



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΙΓΑΙΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Συγκριτική μελέτη λειτουργικών ιδιοτήτων πρώτων  
υλών φυτικής προέλευσης.»



**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:**

Παυλίδου Ειρήνη

A.M. : 6112017100

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

Καραντώνης Χαράλαμπος,  
Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων

Νασοπούλου Κωνσταντίνα, Επίκουρη  
Καθηγήτρια, Μέλος

Πέτσας Ανδρέας, ΕΤΕΠ, Μέλος

Λήμνος, Ακαδημαϊκό έτος 2021-2022

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Καραντώνη Χαράλαμπο, Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη σε κάθε στάδιο εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Νασοπούλου Κωνσταντίνα (Επίκουρη Καθηγήτρια) και τον κ. Πέτσα Ανδρέα (ΕΤΕΠ) για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν.

Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και σε όλους τους οικείους μου, για την συνεχή στήριξη τους σε όλη την πορεία μου.



## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον τόσο για την μελέτη των αντιοξειδωτικών ουσιών, όσο για την ενσωμάτωσή τους στην διατροφή του ανθρώπου. Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ουσίες που έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Η ικανότητα τους αυτή συνεπάγεται με την προστασία από το οξειδωτικό στρες, καθώς και επίσης μπορούν προλαμβάνουν ή να μειώνουν πολλά συμπτώματα ασθενειών που εμφανίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ποσότητας αντιοξειδωτικών που περιέχουν τρία φυτά, συγκεκριμένα ο κράταιγος, ο κίστος και ο σιδερίτης. Δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα των παραπάνω βοτάνων και εξετάστηκαν με χρήση των μεθόδων Folin-Ciocalteu για το πολυφαινολικό τους προφίλ και με χρήση των μεθόδων DPPH, ABTS, CUPRAT και FRAP για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικά πιο υψηλές ποσότητες αντιοξειδωτικών στον σιδερίτη, σχεδόν σε όλες τις δοκιμές, ακολουθούμενος από τον κίστο. Ο κράταιγος φαίνεται να δίνει πολύ πιο χαμηλά αποτελέσματα συγκριτικά με τα άλλα δύο βότανα. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά με την προσθήκη τους σε κάποιο λειτουργικό τρόφιμο που θα αποσκοπεί, μέσω την κατανάλωσής του, σε θετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου.



## 2. Abstract

In recent years there has been considerable interest in the study of antioxidants and their incorporation into the human diet. Antioxidants are substances that have the ability to interact and neutralize free radicals. This ability involves protecting against oxidative stress and preventing or reducing many symptoms of diseases that occur in the human body. The aim of the present study was to investigate the amount of antioxidants contained in three plants, namely *Crataegus*, *Cistus incanus* and *Sideritis sardica*. Extracts of these herbs were prepared and tested using Folin-Ciocalteu methods for their polyphenolic profile and using DPPH, ABTS, CUPRAT and FRAP methods for their antioxidant capacity. The results showed that there were significantly higher amounts of antioxidants in siderite, in almost all tests, followed by *Cistus*. *Crataegus* seemed to give much lower results compared to the other two herbs. This data can be exploited in the future by adding them to a functional food that aims to have a positive effect on human's health through consumption.



## Πίνακας περιεχομένων

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	2
2. Abstract .....	3
A' ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ- ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ .....	6
1.2. Οξειδωτικό στρες.....	6
2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	8
4.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	8
4.2. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών.....	8
4.2.1. Βιταμίν.....	8
4.2.1.1. Βιταμίνη C.....	8
4.2.1.2. Βιταμίνη E .....	9
4.2.2. Καροτενοειδή.....	9
4.2.2.1. Καροτένια .....	9
4.2.2.1.1. β-καροτένιο .....	9
4.2.2.1.2. Λυκοπένιο .....	10
4.2.2.2. Υδροξυ-καροτενοειδή (ξανθοφύλλες) .....	10
4.2.3. Πολυφαινόλες.....	10
4.2.3.1. Φλαβονοειδή .....	10
4.2.3.1.1. Φλαβονόλες .....	11
4.2.3.1.2. Φλαβόνες .....	11
4.2.3.1.3. Φλαβανόνες .....	11
4.2.3.1.4. Ανθοκυανίνες .....	11
4.2.3.1.5. Ισοφλαβόνες .....	12
4.2.3.2. Φαινολικές αλκοόλες.....	12
4.2.3.3. Φαινολικά οξέα.....	12
4.2.3.4. Τανίνες.....	12
4.2.3.5. Στιλβένια.....	13
4.2.3.6. Λιγνάνες.....	13
5. Βότανα υπό διερεύνηση .....	13
5.1. Τι είναι το κάθε βότανο .....	13
5.1.1. Κράταιγος ( <i>Crataegus</i> ).....	13



5.1.2.	Κίστος ( <i>Cistus incanus</i> ).....	14
5.1.3.	Τσάι του βουνού ( <i>Sideritis ssp.</i> ).....	16
B' ΜΕΡΟΣ	.....	17
6.	Σκοπός μελέτης και Μεθοδολογία .....	17
6.1.	Σκοπό Μελέτης.....	17
6.2.	Παρασκευή δειγμάτων .....	17
6.2.1.	Διερεύνηση Ιδανικών συνθηκών εκχύλισης.....	17
6.3.	Διαδικασία παρασκευής δειγμάτων .....	18
6.4.	Περιγραφή Μεθόδων .....	20
6.4.1.	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	20
6.4.2.	Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	23
6.4.3.	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).....	26
6.4.4.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH).....	30
6.4.5.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity).....	33
6.4.6.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης εκχυλισμάτων με τη δοκιμασία FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	36
7.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	40
7.1.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ (IN-VITRO).....	40
7.1.1.	Επεξεργασία δεδομένων.....	40
7.1.2.	Μέθοδος στατιστικής ανάλυσης.....	40
7.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....	40
7.2.1.	Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Folin-Ciocalteu.....	40
7.2.2.	Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών.....	43
7.2.3.	Αντιοξειδωτική Ικανότητα (ABTS).....	45
7.2.4.	Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (DDPH).....	48
7.2.5.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (CUPRAC).....	51
7.2.6.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης (FRAP).....	54
8.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	57
9.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	59



## Α' ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ- ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ

Στον σημερινό σύγχρονο κόσμο, ο κίνδυνος πρόκλησης ασθενειών λόγω οξειδωτικού στρες επιδεινώνεται σημαντικά από τον ανθυγιεινό τρόπο ζωής που τείνει να ακολουθεί ο άνθρωπος. Ο σύγχρονος άνθρωπος αναγκάζεται λόγω των γρήγορων ρυθμών ζωής να εκτίθεται συνεχώς σε παράγοντες όπως χημικές ουσίες, ακτινοβολία, ρύπανση, κάπνισμα τσιγάρων και αλκοόλ. Επιπλέον, η συνεχής καθιστική ζωή σε συνδυασμό με κακή διατροφή και ψυχολογικό στρες μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια να προκληθεί οξειδωτικό στρες (Sen & Chakraborty, 2011). Πολλές έρευνες υποστηρίζουν ότι αυτό μπορεί να συνδέεται με μια σειρά από φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών φαινομένων που συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες όπως φλεγμονές, καρκινογένεση, τοξικότητα και πολλές άλλες ασθένειες (Sies, 2000).

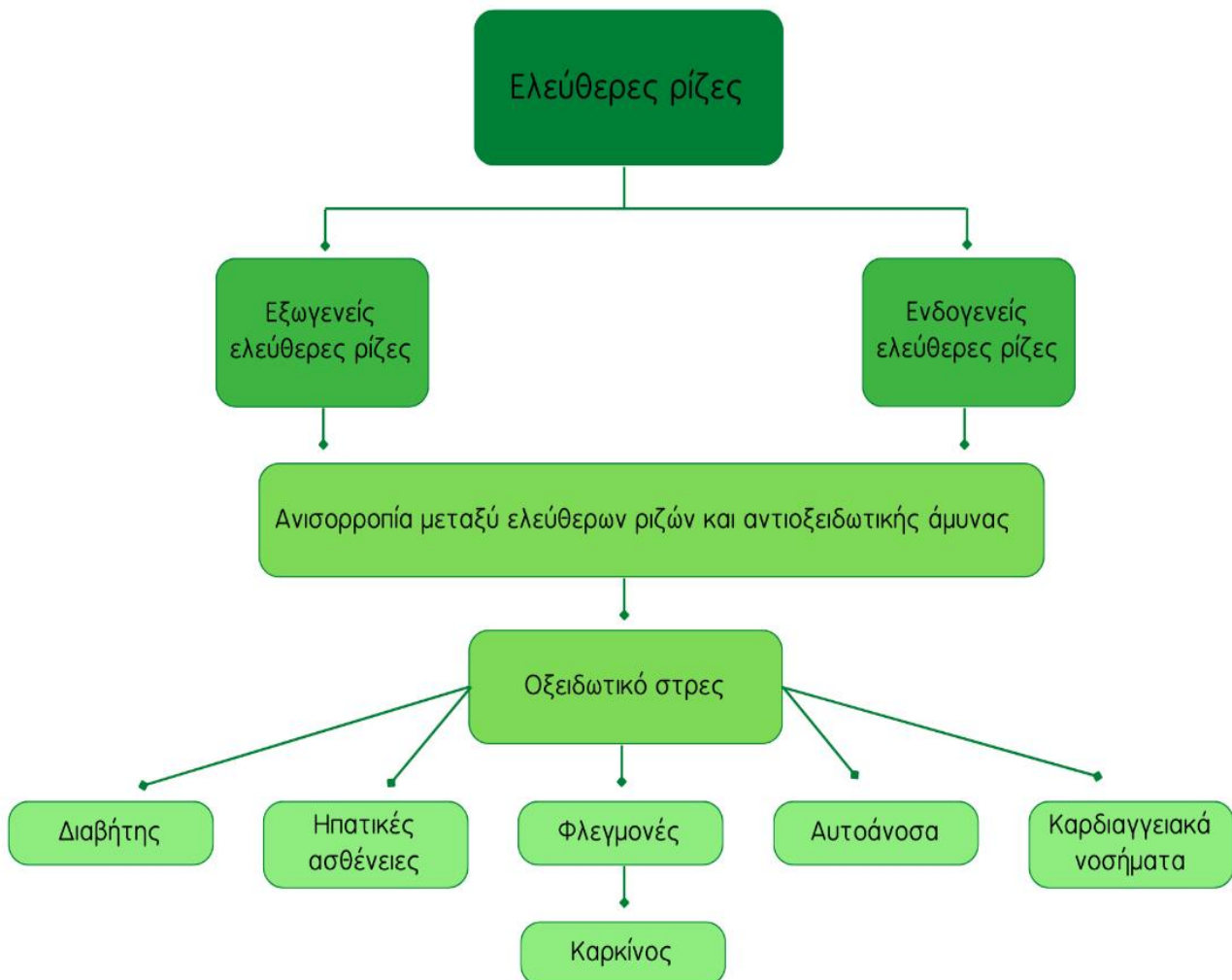
#### 1.2. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα της έλλειψη ισορροπίας μεταξύ του προ-οξειδωτικού και του αντιοξειδωτικού είδους. Τα μόρια τα οποία εμπλέκονται στην δημιουργία του οξειδωτικού στρες είναι: οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS), αζώτου (Reactive Nitrogen Species; RNS), καρβονυλίου (Reactive Carbonyl Species; RCS), καθώς και σεληνίου (Reactive Selenium Species; RSeS) (Ávila-Escalante, Fibi Coop-Gamas, Cervantes-Rodríguez, & Aranda-González, 2020). Η υπερβολική αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), που επιβεβαιώνεται με ανεπαρκή αντιοξειδωτική άμυνα ή αποτυχία του ρυθμιστικού συστήματος που έχουν τα κύτταρα για να διατηρήσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία, οδηγεί σε διάφορες μεταβολές στα βιομόρια και κατά συνέπεια σε διάφορες ασθένειες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να χαρακτηριστεί ανάλογα με την ένταση του ως φυσιολογικό οξειδωτικό στρες ή τοξικό οξειδωτικό στρες (Pisoschi, Pop, Iordache, Stanca, Predoi, & Serban, 2021) (Sies, Berndt, & Jones, 2017). Οι διάφοροι τύποι οξειδωτικού στρες μπορούν μελλοντικά να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα, συγκεκριμένα σε λιποειδικές μεμβράνες, στις πρωτεΐνες και το DNA κάτι το οποίο συνεπάγεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης



διάφορων ασθενειών όπως: καρκίνος, διαβήτης τύπου II, χρόνια νοσήματα κ.α.(Sies et al., 2017).



Διάγραμμα 1: Πιθανά αποτελέσματα ανισορροπίας μεταξύ αντιδραστικών οξυγονωμένων ειδών και της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας. (Pisoschi et al., 2021)

Έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση αντιοξειδωτικών από φυτικές και ζωικές πηγές είναι ευεργετική για την ανθρώπινη υγεία και μπορεί να μειώσει την συχνότητα ασθενειών που μπορούν να προκληθούν από τις ελεύθερες ρίζες (Sen et al., 2011).





## 2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται μπορούν να προκαλέσουν βλάβες, για αυτόν τον λόγο υπάρχει ένα εκτεταμένο φάσμα αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών είτε ενδογενών, είτε εξωγενών οι οποίοι προστατεύουν τα κυτταρικά συστήματα (Young & Woodside, 2001). Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις ή συστήματα που έχουν την δυνατότητα να αλληλοεπιδράσουν με ασφάλεια με τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να τερματίσουν την αλυσιδωτή αντίδραση πριν επέλθει καταστροφή σε ζωτικά μόρια (Oroian & Escriche, 2015).

Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες εκείνες που σε χαμηλή συγκέντρωση μπορούν να αναστέλλουν ή να καθυστερούν σε σημαντικό βαθμό την οξειδωτική διαδικασία. Τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και την προστασία του οργανισμού από αυτές (Young et al., 2001). Τα αντιοξειδωτικά έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιαθηροσκληρωτικές, καθώς επίσης έχουν την δυνατότητα να μειώσουν την συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίων καρδιοαγγειακών παθήσεων και να συμβάλλουν στην διατήρηση της υγείας του εντέρου μέσω της διαμόρφωσης της μικροβιακής ισορροπίας του (Oroian et al., 2015) (Sen et al., 2011).

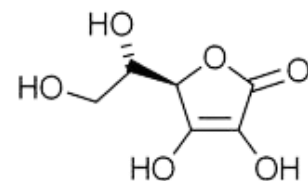
### 4.2. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών.

Αντιοξειδωτικά μπορούν να είναι διάφορες κατηγορίες ενώσεων. Οι κυριότερες κατηγορίες ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική δράση είναι: βιταμίνες (βιταμίνη C και βιταμίνη E), καροτενοειδή (καροτένια και ξανθοφύλλες) και πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, λιγνάνες και στυλβένια) (Oroian et al., 2015).

#### 4.2.1. Βιταμίνες

##### 4.2.1.1. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι από τα πλέον σημαντικά υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, το οποίο είναι αποτελεσματικό στην απομάκρυνση των ριζών υπεροξειδίου, των ριζών υδροξυλίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των RNS. Η συγκεκριμένη βιταμίνη μπορεί να



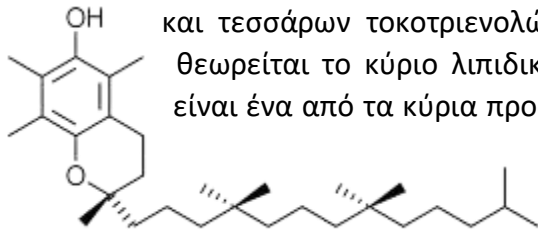
Εικόνα 1: Βιταμίνη C.



αναστείλει ή να καταλύσει την οξείδωση (Oroian et al., 2015). Έχει προταθεί ως ευεργετική για την αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης, καθώς και την μείωση της οξειδωτικής βλάβης (Shahkar et al., 2015). Κάποιες πηγές βιταμίνης C είναι η μπανάνα, το μήλο, το μπρόκολο, οι φλούδες εσπεριδοειδών, το σκόρδο και η μέντα.

#### 4.2.1.2. Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E στην πραγματικότητα πρόκειται για μία ομάδα χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες. Ο συνδυασμός τεσσάρων τοκοφερολών και τεσσάρων τοκοτριενολών παρουσιάζει τη βιταμινική δράση. Γενικότερα θεωρείται το κύριο λιπιδικό αντιοξειδωτικό στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι ένα από τα κύρια προστατευτικά μόρια κατά της οξειδωτικής αλλοίωσης των μεμβρανών των κυττάρων και των οργανιδίων κυρίως από τις ROS. Μερικές πηγές της βιταμίνης E είναι το πράσινο τσάι, οι σπόροι κολοκύθας, οι ελιές, το ελαιόλαδο και ηλιόσποροι (Shahkar et al., 2015).



Εικόνα 2: α-τοκοφερόλη.

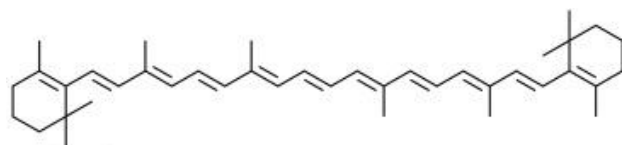
#### 4.2.2. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή πρόκειται για φυσικές χρωστικές ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση μιας ευρείας ποικιλίας δραστικών ριζικών ενώσεων. Υπάρχουν πάνω από 60 είδη καροτενοειδών που εμφανίζονται στα φρούτα και λαχανικά, καταναλώνονται από τον άνθρωπο και έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην μείωση του κινδύνου διαφόρων ασθενειών, όπως ορισμένοι καρκίνοι και οφθαλμικές παθήσεις (Jomona & Valko, 2013) (Krinsky & Johnson, 2005). Κάποιες από τις πηγές των καροτενοειδών είναι τα δημητριακά, ο χυμός πορτοκαλιού, το σέλινο, ο βασιλικός και ο δυόσμος (Oroian et al., 2015).

##### 4.2.2.1. Καροτένια

###### 4.2.2.1.1. β-καροτένιο

Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή προβιταμίνη που αποτελείται από δυο ομάδες ρετινυλίου και πρόκειται για ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορεί να αναστείλει την οξείδωση των λιπιδίων. Το β-καροτένιο σχετίζεται με θετική επίδραση σε ορισμένους τύπους καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Σημαντικές πηγές του είναι: ο αμάραντος, τα σκούρα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, τα κόκκινα καρότα και η γλυκοπατάτα (Oroian et al., 2015).

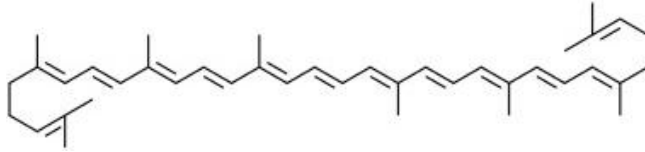


Εικόνα 3: β-καροτένιο.



