

αντιοξειδωτική δραστηριότητα αρωματικών φυτών της Μεσογείου

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΑΤΣΙΓΚΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΘ. ΣΑΛΙΦΟΓΛΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
2000/2001

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΟΥΤΣΟΛΕΛΟΣ
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ
ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΣΑΛΙΦΟΓΛΟΥ

Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
(Επιβλέπων Καθηγητής)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Βιολογικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Αθ. Σαλίφογλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου για τη συνεχή υποστήριξη, συμπαράσταση και οικονομική τους βοήθεια, κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Για την διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποστήριξη και το πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ 'Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστηριότητα' για την οικονομική υποστήριξη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Αθ. Σαλίφογλου για την ανάθεση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, ευχαριστώ την Εντεταλμένη Επίκουρο Καθηγήτρια Μ. Καυκοκεφάλου για την άποψη συνεργασία μας, την υποστήριξη, τις συζητήσεις και την φιλία της όλο το διάστημα αυτό. Τον Καθηγητή Αθ. Κουτσολέλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ν. Χανιωτάκη οι οποίοι πρόθυμα δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική μου επιτροπή, ευχαριστώ θερμά. Ευχαριστώ τον Γ. Μαρκάκη για τη βοήθεια και συμβουλές του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τους Καθηγητές Ν. Okamura (Faculty of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Hiroshima), C. Wright (Houser Inc., Boulder) και Β. Ιγνατιάδου-Ραγκούση (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών) ευχαριστώ για την αποστολή των προτύπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των συστατικών του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.). Επίσης, ευχαριστώ την ΕΛΑΪΣ Α.Ε. για την προσφορά του μαύρου τσαγιού (Lipton, yellow label). Την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ζ. Τσεκούρα (Τομέας Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) ευχαριστώ για την ταυτοποίηση των αρωματικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ν. Κοτσάκη για τις συζητήσεις, τη συνεργασία και τη φιλία του, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που εκπόνησαν τη διπλωματική τους εργασία στο εργαστήριο Ανόργανης και Βιολογικής Χημείας, για το ευχάριστο κλίμα και τη συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σελ.

Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Σχηματισμός, τοξικότητα και απενεργοποίηση <i>in vivo</i>	1
Ορισμός ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	1
Σχηματισμός ελευθέρων ριζών και τοξικότητα <i>in vivo</i>	1
Χημεία Fenton στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)	4
Οργανικά λιπίδια και οξειδωτικές καταστροφές σε κυτταρικό επίπεδο	6
1.4.1. Οξείδωση λιπιδίων	7
1.4.2. Σίδηρος και οξείδωση λιπιδίων	10
<i>In vivo</i> μηχανισμοί απενεργοποίησης των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)	11
Οξειδωτικό stress και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	13
3. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	14
3.1. Αντιοξειδωτικά. Ορισμός	14
Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	14
Φαινολικές ενώσεις ως αντιοξειδωτικά	16
4.1. Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά	16
Φαινολικές ενώσεις ανωτέρων φυτών. Φύση και χρησιμότητα	17
Αντιοξειδωτική δραστηριότητα φαινολικών ενώσεων. Αντιδράσεις φαινολικών ενώσεων με ελεύθερες ρίζες	19
4.4. Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δραστηριότητας διτερπενίων που συναντώνται στην οικογένεια φυτών <i>Labiatae</i> ως αποτέλεσμα της δομικής αλληλομετατροπής τους.....	21
5. Διατροφή και αντιοξειδωτική κατάσταση <i>in vivo</i>	25
Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δραστηριότητας συστατικών φυσικών προϊόντων και μέτρηση του βαθμού οξείδωσης	26
6.1. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δραστηριότητας	26
6.1.1. Προσδιορισμός οξείδωσης λιπιδίων	26
Προσδιορισμός οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης	27
Μέτρηση της αποσύνθεσης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH)	27
6.1.4. Αντίδραση με το υποχλωριώδες οξύ (HClO)	28
6.1.5. Προσδιορισμός της ισοδύναμης προς το trolox αντιοξειδωτικής δραστηριότητας	28
6.2. Μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων οξείδωσης	29
6.2.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της απώλειας των αντιδρώντων	29
6.2.1.1. Μέτρηση συζυγών διενίων	29
6.2.1.2. Μέτρηση πρόσληψης οξυγόνου.....	29
6.2.1.3. Μέτρηση των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων.....	30
6.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των προϊόντων που παράγονται	30
6.2.2.1. Μέτρηση των αερίων υδρογονανθράκων	30
6.2.2.2. Μέτρηση της μαλονυλδιαλδεύδης (MDA)	30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Μελέτη της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου σε μοντέλα βιολογικά σχετιζόμενων υποστρωμάτων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	31
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
2.1. Υλικά	33
2.2. Μέθοδοι	34
2.2.1. Παρασκευή του συμπλόκου $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	34
2.2.2. Απομόνωση φωσφολιποειδών από βόειο εγκέφαλο	34
2.2.3. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών	35
2.2.4. Παρασκευή λιποσωμάτων φωσφολιποειδών και μικκυλίων λινελαϊκού οξέος [18:2(9,12)]	35
2.2.5. Παρασκευή δειγμάτων και οξείδωση φωσφολιποειδών ή λινελαϊκού οξέος	36
2.2.6. Παρασκευή δειγμάτων και οξειδωτική αποικοδόμηση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης	37
2.2.7. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων έναντι της οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος [18:2(9,12)]	38
Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων έναντι της οξείδωσης φωσφολιποειδών	39
Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων έναντι της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης	41
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου παρουσία Fe^{3+} , κάτω από *in vitro* συνθήκες που μιμούνται τη γαστρεντερική πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό. Μελέτη της επίδρασης των ενζύμων της πέψης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	49
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
2.1. Υλικά	51
2.2. Μέθοδοι	52
Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών	52
Παρασκευή δειγμάτων	53
Επώαση δειγμάτων κάτω από <i>in vitro</i> συνθήκες πέψης και απορρόφησης	53
Πρωτόκολλο επώασης	53
Μέτρηση αντιοξειδωτικής δραστηριότητας έναντι της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης	54
Ποσοτική ανάλυση ολικού διαλυτού σιδήρου	55
Ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών	56
Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνικών συστατικών	57
Μοντέλο σύστημα οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης με Fe^{3+} παρουσία μεμονωμένων ενζύμων της πέψης και μίγματος αυτών	57

2.2.10. Μελέτη πιθανού σχηματισμού συμπλόκων σιδήρου με φαινολικά συστατικά στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους	58
2.2.11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
Αντιοξειδωτική δραστικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων	60
Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε ολικό διαλυτό σίδηρο	61
Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε πολυφαινόλες	63
Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δραστικότητας με την περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε ολικό διαλυτό σίδηρο και πολυφαινόλες	64
Επίδραση των ενζύμων της πέψης στην αντιοξειδωτική δραστικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων	66
Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε πρωτεϊνικά συστατικά	69
Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δραστικότητας των ενζύμων της πέψης στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα με την περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο και πρωτεϊνικά συστατικά	70
Μελέτη των ηλεκτρονικών φασμάτων των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Διαχωρισμός των συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.) με HPLC. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	83
2.1. Υλικά	83
2.2.	
Μέθοδοι	83
2.2.1. Ανάκτηση συστατικών υδατικού εκχυλίσματος φασκόμηλου σε διαλύτες διαφορετικής πολικότητας	83
2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων για την χρωματογραφική ανάλυση σε HPLC	84
Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών από εκχυλίσματα φασκόμηλου (<i>Salvia fruticosa</i> L.)	85
2.2.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	86
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
3.1. Φάσματα ορατού/υπεριώδους των εκχυλισμάτων σε οργανικούς διαλύτες του υδατικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου (<i>Salvia fruticosa</i> L.)	87
3.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών στα οργανικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου	88
3.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος εξανίου από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου	90
3.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου	97
3.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου	102
3.6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος 1-βουτανόλης από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου	105
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	109
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	114
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 1	I
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2	VIII
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 3	XIII

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ABSTRACT

Oxidative stress in humans results in the production of reactive oxygen species (ROS), which are implicated in the pathogenesis of chronic diseases, such as cardiovascular diseases and cancer. Various dietary components capable of quenching ROS may contribute to the cell defense system against oxidative damage. The wide presence of polyphenolic compounds in nature has drawn heightened research attention due to their biological properties, among which is their antioxidant activity. Low mortality rates from cardiovascular disease and cancer have been observed in the Mediterranean region, and have purportedly been attributed to the composition of its traditional dietary patterns. The antioxidant properties of herbs, however, used in the traditional Mediterranean diet and medicine have not been widely investigated, even though they may turn to be significant in comprehending their role in disease prevention.

In the present work Mediterranean herb and black tea infusions were investigated, in a non-digestion model system, for possible pro/antioxidant activity promoted by prooxidant iron ions. In the presence of different substrates all of the infusions used exhibited antioxidant activity in comparison to the iron control. The variable, yet effective, antioxidant capacity of the investigated infusions indicates that their antioxidant components can quench ROS generating activity brought on different substrates. In addition, the behavior of Mediterranean herb and black tea infusions was investigated in the presence of iron under *in vitro* digestion conditions. All infusions exhibited variable antioxidant activity in comparison to the controls, in the absence or presence of digestive enzymes and bile salts. The observed antioxidant activity correlated well with polyphenol or protein content, but not with iron in dialysates. The results of the *in vitro* digestion assay demonstrate that it can offer more details on potential antioxidants than a non-digestion model system. The qualitative and quantitative analysis of the aqueous infusion of sage (*Salvia fruticosa* L.) by HPLC, demonstrate the presence of the diterpenes carnosic acid, carnosol and rosmanol, and the phenolic acid caffeic acid, known for their antioxidant properties. The seasonal quantitative differences of carnosic acid and rosmanol in samples of sage, indicate a possible role of these diterpenes in counteracting oxidative stress in plants.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκδήλωση οξειδωτικού stress στον ανθρώπινο οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species), οι οποίες ενοχοποιούνται για την παθογένεση χρόνιων ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος. Τα ROS εμπλέκονται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι δυνατό να προκαλέσουν καταστροφή σε βιομόρια. Η άμυνα του οργανισμού έναντι των οξειδωτικών καταστροφών από τα ROS περιλαμβάνει κυρίως ένζυμα απενεργοποίησης των ROS και πιθανώς ενισχύεται σημαντικά από διατροφικούς παράγοντες ικανούς να απενεργοποιούν τα ROS. Η μελέτη διατροφικών παραγόντων που πιθανώς συνεισφέρουν στην άμυνα του οργανισμού κατά των οξειδωτικών καταστροφών, έχει επικεντρωθεί σε φυσικά προϊόντα, κυρίως σε φρούτα, λαχανικά αλλά και εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και βοτάνων, τα οποία εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα *in vitro*. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που εμφανίζουν τα φυσικά αυτά προϊόντα έχει αποδοθεί, εκτός από τις βιταμίνες C και E και τα καροτενοειδή, στην ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων. Η εκτεταμένη παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων στη φύση έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον σχετικά με τις βιολογικές τους

ιδιότητες. Στις βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών συγκαταλέγεται και η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα.

Στην περιοχή της Μεσογείου έχει παρατηρηθεί χαμηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο, φαινόμενο, το οποίο έχει αποδοθεί στα χαρακτηριστικά της παραδοσιακής μεσογειακής διατροφής. Ανάμεσα στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής είναι η ευρεία κατανάλωση ελαιολάδου, φρούτων και λαχανικών και η χρήση αρωματικών φυτών ως αρτύματα ή ως αφεψήματα. Ορισμένα από αυτά είναι γνωστά για τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες στην παραδοσιακή ιατρική. Ωστόσο, δεν είναι γνωστός ο πιθανός ρόλος τους στην πρόληψη των χρόνιων παθήσεων. Η συνεισφορά των πολυφαινολικών συστατικών των αρωματικών αυτών φυτών στην καταστολή των ROS στον οργανισμό, αποτελεί έναν προτεινόμενο μηχανισμό για την ευεργετική δράση τους στην υγεία. Εν τούτοις, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες εκχυλισμάτων φυτών από την περιοχή της Μεσογείου δεν έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, παρ' όλο που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη χρόνιων παθήσεων.

Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Σχηματισμός, τοξικότητα και απενεργοποίηση *in vivo*.

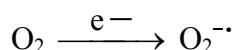
1.1. Ορισμός ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

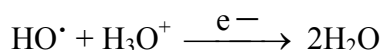
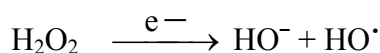
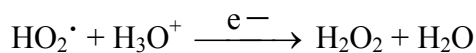
Ως ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται κάθε χημικό είδος, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια.^{1,2} Ένα μόριο ή άτομο μπορεί να λάβει ή να δώσει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο ή ένα ζεύγος ηλεκτρονίων. Σε αμφοτέρως τις περιπτώσεις η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό ριζών. Συνήθως, τα μονήρη ηλεκτρόνια αναζητούν ένα άλλο ηλεκτρόνιο, προκειμένου να σχηματίσουν ζεύγος ηλεκτρονίων. Η αναζήτηση αυτή, της ηλεκτρονιακής σύζευξης, καθιστά τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες δραστικές. Έτσι, οι ρίζες εμφανίζουν την τάση να προσβάλλουν άλλα μόρια. Έχειδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες (ειδικά η σουπεροξειδική ρίζα $O_2^{\cdot-}$) και άλλες δραστικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο παράγονται *in vivo* συνεχώς.^{2,3,4,5,6} Ο όρος ‘δραστικές ενώσεις’ αν και είναι σχετικός, αναφέρεται όχι μόνο στις ελεύθερες ρίζες που περιέχουν ένα κέντρο οξυγόνου, αλλά επίσης και στα παράγωγα του οξυγόνου που δεν αποτελούν ελεύθερες ρίζες, αλλά συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τέτοιες ενώσεις περιλαμβάνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το οξυγόνο απλής κατάστασης (singlet oxygen $^1\Delta_g$), το όζον (O_3) και το υποχλωριώδες οξύ ($HClO$). Όλες οι δραστικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν οξυγόνο, κατατάσσονται σε μία ομάδα ενώσεων, γνωστή ως ‘δραστικές μορφές οξυγόνου’ (ROS: Reactive Oxygen Species).^{2,4,7} Αυξημένη προσοχή έχει δοθεί τελευταία στο ρόλο και στο μηχανισμό δράσης των ROS στην παθοφυσιολογία σημαντικών χρόνιων παθήσεων, όπως ο καρκίνος, η νόσος του Parkinson, η αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση, ο καταρράκτης, και στη διαδικασία της γήρανσης.^{4,5,7,8,9}

1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών και τοξικότητα *in vivo*

Το ερώτημα που συχνά ανακύπτει σχετικά με τα ROS, είναι πώς αυτά σχηματίζονται στο ανθρώπινο σώμα και εάν θεωρούνται τοξικά για τον οργανισμό. Ο ελεγχόμενος και περιορισμένος από τον οργανισμό σχηματισμός των ελευθέρων ριζών πιστεύεται ότι είναι ωφέλιμος. Οι ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως οι $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HClO$ και NO^{\cdot} , επιτελούν σημαντικό βιολογικό ρόλο και αποτελούν τα σημαντικότερα μικροβιοκτόνα που χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα στην άμυνα εναντίον ξένων οργανισμών.^{5,7,10,11,12} Ωστόσο, η μεγαλύτερη παραγωγή γενικά των ROS φαίνεται να είναι μη-ελεγχόμενη.^{3,9} Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί κυρίως μέσω οξειδωσης βιομορίων από το O_2 ή από την ανεπαρκή λειτουργία του αμυντικού μηχανισμού των κυττάρων.¹¹ Επιπλέον, ανεπιθύμητη παραγωγή ROS προκύπτει από την έκθεση του οργανισμού τόσο σε ακτινοβολία φυσικής ή ανθρωπογενούς προέλευσης όσο και σε άλλες περιβαλλοντικές τοξίνες.^{9,11}

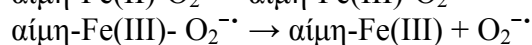
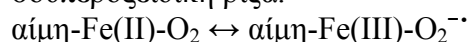
Η τοξικότητα του O_2 θεωρείται ότι βασίζεται στον εκτεταμένο σχηματισμό της σουπεροξειδικής ρίζας ($O_2^{\cdot-}$) στους αερόβιους οργανισμούς και στη συμμετοχή της τελευταίας σε περαιτέρω αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.^{2,5} Η σουπεροξειδική ρίζα $O_2^{\cdot-}$ σχηματίζεται κυρίως κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού, με αναγωγή του O_2 από διάφορα ένζυμα κατά ένα ηλεκτρόνιο.^{2,3,7} Για την πλήρη αναγωγή του O_2 σε H_2O απαιτούνται συνολικά 4 ηλεκτρόνια. Η ολική διαδικασία περιλαμβάνει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου HO^{\cdot} και υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.^{1,13}





Σχήμα 1: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών κατά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τέσσερα ηλεκτρόνια.

Επίσης, σουπεροξειδικές ρίζες ελευθερώνονται *in vivo* κατά την αποσύνθεση της οξυαιμοσφαιρίνης (Σχήμα 2). Ο Fe^{2+} της αίμης συνδέεται με το O_2 διατηρώντας την οξειδωτική του κατάσταση. Ωστόσο, ο απεντοπισμός ενός ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας ενδιάμεσης δομής, όπου ο Fe(III) συνδέεται με τη σουπεροξειδική ρίζα.^{2,14}

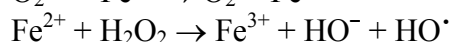
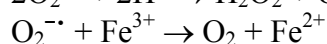
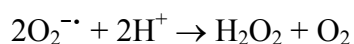


Σχήμα 2: Παραγωγή της σουπεροξειδικής ρίζας κατά την αποσύνθεση της οξυαιμοσφαιρίνης.

Η σουπεροξειδική ρίζα θεωρείται σχετικά αδρανής, ωστόσο, βρίσκεται σε ισορροπία με την υδροϋπεροξειδική ρίζα HO_2^\cdot , η οποία είναι πολύ πιο δραστική (αντίδραση 1).^{3,5,6}

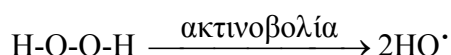
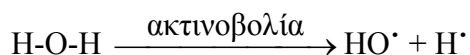


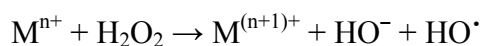
Η συμμετοχή της σουπεροξειδικής ρίζας σε μία αλληλουχία αντιδράσεων, γνωστές ως 'αντίδραση Haber-Weiss' (Σχήμα 3), έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου HO^\cdot και υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , συμβάλλοντας έτσι στην τοξικότητά της. Ο σίδηρος παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση Haber-Weiss.^{5,13,15}



Σχήμα 3: Αντίδραση Haber-Weiss, στην οποία η σουπεροξειδική ρίζα και τα ιόντα σιδήρου παίζουν ενεργό ρόλο.

Από τις πιο δραστικές μορφές οξυγόνου που πιθανώς απαντώνται *in vivo* είναι οι ρίζες υδροξυλίου HO^\cdot . Αυτές αντιδρούν με τα περισσότερα συστατικά των κυττάρων, όπως το DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες.^{3,5,6} Οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται κυρίως μέσω δύο μηχανισμών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4. Ο πρώτος αφορά την ομολυτική διάσπαση του H_2O ή του H_2O_2 με τη χρησιμοποίηση ακτινοβολίας (υπεριώδης ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία, ακτίνες X), ενώ ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τη διάσπαση του H_2O_2 από μεταλλικά ιόντα.^{3,5,6,13}





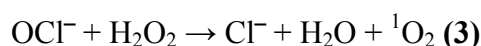
Σχήμα 4: Μηχανισμοί παραγωγής ριζών υδροξυλίου υπό την επίδραση ακτινοβολίας ή μεταλλικών ιόντων.

Το συνηθέστερο μεταλλικό ιόν, το οποίο συμμετέχει σ' αυτή τη διαδικασία, είναι ο σίδηρος, ενώ η αντίδραση που προκύπτει είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton.^{3,5,6,13,16} Παρ' όλο που δεν είναι ρίζα, ένα σημαντικό οξειδωτικό που συναντάται στα βιολογικά συστήματα, είναι το H₂O₂. Το H₂O₂ παράγεται κατά τη διάρκεια διαφόρων ενζυματικών αντιδράσεων, όπως αυτές που καταλύονται από τη σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD: Superoxide Dismutase), κατά τη μετατροπή της σουπεροξειδικής ρίζας O₂^{-•} σε H₂O₂ και O₂ (αντίδραση 2).^{3,5,9}



Η αντίδρασή του H₂O₂ με οργανικά υποστρώματα είναι γενικά αργή. Γι' αυτό το λόγο, το H₂O₂ δεν θεωρείται υψηλής τοξικότητας οξειδωτικό. Ωστόσο, όταν συνδυάζεται με μεταλλικά ιόντα τα οποία μπορούν να βρεθούν σε παραπάνω από μία οξειδωτικές καταστάσεις, η τοξικότητά του αυξάνεται εξαιτίας της παραγωγής δραστικών ριζών υδροξυλίου, όπως στην περίπτωση της αντίδρασης Fenton.^{3,5,6,16} Παραγωγή ριζών υδροξυλίου μπορεί να λάβει χώρα με την ομολυτική σχάση του H₂O₂ με ακτινοβολία, όπως έχει προαναφερθεί.

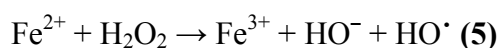
Το μόριο του οξυγόνου στη βασική του κατάσταση περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin σε δύο π* μοριακά τροχιακά του. Η κατάσταση αυτή του μοριακού οξυγόνου θεωρείται γενικά αδρανής. Εάν όμως το μοριακό οξυγόνο δεχθεί ενέργεια, τότε σχηματίζεται μία πιο δραστική κατάσταση, γνωστή ως οξυγόνο απλής κατάστασης, ¹ΔgO₂. Η μορφή αυτή του οξυγόνου θεωρείται ότι απαντάται και *in vivo*. Το οξυγόνο απλής κατάστασης, πιθανώς, παράγεται στα βιολογικά συστήματα από την αντίδραση του H₂O₂ και του HClO (αντίδραση 3), τα οποία σχηματίζονται κατά τη δράση των φαγοκυττάρων, καθώς και κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με φωτοευαισθητοποιητές, όπως η ροδοψίνη στο μάτι.¹³



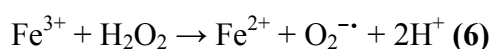
1.3. Χημεία Fenton στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Οι διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις, στις οποίες μπορούν να βρεθούν τα μεταβατικά μέταλλα, επιτρέπουν αυτά να δρουν ως αποτελεσματικοί καταλύτες σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Αυτός είναι και ένας λόγος για τον οποίο τα μεταβατικά μέταλλα χρησιμοποιούνται από τα διάφορα ένζυμα στον οργανισμό.⁷ Ωστόσο ο κίνδυνος που απορρέει από αυτού του είδους καταλύσεις, είναι η ανάπτυξη ανεπιθύμητων αντιδράσεων ελευθέρων ριζών, κυρίως *in vivo*, όταν η διαθεσιμότητα των μεταλλικών ιόντων δεν είναι ελεγχόμενη.^{5,13} Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και γενικά των ROS από μεταλλικά ιόντα, εξαρτάται από α) την παρουσία 'ελεύθερου' μεταλλικού ιόντος, δηλαδή μεταλλικού ιόντος ικανού να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και β) από την ικανότητά του να διαχέεται μέσα στα βιολογικά υγρά.^{5,6,17} *In vivo*, η μεγαλύτερη ποσότητα του σιδήρου είναι συμπλοκοποιημένη σε πρωτεϊνικά μόρια όπως η φερριτίνη, η λακτοφερρίνη, η αιμοσιδερίνη και η τρανσφερρίνη. Παρ' όλα αυτά, ο χηλικτοποιημένος αυτός σίδηρος δεν είναι πάντα αδρανής.^{5,17} Για παράδειγμα, ο συμπλοκοποιημένος σίδηρος στο μόριο της αίμης

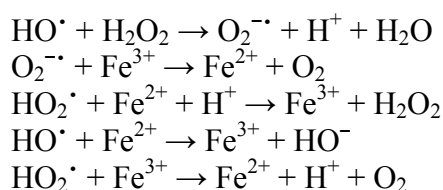
διαφόρων αιμικών πρωτεϊνών, όπως η αιμοσφαιρίνη, λαμβάνει μέρος σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, από τις οποίες είναι δυνατό να διαφύγουν ελεύθερες ρίζες, όπως έχει προαναφερθεί.^{2,14} Γενικά, η παραγωγή των ROS μέσω διαδικασίας στην οποία ένα μεταλλικό ιόν (κυρίως ο σίδηρος) συμμετέχει ενεργά, είναι περισσότερο γνωστή ως 'Χημεία Fenton'.^{3,5,6,13,16} Η αντίδραση Fenton περιγράφεται με τη γενική εξίσωση που απεικονίζεται στην αντίδραση 5.



Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο το σύστημα $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ οξειδώνει τα διάφορα υποστρώματα παραμένει άγνωστος, είναι γενικά αποδεκτό ότι περιλαμβάνει το σχηματισμό διαφόρων οξειδωτικών ενώσεων, μεταξύ των οποίων και οι ρίζες υδροξυλίου HO^\bullet .^{5,6,13,16} Πιθανώς και ο Fe^{3+} αντιδρά με το H_2O_2 , σχηματίζοντας σουπεροξειδικές ρίζες $\text{O}_2^{\bullet-}$ (αντίδραση 6).^{5,13,16}



Γενικά, για την αναλυτική περιγραφή της γενικής αντίδρασης Fenton έχουν προταθεί διάφορες αντιδράσεις, οι οποίες πιθανώς να λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκειά της, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.¹³



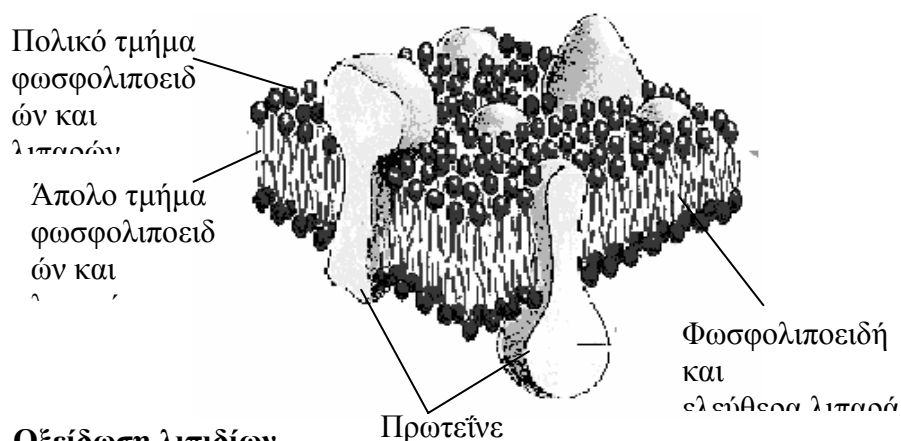
Σχήμα 8: Πιθανές αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την αντίδραση Fenton.

Το ποια αντίδραση, ωστόσο, υπερέχει έναντι κάποιας άλλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, όπως το pH, η παρουσία του H_2O_2 , ο λόγος των συγκεντρώσεων $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, και η προσθήκη υποστρώματος ικανού να οξειδωθεί.¹³ Το τελευταίο, μάλιστα, μπορεί να καθορίσει την τύχη της ρίζας υδροξυλίου, η οποία απουσία οποιουδήποτε υποστρώματος μπορεί να καταναλωθεί αντιδρώντας με το H_2O_2 ή οξειδώνοντας τον Fe^{2+} . Έτσι το μίγμα $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ στην αντίδραση Fenton, η οποία υφίσταται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες *in vivo*, μπορεί να εκκινήσει μία σειρά αντιδράσεων ελευθέρων ριζών.¹³

1.4. Οργανικά λιπίδια και οξειδωτικές καταστροφές σε κυτταρικό επίπεδο

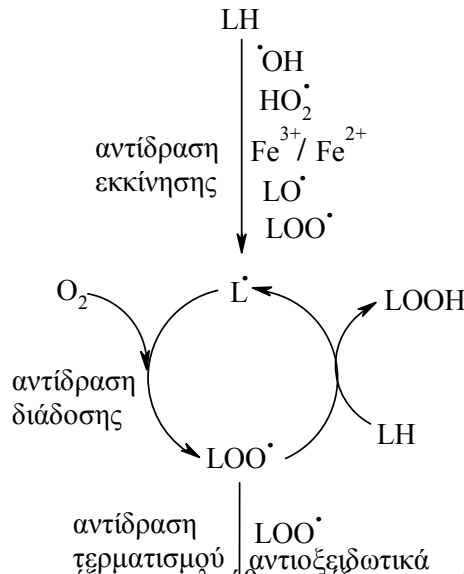
Οι μεμβράνες οι οποίες περιβάλλουν τα κύτταρα και τα κυτταρικά οργανίδια περιέχουν μεγάλο αριθμό λιπιδίων.¹⁸ Τα μεμβρανικά λιπίδια είναι αμφίφιλα μόρια, τα οποία περιέχουν μία υδρόφοβη υδρογονανθρακική αλυσίδα και ένα υδρόφιλο τμήμα. Τα κυρίαρχα λιπίδια στις ζωϊκές κυτταρικές μεμβράνες είναι τα φωσφολιποειδή, τα οποία σχηματίζονται από μόρια λιπαρών οξέων και μία φωσφορυλιωμένη αλκοόλη, εστεροποιημένα με ένα μόριο γλυκερόλης.^{18,19} Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των φωσφολιποειδών απεικονίζονται στο Σχήμα 9. Η διευθέτηση των φωσφολιποειδών, λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και πρωτεϊνών σε μία λιπιδική διπλοστοιβάδα, στην οποία το πολικό τμήμα προσανατολίζεται στο υδατικό περιβάλλον, διαμορφώνει δομικά τις κυτταρικές μεμβράνες (Σχήμα 10).

Οι πλευρικές αλυσίδες των μεμβρανικών λιπιδίων περιέχουν υδρογονανθρακικές αλυσίδες λιπαρών οξέων με 14-24 άτομα άνθρακα και διπλούς δεσμούς σε *cis* διαμόρφωση. Η παρουσία των διπλών δεσμών είναι σημαντική, καθώς μειώνουν το σημείο τήξης των λιπαρών οξέων στα οποία ανήκουν, και επομένως, καθορίζουν τη ρευστότητα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών μεμβρανών.^{18,19}



1.4.1. Οξείδωση λιπιδίων

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, λοιπόν, παίζουν σπουδαίο βιολογικό ρόλο στη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων. Διατάραξη των δομικών τους χαρακτηριστικών μπορεί να έχει μοιραίες επιπτώσεις στην κυτταρική λειτουργία.^{4,7} Επιπλέον, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν βασικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), η οξειδωτική τροποποίηση των οποίων έχει αναγνωριστεί ως το αρχικό στάδιο στην πρόκληση αθηροσκλήρωσης.^{20,21} Η μελέτη της οξείδωσης των λιπιδίων έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή της διαδικασίας αυτής στην εκδήλωση χρόνιων παθήσεων.^{4,21,22} Η οξείδωση των λιπιδίων *in vivo* έχει θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα της δράσης ελευθέρων ριζών σε πλούσιους ηλεκτρονιακά διπλούς δεσμούς, όπως αυτούς που συναντώνται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Χαρακτηριστικό της αντίδρασης οξείδωσης των λιπιδίων μέσω ελευθέρων ριζών, είναι η αλυσιδωτή πορεία αντιδράσεων που ακολουθούνται σε τρία βασικά στάδια: α) το στάδιο εκκίνησης της αλυσιδωτής αντίδρασης, β) τη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης και γ) τον τερματισμό της, όπως διακρίνεται στο Σχήμα 11.^{22,23}

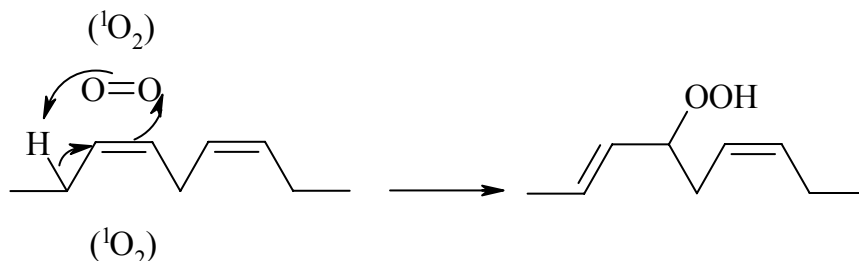


Στο στάδιο εκκίνησης, σχηματίζεται η ελεύθερη ρίζα, η οποία προσβάλλει το λιπαρό οξύ. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος (LH) με μία ελεύθερη ρίζα είναι η αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα μεθυλενικό άτομο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος, παράγοντας έτσι μία άλκυλο ρίζα (L \cdot). Ρίζες υδροξυλίου HO \cdot , υδροϋπεροξειδικές ρίζες HO $_2\cdot$, αλκόξυ ρίζες LO \cdot , υπεροξειδικές ρίζες LOO \cdot και μεταλλικά ιόντα όπως ο Fe $^{3+}$ /Fe $^{2+}$ εμπλέκονται στη διαδικασία εκκίνησης της αλυσιδωτής αντίδρασης.^{4,24} Ειδικά, οι ρίζες υδροξυλίου

μπορούν να εκκινήσουν εύκολα την αντίδραση οξειδωσης, με την προϋπόθεση ότι μπορούν να προσεγγίσουν την πλευρική αλυσίδα των λιπαρών οξέων χωρίς να έχουν προηγουμένως προσβάλλει κάποιο άλλο μόριο.^{4,18} Σε αντίθεση με τη σουπεροξειδική ρίζα O $_2\cdot^-$, η υδροϋπεροξειδική ρίζα HO $_2\cdot$ είναι δραστική έναντι της οξειδωσης των συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς έχει υποστηριχθεί ότι, εφόσον δεν διαθέτει φορτίο, μπορεί πιο εύκολα να εισαχθεί στο υδρόφοβο κυτταρικό μεμβρανικό περιβάλλον.^{5,18}

Στο στάδιο διάδοσης της αλυσιδωτής αντίδρασης, η άλκυλο ρίζα L \cdot αντιδρά γρήγορα με μοριακό οξυγόνο το οποίο ως λιπόφιλο μόριο συγκεντρώνεται στο εσωτερικό των κυτταρικών μεμβρανών, παράγοντας μία υπεροξειδική ρίζα LOO \cdot .^{4,18,25} Η υπεροξειδική ρίζα LOO \cdot αφαιρεί το άτομο υδρογόνου από ένα άλλο λιπαρό οξύ με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός υδροϋπεροξειδίου LOOH και μίας άλκυλο ρίζας L \cdot .^{4,18,25} Η τελευταία αντιδρά περαιτέρω με μοριακό οξυγόνο, συνεχίζοντας το στάδιο διάδοσης της αλυσιδωτής αντίδρασης. Το στάδιο διάδοσης της αλυσιδωτής αντίδρασης τερματίζεται όταν υπεροξειδικές LOO \cdot , αλκόξυ LO \cdot ή άλκυλο L \cdot ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους δίνοντας προϊόντα μη-ριζών, όπως αλκοόλες και κετόνες, ή όταν οι ρίζες απενεργοποιούνται από τη δράση αντιοξειδωτικών.^{4,18}

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να υποστούν οξείδωση και μέσω αντιδράσεων οι οποίες δεν περιλαμβάνουν μηχανισμούς ελευθέρων ριζών. Τυπικό παράδειγμα τέτοιου τύπου αντιδράσεων είναι η οξείδωση λιπαρών οξέων από το οξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο προστίθεται γρήγορα στο διπλό δεσμό του λιπαρού οξέος παράγοντας ένα υδροϋπεροξείδιο όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.^{4,18} Ωστόσο, η αλυσιδωτή αντίδραση δεν θα προχωρήσει στην περίπτωση αυτή, εκτός εάν συμβεί αποσύνθεση των σχηματιζόμενων υδροϋπεροξειδίων κάτω από την επίδραση π.χ. ενός μεταλλικού ιόντος.¹⁸



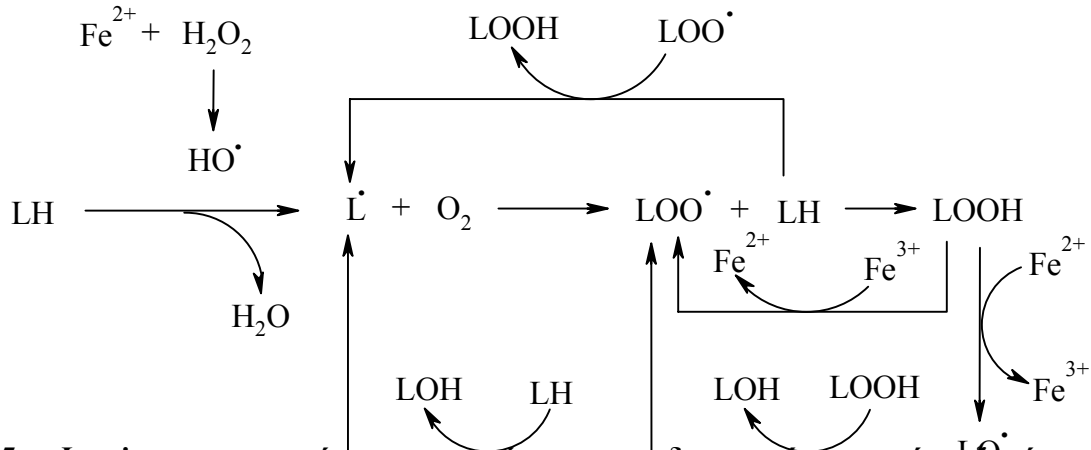
Η αποικοδόμηση των λιπιδικών υπεροξειδίων παράγει ένα πλήθος προϊόντων τα οποία περιλαμβάνουν εποξειδία, κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, κετόνες και υδρογονάνθρακες.^{18,21,26} Ο σχηματισμός υπεροξειδίων, αλκόξυ ριζών και άλλων προϊόντων οξειδωσης μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες, είναι δυνατό να προκαλέσει καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνών, που συνδέονται με τα λιπίδια στη μεμβρανική διπλοστοιβάδα και στις λιποπρωτεΐνες. Γενικά, η οξειδωση των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών, την αύξηση της διαπερατότητας σε ενώσεις, οι οποίες κανονικά δεν θα διαπερνούσαν τη μεμβράνη, και την απενεργοποίηση μεμβρανικών ενζύμων. Η εκτεταμένη οξειδωση των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων και η αποικοδόμησή τους στα προϊόντα οξειδωσης οδηγεί τελικά σε απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας και θάνατο των κυττάρων.^{5,7,18} Τα προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων και της αντίδρασης αυτών με άλλα βιομόρια έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για την εμφάνιση ποικίλων χρόνιων παθήσεων, όπως άσθμα, αθηροσκλήρωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, διαβήτης, καρδιακές παθήσεις, και για τη συνεισφορά τους στη διαδικασία της γήρανσης.^{4,21}

1.4.2. Σίδηρος και οξειδωση λιπιδίων

Ποικίλες μελέτες σχετικές με την οξειδωση των λιπιδίων επιδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των οξειδοαναγωγικά δραστικών μετάλλων στην εκκίνηση και διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης. Ο σχηματισμός ριζών υδροξυλίου HO[•] μέσω καταλυόμενης, από μεταλλικά ιόντα, αντίδρασης Fenton οδηγεί στην εκκίνηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της οξειδωσης με αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ, σχηματίζοντας μία άλκυλο ρίζα L[•] (Σχήμα 11). Η ανάμιξη, ωστόσο, των ριζών υδροξυλίου HO[•] στην εκκίνηση της οξειδωσης των λιπιδίων έχει αμφισβητηθεί από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι προτείνουν την δράση ενώσεων του σιδήρου με το οξυγόνο, όπως η σιδήρυλο (ferryl) ή υπερσιδήρυλο (perferryl) μορφή (Fe^(iv) = O ↔ Fe^(v) = O), ή ακόμα και το σχηματισμό ενός τριπλού συμπλόκου μεταξύ Fe²⁺, Fe³⁺ και O₂ αντίστοιχα.^{18,25,27} Ο σίδηρος παίζει ακόμα έναν ρόλο στην αντίδραση οξειδωσης των λιπιδίων. Ενώσεις του Fe²⁺ αντιδρούν με υπεροξειδία των λιπαρών οξέων, κατά τρόπο όμοιο με την αντίδραση του H₂O₂, προκαλώντας σχάση του δεσμού O-O.^{18,25} Έτσι, από ένα υδροϋπεροξειδίο LOOH προκύπτει μία αλκόξυ ρίζα LO[•], η οποία έχει τη δυνατότητα να αποσπά υδρογόνο από ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ ή υπεροξειδία του. Η σχηματιζόμενη υπεροξειδική ρίζα LOO[•] συνεχίζει την αντίδραση διάδοσης της οξειδωσης των λιπιδίων. Αντίστοιχα, ενώσεις του Fe³⁺ αποικοδομούν τα υδροϋπεροξειδία σε υπεροξειδικές ρίζες.¹⁸ Τα παραπάνω συνοψίζονται στο Σχήμα 13.

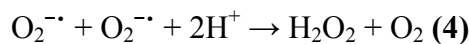
Η αντίδραση του Fe²⁺ με λιπιδικά υδροϋπεροξειδία είναι συχνά πιο γρήγορη από την αντίστοιχη αντίδραση με το H₂O₂. Ενδεικτικά, έχει υπολογιστεί ότι η σταθερά ταχύτητας για την αντίδραση του Fe²⁺ με τα LOOH είναι της τάξης των 1.5x10³ M⁻¹ s⁻¹, ενώ η αντίστοιχη σταθερά για την αντίδραση του Fe²⁺ με το H₂O₂ είναι της τάξης

των $76 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹⁸ Επίσης, η αντίδραση των ιόντων Fe^{2+} με υδροϋπεροξειδία, είναι πιο γρήγορη από την αντίστοιχη με ιόντα Fe^{3+} .¹⁸ Έτσι, η ταχύτητα της οξειδωσης των λιπιδίων μπορεί να αυξηθεί με προσθήκη ενός αναγωγικού μέσου, όπως το ασκορβικό οξύ.

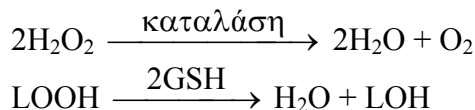


1.5. *In vivo* μηχανισμοί απενεργοποίησης των δραστικών μορφών οξειδωτικού (ROS)

Παράλληλα, οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται συνεχώς *in vivo* ο αναπόφευκτος οργανισμός είναι καλά εξοπλισμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία διατηρούν την παραγωγή ROS υπό έλεγχο. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού περιλαμβάνουν κυρίως ένζυμα, συγκεκριμένες πρωτεΐνες, και μόρια χαμηλού μοριακού βάρους.^{5,9,15,28} Παραδείγματα τέτοιων ενδογενών αντιοξειδωτικών αποτελούν διάφορες πρωτεΐνες που προσδένουν και αποθηκεύουν μεταλλικά ιόντα, όπως η τρανσφερρίνη και η φερριτίνη, οι ουβικινόλες και διάφορες βιταμίνες, όπως οι A, C και E, τα καροτενοειδή, καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), οι καταλάσες και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHpx).^{5,7,9,15,16,28} Η σχέση των ROS και των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό είναι πολύπλοκη. Η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) απομακρύνει τη σουπεροξειδική ρίζα $\text{O}_2^{\cdot-}$ μετατρέποντάς την σε H_2O_2 (αντίδραση 4).^{5,9,15,28}

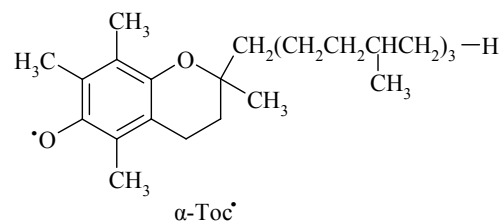


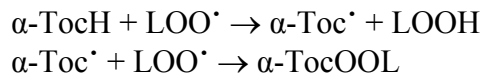
Οι καταλάσες αποικοδομούν το H_2O_2 σε H_2O και O_2 , αν και το σημαντικότερο ένζυμο αποικοδόμησης του H_2O_2 και υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων από τα κύτταρα, είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHpx) (Σχήμα 5).^{9,15,28}



Σχήμα 5: Αντίδραση αποικοδόμησης υπεροξειδίων υπό την επίδραση ενζυμικών συστημάτων.

