

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη αντιοξειδωτικών συστατικών φύλλων του φυτού γκότζι (*Lycium* sp.)
διαφόρων γονοτύπων καλλιεργούμενων στην Ελλάδα**



ΙΟΥΛΙΑ Φ. ΜΠΕΛΔΕΚΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΤΣΑΝΤΙΛΗ ΕΛΕΝΗ

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη αντιοξειδωτικών συστατικών φύλλων του φυτού γκότζι (*Lycium* sp.)
διαφόρων γονοτύπων καλλιεργούμενων στην Ελλάδα**



ΙΟΥΛΙΑ Φ. ΜΠΕΛΔΕΚΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΤΣΑΝΤΙΛΗ ΕΛΕΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη αντιοξειδωτικών συστατικών φύλλων του φυτού γκότζι (*Lycium sp.*)
διαφόρων γονοτύπων καλλιεργούμενων στην Ελλάδα**



ΙΟΥΛΙΑ Φ. ΜΠΕΛΔΕΚΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΤΣΑΝΤΙΛΗ ΕΛΕΝΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΑΝΤΙΛΗ ΕΛΕΝΗ Επιβλέπτουσα, Καθηγήτρια,
ΤΖΟΥΤΖΟΥΚΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ, Λέκτορας
ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Καθηγητής

Περίληψη

Το γένος *Lycium*, στο οποίο ανήκουν τα είδη *L. barbarum* και *L. chinense* που οι καρποί τους είναι γνωστοί ως γκότζι μπέρι, είναι ενδημικό της Ασίας και συγκεκριμένα της Κίνας. Τα τελευταία χρόνια, οι καρποί των γκότζι μπέρι συγκαταλέγονται στις λεγόμενες «υπερτροφές» λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιγηραντικών τους ιδιοτήτων. Επιπλέον, αφεψήματα από τα φύλλα τους καταναλώνονται παραδοσιακά σε χώρες της Ασίας.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν τα αφεψήματα από έξι γονότυπους του *L. barbarum* και ένα του *L. chinense*. Τα φύλλα των αφεψημάτων προήλθαν από σπορόφυτα που καλλιεργήθηκαν στο Βραχάτι Κορινθίας. Τα αφεψήματα παρασκευάστηκαν μετά από βρασμό λυοφιλιωμένων φύλλων γκότζι μπέρι σε νερό. Το νερό ως διαλύτης προτιμήθηκε προκειμένου τα αφεψήματα να προσομοιάζουν με αυτά που παρασκευάζονται με τον παραδοσιακό τρόπο. Στα αφεψήματα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και флаβονοειδών, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των λιποπρωτεϊνών του όρου αίματος και έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των απλών φαινολικών ενώσεων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή μάζας (GC/MS).

Οι τιμές των TP κυμάνθηκαν μεταξύ 67,8 και 106,6 ισοδύναμα mg GA L⁻¹ αφεψήματος, των ολικών флаβονοειδών μεταξύ 14,9 και 50 mg CA Eq L⁻¹, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτιμώμενη με τη μέθοδο DPPH και FRAP, μεταξύ 0,04 και 0,18 ισοδύναμα mM trolox L⁻¹ αφεψήματος και 0,11 και 0,19 mM ασκορβικού οξέος Eq L⁻¹, αντίστοιχα. Ο υψηλότερος χρόνος αντίστασης του ορού στην οξειδωση παρατηρήθηκε στα αφεψήματα από ένα γονότυπο του *L. barbarum*, A321/S, και στον γονότυπο του *L. chinense* που μελετήθηκε.

Μετά την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία ανιχνεύθηκαν η τυροσόλη, τα φαινολικά οξέα p- υδροξυβενζοϊκό, βανιλικό, προτοκατεχικό, συριγγικό, φερουλικό, καφεϊκό και χλωρογενικό, καθώς και τα флаβονοειδή καμφερόλη και κερκετίνη. Το υψηλότερο άθροισμα των παραπάνω φαινολικών ενώσεων παρουσιάστηκε στον γονότυπο A321/S σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γονότυπους, ενώ το άθροισμα σε όλους κυμάνθηκε από 212 έως 2265 μg L⁻¹ αφεψήματος.

Συμπερασματικά, τα αφεψήματα από γκότζι μπέρι που καλλιεργούνται στην Ελλάδα περιέχουν σημαντικές ποσότητες ουσιών με αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως λειτουργικά αφεψήματα.