#### 4.2.2.1.2. Λυκοπένιο

Το λυκοπένιο πρόκειται για μία φυσική κόκκινη καροτενοειδής χρωστική ουσία που βρίσκεται στις ντομάτες, το ροζ γκρέιπφρουτ, το καρπούζι και πολλά άλλα φρούτα και λαχανικά. Έχει συνδεθεί με πολλές ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία. Αποτελεί ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό που έχει την ιδιότητα να προκαλεί απόσβεση του οξυγόνου,

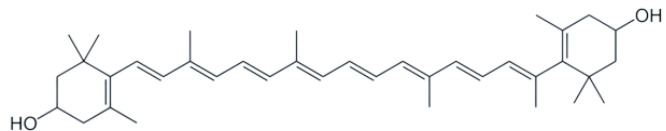


Εικόνα 4: Λυκοπένιο.

καθώς και την ικανότητα να παγιδεύει υπεροξυλικές ρίζες. Δείχνει να είναι ευεργετικό απέναντι στην νόσο Αλτσχάιμερ, μπορεί να ρυθμίσει την οστεοπόρωση και να μειώσει τον νευροπαθητικό πόνο (Kumar, Elango, Asmathulla, & Kavimani, 2017).

#### 4.2.2.2. Υδροξυ-καροτενοειδή (ξανθοφύλλες)

Οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα καροτενοειδή που δημιουργούνται στα πλαστίδια και συνήθως βρίσκονται στις κίτρινες χρωστικές των φύλλων. Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη είναι δύο δομικά ισομερή και έχουν συνδεθεί στενά με την υγεία της όρασης και φαίνεται να εμπλέκονται στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Πηγές της συγκεκριμένης ουσίες είναι το σπανάκι, το καλέ, η Ζέα και το καρότο (Oroian et al., 2015).



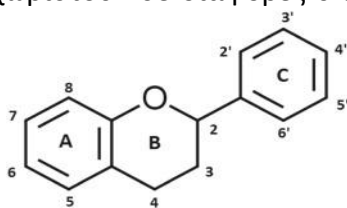
Εικόνα 5: Ζεαξανθίνη.

#### 4.2.3. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες υπάρχουν διασκορπισμένες σε όλο το φυτικό βασίλειο και κατά συνέπεια αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Έχουν την ικανότητα να ασκήσουν άμεση και έμμεση αντιοξειδωτική δράση, καθώς προστατεύουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα του ανθρώπινου σώματος. Οι ομάδες πολυφαινολών αναπτύσσονται στην συνέχεια.

##### 4.2.3.1. Φλαβονοειδή

Πρόκειται για φυσικές χρωστικές που είναι άφθονες στην φύση. Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες υποκατηγορίες όπως: φλαβονόλες, φλαβανόλες (φλαβαν-3-όλες ή κατεχίνες), ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες. Η πρόσληψη φλαβονοειδών σχετίζεται αντιστρόφως με τον καρκίνο (Chen & Chen, 2013). Κάποιες από τις πηγές τους είναι οι σπόροι, το μέλι, ο χυμός πορτοκαλιού και τα φύλλα στέβιας (Oroian et al., 2015). Μερικές από τις υποκατηγορίες τους αναπτύσσονται παρακάτω.

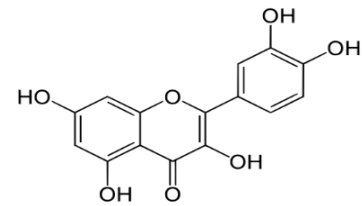


Εικόνα 6: Χημική δομή φλαβονοειδών.



#### 4.2.3.1.1. Φλαβονόλες

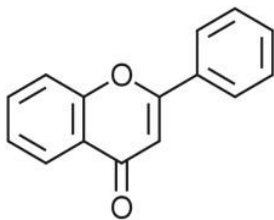
Μετά από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η κερκετίνη που υπάρχει στα κρεμμύδια μπορεί να παρουσιάσει αντιφλεγμονώδη, αντιϊκή δράση και να αποτρέψει τις καρδιαγγειακές παθήσεις στον άνθρωπο. Πηγή τους είναι το πράσινο τσάι, το κρασί, το πράσινο φραγκοστάφυλο, ο μάραθος και το κρεμμύδι (Oroian et al., 2015).



Εικόνα 7: Κερκετίνη.

#### 4.2.3.1.2. Φλαβόνες

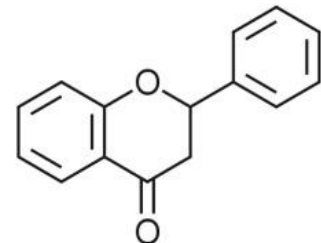
Η αναγνώριση τους πραγματοποιείται από την θέση της υδροξυλικής ομάδας στον δακτύλιο C και τα τμήματα του σακχάρου από το οποίο αποτελείται είναι η γλυκόζη, η ραμνόζη, η λακτόζη και η αραβινόζη. Οι κύριες διαιτητικές φλαβονόλες είναι: η κερκετίνη, η μυρικετίνη, η ρουτίνη, η ισοραμετίνη και η καμπφερόλη (Oroian et al., 2015). Οι φλαβόνες έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες και χρησιμοποιούνται συχνά κατά των καρκίνων, καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλων διαταραχών του ανθρώπινου οργανισμού (Singh, Kaur, & Silakari, 2014).



Εικόνα 8: Χημική δομή Φλαβονών.

#### 4.2.3.1.3. Φλαβανόνες

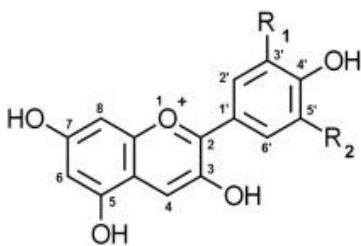
Οι φλαβανόνες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών που έχουν παρόμοια δομή με τις φλαβόνες, με μόνη διαφορά έναν διπλό δεσμό στην θέση 2-3. Οι κύριες φλαβανόνες είναι η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η ισοραμετίνη (Hollman & Arts, 2000). Η κατανάλωση τους μπορεί να έχει αντιοξειδωτική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη και αντι-αθηρογόνα δράση. Κάποιες πηγές από τις οποίες μπορούν να προσληφθούν οι φλαβανόνες είναι διάφορα εσπεριδοειδή (λάιμ, λεμόνια, πορτοκάλι), ξεφλουδισμένη σόγια και μαύρα σόργα (Oroian et al., 2015).



Εικόνα 9: Χημική δομή Φλαβανονώνων.

#### 4.2.3.1.4. Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη ομάδα χρωστικών στην φύση και είναι υπεύθυνη για το χρώμα σε πολλά φρούτα και λουλούδια. Έχει βρεθεί ότι ασκούν ευεργετικές επιδράσεις στον άνθρωπο, έχουν αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση και μπορεί η χορήγηση τους να μειώσει την απόπτωση, τον διαβήτη και τα συμπτώματα της παχυσαρκίας. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό τους εξαρτάται από την χημική δομή του μορίου. Πηγές των ανθοκυανινών είναι τα σταφύλια, οι ντομάτες, το κόκκινο λάχανο, οι γλυκοπατάτες, το κρασί και πολλά άλλα φρούτα και λαχανικά. (Oroian et al., 2015).

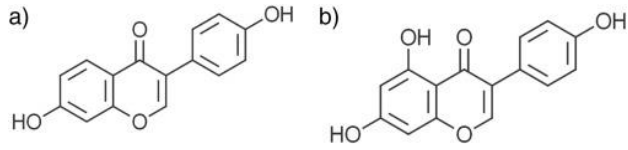


Εικόνα 10: Χημική δομή Ανθοκυανινών.



#### 4.2.3.1.5. Ισοφλαβόνες

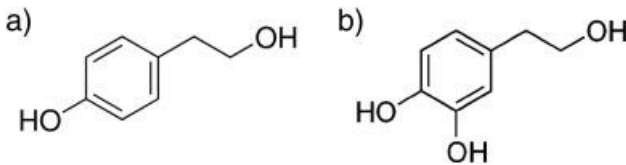
Οι ισοφλαβόνες έχει βρεθεί ότι έχουν μεγάλο φάσμα οφελών στο ανθρώπινο σώμα, όπως είναι για παράδειγμα η μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, των μετεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων ή του καρκίνου. Κάποια φρούτα και λαχανικά από τα οποία μπορεί να προσληφθεί είναι η σόγια, οι φακές (πράσινες, κίτρινες, κόκκινες) και τα ρεβίθια (Oroian et al., 2015).



Εικόνα 11: a) δαϊδζεΐνη, b) γενιστεΐνη.

#### 4.2.3.2. Φαινολικές αλκοόλες

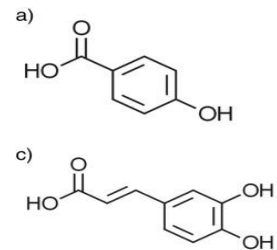
Παρουσιάζουν σημαντική δράση έναντι της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προστατεύσουν τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα και το DNA από διάφορες οξειδωτικές βλάβες. Πηγές τους μπορεί να είναι οι ελιές, το ελαιόλαδο, καθώς και λύματα ελαιοτριβείων (Oroian et al., 2015).



Εικόνα 12 : a) τυροσόλη, b) υδροξυτυροσόλη.

#### 4.2.3.3. Φαινολικά οξέα

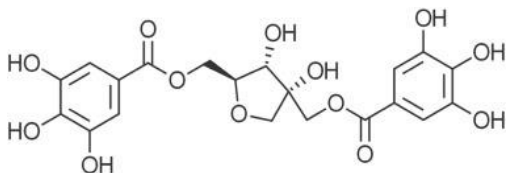
Πρόκειται για φαινόλες που διαθέτουν μια λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Το πρόσφατο ενδιαφέρον για τα φαινολικά οξέα σχετίζεται με τον προστατευτικό τους ρόλο από διάφορες ασθένειες οξειδωτικής βλάβης όπως είναι η στεφανιαία νόσος, το εγκεφαλικό και οι διάφοροι τύποι καρκίνου (Robbins, 2003). Πηγές αυτών των οξέων είναι το αποξηραμένο τζίντζερ, η μουστάρδα, διάφορα μπαχαρικά και ο μάραθος. (Oroian et al., 2015).



Εικόνα 13:  
a) π-υδροξυβενζοϊκό οξύ,  
c) καφεϊκό οξύ.

#### 4.2.3.4. Τανίνες

Οι τανίνες είναι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε πολλά φυτικά τρόφιμα και μπορούν να βρίσκονται σε μορφή συμπυκνωμένη ή υδρολυόμενη. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την διατροφή λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους και των πιθανών προστατευτικών επιδράσεων που μπορεί να έχουν στον άνθρωπο. Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση τους έχει αντιθρομβωτικά, αντιμεταλλαξιογόνα, αντιδιαβητικά και αντικαρκινικά αποτελέσματα. Διάφορες πηγές τους είναι οι πράσινοι κόκκοι καφέ, οι φράουλες, τα ρόδια, τα καρύδια και το ουίσκι (Oroian et al., 2015)(Oszmianski, Wojdylo, Lamer-Zarawska, & Swiader, 2007).

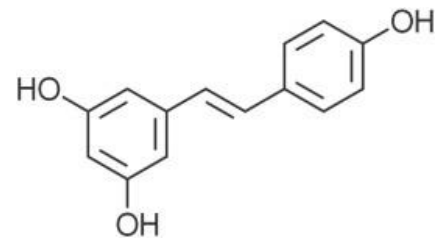


Εικόνα 14: Αμαμελιτανίνη.



#### 4.2.3.5. Στυλβένια

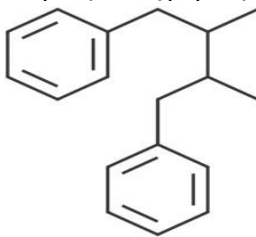
Πρόκειται για μια κατηγορία φυτικών πολυφαινολών που παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον στην έρευνα και ανάπτυξη φαρμάκων λόγω των θεραπευτικών ή προληπτικών εφαρμογών τους. Έχει βρεθεί ότι έχουν δείξει ποικίλες βιοδραστηριότητες που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, ηπατοπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μερικές από τις πηγές τους είναι τα αμύγδαλα, η σοκολάτα και το κακάο (Oroian et al., 2015) (Shen, Wang, & Lou, 2009).



Εικόνα 15: *Trans* ρεσβερατρόλη.

#### 4.2.3.6. Λιγνάνες

Ταξινομούνται ως φαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και έχουν δυο κύριες κατηγορίες: τις λιγνάνες και τις νεολιγνάνες. Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για αυτά τα παράγωγα οφείλεται στα οφέλη τους στην υγεία που έχουν σχέση με τις αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιϊκές ιδιότητες. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική λειτουργία του παχέος εντέρου και αναστέλλουν ή καθυστερούν την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Μπορούν να προσληφθούν από μπαχαρικά, ρίζες, φύλλα, σπόρους και πολλά φρούτα και λαχανικά (Consonni & Ottolina, 2022).



Εικόνα 16: Χημική δομή Λιγνανών.

## 5. Βότανα υπό διερεύνηση

### 5.1. Τι είναι το κάθε βότανο

#### 5.1.1. Κράταιγος (*Crataegus*)

Ο *Crataegus* τοποθετείται σε έναν κλάδο γενών εντός των *Rosaceae* που παραδοσιακά αναφέρεται ως υποοικογένεια *Maloideae* και φαίνεται ότι παγκοσμίως υπάρχουν 150-200 είδη του. Αυτή η κατανομή του γίνεται λόγω των σαρκωδών δρεπανοειδών καρπών που παράγει. Κάποια από τα χαρακτηριστικά ονόματα με τα οποία είναι γνωστό το συγκεκριμένο φυτό είναι: τρικοκκιά, μουρζιά, μπουρμπουτζελιά, ξανθή τσαπουρνιά, τσιατσιά και ξαγκαθιά. Πρόκειται για ένα εγγενές φυτό το οποίο αναπτύσσεται στις βόρειες εύκρατες ζώνες που περιλαμβάνουν την Βόρεια Αμερική, την Ανατολική Ασία, την Κεντρική Ασία και την Ευρώπη. Ο Κράταιγος έχει μορφή μεγάλου θάμνου ή μικρού δέντρου, είναι συνήθως θωρακισμένοι με αγκάθια και μπορεί να έχει ύψος 5 με 15 μέτρα. Αποτελούνται από φωτεινά έως σκούρα πράσινα φύλλα και παράγουν λευκά λουλούδια τα οποία μετατρέπονται σε μούρα με χρώμα από κίτρινο έως έντονο κόκκινο και μαύρο (Edwards, Brown, Talent, Dickinson, & Shipley, 2012).







Εικόνα 17: Απεικόνιση φυτού Κράταιγου.

Έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση των φλαβονοειδών και των προανθοκυανιδινών οι οποίες περιέχονται στο φυτό του κράταιγου εξαρτώνται σημαντικά από διάφορους παράγοντες όπως το περιβάλλον, η εποχή του χρόνου που πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή, ο τύπος του ιστού και το είδος. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί με μετρήσεις ότι η συγκέντρωση αυτών των ουσιών μειώνονται στην εξέλιξη των ανθέων σε λουλούδια, καθώς και επίσης μείωση παρατηρείται και κατά την μετατροπή του καρπού από πράσινο σε κόκκινα. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλότερες πριν το φυτό ανθίσει σε σχέση με όταν οι καρποί του κράταιγου είναι ώριμοι. Επιπλέον, διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των παραπάνω ουσιών παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα αποτελέσματα φυτών που προέρχονταν από διαφορετική γεωγραφική θέση ή από διαφορετική ποικιλία, καθώς και από το είδος του διαλύτη (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη) με τον οποίο γίνεται η εκχύλιση τους (Li, Fu, Huang, Zhang, Cui, Zhang, Ma, et al., 2022)(Edwards et al., 2012).

Από μελέτες έχει προκύψει το ότι ο κράταιγος είναι πλούσιος σε φαινολικά, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και πηκτίνη. Συνεπάγεται λοιπόν, λόγω της αφθονίας αυτών των ουσιών, ότι ο κράταιγος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα (λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα, φάρμακα) που στοχεύουν στην πρόληψη ή την βελτίωση οξειδωτικών ασθενειών και να επιφέρει διάφορες ωφέλιμες λειτουργίες στην υγεία του ανθρώπου. Μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων, παθήσεων του ήπατος και της καρδιάς, καθώς και της παχυσαρκία. Η κατανάλωση του μπορεί να επιφέρει επίσης αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά και αντιδιαβητικά αποτελέσματα, μπορεί να βελτιώσει την γνωστική δυσλειτουργία, την μνήμη και τη διαδικασία της μάθησης (Li et al., 2022)(Alirezalu, Salehi, Ahmadi, Sonboli, Aceto, Maleki, & Ayyari, 2018).

### 5.1.2. Κίστος (*Cistus incanus*)

Ο κίστος αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά γένη μιας σειράς φυτών, των *Cistaceae*, που περιλαμβάνει ποώδη φυτά και θάμνους οκτώ γενεών και 175 ειδών. Εναλλακτικές



ονομασίες του φυτού με τις οποίες είναι γνωστό είναι: Λάβδανο ή Λάδανο ή Κουνούκλα. Ο κίστος αναπτύσσεται συνήθως σε υποβαθμισμένες περιοχές στην περιοχή της Μεσογείου και σύμφωνα με την παραδοσιακή λαϊκή ιατρική βρίσκει εφαρμογή σε προϊόντα που έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση, συμβάλλει στην επούλωση των πληγών και μπορεί να προστεθεί σε κυτταροτοξικά και αγγειοδιασταλτικά φάρμακα. Αυτό συμβαίνει γιατί έχει βρεθεί ότι κύριο συστατικό αυτού του φυσικού φαρμάκου είναι οι φαινολικές ενώσεις (Gaweł-Bęben, Kukula-Koch, Hoian, Czop, Strzepak-Gomółka, & Antosiewicz, 2020).



Εικόνα 18: Απεικόνιση φυτού Κίστου.

Τα φυτά που περιλαμβάνονται στο γένος *Cistus* είναι κυρίαρχοι θάμνοι που βρίσκονται σε ξηρά ή βραχώδη εδάφη σε περιοχές της Μεσογείου, το Μαρόκο, την Πορτογαλία, τη Μέση Ανατολή, αλλά και στα Κανάρια Νησιά. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελείται από είδη που έχουν ευρεία κατανομή, όμως υπάρχουν και κάποια που είναι ενδημικά και που ανήκουν στην οικογένεια *Cistaceae* L. . Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει φαρμακευτικά φυτά με οκτώ γένη, ανάμεσα τους και το γένος *Cistus*. Το γένος αυτό είναι σχετικά μικρό και πολύπλοκο φυτό λόγω του πολυμορφισμού και του υβριδισμού που υπάρχει μεταξύ των ειδών του (Zalegh, Akssira, Bourhia, Mellouki, Rhallabi, Salamatullah, Alkaltham, et al., 2021).