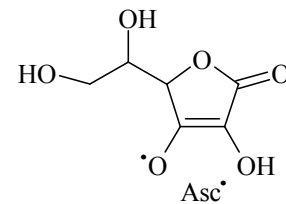
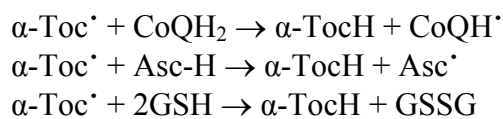
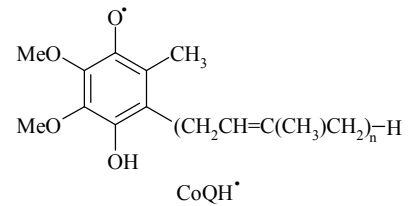
Η α-τοκοφερόλη καθυστερεί την οξειδωση των λιπαρών οξέων, αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές ρίζες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, πιο γρήγορα απ' ό τι αντιδρούν αυτές με άλλα λιπαρά οξέα ή πρωτεΐνες.^{9,15}





Σχήμα 6: Αντίδραση της α-τοκοφερόλης με υπεροξειδικές ρίζες λιπαρών οξέων.

Η ουβικινόλη (ανηγμένη μορφή του συνενζύμου Q), πιθανώς αναγεννά την α-τοκοφερόλη στις κυτταρικές μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες, όπως πιθανώς το ίδιο επιχειρούν η βιταμίνη C και η GSH (Σχήμα 7).^{3,4,15}



Σχήμα 7: Αναγέννηση της α-τοκοφερόλης από την ουβικινόλη, βιταμίνη C και γλουταθειόνη.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι τοποθετημένα τόσο στο λιπόφιλο όσο και στο υδρόφιλο τμήμα των

2. Οξειδωτικό stress και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Η αντιοξειδωτική κατάσταση, στους έμβιους οργανισμούς, χαρακτηρίζεται από την ισορροπία μεταξύ του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος και των προοξειδωτικών παραγόντων. Στον ανθρώπινο οργανισμό, η ισορροπία αυτή συγκλίνει σε μικρό βαθμό προς οξειδωτικές διαδικασίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό, ο οργανισμός έχει αναπτύξει μηχανισμούς 'επιδιόρθωσης', οι οποίοι περιλαμβάνουν διάφορα ένζυμα, όπως οι λιγάσες, νουκλεάσες, πολυμεράσες, πρωτεϊνάσες και φωσφολιπάσες. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ωστόσο, όταν οι φυσικές άμυνες του οργανισμού έχουν εξασθενήσει, προκύπτει μία κατάσταση, η οποία περιγράφεται γενικά με τον όρο οξειδωτικό stress και χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη του φυσιολογικού προτίμηση προς τις οξειδωτικές διεργασίες στον οργανισμό.²⁹ Το οξειδωτικό stress είναι μία κατάσταση, στην οποία υποβάλλεται ο οργανισμός, όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ παραγωγής ROS και αντιοξειδωτικής άμυνας.^{9,18} Γενικά, το οξειδωτικό stress μπορεί να προκύψει λόγω μείωσης της αποτελεσματικότητας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων.¹⁸ Επίσης, η μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών, μέσω της διατροφής ή άλλων βασικών διατροφικών συστατικών, είναι δυνατό να οδηγήσει σε καταστάσεις οξειδωτικού stress.¹⁸ Η αυξημένη παραγωγή των ROS μετά από έκθεση του οργανισμού σε ακτινοβολία, διάφορες τοξίνες ή η υπερβολική παραγωγή τους από τα φαγοκύτταρα, επίσης, οδηγεί τον οργανισμό σε κατάσταση οξειδωτικού stress.^{7,9,18} Ως συνέπεια, η υπερπαραγωγή ROS δύναται να οδηγήσει σε πρόωρη γήρανση, σε μία ποικιλία ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση και άλλες νευρολογικές δυσλειτουργίες.^{5,7,9,20} Η εκδήλωση των χρόνιων αυτών παθήσεων είναι αποτέλεσμα προσβολής των λιπιδίων, πρωτεϊνών, σακχάρων, και DNA, από τα ROS. Μία τέτοια προσβολή είναι δυνατό να οδηγήσει σε οξειδωτική καταστροφή, δυσλειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, τροποποίηση πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων, και σχάση του DNA ή τροποποίηση των βάσεων

του.^{5,6,7,16,22} Για το λόγο αυτό, υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον σχετικά με την πρόληψη και θεραπεία των παθήσεων αυτών μέσω χρησιμοποίησης αντιοξειδωτικών, κυρίως αυτών που παρέχονται μέσω της διατροφής.

3. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

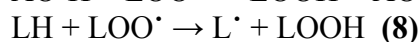
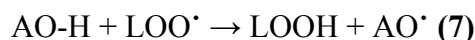
3.1. Αντιοξειδωτικά. Ορισμός

Ως αντιοξειδωτικό αναφέρεται κάθε ένωση, η οποία εμποδίζει ή καθυστερεί μια διαδικασία οξείδωσης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η συγκεκριμένη ένωση εμποδίζει το σχηματισμό των ROS ή απενεργοποιεί τις ήδη σχηματισμένες ελεύθερες ρίζες.^{1,8,23}

3.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

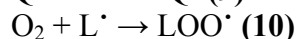
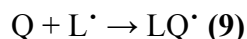
Οι κύριοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δραστηριότητας είναι τρεις: α) η διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών μέσω απενεργοποίησης των σχηματιζόμενων ριζών β) ο μηχανισμός αποτροπής της οξείδωσης μέσω χηλικοποίησης των μεταλλικών καταλυτών της αντίδρασης και γ) η καταστολή του οξυγόνου απλής κατάστασης $^1\text{O}_2$.²³ Ο μηχανισμός διακοπής της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες μηχανισμών. Η πρώτη αφορά τα αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, ενώ η δεύτερη αφορά τα αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων. Και οι δύο υποκατηγορίες μηχανισμών είναι σημαντικοί στη διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών.

Τα αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν ως δότες ηλεκτρονίων (AOH), συναγωνίζονται με το ακόρεστο λιπαρό οξύ LH για την υπεροξειδική ρίζα LOO^\bullet σύμφωνα με τις αντιδράσεις 7 και 8. Ως αποτέλεσμα, μειώνουν την παραγωγή άλκυλο ριζών L^\bullet , οι οποίες σχηματίζονται όταν το ακόρεστο λιπαρό οξύ αντιδρά με την υπεροξειδική ρίζα και έτσι επιβραδύνουν τη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης.²³



Το καθοριστικό κριτήριο, για να υπερισχύσει ο μηχανισμός αυτός, είναι η ευκολία με την οποία το αντιοξειδωτικό δίνει υδρογόνο στην υπεροξειδική ρίζα LOO^\bullet , πριν υπάρξει αλληλεπίδραση της ρίζας αυτής με το ακόρεστο λιπαρό οξύ. Η αποτελεσματικότητα αυτού του τύπου αντιοξειδωτικών εξαρτάται από τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, είναι σημαντικό η σχηματιζόμενη ρίζα του αντιοξειδωτικού (AO^\bullet) να είναι σταθερή και ο βενζολικός δακτύλιος να περιέχει ογκώδεις υποκαταστάτες οι οποίοι εξασφαλίζουν τη σταθερότητα της σχηματιζόμενης ρίζας.

Σε αντίθεση με τον παραπάνω μηχανισμό, αντιοξειδωτικά που είναι δέκτες ηλεκτρονίων (Q), συναγωνίζονται με το μοριακό οξυγόνο για την άλκυλο ρίζα L^\bullet (αντιδράσεις 9 και 10) και, ως αποτέλεσμα, εμποδίζουν τη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών, μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού της υπεροξειδικής ρίζας LOO^\bullet .



Το κυριότερο δομικό χαρακτηριστικό των αντιοξειδωτικών που δρουν μέσω του μηχανισμού αυτού είναι η παρουσία κινόνης στο μόριό τους. Η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών αυτών αποδίδεται κυρίως στη σταθερότητα του προϊόντος LQ.²³

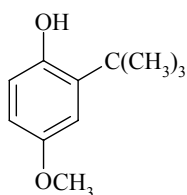
Ο δεύτερος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, ο οποίος περιλαμβάνει την αποτροπή της οξείδωσης, μέσω χηλικοποίησης των μεταλλικών καταλυτών της αντίδρασης, δεν περιλαμβάνει αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει τη χηλικοποίηση μεταλλικών καταλυτών, εμποδίζοντας έτσι το μεταλλικό ιόν να συμμετάσχει σε αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών και αποικοδόμησης υδροϋπεροξειδίων LOOH και H₂O₂.²³ Η χηλικοποίηση του μεταλλικού καταλύτη δεν καταστέλλει αναγκαστικά τη δραστηριότητά του. Η καταστολή της καταλυτικής δράσης του μεταλλικού ιόντος εξαρτάται από το είδος του χηλικοποιητή και τη γεωμετρία του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους ένας χηλικοποιητής μπορεί να καταστείλει ή να επιβραδύνει την καταλυτική δράση μεταλλικών ιόντων αναφέρονται στη: α) μεταβολή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του μεταλλικού ιόντος έτσι ώστε να μην προτιμάται η αντίδρασή του με μέσα παραγωγής ελευθέρων ριζών όπως το H₂O₂ ή άλλα υποστρώματα, β) κατάλληλη γεωμετρία του συμπλόκου του χηλικοποιητή με το μεταλλικό ιόν η οποία εμποδίζει στερεοχημικά την αντίδραση του μεταλλικού ιόντος με τα διάφορα υποστρώματα και γ) διατήρηση του μεταλλικού ιόντος στην ανώτερη οξειδωτική του βαθμίδα, η οποία στην περίπτωση του σιδήρου οδηγεί στη λιγότερο δραστική μορφή του, Fe³⁺.

Ο τρίτος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δραστηριότητας περιλαμβάνει την καταστολή του οξυγόνου απλής κατάστασης ¹O₂. Η δράση του αντιοξειδωτικού, στην περίπτωση αυτή, εντοπίζεται στη μεταφορά ενέργειας από το ¹O₂ στο μόριο του αντιοξειδωτικού με αποτέλεσμα τη μετάπτωση του ¹O₂ στη βασική του κατάσταση. Είναι δυνατό επίσης, το αντιοξειδωτικό να αντιδρά με το ¹O₂ παράγοντας σταθερά προϊόντα.^{23,31,32,33}

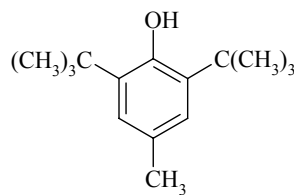
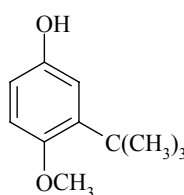
Φαινολικές ενώσεις ως αντιοξειδωτικά

4.1. Συνθετικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

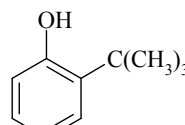
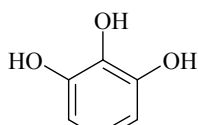
In vitro εφαρμογές φαινολικών αντιοξειδωτικών έχουν μελετηθεί στη συντήρηση τροφίμων. Οι μελέτες και εφαρμογές αυτές έχουν συμβάλει στην κατανόηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού *in vivo*. Τα φαινολικής φύσης συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι συχνά ενώσεις, οι οποίες περιέχουν στο μόριό τους διάφορους άλκυλο-υποκαταστάτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων συνθετικών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα 2,6-δι-^t-βούτυλο-4-μέθυλο-φαινόλη (BHT), 2- ή 3-^t-βούτυλο-4-υδρόξυ-ανισόλη (BHA), γαλλικός προπυλεστέρας (propyl gallate) και ^t-βούτυλο-υδροκινόνη (TBHQ) (Σχήμα 15). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά φυτικής προέλευσης είναι συνήθως φαινολικές ενώσεις, κινόνες ή λακτόνες και πολυφαινόλες. Ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι γνωστός.³⁰ Στα φυσικά αντιοξειδωτικά ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης τους είναι γνωστός μόνο για ορισμένες τάξεις ενώσεων, όπως οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή.^{9,15,23,30}



3-βούτυλο-4-υδρόξυ-ανισόλη
BHA



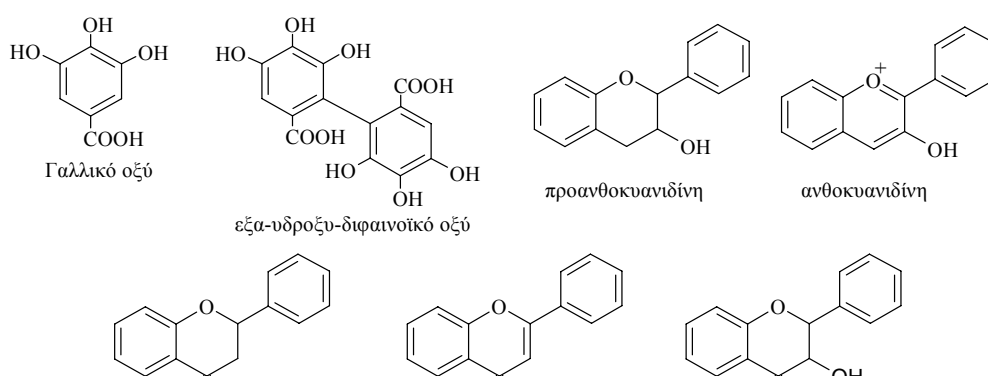
BHT

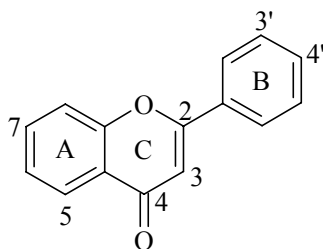


Φαινολικές ενώσεις ανωτέρων φυτών. Φύση και χρησιμότητα

Τα ανώτερα φυτά συνθέτουν έναν μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη, αναπαραγωγή, άμυνα εναντίον οποιασδήποτε προσβολής από άλλους οργανισμούς, και επιβίωση αυτών.³⁴ Μεταξύ των μεταβολιτών αυτών συναντάται μία μεγάλη ποικιλία ενώσεων, οι οποίες περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Η μεγαλύτερη πλειονότητα των αρωματικών ενώσεων φυτικής προέλευσης αποτελείται από φαινόλες. Η μεγάλη οικογένεια ενώσεων των φαινολών χωρίζεται περαιτέρω σε κατηγορίες ανάλογα, συνήθως, με τη βιοσυνθετική πορεία που ακολουθείται στο φυτό. Έτσι, στην οικογένεια των φαινολών ανήκουν μεταξύ των άλλων, οι τάξεις ενώσεων των απλών φαινολών, πολυφαινολών, φλαβονοειδών και ορισμένων τερπενοειδών. Οι απλές φαινόλες είναι μονομερείς ενώσεις των συστατικών, τα οποία σχηματίζουν τους φυτικούς ιστούς, και αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο υποκατεστημένο με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες.³⁵ Οι πολυφαινολικές ενώσεις από την άλλη, συνίστανται από μία πολύπλοκη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι περιλαμβάνουν τρεις οικογένειες ενώσεων: α) τις προανθοκυανιδίνες β) τα παράγωγα του γαλλικού οξέος και γ) τα παράγωγα του εξα-υδροξυ-διφαινοϊκού οξέος.³ Τα φλαβονοειδή αποτελούν, πιθανώς, τη σημαντικότερη ομάδα φαινολών στα ανώτερα φυτά και αποτελούνται από τις ανθοκυανιδίνες, φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβονόλες, χαλκόνες και ισοφλαβόνες.^{35,36,37} Ο δομικός σκελετός των παραπάνω οικογενειών φαινολικών ενώσεων απεικονίζονται στο Σχήμα 16.

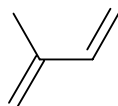
Τα φλαβονοειδή προέρχονται δομικά από το μόριο της φλαβόνης, με κατάλληλη υποκατάσταση στις θέσεις 5 και 7 του δακτυλίου Α, και 3' και 4' του δακτυλίου Β, όπως φαίνεται στο Σχήμα 17. Η υποκατάσταση, συνήθως, περιλαμβάνει ομάδες υδροξυλίου, μεθοξυ-ομάδες ή ομάδες σακχάρων. Τα φλαβονοειδή αποτελούν, συνήθως, χρωστικές ενώσεις στα ανώτερα φυτά.





Σχήμα 17: Μόριο της φλαβόνης, από την οποία σχηματίζονται τα φλαβονοειδή, με κατάλληλες υποκαταστάσεις στις θέσεις που υποδεικνύονται.

Τα τερπενοειδή είναι, συνήθως, πολύπλοκες ενώσεις, οι οποίες συναντώνται σε αφθονία στα φυσικά προϊόντα. Παρ' όλη τη δομική τους πολυπλοκότητα, παρουσιάζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό με βάση το οποίο μπορούν να κατηγοριοποιηθούν. Το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η μονάδα ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο) από την οποία βιοσυντίθενται.³⁴



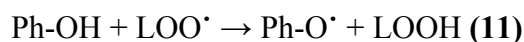
2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο

Έτσι, τα τερπενοειδή κατατάσσονται με βάση τον αριθμό των μονάδων οι οποίες περιέχουν 5 άτομα άνθρακα, και κατηγοριοποιούνται στις τάξεις των μονοτερπενίων (C_{10}), σεσκιτερπενίων (C_{15}), διτερπενίων (C_{20}), τριτερπενίων (C_{30}) και τετρατερπενίων (C_{40}). Όλες οι τάξεις των τερπενοειδών περιέχουν μία πληθώρα ενώσεων ανοιχτής ή κλειστής αλυσίδας, με κατάλληλες υποκαταστάσεις σε διάφορες θέσεις του ανθρακικού σκελετού, οι οποίες περιλαμβάνουν υδροξύλια, καρβοξύλια και καρβονύλια. Τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια αποτελούν ένα μεγάλο μέρος των αιθερίων ελαίων, που συναντώνται στα φυσικά προϊόντα. Τα διτερπένια λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους, δεν αποτελούν αιθέρια έλαια, αλλά θεωρείται ότι αποτελούν μέρος των φυτικών ρητινών. Τα τριτερπένια επίσης αποτελούν μέρος των φυτικών ρητινών και φλοιών, ενώ τα περισσότερα τετρατερπένια συνιστούν τα καροτενοειδή.

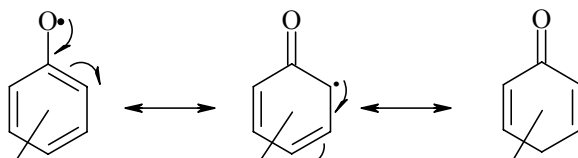
Διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται στα ανώτερα φυτά πιστεύεται ότι επιδεικνύουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμυκητοκτόνο, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και ορισμένα τερπένια.^{3,38,39,40}

4.3. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα φαινολικών ενώσεων. Αντιδράσεις φαινολικών ενώσεων με ελεύθερες ρίζες

Οι φαινολικές ενώσεις, ως ηλεκτρονιακά πλούσιες ενώσεις, έχουν την τάση να συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.³ Κατά τις αντιδράσεις αυτές, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από τη φαινολική ένωση, PhOH, σε ένα μη-κατειλημμένο μοριακό τροχιακό μίας οξειδωτικής ένωσης, όπως η υπεροξειδική ρίζα ενός λιπαρού οξέος $LOO\cdot$. Η μεταφορά αυτή ακολουθείται από τη γρήγορη μεταφορά ενός πρωτονίου (αντίδραση 11).



Η σχηματιζόμενη φαινολική ρίζα $Ph-O\cdot$, σταθεροποιείται μέσω συντονισμού στις *ο*- και *p*-θέσεις του βενζολικού δακτυλίου (Σχήμα 18).



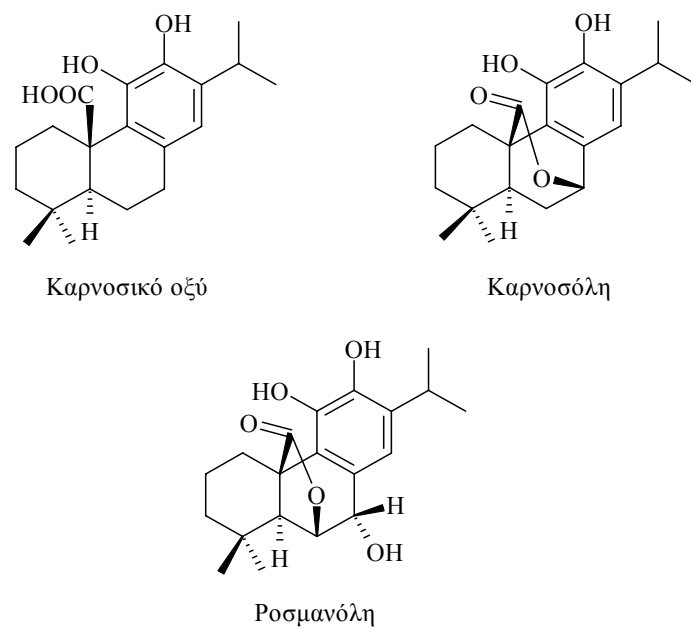
Για να αποτελέσει, ωστόσο, αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό, η σχηματιζόμενη φαινολική ρίζα θα πρέπει να είναι αδρανής ώστε να μην δύναται να εκκινήσει περαιτέρω αντιδράσεις ελεύθερων ριζών. Οι φαινολικές ενώσεις εκτός από τις ρίζες λιπαρών οξέων αντιδρούν και με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως με τις ρίζες υδροξυλίου $HO\cdot$ και τις σουπεροξειδικές ρίζες $O_2\cdot^-$, καθώς και με το οξυγόνο απλής κατάστασης 1O_2 .

Ο μηχανισμός με τον οποίο διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις, από φυσικά προϊόντα, επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα δεν είναι απόλυτα σαφής. Κάποιοι μηχανισμοί, εν τούτοις, έχουν προταθεί για ορισμένες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων, όπως αυτές των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν μία ποικιλία μηχανισμών δράσης και έχουν χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικά, με βάση την ικανότητά τους να απενεργοποιούν ελεύθερες ρίζες ως ηλεκτρονιοδοτικές ενώσεις ή μέσω χηλικοποίησης μεταλλικών καταλυτών σε διάφορα μοντέλα συστήματα.^{41,42,43,44,45,46,47} Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φλαβονοειδών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη σταθερότητα της σχηματιζόμενης ρίζας στο

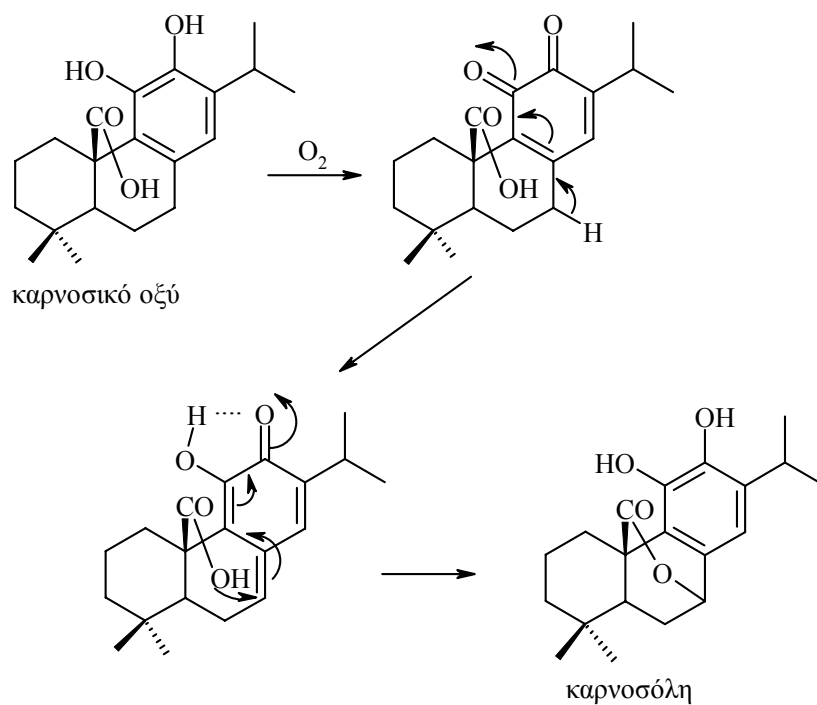
φλαβονοειδές. Γενικά, τα φλαβονοειδή με μεγαλύτερο αριθμό υδροξυλομάδων, ιδιαίτερα σε *ο*-θέσεις μεταξύ τους, είναι περισσότερο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά καθώς οι υδροξυλομάδες, οι οποίες έχουν έντονο ηλεκτρονιοδοτικό χαρακτήρα, ελαττώνουν το οξειδωτικό δυναμικό για μία δεδομένη ένωση, ενώ παράλληλα, η τοποθέτησή τους σε *ο*-θέση μεταξύ τους σταθεροποιεί την παραγόμενη φαινολική ρίζα.^{3,42,44,46} Σημαντικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών, τα οποία καθορίζουν την έκταση της αντιοξειδωτικής δραστηρότητάς τους, περιλαμβάνουν την παρουσία *ο*-υδροξυλομάδων στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου Β. Οι υδροξυλομάδες στις θέσεις αυτές προσφέρουν ιδιαίτερη σταθερότητα και συμμετέχουν στον απεντοπισμό της σχηματιζόμενης ρίζας. Επίσης, η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων 2 και 3, σε συζυγία με την 4-κετονομάδα στο δακτύλιο C, είναι σημαντική καθώς επεκτείνει τον απεντοπισμό της ρίζας αυτής και συμβάλλει στη σταθεροποίησή της. Τέλος, έχει διατυπωθεί ότι η παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C και στη θέση 5 του δακτυλίου A, σε συνδυασμό με την παρουσία κετονομάδας στη θέση 4 του δακτυλίου C, προσδίδει μέγιστη ικανότητα απενεργοποίησης ελευθέρων ριζών στο φλαβονοειδές.^{23,42,44,46,48}

4.4. Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δραστηρότητας διτερπενίων που συναντώνται στην οικογένεια φυτών *Labiatae* ως αποτέλεσμα της δομικής αλληλομετατροπής τους

Διτερπένια όπως το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και η ροσμανόλη (Σχήμα 19), έχουν δειχθεί ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηρότητα *in vitro* σε ποικίλα συστήματα.^{49,50,51} Τα διτερπένια αυτά συναντώνται σε αφθονία στα φυτά της οικογένειας *Labiatae*.^{23,49,50} Στην οικογένεια αυτή ανήκει και το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*) της περιοχής της ανατολικής Μεσογείου. Πιστεύεται, μάλιστα, ότι η αντιοξειδωτική δραστηρότητα που εμφανίζουν εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Labiatae*, όπως το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), οφείλεται ως επί των πλείστον στην παρουσία του καρνοσικού οξέος.^{49,51} Έχει διατυπωθεί, μάλιστα, ότι τα τρία προαναφερόμενα διτερπένια συσχετίζονται, καθώς έχει παρατηρηθεί αλληλομετατροπή μεταξύ τους κατά την κατεργασία με οργανικούς διαλύτες ή παρουσία φωτός και θέρμανσης.^{31,52,53,54} Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δραστηρότητας των φυτικών εκχυλισμάτων γίνεται περισσότερο κατανοητός κατά τη μελέτη των βιοχημικών μετατροπών των συστατικών τους από τη μία μορφή στην άλλη. Η κατανόηση των μετατροπών των ενώσεων αυτών είναι σημαντική, καθώς οι οξειδωτικές και αντιοξειδωτικές διαδικασίες οι οποίες εμφανίζονται ως ιδιότητες αυτών, μπορούν να προβλεφθούν και να αποδειχθούν για μία συγκεκριμένη ένωση. Έτσι, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός για το καρνοσικό οξύ μπορεί να παρουσιαστεί μέσω των οξειδωτικών μετατροπών της ένωσης αυτής σε άλλες μορφές. Η οξείδωση του καρνοσικού οξέος από το μοριακό οξυγόνο οδηγεί σε μετατροπή του σε καρνοσόλη, σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό που απεικονίζεται στο Σχήμα 20.^{31,53} Παρ' όλο που η μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε ροσμανόλη έχει αμφισβητηθεί με βάση πειραματικά δεδομένα,³¹ διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την αλληλομετατροπή αυτή.^{32,53}

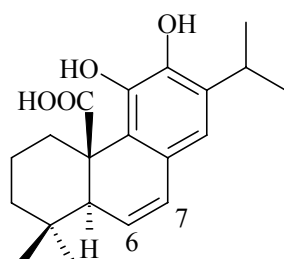


Σχήμα 19: Δομές διτερπενίων, τα οποία συναντώνται στην οικογένεια φυτών

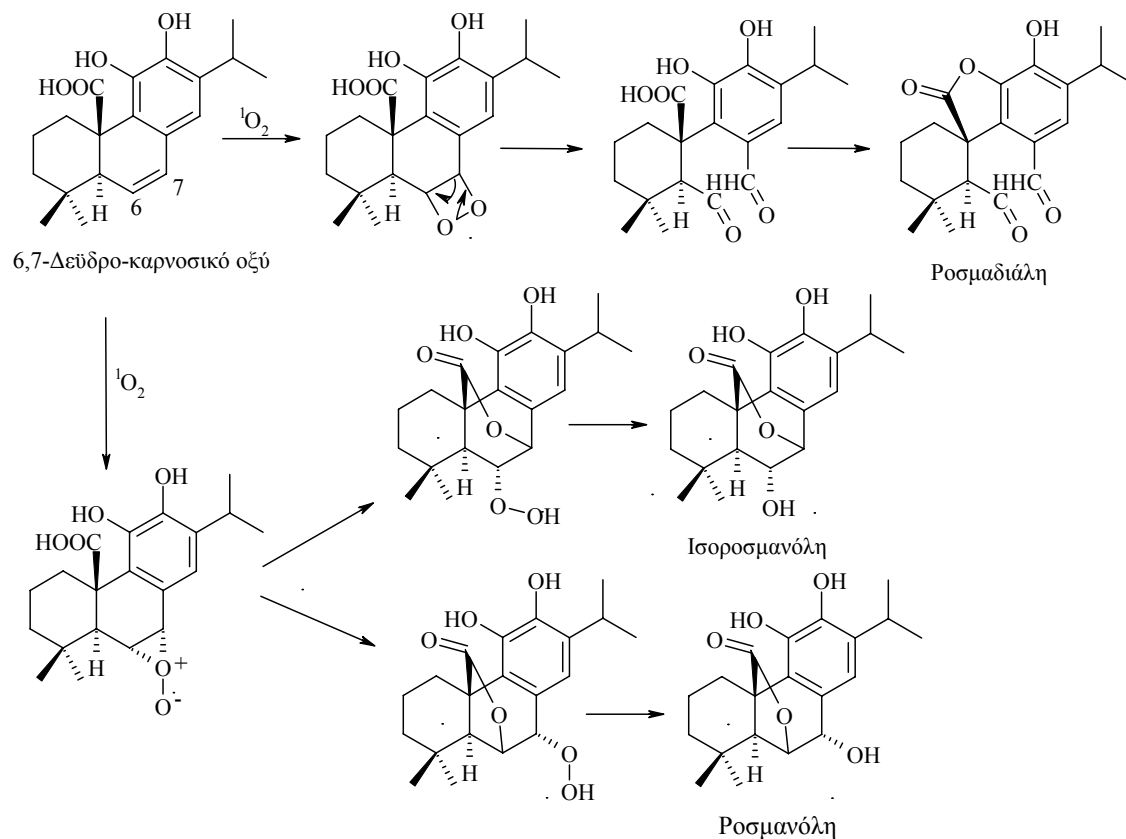


Σχήμα 20: Προτεινόμενος μηχανισμός μετατροπής του καρνοσικού οξέος σε

Το 6,7-δεϋδρο-καρνοσικό οξύ (Σχήμα 21), το οποίο σχηματίζεται από το καρνοσικό οξύ με αφυδρογόνωση, μπορεί να οξειδωθεί στη ροσμανόλη και άλλα παράγωγα. Η αφυδρογόνωση του καρνοσικού οξέος πιστεύεται ότι συμβαίνει ενζυματικά στα φυτά.^{23,51} Η μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε ροσμανόλη, στα φυτά, μπορεί να συμβεί όταν αυτά βρίσκονται σε κατάσταση οξειδωτικού stress, κατά την οποία παράγεται οξυγόνο απλής κατάστασης.^{23,55} Το οξυγόνο απλής κατάστασης προκαλεί την οξείδωση του 6,7-δεϋδρο-καρνοσικού οξέος μέσω προσβολής στους άνθρακες C₆ και C₇, η οποία ακολουθείται από το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων. Ο σχηματισμός των κυριότερων από αυτά φαίνεται στο Σχήμα 22.^{31,32,33}

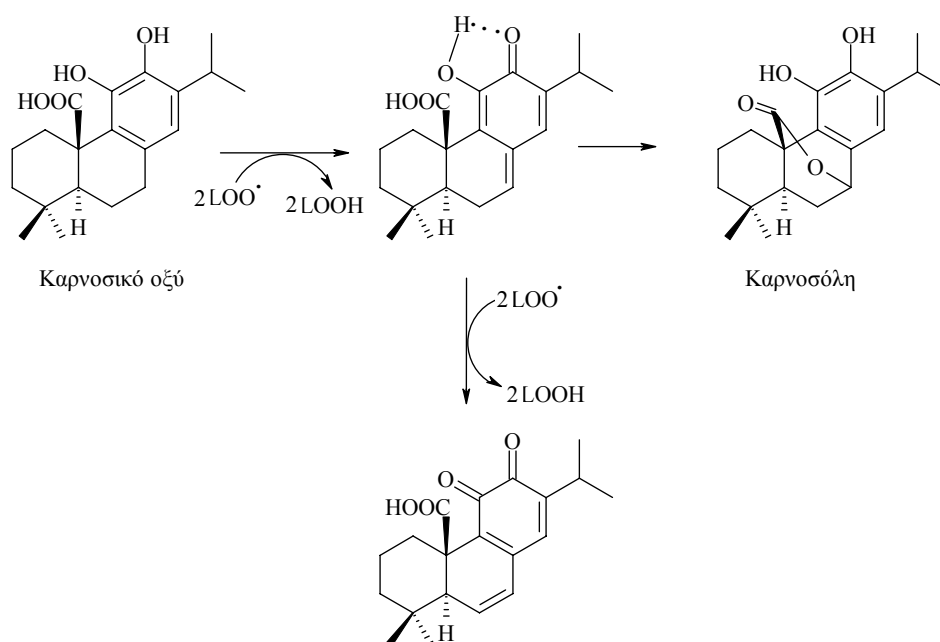


Σχήμα 21: Δομή του 6,7-



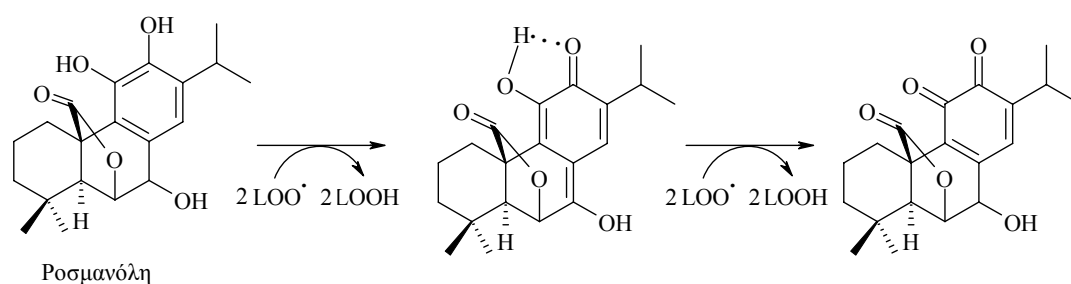
Σχήμα 22: Αντίδραση του 6,7-δεϋδρο-καρνοσικού οξέος με το οξυγόνο απλής κατάστασης.^{31,32,33}

Σημαντικό χαρακτηριστικό του καρνοσικού οξέος, το οποίο καθορίζει την αντιοξειδωτική του δραστηριότητα, είναι ο φαινολικός του χαρακτήρας.²³ Όπως άλλες φαινολικές ενώσεις, το καρνοσικό οξύ πιθανώς δρα αντιοξειδωτικά μέσω ηλεκτρονιοδοτικού μηχανισμού διακοπής της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών. Αποτέλεσμα του μηχανισμού αυτού, είναι ο σχηματισμός μίας ρίζας στο μόριο του καρνοσικού οξέος, το οποίο μπορεί να υποστεί ποικίλες αναδιοργανώσεις προκειμένου να συμπληρώσει την απώλεια του ηλεκτρονίου αυτού. Μία πιθανή αντίδραση του μορίου είναι ο σχηματισμός καρνοσόλης από την ημικινονική μορφή του καρνοσικού οξέος ή η απώλεια ενός ακόμα ατόμου υδρογόνου για να σχηματιστεί το παράγωγο της *o*-κινόνης (Σχήμα 23).²³ Επίσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το καρνοσικό οξύ αντιδρά με το οξυγόνο απλής κατάστασης^{31,32,33} και έτσι, πιθανώς, να εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση έναντι των φωτοοξειδώσεων.⁵⁵



Σχήμα 23: Αντίδραση του καρνοσικού οξέος με υπεροξειδικές ρίζες ακόρεστων υδρογονίων οξέων.²³

Η ροσμανόλη και η καρνοσόλη μπορούν επίσης να δράσουν ως ηλεκτρονιοδοτικά αντιοξειδωτικά και, πιθανώς, ο μηχανισμός δράσης τους να λαμβάνει χώρα κατά τον ίδιο τρόπο.²³ Ως παράδειγμα, παρατίθεται ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας της ροσμανόλης στο Σχήμα 24. Ο μηχανισμός δράσης του καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης και ροσμανόλης, ως αποτελεσματικών δοτών ατόμου υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες, υποστηρίζεται από την παρατηρούμενη μικρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα των αντίστοιχων μεθυλο-αιθέρων των ενώσεων αυτών, οι οποίοι διαθέτουν λιγότερα άτομα υδρογόνου στο μόριό τους.⁴⁹



Σχήμα 24: Αντίδραση της ροσμανόλης με υπεροξειδικές ρίζες ακόρεστων λιπαρών οξέων.²³

5. Διατροφή και αντιοξειδωτική κατάσταση *in vivo*

Προκειμένου οι οργανισμοί να επιβιώσουν επιβάλλεται η ελαχιστοποίηση της μη-επιθυμητής ή μη-ελεγχόμενης οξειδωσης. Ο έλεγχος των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών αντιμετωπίζεται πλέον ως ένας πιθανός τρόπος παρεμπόδισης ή πρόληψης χρόνιων ασθενειών. Μεταξύ άλλων παραγόντων, η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στο καθορισμό της αντιοξειδωτικής κατάστασης στον οργανισμό. Η επίδραση της διατροφής στον οργανισμό, αντιοξειδωτική ή προοξειδωτική, καθορίζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως η σύσταση σε αντιοξειδωτικά και προοξειδωτικά συστατικά, η απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών αυτών, η επεξεργασία και αποθήκευση των τροφών, η παρουσία προσθέτων και διατροφικών συμπληρωμάτων, και η χημική δομή των συστατικών αυτών.⁵⁶ Διατροφικά αντιοξειδωτικά αποτελούν οι βιταμίνες A, C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλες), τα καροτενοειδή και διάφορα μεταλλικά ιόντα, τα οποία αποτελούν μέρος του ενεργού κέντρου πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα ιόντα, ωστόσο, των μεταβατικών μετάλλων μπορούν να δράσουν προοξειδωτικά στη γαστρεντερική οδό, και εφόσον απορροφηθούν, στους οργανικούς ιστούς. Η δράση τους ωστόσο, είναι περιορισμένη λόγω της δέσμευσής τους σε πρωτεΐνες και ένζυμα ή λόγω δράσης φυσικών αντιοξειδωτικών. Αυτό ισχύει τόσο στην περίπτωση της γαστρεντερικής οδού,^{48,57} όσο και πιθανότατα *in vivo*. Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων φυτικής προέλευσης έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον για το διατροφικό και υγιεινό τους ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό. Πολλές από τις ενώσεις αυτές επηρεάζουν την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού, μέσω της άμεσης δράσης τους ως

αντιοξειδωτικά ή της έμμεσης δράσης τους μέσω χηλικοποίησης προοξειδωτικών μεταλλικών ιόντων. Αν και ο ρόλος τους ως βιολογικά αντιοξειδωτικά δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένος, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες συσχετίζουν την κατανάλωση τροφών πλούσιων στα συστατικά αυτά με χαμηλή θνησιμότητα από χρόνιες παθήσεις.^{58,59,60,61}

Σημαντικές εμφανίζονται οι μελέτες, οι οποίες συσχετίζουν τη μεσογειακή διαίτα με σχετικά μικρό αριθμό εμφάνισης καρδιακών παθήσεων και καρκίνου.^{58,59} Από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της μεσογειακής διαίτας είναι η μεγάλη κατανάλωση ελαιολάδου, φρούτων, λαχανικών και δημητριακών. Οι πηγές αυτές της μεσογειακής διατροφής είναι πλούσιες σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες και φαινολικές ενώσεις. Εκτός από τις κύριες αυτές πηγές διατροφής, η μεσογειακή διαίτα περιλαμβάνει και ένα μεγάλο αριθμό βοτάνων, αρωματικών φυτών και μπαχαρικών, τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις.^{58,62,63}

6. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δραστηριότητας συστατικών φυσικών προϊόντων και μέτρησης του βαθμού οξείδωσης

Καθώς η αντιοξειδωτική/προοξειδωτική δραστηριότητα ενώσεων που περιέχονται σε φυσικά προϊόντα αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία, η ανάπτυξη ποικίλων μεθόδων για τον έλεγχο και προσδιορισμό των ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών, κρίνεται αναγκαία. Η ανάλυση των προϊόντων τα οποία παράγονται από τις αντιδράσεις οξείδωσης περιλαμβάνει επίσης μεγάλο αριθμό μεθόδων. Συγκεκριμένα:

6.1. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δραστηριότητας

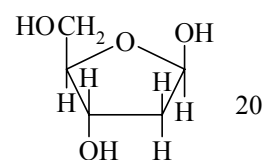
Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δραστηριότητας έχουν αναπτυχθεί ποικίλα συστήματα, τα οποία περιλαμβάνουν: α) τη χρησιμοποίηση διαφόρων υποστρωμάτων που μπορούν να οξειδωθούν για τη μελέτη της επίδρασης ενός ή περισσότερων συστατικών στην αντίδραση οξείδωσης και β) τη μελέτη του βαθμού απενεργοποίησης σταθερών ριζών από ένα ή περισσότερα συστατικά. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται δίνονται παρακάτω.

