanaka, and Kazuo Miyashita. 2004. "Fucoxanthin Induces Apoptosis and Enhances the Antiproliferative Effect of the PPAR γ Ligand, Troglitazone, on Colon Cancer Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1675 (1–3): 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.08.012>.
- Hu, Tingting, Dan Liu, Yan Chen, Jun Wu, and Shusheng Wang. 2010. "Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide Fractions Extracted from *Undaria Pinnatifida* in Vitro." *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2): 193–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.004>.
- Ignat, Ioana, Irina Volf, and Valentin I. Popa. 2011. "A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables." *Food Chemistry* 126 (4): 1821–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- Isaacson, Tal, Itzhak Ohad, Peter Beyer, and Joseph Hirschberg. 2004. "Analysis in Vitro of the Enzyme CRTISO Establishes a Poly-Cis-Carotenoid Biosynthesis Pathway in Plants." *Plant Physiology* 136 (4): 4246–55. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052092>.
- Islam, K.M.S., and F.J. Schweigert. 2015. "Comparison of Three Spectrophotometric Methods for Analysis of Egg Yolk Carotenoids." *Food Chemistry* 172 (April): 233–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.045>.
- Jalilzadeh, Nazila, Naser Samadi, Roya Salehi, Gholamreza Dehghan, Mehrdad Iranshahi, Mohammad Reza Dadpour, and Hamed Hamishehkar. 2020. "Novel Nano-Vehicle for Delivery and Efficiency of Anticancer Auraptene against Colon Cancer Cells." *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58527-0>.
- James H. Overfield, and Alfred J. Andrea. 1990. *The Human Record*. Vol. 1. Boston.
- Javanmardi, Jamal, and Chieri Kubota. 2006. "Variation of Lycopene, Antioxidant Activity, Total Soluble Solids and Weight Loss of Tomato during Postharvest Storage." *Postharvest Biology and Technology* 41 (2): 151–55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.008>.
- Joghataee, S, M Mohammad-Zadeh, B Amin, F Jafari, M Tondar, and O Gholami. 2020. "Auraptene Has Neuroprotective and Memory Enhancing Effects in a Rat Model of Alzheimer's Disease." *Neurology Asia* 25 (3): 353–60.
- Ju-Ichi, Motoharu. 2005. "Chemical Study of *Citrus* Plants in the Search for Cancer Chemopreventive Agents." *YAKUGAKU ZASSHI* 125 (3): 231–54. <https://doi.org/10.1248/yakushi.125.231>.

- Kadam, S.U., and P. Prabhasankar. 2010. "Marine Foods as Functional Ingredients in Bakery and Pasta Products." *Food Research International* 43 (8): 1975–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.007>.
- Kanehisa, M. 2000. "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." *Nucleic Acids Research* 28 (1): 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Kapsaski-Kanelli, V. N., E. Evergetis, A. Michaelakis, D. P. Papachristos, E. D. Myrtsi, S. D. Koulocheri, and S. A. Haroutounian. 2017. "'Gold' Pressed Essential Oil: An Essay on the Volatile Fragment from Citrus Juice Industry By-Products Chemistry and Bioactivity." *BioMed Research International* 2017: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/2761461>.
- Kawata, Akifumi, Yukio Murakami, Seiji Suzuki, and Seiichiro Fujisawa. 2018. "Anti-Inflammatory Activity of β -Carotene, Lycopene and Tri-n-Butylborane, a Scavenger of Reactive Oxygen Species." *In Vivo* 32 (2). <https://doi.org/10.21873/invivo.11232>.
- Kelebek, Hasim. 2010. "Sugars, Organic Acids, Phenolic Compositions and Antioxidant Activity of Grapefruit (Citrus Paradisi) Cultivars Grown in Turkey." *Industrial Crops and Products* 32 (3): 269–74. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.023>.
- Khatiwora, Elija, Vaishali B Adsul, Rasika C Torane, Sucheta Gaikwad, Nirmala R Deshpande, and Rajashree V Kashalkar. 2017. "SPECTROSCOPIC DETERMINATION OF TOTAL PHENOL AND FLAVONOID CONTENTS OF CITRUS LIMON PEEL FROM NORTH EASTERN REGION OF INDIA." *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 7 (1). <https://doi.org/10.22270/jddt.v7i1.1368>.