Οι μελέτες δείχνουν ότι πρόκειται για ένα φυτό το οποίο είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, γαλλικό οξύ, ρουτίνη και ισοκερκετίνη. Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι ουσίες όπως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή είναι σταθερές κατά την διάρκεια θερμικών επεξεργασιών, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα κάποιων ενώσεων (το χλωρογενικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το φερουλικό οξύ) και αυτό μπορεί να αποδοθεί στον διαφορετικό διαλύτη που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση για την εκχύλιση τους (Zalegh et al., 2021). Αποτελέσματα έρευνας για το βότανο *C. Incanus* έδειξε ότι η εκχύλιση με χρήση διαφορετικού τύπου νερού μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποσότητα και την ποιότητα των φαινολικών ενώσεων που θα απομονωθούν. Συγκεκριμένα, η χρήση νερού με υψηλό βαθμό συνολικής σκληρότητας, έδωσε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και κατά συνέπεια και σημαντικά μειωμένες αντιοξειδωτικές ικανότητες (Riehle, Vollmer, & Rohn, 2013).





### 5.1.3. Τσάι του βουνού (*Sideritis ssp.*)

Το φυτό σιδερίτης (*Sideritis spp.*) είναι ένα ενδημικό φυτό της αλπικής ζώνης της Βαλκανικής Χερσονήσου. Κάποιες από τις ονομασίες με τις οποίες είναι γνωστό είναι: «Τσάι του βουνού», «Τσάι του Ποιμενικού», «Τσάι του Ολύμπου», «Τσάι Pirinki», «Ironwort», και «Τσάι Mursalski» (Todorova & Trendafilova, 2014). Πρόκειται για ένα τριχωτό φυτό που έχει μορφή θάμνου με κίτρινα άνθη που ανθίζουν στο στέλεχος και αναπτύσσεται σε μεγάλο υψόμετρο (Moussavi, Azizullah, Malterud, Inngjerdigen, & Wangensteen, 2022).



Εικόνα 19: Απεικόνιση φυτού Σιδερίτη.

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια *Labiatae* και περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη που αναπτύσσονται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές του Βόρειου Ημισφαιρίου, από τις Μπαχάμες έως τη Δυτική Κίνα και από τη Γερμανία έως το Μαρόκο. Το συγκεκριμένο βότανο είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, οι συγκεντρώσεις των οποίων διαφέρουν μεταξύ τους. Οι διαφορές αυτές μπορούν να παρατηρηθούν σε φυτά που ανήκουν σε διαφορετικό υβρίδιο, καθώς και σε φυτά που έχει γίνει συγκομιδή του σε διαφορετική εποχή. Για παράδειγμα, ένα φλαβονοειδές που απομονώθηκε από τα εναέρια μέρη *Sideritis tugronensis* έδειξε μέγιστα επίπεδα στις αρχές του καλοκαιριού (González-Burgos, Carretero, & Gómez-Serranillos, 2011).

Ο σιδερίτης χρησιμοποιείται ευρέως στην βοτανοθεραπεία και ως αφέψημα. Η κατανάλωση του σε μορφή είτε εκχυλισμάτων, είτε συμπληρωμάτων διατροφής έχει βρεθεί ότι μπορεί να συμβάλει στην θεραπεία διάφορων φλεγμονών και ασθενειών (Todorova et al., 2014). Το φυτό έχει βρεθεί μετά από μελέτες ότι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις από φαινολικών ενώσεων, τερπενοειδών και υδατανθράκων οι οποίες έχουν προταθεί ότι είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή και αντικαρκινική δράση, καθώς και για την θεραπεία από καρδιαγγειακές παθήσεις (Oalđe et al., 2021).



## Β' ΜΕΡΟΣ

### 6. Σκοπός μελέτης και Μεθοδολογία

#### 6.1. Σκοπό Μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστούν τα ολικά φαινολικά, τα ολικά φλαβονοειδή και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα τριών διαφορετικών βοτάνων που φαίνεται να εμφανίζουν ερευνητικό ενδιαφέρον, συμπέρασμα που προέκυψε μετά από βιβλιογραφική έρευνα.

#### 6.2. Παρασκευή δειγμάτων

##### 6.2.1. Διερεύνηση Ιδανικών συνθηκών εκχύλισης

Πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα σειρά πειραμάτων με σκοπό την διερεύνηση και επιλογή των ιδανικών συνθηκών για την εκχύλιση κάθε δείγματος κατά τις οποίες η εκχύλιση θα δώσει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών. Μελετήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συνθήκες που σχετίζονται με τη θερμοκρασία, την κινητική χρόνου, την αναλογία διαλυτών ( Αιθανόλη- Απιονισμένο νερό) και την αναλογία στερεού (βότανο) με υγρό (διαλύτης).

##### Κράταιγος

Για τον κράταιγο μελετήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες έτσι ώστε να βρεθεί κάτω από ποιον συνδυασμό αυτών το φυτό δίνει καλύτερα αποτελέσματα συγκεντρώσεων των συστατικών του που μας ενδιαφέρουν. Συγκεκριμένα οι συνθήκες που ελέγχθηκαν είναι:

- ✚ για την θερμοκρασία: 40 , 60 , 70 (°C)
- ✚ για την κινητική χρόνου: 7.5 , 15 , 30 , 45 , 60 (min)
- ✚ για αναλογία διαλυτών C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/dH<sub>2</sub>O: 0%/100% , 100%/0% , 25%/75% , 75%/25% , 50%/50%
- ✚ για αναλογία στερεού-υγρού: 1/20 , 1/40 , 1/60 , 1/80 , 1/100

##### Κίστος

Για τον κίστο μελετήθηκαν οι συνθήκες που ακολουθούν για να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης του:

- ✚ για την θερμοκρασία: 40 , 60 , 70 (°C)
- ✚ για την κινητική χρόνου: 7.5 , 15 , 30 , 45 , 60 (min)
- ✚ για αναλογία διαλυτών C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/dH<sub>2</sub>O: 0%/100% , 100% , 25%/75% , 75%/25% , 50%/50%
- ✚ για αναλογία στερεού-υγρού: 1/20 , 1/40 , 1/60 , 1/80 , 1/100



### Σιδερίτης

Για τον σιδερίτη μελετήθηκαν οι συνθήκες που ακολουθούν για να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης του:

- ✚ για την θερμοκρασία: 40 , 60 , 70 (°C)
- ✚ για την κινητική χρόνου: 7.5 , 15 , 30 , 45 , 60 (min)
- ✚ για αναλογία διαλυτών C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/dH<sub>2</sub>O: 0%/100% , 100%/0% , 25%/75% , 75%/25% , 50%/50%
- ✚ για αναλογία στερεού-υγρού: 1/20 , 1/40 , 1/60 , 1/80

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε βότανο με τον υπολογισμό του IC<sub>50</sub>, τιμή που ταυτίζεται με την ποσότητα του εκχυλίσματος κάθε πρώτης ύλης που δεσμεύει κατά 50% την ελεύθερη ρίζα του ABTS. Οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης που προέκυψαν για κάθε δείγμα υπό εξέταση καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Ιδανικές συνθήκες εκχύλισης φυτών.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ/ΔΕΙΓΜΑ	ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	ΚΙΣΤΟΣ	ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ
Θερμοκρασία (°C)	70	70	60
Χρόνος (minutes)	45	30	60
Αναλογία διαλύτη (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/dH <sub>2</sub> O) (%)	50/50	50/50	25/75
Αναλογία στερεού-υγρού	1/20	1/20	1/20

### 6.3. Διαδικασία παρασκευής δειγμάτων

Για την παρασκευή των δειγμάτων πραγματοποιούνται τα παρακάτω βήματα, όπου δημιουργούνται τα εκχυλίσματα που θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για μέτρηση αντιοξειδωτικών. Τα παρακάτω βήματα εκτελούνται για κάθε βότανο ξεχωριστά.

- 1) Τα βότανα συλλέγονται και πραγματοποιείται ξήρανση τους.
- 2) Τα δείγματα αλέσθηκαν με χρήση οικιακού πολυκόφτη για να δημιουργηθεί ομοιόμορφη πρώτη ύλη. Τα βότανα κράταιγος και κίστος είχαν τελική μορφή πούδρας, ενώ ο σιδερίτης λόγω της μορφής του αρχικού φυτού μετά από την άλεση του ήταν ένα μίγμα πούδρας και χνουδιού. Ο κράταιγος που χρησιμοποιήθηκε είχε υποστεί αφαίρεση του κουκουτσιού του.



- 3) Οι ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα μετρήθηκαν με χρήση ζυγού ακριβείας και προστέθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια.
- 4) Έγινε προσθήκη των κατάλληλων όγκων και αναλογιών των διαλυτών (αιθανόλη και απιονισμένο νερό) με χρήση γυάλινων σιφονιών των 5 και 10 ml.
- 5) Τα σωληνάκια σφραγίστηκαν και για να εξασφαλιστεί ότι δεν θα υπάρχει εξάτμιση των υγρών τα καπάκια ασφαλίστηκαν με χρήση parafilm.
- 6) Τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων και παρέμειναν σε συνθήκες που αναγράφονται στον Πίνακα 2.
- 7) Μετά το πέρας των απαιτούμενων χρονικών διαστημάτων για την εκχύλιση, πραγματοποιήθηκε διήθηση μόνο των δειγμάτων του σιδεριτή, καθώς η μορφή του στερεού από κάθε δείγμα δεν καθιζάνει επιτυχώς με φυγοκέντρηση.
- 8) Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε erpedorf των 2 ml και τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 10 min σε 20000 rcf στους 4°C.
- 9) Αφού ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση η υγρή μορφή των δειγμάτων μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια μικρού όγκου (τύπου erpedorf).
- 10) Τα τελικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση αντιοξειδωτικών με μεθόδους που αναλύονται στην συνέχεια.

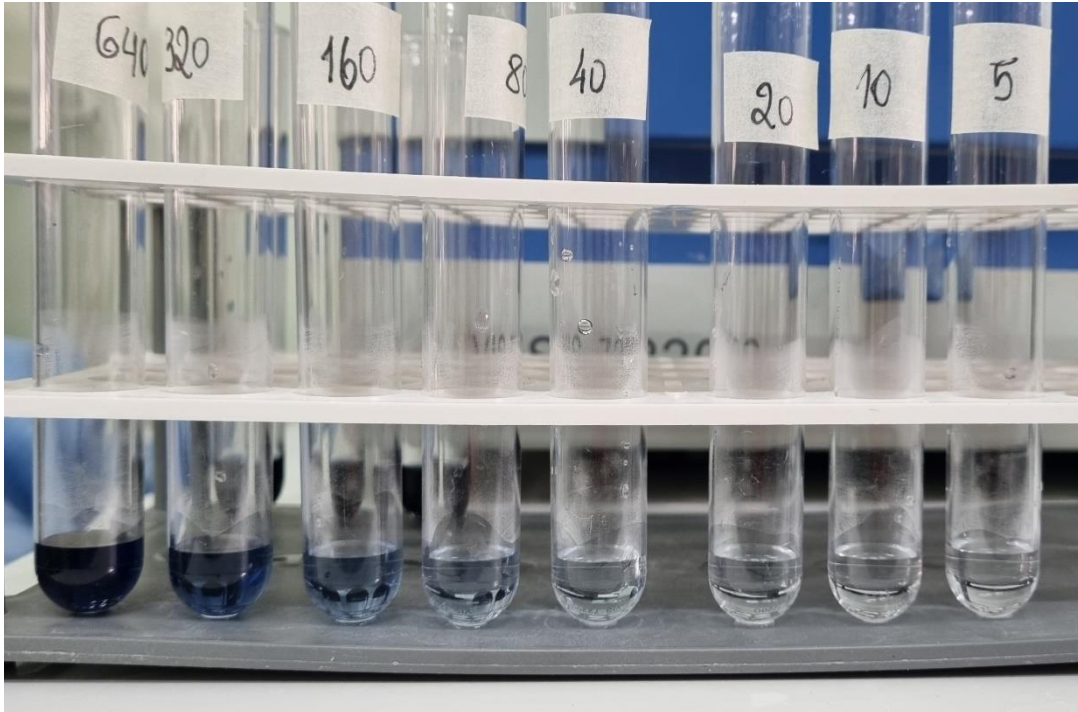
Πίνακας 2: Συνθήκες εκχύλισης φυτών.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ/ΔΕΙΓΜΑ		ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	ΚΙΣΤΟΣ	ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ
Θερμοκρασία (°C)		70	70	60
Χρόνος (minutes)		45	30	60
Αναλογία διαλύτη (ml)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	5	5	2,5
	dH <sub>2</sub> O	5	5	7,5
m <sub>δειγματος</sub> (gr)		1/20	1/20	1/20



## 6.4. Περιγραφή Μεθόδων

### 6.4.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu



Εικόνα 20: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού ολικών φαινολικών.

#### **Σκοπός**

Σκοπός της μεθόδου είναι η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φαινολικών συστατικών των υπό μελέτη δειγμάτων.

#### **Αρχή Μεθόδου**

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) είναι μια διαδικασία φασματοφωτομετρίας που βασίζεται σε μια χημική αναγωγή του ομόλογου αντιδραστηρίου (FC) που αποτελείται από ένα μίγμα οξειδίων βολφραμίου και μολυβδαινίου. Τα προϊόντα τα οποία προκύπτουν από την αναγωγή των οξειδίων των παραπάνω μετάλλων δίνουν ένα μπλε χρώμα το οποίο δίνει μία ευρεία απορρόφηση φωτός με μέγιστο στα 765nm.

Η μέθοδος FC χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών. Η αργή ανάπτυξη χρώματος μπορεί να επιταχυνθεί με την θέρμανση του δείγματος που διερευνάται, όμως αυτή δεν θα πρέπει να είναι υπερβολική καθώς σε αυτήν την περίπτωση υπάρχει απώλεια χρώματος και η μέτρηση των αναπαραγωγικών αποτελεσμάτων δεν θα είναι δυνατή (Singleton & Rossi, 1965).



### Υλικά και αντιδραστήρια

- 1) Γαλλικό οξύ (M.W: 170.12 g/mol)
- 2) Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) \*(Αποθηκεύεται σε σκοτεινό μέρος ή και σκουρόχρωμη φιάλη και τα δείγματα απορρίπτονται εάν γίνουν εμφανώς πράσινα)
- 3) Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (M.W: 105.99 g/mol)
- 4) Απιονισμένο νερό ( $\text{dH}_2\text{O}$ )
- 5) Δείγματα (Σιδερίτης, Κράταιγος, Κίστος)

### Όργανα και Εξοπλισμός

- 1) Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-5 mL και 5-50  $\mu\text{L}$
- 2) Αυτόματη πιπέτα σταθερού όγκου 100  $\mu\text{L}$
- 3) Κυλοαναδευτήρας (Vortex)
- 4) Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- 5) Ποτήρια ζέσεως
- 6) Πλαστικές κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm και όγκου (1mL)
- 7) Ρύγχη αυτόματων πιπετών
- 8) Σπάτουλα ζύγισης
- 9) Σιφώνιο του 1,0 mL
- 10) Στατώ
- 11) Τράπεζα ανακίνησης/ανάδευσης (shaker)
- 12) Υδατόλουτρο
- 13) Υδροβολέας
- 14) Φασματοφωτόμετρο (765nm)

### Παρασκευή διαλυμάτων

#### **Γαλλικό Οξύ (Gallic acid; GA) (MW: 170.12 g/mol)**

Ποσότητα 0,025 g γαλλικού οξέος διαλύεται σε 0,5 mL αιθανόλης και το όλο αραιώνεται ως τελικού όγκου 5,0 mL με  $\text{dH}_2\text{O}$  δίνοντας τελική συγκέντρωση 5000 mg/L.

#### **Διάλυμα Ανθρακικού Νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )**

Ποσότητα 200 g άνυδρου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  διαλύονται σε 800 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και το όλο φέρεται σε βρασμό. Αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται λίγοι κρύσταλλοι  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και αφήνεται για 24h. Ακολουθεί διήθηση σε ογκομετρική φυάλη του 1 L όπου και συμπληρώνεται ως τη χαραγή με  $\text{dH}_2\text{O}$  και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **Πρότυπα διαλύματα**

Χρησιμοποιώντας το διάλυμα φύλαξης του πρότυπου γαλλικού οξέος (GA) συγκέντρωσης 5000 mg/L παρασκευάζονται σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400 και 800 mg/L σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακας 3.





**Πειραματική πορεία**

1. Σε 5 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 10 μL από το πρότυπο διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης που παρασκευάστηκε με βάση τον Πίνακα 3. Προκύπτουν Τα διαλύματα Π1, Π2, Π3, Π4, Π5, Π6, Π7, Π8.
2. Χρησιμοποιείται επιπλέον ακόμη ένας δοκιμαστικός σωλήνας για να παρασκευαστεί το τυφλό διάλυμα.
3. Σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε 10 μL από το βότανο το οποίο μελετάτε, προς υπολογισμό φαινολικών.
4. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 900 μL.
5. Προστίθεται σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 50 μl αντιδραστηρίου FC.
6. Πραγματοποιείται ανάδευση με χρήση του Vortex.
7. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε σκοτεινό μέρος (Η επώαση δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 8 λεπτά).
8. Γίνεται προσθήκη 150 μL κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
9. Πραγματοποιείται εκ νέου ανάδευση με το Vortex.
10. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 40°C.
11. Πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση στα 765 nm.
12. Πραγματοποιείται αραιώση των δειγμάτων κατά 1/10 (20μL δείγματος, 180μL dH<sub>2</sub>O).

**Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς**

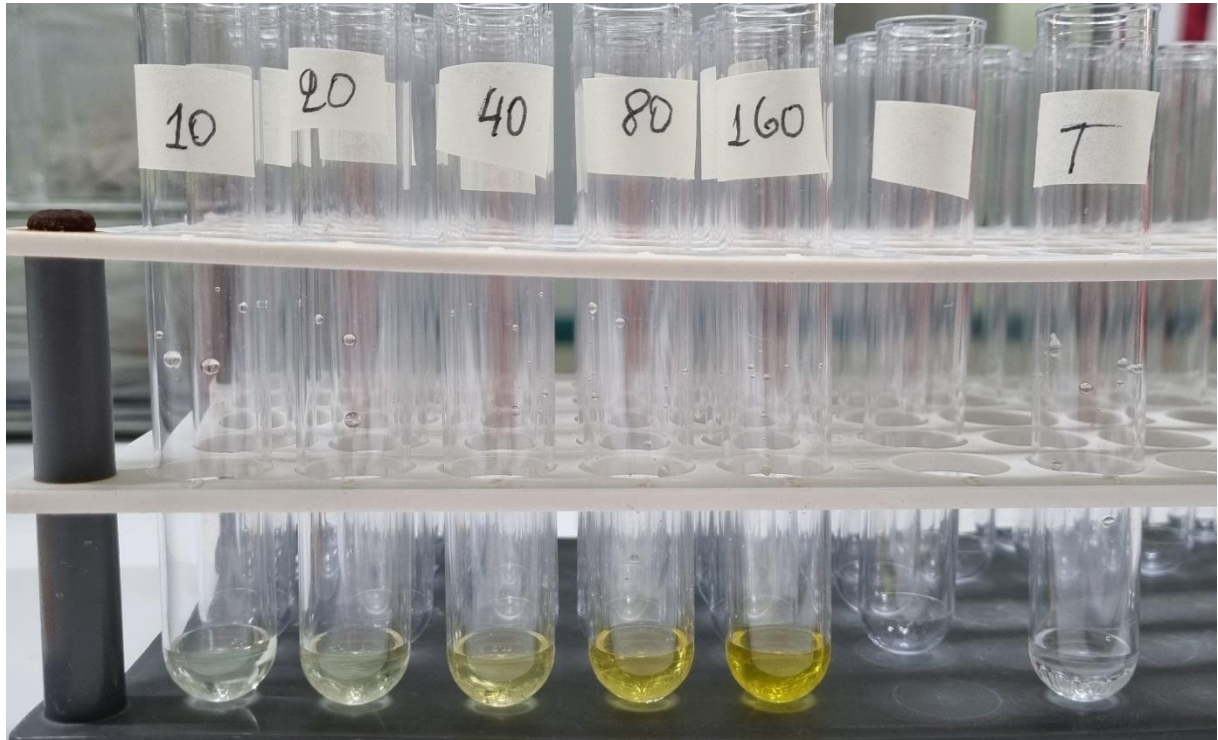
Για να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 5 g/L (0,03M) διαλύματα πρότυπων συγκεντρώσεων. Για τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται διάλυμα 900 μL dH<sub>2</sub>O, 50 μL αντιδραστηρίου FC και 150 μL διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Πίνακας 3: Δεδομένα πειραματικής διαδικασίας.