6.1.1. Προσδιορισμός οξείδωσης λιπιδίων^{4,26}

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία διαδικασία σημαντική *in vivo*, κυρίως λόγω της συνεισφοράς της στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, για τη διασαφήνιση της αποτελεσματικότητας ενός αντιοξειδωτικού έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα συστήματα, τα οποία μετρούν την *in vitro* αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού έναντι της προκαλούμενης οξείδωσης υποστρωμάτων. Τα τελευταία περιλαμβάνουν μεμβρανικά λιπίδια, λιπαρά οξέα ή λιποπρωτεΐνες. Η οξείδωση των λιπιδίων προκαλείται συνήθως με προσθήκη ιόντων μεταβατικών μετάλλων (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+}), συχνά σε συνδυασμό με ένα αναγωγικό μέσο, όπως το ασκορβικό οξύ, ή με χρησιμοποίηση ακτινοβολίας. Ο βαθμός έκτασης της οξείδωσης μετρείται επίσης με ποικίλες μεθόδους, όπως αναφέρεται παρακάτω, ενώ η αποτελεσματικότητα ενός αντιοξειδωτικού εκτιμάται με βάση τα μειωμένα επίπεδα οξείδωσης, ως αποτέλεσμα χαμηλής συγκέντρωσης των προϊόντων οξείδωσης ή ελαχιστοποιημένης καταστροφής του υποστρώματος.

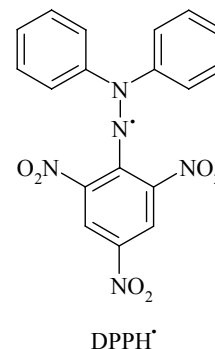
Προσδιορισμός οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης^{64,65}

Οι δραστικές ρίζες υδροξυλίου HO^{\cdot} , οι οποίες παράγονται κατά την αντίδραση του $Fe(III)$ -EDTA με το H_2O_2 , παρουσία ασκορβικού οξέος, μπορούν να προσβάλλουν το μόριο της 2-δεοξυ-D-ριβόζης παράγοντας μία ποικιλία



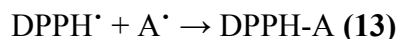
2-δεοξυ-D-ριβόζη

προϊόντων αποικοδόμησης. Οποιοδήποτε άλλο μόριο, παρόν στο μίγμα της αντίδρασης, συναγωνίζεται με τη 2-δεοξυ-D-ριβόζη για τις ρίζες υδροξυλίου. Στην αρχή αυτή στηρίζεται η χρησιμοποίηση της μεθόδου για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ή προοξειδωτικής δράσης ενώσεων έναντι της αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης. Ενώσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ρίζες υδροξυλίου ή συμπλοκοποιούν τα ιόντα Fe(III), καθιστώντας το σίδηρο οξειδοαναγωγικά λιγότερο δραστικό, μπορούν να δράσουν αντιοξειδωτικά. Από την άλλη μεριά, ενώσεις οι οποίες συμμετέχουν σε αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές του ασκορβικού οξέος στη μέθοδο αυτή, μπορούν να αναπτύξουν προοξειδωτική δραστηριότητα.



Μέτρηση της αποσύνθεσης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH[•])³⁸

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αποτελεσματικότητα ενός αντιοξειδωτικού να ανάγει τη σταθερή ρίζα DPPH[•] παρέχοντας άτομο υδρογόνου ή αντιδρώντας με αυτή, όπως φαίνεται στις αντιδράσεις 12 και 13.



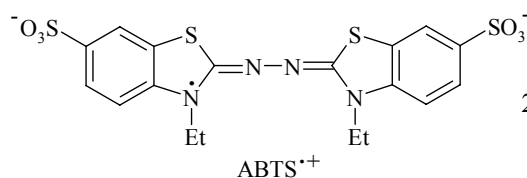
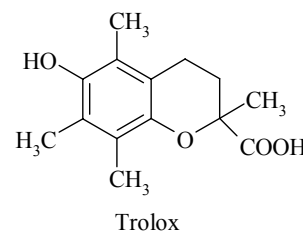
Η ρίζα DPPH[•] εμφανίζει χαρακτηριστική απορρόφηση στο ορατό, στα 515 nm. Η απορρόφηση αυτή εξαφανίζεται σταδιακά κατά την επίδραση του αντιοξειδωτικού.

Αντίδραση με το υποχλωριώδες οξύ (HClO)^{38,51}

Το υποχλωριώδες οξύ παράγεται από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα κύτταρα.^{12,51} Το HClO μπορεί να προσβάλλει διάφορα βιομόρια, από τα οποία το πιο σημαντικό στο πλάσμα του αίματος, είναι η α₁-αντιπρωτεΐνάση, ο σημαντικότερος αναστολέας πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η ελαστάση. Η ικανότητα μιας ένωσης να προστατεύει την α₁-αντιπρωτεΐνάση από απενεργοποίηση από το HClO, αποτελεί ένδειξη της ικανότητάς της να αδρανοποιεί το HClO. Πρακτικά, μετρείται η απορρόφηση στα 410 nm, η οποία όταν αυξάνεται, υποδεικνύει αυξημένη υδρολυτική δράση της ελαστάσης ως αποτέλεσμα της αναστολής της α₁-αντιπρωτεΐνάσης από το HClO.

6.1.5. Προσδιορισμός της ισοδύναμης προς το trolox αντιοξειδωτικής δραστηριότητας^{38,66}

Η ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να δρα ως αναγωγικό της κατιονικής ρίζας του 2,2'-αζινο-δις-3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος (ABTS^{•+}), συγκρίνεται με την αντίστοιχη ικανότητα του 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-χρωμάνο-2-καρβοξυλικού οξέος (trolox). Το οξύ αυτό αποτελεί υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E. Η μέθοδος περιλαμβάνει το σχηματισμό της κατιονικής ρίζας ABTS^{•+}, η οποία εμφανίζει μέγιστα απορρόφησης στα 645, 734 και 815 nm. Παρακολουθείται η μείωση της απορρόφησης στα 734 nm ως αποτέλεσμα της δράσης ενώσεων ως δοτών υδρογόνου στη ρίζα ABTS^{•+}. Η ισοδύναμη προς το trolox, αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση του



trolox, η οποία επιφέρει αντιοξειδωτική δράση όμοια με αυτήν της υπό εξέταση ένωσης με συγκέντρωση 1 mM.

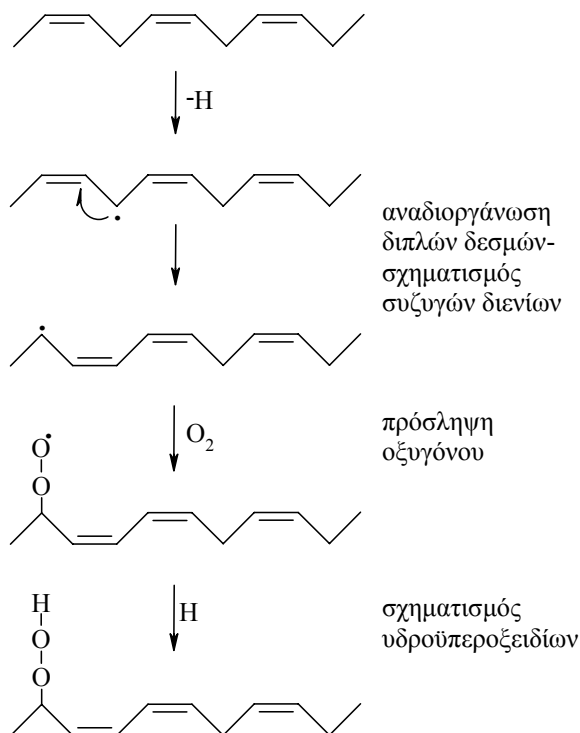
6.2. Μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων οξείδωσης

Οι μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων οξείδωσης αναφέρονται κυρίως στην οξείδωση των λιπιδίων, κατά την οποία ποικίλα προϊόντα παράγονται και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το τι μετρείται προς διασαφήνιση της έκτασης της οξείδωσης. Η πρώτη κατηγορία εστιάζεται στη μέτρηση της απώλειας ενός από τα αντιδρώντα συστατικά (οξυγόνο ή υπόστρωμα), ενώ η δεύτερη στη μέτρηση των προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της οξείδωσης.

Μέθοδοι προσδιορισμού της απώλειας των αντιδρώντων

Μέτρηση συζυγών διενίων^{4,26,64}

Η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω ελευθέρων ριζών ακολουθείται από το σχηματισμό των περισσότερο σταθερών συζυγών διενίων, τα οποία απορροφούν στην περιοχή 230-235 nm του υπεριώδους φωτός. Η μέτρηση αυτής της απορρόφησης είναι χρήσιμη για τον υπολογισμό της οξείδωσης λιπιδίων στα πρώιμα στάδια εξέλιξης της οξείδωσης αυτής.



Μέτρηση πρόσληψης οξυγόνου⁶⁴

Η οξείδωση των λιπιδίων συνοδεύεται από εισαγωγή οξυγόνου σ'αυτά. Η αντίδραση οξείδωσης λοιπόν, μπορεί να παρακολουθηθεί με μέτρηση της ταχύτητας πρόσληψης οξυγόνου από το υπόστρωμα με τη βοήθεια κατάλληλου ηλεκτροδίου.

6.2.1.3. Μέτρηση των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων^{21,26,67}

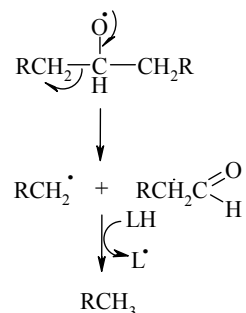
Εισαγωγή οξυγόνου σε ένα οργανικό υπόστρωμα, το οποίο οξειδώνεται, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδίων. Τα υπεροξείδια αυτά μπορούν να προσδιοριστούν με μία ποικιλία μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρησιμοποίηση υγρής και αέριας χρωματογραφίας, φθορισμομετρικούς και φασματοφωτομετρικούς προσδιορισμούς, και ιωδομετρική τιτλοδότηση.

6.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των προϊόντων που παράγονται

Μέτρηση των αερίων υδρογονανθράκων^{64,67,68}

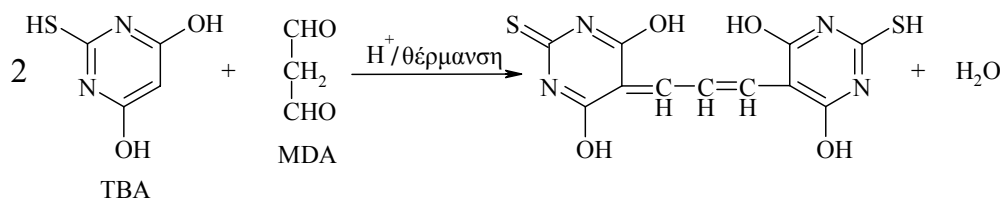
Κατά τη διάρκεια οξείδωσης των λιπιδίων η α -σχάση μίας αλκόξυ ρίζας παράγει μεταξύ των άλλων και υδρογονανθρακικά αέρια, με κυριότερα το αιθάνιο και πεντάνιο. Αιθάνιο παράγεται από n -3 ακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. λινολενικό οξύ), ενώ πεντάνιο από n -6 ακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. λινελαϊκό οξύ). Η παραγωγή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από α) την παρουσία μεταβατικών μεταλλικών ιόντων

ικανών να διασπούν τα υπεροξειδία σε αλκόξυ ρίζες και β) τη συγκέντρωση του οξυγόνου που έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα. Και τα δύο υδρογονανθρακικά αέρια ανιχνεύονται με τη χρησιμοποίηση αέριας χρωματογραφίας.



Μέτρηση της μαλονυδιαλδεΐδης (MDA: OHC-CH₂-CHO)

Η μαλονυδιαλδεΐδη (MDA) είναι ένα μόριο, το οποίο παράγεται τόσο κατά την οξείδωση των λιπιδίων¹⁸ όσο και κατά την οξειδωτική αποικοδόμηση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης.^{65,69} Ένα μόριο MDA αντιδρά με δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA), κάτω από όξινες συνθήκες και με επίδραση θέρμανσης (Σχήμα 25). Κάτω από τις συνθήκες αυτές σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο απορροφά φως στα 534 nm. Στην αντίδραση αυτή στηρίζεται η μέθοδος ανίχνευσης MDA με τη χρησιμοποίηση του ονομαζόμενου 'TBA τεστ', ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα τεστ που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του βαθμού οξείδωσης στα τρόφιμα.



Σχήμα 25: Αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος με την μαλονυδιαλδεΐδη προς σχηματισμό προϊόντος που απορροφά φως στα 534 nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΕΥΡΥΤΕΡΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί πρόσφατα σε αντιοξειδωτικά συστατικά φυσικής προέλευσης και στην ικανότητά τους να προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από χρόνιες παθήσεις, οι οποίες σχετίζονται με τα ROS.^{5,42,70,71,72} Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται εκχυλίσματα αρωματικών φυτών, σε οργανικούς διαλύτες, τα οποία έχουν δειχθεί ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα *in vitro*.^{73,74} Η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δραστηριότητα έχει αποδοθεί στην παρουσία ενώσεων φαινολικής φύσης, επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο τους ως διακόπτες αλυσιδωτών αντιδράσεων και ως απενεργοποιητές ελευθέρων ριζών.^{44,49,73,74} Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων αυτών ως αντιοξειδωτικών μέσων. Φωσφολιποειδή και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για τη μελέτη της οξείδωσης λιπιδίων και της παρεμπόδισης αυτής από αντιοξειδωτικές ουσίες.^{43,75,76,77} Η οξείδωση των λιπιδίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα, εξαιτίας της σημασίας της διαδικασίας αυτής σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού, όπου μεταβολές στη δομή και λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών μπορεί να λάβουν χώρα, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης των μορίων αυτών.^{19,21,78} Ένας μεγάλος αριθμός μοντέλων συστημάτων έχει χρησιμοποιηθεί, όπου ο σίδηρος, στη δισθενή ή τρισθενή του μορφή, και/ή H₂O₂ έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την εκκίνηση αντιδράσεων ελευθέρων ριζών, υπεύθυνων για την οξείδωση των λιπιδίων.^{25,27,127} Επιπλέον, αντιδράσεις τύπου Fenton στις οποίες ο σίδηρος στη δισθενή του μορφή προάγει την αποικοδόμηση του H₂O₂ προς παραγωγή δραστικών ριζών υδροξυλίου HO[•], έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες της οξείδωσης λιπιδίων^{25,75} και βιολογικά σχετιζόμενων σακχάρων, όπως της 2-δεοξυ-D-ριβόζης.⁶⁵ Αν και υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική,^{80,81,82} πολύ λίγα, ωστόσο, είναι γνωστά σχετικά με την ικανότητα αυτών να εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα έναντι καταλυόμενων, από ιόντα σιδήρου, αντιδράσεων οξειδωτικής καταστροφής βιολογικά σχετιζόμενων μορίων, όπως φωσφολιποειδών, ακόρεστων λιπαρών οξέων και σακχάρων. Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε οργανικούς διαλύτες εμφανίζεται πολύ σημαντική. Ωστόσο, εξίσου σημαντική εμφανίζεται και η μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και στα υδατικά τους εκχυλίσματα, εφόσον τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνται και καταναλώνονται ως αφεψήματα. Η μελέτη της δράσης των αφεψημάτων αυτών συμβάλλει στη γενικότερη μελέτη συσχέτισης μεταξύ χαμηλής νοσηρότητας από χρόνιες παθήσεις και διατροφής πλούσιας σε φαινολικά συστατικά. Στην παρούσα εργασία, μελετάται η πιθανή αντιοξειδωτική δραστηριότητα πέντε αρωματικών φυτών που συναντώνται στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, έναντι της οξείδωσης φωσφολιποειδών, λινελαϊκού οξέος [18:2(9,12)] και 2-δεοξυ-D-ριβόζης, η οποία εκκινείται παρουσία α) Fe³⁺ και Fe³⁺/ασκορβικού οξέος και β) συνθηκών αντίδρασης Fenton.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό. Τα βότανα και αρωματικά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία συλλέχθηκαν από την περιοχή της Αγίας Ειρήνης του νομού Ηρακλείου¹ ή από την τοπική αγορά² και ταυτοποιήθηκαν από μέλη του Τομέα Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και Θαλάσσιας Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης. Το μαύρο τσάι (Lipton, yellow label) ήταν δωρεά της ΕΛΑΪΣ ΑΕ.

Κοινή ονομασία φυτού	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
¹ Φασκόμηλο	<i>Salvia fruticosa</i>	Labiatae
¹ Τσουκνίδα	<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae
¹ Μάραθος	<i>Foeniculum vulgare</i>	Umbelliferae
² Χαμομήλι	<i>Matricaria chamomilla</i>	Compositae
² Δίκταμο	<i>Origanum dictamnus</i>	Labiatae
² Μαύρο τσάι Lipton, yellow label	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae

Για την επώαση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης, σε θερμοκρασία 37 °C. Οι φασματοσκοπικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους (U-2001 Hitachi). Για την παρασκευή και ομογενοποίηση μικκυλίων λινελαϊκού οξέος και λιποσωμάτων φωσφολιποειδών, χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων Ulabo USR-3. Όλες οι αναμίξεις πραγματοποιήθηκαν σε αναμικτή δίνης (vortex). Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή φυγοκέντρου (Labofuge 200, Heraeus).

2.1. ΥΛΙΚΑ

Ακετόνη, πετρελαϊκός αιθέρας (40-60 °C), διαιθυλαιθέρας.

Διάλυμα $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Cit}^{4-} = \text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7^{4-}$) 300 μM , 600 μM και 1200 μM σε H_2O .

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 1200 μM 1500 μM και 2400 μM σε H_2O .

Διάλυμα NaCl 0.15 M και 0.3 M, pH 7.4.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline) 5.4 mM.

Εκχυλίσματα αρωματικών φυτών 4 g/100 mL H_2O .

Λινελαϊκό οξύ [18:2(9,12)] και φωσφολιποειδή βόειου εγκεφάλου 5 mg/mL.

Διάλυμα BHT (butylated hydroxy toluene) 2% σε $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

Διάλυμα H_2O_2 24 mM σε H_2O .

Διάλυμα 2-δεοξυ-D-ριβόζης 168 mM σε H_2O .

Διάλυμα CCl_3COOH 2.8 % σε H_2O .

Διάλυμα θειοβαρβιτουρικού οξέος 1 % σε NaOH 50 mM.

Διάλυμα 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίου 0.1 mM σε H_2O .

Διάλυμα $\text{FeCl}_3/\text{EDTA}$ 1:2 (1200 $\mu\text{M}/2400 \mu\text{M}$) σε H_2O .

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Παρασκευή του συμπλόκου $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Η σύνθεση του συμπλόκου $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, για τη χρησιμοποίησή του ως πηγή του μεταλλικού ιόντος Fe^{3+} στις καταλυόμενες αντιδράσεις οξείδωσης των υποστρωμάτων φωσφολιποειδών και λινελαϊκού οξέος, έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.⁸³ Συνοπτικά, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ και κιτρικό οξύ αναμιγνύονται σε αναλογία μορίων 1:2. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για μία μέρα. Την επομένη, το pH ρυθμίζεται στα 8 με διάλυμα αμμωνίας και προσθήκη αιθανόλης προκαλεί καθίζηση κρυσταλλικού υλικού στους 4 °C μερικές μέρες αργότερα. Οι κρύσταλλοι πλένονται με ψυχρή αιθανόλη πριν τη φύλλαξή τους. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται συγκρίνοντας το φάσμα FT-IR αυτών, με το αντίστοιχο πρότυπων κρυστάλλων των οποίων η δομή έχει διασαφηνισθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

2.2.2. Απομόνωση φωσφολιποειδών από βόειο εγκέφαλο.

Η απομόνωση των φωσφολιποειδών από βόειο εγκέφαλο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με κατάλληλα τροποποιημένη βιβλιογραφική μέθοδο.⁸⁴

Ο βόειος εγκέφαλος μεταφέρεται από το σφαγείο σε πάγο. Καθαρίζεται από τα αιμοφόρα αγγεία και τα μηνίγγια, πλένεται με παγωμένο, στους 4 °C, διάλυμα NaCl 0.15 M, pH 7.4, και ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή λαμβάνοντας ένα παχύρευστο μίγμα. Μετρείται ο όγκος του ομογενοποιημένου μίγματος και ακολούθως πραγματοποιείται εκχύλιση με ακετόνη. Ο όγκος της προστιθέμενης ακετόνης είναι τέσσερις φορές εκείνου του ομογενοποιημένου μίγματος. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές. Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος του μίγματος υπό κενό, για την απομάκρυνση της ακετόνης και ξήρανση του εναπομείνοντος στερεού. Στη συνέχεια, το στερεό εκχυλίζεται με, δύο φορές τον αρχικό όγκο του ομογενοποιημένου μίγματος, πετρελαϊκό αιθέρα (40-60 °C). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση του στερεού. Ο πετρελαϊκός αιθέρας απομακρύνεται με τη βοήθεια περιστροφικού αποστακτήρα. Το υλικό που απομένει διαλύεται σε 1/5 του αρχικού όγκου του ομογενοποιημένου μίγματος, διαιθυλαιθέρα. Το διάλυμα που προκύπτει κατεργάζεται με 5 όγκους ακετόνης και το στερεό που καθιζάνει, το οποίο αποτελεί τα φωσφολιποειδή, συλλέγεται με διήθηση υπό κενό, ξηραίνεται, και φυλάσσεται σε αδιαφανή μπουκάλια κάτω από ατμόσφαιρα αργού στους -20 °C.

2.2.3. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών.

Ποσότητα κονιοποιημένου φυτού 4 g προστίθεται σε 100 mL νερό στο σημείο βρασμού και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού, το οποίο χρησιμοποιείται αμέσως στις αντίστοιχες πειραματικές διαδικασίες.

2.2.4. Παρασκευή λιποσωμάτων φωσφολιποειδών και μικκυλίων λινελαϊκού οξέος [18:2(9,12)]

Φωσφολιποειδή βόειου εγκεφάλου ή λινελαϊκό οξύ διαλύονται σε CHCl_3 . Το CHCl_3 απομακρύνεται κάτω από συνθήκες κενού, αφήνοντας ένα λιπαρό υμένιο στα τοιχώματα της φιάλης. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα NaCl 0.3 mM, pH 7.4, ώστε η

συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι 5 mg/mL. Το γαλακτώδες αιώρημα που σχηματίζεται ομογενοποιείται με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων για 10 min, προς σχηματισμό των λιποσωμάτων και μικκυλίων.

Παρασκευή δειγμάτων και οξείδωση φωσφολιποειδών ή λινελαϊκού οξέος

Όγκος 0.5 mL υδατικού εκχυλίσματος αρωματικών φυτών προστίθεται σε πωματισμένο σωλήνα καλλιέργειας. Ακολουθεί προσθήκη 0.5 mL, αιωρήματος λιποσωμάτων φωσφολιποειδών ή μικκυλίων λινελαϊκού οξέος ομογενοποιημένου σε διάλυμα NaCl 0.3 mM. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος NaCl είναι 0.15 mM. Στη συνέχεια προστίθενται διαλύματα $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ή $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /ασκορβικό οξύ 1:2, ή $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /ασκορβικό οξύ 1:2/ H_2O_2 τελικής συγκέντρωσης 50 μM , 50 μM /100 μM , 50 μM /100 μM /1 mM, αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων είναι 1200 μL . Παράλληλα παρασκευάζονται τυφλά δείγματα με αντικατάσταση του υποστρώματος των φωσφολιποειδών ή του λινελαϊκού οξέος, από 0.5 mL διαλύματος NaCl 300 mM pH 7.4. Αντικαθιστώντας τα υδατικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών με H_2O , οδηγεί στην παρασκευή των αντίστοιχων μαρτύρων (controls). Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, συνεχούς ανακίνησης στους 37 °C, για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Ακολούθως, τα δείγματα απομακρύνονται από το υδατόλουτρο. Προστίθενται σ' αυτά, 100 μL BHT 2% σε αιθανόλη, 1 mL τριχλωροοξικό οξύ (TCA) 2.8 % σε H_2O και 1 mL θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) 1% σε NaOH 50 mM. Τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου βράζουν στους 100 °C για 20 λεπτά. Το προϊόν συμπύκνωσης του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) με δύο μόρια μαλονυλδιαλδεΐδης (MDA: $\text{OHC-CH}_2\text{-CHO}$), εκχυλίζεται σε 1000 μL 1-βουτανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στα 2,500 g και μετρείται η απορρόφηση της οργανικής στοιβάδας στα 534 nm με φασματοφωτόμετρο UV/Vis. Για τη διόρθωση του υποβάθρου αφαιρείται η απορρόφηση των τυφλών δειγμάτων. Όπου χρειάζεται, γίνεται 5 φορές αραίωση της οργανικής στοιβάδας με 1-βουτανόλη. Η μετρούμενη απορρόφηση μετατρέπεται σε μονάδες συγκέντρωσης MDA, με τη χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται από την αντίδραση συμπύκνωσης των παραγόμενων με θερμική διάσπαση του 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίου μορίων MDA, με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) όπως αναφέρεται παραπάνω.

Παρασκευή δειγμάτων και οξειδωτική αποικοδόμηση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης⁶⁵

PBS (Phosphate Buffered Saline) 5.4 mM και 0.5 mL υδατικού εκχυλίσματος αρωματικών φυτών. Ακολουθεί η προσθήκη 2-δεοξυ-D-ριβόζης, ασκορβικού οξέος, $\text{FeCl}_3/\text{EDTA}$ 1:2 και H_2O_2 , ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι αντίστοιχα, 2.8 mM, 100 μM , 50 μM /100 μM και 1 mM. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων είναι 1200 μL . Η αντικατάσταση των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών από 0.5 mL H_2O οδηγεί στην παρασκευή του αντίστοιχου μάρτυρα. Παράλληλα, παρασκευάζονται τυφλά δείγματα με αντικατάσταση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης από H_2O . Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C, υπό συνεχή ανακίνηση, για χρονικό

διάστημα μίας ώρας. Ακολούθως τα δείγματα απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και προστίθενται σε αυτά, 1 mL TCA 2.8 % και 1 mL TBA 1 % σε NaOH 50 mM. Κατόπιν, όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου βράζουν στους 100 °C για 20 λεπτά. Το προϊόν συμπύκνωσης του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) με δύο μόρια μαλονυλδιαλδεύδης, εκχυλίζεται σε 1200 μ L 1-βουτανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στα 2,500 g και μετρείται η απορρόφηση της οργανικής στοιβάδας στα 534 nm με φασματοφωτόμετρο UV/Vis. Για τη διόρθωση του υποβάθρου αφαιρείται η απορρόφηση των τυφλών δειγμάτων. Η μετρούμενη απορρόφηση μετατρέπεται σε μονάδες συγκέντρωσης MDA με τη χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται από την αντίδραση συμπύκνωσης των παραγόμενων με θερμική διάσπαση του 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίου μορίων MDA, με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) όπως αναφέρεται παραπάνω.

2.2.7. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

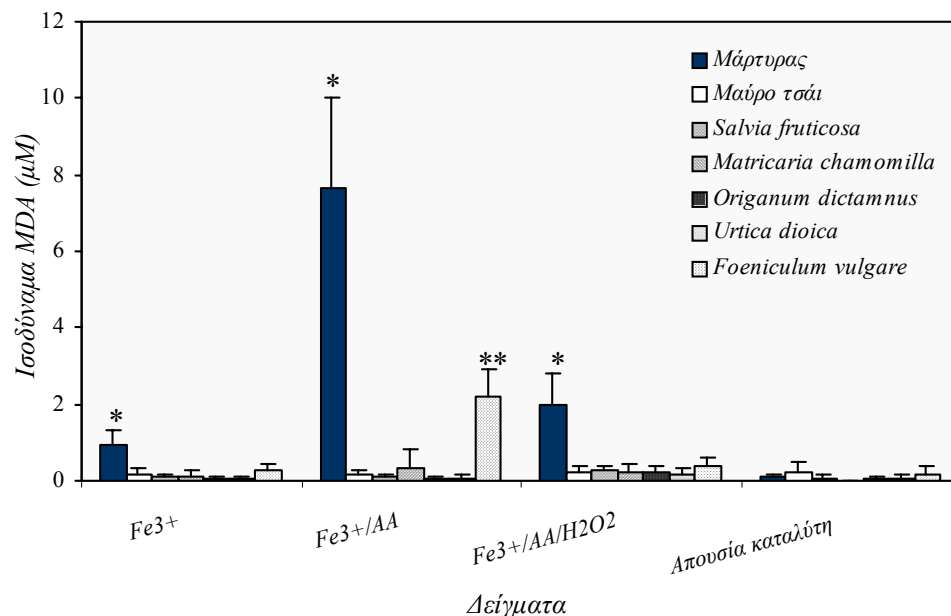
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Statistica, version 5.1. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ελέγχθηκαν με μονοδιάστατο σχεδιασμό (one-way) του ANOVA, LSD (Least Significant Differences) τεστ, σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %. Οι τιμές P της στατιστικής ανάλυσης βρίσκονται στο παράρτημα II του συγγράμματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων έναντι της οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος [18:2(9,12)].

Η συμπεριφορά των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών κάτω από καταλυόμενες συνθήκες οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος, οι οποίες περιλαμβάνουν την παρουσία των εκκινητών Fe^{3+} , Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ, Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2 και την απουσία αυτών, απεικονίζεται στο Σχήμα 1. Τα ιόντα του Fe^{3+} προστίθενται με τη μορφή του υδατοδιαλυτού συμπλόκου $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$.

Παρουσία του καταλύτη Fe^{3+} όλα τα εκχυλίσματα επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα, όπως υπέδειξε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ($P < 0.05$), ως προς το μάρτυρα (control). Ωστόσο, σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική δραστικότητα δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των εκχυλισμάτων ($P > 0.05$). Η παρουσία του ασκορβικού οξέος σε συνδυασμό με τον μεταλλικό καταλύτη αυξάνει σημαντικά την προοξειδωτική δραστικότητα του μάρτυρα ($P < 0.05$) όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Και σ' αυτή την περίπτωση, όμως, όλα τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα ($P < 0.05$) ως προς το μάρτυρα. Το εκχύλισμα του μάραθου (*Foeniculum vulgare*) επιδεικνύει ασθενέστερη αντιοξειδωτική δραστικότητα ($P < 0.05$) ως προς τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, τα οποία δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P > 0.05$). Κατά την εξαρτημένη από H_2O_2 οξείδωση του λινελαϊκού οξέος (αντίδραση Fenton), η εικόνα δεν μεταβάλλεται σημαντικά, καθώς όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστικότητα ως προς το μάρτυρα ($P < 0.05$), απουσία, όμως, διαφοροποίησης της μεταξύ τους αντιοξειδωτικής δραστικότητας ($P > 0.05$). Απουσία μεταλλικού καταλύτη δεν παρατηρείται σημαντική οξειδωτική ή αντιοξειδωτική δραστικότητα στα δείγματα ($P > 0.05$), όπως υποδεικνύει η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Είναι φανερό ότι η αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων των φυτών γίνεται εμφανής μόνο κάτω από καταλυόμενες συνθήκες οξείδωσης του λιπαρού υποστρώματος. Αυτό, πιθανώς, σημαίνει ότι η αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων των φυτών έναντι της οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος εστιάζεται περισσότερο στην παρεμπόδιση της δράσης του μεταλλικού καταλύτη.

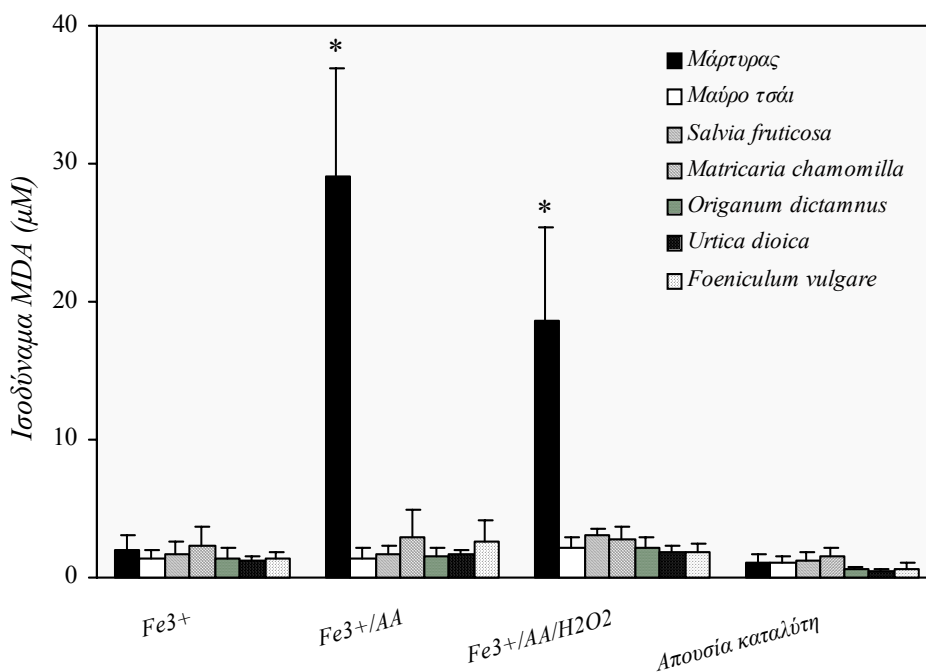


Σχήμα 1: Επίπεδα οξείδωσης (ισοδύναμα MDA σε μM) του λινελαϊκού οξέος παρουσία υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, μετά από επώασή τους με $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$, $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$ /ασκορβικό οξύ (AA), $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$ /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2 και την απουσία αυτών.

3.2. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων έναντι της οξείδωσης φωσφολιποειδών.

Η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών στην οξείδωση φωσφολιποειδών απομονωμένων από βόειο εγκέφαλο παρουσία Fe^{3+} , Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ, Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2 και την απουσία αυτών, απεικονίζεται στο Σχήμα 2. Τα ιόντα του Fe^{3+} προστίθενται με τη μορφή του υδατοδιαλυτού συμπλόκου $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$.

Παρουσία του καταλύτη Fe^{3+} ή απουσία καταλύτη, κανένα από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών δεν επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα, όπως υπέδειξε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ($P>0.05$) ως προς τους αντίστοιχους μάρτυρες. Η παρουσία ωστόσο του ασκορβικού οξέος διαφοροποιεί σημαντικά την κατάσταση, καθώς φαίνεται να ενισχύει σημαντικά την προοξειδωτική δραστηριότητα του καταλύτη ($P<0.05$) απουσία των εκχυλισμάτων. Έτσι στην περίπτωση αυτή, όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ($P<0.05$) ως προς το μάρτυρα, χωρίς να παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ τους ($P>0.05$). Αξιοσημείωτο εμφανίζεται το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα του μάραθου (*Foeniculum vulgare*) δεν εμφανίζει διαφοροποιημένη αντιοξειδωτική δράση, από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, όπως στην περίπτωση οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος. Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και κατά την οξείδωση των φωσφολιποειδών, υπό συνθήκες αντίδρασης Fenton (Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2), όπου όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν παρόμοια σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ($P<0.05$) ως προς το μάρτυρα.



3.3.

αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης.

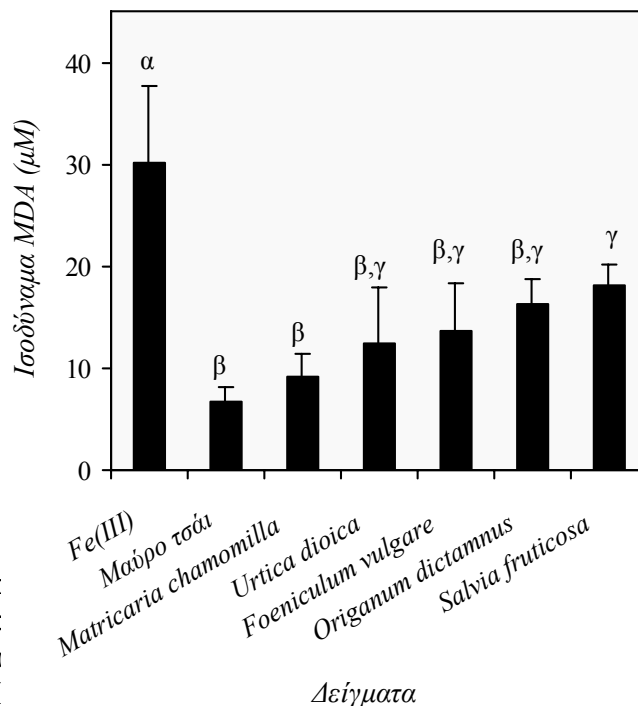
Σχήμα 2: Επίπεδα οξείδωσης (ισοδύναμα MDA σε μM) φωσφολιποειδών βόειου εγκέφαλου παρουσία υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, μετά από επώασή τους με $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$, $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$ /ασκορβικό οξύ (AA), $(NH_4)_5Fe(Cit)_2 \cdot 2H_2O$ /ασκορβικό οξύ (AA)/ H_2O_2 και απουσία αυτών.

Μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση πολλαπλών πειραμάτων ($3 < n < 9$).

Δείγματα σημασμένα με αστερίσκο διαφέρουν στατιστικά.

Η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών στην οξείδωση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης κάτω από συνθήκες αντίδρασης Fenton, (Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2), απεικονίζεται στο Σχήμα 3.

Όπως διακρίνεται από το Σχήμα 3, διαφορετική αντιοξειδωτική δραστηριότητα παρατηρείται από όλα τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών ($P < 0.05$), κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Μέγιστη αντιοξειδωτική δραστηριότητα επιδεικνύουν το μαύρο τσάι (*Lipton yellow label*) και το χαμομήλι (*Matricaria chamomila*) ($P < 0.05$), ακολουθούμενη από το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*). Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς το μάρτυρα ($P < 0.05$), ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση της αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας με την αντίστοιχη των εκχυλισμάτων μαύρου τσαγιού, χαμομηλιού και φασκόμηλου, όπως υποδεικνύει η στατιστική ανάλυση.



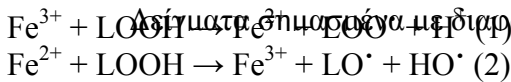
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ιόντα μεταβατικών λιπιδίων, στις οργανικές μεταβατικά μετά μεταλλικό ιόν.

μεταξύ των άλλων, συμμετοχή σε αντιδράσεις αποικοδόμησης υδροπυροξείδιων των λιπιδίων προς προϊόντα ριζών (αντιδράσεις 1 και 2), τα οποία συμμετέχουν στη διατήρηση αλυσίδων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, μετά από επόχληση τους με Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ/ H_2O_2 .

τιδράσεις οξείδωσης έρωων ριζών. Από τα ημενο προοξειδωτικό ρονίου, περιλαμβάνει

Μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση πολλαπλών πειραμάτων ($3 < n < 9$). Δείγματα σημασιολογικά μη διαφορετικά νοάγματα, διαφέρουν στατιστικά.



Σχήμα 1: Οξειδωτική αποικοδόμηση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, υποκινούμενη από ιόντα Fe^{2+} .

Ο σίδηρος ωστόσο, είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζεται από υδρολυτική αστάθεια και δυσδιαλυτότητα σε φυσιολογικό pH.^{90,91,92} Αδιάλυτα υδροξείδια του Fe^{2+} σχηματίζονται σε pH 5.5, ενώ αντίστοιχα του Fe^{3+} μόλις σε pH 2-3.⁹⁰ Ένας τρόπος διατήρησης του σιδήρου σε διαλυτή μορφή είναι η συμπλοκοποίησή του σε χηλικούς υποκαταστάτες. Μέσα χηλικοποίησης του σιδήρου έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε ανάλογες μελέτες, για την αποφυγή της υδρόλυσης και καθίζησης του σιδήρου. Στην παρούσα μελέτη εισήχθηκε για πρώτη φορά το σύμπλοκο $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{Cit})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, το οποίο παρέχει μία καλά ταυτοποιημένη πηγή διαλυτού και δραστικού Fe^{3+} , κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Έχει δείξει ότι ο Fe^{3+} στο σύμπλοκο $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{Cit})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ παραμένει διαλυτός σε υδατικά διαλύματα, στην κλίμακα του φυσιολογικού pH.⁸³ Η ιδιότητα αυτή αποτελεί πιθανώς ένα πλεονέκτημα έναντι άλλων μορφών διαλυτού σιδήρου, οι οποίες παρασκευάζονται *in situ* με προσθήκη ενός οργανικού χηλικοποιητή, καθώς έτσι ελαχιστοποιείται η πιθανότητα υδρόλυσης του σιδήρου κατά τη διάρκεια παρασκευής του συμπλόκου του με κατάλληλο υποκαταστάτη σε υψηλά pH.

Ένας μεγάλος αριθμός αρωματικών φυτών έχει μελετηθεί για την αντιμεταλλαξογόνο, αντιφλεγμονώδη, αντιφλογιστική, αντιπαρασιτική, και αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε βιολογικά συστήματα.^{93,94,95,96} Από τις ιδιότητες αυτές, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που επιδεικνύουν εκχυλίσματα από διάφορα τμήματα φυτών σε οργανικούς διαλύτες, έχει προσφέρει ενδείξεις για αποτελεσματικό συναγωνισμό με διαδικασίες σχετιζόμενες με το σχηματισμό των ROS και επακόλουθη καταστροφή βιολογικά σημαντικών μορίων. Ωστόσο, πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την αντιοξειδωτική δραστηριότητα υδατικών εκχυλισμάτων από διάφορα βότανα και αρωματικά φυτά, τα οποία καταναλώνονται ως αφεψήματα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δραστηριότητα πέντε αρωματικών φυτών που συναντώνται στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Η μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων, έναντι των αντίστοιχων οργανικών, επιλέχθηκε για να διαπιστωθεί πιθανή αντιοξειδωτική δραστηριότητα στα εκχυλίσματα που καταναλώνονται μέσω της διατροφής ή χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μέσα στην παραδοσιακή ιατρική. Στην προσπάθεια αναζήτησης αντιοξειδωτικών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν τρία υποστρώματα, γνωστά για την ευαισθησία τους έναντι οξειδώσεων μέσω παραγωγής και δράσης των ROS: α) το λινελαϊκό οξύ [18:2(9,12)], το οποίο αποτελεί ένα βιολογικά σημαντικό λιπαρό οξύ, β) φωσφολιποειδή απομονωμένα από οργανικό ιστό, και γ) η 2-δεοξυ-D-ριβόζη.

Άξια προσοχής εμφανίζεται η παρόμοια αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών έναντι της οξείδωσης των φωσφολιποειδών και του λινελαϊκού οξέος παρουσία των καταλυτικών συστημάτων Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ και $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ασκορβικό οξύ. Αναφορικά με τα υδατικά εκχυλίσματα, διαπιστώθηκε ότι υφίστανται μικρές διαφορές στην αντιοξειδωτική δραστηριότητά τους έναντι της οξείδωσης των προαναφερόμενων υποστρωμάτων. Οι διαφορές αυτές όμως, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P > 0.05$). Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος του μάραθου (*Foeniculum vulgare*), το οποίο εμφάνισε μικρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα ($P < 0.05$), ως προς τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, έναντι της καταλυτικής οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος από το σύστημα Fe^{3+} /ασκορβικό

οξύ. Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της οξειδωσης των φωσφολιποειδών όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα μεταξύ των εκχυλίσμάτων των αρωματικών φυτών. Ο λόγος για τη συμπεριφορά αυτή του εκχυλίσματος του μάραθου δεν είναι προς το παρόν σαφής. Στην περίπτωση της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς το μάρτυρα (control), η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με το εκχύλισμα που εξετάστηκε ($P < 0.05$).

