



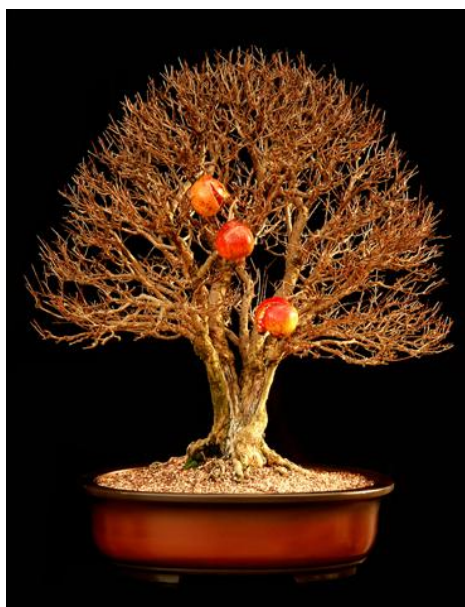
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΡΟΔΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ



ΞΥΝΑΔΑ ΕΥΓΕΝΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

ΡΟΔΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ

ΞΥΝΑΔΑ ΕΥΓΕΝΙΑ

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για  
την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του  
ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013

Εισηγητής Καθηγητής  
ΛΑΓΟΥΡΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΡΟΔΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ

ΞΥΝΑΔΑ ΕΥΓΕΝΙΑ

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα  
Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 14561.

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
2.1. Αυτοξειδωση των λιπαρών υλών .....	3
2.1.1. Μηχανισμός της αυτοξειδωσης .....	3
2.1.2. Παράγοντες που επιταχύνουν την αυτοξειδωση.....	5
2.1.3. Επιβράδυνση της αυτοξειδωσης με χρήση αντιοξειδωτικών.....	6
2.1.4. Εκτίμηση του βαθμού οξειδωσης των λιπαρών υλών.....	7
2.1.4.1 Φυσικές μέθοδοι.....	7
2.1.4.2 Χημικές μέθοδοι.....	8
2.1.4.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης-DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) .....	8
2.1.4.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης-FRAP (Ferric Reducing Activity Power- FRAP).....	9
2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) .....	10
2.3 Αντιοξειδωτικά – Μηχανισμός δράσης.....	11
2.3.1 Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά .....	12
2.3.2 Φαινολικά οξέα .....	13
2.3.3 Φλαβονοειδή.....	14
2.4. Οι πολυφαινόλες στο ρόδι.....	16
2.4.1 Ελλαγιτανίνες-Ελλαγικό οξύ .....	17
2.4.2 Πιουνικαλλαγίνη .....	18
2.5 Ρόδι- Χημική σύσταση-Δράσεις .....	20
2.5.1. Καρπός.....	20
2.5.1.1 Σπόρος.....	21
2.5.1.2 Χυμός.....	21
2.5.1.3 Περικάρπιο (οι φλούδες, το δέρμα, το εξωκάρπιο είναι συνώνυμα) .....	22
2.5.1.4 Φύλλωμα.....	22
2.5.1.5 Άνθη.....	22
2.5.2 Ρόδι-Αντιοξειδωτική δράση-Φαινολική σύσταση .....	23
2.6 Οξειδώσεις in vino και η σημασία των φυσικών αντιοξειδωτικών.....	31
3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	34
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	36
4.1. Υλικά – Συσκευές.....	36

4.1.1. Δείγματα ροδιού .....	36
4.1.2. Χημικά αντιδραστήρια .....	37
4.1.3. Όργανα – Συσκευές .....	37
4.2. Μέθοδοι .....	38
4.2.1. Παραλαβή των εκχυλισμάτων από ρόδι.....	38
4.2.1.1 Χυμός.....	38
4.2.1.2 Εκχύλισμα από φλούδες .....	38
4.2.1.2.1 Ομογενοποίηση.....	38
4.2.1.2.2 Νερό σε θερμοκρασία βρασμού (αφέψημα).....	39
4.2.2 Νερό και μεθανόλη σε θερμοκρασίες 24 και 40 °C .....	39
4.2.3 Εκχύλισμα σπορίων.....	40
4.3. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.....	40
4.3.1. Μέθοδος DPPH.....	40
4.3.2 Μέθοδος FRAP .....	42
4.3.3. Χρωματομετρικές μέθοδοι.....	44
4.3.3.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες .....	44
4.3.3.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή.....	45
4.3.3.3 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε υδρολυμένες ταννίνες .....	46
4.3.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) .....	47
4.3.4.1. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός ελλαγικού οξέος.....	47
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
5.1 Μέθοδος DPPH.....	48
5.2 Μέθοδος FRAP .....	50
5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολών- (Μέθοδος Folin Ciocalteu) .....	52
5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	54
5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός υδρολυμένων ταννίνων.....	55
5.6 Προσδιορισμός Ελλαγικού ξέος στα εκχυλίσματα ροδιού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC).....	57
5.7. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης.....	65
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α .....	1
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β .....	1

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αντιδράσεις οξείδωσης περιορίζουν τη διάρκεια ζωής και προκαλούν αλλοίωση κυρίως σε τρόφιμα που είναι πλούσια σε λιπαρές ύλες. Ένας τρόπος για τον περιορισμό των αντιδράσεων οξείδωσης στα τρόφιμα είναι και η χρησιμοποίηση αντιοξειδωτικών. Δύο βασικές κατηγορίες αντιοξειδωτικών τα συνθετικά και τα φυσικά χρησιμοποιούνται ικανοποιητικά για την επιβράδυνση ή την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπαρών υλών. Στη πράξη έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους και της δυνατότητας προσθήκης τους σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Εμφανίστηκαν όμως και σοβαρά μειονεκτήματα από τη χρήση τους σε τρόφιμα και ιατρικά σκευάσματα είτε λόγω της αστάθειάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες είτε και κυρίως λόγω ορισμένων τοξικών καρκινογόνων επιπτώσεων (Sokmen et al., 2004).

Η ροδιά και ο καρπός της έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην παραδοσιακή ιατρική από πολλούς πολιτισμούς. Η σημασία της ως φαρμακευτικού φυτού ενισχύεται τώρα και από δεδομένα που προέρχονται από τη σύγχρονη επιστήμη. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν μάλιστα ότι ορισμένα συστατικά που υπάρχουν στον καρπό, του προσδίδουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιϊκές ιδιότητες. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι συστατικά που περιέχονται στο χυμό του ροδιού, μειώνουν την αρτηριακή πίεση, την αθηροσκλήρωση, όπως επίσης μειώνουν σημαντικά και την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Karlan, et al., 2001, Negi, Jayaprakasha, & Jena, 2003, Li et al., 2006, Lansky & Newman, 2007, Çam, Hisil, & Durmaz, 2009). Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στην υψηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών και ολικών πολυφαινολών. Χημικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα κλάσματα των πολυφαινολών του χυμού περιέχουν ένα σημαντικό υψηλό επίπεδο σε υδρολυμένες ταννίνες καθώς και ανθοκυανίνες, οι οποίες παρουσιάζουν επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Πράγματι, βρέθηκε ότι ο χυμός του ροδιού έχει τρεις φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από ότι το κόκκινο κρασί ή το πράσινο τσάι, ενώ έξι και οκτώ φορές υψηλότερα επίπεδα δράσης από εκείνα που ανιχνεύθηκαν σε σταφύλια / κράνμπερι, γκρέιπφρουτ και χυμό πορτοκαλιού (Gil et al., 2000, Tzulker et al., 2007, Pande et al., 2009; Fischer et al., 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα υπολείμματα ροδιού που προκύπτουν ως υποπροϊόντα της παραγωγής χυμού περιέχουν υψηλά επίπεδα φαινολικών αντιοξειδωτικών (Singh et al., 2002; Li et al., 2006; Tzulker et al., 2007; Cam et al., 2012). Έτσι τα «στέμφυλα» του ροδιού μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό φυσικό υλικό για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων (Wenjuan et al., 2012).

Λόγω της συνεχούς έρευνας για τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες του ροδιού και το αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για τα διατροφικά τρόφιμα, η ζήτηση για το ρόδι και τα προϊόντα του, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά κυρίως στο δυτικό κόσμο. Κατά συνέπεια δημιουργήθηκαν αρκετές βιομηχανίες που παράγουν χυμό από ρόδι, καθώς επίσης και φαρμακευτικές εταιρείες, οι οποίες βασίζονται στις βιολογικές ιδιότητες του καρπού. Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με τις δράσεις και την σύσταση του ροδιού είναι ελλιπή, καθώς εκτός από το χυμό και τα υπόλοιπα τμήματα του ροδιού, η φλούδα και οι σπόροι, που συνήθως απορρίπτονται ως υποπροϊόντα στη βιομηχανία παρασκευής χυμού, μπορούν να συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην υγεία.

## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1. Αυτοξειδωση των λιπαρών υλών

Αυτοξειδωση είναι μια σειρά αντιδράσεων του μοριακού οξυγόνου με τα ακόρεστα ακυλολιπίδια των λιπαρών υλών. Λιπαρές ύλες που περιέχουν σε σημαντικές συγκεντρώσεις ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να οξειδωθούν πολύ γρήγορα προκαλώντας την αλλοίωση των τροφίμων στα οποία περιέχονται (Shahidi et al., 1992).

Η αυτοξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που χωρεί με τον μηχανισμό των ελεύθερων ριζών. Περιλαμβάνει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Στο στάδιο της διάδοσης κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο και δίνει μια νέα ρίζα και στην συνέχεια η νέα αυτή ρίζα αντιδρά με ένα άλλο μόριο.

Έτσι η αντίδραση συνεχίζεται από μόνη της και θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες.

#### 2.1.1. Μηχανισμός της αυτοξειδωσης

Έναρξη :  $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$  (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση :  $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$  (ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO\cdot + RH \rightarrow R\cdot + ROOH$

Τερματισμός :  $R\cdot + R\cdot \rightarrow 2R$  (αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης)

$R\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR$

$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR + O_2$

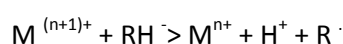
Όπως φαίνεται από τις αντιδράσεις η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στο σχηματισμό των πρώτων ελεύθερων ριζών. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοξειδωσης είναι τα υδρόξυ-υπεροξειδία. Αυτά στη συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, αλλά υδρόξυ-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με την σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτερο ρυθμό. Τα υδρογόνα α- ως προς το διπλό δεσμό είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονικής κατανομής στο δεσμό αυτό. Έτσι στο στάδιο της διάδοσης



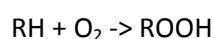
τα υδρογόνα αυτά εύκολα αφαιρούνται και σχηματίζονται δευτεροταγή υδρόξυ-υπεροξειδία στο άτομο άνθρακα α- ως προς το διπλό δεσμό.

Από τα υπεροξειδία ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων όπως οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και αλδεΐδες (Μπόσκου, 2004). Η αντίδραση 1 απαιτεί υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης (~ 35 kcal/mol), για αυτό για να ξεκινήσει η αντίδραση της διάδοσης είναι απαραίτητη η παραγωγή των πρώτων ελεύθερων ριζών (Nawar, 1985).

Αυτό μπορεί να γίνει με απευθείας αντίδραση του ακόρεστου λιπιδίου RH με ιόν μεταβατικού μετάλλου  $M^{(n+1)+}$ .



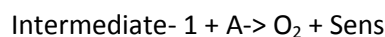
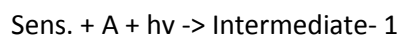
ή με διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων τα οποία σχηματίζονται κατά την αντίδραση του ακόρεστου λιπιδίου RH με το οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης  $O_2$  (singlet oxygen).



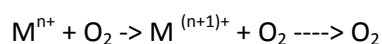
Η μετάβαση του οξυγόνου από την βασική στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση μπορεί να γίνει με την βοήθεια φυσικών χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη α, η φαιοφυτίνη α, η μυοσφαιρίνη και η αιματοπορφυρίνη (Nawar, 1985).

Έχουν προταθεί δύο τύποι φωτοευαισθητοποιούμενης οξείδωσης :

Στον τύπο I, ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφά φως και αντιδρά με το υπόστρωμα A δίνοντας ένα ενδιάμεσο προϊόν, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με το οξυγόνο στην βασική τριπλή κατάσταση.



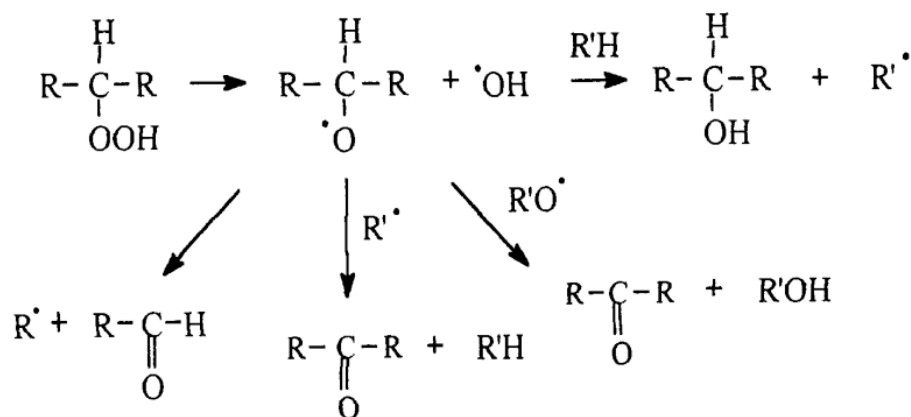
Τέλος, ιόντα μετάλλων μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά την έναρξη της αυτοξειδωσης είναι δραστικές και παίρνουν μέρος στις αντιδράσεις διάδοσης είτε με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου που βρίσκεται σε α-θέση ως προς τον διπλό δεσμό ενός ακόρεστου ακυλολιπιδίου είτε αντιδρώντας με μοριακό οξυγόνο στην βασική κατάσταση.

Η αντίδραση του σχηματισμού υπεροξειδίων είναι πολύ γρήγορη, απαιτεί ελάχιστη ενέργεια ενεργοποίησης και για αυτό το λόγο η συγκέντρωση των  $ROO\cdot$  είναι υψηλότερη αυτής των  $R\cdot$  (Chan, 1977).

Τα υδρουπεροξειδία συμμετέχουν σε δευτερεύουσες αντιδράσεις από τις οποίες προκύπτουν πλήθος οργανικών ενώσεων, κυρίως αλκοόλες, αλδεΐδες και βινυλοκετόνες οι οποίες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής (Nawar, 1985).



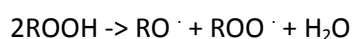
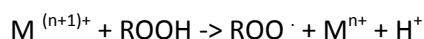
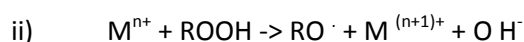
**Σχήμα 1.** Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης λιπαρών υλών (Nawar, 1985).

### 2.1.2. Παράγοντες που επιταχύνουν την αυτοξειδωση

Οι κυριότεροι παράγοντες που δρουν καταλυτικά στην οξείδωση λιπών και ελαίων είναι :

1. *Ένζυμα.* Λιποξειδάσες, βρίσκονται σε όλους τους ζωικούς και φυτικούς ιστούς. Όταν ενεργοποιηθούν κάτω από ειδικές συνθήκες ενεργού οξύτητας, θερμοκρασίας και υγρασίας, καταλύουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των πολυακόρεστων ακυλολιπιδίων.
2. *Μέταλλα.* Ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, ο σίδηρος και ο χαλκός ευνοούν το σχηματισμό νέων ριζών και έτσι δρουν ως προξειδωτικά διότι :

i) Επιταχύνουν την διάσπαση των υδρουπεροξειδίων



iii) Αντιδρούν απευθείας με το υπόστρωμα

iv) Ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο προς οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης που διευκολύνει το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων.

3. *Θερμοκρασία*. Η οξείδωση επιταχύνεται ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 60 °C). Αύξηση της θερμοκρασίας κατά 15 °C διπλασιάζει την ταχύτητα οξείδωσης.

4. *Φώς*. Ιδιαίτερα το υπεριώδες φως επιταχύνει την οξείδωση των λιπών και ελαίων.

5. *Παρουσία αέρα*. Το οξυγόνο έρχεται σε επαφή με την λιπαρή ύλη και επιταχύνει την οξείδωση.

Η ταχύτητα της αυτοοξείδωσης εξαρτάται κυρίως από τον ακόρεστο χαρακτήρα της λιπαρής ύλης. Γι' αυτό όσο πιο ακόρεστο είναι το υπόστρωμα τόσο πιο επιδεκτικό είναι στην αυτοοξείδωση (Sherwin, 1978).

### **2.1.3. Επιβράδυνση της αυτοοξείδωσης με χρήση αντιοξειδωτικών**

Η συσκευασία υπό κενό και η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή ακόμα και η συντήρηση των τροφίμων σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης μπορούν να ελαττώσουν την ταχύτητα της αυτοοξείδωσης (Cooper, 1983). Οι τρόποι αυτοί δεν είναι πάντα αποτελεσματικοί δεδομένου ότι ελάχιστο οξυγόνο είναι σε θέση να προκαλέσει οξείδωση, ενώ δεν είναι πάντοτε οικονομικοί και πρακτικοί για την ολοκληρωτική απομάκρυνση του οξυγόνου από τα τρόφιμα.

Έτσι είναι αναγκαία εκτός των παραπάνω μεθόδων, και η χρήση πρόσθετων με αντιοξειδωτική δράση που προστίθενται στις λιπαρές ύλες ή στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων και να καταστήσουν τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα αντιοξειδωτικά όμως δεν μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα ενός τροφίμου που είναι ήδη οξειδωμένο (Schuler, 1990).

Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες :

- Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- Να μην προσδίνει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό
- Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου (Μπόσκου, 2004).

Η επίδραση που έχει η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στην ταχύτητα της αυτοοξειδωσης εξαρτάται από παράγοντες όπως η δομή του αντιοξειδωτικού, οι συνθήκες οξείδωσης και η φύση του υποστρώματος. Πιο αποτελεσματική είναι η δράση του αντιοξειδωτικού σε ότι αφορά την αύξηση της επαγωγικής περιόδου όταν η λιπαρή ύλη δεν έχει υποστεί οξείδωση σε μεγάλο βαθμό.

Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων :

- i) Μειώνουν την συγκέντρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου
- ii) αποτρέπουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης με την δέσμευση των ελεύθερων ριζών
- iii) Δεσμεύουν τα ιόντα μετάλλων που καταλύουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης
- iv) Διασπούν υπεροξειδία (Dorman et al., 2003).

#### **2.1.4. Εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης των λιπαρών υλών**

Η οξειδωτική αποικοδόμηση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων έχει μεγάλη σημασία για την αποδοχή και την διατροφική αξία ενός προϊόντος και για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την εκτίμηση της έκτασης της οξείδωσης. Καμία μέθοδος δεν μπορεί να συμπεριδιορίσει όλα τα προϊόντα της αυτοοξειδωσης, ούτε μπορεί να εφαρμοστεί σε προϊόντα που βρίσκονται σε οποιοδήποτε στάδιο της οξείδωσης ή σε όλα τα λιπαρά υποστρώματα (Nawar, 1985).

Η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του βαθμού της οξείδωσης μιας λιπαρής ύλης εξαρτάται από την φύση του δείγματος, τον τύπο της πληροφορίας που απαιτείται, το διαθέσιμο χρόνο, τις συνθήκες του πειράματος και το γενικό κόστος της μεθόδου. Συνήθως οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εκτίμηση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπών και ελαίων αποτελούν και την βάση των μεθόδων αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Kochhar et al., 1988).

##### **2.1.4.1 Φυσικές μέθοδοι**

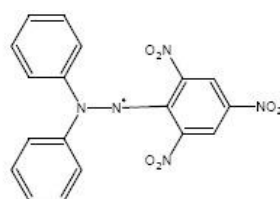
Κατά την αυτοοξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως των οξέων λινελαϊκού και λινολενικού, σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία με συζυγείς τους διπλούς δεσμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της απορρόφησης στα 232 nm. Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως π.χ. τα οξειδιένια εμφανίζουν μέγιστο στα 268 nm. Η μέτρηση του ειδικού συντελεστή απορρόφησης  $\epsilon$  1% 1 cm στα παραπάνω μήκη κύματος χρησιμεύει στην εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης μιας λιπαρής

ύλης (IUPAC, 1987). Άλλες φυσικές μέθοδοι που εμφανίζονται για την εκτίμηση του βαθμού οξειδωσης είναι η μέτρηση της απορρόφησης στο υπέρυθρο ή η μέτρηση του δείκτη διάθλασης. Μπορούν να γίνουν και οργανοληπτικές δοκιμές για την εκτίμηση της οσμής και της γεύσης λόγω των προϊόντων που σχηματίζονται στην πορεία της οξειδωσης και συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής. Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής θα πρέπει να συσχετίζονται με εκείνα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό των προϊόντων αυτοοξειδωσης με φυσικοχημικές μεθόδους. Αν και είναι αρκετά ακριβής η μέθοδος αυτή δεν είναι τόσο πρακτική και δεν χρησιμοποιείται συνήθως (Rossell, 1989).

#### 2.1.4.2 Χημικές μέθοδοι

##### 2.1.4.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης-DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση του αντιοξειδωτικού με μεθανολικό διάλυμα της σταθερής 1,1-διφαινυλ-2-πικριλυδραζυλικής ρίζας (απορροφά στα 517 nm) η οποία με την προσφορά υδρογόνου/ηλεκτρονίου ανάγεται σε υδραζίνη με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος.



DPPH radical

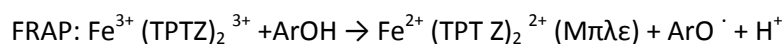
**Σχήμα 2.** Δομή του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Αρκετές μελέτες περιγράφουν την δράση φυτοχημικών αντιοξειδωτικών όπως των φλαβονοειδών με αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH. Το DPPH είναι μια «σταθερή» ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται συχνά και σε ESR μελέτες. Λόγω της παρουσίας του μονήρους ηλεκτρονίου, το DPPH έχει υψηλή απορρόφηση σε αιθανολικό διάλυμα στα 517 nm. Όσο το ηλεκτρόνιο αυτό δεσμεύεται, η απορρόφηση μειώνεται και ο βαθμός αποχρωματισμού είναι στοιχειομετρικά ο αριθμός των ηλεκτρονίων που έχουν δεσμευτεί.

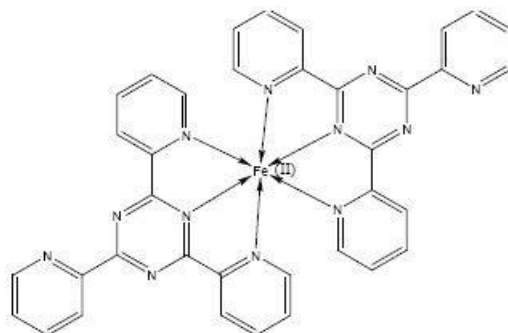
### 2.1.4.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης-FRAP (Ferric Reducing Activity Power- FRAP)

Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Benzie και Strain (1996) για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος του αίματος και από τότε έχει τροποποιηθεί για την χρήση της και σε άλλα φυσικά προϊόντα όπως τα φυτικά εκχυλίσματα.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση διεξάγεται σε pH = 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη (Dayan, 2008). Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω:



όπου ArOH: φαινολικό αντιοξειδωτικό, TPTZ: 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη



FRAP:  $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Ferrous tripyridyltriazine cation)

**Σχήμα 3.** Δομή του FRAP  $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Arak et al., 2007)

Λόγω της βαθμιαίας μείωσης της απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου για μερικές κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών όπως τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή, θα πρέπει να επέλθει ένας συμβιβασμός ανάμεσα στις τεχνικές μέτρησης (π.χ. γρήγορη έναντι καθυστερημένης μέτρησης της απορρόφησης στους 37 °C). Έτσι οι Figuzi et al., (2008), θεωρούν ότι οι τιμές που λαμβάνονται με μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm σε χρόνο 4 min λαμβάνουν υπόψη την κινητική της αντίδρασης καλύτερα από τις τιμές που λαμβάνονται στα 60 min. Πρέπει επομένως στα αποτελέσματα να

αντικατοπτρίζεται και η κινητική της αντίδρασης και η θερμοδυναμική αυτής ώστε να συλλέγονται χρήσιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών των τροφίμων.

Επιπλέον το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή με τα υψηλότερα αποτελέσματα δράσης όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο FRAP ήταν και τα πιο ευοξειδωτα συστατικά δηλαδή με το χαμηλότερο δυναμικό οξείδωσης/αναγωγής επιβεβαιώνει ότι η FRAP είναι μια σωστά επιλεγμένη μέθοδος μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης

## **2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC)**

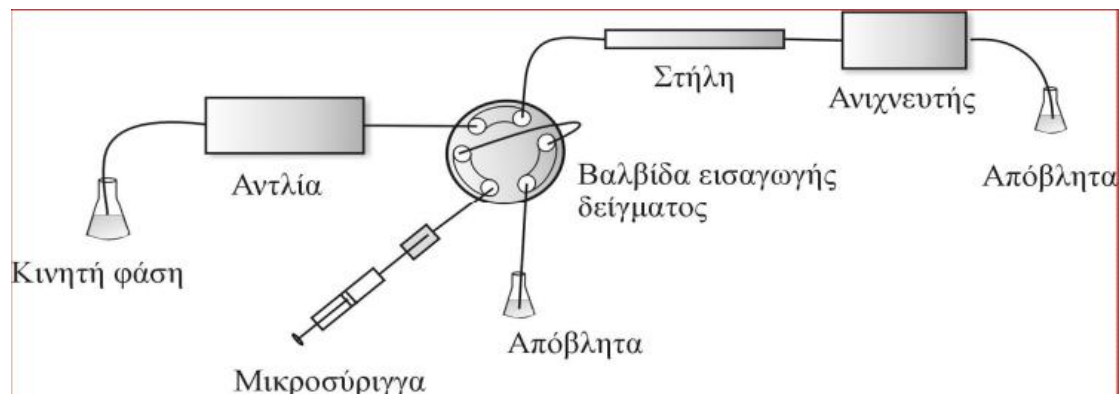
Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να οριστούν ως διαχωριστικές μέθοδοι, οι οποίες προϋποθέτουν μαζική μετακίνηση των συστατικών που ενδιαφέρουν μεταξύ μιας κινητής και μιας ακίνητης φάσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός, γενικά βασίζεται στο φαινόμενο της διαφορετικής αντίδρασης που εμφανίζουν τα συστατικά ενός μίγματος.

Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χαρακτηρίζεται από τη χρήση κινητής φάσης υγρής μορφής για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Το προς ανάλυση μίγμα – διάλυμα διοχετεύεται υπό υψηλή πίεση, σε χρωματογραφική στήλη στην οποία διαχωρίζεται στα συστατικά του. Το ποσοστό του διαχωρισμού είναι σημαντικό και εξαρτάται από το είδος και την έκταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ συστατικών και στατικής φάσης. Η αλληλεπίδραση των συστατικών με τα δυο είδη φάσεων εξαρτάται και καθορίζεται από τις διάφορες δυνατότητες επιλογής διαλύτη και στατικής.

Η διαδικασία διέλευσης του μίγματος από την χρωματογραφική στήλη χωρίζεται σε τρία στάδια: έγχυση, διαχωρισμός, έκλουση. Κατά την έγχυση του μίγματος τα συστατικά που ενδιαφέρουν προσροφούνται στη στατική φάση, ενώ παρασύρονται από την κινητή. Οι δύο αντίθετες δυνάμεις, που ασκούνται στα συστατικά –αντίσταση και ώθηση– έχουν ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό και τη μετακίνηση των συστατικών προς την έξοδο της στήλης. Καρδιά του συστήματος αποτελεί η στήλη, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός.

Εφόσον η στατική φάση αποτελείται από πορώδες υλικό με πολύ μικρή διάμετρο σωματιδίων, απαιτείται αντλία υψηλής πίεσης, ώστε να πραγματοποιηθεί η διέλευση της κινητής φάσης μέσω της στήλης. Η διαδικασία της χρωματογραφίας ξεκινά με την έγχυση του δείγματος στην κορυφή της στήλης και ο διαχωρισμός των συστατικών συμβαίνει καθώς τα συστατικά που ενδιαφέρουν και η κινητή φάση αντλούνται διαμέσου της στήλης.

Τελικά κάθε συστατικό που εκλύεται από την στήλη ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή, η απόκριση του οποίου εμφανίζεται σαν κορυφή στο καταγραφικό σύστημα. Το συνολικό αποτέλεσμα όλης της διαδικασίας στο καταγραφικό είναι γνωστό σαν χρωματογράφημα (Macrae, 1988).



**Σχήμα 4.** Βασική διάταξη της HPLC με σταθερή παροχή διαλύτη - isocratic elution

### 2.3 Αντιοξειδωτικά – Μηχανισμός δράσης

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις οι οποίες όταν προστεθούν σε προϊόντα διατροφής, ιδιαίτερα για τα λιπίδια και τα λιπίδια που περιέχουν τα τρόφιμα, μπορούν να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής τους με την καθυστέρηση της διαδικασίας της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, που είναι ένας από τους σημαντικότερους λόγους για την υποβάθμιση των τροφίμων, κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA) και βουτυλιωμένο hydroxytoluene (BHT), έχουν περιορισμένη χρήση σε τρόφιμα καθώς για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι καρκινογόνα. Ως εκ τούτου, η σημασία για την αναζήτηση και την εκμετάλλευση των φυσικών αντιοξειδωτικών, κυρίως φυτικής προέλευσης, έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια (Singh et al., 2002).

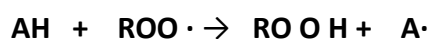
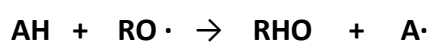
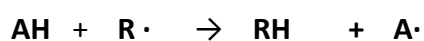
Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που προστίθενται είτε στα λίπη είτε στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση και να καταστήσουν τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζονται αδρανή προϊόντα. Όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους σταματά θεωρητικά η οξείδωση. Όμως, ο αυτόματος τερματισμός της



οξειδωσης, είναι πολύ δύσκολο να συμβεί, αφού είναι απίθανο να αντιδράσουν μεταξύ τους όλες οι ρίζες.

Είναι δυνατόν όμως, με τη προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στις λιπαρές ύλες να εμποδιστεί ή να καθυστερήσει η εμφάνιση της οξειδωσης (Κυριτσάκης, 1984). Η δέσμευση μιας ελεύθερης ρίζας, μπορεί να γίνει με τη προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό προς την ελεύθερη ρίζα. Γι' αυτό άλλωστε τα αντιοξειδωτικά είναι γνωστά και σαν δωρητές υδρογόνου. Με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών εμποδίζεται ο σχηματισμός των αλυσιδωτών αντιδράσεων και κατά συνέπεια διακόπτεται η πορεία της οξειδωσης.

Στις αντιδράσεις που ακολουθούν φαίνεται χαρακτηριστικά ο τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών, που οδηγεί στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών.



Όπου: (AH = αντιοξειδωτικό, R·, RO· και ROO· = ελεύθερες ρίζες, RH = λιπαρό οξύ, ROH = αλκοόλη, ROOH = υπεροξειδίο και A = ελεύθερη ρίζα αντιοξειδωτικού).

Οι ελεύθερες ρίζες αντιοξειδωτικών που σχηματίζονται, μετά την απομάκρυνση του υδρογόνου, μπορεί να σταθεροποιηθούν στη συνέχεια, είτε αντιδρώντας με άλλες ρίζες αντιοξειδωτικών, είτε με ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων (Κυριτσάκης, 1984).



### 2.3.1 Φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά

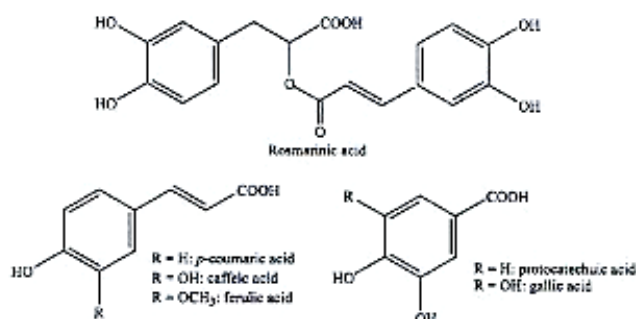
Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο και μια σειρά από μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες από τα απλά φαινολικά μόρια έως πολυμερείς ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις απαντώνται ως μονο- και πολυσακχαρίτες που συνδέονται με μια ή περισσότερες από τις υδροξυλομάδες τους με σάκχαρα και μπορούν επίσης να εμφανιστούν με την μορφή εστέρων και μεθυλεστέρων. Κύριες φαινολικές ενώσεις που

είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση είναι τόσο οι απλές μονοφαινόλες όπως η π-κρεσόλη, η 3-αιθυλοφαινόλη και η 3,4-διμεθυλοφαινόλη όσο και διφαινόλες όπως η υδροκινόνη που είναι η πιο διαδεδομένη, τα φαινολικά οξέα όπως τα υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού, φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος, τα φαινολικά διτερπένια και τα флаβονοειδή. Μεταξύ των φαινολικών οξέων που εμφανίζονται σαν φυσικά αντιοξειδωτικά σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα τα πιο διαδεδομένα είναι το καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και το βανιλλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ έχει υψηλή δραστηριότητα συγκρίσιμη της флаβονόλης κερκετίνης. Το φερουλικό οξύ εμφανίζεται να εμποδίζει την προοξείδωση του λινολενικού ή λινελαϊκού οξέος σε υψηλές συγκεντρώσεις

### 2.3.2 Φαινολικά οξέα

Οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα αρωματικά φυτά και οι κυριότερες ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών οξέων, των флаβονοειδών και φαινολικών διτερπενίων. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίου/υδρογόνου και παράγοντες αδρανοποίησης δραστικών μορφών οξυγόνου. Έχουν επίσης ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με ιόντα μετάλλων και παρεμπόδισης της αντίδρασης Fenton.

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε: i) υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή καθώς και ως εστέρες ή γλυκοζίτες όπως το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το συριγκικό οξύ και το βανιλλικό οξύ, ii) σε υδροξυλιωμένα παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C6-C3) κυρίως απαντούν με την μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών, όπως το καφεϊκό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Και τέλος γλυκοζιτικοί φαινυλοξικοί εστέρες.



Σχήμα 5. Δομή φαινολικών οξέων

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι η πιο σημαντική κατηγορία φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται στα φυτά και τα προϊόντα τους. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους είναι βιοδραστικά συστατικά με αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία. Ειδικότερα οι ο-διφαινόλες (κατεχόλες) όπως το πρωτοκατεχικό οξύ (3,4- διυδροξυβενζοϊκό οξύ) (PA) και καφεϊκό οξύ (3,4- διυδροξυκινναμωμικό οξύ) (CA) παρουσιάζουν ισχυρή δράση αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών. Το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (GA), έδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο σε γαλακτώματα όσο και σε λιπαρά υποστρώματα. Η αντιοξειδωτική του δράση ήταν παρόμοια του Trolox και πιο ισχυρή από άλλα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (AA).

### 2.3.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων και είναι παράγωγα του βενζο-γ-πυρανίου. Η δομή τους αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους τον Α και τον Β, ενωμένους από μια γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα, συνήθως σε μορφή ετεροκυκλικού δακτυλίου. Στα φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνονται οι κατεχίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες.

Οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες βρίσκονται στα φυτά με την μορφή Ο-γλυκοζιτών, κυρίως στα φύλλα και τα εξωτερικά μέρη των φυτών και στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά. Φλαβονοειδή έχουν βρεθεί ακόμα σε σπόρους (chia seeds), ελαιούχους καρπούς (φιστίκια), στη σόγια και στα προϊόντα της. Έχουν ανιχνευτεί πάνω από 4000 φλαβονοειδή και βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, κόκκινο κρασί και σε πολλά συμπληρώματα διατροφής ή φυτικά φάρμακα.

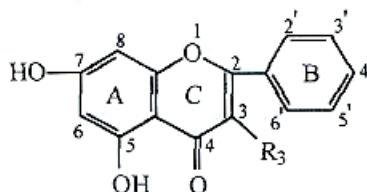
Είναι από τα πιο σημαντικά φαινολικά φυτοχημικά, και το ενδιαφέρον για αυτά τα συστατικά οφείλεται κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Πολλά φλαβονοειδή έχουν βρεθεί να εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Τα φυσικά φλαβονοειδή μπορούν να προσφέρουν μια εναλλακτική λύση για την προστασία από την οξείδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα. Έχουν χαρακτηριστεί ως προασπιστές της υγείας, για την πρόληψη ασθενειών όπως του καρκίνου. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά αντί των ευρέως χρησιμοποιημένων συνθετικών φαινολικών αντιοξειδωτικών στις βιομηχανίες τροφίμων, και να έχουν οφέλη για την υγεία, όπως προκύπτει από επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες

δείχνουν ότι η κατανάλωση τροφίμων που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή μπορεί να μειώσει το κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου.

Τα περισσότερα φλαβονοειδή εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση σε λιπαρά συστήματα τροφίμων. Η δράση αυτή εξαρτάται από τη θέση και τον αριθμό των υδροξυλίων στο μόριο τους. Η υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου Β συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση. Έτσι όλα τα φλαβονοειδή με υδροξύλια στις θέσεις 3 και 4 είναι δραστικά. Επίσης αναφέρεται ότι η ο-διυδροξυλίωση στον ένα αρωματικό δακτύλιο και η π-διυδροξυλίωση στον άλλον δημιουργεί ισχυρά αντιοξειδωτικά ενώ η 5,7-υδροξυλίωση στον αρωματικό δακτύλιο Α δεν έχει σημαντική επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση (φισετίνη και κερκετίνη έχουν την ίδια δράση). Η παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου στην 3-θέση και του διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 του δακτυλίου C ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση.

Ο σχηματισμός γλυκοζίτη στην 3- θέση των φλαβονοειδών με μονοσακχαρίτες ή δισακχαρίτες μειώνει την αντιοξειδωτική δράση (η ρουτίνη είναι ασθενέστερο αντιοξειδωτικό σε σχέση με την κερκετίνη).