Λέξεις κλειδιά: *Lycium sp.*, αφεψήματα φύλλων γονότυποι, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro*, αντιοξειδωτική ικανότητα ορού αίματος

Study of antioxidant characteristics of goji berry (*Lycium* sp.) leaves in different genotypes cultivated in Greece

Abstract

Lycium barbarum and *Lycium chinense* are two closely related species of boxthorn, native in Asia. Their fruits, goji berries, belong to the so-called superfoods, while decoctions of their leaves are traditionally consumed in Asia. Recently, successful goji cultivation started in Greece. The present work aimed to determine the phenolic antioxidants and to evaluate the functional properties of decoctions prepared from goji leaves obtained from six genotypes of *L. barbarum* and one genotype of *L. chinense* seedlings cultivated in Vrahati, Korinthia, Greece.

Decoctions were prepared by infusing 12 g of dry leaves into 1 L of boiling water. After cooling, infusions were filtered, lyophilized and residues were stored at -40° C. Total phenolics and total flavonoids content, DPPH radical scavenging capacity and ferric reducing power (FRAP) of goji leaves infusions were determined by photometric assays. HPLC-ESI-MS analysis was performed to study the composition of phenolic compounds. In addition, the antioxidant activity of infusions against copper induced serum lipid oxidation was assayed.

The infusion process yielded 225-306 mg dry residue/g of leaves. Total phenolic and total flavonoid content ranged between 66.3-108.2 mg gallic acid L⁻¹ of infusion and 13.7-53.5 mg catechin L⁻¹, respectively. The radical scavenging capacity of the infusions ranged from 0.04-0.18 mM Trolox equivalents, and their reducing power ranged from 0.11 to 0.19 mM ascorbic acid equivalents.

GC-MS analysis of the infusions revealed the presence of (a) tyrosol, (b) the phenolic acids benzoic, protocatechuic, syringic, and vanillic, (c) the hydroxycinnamic acids p-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic, and chlorogenic, and (d) the flavonoids kaempferol and quercetin. The sum of simple phenolics concentrations ranged between 212 and 2265 µg L⁻¹ of infusion, with the highest sum being observed in A321/S.

Among the genotypes studied the infusion of *L. chinense* and A321/S exhibited substantial inhibition of total serum oxidizability by increasing the oxidation lag time, being between 800 and 1000 sec, whereas the rest genotypes were below 200 sec or not measurable/detectable.

It is concluded that leaves from goji plants cultivated in Greece, contain significant amounts of phenolic antioxidants, and exert antioxidant and functional actions.

Keywords: *Lycium* sp., leaf decoctions, genotypes, phenolic compounds, antioxidant capacity, inhibition of total serum oxidizability

Αντί προλόγου,

Από αυτό το σημείο θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Καθηγήτρια Ελένη Τσαντίλη για την καθοδήγηση, την στήριξη και εμπιστοσύνη που με έδειξε αναθέτοντας μου ένα τόσο σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νίκο Καλογερόπουλο για την επιστημονική του καθοδήγηση και που με καλή διάθεση με δέχτηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τα πειράματά μου στο εργαστήριο του και να γνωρίσω έναν διαφορετικό εκπαιδευτικό χώρο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την φίλη και συνάδελφο Δρ Μίνα Καυκαλέτου για την πολύτιμη και απεριόριστη βοήθεια σε αυτή την εργασία τόσο επιστημονικά και ηθικά.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	5
1.1	Γενικά για τογκότζι μπέρι	5
1.1.2	Βοτανικοί χαρακτήρες	5
1.1.3	Ποικιλίες	7
1.1.4	Πολλαπλασιασμός	7
1.1.5	Εδαφοκλιματικές συνθήκες	7
1.1.6	Καλλιεργητική τεχνική – Φύτευση	8
1.1.7	Λίπανση	8
1.1.8	Άρδευση	9
1.1.9	Κλάδεμα	9
1.1.10	Άνθηση – Καρποφορία	9
1.1.11	Συγκομιδή	10
1.2	Αφεψήματα και αντιοξειδωτικά	11
1.2.1	Η σημασία των αντιοξειδωτικών	12
1.3	Σκοπός του πειράματος	14
2	Υλικά και μέθοδοι	15
2.1	Φυτικό υλικό	15
2.2	Προετοιμασία αφεψημάτων	19
2.2.1	Πλεονεκτήματα της τεχνικής της λυοφιλίωσης	19
2.3	Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu	20 (FC)
2.3.1	Αρχή μεθόδου	20
2.3.2	Αναλυτική πορεία	20
2.3.3	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	21
2.4	Προσδιορισμός συνολικού περιεχόμενου σε φλαβονειδή	22
2.4.1	Αρχή της μεθόδου	22
2.4.2	Αναλυτική πορεία	22
2.4.3	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	22
2.5	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2- πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH')	
2.5.1	Αρχή της μεθόδου	22
2.5.2	Αναλυτική πορεία	23