Συγκρίνοντας τα επίπεδα οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος με τα αντίστοιχα των φωσφολιποειδών διαπιστώνεται μία διαφορά στην απόλυτη κλίμακά τους. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα οξειδωσης των φωσφολιποειδών εμφανίστηκαν υψηλότερα ως προς τα αντίστοιχα του λινολεϊκού οξέος. Το φαινόμενο αυτό, πιθανώς, να οφείλεται α) στο διαφορετικής φύσης υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και/ή β) στα διαφορετικά προϊόντα που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της οξειδωσης αυτών.^{21,26} Έχει, μάλιστα, αναφερθεί ότι η MDA, η οποία μετρείται με το TBA τεστ δεν αποτελεί το κύριο προϊόν οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος.²¹ Είναι, επίσης, γνωστό ότι ιόντα μεταβατικών μετάλλων, όπως αυτό του σιδήρου, καταλύουν την αποικοδόμηση των σχηματιζόμενων υπεροξειδίων των λιπιδίων παράγοντας ένα πλήθος προϊόντων.¹⁸ Η αντίδραση αυτή είναι πιο γρήγορη παρουσία ιόντων Fe^{2+} . Όταν τα κύτταρα καταστρέφονται, ευνοείται η οξειδωση των λιπιδίων και ο σχηματισμός λιπιδικών υπεροξειδίων στους ιστούς από την ενζυματική δράση της κυκλοξυγεννάσης και της λιποξυγεννάσης. Έτσι, τμήματα των μεμβρανών, τα οποία απομονώνονται από διάρρηξη κυττάρων, περιέχουν συνήθως υπεροξειδία λιπιδίων. Όταν ενώσεις του σιδήρου προστίθενται σε τέτοια τμήματα μεμβρανών, τα λιπιδικά υπεροξειδία αποικοδομούνται σχηματίζοντας υπεροξειδικές $LOO\cdot$ και αλκόξυ $LO\cdot$ ρίζες. Έτσι, η προσθήκη του μεταλλικού ιόντος διεγείρει την οξειδωση, μέσω αποικοδόμησης των προσχηματισμένων υπεροξειδίων σε ρίζες που συμμετέχουν στη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης.¹⁸ Παράλληλα, τα φωσφολιποειδή που απομονώνονται από οργανικούς ιστούς διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς και στο βαθμό ακορεστότητάς τους.^{19,97} Καθώς η ταχύτητα με την οποία προχωράει μία οξειδωση μέσω ελευθέρων ριζών εξαρτάται από το βαθμό ακορεστότητας του λιπαρού υποστρώματος,³⁰ η ύπαρξη περισσότερων από δύο συζυγείς διπλούς δεσμούς, σε κάποια από τα λιπαρά οξέα των φωσφολιποειδών, θα είναι ικανή να επιφέρει ανάλογη αύξηση στην ταχύτητα, με την οποία θα οξειδωθεί το υπόστρωμα κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η αύξηση αυτή στην ταχύτητα οξειδωσης έχει ως αποτέλεσμα ανάλογη αύξηση στα επίπεδα του μετρούμενου προϊόντος οξειδωσης. Συνεπώς, ποικίλοι παράγοντες, μεταξύ αυτών πολλοί άγνωστοι, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στα φαινομενικά αυξημένα επίπεδα οξειδωσης των φωσφολιποειδών ως προς τα αντίστοιχα του λινελαϊκού οξέος.

Στην περίπτωση των φωσφολιποειδών, η παρουσία ιόντων Fe^{3+} δεν φαίνεται να προκάλεσε σε μεγάλο βαθμό οξειδωση αυτών και κατά συνέπεια κανένα από τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών δεν εμφάνισε σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς το μάρτυρα, όπως υπέδειξε η στατιστική ανάλυση ($P > 0.05$). Η μικρού μεγέθους κατάλυση της οξειδωσης των φωσφολιποειδών από τα ιόντα Fe^{3+} διαπιστώνεται εξάλλου από τη σύγκριση των επιπέδων οξειδωσης με τα αντίστοιχα στο σύστημα οξειδωσης απουσία μεταλλικού καταλύτη, όπου παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί. Επίσης παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα οξειδωσης παρουσία Fe^{3+} και Fe^{3+} /ασκορβικού οξέος ή Fe^{3+}/H_2O_2 /ασκορβικού οξέος. Τα

προαναφερόμενα, συνηγορούν υπέρ της πιθανής έλλειψης καταλυτικής δράσης του Fe^{3+} , κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες οξείδωσης λιπιδίων.^{25,98} Παρόμοια συμπεριφορά, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος παρουσία του Fe^{3+} , όπου διαπιστώθηκε αντιοξειδωτική δραστηριότητα από τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών ως προς το μάρτυρα. Ωστόσο, και σ' αυτή την περίπτωση, η παρουσία ιόντων Fe^{3+} δεν προκάλεσε οξείδωση του λινελαϊκού οξέος σε επίπεδα παρόμοια με τα άλλα δύο καταλυτικά συστήματα. Η μειωμένη καταλυτική δράση του Fe^{3+} έναντι της οξείδωσης λιπιδίων, πιθανώς, αντανακλά την μικρότερη ταχύτητα αντίδρασης του ιόντος αυτού με σχηματιζόμενα υδρουπεροξειδία λιπιδίων, κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων ως προς την αντίστοιχη των ιόντων Fe^{2+} .¹⁸

Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των αρωματικών φυτών, έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων, ήταν περισσότερο εμφανής σε σχέση με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, έναντι της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, με τη χρησιμοποίηση αντίδρασης οξείδωσης τύπου Fenton. Στη περίπτωση οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών φαίνεται να επιδεικνύουν μικρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, σε σύγκριση με την αντίστοιχη έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων, ως προς το μάρτυρα. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων, πιθανώς, να οφείλεται στη φύση του υπό οξείδωση υποστρώματος και στο διαφορετικό μηχανισμό οξείδωσης μέσω ελευθέρων ριζών. Στην περίπτωση της οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, όλα τα συστατικά του συστήματος είναι υδατοδιαλυτά, ενώ στην περίπτωση οξείδωσης των λιπιδίων το υπόστρωμα είναι λιπόφιλο και ο μηχανισμός οξείδωσης πιθανώς διαφορετικός. Κατά την οξείδωση της 2-δεοξυ-D-ριβόζης, η παρόμοια διαλυτότητα υποστρώματος, αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών συστατικών επιτρέπει ισοδύναμη αλληλεπίδραση όλων αυτών με τις ρίζες υδροξυλίου HO^{\bullet} , που παράγονται κατά την αντίδραση του Fe^{2+} με το H_2O_2 . Έτσι, η 2-δεοξυ-D-ριβόζη συναγωνίζεται με τα αντιοξειδωτικά συστατικά για τις ρίζες υδροξυλίου HO^{\bullet} . Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται διαφοροποίηση στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων ανάλογα με την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών αυτών να απενεργοποιούν τη ρίζα υδροξυλίου HO^{\bullet} , πριν αυτή αλληλεπιδράσει με τη 2-δεοξυ-D-ριβόζη, ή να αδρανοποιούν το σίδηρο μέσω συμπλοκοποίησης. Στην περίπτωση ωστόσο της οξείδωσης των λιπιδίων, η δυνατότητα των παραγόμενων ριζών υδροξυλίου HO^{\bullet} να προσβάλλουν τη λιπιδική στοιβάδα πιθανώς να περιορίζεται αποτελεσματικά από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των εκχυλισμάτων, λόγω της υδροφιλικότητας των τελευταίων έναντι της λιπόφιλης φύσης του υποστρώματος. Επίσης είναι δυνατό ο σχηματισμός των ριζών υδροξυλίου HO^{\bullet} να εμποδίζεται λόγω συμπλοκοποίησης του σιδήρου στα αντιοξειδωτικά συστατικά.^{45,46,99}

Κατά τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας συστατικών δεν θα πρέπει να υποτιμάται ο μηχανισμός με τον οποίο οξειδώνεται ένα υπόστρωμα παρουσία ενός προοξειδωτικού μεταλλικού ιόντος. Για το λόγο αυτό, η εισαγωγή περισσότερων του ενός καταλυτικών συστημάτων για τη μελέτη πιθανής αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς συστατικών από φυσικά προϊόντα εμφανίζεται πολύ σημαντική, καθώς τα διαφορετικής φύσης ROS, που σχηματίζονται ανά περίπτωση, θα μπορούσαν να προσβάλλουν βιολογικώς σημαντικά υποστρώματα. Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών στην παρούσα εργασία υπέδειξε μία

σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα έναντι της οξείδωσης διαφορετικών υποστρωμάτων, με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών καταλυτικών συστημάτων. Το αποτέλεσμα αυτό, πιθανώς, υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των συστατικών των εκχυλισμάτων να αποτρέπουν το σχηματισμό ή να απενεργοποιούν τη δράση των ROS. Η παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως αυτών που συναντώνται στα αρωματικά φυτά που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή, θα μπορούσε να συμβάλει στην υπόδειξη διατροφικών προσεγγίσεων για την αποτροπή πιθανής εκδήλωσης χρόνιων νοσημάτων σχετικών με τη δράση των ROS. Περαιτέρω μελέτη της σύστασης και δράσης των συστατικών των εκχυλισμάτων αυτών για τη διασαφήνιση του μηχανισμού αντιοξειδωτικής δράσης τους, εμφανίζεται πολύ σημαντική.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα τα οποία μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα μελέτη μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

Υδατικά εκχυλίσματα δίκταμου (*Origanum dictamnus*), φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*), χαμομηλιού (*Matricaria chamomilla*), τσουκνίδας (*Urtica dioica*) και μάραθου (*Foeniculum vulgare*), από την περιοχή της Μεσογείου καθώς και του μαύρου τσαγιού (Lipton, yellow label), επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα έναντι της καταλύμενης από ιόντα σιδήρου, οξείδωσης λινελαϊκού οξέος, φωσφολιποειδών και 2-δεοξυ-D-ριβόζης.

Η διαφοροποιημένη αντιοξειδωτική και προοξειδωτική συμπεριφορά, η οποία παρατηρείται παρουσία διαφορετικών υποστρωμάτων και καταλυτικών συστημάτων, που περιλαμβάνουν ως πηγή σιδήρου το σύμπλοκο $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{Cit})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, υποδεικνύουν, πιθανώς, την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών σχηματισμού και δράσης των ROS.

Τα αποτελέσματα, τα οποία εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη, υποδεικνύουν την ύπαρξη αντιοξειδωτικών συστατικών, τα οποία είναι ικανά να προστατεύουν από οξειδώσεις, τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα υποστρώματα. Η υδατοδιαλυτή τους φύση, ωστόσο, πιθανώς τα καθιστά ενεργά αντιοξειδωτικά και *in vivo*, καθώς η φύση τους διευκολύνει τη μεταφορά και κυκλοφορία τους στα βιολογικά υγρά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΕΥΡΥΤΕΡΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Fe^{3+} , ΚΑΤΩ ΑΠΟ *IN VITRO* ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΜΙΜΟΥΝΤΑΙ ΤΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS) έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση χρόνιων παθήσεων και εκφυλιστικών ασθενειών.^{4,5,7,8,9} Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η εξουδετέρωσή τους από τη δράση του αμυντικού συστήματος του οργανισμού ενισχύεται σημαντικά από συστατικά, τα οποία λαμβάνονται μέσω της διατροφής.^{100,101,102,103,104} Η ωφέλιμη δράση των συστατικών αυτών έχει αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα που επιδεικνύουν η βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινολικές ενώσεις.^{5,42,70,71,72} Έχει δειχθεί επίσης, ότι υδατικά εκχυλίσματα διαφόρων ειδών τσαγιού επιδεικνύουν αντιμεταλλαξογόνο δράση *in vitro*^{93,105,106} και η κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με αντικαρκινογόνο δράση.^{107,108} Από την άλλη μεριά, ιόντα μεταβατικών μετάλλων έχουν ενοχοποιηθεί στην κατάλυση σχηματισμού ROS και, ως εκ τούτου, στην πρόκληση μεταβολικών δυσλειτουργιών και ασθενειών.^{5,109} Η παρουσία των μεταλλικών ιόντων στη διατροφή αναμφίβολα περιπλέκει τη μελέτη της δράσης των συστατικών που περιλαμβάνονται σ' αυτή. Είναι σημαντικό ωστόσο, να λαμβάνεται υπόψη η παρουσία τέτοιων μεταλλικών ιόντων στο βιολογικό περιβάλλον όπου δρουν. Στην περιοχή της Μεσογείου έχει παρατηρηθεί χαμηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιακές παθήσεις και καρκίνο.^{58,59,63,110} Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μεσογειακής διατροφής είναι η υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου και η ευρεία χρήση αρωματικών φυτών, ως αρτύματα ή εκχυλίσματα (π.χ. φασκόμηλο, δίκταμο, δενδρολίβανο, θυμάρι).^{58,59,62,63} Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς για την ευεργετική δράση των αρωματικών φυτών στην υγεία είναι η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα. Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι αρωματικά φυτά της Κρήτης επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε μοντέλα συστήματα.¹¹¹

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μοντέλων συστημάτων, στα οποία έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική δραστηριότητα διαφόρων εκχυλισμάτων τσαγιού, παρουσία του προοξειδωτικού μεταλλικού ιόντος του Fe^{3+} , σε συνθήκες αντίδρασης Fenton.^{105,112,113} Πολύ λίγες πληροφορίες ωστόσο, είναι διαθέσιμες σχετικά με τη συμπεριφορά συστημάτων α) που περιέχουν πηγές αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών συστατικών και β) υποβάλλονται σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που επικρατούν κατά την πέψη και απορρόφηση *in vivo*. Η γνώση της συμπεριφοράς τέτοιων συστημάτων είναι ουσιαστική για την κατανόηση της όποιας αναπτυσσόμενης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *in vivo*.

Ο σχεδιασμός *in vitro* μεθόδων προσδιορισμού της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου, οι οποίες μιμούνται στο βέλτιστο τις συνθήκες πέψης και απορρόφησης *in vivo*, έχει αποδειχθεί πολύπλοκος.¹¹⁴ Οι πρώτες προσπάθειες εστιάστηκαν σε απλά συστήματα για τον προσδιορισμό διαλυτότητας του σιδήρου, μετά από επώαση σε όξινα διαλύματα παρουσία ή όχι, ασκορβικού οξέος.⁹⁰ Παράλληλα, αναπτύχθηκαν περισσότερο πολύπλοκες τεχνικές προσδιορισμού της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου παρουσία και άλλων διατροφικών παραγόντων, οι οποίες περιλαμβάνουν τα διάφορα στάδια της

πέψης.^{115,116,117} Πρόσφατα, στις τεχνικές αυτές προστέθηκαν και κυτταρικές καλλιέργειες, παράλληλα με τα *in vitro* συστήματα πέψης, στα οποία μελετάται η απορρόφηση του σιδήρου από τα συγκεκριμένα κύτταρα.^{118,119} Τελευταία, αναπτύχθηκε παρόμοια μέθοδος για τη μέτρηση της βιοδιαθεσιμότητας καροτενοειδών, παρόντων στη διατροφή.¹²⁰ Στην παρούσα εργασία υιοθετήθηκε μία *in vitro* τεχνική, η οποία προσομοιάζει την πέψη και απορρόφηση *in vivo*¹¹⁷ με σκοπό να μελετηθεί η αντιοξειδωτική συμπεριφορά εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε σύστημα, το οποίο δίνει έμφαση: α) στη παρουσία του μεταλλικού ιόντος Fe^{3+} καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, προσεγγίζοντας έτσι καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες κατά τη λήψη τροφής β) στην παρουσία γαστρεντερικών ενζύμων και χολικών αλάτων γ) στις μεταβολές του pH, ανάλογες με αυτές που συμβαίνουν στη διάρκεια της πέψης *in vivo* και δ) στη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα, το οποίο αντιστοιχεί στο απορροφήσιμο κλάσμα *in vivo*.¹²¹ Το αποτέλεσμα που εξάγεται επηρεάζεται έτσι από όλους τους παράγοντες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστατικών των αρωματικών φυτών, του σιδήρου και των ενζύμων-χολικών αλάτων της πέψης, κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες pH.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό. Τα αρωματικά φυτά, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, συλλέχθηκαν από την περιοχή της Αγίας Ειρήνης του νομού Ηρακλείου¹ ή από την τοπική αγορά² και ταυτοποιήθηκαν από μέλη του Τομέα Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και Θαλάσσιας Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης. Το μαύρο τσάι (Lipton, yellow label) ήταν δωρεά της ΕΛΑΪΣ ΑΕ.

Κοινή ονομασία φυτού	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
¹ Φασκόμηλο	<i>Salvia fruticosa</i>	Labiatae
¹ Θυμάρι	<i>Coridothymus capitatus</i>	Labiatae
² Δίκταμο	<i>Origanum dictamnus</i>	Labiatae
² Μαύρο τσάι, Lipton yellow label	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae

Για την επώαση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης, σε θερμοκρασία 37 °C. Οι φασματοσκοπικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους (U-2001 Hitachi). Όλες οι αναμίξεις πραγματοποιήθηκαν σε αναμίκτη δίνης (vortex). Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή φυγοκέντρου (Labofuge 200, Heraeus).

2.1. ΥΛΙΚΑ

$FeCl_3$ 29.5 ppm Fe^{3+} σε HCl 0.01 M.
HCl 0.01 M και 0.2 M.

Ρυθμιστικό διάλυμα PIPES [δινάτριο άλας του πιπεραζινο-N,N'-δισ(2-αιθανοσουλφονικού οξέος)], 0.15 M σε H₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 6.1 ή 6.4, ανάλογα με την προσθήκη ή όχι των ενζύμων της πέψης στα δείγματα.

Ημιπερατές μεμβράνες M.W. cut-off 14 kDa, μήκος 25 cm και πλάτος 3 cm.

Διόρημα πεψίνης 4 g/100 mL HCl 0.1 M.

Διόρημα παγκρεατίνης και χολικών αλάτων 0.5 g και 3 g αντίστοιχα σε 250 mL NaHCO₃ 0.1 M.

Εκχυλίσματα αρωματικών φυτών 4 g/100 mL H₂O.

Διάλυμα (+)-κατεχίνης 0.28 g/100 mL H₂O.

Διάλυμα 2-δεοξυ-D-ριβόζης 168 mM σε H₂O.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 1.5 mM.

Διάλυμα H₂O₂ 12 mM σε H₂O.

Διάλυμα CCl₃COOH 2.8 % και 11.3 % σε H₂O.

Διάλυμα θειοβαρβιτουρικού οξέος 1 % σε NaOH 50 mM.

Διάλυμα 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίου 0.1 mM σε H₂O.

Διάλυμα CH₃COONH₄ 10 % σε H₂O.

Διάλυμα δινάτριου άλατος της 3-(2-πυριδιλο)-5,6-δισ(4-φαινυλοσουλφονικό οξύ)-1,2,4-τριαζίνης (ferrozine) 5 mg/mL σε H₂O.

1:1 DMF/ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONH₄ pH 3.4.

Διάλυμα H₂NCONH₂ 50% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONH₄ pH 3.4.

Διάλυμα αραβικού κόμματος 1 % σε H₂O.

Διάλυμα Fe₂(SO₄)₃ · (NH₄)₂SO₄ · 24H₂O 5 % σε HCl 1 M.

Διάλυμα Coomassie blue G-250 0.2 % w/v σε CH₃CH₂OH.

Διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline) 5.4 mM.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών

Ποσότητα 4 g κονιοποιημένου φυτού προστίθεται σε 100 mL νερού στο σημείο βρασμού και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού, το οποίο χρησιμοποιείται αμέσως στις αντίστοιχες πειραματικές διαδικασίες. Διάλυμα (+)-κατεχίνης παρασκευάζεται διαλύοντας 0.28 g (+)-κατεχίνης σε 100 mL H₂O στο σημείο βρασμού. Η ποσότητα της (+)-κατεχίνης που επιλέγεται, βασίζεται σε εκείνη των κατεχολικών παραγώγων που έχουν ταυτοποιηθεί στο μαύρο τσάι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.¹⁰⁶

2.2.2. Παρασκευή δειγμάτων

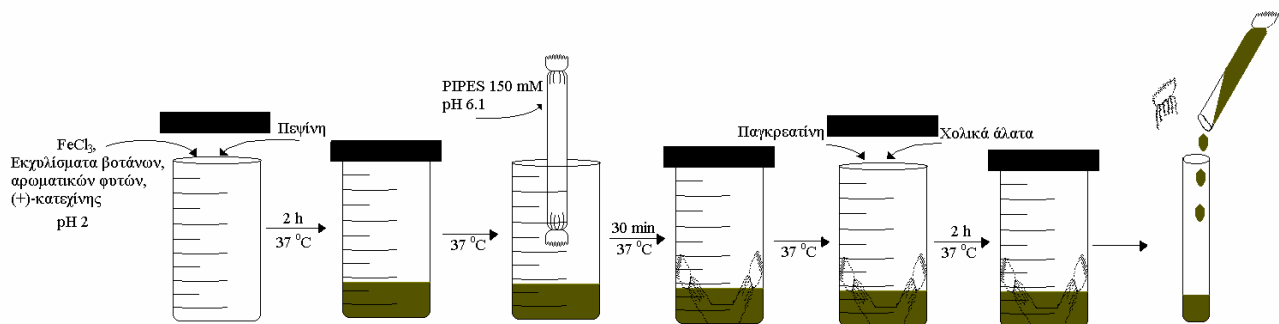
Όγκος 10 mL εκχυλίσματος αρωματικών φυτών ή διαλύματος (+)-κατεχίνης, αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος FeCl₃ 29.5 ppm σε Fe³⁺. Αντίστοιχοι μάρτυρες (controls) παρασκευάζονται με προσθήκη 10 mL H₂O σε ίσο όγκο διαλύματος FeCl₃ 29.5 ppm Fe³⁺ ή FeCl₃ (29.5 ppm Fe³⁺)/NTA 1:2 ή FeCl₃ (29.5 ppm Fe³⁺)/ασκορβικό οξύ 1:10, οι οποίοι θα αναφέρονται στη συνέχεια ως Fe(III), FeNTA και FeAA, αντίστοιχα.

2.2.3. Επώαση δειγμάτων κάτω από *in vitro* συνθήκες πέψης και απορρόφησης

Η επώαση περιλαμβάνει τρία πειραματικά στάδια. Το πρώτο στάδιο ακολουθεί το πρωτόκολλο επώασης.¹¹⁷ Το δεύτερο στάδιο ακολουθεί το πρωτόκολλο επώασης παρακάμπτοντας, όμως, την προσθήκη των ενζύμων της πέψης. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει επώαση των επιμέρους ενζύμων της πέψης και του μίγματος αυτών σύμφωνα με το πρωτόκολλο επώασης, απουσία των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης. Σε κάθε περίπτωση, το αναφερόμενο συστατικό είναι παρόν, ενώ τα υπόλοιπα αντικαθίστανται από το διαλύτη τους.

2.2.4. Πρωτόκολλο επώασης

Όλα τα δείγματα μεταφέρονται σε γυάλινο δοχείο επώασης των 120 mL και το pH ρυθμίζεται στο 2 με HCl. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 mL αιωρήματος πεψίνης (4 g/100 mL HCl). Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης, στους 37 °C, όπου επωάζονται για 2 ώρες. Στο τέλος του χρονικού αυτού διαστήματος και χωρίς διακοπή της επώασης, τοποθετείται σε κάθε δείγμα ημιπερατή μεμβράνη, η οποία περιέχει 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος PIPES 0.15 M σε pH 6.1 (ή pH 6.4 για τα δείγματα στα οποία δεν προστίθενται τα ένζυμα της πέψης). Η επώαση συνεχίζεται για άλλα 30 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 5 mL διαλύματος παγκρεατίνης και χολικών αλάτων (0.5 g και 3 g αντίστοιχα /250 mL NaHCO₃ 0.1 M) και η επώαση συνεχίζεται για 2 επιπρόσθετες ώρες. Στο τέλος της διαδικασίας, οι ημιπερατές μεμβράνες απομακρύνονται από τα δείγματα, πλένονται εξωτερικά με διπλά απιονισμένο νερό, και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετρείται το βάρος αυτών και το pH, ως ένδειξη καλής εξισορρόπησης των συγκεντρώσεων μεταξύ του εξωτερικού και του εσωτερικού περιεχομένου της ημιπερατής μεμβράνης. Ορίζουμε το διάλυμα που περιέχεται στην ημιπερατή μεμβράνη, το οποίο παραλαμβάνεται μετά την επώαση των δειγμάτων κάτω από *in vitro* συνθήκες πέψης και απορρόφησης, ως το χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα ενώσεων, που αντιστοιχεί στο αντίστοιχο απορροφήσιμο κλάσμα *in vivo*. Το απομένον εξωτερικά της μεμβράνης διάλυμα περιέχει τόσο το μεγάλο μοριακού βάρους κλάσμα ενώσεων όσο και το χαμηλού μοριακού βάρους κλάσμα ενώσεων, σε συγκέντρωση ίση με αυτήν του διαλύματος που περιέχεται εντός της ημιπερατής μεμβράνης. Τα παραπάνω περιγράφονται σχηματικά στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου επώασης δειγμάτων κάτω από *in vitro* συνθήκες οι οποίες μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό.

Η επώαση με πεψίνη αντιστοιχεί στη γαστρική φάση πέψης. Η περαιτέρω επώαση με παγκρεατίνη και χολικά άλατα αντιστοιχεί στην εντερική φάση της πέψης.

Κατά την προσομοίωση της εντερικής φάσης της πέψης, το pH ανέδραται

2.2.5. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δραστηριότητας έναντι της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης

Για το σκοπό της παρούσας ερευνητικής εργασίας τροποποιήθηκε κατάλληλα η αντίστοιχα αναφερόμενη βιβλιογραφικά μέθοδος.⁶⁵

Τα δείγματα προετοιμάζονται με ανάμιξη 1 mL του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος με 2-δεοξυ-D-ριβόζη, ασκορβικό οξύ, και H₂O₂ τελικής συγκέντρωσης 2.8 mM, 100 μM και 1 mM αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων είναι 1200 μL. Η ανάμιξη και η ακολουθούμενη επώαση πραγματοποιείται σε πωματισμένους σωλήνες καλλιέργειας. Αντίστοιχα τυφλά δείγματα παρασκευάζονται με αντικατάσταση του υποστρώματος και του οξειδωτικού συστήματος, από 200 μL H₂O. Όλα τα δείγματα και τα τυφλά τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης, στους 37 °C, και επωάζονται για μία ώρα. Ακολούθως, τα δείγματα απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και προστίθενται σε αυτά 1 mL τριχλωρο-οξικό οξύ 2.8 % (TCA) και 1 mL θειοβαρβιτουρικό οξύ 1 % σε NaOH 50 mM (TBA). Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου βράζουν στους 100 °C για 20 λεπτά. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, πραγματοποιείται συμπύκνωση δύο μορίων θειοβαρβιτουρικού οξέος με ένα μόριο μαλονυλδιαλδεϋδης (MDA: OHC-CH₂-CHO) και το προϊόν εκχυλίζεται σε 1200 μL 1-βουτανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στα 2,500 g και μετρείται η απορρόφηση της οργανικής στοιβάδας στα 534 nm με φασματοφωτόμετρο UV/Vis. Για τη διόρθωση του υποβάθρου αφαιρείται η απορρόφηση των τυφλών δειγμάτων. Η μετρούμενη απορρόφηση μετατρέπεται σε μονάδες συγκέντρωσης MDA με τη χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται από την αντίδραση συμπύκνωσης των παραγόμενων μορίων MDA, με θερμική διάσπαση του 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίου, με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) όπως αναφέρεται παραπάνω.

2.2.6. Ποσοτική ανάλυση ολικού διαλυτού σιδήρου

Ο προσδιορισμός του ολικού διαλυτού σιδήρου, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των δειγμάτων, ακολουθεί κατάλληλα τροποποιημένη μέθοδο για τις ανάγκες του πειράματος, όπως περιγράφεται ακολούθως.¹²²

Όγκος 1 mL διαλύματος το οποίο περιέχει HCl 0.2 M, TCA 11.3 %, CH₃COONH₄ 10 % και δινάτριο άλας της 3-(2-πυριδιλο)-5,6-δις(4-φαινυλοσουλφονικό οξύ)-1,2,4-τριαζίνης (ferrozine) 5 mg/mL, σε αναλογία όγκων 5:5:4:1, και ασκορβικό οξύ συγκέντρωσης 1.33 mg/mL, προστίθεται σε 1 mL χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος (αραιωμένου 1:2 με H₂O). Όταν καθίσταται αναγκαίο, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο UV/Vis στα 562 nm. Για τη διόρθωση του υποβάθρου, αφαιρείται η απορρόφηση δειγμάτων απουσία της ferrozine. Η συγκέντρωση του ολικού διαλυτού σιδήρου υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται πριν από κάθε μέτρηση με τη χρησιμοποίηση πρότυπου διαλύματος FeCl₃ 1020 ppm σε Fe³⁺ με κατάλληλες αραιώσεις. Ο ολικός διαλυτός σίδηρος, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα, εκφράζεται ως το % του ολικού προστιθέμενου σιδήρου:

$$\Delta-[Fe^{2+}+Fe^{3+}] = \frac{[Fe^{2+} + Fe^{3+}]_{\text{χαμηλού M.B.δ/τόκλασμα}}^2 (\mu\text{g/mL}) \times \text{ολικός όγκος}^3 (\text{mL})}{Fe^{3+}_{\text{στο αρχικό δείγμα}}^4 (\mu\text{g})} \times 100$$

¹ Ολικός διαλυτός σίδηρος (% του σιδήρου στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα)

² Συγκέντρωση ολικού σιδήρου στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα

³ Όγκος του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος + όγκος του απομείνοντος εξωτερικά διαλύματος

⁴ μg του Fe^{3+} που προστίθεται στο αρχικό δείγμα

2.2.7. Ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των δειγμάτων, πραγματοποιείται σύμφωνα με κατάλληλα τροποποιημένη βιβλιογραφική μέθοδο.¹²³

Όγκος 0.75 mL χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος αναμιγνύεται με 0.25 mL διαλύματος 1:1 DMF/ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 3.4. Σε όγκο 0.25 mL από το προκύπτον διάλυμα, προστίθεται 1 mL, από διάλυμα που παρασκευάζεται με ανάμιξη ουρίας 50% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 3.4, αραβικού κόμμεος 1 % σε H_2O και $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ 5 % σε HCl 1 M, σε αναλογία όγκων 89:10:1. Μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο UV/Vis στα 702 nm και 580 nm, για τον προσδιορισμό αντίστοιχα κατεχολικών και γαλλόυλο-παραγώγων στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα. Για τη διόρθωση του υποβάθρου αφαιρείται η απορρόφηση δειγμάτων, τα οποία περιέχουν ό,τι και τα προαναφερθέντα, με αντικατάσταση του διαλύματος του $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ από διάλυμα HCl 1 M. Η συγκέντρωση των κατεχολικών και γαλλόυλο-παραγώγων στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα (+)-κατεχίνης ή ταννικού οξέος, αντίστοιχα, και εκφράζεται ως ισοδύναμα (+)-κατεχίνης ή ταννικού οξέος σε μM .

2.2.8. Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνικών συστατικών

Η μέθοδος ποσοτικής ανάλυσης των πρωτεϊνικών συστατικών στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα βασίζεται σε βιβλιογραφική μέθοδο, με κατάλληλες τροποποιήσεις.¹²⁴

Σε 25 mL αιθανολικού διαλύματος Coomassie blue G-250 0.2 % w/v προστίθενται 50 mL H_3PO_4 85 % και 425 mL H_2O (διάλυμα Bradford). Όγκος 1 mL από το διάλυμα Bradford προστίθεται σε 200 μL χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος των δειγμάτων. Μετρείται η απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο UV/Vis στα 595 nm, με αφαίρεση της απορρόφησης του διαλύματος Bradford. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα, υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς, η οποία παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL, με κατάλληλες αραιώσεις, και εκφράζεται ως ισοδύναμα BSA σε $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2.9. Μοντέλο σύστημα οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης με Fe^{3+} , παρουσία μεμονωμένων ενζύμων της πέψης και μίγματος αυτών

Σε πωματισμένους σωλήνες καλλιέργειας προστίθενται 0.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος PIPES pH 6.1, διάλυμα FeCl_3 29.5 ppm, και αιώρημα των αντίστοιχων ενζύμων της πέψης, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σε Fe^{3+} να είναι 1 ppm και των

ενζύμων της πέψης η αντίστοιχη που χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο *in vitro* επώασης, κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό. Η διαδικασία οξειδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης που ακολουθείται, περιγράφεται στο τμήμα 2.2.5.

2.2.10. Μελέτη πιθανού σχηματισμού συμπλόκων σιδήρου με φαινολικά συστατικά στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους.

Λαμβάνεται το φάσμα ορατού/υπεριώδους στην περιοχή 350-800 nm των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων απουσία των ενζύμων της πέψης, μετά από διόρθωση του υποβάθρου με αντίστοιχα δείγματα τα οποία δεν περιέχουν σίδηρο. Επίσης λαμβάνεται το φάσμα ορατού/υπεριώδους διαλύματος $\text{Fe}^{3+}/(+)$ -κατεχίνης, σε μοριακή αναλογία 1:3, το οποίο έχει παρασκευαστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES 150 mM, pH=6.1, ώστε η συγκέντρωση του σιδήρου να είναι 2.8 μM . Στην περίπτωση αυτή η διόρθωση του υποβάθρου έχει γίνει με διάλυμα (+)-κατεχίνης απουσία Fe^{3+} . Η σταθερότητα του τελευταίου μελετάται σε pH 7.4 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 5.4 mM, λαμβάνοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα 10 ή 20 ή 30 λεπτών, το φάσμα ορατού/υπεριώδους στην περιοχή 200-800 nm και για συνολικό χρονικό διάστημα 210 λεπτών.

2.2.11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

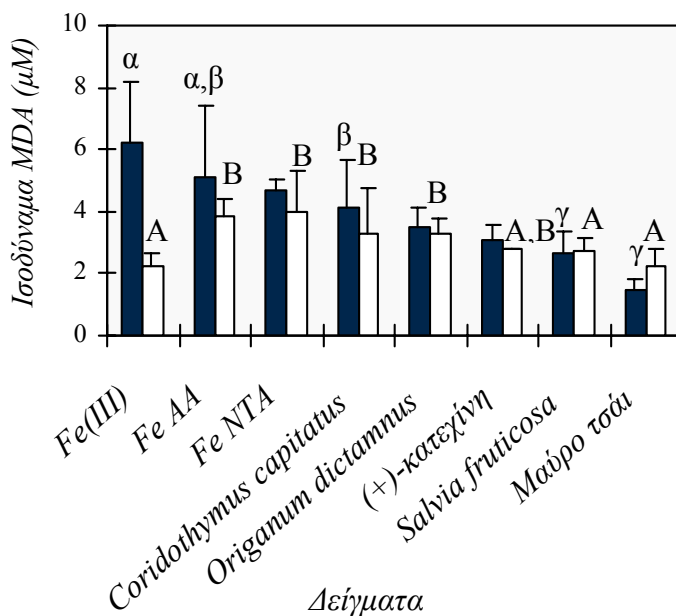
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Statistica, version 5.1, σύμφωνα με έναν 2x8 παραγοντικό σχεδιασμό. Παράγοντες που ελήφθησαν υπόψη στο σχεδιασμό ήταν: α) η απουσία ή παρουσία των ενζύμων της πέψης και β) τα δείγματα. Η αλληλεπίδραση των παραγόντων ελέγχθηκε με παραγοντική ανάλυση, σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων στην περίπτωση όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση, ελέγχθηκαν με δισδιάστατο σχεδιασμό (two-way) του ANOVA, LSD (Least Significant Differences) τεστ, σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %, ή με μονοδιάστατο σχεδιασμό (one-way) του ANOVA, LSD τεστ σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %, στην περίπτωση που παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση των παραγόντων. Μονοδιάστατος (one-way) σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε, επίσης, όπου δεν είναι παρόντες παράγοντες αλληλεπίδρασης. Στις μελέτες συσχέτισης, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων του ίδιου προγράμματος. Οι τιμές P της στατιστικής ανάλυσης βρίσκονται στο παράρτημα I του συγγράμματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλάσμάτων των εκχυλισμάτων

Η συμπεριφορά του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης έναντι της οξειδωτικής αποικοδόμησης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης μετά την επώασή τους κάτω από συνθήκες, οι οποίες μιμούνται την γαστρεντερική πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, περιγράφεται στο Σχήμα 1. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση ($P < 0.05$) των παραγόντων 'παρουσία των ενζύμων της πέψης' και 'απουσία των ενζύμων της πέψης', στην εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος των εκχυλισμάτων. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση των δειγμάτων, κάτω από *in vitro* συνθήκες προσομοίωσης της πέψης και απορρόφησης στον οργανισμό, επηρεάζει κατά διαφορετικό τρόπο την μετέπειτα αντιοξειδωτική/προοξειδωτική συμπεριφορά τους.

Απουσία των ενζύμων της πέψης, τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*) και του μαύρου τσαγιού (Lipton yellow label) διαφέρουν στατιστικά ($P < 0.05$) από τους μάρτυρες (controls) Fe(III), FeAA και FeNTA, εμφανίζοντας αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σχέση με αυτούς. Τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα του θυμαριού (*Coridothymus capitatus*), δίκταμου (*Origanum dictamnus*) και (+)-κατεχίνης διαφέρουν στατιστικά ($P < 0.05$) από το μάρτυρα Fe(III), επιδεικνύοντας έτσι αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς το μάρτυρα αυτό. Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παραπάνω και των μαρτύρων FeAA και FeNTA, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί τόσο στην πιθανή διαφοροποίηση της ενεργής τους σύστασης, σε σχέση με το φασκόμηλο και το μαύρο τσάι, όσο και στην παρατηρούμενη σχετικά μεγάλη τυπική απόκλιση σε μερικά από τα δείγματα, η οποία δεν επιτρέπει την ανίχνευση τυχόν σημαντικών διαφορών κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όταν οι απόλυτες τιμές είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη.



Σχήμα 1: Επίπεδα οξειδωσης (ισοδύναμα MDA σε μM) στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και (+)-κατεχίνης, μετά από επώασή τους με Fe^{3+} , κάτω από συνθήκες που μιμούνται

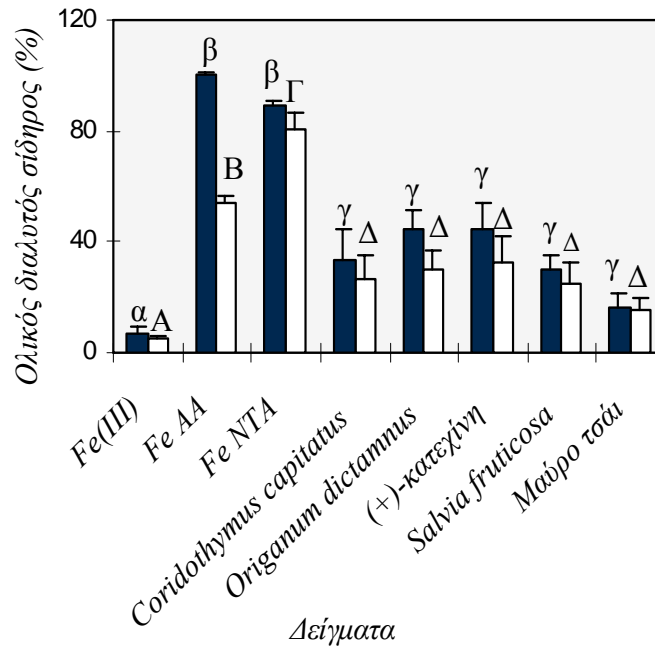
Παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση, τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου και του μαύρου τσαγιού βρέθηκαν να διαφέρουν στατιστικά ($P < 0.05$) από τους μάρτυρες FeAA και FeNTA, επιδεικνύοντας σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς αυτά. Η αντιοξειδωτική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων αυτών εμφανίζεται παρόμοια απουσία και παρουσία των ενζύμων της πέψης. Το ίδιο παρατηρείται και στα υπόλοιπα εκχυλίσματα, τα οποία, ωστόσο, δεν εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ($P > 0.05$), ως προς τους μάρτυρες, παρουσία των ενζύμων της πέψης. Σημαντική διαφοροποίηση στην οξειδωτική συμπεριφορά του μάρτυρα Fe(III) παρατηρείται παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση. Η μικρότερη οξειδωτική δράση του μάρτυρα Fe(III), παρουσία των ενζύμων, αντανακλά την πιθανή επίδραση που έχουν αυτά στην αναφερόμενη δράση. Αξιοσημείωτη, επίσης, είναι η συμπεριφορά του μάρτυρα FeAA. Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ επιδεικνύει αντιοξειδωτική ή προοξειδωτική συμπεριφορά, ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες πειραματικές συνθήκες.^{125,126,127,128,129} Κάτω από τις συγκεκριμένες όμως πειραματικές συνθήκες, η μή-ισοδύναμη περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο, στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των τριών μαρτύρων, όπως περιγράφεται παρακάτω, δεν επιτρέπει την διασαφήνιση της δράσης του ασκορβικού οξέος, καθώς δεν είναι γνωστή η σχέση μεταξύ προοξειδωτικής/αντιοξειδωτικής δράσης και συγκέντρωσης σιδήρου παρουσία ασκορβικού οξέος κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Αν και η περιεκτικότητα σε σίδηρο των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των τριών μαρτύρων διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους, όπως αναφέρεται παρακάτω, ανάλογη διαφοροποίηση δεν παρατηρείται στη οξειδωτική τους δραστηριότητα. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει μία πιθανή αντιοξειδωτική δραστηριότητα από το ασκορβικό οξύ.

3.2. Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε ολικό διαλυτό σίδηρο.

Στα πλαίσια της *in vitro* επώασης των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης, κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, μετρήθηκε η περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε ολικό διαλυτό σίδηρο. Ο αναφερόμενος ολικός σίδηρος αντιπροσωπεύει όλες τις μορφές διαλυτού σιδήρου (Fe^{3+} , Fe^{2+}), που απαντώνται στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών φαίνεται στο Σχήμα 2. Όπως και στην περίπτωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, η στατιστική ανάλυση υπέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση των παραγόντων 'παρουσία' και 'απουσία των ενζύμων της πέψης', όσον αφορά την περιεκτικότητα του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος των εκχυλισμάτων σε ολικό διαλυτό σίδηρο.

Απουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση των δειγμάτων, οι μάρτυρες FeAA και FeNTA εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ολικού διαλυτού σιδήρου ($P < 0.05$) ως προς το μάρτυρα Fe(III). Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στην παρουσία του ασκορβικού οξέος και του NTA, ενώσεις οι οποίες είναι γνωστές για την ικανότητά τους να διατηρούν το σίδηρο σε διαλυτή μορφή.^{117,130,131} Ο ολικός διαλυτός σίδηρος, στα

χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα όλων των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά ($P < 0.05$) από τους τρεις μάρτυρες. Ειδικότερα, τα επίπεδα του ολικού διαλυτού σιδήρου στα εκχυλίσματα, βρέθηκαν υψηλότερα ως προς το μάρτυρα Fe(III) και χαμηλότερα ως προς τα αντίστοιχα FeAA και FeNTA. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη παρουσίας χηλικοποιητών του σιδήρου στα εκχυλίσματα, οι οποίοι μπορούν ως ένα βαθμό να διατηρήσουν τη διαλυτότητα του σιδήρου, όχι όμως στον ίδιο βαθμό με το ασκορβικό οξύ και το NTA.

