



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΙΓΑΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Επίδραση θερμοκρασίας στην αντιοξειδωτική δράση του
ασπρομύτικου φασολιού Λήμνου»*



Φοιτητής:

Αραμπατζής Αντώνιος
(6612015005)

Επιβλέπων Καθηγητής:

Καραντώνης Χαράλαμπος
Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Καραντώνης Χαράλαμπος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Κουτελιδάκης Αντώνιος
Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος
Πέτσας Ανδρέας
Ε.Τ.Ε.Π., Μέλος

Ευχαριστίες

Η Πτυχιακή Μελέτη που ακολουθεί πραγματοποιήθηκε κάτω από την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας Τροφίμων κύριο Χαράλαμπο Καραντώνη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της Πτυχιακής μου Μελέτης καθώς και την απεριόριστη υποστήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε συνεχώς έως το πέρας της μελέτης αυτής.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον κύριο Αντώνιο Κουτελιδάκη, Επίκουρο Καθηγητή, που μας τίμησε με την παρουσία και την συμμετοχή του στην Τριμελή Επιτροπή αξιολόγησης της Πτυχιακής μου Μελέτης μαζί με τον κύριο Ανδρέα Πέτσα, μέλος του Ειδικού Τεχνικού Εργαστηριακού Προσωπικού (Ε.Τ.Ε.Π.), ο οποίος επιπλέον προσέφερε και εκείνος τις δικές του γνώσεις και εμπειρίες καθώς και αμέριστη βοήθεια στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου καθώς και τα αγαπημένα μου πρόσωπα που μου στάθηκαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	7
Εισαγωγή	8
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
Κεφάλαιο 1: Μεσογειακή διατροφή και αντιοξειδωτικά	9
Κεφάλαιο 2: Μαυρομάτικο φασόλι (<i>Vigna unguiculata</i>)	9
Κεφάλαιο 3: Αντιοξειδωτικά	10
3.1 Γενικές πληροφορίες	10
3.2 Φαινολικές ενώσεις	11
3.2.1 Γενικές πληροφορίες	11
3.2.2 Φαινολικά οξέα	11
3.2.3 Κουμαρίνες	12
3.2.4 Λιγνάνες	13
3.2.5 Στιλβένια	15
3.2.6 Τανίνες	15
3.2.6.1 Γενικές Πληροφορίες	15
3.2.6.2 Υδρολύμενες και Συμπυκνωμένες τανίνες	16
3.2.7 Φλαβονοειδή	16
3.2.7.1 Γενικές πληροφορίες	16
3.2.7.2 Φλαβόνες	17
3.2.7.3 Φλαβανόνες	18
3.2.7.4 Φλαβονόλες	18
3.2.7.5 Φλαβανόλες	19
3.2.7.6 Ανθοκυανίνες	20
3.2.7.7 Ισοφλαβόνες	20
Κεφάλαιο 4: Αντιοξειδωτική δράση <i>Vigna unguiculata</i>	21
4.1 Γενικές πληροφορίες	21
4.2 Φαινολικά οξέα στην ποικιλία <i>Vigna unguiculata</i>	22
4.3 Φλαβονόλες στην ποικιλία <i>Vigna unguiculata</i>	24
4.4 Ανθοκυανίνες στην ποικιλία <i>Vigna unguiculata</i>	25
Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	26

5.1 Μέθοδος ABTS.....	26
5.2 Μέθοδος DPPH.....	27
5.3 Μέθοδος ORAC.....	27
5.4 Μέθοδος PCL.....	28
5.5 Μέθοδος FRAP.....	28
5.6 Μέθοδος CUPRAC.....	28
5.7 Μέθοδος β-καροτένιου-λινελαϊκού οξέος.....	29
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογίες.....	30
6.1 Προετοιμασία δειγμάτων- Βρασμός.....	30
6.2 Αποξήρανση- Άλεσμα.....	32
6.3 Εκχύλιση- Φυγοκέντρηση.....	32
6.4 Μέθοδος ABTS.....	33
Κεφάλαιο 7: Δημιουργία διαλύματος ABTS.....	35
Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα Πειραμάτων.....	39
8.1 Μέθοδος ABTS.....	39
8.2 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Δειγμάτων.....	40
8.3 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης ABTS Βρασμένων Δειγμάτων.....	43
Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και Συζήτηση.....	46
Κεφάλαιο 10: Βιβλιογραφία.....	48

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

I. ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Βασική δομή φαινολικών ενώσεων.....	11
Εικόνα 2: Γενική δομή φαινολικών οξέων.....	12
Εικόνα 3: Δομές των σημαντικότερων φαινολικών οξέων.....	12
Εικόνα 4: Γενική δομή κουμαρινών.....	13
Εικόνα 5: Σημαντικότερες λιγνάνες.....	14
Εικόνα 6: Στιλβένια, χημική δομή ρεσβερατρόλης.....	15
Εικόνα 7: Βασική δομή τανινών.....	16
Εικόνα 8: Γενική δομή Φλαβονοειδών.....	17
Εικόνα 9: Γενική δομή φλαβονών.....	18
Εικόνα 10: Γενική δομή φλαβανονών.....	18
Εικόνα 11: Γενική δομή φλαβονολών.....	19
Εικόνα 12: Γενική δομή φλαβανολών ή κατεχινών.....	19
Εικόνα 13: Γενική δομή ανθοκυανινών.....	20
Εικόνα 14: Γενική δομή	

ισοφλαβονών.....	21
Εικόνα 15: Δομή κύριων φαινολικών οξέων του <i>Vigna unguiculata</i>	22
Εικόνα 16: Προϊόντα υδρόλυσης φαινολικών οξέων του <i>Vigna unguiculata</i>	23
Εικόνα 17: Λοιπά φαινολικά οξέα στο <i>Vigna unguiculata</i>	23
Εικόνα 18: Φλαβονόλες στο <i>Vigna unguiculata</i>	24
Εικόνα 19: Ανθοκυανίνες στο <i>Vigna unguiculata</i>	25
Εικόνα 20: Δομή αντιδραστηρίου ABTS.....	35
Εικόνα 21: Σχηματισμός σταθερών ριζών ABTS από ABTS με υπερθειϊκό κάλιο ($K_2S_2O_8$)...36	

II. ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Τροlox.....	%	Απορρόφηση	nmol
			39
Πίνακας 2: Ισοδύναμη αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας <i>vigna unguiculata</i>			40
Πίνακας 3: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας <i>vigna unguiculata</i> μετά από βρασμό.....			41
Πίνακας 4: Ισοδύναμη αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας <i>vigna unguiculata</i> μετά από βρασμό.....			43

Πίνακας 5: Μέσος Όρος και Τυπική Απόκλιση nmol Trolox/ mg αρχικού βρασμένου δείγματος.....44

III. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας ABTS.....38

Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox ABTS.....39

Διάγραμμα 3: Ισοδύναμη Αντιοξειδωτική Δράση ως Trolox ωμών δειγμάτων φασολιών...41

Διάγραμμα 4: Αντιοξειδωτική Δράση ABTS ωμών δειγμάτων φασολιών.....42

Διάγραμμα 5: : Ισοδύναμη Αντιοξειδωτική Δράση ως Trolox βρασμένων δειγμάτων φασολιών.....44

Διάγραμμα 6: : Αντιοξειδωτική Δράση ABTS βρασμένων δειγμάτων φασολιών.....45

Διάγραμμα 7: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας *vigna unguiculata* μετά από βρασμό.....46

Περίληψη

Στην Μεσογειακή Διατροφή συγκαταλέγονται τροφές οι οποίες προσφέρουν πολλά θρεπτικά συστατικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Τέτοιες τροφές που

καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα της Μεσογειακής Διατροφής, είναι τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Σε αυτά ανήκει και το μαυρομάτικο φασόλι (*Vigna unguiculata*) το οποίο διαθέτει μεγάλο φορτίο φαινολικών ενώσεων αλλά και άλλων βιοδραστικών ουσιών. Οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστές ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Αποτελούνται από διάφορες κατηγορίες και υποκατηγορίες, ανάλογα την δομή τους και την δράση τους. Αρκετές από αυτές τις κατηγορίες φαινολικών ενώσεων περιέχονται στο *Vigna unguiculata* και του προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση.

Στην μελέτη αυτή, μελετήθηκε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης 12 ελληνικών ποικιλιών του *Vigna unguiculata* συμπεριλαμβανομένου και ποικιλίες ασπρομούτικου φασολιού από την Λήμνο. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με βάση την μέθοδο ABTS, όπου τα δείγματα μελετήθηκαν πριν και μετά το βρασμό. Τα αποτελέσματα δείξαν αντιοξειδωτική δράση τόσο πριν όσο και μετά το βρασμό με την αντιοξειδωτική δράση μετά το βρασμό να σημειώνει αύξηση. Οι Λημνιές ποικιλίες έδειξαν να εμφανίζουν και αυτές σημαντική αντιοξειδωτική δράση πριν το βρασμό με σημαντική αύξηση μετά το βρασμό.

Λέξεις κλειδιά: Μαυρομάτικο φασόλι (*Vigna unguiculata*), φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση, ασπρομούτικο φασόλι Λήμνου, μέθοδος ABTS.

Abstract

Mediterranean Diet include foods that offer a lot of nutrients to human body. Foods which cover a big spectrum of Mediterranean Diet, are foods of plant origin. One of these foods is the cowpea (*Vigna unguiculata*) which contains significant amount of phenolic compounds and other bioactive substances. Phenolic compounds are known for their antioxidant activity. They are consisted of different categories and subcategories, depending on their structure and their activity. Several of these categories of phenolic compounds exist in *Vigna unguiculata* and offer significant antioxidant activity.

In this study, the antioxidant activity of extracts form 12 Greek varieties of *Vigna unguiculata* including varieties of white-eyed beans from Lemnos were studied by the ABTS assay before and after cooking by boiling. The results showed significant antioxidant activity in all samples both before and after boiling with an increase of antioxidant activity on cowpea samples after boiling.

Keywords: cowpea (*Vigna unguiculata*), phenolic compounds, antioxidant activity, white-eyed beans of Lemnos, ABTS assay.

Εισαγωγή

Η συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζει την επίδραση της θερμοκρασίας στην αντιοξειδωτική δράση των φασολιών της Λήμνου. Αρχικά στο θεωρητικό κομμάτι της μελέτης αυτής αναφέρονται κάποια στοιχεία που αφορούν την σχέση των αντιοξειδωτικών με τη Μεσογειακή Διατροφή. Στην συνέχεια αναφέρονται γενικές πληροφορίες για τα αντιοξειδωτικά καθώς και βασικές πληροφορίες για την κάθε κατηγορία αυτών. Έπειτα παρουσιάζονται κάποιες γενικές πληροφορίες για το είδος του φασολιού *Vigna unguiculata* καθώς και την ποικιλία αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στο είδος αυτό. Τέλος αναφέρονται και αναλύονται διάφορες εργαστηριακές δοκιμές προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα *Vigna unguiculata*.

Στο πειραματικό κομμάτι παρουσιάζονται αναλυτικά τα πρωτόκολλα της μελέτης αυτής καθώς και η πειραματική διαδικασία που διεξάχθηκε μέσα στο εργαστήριο κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού εξαμήνου. Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης και ακολουθεί σχολιασμός και συζήτηση των αποτελεσμάτων αυτών.

Σκοπός την πτυχιακής μελέτης είναι να εξετάσει την επίδραση της θερμοκρασίας στην αντιοξειδωτική δράση των ασπρομύτικων φασολιών της Λήμνου του είδους *Vigna unguiculata* σε σύγκριση με άλλες εγχώριες ποικιλίες φασολιών του ίδιου είδους.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Μεσογειακή διατροφή και αντιοξειδωτικά

Η Μεσογειακή διατροφή είναι ένας τρόπος ζωής των λαών των χωρών γύρω από την Μεσόγειο. Είναι μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, όσπρια, κρέας και ψάρια. Τα τρόφιμα αυτά είναι πλούσια με μακροθρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιποειδή καθώς και σε μικροθρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, πολυφαινόλες, φυτικές ίνες, πολυακόρεστα, λιπαρά οξέα και ιχνοστοιχεία (Silva et al.). Τα μικροθρεπτικά αυτά συστατικά παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην Μεσογειακή διατροφή διότι αποτελούν σημαντικά αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις και κάποια ιχνοστοιχεία όπως το σελήνιο (González et al.). Η ύπαρξη αυτών των αντιοξειδωτικών ουσιών σχετίζεται με την πρόληψη χρόνιων ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και διάφορων τύπων καρκίνου. ενώ παρουσιάζουν επίσης αντιγηραντικές ιδιότητες (González et al.; Haile et al.).