	T	Π1	Π2	Π3	Π4	Π5	Π6	Π7	Π8	Δ	Δ'	Δ''
Γαλλικό οξύ (μL)	0	640	320	120	80	40	20	10	5	0	0	0
dH <sub>2</sub> O (μL)	900	260	580	780	820	860	880	890	895	890	890	890
Βότανα (Σιδερίτης ή Κράταιγος ή Κίστος) (μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10
Folin Ciocal(μL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20% (μL)	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Ντελικό (μL)	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100



## 6.4.2. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών



Εικόνα 21: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών.

### Σκοπός

Το πείραμα έχει σκοπό την ποσοτική εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται στα υπό μελέτη δείγματα.

### Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος αποτελεί μία φασματοφωτομετρική διαδικασία, όπου η ένταση απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών ενώσεων που περιέχονται στο διάλυμα. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται στα 510 nm.

### Υλικά και Αντιδραστήρια

- 1) Ρουτίνη ( M.W.: 664,58 g/mol)
- 2) Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH)
- 3) Νιτρώδες Νάτριο 5%
- 4) Τριχλωριούχο Αργίλιο 10%
- 5) Καυστικό Νάτριο (NaOH) (M.W.: 40,0 g/mol)
- 6) Υπερκάθαρο νερό
- 7) Υπό μελέτη δείγματα

### Όργανα και Εξοπλισμός

- 1) Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 5-50 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL
- 2) Αναλυτικός ζυγός





- 3) Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- 4) Κυκλοαναδευτήρας (*Vortex*)
- 5) Ποτήρια ζέσεως
- 6) Ρύγχη αυτόματων πιπετών
- 7) Τριβάλβοδο πουάρ
- 8) Πλαστικές κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL
- 9) Σιφώνιο των 10,0 mL
- 10) Στατώ
- 11) Σπάτουλα ζύγισης
- 12) Φασματοφωτόμετρο (510nm)

### **Παρασκευή διαλυμάτων**

#### **Ρουτίνη (Rutin; R)**

Ποσότητα 8,3 mg ρουτίνης διαλύεται σε 8,3 mL μεθανόλης δίνοντας τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 1,505 mM.

#### **Νιτρώδες Νάτριο 5% ( $\text{NaNO}_2$ )**

Ποσότητα 5,0 g  $\text{NaNO}_2$  προστίθενται σε 80 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με  $\text{dH}_2\text{O}$ .

#### **Τριχλωριούχο Αργίλιο 10% ( $\text{AlCl}_3$ )**

Ποσότητα 10,0 g  $\text{AlCl}_3$  προστίθενται σε 80 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με  $\text{dH}_2\text{O}$ .

#### **Διάλυμα καυστικού νατρίου ( $\text{NaOH}$ ) 1M**

Ποσότητα 4,0 g  $\text{NaOH}$  προστίθενται σε 80 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με  $\text{dH}_2\text{O}$ .

#### **Πρότυπα διαλύματα**

Παρασκευάζονται με χρήση διαλύματος φύλαξης του πρότυπου ρουτίνης συγκέντρωσης 1,505 δείγματα για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Τα δείγματα είναι T, P1=10  $\mu\text{L}$ , P2=20  $\mu\text{L}$ , P3=40  $\mu\text{L}$ , P4=80  $\mu\text{L}$ , P5=160  $\mu\text{L}$ . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol/ $\mu\text{L}$  ρουτίνης.

#### **Πειραματική πορεία**

1. Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων δείγματος.
2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη υπερκαθαρού νερού μέχρι τελικό όγκο 740  $\mu\text{L}$ .
3. Πραγματοποιείται προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 30  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$ .



4. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση με Vortex.
5. Μετά από 5 λεπτά, γίνεται προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 30  $\mu\text{L}$  10%  $\text{AlCl}_3$ .
6. Ακολουθεί εκ νέου πολύ καλή ανάδευση με Vortex.
7. Μετά από 6 λεπτά, γίνεται προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 200  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  1M.
8. Πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση στα 510 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης.

Πίνακας 4: Δεδομένα πειραματικής διαδικασίας πρότυπων διαλυμάτων.

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	T	Π1	Π2	Π3	Π4	Π5
Γαλλικό οξύ ( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	40	80	160
$\text{dH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	740	730	720	700	660	580
5% $\text{NaNO}_2$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30	30	30	30
10% $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30	30	30	30
$\text{NaOH}$ 1M ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200	200
Ντελικό ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Πίνακας 5: Δεδομένα πειραματικής διαδικασίας Κράταιγου.

ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	$\Delta 1$	$\Delta 1'$	$\Delta 1''$
Κράταιγος ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
$\text{dH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	640	640	640
5% $\text{NaNO}_2$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30
10% $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30
$\text{NaOH}$ 1M ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200
Ντελικό ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000

Πίνακας 6: Δεδομένα πειραματικής διαδικασίας Κίστου.

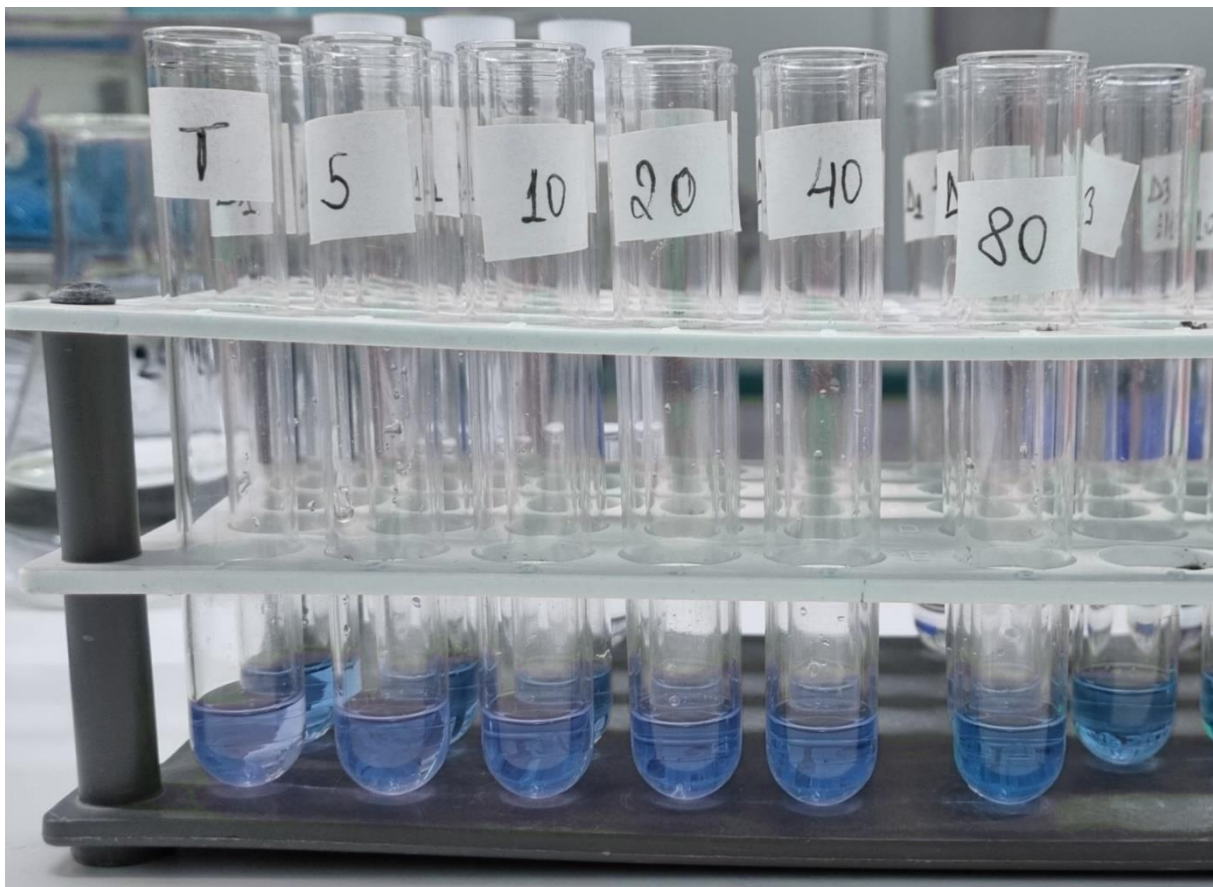
ΚΙΣΤΟΣ	$\Delta 2$	$\Delta 2'$	$\Delta 2''$
Κίστος ( $\mu\text{L}$ )	10	10	10
$\text{dH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	730	730	730
5% $\text{NaNO}_2$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30
10% $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	30	30	30
$\text{NaOH}$ 1M ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200
Ντελικό ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000



Πίνακας 7: Δεδομένα πειραματικής διαδικασίας Σιδερίτη.

ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	Δ3'	Δ3''
Σιδερίτης (μL)	30	10	10
dH <sub>2</sub> O (μL)	710	730	730
5% NaNO <sub>2</sub> (μL)	30	30	30
10% AlCl <sub>3</sub> (μL)	30	30	30
NaOH 1M (μL)	200	200	200
Ντελικό (μL)	1000	1000	1000

6.4.3. 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)



Εικόνα 22: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS).



## Σκοπός

Σκοπός της χρήσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης ελεύθερης ρίζας.

## Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος ABTS (2,2'-αζινο δις (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος) βασίζεται στην αρχή της οξείδωσης του προς ριζικό κατιόν με υπερθειικά ιόντα με βαθύ κυανοπράσινο χρώμα που απορροφά ισχυρά στα 734 nm και ακολουθεί αποχρωματισμός αυτού υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών.

Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος ABTS<sup>•+</sup> που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται συνήθως σε ισοδύναμα Trolox (6-Hydroxy- 2,5,7,8tetramethylchoman-2-carboxylic acid) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Roginsky & Lissi, 2005).

Το ABTS<sup>•+</sup> μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση [π.χ. με διοξείδιο μαγγανίου (MnO<sub>2</sub>), με υπερθειικό κάλιο (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη)]. Γενικότερα η χημική αντίδραση απαιτεί αρκετό χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθειικού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι πιο γρήγορες και οι συνθήκες αντίδρασης είναι ηπιότερες.

Μέγιστη απορρόφηση του ABTS<sup>•+</sup> αποδείχτηκε ότι είναι σε μήκη κύματος 415, 645, 734 και 815nm. Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν από τους περισσότερους ερευνητές για να ελεγχθούν φασματοφωτομετρικά για την αντίδραση μεταξύ αντιοξειδωτικών και του ABTS<sup>•+</sup> είναι 415 και 734nm.

Οι πιο πρόσφατες και αναθεωρημένες μέθοδοι μπορούν να μετρήσουν την μείωση της απορροφητικότητας του ABTS<sup>•+</sup> υπό την παρουσία του προς εξέταση δείγματος ή του πρότυπου αντιδραστήριου Trolox σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα 4 με 6 λεπτά και έπειτα υπολογίζεται σε ισοδύναμα Trolox η αντιοξειδωτική ικανότητα (Prior et al., 2005).

## Υλικά και αντιδραστήρια

- 1) Πυκνό διάλυμα ABTS (2,2'-αζινοβις(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο) – 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 μL και 100 μL
- 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 dH<sub>2</sub>O και προστίθενται 0,1801 g ABTS (m.w: 514,62 g/mol) και 0,0331 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (m.w: 270,322 g/mol). Ακολουθεί ανάδευση έως διαλυτοποίηση 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 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. 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 -40oC.

#### **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.

### **Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων**

Για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται διαλύματα αναφοράς Trolox με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM. Πραγματοποιείται αραιώση αυτού με τελική συγκέντρωση 0,62 mM. Συγκεκριμένα τα διαλύματα είναι T, P1=5 μL, P2=10 μL, P3=20 μL, P4=40 μL. Τα αποτελέσματα θα εκφραστούν σε nmol/μL Trolox.

### **Πειραματική Πορεία**

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας εκχυλισμάτων.
2. Σε κάθε ένα από τα δείγματα γίνεται προσθήκη ανά 30 sec 1000 μL διαλύματος εργασίας του ριζικού κατιόντος του ABTS (ABTS+•) και ακολουθεί ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα.
3. Γίνεται επώαση σε σκοτεινό μέρος για ακριβώς 15 λεπτά.
4. Μετά το πέρας των 15 λεπτών ακολουθεί φασματοφωτομετρία των δειγμάτων στα 734 nm και καταγραφή των μετρήσεων.



Πίνακας 8: Πειραματική διαδικασία πρότυπων δειγμάτων.

Πρότυπα δείγματα	T	Π1	Π2	Π3	Π4
trolox (μL)	0	5	10	20	40
ABTS (μL)	1000	1000	1000	1000	1000

Πίνακας 9: Πειραματική διαδικασία Κράταιγου.

ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ		Δ1	Δ1'	Δ1''
Α' Μέτρηση	Κράταιγος (μL)	30	30	30
	ABTS (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Κράταιγος (μL)	70	70	70
	ABTS (μL)	1000	1000	1000

Πίνακας 10: Πειραματική διαδικασία Κίστου.

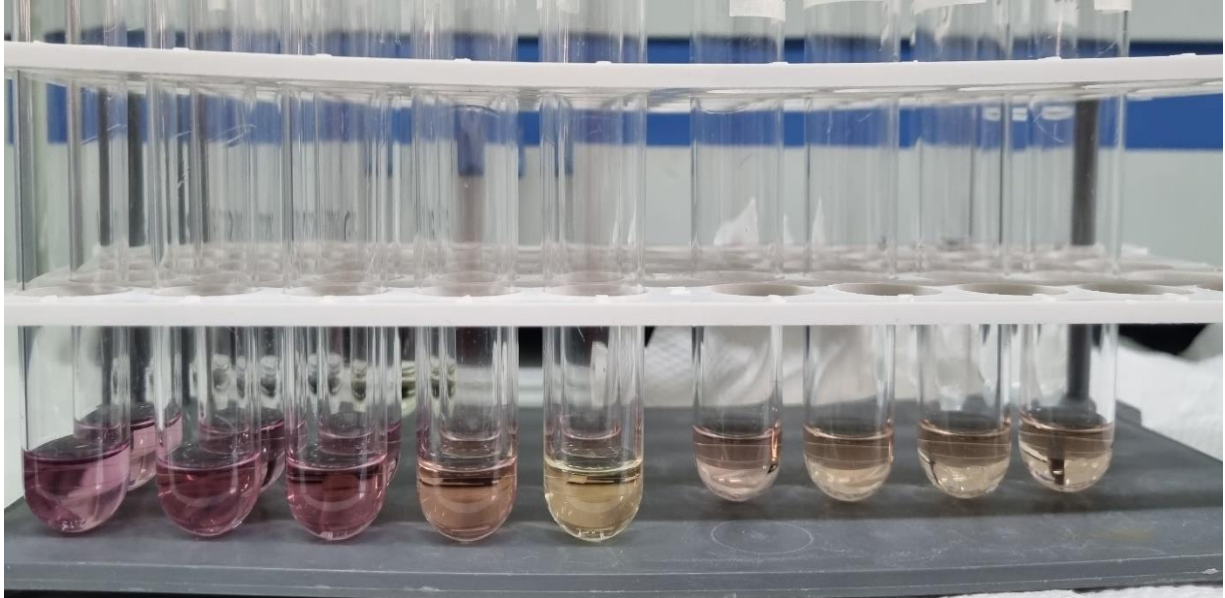
ΚΙΣΤΟΣ		Δ2	Δ2'	Δ2''
Α' Μέτρηση	Κίστος (μL)	30	30	30
	ABTS (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Κίστος (μL)	20	20	20
	ABTS (μL)	1000	1000	1000

Πίνακας 11: Πειραματική διαδικασία Σιδερίτη.

ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ		Δ3	Δ3'	Δ3''
Α' Μέτρηση	Σιδερίτης (μL)	30	30	30
	ABTS (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Σιδερίτης (μL)	20	20	20
	ABTS (μL)	1000	1000	1000



6.4.4. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)



Εικόνα 23: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών.

### **Σκοπός**

Η μέθοδος χρησιμοποιείται με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης μιας σταθερής και εμπορικά διαθέσιμης οργανικής ρίζας αζώτου.

### **Αρχή Μεθόδου**

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή του DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλιο) όπου εξασθενεί το πορφυρό χρώμα του διαλύματος στα 515 nm κατά τη δέσμευση του από τα αντιοξειδωτικά.

### **Όργανα και Εξοπλισμός**

- 1) Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
- 2) Υπερκάθαρο  $\text{H}_2\text{O}$
- 3) DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο)
- 4) Trolox (M.W: 290,29 g/mol)
- 5) Υπό μελέτη δείγματα





### Υλικά και αντιδραστήρια

- 1) Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου των 20-200  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$  και 0,5-5mL
- 2) Φιαλίδια από πολυπροπυλένιο των 2,0 mL
- 3) Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- 4) Ζύγος ακριβείας
- 5) Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
- 6) Κωνικές φιάλες των 50 και 100mL
- 7) Κυψελίδες πολυστυρενίου οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL
- 8) Σπάτουλα ζύγισης
- 9) Στατώ
- 10) Υδροβολέας
- 11) Φασματοφωτόμετρο (515nm)
- 12) Χαρτί ζύγισης
- 13) Δείγματα υπό διερεύνηση

### Παρασκευή διαλυμάτων

#### **Διάλυμα φύλαξης DPPH συγκέντρωσης 600 $\mu\text{M}$**

Ζυγίζονται 0,0118 g DPPH (m.w: 394,32 g/mol) και αναδιαλύονται σε 25 mL  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με  $\text{CH}_3\text{OH}$  έως τα 50,0 mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους  $-40^\circ\text{C}$ .

#### **Διάλυμα φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM**

Σε σωλήνα προστίθενται 10,0 mL διαλύματος  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Ζυγίζονται 0,0160g Trolox 97% (m.w.: 250,29 g/mol) και προστίθενται στο διάλυμα  $\text{CH}_3\text{OH}$ , προκύπτει έτσι διάλυμα συγκέντρωση 6,2 mM. Το διάλυμα αραιώνεται και έχει τελική συγκέντρωση 0,62 Mm. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους  $-40^\circ\text{C}$ .

### Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιούνται Trolox (ανάλογα της Βιταμίνης E, με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox. Τα διαλύματα που παρασκευάζονται είναι T, Π1=5  $\mu\text{L}$ , Π2=10  $\mu\text{L}$ , Π3=20  $\mu\text{L}$ , Π4=40  $\mu\text{L}$ .

### Πειραματική Πορεία

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται μεταφορά των κατάλληλων όγκων από τα εκχυλίσματα.
2. Παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας του DPPH 0,6 mM με μεθανόλη ώστε να έχει απορρόφηση  $A=0,6$ .
3. Γίνεται προσθήκη 1 mL διαλύματος εργασίας DPPH ανά 30 sec στο κάθε δείγμα.





4. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα.
5. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15 λεπτά.
6. Έπειτα γίνεται φωτομέτρηση στα 515 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης.

Πίνακας 12: Πειραματική διαδικασία πρότυπων δειγμάτων.

Πρότυπα δείγματα	T	Π1	Π2	Π3	Π4
trolox (μL)	0	5	10	20	40
DPPH (μL)	1000	1000	1000	1000	1000

Πίνακας 13: Πειραματική διαδικασία Κράταιγου.

ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ		Δ1	Δ1'	Δ1''
Α' Μέτρηση	Κράταιγος (μL)	60	60	60
	DPPH (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Κράταιγος (μL)	140	140	140
	DPPH (μL)	1000	1000	1000

Πίνακας 14: Πειραματική διαδικασία Κίστου.

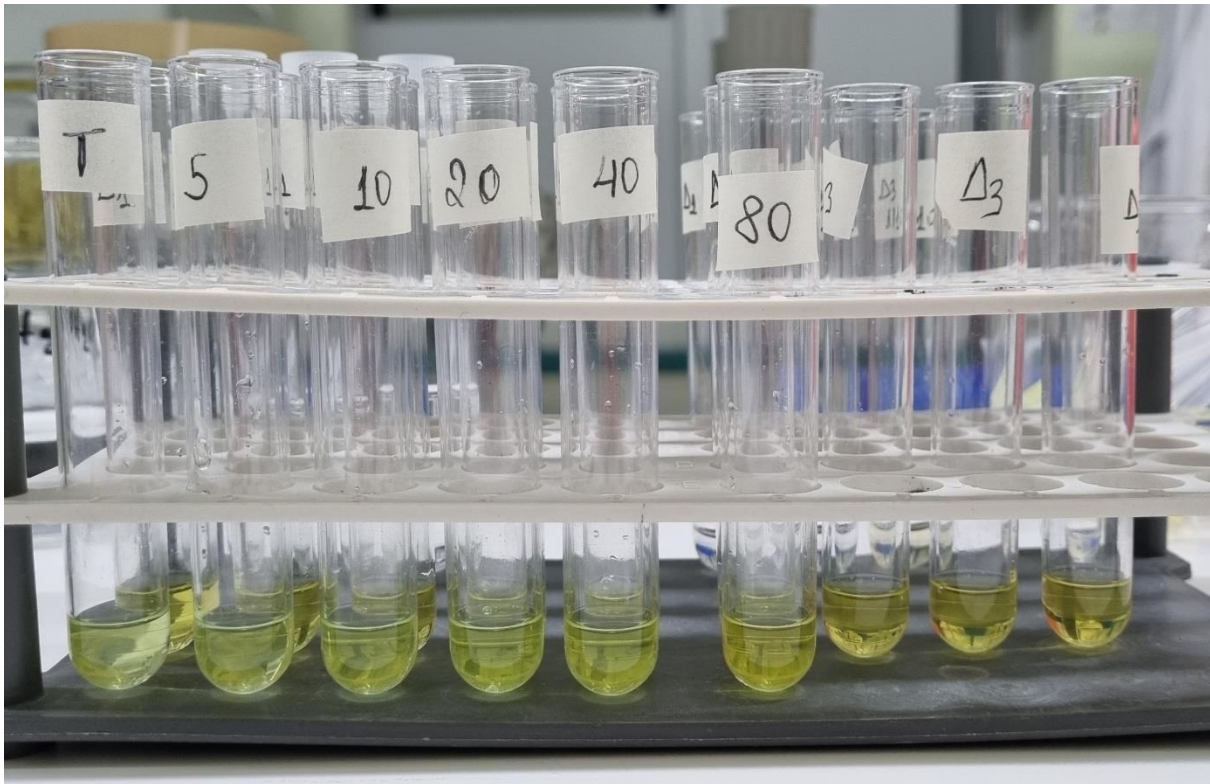
ΚΙΣΤΟΣ		Δ2	Δ2'	Δ2''
Α' Μέτρηση	Κίστος (μL)	40	40	40
	DPPH (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Κίστος (μL)	20	20	20
	DPPH (μL)	1000	1000	1000

Πίνακας 15: Πειραματική διαδικασία Σιδερίτη.

ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ		Δ3	Δ3'	Δ3''
Α' Μέτρηση	Σιδερίτης (μL)	40	40	40
	DPPH (μL)	1000	1000	1000
Β' Μέτρηση	Σιδερίτης (μL)	20	20	20
	DPPH (μL)	1000	1000	1000



### 6.4.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)



Εικόνα 24: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας (CUPRAC).

#### **Σκοπός**

Η μέθοδος χρησιμοποιείται με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με βάση την δοκιμασία CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity).

#### **Αρχή Μεθόδου**

Η συγκεκριμένη μέθοδος πρόκειται για δοκιμασία μεταφοράς ηλεκτρονίου και βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των ελεύθερων ριζών, καθώς και τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναγωγής των ιόντων χαλκού που πραγματοποιείται από τα αντιοξειδωτικά που παρατηρείται μέσω της απορρόφησης στα 450 nm.

#### **Υλικά και αντιδραστήρια**

- 1) Διϋδρικός χλωριούχος χαλκός ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , M.W.: 170.48 g/mol)
- 2) Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) 1M, pH=7,0
- 3) 2,9-διμέθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (νεοκουπροΐνη) Nc
- 4) Διάλυμα εργασίας CUPRAC



- 5) Αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- 6) Διάλυμα φύλαξης trolox 6,2 mM
- 7) Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- 8) Ρυθμιστικά διαλύματα του pHμέτρου pH=4 και pH=7
- 9) Αέριο άζωτο (N<sub>2</sub>)
- 10) Υπό μελέτη δείγματα

### **Όργανα και Εξοπλισμός**

- 1) Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL
- 2) Ποτήρια ζέσεως των 100 mL
- 3) Κωνικές φιάλες των 250 mL
- 4) Υάλινο χωνί
- 5) Υδροβολέας
- 6) Πλαστικό παστέρ
- 7) Μαγνήτης ανάδευσης
- 8) Μαγνητικός αναδευτήρας
- 9) Κυκλοαναδευτήρας
- 10) Αυτόματες πιπέτες των 0,5-5 mL, 5-50 μL και 20-200 μL
- 11) pHμετρο
- 12) Φασματοφωτόμετρο (450 nm)
- 13) Πλαστικές κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm και όγκου 1 mL
- 14) Ζυγός ακριβείας
- 15) Φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο

### **Παρασκευή διαλυμάτων**

#### **Διάλυμα διϋδρικού χλωριούχου χαλκού CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 10 mM**

Ποσότητα ίση με 0,4262 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (M.W.: 170.48 g/mol) διαλύεται σε 100 mL dH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O έως τα 250,0 mL.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) 1M, pH=7,0**

Ποσότητα CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> ίση με 19,27 g (M.W.: 77,08) διαλύεται σε 200 mL dH<sub>2</sub>O, ρυθμίζεται το pH στο 7,0 και στη συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O έως τα 250,0 mL.

#### **Διάλυμα νεοκουπροΐνης (Neocuproine, Nc) συγκέντρωσης 7,5 mM**

Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα χρήσης του. Ποσότητα νεοκουπροΐνης ίση με 0,0163 g (M.W.: 217,27 g/mol) διαλύεται έως τελικού όγκου 10 mL με αιθανόλη 96%.



## Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Για την Παρασκευή των πρότυπων δειγμάτων χρησιμοποιούνται δείγματα αναφοράς Trolox που παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 0,62 nmol Trolox. Τα δείγματα που δημιουργήθηκαν είναι T, Π1=5 μL, Π2=10 μL, Π3=20 μL, Π4=40 μL, Π5=80 μL, Π6=160 μL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα nmol Trolox.

## Πειραματική Πορεία

1. Προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατάλληλες ποσότητες δειγμάτων.
2. Γίνεται προσθήκη 300 μL διαλύματος  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM, 300 μL διαλύματος νεοκουρποΐνης 7,5 mM, 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1M pH=7,0 και συμπληρώνεται ο όγκος με  $\text{dH}_2\text{O}$  έως τελικού όγκου 1200 μL.
3. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και επώαση για 30 min στους 20 °C.
4. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 450 nm.

Πίνακας 16: Πειραματική διαδικασία Πρότυπων Διαλυμάτων.

Πρότυπα δείγματα	T	Π1	Π2	Π3	Π4	Π5	Π6
trolox (μL)	0	5	10	20	40	80	160
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (μL)	300	300	300	300	300	300	300
Nc (μL)	300	300	300	300	300	300	300
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	300	300	300	300	300	300	300
$\text{dH}_2\text{O}$ (μL)	300	295	290	280	260	220	140
Υπελικό (μL)	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200

Πίνακας 17: Πειραματική διαδικασία Κράταιγου.

ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	Δ1'	Δ1''
Δείγμα(μL)	70	70	70
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (μL)	300	300	300
Nc (μL)	300	300	300
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	300	300	300
$\text{dH}_2\text{O}$ (μL)	230	230	230
Υπελικό (μL)	1200	1200	1200



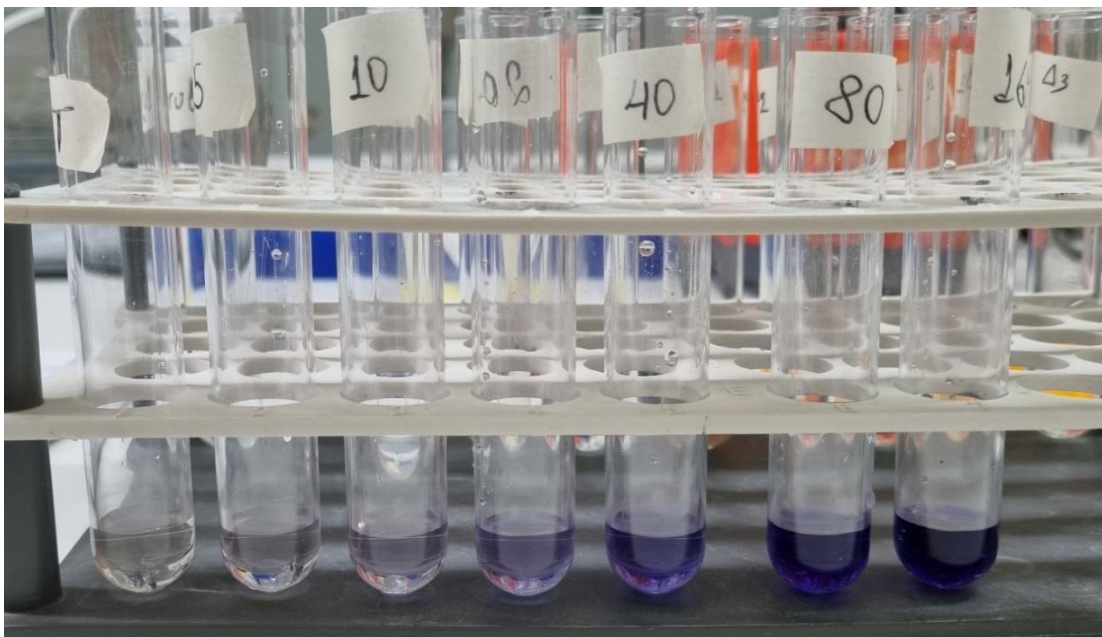
Πίνακας 18: Πειραματική διαδικασία Κίστου.

ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	Δ2'	Δ2''
Δείγμα(μL)	30	30	30
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (μL)	300	300	300
Nc (μL)	300	300	300
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	300	300	300
dH <sub>2</sub> O (μL)	270	270	270
Ντελικό (μL)	1200	1200	1200

Πίνακας 19: Πειραματική διαδικασία Σιδερίτη.

ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	Δ3'	Δ3''
Δείγμα(μL)	30	30	30
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (μL)	300	300	300
Nc (μL)	300	300	300
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	300	300	300
dH <sub>2</sub> O (μL)	270	270	270
Ντελικό +(μL)	1200	1200	1200

#### 6.4.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης εκχυλισμάτων με τη δοκιμασία FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)



Εικόνα 25: Δείγματα πειράματος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης (FRAP).



## Σκοπός

Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου έχει σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας των εκχυλισμάτων να ανάγουν τα ιόντα του σιδήρου από τρισθενή σε δισθενή.

## Αρχή μεθόδου

Η συγκεκριμένη δοκιμασία (FRAP) βασίζεται στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{3+}$ ) υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών. Αυτή η αναγωγή σχηματίζει έγχρωμο σύμπλοκο του  $\text{Fe}^{2+}$  με την 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  σε όξινο περιβάλλον και απορροφά ισχυρά στα 593 nm.

## Υλικά και αντιδραστήρια

- 1) Απεσταγμένο νερό ( $\text{dH}_2\text{O}$ )
- 2) Κρυσταλλικό οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- 3) Τριυδρικό οξικό νάτριο ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (M.W: 136,08 g/mol)
- 4) 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη (TPTZ) (M.W: 312,33 g/mol)
- 5) Τριχλωριούχος σίδηρος ( $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (M.W: 270,29 g/mol)
- 6) Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (π. HCl 37%) (M.W: 36.469 g/mol)
- 7) Υπό μελέτη δείγματα

## Όργανα και Εξοπλισμός

- 1) Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου 0,5-5 mL
- 2) Ζυγός ακριβείας
- 3) Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
- 4) Μαγνήτης ανάδευσης
- 5) Ογκομετρικός κύλινδρος των 25mL
- 6) Ογκομετρικές φιάλες των 100, 250, και 500 mL
- 7) pHμετρο
- 8) Πλαστικό σταγονόμετρο
- 9) Υάλινα ποτήρια ζέσεως των 250 και 600 mL
- 10) Φιάλες αντιδραστήριου των 250 και 500 mL
- 11) Φασματοφωτόμετρο (593nm)
- 12) Υάλινο χωνί



**Παρασκευή διαλυμάτων****Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 3mM, pH=3.6 (ΔΙΑΛΥΜΑ Α)**

Ζυγίζονται 3,1g τριυδρικού οξικού νατρίου, προστίθενται 16 mL κρυσταλλικού οξικού οξέος και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό έως τα 100mL.

**Παρασκευή διαλύματος HCl 40 mM**

Προστίθενται 1,670 mL πυκνού HCl 37% (M.W: 36,46 g/mol) και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό έως τα 500 mL (40 mM HCl).

**Παρασκευή TPTZ (2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνης) (M.W: 312,33 g/mol) (ΔΙΑΛΥΜΑ Β)**

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL προστίθενται 0,0312 g TPTZ και διαλύονται με 10 mL διαλύματος HCl 40mM.

**Παρασκευή Τριχλωριούχου Σιδήρου FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (M.W: 270,29 g/mol) (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ)**

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL προστίθενται 0,0541 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O και διαλύονται σε 10 mL απεσταγμένου νερού.

**Παρασκευή αντιδραστηρίου FRAP**

Αναμιγνύονται ποσότητες από τα διαλύματα Α,Β και Γ σε αναλογία 1:1:1 (v/v/v).

**Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων**

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς δημιουργούνται πρότυπα διαλύματα από το διάλυμα φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 0,62 mM. Τα δείγματα που δημιουργήθηκαν είναι : Τ, Π1=5 μL, Π2=10 μL, Π3=20 μL, Π4=40 μL, Π5=80 μL, Π6=160 μL.

**Πειραματική πορεία**

1. Σε υάλινους σωλήνες γίνεται προσθήκη με αυτόματη πιπέτα οι κατάλληλες ποσότητες από τα εκχυλίσματα.
2. Ακολουθεί προσθήκη dH<sub>2</sub>O σε κάθε δείγμα μέχρι τελικό όγκο 900 μL.
3. Προστίθεται σε κάθε δείγμα ανά 30 sec 300 μL διαλύματος FRAP και γίνεται καλή ανάδευση με χρήση κυκλοαναδευτήρα.
4. Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 min.
5. Έπειτα πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση στα 593 nm και καταγραφή των απορροφήσεων.

Πίνακας 20: Πειραματική διαδικασία Πρότυπων Δειγμάτων.

Πρότυπα δείγματα	Τ	Π1	Π2	Π3	Π4	Π5	Π6
trolox (μL)	0	5	10	20	40	80	160
dH <sub>2</sub> O (μL)	900	895	890	880	860	820	740
FRAP (μL)	300	300	300	300	300	300	300
Ντελικό (μL)	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200





Πίνακας 21: Πειραματική διαδικασία Κράταιγου.

ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	Δ1'	Δ1''
Δείγμα(μL)	70	70	70
dH <sub>2</sub> O (μL)	830	830	830
FRAP (μL)	300	300	300
Ντελικό (μL)	1200	1200	1200

Πίνακας 22: Πειραματική διαδικασία Κίστου.

ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	Δ2'	Δ2''
Δείγμα(μL)	30	30	30
dH <sub>2</sub> O (μL)	870	870	870
FRAP (μL)	300	300	300
Ντελικό (μL)	1200	1200	1200

Πίνακας 23: Πειραματική διαδικασία Σιδερίτη.

ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	Δ3'	Δ3''
Δείγμα(μL)	30	30	30
dH <sub>2</sub> O (μL)	870	870	870
FRAP (μL)	300	300	300
Ντελικό (μL)	1200	1200	1200





## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 7.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ (IN-VITRO)

#### 7.1.1. Επεξεργασία δεδομένων

Για κάθε βότανο σε μια δοκιμή, οι απορροφήσεις των δειγμάτων που δημιουργήθηκαν μετατρέπονται σε ισοδύναμα nmol/μL. Με χρήση της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε εκφράζονται σε ποσότητες που αντιστοιχούν είτε σε ολικά φαινολικά, είτε σε ολικά φλαβονοειδή, είτε σε ολική αντιοξειδωτική δράση του κάθε βότανου που είναι υπό εξέταση.

#### 7.1.2. Μέθοδος στατιστικής ανάλυσης

Για να γίνει στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM Statistics SPSS. Η ανάλυση ANOVA θεωρείται ότι είναι έγκυρη όταν το κριτήριο Levene είναι στατιστικώς μη σημαντικό. Αυτό συμβαίνει όταν το p-value που προκύπτει από την δοκιμή ομοιογένειας των διακυμάνσεων είναι >0,05. Όταν αυτό ισχύει πραγματοποιείται ανάλυση ANOVA και αν το p-value<0.05 υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Το που ακριβώς εντοπίζεται η διαφορά αυτή προκύπτει από την ανάλυση Post Hoc (σύγκριση ανά ζεύγη) με χρήση μεθόδου Bonferroni.