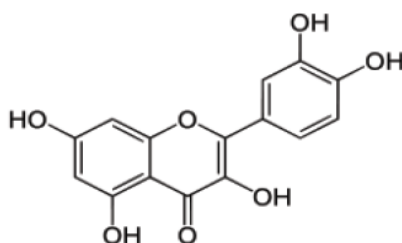
Συνοπτικά τα δομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση είναι : i) η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 και καρβονυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου C ii) η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C και iii) η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου Β. Τα φλαβονοειδή δρουν με δυο μηχανισμούς ως αντιοξειδωτικά. Κυρίως διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξείδωσης δίνοντας άτομα υδρογόνου στις υπέροξυ-ρίζες, όπως όλα τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση. Στο σχηματισμό συμπλόκων συμμετέχουν το υδροξύλιο στη θέση 3 και το καρβονύλιο στη θέση 4 των φλαβονολών ή το καρβονύλιο στη θέση 4 και ένα υδροξύλιο στη θέση 5 των φλαβονολών, των φλαβονών και των φλαβανονών.



**Σχήμα 6.** Δομή φλαβονοειδών

Η κερκετίνη (φλαβονόλη) βρίσκεται κυρίως στα μήλα, κρεμμύδια και το πράσινο τσάι, εμφανίζεται κυρίως ως γλυκοζίτης, με σάκχαρα όπως η γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη,

ρουτινόζη ή ξυλόζη, τα οποία ενώνονται με μια υδροξυλομάδα της φλαβονόλης. Η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό *in vitro*. Εντός της οικογένειας των φλαβονοειδών, αδρανοποιεί ισχυρά δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (συμπεριλαμβανομένων και  $O_2 \bullet-$ ) και αζώτου (RNS) ( $NO\bullet$  και  $ONOO-$ ). Αυτές οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κερκετίνης μπορούν να αποδοθούν στη παρουσία δύο δομικών χαρακτηριστικών μέσα στο μόριο που έχουν τη βέλτιστη διάταξη για τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, όπως η δομή της κατεχόλης στο δεύτερο δακτύλιο και η υδροξυλομάδα στη τρίτη θέση του πρώτου και τρίτου δακτυλίου. Επίσης η κερκετίνη ενισχύει σημαντικά την ενδογενή αντιοξειδωτική προστασία λόγω της συνεισφοράς της στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος που είναι 6,024 φορές υψηλότερη από αυτή του αντιοξειδωτικού αναφοράς (Trolox), ενώ η συμβολή της βιταμίνης C και του ουρικού οξέος ουσιαστικά ισοδυναμεί με αυτή του Trolox



**Σχήμα 7.** Δομή κερκετίνης

#### **2.4. Οι πολυφαινόλες στο ρόδι**

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως γνωστές στο φυτικό βασίλειο για τις υγιεινές τους ιδιότητες και συχνά τις συναντούμε στην καθημερινή μας ζωή, αφού περιέχονται στο τσάι, το κόκκινο κρασί, τα φρούτα, τα ποτά και διάφορα φαρμακευτικά φυτά. Αποτελούν την κυριότερη τάξη των φυτοχημικών που βρίσκονται στο ρόδι. Οι φαινολικές αυτές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στο φλοιό και το μεσοκάρπιο του ροδιού και μεταξύ αυτών οι υδρολύμενες ταννίνες, εκχυλίζονται στο χυμό κατά την ολική σύνθλιψη του καρπού στη διάρκεια της επεξεργασίας του. Το κλάσμα των ταννινών αποτελείται και από γαλλικό οξύ και εστέρες ελλαγικού οξέος. Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών συνδυασμών των μονομερών προκαλεί τεράστια πολυμορφία. Οι δομές αυτές υποδιαιρούνται σε 26 γαλλοταννίνες (ταννίνες τύπου I) και ελλαγιταννίνες (ταννίνες τύπου II) καθώς και τους γαλλαγγλεστέρες, όπως την κύρια υδρολύσιμη ταννίνη των ροδιών γνωστή ως

πιουνικαλαγίνη. Περαιτέρω κατηγορίες ελλαγιταννίνων είναι οι δεϋδροελλαγιταννίνες (ταννίνες τύπου III) και τροποποιημένες δεϋδροελλαγιταννίνες (ταννίνες τύπου IV).

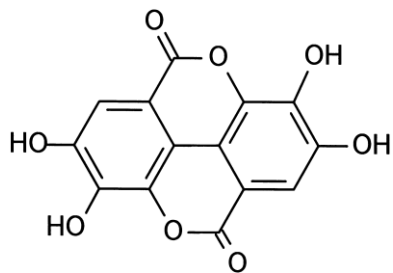
Οι πολυφαινόλες είναι επίσης σημαντικά συστατικά όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες στα επισπέρμια και το χυμό, αφού είναι υπεύθυνες για το ελκυστικό κόκκινο χρώμα και την ήπια στυπτικότητα που είναι χαρακτηριστική του ροδιού (Fischer et al., 2010).

#### **2.4.1 Ελλαγιταννίνες-Ελλαγικό οξύ**

Οι ελλαγιταννίνες (ETS) είναι βιοδραστικές πολυφαινόλες που είναι άφθονες σε ορισμένα φρούτα, ξηρούς καρπούς και σπόρους, όπως ρόδια, μαύρα σμέουρα, βατόμουρα, φράουλες, τα καρύδια και τα αμύγδαλα. Οι ελλαγιταννίνες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία υδρολύμενων ταννινών των πολυφαινολών, είναι πολύπλοκα παράγωγα του ελλαγικού οξέος (EA). Χαρακτηρίζονται από ένα ή περισσότερα εξαϋδροξυδιφαινικά (HHDP) μόρια εστεροποιημένα με ένα σάκχαρο, συνήθως γλυκόζη.

Η υδρόλυση των ελλαγιταννινών με οξέα ή βάσεις οδηγούν σε ελλαγικό οξύ. Αυτή η αντίδραση έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των ελλαγιταννινών ως ισοδύναμα ελλαγικού οξέος μετά από όξινη υδρόλυση των δειγμάτων τροφίμων. Επίσης, στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, προσλαμβάνονται ελλαγιταννίνες που υδρολύονται και έτσι απελευθερώνεται ελλαγικό οξύ. Με περισσότερα από 500 φυσικά προϊόντα που έχουν προσδιοριστεί μέχρι στιγμής, οι ελλαγιταννίνες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των γνωστών ταννινών. Παρατηρήθηκε ότι πολλές ταννίνες μπορούν να υδρολυθούν στα συστατικά τους, όπως για παράδειγμα με την έκθεση σε ζεστό νερό, οξέα, βάσεις ή με ταννάσες, γιατί και ονομάστηκαν υδρολυμένες ταννίνες. Οι μη-υδρολυμένες ολιγομερείς και πολυμερείς προανθοκυανιδίνες ταξινομούνται ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Ως εκ τούτου, ο όρος «υδρολυμένες ταννίνες» περιλαμβάνει τόσο τις γαλλοταννίνες όσο και τις ελλαγιταννίνες.

Το ελλαγικό οξύ (EA), όπως φαίνεται στο σχήμα 8, είναι παράγωγο του διμερούς γαλλικού οξέος, βρίσκεται σε φρούτα, ξηρούς καρπούς, σε συνδυασμό με το πρόδρομό του, εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ ή δεσμευμένο στις ελλαγιταννίνες. Το ελλαγικό οξύ έχει βρεθεί να είναι αντιμεταλλαξιογόνο, αντιικό, λευκαντικό του δέρματος και αντιοξειδωτικό. Η αποτελεσματικότητα των ελλαγιταννινών και του ελλαγικού οξέος ως αντιοξειδωτικών ενώσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή. Συνδέεται άμεσα με το βαθμό της υδροξυλίωσης και μειώνεται με την παρουσία ενός μορίου σακχάρου.



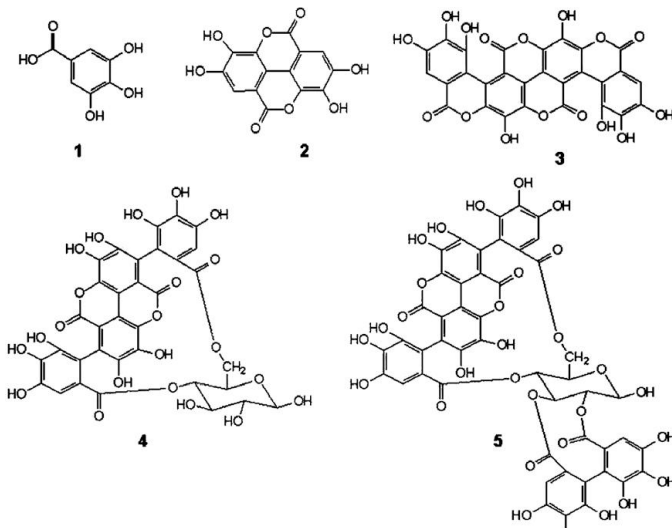
**Σχήμα 8.** Δομή ελλαγικού οξέος

Επιπλέον, στην Ιαπωνία το ελλαγικό οξύ χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, εφόσον λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό. Έτσι, η ανάπτυξη μιας απλής μεθόδου για τον προσδιορισμό του στα τρόφιμα είναι απαραίτητη και σημαντική για την υγεία και τη διατροφική αξία των τροφίμων. Παρά το γεγονός ότι πολλές είναι οι μέθοδοι ανάλυσης του ελλαγικού οξέος που εμπεριέχουν εκχύλιση υγρού-υγρού και βαθμιαία έκλυση, εντούτοις είναι περίπλοκες και απαιτούν πολύ χρόνο και εργαστηριακή δουλειά για να ολοκληρωθούν.

#### **2.4.2 Πιουνικαλαγίνη**

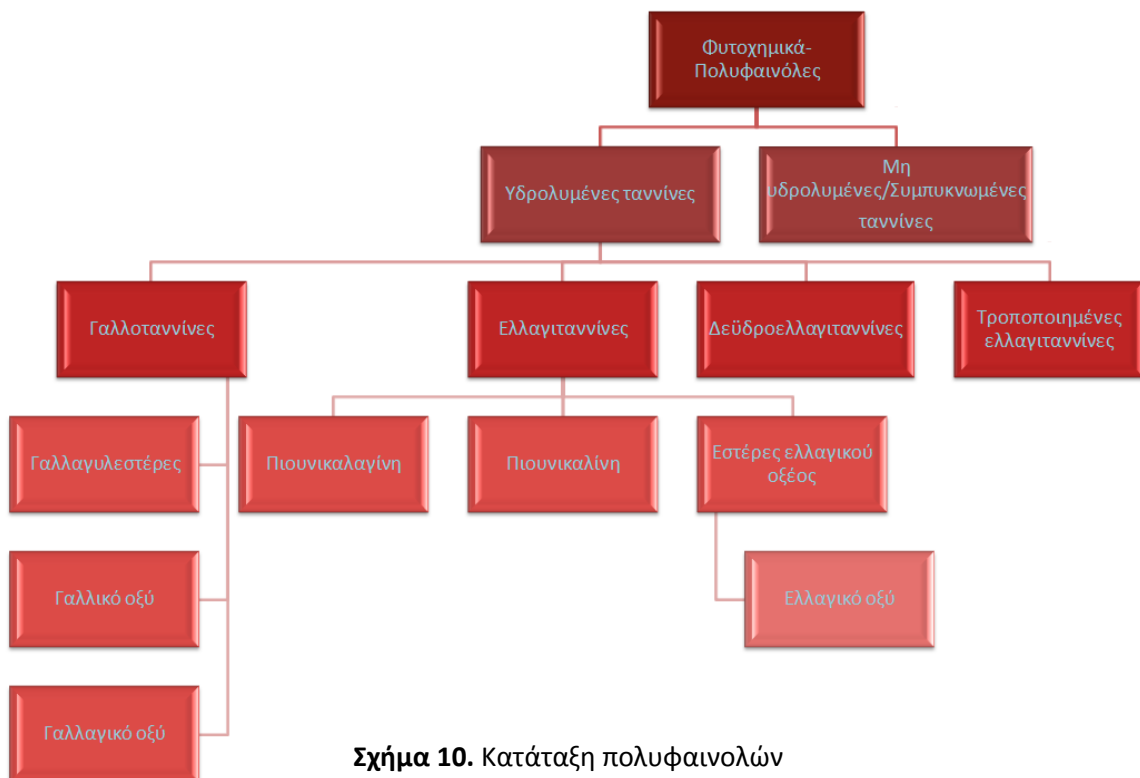
Η πιουνικαλαγίνη είναι μια υδατοδιαλυτή ελλαγιταννίνη που αποτελείται από ένα μόριο γαλλαγικού οξέος, ένα μόριο ελλαγικού οξέος και ένα μόριο γλυκόζης. Τα ισομερή της πιουνικαλαγίνης έχει αναφερθεί ότι είναι κυρίως υπεύθυνα για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση του χυμού. Οι ενώσεις αυτές προσδίδουν το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα στο φλοιό, και εκχυλίζονται στο χυμό κατά την επεξεργασία του καρπού (Begona et al., 2004).

Η πιουνικαλαγίνη, το γαλλαγικό οξύ και η πιουνικαλίνη, είναι η πλειοψηφία των υδρολυμένων ταννινών στις φλούδες. Ο ρόλος των ολικών φαινολών είναι να παρέχουν προστασία στο φυτό από τις ασθένειες και τα παράσιτα, που είναι αναγκαία κυρίως στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των φρούτων. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι υδρολυμένες ταννίνες μπορεί να ευθύνονται για τη συτπτικότητα, η μείωση αυτών των συστατικών στα φρούτα δείχνει ότι τα φρούτα αυτορυθμίζονται με την γεύση των ζώων που καταναλώνουν τα φρούτα με σκοπό την εξάπλωση των σπόρων (Elinor et al., 2009).



**Σχήμα 9.** Δομές πολυφαινολικών ενώσεων στο ρόδι. [ Γαλλικό οξύ (1), ελλαγικό οξύ (2), γαλλαγικό οξύ (3), πιουνικαλίνη (4), και πιουνικαλαγίνη (5).]

Τα πιθανά οφέλη για την υγεία και η υψηλή αντιοξειδωτική δράση του ροδιού οφείλονται στις πολυφαινόλες που περιέχει, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων γαλλικό και ελλαγικό οξύ, και πιουνικαλαγίνη Α και Β, δύο μοναδικές πολυφαινόλες του φρούτου. Στο σχήμα 10 που ακολουθεί φαίνεται η κατάταξη των πολυφαινολών.



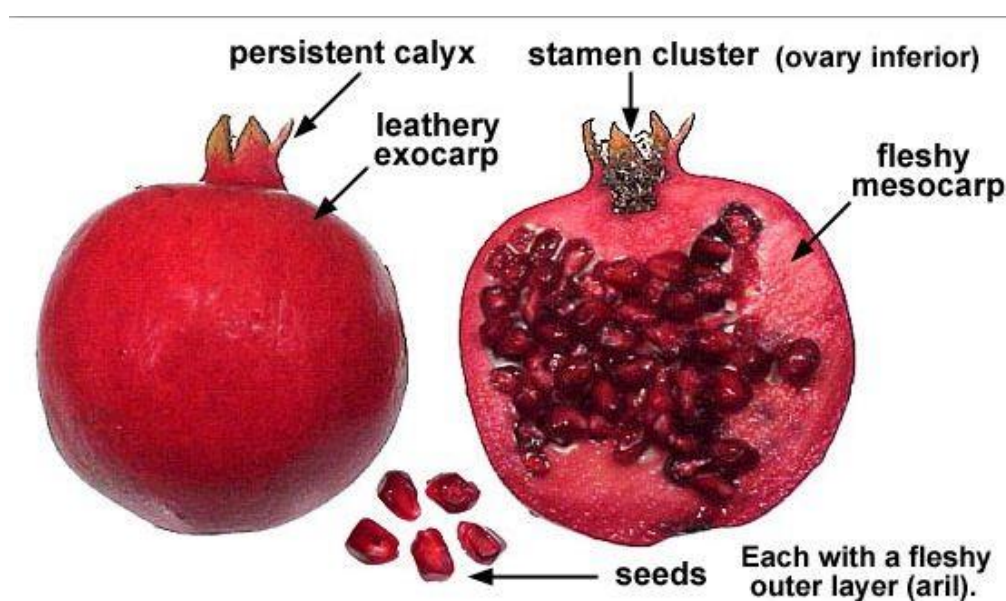
**Σχήμα 10.** Κατάταξη πολυφαινολών



## 2.5 Ρόδι- Χημική σύσταση-Δράσεις

### 2.5.1. Καρπός

Το ρόδι είναι αντικείμενο έρευνας για πάνω από 100 χρόνια στην επιστήμη της φαρμακευτικής. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υδατικής και λιπαρής φάσης του καρπού, καθώς και μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών που βρίσκονται σε κάθε φάση. Αν και αναμφίβολα, το μεγαλύτερο μέρος σχετικά με τη χημεία του ροδιού και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες εξακολουθεί να μένει άγνωστο, οι απαρχές της πιθανής χρήσης του για την πρόληψη του καρκίνου και της χημειοθεραπείας, σε μεγάλο βαθμό απορρέουν από τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τόσο της υδατικής όσο και της λιπαρής του φάσης, όπου οι μελέτες είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια. Μεγάλο μέρος της έρευνας ολοκληρώθηκε για το ρόδι τα τελευταία 7 χρόνια όπου και έχει επικεντρωθεί στην αντιοξειδωτική δράση των διαφόρων επιμέρους τμημάτων του δέντρου. Στο σχήμα 11 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η δομή του καρπού (Lansky et al., 2007).



Σχήμα 11. Δομή ροδιού

### 2.5.1.1 Σπόρος

Το λάδι από σπόρο του ροδιού (ΛΣΡ) αποτελεί το 12-20% του συνολικού βάρους του σπόρου. Το λάδι αποτελείται από περίπου 80% συζευγμένα οκταδεκατριενοϊκά λιπαρά οξέα, με υψηλή περιεκτικότητα σε cis 9, trans 11, 13 cis οξέα (δηλ. πιουνικό οξύ), όπου συντίθενται επί τόπου από μη συζευγμένο οκταδεκατριενοϊκό λιπαρό οξύ, λινελαϊκό οξύ, το οποίο αποτελεί περίπου το 7% του ΛΣΡ. Το λιπαρό οξύ περιλαμβάνει πάνω από 95% του ελαίου, όπου το 99% είναι τριγλυκερίδια. Την μειονότητα των συστατικών του ελαίου περιλαμβάνουν οι στερόλες, τα στεροειδή, και ένα βασικό στοιχείο στα έλυτρα των θηλαστικών, το σερεβροσίδιο. Η μήτρα του σπόρου περιλαμβάνει λιγνίνη, προϊόντα σύντηξης του κυτταρικού τοιχώματος και υδροξυκιναμικά οξέα, ισχυρά αντιοξειδωτικά και παράγωγα λιγνίνης (Lansky et al., 2007).

### 2.5.1.2 Χυμός

Ανθοκυάνες, ισχυρά αντιοξειδωτικά φλαβονοειδή, παρέχουν στο χυμό από ρόδι το ζωντανό χρώμα του, του οποίου η ένταση αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στο χυμό και τους σπόρους περιλαμβάνουν Fe, που είναι και σχετικά διαδεδομένος, αλλά όχι σε τόσο υψηλά επίπεδα όπως στο καρπούζι, και Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sc, Se, Sn, Sr, και Zn. Ο εμπορικός χυμός ροδιού (EX) παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντι-αθηρωματικές ιδιότητες που αποδίδονται στην υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες όπως το ελλαγικό οξύ (EA), τις ελεύθερες και δεσμευμένες μορφές του [ως ελλαγιταννίνες (ET) και γλυκοζίτες του ελλαγικού οξέος (EAF)], γαλλοταννίνες και ανθοκυανίνες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη και γλυκοζίτες πελαγρονιδίνης,) και φλαβονοειδή (κερκετίνη, καμπφερόλη και γλυκοζίτες λουτεολίνης). Η πιο άφθονη από αυτές τις πολυφαινόλες είναι η πιουνικαλαγίνη, μια ET που λειτουργεί ως βιοενεργό συστατικό υπεύθυνο για > 50% της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού. Η πιουνικαλαγίνη βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στο φλοιό του φρούτου και κατά την επεξεργασία του εκχυλίζεται και στο χυμό σε σημαντικές ποσότητες που φτάνουν την τάξη των > 2 g / L χυμού. In vitro οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της πιουνικαλαγίνης, του ελλαγικού οξέος και των ολικών ταννινών στο εκχύλισμα ροδιού, ενισχύονται σε συνδυασμό με άλλες πολυφαινόλες οι οποίες βρίσκονται στο χυμό (Seerama et al., 2005). Η φλούδα είναι ένα υποπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής χυμού, πλούσια πηγή υδρολυμένων ταννινών που ονομάζονται ελλαγιταννίνες (ETS). Στον εμπορικό χυμό ροδιού,

αυτές οι ETS προέρχονται από το φλοιό του λόγω της υδρόφιλης φύσης τους (Seeram et al., 2005).

### **2.5.1.3 Περικάρπιο (οι φλούδες, το δέρμα, το εξωκάρπιο είναι συνώνυμα)**

Τόσο τα φλαβονοειδή όσο και οι ταννίνες είναι πιο άφθονα στις φλούδες των φρούτων που φύονται άγρια σε σύγκριση με τα φρούτα που καλλιεργούνται.

Μια βιβλιογραφική έρευνα αποκάλυψε ότι οι ταννίνες του περικαρπίου του ροδιού δρουν κατά του ιού του έρπητα των γεννητικών οργάνων. Το εκχύλισμα της φλούδας του ροδιού επίσης φαίνεται να είναι ένας ισχυρός ιοκτόνος παράγοντας και έχει χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε αντιμυκητιακά και αντιικά σκευάσματα. Υπάρχουν αναφορές για τη χρήση υδατικού αφεψήματος φλούδας του ροδιού σε σκόνη, ως ένα πολυλειτουργικό κολπικό υπόθετο για την αντισύλληψη, την πρόληψη και θεραπεία των αφροδίσιων νοσημάτων. Η φλούδα του ροδιού αναφέρεται ως μέρος παρασκευάσματος που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λοίμωξης των αρσενικών ή θηλυκών σεξουαλικών οργάνων, τη μαστίτιδα, την ακμή, τη θυλακίτιδα, την αλλεργική δερματίτιδα, το έγκαιμα και τη θεραπεία της διάρροιας και δυσεντερίας και ως μέρος φαρμάκων για τη θεραπεία των νόσων του στόματος. Το εκχύλισμα της φλούδας του ροδιού, όταν εισαχθεί στο χυμό, βελτιώνει την επιτάχυνση της καθίζησης κατά του θολώματος (Singh et. al., 2002).

### **2.5.1.4 Φύλλωμα**

Μοναδικές οι ταννίνες που ανιχνεύονται στα φύλλα του ροδιού, όπως και στην φλούδα. Τα φύλλα περιέχουν επίσης γλυκοζίτες απιγενίνης, μια φλαβόνη με αγχολυτικές ιδιότητες. Όσον αφορά τα χημικά στοιχεία, το N είναι υψηλό σε σχετικά μεσαίο στάδιο ωρίμανσης, ενώ το K σε πρώιμο, Ca και Fe σε παλιά φύλλα. Τον Ιούλιο και τον Αύγουστο στο βόρειο ημισφαίριο, N και K είναι τόσο χαμηλά κατά την άνθηση και καρποφόρηση, ενώ με την ωρίμανση των καρπών, μειώνονται και Mg, Fe και Zn.

### **2.5.1.5 Άνθη**

Τα λουλούδια περιέχουν ενώσεις, που επίσης βρέθηκαν στις φλούδες (π.χ. γαλλικό οξύ) και τους σπόρους (π.χ. ουρσολικό οξύ). Περαιτέρω μελέτη είναι σε εξέλιξη για τη χημική τους ανάλυση και προκαλούν διεθνώς το φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει συστατικά που έχουν βρεθεί στο χυμό, στο φλοιό, στους σπόρους, στα φύλλα και στα άνθη. Επίσης γνωστή είναι η φαρμακολογική δράση τους στα κύτταρα των θηλαστικών που σχετίζονται με την πρόληψη και / ή τη θεραπεία των

κακοηθών κυττάρων. Καθώς η χημική σύσταση του καρπού είναι αρκετά πολύπλοκη, πολλά είναι και τα θέματα της αύξησης της απόπτωσης, της μείωσης των φλεγμονών, της μείωσης της μετάστασης και της εισβολής, καθώς και της μειωμένης αντίστασης στη δράση των φαρμάκων. Για παράδειγμα, οι ενώσεις, όπως το ουρσολικό οξύ, η γ-τοκοφερόλη, το ελλαγικό οξύ, η κερκετίνη, οι ελλαγιτανίνες, η λουτεολίνη και η απιγενίνη έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση απόπτωσης στα κυτταρα του όγκου (Lansky et al., 2007).

**Πίνακας 1.** Συστατικά με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές ή αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Μέρος του φυτού	Συστατικά με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές ή αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
<b>Σπόρος</b>	γ-Τοκοφερόλη
	Στερόλες
	Πιουνικό οξύ
	Υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό και ελλαγικό)
	Υδροξυκιναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ)
<b>Χυμός και φλούδες</b>	Κατεχίνες και επικατεχίνες
	Προανθοκυανίνες και ανθοκυανίνες
	Κερκετίνη
	Ελλαγιτανίνες (πιουνικαλίνη και πιουνικαλαγίνη)
	Φλαβονόλες
<b>Φλούδες</b>	Φλαβόνες (π.χ. λουτεολίνη)
	Απιγενίνη
<b>Φύλλα</b>	Ασιατικό οξύ
	Μασλιτικό οξύ

### 2.5.2 Ρόδι-Αντιοξειδωτική δράση-Φαινολική σύσταση

Τα φυσικής ή φυτικής προέλευσης αντιοξειδωτικά εκχυλίζονται από πρώτες ύλες ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, με οργανικούς διαλύτες όπως είναι η μεθανόλη, ο διαιθυλαιθέρας και η ακετόνη. Η μεθανόλη είναι ένα αποτελεσματικό εκχυλιστικό μέσο για την παραλαβή ενός ευρέως φάσματος πολυφαινολών, επομένως είναι ένας συχνά

χρησιμοποιούμενος διαλύτης τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα (Wang, Wang, & Choong, 2004). Οι πολυφαινόλες εκχυλίζονται από φλούδες του ροδιού συνήθως με μεθανόλη και / ή συνδυασμούς μεθανόλης και άλλων οργανικών διαλυτών και με τις κλασικές μεθόδους εκχύλισης. Το νερό δεν είναι τόσο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση πολυφαινολικών συστατικών από τις φλούδες του ροδιού συγκριτικά με τη μεθανόλη υπό κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορεί να επηρεάσουν τη δράση των εκχυλισμάτων του ροδιού, δεδομένου ότι οι διαφορετικοί διαλύτες καθώς και η εκχύλιση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, μπορούν να συνεισφέρουν στην διαλυτοποίηση και την παραλαβή διαφορετικών δραστικών ενώσεων. Σε πολλές μελέτες γίνεται αναφορά σε ολικές φαινόλες, ολικές ταννίνες ή φλαβονοειδή, σε συσχετίσεις με τα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και σε ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς μεμονωμένων φαινολικών συστατικών σε χυμούς και επιμέρους εκχυλίσματα τμημάτων ροδιού από διαφορετικές ποικιλίες και προελεύσεις.

Οι Yunfeng et al, (2006) εκχύλισαν αντιοξειδωτικά από φλούδα του ροδιού, χρησιμοποιώντας ένα μείγμα αιθανόλης, μεθανόλης και ακετόνης, και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος ερευνήθηκαν περαιτέρω και συγκρίθηκαν με το εκχύλισμα της πούλπας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μείγμα των διαφορετικών διαλυτών ήταν πιο ισχυρό στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών από ό,τι ο κάθε διαλύτης ξεχωριστά. Τα εκχυλίσματα της φλούδας είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αντιοξειδωτικών από ότι της πούλπας. Η σύσταση σε ολικές φαινόλες, φλαβονοειδή και προανθοκυανιδίνες ήταν επίσης υψηλότερη στο εκχύλισμα φλούδας από το εκχύλισμα πούλπας. Όσον αφορά τις φαινόλες η πούλπα είχε συγκέντρωση  $24.4 \pm 2.7$  (mg / g) και η φλούδα σχεδόν 10-πλάσια  $249.4 \pm 17.2$  (mg / g), ενώ η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στην πούλπα ήταν  $17.2 \pm 3.3$  (mg / g) και στη φλούδα  $59.1 \pm 4.8$  (mg / g). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το εκχύλισμα φλούδας παρουσίασε μεγαλύτερη ικανότητα αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας σουπεροξειδίου από ότι της πούλπας. Σε μια συγκέντρωση των 50  $\mu\text{g/L}$ , η δράση ήταν 43.0% και 37.7% για τα εκχυλίσματα φλούδας και πούλπας, αντίστοιχα. Με βάση τη μέθοδο FRAP, το εκχύλισμα φλούδας ήταν πολύ ισχυρότερο από το εκχύλισμα πούλπας. Το εκχύλισμα φλούδας του ροδιού είχε επίσης πολύ υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη των σπόρων, όπως βρέθηκε με την εφαρμογή των μεθόδων του  $\beta$ -καροτενίου-λινελαϊκού και DPPH.

Οι Singh et al., (2002) μελέτησαν τα κλάσματα που εκχυλίστηκαν από φλούδες και σπόρους ροδιού με οξικό αιθυλεστέρα, μεθανόλη και νερό. Τα εκχυλίσματα αυτά μελετήθηκαν για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες με την εφαρμογή μεθόδων in vitro,

όπως η DPPH. Το εκχύλισμα φλούδας έδειξε 81% αντιοξειδωτική δράση σε 50 ppm, ενώ το εκχύλισμα σπόρων έδειξε 23,2% σε 100 ppm. Η φλούδα που εκχυλίστηκε με μεθανόλη έδωσε τη μέγιστη απόδοση σε εκχύλισμα και περιεκτικότητα σε φαινολικά, και ακολούθησαν ο οξικός αιθυλεστέρας και το νερό. Το υδατικό εκχύλισμα σπόρων βρέθηκε να έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά και ακολούθησαν τα εκχυλίσματα μεθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε φαινόλες των διαφόρων εκχυλισμάτων φλούδας, έτσι, το μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας έδειξε μεγαλύτερη δράση σε σύγκριση με τα άλλα εκχυλίσματα. Ωστόσο, στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σπόρου, το φαινολικό περιεχόμενο είναι αρκετά χαμηλό και δεν μπορεί να υπάρξει άμεσος συσχετισμός μεταξύ φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής δράσης. Στα 50 ppm, τα εκχυλίσματα φλούδας οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και νερού έδωσαν 46, 81, και 43% δράση ελεύθερων ριζών, αντίστοιχα, σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο. Στα 100 ppm, τα εκχυλίσματα σπόρων EtOAc, MeOH και νερού έδωσαν 26,5, 23,2, και 39,6% δράση ελεύθερων ριζών, αντίστοιχα.

Οι Fischer et al., (2011) υποστήριξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι σημαντικά συστατικά όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ροδιού, αφού προσδίδουν το ελκυστικό κόκκινο χρώμα και την ήπια στυπτικότητα που είναι και η χαρακτηριστική γεύση του ροδιού. Οι ελλαγιταννίνες βρέθηκαν να είναι οι κύριες φαινόλες σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα, μεταξύ των οποίων η πιουνικαλαγίνη που κυμάνθηκε από 11 έως 20 g ανά χιλιόγραμμο επί ξηρής βάσης του μεσοκαρπίου και της φλούδας καθώς και από 4 έως 565 mg / L στους χυμούς. Οι μεμονωμένες ενώσεις, τα εκχυλίσματα και οι χυμοί εξετάστηκαν επίσης με την εφαρμογή των μεθόδων TEAC, FRAP και Folin-Ciocalteu όπου βρέθηκε υψηλή συσχέτιση ( $R^2 = 0.9995$ ) μεταξύ των μεθόδων TEAC και FRAP, αλλά και με τις ολικές φαινόλες όπως προσδιορίστηκαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και HPLC. Τα αποτελέσματα των μεθόδων που εφαρμόσαν ήταν τα εξής: FRAP: φλούδα: 589.1 mmol Trolox/kg, χυμός: 8.8-31.5 mmol Trolox/L. Ολικές φαινόλες: φλούδα: 101856.3 mg GA/kg, χυμός: 2015-5186 mg GA/L. HPLC ελλαγικό οξύ (μετά από όξινη υδρόλυση): φλούδα: 637.7 mg/kg ξηρής βάσης, χυμός: 2.1-7.2 mg/L. Συνολικά 48 φαινολικές ενώσεις ανιχνεύθηκαν στη φλούδα του ροδιού, το μεσοκάρπιο και τα επισπέρμια. Κατέληξαν ότι οι ελλαγιταννίνες είναι αυτές που κυριαρχούν στο ρόδι και τα προϊόντα του, ότι η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις και πως οι πρώτες ύλες και η επεξεργασία τους επηρεάζουν σημαντικά το προφίλ και τις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις.

Σύμφωνα με τους Garima et al, (2009) οι ολικές φαινόλες και σημαντικές φαινολικές ενώσεις προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και HPLC. Δύο in vitro μέθοδοι, FRAP και Trolox ισοδύναμης αντιοξειδωτικής δράσης, χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Τα υδρόφιλα δείγματα εκχυλίσθηκαν με μείγμα διαλυτών ακετόνη/νερό/οξικό οξύ (70:28:2 v/v/v), ενώ τα λιπόφιλα με εξάνιο. Συνολικά, η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ανιχνεύτηκε στα φύλλα και ακολούθησαν η φλούδα, η πούλπα, και οι σπόροι. Η αντιοξειδωτική δράση και η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες βρέθηκαν να έχουν υψηλή συσχέτιση. Αθροίσματα υδρόφιλων και υδρόφοβων φαινολικών κλασμάτων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και βρέθηκαν στην πούλπα: 161.5-173.4 και στην φλούδα 285.8-329.1 mg GAE/100g νωπού βάρους. Τα κύρια φαινολικά οξέα που προσδιορίστηκαν ήταν: καφεϊκό οξύ (πούλπα: 12.3-14.4 mg/100g νωπού βάρους, φλούδα: 18.9-21.4), π- κουμαρικό (πούλπα: 6.6-8.1, φλούδα: 3.8-5.2 mg/100g νωπού βάρους), και φερουλικό οξύ (πούλπα: 1.3-3, φλούδα: 17.1-18.9 mg/100g νωπού βάρους) και φλαβονοειδή όπως η κατεχίνη (πούλπα: 82.7-101.2, φλούδα: 115.8-126.7/100g νωπού βάρους), επικατεχίνη (πούλπα: 9.6-11.7, φλούδα: 25.4-29.5 /100g νωπού βάρους) και κερκετίνη (πούλπα: 66.7-77.1, φλούδα: 92.1-99.2 /100g νωπού βάρους). Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν να έχουν οι υδρολυμένες ταννίνες, (οι γαλλοταννίνες, παράγωγα ελλαγικού οξέος, και γαλλαγυλ-ταννίνες κυρίως ισομερή πιουνικαλαγίνης και πιουνικαλίνης) με το εκχύλισμα φλούδας να έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα (πούλπα: 71.2-103.1 mg/100g νωπού βάρους, φλούδα: 4792.3-6894.8 mg/100g νωπού βάρους).

Οι Çam et al., (2009) μελέτησαν χυμούς από οκτώ διαφορετικές ποικιλίες ροδιού μετρώντας την αντιοξειδωτική τους δράση και τις ολικές φαινόλες. Όλες οι ποικιλίες έδωσαν αποτελέσματα με τη μέθοδο DPPH 29.8-72.3 ml χυμό/g. Και οι οκτώ έδωσαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (73.0-91.8%) από τους χυμούς της ποικιλίας "Ganesh" (69%) που αναφέρθηκε από τους Kulkarni και Aradhya (2005). Οι ολικές φαινόλες βρέθηκαν να κυμαίνονται από 208.3-343.6 mg κατεχ./100 ml χυμού, ενώ σε άλλη μελέτη οι Gil et al. (2000) ανέφεραν ότι η ποικιλία "Wonderful" έφτανε τα 248.7 mg/100 ml. Σε άλλη έρευνα από τους Vardin & Fenercioglu (2003), η ποικιλία "Suruk" έφτανε τα 156.4 mg/100 ml. Οι ολικές φαινόλες των χυμών ροδιού κυμάνθηκαν σε μεγαλύτερες τιμές από αντίστοιχους χυμούς άλλων κόκκινων φρούτων όπως το κεράσι (79.7 mg/ 100 ml) και γογγύλι (77.2 mg/ 100 ml) (Gündüç & El, 2003).