Κεφάλαιο 2: Μαυρομάτικο φασόλι (*Vigna unguiculata*)

Το μαυρομάτικο φασόλι (*Vigna unguiculata*) είναι ένα θρεπτικό όσπριο το οποίο μπορεί να καλλιεργηθεί σε πολλά σημεία του κόσμου, με μεγάλη εμφάνιση στην Ασία και στην Αφρική (Adebooye and Singh, Behura et al., Oyeyinka et al.). Ανήκει στην οικογένεια των *Fabaceae/Papilionaceae* αλλά γενικά αποτελεί κατηγορία συγκεκριμένης ποικιλίας μαυρομάτικων φασολιών, την *Unguiculata* (Jayathilake et al.). Είναι γνωστό πως τα όσπρια είναι πηγή ενέργειας και έχουν μεγάλη πρωτεϊνική αξία. Έτσι και τα μαυρομάτικα φασόλια αποτελούν μία πολύ καλή και φθηνή πηγή πρωτεϊνών και υδατανθράκων (Oyeyinka et al.; Jayathilake et al.). Πέραν τούτου, τα μαυρομάτικα φασόλια είναι σημαντική πηγή φυτικών ινών, σιδήρου (Fe), ψευδαργύρου (Zn) και περιέχουν απαραίτητες ποσότητες

βιοδραστικών ουσιών (Oyeyinka et al.). Αυτές οι ουσίες παίζουν σημαντικό διατροφικό ρόλο καθώς χαρακτηρίζουν το φασόλι υψηλής διατροφικής αξίας αλλά αποδίδουν χαμηλή ενέργεια. Αυτές οι ουσίες είναι διαλυτές και αδιάλυτες διαιτητικές ίνες, μεταλλικά στοιχεία, φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες κυρίως του συμπλέγματος της βιταμίνης Β αλλά και πολλές άλλες οι οποίες έχουν θεραπευτικές ιδιότητες που συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών. Αυτό οφείλεται κατά έναν μεγάλο βαθμό στην αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα μαυρομάτικα φασόλια εξαιτίας των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν (Jayathilake et al.).

Κεφάλαιο 3: Αντιοξειδωτικά

3.1 Γενικές πληροφορίες

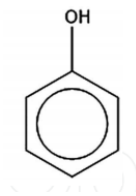
Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση των δραστικών μορφών του οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) και του αζώτου (Reactive Nitrogen Species) σε έναν οργανισμό (Brainina et al.) Οι οξειδώσεις οδηγούν στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οι οποίες είναι πολύ δραστικές και αυτές με την σειρά τους προκαλούν το οξειδωτικό στρες (Oxidative Stress) ή (OS) το οποίο είναι καταστρεπτικό για τον οργανισμό καθώς είναι αυτό που ευθύνεται για την εμφάνιση διαφόρων σοβαρών ασθενειών όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Brainina et al.; Neha et al.). Τα αντιοξειδωτικά δεσμεύουν τις ρίζες αυτές και τις ανάγουν στην μη-οξειδωμένη μορφή τους. Επίσης τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα την προέλευση τους, τη χημική τους σύσταση και την λειτουργικότητά τους. Χωρίζονται στα φυσικά και στα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε ενδογενή και εξωγενή. Τα ενδογενή ανάλογα την λειτουργία τους χωρίζονται σε ενζυμικά και σε μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι τα καροτονοειδή, οι βιταμίνες: Α, C, E, τα φυσικά

φλαβονοειδή και άλλες ουσίες. Στα συνθετικά αντιοξειδωτικά ανήκουν διάφορες ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την διατήρηση της διατροφικής αξίας, του αρώματος και του χρώματος στα διάφορα προϊόντα των τροφίμων (Neha et al.).

3.2 Φαινολικές ενώσεις

3.2.1 Γενικές πληροφορίες

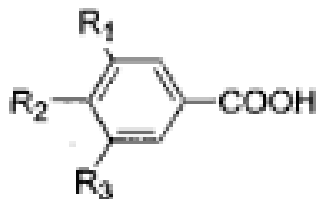
Οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση καθώς αποτελούν μία από τις κύριες κατηγορίες εξωγενών αντιοξειδωτικών και δευτερογενών μεταβολητών, με ένα μεγάλο εύρος δομών και λειτουργιών (Robards et al.). Πρόκειται για οργανικές ενώσεις που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα ή περισσότερα ιόντα υδροξυλίου (OH) (Robards et al.; Αικατερίνη Καραμανώλη). Ο σκελετός των φαινολικών ενώσεων αποτελείται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίου συνδεδεμένους με τα ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες είναι εν δυνάμει συνδεδεμένες με άλλους υποκαταστάτες (Αικατερίνη Καραμανώλη). Οι φαινόλες κατηγοριοποιούνται σε φλαβονοειδή και σε μη-φλαβονοειδή ("Plant Phenolics Hum. Heal.") (Αικατερίνη Καραμανώλη).



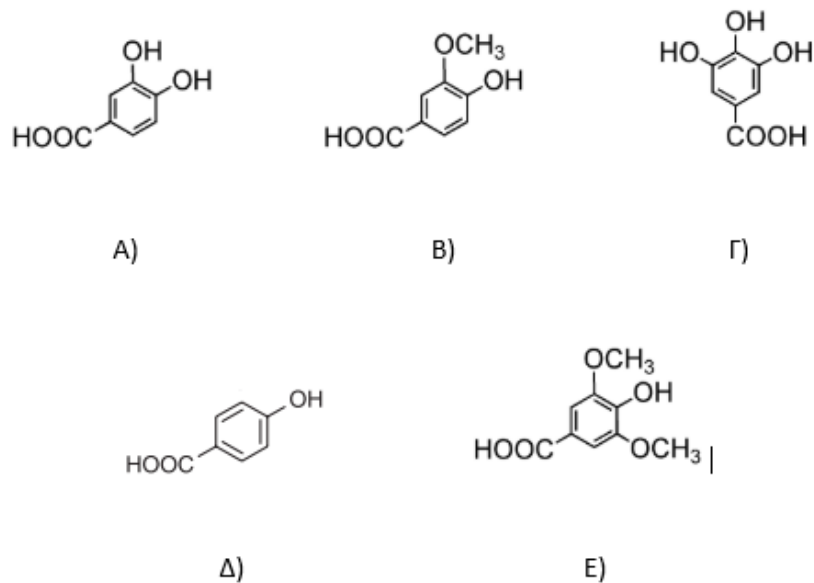
Εικόνα 1: Βασική δομή φαινολικών ενώσεων (Adilođlu et al.)

3.2.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα ή αλλιώς γνωστά ως υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι από τις σημαντικότερες ομάδες φαινολικών ενώσεων καθώς και η κύρια ομάδα των μη-φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων. Υπάρχουν κυρίως στην δεσμευμένη μορφή τους και αποτελούν συστατικά πιο σύνθετων ουσιών όπως είναι οι λιγνίνες και οι τανίνες ("Plant Phenolics Hum. Heal."). Ο σκελετός των φαινολικών οξέων αποτελείται από την σειρά των ανθράκων C6-C1 (Zamora; "Plant Phenolics Hum. Heal."). Τα σημαντικότερα και τα πιο συνηθισμένα φαινολικά οξέα είναι το γαλλικό οξύ, το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το συριγγικό οξύ ("Plant Phenolics Hum. Heal.).



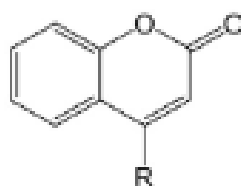
Εικόνα 2: Γενική δομή φαινολικών οξέων ("Plant Phenolics Hum. Heal.")



Εικόνα 3: Δομές των σημαντικότερων φαινολικών οξέων. Α) πρωτοκατεχικό οξύ, Β) Βανιλικό οξύ, Γ) Γαλλικό οξύ, Δ) p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, Ε) Συριγγικό οξύ ("Plant Phenolics Hum. Heal.")

3.2.3 Κουμαρίνες

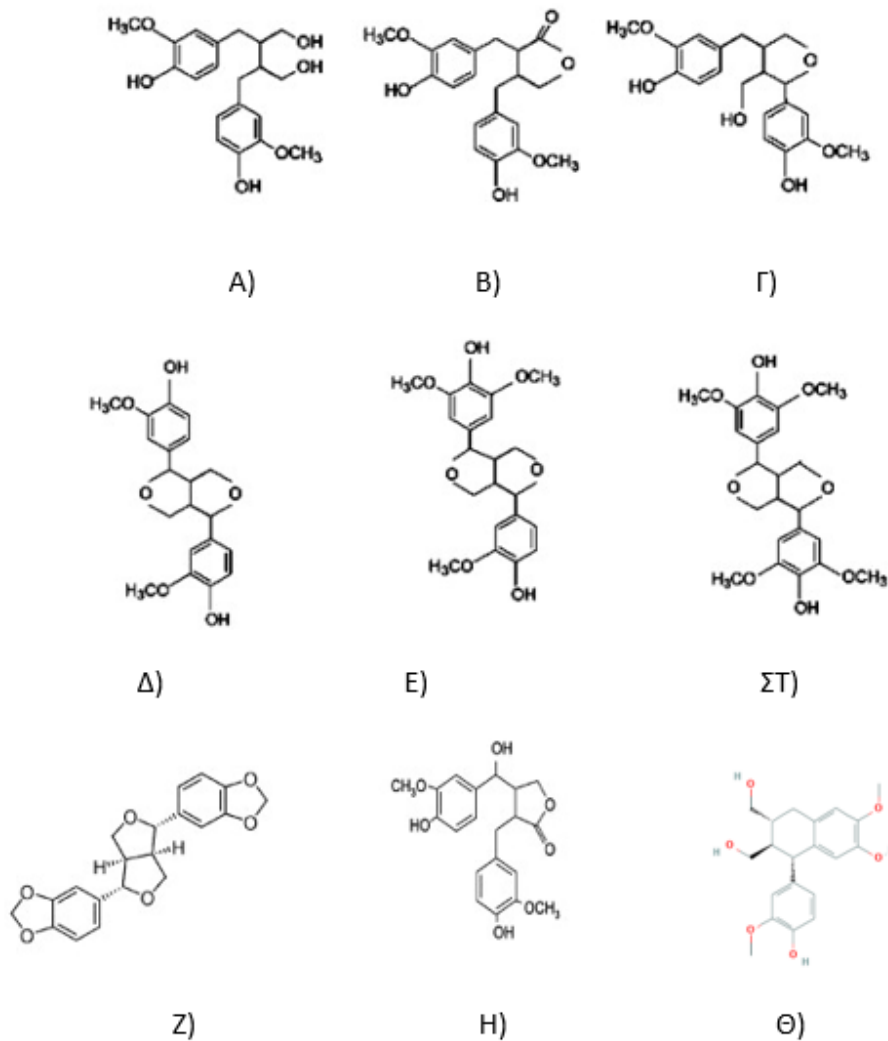
Οι κουμαρίνες είναι κι αυτές δευτερογενείς μεταβολιτές και συναντιούνται κυρίως στα φυτά. Γενικά όμως προέρχονται από το μεταβολικό μονοπάτι των φαινολοπροπανίων. Κατά την βιοσύνθεση των κουμαρινών θέτονται σε λειτουργία πολλά ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο βιοσυντίθενται αρκετοί τύποι κουμαρινών που οδηγούν στην δημιουργία των υδρόφοβων κουμαρινών, τις γραμμικές και υπό γωνία φουρανοκουμαρίνες, τις γλυκοζυωμένες κουμαρίνες, τις πυρανοκουμαρίνες, τις μεθυλενεδιοξυ-κουμαρίνες, τις υδροξυλιωμένες και τις μεθοξυλιωμένες κουμαρίνες (Gonçalves et al.). Οι κουμαρίνες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων πολλών ευεργετικών δράσεων και υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο οι φαρμακολογικές, θεραπευτικές και βιοχημικές ιδιότητες των κουμαρινών εξαρτώνται από τον τρόπο υποκατάστασης τους (Venkata Sairam et al.).



Εικόνα 4: Γενική δομή κουμαρινών (de Souza et al.)

3.2.4 Λιγνάνες

Μια ακόμα κατηγορία φαινολικών ενώσεων αποτελούν οι λιγνάνες. Οι λιγνάνες είναι πολυφαινόλες που αποτελούν μέρος της οικογενείας των φυτοοιστρογόνων, τα οποία είναι ενώσεις με οιστροφονική δράση που απαντούν στα φυτά, και είναι γνωστές για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες (López-Biedma et al.; Landete). Μία από αυτές τις ιδιότητες είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι λιγνάνες ωστόσο απαντούν κυρίως στα φρούτα και στα λαχανικά. Οι σημαντικότερες λιγνάνες αποτελούνται από διφαινολικές ενώσεις όπως είναι η σεκοΐσολαρικρεσινόλη (Ses), η ματιρεσινόλη (Mat), η πινορεσινόλη (Pin), η μεριδορεσινόλη (Med), η λαρικρεσινόλη (Lari), η συρριγαρεσινόλη (Syr), η σεσαμίνη (Sis), η 7'-υδροξυματιρεσινόλη και η ισολαρικρεσινόλη (Landete).