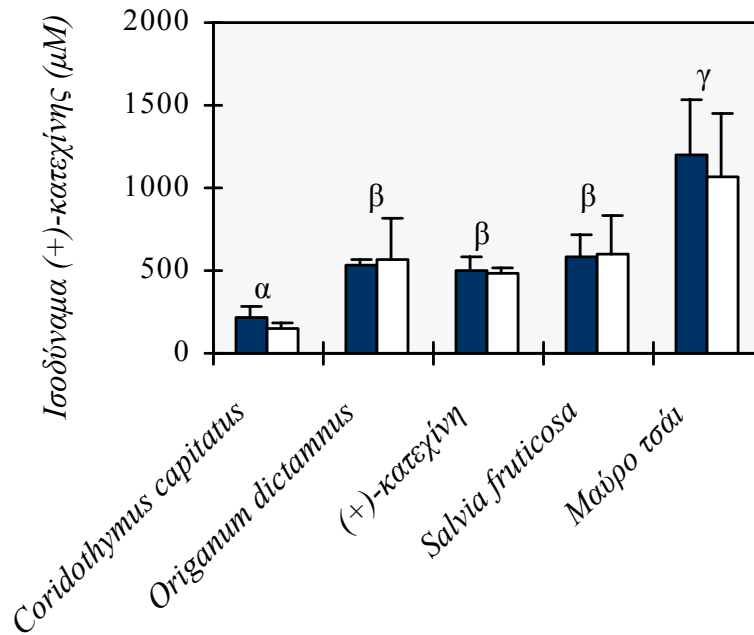


Η ίδια εικόνα δια
 που παρατηρείται
Σχήμα 2: Ολικός διαλυτός σίδηρος (%) στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των αρωματικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και (+)-κατεχίνης, μετά από επώαση τους με Fe^{2+} κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και περίπου 50 % μείωση στον ολικό διαλυτό σίδηρο του μάρτυρα FeAA, παρουσία των απορρόφηση στον οργανισμό, απουσία (■) και παρουσία (□) των ενζύμων της πέψης. Στην περίπτωση αυτή, η παρουσία των ενζύμων της πέψης διαφοροποιεί τη διαλυτότητα του σιδήρου, επηρεάζοντας έτσι την περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα του μάρτυρα FeAA.

3.3. Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε πολυφαινόλες.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, υπολογίστηκε και η περιεκτικότητα του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης, σε πολυφαινόλες κατεχολικών παραγώγων, μετά την *in vitro* επώαση τους, κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 3. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπέδειξε απουσία σημαντικής αλληλεπίδρασης ($P > 0.05$) των παραγόντων 'παρουσία των ενζύμων της πέψης' και 'απουσία των ενζύμων της πέψης', όσον αφορά την περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε πολυφαινόλες. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση των δειγμάτων

επηρεάζει κατά τον ίδιο τρόπο ή δεν επηρεάζει καθόλου τη συγκέντρωση των πολυφαινολών. Τόσο παρουσία όσο και απουσία των ενζύμων της πέψης, οι μετρήσεις της συγκέντρωσης των πολυφαινολών ακολουθούν παρόμοια συμπεριφορά. Ειδικότερα, το χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα του εκχυλίσματος θυμαριού εμφάνισε τη μικρότερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες κατεχολικών παραγώγων, ενώ το αντίστοιχο του μαύρου τσαγιού τη μεγαλύτερη. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών κατεχολικών παραγώγων στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων φασκόμηλου, δίκταμου και (+)-κατεχίνης βρέθηκε να μην διαφέρει σημαντικά ($P>0.05$) μεταξύ τους, ενώ διαφέρει σημαντικά ($P<0.05$) σε σχέση με την αντίστοιχη των εκχυλισμάτων θυμαριού και μαύρου τσαγιού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κανένα από τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων εκτός από αυτό του μαύρου τσαγιού δεν περιείχαν πολυφαινόλες γαλλόυλο-παραγώγων. Το χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα του εκχυλίσματος του μαύρου τσαγιού βρέθηκε να περιέχει πολυφαινόλες, τόσο κατεχολικών όσο και γαλλόυλο-παραγώγων.



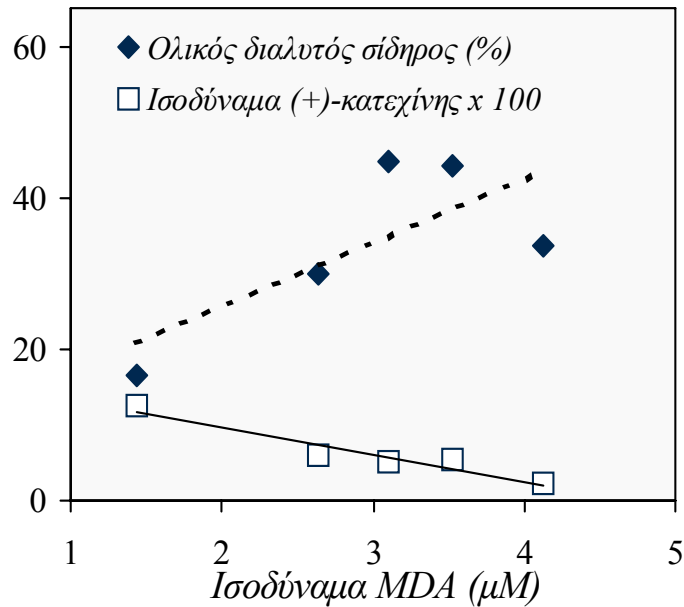
3.4. Συσχέτιση περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες χαμηλού μοριακού βάρους

Δείγματα

Περιεκτικότητα των δειγμάτων σε οξύ σίδηρο και οξύ ασβέστιο

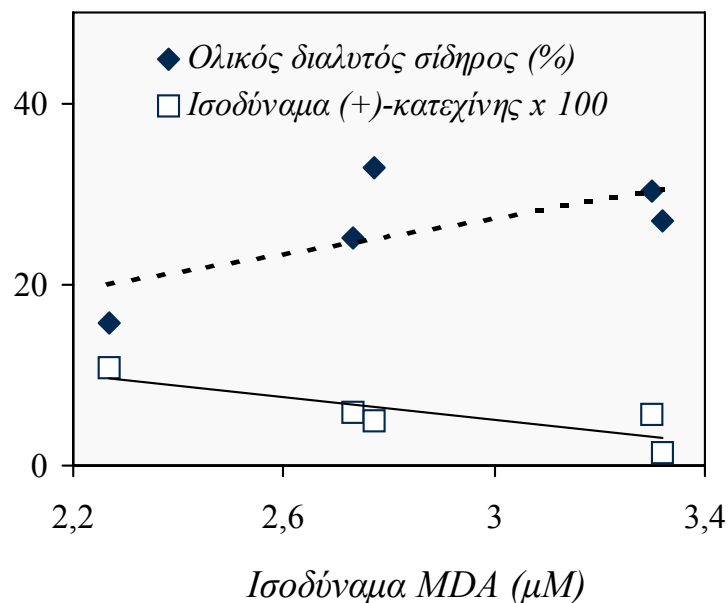
Σχήμα 3: Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (ισοδύναμα (+)-κατεχίνης σε μM) στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και (+)-κατεχίνης, μετά από επώαση τους με Fe^{2+} κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, παρουσία (■) και απουσία (□) των ενζύμων της πέψης. Ειδικότερα, παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση των εκχυλισμάτων κάτω από *in vitro* συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, εμφανίστηκε γραμμική εξάρτηση ($P<0.05$) των επιπέδων της οξειδωσιμότητας από την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κατεχολικών παραγώγων στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και (+)-κατεχίνης, μετά από επώαση τους με Fe^{2+} κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, παρουσία (■) και απουσία (□) των ενζύμων της πέψης. Μέσοι όροι \pm τυπική αποκλίση πολλαπλών πειραμάτων ($2 < n < 4$).

βάρους διαλυτό κλάσμα. Απόκλιση, ωστόσο, από τη γραμμικότητα παρατηρείται ($P>0.05$) μεταξύ των επιπέδων οξείδωσης και της περιεκτικότητας σε ολικό διαλυτό σίδηρο στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα. Η παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση των εκχυλισμάτων διαφοροποιεί την κατάσταση, καθώς δεν παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση ($P>0.05$) μεταξύ των επιπέδων οξείδωσης και της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες κατεχολικών παραγώγων ή ολικό διαλυτό σίδηρο.

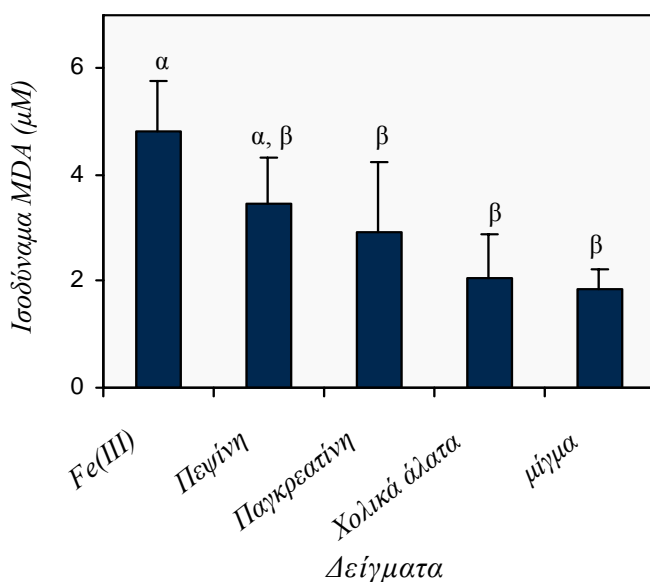


Σχήμα 4: Συσχέτιση επιπέδων οξείδωσης με τον ολικό διαλυτό σίδηρο και την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης, μετά από επώασή τους με Fe^{3+} , κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, απουσία των ενζύμων της πέψης.

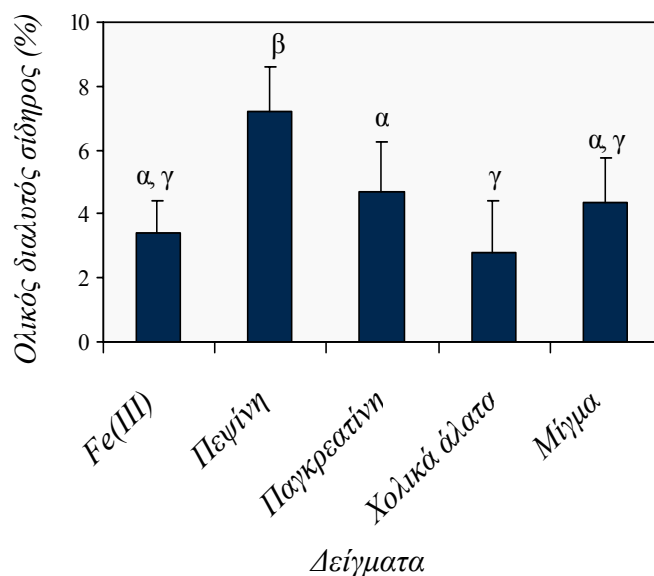
Τα επίπεδα οξείδωσης συσχετίζονται στατιστικά ($P<0.05$) με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ($R^2 \cong 0.92$), αλλά όχι ($P>0.05$) με τον ολικό διαλυτό σίδηρο ($R^2 \cong 0.54$).



Σχήμα 5: Συσχέτιση επιπέδων οξειδωτικής με τον ολικό διαλυτό σίδηρο και την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλάσματος των εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και της (+)-κατεχίνης, μετά από επώασή τους με Fe^{3+} του σιδήρου ελεγχόμε στο μάρτυρα Fe(III), καθώς παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($P < 0.05$) στην προσξειδωτική δραστηριότητα του σιδήρου παρουσία των ενζύμων της πένης. Τα επίπεδα οξειδωτικής δραστηριότητας δεν συσχετίζονται στατιστικά ($P > 0.05$) με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ($R^2 = 0.70$) και τον ολικό διαλυτό σίδηρο ($R^2 = 0.46$) *in vitro* συνθήκες που αμμονιά την πένη και απορρόφησή στον οργανισμό παρουσία μεμονωμένων ενζύμων της πένης, αλλά και του μίγματός τους, προκειμένου να εξεταστεί αν και ποια από τα ένζυμα είναι δυνατό να επηρεάσουν την οξειδωτική δραστηριότητα του σιδήρου κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η επίδραση των ενζύμων της πένης στην προσξειδωτική δραστηριότητα του σιδήρου στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα, απεικονίζεται στο Σχήμα 6. Παρατηρήθηκε σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ($P < 0.05$) από την παγκρεατίνη και τα χολικά άλατα, σε σχέση με το μάρτυρα Fe(III), που στην περίπτωση αυτή είχε επωαστεί απουσία των ενζύμων της πένης. Η συμπεριφορά, ωστόσο, της πεψίνης δεν ήταν ξεκάθαρη. Ανάλογα σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα εμφάνισε και το μίγμα των τριών ενζύμων της πένης.



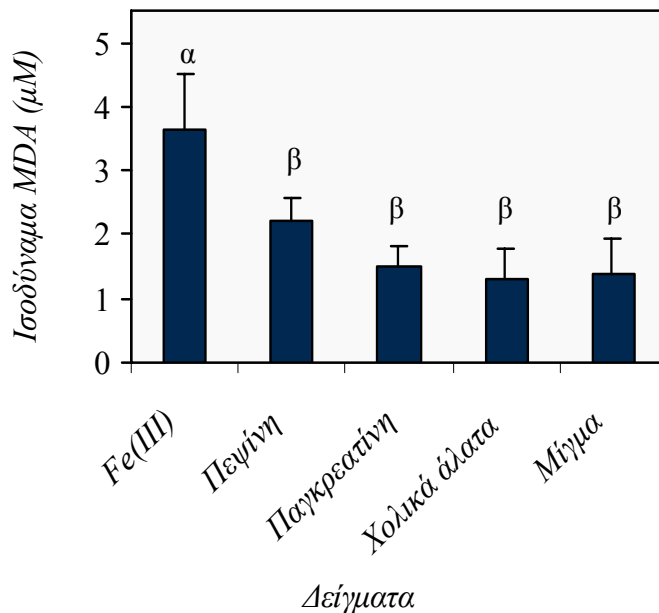
Στα πλαίσια της ίδιας μελέτης μετρήθηκε και ο ολικός διαλυτός σίδηρος στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 7. Ο μάρτυρας Fe(III) εμφανίστηκε να περιέχει μικρότερο ποσοστό σε ολικό διαλυτό σίδηρο μόνο σε σχέση με το δείγμα της πεψίνης ($P < 0.05$). Διαφορές στον ολικό διαλυτό σίδηρο, δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των υπολοίπων δειγμάτων και του μάρτυρα Fe(III). Αν και η στατιστική ανάλυση δεν ήταν ξεκάθαρη, ο ολικός διαλυτός σίδηρος, στο δείγμα των χολικών αλάτων, φαίνεται να διαφέρει από τον αντίστοιχο της παγκρεατίνης και της πεψίνης ($P < 0.05$). Αντίστοιχα, ο ολικός διαλυτός σίδηρος, στο δείγμα της παγκρεατίνης, διαφέρει στατιστικά ($P < 0.05$) από τον αντίστοιχο της πεψίνης. Καθώς η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υποδεικνύει σημαντικές διαφορές στο ποσοστό του ολικού διαλυτού σιδήρου μεταξύ των δειγμάτων, κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί η συμπεριφορά των ενζύμων της πέψης σε απλά συστήματα τα οποία δεν περιλαμβάνουν συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό. Καθώς η μελέτη που περιγράφεται στο σημείο αυτό αποσκοπεί στη διευκρίνιση της επίδρασης των ενζύμων της πέψης στην προοξειδωτική συμπεριφορά του σιδήρου στο μάρτυρα Fe(III), επιβάλλεται η χρησιμοποίηση περισσότερο ελεγχόμενων συνθηκών, όπου η συγκέντρωση του σιδήρου παρόντος κατά τη διάρκεια της οξείδωσης να είναι σταθερή. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο σειρών πειραμάτων θα οδηγήσει σε περισσότερο ασφαλή συμπεράσματα. Τα επίπεδα οξείδωσης σε μοντέλα δείγματα υπό την παρουσία $[Fe^{3+}] = 1 \text{ ppm}$ απεικονίζονται στο Σχήμα 8. Η παρουσία μεμονωμένων ενζύμων της πέψης, καθώς και του μίγματος αυτών, επηρεάζει σημαντικά ($P < 0.05$) την προοξειδωτική συμπεριφορά του σιδήρου στο μάρτυρα Fe(III), μειώνοντάς την. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο σειρών πειραμάτων υποδεικνύει πολύ παρόμοια συμπεριφορά των ενζύμων της πέψης κάτω από εντελώς διαφορετικές συνθήκες επώασης, ενισχύοντας την άποψη της επίδρασής τους στην προοξειδωτική συμπεριφορά του σιδήρου.



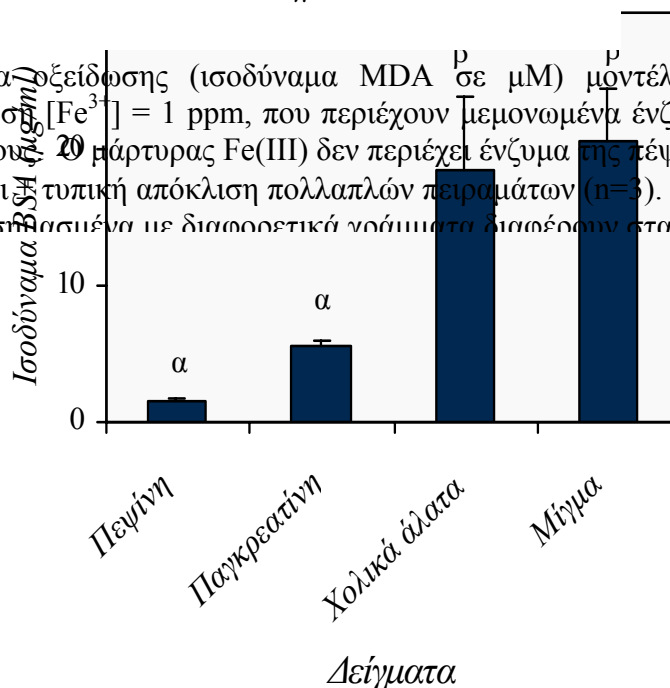
Σχήμα 7: Ολικός διαλυτός σίδηρος στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα δειγμάτων, μετά από επώαση μεμονωμένων ενζύμων της πέψης και του μίγματός τους με Fe^{3+} , κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό. Το δείγμα Fe(III) επωάζεται απουσία των ενζύμων της πέψης και

3.6. Περιεκτικότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων σε πρωτεϊνικά συστατικά

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών συστατικών στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των δειγμάτων, παρουσία μεμονωμένων ενζύμων της πέψης και του μίγματός τους. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών συστατικών εκφράζεται σε ισοδύναμα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) σε $\mu\text{g/mL}$. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 9. Όπως προκύπτει από το σχήμα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) στα ισοδύναμα BSA μεταξύ των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων της πεψίνης και παγκρεατίνης, καθώς και μεταξύ αυτών των χολικών αλάτων και του μίγματος των ενζύμων. Παρατηρήθηκε ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στα ισοδύναμα BSA μεταξύ των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων της πεψίνης και της παγκρεατίνης, με τα αντίστοιχα των χολικών αλάτων και του μίγματος των ενζύμων της πέψης. Τα χολικά άλατα και το μίγμα των ενζύμων της πέψης περιείχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνικών συστατικών στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα.

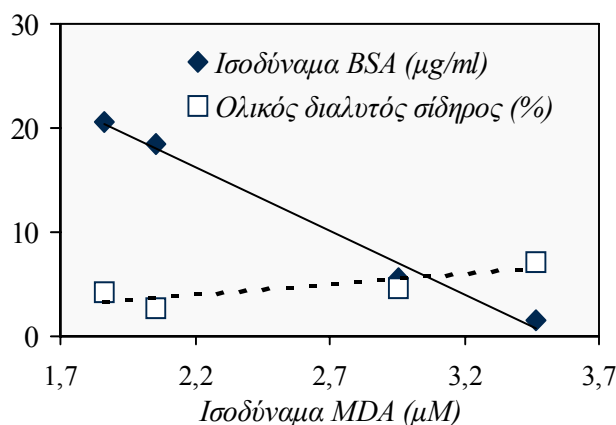


Σχήμα 8: Επίπεδα οξειδωσης (ισοδύναμα MDA σε μM) μοντέλων δειγμάτων με συγκέντρωση $[\text{Fe}^{3+}] = 1 \text{ ppm}$, που περιέχουν μεμονωμένα ένζυμα της πέψης και το μίγμα τους. Ο δείκτης Fe(III) δεν περιέχει ένζυμα της πέψης. Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση πολλαπλών πειραμάτων ($n=3$). Δείγματα στατισμένα με διαφορετικά γράμματα διαφόρων στατιστικά



3.7. Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των ενζύμων της πέψης, στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα, με την περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο και πρωτεϊνικά συστατικά

Τέλος μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και περιεκτικότητας σε πρωτεϊνικά συστατικά και ολικό διαλυτό σίδηρο, στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα, η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 10. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπέδειξε γραμμική εξάρτηση ($P < 0.05$) των επιπέδων της οξείδωσης από την περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικά συστατικά στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα. Απόκλιση, ωστόσο, από τη γραμμικότητα παρατηρείται ($P > 0.05$) μεταξύ των επιπέδων οξείδωσης και της περιεκτικότητας σε ολικό διαλυτό σίδηρο στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα.



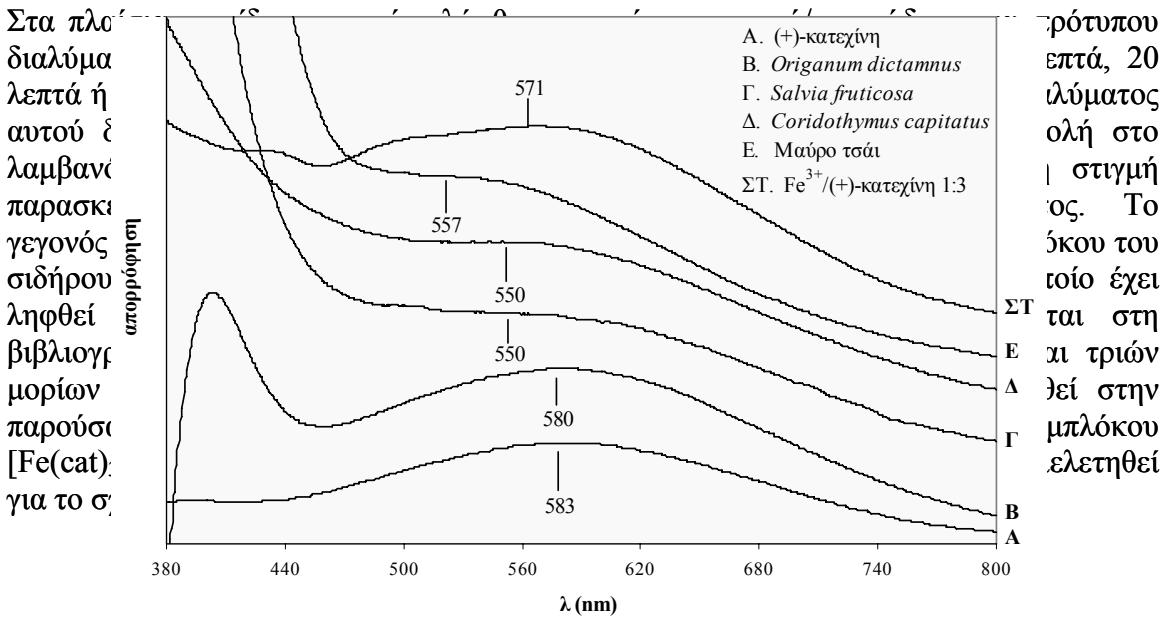
Σχήμα 10: Συσχέτιση οξείδωσης με τον ολικό διαλυτό σίδηρο και την περιεκτικότητα σε

πρωτεϊνικά συστατικά στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα δειγμάτων, μετά από εκπόση μεμονωμένων ενζύμων της πέψης και του κλασμάτων των εκχυλισμάτων με Fe^{3+} , κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και

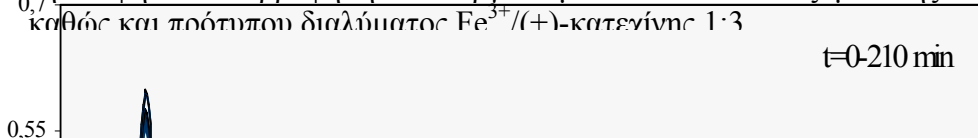
Έχει προταθεί ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά σε καταλλόμενες αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, όχι με την απενεργοποιώντας τις παραγόμενες από το σύστημα ελεύθερες ρίζες, αλλά και συμπλοκοποιώντας τους μεταλλικούς καταλύτες. Οι περισσότερες πολυφαινολικές ενώσεις είναι υποκατεστημένες με ομάδες υδροξυλίου σε *o*-θέση μεταξύ τους. Ο κατεχολικού τύπου δομικός σχηματισμός των πολυφαινολικών ενώσεων δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού σταθερών συμπλόκων με μεταλλοϊόντα όπως ο σίδηρος. Κατεχολικά σύμπλοκα του $Fe(III)$ οκταεδρικής συμμετρίας είναι γνωστά στη βιβλιογραφία με χαρακτηριστικό παράδειγμα το σύμπλοκο $[Fe(cat)_3]^{3-}$, το οποίο έχει χαρακτηριστεί και κρυσταλλογραφικά.¹³² Άλλωστε, η δομική μονάδα της κατεχόλης χρησιμοποιείται και από διάφορα βακτήρια ως σιδηροφόρα ομάδα για τη μεταφορά και χρησιμοποίηση του σιδήρου από τους οργανισμούς αυτούς.¹³³ Δεν είναι παράλογο,

λοιπόν, να αναμένεται μία ικανότητα των πολυφαινολών να συμπλοκοποιούν ιόντα σιδήρου.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής μελετήθηκε το φάσμα απορρόφησης στο ορατό/υπεριώδες των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων και έγινε η σύγκριση αυτών με το αντίστοιχο πρότυπα παρασκευασμένου διαλύματος $Fe^{3+}/(+)$ -κατεχίνης, σε μοριακή αναλογία 1:3. Τα φάσματα φαίνονται στο Σχήμα 11, όπου και σημειώνονται τα αντίστοιχα μέγιστα στις ταινίες απορρόφησης που παρατηρούνται για κάθε χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα. Οι ευρείες αυτές ταινίες απορρόφησης αντιστοιχούν σε ταινίες μεταφοράς φορτίου από τους υποκαταστάτες προς το ιόν του σιδήρου (LMCT) και οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις που συμβαίνουν σ' αυτή την περίπτωση είναι οι $\pi \rightarrow d_{\pi}$. Τα μέγιστα στις ταινίες μεταφοράς φορτίου περιορίζονται στην περιοχή 550 nm-590 nm. Η μετατόπιση στο μέγιστο της ταινίας μεταφοράς φορτίου οφείλεται σε διαφορετική φύση των υποκαταστατών. Είναι φανερή η ομοιότητα μεταξύ των φασμάτων των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων των φυτών και του πρότυπου διαλύματος $Fe^{3+}/(+)$ -κατεχίνης 1:3, υποδεικνύοντας μία πιθανή ομοιότητα στις οντότητες στις οποίες οφείλεται η μορφή του ηλεκτρονικού φάσματος. Οι οντότητες αυτές πιθανώς αποτελούνται από οκταεδρικά σύμπλοκα του σιδήρου με τρία μόρια κατεχολικού τύπου.



Σχήμα 11: Φάσμα απορρόφησης στο ορατό/υπεριώδες των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών και (+)-κατεχίνης μετά από επώασή τους κάτω από συνθήκες που μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό απουσία των ενζύμων της πέψης⁷⁰ καθώς και πρότυπου διαλύματος $Fe^{3+}/(+)$ -κατεχίνης 1:3



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που επιδεικνύουν εκχυλίσματα φυτών σε απλά μοντέλα συστήματα. Παρ' όλο που οι πληροφορίες που λαμβάνονται είναι σημαντικές, πολύ λίγες, ωστόσο, είναι διαθέσιμες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα και τη συμπεριφορά *in vivo*, των συστατικών των εκχυλισμάτων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του εκχυλίσματος. Το *in vitro* μοντέλο επώασης, κάτω από συνθήκες που μιμούνται τη γαστρεντερική πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικών με την αντιοξειδωτική/προοξειδωτική συμπεριφορά υδατικών εκχυλισμάτων φυτών, πλησιάζει σε μεγάλο βαθμό την αντίστοιχη διαδικασία *in vivo*.¹²¹ Αν και αποτελεί ένα απλοποιημένο μοντέλο σύστημα σε σχέση με την πολύπλοκη διαδικασία *in vivo*, περιλαμβάνει, ωστόσο, ουσιαστικά στάδια της *in vivo* διαδικασίας γαστρεντερικής πέψης και απορρόφησης. Επομένως, τα συστατικά που είναι παρόντα στο σύστημα, υποβάλλονται σε διαφοροποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την πέψη και είναι δυνατό να περιλαμβάνουν διαδικασίες, όπως αντιδράσεις συμπλοκοποίησης, υδρόλυσης, πολυμερισμού και οξειδοαναγωγής. Το μοντέλο αυτό σύστημα έχει το σημαντικό πλεονέκτημα να βρίσκεται πολύ κοντά στις *in vivo* συνθήκες, καθόσον περιλαμβάνει α) μεταβολές pH β) συγκεντρώσεις των ενζύμων της πέψης παρόμοιες με αυτές που επικρατούν *in vivo* και γ) την παρουσία ημιπερατής μεμβράνης συγκεκριμένου μεγέθους πόρων. Σημαντική μεταξύ των χαρακτηριστικών του μοντέλου αυτού συστήματος είναι και η παρουσία του προοξειδωτικού μεταλλικού ιόντος Fe^{3+} , γνωστού για την ικανότητα κατάλυσης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η παρουσία της ημιπερατής μεμβράνης καθορίζει τη συγκέντρωση των 'βιοδιαθέσιμων' συστατικών, επιτρέποντας μόνο τις χαμηλού μοριακού βάρους οντότητες να διαχέονται, διαμέσου των πόρων της, προς το εσωτερικό. Ο αποκλεισμός των μεγάλου μοριακού βάρους οντοτήτων από τη διέλευσή τους στο εσωτερικό της μεμβράνης υπαγορεύεται από το μέγεθος των πόρων της (14kDa). Έτσι, ο έλεγχος της μετακίνησης συστατικών συγκεκριμένου μοριακού βάρους διαμέσου της μεμβράνης, επιτρέπει τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής συμπεριφοράς συστατικών, τα οποία έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να αποτελούν μέρος του αντίστοιχου απορροφήσιμου κλάσματος *in vivo*.

Κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζουν μία διακύμανση στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά σε σχέση με τους μάρτυρες (controls). Λαμβάνοντας υπόψη την προαναφερόμενη λειτουργική ικανότητα του μοντέλου συστήματος επώασης, κάτω από συνθήκες που μιμούνται τη γαστρεντερική πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό, τα λαμβανόμενα αποτελέσματα υποδεικνύουν καθαρά τη συνεισφορά στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα του συστήματος, συστατικών, όπως οι πολυφαινόλες και τα ένζυμα της πέψης.

Είναι γνωστό ότι η βιοδιαθεσιμότητα του μη-αιμικού σιδήρου επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες οι οποίοι, μεταξύ των άλλων, περιλαμβάνουν συστατικά προερχόμενα από φυτικές πηγές της διατροφής.^{137,138,139} Τέτοια συστατικά συνήθως μειώνουν σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα του μη-αιμικού σιδήρου. Από τη άλλη μεριά, είναι επίσης γνωστό ότι ο Fe^{3+} χαρακτηρίζεται από δυσδιαλυτότητα σε pH κοντά στο φυσιολογικό (pH~7).^{90,91,92} Το γεγονός ότι ο ολικός διαλυτός σίδηρος στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων βρέθηκε αυξημένος σε σχέση με το

μάρτυρα Fe(III), δεν σημαίνει αναγκαστικά και αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου παρουσία των εκχυλισμάτων. Είναι απόλυτα λογικό ο σίδηρος στο μάρτυρα Fe(III) να έχει υποστεί μία εκτεταμένη υδρόλυση σχηματίζοντας μεγαλομοριακά πολυμερή, ειδικά κατά το τελικό στάδιο της επώασης, όπου το pH ανέρχεται σταδιακά περίπου στο 6, έτσι ώστε το ποσοστό που διέρχεται διαμέσου της ημιπερατής μεμβράνης και που μετράται ως ποσοστό ολικού διαλυτού σιδήρου, να περιορίζεται σε χαμηλά επίπεδα. Εξάλλου, χηλικοποιητές του σιδήρου, όπως το NTA και το ασκορβικό οξύ, διατήρησαν το ποσοστό του ολικού διαλυτού σιδήρου σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Τα εκχυλίσματα των φυτών και της (+)-κατεχίνης περιόρισαν τη διαλυτότητα του σιδήρου περίπου στο 15-45 % του ολικού, ανάλογα με την περίπτωση. Ωστόσο, το γεγονός ότι ο σίδηρος διατηρήθηκε διαλυτός σε υψηλότερο ποσοστό απ' ό,τι στο μάρτυρα Fe(III), ο οποίος χαρακτηρίζεται από την απουσία χηλικοποιητή, αποτελεί μία σημαντική ένδειξη ύπαρξης συστατικών στα εκχυλίσματα, ικανών να συμπλοκοποιούν και να αυξάνουν τη διαλυτότητα του σιδήρου, όχι όμως κατά ανάγκη και τη βιοδιαθεσιμότητά του. Η πιθανή συμπλοκοποίηση του σιδήρου σε συστατικά των εκχυλισμάτων των φυτών ενισχύεται από τα φάσματα ορατού/υπεριώδους των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλάσμάτων καθώς και του πρότυπου διαλύματος $Fe^{3+}/(+)$ -κατεχίνης 1:3, τα οποία εμφανίζουν την ίδια χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης σε μήκος κύματος περίπου 560 nm-590 nm, σε pH~6. Εάν όντως υφίσταται το σύμπλοκο μεταξύ του σιδήρου και της (+)-κατεχίνης, αυτό φαίνεται να είναι αρκετά σταθερό, καθώς δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στο ηλεκτρονικό φάσμα που έχει ληφθεί κατά τη διάρκεια τουλάχιστον 3 ωρών, σε pH 7.4. Έτσι, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που εμφανίζουν τα εκχυλίσματα των φυτών κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, πιθανώς να είναι το αποτέλεσμα, κατά ένα μέρος, της ικανότητας των συστατικών αυτών να εμποδίζουν μέσω συμπλοκοποίησης του μεταλλικού καταλύτη, την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η συμπλοκοποίηση αυτή πιθανώς ελαττώνει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συστήματος έτσι ώστε, η συμμετοχή των ιόντων σιδήρου στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών με αντίδρασή τους με το H_2O_2 να περιορίζεται. Δεν αποκλείεται ωστόσο ο συμπλοκοποιημένος σίδηρος να παραμένει καταλυτικά δραστήριος. Στην περίπτωση αυτή, ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών συμβαίνει τοποειδικά στην περιοχή συμπλοκοποίησης του μεταλλικού ιόντος. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες μπορούν περαιτέρω να απενεργοποιηθούν από τις πολυφαινολικές ενώσεις στην περιοχή παραγωγής τους, πριν προλάβουν να προσβάλουν οποιοδήποτε άλλο υπόστρωμα. Η ποσοτική ανάλυση στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων, υποδεικνύει την παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων. Οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις συνεισφέρουν κατά μεγάλο μέρος στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα του συστήματος, γεγονός το οποίο ενισχύεται από την ανάλογη συμπεριφορά που επιδεικνύει το χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα της (+)-κατεχίνης. Η τελευταία αποτελεί μία πολυφαινόλη της τάξης των φλαβονοειδών. Η (+)-κατεχίνη, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, επιφέρει αύξηση στον ολικό διαλυτό σίδηρο και επιδεικνύει αντιοξειδωτική δραστηριότητα ανάλογη προς την αντίστοιχη των υπολοίπων εκχυλισμάτων των φυτών. Η συνεισφορά των πολυφαινολικών ενώσεων στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα του συστήματος υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα συσχέτισης μεταξύ πολυφαινολών στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του συστήματος. Συγκεκριμένα, απουσία των ενζύμων της πέψης κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων,

παρατηρείται γραμμική εξάρτηση μεταξύ του περιεχομένου στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα σε πολυφαινόλες και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Φαίνεται λογικό ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα, τόσο μειώνεται η οξειδωτική ικανότητα του συστήματος. Άξια προσοχής εμφανίζεται η ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα των εκχυλισμάτων των φυτών, η οποία βασίζεται στη μέτρηση πολυφαινολών κατεχολικού τύπου και όχι στην μέτρηση της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά. Η γραμμική εξάρτηση της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς του συστήματος από την περιεκτικότητα σε κατεχολικού τύπου πολυφαινολικά συστατικά, αποτελεί ενδεικτικό της σημαντικής συνεισφοράς πολυφαινολών του τύπου αυτού, στην εκδήλωση αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η εμπλοκή των πολυφαινολικών ενώσεων κατεχολικού τύπου στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων, ενισχύει την προτεινόμενη οδό δράσης τους ως α) απενεργοποιητών των παραγόμενων ελευθέρων ριζών, όπου μεγάλη βαρύτητα δίνεται στην παρουσία *o*-υδροξυλίων στο μόριο της πολυφαινόλης ή/και β) μέσω απομάκρυνσης του προοξειδωτικού μεταλλικού ιόντος Fe^{3+} μέσω συμπλοκοποίησής του στις ίδιες *o*-υδροξυλικές θέσεις των μορίων. Απόκλιση, ωστόσο, από τη γραμμικότητα μεταξύ περιεχομένου, στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα, σε πολυφαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς, παρατηρείται όταν τα εκχυλίσματα των φυτών επωάζονται παρουσία των ενζύμων της πέψης, υποδεικνύοντας μία πιθανή επίδραση των τελευταίων στην εκδήλωση της αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής ικανότητας του συστήματος. Επίσης, δεν παρατηρείται άμεση συσχέτιση μεταξύ του ολικού διαλυτού σιδήρου στο χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτό κλάσμα και της οξειδωτικής ικανότητας του συστήματος, τόσο απουσία όσο και παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων. Η μη γραμμική εξάρτηση των επιπέδων οξείδωσης από την περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο, των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων, απουσία και παρουσία των ενζύμων της πέψης κατά την επώαση, υποδεικνύει την σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων, που οφείλεται προφανώς στη σύσταση τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Το συμπέρασμα αυτό φαίνεται να ενισχύεται από το γεγονός ότι αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου δεν επιφέρει ανάλογη αύξηση στην οξειδωτική δραστηριότητα του συστήματος. Η μετρούμενη περιεκτικότητα σε ολικό διαλυτό σίδηρο, αντιπροσωπεύει όλες τις μορφές διαλυτού σιδήρου παρούσες στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων. Μεταξύ αυτών, ένα ποσοστό σιδήρου πιθανώς να είναι συμπλοκοποιημένο στις πολυφαινόλες ή και τα ένζυμα της πέψης, έτσι ώστε να μην καθίσταται δυνατή η συμμετοχή του ως καταλύτη στις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Μελετώντας την επίδραση των ενζύμων της πέψης στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων, φαίνεται να υπάρχει μία συνεισφορά από τα χολικά άλατα και την παγκρεατίνη. Η συνεισφορά αυτή δεν παρουσιάζεται ως προσθετική ιδιότητα, καθώς η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δραστηριότητα του μίγματος των ενζύμων της πέψης δεν αποτελεί το άθροισμα της δραστηριότητας των επιμέρους συστατικών. Η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δραστηριότητα των ενζύμων της πέψης μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά τους, ως πρωτεϊνών και οργανικών χηλικοποιητών μεταλλικών ιόντων, να δεσμεύουν το σίδηρο,

ελαχιστοποιώντας τη δράση του ως καταλύτη παραγωγής ελευθέρων ριζών. Δεν μπορεί επίσης να αποκλεισθεί η πιθανή ικανότητά τους να δρουν ως απενεργοποιητές των ελευθέρων ριζών.^{140,141,142} Τα ένζυμα της πέψης αποτελούν τη μοναδική πηγή πρωτεϊνών παρόντα στο σύστημα. Πιθανώς λοιπόν να δρουν ως πρωτεΐνες παρά ως πρωτεάσες στο παρόν σύστημα. Για το λόγο αυτό το παρατηρούμενο αποτέλεσμα πιθανώς να μην περιορίζεται για τα ένζυμα της πέψης, αλλά να υφίσταται και για άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Συσχετίζοντας την περιεκτικότητα του χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτού κλάσματος σε πρωτεϊνικά συστατικά με την οξειδωτική δραστηριότητα του συστήματος, προκύπτει γραμμική εξάρτηση των δύο παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται παρόμοια με τα αντίστοιχα της συσχέτισης της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων των φυτών, και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητάς τους, απουσία των ενζύμων της πέψης, κατά τη διάρκεια της επώασης. Η ομοιότητα αυτή στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά, τόσο των πολυφαινόλων όσο και των ενζύμων της πέψης, υποδεικνύει μία παράλληλη δράση των δύο παραγόντων, όταν οι τελευταίοι είναι παρόντες ταυτόχρονα κατά την επώαση των δειγμάτων κάτω από συνθήκες, οι οποίες μιμούνται την πέψη και απορρόφηση στον οργανισμό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα τα οποία μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα μελέτη μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

Τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των υδατικών εκχυλισμάτων (+)-κατεχίνης, μαύρου τσαγιού (Lipton, yellow label), φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*), δίκταμου (*Origanum dictamnus*) και θυμαριού (*Coridothymus capitatus*), εμφανίζουν μία διακύμανση στην αντιοξειδωτική τους συμπεριφορά ως προς τους μάρτυρες Fe(III), FeAA και FeNTA.

Απουσία των ενζύμων της πέψης, όλα τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των εκχυλισμάτων εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς τους μάρτυρες Fe(III), FeAA ή FeNTA. Παρουσία των ενζύμων της πέψης, μόνο το φασκόμηλο και το μαύρο τσάι εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα ως προς τους μάρτυρες FeAA και FeNTA.

Απουσία των ενζύμων της πέψης, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων των εκχυλισμάτων συσχετίζεται με την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες κατεχολικού τύπου.

Η παρουσία των ενζύμων της πέψης επηρεάζει την οξειδωτική ικανότητα του σιδήρου. Τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα της παγκρεατίνης και των χολικών αλάτων, όπως και του μίγματος αυτών, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σχέση με το μάρτυρα Fe(III), η οποία συσχετίζεται με την περιεκτικότητά τους σε πρωτεϊνικά συστατικά.

Τα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα των υδατικών εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών αυξάνουν τη διαλυτότητα του σιδήρου ως προς το μάρτυρα Fe(III), αλλά όχι ως προς τους μάρτυρες FeAA και FeNTA, τόσο παρουσία όσο και απουσία των ενζύμων της πέψης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ύπαρξη χαρακτηριστικής

ταινίας απορρόφησης των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων στην περιοχή του ορατού φωτός, υποδεικνύει την ύπαρξη ενώσεων ικανών να συμπλοκοποιούν ιόντα σιδήρου.

Παράγοντες όπως η παρουσία των ενζύμων της πέψης, η χημική διαφοροποίηση των συστατικών, που υπόκεινται στη διαδικασία της *in vitro* πέψης, και ο διαχωρισμός μεταξύ των μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους συστατικών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των αναφερόμενων εκχυλισμάτων.

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας συστατικών σε περισσότερο πολύπλοκα διατροφικά συστήματα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό. Το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa* L.) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία συλλέχθηκε από την περιοχή της Αγίας Ειρήνης του νομού Ηρακλείου τις χρονικές περιόδους Ιουλίου 1997 και Μαρτίου 2000 και ταυτοποιήθηκε από μέλη του Τομέα Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και Θαλάσσιας Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης.

Οι φασματοσκοπικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους (U-2001 Hitachi). Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό συστατικών, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC, Marathon IV) με ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους (Fasma 525 Programmable Detector). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση ήταν καθαρότητας HPLC grade. Η απαέρωση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε γραμμή κενού.