Οι Çam et al., (2010) υποστήριξαν ότι το ποσοστό των φλαβονοειδών και οι συμπυκνωμένες ταννίνες στα εκχυλίσματα αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος του συνόλου

των φαινολικών ενώσεων. Οι υδρολυμένες ταννίνες συνέβαλαν σε σημαντικό ποσοστό στις ολικές φαινόλες της φλούδας. Οι κύριες πολυφαινόλες στη φλούδα του ροδιού ήταν η πιουνικαλαγίνη και τα παράγωγά της, όπως η πιουνικαλίνη, το γαλλαγικό οξύ, το ελλαγικό οξύ, και οι γλυκοζίτες ελλαγικού οξέος. Το περιεχόμενο σε πιουνικαλαγίνη (A + B) στις φλούδες ροδιού ορίστηκε ως  $116.6 \pm 12.2$  mg / g επί ξηρού. Το ποσό των παραγώγων πιουνικαλαγίνης στις φλούδες ανιχνεύτηκε στα  $10.3 \pm 3.7$ ,  $15.5 \pm 2.6$  και  $0.16 \pm 0.1$  mg / g για τις ενώσεις 1, 2, και 4, αντίστοιχα. Το ελλαγικό οξύ ανιχνεύτηκε στα εκχυλίσματα περίπου στα  $1.25 \pm 0.2$  mg / g. Το ποσό των παραγώγων ελλαγικού οξέος στις φλούδες ανιχνεύτηκε στα  $1.21 \pm 0.1$ ,  $1.19 \pm 0.2$  και  $0.83 \pm 0.1$  mg / g για τις ενώσεις 7, 8 και 9, αντίστοιχα. Γαλλικό οξύ, επίσης, ανιχνεύτηκε στα  $1.43 \pm 0.3$  mg / g στις φλούδες. Οι πολυφαινόλες στις φλούδες (μόνο πιουνικαλαγίνη A και B) εκχυλίστηκαν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης και προσδιορίστηκαν με HPLC, στα πλαίσια της προαναφερθείσας μελέτης. Το σύνολο σε ελλαγικό οξύ και άλλα παράγωγα ελλαγικού οξέος ( $4.5$  mg / g) ήταν χαμηλότερο από εκείνο των τιμών που αναφέρθηκαν από τους Zhou, Li, Zhang, και Γιου (2008) ( $10.8$  mg / g). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην περιορισμένη διαλυτότητα του ελλαγικού οξέος στο νερό σε σύγκριση με τη μεθανόλη που χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης στην προαναφερθείσα μελέτη. Το άθροισμα των μεμονωμένων φαινολικών ουσιών στις φλούδες υπολογίστηκε με HPLC ως  $147.9$  mg/g επί ξηρού. Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά στις φλούδες επίσης προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ως  $159.4 \pm 5.2$  mg ισοδύναμο κατεχίνης / g ξηράς ουσίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκχύλιση με νερό υπό πίεση ήταν εξίσου αποτελεσματική με τη συμβατική εκχύλιση με μεθανόλη για την ανάκτηση των πολυφαινολών από φλούδες ροδιού. Οι ολικές φαινόλες στις φλούδες που εκχυλίστηκαν με νερό υπό πίεση, και η συμβατική στερεά-υγρή εκχύλιση με μεθανόλη ανιχνεύτηκαν στα  $264.3$  και  $258.2$  mg / g ταννικού οξέος αντίστοιχα. Οι υδρολυμένες ταννίνες ήταν οι κυρίαρχες πολυφαινόλες στις φλούδες που αντιστοιχούν σε  $262,7$  mg / g ταννικού οξέος αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα της πιουνικαλαγίνης στις φλούδες από την εκχύλιση του νερού υπό πίεση βρέθηκε να είναι  $116,6$  mg / g επί ξηρού. Τα υδατικά εκχυλίσματα σε φαινόλες με τη μέθοδο DPPH (για τα 100-φορές αραιωμένα εκχυλίσματα: 44.6 – 67.2%). Τα υδατικά εκχυλίσματα υπό πίεση (TP:  $264.3$  mg ταννικό οξύ / g, υδρολυμένες ταννίνες:  $262,7$  mg TAE / g) και τα μεθανολικά εκχυλίσματα (TP:  $258.2$  mg TAE / g, υδρολυμένες ταννίνες:  $260,2$  mg TAE / g), έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα σε ολικές φαινόλες και υδρολυμένες ταννίνες. Τα εκχυλίσματα μεθανόλης έδωσαν ολικά φλαβονοειδή ( $18.1$  mg κατεχινών / g) υψηλότερα από εκείνα των υδατικών υπό πίεση εκχυλισμάτων ( $13$  mg CAE / g). Αυτό



δείχνει την αποτελεσματικότητα της μεθανόλης για την εκχύλιση των φλαβονοειδών, τα οποία συνήθως παραλαμβάνονται με οργανικούς ή υδατικούς οργανικούς διαλύτες. Για το υδατικό εκχύλισμα: TP: 80,5 mg TAE / g, TP: 6,2 mgTAE / g, υδρολυμένες ταννίνες 82,6 mg TAE / g.

Οι Tezcan et al., (2009) ομογενοποίησαν επισπέρμια σε θερμοκρασία δωματίου. Η πούλπα χρησιμοποιήθηκε για χημική ανάλυση εντός δέκα ημερών. Το ρόδι παρουσίασε καλή αντιοξειδωτική δράση, κυρίως λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και άλλες πολυφαινόλες. Το ποσό ολικών φαινολών κυμάνθηκε μεταξύ 1245 και 2076 mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος (GAE) / λίτρο χυμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων ήταν κατά μέσο όρο 5.60 και 7.35 mM TE με τη χρήση μεθόδων TEAC και FRAP. Ωστόσο, τα ομογενοποιημένα προερχόμενα από ολόκληρα τα φρούτα παρουσίασαν περίπου 20-φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από ότι τα εκχυλίσματα του περικάρπιου στην έρευνα όπου 29 διαφορετικά ρόδια συγκρίθηκαν. Σε συμφωνία με τα παραπάνω οι Tzulker et al. (2007) ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες αυξήθηκε κατά περίπου 6.5 φορές και η αντιοξειδωτική δράση κατά περίπου 20 φορές, για τους χυμούς που παρασκευάζονται από ολόκληρα φρούτα σε σύγκριση με τους χυμούς που ετοιμάζονται μόνο από επισπέρμια. Οι ολικές φαινόλες των εκχυλισμάτων που ανιχνεύτηκαν από τους Li et al. (2006) ήταν σχεδόν 10-πλάσιες από του εκχυλίσματος της πούλπας. Έξι από τους επτά χυμούς ροδιού παρουσίασαν υψηλό περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες καθώς και σε αντιοξειδωτικής δράση (DPPH%: 10.37 – 67.46 και FRAP: 18.34 – 109.9 mmol / L Fe<sup>2+</sup>).

Οι Mousavinejad et al., (2009) μελέτησαν το ελλαγικό οξύ, το οποίο είναι ένα σημαντικό φαινολικό οξύ με υψηλή αντιοξειδωτική δράση και έχει ανιχνευτεί σε ορισμένους χυμούς φρούτων (Amakura et al., 2000a, 2000b). Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των συγκεντρώσεων ελλαγικού οξέος και ολικών ταννινών σε διαφορετικές ποικιλίες, οι οποίες κυμαίνονται για το ελλαγικό οξύ από 7 έως 160 mg/L και για τις ολικές ταννίνες από 15 έως 32 g ανά 100 g. Ανέφεραν πως το σύνολο των ταννινών που κατέγραψαν από τη μελέτη, 150 - 320 mg/L, ήταν κάπως μικρότερο από εκείνο που αναφέρεται στην έρευνα των Gil et al. (2000), οι οποίοι ανίχνευσαν συνολική περιεκτικότητα σε ταννίνες της τάξης των 417-539 mg/L για πειραματικούς και εμπορικούς χυμούς από μία ποικιλία ροδιού «Wonderful». Προκειμένου να προσδιοριστούν όλες οι φαινολικές ενώσεις στο χυμό ροδιού, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων, εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών που μελετήθηκαν (2376-9304 mg/L). Για την αντιοξειδωτική δράση

και τα επίπεδα ολικών φαινόλων βρέθηκε θετική και στατιστικά σημαντική η συσχέτιση τους ( $r > 0.98$ ).

Οι Gil et al., (2000) μέτρησαν τις ολικές φαινόλες του χυμού από ρόδι από φρέσκα επισπέρμια ως  $2117 \pm 95$  mg / L και για εμπορικό χυμό ως  $2566 \pm 131$  mg / L, ενώ οι Tzulker et al., (2007) ανέφεραν ότι οι ολικές φαινόλες από ολόκληρα φρούτα, υπολογίστηκαν από 1875 έως 11250 mg / L, οι οποίες είναι υψηλότερες κατά περίπου 6.5-φορές σε σύγκριση με τους χυμούς που προέρχονται μόνο από επισπέρμια.

Η έρευνα των Tzulker et al. (2007) είχε στόχο την μελέτη της σχέσης μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης, της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, της συνολικής περιεκτικότητας σε ανθοκυανίνες, και τα επίπεδα υδρολυόμενων ταννινών σε τέσσερις διαφορετικούς χυμούς / ομογενοποιημένα από διαφορετικά τμήματα του καρπού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση σε χυμό από περικάρπιο συσχετίζεται σημαντικά με τις ολικές πολυφαινόλες και τις περιεχόμενες ανθοκυανίνες. Σε αντίθεση με τα επισπέρμια, το επίπεδο αντιοξειδωτικών στα ομογενοποιημένα συσχετίζεται σημαντικά με το περιεχόμενο των τεσσάρων υδρολυμένων τανινών όπου η πιουνικαλαγίνη κυριαρχεί, καθώς δεν βρέθηκε συσχέτιση στο επίπεδο των ανθοκυανινών.

Τα επίπεδα τεσσάρων υδρολυμένων τανινών (πιουνικαλαγίνη, πιουνικαλίνη, ελλαγικό οξύ και γαλλαγικό οξύ) συσχετίζονται θετικά με την αντιοξειδωτική δράση των ομογενοποιημάτων από ολόκληρα φρούτα και φλούδες. Η ανάλυση του χυμού ροδιού που παραλήφθηκε ύστερα από την εφαρμογή υδροστατικής πίεσης σε ολόκληρο το φρούτο έδειξε ότι ο κυρίαρχος τύπος των πολυφαινολικών ενώσεων που προέρχονται από τις φλούδες είναι οι υδατοδιαλυτές ενώσεις των υδρολυμένων τανινών και αντιπροσωπεύουν το 92% της αντιοξειδωτικής δράσης του. Αυτή η ομάδα υδρολυμένων τανινών βρίσκεται στο φλοιό (το φλοιό, το δέρμα ή το περικάρπιο), τις μεμβράνες, και το εσωτερικού του καρπού. Η ομάδα των υδρολυμένων τανινών περιέχει ισομερή πιουνικαλαγίνης, υπεύθυνων για το ήμισυ περίπου της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού, εκτός από το ελλαγικό οξύ, το γαλλαγικό οξύ, και την πιουνικαλίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα αυτών των τεσσάρων ενώσεων είναι θετικά και σημαντικά συσχετισμένα με την αντιοξειδωτική δράση και το φαινολικό επίπεδο των ομογενοποιημένων παρασκευασμάτων από ολόκληρα τα φρούτα. Η υψηλότερη τιμή συσχέτισης επιτεύχθηκε μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και πιουνικαλαγίνης στον πολτό που προήλθε από ολόκληρο το ρόδι ( $r = 0.87$ ), και του γαλλαγικού οξέος σε εκχύλισμα φλούδας ( $r = 0.94$ ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι υδρολυμένες τανίνες που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα είναι οι κύριες ουσίες που συμβάλλουν στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Οι Ozgen et al., (2008) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση του επισπέρμιου με τη μέθοδο FRAP η οποία έδωσε αποτελέσματα 6.35 mmol TE/L. Οι ολικές φαινόλες ήταν 1507 mg GAE/ L χυμού. Τα επίπεδα των μεθόδων FRAP και ολικών φαινολών είχαν ισχυρή συσχέτιση ( $r = 0.82-0.96$ ).

Οι Ardekania et al., (2011) μελέτησαν εννιά διαφορετικές ποικιλίες ροδιού από το Ιράν και με εκχύλιση Soxhlet της φλούδας και του επισπέρμιου με διαλύτες όπως ακετόνη, μεθανόλη, νερό, οξικός αιθυλεστέρας, έγινε προσδιορισμός ολικών φαινολών, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής δράσης. Τα αποτελέσματα που βρέθηκαν ήταν τα εξής: Για τις ολικές φαινόλες: πούλπα 11.62-21.03, φλούδα 98.24-226.56 mg GA/g εκχυλ. Ολικά φλαβονοειδή: πούλπα 0.84-2.14, φλούδα 18.61-36.4 mg κατεχίνης/g εκχυλ.

Αντιοξειδωτική δράση (FRAP): πούλπα 0.136-0.234, φλούδα 1.675-2.395 mmol Vit C/ g εκχυλ. Τα εκχυλίσματα φλούδας έδωσαν περίπου 10 φορές μεγαλύτερες τιμές από τα εκχυλίσματα πούλπας. Στον πίνακα 2 που ακολουθεί παραθέτονται τιμές συγκέντρωσης ολικών φαινολών και φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ροδιού.

**Πίνακας 2.** Τιμές συγκέντρωσης ολικών φαινολών και φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ροδιού.

Εκχύλισμα	Διαλύτης	Μέθοδος	Συγκέντρωση	Βιβλιογραφία
Φλούδα	Μείγμα διαλυτών αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη	Φλαβονοειδή	59.1 ± 4.8 (mg/g)	Yunfeng et al., (2006)
Φλούδα	Μείγμα διαλυτών (αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη)	Φαινόλες	249.4 ± 17.2 (mg / g)	Yunfeng et al., (2006)
Πούλπα	Μείγμα διαλυτών (αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη)	Φλαβονοειδή	17.2 ± 3.3 (mg/g)	Yunfeng et al., (2006)
Φλούδα	-	HPLC (μετά από όξινη υδρόλυση)	637.7 mg/kg ξ.β. (EA)	Fischer et al., (2011)
Χυμός	-	HPLC (μετά από όξινη υδρόλυση)	2.1-7.2 mg/L (EA)	Fischer et al., (2011)

Χυμός	-	DPPH	29.8-72.3 ml χυμό/g	Çam et al., (2009)
Φλούδα	Νερό	Ολικά φλαβονοειδή	13 mg CAE/g	Çam et al., (2010)
Φλούδα	Μεθανόλη	Ολικά φλαβονοειδή	18,1 mg κατεχινών / g	Çam et al., (2010)
Χυμός	-	FRAP	18.34-109.9 mmol / L Fe <sup>2+</sup> +	Tezcan et al., (2009)
Χυμός	-	Ολικές φαινόλες	2117±95	Gil et al., (2000)
Χυμός	-	Ολικές φαινόλες	2566±131	Gil et al., (2000)
Φλούδα	(Ακετόνη, μεθανόλη, νερό, οξικός αιθυλεστέρας)	FRAP	1.675-2.395 mmol Vit C/ g εκχυλ	Ardekania et al., (2011)
Επισπέρμιο	-	FRAP	6.35 mmol TE/L	Ozgen et al., (2008)
Σπόρια	Νερό	DPPH	100 ppm	Singh et al., (2002)

## 2.6 Οξειδώσεις in vivo και η σημασία των φυσικών αντιοξειδωτικών

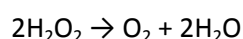
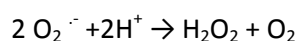
Μια από τις πιο σοβαρές συνέπειες της συμμετοχής του οξυγόνου σε αντιδράσεις οξείδωσης είναι ο σχηματισμός ενεργών μορφών οξυγόνου που δρουν ως ισχυρά οξειδωτικά μέσα. Οι ενεργές μορφές του οξυγόνου μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια όπως οι υδροξυρίζες (OH<sup>·</sup>) και οι υπεροξυρίζες (LOO<sup>·</sup>), υπάρχουν όμως και άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Απαντούν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και η παρουσία τους οφείλεται είτε σε εξωγενείς παράγοντες, είτε είναι αποτέλεσμα μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν ένζυμα ή αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν ιόντα μεταβατικών μετάλλων, όπως τα ιόντα δισθενούς σιδήρου.



Όταν οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν δεν είναι αδρανείς, τότε μπορούν να καταστρέψουν όλα τα είδη των κυτταρικών μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι

υδατάνθρακες, τα λίπη και τα νουκλεϊνικά οξέα και να προκαλέσουν την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για να ανενεργοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και τις άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου. Οι μηχανισμοί αυτοί συνδέονται και συμπληρώνονται μεταξύ τους γιατί ενεργούν σε διαφορετικούς οξειδωτικούς παράγοντες και σε διάφορα τμήματα του κυττάρου.

Ένας τέτοιος μηχανισμός βασίζεται σε ένα σύστημα ενζύμων το οποίο περιλαμβάνει τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που καταλύουν αντίστοιχα τις παρακάτω αντιδράσεις :



Οι δισμουτάσες είναι μια οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων πολύ σημαντικών για την καταλυτική αποικοδόμηση της ρίζας σουπεροξειδίου προς υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του οξυγόνου ενώ οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων πολύ σημαντικών για την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων, κυρίως εκείνων που προέρχονται από την οξείδωση των ακόρεστων ακυλολιπιδίων.

Ένας δεύτερος μηχανισμός αμυντικής προστασίας από την δράση των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνει χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες είναι προϊόντα κανονικού μεταβολισμού και δρουν ως αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, η ουβικινόλη και το ουρικό οξύ. Η ουβικινόλη είναι το μόνο μέχρις στιγμής γνωστό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που συντίθεται στα ζωικά κύτταρα. Θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τη οξείδωση.

Άλλα χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες C και E και τα καροτενοειδή που απαντούν στην καθημερινή τροφή, κυρίως στα φρούτα και λαχανικά, αλλά και σε σημαντικές ποσότητες στα υγρά του σώματος. Η βιταμίνη E περιλαμβάνει μια σειρά τοκοφερολών και τοκοτριενολών, μορίων με σημαντική βιολογική αξία. Είναι λιποδιαλυτή και ως ισχυρό αντιοξειδωτικό όλων των κυτταρικών μεμβρανών προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την οξείδωση. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι υδατοδιαλυτή και θεωρείται ως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό των εξωκυτταρικών υγρών, ενώ εμφανίζει και ενδοκυτταρική δραστικότητα. Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα φυσικών χρωστικών που απαντούν κυρίως στα φυτικά τρόφιμα, αλλά και στους ζωικούς ιστούς. Μερικά από αυτά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A.

Στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης περιέχονται και διάφορες φαινολικές ενώσεις, κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, οι οποίες αν και δεν έχουν διατροφική αξία, εντούτοις θεωρούνται σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Πρόσφατες έρευνες έχουν συνδέσει τη παρουσία των ενώσεων αυτών στα τρόφιμα με την προστασία του οργανισμού από καρκινογενέσεις ή καρδιακές παθήσεις,

Έτσι παραδείγματος χάρη, η θετική δράση της κερκετίνης μια πολύ γνωστής φλαβονόλης *in vivo* αποδίδεται στο ότι παρεμποδίζει:

- ❖ Την ενεργοποίηση παραγόντων που προκαλούν καρκίνο του δέρματος, των αδένων και του παχέος εντέρου στα ζώα
- ❖ Τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος
- ❖ Τη δράση της πρωτεΐνης κινάσης C

Αποτελέσματα από επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι περιορίστηκαν σημαντικά τα συμπτώματα των καρδιακών παθήσεων σε περιπτώσεις όπου αυξήθηκε σε καθημερινή βάση η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών αλλά και προϊόντων που θεωρούνται σημαντικές πηγές κερκετίνης και άλλων φαινολικών ενώσεων όπως το τσάι και το κόκκινο κρασί (Λάγουρη, 1998).

Σε γενικές γραμμές *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι οι χυμοί ή εκχυλίσματα από άλλα φρούτα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση χαμηλότερη από εκείνη του ροδιού. Εκτός από τις *in vitro*, πολλές είναι και *in vivo* μελέτες με κλινικά ευρήματα για αντιοξειδωτική δράση. Παραδείγματα *in vivo* μελετών της ευεργετικής επίδρασης της αντιοξειδωτικής δράσης του ροδιού περιλαμβάνουν: την προστασία του βλεννογόνου του στομάχου αρουραίων από την αιθανόλη ή την τοξικότητα της ασπιρίνης, την προστασία του εγκεφάλου των νεογνών του αρουραίου από υποξία, την πρόληψη της ανδρικής στυτικής δυσλειτουργίας σε ιστούς κουνελιών, καθώς και την κατάργηση του νιτριλοτριξικού σιδήρου (Fe-NTA) που προκαλείται από ηπατοτοξικότητα, δράσεις της γλουταθειόνης (GSH), καταλάσης (CAT), της γλουταθειόνης υπεροξειδάσης (GPX), αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης (GST), ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης του ορού (AST), της αμινοτρανσφεράσης (ALT), αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της χολερυθρίνης και επιπέδων αλβουμίνης, την ηπατική εκφύλιση, και τη νέκρωση. Καρδιαγγειακές επιδράσεις του χυμού από ρόδι στον άνθρωπο, περιλαμβάνουν μείωση της LDL και της ολικής χοληστερόλης άμβλυση συστολικής υπέρτασης και τη μείωση της αρτηριακής στένωσης της καρωτίδας (Lansky et al., 2007).

### 3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών λαμβάνουν χώρα ως φυσιολογική λειτουργία μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Μια υπερπαραγωγή των δραστικών αυτών ειδών λόγω οξειδωτικού στρες μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε βιομόρια και την ανάπτυξη χρόνιων παθήσεων, όπως η γήρανση, η στεφανιαία νόσος και ο καρκίνος. Η επιβλαβής δράση των ελευθέρων ριζών μπορεί να ανασταλεί από αντιοξειδωτικές ουσίες που αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες και αποτοξινώνουν τον οργανισμό. Η τρέχουσα έρευνα επιβεβαιώνει ότι τα διατροφικά αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, του καρκίνου, νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς επίσης και φλεγμονών.

Το ρόδι (*Punica granatum* L.) είναι ένας από τους παλαιότερους εδώδιμους καρπούς και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην ιατρική από πολλούς πολιτισμούς. Η δημοτικότητα του ροδιού έχει αυξηθεί ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία λόγω των αντιμικροβιακών, αντι-ιικών, αντικαρκινικών, ισχυρών αντι-οξειδωτικών και αντι-μεταλλαξιόγνων δράσεων του. Οι πολυφαινόλες, αντιπροσωπεύουν την κυρίαρχη τάξη των φυτοχημικών του ροδιού, που αποτελείται κυρίως από υδρολυμένες ταννίνες, γαλλοταννίνες, ελλαγιταννίνες, γαλλαγυλ-, ελλαγυλ-εστέρες καθώς και ελεύθερα οξέα όπως το ελλαγικό οξύ. Το ελλαγικό οξύ έχει βρεθεί ότι εμφανίζει αντιμεταλλαξιόγνες, αντιιικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως επίσης φαίνεται να έχει και λευκαντική δράση στο δέρμα. Ο καρπός αποτελείται από τρία μέρη: τους σπόρους, το χυμό, και τις φλούδες.

Ο χυμός των επισπέρμιων, τα ομογενοποιημένα (με νερό στο blender) και τα εκχυλίσματα του φλοιού (με νερό βράζον, νερό και μεθανόλη στους 24 και 40 °C) και των σπόρων (με μεθανόλη μετά από εκχύλιση με εξάνιο) από δύο ποικιλίες ροδιού προερχόμενες από την ηπειρωτική Ελλάδα (Κεντρική Μακεδονία και Θράκη), βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας αντίστοιχα, μελετήθηκαν για:

α) την αντιοξειδωτική τους δράση (DPPH radical scavenging activity/αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας) με την χρήση της σταθερής ρίζας DPPH και την αναγωγική τους δράση (Ferric reducing antioxidant power/Αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής τρισθενούς σιδήρου) με τη χρήση του συμπλόκου TPTZ-  $Fe^{3+}$ . Οι μετρήσεις έγιναν στην αρχή και για κάποια από τα εξεταζόμενα κλάσματα και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στο ψυγείο στους 4°C.

β) τον προσδιορισμό ολικών φαινολών, στην αρχή και για κάποια από τα εξεταζόμενα κλάσματα και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στο ψυγείο στους 4°C, τον προσδιορισμό φλαβονοειδών, υδρολυμένων ταννινών και ελλαγικού οξέος χρησιμοποιώντας μεθόδους φασματοφωτομετρίας και υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε εμπορικός εμφιαλωμένος χυμός. Το γαλλικό οξύ, το ασκορβικό οξύ και το ελλαγικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως εξωτερικά πρότυπα.



## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1. Υλικά – Συσκευές

#### 4.1.1. Δείγματα ροδιού

Στα πλαίσια της πτυχιακής, χρησιμοποιήθηκαν ρόδια συμβατικής καλλιέργειας από τη Θράκη και ρόδια βιολογικής καλλιέργειας από τη Χαλκιδική. Τα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν παραθέτονται στον πίνακα 3 που ακολουθεί.

Πίνακας 3. Προέλευση δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα σπορίων	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα σπορίων	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής

#### 4.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

Ανθρακικό Νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (άνυδρο) (Mallinckrodt, New York)

Ασκορβικό οξύ-L(+) 99,7% (Merck, Darmstadt, Germany)

Γαλλικό Οξύ ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) (Fluka, Germany)

Ιωδικό Κάλιο 2,5% ( $\text{KIO}_3$ ) (Fluka, Switzerland)

Κερκετίνη 96% (HPLC) (Neochema, Germany)

κ-Εξάνιο 97% (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany)

Ελλαγικό οξύ  $\geq 95\%$  (HPLC) (Fluka, United Kingdom)

Μεθανόλη 99,8% (HPLC) (Baker, Holland)

Νερό (HPLC) (Merck, Germany)

Νιτρώδες Νάτριο ( $\text{NaNO}_2$ ) (άνυδρο) (HACH Company, USA)

Οξικό Νάτριο 99% ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Merck, Germany)

Οξικό Οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 100% (Merck, Darmstadt - Germany)

Τριχλωριούχος Άργιλος ( $\text{AlCl}_3$ ) (άνυδρο) (Sigma Aldrich, Germany)

Τριχλωριούχος Σίδηρος ( $\text{FeCl}_3$ ) (Sigma Aldrich, Germany)

Υδροχλωρικό οξύ 6N (HCL) (Carlo Erba, Italy)

Folin – Ciocalteu (Merck, Darmstadt - Germany)

DPPH (2,2diphenyl-picrylhydrazyl) 85% (Sigma Aldrich Germany)

TPTZ (2,4,6 – Tri (2-piridyl) -1,3,5-triazine) 98% (Alfa Aesar, Germany)

#### 4.1.3. Όργανα – Συσκευές

- ✓ Συμπυκνωτής, Rotavapor – R – Buchi, Greece
- ✓ Υγρός χρωματογράφος με απαερωτή Finnigan Spectra System SCM 1000 και αντλία Spectra System P2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), ανιχνευτή UV-Vis Fasma 525 (Rigas Labs, Greece). Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης ChromQuest (ChromQuest Scientific Software, Version 4.1, Thermo Electron Co., San Jose, California).
- ✓ Φασματοφωτόμετρο Thermo-scientific Helios γ (UV-Vis) με κυψελίδες lighpath optical LTD (United Kingdom) (1-G-10 mm).
- ✓ Κυκλικά διηθητικά φίλτρα  $\phi$  110 mm (Black Ribbon, Germany)
- ✓ Διηθητικά φίλτρα 0.45  $\mu\text{m}$
- ✓ Sonication elma S 30 H elmasonic
- ✓ Φυγοκεντρικός διαχωριστής / διαυγαστής (ALFA-LAVAL, Γαλλία)

- ✓ Αποχυματής εσπεριδοειδών (HENRI BIAUGEAUD, Γαλλία)

## 4.2. Μέθοδοι

### 4.2.1. Παραλαβή των εκχυλισμάτων από ρόδι

#### 4.2.1.1 Χυμός

- Εμπορικός χυμός ρόδι “Ζωή” 100% φυσικός χυμός από μη συμπυκνωμένο χυμό (314 ml) με προέλευση από τον Καύκασο.
- Για την παραλαβή φρέσκου χυμού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:
  - Κατάτμηση του δείγματος
  - Στύψιμο του εσωτερικού του ροδιού
  - Διήθηση υπό κενό
  - Φυγοκέντριση 4000 rpm για 15 λεπτά
  - Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C

#### 4.2.1.2 Εκχύλισμα από φλούδες

##### 4.2.1.2.1 Ομογενοποίηση

- Για την παραλαβή ομογενοποιημένου από φλούδες με νερό σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:
  - 150 g φλούδες ζυγίστηκαν
  - Προστέθηκαν 450 ml απιονισμένου νερού
  - Ανάδευση στο blender
  - Φυγοκέντριση 4000 rpm για 15 λεπτά
  - Διήθηση υπό κενό
  - Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C

#### 4.2.1.2.2 Νερό σε θερμοκρασία βρασμού (αφέψημα)

- Για την παραλαβή εκχυλίσματος από φλούδες με νερό σε θερμοκρασία βρασμού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:
  - 100 g φλούδες ζυγίστηκαν
  - Προστέθηκαν 400 ml απιονισμένου νερού
  - Βράσιμο για 15 λεπτά με συνεχή ανάδευση
  - Φυγοκέντριση 4000 rpm για 15 λεπτά
  - Διήθηση υπό κενό
  - Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C

#### 4.2.2 Νερό και μεθανόλη σε θερμοκρασίες 24 και 40 °C

- Νερό στους 24 °C (θερμοκρασία δωματίου)
  - ❖ 25 g φλούδες κομμένες αναδεύονται επί μια ώρα με 100 ml απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 24 °C)
  - ❖ Διήθηση
  - ❖ Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C
- Νερό στους 40 °C
  - ❖ 25 g φλούδες κομμένες αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα επί μια ώρα με 100 ml απιονισμένου νερού στους 40 °C
  - ❖ Διήθηση με φίλτρα Whatman No.41
  - ❖ Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C
- Μεθανόλη στους 24 °C (θερμοκρασία δωματίου)
  - ❖ 25 g φλούδες κομμένες αναδεύονται επί μια ώρα με 100 ml μεθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 24 °C)
  - ❖ Διήθηση υπό κενό
  - ❖ Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C

- Μεθανόλη στους 40 °C
  - ❖ 25 g φλούδες κομμένες αναδεύονται επί μια ώρα με 100 ml μεθανόλης στους 40 °C
  - ❖ Διήθηση με φίλτρα Whatman No.41
  - ❖ Διατήρηση στο ψυγείο στους 5 °C

### 4.2.3 Εκχύλισμα σπορίων

- Για την παραλαβή εκχυλίσματος από σπόρια:
  - 20 g σπόρια εκχυλίστηκαν σε συσκευή Soxhlet με διαλύτη εξάνιο για 4 ώρες.
  - Ακολούθησε ξήρανση του απολιπασμένου δείγματος στους 40 °C.
  - 16,336 g ξηρού δείγματος σπόρων αναδεύτηκαν με 100 ml μεθανόλη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου .
  - Συμπύκνωση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστρεφόμενο εξατμιστή κενού στους 60°C.
  - Προσθήκη 50 ml μεθανόλης

## 4.3. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων

### 4.3.1. Μέθοδος DPPH

0,1 mL χυμού ή ομογενοποιημένου/εκχυλίσματος προστέθηκαν σε 3ml μεθανολικού διαλύματος DPPH  $6 \cdot 10^{-5}$  M (Brand-Williams *et al.*, 1995). Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παραθέτονται τα δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου DPPH.

**Πίνακας 4.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου DPPH

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα σπορίων	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα σπορίων	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής

Μετά από 45 min έγινε διήθηση με φίλτρα 0,45μm και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 517 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως % ικανότητα δέσμωσης της ελεύθερης ρίζας, με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\% \text{ Αντιοξειδωτική δράση} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Όπου  $A_0$ : Απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού

$A_1$ : Απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν οι μέσοι όροι των τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις. Μετρήθηκε για λόγους σύγκρισης η δράση του ασκορβικού οξέος (200ppm) και του ελλαγικού οξέος (500 ppm). Επίσης έγινε μέτρηση της δράσης και μετά το πέρασ 12 εβδομάδων αποθήκευσης στους +4°C για τα κλάσματα που παραθέτονται στον Πίνακα 5 που ακολουθεί.

**Πίνακας 5.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου DPPH μετά το πέρας 12 εβδομάδων

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής

#### 4.3.2 Μέθοδος FRAP

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα TPTZ 10 mmoles/L και FeCl<sub>3</sub> 20 mmoles/L, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COONa 300 mmoles/L, το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 3.6 με CH<sub>3</sub>COOH (Benzie & Strain, 1996). Σε 2.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκαν 0.25 mL διαλύματος TPTZ, 0.25 mL διαλύματος FeCl<sub>3</sub> και στη συνέχεια 0.2 mL χυμού ή ομογενοποιημένου/εκχυλίσματος. Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί έγινε εφαρμογή της μεθόδου FRAP.

**Πίνακας 6.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου FRAP

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	-
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50

Μετά από 30 min παραμονής σε υδατόλουτρο στους 37°C μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 593 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως % αναγωγική δράση με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης

$$\% \text{ Αναγωγική δράση} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Όπου  $A_0$ : Απορρόφηση λευκού προσδιορισμού

$A_1$ : Απορρόφηση του δείγματος

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν οι μέσοι όροι των τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις. Μετρήθηκε για λόγους σύγκρισης η δράση του ασκορβικού οξέος (100ppm) και του ελλαγικού οξέος (500 ppm). Επίσης έγινε μέτρηση της δράσης και μετά το πέρας 12 εβδομάδων αποθήκευσης στους +4°C για τα δείγματα που παραθέτονται στον Πίνακα 7 που ακολουθεί.

**Πίνακας 7.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου FRAP μετά το πέρας 12 εβδομάδων

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	-
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50
Ομογενοποίημα	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Ομογενοποίημα	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50



### 4.3.3. Χρωματομετρικές μέθοδοι

#### 4.3.3.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 0,5 ml χυμού ή ομογενοποιημένου/εκχυλίσματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά από 3 min προστέθηκε 1mL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (35%) και αποσταγμένου νερού μέχρι την πλήρωση της ογκομετρικής φιάλης (Slinkard & Singleton 1997). Στον Πίνακα 8 που ακολουθεί παραθέτονται τα δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός ολικών φαινολών.

**Πίνακας 8.** Δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός ολικών φαινολών

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	1:5
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:20 - 1:50
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50 - 1:100
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:100
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:200
Μεθανολικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:300
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:200
Υδατικό εκχύλισμα 24°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:200
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200

Μετά από μία ώρα μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 760 nm (Tere et al., 2005). Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε ως προς γαλλικό οξύ (10-200 ppm,  $R^2=0.9988$ ) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/ L χυμού ή kg εκχυλίσματος. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις. Επίσης έγινε μέτρηση και μετά το πέρας 12 εβδομάδων

αποθήκευσης στους +4°C για τα δείγματα που παραθέτονται στον Πίνακα 9 που ακολουθεί.

**Πίνακας 9.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου FRAP μετά το πέρας 12 εβδομάδων

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	1:5
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:20 - 1:50
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:50 - 1:100
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:50
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:100
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:200

#### 4.3.3.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 2 mL χυμού ή ομογενοποιημένου/εκχυλίσματος, 0.3 mL NaNO<sub>2</sub> κι έπειτα από 5 min προστέθηκαν 3 mL AlCl<sub>3</sub> και η φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό (Zhisen, 1999).

Η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε αμέσως στα 510 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης (200-3000 ppm, R<sup>2</sup>=0.9915) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα, εκφρασμένη σε mg κερκετίνης/L χυμού ή kg εκχυλίσματος. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις. Στον Πίνακα 10 που ακολουθεί παραθέτονται τα δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός φλαβονοειδών.

**Πίνακας 10.** Δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός φλαβονοειδών

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	-
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:5
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:5
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:5

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Μεθανολικό εκχύλισμα 24 <sup>0</sup> C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:10
Μεθανολικό εκχύλισμα 40 <sup>0</sup> C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:15
Υδατικό εκχύλισμα 24 <sup>0</sup> C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Υδατικό εκχύλισμα 40 <sup>0</sup> C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5

#### 4.3.3.3 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε υδρολυμένες ταννίνες

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 ml χυμού ή ομογενοποιημάτος/εκχυλίματος και 5 ml KIO<sub>3</sub>. Μετά από ανάδευση και χρόνο 2 min μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 550 nm (Willis, 1998). Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος (200-1400 ppm, R<sup>2</sup>=0.9975) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των υδρολυμένων ταννίνων στα εκχυλίματα, εκφρασμένη σε mg γαλλικού/L χυμού ή kg εκχυλίματος. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις. Στον Πίνακα 11 που ακολουθεί παραθέτονται τα δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός υδρολυμένων ταννίνων.

**Πίνακας 11.** Δείγματα στα οποία έγινε προσδιορισμός υδρολυμένων ταννίνων.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου	-
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης	-
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Αφέψημα από φλούδες 100 <sup>0</sup> C	Συμβατικά ρόδια Θράκης	-
Αφέψημα από φλούδες 100 <sup>0</sup> C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:5
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης	1:5
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής	1:10

#### 4.3.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

##### 4.3.4.1. Υγροχρωματογραφικός προσδιορισμός ελλαγιικού οξέος

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό ελλαγιικού οξέος χρησιμοποιήθηκε στήλη  $RPC_{18}$  (250x4,6 mm, 2  $\mu$ m) (MZ, Analytical, Germany). Ο διαχωρισμός έγινε με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό-οξικό οξύ (3,5%) (23/77 v/v), ροή διαλυτή έκλουσης 1 mL/min και ενέσιμη ποσότητα 10  $\mu$ L. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 365 nm και ο μέγιστος χρόνος ανάλυσης ήταν τα 15 min. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπο διάλυμα ελλαγιικού οξέος (5-200 ppm,  $R^2=0.9976$ ). Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ελλαγιικού οξέος/ L χυμού ή kg εκχυλίσματος. Στον πίνακα 12 παραθέτονται τα δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου HPLC.