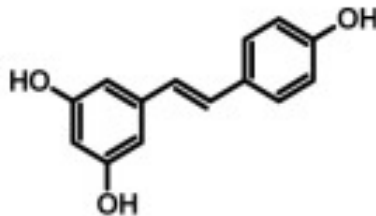


Εικόνα 5: Σημαντικότερες λιγνάνες Α) σεκοΐσολαρικρεσινόλη (Ses), Β) ματιρεσινόλη (Mat), Γ) λαρικρεσινόλη (Lari), Δ) πινορεσινόλη (Pin), Ε) μεριδορεσινόλη (Med), ΣΤ) συρριγαρεσινόλη (Syr), Ζ) σεκοΐσολαρικρεσινόλη (Ses), Η) 7'-υδροξυματιρεσινόλη, Θ) ισολαρικρεσινόλη (Landete; PubChem)

3.2.5 Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούν κατηγορία των φαινολικών μεταβολιτών που συναντιούνται σε διάφορα βρώσιμα τρόφιμα φυτικής προέλευσης (El Khawand et al.). Στα στιλβένια συναντάμε τα δύο ισομερή του (Ε)-στιλβενίου και το (Ζ)-

στιλβενίου με το πρώτο να έχει σταθερότερη δομή έναντι του πρώτου (SUN). Επιπλέον παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στην φαινολική τους δομή πράγμα που αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την απορρόφηση και τον μεταβολισμό τους. Ωστόσο θέμα μελέτης αποτελεί και η βιοδραστικότητα των στιλβενίων για τα πλεονεκτήματά τους στην ανθρώπινη υγεία. Το σημαντικότερο και το πιο αξιόλογο στιλβένιο με πολλές μελέτες να έχουν διεξαχθεί για αυτό είναι η ρεσβερατρόλη. Η ρεσβερατρόλη μέσα από τις μελέτες αυτές δείχνει να περιέχει εκτός από πολλές άλλες ευεργετικές ιδιότητες, και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (El Khawand et al.).



Εικόνα 6: Στιλβένια, χημική δομή ρεσβερατρόλης (El Khawand et al.)

3.2.6 Τανίνες

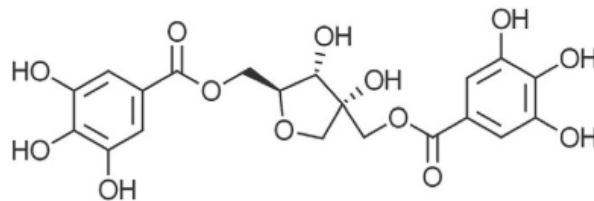
3.2.6.1 Γενικές Πληροφορίες

Οι τανίνες είναι υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες που εντοπίζονται κυρίως σε πολλές φυτικές τροφές και λειτουργούν ως δευτερεύοντες μεταβολίτες (Chung et al.; Oroian and Escriche). Η μοριακή τους μάζα φτάνει τα 30000 Da (Oroian and Escriche). Έρευνες δείχνουν πως οι τανίνες μειώνουν την αποδοτικότητα των τροφών, την μεταβολιζόμενη ενέργεια και την πεπτικότητα των πρωτεϊνών. Συνεπώς τρόφιμα πλούσια σε τανίνες θεωρούνται χαμηλής διατροφικής αξίας (Chung et al.). Επιπλέον οι τανίνες ανάλογα με την δομή τους χωρίζονται σε δύο

κατηγορίες μακρομορίων, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες τανίνες (Oroian and Escriche).

3.2.6.2 Υδρολυόμενες και Συμπυκνωμένες τανίνες

Οι υδρολυόμενες τανίνες έχουν μοριακή μάζα έως 5000 Da και παρά τον στυπτικό τους χαρακτήρα εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Από την άλλη οι συμπυκνωμένες τανίνες ή προανθουκιοανιδίνες είναι πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος και μοριακή μάζα έως 30000 Da. Η μονομερής μορφή είναι μία φλαβ-3-όλη με το μόριο φλαβ-3,4-διόλη ως πρόδρομο (Oroian and Escriche).



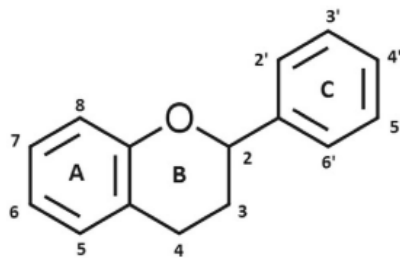
Εικόνα 7: Βασική δομή τανινών (Oroian and Escriche)

3.2.7 Φλαβονοειδή

3.2.7.1 Γενικές πληροφορίες

Η σημαντικότερη και η πιο γνωστή κατηγορία φαινολικών ενώσεων αποτελούν τα φλαβονοειδή, που απαντούν σε φυτικές τροφές, κυρίως σε όσπρια, φρούτα και λαχανικά και πολλά από αυτά αποτελούν χρωστικές ουσίες στις τροφές αυτές (Oroian and Escriche; Nijveldt et al.). Οι τροφές αυτές ωστόσο ήταν ήδη γνωστές για τα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία πρωτού τα φλαβονοειδή μπορέσουν να απομονωθούν από αυτά (Nijveldt et al.). Τα φλαβονοειδή υπάρχουν άφθονα στην φύση καθώς έχουν παρατηρηθεί πάνω από 4000 ποικιλίες φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή διαχωρίζονται σε υποκατηγορίες ανάλογα την χημική τους δομή.

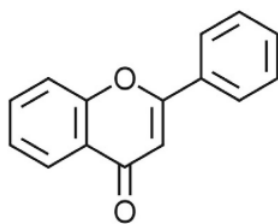
Έτσι χωρίζονται στις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόλες ή κατεχίνες, τις ανθοκυανίνες και τις ισοφλαβόνες (Nijveldt et al.; Oroian and Escriche). Από αυτές, οι φλαβόνες και οι κατεχίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Τα φλαβονοειδή σταθεροποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες και λόγω της υψηλής αντιδραστικότητας της υδροξυλομάδας των φλαβονοειδών, οι ρίζες καθίστανται ανενεργές (Nijveldt et al.).



Εικόνα 8: Γενική δομή Φλαβονοειδών (Oroian and Escriche)

3.2.7.2 Φλαβόνες

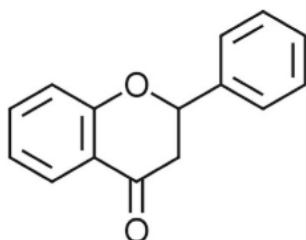
Οι φλαβόνες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες ομάδες των φλαβονοειδών. Βρίσκονται σε όλα τα μέρη των φυτών, κάτω και πάνω από το έδαφος καθώς και στους καρπούς αυτών όπως στα διάφορα φρούτα και λαχανικά. Χημικά, οι φλαβόνες έχουν έλλειψη μιας υδροξυλομάδας. Το κύριο μέρος των φλαβονών αποτελείται από την σύνθεση δύο φλαβανονών, της ναρρενίνης και της πινοκεμπρίνης. Η βιομετατροπή των φλαβονών γίνεται μέσω των φλαβονικών συνθετασών I και II. Τέλος οι φλαβόνες εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης έχουν μεγάλη αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, νευροπροστατευτική, αντιδιαβητική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (Oroian and Escriche).



Εικόνα 9: Γενική δομή φλαβονών (Oroian and Escriche)

3.2.7.3 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες είναι μία κατηγορία φλαβονοειδών που βρίσκονται άφθονες στα εσπεριδοειδή. Επίσης μπορούν να υπάρξουν ως O- ή C-γλυκοζίτες. Η σημαντικότερη φλαβανόνη που βρίσκεται κυρίως στα εσπεριδοειδή, είναι η ναρρενίνη. Η ναρρενίνη ως φλαβανόνη έχει πολλές φαρμακρευτικές ιδιότητες με κυριότερες την αντικαρκινική και την αντιοξειδωτική δράση που περιέχει προλαμβάνοντας και αντιμετωπίζοντας έτσι πολλές χρόνιες ασθένιες (Oroian and Escriche).

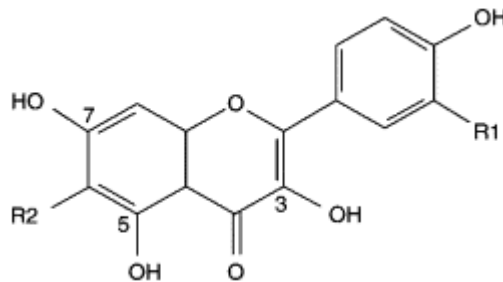


Εικόνα 10: Γενική δομή φλαβανονών (Oroian and Escriche)

3.2.7.4 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες αποτελούν μία κατηγορία χρωστικών φλαβονοειδών ουσιών. Οι περισσότερες από αυτές δίνουν άφθονο κίτρινο χρώμα το οποίο έχει σημαντική χρήση στην δημιουργία βαφών. Απαντούν σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα. Οι βασικότερες φλαβονόλες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι η κερκετίνη, η καεμφερόλη και η μυρικετίνη. Δομικά μοιάζουν με τις φλαβόνες. Η μόνη διαφορά

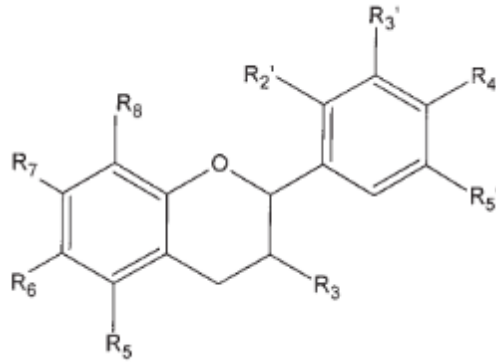
είναι πως οι φλαβονόλες έχουν μία υδροξυλοομάδα στην τρίτη θέση του C-δακτυλίου (Alihosseini and Sun).



Εικόνα 11: Γενική δομή φλαβονολών (Alihosseini and Sun)

3.2.7.5 Φλαβανόλες

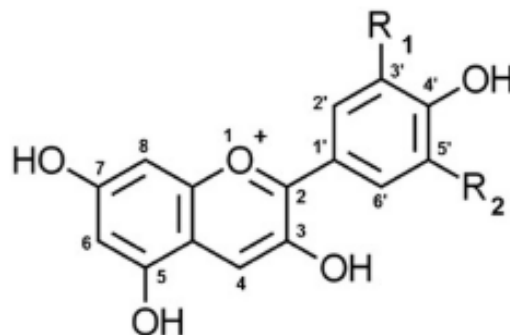
Οι φλαβανόλες είναι μία ακόμα σημαντική κατηγορία των φλαβονοειδών και φέρουν επίσης την ονομασία κατεχίνες. Οι φλαβανόλες είναι ευαίσθητες σε αρκετές αντιδράσεις που επιταχύνονται από τη θερμότητα, τα συστατικά των τροφίμων, τις συνθήκες υψηλού pH και την παρουσία διαλυμένου οξυγόνου ή άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου. Η αυτόματη οξείδωση των φλαβαν-3-ολών συμβαίνει με το σχηματισμό μιας ριζικής δομής ημικινόνης και σταθεροποιείται μέσω πολλαπλών δομών συντονισμού που διατίθενται στην φλαβαν-3-όλη (Alihosseini and Sun).



Εικόνα 12: Γενική δομή φλαβανολών ή κατεχινών (Alihosseini and Sun)

3.2.7.6 Ανθοκυανίνες

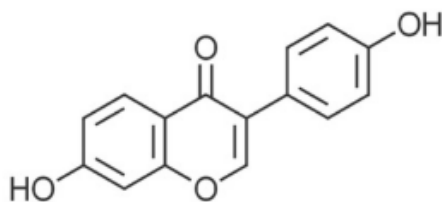
Οι ανθοκυανίνες, η μεγαλύτερη ομάδα χρωστικών στη φύση. Είναι επίσης μια κατηγορία φυσικών βιοδραστικών των οποίων η παρουσία βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα και ποτά. Οι ανθοκυανιδίνες όταν συνδέονται με μία ή περισσότερες γλυκοσιδικές μονάδες ονομάζονται ανθοκυανίνες. Οι ανθοκυανίνες επίσης χαρακτηρίζονται για την αντικαρκινική και την αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην φαινολική τους δομή η οποία έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς αυτές εξαρτώνται από την χημική δομή όλου του μορίου. Γενικά οι δομές των ανθοκυανινών είναι ιδιαίτερα ασταθείς και εύκολα υποβαθμίζονται εξαιτίας βιολογικών παραγόντων όπως διάφορα ένζυμα αλλά κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH κτλ. (Oroian and Escriche).



Εικόνα 13: Γενική δομή ανθοκυανινών (Oroian and Escriche)

3.2.7.7 Ισοφλαβόνες

Από τις σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις είναι οι ισοφλαβόνες. Είναι μια ομάδα ενώσεων ετεροκυκλικού οξυγόνου που ανήκουν στην οικογένεια των φυτοοιστρογόνων. Εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό στα όσπρια. Οι κύριες μορφές των ισοφλαβόνων στα φυτά είναι οι γλυκοζίτες με σάκχαρο όπως είναι η γλυκόζη, η μηλονυλογλυκόζη, η ακετυλογλυκόζη, η γαλακτόζη και η ραμνόζη. Προστατεύουν κυρίως από τα καρδιαγγειακά νοσήματα εξ' αιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης, ενώ εκδηλώνουν και αντικαρκινογόνο δράση (Oroian and Escriche).