2.5.3	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	23
2.6	Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)	24
2.6.1	Αρχή της μεθόδου	
2.6.2	Αναλυτική πορεία	24
2.6.3	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	24
2.6.4	Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των αφεψημάτων από φύλλα γκότζι μπέρρις στις λιποπρωτεΐνες του ορού	
2.6.5	Παραλαβή ορού	25
2.6.6	Αρχή της μεθόδου	25
2.6.7	Αναλυτική πορεία	25
2.6.8	Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών	26
2.6.9	Αναλυτική πορεία	27
2.6.10	Αντίδραση σιλυλίωσης	27
2.6.11	Αέρια Χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) για τον προσδιορισμό πολυφαινολών	27
2.6.12	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	29
2.6.13	Αποτελέσματα και Συζήτηση	30
2.6.14	Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου πολυφαινολών	30
2.6.15	Προσδιορισμός συνολικού περιεχόμενου σε φλαβονειδή	31
2.6.16	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)	33
2.6.17	Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)	34
2.6.18	Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των λιποπρωτεϊνών του ορού	35
2.6.19	Προσδιορισμός απλών φαινολικών ενώσεων	36
2.6.20	Συμπεράσματα	38
2.6.21	Βιβλιογραφία	41

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για το γκότζι μπέρι

Το γκότζι μπέρι (ή wolfberry fruit) είναι ο καρπός ενός φυλλοβόλου δένδρου-θάμνου που ανήκει στο γένος *Lycium* και στην οικογένεια των σολανωδών (*Solanaceae*). Κατάγεται από την Κεντρική Ασία, κυρίως από την περιοχή του Θιβέτ με την ονομασία gouqi για το φυτό και gouqizi για τον καρπό. Χρησιμοποιούνταν από τους Κινέζους κυρίως για ιατρικούς λόγους με αναφορές πριν από 2300 χρόνια. Τα είδη γκότζι μπέρι, είναι φυλλοβόλα, ξυλώδη, πολυετή φυτά, που αναπτύσσονται σε ύψος 1–3 μ. Το *L. chinense*, καλλιεργείται στη νότια Κίνα και τείνει να είναι κάπως βραχύτερο, ενώ το *L. barbarum* καλλιεργείται στον βορρά, πρωτίστως στην Αυτόνομη Περιοχή *Ningxia Hui* και τείνει να είναι κάπως υψηλότερο. Καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο και οι χώρες παραγωγής είναι η Β. και Ν. Αμερική, η Ν. Αφρική, η Ευρώπη και η Αυστραλία (Fukuda *et al.*, 2001).

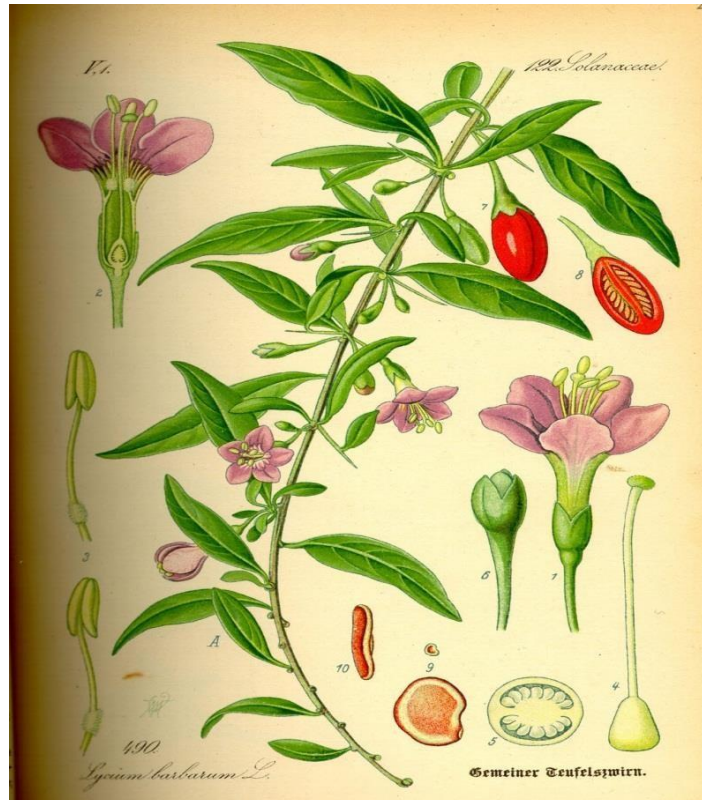
Το γκότζι μπέρι αποτελεί μια καινούργια καλλιέργεια, η οποία αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια στην χώρα μας εξαιτίας της ιδιαίτερης έμφασης που έχει δοθεί στην έρευνα για τις βιοδραστικές ή λειτουργικές τροφές, λόγω των θετικών επιδράσεων τους στη πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών, αλλά και λόγω της ενημέρωσης και ζήτησης των καταναλωτών. Καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο, στην Θεσσαλία και στην Μακεδονία (Ρούσσο, 2013). Πιο συγκεκριμένα καλλιεργείται για τους καρπούς του, οι οποίοι καταναλώνονται κυρίως σε ξηρή μορφή, αλλά στις περιοχές παραγωγής μπορεί να καταναλωθούν και σε νωπή μορφή.