**Πίνακας 12.** Δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθόδου HPLC

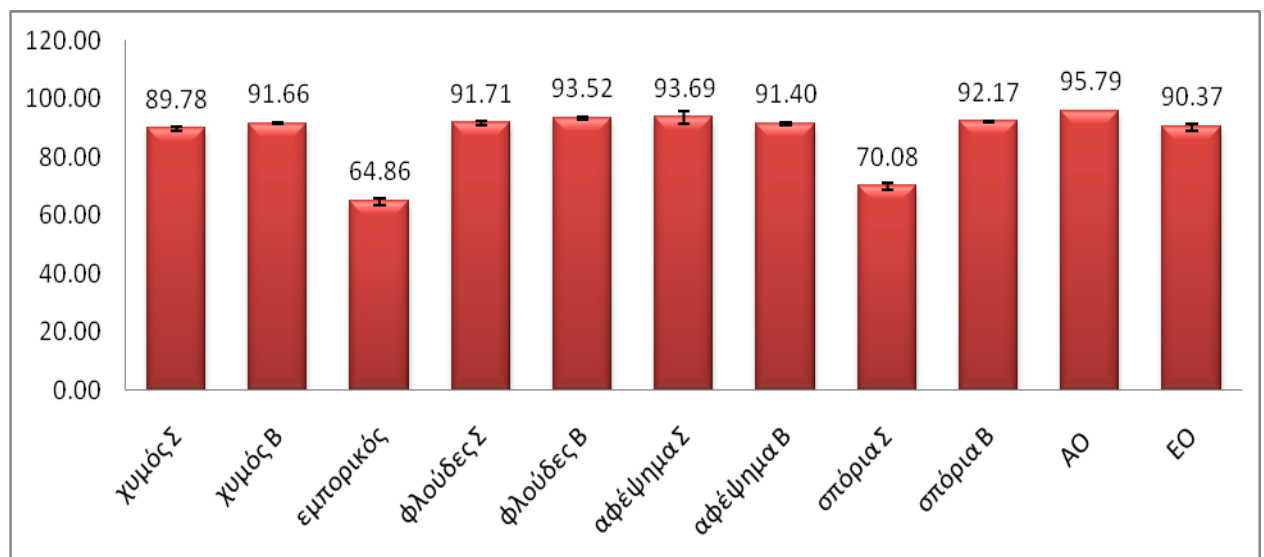
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
Χυμός εμπορικός	100% φυσικός χυμός Καυκάσου
Φρέσκος στυμμένος	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Φρέσκος στυμμένος	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Αφέψημα από φλούδες 100°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Ομογενοποίηση	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Ομογενοποίηση	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Μεθανολικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Συμβατικά ρόδια Θράκης
Υδατικό εκχύλισμα 40°C	Βιολογικά ρόδια Χαλκιδικής

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

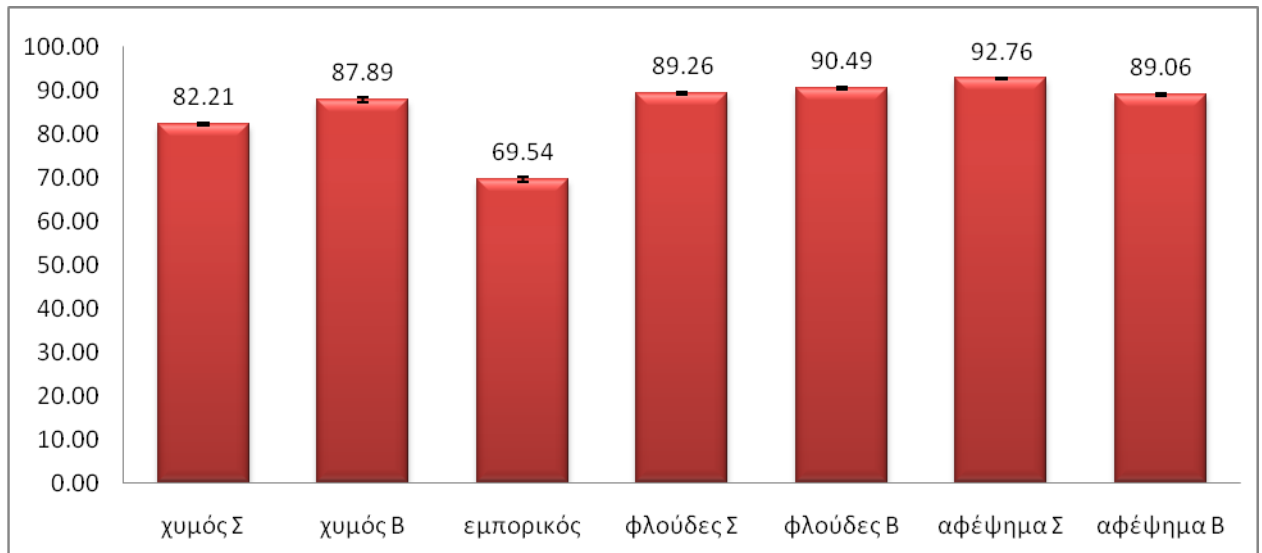
### 5.1 Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος βασίζεται στη βαθμιαία εξαφάνιση της ιώδους απόχρωσης της σταθερής DPPH ρίζας στα 517 nm λόγω της δέσμευσής της από αντιοξειδωτικές ουσίες με ισχυρή ικανότητα αδρανοποίησης ελευθέρων ριζών.

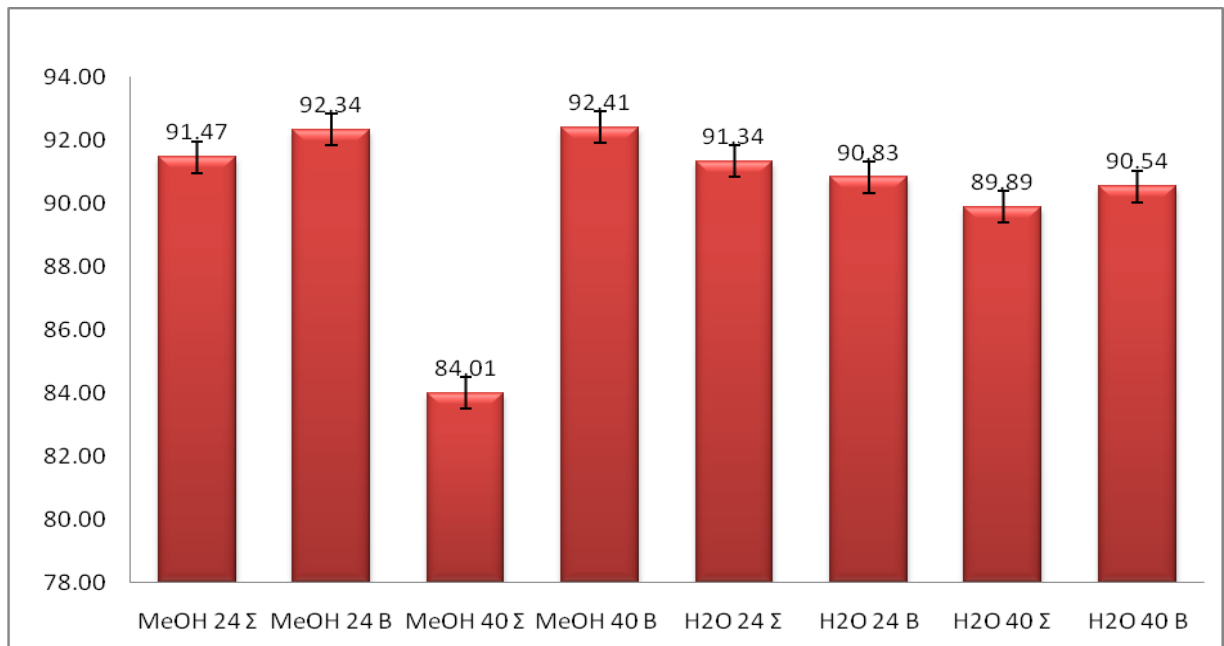
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 12-15) (αποτελέσματα στο Παράρτημα Α-Πιν. 1-9) παρουσιάζεται η % ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από τα δείγματα.



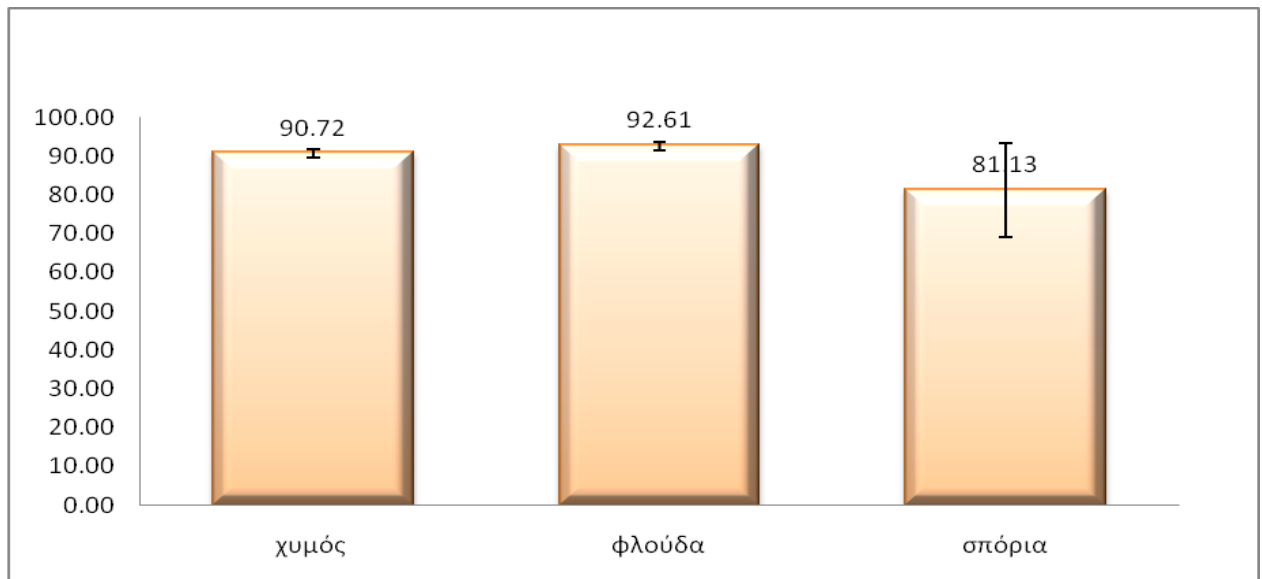
**Σχήμα 12.** % δράση DPPH χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), χυμός εμπορίου (εμπορικός), ομογενοποίημα φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ), μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλία Β: (Σπόρια Β) και ποικιλίας Σ: (Σπόρια Σ), ΑΟ: Ασκορβικό Οξύ, ΕΟ: Ελλαγικό οξύ



**Σχήμα 13.** % δράση DPPH μετά το πέρας 12 εβδομάδων αποθήκευσης στους 4° C, χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), χυμός εμπορίου (εμπορικός), ομογενοποίημα φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).



**Σχήμα 14.** % δράση DPPH μεθανολικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλία Β: (MeOH Β) και ποικιλία Σ: (MeOH Σ), υδατικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλία Β: (H<sub>2</sub>O Β) και ποικιλία Σ: (H<sub>2</sub>O Σ) στους 24 °C και 40 °C.

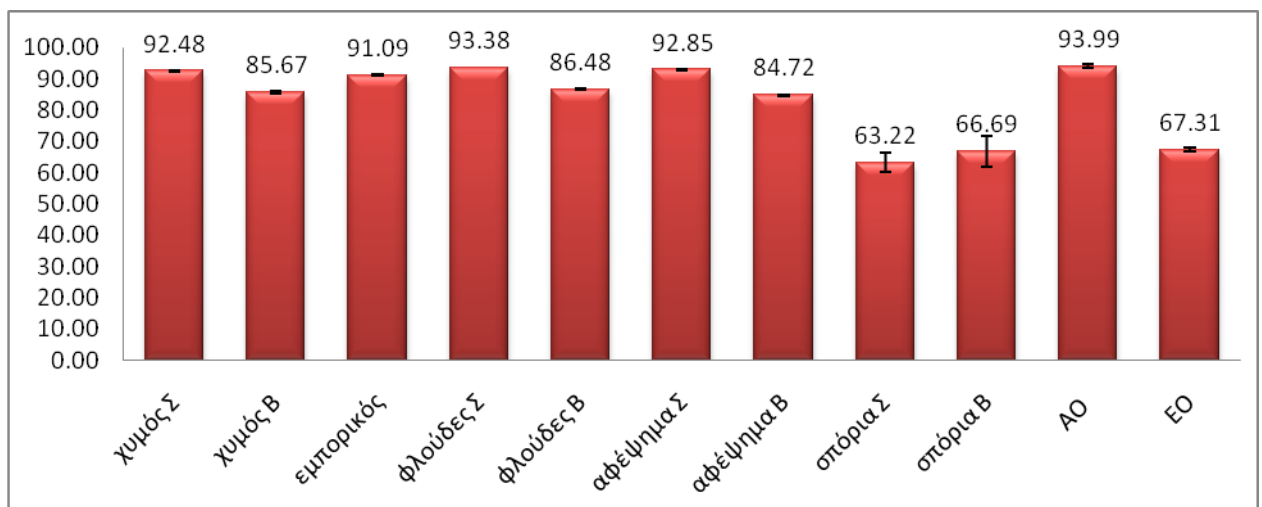


**Σχήμα 15.** % δράση DPPH τμημάτων του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίηση φλούδας ποικιλίας Β και ποικιλίας Σ, μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλία Β και ποικιλίας Σ.

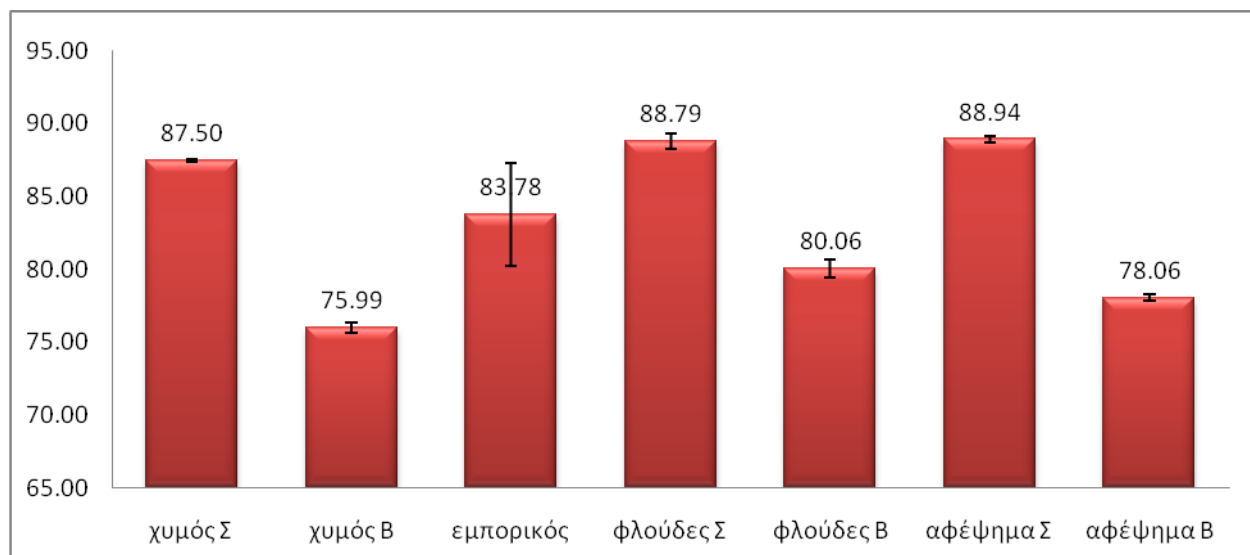
## 5.2 Μέθοδος FRAP

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) σε δισθενή σίδηρο ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm.

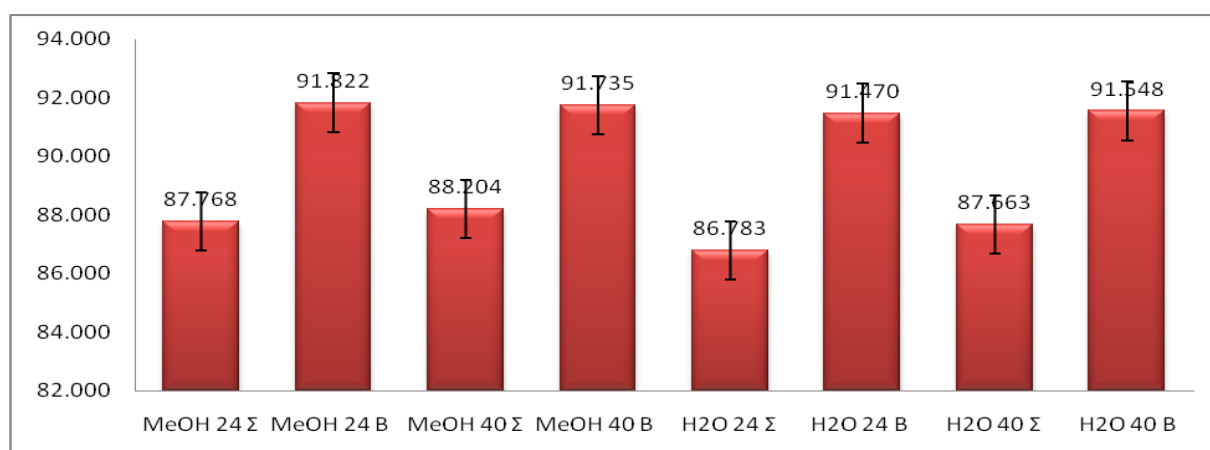
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 16-19), αποτελέσματα Παράρτημα Α, Πιν. 10-18) παρουσιάζεται η % ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου από τα δείγματα.



**Σχήμα 16.** % δράση FRAP χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίηση φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ), μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλία Β: (Σπόρια Β) και ποικιλίας Σ: (Σπόρια Σ), ΑΟ: Ασκορβικό Οξύ, ΕΟ: Ελλαγικό οξύ.

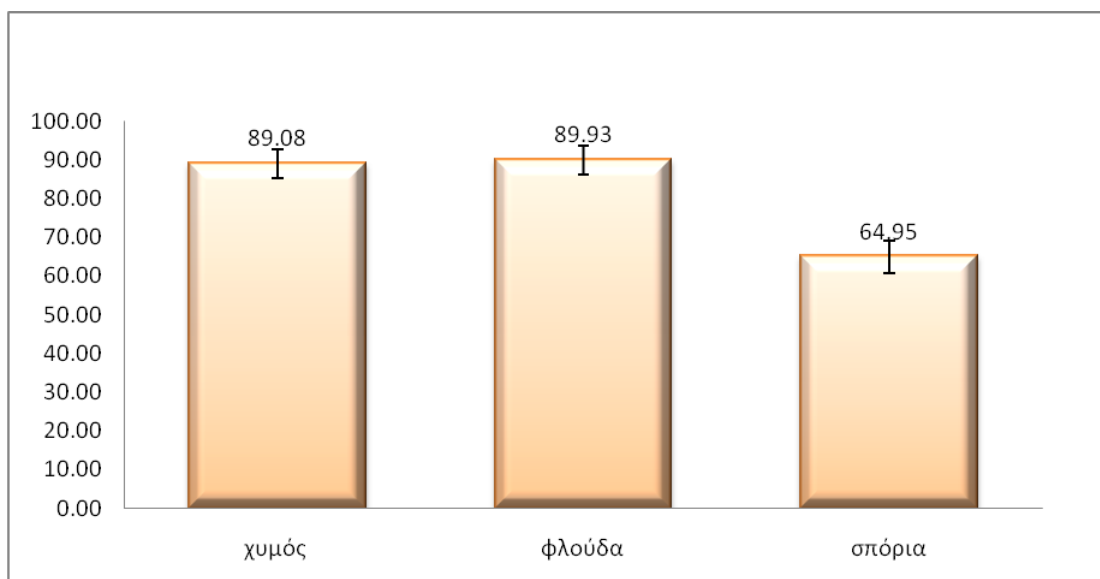


**Σχήμα 17.** % δράση FRAP μετά το πέρας 12 εβδομάδων αποθήκευσης στους 4° C , χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίηση φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).



**Σχήμα 18.** % δράση FRAP μεθανολικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλία Β: (MeOH Β) και ποικιλία Σ: (MeOH Σ), υδατικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλία Β: (H<sub>2</sub>O Β) και ποικιλίας Σ: (H<sub>2</sub>O Σ) στους 24 °C και 40 °C.



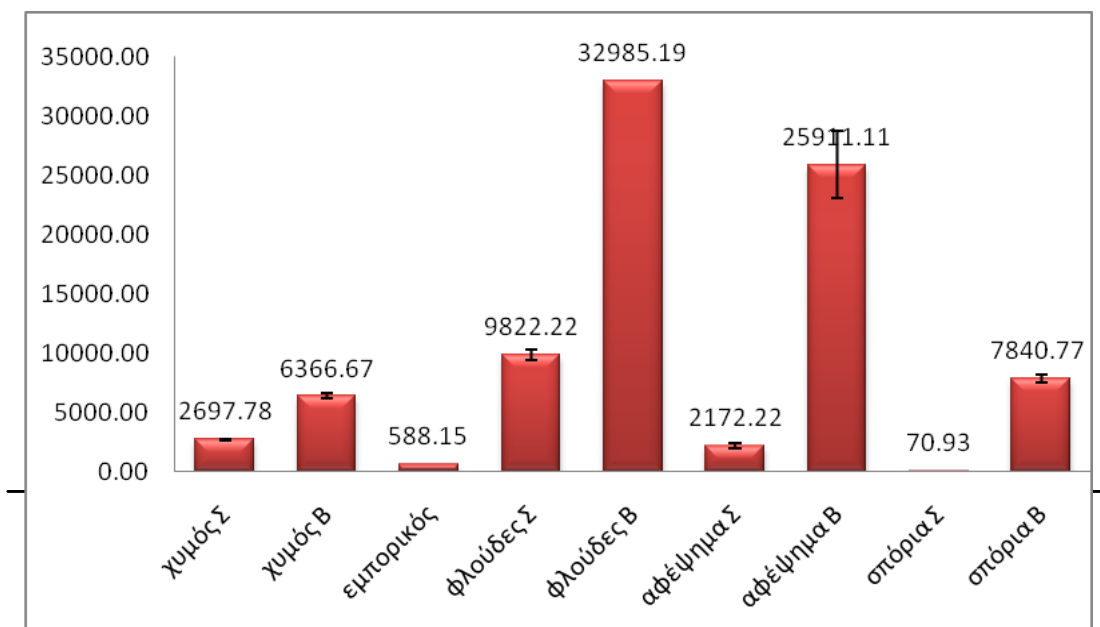


**Σχήμα 19.** % δράση FRAP τμημάτων του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίηση φλούδας ποικιλία Β και ποικιλίας Σ, μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλία Β και ποικιλίας Σ.

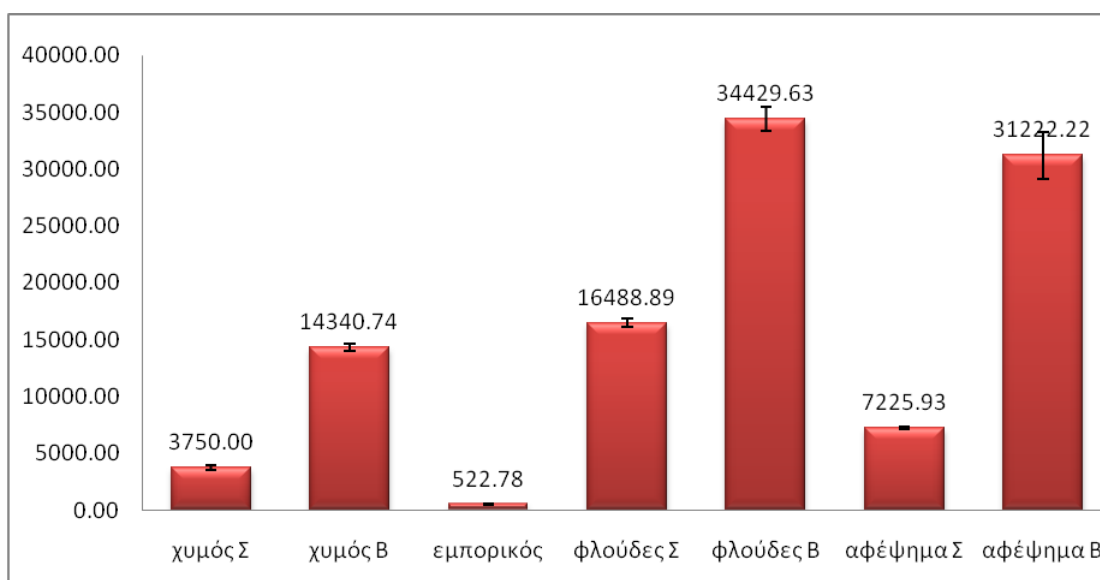
### 5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολών- (Μέθοδος Folin Ciocalteu)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu και μέτρηση της απορρόφησης στα 760 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος (10-200 ppm,  $R^2=0,998$ ) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε mg γαλλικούοξέος/L εκχυλίσματος.

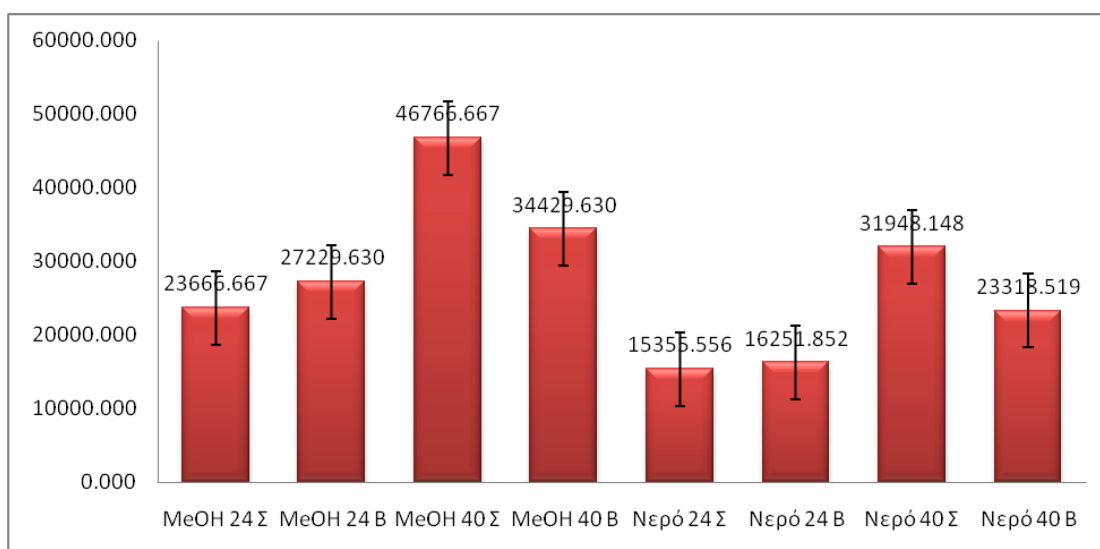
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 20-23), αποτελέσματα Παράρτημα Α, Πιν. 19-25) παρουσιάζεται η συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες στα δείγματα.



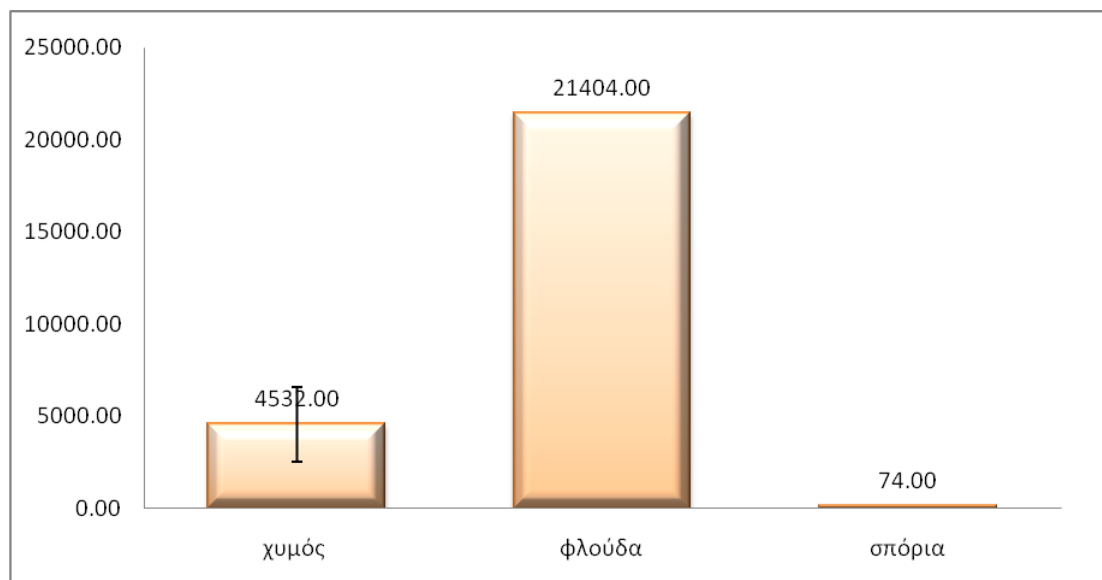
**Σχήμα 20.** Συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίηση φλούδας ποικιλίας Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλίας Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ), μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλίας Β: (Σπόρια Β) και ποικιλίας Σ: (Σπόρια Σ).



**Σχήμα 21.** Συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες μετά το πέρας 12 εβδομάδων αποθήκευσης στους 4° C, χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίηση φλούδας ποικιλίας Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλίας Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).



**Σχήμα 22.** Συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες μεθανολικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλίας Β: (MeOH Β) και ποικιλίας Σ: (MeOH Σ), υδατικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλίας Β: (H<sub>2</sub>O Β) και ποικιλίας Σ: (H<sub>2</sub>O Σ) στους 24 °C και 40 °C.

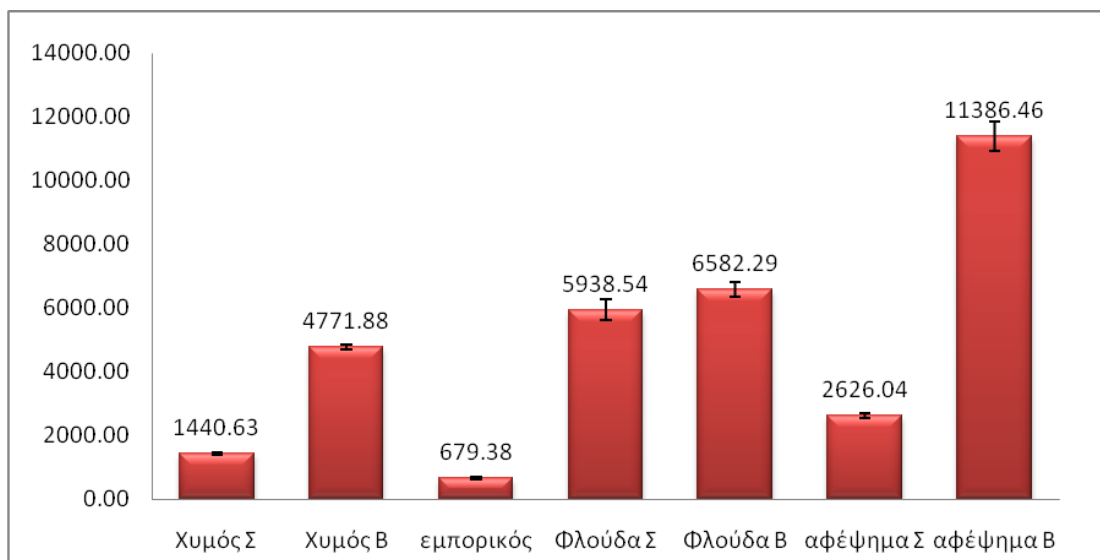


**Σχήμα 23.** Συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες τμημάτων του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίημα φλούδας ποικιλίας Β και ποικιλίας Σ, μεθανολικά εκχυλίσματα σπορίων ποικιλίας Β και ποικιλίας Σ.

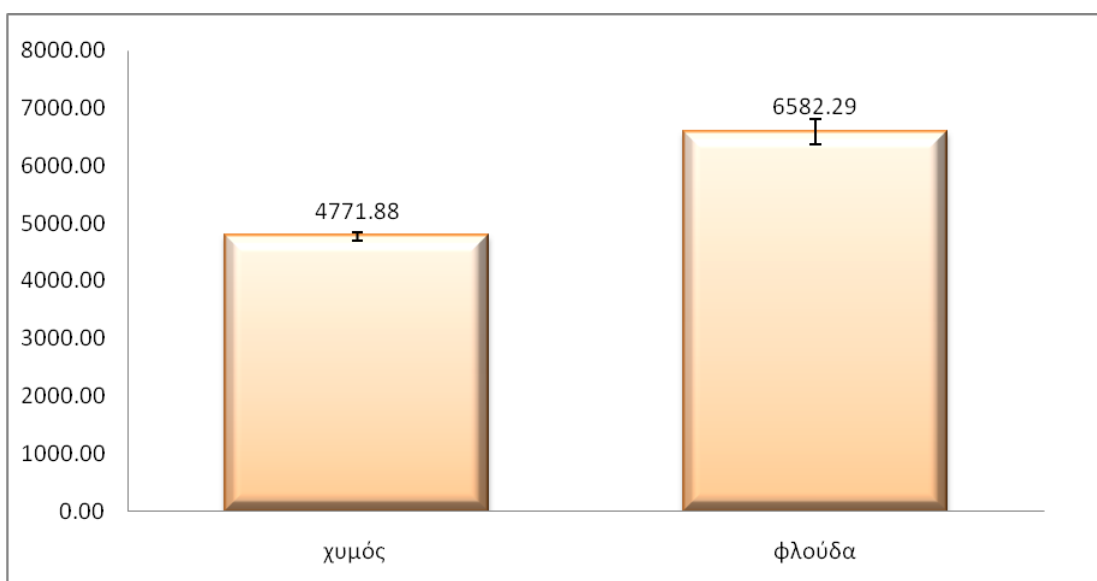
#### 5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε με χρωματομετρική μέθοδο όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης (200-3000 ppm,  $R^2=0,991$ ) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα, εκφρασμένη σε mg κερκετίνης/L εκχυλίσματος.

Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 24-25), αποτελέσματα Παράρτημα Α, Πιν. 26) παρουσιάζεται η συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή στα δείγματα.



**Σχήμα 24.** Συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίηση φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).



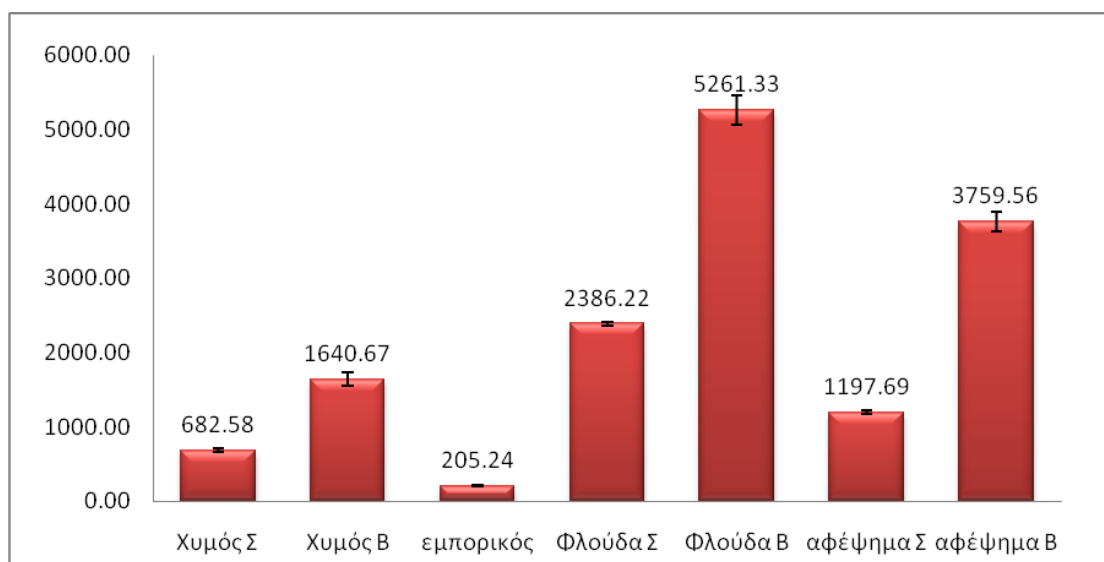
**Σχήμα 25.** Συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή μερών του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίηση φλούδας ποικιλία Β και ποικιλίας Σ.

## 5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός υδρολυμένων ταννίνων

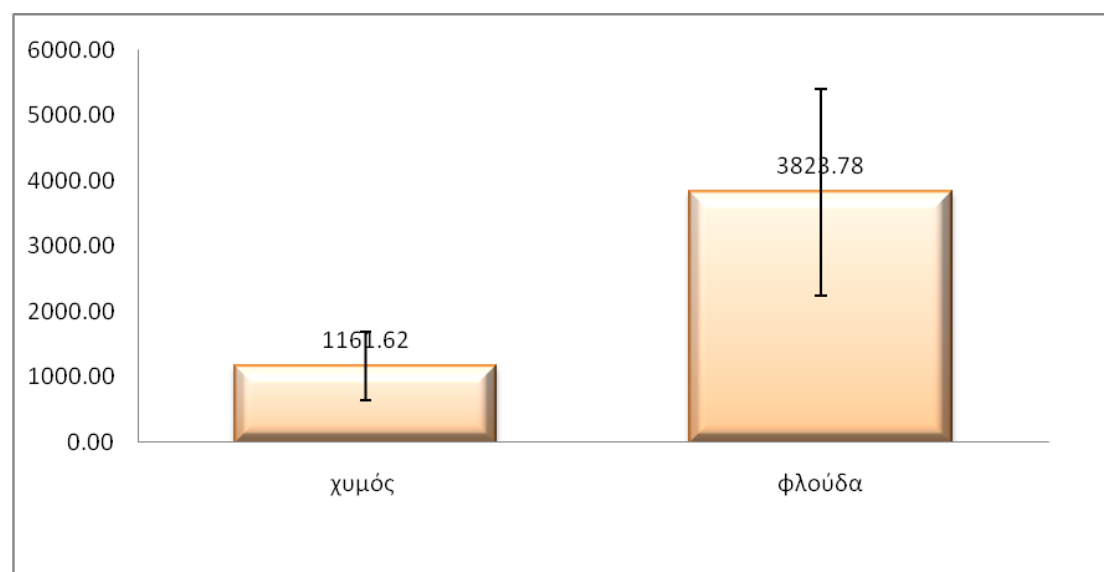
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των υδρολυμένων ταννίνων έγινε με χρωματομετρική μέθοδο όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 550 nm. Με τη βοήθεια της καμπύλης

αναφοράς του γαλλικού οξέος (200-1400 ppm,  $R^2=0,997$ ) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των υδρολυμένων ταννίνων στα εκχυλίσματα, εκφρασμένη σε mg GA/L ή GA/ kg εκχυλίσματος.

Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 26-27), αποτελέσματα Παράρτημα Α, Πιν. 27) παρουσιάζεται η συγκέντρωση σε υδρολυμένες ταννίνες στα δείγματα.



**Σχήμα 26.** Συγκέντρωση σε υδρολυμένες ταννίνες χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίημα φλούδας ποικιλία Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).