Εικόνα 14: Γενική δομή ισοφλαβονών (Oroian and Escriche)

Κεφάλαιο 4: Αντιοξειδωτική δράση *Vigna unguiculata*

4.1 Γενικές πληροφορίες

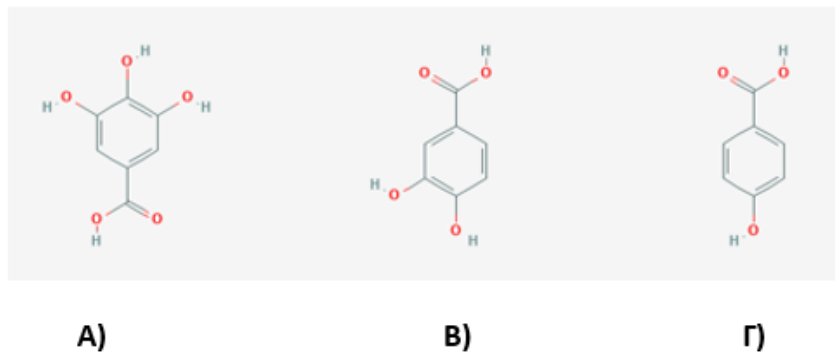
Τα φασόλια της ποικιλίας *Vigna unguiculata* αποτελούν γνωστά όσπρια τα οποία είναι γνωστά για την αντιοξειδωτικής του δράση καθώς έχει μελετηθεί

εξονυχιστικά το φαινολικό και το πρωτεϊνικό προφίλ (Adebooye and Singh). Τα περισσότερα όσπρια όπως και τα φασόλια περιέχουν φαινολικές ενώσεις σε διάφορες μορφές όπως υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα, τόσο ελεύθερα όσο και δεσμευμένα σε άλλα μόρια, ως οργανικά οξέα, σε εστεροποιημένες μορφές και φλαβονοειδή, κυρίως φλαβανό-3-όλες, φλαβονόλες και φλαβόνες, οι οποίες απαντώνται συχνότερα στη γλυκοσιδική μορφή (Dueñas et al.). Έχει παρατηρηθεί πως η ποικιλία *Vigna unguiculata* περιέχει πολύ μεγάλη συγκέντρωση από αντιοξειδωτικές ουσίες όπως φυτικά φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, τανίνες και πολυφαινόλες τα οποία γενικά βρίσκονται σε όσπρια και συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία. Οι φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στην ποικιλία *Vigna unguiculata* πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές αλλά και για άλλες ιδιότητες που προάγουν την υγεία (Adebooye and Singh). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων έχει άμεση σχέση με την χημική τους δομή. Γενικά, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα μη-φλαβονοειδή και οι συνδυασμένες μορφές όπως οι γλυκοζίτες παρουσιάζουν χαμηλότερη δραστηριότητα από τις ελεύθερες μορφές. Μεταξύ των μη φλαβονοειδών ενώσεων, τα βενζοϊκά οξέα είναι κάπως λιγότερο δραστικά από τα ομόλογα κινναμικά οξέα. Στην περίπτωση παραγώγων αυτών των οξέων, η σχετική αντιοξειδωτική δράση δείχνει ότι τα παράγωγα κινναμικού οξέος είναι πιο αποτελεσματικά από τα αντίστοιχα του βενζοϊκού οξέος (Dueñas et al.).

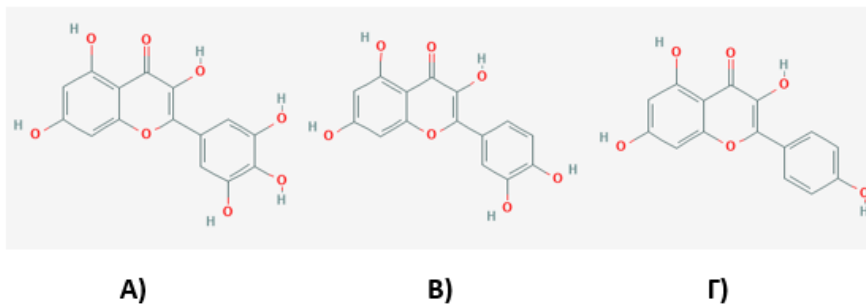
4.2 Φαινολικά οξέα στην ποικιλία *Vigna unguiculata*

Το φαινολικό αυτό φορτίο στην ποικιλία *Vigna unguiculata* το οποίο ευθύνεται για την αντιοξειδωτική του δράση βρίσκεται σε όλα τα μέρη του φασολιού αλλά και στο φλοιό του. Ο φλοιός του φασολιού περιέχει έως και δέκα φορές περισσότερα ελεύθερα και δεσμευμένα φλαβονοειδή από ότι το υπόλοιπο φασόλι. Στον φλοιό του φασολιού υπάρχουν ελεύθερα και δεσμευμένα φαινολικά οξέα με τα πιο κύρια

να είναι το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Μελέτες δείχνουν πως ύστερα από υδρόλυση των παραπάνω φαινολικών οξέων που πραγματοποιείται στον φλοιό του φασολιού έχουν ανιχνευτεί επίπεδα μυρικετίνης, κερκετίνης και καεμφερόλης (Gutiérrez-Urbe et al.).



Εικόνα 15: Δομή κύριων φαινολικών οξέων του *Vigna unguiculata* A) Γαλλικό οξύ B) Πρωτοκατεχικό οξύ Γ) p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PubChem)

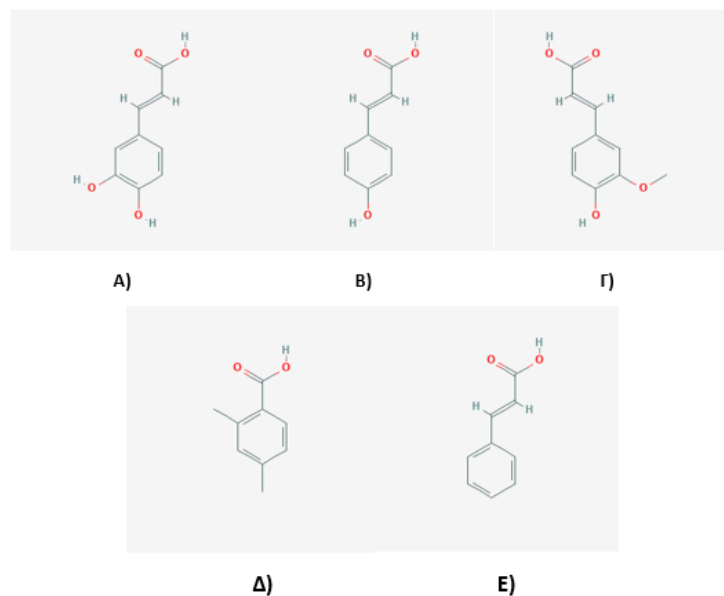


Εικόνα 16: Προϊόντα υδρόλυσης φαινολικών οξέων της ποικιλίας *Vigna unguiculata*

A) Μυρικετίνη B) Κουερσετίνη Γ) Καεμφερόλη (PubChem)

Από όλα τα φαινολικά οξέα που εντοπίζονται στον σπόρο του φασολιού, το πρωτοκατεχικό οξύ φαίνεται να επικρατεί και να είναι το κύριο φαινολικό οξύ στην ποικιλία *Vigna unguiculata*, του οποίου η συγκέντρωση υπολογίζεται στα

92,7mg/ 100g μετά την υδρόλυση. Ωστόσο στην ποικιλία *Vigna unguiculata* έχουν εντοπιστεί και άλλα φαινολικά οξέα σε μικρότερη συγκέντρωση όπως το καφεϊκό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το 2,4-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ, και το κινναμικό οξύ. Συνολικά αυτά τα οξέα κυμαίνονται σε συγκέντρωση 34,6 έως 376,6mg /100g φασολιού (Gutiérrez-Uribe et al.).

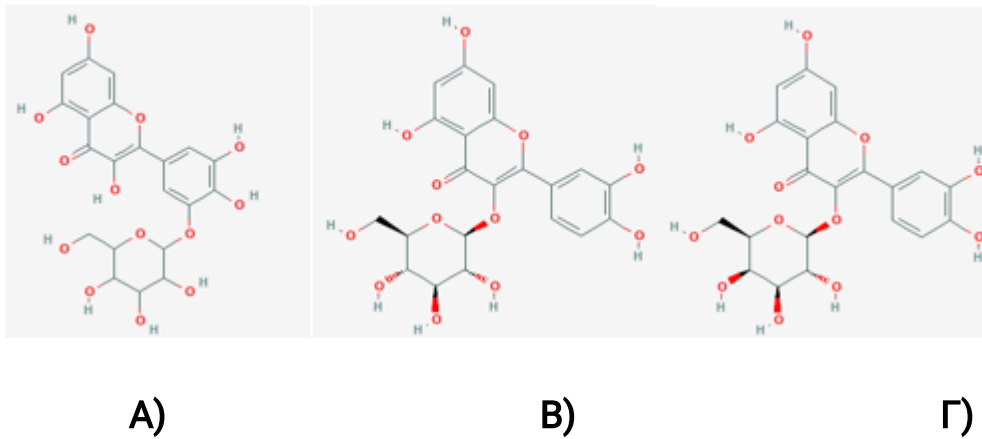


Εικόνα 17: Λοιπά φαινολικά οξέα στην ποικιλία *Vigna unguiculata* A) Καφεϊκό οξύ B) *p*-κουμαρικό οξύ Γ) Κουμαρικό οξύ Δ) 2,4-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ E) Κινναμικό οξύ (PubChem)

4.3 Φλαβονόλες στην ποικιλία *Vigna unguiculata*

Στην ποικιλία *Vigna unguiculata* περιέχει ενδεχομένως πολλές φαινολικές ενώσεις οι οποίες του προσδίδουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι εκτός από τα διάφορα φαινολικά οξέα όπως τα υδροξυβενζοϊκά οξέα που εντοπίζονται στη συγκεκριμένη ποικιλία φασολιού, εντοπίζονται και άλλες φαινολικές ενώσεις όπως διάφορες φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες που έχουν εντοπιστεί από μελέτες στην ποικιλία *Vigna unguiculata* είναι η 3-O-γλυκοσίδη της μυρικετίνης, η ισοκερκετίνη και η υπεροσίδη και γενικά διγλυκοσίδες της κερκετίνης (Gutiérrez-

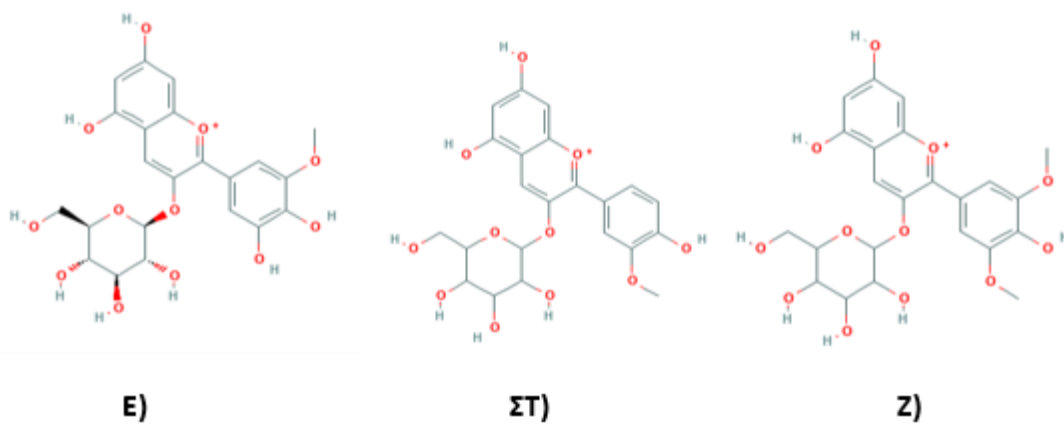
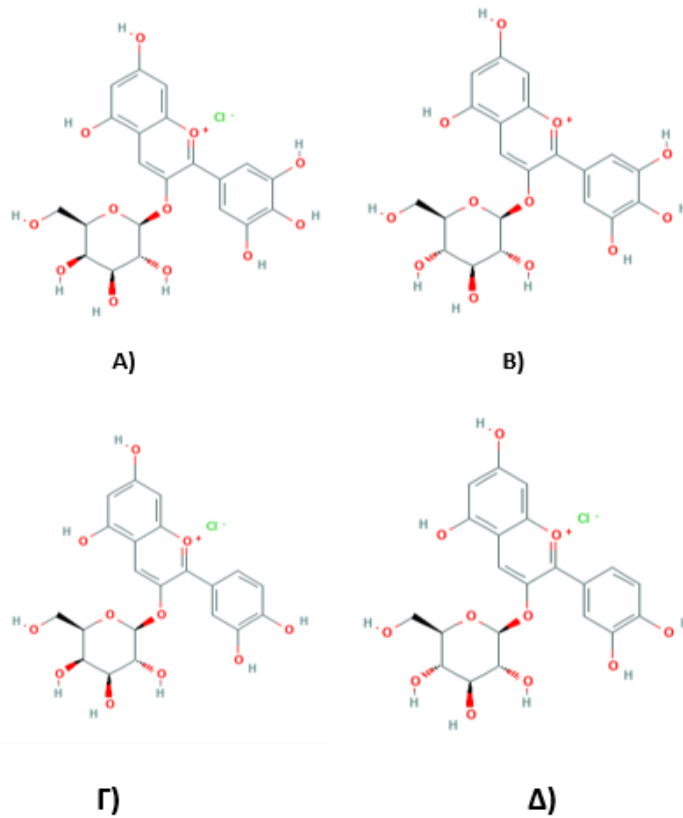
Uribe et al.).