1.1.2 Βοτανικοί χαρακτήρες

Το γκότζι μπέρι ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae*, στο γένος *Lycium* και αποτελείται από διάφορα είδη, όπως το *L. barbarum*, *L. chinense* (μόνο καλλωπιστική χρήση και χρησιμοποιείται συχνά στον σχηματισμό φραχτών), το *L. europaeum* (αυτοφυές της Νότιας Ευρώπης) και το *L. minimum* (ενδημικό της Νότιας Αμερικής) (Levin *et al.*, 2008). Το *L. barbarum*, είναι φυλλοβόλο δένδρο-θάμνος που μπορεί να φτάσει μέχρι και το ύψος των 4 μ. και 1,5 μ. σε πλάτος, με διάρκεια ζωής που μπορεί να ξεπεράσει τα 100 χρόνια.

Τα φύλλα του *L. barbarum* είναι γκριζοπράσινα, λογχοειδή, με τραχιές ή κυκλικές άκρες και σχηματίζονται επάνω στους βλαστούς. Είναι είτε μονήρη ή εναλλασσόμενα σε δέσμες των 3 ή περισσότερων. Επάνω στα στελέχη του ξύλου σχηματίζονται από 1 έως 3 άνθη 1 με 2 εκ. πλάτος. Ο

κάλυκας αποτελείται από πέταλα σε σχήμα καμπάνας ή σωληνωτά που διαμορφώνονται σε μικρούς, τριγωνικούς λοβούς. Η στεφάνη του κάλυκα, που σχηματίζεται από τα πέταλα του άνθους, έχει χρώμα μωβ ή πορφυρό, με πλάτος 9 με 14 χιλ. και διαθέτει 5 ή 6 λοβούς μικρότερους από τον σωλήνα. Οι στήμονες διαθέτουν ανθήρες που ανοίγουν (Amagase and Farnsworth, 2011). Η ανθοφορία του παρατηρείται, στο Βόρειο Ημισφαίριο, από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο.



Εικόνα 1.1. Βοτανική απεικόνιση του γκότζι μπέρι.

Ο καρπός είναι ελλειψοειδής ράγα (6-20 χιλιοστά μήκος και 3-8 χιλιοστά διάμετρο), χρώματος κόκκινο-πορτοκαλί με 20-30 σπόρους, οι οποίοι δε γίνονται αντιληπτοί κατά την μάσηση. Είναι φυτό αυτογόνιμο. Η ωρίμανση των καρπών, στο Βόρειο Ημισφαίριο, γίνεται από τον Αύγουστο έως και τον Σεπτέμβριο (Amagase and Farnsworth, 2011).

1.1.3 Ποικιλίες

Συναντάμε πάνω από 40 ποικιλίες του γένους *Lycium*, όμως οι 3 πιο ισχυρές από αυτές είναι: τα άγρια μούρα *Lycium goji berries* Tibet (Θιβέτ και Μογγολία), τα κινέζικα *Ningxia wolfberries* (*Lycium barbarum*) από όπου προέρχονται και οι επιλογές NQ No1 (ημίγλυκα), *L. barbarum* No4 (γλυκά), *L. barbarum* No6 (ημίγλυκα) και επίσης τα κινέζικα *Xinjiang wolfberries* που καλλιεργούνται στην Κίνα. Τέλος, υπάρχουν και οι ποικιλίες *L. barbarum* DaMaYe και *L. chinense var rotaninii*, cv Jiaqiguo (Amagase and Farnsworth, 2011). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Δυτική Ασία και αφορούσε στη διερεύνηση των κύριων συστατικών του *L. barbarum* από διαφορετικές περιοχές, διαπιστώθηκε ότι οι καρποί ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας διέφεραν στο ποσοστό των πολυφαινολών και των πολυσακχαριτών (Dong *et al.*, 2012).