- Kimura, Mieko, Cintia N. Kobori, Delia B. Rodriguez-Amaya, and Penelope Nestel. 2007. "Screening and HPLC Methods for Carotenoids in Sweetpotato, Cassava and Maize for Plant Breeding Trials." *Food Chemistry* 100 (4): 1734–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.020>.
- Kimura, Mieko, Delia B. Rodriguez-Amaya, and Helena T. Godoy. 1990. "Assessment of the Saponification Step in the Quantitative Determination of Carotenoids and Provitamins A." *Food Chemistry* 35 (3): 187–95. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90032-Y](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90032-Y).
- Ko, Jeong-Hyeon, Frank Arfuso, Gautam Sethi, and Kwang Ahn. 2018. "Pharmacological Utilization of Bergamottin, Derived from Grapefruits, in Cancer Prevention and Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 4048. <https://doi.org/10.3390/ijms19124048>.
- Lacatusu, Ioana, Nicoleta Badea, Oprea Ovidiu, Dionezie Bojin, and Aurelia Meghea. 2012. "Highly Antioxidant Carotene-Lipid Nanocarriers: Synthesis and Antibacterial Activity." *Journal of Nanoparticle Research* 14 (6). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0902-9>.
- Lado, Joanna, Lorenzo Zacarías, and María Jesús Rodrigo. 2016. "Regulation of Carotenoid Biosynthesis During Fruit Development." In *Carotenoids in Nature*, edited by Claudia Stange, 79:161–98. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_6.
- Lee, Hyoungh S. 2002. "Characterization of Major Anthocyanins and the Color of Red-Fleshed Budd Blood Orange (Citrus Sinensis)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (5): 1243–46. <https://doi.org/10.1021/jf011205+>.
- Lefebvre, Véronique, Marcel Kuntz, Bilal Camara, and Alain Palloix. 1998. "The Capsanthin-Capsorubin Synthase Gene: A Candidate Gene for the γ Locus Controlling the Red Fruit Colour in Pepper." *Plant Molecular Biology* 36 (5): 785–89. <https://doi.org/10.1023/A:1005966313415>.

- Li, Jigang, Yaorong Wu, Qi Xie, and Zhizhong Gong. 2017. "Abscisic Acid." In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*, 161–202. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00005-0>.
- Li, Shiming, Chih-Yu Lo, and Chi-Tang Ho. 2006. "Hydroxylated Polymethoxyflavones and Methylated Flavonoids in Sweet Orange (Citrus Sinensis) Peel." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (12): 4176–85.
<https://doi.org/10.1021/jf060234n>.
- Lichtenthaler, H.K. 2000. "Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis: Enzymes, Genes and Inhibitors." *Biochemical Society Transactions* 28 (6): 785.
<https://doi.org/10.1042/0300-5127:0280785>.
- Liu, Bo, Quanhong Deng, Lei Zhang, and Wen Zhu. 2020. "Nobiletin Alleviates Ischemia/Reperfusion Injury in the Kidney by Activating PI3K/AKT Pathway." *Molecular Medicine Reports* 22 (6): 4655–62.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11554>.
- Liu, Xiaogang, Cailing Lin, Xiaodi Ma, Yan Tan, Jiuzhao Wang, and Ming Zeng. 2018. "Functional Characterization of a Flavonoid Glycosyltransferase in Sweet Orange (Citrus Sinensis)." *Frontiers in Plant Science* 9 (February).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00166>.
- Lloyd Berg. n.d. SEPARATION OF PHELLANDRENE FROM LMONENE BYAZEOTROPIC U.S. PATENT DOCUMENTS DSTLLATION. 5,698,080, filed November 22, 1996.
- Luterotti, Svjetlana, Dane Bicanic, Kristina Kljak, Darko Grbesa, Eduardo San Martin Martínez, and Ruud Spruijt. 2011. "Assaying Total Carotenoids in Flours of Corn and Sweetpotato by Laser Photoacoustic Spectroscopy." *Food Biophysics* 6 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9168-x>.
- Ma, Y.-Z., N. E. Holt, X.-P. Li, K. K. Niyogi, and G. R. Fleming. 2003. "Evidence for Direct Carotenoid Involvement in the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8): 4377–82.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0736959100>.
- Maeda, Hayato. 2015. "Nutraceutical Effects of Fucoxanthin for Obesity and Diabetes Therapy: A Review." *Journal of Oleo Science* 64 (2): 125–32.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess14226>.