Εικόνα 18: Φλαβονόλες στην ποικιλία *Vigna unguiculata* A) 3-O-γλυκοσίδη της μυρικετίνης B) Ισοκερκετίνη Γ) Υπεροσίδη (PubChem)

4.4 Ανθοκυανίνες στην ποικιλία *Vigna unguiculata*

Η ποικιλία *Vigna unguiculata* έχει διάφορες υποποικιλίες οι οποίες διαφέρουν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα. Άλλες ποικιλίες είναι καφέ, άλλες μαύρες και άλλες κιτρινωπές-λευκές. Οι διαφορετικές αυτές αποχρώσεις οφείλονται σε διαφορετικά είδη και περιεκτικότητες φαινολικών συστατικών όπως οι ανθοκυανίνες και υποεικνύουν και πιθανές διαφορές σε βιολογικές δράσεις. Για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ανθοκυανινών στην ποικιλία *Vigna unguiculata* χρησιμοποιείται χρωματογραφία στήλης C-18 αντίστροφης φάσης και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση συστοιχίας διόδων και ιονισμό ηλεκτροψεκασμού / ανάλυση φασματομετρίας μάζας (HPLC-DAD-ESI / MS). Ύστερα από μελέτες που έχουν γίνει έχουν εντοπιστεί οι παρακάτω ανθοκυανίνες στην ποικιλία *Vigna unguiculata*: Δελφινιδίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη, Δελφινιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Κυανιδίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη, Κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Πετουινιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Πεονιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη και Μαλβιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη (Ha et al.)



Εικόνα 19: Ανθοκυανίνες στο *Vigna unguiculata*: A) Δελφινιδίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη, Β) Δελφινιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Γ) Κυανιδίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη, Δ) Κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Ε) Πετουνιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, ΣΤ) Πεονιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη, Ζ) Μαλβιδίνη-3-Ο-γλυκοσίδη (PubChem)

Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

5.1 Μέθοδος ABTS

Η Μέθοδος ABTS (2,2'-αζινοβις-(3-αιθυλβενζοθειαζολινο) – 6 σουλφονικού οξύ), θεωρείται μία από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές για τον εντοπισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, επειδή η απόκριση των αντιοξειδωτικών περιλαμβάνει ταχύτερη κινητική αντίδρασης. Βασίζεται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να σταθεροποιεί το ριζικό κατιόν του ABTS, το οποίο σχηματίζεται με την οξείδωση του ABTS (2,2-αζινοβίνη-(3-αιθυλοβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)) από κάποιον οξειδωτικό παράγοντα όπως η μεθαιμοσφαιρίνη, υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλα. Η τροποποιημένη τεχνική για τη δημιουργία του ριζικού κατιόντος του ABTS περιλαμβάνει άμεση παραγωγή του πράσινου-μπλε χρωμοφόρου ριζικού κατιόντος ABTS μέσω της αντίδρασης μεταξύ ABTS και υπερθειικού καλίου. Αυτό το χρωμοφόρο έχει τρία μέγιστα απορρόφησης σε μήκη κύματος 645, 734 και 815 nm. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε αυτήν την λαμβανόμενη ρίζα ακολουθεί έναν μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο οποίος απεικονίζεται ως αποχρωματισμός που αντιστοιχεί στο πότε η ρίζα ABTS ανάγεται από ένα αντιοξειδωτικό. Με αυτόν τον τρόπο, ο βαθμός αποχρωματισμού καθιστά δυνατή την αξιολόγηση του ποσοστού αναστολής του ριζικού κατιόντος του ABTS, το οποίο προσδιορίζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών αντιοξειδωτικής και του χρόνου της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox ή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Hernández-Rodríguez et al.; Opitz et al.; Sombié et al.).

5.2 Μέθοδος DPPH

Το DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα που έχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων σθένους σε ένα άτομο γέφυρας αζώτου. Η εκκαθάριση (scavenging) της ρίζας του DPPH είναι η βάση της δημοφιλούς αντιοξειδωτικής δοκιμασίας του DPPH. Υψηλές συγκεντρώσεις DPPH στο μείγμα αντίδρασης δίνουν απορρόφηση πέρα από την ακρίβεια των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων. Το φως, το οξυγόνο και το pH του μείγματος αντίδρασης επηρεάζουν επίσης την απορρόφηση του DPPH. Επιπλέον, στο πλαίσιο της κινητικής εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών γίνεται χρήση πρότυπων αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ (Sharma and Bhat).

5.3 Μέθοδος ORAC

Στην ανάλυση ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), το RO₂ δημιουργείται με θερμική αποδόμηση του AAPH (διϋδροχλωρίδιο του 2,2'-Αζοδι-(2-αμιδινοπροπανίου)). Οι παραγόμενες υπεροξυλικές ρίζες αντιδρούν με φλουορεσκεΐνη ή παράγωγο αυτής μειώνοντας το σήμα φθορισμού σε ένα ζεύγος μήκους κύματος διέγερσης/εκπομπής 493/515nm. Οι αντιδράσεις μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) (Hydrogen Atom Transfer) των αντιοξειδωτικών με υπεροξυδραστικά αναστέλλουν την αντίδραση της φλουορεσκεΐνης στο δείγμα (Sombié et al.).

5.4 Μέθοδος PCL

Στο πρώτο βήμα της ανάλυσης PCL (Photochemiluminescence), η λουμινόλη (5-αμινο-2,3-διϋδρο-1,4-φθαλαζινοδιόνη) φωτοαποικοδομείται με αποτέλεσμα την παραγωγή/απόσβεση του O₂. Μόλις δημιουργηθούν οι ρίζες O₂ και η λουμινόλη, προχωρούν σε μια σειρά αντιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε φωταύγειας. Το αντιοξειδωτικό είδος που υπάρχει στο μείγμα της

αντίδρασης δρα ανταγωνιστικά (Sombié et al.).

5.5 Μέθοδος FRAP

Ο προσδιορισμός FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain το 1996 για τη μέτρηση της σιδηρούχου αναγωγικής ισχύος του ανθρώπινου πλάσματος. Η μέθοδος αυτή προσαρμόστηκε για να ποσοτικοποιηθεί η αντιοξειδωτική ισχύς των φυτικών εκχυλισμάτων. Στη δοκιμασία FRAP, η αντίδραση της ανάλυσης συνεπάγεται την αναγωγή του Fe³⁺ + -TTTZ (σίδηρος [III] - 2,4,6-τριπυριδυλ-S-τριαζίνη) σε Fe²⁺ + -TTTZ (σίδηρος [II] - 2,4,6-δυσπυριδυλ-S-τριαζίνη) μέσω μεταφοράς μονήρους ηλεκτρονίου (Single-Electron Transfer, SET) με μια αντιοξειδωτική ένωση. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι ένα έντονο μπλε χρώμα (Sombié et al.).

5.6 Μέθοδος CUPRAC

Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με χαλκό είναι συχνά γρηγορότερες από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με σίδηρο. Παρόμοια με τον σίδηρο, τα ιόντα χαλκού δημιουργούν ενώσεις συναρμογής με χηλικούς παράγοντες που περιέχουν άζωτο όπως η 2,20-διπυριδίνη ή 1,10-φαινανθρολίνη, και τα παράγωγά της. Η μέθοδος CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) περιλαμβάνει την αναγωγή του χαλκού (II) σε χαλκό (I) παρουσία νεοκουπροΐνης (NC) (2,9-διμεθυλ-1,10-φαινανθρολίνη), η οποία οδηγεί στο σύμπλοκο Cu (I) -NC σε αναλογία 2:1 (Sombié et al.).

5.7 Μέθοδος β-καροτένιου-λινελαϊκού οξέος

Σε αυτόν τον προσδιορισμό, χρησιμοποιείται ένα σύστημα γαλακτώματος. Το πενταδιενύλιο, ως ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται από λινελαϊκό οξύ και

προσβάλλει έντονα μη κατεργασμένα μόρια β-καροτενίου προς απώλεια του χαρακτηριστικού πορτοκαλί χρώματος του γαλακτώματος. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να προστατεύσουν το β-καροτένιο από την καταστροφή εξουδετερώνοντας την ελεύθερη ρίζα λινελαϊκού οξέος. Αυτή η διαδικασία μπορεί να παρακολουθηθεί φασματοφωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση του δείγματος στα 470 nm (Sombié et al.).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογίες

6.1 Προετοιμασία δειγμάτων- Βρασμός

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Υπό μελέτη δείγματα
2. Απεσταγμένο νερό (dH₂O)

Μελετήθηκαν με την σειρά όπως αναγράφονται τα παρακάτω δείγματα φασολιού *Vigna unguiculata* με τις εξής κωδικές ονομασίες:

1. AUAANDRO098
2. KYMI
3. AUALIMNOS133
4. ARTA1
5. KYTHIRA1
6. AUAANDRO148
7. AUAANDRO117
8. AUAANDRO116
9. ATSIKI LIMNOS
10. SAMOS
11. A (Λήμνος)
12. B (Λήμνος)

Όργανα και εξοπλισμός

1. Ογκομετρικός κύλινδρος των 100mL
2. Κωνική φιάλη των 500mL
3. Ψυκτήρας και λάστιχα από σύστημα απόσταξης
4. Λύχνος Bunsen
5. Υδροβολέας
6. Αλουμινένια δοχεία
7. Πλαστική λεκάνη
8. Πλαστικό στραγγιστήρι
9. Ζυγός ακριβείας

Πειραματική πορεία

Αρχικά ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας 5g των παραπάνω δειγμάτων σε υποδοχείς ααλουμινίου. Στην συνέχεια μεταφέρονται 100mL απεσταγμένου νερού με τη βοήθεια υάλινου χωνιού μέσα σε κωνική φιάλη. Έπειτα τοποθετούνται τα φασόλια μέσα στην κωνική φιάλη και ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για 20 λεπτά με χρήση ψυκτήρα. Εν συνεχεία τα δείγματα στραγγίζονται και ξαναζυγίζονται στον ζυγό ακριβείας. Τέλος τοποθετούνται στο φούρνο αποξήρανσης για 72 ώρες στους 70°C ώστε να απομακρυνθεί τελείως η υγρασία.

6.2 Αποξήρανση- Άλεσμα

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Υπό μελέτη δείγματα

Όργανα και εξοπλισμός

1. Κλίβανος αποξήρανσης
2. Υποδοχείς αλουμινίου
3. Εργαστηριακός μύλος
4. Ζυγός ακριβείας
5. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
6. Στατώ

Πειραματική πορεία

Μετά την ξήρανση των 24 δειγμάτων στον κλίβανο για 72 ώρες στους 70°C ακολουθεί άλεση σε εργαστηριακό μύλο για 30 δευτερόλεπτα και το προϊόν άλεσης συλλέγεται και φυλάσσονται σε πλαστικούς ογκομετρικούς σωλήνες.

6.3 Εκχύλιση- Φυγοκέντρηση

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Υπό μελέτη δείγματα
2. Διαλύτης Εκχύλισης W:M:Α_{COH} (90:10:1, v/v/v)

Όργανα και εξοπλισμός

1. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
2. Εργαστηριακός αναδευτήρας
3. Εργαστηριακή φυγόκεντρος
4. Μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου με πώμα όγκου 2,0 mL
5. Τριβάλβιδο πουάρ
6. Πιπέτα 500μL
7. Καταψύκτης
8. Σιφώνι 5mL
9. Στατώ

Πειραματική πορεία

Λαμβάνονται 0,250g από το κάθε αλεσμένο δείγμα και ακολουθεί προσθήκη 5,0 mL διαλύματος εκχύλισης W:M:AcOH (90:10:1, v/v/v). Ύστερα τα διαλύματα αυτά αναδεύονται για μισή ώρα σε τράπεζα ανάδευσης στα 250rpm. Μετά την ανάδευση, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 2000×g για 15 λεπτά. Μετά και από τη φυγοκέντρηση, παραλαμβάνεται η πάνω φάση και αποθηκεύεται στους -40°C έως περαιτέρω ανάλυσης.