1.1.4 Πολλαπλασιασμός

Το φυτό πολλαπλασιάζεται με σπόρο, ένας εύκολος τρόπος πολλαπλασιασμού αλλά με μη σταθερή διάρκεια λήθαργου (και όπως αναμένεται με μη σταθερούς γονοτύπους φυτών), με μοσχεύματα (φυλλοφόρα και άφυλλα ξυλοποιημένα), με καταβολάδες (κυρίως με αποκοπή παραφυάδων) και τέλος με ιστοκαλλιέργεια (Amagase and Farnsworth, 2011). Για την δημιουργία ποικιλιών σταθερών γονοτύπων θα πρέπει να γίνεται επιλογή κάποιου γονοτύπου με αγενή πολλαπλασιασμό, όπως με μοσχεύματα. Θα πρέπει τα μοσχεύματα να διατηρούνται σε χώρο με υγρασία, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αφυδάτωσή τους. Τα μοσχεύματα έπειτα φυτεύονται σε ένα μίγμα άμμου και τύρφης που διατηρείται υγρό. Οι πρώτες ρίζες εμφανίζονται μετά από 1-2 εβδομάδες. Η μεταφύτευση τους γίνεται μετά από 3 βδομάδες (Amagase and Farnsworth., 2011).

1.1.5 Εδαφοκλιματικές συνθήκες

Το γκότζι μπέρι είναι ένα φυτό που ευδοκιμεί στις εύκρατες και ηλιόλουστες περιοχές. Όσον αφορά στην θερμοκρασία, μπορεί να ανταπεξέλθει σε ευρεία κλίμακα: από -15° C έως ακόμα και πάνω από 40° C, ενώ απαιτεί ηλιοφάνεια μεγάλης διάρκειας. Παρ' όλα αυτά, σε θερμοκρασίες πάνω από 38° C παρουσιάζει στασιμότητα στην ανάπτυξη και αδυναμία στο δέσιμο των καρπών. Πέραν τούτου, όταν υποχωρήσει η θερμοκρασία, επανέρχεται σε κανονική δραστηριότητα (Amagase and Farnsworth, 2011). Δεν μπορεί⁵ να αναπτυχθεί σε περιοχές που επικρατούν θερμοκρασίες της τάξης των -23° C (Gross *et al.*,

2006). Πρέπει να καλλιεργείται σε περιοχές με ύψος βροχής που κυμαίνεται στα 100 με 700 mm. Το φυτό είναι ανεκτικό στους δυνατούς ανέμους και σταγονίδια θάλασσας. Ευδοκίμει σε καλά αποστραγγισμένα εδάφη, πλούσια σε οργανική ουσία, με pH 7.0-8.0, αρκεί να αερίζονται καλά (Amagase and Farnsworth, 2011). Μπορεί να αναπτυχθεί και σε πιο φτωχά εδάφη, με τη βοήθεια της χωνεμένης κοπριάς. Το αλκαλικό έδαφος παίζει σημαντικό ρόλο στην ποσότητα και την ποιότητα της παραγωγής.

1.1.6 Καλλιεργητική τεχνική - Φύτευση

Γίνεται χρήση πιστοποιημένων φυτών που τοποθετούνται σε γλαστράκια με μπάλα χώματος. Η τεχνική φύτευσης που χρησιμοποιείται είναι γραμμική με αποστάσεις φύτευσης 2 - 2,3 x 3,5 – 4 μέτρα περίπου, οι μεγάλες αποστάσεις μπορεί να βοηθούν στη μηχανοποίηση της καλλιέργειας, όμως η συγκομιδή με το χέρι είναι προτιμότερη και μάλιστα με βαμβακερά γάντια, καθώς οι καρποί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στις μεταχειρίσεις. Φυτεύονται συνολικά 170 - 250 φυτά ανά στρέμμα. Η παραγόμενη ποσότητα καρπού μπορεί να ξεπεράσει τον 1 τόνο ανά στρέμμα. Παραγωγή καρπών έχουμε από τον πρώτο με δεύτερο χρόνο και πλήρη παραγωγή από τον τρίτο με τέταρτο χρόνο (Amagase and Farnsworth, 2011).

1.1.7 Λίπανση

Γενικά το φυτό αυτό δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες λιπαντικών μονάδων, όμως με τη χρήση 1– 2 τόνων το στρέμμα καλά χωνεμένης κοπριάς από αιγοπρόβατα βοηθάμε στη βελτιστοποίηση της γονιμότητας του εδάφους και κατά συνεπεία στην καλύτερη ανάπτυξη του φυτού.