- Mansour, Rita. 2019. "Determination of Nutritional Composition in Citrus Fruits C. Aurantium during Maturity." *Nutrition & Food Science* 49 (2): 299–317.
<https://doi.org/10.1108/NFS-05-2018-0141>.
- Martens, Stefan, Anja Preuß, and Ulrich Matern. 2010. "Multifunctional Flavonoid Dioxygenases: Flavonol and Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Thaliana L." *Phytochemistry* 71 (10): 1040–49.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.016>.
- Martin, Luc. 2015. "Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment." *Marine Drugs* 13 (8): 4784–98.
<https://doi.org/10.3390/md13084784>.
- Mathews-Roth, Micheline M. 1982. "Antitumor Activity of β -Carotene, Canthaxanthin and Phytoene." *Oncology* 39 (1): 33–37. <https://doi.org/10.1159/000225601>.
- Mecocci, Patrizia, M.Cristina Polidori, Leonarda Troiano, Antonio Cherubini, Roberta Cecchetti, Gabriella Pini, Marjanne Straatman, et al. 2000. "Plasma Antioxidants and Longevity: A Study on Healthy Centenarians." *Free Radical Biology and Medicine* 28 (8): 1243–48. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00246-X).
- Meléndez-Martínez, Antonio J., Carla M. Stinco, and Paula Mapelli-Brahm. 2019. "Skin Carotenoids in Public Health and Nutricosmetics: The Emerging Roles and Applications of the UV Radiation-Absorbing Colourless Carotenoids Phytoene and Phytofluene." *Nutrients* 11 (5): 1093. <https://doi.org/10.3390/nu11051093>.

- Mialoundama, Alexis Samba, Dimitri Heintz, Nurul Jadid, Paul Nkeng, Alain Rahier, Jozsef Deli, Bilal Camara, and Florence Bouvier. 2010. "Characterization of Plant Carotenoid Cyclases as Members of the Flavoprotein Family Functioning with No Net Redox Change." *Plant Physiology* 153 (3): 970–79. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155440>.
- Mierziak, Justyna, Kamil Kostyn, and Anna Kulma. 2014. "Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment." *Molecules* 19 (10): 16240–65. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>.
- Min, Kyoung-Bok, and Jin-Young Min. 2017. "Association between Leukocyte Telomere Length and Serum Carotenoid in US Adults." *European Journal of Nutrition* 56 (3): 1045–52. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1152-x>.
- Miras-Moreno, Begoña, María Ángeles Pedreño, and Lorena Almagro Romero. 2019. "Bioactivity and Bioavailability of Phytoene and Strategies to Improve Its Production." *Phytochemistry Reviews* 18 (2): 359–76. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9597-6>.
- Miziorko, Henry M. 2011. "Enzymes of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505 (2): 131–43. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>.
- Moore, Gloria A. 2001. "Oranges and Lemons: Clues to the Taxonomy of Citrus from Molecular Markers." *Trends in Genetics* 17 (9): 536–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02442-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02442-8).
- Mozos, Ioana, Dana Stoian, Alexandru Caraba, Clemens Malainer, Jarosław O. Horbańczuk, and Atanas G. Atanasov. 2018. "Lycopene and Vascular Health." *Frontiers in Pharmacology* 9 (May). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00521>.
- Nian, Shen, and Amy C.Y. Lo. 2018. "Lutein and the Aging Eye." In *Progress in Carotenoid Research*, edited by Leila Queiroz Zepka, Eduardo Jacob-Lopes, and Veridiana Vera De Rosso. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79604>.
- Nicolosi, E., Z. N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, and E. Tribulato. 2000. "Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Investigated by Molecular Markers." *Theoretical and Applied Genetics* 100 (8): 1155–66. <https://doi.org/10.1007/s001220051419>.
- Nisar, Nazia, Li Li, Shan Lu, Nay Chi Khin, and Barry J. Pogson. 2015. "Carotenoid Metabolism in Plants." *Molecular Plant* 8 (1): 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>.
- Nogueira, M., L. Mora, E. M. A. Enfissi, P. M. Bramley, and P. D. Fraser. 2013. "Subchromoplast Sequestration of Carotenoids Affects Regulatory Mechanisms in Tomato Lines Expressing Different Carotenoid Gene Combinations." *The Plant Cell* 25 (11): 4560–79. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116210>.