6.4 Μέθοδος ABTS

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Υπό μελέτη δείγματα
2. Διάλυμα ABTS
3. Απιονισμένο νερό

Όργανα και εξοπλισμός

1. . Μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου με πώμα όγκου 2,0 mL
2. Δοκιμαστικοί σωλήνες
3. Υδροβολέας
4. Αναδευτήρας Vortrex
5. Φυγόκεντρος
6. Πιπέτα 1000μL
7. Πιπέτα 500ML
8. Πιπέτα 10μL
9. Κυβέτες
10. Φασφατοφωτόμετρο

Πειραματική πορεία

Τα δείγματα αποσύρονται από τον καταψύκτη και αφήνονται έως ότου έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλέγεται το υπερκείμενο.. Ακολούθως μικρή ποσότητα υπερκειμένου τοποθετείται σε μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου με πώμα όγκου 2,0 mL και Έπειτα προστίθεται 1mL διαλύματος ABTSκαι επωάζεται για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης το κάθε δείγμα φωτομετρείται στα 734nm για τον προσδιορισμό της απορρόφησης.

Κεφάλαιο 7: Δημιουργία διαλύματος ABTS

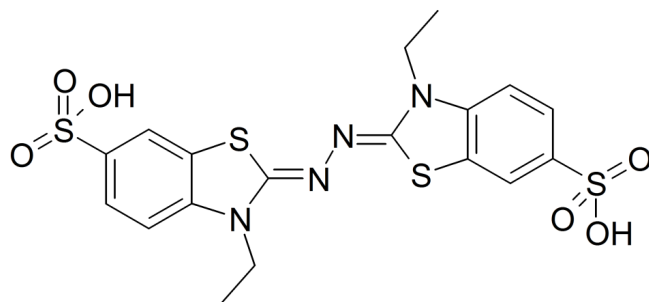
Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία του 2,2'-αζινο-δισ-[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]; ABTS)

Σκοπός

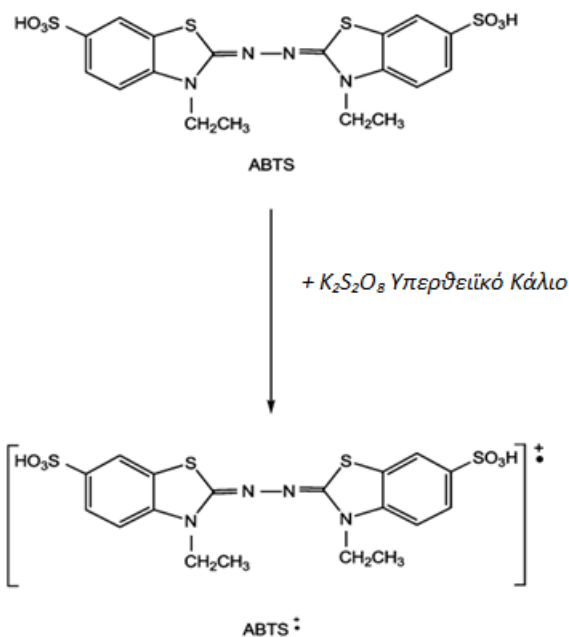
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης ελεύθερης ρίζας.

Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου του ABTS (2,2'-αζινο δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος) βασίζεται στην οξείδωσή του προς ριζικό κατιόν με υπερθεϊκά ιόντα με βαθύ κυανοπράσινο χρώμα που απορροφά ισχυρά στα 734 nm, και στον ακόλουθο αποχρωματισμό αυτού υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών.



Εικόνα 20: Δομή αντιδραστηρίου ABTS



Εικόνα 21: Σχηματισμός σταθερών ριζών ABTS από ABTS με υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$)

Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος $ABTS^{•+}$ που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται συνήθως σε ισοδύναμα Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchoman-2-carboxylic acid) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Roginsky & Lissi, 2004).

Το $ABTS^{•+}$ μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση [π.χ. με διοξειδίο μαγγανίου (MnO_2), με υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυσοφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη)].

Γενικά, η χημική αντίδραση απαιτεί πολύ χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθειικού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι ταχύτερες και οι συνθήκες αντίδρασης ηπιότερες.

Η μέγιστη απορρόφηση του $ABTS^{•+}$ αποδείχτηκε ότι είναι σε μήκη κύματος 415, 645, 734 και 815nm. Τα μήκη κύματος, τα οποία επιλέχτηκαν από τους περισσότερους ερευνητές για να ελέγξουν φασματοφωτομετρικά την αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και του $ABTS^{•+}$ είναι 415 και 734nm.

Οι πιο πρόσφατες αναθεωρημένες μέθοδοι μετρούν την μείωση της απορροφητικότητας του $ABTS^{•+}$ παρουσία του προς εξέταση δείγματος ή του πρότυπου αντιδραστήριου Trolox σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα 4-6min και έπειτα η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται σε ισοδύναμα Trolox (Prior et al., 2005).

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Πυκνό διάλυμα ABTS (2,2'-αζινοβις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο) - 6 σουλφονικού οξέος) (M.W.:514.62 g/mol)
2. Υπερκάθαρο νερό
3. Υπό μελέτη δείγματα

Όργανα και Εξοπλισμός

1. Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου 0,5-5 mL
2. Αυτόματες πιπέτες σταθερού όγκου 1000 μ L και 100 μ L
3. Κυψελίδες πολυστυρενίου οπτικής διαδρομής 1 cm και όγκου 1 mL
4. Υάλινοι Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL
5. Υδροβολέας
6. Φασματοφωτόμετρο (734nm)
7. Σωλήνας πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL.

Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος ABTS

Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL τοποθετούνται 20 mL dH₂O και προστίθενται 0,1801 g ABTS (m.w: 514,62 g/mol) και 0,0331 g K₂S₂O₈ (m.w: 270,322 g/mol). Ακολουθεί ανάδευση έως διαλυτοποίησης και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 50,0 ml για να δώσει συγκέντρωση 7 mM σε ABTS και 2,45 mM σε K₂S₂O₈. Το μίγμα που δημιουργείται διατηρείται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 16h, ώστε να προκύψει βαθύ κυανό διάλυμα. Στη συνέχεια αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C.

Παρασκευή διαλύματος εργασίας ριζικού κατιόντος ABTS

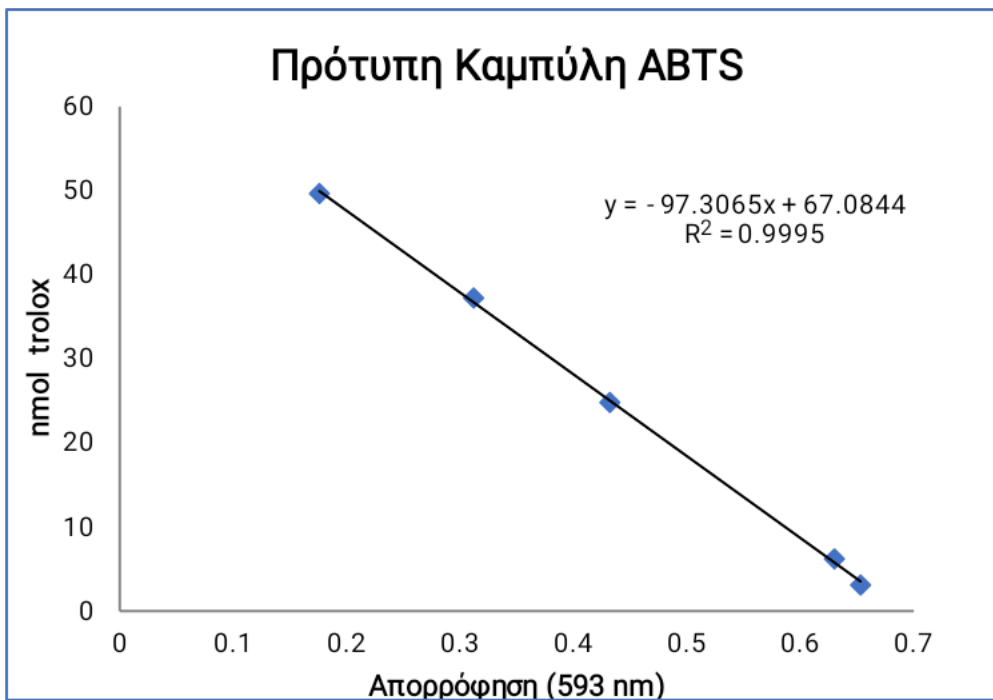
Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL τοποθετούμε 49,5mL υπερκάθαρο νερό και 0,5 mL διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος του ABTS. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε τιμή κοντά στο 0,700.

Πειραματική Πορεία

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλισμάτων και εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου.
2. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ανά 30 sec. 2.500 μ L διαλύματος εργασίας του ριζικού κατιόντος του ABTS (ABTS^{**}) και ακολουθεί ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Στη συνέχεια τα δείγματα επώάζονται σε σκοτεινό μέρος για 15 min ακριβώς.
3. Μετά τα 15 min της επώασης ακολουθεί καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734nm.
4. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς trolox και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα trolox.

πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3, 6, 12,5, 25, 37 και 50 nmol trolox.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας ABTS

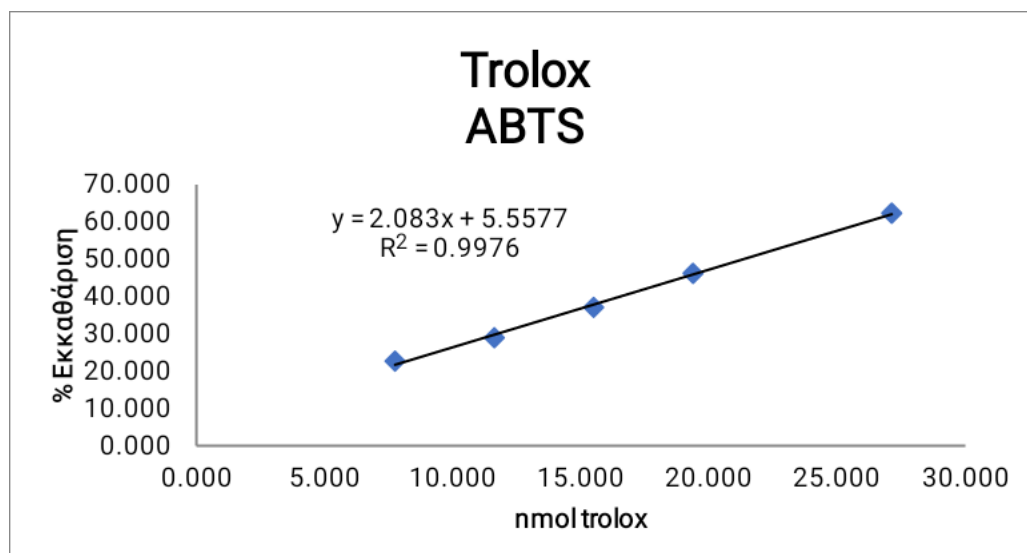
Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα Πειραμάτων

8.1 Μέθοδος ABTS

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων ποικιλίας *Vigna unguiculata* έγινε με την μέθοδο του ABTS.. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox βάσει της οποίας υπολογίστηκαν τα ισοδύναμα nmol Trolox /mg αρχικού δείγματος .