2.1. ΥΛΙΚΑ

Εκχύλισμα φασκόμηλου 4 gr/100 mL.

C₆H₁₄, C₂H₅OC₂H₅, CH₃COOC₂H₅, C₃H₇CH₂OH, CH₃OH, CH₃CN, H₃PO₄, CH₃COOH.

Φίλτρα Acrodisc 13 CR PTFE διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων 0.2 μm.

Καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμανόλη και καφεϊκό οξύ.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Ανάκτηση συστατικών υδατικού εκχυλίσματος φασκόμηλου σε διαλύτες διαφορετικής πολικότητας

Υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου 4 g/100 mL εκχυλίζεται κατά σειρά με διαλύτες εξάνιο, διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, 1-βουτανόλη, μέχρι αποχρωματισμού της οργανικής στοιβάδας. Οι οργανική στοιβάδα συλλέγεται κάθε φορά και απομακρύνεται με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα, εκτός από την περίπτωση της 1-βουτανόλης, η οποία απομακρύνεται κάτω από κενό, λόγω του μεγάλου σημείου βρασμού της (117 °C). Το στερεό ή ελαιώδες υπόλειμμα που συλλέγεται, φυλάσσεται κάτω από ατμόσφαιρα αργού σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του στις αναλύσεις. Ελέγχονται τα μέγιστα απορρόφησης κάθε εκχυλίσματος σε μεθανόλη, με φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους. Η διόρθωση του υποβάθρου γίνεται με μεθανόλη.

2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων για την ανάλυση με HPLC

Τα δείγματα προς ανάλυση διαλύονται σε μεθανόλη με κατάλληλες αραιώσεις (Πίνακας 1). Το υλικό που συλλέγεται από το εκχύλισμα της 1-βουτανόλης, διαλύεται σε H₂O. Τα διαλύματα διηθούνται μέσω φίλτρων διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων 0.2 μm (Acrodisc 13 CR PTFE). Ακολουθεί άμεση εισαγωγή κάθε δείγματος στο HPLC μέσω βρόγχου 20 μL. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω στήλης Kromasil C₁₈, 5 μm (250 x 4.6 mm ID) σε θερμοκρασία δωματίου και η ανίχνευση των διαχωριζόμενων ενώσεων παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά μέσω ανιχνευτή

UV/Vis στα 230 nm, 280 nm, και 330 nm. Ο διαχωρισμός και η ανίχνευση καταγράφονται μέσω υπολογιστή και η περαιτέρω ανάλυση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του προγράμματος EZCrom Chromatography Data System (version 6.7).

Πίνακας 1: Αραιώσεις δειγμάτων ανά εκχύλισμα πριν την εισαγωγή στη χρωματογραφική στήλη	
Εκχύλισμα	Αραιώσεις
Εξάνιο	_____
Διαιθυλαιθέρας	2
Οξικός αιθυλεστέρας	3 ή 5
1-Βουτανόλη	Ζυγίζεται δείγμα 4 mg/mL από το αρχικό

2.2.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών από εκχυλίσματα φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)

Τα εκχυλίσματα εξανίου και διαιθυλαιθέρα χρωματογραφούνται ισοκρατικά με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 1 mL/min. Η κινητή φάση έκλουσης των συστατικών των εκχυλισμάτων αυτών αποτελείται, αντίστοιχα, από το σύστημα διαλυτών:

α) 60% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ σε H₂O και

β) 40% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ σε H₂O.

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί βαθμιδωτό πρόγραμμα με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0.8 mL/min, όπως αναφέρεται στους Πίνακες 2, και 3, που ακολουθούν.

Η επιλεγόμενη κινητή φάση στην περίπτωση αυτή αποτελείται από τους διαλύτες:

A. 10 % CH₃OH/2% CH₃COOH σε H₂O.

B. 90 % CH₃OH/2% CH₃COOH σε H₂O.

Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της 1-βουτανόλης χρωματογραφούνται με βαθμιδωτό πρόγραμμα όπως αναφέρεται στους πίνακες 4 και 5, με χρησιμοποίηση του παραπάνω συστήματος διαλυτών.

Πίνακας 2: Βαθμιδωτό πρόγραμμα χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών του εκχυλίσματος εξανίου με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0.8 mL/min		
%A	%B	Time (min)
50	50	INIT
50	50	10
20	80	11
20	80	20
10	90	21
10	90	30
0	100	31
0	100	60

Πίνακας 3: Βαθμιδωτό πρόγραμμα χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0.8 mL/min

%A	%B	Time (min)
80	20	INIT
80	20	20
50	50	21
50	50	26
20	80	27
20	80	35
10	90	36
10	90	46
0	100	47
0	100	60

Πίνακας 4: Βαθμιδωτό πρόγραμμα χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0.8 mL/min

%A	%B	Time (min)
85	15	INIT
45	55	30
45	55	35
20	80	40

Πίνακας 5: Βαθμιδωτό πρόγραμμα χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών του εκχυλίσματος 1-βουτανόλης με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0.8 mL/min

%A	%B	Time (min)
100	0	INIT
70	30	30
65	35	35
50	50	50
50	50	55
20	80	60

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ ποσότητας κερνοσικού οξέος και κερνοσόλης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Statistica, version 5.1, σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η στατιστική ανάλυση των ποσοτικών διαφοροποιήσεων των συστατικών του αφεψήματος φασκόμηλου το οποίο έχει συλλεχθεί σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, ελέγχθηκαν με μονοδιάστατο σχεδιασμό (one-way) του ANOVA, LSD (Least Significant Differences) τεστ, σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %. Οι τιμές P της στατιστικής ανάλυσης βρίσκονται στο παράρτημα III του συγγράμματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

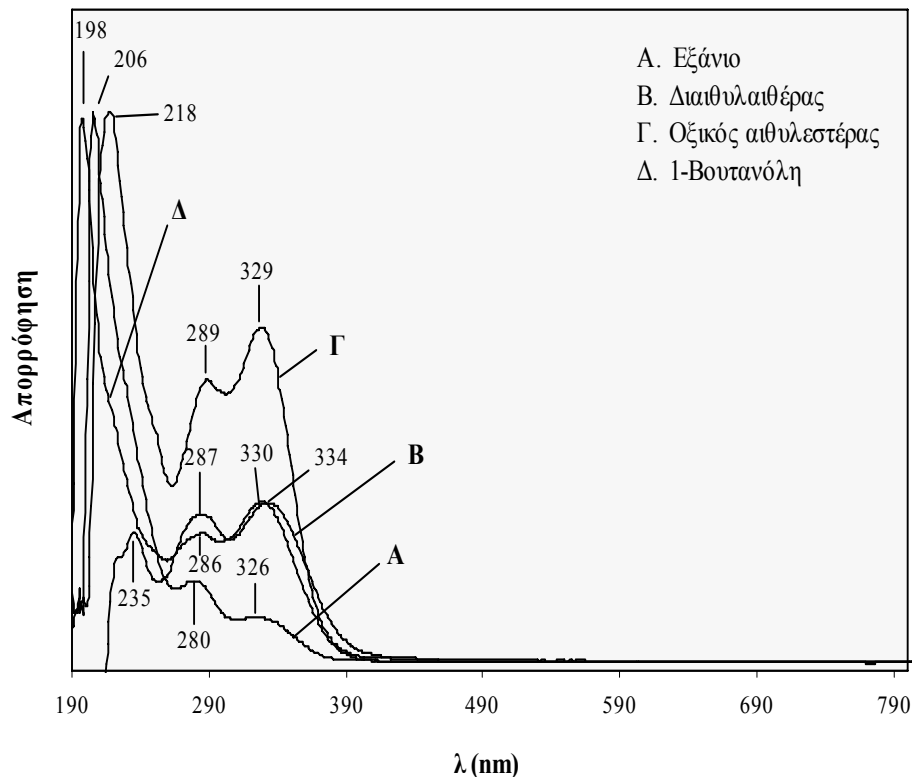
Φάσματα ορατού/υπεριώδους των εκχυλισμάτων σε οργανικούς διαλύτες του υδατικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*)

Στο Σχήμα 1 απεικονίζεται το φάσμα ορατού/υπεριώδους στην περιοχή 190-800 nm των εκχυλισμάτων εξανίου, διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλης, τα οποία έχουν ληφθεί από το αφέννημα του φασκόμηλου. Είναι εμφανές ότι όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν τρεις παρόμοιες ταινίες απορρόφησης οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή 200-340 nm. Τα αντίστοιχα μέγιστα στις ταινίες απορρόφησης υποδεικνύονται στο ίδιο σχήμα. Οι μετατοπίσεις στα μέγιστα απορρόφησης των ταινιών οφείλονται στην ύπαρξη των χρωμοφόρων ομάδων οι οποίες προκαλούν υψιχρωμικά ή βαθυχρωμικά φαινόμενα. Παρ' όλη την άγνωστη σύσταση των εκχυλισμάτων είναι δυνατό από τα φάσματα ορατού/υπεριώδους να εξαχθούν ορισμένες πληροφορίες για τη δομή τους. Η απουσία απορρόφησης στην περιοχή 490-540 nm υποδεικνύει απουσία ενώσεων όπως οι ανθοκυανιδίνες και οι ανθοκυανίνες από τα εκχυλίσματα. Η ύπαρξη ταινιών απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (200-340 nm) είναι ενδεικτική της ύπαρξης χρωμοφόρων ομάδων, όπως, υποκατεστημένες αρωματικές ομάδες, καρβονυλικές ομάδες και οργανικά οξέα. Επίσης, η ύπαρξη ταινίας απορρόφησης στην περιοχή των 280 nm είναι ενδεικτική της ύπαρξης ενώσεων που περιέχουν στη δομή τους βενζολικό δακτύλιο. Εκτός από τις δομικές πληροφορίες που εξάγονται, τα φάσματα ορατού/υπεριώδους των εκχυλισμάτων αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την επιλογή του μήκους κύματος για την ανίχνευση των συστατικών κατά το χρωματογραφικό τους διαχωρισμό με ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους. Έτσι, οι αναλύσεις των εκχυλισμάτων επιτεύχθηκαν στα 230 nm, 280 nm και 330 nm. Ο λόγος για τον οποίο δεν επιλέχθηκε μικρότερο των 230 nm, μήκος κύματος για τις αναλύσεις, είναι ο περιορισμός που τίθεται κατά τη χρησιμοποίηση των διαλυτών ως κινητή φάση και η παρουσία του οξυγόνου. Διαλύτες οι οποίοι περιέχουν δεσμούς C-O όπως η μεθανόλη ή το οξικό οξύ, απορροφούν ισχυρά σε μήκη κύματος <230 nm. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη την ανάλυση σε μήκος κύματος 230 nm όταν η μεθανόλη και το οξικό οξύ είναι παρόντα. Επίσης το διαλυμένο στην κινητή φάση οξυγόνο καθώς και αυτό που προϋπάρχει στον ανιχνευτή, απορροφά ισχυρά στην περιοχή των 190 nm. Έτσι, παρ' όλο που το ακετονιτρίλιο και το φωσφορικό οξύ δεν απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους, η ανάλυση δεν μπορεί να επιτευχθεί σε μήκος κύματος μικρότερο των 230 nm καθώς παρατηρείται έντονος θόρυβος στο σήμα υποβάθρου. Εξάλλου, παρόμοιες αναλύσεις γνωστές από τη βιβλιογραφία, πραγματοποιούνται επίσης, στα 230 nm.^{49,52} Παρ' όλη την ύπαρξη τριών ταινιών απορρόφησης στο φάσμα ορατού/υπεριώδους των εκχυλισμάτων, επιλέγεται ως μήκος κύματος ανάλυσης αυτό στο οποίο οι πρότυπες ενώσεις εμφανίζουν μέγιστη απόκριση. Για το καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και ροσμανόλη, αυτό είναι τα 230 nm, ενώ για το καφεϊκό οξύ τα 330 nm.

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών στα οργανικά εκχυλίσματα του φασκόμηλου

Στον Πίνακα 1 αναφέρονται τα αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης συστατικών με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου ενώσεων, ανά εκχύλισμα

φασκόμηλου, το οποίο συλλέχθηκε σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους: τον Ιούλιο του 1997 και το Μάρτιο του 2000 αντίστοιχα. Στο εκχύλισμα της 1-βουτανόλης ανιχνεύθηκε συστατικό με χρόνο κατακράτησης όμοιο με του καφεϊκού οξέος. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Πιθανώς το καφεϊκό οξύ να μην ανακτάται πλήρως στον οξικό αιθυλεστέρα, οπότε η ποσότητα που απομένει μετά την εκχύλιση με το διαλύτη αυτό, να ανακτάται στην 1-βουτανόλη. Η μη-πλήρης ανάκτηση ενός συστατικού από έναν διαλύτη σε άλλον, είναι ένα συχνό φαινόμενο το οποίο παρατηρείται λόγω της ισορροπίας των συγκεντρώσεων μεταξύ των δύο διαλυτών. Δεν αποκλείεται βέβαια το ενδεχόμενο να πρόκειται για διαφορετική ένωση με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης.



Σχήμα1: Φάσμα απορρόφησης στο ορατό/υπεριώδες εκχυλισμάτων οργανικών διαλυτών από το αφέψημα του φασκόμηλου

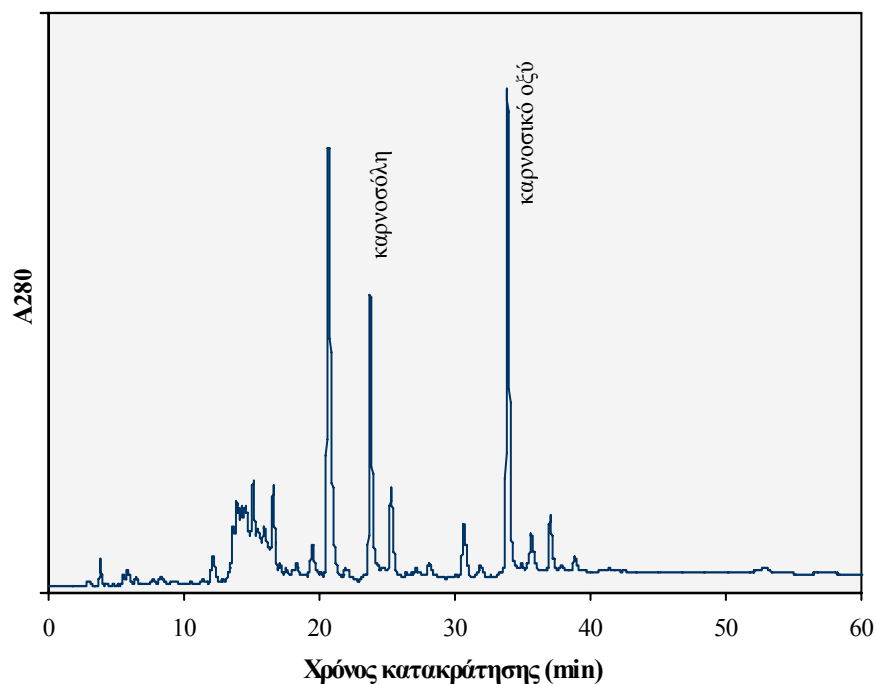
Πίνακας 1: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών από το αφέψημα του φασκόμηλου (<i>Salvia fruticosa</i>)			
Ιούλιος 1997			
Εκχύλισμα	mg±SD στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος	Ένωση	mg ± SD*
Εξάνιο	9 ± 0	Καρνοσόλη	0.66 ± 0.19
		Καρνοσικό οξύ	1.31 ± 0.33
Διαθυλαιθέρας	7 ± 0	Ροσμανόλη	0.56 ± 0.12
Οξικός αιθυλεστέρας	13 ± 5.6	Καφεϊκό οξύ	0.26 ± 0.07
1-Βουτανόλη	25.5 ± 6.4		
Μάρτιος 2000			
Εξάνιο	7 ± 2	Καρνοσόλη	0.99 ± 0.36
		Καρνοσικό οξύ	0.28 ± 0.04
Διαθυλαιθέρας	6.8 ± 2.2	Ροσμανόλη	0.16 ± 0.03
Οξικός αιθυλεστέρας	22.2 ± 6.8	Καφεϊκό οξύ	0.21 ± 0.06
1-Βουτανόλη	26.2 ± 10.2		

* Η ποσοτική ανάλυση των συστατικών είναι εκφρασμένη σε mg ένωσης ανά 100 mL αφεψήματος φασκόμηλου το οποίο έχει παρασκευαστεί από την εκχύλιση 4 gr φυτού με 100 mL H₂O.

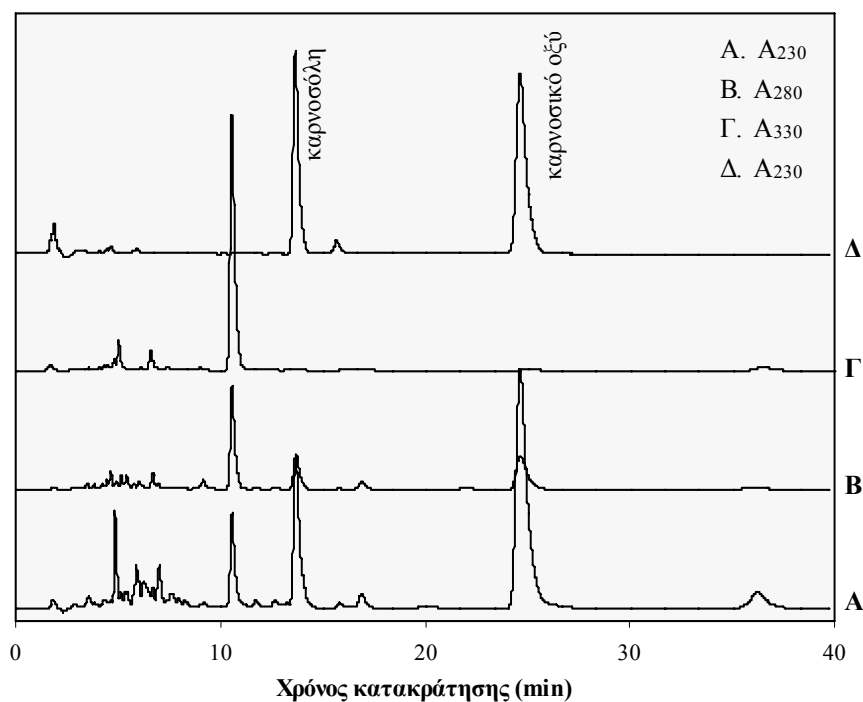
3.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος εξανίου από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου

Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος εξανίου, το οποίο έχει ληφθεί κάτω από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης, όπως περιγράφεται στο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας και παρακολουθείται με ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους στα 280 nm. Η μέθοδος αυτή, ωστόσο, δεν εφαρμόστηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος εξανίου, καθώς παρουσίασε ορισμένα πρακτικά προβλήματα. Το σημαντικότερο από αυτά ήταν η προβληματική έκλυση των συστατικών, η οποία οδήγησε στην εμφάνιση κορυφών με πολλαπλά μέγιστα και ώμους, πιθανότατα εξαιτίας της βαθμιδωσης της κινητής φάσης που ακολουθήθηκε. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκληθεί αν η κινητή και στατική φάση δεν έχουν έρθει σε ισορροπία ή και από την αποσύνθεση της στατικής στοιβάδας της χρωματογραφικής στήλης. Το πιθανότερο ωστόσο που έχει συμβεί στην περίπτωση αυτή, είναι ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα κατά την ανάμιξη των διαλυτών της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της βαθμιδωσης των συγκεντρώσεων, καθώς το όργανο που χρησιμοποιήθηκε δεν διαθέτει on-line σύστημα απαέρωσης. Επίσης, η αδυναμία παρακολούθησης της έκλουσης σε μικρά μήκη κύματος (<280 nm), εξαιτίας της παρουσίας CH₃COOH στην κινητή φάση, η οποία προκαλεί έντονο θόρυβο στο λαμβανόμενο σήμα καθιστά μειονεκτική τη μέθοδο αυτή. Έτσι, η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος επιτεύχθηκε κάτω από ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης της κινητής φάσης. Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη της μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης έχει συνήθως χρήσιμη εφαρμογή στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων συστατικών και συχνά εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα από αντίστοιχες ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης της κινητής φάσης.

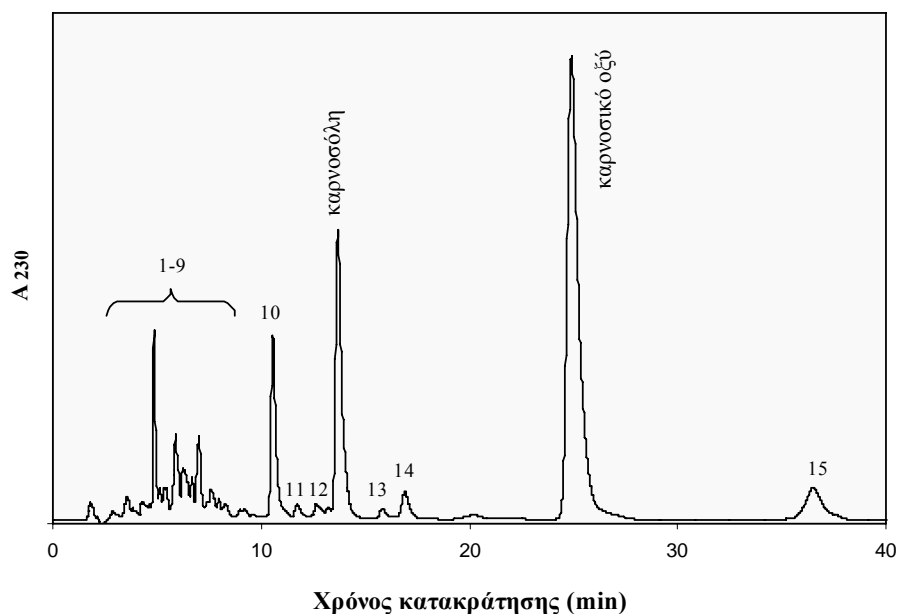
Στο Σχήμα 3 απεικονίζεται α) το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος εξανίου το οποίο λαμβάνεται κάτω από ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης κινητής φάσης 60% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ σε H₂O, με ταχύτητα ροής 1 mL/min, και β) το αντίστοιχο χρωματογράφημα του μίγματος πρότυπων ενώσεων καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος συγκέντρωσης 162.5 μg/mL και 325 μg/mL, αντίστοιχα. Η έκλυση των συστατικών του εκχυλίσματος παρακολουθήθηκε στα 230 nm, 280 nm και 330 nm. Οι αναλύσεις, ωστόσο, πραγματοποιήθηκαν με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν στα 230 nm (Σχήμα 4), καθώς στο μήκος κύματος αυτό τα παρακολουθούμενα συστατικά εμφανίζουν μέγιστο απόκριση. Παρ' όλη την πολυπλοκότητα, η εφαρμογή των συγκεκριμένων συνθηκών έκλουσης εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα διαχωρισμού. Στον Πίνακα 2 αναγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης των αριθμημένων κορυφών.



Σχήμα 2: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου από αφέψημα φασκόμηλου, λαμβανόμενο κάτω από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 0.8 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από τα συστήματα διαλυτών: Α. 10% CH₃OH /2% CH₃COOH σε H₂O και Β. 90% CH₃OH /2% CH₃COOH σε H₂O.



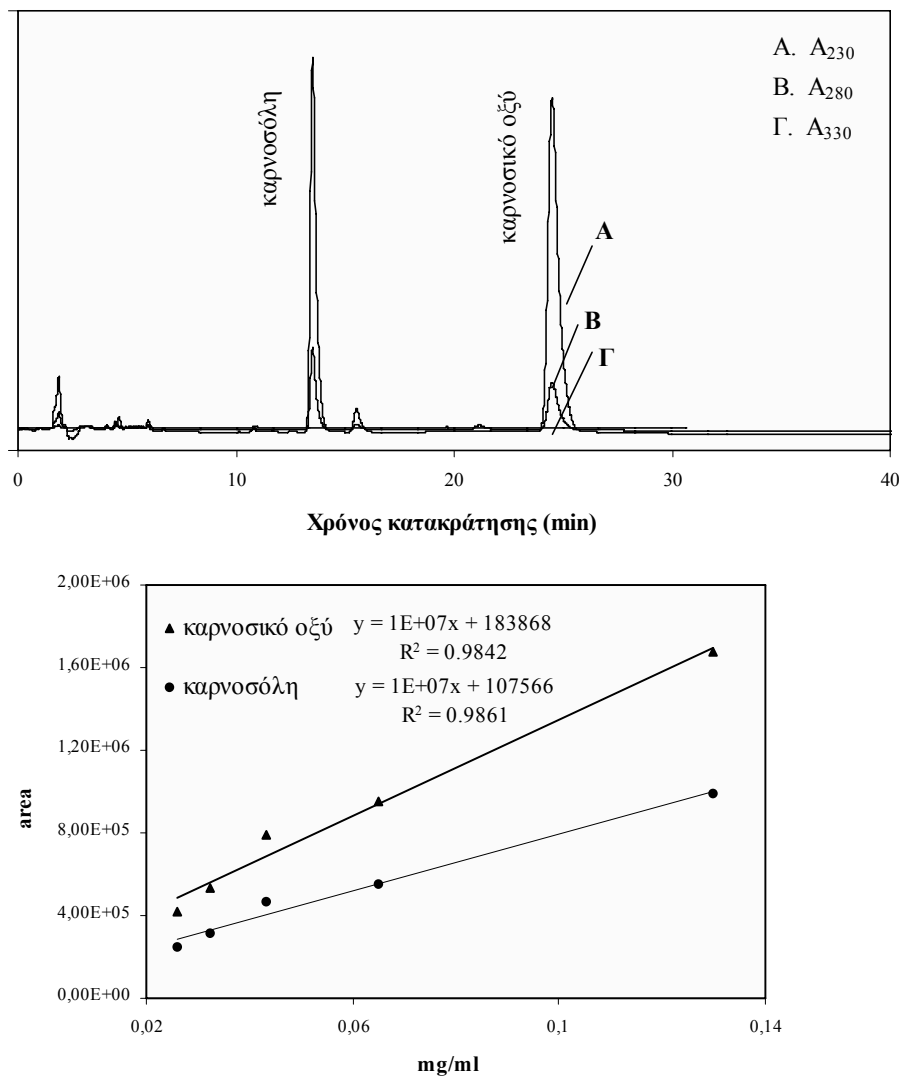
ΣΧΗΜΑ 3: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου από αφέψημα φασκόμηλου (Α, Β, Γ) και προτύπων ενώσεων καρνοσώλης και καρνοσικού οξέος (Δ), λαμβανόμεν⁸⁷ κάτω από συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από το σύστημα διαλυτών 60% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ ΣΕ H₂O.



Σχήμα 4: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου από αφέψημα φασκόμηλου, το οποίο καταγράφεται μέσω ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους στα 230 nm.

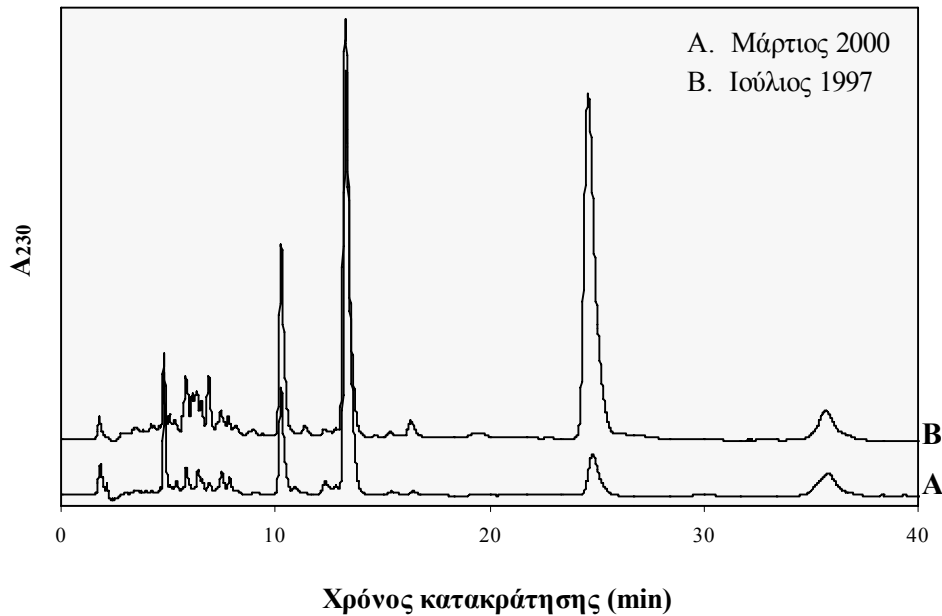
Πίνακας 2: Χρόνοι κατακράτησης των συστατικών του εκχυλίσματος του εξανίου	
Αριθμός κορυφής	Χρόνος κατακράτησης (min) \pm SD
1	4.81 \pm 0.07
2	5.10 \pm 0.03
3	5.34 \pm 0.04
4	5.84 \pm 0.07
5	6.37 \pm 0.09
6	6.58 \pm 0.12
7	6.94 \pm 0.07
8	7.52 \pm 0.07
9	7.89 \pm 0.08
10	10.44 \pm 0.13
11	11.58 \pm 0.11
12	12.51 \pm 0.10
Καρνοσόλη	13.51 \pm 0.12
13	15.68 \pm 0.12
14	16.73 \pm 0.14
Καρνοσικό οξύ	25.05 \pm 0.14
15	36.57 \pm 0.39

Στο Σχήμα 5 απεικονίζεται α) το χρωματογράφημα των προτύπων ενώσεων καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος το οποίο παρακολουθείται στα 230 nm, 280 nm, και 330 nm και β) η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει για κάθε ένωση η οποία, λαμβάνεται μετά από την εισαγωγή πρότυπων ενώσεων καρνοσόλης (13 µg/mL - 65 µg/mL) και καρνοσικού οξέος (26 µg/mL - 130 µg/mL) στη στήλη χρωματογραφίας, και ανίχνευση στα 230 nm. Όπως φαίνεται, το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη εμφανίζουν μέγιστο απόκρισης στα 230 nm. Οι αντίστοιχες ενώσεις στο εκχύλισμα του εξανίου εμφανίζουν ανάλογη συμπεριφορά με τις πρότυπες ενώσεις σε σχέση με την απόκρισή τους στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος.



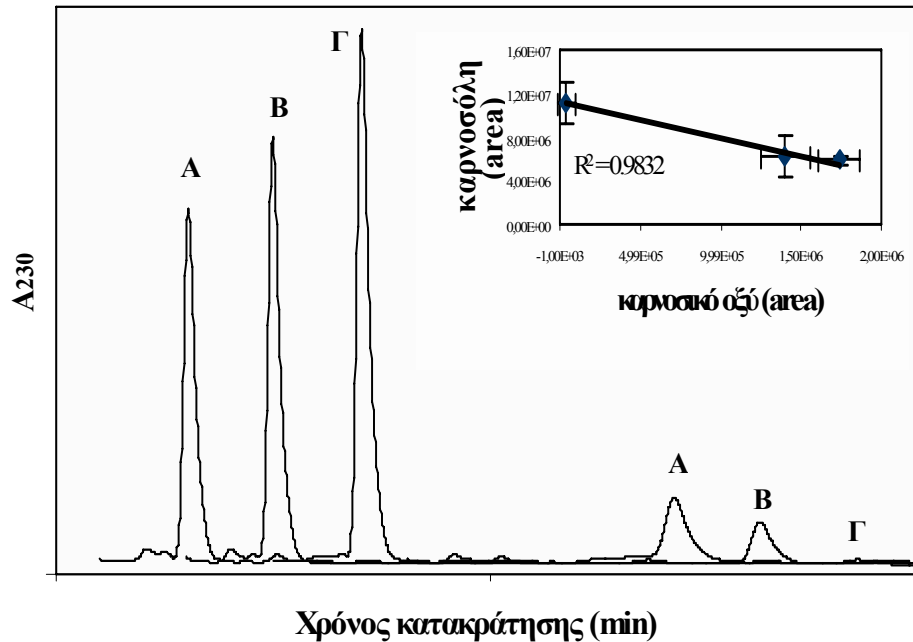
ΣΧΗΜΑ 5: Χρωματογράφημα πρότυπων ενώσεων καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος, και καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από στοιχεία του χρωματογραφήματος που συλλέγονται στα 230 nm. Το χρωματογράφημα λαμβάνεται κάτω από συνθήκες όμοιες προς αυτές που χρησιμοποιούνται στο άγνωστο δείγμα του

Στο Σχήμα 6 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος εξανίου από φασκόμηλο το οποίο έχει συλλεχθεί την περίοδο του καλοκαιριού του 1997 (Ιούλιος) και της άνοιξης του 2000 (Μάρτιος). Η έκλυση των συστατικών του εκχυλίσματος παρακολούθηθηκε στα 230 nm. Είναι εμφανής η διαφορά στην ποσοτική σύσταση του εκχυλίσματος, κυρίως όσον αφορά τη σύσταση σε καρνοσικό οξύ, αλλά όχι στην ποιοτική σύσταση. Καθώς έχει αναφερθεί η ευαισθησία του καρνοσικού οξέος έναντι του φωτός και της θερμότητας κατά την περίοδο του καλοκαιριού,^{31,55} άξιο προσοχής εμφανίζεται το γεγονός ότι η ποσότητά του στο δείγμα που συλλέχθηκε τον Ιούλιο του 1997 είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του δείγματος που έχει συλλεχθεί τον Μάρτιο του 2000. Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι η ευαισθησία της ένωσης αυτής δεν περιορίζεται μόνο στις συγκεκριμένες συνθήκες. Δεν αποκλείεται η μεταβολή αυτή στη σύσταση του καρνοσικού οξέος να οφείλεται κυρίως σε βιοσυνθετικούς παράγοντες, καθώς η ανάπτυξη του φυτού την εποχή της άνοιξης δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί.



Σχήμα 6: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η ανίχνευση των συστατικών του εκχυλίσματος πραγματοποιείται στα 230 nm

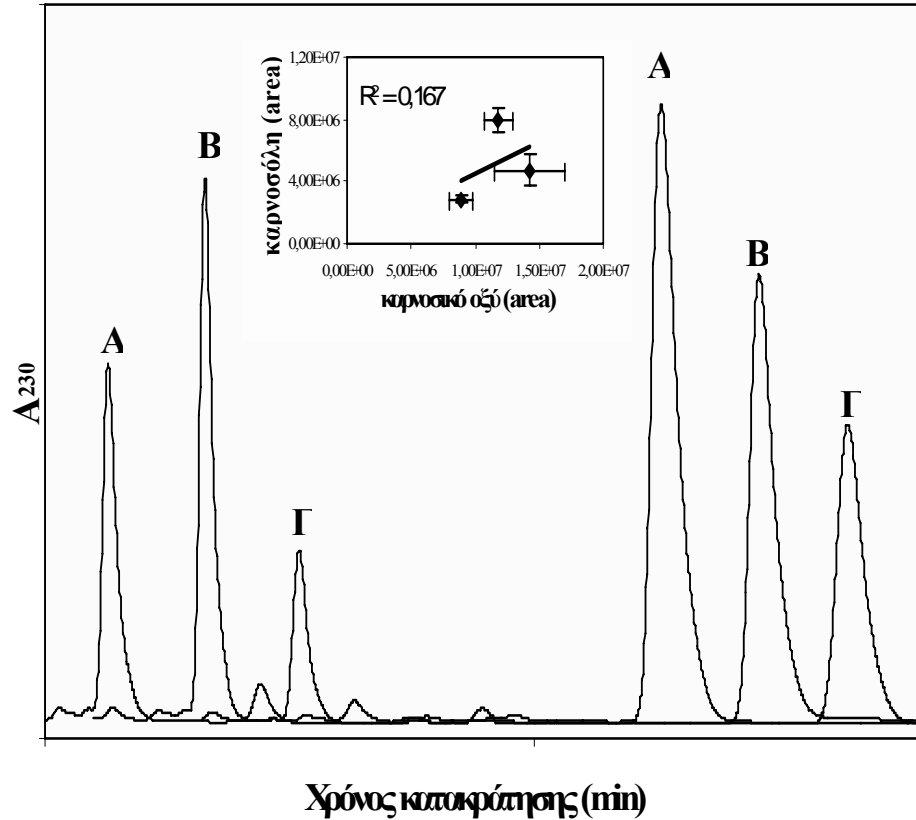
Έχει αναφερθεί ότι το κερνοσικό οξύ μετατρέπεται σε κερνοσόλη μετά από έκθεσή του σε φως, θέρμανση ή και πολικούς διαλύτες, υποδηλώνοντας μία πιθανή κοινή βιοσυνθετική πορεία και συσχέτιση των δύο ενώσεων.^{52,53} Πιθανώς, αυτό να ισχύει καθώς παρατηρήθηκε μία γραμμική αντίστροφη σχέση ($P < 0.05$) μεταξύ ποσότητας κερνοσόλης και κερνοσικού οξέος, που ανιχνεύεται μεταξύ δειγμάτων εκχυλίσματος εξανίου από φασκόμηλο, το οποίο συλλέχθηκε την εποχή του Μαρτίου του 2000, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσοτική σύσταση σε κερνοσόλη τόσο μικρότερη είναι η αντίστοιχη ποσότητα του κερνοσικού οξέος.



Σχήμα 7: Τμήμα χρωματογραφήματος εκχυλίσματος εξανίου από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί τον Μάρτιο του 2000. Στατιστική ανάλυση υποδεικνύει μία αντίστροφη γραμμική σχέση μεταξύ κερνοσόλης και κερνοσικού οξέος ($P < 0.05$).

Ωστόσο, κάτι ανάλογο δεν παρατηρήθηκε στο αντίστοιχο εκχύλισμα εξανίου από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997, όπου δεν υφίσταται γραμμική συσχέτιση ($P > 0.05$) στη μεταβολή της ποσότητας κερνοσόλης και κερνοσικού οξέος μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν (Σχήμα 8). Πιθανώς στην περίπτωση αυτή, η παραμονή του φυτού για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρ' όλες τις προφυλάξεις που είχαν ληφθεί κατά την φύλλαξή του, επηρέασε την περιεκτικότητά του, ειδικά σε κερνοσικό οξύ, εφόσον έχει δείχθει η ευαισθησία του διτερπενίου αυτού. Δεν θα πρέπει, ωστόσο, να παραβλεφθεί το γεγονός ότι τα φυτά τους καλοκαιρινούς μήνες βρίσκονται σε έντονες καταστάσεις οξειδωτικού stress λόγω της εκτεταμένης ηλιακής ακτινοβολίας και θερμότητας. Τέτοιες καταστάσεις θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τη σύσταση στα φύλλα των φυτών αυτών, τα οποία, δέχονται τη μεγαλύτερη επιρροή των προαναφερόμενων παραγόντων. Στην περίπτωση αυτή, οποιαδήποτε συσχέτιση των συστατικών που ανιχνεύονται καθίσταται ασαφής. Ωστόσο, αξίζει γενικά να σημειωθεί

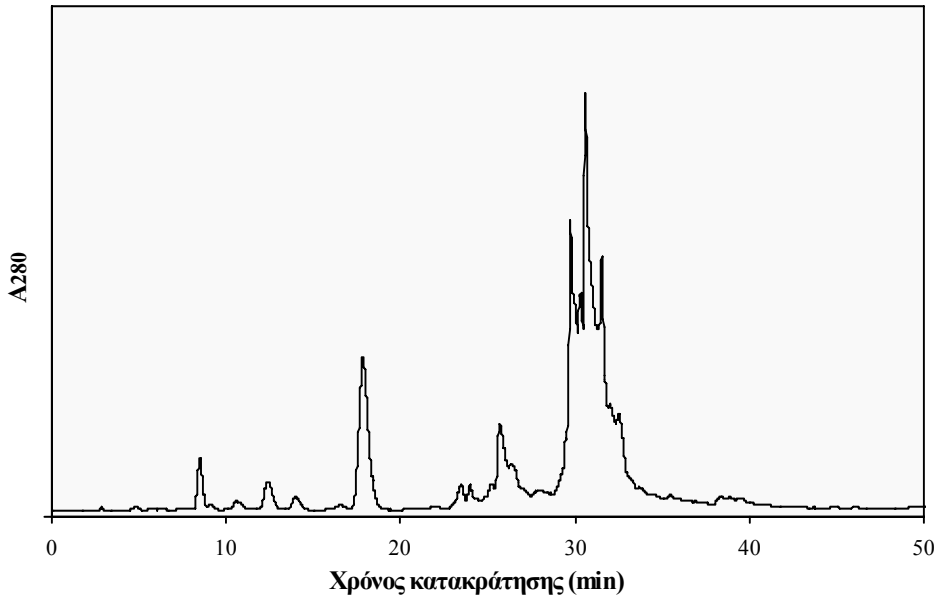
ότι παρατηρήθηκε σε δείγματα εκχυλίσματος φασκόμηλου, που έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997, μία αυξημένη ποσότητα καρνοσικού οξέος και ροσμανόλης, σε σχέση με τα αντίστοιχα φασκόμηλου, που έχει συλλεχθεί το Μάρτιο του 2000.



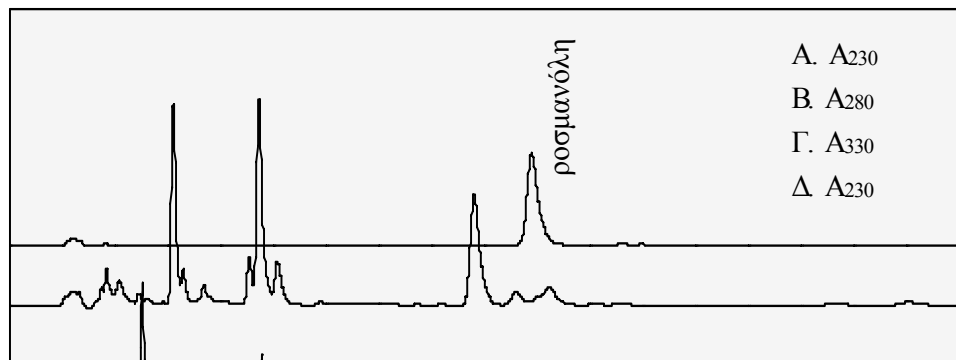
Σχήμα 8: Τμήμα χρωματογραφήματος εκχυλίσματος εξανίου από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997. Στατιστική ανάλυση δεν υποδεικνύει μία αντίστροφη γραμμική σχέση μεταξύ καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος ($P > 0.05$).

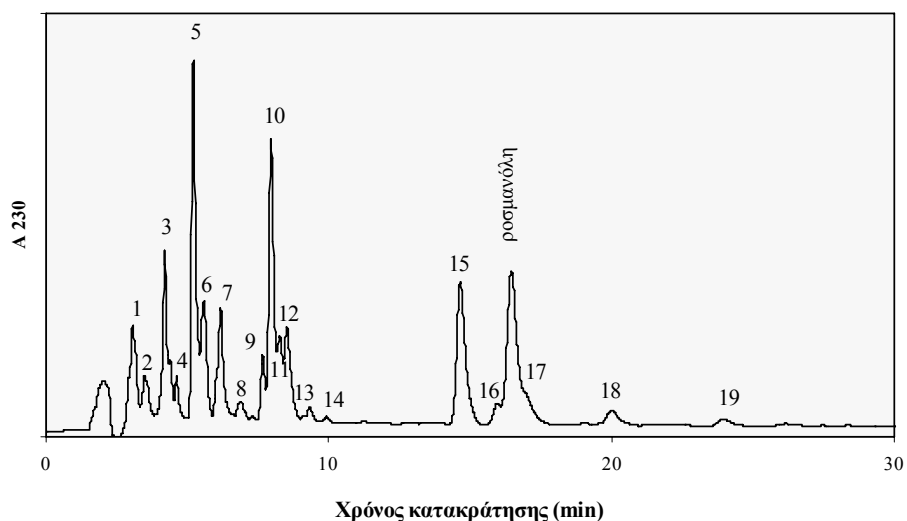
3.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου

Στο Σχήμα 9 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα, το οποίο έχει ληφθεί κάτω από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης, όπως περιγράφεται στο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας και παρακολουθείται με ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους στα 280 nm. Κατ' αναλογία με την περίπτωση του εκχυλίσματος εξανίου, η χρησιμοποίηση των συνθηκών αυτών εμφανίζεται μειονεκτική καθώς εμφάνισε τα ίδια προβλήματα σε σχέση με την έκλυση των συστατικών από τη χρωματογραφική στήλη. Η ανάπτυξη, ωστόσο, διαφορετικής μεθόδου διαχωρισμού χρησιμοποιώντας ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης της κινητής φάσης, βελτίωσε όχι μόνο τη μορφή του χρωματογραφήματος, αλλά και μείωσε το χρόνο ανάλυσης πρακτικά στο μισό. Έτσι, η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση ισοκρατικών συνθηκών έκλουσης κινητής φάσης 40% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ σε H₂O.