- Oberholster, Renate, A. Keith Cowan, Péter Molnár, and Gy. Tóth. 2001. "Biochemical Basis of Color as an Aesthetic Quality in *Citrus insensis*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1): 303–7. <https://doi.org/10.1021/jf0007840>.
- "OrangeDream." n.d. <http://www.orangedream.gr/?p=2118>.
- Organic Serums. n.d. "Making Essential Oils: Distillation, Cold-Press Extraction and Solvent Extraction." <https://organicserums.com/blogs/articles/making-essential-oils-distillation-cold-press-extraction-and-solvent-extraction>.
- Paul Decharme. 1996. *Μυθολογία Της Αρχαίας Ελλάδος*. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ.
- Pecker, Iris, Rachel Gabbay, Francis X. Cunningham, and Joseph Hirschberg. 1996. "Cloning and Characterization of the cDNA for Lycopene β -Cyclase from Tomato Reveals Decrease in Its Expression during Fruit Ripening." *Plant Molecular Biology* 30 (4): 807–19. <https://doi.org/10.1007/BF00019013>.

- Pękal, Anna, and Krystyna Pyrzynska. 2014. "Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay." *Food Analytical Methods* 7 (9): 1776–82. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>.
- Peng, Juan, Jian-Ping Yuan, Chou-Fei Wu, and Jiang-Hai Wang. 2011. "Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health." *Marine Drugs* 9 (10): 1806–28. <https://doi.org/10.3390/md9101806>.
- Perez-Cacho, Pilar Ruiz, and Russell Rouseff. 2008. "Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A Review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21): 9785–96. <https://doi.org/10.1021/jf801244j>.
- Peterson, Julia J., Johanna T. Dwyer, Gary R. Beecher, Seema A. Bhagwat, Susan E. Gebhardt, David B. Haytowitz, and Joanne M. Holden. 2006. "Flavanones in Oranges, Tangerines (Mandarins), Tangors, and Tangelos: A Compilation and Review of the Data from the Analytical Literature." *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (August): S66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.006>.
- Petyaev, Ivan M. 2016. "Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/3218605>.
- "Photosynthesis Theory." 2020. http://ressources.unisciel.fr/tp_virtuels/Pigment_Extraction_Lab/co/module_Virtual%20Experiment_1.html.
- Polidori, Maria Cristina, Wilhelm Stahl, Olaf Eichler, Irmgard Niestroj, and Helmut Sies. 2001. "Profiles of Antioxidants in Human Plasma." *Free Radical Biology and Medicine* 30 (5): 456–62. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00345-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00345-2).
- Pollmann, Hendrik, Jürgen Breitenbach, and Gerhard Sandmann. 2017. "Development of Xanthophyllomyces Dendrorhous as a Production System for the Colorless Carotene Phytoene." *Journal of Biotechnology* 247 (April): 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.027>.
- Polyakov, N. 2001. "Carotenoids as Antioxidants: Spin Trapping EPR Andoptical Study." *Free Radical Biology and Medicine* 31 (1): 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00547-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00547-0).
- Polyakov, Nikolay E., A. Ligia Focsan, Michael K. Bowman, and Lowell D. Kispert. 2010. "Free Radical Formation in Novel Carotenoid Metal Ion Complexes of Astaxanthin." *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (50): 16968–77. <https://doi.org/10.1021/jp109039v>.
- Rasmussen, Amanda, Stephen Depuydt, Sofie Goormachtig, and Danny Geelen. 2013. "Strigolactones Fine-Tune the Root System." *Planta* 238 (4): 615–26. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1911-3>.
- Razavi, Seyed Mehdi. 2010. "Plant Coumarins as Allelopathic Agents." *International Journal of Biological Chemistry* 5 (1): 86–90. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2011.86.90>.
- Razavi, Seyed Mehdi, Saber Zahri, Hossein Nazemiyeh, Gholamreza Zarrini, Sariyeh Mohammadi, and Mohammad-Amin Abolghassemi-Fakhri. 2009. "A Furanocoumarin from Prangos Uloptera Roots, Biological Effects." *Natural Product Research* 23 (16): 1522–27. <https://doi.org/10.1080/14786410802691909>.