% Εκκαθάριση	nmol trolox
22,682	7,750
28,959	11,625
37,090	15,500
46,220	19,375
62,340	27,125

Πίνακας 1: % Απορρόφηση nmol Trolox



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox ABTS

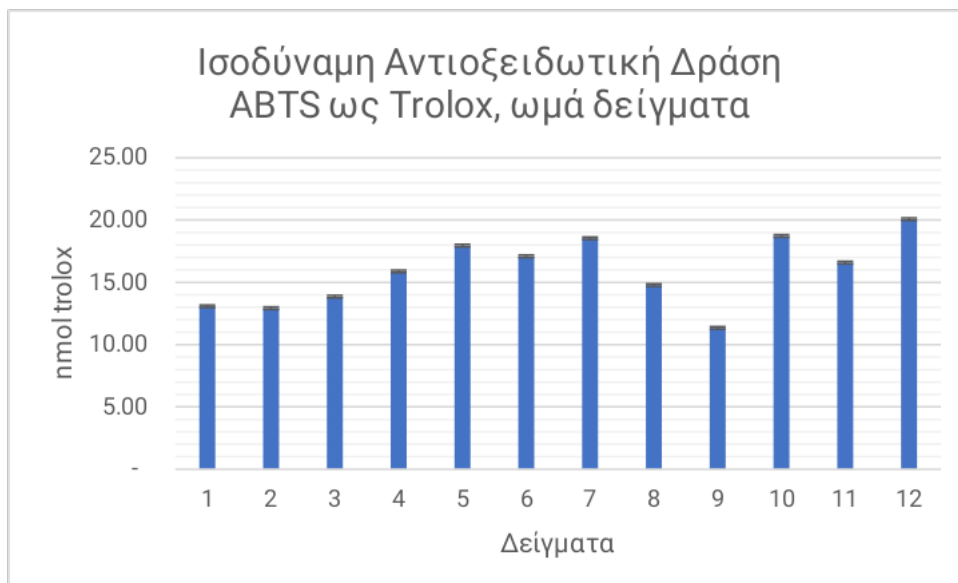
8.2 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Δειγμάτων

Με βάση την παραπάνω πρότυπη καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων και εκφράστηκε ως ισοδύναμη ποσότητα Trolox. Το Trolox είναι συνθετικό υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E το οποίο παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ισοδύναμης αντιοξειδωτικής δράσης άλλων ουσιών.. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ισοδύναμης αντιοξειδωτικής δράσης ως Trolox για τα ωμά δείγματα των φασολιών:

Κωδικός	Όνομασία Δείγματος	Αντιοξειδωτική δράση (nmol Trolox) ¹	μL δείγματος
1	AUAANDRO 098	13,08 ± 0,55	10
2	KYMI	12,93 ± 1,36	50
3	AUALIMNOS133	13,85 ± 1,34	50
4	ARTA1	15,88 ± 0,74	50
5	KYTHIRA1	17,95 ± 1,62	50
6	AUAANDRO 148	17,10 ± 1,54	50
7	AUAANDRO 117	18,54 ± 0,46	10
8	AUAANDRO 116	14,78 ± 1,65	50
9	ATSIKI LIMNOS	11,34 ± 1,14	50
10	SAMOS	18,72 ± 2,63	10
11	A (Λήμνος)	16,58 ± 1,33	50
12	B (Λήμνος)	20,07 ± 1,52	50

¹: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων μετρήσεων

Πίνακας 2: Ισοδύναμη αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας *vigna unguiculata*



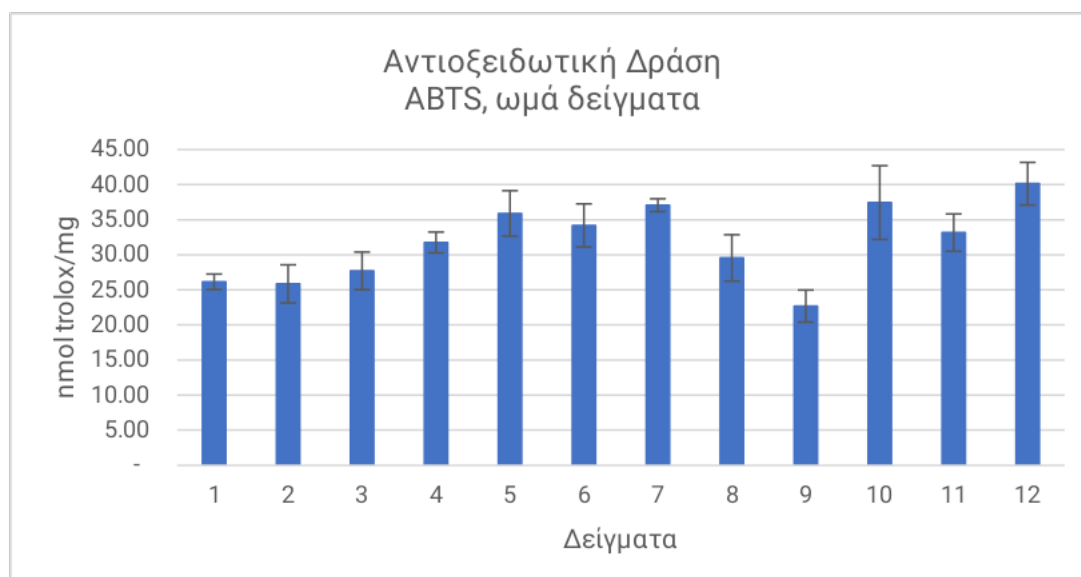
Διάγραμμα 3: Ισοδύναμη Αντιοξειδωτική Δράση ως Trolox ωμών δειγμάτων φασολιών

Κωδικός	Όνομασία Δείγματος	Αντιοξειδωτική δράση (nmol Trolox/ mg) ¹
1	AUAANDRO 098	26,15 ± 1,10
2	ΚΥΜΙ	25,86 ± 2,72
3	AUALIMNOS133	27,71 ± 2,68
4	ARTA1	31,75 ± 1,48
5	ΚΥΘΗΡΑ1	35,90 ± 3,24
6	AUAANDRO 148	34,19 ± 3,07
7	AUAANDRO 117	37,07 ± 0,92
8	AUAANDRO 116	29,56 ± 3,30
9	ATSIKI LIMNOS	22,69 ± 2,29
10	SAMOS	37,45 ± 5,26
11	A (Λήμνος)	33,17 ± 2,66
12	B (Λήμνος)	40,14 ± 3,04

¹: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων μετρήσεων

Πίνακας 3: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας *vigna unguiculata*

Βάσει του Διαγράμματος 3 και του Πίνακα 2, υπολογίστηκε ο παραπάνω πίνακας που καταγράφει τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των ωμών δειγμάτων των φασολιών, μετρημένο ως nmol Trolox/ mg αρχικού δείγματος. Ακολουθεί και το διάγραμμα αναπαράστασης των αποτελεσμάτων αυτών.



Διάγραμμα 4: Αντιοξειδωτική Δράση ABTS ωμών δειγμάτων φασολιών

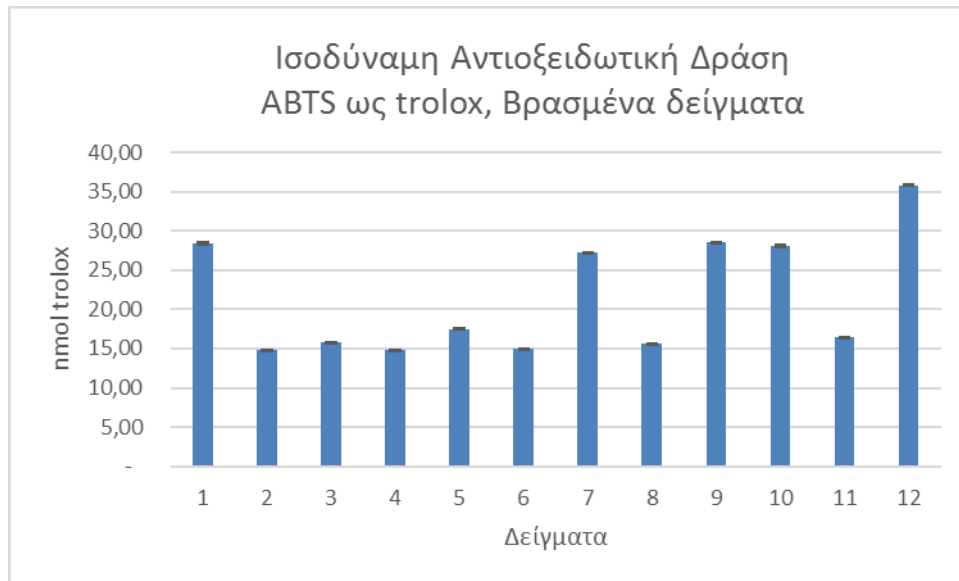
8.3 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης ABTS Βρασμένων Δειγμάτων

Παράλληλα με τα ωμά δείγματα μετρήθηκαν και τα βρασμένα δείγματα των ίδιων δειγμάτων και προσδιορίστηκε και σε αυτά η αντιοξειδωτική τους δράση με τον ίδιο τρόπο όπως στα ωμά δείγματα. Ακολουθεί υπολογισμός της Ισοδύναμης αντιοξειδωτικής δράσης των βρασμένων δειγμάτων ως Trolox καθώς και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των βρασμένων δειγμάτων μετρημένα σε nmol Trolox/ mg αρχικού δείγματος.

Κωδικός	Όνομασία Δείγματος	Αντιοξειδωτική δράση (nmol Trolox) ¹	μL δείγματος
1B	AUAANDRO 098	28,38 ± 2,03	150
2B	KYMI	14,76 ± 1,49	150
3B	AUALIMNOS133	15,77 ± 1,57	150
4B	ARTA1	14,76 ± 1,19	150
5B	KYTHIRA1	17,49 ± 1,47	150
6B	AUAANDRO 148	14,92 ± 1,56	150
7B	AUAANDRO 117	27,21 ± 1,66	150
8B	AUAANDRO 116	15,61 ± 1,47	150
9B	ATSIKI LIMNOS	28,53 ± 1,63	150
10B	SAMOS	28,08 ± 1,81	150
11B	A (Λήμνος)	16,43 ± 1,51	150
12B	B (Λήμνος)	35,78 ± 1,48	150

¹: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων μετρήσεων

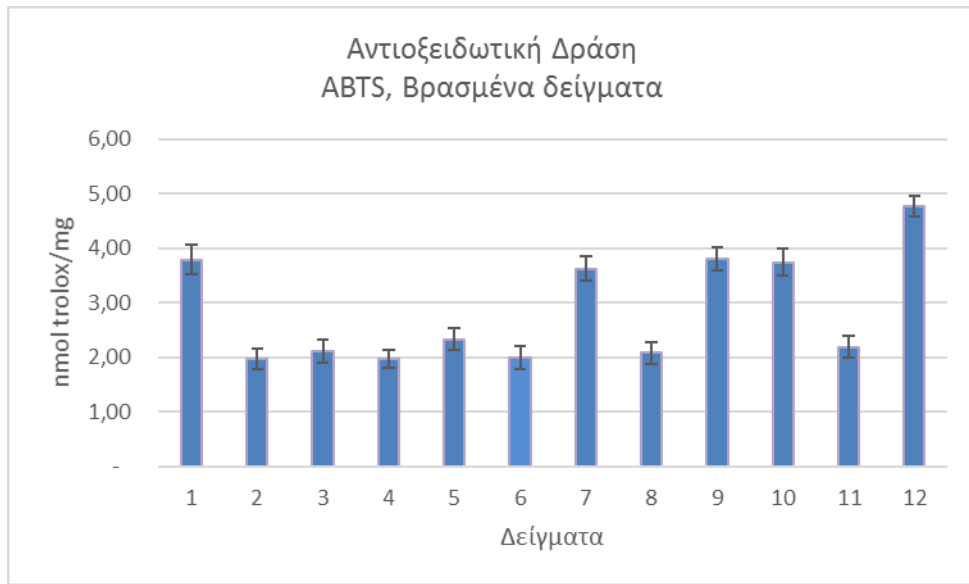
Πίνακας 4: Ισοδύναμη αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας *vigna unguiculata* μετά από βρασμό



Διάγραμμα 5: : Ισοδύναμη Αντιοξειδωτική Δράση ως Trolox βρασμένων δειγμάτων φασολιών

Κωδικός	Όνομασία Δείγματος	Αντιοξειδωτική δράση (nmol Trolox/ mg) ¹
1B	AUAANDRO 098	56,77 ± 4,05
2B	KYMI	29,53 ± 2,98
3B	AUALIMNOS133	31,54 ± 3,14
4B	ARTA1	29,53 ± 2,38
5B	KYTHIRA1	34,98 ± 2,95
6B	AUAANDRO 148	29,85 ± 3,12
7B	AUAANDRO 117	54,41 ± 3,31
8B	AUAANDRO 116	31,22 ± 2,93
9B	ATSIKI LIMNOS	57,06 ± 3,26
10B	SAMOS	56,16 ± 3,62
11B	A (Λήμνος)	32,86 ± 3,01
12B	B (Λήμνος)	71,57 ± 2,95

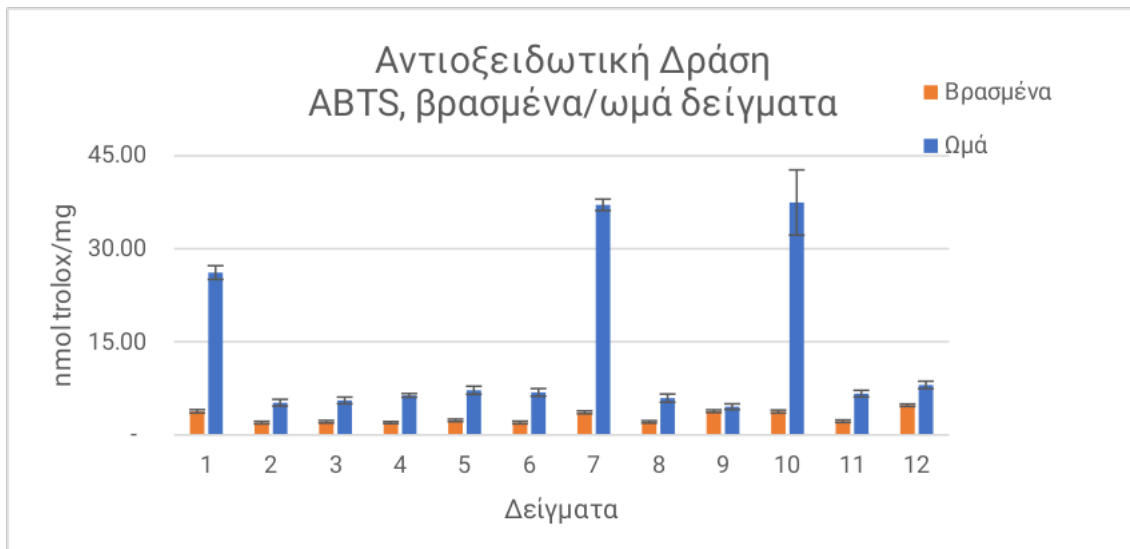
Πίνακας 5: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από δείγματα φασολιών ποικιλίας *vigna unguiculata* μετά από βρασμό