Έχει καλή ανταπόκριση στο άζωτο αλλά οτιδήποτε επιπλέον μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ανάπτυξης, όπως δημιουργία πολλών λαίμαργων βλαστών, σε βάρος της παραγωγής καρπών. Η εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων (π.χ. ουρίας) πρέπει να γίνεται σε τρεις δόσεις (τέλη Απριλίου, Μαΐου και Ιουνίου), αφού πρώτα προηγηθεί ανάλυση εδάφους ώστε να εκτιμηθούν οι ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά και σε τι ποσότητες. Προτείνεται όμως και κατά τα παραγωγικά χρόνια μία λίπανση ισορροπημένη ώστε να δίδονται τα βασικά θρεπτικά στοιχεία (N-P-K) (Amagase and Farnsworth, 2011).

1.1.8 Άρδευση

Το γκότζι μπέρι θεωρείται ανθεκτικό στην ξηρασία και μπορεί να αναπτυχθεί σε ξηρικές και ημιξηρικές περιοχές. Δεν έχει μεγάλες απαιτήσεις σε νερό, απαιτεί όμως συστηματική άρδευση κατά τα 2-3 πρώτα χρόνια από την εγκατάστασή του, μέχρι να αναπτύξει πλούσιο ριζικό σύστημα. Επίσης, κατά την διάρκεια της παραγωγής θα πρέπει να ποτίζεται όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, απαραίτητως τα νεαρά φυτά πρέπει να ποτίζονται τακτικά (ακόμα και 2 φορές την εβδομάδα) (Amagase and Farnsworth, 2011). Η καλύτερη μέθοδος αρδεύσεως είναι με σταγόνες (μπεκάνια) διότι αποφεύγεται η διαβροχή των φύλλων και κατά συνέπεια η ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών. Η συχνότητα της άρδευσης εξαρτάται τόσο από την ηλικία του φυτού, όσο και από τον τύπο του εδάφους και την εποχή. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στην αλατότητα (μόνο το *L. barbarum* και συγκεκριμένα το ενήλικο φυτό μπορεί να αντέξει σε αλατότητα μέχρι και $11 \text{ g NaCl kg}^{-1}$ εδάφους $\sim 20 \text{ dS m}^{-1}$) οπότε προτείνεται για περιοχές με νερό υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Προσαρμόζεται καλύτερα σε εδάφη με συγκέντρωση άλατος μικρότερη από 0.2%, σε έδαφος με $\text{EC}=10 \text{ dS m}^{-1}$ υπήρξε βελτίωση της ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα (Ρούσσο, 2013).

1.1.9 Κλάδεμα

Το δένδρο μπορεί να πάρει την μορφή θάμνου με κατάλληλο κλάδεμα (κρεμοκλαδής μορφή). Προτείνεται και ένα είδος με πλάγια βλάστηση που ξεκινά από τα 50-60 εκ. μέχρι και ύψος περί τα 1.5- 2 μέτρα (Amagase and Farnsworth, 2011). Στόχος του κλαδέματος είναι η έκθεση των βλαστών στο φως και συνήθως κλαδεύονται ελαφρά. Την άνοιξη αφαιρούνται αδύναμοι, ξηροί ή γερασμένοι βλαστοί ενώ οι πολύ ζωηροί συντέμνονται σε μια πλάγια βλάστηση (εφαρμογή κλαδέματος επιστροφής). Επίσης, γίνεται αραίωμα σε βλαστούς που συνωστίζονται με σκοπό τον καλύτερο φωτισμό και αερισμό. Στο καλοκαιρινό κλάδεμα γίνεται αφαίρεση λαίμαργων βλαστών ή παραφυάδων. Για αναγέννηση μπορεί να κλαδευτεί χαμηλά ώστε να αναπτυχθούν νέοι βλαστοί (Ρούσσο, 2013)..

1.1.10 Άνθηση - Καρποφορία

Απαιτούνται περίπου 35-40 ημέρες από την πλήρη άνθηση έως την ωρίμανση των καρπών, ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας. Παράγεται πάνω από 1 kg καρπού ανά φυτό ήδη από το 2^ο χρόνο. Επίσης, μπορεί να δώσει καρπούς από το πρώτο καλοκαίρι μετά το φύτεμα, 0,5–1 kg ανά δένδρo.

Μετά τον 3^ο-4^ο χρόνο το φυτό μπαίνει σε πλήρη παραγωγή, 4-5 kg ανά δενδρύλλιο, η οποία διαρκεί για πολλά χρόνια (Amagase and Farnsworth, 2011).