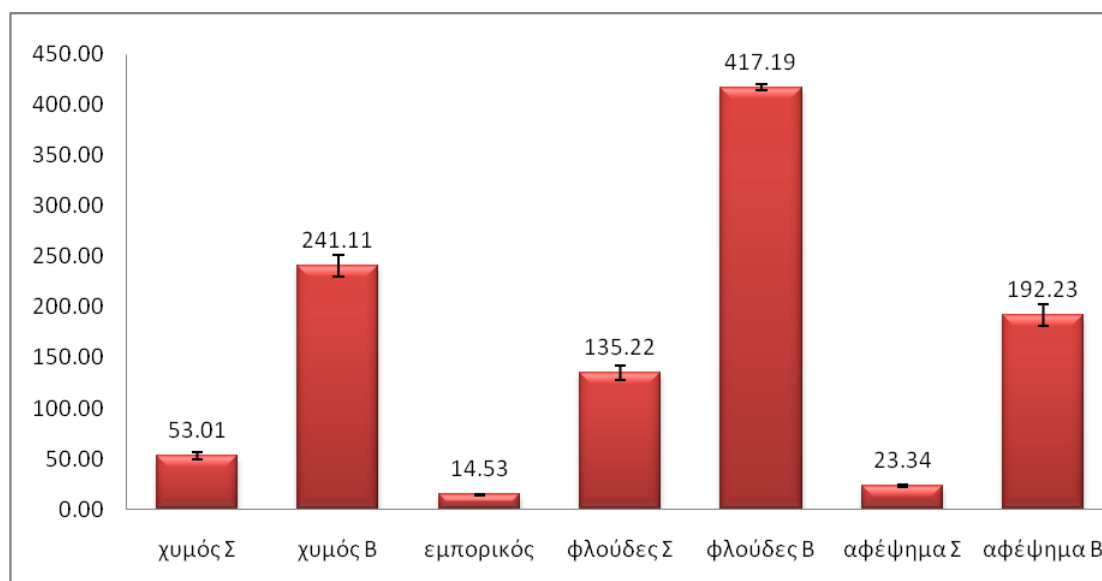


**Σχήμα 27.** Συγκέντρωση σε υδρολυμένες ταννίνες τμημάτων του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίημα φλούδας ποικιλία Β και ποικιλίας Σ.

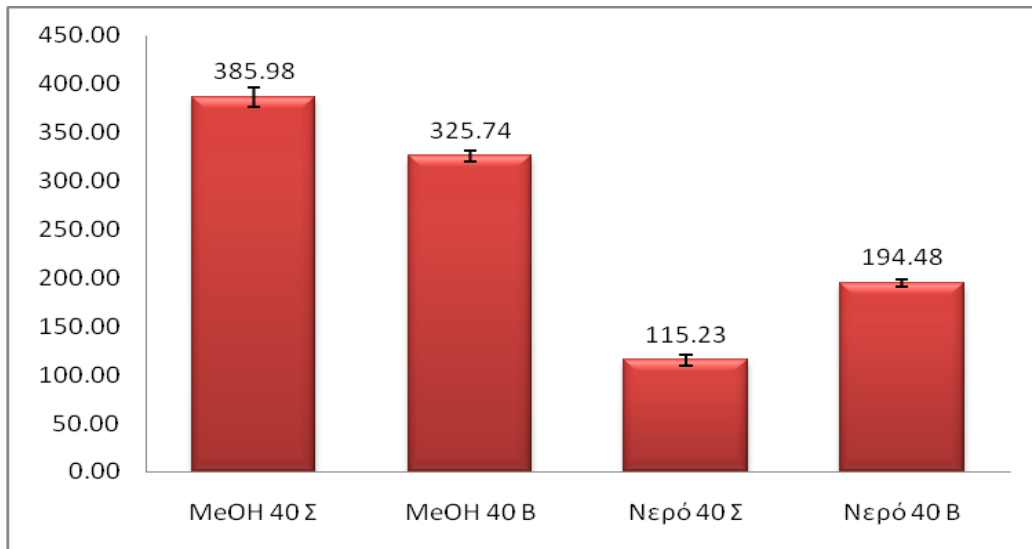
## 5.6 Προσδιορισμός Ελλαγικού οξέος στα εκχυλίσματα ροδιού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Ο διαχωρισμός έγινε με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με μίγμα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό-οξικό οξύ (3,5%) (23/77 v/v), ροή διαλυτη έκλουσης 1 mL/min και ενέσιμη ποσότητα 10  $\mu$ L. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 365 nm και ο μέγιστος χρόνος ανάλυσης ήταν τα 15 min. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπο διάλυμα ελλαγικού οξέος (5-200 ppm,  $R^2=0.9976$ ). Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ελλαγικού οξέος/ L χυμού ή kg εκχυλίσματος. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση το χρόνο έκλουσης (retention time, RP) (4,5 min) του ελλαγικού οξέος.

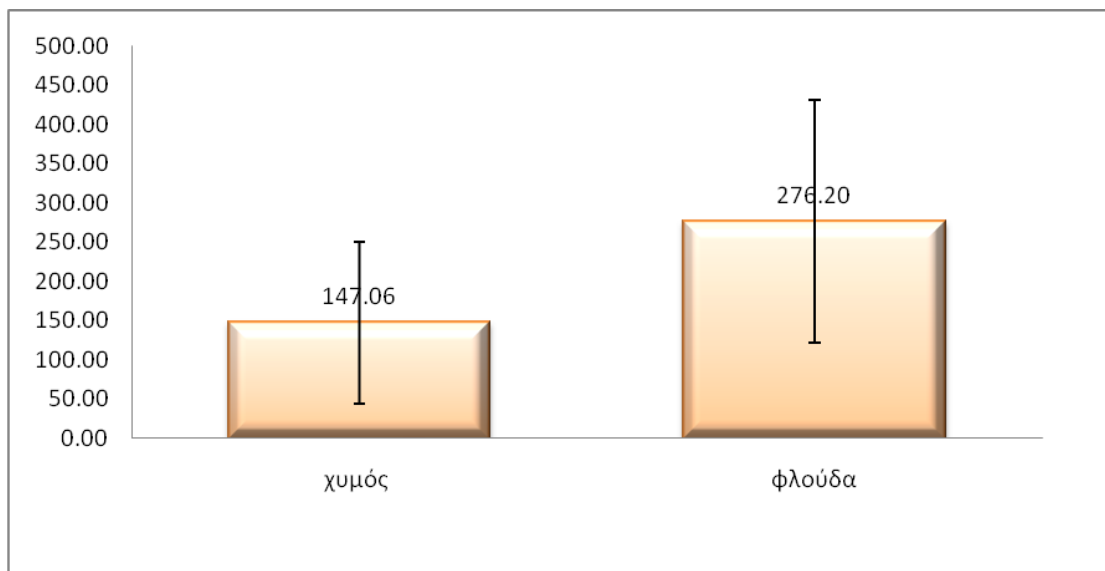
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχ. 28-30), Παράρτημα Α, Πιν. 28) παρουσιάζεται η συγκέντρωση σε ελλαγικό οξύ καθώς επίσης και τα χρωματογραφήματα (Σχ. 31-47).



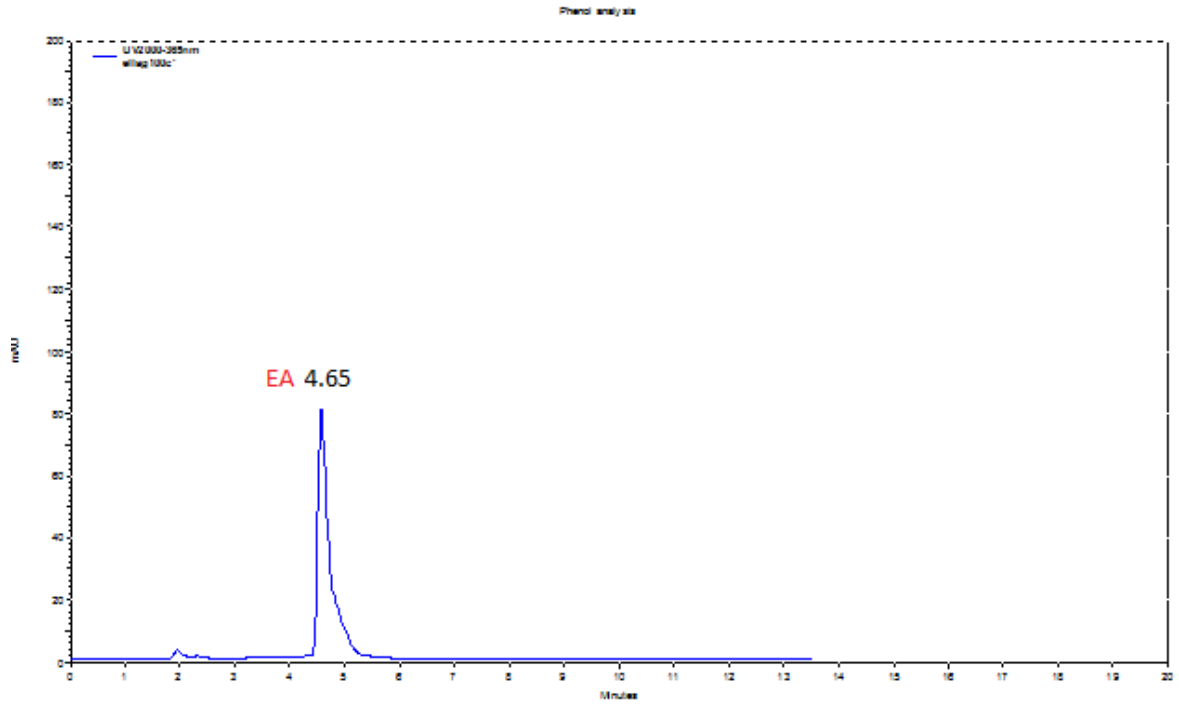
**Σχήμα 28.** HPLC χυμών ποικιλίας Β: (Χυμός Β) ποικιλίας Σ: (Χυμός Σ), ομογενοποίημα φλούδας ποικιλίας Β: (Φλούδα Β) και ποικιλίας Σ: (Φλούδα Σ), αφέψημα φλούδας ποικιλία Β (αφέψημα Β), και ποικιλίας Σ (αφέψημα Σ).



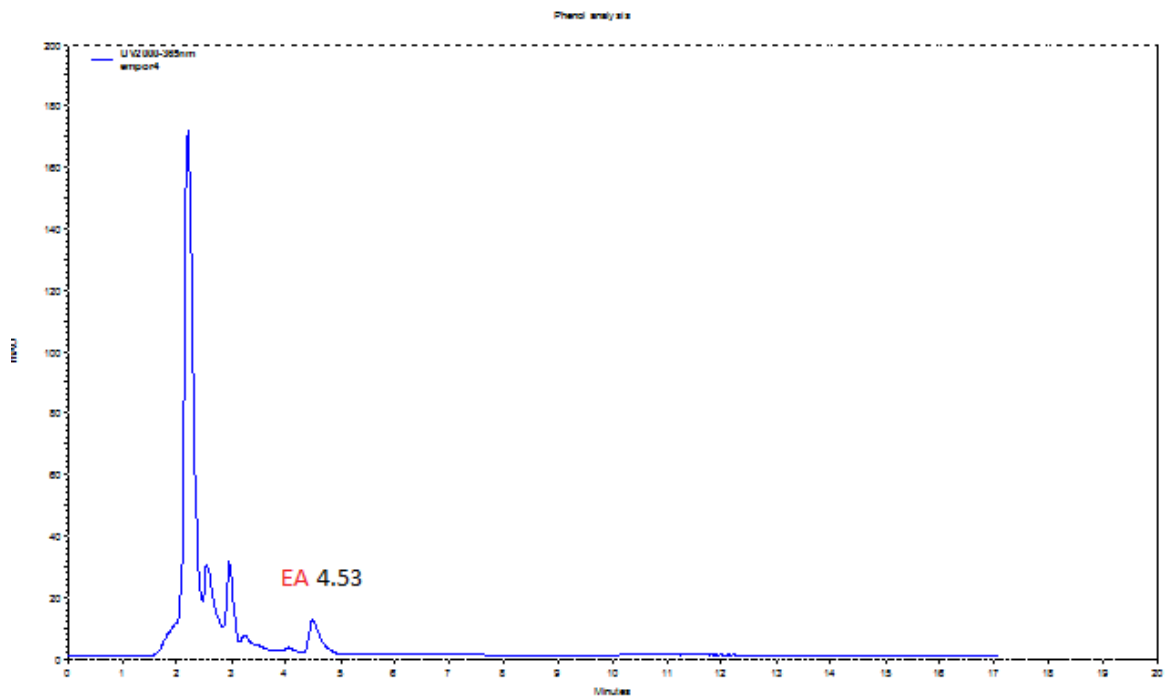
**Σχήμα 29.** ΗPLC μεθανολικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλίας Β: (ΜεΟΗ Β) και ποικιλίας Σ: (ΜεΟΗ Σ), υδατικού εκχυλίσματος φλούδας ποικιλίας Β: (Η<sub>2</sub>Ο Β) και ποικιλίας Σ: (Η<sub>2</sub>Ο Σ) στους 40 °C.



**Σχήμα 30.** ΗPLC τμημάτων του ροδιού από χυμό ποικιλίας Β, ποικιλίας Σ, ομογενοποίημα φλούδας ποικιλίας Β και ποικιλίας Σ.

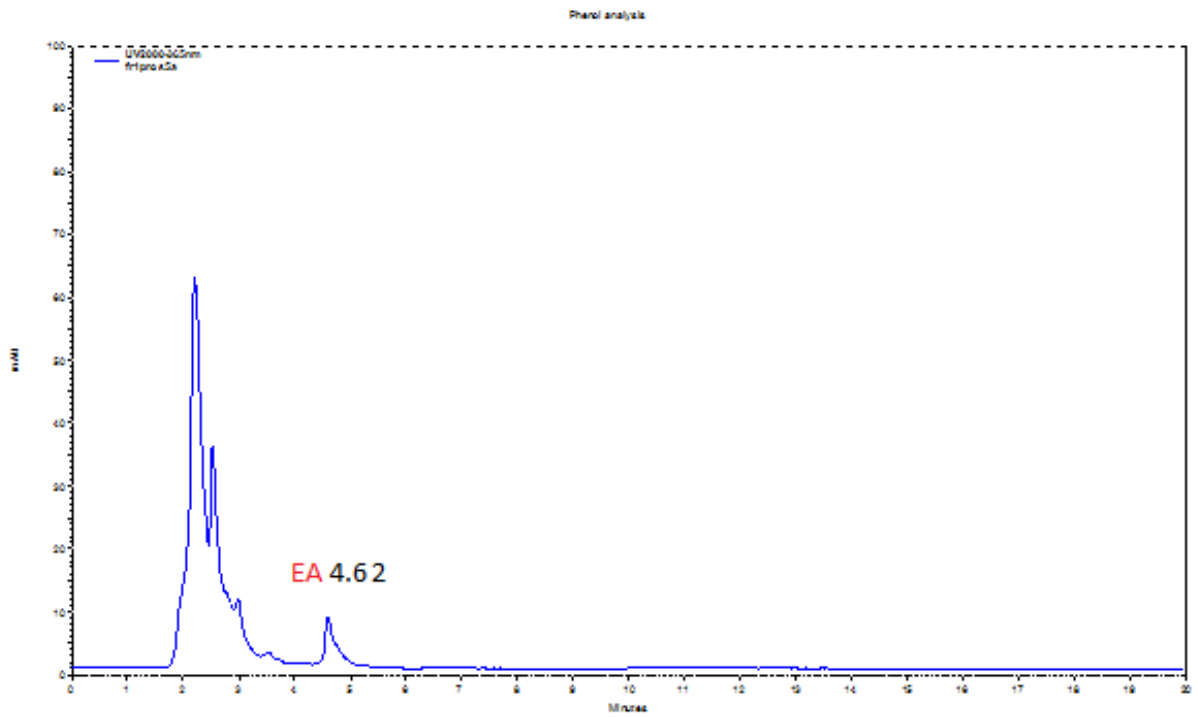


Σχήμα 31. Χρωματογράφημα Ελλαγικού Οξέος (100 ppm)

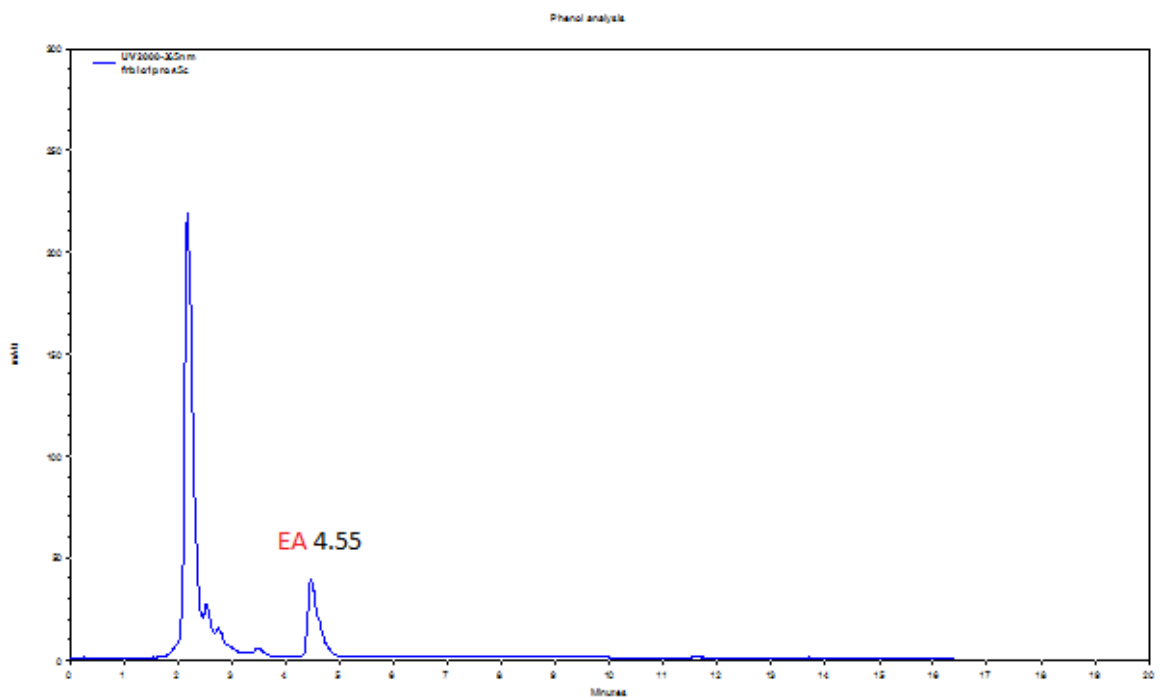


Σχήμα 32. Χρωματογράφημα χυμού εμπορίου (EA:Ελλαγικό Οξύ)

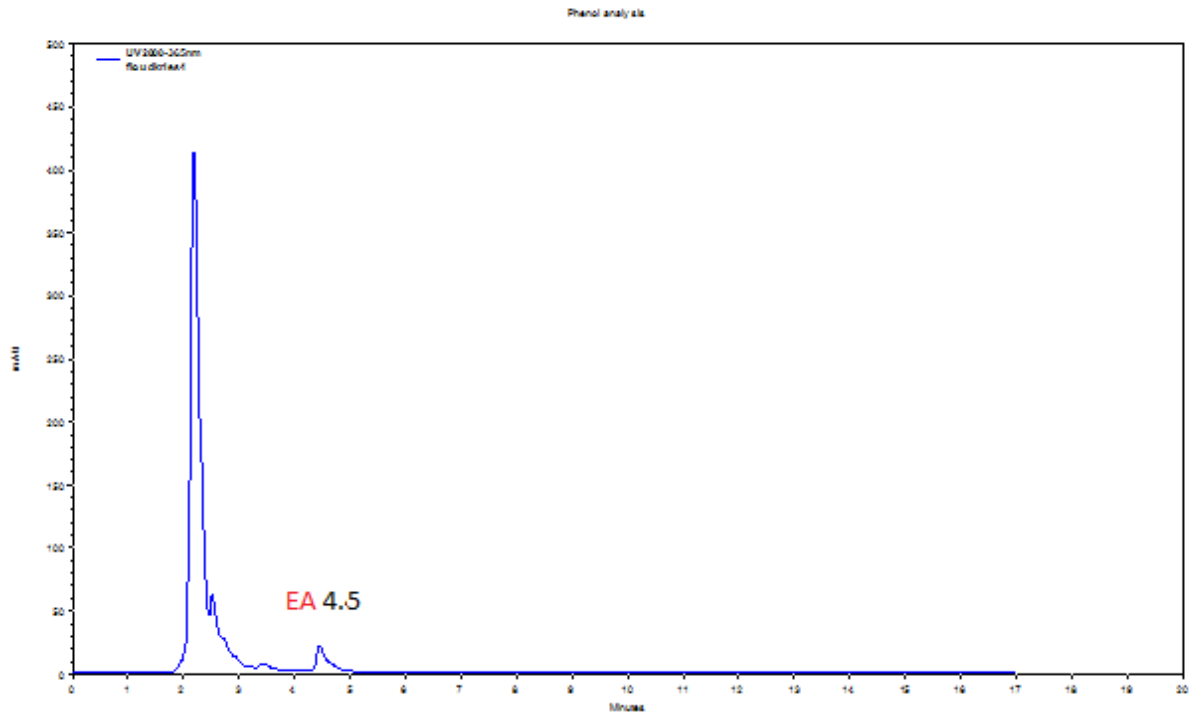




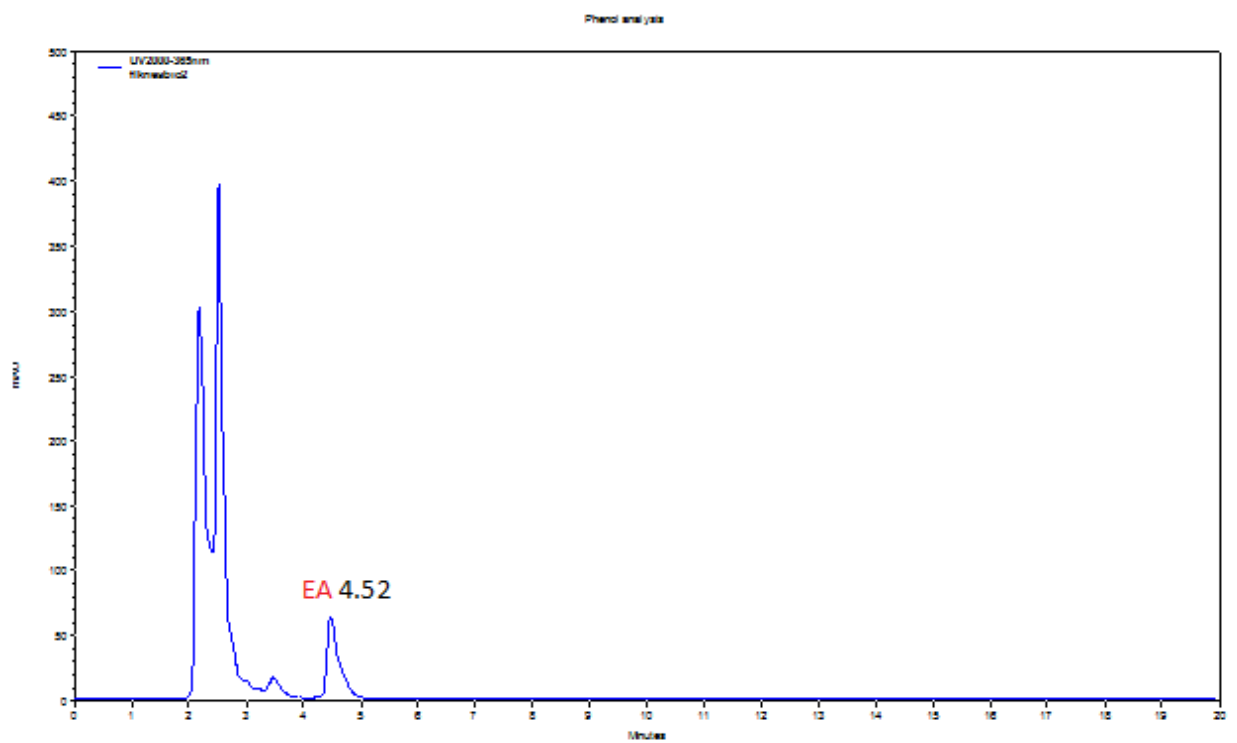
Σχήμα 33. Χρωματογράφημα φρέσκου χυμού από συμβατικά ρόδια (EA:Ελλαγικό Οξύ).



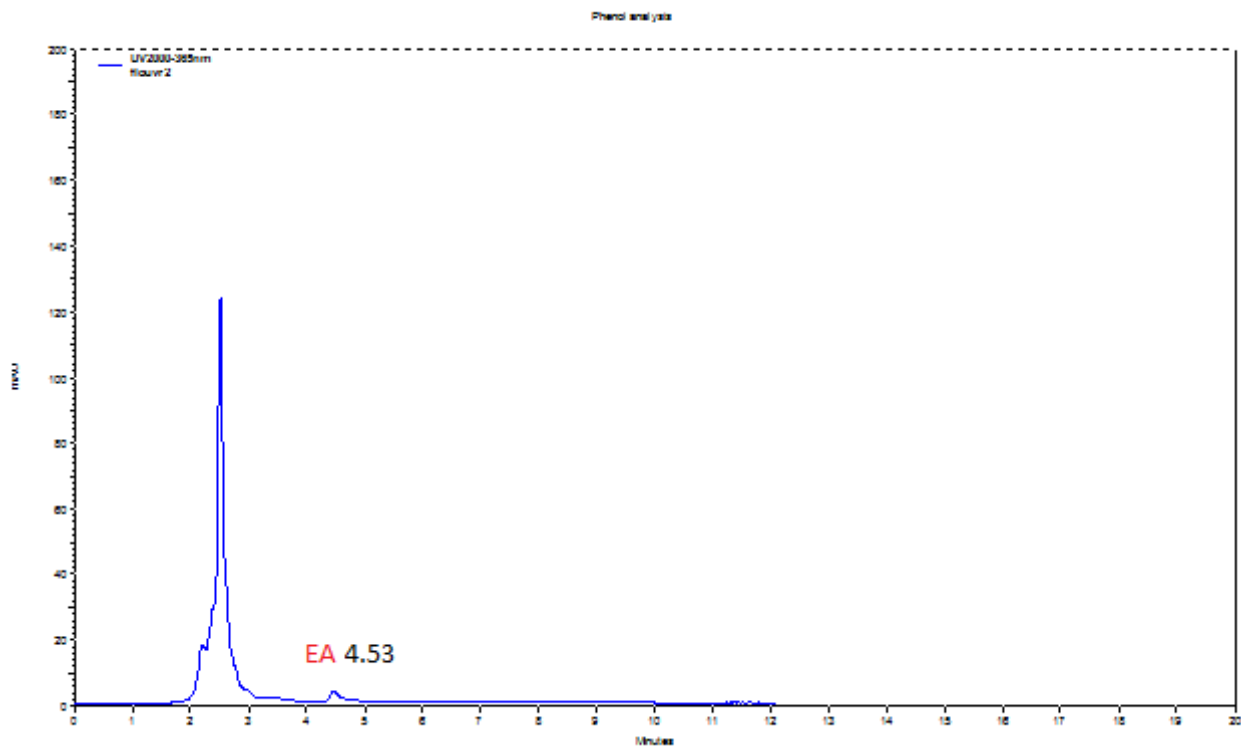
Σχήμα 34. Χρωματογράφημα φρέσκου χυμού από βιολογικά ρόδια (EA:Ελλαγικό Οξύ).



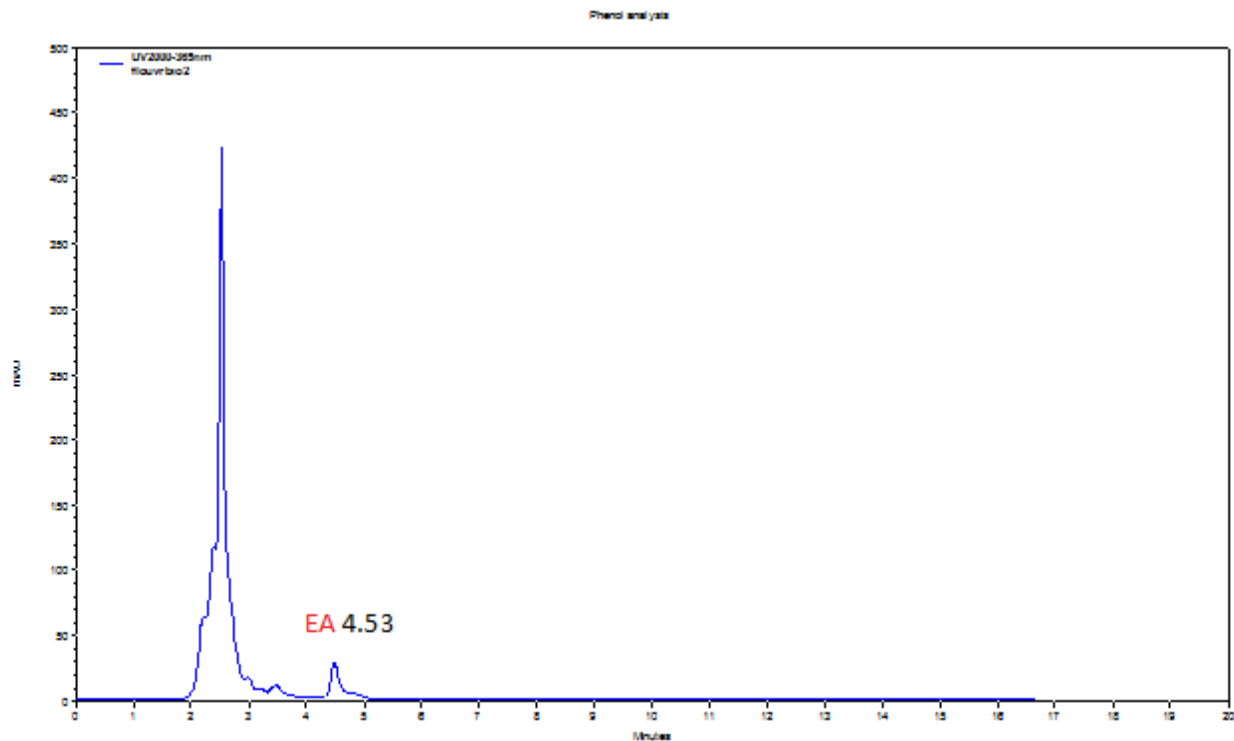
**Σχήμα 35.** Χρωματογράφημα ομογενοποιημένου φλούδας από συμβατικά ρόδια (EA:Ελλαγικό Οξύ).



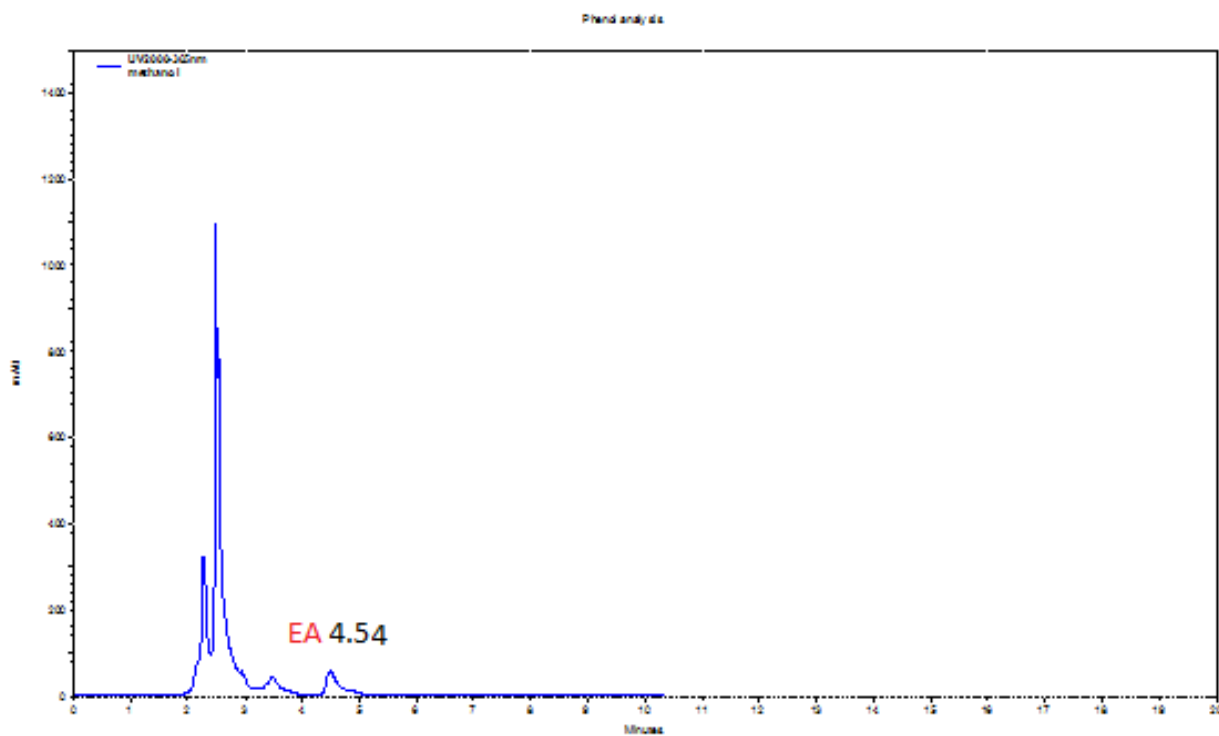
**Σχήμα 36.** Χρωματογράφημα ομογενοποιημένου φλούδας από βιολογικά ρόδια (EA:Ελλαγικό Οξύ).



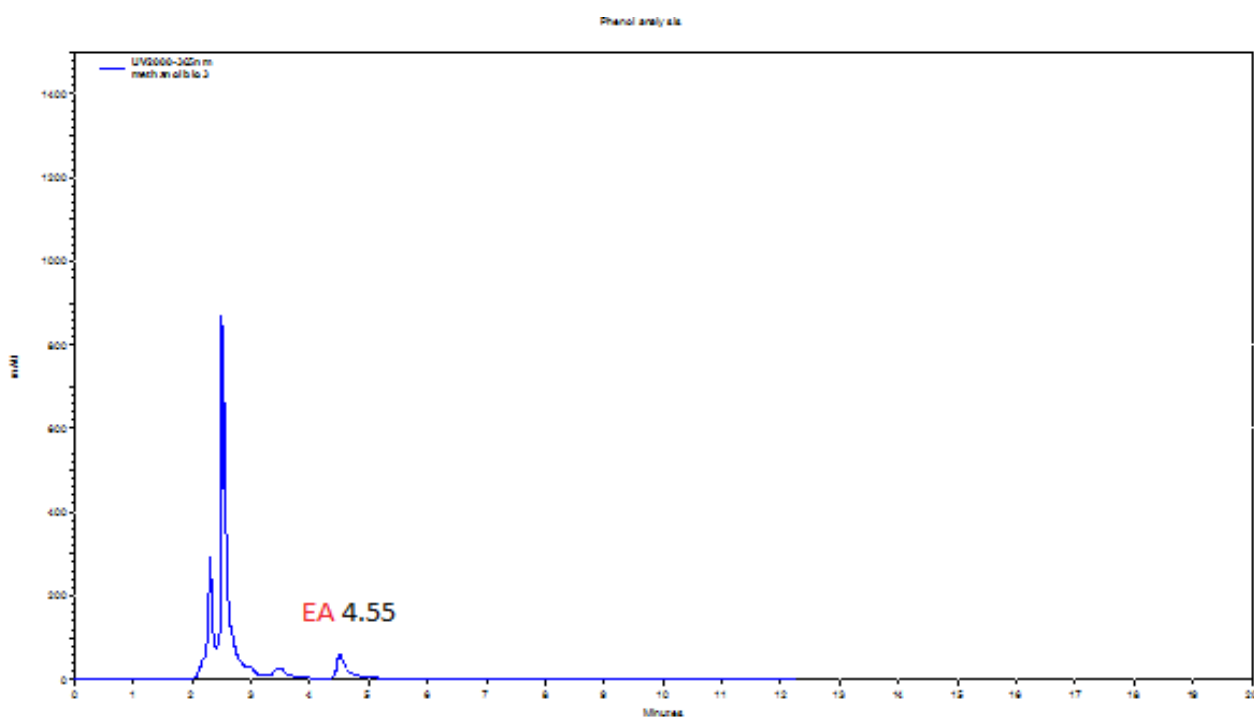
**Σχήμα 37.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος από αφέψημα φλούδας συμβατικών ροδιών (EA:Ελλαγικό Οξύ).



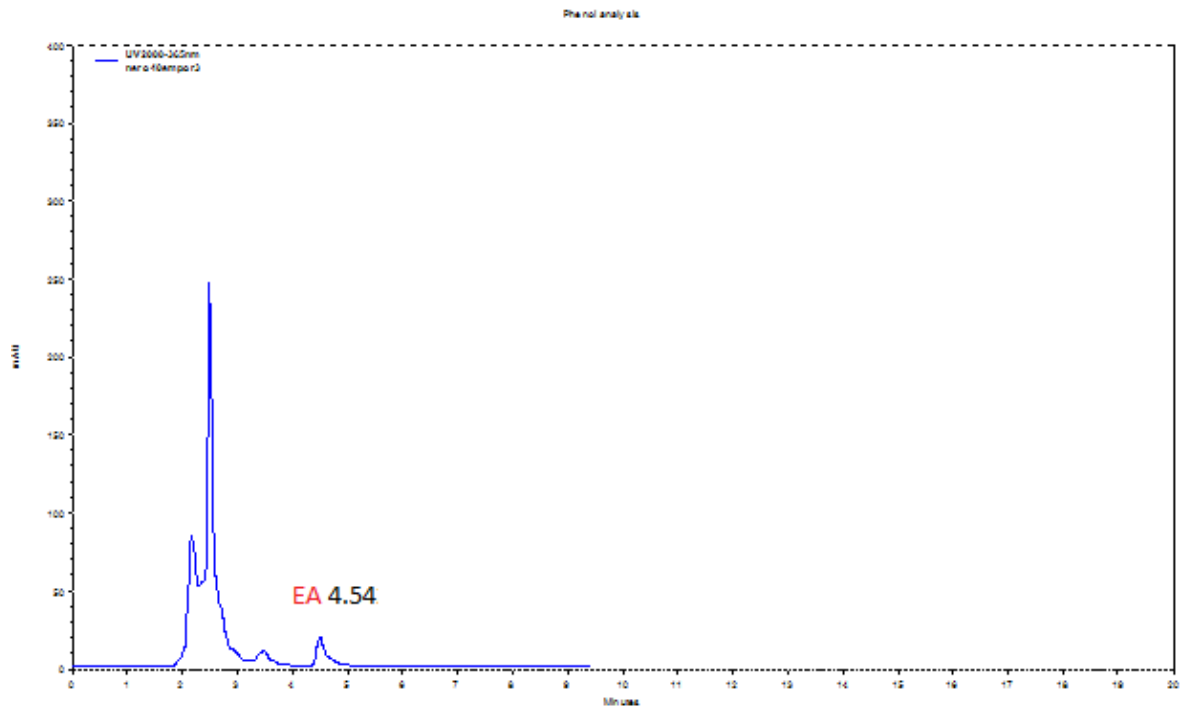
**Σχήμα 38.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος από αφέψημα φλούδας βιολογικών ροδιών (EA:Ελλαγικό Οξύ).