- Rivera, S.M., and R. Canela-Garayoa. 2012. "Analytical Tools for the Analysis of Carotenoids in Diverse Materials." *Journal of Chromatography A* 1224 (February): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.025>.
- Rodrigo, María-Jesús, Jose F. Marcos, and Lorenzo Zacarías. 2004. "Biochemical and Molecular Analysis of Carotenoid Biosynthesis in Flavedo of Orange (*Citrus*

- Sinensis* L.) during Fruit Development and Maturation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (22): 6724–31. <https://doi.org/10.1021/jf049607f>.
- Rodriguez-Concepcion, M. 2002. "Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics." *PLANT PHYSIOLOGY* 130 (3): 1079–89. <https://doi.org/10.1104/pp.007138>.
- Ross, A. Catharine, ed. 2014. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Rossi, Miriam, Sandjida Aktar, Marissa Davis, Emily Hefter Feuss, Samara Roman-Holba, Kelly Wen, Christopher Gahn, and Francesco Caruso. 2020. "The Grapefruit Effect: Interaction between Cytochrome P450 and Coumarin Food Components, Bergamottin, Fraxidin and Osthole. X-Ray Crystal Structure and DFT Studies." *Molecules* 25 (14): 3158. <https://doi.org/10.3390/molecules25143158>.
- Ruyter-Spira, Carolien, Salim Al-Babili, Sander van der Krol, and Harro Bouwmeester. 2013. "The Biology of Strigolactones." *Trends in Plant Science* 18 (2): 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.003>.
- Santos, Erica L., Beatriz Helena L.N. Sales Maia, Aurea P. Ferriani, and Sirlei Dias Teixeira. 2017. "Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology." In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, edited by Goncalo C. Justino. InTech. <https://doi.org/10.5772/67861>.
- Satomi, Yoshiko. 2017. "Antitumor and Cancer-Preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid." *Anticancer Research* 37 (4): 1557–62. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11484>.
- Schnurr, Georg, Norihiko Misawa, and Sandmann Sandmann. 1996. "Expression, Purification and Properties of Lycopene Cyclase from *Erwinia Uredovora*." *Biochemical Journal* 315 (3): 869–74. <https://doi.org/10.1042/bj3150869>.
- Schwartz, Steven H., Xiaoqiong Qin, and Jan A. D. Zeevaart. 2001. "Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants." *Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 25208–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102146200>.
- Schwartz, Steven H, Bao C Tan, Donald R McCarty, William Welch, and Jan A.D Zeevaart. 2003. "Substrate Specificity and Kinetics for VP14, a Carotenoid Cleavage Dioxygenase in the ABA Biosynthetic Pathway." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1619 (1): 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00422-1).
- Scora, Rainer W. 1975. "On the History and Origin of Citrus." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102 (6): 369–75. <https://doi.org/10.2307/2484763>.
- Shiratori, Kenji, Kazuhiro Ohgami, Iliyana Ilieva, Xue-Hai Jin, Yoshikazu Koyama, Kazuo Miyashita, Kazuhiko Yoshida, Satoru Kase, and Shigeaki Ohno. 2005. "Effects of Fucoxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Vitro and in Vivo." *Experimental Eye Research* 81 (4): 422–28. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>.
- Singleton, Vernon L., Rudolf Orthofer, and Rosa M. Lamuela-Raventós. 1999. "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent." In *Methods in Enzymology*, 299:152–78. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Sommer, Alfred. 2001. "Vitamin A Deficiency." In *Encyclopedia of Life Sciences*, edited by John Wiley & Sons, Ltd. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002106>.
- Stephensen, Charles B. 2001. "Vitamin A, Infection, and Immune Function*." *Annual Review of Nutrition* 21 (1): 167–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>.

- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma, F. Ando, and M. Yano. 2008. "Bone Mineral Density in Post-Menopausal Female Subjects Is Associated with Serum Antioxidant Carotenoids." *Osteoporosis International* 19 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0457-2>.
- Takehara, Munenori, Masatoshi Nishimura, Takahiro Kuwa, Yoshinori Inoue, Chitoshi Kitamura, Tsutomu Kumagai, and Masaki Honda. 2014. "Characterization and Thermal Isomerization of (All-E)-Lycopene." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (1): 264–69. <https://doi.org/10.1021/jf404497k>.