Διάγραμμα 6: Αντιοξειδωτική Δράση ABTS βρασμένων δειγμάτων φασολιών

Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και Συζήτηση

Η αντιοξειδωτική δράση των τροφών είναι ωφέλιμη για την υγεία του ανθρώπου καθώς οι αντιοξειδωτικές ενώσεις δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες του οργανισμού και αποτρέπουν την οξείδωση τους που καταλήγει στην εμφάνιση σοβαρών ασθενειών. Οι αντιοξειδωτικές αυτές ουσίες βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης και αποτελούνται από βιταμίνες, και φαινολικές ενώσεις. Πληθώρα φαινολικών ενώσεων διαθέτουν και τα φασόλια της ποικιλίας *Vigna unguiculata*. Στο πειραματικό κομμάτι αυτής της Πτυχιακής Μελέτης μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εκχυλισμάτων φασολιών της ποικιλίας *Vigna unguiculata* με την μέθοδο του ABTS. Μελετήθηκαν 12 διαφορετικές υποποικιλίες του συγκεκριμένου είδους φασολιού με κωδικούς: AUAANDRO 098, KYMI, AUALIMNOS133, ARTA1, KYTHIRA1, AUAANDRO 148, AUAANDRO 117, AUAANDRO 116, ATSIKI LIMNOS, SAMOS, A (Λήμνος) και B (Λήμνος). Τα δείγματα αυτά προετοιμάστηκαν για να μετρηθούν με την μέθοδο του ABTS και δίχως θερμική επεξεργασία αλλά και έπειτα από βρασμό. Αφού με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση και των 24 δειγμάτων, συγκρίνεται η αντιοξειδωτική δράση δείγματος πριν και μετά το βρασμό όπως φαίνεται στον παρακάτω συγκριτικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 7: Αντιοξειδωτική Δράση ABTS ωμών και βρασμένων δειγμάτων φασολιών

Στην μέθοδο του ABTS το ριζικό κατιόν ABTS ανάγεται από τα φαινολικά των υπό μελέτη εκχυλισμάτων. Στον παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται πως σε όλα τα δείγματα, τα βρασμένα δείγματα εμφανίζουν την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα ωμά. Τα δείγματα: AUAANDRO 098 (1), AUAANDRO 117 (7) και το SAMOS (10) εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση καθώς και την μεγαλύτερη διαφορά σε σύγκριση με τα βρασμένα τους αφού χρειάστηκε να μειωθούν τα μL που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο ABTS για να μπορούν να φωτομετρηθούν. Στα δείγματα του ασπρομύτικου φασολιού της Λήμνου παρουσιάζεται επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση η οποία μειώνεται με την θερμική επεξεργασία του φασολιού ωστόσο η διαφορά αυτή στο δείγμα ATSIKI LIMNOS (9) είναι αμελητέα. Έμμεσα συμπεραίνεται πως σε γενικές γραμμές με το βράσιμο των φασολιών μειώνεται η αντιοξειδωτική τους δράση το οποίο πιθανολογείται πως οφείλεται στην αλλαγή της δομής των φαινολικών ενώσεων του φασολιού εάν υποστεί θερμική επεξεργασία.

Κεφάλαιο 10: Βιβλιογραφία

- Adebooye, Ounayo Clement, and Vasudeva Singh. "Tannins , Phytate , Amino Acid , Fatty Acid and Mineral Nutrients of Whole-Grain and Decorticated." *Journal of Food Quality*, vol. 30, no. 2007, 2007, pp. 1101–20.
- Adiloğlu, Sevinç, et al. "We Are IntechOpen , the World ' s Leading Publisher of Open Access Books Built by Scientists , for Scientists TOP 1 %." *Intech*, vol. i, no. tourism, 2012, p. 13, doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.014.
- Alihosseini, F., and G. Sun. "Antibacterial Colorants for Textiles." *Functional Textiles for Improved Performance, Protection and Health*, 2011, pp. 376–403, doi:10.1533/9780857092878.376.
- Behura, Ratikanta, et al. "Cowpea [Vigna Unguiculata (L.) Walp.]." *Methods in Molecular Biology*, vol. 1223, 2015, pp. 255–64, doi:10.1007/978-1-4939-1695-5_20.
- Brainina, Khiena, et al. *Antioxidants : Terminology , Methods , and Future Considerations*. 2019.
- Chung, King Thom, et al. "Tannins and Human Health: A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 38, no. 6, 1998, pp. 421–64, doi:10.1080/10408699891274273.
- de Souza, Luana G., et al. "Coumarins as Cholinesterase Inhibitors: A Review." *Chemico-Biological Interactions*, vol. 254, 2016, pp. 11–23, doi:10.1016/j.cbi.2016.05.001.
- Dueñas, Montserrat, et al. "Bioactive Phenolic Compounds of Cowpeas (Vigna Sinensis L). Modifications by Fermentation with Natural Microflora and with

Lactobacillus Plantarum ATCC 14917." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 85, no. 2, 2005, pp. 297–304, doi:10.1002/jsfa.1924.

- El Khawand, Toni, et al. "A Review of Dietary Stilbenes: Sources and Bioavailability." *Phytochemistry Reviews*, vol. 17, no. 5, 2018, pp. 1007–29, doi:10.1007/s11101-018-9578-9.
- Gonçalves, Guilherme Arraché, et al. "Natural and Synthetic Coumarins as Antileishmanial Agents: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 203, 2020, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112514.
- González, Carmen Maria, et al. "Evaluation of Nutritional Profile and Total Antioxidant Capacity of the Mediterranean Diet of Southern Spain." *Food Science and Nutrition*, vol. 7, no. 12, 2019, pp. 3853–62, doi:10.1002/fsn3.1211.
- Gutiérrez-Urbe, J. A., et al. "Phenolic Composition and Mammary Cancer Cell Inhibition of Extracts of Whole Cowpeas (*Vigna Unguiculata*) and Its Anatomical Parts." *Journal of Functional Foods*, vol. 3, no. 4, 2011, pp. 290–97, doi:10.1016/j.jff.2011.05.004.
- Ha, Tae Joung, et al. "Anthocyanins in Cowpea [*Vigna Unguiculata* (L.) Walp. Ssp. *Unguiculata*]." *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, no. 3, 2010, pp. 821–26, doi:10.1007/s10068-010-0115-x.
- Haile, Belay, et al. "Evolution of Human Diet and Effect of Globalization on Regional Diet with Emphasis to the Mediterranean Diet." *Nutrition and Food Science*, vol. 47, no. 6, 2017, pp. 869–83, doi:10.1108/NFS-02-2017-0017.
- Jayathilake, Chathuni, et al. "Cowpea: An Overview on Its Nutritional Facts and

Health Benefits." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 98, no. 13, 2018, pp. 4793–806, doi:10.1002/jsfa.9074.

- K. Venkata Sairam, B. M. Gurupadayya, R. S. Chandan, Dattatri K. Nagesha and B. Vishwanathan, "A Review on Chemical Profile of Coumarins and their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer", *Current Drug Delivery* (2016) 13: 186. <https://doi.org/10.2174/1567201812666150702102800>
- Landete, J. M. "Plant and Mammalian Lignans: A Review of Source, Intake, Metabolism, Intestinal Bacteria and Health." *Food Research International*, vol. 46, no. 1, Elsevier Ltd, 2012, pp. 410–24, doi:10.1016/j.foodres.2011.12.023.
- López-Biedma, Alicia, et al. "The Biological Activities of Natural Lignans from Olives and Virgin Olive Oils: A Review." *Journal of Functional Foods*, vol. 26, Elsevier Ltd, 2016, pp. 36–47, doi:10.1016/j.jff.2016.07.005.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 176440, Delphinidin 3-galactoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Delphinidin-3-galactoside>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 443650, Delphinidin 3-glucoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Delphinidin-3-glucoside>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 176457, Idaein chloride. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Idaein-chloride>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 197081, Cyanidin 3-glucoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-glucoside>.

- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 443651, Petunidin 3-glucoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Petunidin-3-glucoside>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 14311151, Peonidin-3-O-glucoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Peonidin-3-O-glucoside>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 3568969, Malvidin-3-o-glucoside. Retrieved September 24, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malvidin-3-o-glucoside>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 160521, Isolariciresinol. Retrieved August 5, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isolariciresinol>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 72, 3,4-Dihydroxybenzoic acid. Retrieved August 21, 2020 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_4-Dihydroxybenzoic-acid.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 135, 4-Hydroxybenzoic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound

Summary for CID 5281672, Myricetin. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myricetin>.

- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5280343, Quercetin. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5280863, Kaempferol. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5089687, Prodelphinidin B. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prodelphinidin-B>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 689043, Caffeic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 637542, 4-Hydroxycinnamic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxycinnamic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound

Summary for CID 11897, 2,4-Dimethylbenzoic acid. Retrieved August 21, 2020 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dimethylbenzoic-acid.

- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5280804, Isoquercitrin. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoquercitrin>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 444539, Cinnamic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 370, Gallic acid. Retrieved August 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 12302392, Myricetin 3'-glucoside. Retrieved August 22, 2020 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myricetin-3_-glucoside.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5281643, Hyperoside. Retrieved August 22, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hyperoside>.
- Neha, Kumari, et al. "Medicinal Prospects of Antioxidants: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 178, 2019, pp. 687–704, doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.010.
- Nijveldt, Robert J., et al. "Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications." *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no. 4, 2001, pp. 418–25, doi:10.1093/ajcn/74.4.418.

- Oroian, Mircea, and Isabel Escriche. "Antioxidants: Characterization, Natural Sources, Extraction and Analysis." *Food Research International*, vol. 74, Elsevier B.V., 2015, pp. 10–36, doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018.
- Oyeyinka, Samson A., et al. "A Review on the Physicochemical Properties and Potential Food Applications of Cowpea (*Vigna Unguiculata*) Starch." *International Journal of Food Science and Technology*, 2020, pp. 1–9, doi:10.1111/ijfs.14604.
- Patricia Hernández-Rodríguez, Ludy Pabón Baquero, Harold Rodríguez Larrota, Chapter 14 - Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant - Capacity, Editor(s): Maira Rubi Segura Campos, Bioactive Compounds, Woodhead Publishing, 2019, Pages 265-288, ISBN 9780128147740, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014->
- "Plant Phenolics and Human Health." *Plant Phenolics and Human Health*, 2009, doi:10.1002/9780470531792.
- Robards, Kevin, et al. "Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Processes in Fruits." *Food Chemistry*, vol. 66, no. 4, 1999, pp. 401–36, doi:10.1016/S0308-8146(99)00093-X.
- Sebastian E.W. Opitz, Samo Smrke, Bernard A. Goodman, Chahan Yeretian, Chapter 26 - Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays, Editor(s): Victor Preedy, Processing and Impact on Antioxidants in Beverages, Academic Press, 2014, Pages 253-264, ISBN 9780124047389, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00026-X>.
- Sharma, Om P., and Tej K. Bhat. "DPPH Antioxidant Assay Revisited." *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, Elsevier Ltd, 2009, pp. 1202–05,

doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008.

- Silva, Paula, et al. "How Efficient Is Resveratrol as an Antioxidant of the Mediterranean Diet, towards Alterations during the Aging Process?" *Free Radical Research*, vol. 53, no. sup1, Taylor & Francis, 2019, pp. 1101–12, doi:10.1080/10715762.2019.1614176.
- Sombié, Pierre Alexandre Eric Djifaby, et al. "Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna Unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso." *Foods*, vol. 7, no. 9, 2018, doi:10.3390/foods7090143.
- SUN, Gui-ling. "Evolution of Metabolic Pathways." *Zoological Research*, vol. 29, no. 4, 2008, pp. 459–64, doi:10.3724/sp.j.1141.2008.00459.
- Zamora, Fernando. "Biochemistry of Alcoholic Fermentation." *Wine Chemistry and Biochemistry*, 2009, doi:10.1007/978-0-387-74118-5_1.
- Αικατερίνη Καραμανώλη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ανοιχτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα, Δευτερογενείς μεταβολίτες: βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος, Ενότητα 3: Φαινολικές Ενώσεις
<https://opencourses.auth.gr/modules/document/file.php/OCRS510/%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82/%CE%95%CE%BD%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%203.pdf>
- Το πρωτόκολλο κατασκευής του διαλύματος ABTS δόθηκε από τον κ. Χαράλαμπο Καραντώνη, Αναπληρωτή Καθηγητή, Επιβλέπων Καθηγητής