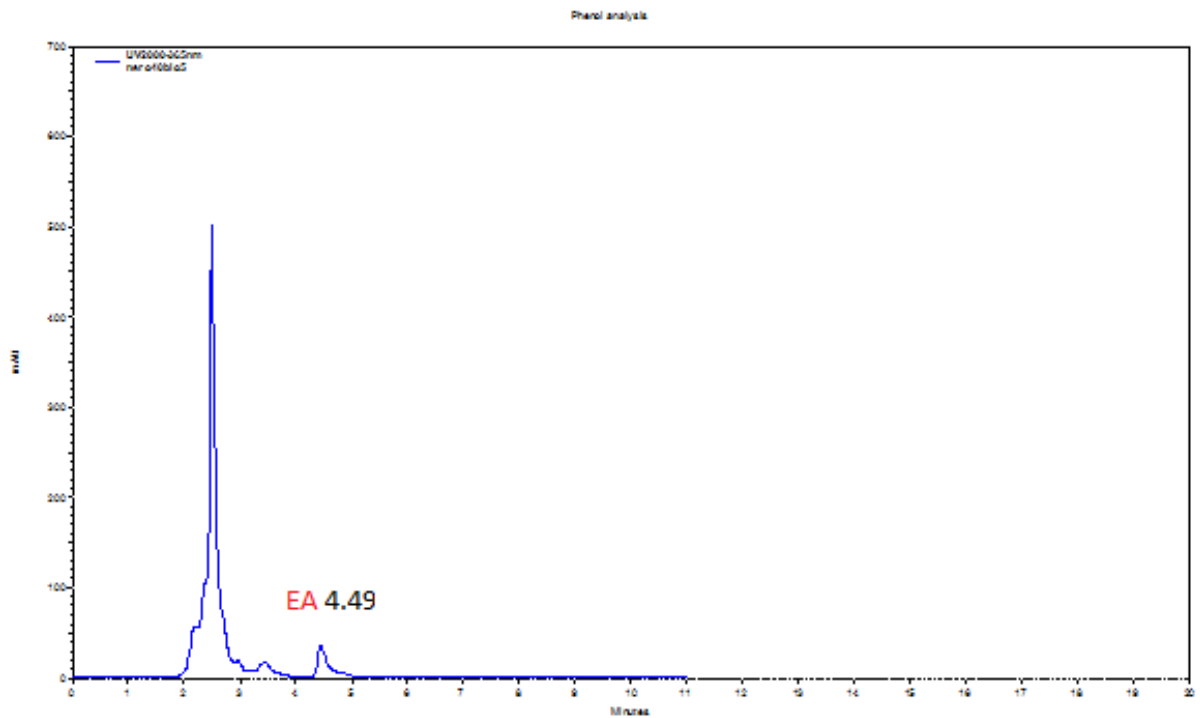
**Σχήμα 39.** Χρωματογράφημα από μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας συμβατικών ροδιών στους 40° C (EA:Ελλαγικό Οξύ).



**Σχήμα 40.** Χρωματογράφημα από μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας βιολογικών ροδιών στους 40° C (EA:Ελλαγικό Οξύ).



**Σχήμα 41.** Χρωματογράφημα από υδατικό εκχύλισμα φλούδας συμβατικών ροδιών στους 40° C (EA:Ελλαγικό Οξύ).



**Σχήμα 42.** Χρωματογράφημα από υδατικό εκχύλισμα φλούδας βιολογικών ροδιών στους 40° C (EA:Ελλαγικό Οξύ).

## 5.7. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης

Για τη στατιστική ανάλυση εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one way ANOVA), όπου μελετήθηκε η επίδραση i) του διαλύτη εκχύλισης, ii) της θερμοκρασίας επίδρασης, iii) η ποικιλία στις μεταβλητητές 1. αντιοξειδωτική δράση, 2. Αναγωγική δράση, 3. Ολικές φαινόλες, 4. Ολικά φλαβονοειδή, 5. Υδρολυμένες ταννίνες, 6. Ελλαγικό οξύ. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης της διακύμανσης καθώς και για τον έλεγχο ομοιογένειας της διακύμανσης που προηγήθηκε, ήταν το Minitab 16.

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες και η παρουσία δραστικών ενώσεων έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στο χυμό του ροδιού (Gil *et al.* 2000; Tzulker *et al.*, 2007; Tezcan *et al.* 2009; Fischer *et al.*, 2011) όμως ολοένα και αυξάνεται η έρευνα σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση στις φλούδες και τα σπόρια (Singh *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Tzulker *et al.*, 2007; Cam *et al.*, 2012) τα οποία θεωρούνται υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και μπορούν να αποτελέσουν μια καλή πηγή ωφέλιμων φυτοχημικών.

Οι πολυφαινόλες εκχυλίζονται από τις φλούδες του ροδιού συνήθως με μεθανόλη και / ή συνδυασμούς μεθανόλης και άλλων οργανικών διαλυτών και με τις κλασικές μεθόδους εκχύλισης (Singh *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Ardekani *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2011). Ιδιαίτερη σημασία έχει όμως και η χρήση του νερού ως διαλύτη εκχύλισης των πολυφαινολών γιατί είναι εύκολα διαθέσιμο, μη τοξικό, φιλικό προς το περιβάλλον και χωρίς να δημιουργεί προβλήματα στην υγεία όπως η μεθανόλη και οι άλλοι συνήθως χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες. Επίσης οι μέθοδοι εκχύλισης (ομογενοποίηση στο μπλέντερ ή ανάδευση) ενδεχομένως επηρεάζουν τη δράση των εκχυλισμάτων του ροδιού, δεδομένου επίσης ότι οι διαφορετικοί διαλύτες (μεθανόλη, νερό) καθώς και η εκχύλιση σε διαφορετικές θερμοκρασίες (24, 40 ή 100 °C), μπορούν να συνεισφέρουν στην διαλυτοποίηση και την παραλαβή διαφορετικών πολυφαινολικών ενώσεων.

Στην παρούσα εργασία ο χυμός, τα ομογενοποιημένα (με νερό στο μπλέντερ) και τα εκχυλίσματα του φλοιού (με βράζον νερό, νερό και μεθανόλη στους 24 και 40 °C) και των σπόρων (με μεθανόλη μετά από εκχύλιση με εξάνιο) από δύο ποικιλίες ροδιού προερχόμενες από την ηπειρωτική Ελλάδα (Κεντρική Μακεδονία και Θράκη), βιολογικής (B) και συμβατικής καλλιέργειας (C) αντίστοιχα, μελετήθηκαν σε ότι αφορά: α) την αντιοξειδωτική τους δράση (DPPH radical scavenging activity/αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας) με την χρήση της σταθερής ρίζας DPPH και την αναγωγική τους δράση (Ferric reducing antioxidant power/Αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής τρισθενούς σιδήρου) με τη χρήση του συμπλόκου TPTZ- Fe<sup>3+</sup>. Οι μετρήσεις έγιναν στην αρχή και για κάποια από τα εξεταζόμενα κλάσματα και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στο ψυγείο στους 4°C β) τον προσδιορισμό ολικών φαινολών, στην αρχή και για κάποια από τα εξεταζόμενα κλάσματα και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στο ψυγείο στους 4°C, τον προσδιορισμό φλαβονοειδών, υδρολυμένων ταννινών και ελλαγικού οξέος χρησιμοποιώντας μεθόδους φασματοφωτομετρίας και υγρής χρωματογραφίας υψηλής

πίεσης. Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν εμπορικός εμφιαλωμένος χυμός, και οι πρότυπες ενώσεις ασκορβικό και ελλαγικό οξύ.

Οι φλούδες και για τα δυο είδη βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας, μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ, έδειξαν DPPH δράση (92.61%) μεγαλύτερη από τους αντίστοιχους χυμούς (90.72%) και τα σπόρια (81.12%). Ο βιολογικός (91.66, 87.89%) και ο συμβατικός (89.77, 82.21%) χυμός έδειξαν δράση μεγαλύτερη από τον εμπορικό (64.85, 69.54%) χυμό στην αρχή και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στους 4 °C αντίστοιχα. Οι βιολογικές φλούδες (93.52, 90.49%), μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ, είχαν παραπλήσια και μεγαλύτερη δράση από τις συμβατικές (91.71, 89.26%), στην αρχή και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στους 4 °C αντίστοιχα και μάλιστα μεγαλύτερη από εκείνη του ελλαγικού οξέος (90.37%). Επιπλέον οι βιολογικές φλούδες μετά από εκχύλιση με βραστό νερό υπό ανάδευση είχαν παραπλήσια και μικρότερη δράση (91.39, 89.06 %) από τις συμβατικές (93.69, 92.76 %), στην αρχή και μετά από 12 εβδομάδες αποθήκευσης στους 4 °C αντίστοιχα. Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα από φλούδες που παραλήφθησαν με ανάδευση χρησιμοποιώντας μεθανόλη και νερό στους 24 και 40 °C τα αποτελέσματα έδειξαν τα εξής: Οι βιολογικές φλούδες στα εκχυλίσματα τους με μεθανόλη στους 40 °C (92.41%) είχαν μεγαλύτερη δράση από τις συμβατικές (84.01%). Οι βιολογικές και συμβατικές φλούδες έδειξαν περίπου τα ίδια επίπεδα δράσης στα εκχυλίσματά τους με μεθανόλη στους 24 °C (92.33, 91.47%) και νερό στους 24 °C (90.83, 91.34%) και 40 °C (90.54, 89.89%).

Οι φλούδες (89.93%) και οι χυμοί (89.07%) και στα δύο είδη βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας έδειξαν μεγαλύτερη (FRAP) αναγωγική δράση από τα σπόρια (64.95%). Οι φλούδες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ (93.38, 88.79%), μετά από εκχύλιση με βραστό νερό υπό ανάδευση (92.85, 88.94 %) και ο χυμός (92.48, 87.5%) της συμβατικής καλλιέργειας εμφάνισαν στην αρχή και στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης μεγαλύτερη αναγωγική δράση από τις φλούδες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ (86.48, 80.06%), μετά από εκχύλιση με βραστό νερό υπό ανάδευση (84.72, 78.06 %) και τον χυμό της βιολογικής καλλιέργειας (85.67, 75.99%) εμφανίζοντας μάλιστα παρόμοια επίπεδα δράσης με το ασκορβικό οξύ (94.03%) γνωστό για την υψηλή αναγωγική του δράση. Αντίθετα οι βιολογικές φλούδες έδειξαν μεγαλύτερη αναγωγική δράση από τις συμβατικές στα εκχυλίσματα που παραλήφθησαν με ανάδευση χρησιμοποιώντας



μεθανόλη στους 24 °C (91.82%, 87.77%) και 40 °C (91.73, 88.20%) και νερό στους 24 °C (91.47, 87.77%) και 40 °C (91.54, 87.66%).

Οι φλούδες και στα δυο είδη βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας, μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ, έδειξαν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινόλες (21404 mg GA/kg) από ότι οι χυμοί (4532 mg GA/L) και τα σπόρια (74 mg GA/kg). Ο βιολογικός χυμός έδειξε στην αρχή και στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης περισσότερες φαινόλες (6366.7, 14341 mg GA/L) από τον συμβατικό (2697.8, 3750 mg GA/L) και τον εμπορικό (588.1, 523 mg GA/L). Οι βιολογικές φλούδες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ (32985, 34430 mg GA/kg) στην αρχή και στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης έδειξαν περισσότερες φαινόλες από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα συμβατικής καλλιέργειας (9822, 16489 mg GA/kg). Επιπλέον οι βιολογικές φλούδες μετά από εκχύλιση με βραστό νερό υπό ανάδευση (25911, 31222 mg GA/kg) στην αρχή και στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης έδειξαν περισσότερες φαινόλες από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα συμβατικής καλλιέργειας (2172, 7226 mg GA/kg). Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα από φλούδες βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας που παραλήφθηκαν με ανάδευση χρησιμοποιώντας μεθανόλη και νερό στους 24 °C και 40 °C τα αποτελέσματα έδειξαν και για τα δυο είδη την εξής συγκέντρωση σε φαινόλες με φθίνουσα σειρά:

Μεθανόλη 40°C (34430, 46767) > Μεθανόλη 24° C (27230, 23667) > Νερό 40° C (23319, 31948) > Νερό 24° C (16252, 15356)

Η σειρά αυτή δείχνει ότι η μεθανόλη περισσότερο από το νερό και μάλιστα στους 40 °C αποτελεί τον καλύτερο διαλύτη εκχύλισης φαινολικών συστατικών και για τα δυο είδη καλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα για τα ολικά φλαβονοειδή και τις υδρολυμένες ταννίνες, και στις δυο καλλιέργειες βιολογική και συμβατική, έδειξαν ότι οι φλούδες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ είχαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (6260.41 mg QE/kg, 3823.75 mg GA/kg) από τους χυμούς (3106.25 mg QE/L, 1161.55 mg GA/L) αντίστοιχα ( $P < 0.05$ ). Τα φλαβονοειδή στις φλούδες και στις δυο καλλιέργειες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλέντερ, βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα (6582.3, 5938.5 mg QE/kg). Τα φλαβονοειδή στις βιολογικές φλούδες μετά από εκχύλιση με βραζον νερό (11386.5 mg QE/kg) ήταν σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στις συμβατικές φλούδες (2626 mg QE/kg) αντίστοιχα. Στην βιολογική καλλιέργεια οι υδρολυμένες ταννίνες βρέθηκαν στο χυμό

(1640.7 mg GA/L), στο εκχύλισμα με νερό στο μπλεντερ (5261.3 mg GA/kg) και στο εκχύλισμα με βράζων νερό (3759.6 mg GA/kg), σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι στα αντίστοιχα κλάσματα της συμβατικής καλλιέργειας (682.6 mg GA/L, 2386.2 mg GA/kg, 1197.7 mg GA/kg) ( $P < 0.05$ ).

Στις φλούδες και στις δυο καλλιέργειες μετά από εκχύλιση με νερό στο μπλεντερ βρέθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση ελλαγικού οξέος (191.99 mg EA/kg) από ότι στους χυμούς (147.06 mg EA/L) ( $P < 0.05$ ). Το ελλαγικό οξύ στο χυμό (241.11 mg EA/L), στο εκχύλισμα με νερό στο μπλεντερ (417.18 mg EA/kg) και στο εκχύλισμα με βράζων νερό (192.23 mg EA/kg) της βιολογικής καλλιέργειας βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στα αντίστοιχα κλάσματα της συμβατικής καλλιέργειας (53.01 mg EA/L, 135.22 mg EA/kg, 23.34 mg EA/kg) ( $P < 0.05$ ). Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα από φλούδες βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας που παραλήφθησαν με ανάδευση χρησιμοποιώντας μεθανόλη και νερό στους 40°C τα αποτελέσματα έδειξαν την εξής συγκέντρωση σε ελλαγικό οξύ με φθίνουσα σειρά: Μεθανόλη 40°C (325,74, 385,98 mg EA/kg) > Νερό 40°C (194,48, 115,23 mg EA/kg). Η σειρά αυτή δείχνει ότι η μεθανόλη περισσότερο από το νερό στους 40 °C αποτελεί τον καλύτερο διαλύτη εκχύλισης ελλαγικού οξέος και για τα δυο είδη καλλιέργειας. Η συμβατική καλλιέργεια στα μεθανολικά της εκχυλίσματα έδειξε μεγαλύτερη συγκέντρωση ελλαγικού οξέος από τη βιολογική το αντίστροφο βρέθηκε στα υδατικά εκχυλίσματα όπου η βιολογική καλλιέργεια υπερίσχυσε σε ελλαγικό οξύ.

Σε παραπλήσιες μελέτες έγινε αναφορά σε επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης ολικές φαινόλες, ολικές ταννίνες ή φλαβονοειδή, καθώς και σε ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς μεμονωμένων φαινολικών συστατικών στους χυμούς και στα επιμέρους κλάσματα ροδιού από διαφορετικές ποικιλίες και γεωγραφικές προελεύσεις.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, οι Singh *et al.*, (2002) μελέτησαν τα κλάσματα που παραλήφθησαν από φλούδες και σπόρους με οξικό αιθυλεστέρα, μεθανόλη και νερό. Με τη μέθοδο DPPH, το μεθανολικό εκχύλισμα από τις φλούδες έδειξε 81% δράση στα 50 ppm, ενώ το αντίστοιχο εκχύλισμα σπόρων έδειξε πολύ μικρότερη δράση 23,2% στα 100 ppm. Οι φλούδες που εκχυλίστηκαν με μεθανόλη έδωσαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες και ακολούθησαν ο οξικός αιθυλεστέρας και το νερό. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε φαινόλες των εκχυλισμάτων, έτσι το μεθανολικό εκχύλισμα από τις φλούδες έδειξε μεγαλύτερη δράση σε σύγκριση με τα άλλα εκχυλίσματα.

Οι Li et al., (2006) χρησιμοποίησαν ένα μείγμα αιθανόλης, μεθανόλης και ακετόνης σε φλούδες ροδιού και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος ερευνήθηκαν περαιτέρω και συγκρίθηκαν με το αντίστοιχο εκχύλισμα της πούλπας. Η σύσταση σε ολικές φαινόλες και φλαβονοειδή ήταν υψηλότερη στο εκχύλισμα φλούδας από ότι στο εκχύλισμα πούλπας. Σε ότι αφορά τις ολικές φαινόλες η πούλπα είχε συγκέντρωση 24.4 (mg ταννικού οξέος/ g) και η φλούδα σχεδόν 10-πλάσια 249.4 (mg ταννικού οξέος/ g), ενώ η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στην πούλπα ήταν  $17.2 \pm 3.3$  (mg ρουτίνης/ g) και στη φλούδα  $59.1 \pm 4.8$  (mg ρουτίνης/ g). Με βάση τη μέθοδο FRAP, το εκχύλισμα φλούδας ήταν πολύ δραστικότερο από το εκχύλισμα πούλπας. Επιπλέον, το εκχύλισμα φλούδας είχε πολύ υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη των σπόρων, όπως βρέθηκε με την εφαρμογή των μεθόδων του β-καροτενίου-λινελαϊκού οξέος και DPPH.

Οι Fischer et al., (2011) μελέτησαν εκχυλίσματα (80% μεθανολικά) από φλούδες και χυμούς και βρήκαν ότι η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών, μεταξύ των οποίων οι ελλαγιταννίνες ήταν οι επικρατέστερες φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν στα ρόδια και τα προϊόντα τους. Τα εκχυλίσματα και οι χυμοί εξετάστηκαν με την εφαρμογή των μεθόδων FRAP και Folin-Ciocalteu όπου βρέθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και ολικών φαινολών όπως προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και HPLC. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι φλούδες έδειξαν υψηλότερη δράση, συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες και ελλαγικό οξύ από τους χυμούς (FRAP: φλούδα: 589.1 mmol Trolox/kg, χυμός: 8.8-31.5 mmol Trolox/L. Ολικές φαινόλες: φλούδα: 101856.3 mg GA/kg, χυμός: 2015-5186 mg GA/L. HPLC ελλαγικό οξύ (μετά από όξινη υδρόλυση): φλούδα: 637.7 mg/kg ξηρής βάσης, χυμός: 2.1-7.2 mg/L)

Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν σύμφωνα με την εργασία των Mousavinejad et. al., (2009) μεταξύ των συγκεντρώσεων ελλαγικού οξέος και ολικών ταννινών σε διαφορετικές ποικιλίες ροδιού (ελλαγικό οξύ: 7-160 mg / L και ολικές ταννίνες 15-32 g/100 g). Οι Tezcan et al., (2009) μελέτησαν τις ολικές φαινόλες σε χυμούς από ρόδι και οι συγκεντρώσεις τους κυμάνθηκαν από 2602 έως 10086 mg/L. Οι Gil et al., (2000) μέτρησαν τις ολικές φαινόλες σε χυμό από επισπέρμια από 1800 έως 2100 mg / L και σε εμπορικό χυμό έως 2566 mg/L. Οι εμπορικοί χυμοί έδειξαν επίσης αντιοξειδωτική δράση μεγαλύτερη από τους εργαστηριακούς λόγω της παρουσίας ταννινών στη φλούδα που συνεχυλίζονται με τον χυμό. Οι ολικές φαινόλες σε χυμούς (από επισπέρμια) από την περιοχή της Τουρκίας κυμάνθηκαν μεταξύ 1245 και 2076 mg / L (Özgen et al., 2008).

Σύμφωνα με την εργασία των Cam et al., (2010) οι ολικές φαινόλες σε φλούδες που εκχυλίστηκαν με νερό υπό πίεση και μεθανόλη βρέθηκαν στα 264.3 και 258.2 mg ταννικού οξέος/g, αντίστοιχα ενώ οι υδρολυμένες ταννίνες στα 262.7 mg ταννικού οξέος/g και 260.2 mg/g αντίστοιχα. Τα ολικά φλαβονοειδή στα μεθανολικά εκχυλίσματα βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (18.1 mg κατεχίνης/g) από τα υδατικά εκχυλίσματα (13 mg CAE/g) επομένως η μεθανόλη ήταν πιο αποτελεσματικός διαλύτης στην εκχύλιση φλαβονοειδών τα οποία εκχυλίζονται κυριώς με οργανικούς ή υδατικούς οργανικούς διαλύτες. Για τα υδατικά εκχυλίσματα υπό ατμοσφαιρική πίεση οι συγκεντρώσεις ήταν μικρότερες έτσι για τις ολικές φαινόλες βρέθηκαν στα 80.5 mg ταννικού οξέος/g, για τα φλαβονοειδή στα 6.2 mg κατεχίνης/g και για τις υδρολυμένες ταννίνες στα 82.6 mg TAE/g. Στα υδατικά εκχυλίσματα τα επίπεδα του ελλαγικού οξέος και των παραγώγων του (4.5 mg/g) βρέθηκαν χαμηλότερα από τις τιμές που βρήκαν οι Zhou, Wu, Li, Zhang, and Hu (2008) (10.8 mg/g) λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του ελλαγικού οξέος στο νερό σε σχέση με τη μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε.

Οι Tzulker et al. (2007) μελέτησαν τις ολικές φαινόλες σε χυμούς από ολόκληρα φρούτα και επισπέρμια από 29 διαφορετικές ποικιλίες ροδιού. Στους χυμούς από ολόκληρα φρούτα οι ολικές φαινόλες κυμάνθηκαν από 1875 έως 11250 mg / L, υψηλότερες κατά περίπου 6.5-φορές σε σύγκριση με τους χυμούς μόνο από επισπέρμια. Η αντιοξειδωτική δράση σε χυμό από τα επισπέρμια συσχετίζεται σημαντικά με τις ολικές πολυφαινόλες. Ωστόσο οι χυμοί από ολόκληρα φρούτα παρουσίασαν περίπου 20 φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Τα επίπεδα τεσσάρων υδρολυμένων ταννινών (πιουνικαλαγίνη, πιουνικαλίνη, ελλαγικό οξύ και γαλλαγικό οξύ) συσχετίζονται θετικά με την αντιοξειδωτική δράση των ομογενοποιημάτων από ολόκληρα φρούτα και φλούδες.

Οι Ardekani et al., (2011) μελέτησαν εννιά διαφορετικές ποικιλίες από το Ιράν με εκχύλιση (Soxhlet) της φλούδας και του μεσοκάρπιου με διαλύτες όπως ακετόνη, μεθανόλη, νερό, οξικό αιθυλεστέρα, έγινε προσδιορισμός ολικών φαινολών, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής δράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα φλούδας είχαν περίπου 10 φορές μεγαλύτερες τιμές από τα εκχυλίσματα πούλπας: Αντιοξειδωτική δράση (FRAP): πούλπα 0.136-0.234, φλούδα 1.675-2.395 mmol Vit C/ g εκχυλ. Για τις ολικές φαινόλες: πούλπα 11.62-21.03, φλούδα 98.24-226.56 mg GA/g εκχυλ. Για τα ολικά φλαβονοειδή: πούλπα 0.84-2.14, φλούδα 18.61-36.4 mg κατεχίνης/g εκχυλ.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση και την παρουσία σε σημαντικές συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών στους χυμούς και στα πολικά εκχυλίσματα (υδατικά και μεθανολικά) από φλούδες και σπόρια βιολογικής και συμβατικής καλλιέργειας ροδιού. Η αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση των χυμών και εκχυλισμάτων από φλούδες και σπόρια στις δύο ποικιλίες καθώς και η συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες, флаβονοειδή, υδρολυμένες ταννίνες και ελλαγικό οξύ φαίνεται ότι επηρεάζονται από τη μέθοδο εκχύλισης καθώς και από το είδος του διαλύτη και τη θερμοκρασία εκχύλισης, εφόσον αυτές συνεισφέρουν στην διαλυτοποίηση και την παραλαβή διαφορετικών κατηγοριών φαινολικών συστατικών. Οι φλούδες επικράτησαν σε αντιοξειδωτική δράση και φαινολικά συστατικά (ολικές φαινόλες, флаβονοειδή, υδρολυμένες ταννίνες και ελλαγικό οξύ) συγκριτικά με τους χυμούς και τα σπόρια. Σε επόμενο στάδιο θα γίνει περαιτέρω μελέτη για τον προσδιορισμό και άλλων δραστικών φαινολικών συστατικών εκτός του ελλαγγικού οξέος και της πιθανής συνεργιστικής δράσης μεταξύ τους.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography* (**896**), 87–93
- ✓ Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Burcu B, Berker K., Ozyurt D. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* (**12**), 1496-1547
- ✓ Begona C., Espin J. C., Parra S., Martinez P., Barderan T. A. F., (2004). The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6- one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* (**43**), 205–220
- ✓ Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Anal. Biochem.* (**239**), 70-76
- ✓ Çam M., Yasar H., Gökhan D. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry* (**112**), 721–726
- ✓ Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology.* (**28**), 25-30
- ✓ Çam M., Yasar H., (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry* (**123**), 878–885
- ✓ Chan, H.W.S. 1977. Photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters: the indentification of different pathways. *Journal of American Oil Chemistry Society* (**54**), 100-104
- ✓ Coopen, P.P. 1983. Use of antioxidants in Rancidity in Foods, edited by Allen, J.C., Hamilton, R.J. *Applied Science* , London. pp. 76-85
- ✓ Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (**51**), 4563-69
- ✓ Elinor S., Ira G., Irit B. Y., Ifat M., Igal B. I., Dorn H., Rachel A., (2009). Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry* (**115**), 965–973
- ✓ Garima P. & Casmir C. A., (2009). Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* (**57**), 9427–9436

- ✓ Gil, M. I.; Tomas B., F. A.; Hess P., B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A., (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem* **(48)**, 4581–4589
- ✓ He L., Zhang X., Xu H., Chao X., Yuan F., Knez Z., Novak Z., Gao Y., (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS•+ assay. *Food and bioproducts processing* **(90)**, 215-223
- ✓ IUPAC. Peroxide value determination 2.501. International Union of Pure and Applied Chemistry: standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7<sup>th</sup> revised edition. 1987
- ✓ Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfield, L., Vaya, M. (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J. Nutr.* **(131)**, 2082-2089
- ✓ Kochhar, S.P., Rossel, J.B. 1988. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems in *Food Antioxidants*, edited by Hudson, B.J.F. *Elsevier Applied Science*, London, 19-52
- ✓ Kulkarni A. P., Aradhya S. M., (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry* **(93)**, 319–324
- ✓ Lansky E. P., Newman R. A., (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* **(109)**, 177–206
- ✓ Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* **(96)**, 254–260
- ✓ Macrae R. 1988. HPLC in food analysis. Academic Press, London
- ✓ Mohammad R. S. A., Mannan H., Mohammad R. O., Nafigceh S., Behrooz J., Ali Mohammad R., & Tahereh M., (2011), Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **10 (3)**, 519-524
- ✓ Mousavinejad G., Zahra E. D., Rezaei K., Mohammad H. H. K., (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry* **(115)**, 1274–1278

- ✓ Mustafa O., Coskun D., Sedat S., Cemal K., (2008). Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry* **(111)**, 703–706
- ✓ Nawar, W.W. 1985. Lipids in Food Chemistry, edited by Fennema, O.R., Marcel Dekker, New York, 139-244
- ✓ Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* **(80)**, 393–397.
- ✓ Rossell, j.b. 1989. Measurement of rancidity in Rancidity in Foods, edited by Allen, J.C., Hamilton, R.J. *Elsevier Science Publishers*. London.
- ✓ Schuler, P. 1990. Natural antioxidants exploited commercially in Food antioxidants, edited by Hudson, B.J.F., *Elsevier Applied Science* , London , 130-139
- ✓ Seeram N., Lee R., Hardy M., Heber D., (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* **(41)**, 49–55
- ✓ Shahidi, F., Gamipha, P.K., Wanasundera, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32, 67-103
- ✓ Sherwin, E.R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of American Oil Chemical Society* **(55)**, 809-814
- ✓ Singh R. P., Chidambara M. K. N., & Jayaprakasha G. K., (2002). Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.* **(50)**, 81–86.
- ✓ Slinkard, K. and Singleton, V.L. (1997). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, **(28)**, 49-55
- ✓ Tezcan F., Gültekin Ö. M., Diken T., Özçelik B., Bedia E. F., (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry* **(115)**, 873–877
- ✓ Tzulker R., GLAZER I., Bar I. I., Holland D., Aviram M., & Amir R., (2007). Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *J. Agric. Food Chem.* **(55)**, 9559–9570
- ✓ Ulrike A. F., Reinhold C., Dietmar R. K., (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chemistry* **(127)**, 807–821



- ✓ Yunfeng L., Changjiang G., Jijun Y., Jingyu W., Jing X., Shuang C., (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* **(96)**, 254–260
- ✓ Zhisen J (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* **(64)**, 555– 559.
- ✓ Zhou B., Wu Z., Li X., Zhang J., & Hu X., (2008). Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **(19)**, 86–89.
- ✓ Wenjuan Q., Breksa A. P., Zhongli P., Haile M., (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry* **(132)** 1585–1591
- ✓ Willis, R.B. (1998). Improved method for measurement hydrolysable tannins using potassium iodate. *Analyst*, **(123)**, 435-39.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Κυριτσάκης, Α. 1984. Σημειώσεις τεχνολογίας λιπών και λαδίων. Τ.Ε.Ι.Θ. Τμήμα τεχνολογίας τροφίμων. Θεσσαλονίκη
- ✓ Λάγουρη, Β. 1998. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής σύστασης εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Lamiales. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή Θετικών Επιστημών
- ✓ Μπόσκου, Δ. 2004. Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

### 1. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΔΡΡΗ

Πίνακας 1. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στους χυμούς την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	0.237	0.64	0.65	63.57	0.0076
	0.222	0.65		65.88	
	0.227	0.65		65.11	
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	0.055	0.57	0.57	90.36	0.0035
	0.062	0.57		89.13	
	0.058	0.56		89.83	
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	0.042	0.51	0.51	91.79	0.0006
	0.043	0.51		91.59	
	0.043	0.51		91.59	

Πίνακας 2. Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στους χυμούς την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	0.160	0.53	0.53	70.0375	0.0031
	0.162	0.534		69.6629	
	0.166	0.538		68.9139	
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	0.0940	0.53	0.53	82.3970	0.0017
	0.0970	0.534		81.8352	
	0.0940	0.538		82.3970	
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	0.058	0.452	0.45	87.3085	0.0025
	0.053	0.453		88.4026	
	0.055	0.466		87.9650	

**Πίνακας 3.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα εκχυλίσματα φλούδας την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	0.045	0.57	0.57	92.11	0.0032
	0.046	0.57		91.93	
	0.051	0.56		91.06	
Ομογενοποίηση Βιολογικό	0.029	0.45	0.48	94.00	0.0021
	0.032	0.49		93.38	
	0.033	0.49		93.17	
Αφέψημα Συμβατικό	0.028	0.57	0.57	95.09	0.0122
	0.030	0.57		94.74	
	0.050	0.56		91.23	
Αφέψημα Βιολογικό	0.035	0.37	0.43	91.86	0.0017
	0.038	0.4		91.16	
	0.038	0.45		91.16	

**Πίνακας 4.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα εκχυλίσματα φλούδας την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	0.058	0.53	0.53	89.13	0.0012
	0.056	0.53		89.51	
	0.058	0.58		89.13	
Ομογενοποίηση Βιολογικό	0.047	0.52	0.51	90.81	0.0015
	0.049	0.49		90.42	
	0.050	0.52		90.22	
Αφέψημα Συμβατικό	0.038	0.53	0.53	92.88	0.0012
	0.040	0.53		92.50	
	0.038	0.53		92.88	
Αφέψημα Βιολογικό	0.049	0.45	0.45	89.27	0.0010
	0.051	0.45		88.84	
	0.050	0.46		89.05	

**Πίνακας 5.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα εκχυλίσματα σπορίων ,ελλαγικού και ασκορβικού οξέος

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανολικό εκχύλισμα Συμβατικών σπορίων	0.151	0.504	0.4813	68.63	0.0061
	0.141	0.435		70.71	
	0.14	0.505		70.91	
Μεθανολικό εκχύλισμα Βιολογικών σπορίων	0.036	0.504	0.4813	92.52	0.0015
Ελλαγικό Οξύ (500 ppm)	0.049	0.504	0.4813	89.82	0.0055
	0.05	0.435		89.61	
Ασκορβικό Οξύ (200 ppm)	0.02	0.47	0.02	95.79	0
	0.02	0.476			
	0.02	0.478			

**Πίνακας 6.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας συμβατικής καλλιέργειας στους 24° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη	0.044	0.54	0.53	91.66	0.001
	0.045	0.55		91.47	
	0.046	0.49		91.28	
Νερό	0.047			91.09	0.0012
	0.045			91.47	
	0.045			91.47	

**Πίνακας 7.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας συμβατικής καλλιέργειας στους 40° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη	0.079	0.54	0.53	85.02	0.0047
	0.088	0.55		83.31	
	0.086	0.49		83.69	
Νερό	0.049	0.47	0.48	89.75	0.0012
	0.049	0.48		89.75	
	0.047	0.49		90.17	

**Πίνακας 8.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη	0.035	0.41	0.47	92.48	0.0012
	0.035	0.50		92.48	
	0.037	0.49		92.05	
Νερό	0.043			90.76	0.0015
	0.044			90.54	
	0.041			91.19	

μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας βιολογικής καλλιέργειας στους 24° C

**Πίνακας 9.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας βιολογικής καλλιέργειας στους 40° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη	0.035	0.41	0.47	92.48	0.0006
	0.035	0.50		92.48	
	0.036	0.49		92.26	
Νερό	0.042			90.97	0.002
	0.044			90.54	
	0.046			90.11	

## 2. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – FRAP

**Πίνακας 10.** Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου στους χυμούς την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	0.998	0.078	0.090	91.01	0.015
	0.997	0.094		91.01	
	1.023	0.097		91.23	
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	1.049	0.085	0.0797	92.40	0.016
	1.078	0.081		92.601	
	1.052	0.073		92.42	
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	0.800	0.115	0.1150	85.62	0.023
	0.827	0.115		86.09	
	0.782	0.115		85.29	

**Πίνακας 11.** Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου στους χυμούς την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	0.573	0.092	0.083	85.45	0.103
	0.411	0.078		79.72	
	0.602	0.08		86.15	
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	0.666	0.092	0.083	87.48	0.005
	0.672	0.078		87.59	
	0.662	0.08		87.41	
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	0.430	0.103	0.104	75.65	0.007
	0.444	0.105		76.42	
	0.434	0.106		75.88	

**Πίνακας 12.** Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου στα εκχυλίσματα φλούδας την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	1.207	0.085	0.0797	93.39	0.013
	1.189	0.081		93.29	
	1.214	0.073		93.43	
Ομογενοποίηση Βιολογικό	0.857	0.092	0.1147	86.61	0.013
	0.854	0.096		86.57	
	0.834	0.156		86.25	
Αφέψημα Συμβατικό	1.107	0.085	0.0797	92.80	0.009
	1.114	0.081		92.84	
	1.124	0.073		92.91	
Αφέψημα Βιολογικό	0.762	0.092	0.1147	84.95	0.014
	0.735	0.096		84.39	
	0.755	0.156		84.81	

**Πίνακας 13.** Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου στα εκχυλίσματα φλούδας την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	0.772	0.092	0.0833	89.20	0.036
	0.704	0.078		88.16	
	0.758	0.08		89.00	
Ομογενοποίηση Βιολογικό	0.511	0.103	0.1047	79.51	0.016
	0.522	0.105		79.94	
	0.543	0.106		80.72	
Αφέψημα Συμβατικό	0.738	0.092	0.0833	88.70	0.014
	0.765	0.078		89.10	
	0.757	0.08		88.99	
Αφέψημα Βιολογικό	0.472	0.103	0.1047	77.82	0.005
	0.477	0.105		78.05	
	0.482	0.106		78.28	

**Πίνακας 14.** Μεταβολή της % ικανότητας αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου στα εκχυλίσματα σπορίων, ελλαγικού και ασκορβικού οξέος