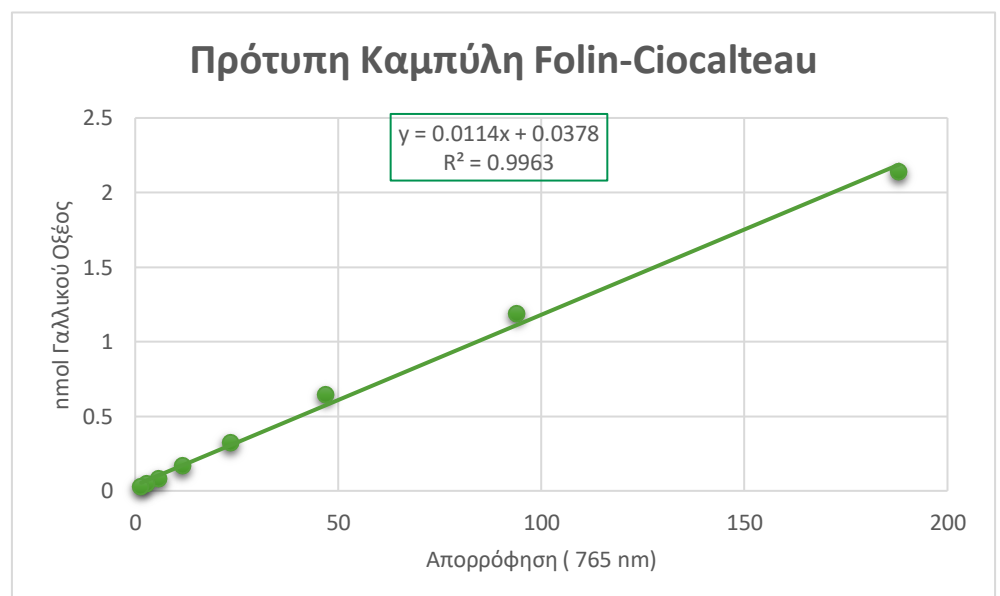
### 7.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

#### 7.2.1. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Folin-Ciocalteu

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ρουτίνης που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα ρουτίνης που δημιουργήθηκαν με βάση το Πίνακας 24.

Πίνακας 24: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς.

GA(nmol)	A765 (nm)
188,103	2,137
94,051	1,182
47,026	0,641
23,513	0,319
11,756	0,161
5,878	0,079
2,939	0,043
1,470	0,023



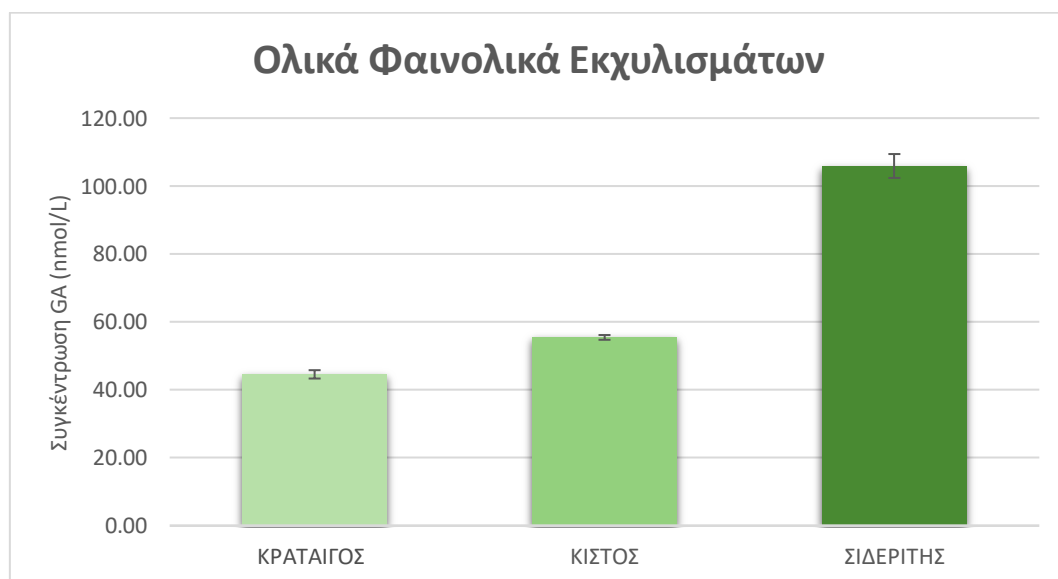
Εικόνα 26: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu.



Μετά την εκτέλεση της βιοχημικής δοκιμής Folin-Ciocalteu στα δείγματα τα οποία δημιουργήθηκαν για κάθε βότανο με σκοπό τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, προέκυψαν τα αποτελέσματα που καταγράφονται παρακάτω. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα  $\mu\text{mol/L GA}$  με βάση την εξίσωση  $y=0,0114x + 0,0378$ .

Πίνακας 25: Σύγκριση Ολικών Φαινολικών.

ΔΕΙΓΜΑ		Ολικά φαινολικά ( $\mu\text{mol/L GA}$ )	Ολικά Φαινολικά ( $\mu\text{mol/L GA}$ ) (Μέση τιμή $\pm$ Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΕΓΟΣ	$\Delta 1$	43,35	44,55 $\pm$ 1,23
	$\Delta 1'$	44,49	
	$\Delta 1''$	45,81	
ΚΙΣΤΟΣ	$\Delta 2$	54,75	55,43 $\pm$ 0,70
	$\Delta 2'$	55,37	
	$\Delta 2''$	56,16	
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	$\Delta 3$	101,95	105,89 $\pm$ 3,52
	$\Delta 3'$	107,04	
	$\Delta 3''$	108,70	



Σχήμα 1: Ολικά φαινολικά Εκχυλισμάτων.

Παρατηρώντας το παραπάνω Σχήμα 1 που απεικονίζει το ραβδόγραμμα από τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών στο κάθε δείγμα βοτάνου, μπορούμε να



συμπεράνουμε ότι την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει ο σιδερίτης ο οποίος εμφανίζει σχεδόν διπλάσια τιμή. Ακολουθούν με μικρότερες συγκεντρώσεις κατά σειρά ο κίστος και ο κράταιγος. Πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics για την εξακρίβωση της ύπαρξης στατιστική σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 26: Δοκιμασία ομοιογένειας διακυμάνσεων.

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Total_Phenolics	Based on Mean	4,596	2	6	,062
	Based on Median	1,078	2	6	,398
	Based on Median and with adjusted df	1,078	2	2,412	,463
	Based on trimmed mean	4,216	2	6	,072

Πίνακας 27: Ανάλυση ANOVA.

Total_Phenolics					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6428,936	2	3214,468	670,329	<,001
Within Groups	28,772	6	4,795		
Total	6457,708	8			

Πίνακας 28: Ανάλυση Post Hoc.

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-10,87667*	1,78799	,003	-16,7546	-4,9987
	Σιδερίτης	-61,34667*	1,78799	<,001	-67,2246	-55,4687
Κίστος	Κράταιγος	10,87667*	1,78799	,003	4,9987	16,7546
	Σιδερίτης	-50,47000*	1,78799	<,001	-56,3479	-44,5921
Σιδερίτης	Κράταιγος	61,34667*	1,78799	<,001	55,4687	67,2246
	Κίστος	50,47000*	1,78799	<,001	44,5921	56,3479

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα των πινάκων πληρούνται οι προϋποθέσεις για να εκτελεσθεί ανάλυση Ανοva όπου και προκύπτει ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στα δείγματα. Συγκεκριμένα, ο Πίνακας 28 μας δείχνει ανά ζεύγη δειγμάτων ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ και των τριών ζευγών που συγκρίθηκαν με την μέθοδο Bonferroni. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ και των τριών ζευγών δειγμάτων που υπάρχουν καθώς ισχύει ότι το  $p\text{-value} < 0.05$  (Κράταιγος-Κίστος  $p\text{-value} = 0.003$ , Κράταιγος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ , Κίστος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ ).

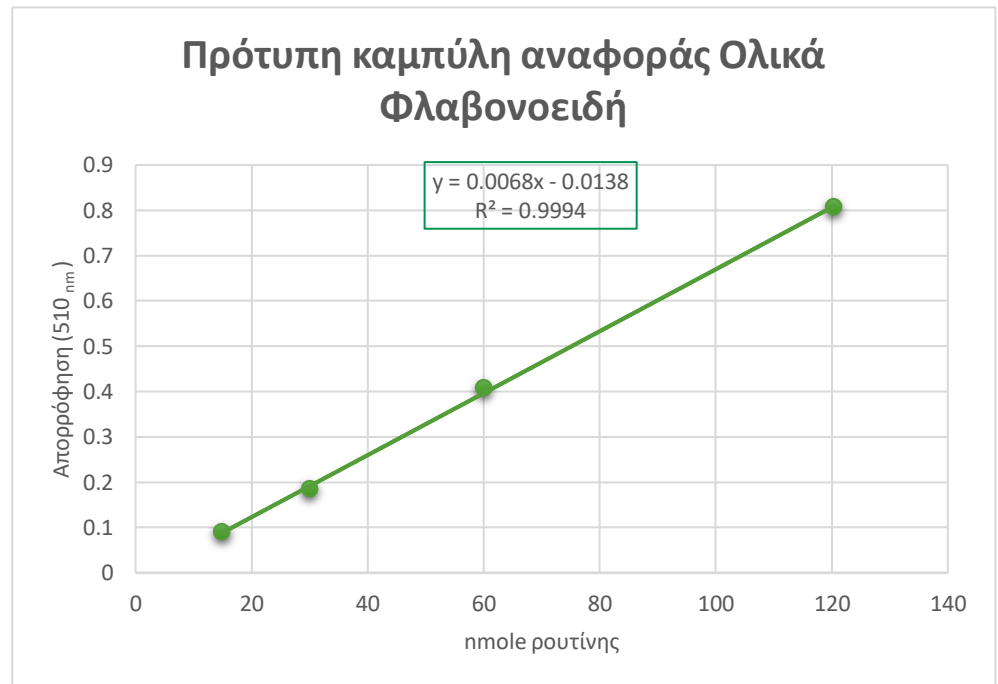


### 3.2.2. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα Trolox που δημιουργήθηκαν. Τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 29: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς.

nmol ρουτίνης	A510
15,05	0,09
30,1	0,184
60,2	0,408
120,4	0,806



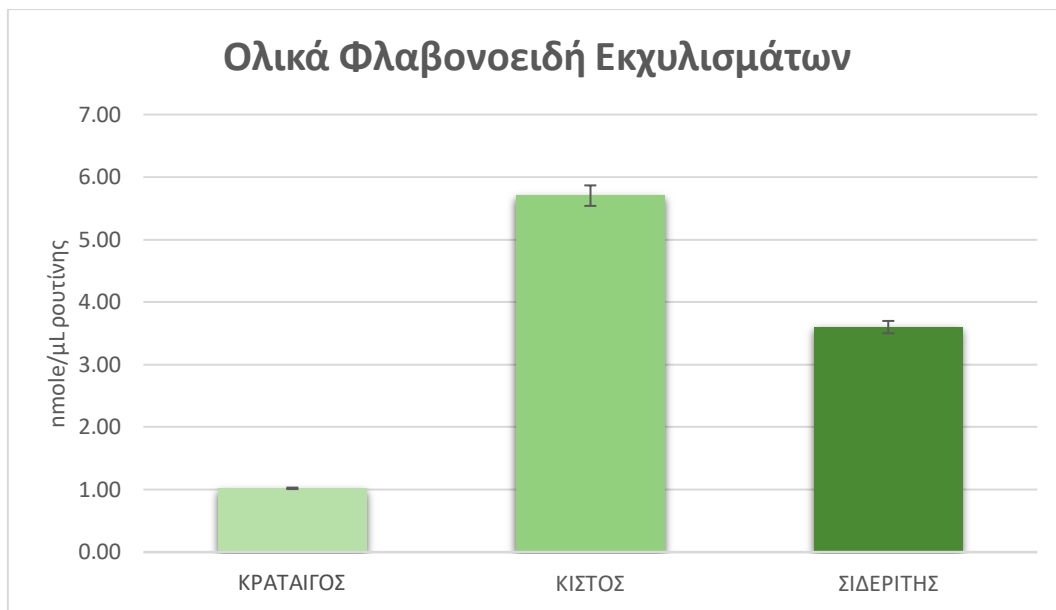
Εικόνα 27: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Ολικών Φλαβονοειδών.

Μετρήθηκαν συνολικά για κάθε βότανο τρία δείγματα οπότε ο συνολικός αριθμός των εξεταζόμενων δειγμάτων είναι εννιά. Με την εκτέλεση της βιοχημικής δοκιμασίας προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα όσον αφορά τα ολικά φλαβονοειδή που περιέχει το κάθε βότανο. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα nmol/μL ρουτίνης με βάση την εξίσωση  $y=0,0068x - 0,0138$ .

Πίνακας 30: Σύγκριση Ολικών Φλαβονοειδών.

ΔΕΙΓΜΑ		Ολικά Φλαβονοειδή (nmol/μL ρουτίνης)	Ολικά Φλαβονοειδή (nmol/μL ρουτίνης) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	1,01	1,02 ± 0,01
	Δ1'	1,02	
	Δ1''	1,03	
ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	5,67	5,70 ± 0,16
	Δ2'	5,56	
	Δ2''	5,88	
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	3,68	3,60 ± 0,10
	Δ3'	3,49	
	Δ3''	3,64	





Σχήμα 2: Ολικά Φλαβονοειδή Εκχυλισμάτων.

Από το παραπάνω Σχήμα 2 που κατοπτρίζει το ραβδόγραμμα που αφορά τα ολικά φλαβονοειδή τα οποία περιέχονται σε κάθε δείγμα προκύπτει ότι η τα περισσότερα περιέχονται στα βότανα με την εξής φθίνουσα σειρά κίστος, σιδερίτης, κράταιγος. Μεγαλύτερη συγκέντρωση φαίνεται να έχει ο κίστος, ενώ ο κράταιγος εμφανίζει πολύ μικρότερη σε σχέση με τα άλλα δυο βότανα. Τα αποτελέσματα εξακριβώνεται αν είναι στατιστικώς σημαντικά με χρήση προγράμματος IMP SPSS Statistics.

Πίνακας 31: Δοκιμή ομοιογένειας διακυμάνσεων.

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Total_Flavonoids	Based on Mean	3,971	2	6	,080
	Based on Median	1,324	2	6	,334
	Based on Median and with adjusted df	1,324	2	3,698	,369
	Based on trimmed mean	3,724	2	6	,089

Πίνακας 32: Ανάλυση ANOVA.

ANOVA					
Total_Flavonoids					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33,017	2	16,509	1354,398	<,001
Within Groups	,073	6	,012		
Total	33,090	8			



Πίνακας 33: Ανάλυση Post Hoc.

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Total_Flavonoids						
Bonferroni						
(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-4,68333*	,09014	<,001	-4,9797	-4,3870
	Σιδερίτης	-2,58333*	,09014	<,001	-2,8797	-2,2870
Κίστος	Κράταιγος	4,68333*	,09014	<,001	4,3870	4,9797
	Σιδερίτης	2,10000*	,09014	<,001	1,8037	2,3963
Σιδερίτης	Κράταιγος	2,58333*	,09014	<,001	2,2870	2,8797
	Κίστος	-2,10000*	,09014	<,001	-2,3963	-1,8037

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

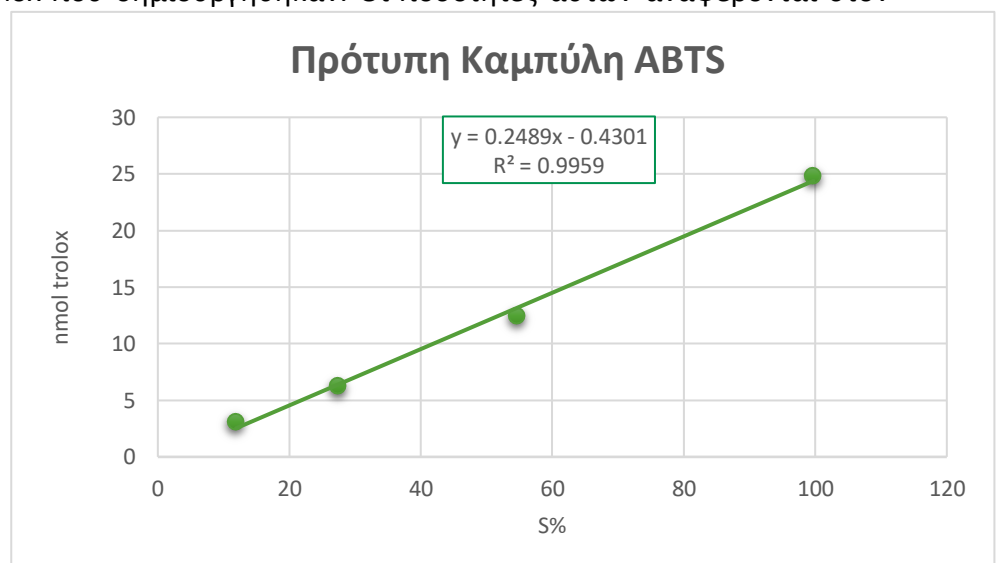
Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, καθώς με βάση το κριτήριο Levene που καταγράφεται στον Πίνακα 31 έχουμε  $p=0.08 > 0.05$  οπότε και πραγματοποιείται ανάλυση Ανοη. Από τα αποτελέσματα της έχουμε ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση μεταξύ των δειγμάτων μας. Το που βρίσκεται αυτή η στατιστική διαφορά προκύπτει από την ανάλυση Bonferroni που φαίνεται στον Πίνακα 33. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ και των τριών ζευγών δειγμάτων που υπάρχουν καθώς ισχύει ότι το  $p\text{-value} < 0.005$  (Κράταιγος-Κίστος  $p\text{-value} < 0.001$ , Κράταιγος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ , Κίστος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ ).

### 3.2.3. Αντιοξειδωτική Ικανότητα (ABTS)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα Trolox που δημιουργήθηκαν. Οι ποσότητες αυτών αναφέρονται στον Πίνακα 34.

Πίνακας 34: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς.

S%	nmole trolox
11,89802	3,1
27,47875	6,2
54,67422	12,4
99,71671	24,8



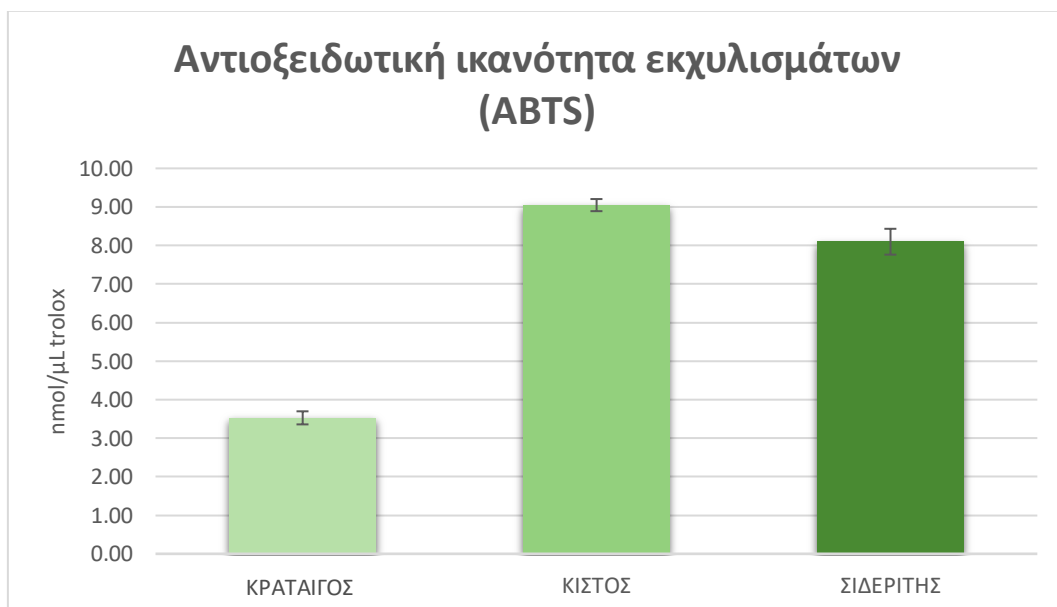
Εικόνα 28: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς (ABTS).



Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις για κάθε βότανο οπότε τα συνολικά δείγματα είναι εννιά. Μετά την εκτέλεση της μεθόδου ABTS σε κάθε δείγμα βοτάνου που δημιουργήθηκε προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα όσον αφορά της αντιοξειδωτική ικανότητάς τους. Οι μετρήσεις των δειγμάτων ήταν διπλές έτσι ώστε να υπολογιστεί να υπολογιστεί το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των υπό εξέταση ουσιών οι οποίες προκαλούν μείωση των ριζών ABTS+• κατά 50%. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα nmol/μL Trolox με βάση την εξίσωση  $y=0,2489x - 0,4301$ .

Πίνακας 35: Σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Δείγμα	Αντιοξειδωτική ικανότητα (nmol/μL trolox) Μέση τιμή δοκιμών	Αντιοξειδωτική Ικανότητα (nmol/μL trolox) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΕΓΟΣ	Δ1	3,48
	Δ1'	3,39
	Δ1''	3,72
ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	9,08
	Δ2'	8,87
	Δ2''	9,18
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	7,73
	Δ3'	8,16
	Δ3''	8,39



Σχήμα 3: Αντιοξειδωτική Ικανότητα Εκχυλισμάτων (ABTS).





Παρατηρώντας το παραπάνω Σχήμα 3 που απεικονίζει το ραβδόγραμμα με τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ο Κίστος και να ακολουθούν κατά σειρά ο σιδερίτης και ο κράταιγος. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων έτσι με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχει μεταξύ των δειγμάτων στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 36: Δοκιμή ομοιογένειας διακυμάνσεων.

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Total_Antioxidants	Based on Mean	1,292	2	6	,341
	Based on Median	,536	2	6	,611
	Based on Median and with adjusted df	,536	2	4,182	,620
	Based on trimmed mean	1,228	2	6	,357

Πίνακας 37: Ανάλυση ANOVA.

Total_Antioxidants					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	52,123	2	26,062	469,956	<,001
Within Groups	,333	6	,055		
Total	52,456	8			

Πίνακας 38: Ανάλυση Post Hoc.

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-5,51333	,19228	<,001	-6,1454	-4,8812
	Σιδερίτης	-4,56333*	,19228	<,001	-5,1954	-3,9312
Κίστος	Κράταιγος	5,51333	,19228	<,001	4,8812	6,1454
	Σιδερίτης	,95000	,19228	,008	,3179	1,5821
Σιδερίτης	Κράταιγος	4,56333*	,19228	<,001	3,9312	5,1954
	Κίστος	-,95000*	,19228	,008	-1,5821	-,3179

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



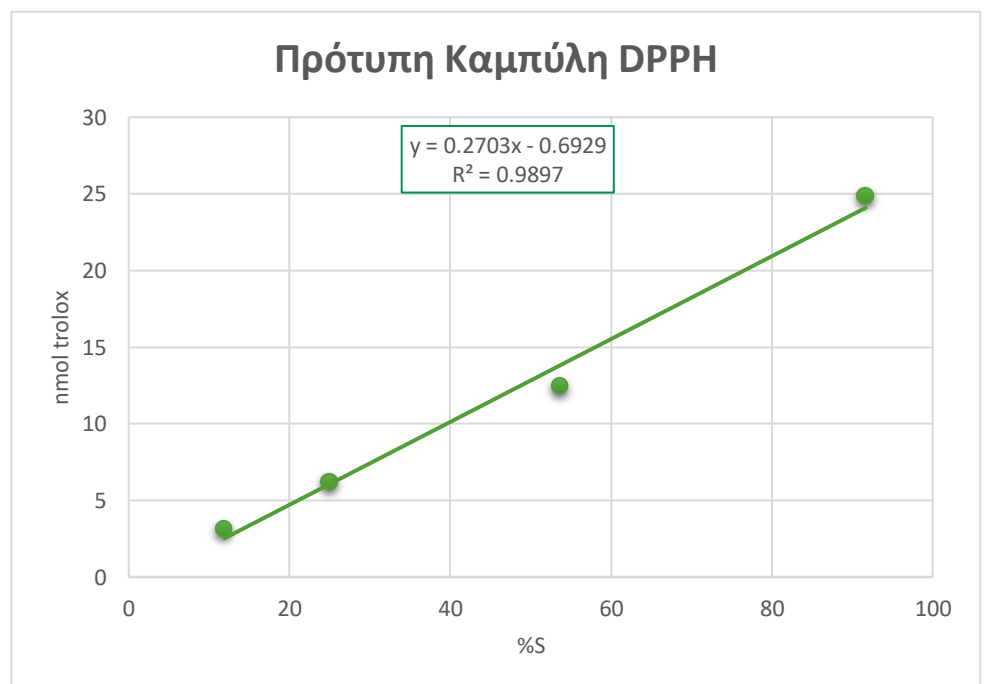
Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, καθώς με βάση το κριτήριο Levene που καταγράφεται στον Πίνακα 36 έχουμε  $p=0.341 > 0.05$  οπότε και πραγματοποιείται ανάλυση ΑνοVA. Από τα αποτελέσματα της έχουμε ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση μεταξύ των δειγμάτων μας. Το που βρίσκεται αυτή η στατιστική διαφορά προκύπτει από την ανάλυση Bonferroni που φαίνεται στον Πίνακα 38. Συγκεκριμένα στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των ζευγών δειγμάτων Κράταιγος-Κίστος ( $p\text{-value} < 0.001$ ), Κράταιγος-Σιδερίτης ( $p\text{-value} < 0.001$ ), καθώς και στο ζεύγος Κίστος-Σιδερίτης ( $p\text{-value} = 0.008$ ).

### 3.2.4. Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (DPPH)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα Trolox που δημιουργήθηκαν με βάση το Πίνακα 39.

Πίνακας 39: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς

%S	nmole trolox
11,93	3,1
25,04	6,2
53,66	12,4
91,65	24,8



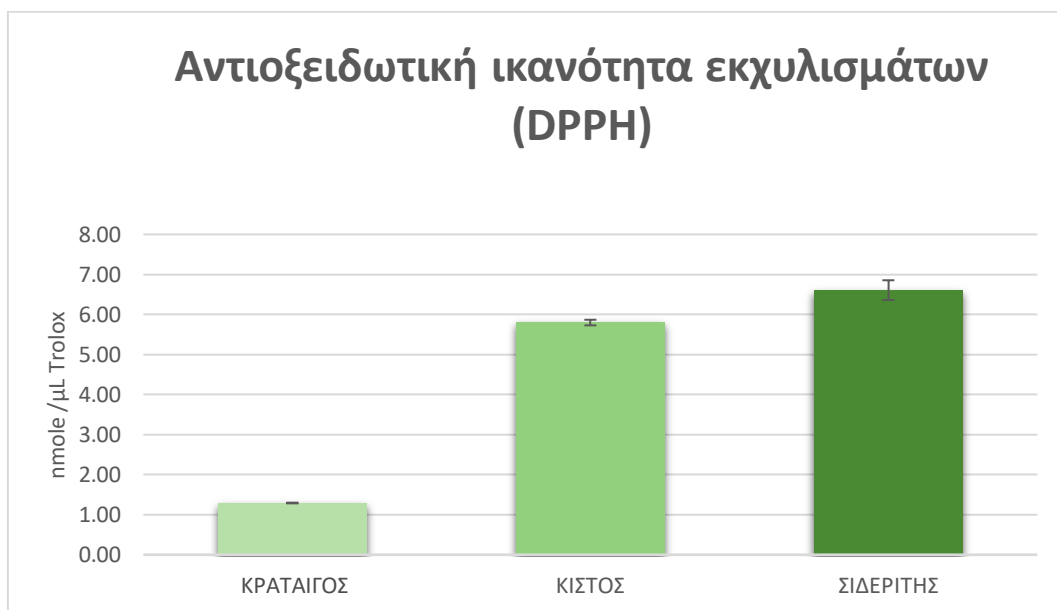
Εικόνα 29: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς (DPPH).

Με την εκτέλεση της δοκιμής DPPH στα δείγματα βοτάνων με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 διαφορετικές δοκιμές με σκοπό τον υπολογισμό του  $IC_{50}$ , που ταυτίζεται με την συγκέντρωση των υπό εξέταση ουσιών που προκαλεί μείωση της ρίζας DPPH. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα nmol/μL Trolox με βάση την εξίσωση  $y = 0,2703x - 0,6929$ .



Πίνακας 40: Σύγκριση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.

ΔΕΙΓΜΑ		Αντιοξειδωτική δράση Μέση τιμή δοκιμών (nmol/μL Trolox)	Αντιοξειδωτική δράση (nmol/μL Trolox) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	1,30	1,29 ± 0,0087
	Δ1'	1,29	
	Δ1''	1,28	
ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	5,79	5,80 ± 0,0699
	Δ2'	5,73	
	Δ2''	5,87	
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	6,34	6,61 ± 0,2468
	Δ3'	6,83	
	Δ3''	6,65	



Σχήμα 4: Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (DPPH).

Από το παραπάνω Σχήμα 4 όπου απεικονίζετε το ραβδόγραμμα της συγκέντρωσης nmol/μL Trolox για το κάθε δείγμα προκύπτει ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να δίνουν κατά σειρά τα δείγμα του σιδεριτή και του κίστου. Πολύ μικρότερη φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα που αφορά τον κράταιγο. Απαραίτητο είναι να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση για εξακριβωθεί αν τα παραπάνω οπτικά αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με την χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics με σκοπό να εξακριβωθεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.



Πίνακας 41: Δοκιμή Ομοιογένειας Διακυμάνσεων.

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Total_Antioxidants	Based on Mean	4,641	2	6	,061
	Based on Median	2,294	2	6	,182
	Based on Median and with adjusted df	2,294	2	2,291	,284
	Based on trimmed mean	4,465	2	6	,065

Πίνακας 42: Ανάλυση ANOVA.

ANOVA					
Total_Antioxidants	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	49,233	2	24,617	1111,078	<,001
Within Groups	,133	6	,022		
Total	49,366	8			

Πίνακας 43: Ανάλυση Post Hoc.

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Total_Antioxidants						
Bonferroni						
(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-4,50667 <sup>*</sup>	,12153	<,001	-4,9062	-4,1071
	Σιδερίτης	-5,31667 <sup>*</sup>	,12153	<,001	-5,7162	-4,9171
Κίστος	Κράταιγος	4,50667 <sup>*</sup>	,12153	<,001	4,1071	4,9062
	Σιδερίτης	-,81000 <sup>*</sup>	,12153	,002	-1,2095	-,4105
Σιδερίτης	Κράταιγος	5,31667 <sup>*</sup>	,12153	<,001	4,9171	5,7162
	Κίστος	,81000 <sup>*</sup>	,12153	,002	,4105	1,2095

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, καθώς με βάση το κριτήριο Levene που καταγράφεται στον Πίνακας 41 έχουμε  $p=0.061 > 0.05$  οπότε και πραγματοποιείται ανάλυση Ανοva. Από τα αποτελέσματα της έχουμε ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση μεταξύ των δειγμάτων μας. Το που βρίσκεται αυτήν η στατιστική διαφορά προκύπτει από την ανάλυση Bonferroni που φαίνεται



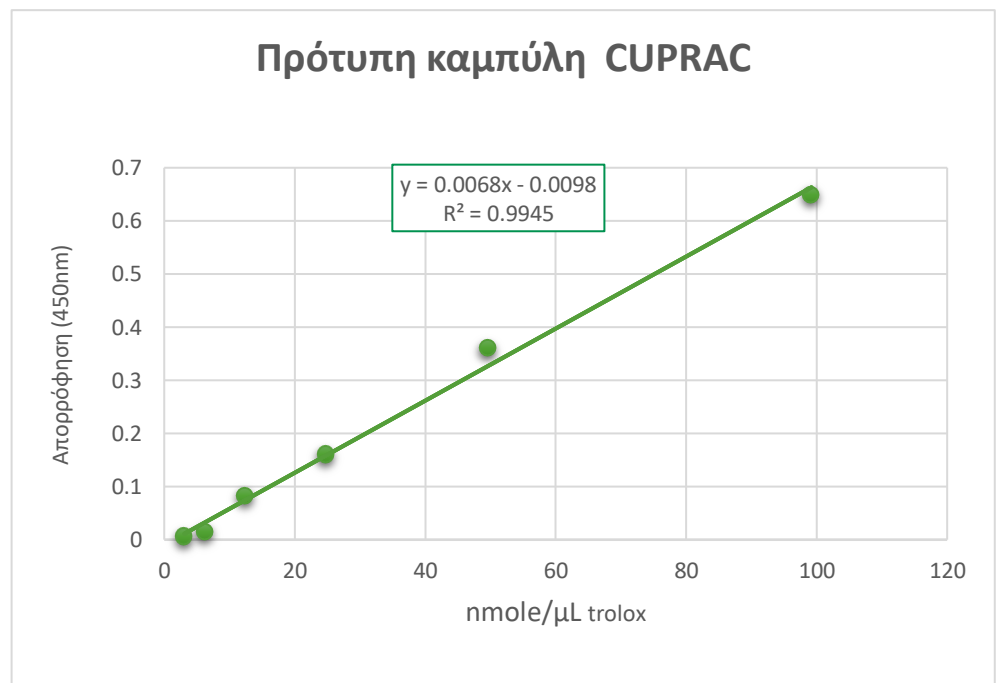
στον Πίνακα 43. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ και των τριών ζευγών δειγμάτων που υπάρχουν καθώς ισχύει ότι το  $p\text{-value} < 0.005$  (Κράταιγος-Κίστος  $p\text{-value} < 0.001$ , Κράταιγος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ , Κίστος-Σιδερίτης  $p\text{-value} = 0.002$ ).

### 3.2.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (CUPRAC)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα Trolox που δημιουργήθηκαν. Τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 44.

Πίνακας 44: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς.

nmole trolox	A510 <sub>nm</sub>
3,1	0,005
6,2	0,014
12,4	0,081
24,8	0,16
49,6	0,359
99,2	0,647



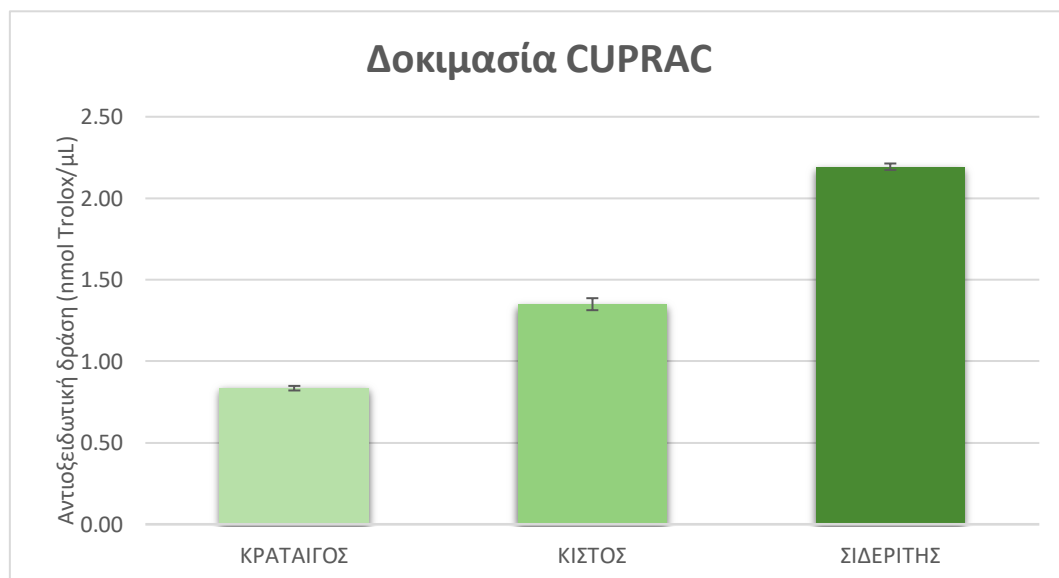
Εικόνα 30: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς (CUPRAC).

Τα εννιά δείγματα τα οποία δημιουργήθηκαν για το πείραμα, τρία για κάθε βότανο, μετρήθηκαν με την χρήση της μεθόδου CUPRAC με σκοπό τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα nmol/μL Trolox με βάση την εξίσωση  $y = 0,0068x - 0,0098$ . Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 45.



Πίνακας 45: Σύγκριση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.

ΔΕΙΓΜΑ		Αντιοξειδωτική ικανότητα (nmol/μL Trolox)	Αντιοξειδωτική ικανότητα (nmol Trolox ) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	0,82	0,84 ± 0,01
	Δ1'	0,85	
	Δ1''	0,83	
ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	1,31	1,35 ± 0,04
	Δ2'	1,37	
	Δ2''	1,37	
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	2,19	2,19 ± 0,02
	Δ3'	2,21	
	Δ3''	2,18	



Σχήμα 5: Ολική Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (CUPRAT).

Παρατηρώντας το Σχήμα 5 με το ραβδόγραμμα που αφορά την συνολική αντιοξειδωτική δράση που προέκυψε, προκύπτει ότι μεγαλύτερη δράση φαίνεται να έχει ο Σιδερίτης, μετά ο κίστος και μετά ο κράταιγος. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics με σκοπό την εξακρίβωση του αν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 46: Δοκιμή Ομοιογένειας Διακυμάνσεων.

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CUPRAT	Based on Mean	3,161	2	6	,115
	Based on Median	,214	2	6	,813
	Based on Median and with adjusted df	,214	2	2,685	,820
	Based on trimmed mean	2,631	2	6	,151



Πίνακας 47: Ανάλυση ANOVA.

ANOVA					
CUPRAT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,828	2	1,414	2544,980	<,001
Within Groups	,003	6	,001		
Total	2,831	8			

Πίνακας 48: Ανάλυση Post Hoc.