- Tanaka, Yoshikazu, Nobuhiro Sasaki, and Akemi Ohmiya. 2008. "Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids." *The Plant Journal* 54 (4): 733–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>.
- Taylor, Ian B., Tineke Sonneveld, Timothy D. H. Bugg, and Andrew J. Thompson. 2005. "Regulation and Manipulation of the Biosynthesis of Absciscic Acid, Including the Supply of Xanthophyll Precursors." *Journal of Plant Growth Regulation*, December. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0070-6>.
- Tritsch, Denis, Andréa Hemmerlin, Thomas J Bach, and Michel Rohmer. 2010. "Plant Isoprenoid Biosynthesis via the MEP Pathway: In Vivo IPP/DMAPP Ratio Produced by (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphate Reductase in Tobacco BY-2 Cell Cultures." *FEBS Letters* 584 (1): 129–34. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.010>.
- Vanamala, Jairam, Lavanya Reddivari, Kil Sun Yoo, Leonard M. Pike, and Bhimanagouda S. Patil. 2006. "Variation in the Content of Bioactive Flavonoids in Different Brands of Orange and Grapefruit Juices." *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2–3): 157–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.06.002>.
- Vishwanathan, Rohini, Wolfgang Schalch, and Elizabeth J. Johnson. 2016. "Macular Pigment Carotenoids in the Retina and Occipital Cortex Are Related in Humans." *Nutritional Neuroscience* 19 (3): 95–101. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.00000000141>.
- Wang, Dandan, Jian Wang, Xuehui Huang, Ying Tu, and Kunyi Ni. 2007. "Identification of Polymethoxylated Flavones from Green Tangerine Peel (Pericarpium Citri Reticulatae Viride) by Chromatographic and Spectroscopic Techniques." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (1): 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.048>.
- Wang, Yue, Yunyi Chen, He Zhang, Jiebiao Chen, Jinping Cao, Qingjun Chen, Xian Li, and Chongde Sun. 2020. "Polymethoxyflavones from Citrus Inhibited Gastric Cancer Cell Proliferation through Inducing Apoptosis by Upregulating RAR β , Both in Vitro and in Vivo." *Food and Chemical Toxicology* 146 (December): 111811. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111811>.
- Winkel-Shirley, Brenda. 2001. "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology." *Plant Physiology* 126 (2): 485–93. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>.
- Xi, Wanpeng, Juanfang Lu, Junping Qun, and Bining Jiao. 2017. "Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Different Fruit Part from Lemon (Citrus Limon Burm.) Cultivars." *Journal of Food Science and Technology* 54 (5): 1108–18. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2544-5>.
- Xu, Chang-Jie, Paul D. Fraser, Wei-Jie Wang, and Peter M. Bramley. 2006. "Differences in the Carotenoid Content of Ordinary Citrus and Lycopene-Accumulating Mutants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (15): 5474–81. <https://doi.org/10.1021/jf060702t>.

- Xu, Yanan, Iskander Ibrahim, Chiziezi Wosu, Ami Ben-Amotz, and Patricia Harvey. 2018. "Potential of New Isolates of *Dunaliella Salina* for Natural β -Carotene Production." *Biology* 7 (1): 14. <https://doi.org/10.3390/biology7010014>.
- Yang, Tiansong, Chuwen Feng, Dongyan Wang, Yuanyuan Qu, Yan Yang, Yulin Wang, and Zhongren Sun. 2020. "Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effect of Tangeretin Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats." *Inflammation* 43 (6): 2332–43. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01303-z>.
- Yokoyama, Henry, and Carl E. Vandercook. 1967. "Citrus Carotenoids. I. Comparison of Carotenoids of Mature-Green and Yellow Lemons." *Journal of Food Science* 32 (1): 42–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1967.tb01954.x>.
- Zhang, Hua, Yi-fei Yang, and Zhi-qin Zhou. 2018. "Phenolic and Flavonoid Contents of Mandarin (*Citrus Reticulata* Blanco) Fruit Tissues and Their Antioxidant Capacity as Evaluated by DPPH and ABTS Methods." *Journal of Integrative Agriculture* 17 (1): 256–63. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61664-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61664-2).
- Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Βαλεντίνη. 2009. *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία.
- "Φυτόριο Γιαντσάκη." n.d. <http://www.giantsakiplants.gr/Fyta/Oporofora/1Esperid/Esperidoeid.php>.