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Μεθανολικό εκχύλισμα Συμβατικών σπορίων	0.39	0.169	0.154	60.51	0.0358
	0.46	0.146		66.52	
	0.412	0.147		62.62	
Μεθανολικό εκχύλισμα Βιολογικών σπορίων	0.4	0.169	0.154	61.5	0.0685
Ελλαγικό Οξύ(500 ppm)	0.47	0.165	0.1507	67.94	0.0078
	0.456	0.127		66.95	
Ασκορβικό Οξύ(100 ppm)	0.568	0.04	0.64	93.31	0.068009803
	0.704	0.036		94.60	
	0.638	0.038		94.04	

**Πίνακας 15.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας συμβατικής καλλιέργειας στους 24° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Νερό	0.538	0.09	0.07	86.18	0.0219
	0.579	0.06		87.16	
	0.572	0.08		87.00	
Μεθανόλη	0.624			88.09	0.0171
	0.59			87.40	
	0.61			87.81	

**Πίνακας 16.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας συμβατικής καλλιέργειας στους 40° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Νερό	0.626	0.09	0.07	88.13	0.021
	0.598	0.06		87.57	
	0.585	0.08		87.29	
Μεθανόλη	0.641			88.40	0.0129
	0.616			87.93	
	0.634			88.28	

**Πίνακας 17.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας βιολογικής καλλιέργειας στους 24° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Νερό	1.875	0.16	0.16	91.40	0.0148
	1.904	0.16		91.53	
	1.895	0.16		91.49	
Μεθανόλη	1.99			91.89	0.0544
	2.018			92.01	
	1.913			91.57	

**Πίνακας 18.** Μεταβολή της % ικανότητας αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας βιολογικής καλλιέργειας στους 40° C

Δείγμα	Απορρόφηση	Λευκός προσδιορισμός	Μέσος όρος	% ικανότητα αδρανοποίησης	Τυπική απόκλιση
Νερό	1.934	0.16	0.16	91.66	0.0278
	1.879	0.16		91.41	
	1.914	0.16		91.57	
Μεθανόλη	1.915			91.58	0.0326
	1.975			91.83	
	1.967			91.80	



### 3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – Ολικές Φαινόλες

Πίνακας 19. Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στους χυμούς την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	1.417	587.77	588.14	0.01
	1.433	596.66		
	1.403	580.00		
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	1.546	2637.77	2697.78	0.02
	1.588	2731.11		
	1.585	2724.44		
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	1.518	6438.88	6366.67	0.03
	1.462	6127.77		
	1.535	6533.33		

Πίνακας 20. Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στους χυμούς την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Χυμός Εμπορικός	1.334	541.66	522.77	0.052
	1.327	537.77		
	1.239	488.88		
Φρέσκος συμμένος Συμβατικός	1.069	3944.44	3750	0.038
	1.041	3788.89		
	0.992	3516.67		
Φρέσκος συμμένος Βιολογικός	1.651	14355.56	14340.74	0.029
	1.678	14655.56		
	1.62	14011.11		

Πίνακας 21. Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα φλούδας την πρώτη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	1.208	9433.33	9822.22	0.04
	1.287	10311.11		
	1.234	9722.22		
Ομογενοποίηση Βιολογικό	1.842	32955.56	32985.189	0.001
	1.845	33022.22		
	1.843	32977.77		
Αφέψημα Συμβατικό	0.759	2222.22	2172.22	0.045
	0.701	1900.00		
	0.79	2394.44		
Αφέψημα Βιολογικό	1.547	26400	25911.11	0.12
	1.389	22888.89		
	1.639	28444.44		

**Πίνακας 22.** Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα φλούδας  
την δωδέκατη εβδομάδα

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Ομογενοποίηση Συμβατικό	1.828	16322.22	16488.89	0.031
	1.878	16877.78		
	1.823	16266.67		
Ομογενοποίηση Βιολογικό	1.869	33555.56	34429.62	0.047
	1.895	34133.33		
	1.961	35600		
Αφέψημα Συμβατικό	1.638	7105.56	7225.92	0.021
	1.661	7233.33		
	1.68	7338.89		
Αφέψημα Βιολογικό	1.864	33444.44	31222.22	0.092
	1.747	30844.44		
	1.681	29377.78		

**Πίνακας 23.** Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα σπορίων

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Μεθανολικό εκχύλισμα Συμβατικών σπορίων	0.972	68.11	70.92	0.02
	1.03	74.55		
	0.99	70.11		
Μεθανολικό εκχύλισμα Βιολογικών σπορίων	1.032	74.77	76.78	0.024
	1.04	75.66		
	1.078	79.89		

**Πίνακας 24.** Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας συμβατικής καλλιέργειας

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη 24	1.452	24288.89	23666.66	0.04
	1.45	24244.44		
	1.37	22466.67		
Μεθανόλη 40	1.744	46166.67	46766.67	0.04
	1.814	48500		
	1.728	45633.33		
Νερό 24	1.006	14377.78	15355.56	0.06
	1.018	14644.44		
	1.126	17044.44		
Νερό 40	1.689	29555.56	31948.14	0.12
	1.933	34977.78		
	1.768	31311.11		

**Πίνακας 25.** Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φαινολών στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φλούδας βιολογικής καλλιέργειας

Δείγμα	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Μεθανόλη 24	1.557	26622.22	27229.62	0.11
	1.714	30111.11		
	1.482	24955.56		
Μεθανόλη 40	1.898	34200	34429.62	0.04
	1.961	35600		
	1.866	33488.89		
Νερό 24	1.078	15977.78	16251.85	0.013
	1.105	16577.78		
	1.088	16200		
Νερό 40	1.37	22466.67	23318.51	0.058
	1.476	24822.22		
	1.379	22666.67		

### 3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – Ολικά φλαβονοειδή

**Πίνακας 26.** Μεταβολή συγκέντρωσης ολικών φλαβονοειδών στους χυμούς και τα εκχυλίσματα φλούδας

ΔΕΙΓΜΑ	Απορρόφηση	mg QE/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Φρέσκος στυμμένος Συμβατικός	0.336	1459.38	1440.63	0.007
	0.338	1471.88		
	0.325	1390.63		
Εμπορικός	0.612	636.88	679.38	0.030
	0.658	694.38		
	0.668	706.88		
Φρέσκος στυμμένος Βιολογικός	0.88	4859.38	4771.88	0.012
	0.86	4734.38		
	0.858	4721.88		
Ομογενοποίηση Συμβατικό	1.109	6290.63	5938.54	0.051
	1.009	5665.63		
	1.04	5859.38		
Ομογενοποίηση Βιολογικό	1.19	6778.13	6582.29	0.036
	1.16	6628.13		
	1.12	6340.63		
Αφέψημα Συμβατικό	0.52	2584.38	2626.04	0.012
	0.54	2715.63		
	0.52	2578.13		
Αφέψημα Βιολογικό	1.86	10959.38	11386.46	0.074
	2.00	11878.13		
	1.91	11321.88		

#### 4. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- Υδρολυμένες ταννίνες

Πίνακας 27. Μεταβολή συγκέντρωσης υδρολυμένων ταννίνων

ΔΕΙΓΜΑ	Απορρόφηση	mg GA/L	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Φρέσκος στυμμένος Συμβατικός	1.167	707.46	682.58	0.034
	1.099	662.13		
	1.123	678.13		
Εμπορικός	0.415	206.13	205.24	0.012
	0.425	212.81		
	0.401	196.81		
Φρέσκος στυμμένος Βιολογικός	0.625	1730.66	1640.66	0.027
	0.572	1554		
	0.597	1637.33		
Ομογενοποίηση Συμβατικό	0.82	2364	2367.33	0.009
	0.82	2364		
	0.83	2374		
Ομογενοποίηση Βιολογικό	0.92	5428	5261.33	0.029
	0.902	5048		
	0.863	5308		
Αφέψημα Συμβατικό	1.95	1184.13	1197.66	0.041
	1.875	1179.46		
	1.882	1229.4		
Αφέψημα Βιολογικό	1.19	3850.66	3759.55	0.038
	1.25	3814		
	1.26	3614		

## 5. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΛΑΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ-HPL C

Πίνακας 28. Μεταβολή συγκέντρωσης ελλαγικού οξέος

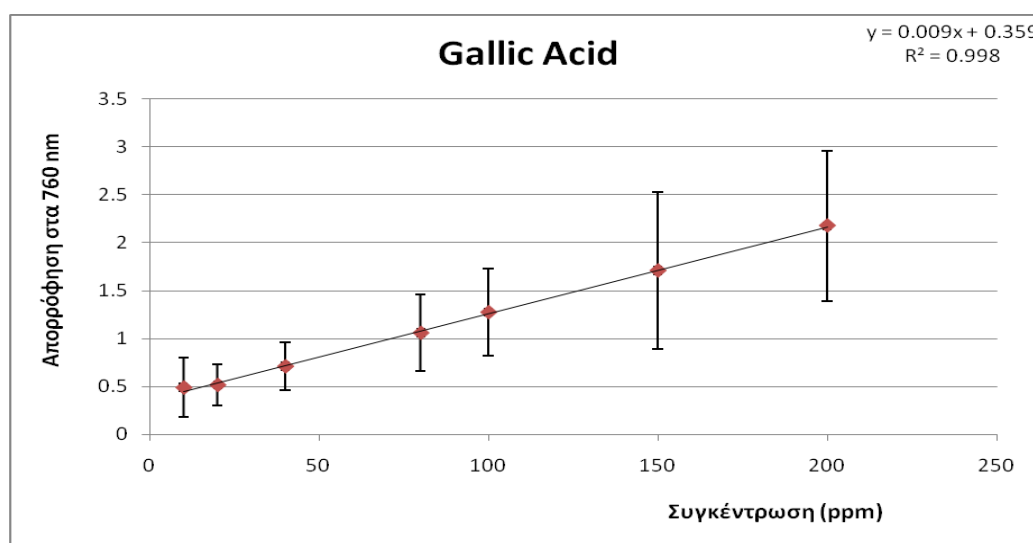
Δείγμα	χρόνος έκλουσης (min)	Εμβαδό	Μέσος όρος Εμβαδού	mg EA/L	Τυπική απόκλιση
Εμπορικός	4.63	180153	175553.67	14.91	0.77
	4.528	181407		15.02	
	4.465	165101		13.64	
Φρέσκος συμμενός συμβατικός	4.648	123139	129033.67	50.51	3.66
	4.617	124968		51.29	
	4.617	138994		57.21	
Φρέσκος συμμενός βιολογικός	4.547	576680	574498	242.03	10.92
	4.52	599216		251.54	
	4.512	547598		229.75	
Ομογενοποίηση Συμβατικό	4.675	307952	323732	128.55	6.96
	4.612	340819		142.43	
	4.498	322425		134.66	
Ομογενοποίηση Βιολογικό	4.602	983944	991480.67	414.01	2.95
	4.517	997767		419.84	
	4.552	992731		417.71	
Αφέψημα Συμβατικό	4.533	56156	58766.67	22.23	1.50
	4.597	62830		25.05	
	4.545	57314		22.73	
Αφέψημα Βιολογικό	4.552	480376	458748.33	201.36	10.76
	4.525	430638		180.36	
	4.53	465231		194.97	
Μεθανολικό Συμβατικό εκχύλισμα 40°C	4.537	944266	917572.33	397.24	9.76
	4.528	904408		380.41	
	4.587	904043		380.26	
Μεθανολικό Βιολογικό εκχύλισμα 40°C	4.52	772029	774923.67	324.51	5.62
	4.547	763305		320.83	
	4.55	789437		331.87	
Υδατικό Συμβατικό εκχύλισμα 40°C	4.543	265106	276381	110.46	5.51
	4.495	290677		121.26	
	4.542	273360		113.95	
Υδατικό Βιολογικό εκχύλισμα 40°C	4.52	454692	464068	190.52	4.01
	4.533	473700		198.54	
	4.492	463812		194.37	

## 6. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ

### 7.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ- ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Πίνακας 29. Μετρήσεις πρότυπης καμπύλης Γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό Ολικών Φαινολών

mg GA/L	Απορρόφηση	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
10	0.427	0.49	0.31
	0.385		
	0.656		
20	0.565	0.52	0.22
	0.507		
	0.478		
40	0.702	0.71	0.25
	0.721		
	0.708		
80	1.006	1.06	0.40
	1.09		
	1.082		
100	1.28	1.27	0.46
	1.24		
	1.301		
150	1.914	1.71	0.82
	1.435		
	1.776		
200	2.19	2.18	0.78
	2.227		
	2.111		

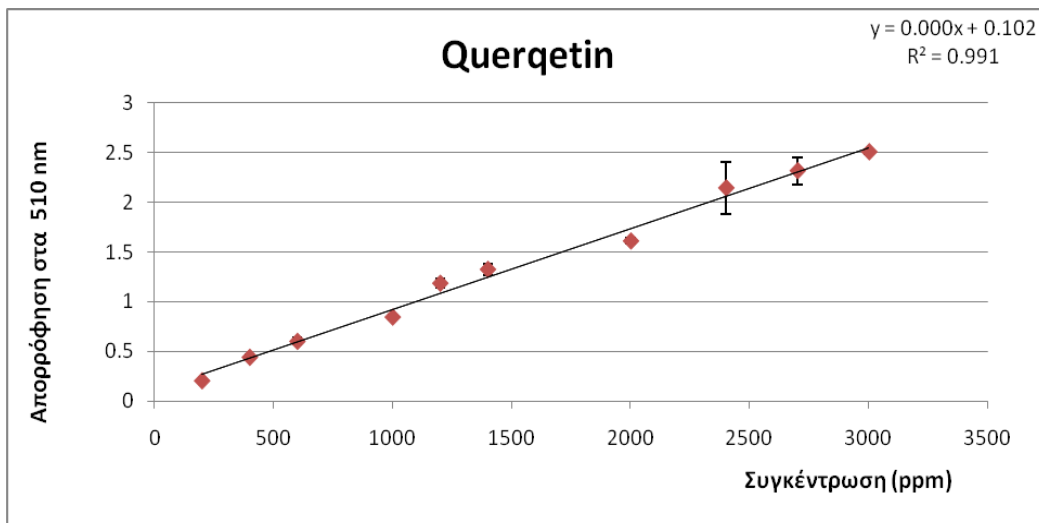


Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού Οξέος

## 6.2 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ- ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Πίνακας 30. Μετρήσεις πρότυπης καμπύλης Κερκετίνης για τον προσδιορισμό Ολικών Φλαβονοειδών

mg QE/L	Απορρόφηση	Μ.ο	Τυπική απόκλιση
200	0.21	0.21	0.00
	0.204		
	0.209		
400	0.454	0.44	0.02
	0.42		
	0.455		
600	0.583	0.60	0.04
	0.58		
	0.646		
1000	0.829	0.85	0.02
	0.87		
	0.84		
1200	1.15	1.18	0.04
	1.17		
	1.234		
1400	1.298	1.32	0.06
	1.288		
	1.388		
2000	1.596	1.61	0.03
	1.59		
	1.64		
2400	1.844	2.14	0.26
	2.295		
	2.285		
2700	2.358	2.31	0.14
	2.424		
	2.16		
3000	2.504	2.50	0.02
	2.486		
	2.52		

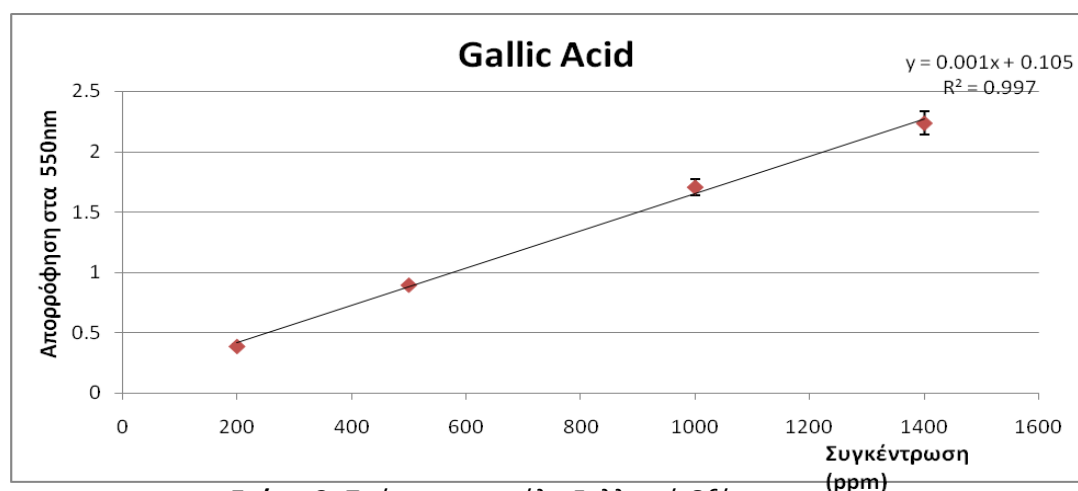


Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη Κερκετίνης

### 6.3 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ- ΥΔΡΟΛΥΜΕΝΕΣ ΤΑΝΝΙΝΕΣ

Πίνακας 31. Μετρήσεις πρότυπης καμπύλης Γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό Υδρολυμένων Ταννίνων

mg GA/L	Απορρόφηση	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
200	0.405	0.39	0.02
	0.389		
	0.367		
500	0.88	0.90	0.01
	0.905		
	0.9		
1000	1.681	1.71	0.07
	1.785		
	1.65		
1400	2.166	2.24	0.10
	2.195		
	2.345		



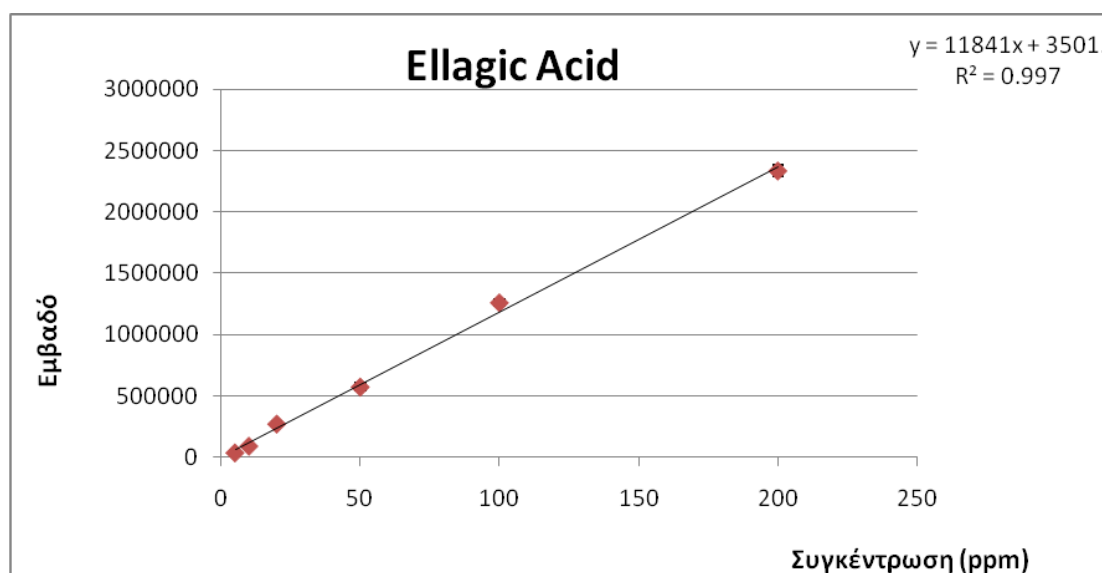
Σχήμα 3. Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού Οξέος



## 6.4 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΕΛΛΑΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ- HPL C

Πίνακας 32. Μετρήσεις πρότυπης καμπύλης Ελλαγικού οξέος

mg EA/L	Εμβαδό	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
5	38393	38093.33	2901.13
	40833		
	35054		
10	92055	92742.67	1819.71
	91367		
	94806		
20	289349	273253.67	14101.98
	267344		
	263068		
50	603239	575039.00	26106.49
	551713		
	570165		
100	1288324	1262583.67	23081.37
	1243728		
	1255699		
200	2341145	2338202.67	44964.76
	2291839		
	2381624		



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη Ελλαγικού Οξέος

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

### 1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

#### 1.1 DPPH χυμοί

##### One-way ANOVA: C4 versus C5

Grouping Information Using Tukey Method

C5	N	Mean	Grouping
χυμός φρέσκος_Βιο	3	91,661	A
χυμός φρέσκος_Εμπορ.	3	89,778	A
Εμπορικός	3	64,857	B

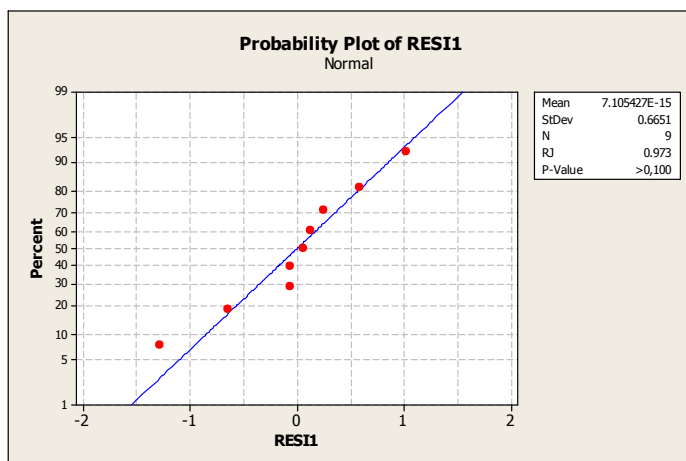
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>:** Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

**H<sub>a</sub>:** Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα με αύξουσα ταξινόμηση:

Εμπορικός < Φρέσκος\_Εμπο = Φρέσκος\_Βιο



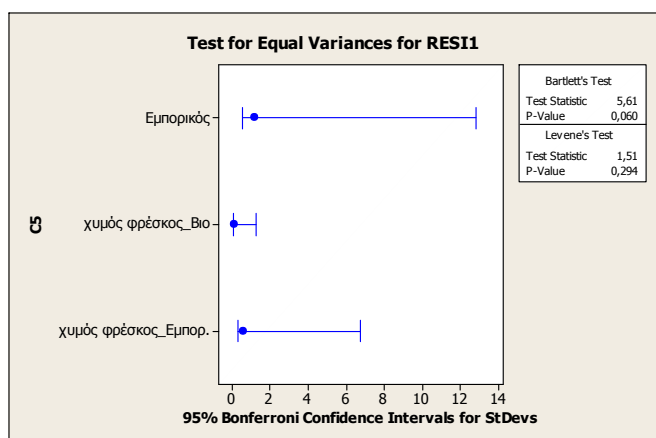
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>:** Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

**H<sub>a</sub>:** Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερνάμε ότι ισχύει η  $H_0$  άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,060 ( P-Value >0,05).

## 1.2 DPPH φλούδες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6 N Mean Grouping

Φλούδες\_Βρ\_Ε 3 93,692 A

Φλούδες\_Κρ\_Βιο 3 93,522 A

Φλούδες\_κρύες\_Ε 3 91,706 A

Φλούδες\_Βρ\_Βιο 3 91,395 A

Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η  $H_0$ ) αφού P= 0,079.

## 1.3 Dpph μέρη ροδιού

### Kruskal-Wallis Test: C4 versus C5

Kruskal-Wallis Test on C4

C5    N    Median    Ave Rank    Z

Σπόρια    6    81,41    7,5    -1,12

Φλούδα    6    92,65    14,0    2,53

Χυμός    6    90,98    7,0    -1,40

Overall    18            9,5

H = 6,42    DF = 2    P = 0,040

H = 6,43    DF = 2    P = 0,040 (adjusted for ties)

**Η τιμή P του ελέγχου είναι  $P < 0.05$  αφού  $P = 0.04$  επομένως ισχύει η  $H_0$  υπόθεση, δηλαδή οι τιμές των διαμέσων δεν είναι όλες ίσες μεταξύ τους. Συγκεκριμένα:**

**Χυμός    Σπόρια    Φλούδα**

-----

**Ο χυμός και τα σπόρια δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ενώ οι φλούδες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και με το χυμό και τα σπόρια.**

## 1.4 Drrh διαλύτες

### One-way ANOVA: C9 versus C10

C10    N    Mean    Grouping

MeOH\_40\_Bio    3    92.407    A

MeOH\_24\_Bio    3    92.335    A

MeOH\_24\_Συμβ    3    91.466    A B

Νερό\_24\_Συμβ    3    91.340    A B

Νερό\_24\_Bio    3    90.831    B C

Νερό\_40\_Bio    3    90.544    B C

Νερό\_40\_Συμβ    3    89.888    C

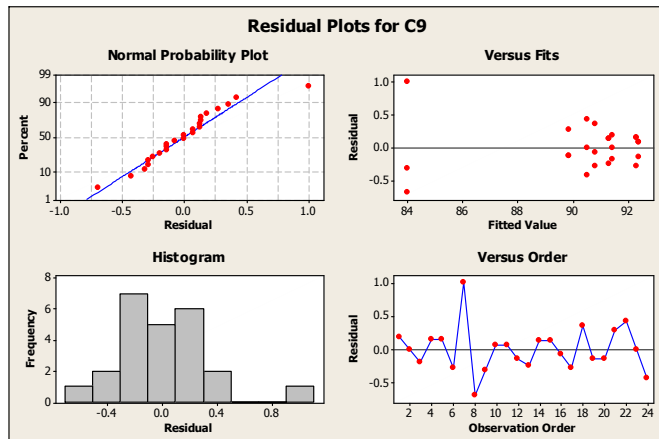
MeOH\_40\_Συμβ    3    84.008    D

Means that do not share a letter are significantly different.

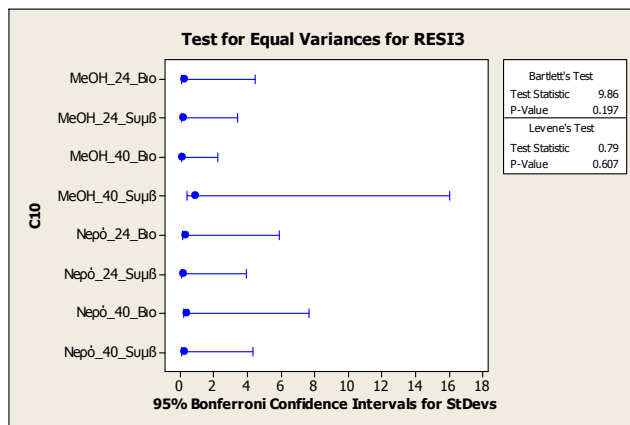
**$H_0$ : Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**$H_a$ : Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η  $H_0$ ) αφού  $P=0$ .



### Test for Equal Variances: RESI3 versus C10



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού  $P\text{-Value} = 0,197$  ( $P\text{-Value} > 0,05$ ).

## 1.5 FRAP χυμοί

### One-way ANOVA: C4 versus C5

C5            N    Mean    Grouping

χυμός φρέσκος\_Εμπορ.    3    92,4805    A

Εμπορικός                    3    91,0855    B

χυμός φρέσκος\_Βιο        3    85,6711    C

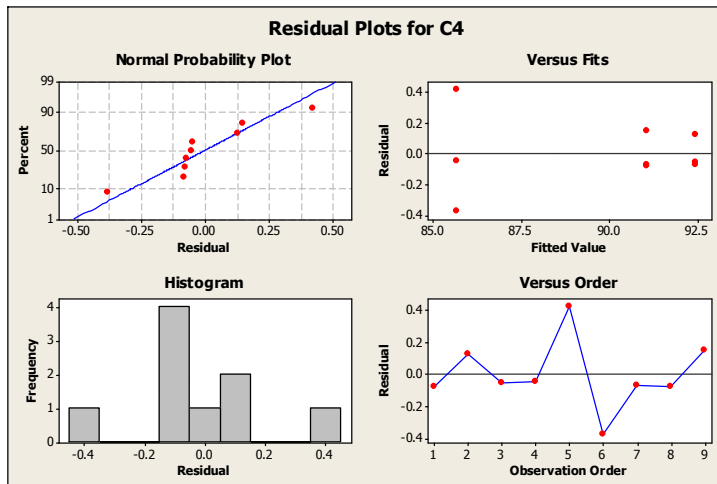
Means that do not share a letter are significantly different.

Ho: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

Ha: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Ha) αφού  $P=0$  και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα Και με αύξουσα κατάταξη όλοι οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους

Φρέσκος\_Βιο < Εμπορικός < Φρέσκος\_Εμπο



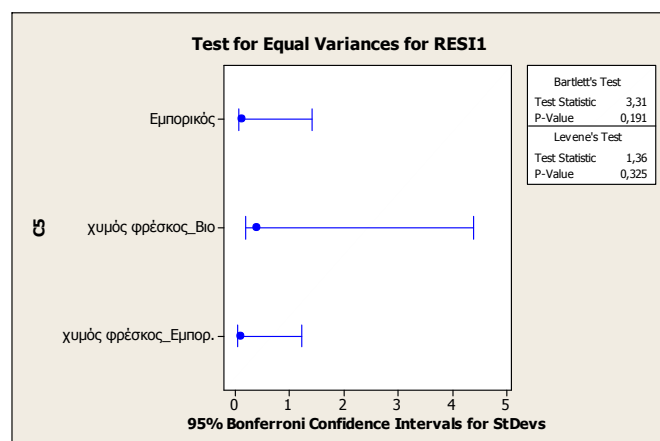
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0.100 (δηλαδή P-Value >0,05).

Test for Equal Variances: RESI1 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,191 ( P-Value >0,05).

## 1.6 FRAP φλούδες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6      N    Mean    Grouping

Φλούδες\_κρύες\_E    3    93,3787    A

Φλούδες\_βρ\_E      3    92,8544    B

Φλούδες\_Κρ\_Βιο    3    86,4813    C

Φλούδες\_βρ\_Βιο    3    84,7211    D

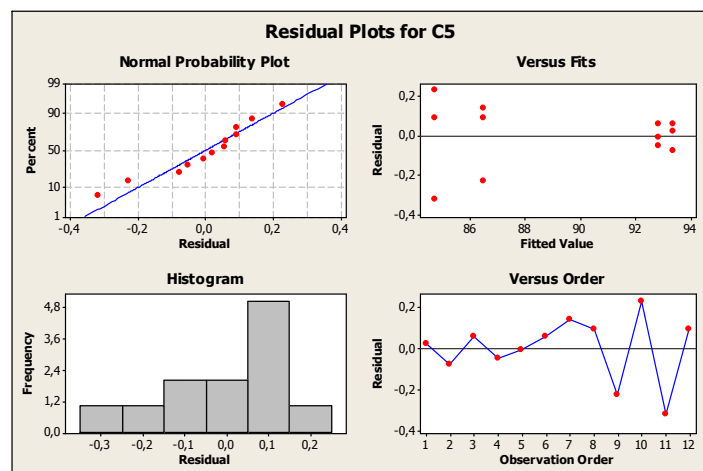
Means that do not share a letter are significantly different.

**Ho: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**Ha: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Ha) αφού  $P=0$  και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα και με αύξουσα κατάταξη όλοι οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους

**Φλούδες\_βρ\_Βιο < Φλούδες\_Κρ\_Βιο < Φλούδες\_βρ\_ΕΜΠ < Φλούδες\_Κρ\_ΕΜΠΟ**



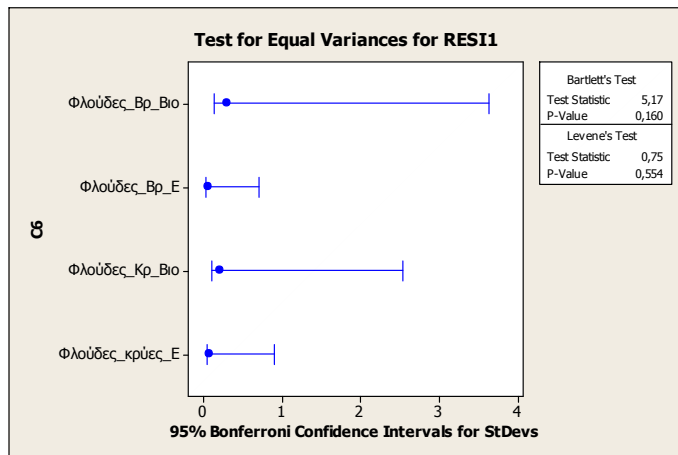
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

όπου και συμπερνούμε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0.100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RES1 versus C6



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 160 ( P-Value >0,05).

## 1.7 FRAP μέρη ροδιού

### One-way ANOVA: C4 versus C5

Φλούδα 6 89,930 A

Χυμός 6 89,076 A

Σπόρια 6 64,952 B

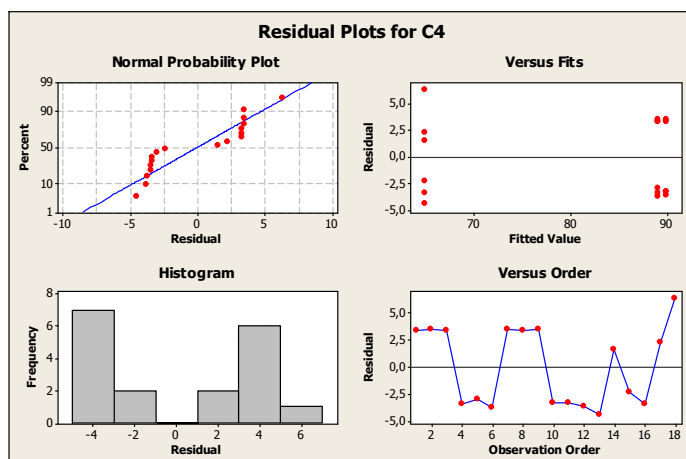
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>:** Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

**H<sub>a</sub>:** Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα με αύξουσα ταξινόμηση:

Σπόρια < Χυμός = φλούδες





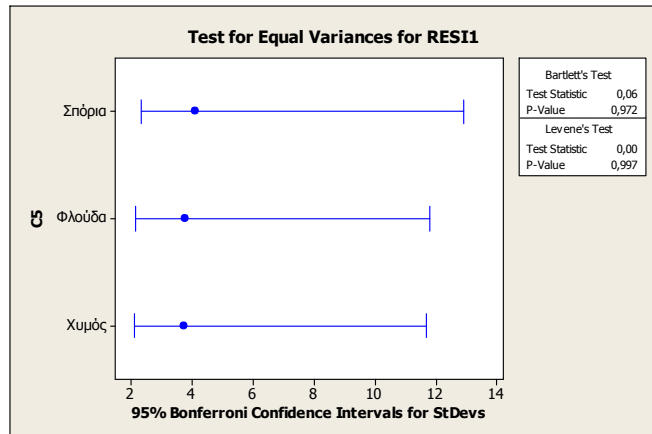
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η Ha άρα δηλαδή πως δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value < 0.010 (δηλαδή P-Value < 0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Levene που και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,997 ( P-Value > 0,05).

## 1.8 FRAP διαλύτες

### One-way ANOVA: C9 versus C10

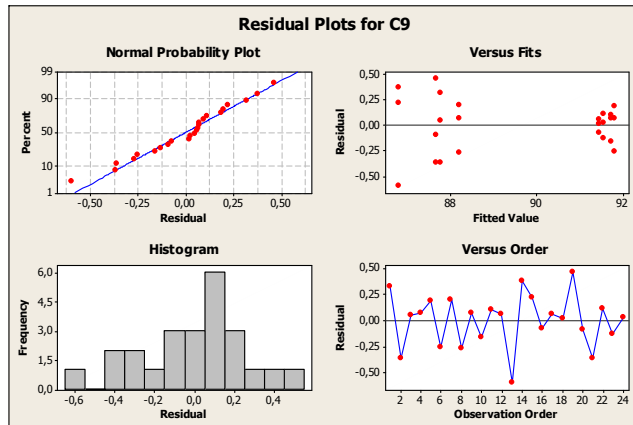
C10	N	Mean	Grouping
MeOH_24_Bio	3	91,8215	A
MeOH_40_Bio	3	91,7348	A
Νερό_40_Bio	3	91,5476	A
Νερό_24_Bio	3	91,4695	A
MeOH_40_Συμβ	3	88,2040	B
MeOH_24_Συμβ	3	87,7676	B
Νερό_40_Συμβ	3	87,6629	B
Νερό_24_Συμβ	3	86,7833	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Ho: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

Ha: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Ha) αφού  $P=0$



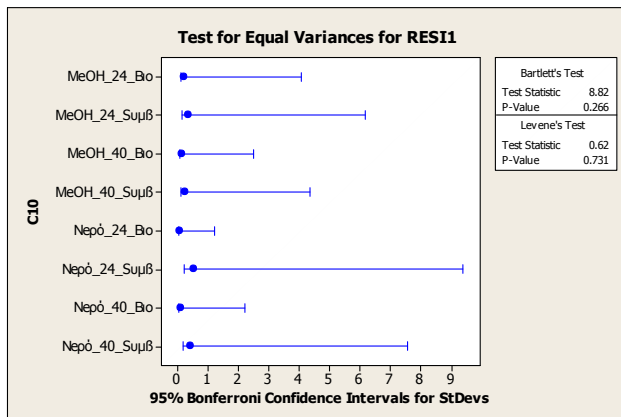
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value  $>0.100$  (δηλαδή  $P\text{-Value} >0,05$ ).

Test for Equal Variances: RESI1 versus C10



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού  $P\text{-Value} = 0,266$  ( $P\text{-Value} >0,05$ ).

## 1.9 Ολικές φαινόλες χυμπί

One-way ANOVA: C7 versus C5

C5            N    Mean   Grouping

Εμπορικός            3   0,041236   A

χυμός φρέσκος\_Εμπορ.   3   0,019255   B

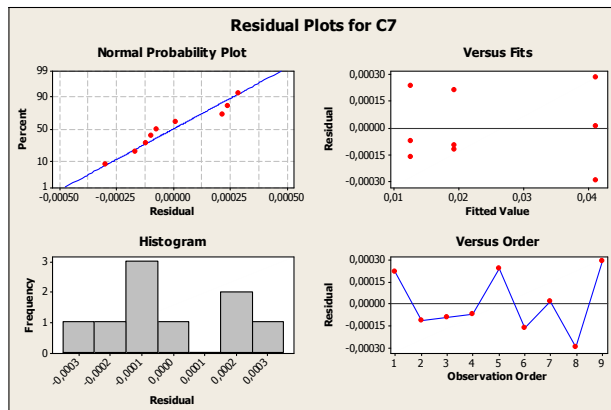
χυμός φρέσκος\_Βιο    3   0,012536   C

Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα ότι όλοι οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους



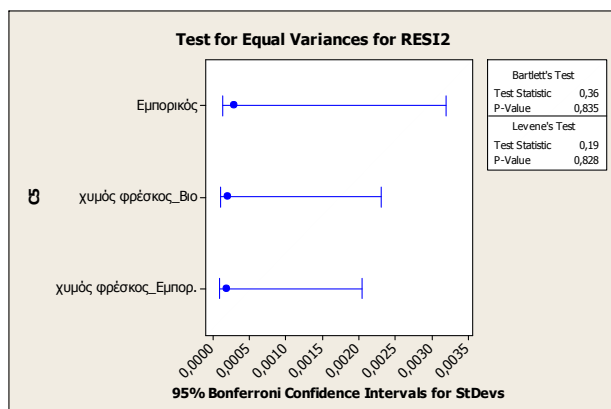
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**H<sub>a</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

όπου και συμπερνάμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0.100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI2 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,835 ( P-Value >0,05).