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: CUPRAT						
Bonferroni						
(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-,51667*	,01925	<,001	-,5799	-,4534
	Σιδερίτης	-1,36000*	,01925	<,001	-1,4233	-1,2967
Κίστος	Κράταιγος	,51667*	,01925	<,001	,4534	,5799
	Σιδερίτης	-,84333*	,01925	<,001	-,9066	-,7801
Σιδερίτης	Κράταιγος	1,36000*	,01925	<,001	1,2967	1,4233
	Κίστος	,84333*	,01925	<,001	,7801	,9066

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, καθώς με βάση το κριτήριο Levene που καταγράφεται στον Πίνακα 46 έχουμε  $p=0.115 > 0.05$  οπότε και πραγματοποιείται ανάλυση Anova. Από το αποτέλεσμα της έχουμε ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση μεταξύ των δειγμάτων μας. Το που βρίσκεται αυτήν η στατιστική διαφορά προκύπτει από την ανάλυση Bonferroni που φαίνεται στον

Πίνακας 48. Συγκεκριμένα στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ και των τριών ζευγών δειγμάτων που υπάρχουν καθώς ισχύει ότι το  $p\text{-value} < 0.05$  (Κράταιγος-Κίστος  $p\text{-value} < 0.001$ , Κράταιγος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ , Κίστος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ ).



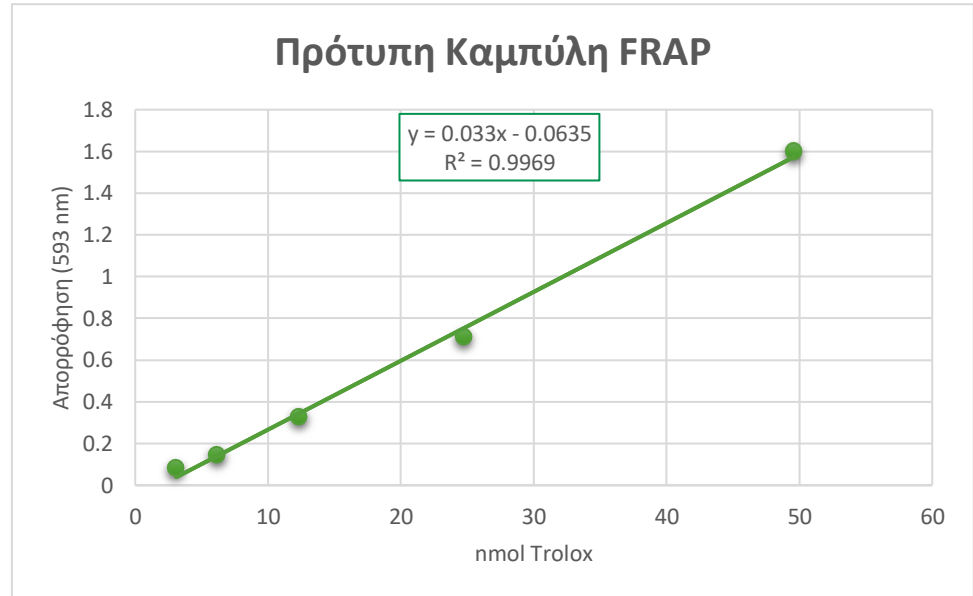


### 3.2.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης (FRAP)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα συγκρίθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση που έδωσαν τα πρότυπα διαλύματα Trolox που δημιουργήθηκαν. Τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 49.

Πίνακας 49: Δεδομένα Καμπύλης Αναφοράς

nmole trolox/μL	A(593nm)
3,1	0,078
6,2	0,144
12,4	0,324
24,8	0,709
49,6	1,599



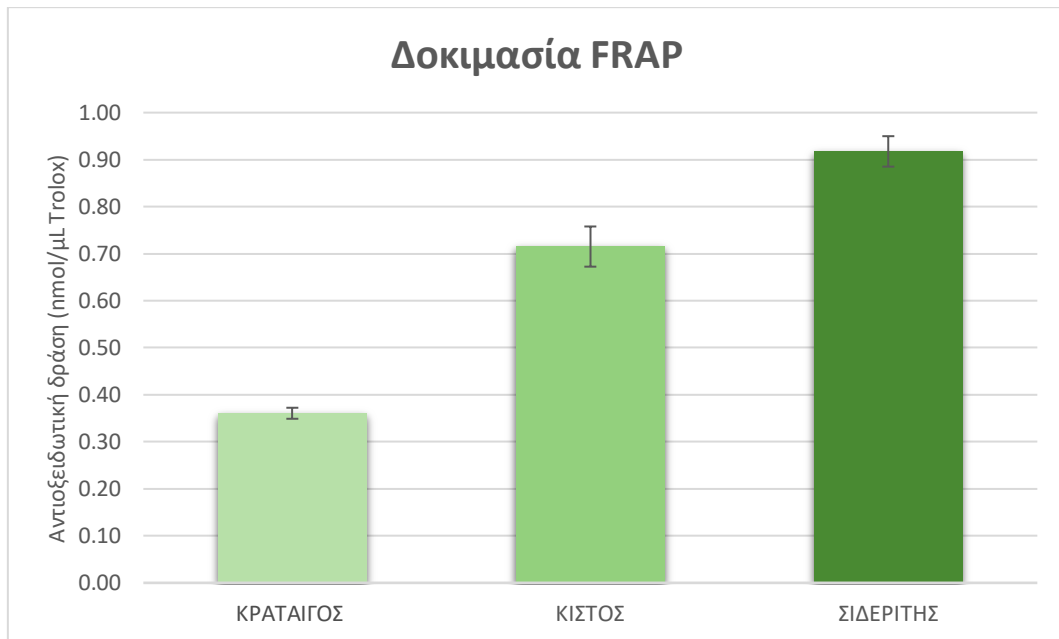
Εικόνα 31: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς (FRAP).

Τα δείγματα που δημιουργήθηκαν μελετήθηκαν με την χρήση της μεθόδου FRAP, με σκοπό τον προσδιορισμό την αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Οι απορροφήσεις που έδωσε το κάθε δείγμα μετατράπηκαν σε ισοδύναμα nmol/μL Trolox με βάση την εξίσωση  $y=0,033x - 0,0635$ .

Πίνακας 50: Σύγκριση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.

ΔΕΙΓΜΑ		Αντιοξειδωτική ικανότητα (nmol/μL Trolox)	Αντιοξειδωτική ικανότητα (nmol/μL Trolox) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
ΚΡΑΤΑΙΓΟΣ	Δ1	0,35	0,36 ± 0,01
	Δ1'	0,36	
	Δ1''	0,37	
ΚΙΣΤΟΣ	Δ2	0,69	0,72 ± 0,04
	Δ2'	0,69	
	Δ2''	0,76	
ΣΙΔΕΡΙΤΗΣ	Δ3	0,88	0,92 ± 0,03
	Δ3'	0,94	
	Δ3''	0,94	





Σχήμα 6: Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (FRAP).

Παρατηρώντας το ραβδόγραμμα το οποίο απεικονίζεται στο Σχήμα 6 προκύπτει ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει ο σιδεριτής, ακολουθούμενος από τον κίστο και έπειτα τον κράταιγος. Φαίνεται η δράση των δειγμάτων να έχει διαφορά, όμως πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια στατιστική ανάλυση μεταξύ των δειγμάτων για να εξακριβωθεί αν οι διαφορές είναι στατιστικώς σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics.

Πίνακας 51: Δοκιμή Ομοιογενοποίηση Διακυμάνσεων.

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
FRAP	Based on Mean	4,383	2	6	,067
	Based on Median	,244	2	6	,791
	Based on Median and with adjusted df	,244	2	4,000	,794
	Based on trimmed mean	3,487	2	6	,099



Πίνακας 52: Ανάλυση ANOVA.

ANOVA					
FRAP					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,481	2	,241	246,045	<,001
Within Groups	,006	6	,001		
Total	,487	8			

Πίνακας 53: Ανάλυση Post Hoc.

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: FRAP						
Bonferroni						
(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Κράταιγος	Κίστος	-,35333*	,02553	<,001	-,4373	-,2694
	Σιδερίτης	-,56000*	,02553	<,001	-,6439	-,4761
Κίστος	Κράταιγος	,35333*	,02553	<,001	,2694	,4373
	Σιδερίτης	-,20667*	,02553	<,001	-,2906	-,1227
Σιδερίτης	Κράταιγος	,56000*	,02553	<,001	,4761	,6439
	Κίστος	,20667*	,02553	<,001	,1227	,2906

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, καθώς με βάση το κριτήριο Levene που καταγράφεται στον Πίνακας 51 έχουμε  $p=0.067 > 0.05$  οπότε και πραγματοποιείται ανάλυση Anova. Από το αποτέλεσμα της έχουμε ότι το  $p\text{-value} < 0.001$  μικρότερο του 0.05 οπότε έχουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση μεταξύ των δειγμάτων μας. Το που βρίσκεται αυτή η στατιστική διαφορά προκύπτει από την ανάλυση Bonferroni που φαίνεται στον Πίνακας 53. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ και των τριών ζευγών δειγμάτων που υπάρχουν καθώς ισχύει ότι το  $p\text{-value} < 0.005$  (Κράταιγος-Κίστος  $p\text{-value} < 0.001$ , Κράταιγος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ , Κίστος-Σιδερίτης  $p\text{-value} < 0.001$ ).



## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης, με σκοπό να προσδιοριστούν τα αντιοξειδωτικά στα φυτά κράταιγος, κίστος και σιδερίτης προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα. Αρχικά όσον αφορά τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται οι εκχυλίσεις των βοτάνων προκύπτει ότι διαφέρουν ανάλογα με το φυτό που έχουμε να επεξεργαστούμε. Συγκεκριμένα, ενώ φαίνεται ότι οι αναλογίες ανάμεσα στον διαλύτη και στο φυτό που λειτουργούν βέλτιστα ισούνται με 1/20 και είναι ίδιες και στα τρία βότανα, οι συνθήκες που αφορούν την θερμοκρασία, τον χρόνο εκχύλισης και την αναλογία των διαλυτών διαφέρουν από βότανο σε βότανο. Έχουμε ότι και τα τρία δείγματα δίνουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ουσιών που μας ενδιαφέρουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, έχουν όμως μικρές διαφορές ( 70 °C κράταιγος, 70 °C κίστος, 80 °C σιδερίτης). Από την κινητική χρόνου προέκυψε ότι ο σιδερίτης απαιτώντας 60 min χρειάζεται τον περισσότερο χρόνο στο εκχύλισης, ο κράταιγος χρειάζεται 45 min, ενώ λιγότερο χρειάζεται ο κίστος ίσο με 30 min. Οι χρονικές διαφορές μεταξύ και το ιδιαίτερα μεγαλύτερο διάστημα το οποίο απαιτεί σιδερίτης πιθανώς οφείλεται στην μορφολογία του φυτού, η οποία είναι με χνούδι. Τέλος, όσον αφορά την αναλογία μεταξύ των δύο διαλυτών που χρησιμοποιήσαμε έχουμε ότι ο κράταιγος και ο κίστος απαιτούν αναλογία C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/dH<sub>2</sub>O 50/50 (%), ενώ ο σιδερίτης αναλογία C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/dH<sub>2</sub>O 25/75 (%).

Για τον έλεγχο της ποσότητας φαινολικών και φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε δοκιμή Folin-Ciocalteu. Προέκυψε ότι για τα ολικά φαινολικά φαίνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση να δίνει ο σιδερίτης (105,89 ± 3,52 nmol/L GA), ποσότητα που είναι σχεδόν διπλάσια με αυτές που έδωσαν ο κράταιγος (44,55 ± 1,23 nmol/L GA) και ο κίστος (55,43 ± 0,70 nmol/L GA). Τα αποτελέσματα που αφορούν τα ολικά φλαβονοειδή έδειξαν ότι ο κίστος εμφανίζει μεγαλύτερη ποσότητα που ισούται με 5,70 ± 0,16 nmol/μL ρουτίνης. Ακολουθεί ο σιδερίτης με συγκέντρωση ίση με 3,60 ± 0,10 nmol/μL ρουτίνης και έπειτα ο κράταιγος με τιμή 1,02 ± 0,01 nmol/μL ρουτίνης.

Πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές ABTS, DPPH, CUPRAT και FRAP με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε βότανου. Οι τρεις δοκιμές εκτός της ABTS έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των βοτάνων με φθίνουσα σειρά είναι σιδερίτης, κίστος και κράταιγος. Συγκεκριμένα, η δοκιμή DPPH έχει αποτελέσματα για τον κράταιγο 1,29 ± 0,0087 nmol/μL Trolox, για τον κίστο 5,80 ± 0,0699 nmol/μL Trolox και για τον σιδερίτη 6,61 ± 0,2468 nmol/μL Trolox. Η δοκιμή CUPRAT δίνει τιμές για κάθε βότανο ίσες με 0,84 ± 0,01 nmol/μL Trolox για τον κράταιγο, 1,35 ± 0,04 nmol/μL Trolox για τον κίστο και 2,19 ± 0,02 nmol/μL Trolox για τον σιδερίτη. Τέλος, για το την δοκιμή FRAP σημειώθηκαν τιμές ίσες με 0,36 ± 0,01 nmol/μL Trolox (κράταιγος), 0,72 ± 0,04 nmol/μL Trolox (κίστος) και 0,92 ± 0,03 nmol/μL Trolox (σιδερίτης). Τα αποτελέσματα της μέθοδος ABTS έδειξαν ότι μεγαλύτερη ποσότητα αντιοξειδωτικών έχουν ο κίστος (9,05 ± 0,16 nmol/μL Trolox) και ο σιδερίτης (8,10 ± 0,34 nmol/μL Trolox). Ο κράταιγος δίνει μικρότερη μέση τιμή ποσοτήτων των δειγμάτων του ίση με 3,53 ± 0,17 nmol/μL Trolox.

Παρατηρείται ότι σε κάθε δοκιμασία είτε για αντιοξειδωτική δράση είτε για προσδιορισμό φαινολικών και φλαβονοειδών ο κράταιγος είναι το δείγμα που δίνει τις μικρότερες συγκεντρώσεις, τιμές που είναι επίσης αναλογικά πολύ μικρότερες από αυτές



που δίνουν τα άλλα δύο βότανα. Αυτό πιθανόν μπορεί να οφείλεται είτε στην μορφολογία του ίδιου του φυτού και την ποσότητα των ουσιών που διερευνώνται, είτε στο ίδια την μέθοδο που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα ώριμου καρπού κράταιγου χωρίς κουκούτσι, κάτι που βιβλιογραφικά μπορεί να συνδεθεί με το ότι έχει αποδειχθεί ότι οι ποσότητα των φαινολικών ενώσεων μειώνεται σημαντικά από την στιγμή πριν ανθίσει το φυτό με αυτή που περιέχει όταν ο καρπός είναι ώριμος.

Μελλοντικά είναι αναγκαίο να γίνουν περαιτέρω πειράματα όσον αφορά τον κράταιγο έτσι ώστε να αποδειχθεί αν μπορεί να δώσει υψηλότερες τιμές από τα δύο άλλα βότανα σε κάποια άλλη χρονική στιγμή συγκομιδής του ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Επιπλέον, για τα βότανα κίστο και σιδερίτη που έχουν αποδειχθεί εκτενώς και βιβλιογραφικά οι υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών, είναι απαραίτητο να ενσωματωθούν σε κάποιο λειτουργικό τρόφιμο και να ερευνηθούν οι τελικές τιμές αντιοξειδωτικών που θα περάσουν μέσω αυτού στον ανθρώπινο οργανισμό. Μελέτες δείχνουν ότι τα αντιοξειδωτικά μειώνονται σημαντικά μετά την κατανάλωση τους μέσω κάποιου τρόφιμου, οπότε η περαιτέρω έρευνα για την σταθεροποίηση τους μέσα στον ίδιο τρόφιμο κρίνεται απαραίτητη.



## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alirezalu, A., Salehi, P., Ahmadi, N., Sonboli, A., Aceto, S., Maleki, H. H., & Ayyari, M. (2018). Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran. *https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446146*, 21(1), 452–470.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446146>
2. Ávila-Escalante, M. L., Fibi Coop-Gamas, |, Cervantes-Rodríguez, M., & Aranda-González, I. I. (2020). The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases-Clinically controlled trials. *J Food Biochem*, 44, 13191. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13191>
3. Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099–2107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.139>
4. *Comparison of antioxidant assay methods (Prior et al., 2005)*. | *Download Scientific Diagram*. (n.d.). Retrieved September 11, 2022, from [https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-antioxidant-assay-methods-Prior-et-al-2005\\_tbl1\\_44139185](https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-antioxidant-assay-methods-Prior-et-al-2005_tbl1_44139185)
5. Consonni, R., & Ottolina, G. (2022). NMR Characterization of Lignans. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 2340, 27(7), 2340. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27072340>
6. Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., & Shipley, P. R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5–26. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2012.04.006>
7. Gawel-Bęben, K., Kukula-Koch, W., Hoian, U., Czop, M., Strzępek-Gomółka, M., & Antosiewicz, B. (2020). Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. Extracts as Potential Multifunctional Antioxidant Ingredients for Skin Protecting Cosmetics. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 202, 9(3), 202. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030202>
8. González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2011). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 209–225. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2011.03.014>
9. Hollman, P. C., & Arts, I. C. (2000). *Review Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7)
10. Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2013.09.054>
11. Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.10.001>
12. Kumar, P. V. N., Elango, P., Asmathulla, S., & Kavimani, S. (2017). A systematic review on lycopene and its beneficial effects. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(4), 2113–2120. <https://doi.org/10.13005/BPJ/1335>



13. Li, T., Fu, S., Huang, X., Zhang, X., Cui, Y., Zhang, Z., Ma, Y., Zhang, X., Yu, Q., Yang, S., & Li, S. (2022). Biological properties and potential application of hawthorn and its major functional components: A review. *Journal of Functional Foods*, *90*, 104988. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2022.104988>
14. Moussavi, N., Azizullah, H., Malterud, K. E., Inngjerdingen, K. T., & Wangensteen, H. (2022). Immunomodulating polyphenols from *Sideritis scardica*. *Journal of Functional Foods*, *96*, 105197. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2022.105197>
15. Oalđe, M., Kolarević, S., Živković, J., Alimpić Aradski, A., Jovanović Marić, J., Kračun Kolarević, M., Đorđević, J., Marin, P. D., Šavikin, K., Vuković-Gačić, B., Vuković-Gačić, B., & Duletić-Laušević, S. (2021). A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models in vitro. *Food and Function*, *12*(7), 3233–3245. <https://doi.org/10.1039/d1fo00447f>
16. Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10–36. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.04.018>
17. Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., & Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, *100*(2), 579–583. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.086>
18. Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *209*, 112891. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112891>
19. Riehle, P., Vollmer, M., & Rohn, S. (2013). Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions — Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International*, *53*(2), 891–899. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.09.020>
20. Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/JF026182T/ASSET/IMAGES/LARGE/JF026182TF00004.JPEG>
21. Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, *92*(2), 235–254. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.08.004>
22. Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). *The Role of Antioxidants in Human Health*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
23. Shahkar, E., Yun, H., Kim, D. J., Kim, S. K., Lee, B. I., & Bai, S. C. (2015). Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, *438*, 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.01.001>
24. Shen, T., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, *26*(7), 916–935. <https://doi.org/10.1039/B905960A>
25. Sies, H. (2000). *What is Oxidative Stress?* 1–8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8_1)





26. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037>
27. Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239. <https://doi.org/10.1016/j.EJMECH.2014.07.013>
28. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3).
29. Todorova, M., & Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.022>
30. Young, I. S., & Woodside, J. v. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
31. Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S., Khalil Alyahya, H., & Mhand, R. A. (2021). A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants 2021, Vol. 10, Page 1214, 10(6)*, 1214. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10061214>