Εικόνα 1.2. Ανθός του φυτού γκότζι μπέρι

1.1.11 Συγκομιδή

Κριτήρια συγκομιδής των καρπών αποτελούν το λαμπερό κόκκινο χρώμα, η μέτρια συνεκτικότητα και ικανοποιητικά διαλυτά στερεά που προσδίδουν μια γλυκιά γεύση.

Η συλλογή των καρπών γίνεται είτε με το χέρι, με γάντια για προστασία των χεριών, ή με δόνηση και πτώση των καρπών πάνω σε ύφασμα, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους. Προτιμώνται οι πρωινές ή βραδινές ώρες, γενικότερα αποφεύγονται ώρες ή ημέρες με αυξημένη υγρασία, μετά από βροχή ή υπό υψηλή θερμοκρασία, διότι υποβαθμίζεται η ποιότητα του προϊόντος. Η συλλογή των καρπών γίνεται κάθε 3-4 ημέρες και διαρκεί από Ιούλιο - Αύγουστο μέχρι και Οκτώβριο-Νοέμβριο στην Ελλάδα, ανάλογα με την περιοχή και τις κλιματολογικές συνθήκες μπορεί να διαρκέσει και παραπάνω (Ρούσσος, 2013). Εφόσον οι καρποί προορίζονται για αποξήρανση οδηγούνται σε σκιά για να διατηρήσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και έπειτα μεταφέρονται στον ήλιο μέχρι ο φλοιός να γίνει σκληρός αλλά η σάρκα να παραμένει μαλακή. Εάν προορίζονται για νωπή κατανάλωση διατηρούνται από 10 έως το πολύ 15 ημέρες μετά τη συγκομιδή σε χαμηλή θερμοκρασία (Kafkaletou *et al.*, 2017). Τέλος, πολλοί καταψύχουν τους καρπούς και τους διακινούν κατεψυγμένους ώστε να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερο τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (Ρούσσος, 2013).



Εικόνα 1.3. Καρποί γκότζι μπέρι

1.2 Αφεψήματα και αντιοξειδωτικά

Πολλά φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική και στη μαγειρική. Καταναλώνονται ευρέως σε όλο τον κόσμο, λόγω της γεύσης και των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων. Τα εκχυλίσματα των βοτάνων που παρασκευάζονται με βρασμό σε νερό ονομάζονται αφέψημα (Chanda *et al.*, 2011). Με την παραπάνω διαδικασία εκχυλίζονται διάφορες κατηγορίες οργανικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πρωτεϊνών, αμινοξέων, αρωματικών ουσιών, βιταμινών, πτητικών ελαίων και διάφορων φωτοχημικών (Karavoltsos *et al.*, 2014).

Τα τελευταία χρόνια στο καταναλωτικό κοινό έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον σε όλο τον κόσμο, γύρω από συγκεκριμένα τρόφιμα που απαντώνται στη φύση, τα οποία, είτε από την παράδοση ή από επιστημονικές μελέτες, υποστηρίζεται ότι έχουν πληθώρα οφελών για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα τρόφιμα αυτά επικράτησαν να ονομάζονται υπερτροφές (superfoods), κατηγορία η οποία διαρκώς διευρύνεται, ενώ πολλοί παραγωγοί στρέφονται στην καλλιέργεια φυτών που έχουν κατηγοριοποιηθεί ως superfoods.

Το καταναλωτικό ενδιαφέρον αυξάνεται και για τα ήδη γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα βότανα, καθώς όλο και περισσότερες έρευνες τους αποδίδουν ευεργετικές ιδιότητες. Η κατανάλωση και χρήση καρπών και βοτάνων ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αφεψημάτων, υπάρχει ήδη από την αρχαιότητα και απαντάται σε όλες τις κουλτούρες. Το φάσμα χρήσεών τους είναι ευρύ,

χρησιμοποιούνται στη μαγειρική, στην ιατρική και στην φαρμακοποιία, ενώ μείζονα ρόλο έχουν διαδραματίσει και στις θρησκευτικές πρακτικές πολλών πολιτισμών. Για παράδειγμα, το ιπποφαές αναφέρεται κατά την αρχαιότητα σε κείμενα του Διοσκουρίδη, πατέρα της Φαρμακολογίας αλλά και του Θεόφραστου, μαθητή του Αριστοτέλη. Τα φύλλα και οι καρποί του φυτού καταναλώνονταν από τα άρρωστα και τραυματισμένα άλογα του Μ. Αλεξάνδρου με αποτέλεσμα αυτά να αποκτούν λαμπερό τρίχωμα, περισσότερη δύναμη και να αναρρώνουν γρηγορότερα. Τόσο ο Διοσκουρίδης όσο και ο Ηρόδοτος αναφέρουν στα έργα τους το λάβδανο («λάδανον»), μια ρητίνη που βγαίνει από το φυτό κίστος και που συλλεγόταν τόσο από τους αρχαίους Έλληνες όσο και από τους Άραβες, λόγω της ιατροφαρμακευτικής της δράσης.