## 1.10 Ολικές φαινόμελες φλούδες

Η<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

Η<sub>α</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Η<sub>α</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα και με αύξουσα κατάταξη όλοι οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6      N    Mean    Grouping

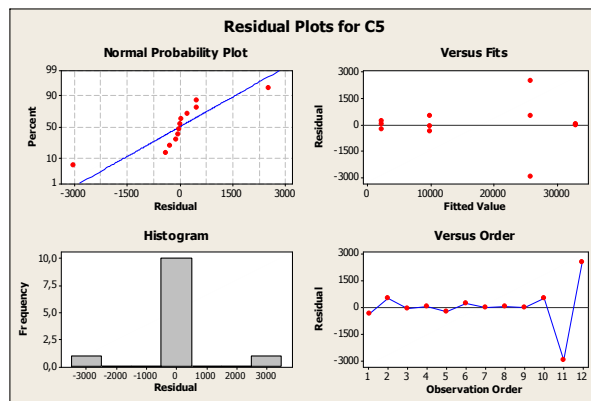
Φλούδες\_Κρ\_Βιο    3    32985    A

Φλούδες\_Βρ\_Βιο    3    25911    B

Φλούδες\_κρύες\_E    3    9822    C

Φλούδες\_Βρ\_E    3    2172    D

Means that do not share a letter are significantly different.



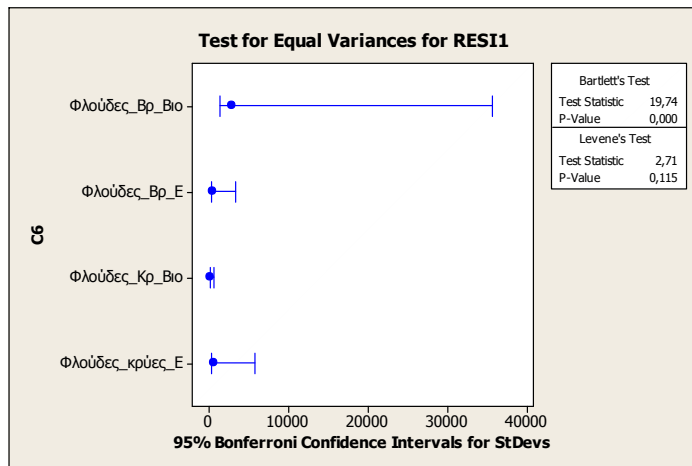
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Η<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Η<sub>α</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπεραίνουμε ότι ισχύει η Η<sub>α</sub> άρα δηλαδή πως δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value <0.010 (δηλαδή P-Value <0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C6



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Levene που και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,115 ( P-Value >0,05).

## 1.11 Ολικές φαινόλες μέρη ροδιού

### Kruskal-Wallis Test: C4 versus C5

Kruskal-Wallis Test on C4

C5	N	Median	Ave Rank	Z
Σπόρια	6	74,67	3,5	-3,37
Φλούδα	6	21633,33	15,5	3,37
Χυμός	6	4429,44	9,5	0,00
Overall	18		9,5	

H = 15,16 DF = 2 P = 0,001

Η τιμή P του ελέγχου είναι  $P < 0.05$  αφού  $P = 0.001$  επομένως ισχύει η  $H_0$  υπόθεση, δηλαδή οι τιμές των διαμέσων δεν είναι όλες ίσες μεταξύ τους.

Συγκεκριμένα με αύξουσα κατάταξη:

Σπόρια < Χυμός < Φλούδες

Οι διάμεσοι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά όλες μεταξύ τους.

## 1.12 Ολικές φαινόλες διαλύτες

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

C10	N	Mean	Grouping
-----	---	------	----------

MeOH\_40\_Συμβ 3 46767 A

MeOH\_40\_Bιο 3 34430 B

Νερό\_40\_Συμβ 3 31948 B C

MeOH\_24\_Bιο 3 27230 C D

MeOH\_24\_Συμβ 3 23667 D

Νερό\_40\_Bιο 3 23319 D

Νερό\_24\_Bιο 3 16252 E

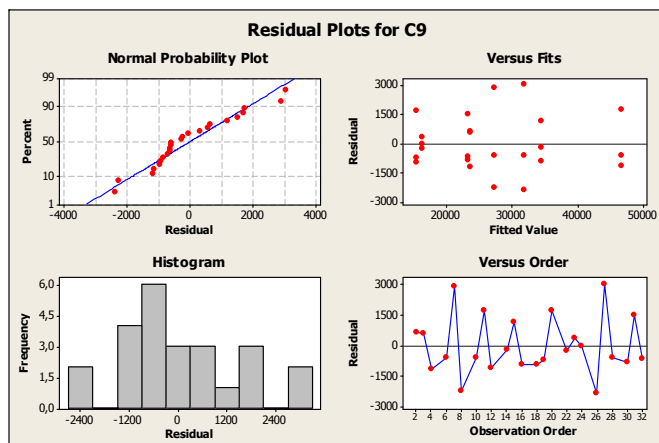
Νερό\_24\_Συμβ 3 15356 E

Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0



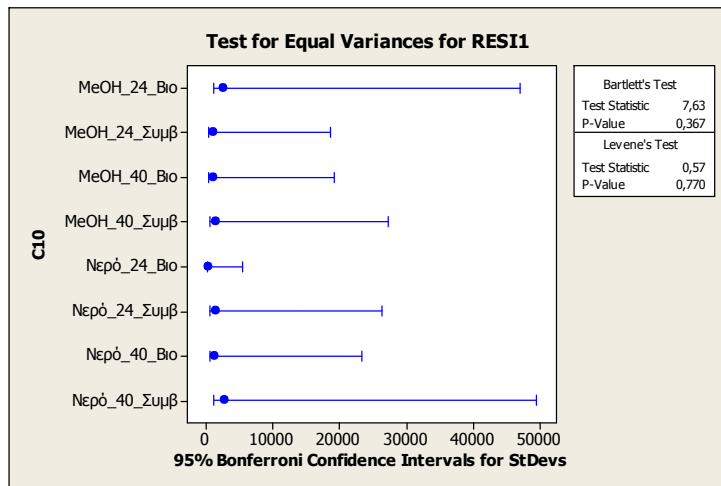
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**H<sub>a</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0.100 (δηλαδή P-Value >0,05).

**Test for Equal Variances: RESI1 versus C10**



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,367 ( P-Value >0,05).

## 1.13 Ολικά φλαβονοειδή χυμοί

### One-way ANOVA: C4 versus C5

C5      N    Mean    Grouping

Bio      3    4771,9    A

Conventional 3    1440,6    B

emporikos    3    679,4    C

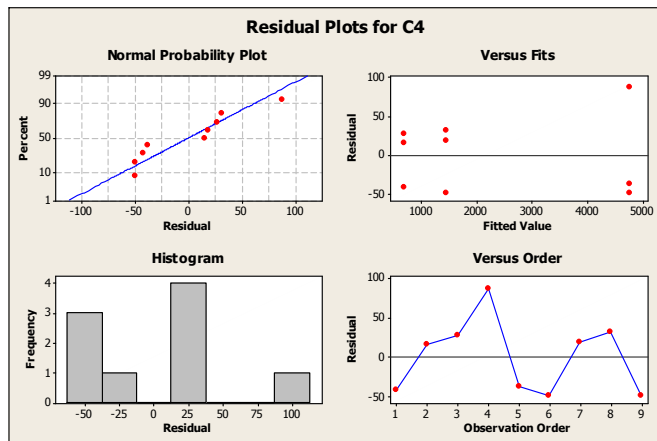
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα διαφέρουν όλα μεταξύ τους

Bio > Convn > Emporikos



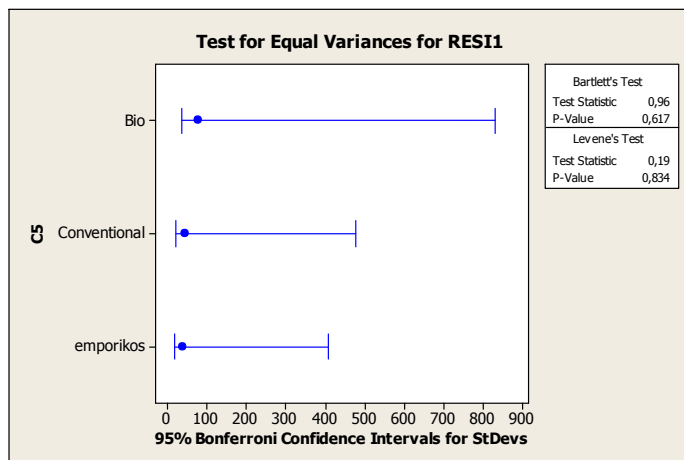
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

H<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

H<sub>a</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,617 ( P-Value >0,05).

## 1.14 Ολικά φλαβονοειδή φλούδες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6 N Mean Grouping

fl\_vr\_Bio 3 11386,5 A



fl\_kries\_Bio 3 6582,3 B

fl\_kries\_Conv 3 5938,5 B

fl\_vr\_Conv 3 2626,0 C

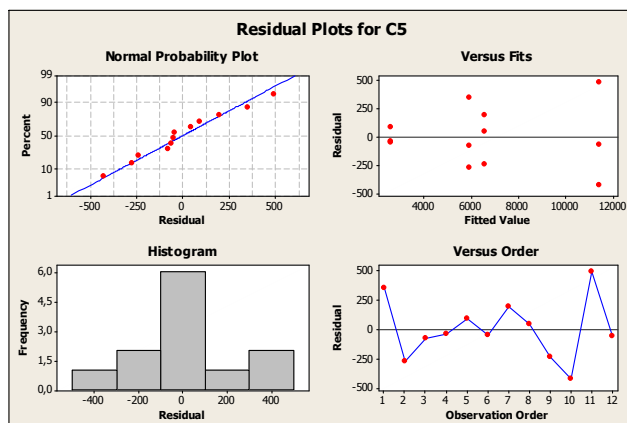
Means that do not share a letter are significantly different.

**Ho: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**Ha: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Ha) αφού  $P=0$  και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα με φθίνουσα ταξινόμηση:

φλου\_βρασ\_Βιο > φλου\_κρυ\_Βιο = φλου\_κρυ\_Εμπο > φλου\_βρασ\_Εμπο



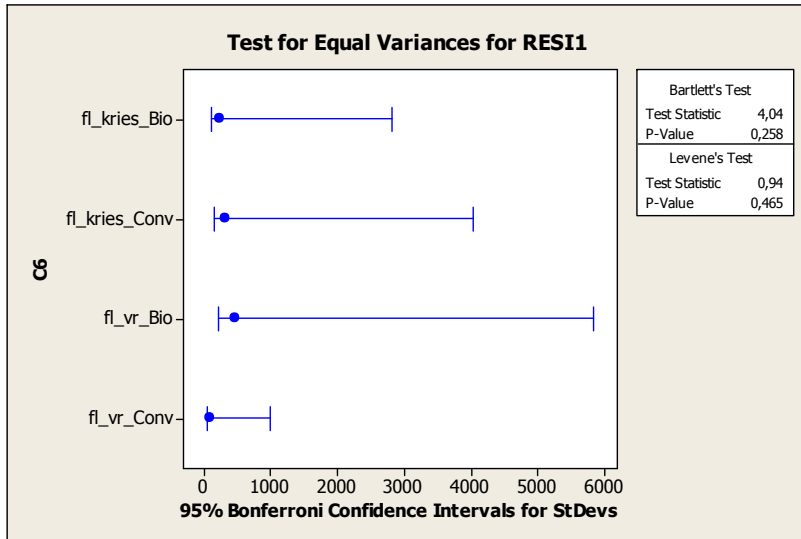
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

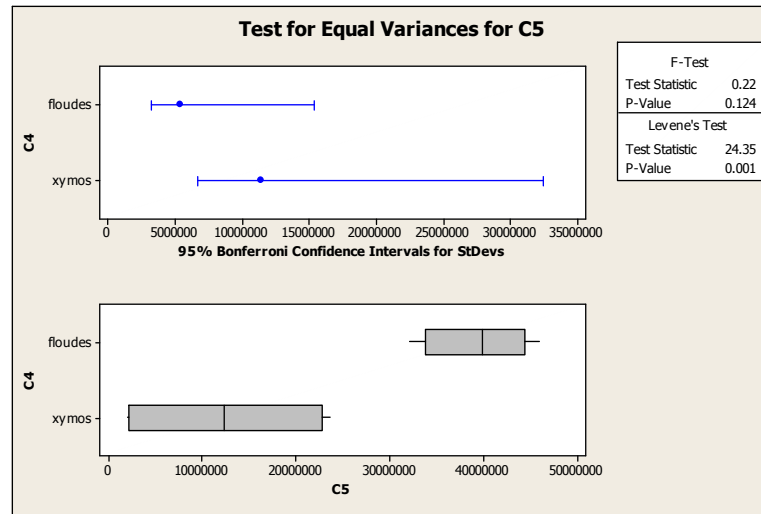
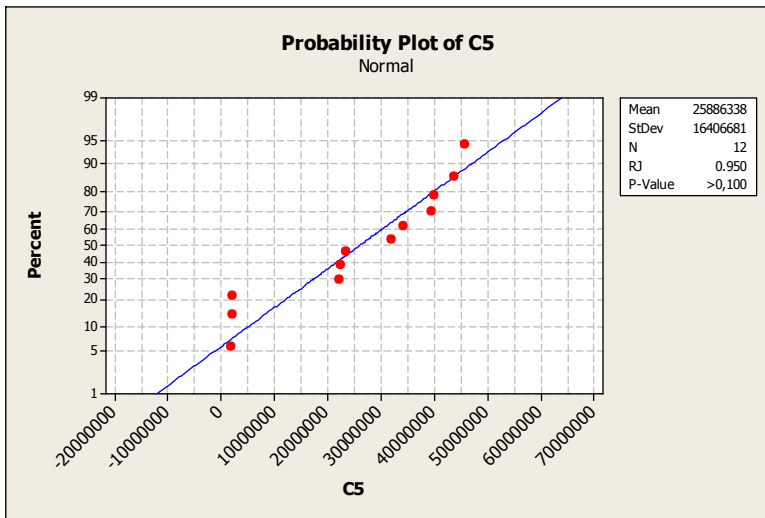
όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0.100 (δηλαδή P-Value >0,05).

**Test for Equal Variances: RESI1 versus C6**



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,258 ( P-Value >0,05).

### 1.15 Ολικά φλαβονοειδή μέρη



### Two-Sample T-Test and CI: C5; C4

Two-sample T for C5

C4	N	Mean	StDev	SE Mean
----	---	------	-------	---------

floudes	6	39347015	5347715	2183196
---------	---	----------	---------	---------

xyμος	6	12425661	11346389	4632144
-------	---	----------	----------	---------

Difference = mu (floudes) - mu (xyμος)

Estimate for difference: 26921354

95% CI for difference: (15511390; 38331318)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 5,26 P-Value = 0,000 DF = 10

Both use Pooled StDev = 8869571,6175

**Οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. και πιο συγκεκριμένα φλουδες> χυμος**

## 1.16 Ολικά φλαβονοειδή διαλύτες

### One-way ANOVA: C9 versus C10

C10 N Mean Grouping

MeoH\_40\_Bio 3 24453 A

MeoH\_24\_Bio 3 24048 A

MeoH\_40\_conv 3 14151 B

MeOH\_24\_conv 3 9234 C

Nero\_24\_Bio 3 8495 C

Nero\_24\_conv 3 7922 C

NEro\_40\_Bio 3 4418 D

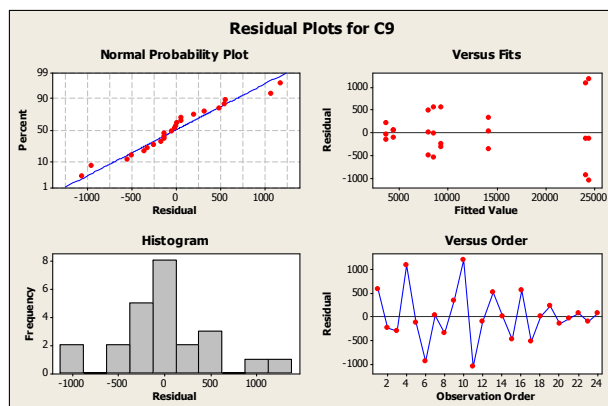
Nero\_40\_conv 3 3589 D

Means that do not share a letter are significantly different.

**Ho: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**Ha: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

**Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η Ha) αφού P=0**



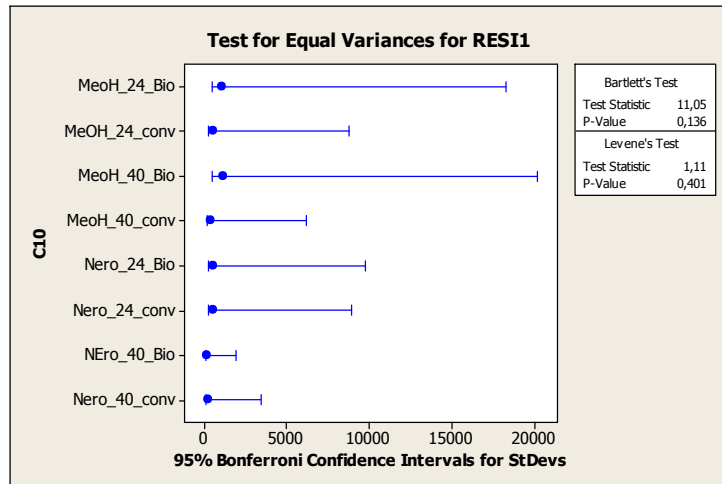
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>:** Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

**H<sub>α</sub>:** Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C10



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,136 ( P-Value >0,05).

## 1.17 Υδρολυμένες ταννίνες χυμοί

### One-way ANOVA: C7 versus C5

C5 N Mean Grouping

Bio 3 7,4019 A

conventional 3 6,5255 B

emporikos 3 5,3237 C

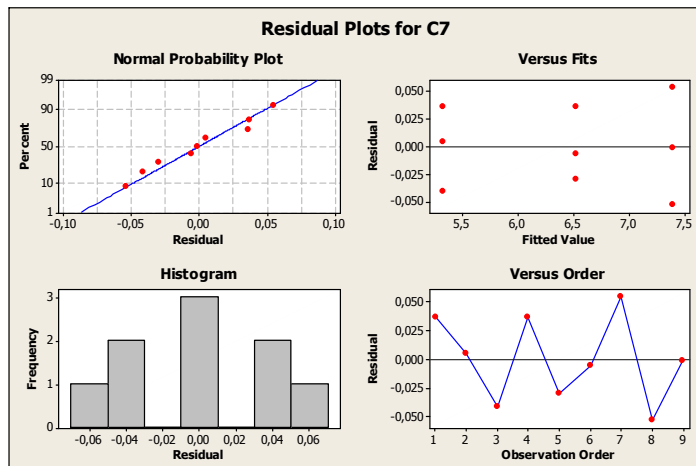
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>:** Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

**H<sub>α</sub>:** Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>α</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα διαφέρουν όλα μεταξύ τους

Bio > Conv > Emporikos



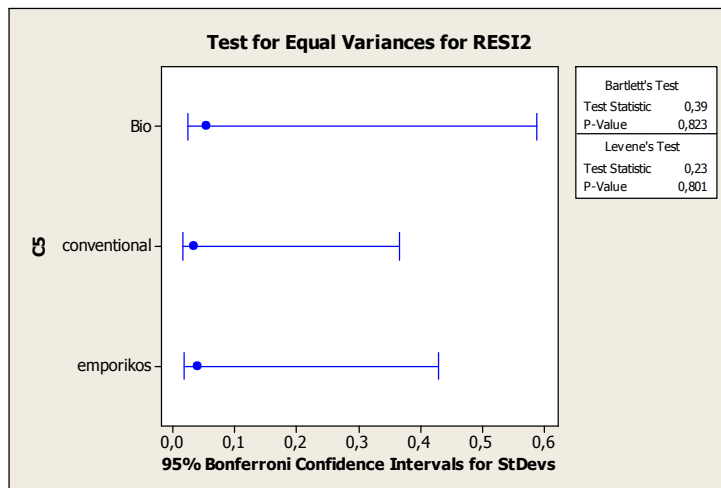
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερνόμαστε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI2 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,823 ( P-Value >0,05).

## 1.18 Υδρολυμένες ταννίνες φλούδες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6 N Mean Grouping

flou\_kries\_Bio 3 5261,3 A

flou\_vras\_Bio 3 3759,6 B

flou\_kries\_conv 3 2386,2 C

flou\_vras\_conv 3 1197,7 D

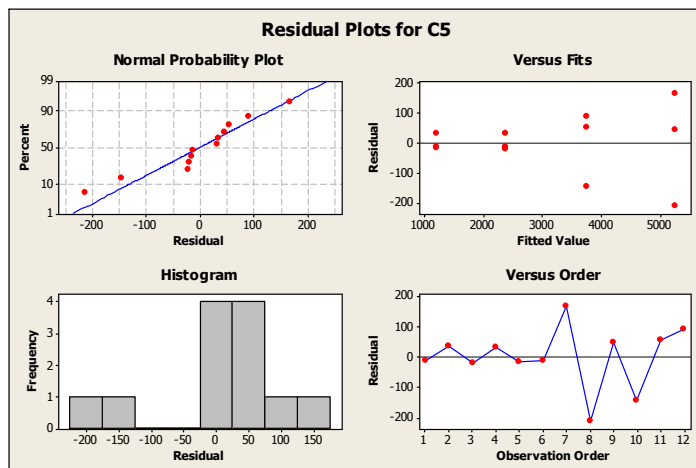
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα διαφέρουν όλα μεταξύ τους

φλου\_κρυ\_Bio > φλου\_βρ\_Bio > φλου\_κρ\_Εμπο > φλου\_βρ\_Εμπορι



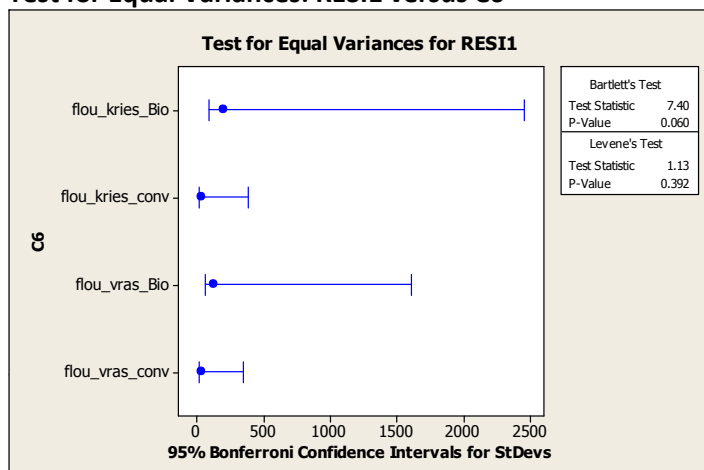
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**H<sub>a</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

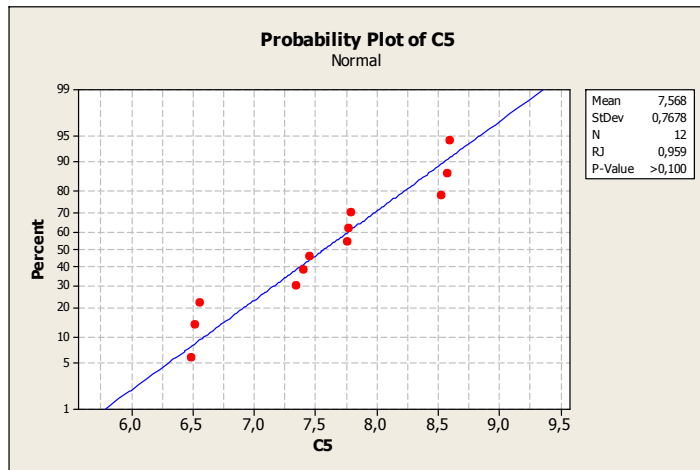
όπου και συμπερνούμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value > 0,100 (δηλαδή P-Value > 0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C6

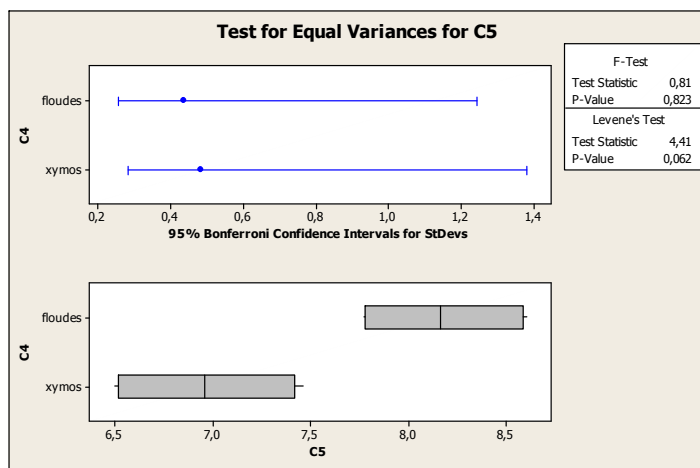


Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,06 ( P-Value >0,05).

## 1.19 Υδρολυμένες ταννίνες μέρη ροδιού



### Test for Equal Variances: C5 versus C4



### Two-Sample T-Test and CI: C5; C4

Two-sample T for C5

C4	N	Mean	StDev	SE Mean
----	---	------	-------	---------

floudes	6	8,173	0,434	0,18
---------	---	-------	-------	------

xymos	6	6,964	0,482	0,20
-------	---	-------	-------	------

Difference = mu (floudes) - mu (xymos)

Estimate for difference: 1,209

95% CI for difference: (0,619; 1,798)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 4,57 P-Value = 0,001 DF = 10

Both use Pooled StDev = 0,4583

Οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους αφού  $P < 0,05$  και πιο συγκεκριμένα φλούδες > χυμός

## 1.20 HPLC χυμοί

### One-way ANOVA: C7 versus C5

C5      N    Mean    Grouping

freskos bio      3    16,9975    A

freskos empirikos    3    15,4818    B

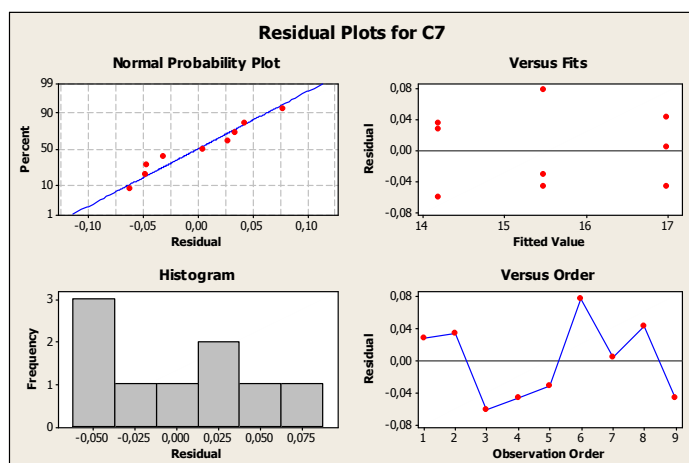
empirikos      3    14,1882    C

Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>:** Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

**H<sub>a</sub>:** Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού  $P = 0$  και συγκεκριμένα διαφέρουν όλοι μεταξύ τους



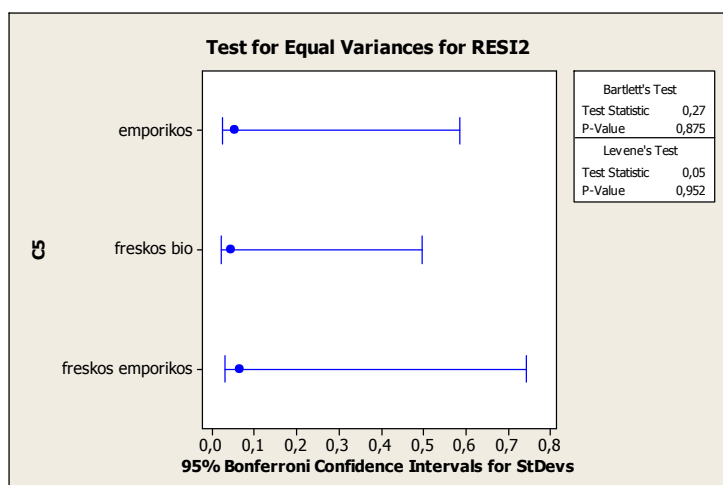
**H<sub>0</sub>:** Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

**H<sub>a</sub>:** Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

όπου και συμπερνούμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value > 0,100 (δηλαδή P-Value > 0,05).



## Test for Equal Variances: RESI2 versus C5



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,875 ( P-Value >0,05).

## 1.21 HPLC φλούδες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6	N	Mean	Grouping
floudes kries bio	3	417,19	A
floudes vrasmenes bio	3	192,23	B
floudes kries emporikes	3	135,22	C
floudes vrasmenes emporikes	3	23,34	D

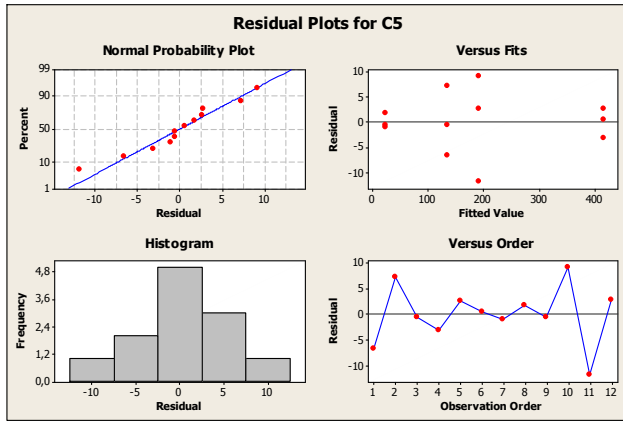
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>:** Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι

**H<sub>a</sub>:** Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και συγκεκριμένα διαφέρουν όλοι μεταξύ τους και με φθίνουσα διαταξη:

φλου\_κρ\_Βιο > φλου\_Βρασ\_Βιο > φλου\_κρ\_Εμπο > φλου\_Βρασ\_Εμπο



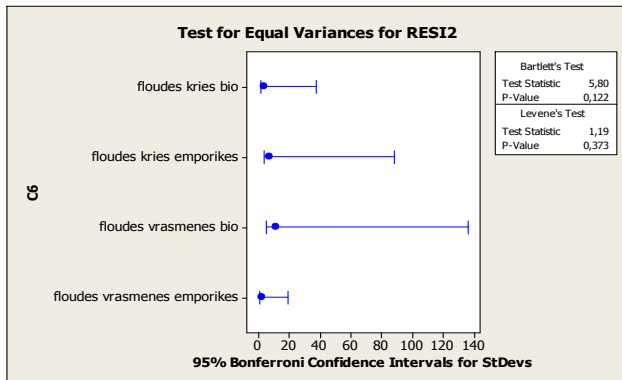
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

Ho: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή

Ha: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή

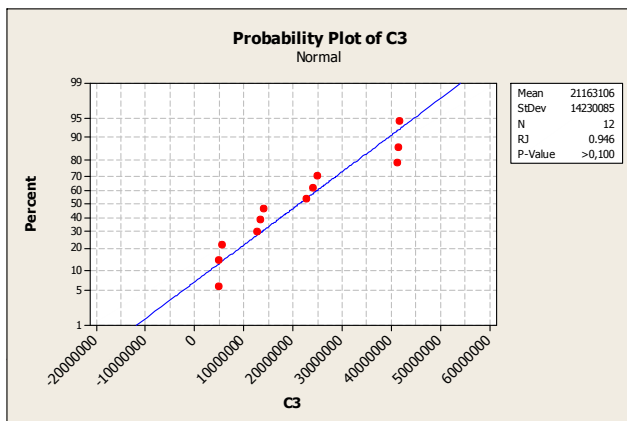
όπου και συμπερνούμε ότι ισχύει η Ho άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI2 versus C6



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,122 ( P-Value >0,05).

## 1.22 HPLC μέρη ροδιού



## Test for Equal Variances: C3 versus C4

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

C4	N	Lower	StDev	Upper
----	---	-------	-------	-------

floudes	6	9059588	15451233	44205126
---------	---	---------	----------	----------

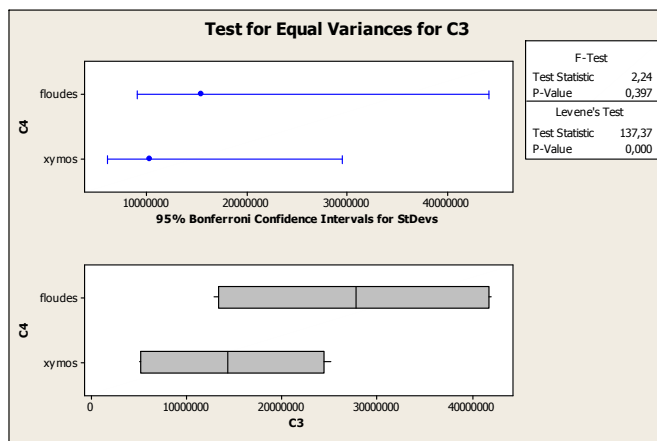
xymos	6	6055983	10328550	29549411
-------	---	---------	----------	----------

F-Test (Normal Distribution)

Test statistic = 2,24; p-value = 0,397

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 137,37; p-value = 0,000



## Two-Sample T-Test and CI: C3; C4

Two-sample T for C3

C4	N	Mean	StDev	SE Mean
----	---	------	-------	---------

floudes	6	27620342	15451233	6307940
---------	---	----------	----------	---------

xymos	6	14705871	10328550	4216613
-------	---	----------	----------	---------

Difference =  $\mu$  (floudes) -  $\mu$  (xymos)

Estimate for difference: 12914471

95% CI for difference: (-3991499; 29820440)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 1,70 P-Value = 0,120 DF = 10

Both use Pooled StDev = 13141909,0855

**Οι τιμές των μέσων όρων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά αφού  $P > 0,05$ . Δηλαδή οι φλούδες και ο χυμός δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά**

## 1.23 HPLC διαλύτες

### One-way ANOVA: C5 versus C6

C6      N    Mean    Grouping

MeOH\_40\_conv 3 385.98 A

MeOH\_40\_Bio 3 325.74 B

Nero\_40\_Bio 3 194.48 C

Nero\_40\_conv 3 115.23 D

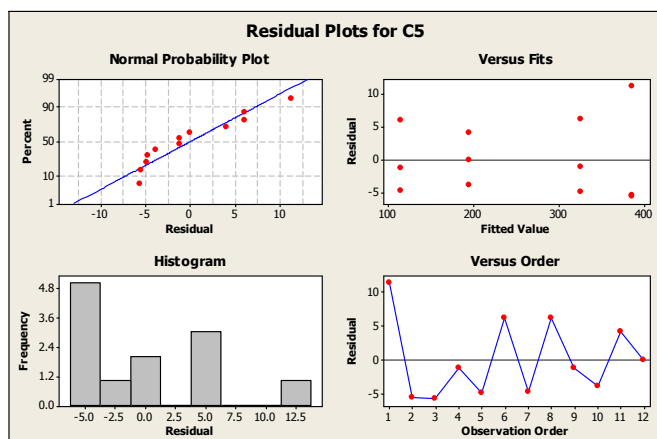
Means that do not share a letter are significantly different.

**H<sub>0</sub>: Οι μέσοι όροι είναι όλοι ίσοι**

**H<sub>a</sub>: Οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι**

Με τον έλεγχο ANOVA προκύπτει πως οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (ισχύει δηλαδή η H<sub>a</sub>) αφού P=0 και με την εφαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων μέσω των όρων Tukey βλέπουμε συγκεκριμένα με φθίνουσα διάταξη:

MeOH\_40\_conv > MeOH\_40\_Bio > Nero\_40\_Bio > Nero\_40\_conv



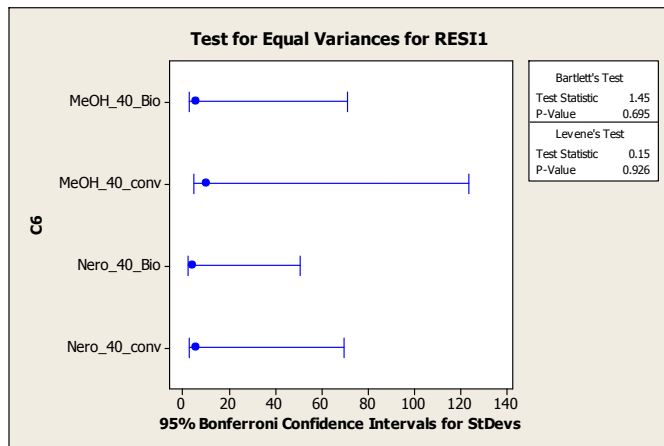
Έλεγχος κανονικότητας των υπολειμμάτων ακολούθησε με :

**H<sub>0</sub>: Τα υπολείμματα ακολουθούν την κανονική κατανομή**

**H<sub>a</sub>: Τα υπολείμματα δεν μπορούμε να πούμε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή**

όπου και συμπερένουμε ότι ισχύει η H<sub>0</sub> άρα δηλαδή πως ακολουθούν την κανονική κατανομή αφού η P-Value >0,100 (δηλαδή P-Value >0,05).

### Test for Equal Variances: RESI1 versus C6



Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων ακολούθησε και αφού τα υπολείμματα ακολούθησαν την κανονική κατανομή συμβουλευόμαστε τον έλεγχο Bartlett όπου και μας πληροφορεί ότι το δείγμα έχει ίσες διακυμάνσεις αφού P-Value = 0,695 ( P-Value >0,05).