Στο Σχήμα 9, το οποίο λαμβάνεται κάτω από ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης κινητής φάσης 40% CH₃CN/0.1% H₃PO₄ σε H₂O με ταχύτητα ροής 0.8 mL/min και βλ. το αντίστοιχο Σχήμα 9. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου. **ΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ** κατά από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 0.8 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από τα συστήματα διαλυτών 33:0% CH₃CN/2% CH₃COOH σε H₂O και Β. 90% CH₃CN/2% CH₃COOH σε H₂O που συλλέχθηκαν στα 230 nm (Σχήμα 11). Στον Πίνακα 3 αναγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης των αριθμημένων κορυφών.



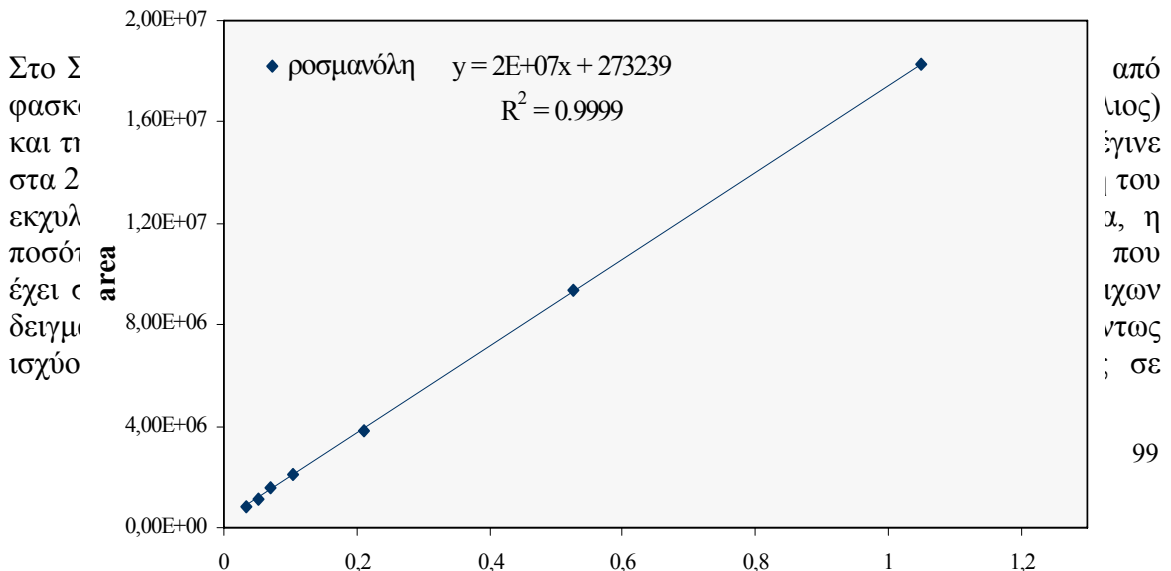
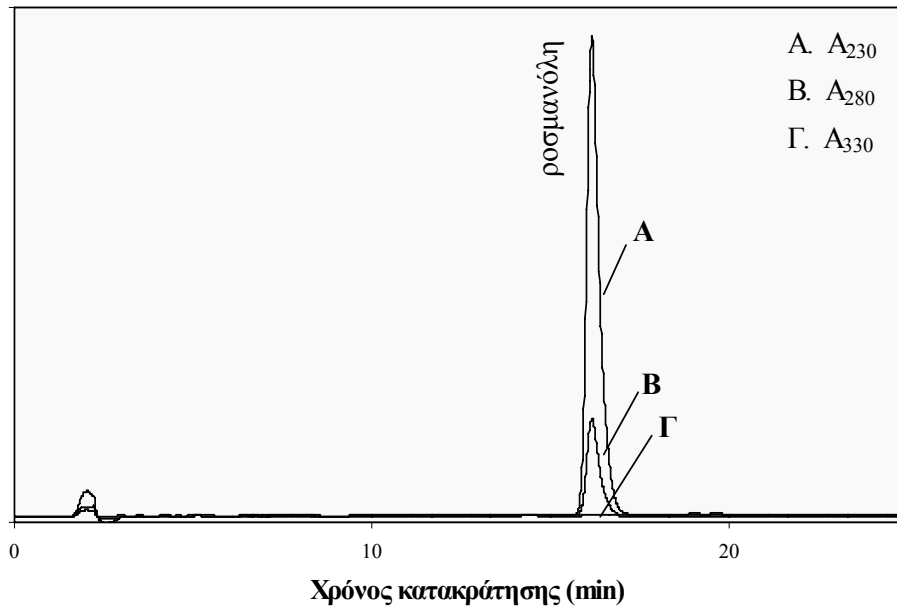


Σχήμα 11: Χρονογράφημα εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα φασκόμηλου, το οποίο καταγράφεται μέσω ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους στα 230nm.

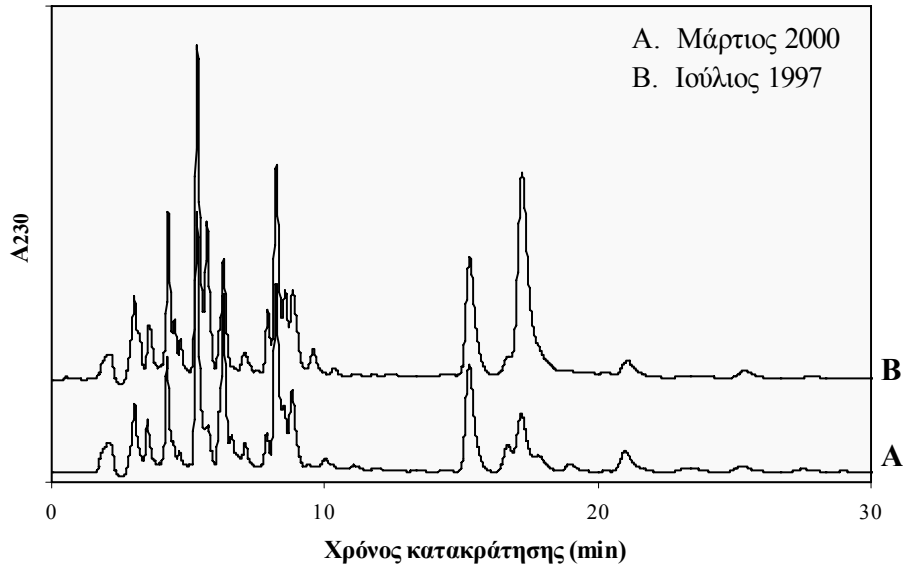
Αριθμός κορυφής	Χρόνος κατακράτησης (min) ± SD
1	3.04 ± 0.02
2	3.52 ± 0.01
3	4.27 ± 0.02
4	4.69 ± 0.01
5	5.34 ± 0.02
6	5.71 ± 0.02
7	6.29 ± 0.02
8	7.08 ± 0.01
9	7.91 ± 0.05
10	8.24 ± 0.04
11	8.55 ± 0.05
12	8.84 ± 0.05
13	9.51 ± 0.14

14	10.17 ± 0.19
15	15.35 ± 0.08
16	16.77 ± 0.09
Ροσμανόλη	17.27 ± 0.09
17	17.80 ± 0.04
18	21.10 ± 0.11
19	25.40 ± 0.13

Στο Σχήμα 12 απεικονίζεται α) το χρωματογράφημα της πρότυπης ένωσης ροσμανόλης το οποίο παρακολουθείται στα 230 nm, 280 nm, και 330 nm και β) η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει για την ένωση αυτή λαμβανόμενη μετά από την εισαγωγή διαφόρων συγκεντρώσεων (0.035 mg/mL - 1.05 mg/mL) ροσμανόλης στη στήλη χρωματογραφίας και ανίχνευση στα 230 nm. Όπως φαίνεται, η ροσμανόλη εμφανίζει μέγιστο απόκριση στα 230 nm. Η αντίστοιχη ένωση στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα, η οποία πιστοποιείται ως ροσμανόλη, εμφανίζει ανάλογη συμπεριφορά με την πρότυπη ένωση σε σχέση με την απόκριση στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος.



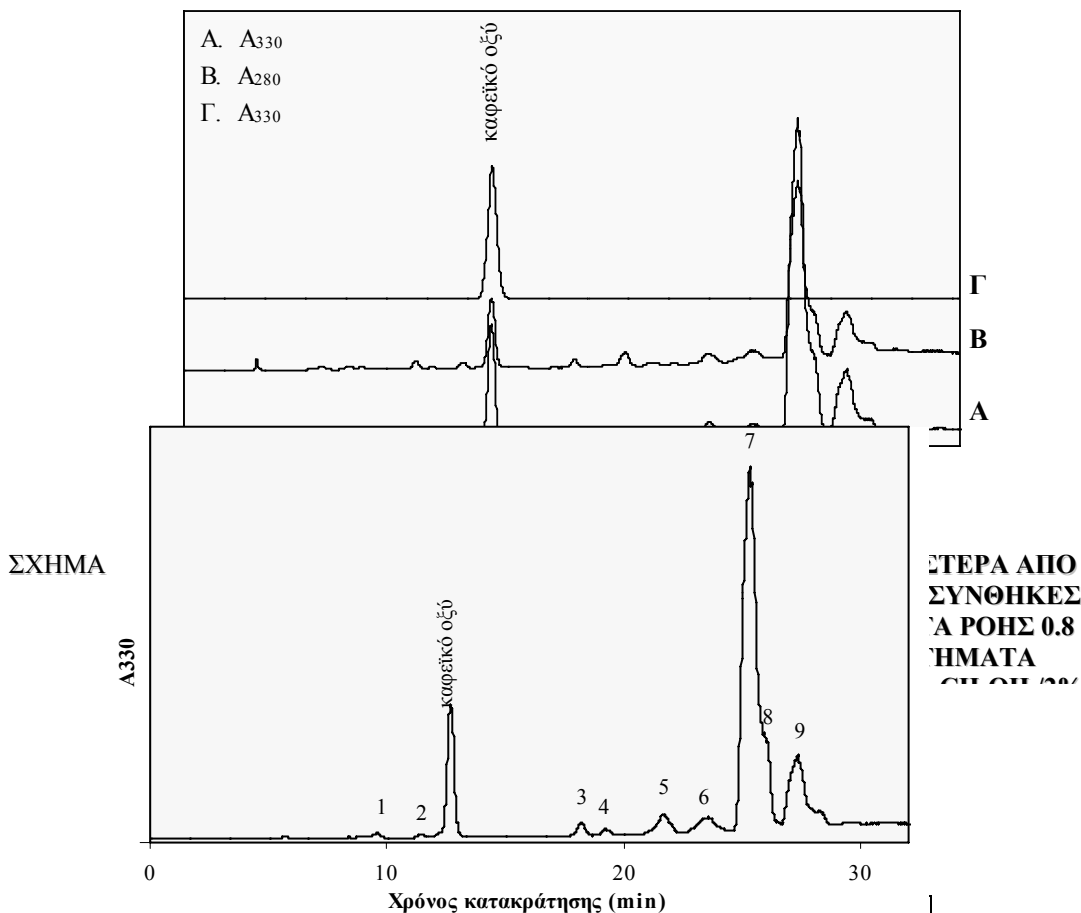
ροσμανόλη κάτω από την επίδραση οξυγόνου απλής κατάστασης $^1\text{O}_2$,^{31,32,33} τότε η διαφοροποίηση που παρατηρείται στην ποσότητα της ροσμανόλης δικαιολογείται απόλυτα ως αποτέλεσμα της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας τους καλοκαιρινούς μήνες, η οποία αυξάνει το οξειδωτικό stress στα φυτά και την παραγωγή $^1\text{O}_2$ από αυτά.^{23,55}



Σχήμα 13: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα από φασκόμηλο το οποίο έχει συλλεχθεί σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η ανίχνευση των συστατικών του εκχυλίσματος πραγματοποιείται στα 230 nm

3.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα από υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου

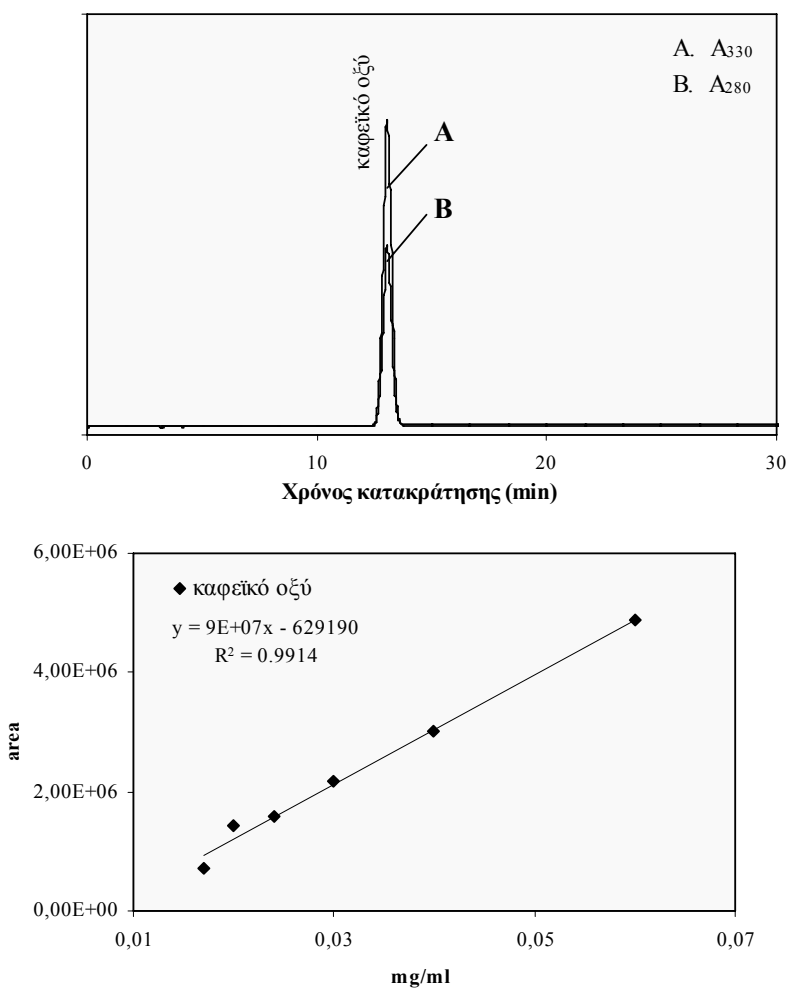
Στο Σχήμα 14 απεικονίζεται α) το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα, το οποίο έχει ληφθεί κάτω από βαθμιδωτές συνθήκες έκλουσης με ταχύτητα ροής 0.8 mL/min όπως περιγράφεται στο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας, και β) το αντίστοιχο χρωματογράφημα πρότυπης ένωσης καφεϊκού οξέος συγκέντρωσης 60 µg/mL. Η έκλουση των συστατικών του εκχυλίσματος παρακολούθηθηκε στα 280 nm και 330 nm, οι αναλύσεις, ωστόσο, πραγματοποιήθηκαν με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν στα 330 nm (Σχήμα 15), καθώς το καφεϊκό οξύ εμφανίζει μέγιστη απόκριση σ' αυτό το μήκος κύματος. Περαιτέρω προσπάθειες βελτίωσης της μεθόδου διαχωρισμού δεν έγιναν, καθώς, μέχρι το σημείο έκλουσης του καφεϊκού οξέος, η μέθοδος δεν εμφάνισε προβλήματα. Δεν ήταν δυνατή, όμως, η ποιοτική ανάλυση άλλων, εκτός του καφεϊκού οξέος, ενώσεων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αναλογία όγκων H₂O/CH₃OH μετά τα 25 min προσεγγίζει το 1:1, σημείο στο οποίο το μίγμα των διαλυτών αυτών εμφανίζει μέγιστο ιξώδες. Η θερμότητα λοιπόν που παράγεται, ευνοεί την απομάκρυνση του παγιδευμένου οξυγόνου από την κινητή φάση, υπό τη μορφή παρατηρούμενων φυσαλίδων οι οποίες συμβάλλουν στην προβληματική έκλουση των συστατικών. Στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης των αριθμημένων κορυφών του Σχήματος 15.



ΣΧΗΜΑ 15: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΑΦΨΗΜΑ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ, ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΤΑΙ ΜΕΣΩ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΟΡΑΤΟΥ/ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΣΤΑ 330 ΝΜ.

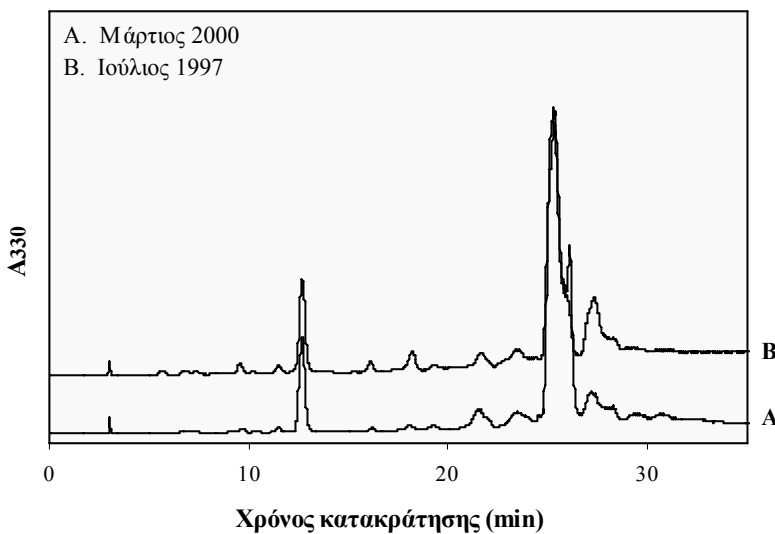
Αριθμός κορυφής	Χρόνος κατακράτησης (min) ± SD
1	9.56 ± 0.01
2	11.56 ± 0.13
Καφεϊκό οξύ	12.77 ± 0.14
3	18.30 ± 0.11
4	19.38 ± 0.09
5	21.74 ± 0.18
6	23.62 ± 0.11
7	25.39 ± 0.14
8	26.15 ± 0.25
9	27.42 ± 0.07

Στο Σχήμα 16 απεικονίζεται α) το χρωματογράφημα πρότυπης ένωσης καφεϊκού οξέος, το οποίο παρακολουθείται στα 280 nm και 330 nm και β) η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει για την ένωση αυτή, λαμβανόμενη μετά από την εισαγωγή διαφόρων συγκεντρώσεων (17.14 µg/mL - 60 µg/mL) καφεϊκού οξέος στη στήλη χρωματογραφίας και ανίχνευση στα 330 nm. Όπως φαίνεται, το καφεϊκό οξύ εμφανίζει μέγιστο απόκρισης στα 330 nm. Η αντίστοιχη ένωση στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, η οποία πιστοποιείται ως καφεϊκό οξύ, εμφανίζει ανάλογη συμπεριφορά με την πρότυπη ένωση σε σχέση με την απόκριση στα δύο διαφορετικά μήκη κύματος.

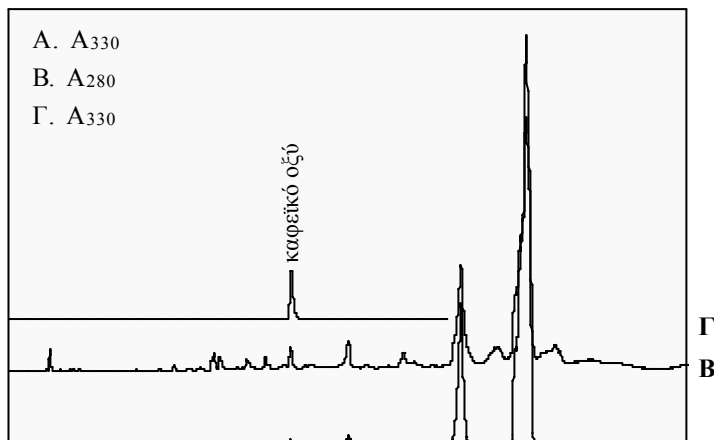


ΣΧΗΜΑ 16: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΚΑΦΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ

Στο Σχήμα 17 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα από φασκόμηλο, το οποίο συλλέχθηκε την περίοδο του καλοκαιριού του 1997 (Ιούλιος) και της άνοιξης του 2000 (Μάρτιος) και παρακολούθηθηκε στα 330 nm. Όπως διαπιστώνεται, η ποσοτική σύσταση του εκχυλίσματος δεν διαφέρει σημαντικά εκτός από τις ενώσεις που εκλύονται μετά τα 25 λεπτά, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται και στην προβληματική έκλυση των συστατικών. Η ποσότητα του καφεϊκού οξέος που ανιχνεύεται δεν διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων του εκχυλίσματος φασκόμηλου που έχει συλλεχθεί τις δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους.



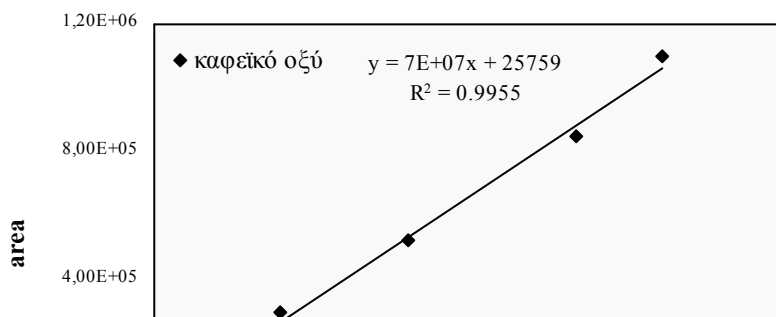
3.6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος 1-βουτανόλης
Επίπλευτικό εκχύλισμα φασκόμηλου
 Στο Σχήμα 18 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα από φασκόμηλο, το οποίο λαμβάνεται κάτω από βαθμιαίες συνθήκες εκτόξευσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 0.8 mL/min και β) το αντίστοιχο χρωματογράφημα πρότυπης ένωσης καφεϊκού οξέος συγκέντρωσης 24 μg/mL. Η έκλυση των συστατικών του εκχυλίσματος παρακολούθηθηκε στα 280 nm και 330 nm. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση στοιχεία που συλλέχθηκαν στα 330 nm, όπου το καφεϊκό οξύ εμφανίζει μέγιστο απόκριση. Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης των αριθμημένων κορυφών του Σχήματος 19. Όπως και στην περίπτωση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα, η χρησιμοποίηση βαθμιαίας έκλυσης εμφάνισε προβληματικά εκλούμενες κορυφές συστατικών, μετά από 30 min από την εισαγωγή του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη. Ωστόσο και στην περίπτωση αυτή δεν βελτιώθηκε η μέθοδος, εφόσον δεν ήταν δυνατή η ποιοτική ανάλυση ενώσεων εκτός του καφεϊκού οξέος.



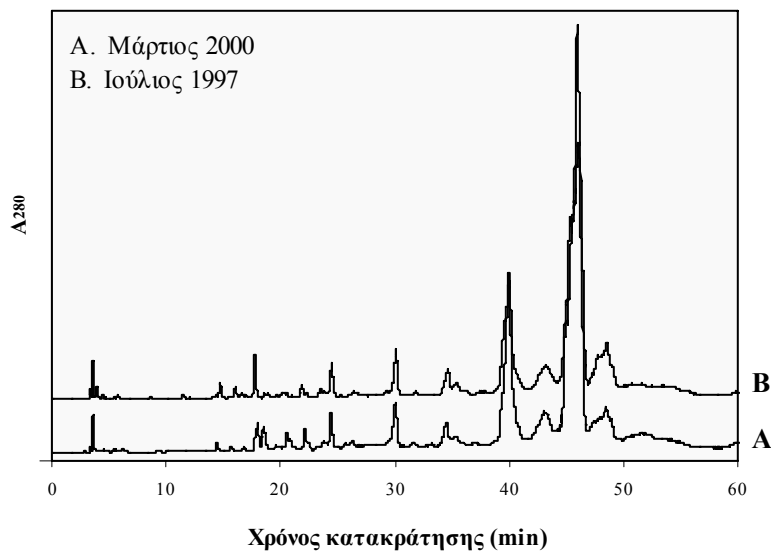
Πίνακας 5: Χρόνοι κατακράτησης των συστατικών του εκχυλίσματος της 1-βουτανόλης.

Αριθμός κορυφής	Χρόνος κατακράτησης (min) ± SD
1	17.33 ± 0.78
2	20.71 ± 0.49
3	22.47 ± 0.57
4	24.04 ± 0.32
Καφεϊκό οξύ	25.09 ± 0.32
5	30.22 ± 0.50
6	35.69 ± 0.70
7	41.07 ± 0.77
8	43.86 ± 0.61
9	46.82 ± 0.84
10	49.54 ± 0.88

Στο Σχήμα 20 απεικονίζεται η καμπύλη αναφοράς για το καφεϊκό οξύ, η οποία προκύπτει από την ειγασωγή καφεϊκού οξέος διαφόρων συγκεντρώσεων (4 µg/mL - 24 µg/mL) στη χρωματογραφική στήλη και ανίχνευση στα 330 nm.



Τα χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων 1-βουτανόλης από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί την περίοδο του καλοκαιριού του 1997 (Ιούλιος) και της άνοιξης του 2000 (Μάρτιος), φαίνονται στο σχήμα 21. Όπως διαπιστώνεται, σημαντικές μεταβολές στην ποσοτική σύσταση του εκχυλίσματος δεν παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων φασκόμηλου που έχουν συλλεχθεί τις δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους.

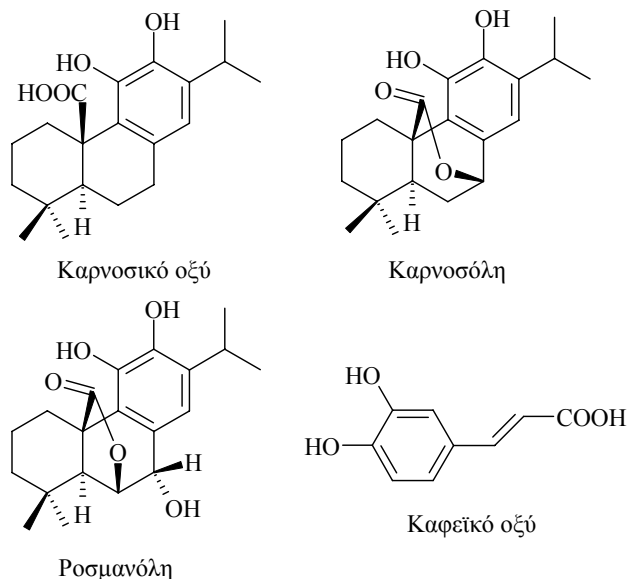


Σχήμα 21: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος 1-βουτανόλης από φασκόμηλο, το οποίο έχει συλλεχθεί σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η ανίχνευση των συστατικών του εκχυλίσματος πραγματοποιείται στα 280 nm

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση της HPLC, τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα εμφανίζονται συχνά πολύπλοκα και τα συστατικά των εκχυλισμάτων συχνά δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών τέτοιων εκχυλισμάτων αποδεικνύεται επίπονη και μακροχρόνια διαδικασία, καθώς, πρότυπες ενώσεις δεν είναι πάντα εμπορικά διαθέσιμες. Στην παρούσα εργασία έγινε μία πρώτη προσπάθεια διαχωρισμού, ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των συστατικών του αφεψήματος του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστές ανάλογες αναλύσεις φυτικών εκχυλισμάτων οι οποίες εστιάζονται στον προσδιορισμό συστατικών σε διάφορα τμήματα φυτών (φύλλα – ρίζες). Η παρούσα εργασία εστίαστηκε στον προσδιορισμό των συστατικών που περιέχονται στο αφέψημα του φασκόμηλου, καθώς αυτά καταναλώνονται και είναι υπεύθυνα για την εκδηλούμενη *in vitro* αντιοξειδωτική δραστηριότητα του αφεψήματος. Για την απλοποίηση του διαχωρισμού του μεγάλου αριθμού ενώσεων που περιέχονται στο αφέψημα του φασκόμηλου, πραγματοποιήθηκε μία προκαταρκτική κατανομή τους σε τέσσερις οργανικούς διαλύτες. Η επιλογή των διαλυτών έγινε με βάση α) τη μη-αναμιξιμότητά τους με το H₂O ώστε να είναι δυνατή η εκχύλιση και η ανάκτηση των συστατικών από το H₂O και β) τη σχετική ευκολία με την οποία μπορεί ο διαλύτης να απομακρυνθεί από τα λαμβανόμενα συστατικά. Με βάση τη διαδικασία αυτή επιτεύχθηκε αρκετά ικανοποιητικός διαχωρισμός των συστατικών με χρησιμοποίηση HPLC. Μεταξύ των συστατικών που αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά περιλαμβάνονται τέσσερις ενώσεις: η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, η ροσμανόλη και το καφεϊκό οξύ, των οποίων η δομή φαίνεται στο Σχήμα 1. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση των ενώσεων αυτών από δείγματα αφεψήματος φασκόμηλου, το οποίο έχει συλλεχθεί από την ίδια περιοχή, σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, τον Ιούλιο του 1997 και το Μάρτιο του 2000. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των αφεψημάτων του φασκόμηλου, όσον αφορά τη ροσμανόλη και το καρνοσικό οξύ (P<0.05). Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε μία αυξημένη κατά 78.8 % ποσότητα καρνοσικού οξέος και κατά 55.6 % ποσότητα ροσμανόλης στο αφέψημα φασκόμηλου το οποίο έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997.

Διαφορές δεν παρατηρήθηκαν στις ποσότητες της καρνοσόλης και του καρνοσικού οξέος ($P > 0.05$).



Σχήμα 1: Συστατικά από το αφέψημα του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.) τα οποία αναλύθηκαν με χρήση της HPLC.

Η ευαισθησία των διτερπενίων καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ έναντι φωτός οξυγόνου και θέρμανσης, καθώς και η αλληλομετατροπή τους, έχει δειχθεί στο παρελθόν.^{31,52,53,54} Η αντίστροφη γραμμική σχέση μεταξύ των ποσοτήτων των ενώσεων αυτών σε δείγματα φασκόμηλου που έχει συλλεχθεί το Μάρτιο του 2000, υποστηρίζει μία πιθανή μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη. Η μετατροπή αυτή πιθανώς να συμβαίνει σύμφωνα με τους βιβλιογραφικά προτεινόμενους μηχανισμούς.^{31,53} Αλλά και η απουσία ανάλογης σχέσης σε δείγματα φασκόμηλου που έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997 δεν αντιτίθεται στον ισχυρισμό αυτόν, καθώς, έχει αναφερθεί ότι τα φυτά τους καλοκαιρινούς μήνες βρίσκονται σε καταστάσεις οξειδωτικού stress λόγω της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας και θερμότητας. Ο παράγοντας του οξειδωτικού stress έχει υποστηριχθεί ότι συμβάλλει σε περαιτέρω διαφοροποίηση των διτερπενίων που περιέχονται στα φυτά. Ειδικά στην περίπτωση του καρνοσικού οξέος, έχει αναφερθεί ο σχηματισμός ενώσεων, όπως η ροσμανόλη, υπό την επίδραση οξυγόνου απλής

κατάστασης $^{18}\text{O}_2$.^{31,32,33} Αν όντως σχηματίζεται ροσμανόλη από το καρνοσικό οξύ υπό την επίδραση του $^{18}\text{O}_2$, το οποίο παράγεται όταν το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού stress, αυτό δικαιολογεί με τη σειρά του την αυξημένη ποσότητα ροσμανόλης που ανιχνεύθηκε στα δείγματα φασκόμηλου που έχει συλλεχθεί τον Ιούλιο του 1997, σε σχέση με αντίστοιχα δείγματα φασκόμηλου που έχουν συλλεχθεί το Μάρτιο του 2000. Τα παραπάνω υποδεικνύουν μία σημαντική βιοσυνθετική σπουδαιότητα των αναφερόμενων διτερπενίων για το φυτό του φασκόμηλου, το οποίο πιθανώς συνθέτει ανάλογες ενώσεις ως άμυνα έναντι αυξημένων καταστάσεων οξειδωτικού stress. Άλλωστε, η παρόμοια δομική διαμόρφωση του καρνοσικού οξέος, της καρνοσόλης και της ροσμανόλης, πιθανώς υποδηλώνει μία κοινή βιοσυνθετική οδό και παρόμοιους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αποδεικνύεται λοιπόν ότι, το αφέψημα του φασκόμηλου περιέχει και συστατικά με λιπόφιλο χαρακτήρα, τα οποία μπορούν να προστατεύσουν λιπόφιλα υποστρώματα από οξειδώσεις, όπως τα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό επιβεβαιώθηκε κατά τη μελέτη της *in vitro* αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αφειψημάτων έναντι της οξείδωσης φωσφολιποειδών και λινελαϊκού οξέος στο Κεφάλαιο 2.

Για το διαχωρισμό των συστατικών του αφειψηματος του φασκόμηλου με χρήση της HPLC, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές κινητές φάσεις με ισοκρατικές ή βαθμιδωτές συνθήκες έκλουσης. Οι βαθμιδωτές συνθήκες έκλουσης χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μείωση της κατακράτησης μίας ένωσης σε μία υδρόφοβη στατική στοιβάδα, έτσι ώστε να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης και οι λαμβανόμενες, στο χρωματογράφημα, κορυφές να εμφανίζονται οξείες και συμμετρικές. Αυτό διευκολύνει την περαιτέρω ανάλυση κυρίως σε πολύπλοκα μίγματα ενώσεων, όπου πλήρης διαχωρισμός των συστατικών είναι δύσκολος να επιτευχθεί. Η ασυμμετρία και η σταδιακή αύξηση του πλάτους των κορυφών του Σχήματος 4, είναι ένα φαινόμενο το οποίο δεν οφείλεται αποκλειστικά στην εφαρμογή ισοκρατικών συνθηκών έκλουσης. Γενικά, η ασυμμετρία και το πλάτος μίας κορυφής είναι παράγοντες οι οποίοι αποδίδονται τόσο στη φυσική κατάσταση της χρωματογραφικής στήλης και την κατακράτηση μίας ένωσης, όσο και από το χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη στην κινητή φάση. Η εμφάνιση ασυμμετρίας στις κορυφές ενός χρωματογραφήματος είναι συχνό φαινόμενο όταν το CH_3CN αποτελεί μέρος της κινητής φάσης. Το CH_3CN είναι ένωση, η οποία δεν έχει την ικανότητα να

σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου. Έτσι, οι ελεύθερες ομάδες $-Si-OH$ του υλικού πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης, είναι διαθέσιμες για αλληλεπίδραση με τις ενώσεις προς διαχωρισμό. Από την άλλη μεριά, η CH_3OH , καθώς σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, συνεισφέρει στην ‘επικάλυψη’ των ομάδων $-Si-OH$ του υλικού πλήρωσης και έτσι στη μείωση της αλληλεπίδρασης αυτών με συστατικά προς διαχωρισμό. Παρ’ όλα αυτά, το CH_3CN προτιμάται ως μέρος της κινητής φάσης, καθώς, αυτό και τα μίγματά του με το H_2O , εμφανίζουν μικρότερο ιξώδες σε σχέση με άλλους χρησιμοποιούμενους, στην HPLC, διαλύτες. Η χρησιμοποίησή του σε ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης των συστατικών του εκχυλίσματος του εξανίου από το φασκόμηλο, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα διαχωρισμού. Η χρήση βαθμιδωτών συνθηκών έκλουσης, από την άλλη μεριά, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, δεν έδωσε επαναλήψιμα αποτελέσματα, αλλά μάλλον συνέβαλλε στην προβληματική έκλουση των συστατικών από τη χρωματογραφική στήλη. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα, οι βαθμιδωτές συνθήκες έκλουσης είχαν το επιπρόσθετο μειονέκτημα του ‘φτωχού’ διαχωρισμού των συστατικών που εκλούνται μετά τα 20 λεπτά και του μεγάλου χρόνου ανάλυσης σε σχέση με την εφαρμογή ισοκρατικών συνθηκών έκλουσης. Οι τελευταίες συνθήκες μάλιστα, μείωσαν το χρόνο ανάλυσης πρακτικά στο μισό. Η εφαρμογή βαθμιδωτών συνθηκών έκλουσης στην περίπτωση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλης, εμφάνισε προβλήματα μετά την έκλουση του καφεϊκού οξέος. Καθώς μόνο το καφεϊκό οξύ ανιχνεύθηκε, οι χρωματογραφικές αυτές συνθήκες δεν εμπόδισαν την περαιτέρω ανάλυση του συστατικού αυτού.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών στα εκχυλίσματα από το αφένημα του φασκόμηλου, έδωσαν επαναλήψιμα αποτελέσματα όσον αφορά το χρόνο κατακράτησης των συστατικών στη στήλη, με εξαίρεση το εκχύλισμα της 1-βουτανόλης. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες έκλουσης των εκχυλισμάτων εξανίου, διαιθυλαιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα, έδωσαν χρόνους κατακράτησης των συστατικών, με τυπική απόκλιση $\leq 1\%$, ενώ στην περίπτωση της 1-βουτανόλης η τυπική απόκλιση έφτασε τα 4 %. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να παραβλεφθεί το γεγονός ότι η κατακράτηση στη χρωματογραφική στήλη είναι συνάρτηση παραγόντων όπως: α) η θερμοκρασία της στήλης, η οποία σταδιακά αυξάνει λόγω της ροής της

κινητής φάσης και β) η σύσταση της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα, μεταβολές στη θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης είναι δυνατό να επιφέρουν σφάλματα στο χρόνο κατακράτησης της τάξης του 1-2.5 % ανά 1 °C. Επίσης, 1 % σφάλμα στη σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να οδηγήσει σε σφάλμα στο χρόνο κατακράτησης της τάξης του 7-15 %.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα τα οποία μπορούν να εξαχθούν κατά το διαχωρισμό, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του αφεψήματος του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.), μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

1. Το αφέψημα του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.) περιέχει τα διτερπένια καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και ροσμανόλη, και το φαινολικό οξύ, καφεϊκό οξύ.
2. Συνολικά, το αφέψημα του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.) φαίνεται να περιέχει τουλάχιστον 57 κύρια συστατικά.
3. Η εποχή συλλογής του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.) επηρεάζει τη σύσταση του αφεψήματος όσον αφορά τα διτερπένια καρνοσικό οξύ και ροσμανόλη.
4. Μία πιθανή αλληλομετατροπή των διτερπενίων καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και ροσμανόλη υφίσταται, υποδεικνύοντας μία βιοσυνθετική σπουδαιότητά τους για την προστασία του φυτού έναντι καταστάσεων οξειδωτικού stress.
5. Ο λιπόφιλος χαρακτήρας των διτερπενίων, που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, ενισχύει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του αφεψήματος έναντι οξειδώσεων που αφορούν λιπόφιλα υποστρώματα, όπως τα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών.
6. Η χρησιμοποίηση ισοκρατικών συνθηκών έκλουσης κινητής φάσης, η οποία περιέχει CH_3CN ως οργανικό διαλύτη, αποδείχθηκε γρήγορη και επαναλήψιμη μέθοδος σε σχέση με τη χρήση βαθμίδωσης της συγκέντρωσης της κινητής φάσης, η οποία περιέχει CH_3OH .

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η μελέτη της οποίας η περιγραφή έγινε στα προηγούμενα τρία κεφάλαια, είχε ως γενικότερο σκοπό τη συμβολή σ' ένα ευρύ πεδίο έρευνας, το οποίο περιλαμβάνει τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας φυσικών προϊόντων έναντι της δράσης ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Η σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων που εξάγονται από παρόμοιες μελέτες, πηγάζει από τη συσχέτιση χαμηλής νοσηρότητας και θνησιμότητας από χρόνιες παθήσεις, ιδιαίτερα στην περιοχή της Μεσογείου, καθώς έτσι, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που εμφανίζει μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων, αναγνωρίζεται πλέον ως μία από τις σημαντικότερες αιτίες που υποστηρίζουν τις συσχετίσεις αυτές. Μεγάλη βαρύτητα στις μελέτες παραδοσιακής διατροφής και πρόληψης χρόνιων παθήσεων, έχει δοθεί στην ευρεία κατανάλωση ελαιολάδου, φρούτων και λαχανικών, πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά και βιταμίνες. Ωστόσο, πολύ λίγα αναφέρονται στη συνεισφορά του μεγάλου αριθμού βοτάνων και αρωματικών φυτών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως αρτύματα στη μεσογειακή διατροφή ή ως θεραπευτικά μέσα στην παραδοσιακή ιατρική. Παρ' όλο που τα βότανα και αρωματικά φυτά, συγκριτικά, δεν αποτελούν πολύ μεγάλο ποσοστό της διατροφής, δεν μπορούμε να παραβλέψουμε το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται σε σημαντικές ποσότητες. Η πιθανή συνεισφορά τους, λοιπόν, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν πραγματοποιούνται μελέτες σχετικές με τη διατροφή και την αντιοξειδωτική κατάσταση στον οργανισμό.

Αφεψημάτα αρωματικών φυτών τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παραδοσιακή ιατρική και διατροφή γενικότερα, φάνηκε να εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα *in vitro*. Η επίδραση των συστατικών των αφεψημάτων *in vivo* δεν είναι απόλυτα γνωστή, εφόσον, γνωρίζουμε λίγα για τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ωστόσο, επιτεύχθηκε πρόοδος προς την κατεύθυνση αυτή με την εισαγωγή ενός μοντέλου συστήματος που προβλέπει την ύπαρξη και άλλων διατροφικών συστατικών, τα οποία μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα αντιοξειδωτικά συστατικά, και μελετά τη δραστηριότητα στα προκαταρκτικά στάδια του μεταβολισμού, δηλαδή της πέψης. Εξίσου σημαντική εμφανίζεται η διασαφήνιση της χημικής σύστασης των φυσικών προϊόντων, υπεύθυνης για την εκδηλούμενη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, η οποία στον ελάχιστο βαθμό που ήταν εφικτό επιτεύχθηκε για το αφέψημα του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*

L.). Η γνώση της χημικής δομής των αντιοξειδωτικών συστατικών των φυσικών προϊόντων καθιστά δυνατή τη μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο αυτά επιδεικνύουν τη δραστηριότητά τους έναντι των ROS, καθώς και του βαθμού δραστηριότητας σε σχέση με ήδη γνωστά φυσικά ή συνθετικά αντιοξειδωτικά συστατικά.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Ternay A.L. and Sorokin V. **1999**. Redox, Radicals, and Antioxidants In “Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals”, (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 1-21.
2. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Oxygen is a toxic gas-an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 1-35.
3. Acworth I.N., McCabe D.R. and Maher T. **1997**. The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants In “Oxidants, Antioxidants and Free Radicals”, (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 23-77.
4. Halliwell B. and Chirico S. **1993**. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715S-725S.
5. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. **1986**. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2, 501-514.
6. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1992**. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS*, 307, 108-112.
7. Oldham K.M. and Bowen P.E. **1998**. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial? *J. Am. Diet Assoc.*, 98,1001-1008.
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., and Cross C.E. **1992**. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 598-620.
9. Halliwell B. **1994**. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*, 344, 721-714.
10. McGrath J.J. **1997**. Oxidant injury from inhaled particulate matter In “Oxidants, Antioxidants and Free Radicals”, (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 273-290.
11. Halliwell B. and Aruoma O.I. **1997**. Free Radicals and Antioxidants: The Need for *in vivo* Markers of Oxidative Stress In “Antioxidant Methodology: *In vivo* and *in vitro* Concepts”, (Aruoma O.I. and Cuppett S.L.H. Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois., pp 1-22.

12. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Reactive Species as Useful Biomolecules In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 430-484.
13. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. The Chemistry of Free Radicals and Related Reactive Species In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 36-104.
14. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Oxidative Stress and Antioxidant Protection: Some special Cases In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 485-543.
15. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Antioxidant Defenses in Free Radicals In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 105-245.
16. Henle E.S. and Linn S. **1997**. Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 272, 19095-19098.
17. Colton C. and Zakhari S. **1997**. Role of free radicals in alcohol-induced tissue injury In “Oxidants, Antioxidants and Free Radicals”, (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 259-271.
18. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Oxidative stress: Adaptation, damage, repair and death In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 246-350.
19. Farooqui A.A., Horrocks L.A. and Farooqui T. **2000**. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106, 1-29.
20. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Free radicals, other reactive species and disease In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 617-783.
21. Spiteller G. **1998**. Linoleic acid peroxidation-the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein-and its relationship to chronic diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 95, 105-162.

22. Noguchi N. and Niki E. **1999**. Chemistry of active oxygen species and antioxidants In "Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health", (Papass A.M. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 3-20.
23. Hall C.A. and Cuppett S.L. **1997**. Structure-Activities of Natural Antioxidants In "Antioxidant Methodology: *In vivo* and *in vitro* Concepts", (Aruoma O.I. and Cuppett S.L. Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 141-172.
24. Muriel P. **1997**. Peroxidation of lipids and liver damage In "Oxidants, Antioxidants and Free Radicals", (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 237-257.
25. Minotti G. and Aust S.D. **1992**. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27, 219-226.
26. Slater T.F. **1984**. Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 105, 283-293.
27. Minotti G. and Aust S.D. **1987**. The requirement for iron(III) in the initiation of lipid peroxidation by iron(II) and hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 1098-1104.
28. Somani S.M., Husain K. and Schlorff E.C. **1997**. Response of antioxidant system to physical and chemical stress In "Oxidants, Antioxidants and Free Radicals", (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 125-141.
29. Papass A.M. **1999**. Determinants of Status in Humans In "Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health", (Papass A.M. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 21-36.
30. Nawar W.W. **1996**. Lipids In "Food Chemistry", (Fennema O. Ed.), 3rd ed., Marcell Dekker, N.Y., pp 254-313.
31. Gonzalez A., Andres L., Aguiar Z. and Luis J. **1992**. Diterpenes from *Salvia mellifera* and their biogenetic significance. *Phytochemistry*, 31, 1297-1305.
32. Gonzalez A., Rodriguez C. and Luis J. **1988**. Oxidation reactions of carnosic acid derivatives. *J. Chem. Research (M)*, 1141-1156.
33. Luis J., Andres L. and Fletcher W. **1994**. Chemical evidence for the participation of a peroxide intermediate in the reaction of singlet oxygen with mono-olefins in relationship with the biogenetic pathway to highly oxidized abietane diterpenes. *Tetrahed. Lett.*, 35, 179-182.

34. Cseke L.J. and Kaufman P.B. **1999**. How and Why These Compounds are Synthesized by Plants In “Natural Products from Plants”, (Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A. and Brielmann H.L. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 37-90.
35. Brielmann H.L. **1999**. Phytochemicals: The Chemical Components of Plants In “Natural Products from Plants”, (Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A. and Brielmann H.L. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 1-36.
36. Bors W., Heller W. and Michel C. **1998**. The Chemistry of Flavonoids, In “Flavonoids in health and Disease”, (Rice-Evans C.A. and Packer L. Ed.), Marcel Dekker, INC, N.Y., pp 111-136.
37. Larson R.A. **1997**. Phenolic and Enolic Antioxidants In “Naturally Occurring Antioxidants”, (Larson R.A. Ed.), Lewis Publishers, N.Y., pp 83-126.
38. Aruoma O.I., Halliwell. B. and Williamson G. **1997**. *In vitro* Methods for Characterizing Potential Prooxidant and Antioxidant Actions of nonnutritive Substances in Plant Foods In “Antioxidant Methodology: *In vivo* and *in vitro* Concepts”, (Aruoma O.I. and Cuppett S.L. Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 173-204.
39. Pietta P. **1998**. Flavonoids in Medicinal Plants In “Flavonoids in health and Disease”, (Rice-Evans C.A. and Packer L. Ed.), Marcel Dekker, INC, N.Y., pp 61-110.
40. Duke J.A. and Bogenschutz-Godwin M.J. **1999**. The Synergy Principle at Work in Plants, Pathogens, Insects, Herbivores and Humans In “Natural Products from Plants”, (Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A. and Brielmann H.L. Ed.), CRC Press LLC N.Y., pp 183-205.
41. Rice-Evans C.A., Miller N.J., van Acker S.A.B.E., van der Vijgh W.J.F., Bast A., Leake D.S., Terao J., Piskula M.K., Briviba K., Sepulveda-Boza S., Zilliken F.W. and Sies H. **1998**. Antioxidant Activities In “Flavonoids in health and Disease”, (Rice-Evans C.A. and Packer L. Ed.), Marcel Dekker, INC, N.Y., pp 199-302.
42. Bors W., Werner H., Michel C., and Saran M. **1990**. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.*, 186, 343-355.
43. Wang P.F. and Zheng R.L. **1992**. Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 63, 37-40.

44. Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. and Rice-Evans C. **1995**. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 339-346.
45. Cheng I.F. and Breen K. **2000**. On the ability of four flavonoids, baiclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*, 13, 77-83.
46. Arora A., Nair M.G. and Strasburg G.M. **1998**. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad. Biol. Med.*, 24, 1355-1363.
47. Morel I., Cillard P and Cillard J. **1998**. Flavonoid-Metal Interactions in Biological Systems In "Flavonoids in health and Disease", (Rice-Evans C.A. and Packer L. Ed.) Marcel Dekker, INC, N.Y., pp 163-177.
48. Rice-Evans C.A. and Miller N.J. **1998**. Structure-Antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Isoflavonoids In "Flavonoids in health and Disease", (Rice-Evans C.A. and Packer L. Ed.), Marcel Dekker, INC, N.Y., pp 199-219.
49. Richeimer S.L., Bernart M.W., King G.A., Kent M.C. and Bailey D.T. **1996**. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 507-514.
50. Cuvelier M.E., Berset C. and Richard H. **1994**. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 42, 665-669.
51. Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R. and Löliger J. **1992**. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22, 257-268.
52. Okamura N., Fujimoto Y., Kuwabara S. and Yagi A. **1994**. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 679, 381-386.
53. Wenkert E., Fuchs A. and McChesney J.D. **1965**. Chemical artifacts from the family *Labiatae*. *J. Org. Chem.*, 30, 2931-2934.
54. Gonzalez A., Rodriguez C. and Luis J. **1988**. Oxidation reactions of carnosic acid derivatives. *J. Chem. Research (S)*, 114-115.

55. Munne-Bosch S., Schwarz K. and Alegre L. **1999**. Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L.: New insights into the function of diterpenes in plants. *Free Rad. Res.*, 31, S107-S112.
56. Papas A.M. **1999**. Diet and Antioxidant Status In “Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health”, (Papas A.M. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 89-106.
57. Yoshikawa T., Minamiyama Y., Ichikawa H., Takahashi S., Naito Y. and Kondo M. **1997**. Role of lipid peroxidation and antioxidants in gastric mucosal injury induced by the hypoxanthine-xanthine oxidase system in rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 23, 243-250.
58. Tavani A. and La Vecchia C. **1995**. Fruit and vegetable consumption and cancer risk in a Mediterranean population. *Am. J. Clin. Nutr.* 61(suppl.): 1374S-1377S.
59. Renaud S., de Lorgeril M., Delaye J., Guidollet J., Jacquard F., Mamelle N., Martin J.L., Mnjaud I., Salen P. and Toubol P. **1995**. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61(suppl.), 1360S-1367S.
60. Handelman G.J. and Pryor W.A. **1999**. Evaluation of Antioxidant Status in Humans In “Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health”, (Papas A.M. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 37-62.
61. Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B. and Kromhout D. **1993**. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
62. Trichopoulou A., Lagiou P. and Papas A.M. **1999**. Mediterranean Diet: Are Antioxidants Central to Its Benefits? In “Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health”, (Papas A.M. Ed.), CRC Press LLC, N.Y., pp 107-129.
63. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. **1995**. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61 (suppl), 1402S-1406S.
64. Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. **1999**. Detection of free radicals and other reactive species: trapping and fingerprinting In “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd ed., Oxford University Press Inc. N.Y., pp 351-429.
65. Aruoma O.I. **1994**. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Meth. Enzymol.*, 233, 57-66.

66. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
67. Larson R.A. **1997**. Autooxidizable substances: Weathering In “Naturally Occurring Antioxidants”, (Larson R.A. Ed.), Lewis Publishers, N.Y., pp 1-24.
68. Kneepkens C.M.F. **1997**. Assessment of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Humans: The Hydrocarbon Breath Test In “Antioxidant Methodology: *In vivo* and *in vitro* Concepts”, (Aruoma O.I. and Cuppett S.L. Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 23-38.
69. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Aruoma O.I. **1987**. The Deoxyribose Method: A Simple “Test Tube” Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Anal. Biochem.*, 165, 215-219.
70. Diplock A.T. **1991**. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 189S-193S.
71. Hanasaki Y., Ogawa S., and Fukui S. **1994**. The correlation between oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 845-850.
72. Sies H., and Stahl W. **1995**. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (Suppl. 6), 1315S-1321S.
73. Kählönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S. and Heinonen M. **1999**. Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3954-3962.
74. Møller J.K.S., Lindberg-Madsen H., Aaltonen T., Skibsted L.H. **1999**. Dittany (*Origanum Dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215-219.
75. Fukuzawa K. and Fujii T. **1992**. Peroxide dependent and independent lipid peroxidation: Site-specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by α -tocopherol. *Lipids*, 27, 227-233.
76. Jia Z.S. Zhou B., Vang L., Liu Z.L. **1998**. Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induces peroxidation of linoleic acid in solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 911-915.

77. Thomas C.E., McLean L.R., Parker R.A and Ohlweiler D.F. **1992**. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids*, 27, 543-550.
78. de Kok T.M.C.M., ten Vaarwerk F., Wingman I.Z., van Maanen J.M.S. and Kleinjans J.C.S. **1994**. Peroxidation of linoleic, arachidonic and oleic acid in relation to the induction of oxidative DNA damage and cytogenetic effects. *Carcinogenesis*, 15, 1399-1404.
79. Aruoma O.I., Halliwell B., Lomgton M.J., Quinlan G.J. and Gutteridge J.M.C. **1989**. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem. J.*, 285, 617-620.
80. Thiemer V.K., Stadler R. and Isaac O. **1972**. Biochemische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. *Arzneimittel Forderung*, 22, 1086-1087.
81. Shale T.L., Stirk W.A. and van Staden J. **1999**. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 67, 347-354.
82. de Rojas V.R.S., Somoza B., Ortega T. and Villar A.M. **1996**. Isolation of Vasodialtory Active flavonoids from the Traditional Remedy Satureja obovata. *Planta Medica*, 62, 272-274.
83. Matzapetakis M., Raptopoulou C. R., Tsochos A., Papaefthymiou V., Moon N. and Salifoglou A. **1998**. Synthesis, Spectroscopic and Structural Characterization of the First Mononuclear Water Soluble Iron Citrate Complex, $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *J. Am. Chem. Soc.*, 50, 13266-13267.
84. Gutteridge J.M.C. **1977**. The measurement of malondialdehyde in peroxidised ox-brain phospholipid liposomes. *Anal. Biochem.*, 82, 76-82.
85. Koppenol W.H. and Butler J. **1985**. Energetics of interconversion reactions of oxyradicals. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, 1, 91-131.
86. Aust S.D., Morehouse L.A. and Thomas C.E. **1985**. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1, 3-25.
87. Powell S.R. and Tortolani A.J. **1992**. Recent advances in the role of reactive oxygen intermediates in ischemic injury. *J. Surg. Res.*, 53, 417-429.

88. Koppenol W.H. **1994**. Chemistry of iron and copper in chemical reactions. *New Comprehensive Biochemistry*, 28, 3-24.
89. Slater M.J. and Slater T.F. **1987**. Studies on the metal-ion and lipoygenase-catalyzed breakdown of hydroperoxides using electron spin resonance spectroscopy. *Biochemical Journal*, 245, 167-173.
90. Eyerman, L.S., Clydesdale, F.M., Huguenin, R., and Zajicek, O.T. **1987**. Characterization of solution properties of four iron sources in model systems by solubility studies and IR/Vis reflectance spectroscopy. *J. Food Sci.* 52, 197-201, 209.
91. Lippard S.J. and Berg J.M. **1994**. Principles of Bioinorganic Chemistry. University Science Books, Mill Valley, California, pp. 21-42.
92. May P.M., Williams D.R. and Linder P.W. **1978**. Biological significance of low molecular weight iron(III) complexes. In "Metal Ions in Biological Systems" (Sigel H. Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, Vol. 7, pp. 30-76.
93. Yen G.C., and Chen H.Y. **1994**. Comparison of antimutagenic effect of various tea extracts (green, oolong, pouchong, and black tea). *J. Food Protect.*, 57, 54-58.
94. Obertreis B., Giller K., Teucher T., Behnke B. and Schmidt H. **1996**. Antiphlogistic effects of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Drug Res.*, 46, 52-56.
95. Guarrera P.M. **1999**. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J. Ethnopharmacol.*, 68, 183-192.
96. Duha P.D. and Yenb G.C. **1997**. Antioxidant activity of three herbal water extracts. *Food Chem.*, 60, 639-645.
97. Pamplona R., Portero-Otín M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A. and Barja G. **1999**. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 112, 169-183.
98. Sreejayan N and Von Ritter C. **1998**. Effect of bile acids on lipid peroxidation: The role of iron. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 50-56.

99. Jovanovic S.V., Simic M.G., Steenken S. and Hara Y. **1998**. Iron complexes of gallo catechins. Antioxidant action or iron regulation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2365-2369.
100. Sacks F.M., and Kass E.H. **1988**. Low blood pressure in vegetarians: effects of specific foods and nutrients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48 (Suppl 3), 795-800.
101. Dragsted L.O., Strube M., and Larsen J.C. **1993**. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, 72(Suppl. 1), 116-135.
102. Willett W.C. **1994**. Micronutrients and cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59 (Suppl. 5), 1162S-1165S.
103. Wang H., Cao G., and Prior R.L. **1996**. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 701-705.
104. Verlangieri A.J., Kapeghian J.C., el-Dean S., and Bush M. **1985**. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. *Med. Hypoth.*, 16, 7-15.
105. Yen G.C., and Chen H.Y. **1995**. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27-32.
106. Apostolides Z., Balentine D.A., Harbowy M.E., and Weisburger J.H. **1996**. Inhibition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) mutagenicity by black and green tea extracts and polyphenols. *Mutat. Res.*, 359, 159-163.
107. Isao T. **1990**. Preventive effects of tea on cancer. *Fragrance J.*, 5, 54-61.
108. Chang F.L., Wang M., Rivenson A., Iatropoulos M.J., Reinhardt J.C., Pittman B., Ho C.T., Amin S.G. **1998**. Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Fischer rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Res.*, 58, 4096-4101.
109. Chevion M. **1988**. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Rad. Biol. Med.*, 5, 27-37.
110. Vlachonikolis I.G., Philalithis A.E., Brittan Y, Georgoulas V. **1998**. Mortality from malignant neoplasms in Crete, 1992-1993. *Eur. J. Epidemiol. Community Health*, 52, 126-7.

111. Lionis C, Faresjo A, Skoula M, Kapsokefalou M, Faresjo T. **1998**. Antioxidant effects of herbs in Crete. *Lancet*, 352, 1987-1988.
112. Cao G., Sofic E., and Prior R.L. **1996**. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3426-3431.
113. Yen G.-C., and Chen H.-Y., Peng H.-H. **1997**. Antioxidant and prooxidant effects of various tea extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 30-34.
114. Van Campen D. **1983**. Iron bioavailability techniques: An overview. *Food Technol.*, 37, 127-132.
115. Miller D.D., Schriker B.R., Rasmussen R.R., and Van Campen D. **1981**. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2248-2256.
116. Rao B.S.N., and Prabhavathi T. **1978**. An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 169-175.
117. Kapsokefalou M., and Miller D.D. **1991**. Effect of meat and selective food components on the valence of the non-heme iron during the *in vitro* digestion. *J. Food Sci.*, 56, 352-355 & 358.
118. Glahn R.P., Lee O.A., Yeung A., Goldman M.I., and Miller D.D. **1998**. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr.*, 128, 1555-1561.
119. Gangloff M.B., Glahn R.P., Miller D.D. Van Campen R. **1996**. Assessment of iron availability using combined *in vitro* digestion and Caco-2 cell culture. *Nutr. Res.*, 16, 479-487.
120. Garrett D.A., Failla M.L. and Sarama R.J. **1999**. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4301-4309.
121. Matsingou T.C., Kapsokefalou M. and Salifoglou A. **2000**. *In vitro* antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Sci.*, in press.
122. Carter P. **1971**. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (Ferrozine). *Anal. Biochem.*, 40, 450-458.

123. Brune M., Hallberg L., and Skanberg A.B. **1991**. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *J. Food Sci.*, 56, 128-131,167.
124. Bradford M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
125. Frei B., Stocker R., England L., and Ames B.N. **1990**. Ascorbate: The most effective antioxidant in human blood plasma In Antioxidants in “Therapy and Preventive Medicine”, (Emerit I. Ed.), Plenum Press, New York, NY., pp. 155-163.
126. Giulivi C., and Cadenas, E. **1993**. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. Antioxidant and prooxidant aspects. *FEBS*, 332, 287-290.
127. Sakagami H., and Satoh K. **1996**. The interaction between two antioxidants, sodium ascorbate and gallic acid: radical intensity and apoptosis induction. *Anticancer Res.*, 16, 1231-1234.
128. Almaas R., Rootwelt T., Oyasaeter S., and Saugstad O.D. **1997**. Ascorbic acid enhances hydroxyl radical formation in iron-fortified infant cereals and infant formulas. *Eur. J. Pediatrics*, 156, 488-492.
129. Frei B., England L., and Ames B.N. **1989**. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6377-6381.
130. Ivan M., Jui P., and Hidirolou M. **1979**. The effects of nitrilotriacetic acid on solubilities of zinc, copper, manganese, and iron in the stomach of sheep. *Can. J. of Physiol. Pharmacol.*, 57, 369-374.
131. Motekaitis R.J., and Martell A.E. **1994**. The iron(III) complexes of nitrilotriacetic acid. *J. Coord. Chem.*, 31, 67-78.
132. Raymond K.N., Isied S.S. Brown L.D., Fronczek F.R. and Nibert J. H. **1976**. Coordination isomers of biological iron transport compounds. VI. Models of the enterobactin coordination site. A crystal field effect in the structure of potassium tris(catecholato)chromate(III) and -ferrate(III) sesquihydrates, $K_3[M(O_2C_6H_4)_3 \cdot 1.5H_2O]$, M = Cr, Fe. *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 1767-1774.
133. Albrecht-Gary A.M. and Crumbliss A.L. **1998**. Coordination Chemistry of Siderophores: Thermodynamics and kinetics of iron chelation and release In “metal

ions in biological systems” (Sigel A. and Sigel H. Ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp 239-327.

134. Karpishin T.B., Gebhard M.S., Solomon E.I. and Raymond K.N. **1991**. Spectroscopic studies of the electronic structure of iron(III)Tris(catecholates). *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 2977-2984.
135. Kowabata T., Schepkin V., Haramaki N., Phadke R.S. and Packer L. **1996**. Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Biochem. Pharmacol.*, 51, 1569-1577.
136. Lopes G.K.B., Schulman H.M. and Hermew-Lima M. **1999**. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1472, 142-152.
137. Gillooly M., Bothwell T.H., Torrance J.D., MacPhail A.P., Derman D.P., Bezwoda W.R., Mills W. and Charlton R.W. **1983**. The effect of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br. J. Nutr.*, 49, 331-342.
138. Halberg L. **1981**. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.*, 1, 123-147.
139. Gillooly M., Bothwell T.H., Charlton R.W., Torrance J.D., Bezwoda W.R., MacPhail A.P. and Derman D.P. **1984**. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *Br. J. Nutr.*, 51, 37-46.
140. Stocker R., McDonach A.F., Glazer A.N., and Ames B.N. **1990**. Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and Bilirubin. *Meth. Enzymol.*, 186, 301-309.
141. Curtis H. **1983**. The digestive system. In “Biology”, (Anderson S. Ed.), 4th Ed., Worth Publishers Inc. N.Y., pp. 671-687.
142. DeLange R.J., and Glazer A.N. **1990**. Bile acids: Antioxidants or enhancers of peroxidation depending on lipid concentration. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 276, 19-25.
143. Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J. and Halliwell B. **1996**. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and provençal herbs. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 449-456.

144. Djarmati Z., Jankov R.M., Schwirtlich E., Djulinac B. and Djordjevic A. **1991**. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 731-734.
145. Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C. and Ho C.T. **1998**. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4869-4873.
146. Skoula M., El Hilali I. and Makris A.M. **1999**. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem. System. Ecol.*, 27, 559-568.
147. Glasl S., Kastner U., Jurenitsch J. and Kubelka W. **1999**. Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B*, 729, 361-368.
148. Tsimidou M., Papadopoulos G. and Boskou D. **1992**. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.*, 44, 53-60.
149. Nardini M., Pisu P., Gentili V., Natella F., Di Felice M., Piccolella E. and Scaccini C. **1998**. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress in U937. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 1098-1105.
150. Meyer A.S., Heinonen M. and Frankel E.N. **1998**. Antioxidant interaction of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61, 71-75.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

I. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 1

I-VII

II. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2

VIII-XII

III. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 3

XIII

Πίνακας 1. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της οξειδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα (Σχ. 1, Κεφ. 1).

Απουσία ενζύμων της πέψης	Fe(III)	FeAA	FeNTA	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	(+)-Κατεχίνη	<i>Salvia fruticosa</i>	Μαύρο τσάι
Fe(III)		0.240788	0.222234	*0.011294	*0.003219	*0.005819	*0.000006	*0.000000
FeAA	0.240788		0.968842	0.368441	0.167478	0.110933	*0.006324	*0.000016
FeNTA	0.222234	0.968842		0.391667	0.180060	0.118458	*0.007050	*0.000018
<i>Coridothymus capitatus</i>	*0.011294	0.368441	0.391667					
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.003219	0.167478	0.180060					
(+)-Catechin	*0.005819	0.110933	0.118458					
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000006	*0.006324	*0.007050					
Μαύρο τσάι	*0.000000	*0.000016	*0.000018					

Παρουσία ενζύμων της πέψης	Fe(III)	FeAA	FeNTA	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	(+)-Κατεχίνη	<i>Salvia fruticosa</i>	Μαύρο τσάι
Fe(III)		*0.000088	*0.000054	*0.004158	*0.000612	0.175448	0.104706	0.951387
FeAA	*0.000088		0.900083	0.190652	0.310184	0.107069	*0.036443	*0.000541
FeNTA	*0.000054	0.900083		0.150964	0.250468	0.087533	*0.027349	*0.000361
<i>Coridothymus capitatus</i>	*0.004158	0.190652	0.150964					
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000612	0.310184	0.250468					
(+)-Catechin	0.175448	0.107069	0.087533					
<i>Salvia fruticosa</i>	0.104706	*0.036443	*0.027349					
Μαύρο τσάι	0.951387	*0.000541	*0.000361					

**All effects	*0.000000
----------------------	-----------

* Στατιστικές διαφορές.

** Στατιστική ύπαρξη αλληλεπίδρασης των παραγόντων 'απουσία' και 'παρουσία' των ενζύμων της πέψης. P<0.05 υποδεικνύει αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.

Πίνακας 2. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων ολικού διαλυτού σιδήρου (%) στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα (Σχ. 2, Κεφ. 1).

Απουσία ενζύμων της πέψης	Fe(III)	FeAA	FeNTA	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	(+)-Κατεχίνη	<i>Salvia fruticosa</i>	Μαύρο τσάι
Fe(III)		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000034
FeAA	*0.000000		0.639884	*0.000020	*0.001246	*0.006418	*0.000006	*0.000000
FeNTA	*0.000000	0.639884		*0.000085	*0.004601	*0.017703	*0.000028	*0.000000
<i>Coridothymus capitatus</i>	*0.000000	*0.000020	*0.000085					
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	*0.001246	*0.004601					
(+)-Catechin	*0.000000	*0.006418	*0.017703					
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	*0.000006	*0.000028					
Μαύρο τσάι	*0.000034	*0.000000	*0.000000					

Παρουσία ενζύμων της πέψης	Fe(III)	FeAA	FeNTA	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	(+)-Κατεχίνη	<i>Salvia fruticosa</i>	Μαύρο τσάι
Fe(III)		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000
FeAA	*0.000000		*0.020713	*0.000039	*0.000830	*0.020364	*0.000009	*0.000000
FeNTA	*0.000000	*0.020713		*0.000000	*0.000000	*0.000087	*0.000000	*0.000000
<i>Coridothymus capitatus</i>	*0.000000	*0.000039	*0.000000					
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	*0.000830	*0.000000					

(+)-Catechin	*0.000000	*0.020364	*0.000087					
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	*0.000009	*0.000000					
Μαύρο τσάι	*0.000000	*0.000000	*0.000000					

**All effects	*0.000000
----------------------	-----------

* Στατιστικές διαφορές

** Στατιστική ύπαρξη αλληλεπίδρασης των παραγόντων ‘απουσία’ και ‘παρουσία’ των ενζύμων της πέψης. $P < 0.05$ υποδεικνύει αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.

Πίνακας 3. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες των χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτών κλασμάτων (Σχ. 3, Κεφ. 1).

	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	(+)-Κατεχίνη	<i>Salvia fruticosa</i>	Μαύρο τσάι
<i>Coridothymus capitatus</i>		*0.008729	*0.012973	*0.004542	*0.000014
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.008729		0.847789	0.753905	*0.009043
(+)-Catechin	*0.012973	0.847789		0.614343	*0.005842
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.004542	0.753905	0.614343		*0.018322
Μαύρο τσάι	*0.000014	*0.009043	*0.005842	*0.018322	

**All effects	0.814055
----------------------	----------

* Στατιστικές διαφορές

** Στατιστική ύπαρξη αλληλεπίδρασης των παραγόντων ‘απουσία’ και ‘παρουσία’ των ενζύμων της πέψης. $P > 0.05$ υποδεικνύει μη-αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.

Πίνακας 4. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης και της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και ολικό διαλυτό σίδηρο στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα, απουσία των ενζύμων της πέψης. (Σχ. 4, Κεφ. 1).

Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες.	*0.008523
Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και ολικού διαλυτού σιδήρου (%).	0.155919

* Στατιστικές διαφορές. $P < 0.05$ υποδεικνύει συσχέτιση μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες.

Πίνακας 5. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης και της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και ολικό διαλυτό σίδηρο στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα, παρουσία των ενζύμων της πέψης. (Σχ. 5, Κεφ. 1).

Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες.	0.076989
Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξείδωσης και ολικού διαλυτού σιδήρου (%).	0.209707

Πίνακας 6. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα καθενός ενζύμου της πέψης και του μίγματός τους (Σχ. 6, Κεφ. 1).

	Fe(III)	Πεψίνη	Παγκρεατίνη	Χολικά άλατα	Μίγμα
Fe(III)		0.161421	*0.034236	*0.004762	*0.003107
Πεψίνη	0.161421		0.508959	0.100864	0.066652
Παγκρεατίνη	*0.034236	0.508959		0.201934	0.125827
Χολικά άλατα	*0.004762	0.100864	0.201934		0.770199
Μίγμα	*0.003107	0.066652	0.125827	0.770199	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 7. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης του ολικού διαλυτού σιδήρου (%) στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα καθενός ενζύμου της πέψης και του μίγματός τους (Σχ. 7, Κεφ. 1).

	Fe(III)	Πεψίνη	Παγκρεατίνη	Χολικά άλατα	Μίγμα
Fe(III)		*0.000856	0.196015	0.521549	0.352706
Πεψίνη	*0.000856		*0.012206	*0.000103	*0.004925
Παγκρεατίνη	0.196015	*0.012206		*0.047957	0.685731
Χολικά άλατα	0.521549	*0.000103	*0.047957		0.104842
Μίγμα	0.352706	*0.004925	0.685731	0.104842	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 8. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της οξείδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης σε μοντέλα δείγματα καθενός ενζύμου της πέψης και του μίγματός τους με συγκέντρωση $Fe^{3+} = 1$ ppm (Σχ. 8, Κεφ. 1).

	Fe(III)	Πεψίνη	Παγκρεατίνη	Χολικά άλατα	Μίγμα
Fe(III)		*0.011084	*0.000814	*0.000422	*0.000604
Πεψίνη	*0.011084		0.137751	0.666861	0.100039
Παγκρεατίνη	*0.000814	0.137751		0.666861	0.846325
Χολικά άλατα	*0.000422	0.066744	0.666861		0.811730
Μίγμα	*0.000604	0.100039	0.846325	0.811730	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 9. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα καθενός ενζύμου της πέψης και του μίγματός τους (Σχ. 9, Κεφ. 1).

	Πεψίνη	Παγκρεατίνη	Χολικά άλατα	Μίγμα
Πεψίνη		0.299890	*0.000426	*0.000160
Παγκρεατίνη	0.299890		*0.001199	*0.000369
Χολικά άλατα	*0.000426	*0.001199		0.419013
Μίγμα	*0.000160	*0.000369	0.419013	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 10. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων οξειδωσης της 2-δεοξυ-D-ριβόζης και της περιεκτικότητας σε πρωτεϊνικά συστατικά και ολικό διαλυτό σίδηρο στα χαμηλού μοριακού βάρους διαλυτά κλάσματα καθενός ενζύμου της πέψης και του μίγματός τους. (Σχ. 10, Κεφ. 1).

Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξειδωσης και περιεκτικότητας σε πρωτεϊνικά συστατικά.	*0.005215
Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων οξειδωσης και ολικού διαλυτού σιδήρου (%).	0.160824

- Στατιστικές διαφορές. $P < 0.05$ υποδεικνύει συσχέτιση μεταξύ επιπέδων οξειδωσης και περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες.

Πίνακας 11. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της οξειδωσης του λιπελαϊκού οξέος στα μοντέλα συστήματα (Σχ. 1, Κεφ. 2).

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		*0.000001	*0.000000	*0.000001	*0.000000	*0.000000	*0.000026
Μαύρο τσάι	*0.000001		0.751239	0.687225	0.475085	0.426143	0.585844
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	0.751239		0.917141	0.689522	0.629902	0.400723
<i>Matricaria chamomila</i>	*0.000001	0.687225	0.917141		0.784894	0.725747	0.370996
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	0.475085	0.689522	0.784894		0.934040	0.227238

<i>Urtica dioica</i>	*0.000000	0.426143	0.629902	0.725747	0.934040		0.199655
<i>Foeniculum vulgare</i>	*0.000026	0.585844	0.400723	0.370996	0.227238	0.199655	

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O/ ασκορβικό οξύ	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000
Μαύρο τσάι	*0.000000		0.942406	0.866659	0.880607	0.889061	*0.024301
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	0.942406		0.813471	0.937848	0.946371	*0.020774
<i>Matricaria chamomila</i>	*0.000000	0.866659	0.813471		0.757070	0.764746	*0.045225
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	0.880607	0.937848	0.757070		0.991453	*0.017498
<i>Urtica dioica</i>	*0.000000	0.889061	0.946371	0.764746	0.991453		*0.017918
<i>Foeniculum vulgare</i>	*0.000000	*0.024301	*0.020774	*0.045225	*0.017498	*0.017918	

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O/ ασκορβικό οξύ/H ₂ O ₂	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		*0.000000	*0.000000	*0.000001	*0.000000	*0.000000	*0.000004
Μαύρο τσάι	*0.000000		0.941771	0.950080	0.962924	0.816291	0.684455
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	0.941771		0.895412	0.904865	0.760190	0.735542
<i>Matricaria chamomila</i>	*0.000001	0.950080	0.895412		0.985014	0.875647	0.656517
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	0.962924	0.904865	0.985014		0.852535	0.652700

<i>Urtica dioica</i>	*0.000000	0.816291	0.760190	0.875647	0.852535		0.532607
<i>Foeniculum vulgare</i>	*0.000004	0.684455	0.735542	0.656517	0.652700	0.532607	

Απουσία καταλύτη	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		0.101476	0.772083	0.312484	0.535843	0.666360	0.492940
Μαύρο τσάι	0.101476		0.084861	*0.023428	*0.044568	0.064824	0.456081
<i>Salvia fruticosa</i>	0.772083	0.084861		0.495861	0.765418	0.898186	0.384765
<i>Matricaria chamomila</i>	0.312484	*0.023428	0.495861		0.687960	0.574427	0.146450
<i>Origanum dictamnus</i>	0.535843	*0.044568	0.765418	0.687960		0.864550	0.252832
<i>Urtica dioica</i>	0.666360	0.064824	0.898186	0.574427	0.864550		0.323548
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.492940	0.456081	0.384765	0.146450	0.252832	0.323548	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 12. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέτρησης της οξειδωσης φωσφωλιποειδών βόειου εγκεφάλου στα μοντέλα συστήματα (Σχ. 2, Κεφ. 2).

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		0.261855	0.609170	0.628561	0.299631	0.212723	0.327602
Μαύρο τσάι	0.261855		0.597265	0.176094	0.940566	0.912514	0.900081

<i>Salvia fruticosa</i>	0.609170	0.597265		0.399906	0.649611	0.524042	0.686535
<i>Matricaria chamomila</i>	0.628561	0.176094	0.399906		0.199839	0.145228	0.217464
<i>Origanum dictamnus</i>	0.299631	0.940566	0.649611	0.199839		0.853714	0.959314
<i>Urtica dioica</i>	0.212723	0.912514	0.524042	0.145228	0.853714		0.813952
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.327602	0.900081	0.686535	0.217464	0.959314	0.813952	

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O/ ασκορβικό οξύ	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000
Μαύρο τσάι	*0.000000		0.925867	0.597140	0.964727	0.922478	0.684393
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000000	0.925867		0.662706	0.963857	0.996594	0.756355
<i>Matricaria chamomila</i>	*0.000000	0.597140	0.662706		0.653440	0.665786	0.902175
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000000	0.964727	0.963857	0.653440		0.960707	0.737054
<i>Urtica dioica</i>	*0.000000	0.922478	0.996594	0.665786	0.960707		0.756889
<i>Foeniculum vulgare</i>	*0.000000	0.684393	0.756355	0.902175	0.737054	0.756889	

(NH ₄) ₅ Fe(Cit) ₂ ·2H ₂ O/ ασκορβικό οξύ/H ₂ O ₂	Control	Μαύρο τσάι	<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Urtica dioica</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
Control		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000000
Μαύρο τσάι	*0.000000		0.731585	0.829318	0.985230	0.883747	0.879368

Fe(III)		*0.000000	*0.000000	*0.000000	*0.000002		
Μαύρο τσάι	*0.000000		0.400733	0.089668	*0.044210	*0.004285	*0.000785
<i>Matricaria chamomila</i>	*0.000000	0.400733		0.270259	0.143989	*0.015729	*0.002701
<i>Urtica dioica</i>	*0.000000	0.089668	0.270259		0.747702	0.264139	0.093991
<i>Foeniculum vulgare</i>	*0.000002	*0.044210	0.143989	0.747702		0.433051	0.176420
<i>Origanum dictamnus</i>	*0.000007	*0.004285	*0.015729	0.264139	0.433051		0.537845
<i>Salvia fruticosa</i>	*0.000064	*0.000785	*0.002701	0.093991	0.176420	0.537845	

* Στατιστικές διαφορές

Πίνακας 14. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων συσχέτισης μεταξύ καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης στο εκχύλισμα εξανίου από το αφέψημα του φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.), το οποίο έχει συλλεχθεί το Μάρτιο του 2000 και τον Ιούλιο του 1997 (Σχ. 7 και Σχ. 8, Κεφ. 3).

Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης στο εκχύλισμα φασκόμηλου (Μάρτιος 2000).	*0.002873
----------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης στο εκχύλισμα φασκόμηλου (Ιούλιος 1997).	0.328909
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----------

* Στατιστικές διαφορές. $P < 0.05$ υποδεικνύει συσχέτιση μεταξύ καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης.

Πίνακας 15. Τιμές P στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων των ποσοτικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των συστατικών του αφεψήματος φασκόμηλου (*Salvia fruticosa* L.), το οποίο έχει συλλεχθεί το Μάρτιο του 2000 και τον Ιούλιο του 1997 (Πίνακας 1, Κεφ. 3).

	Καρνοσικό οξύ	Καρνοσόλη	Ροσμανόλη	Καφεϊκό οξύ
Καρνοσικό οξύ	*0.000483			
Καρνοσόλη		0.075230		
Ροσμανόλη			*0.000004	
Καφεϊκό οξύ				0.365176

* Στατιστικές διαφορές.

Ματσίγκου Χριστίνα

Μεραμβέλλου 10
Ηράκλειο 71202
E-mail: chem271@edu.uoh.gr

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης (M.Sc.) 2000
Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τίτλος εργασίας:
**“ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ”**

• Πτυχίο

1997

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

- Διπλωματική εργασία 1996-1997
Εργαστήριο Ανόργανης και Βιολογικής Χημείας
Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τίτλος εργασίας:
“*In vitro* μελέτη αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και αλληλεπίδρασης
πολυφαινολών με σίδηρο στο τσάι”

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

EU-ESF 12th Advance Course on “Chemistry of Metals in Biological Systems” 1998
Louvain-la-Neuve, Βέλγιο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Εργαστηριακή βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Ανόργανης Χημείας 1998
Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Εργαστηριακή βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Γενικής Χημείας 1997-1998
Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Εργαστηριακή διδασκαλία 1998
Διδασκαλία του μαθήματος “Αρχές Οργάνωσης Εργαστηρίου Φυσικών Επιστημών”
Ερευνητικό Πρόγραμμα “Σχεδιασμός, οργάνωση και εφαρμογή ειδικού επιμορφωτικού προγράμματος για την ακαδημαϊκή και επαγγελματική αναβάθμιση των εκπαιδευτικών της πρωτοβάθμιας εκπαίδευσης (Εξομοίωση)”, Παιδαγωγικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Εργαστηριακή βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας 1994
Πρόγραμμα έμμισθης απασχόλησης προπτυχιακών φοιτητών

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

- Εργαστηριακή βοήθος στα ερευνητικά εργαστήρια Οργανικής Χημείας, 1993
Πρόγραμμα έμμισθης απασχόλησης προπτυχιακών φοιτητών
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Φασματοσκοπία FT-IR
- Φασματοσκοπία UV-Vis
- Υγρή χρωματογραφία HPLC
- Αέρια χρωματογραφία GC-MS
- Χρήση γραμμής κενού

ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

- Microsoft Word
- Microsoft Excel
- Microsoft PowerPoint
- Microcal Origin
- CS ChemOffice (CS ChemDraw Pro)
- ISIS Draw 2.3 Standalone
- Statistical software *SPSSwin* and *Statistica*

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά (Cambridge First Certificate, 2000)
- Δανικά

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ-ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Μέλος οργανωτικής επιτροπής 2000
“6^ο Μεταπτυχιακό Συνέδριο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης”
14-16 Ιουνίου 2000, Κολυμπάρι, Χανιά
- Μέλος οργανωτικής επιτροπής 1999
“5^ο Μεταπτυχιακό Συνέδριο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης”
15-17 Ιουνίου 1999, Κολυμπάρι, Χανιά
- Γραμματειακή υποστήριξη στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ 1998-1999
“Προγράμματα Σπουδών-Συγγράμματα 3.1.α”
- Γραμματειακή υποστήριξη στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ 1998-1999
“Αποτίμηση εκπαιδευτικού έργου και παρεχόμενων υπηρεσιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης ”
- Εργαστηριακή διδασκαλία 1998
Διδασκαλία του μαθήματος “Αρχές Οργάνωσης Εργαστηρίου Φυσικών Επιστημών”
Ερευνητικό Πρόγραμμα “Σχεδιασμός, οργάνωση και εφαρμογή ειδικού επιμορφωτικού προγράμματος για την ακαδημαϊκή και επαγγελματική

αναβάθμιση των εκπαιδευτικών της πρωτοβάθμιας εκπαίδευσης
(Εξομοίωση)”, Παιδαγωγικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Διαθέσιμες κατόπιν αιτήσεως

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

“In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusion toward iron under simulated gastrointestinal conditions.”

T. C. Matsingou, M. Kapsokoufalou and A. Salifoglou

(Υπό τύπωση, στο *Journal of Food Science*)

“Mediterranean herb infusions exhibit antioxidant activity toward iron promoted oxidation of phospholipids, linoleic acid and deoxyribose”

T. C. Matsingou, M. Kapsokoufalou and A. Salifoglou

(Υπό κρίση στο *Free Radical Research*)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. *Αντιοξειδωτική συμπεριφορά μιγμάτων σιδήρου και τσαγιού ή αρωματικών φυτών κάτω από in vitro συνθήκες πέψης*
X. Ματσίγκου, M. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
6^ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδας-Κύπρου “Χημεία και συστήματα ποιότητας στην παραγωγή και τον έλεγχο”
2-5 Σεπτεμβρίου 1999, Ρόδος
2. *Μελέτη αντιοξειδωτικής δραστηριότητας εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε μοντέλα βιολογικών συστημάτων*
X. Ματσίγκου, M. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
5^ο Μεταπτυχιακό Συνέδριο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
15-17 Ιουνίου 1999, Κολυμπάρι, Χανιά
3. *Αντιοξειδωτική δραστηριότητα εκχυλισμάτων μαύρου τσαγιού και βοτάνων κάτω από in vitro συνθήκες πέψης*
X. Ματσίγκου, M. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
4^ο Μεταπτυχιακό Συνέδριο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
12-14 Ιουνίου 1998, Κολυμπάρι, Χανιά

POSTERS

- 1. Antioxidant activity of Mediterranean herbs toward lipid peroxidation and 2-deoxy-D-ribose degradation*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2nd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries on Chemical Sciences for Sustainable Development
6-9 Ιουνίου 2000, Χαλκιδική
- 2. Chemical studies of plant and herb infusions in the presence of prooxidant metal ions*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry
13-17 Απριλίου 1999, Κέρκυρα
- 3. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα φυτικών εκχυλισμάτων κάτω από in vitro συνθήκες πέψης*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
9^ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο
7-9 Νοεμβρίου 1998, Αθήνα
- 4. Antioxidant activity of black tea and herbs infusions under in vitro digestion conditions*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
EU-ESF 12th Advance Course on “Chemistry of Metals in Biological Systems”
13-22 Μαΐου 1998, Louvain-la-Neuve, Βέλγιο
- 5. Πολυφαινόλες, σίδηρος και αντιοξειδωτική δραστηριότητα στο μαύρο τσάι*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2^ο Συμπόσιο Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”
“Χημική Έρευνα και Βιομηχανία”
3-5 Δεκεμβρίου 1997, Αθήνα
- 6. Iron polyphenol complexes and antioxidant activity in black tea*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
4th FGIPS Meeting in Inorganic Chemistry
European Mediterranean Conference in Inorganic Chemistry
14-18 Οκτωβρίου 1997, Κέρκυρα
- 7. Polyphenols, iron and antioxidant activity in black tea*
X. Ματσίγκου, Μ. Καψοκεφάλου, Αθ. Σαλίφογλου
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives
9-11 Οκτωβρίου 1997, Αθήνα