Συγκεκριμένα, το γκότζι μπέρι (Goji berry), που είναι ενδημικό είδος της νοτιο-ανατολικής Ευρώπης και της Ασίας, είναι γνωστό εδώ και αιώνες στην Κίνα και στην περιοχή του Θιβέτ. Αναφέρεται στις κινέζικες λαϊκές παραδόσεις από το 2.800 π.Χ. Χρησιμοποιείται στην κινεζική ιατρική για τις ευεργετικές του ιδιότητες όσον αφορά την τόνωση της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών λόγω της ισχυρής του αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Τα αφεψήματα που προέρχονται ή/και περιέχουν γκότζι εμπορεύονται βάσει των ιδιοτήτων τους για την αντιγήρανση, τη καλυτέρευση της όρασης και για το ότι βοηθούν στη λειτουργία των νεφρών και του ήπατος (Amagase and Farnsworth, 2011). Σε μελέτη που έγινε με τη χορήγηση αφεψημάτων σε ποντίκια αναφέρεται ότι παρεμποδίστηκε ισχυρά ο σχηματισμός της μηλονικής διαλδεΐδης στα ηπατικά τους κύτταρα (Wu et al, 2004).

Τα φύλλα του γκότζι περιέχουν 5 υδατοδιαλυτά κλάσματα πολυσακχαριτών, κυρίως της ραμνόζης, αραβινόζης, ξυλόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης. Ακόμα περιέχουν τις εξής πολυφαινόλες: τον ρουτινοζίτη-3 της κερκετίνης, τον γλυκοζίτη-7 της κερκετίνης, την καμφερόλη, τη ρουτίνη, το βανίλλικό και σαλικυλικό οξύ κ.α. (Amagase and Farnsworth, 2011).

1.2.1 Η σημασία των αντιοξειδωτικών

Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν πολυάριθμες φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες που μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προϊόντα δράσης αυτών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στα μοριακά συστατικά του σώματος όπως στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA. Μακροχρόνια, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες ασθένειες, όπως αθηροσκλήρωση, καρκίνος, διαβήτης και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες. Η οξειδωτική διάσπαση των λιπιδίων επιταχύνεται από διάφορους παράγοντες τόσο εσωτερικούς όσο και εξωτερικούς. Οι

παράγοντες που επιταχύνουν τη διάσπαση των λιπιδίων είναι οι ελεύθερες ρίζες, τα μεταλλικά ιόντα, το φως και η θερμότητα. Τα βότανα μπορεί να περιέχουν μια ευρεία ποικιλία μορίων εκκαθάρισης των ελεύθερων ριζών, όπως οι φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, κινόνες, κουμαρίνες, λιγνάνες, στιλβένια, και τανίνες), οι ενώσεις αζώτου (π.χ. αλκαλοειδή, αμίνες, κτλ.), βιταμίνες, τερπενοειδή και άλλοι ενδογενείς μεταβολίτες με αντιοξειδωτική δράση. Πρόσφατα, το ενδιαφέρον στράφηκε στην εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών στοχεύοντας στην αντικατάσταση των συνθετικών στα τρόφιμα και φάρμακα, καθώς πιθανολογείται πως αποτελούν παράγοντες καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό τα βότανα και τα συστατικά τους έχουν χρησιμοποιηθεί ήδη ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014).

Φαινολικά οξέα

Στα φυτά τα πιο κοινά φαινολικά οξέα είναι το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Αυτά βρίσκονται σε πολλά φυτικά τρόφιμα όπως ο καφές, το κόκκινο κρασί, τα μήλα, τα αχλάδια, τα μούρα, οι ντομάτες, τα δαμάσκηνα και στα αφεψήματα. Η κατανάλωση 15 mg χλωρογενικού οξέος, που υπάρχει στον καφέ ή στο μαύρο τσάι αυξάνει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης του πλάσματος των ανθρώπων, ενώ φαίνεται να καταστέλλει τη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών. Το χλωρογενικό οξύ βρέθηκε να καταστέλλει την οξειδωση της LDL χοληστερόλης ενώ, χυμός μήλου, πλούσιος σε φαινολικά οξέα, μπορεί να μειώσει την LDL στο πλάσμα (Leitzmann, 2016).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τουλάχιστον 4.000 ενώσεις και μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη χημική τους δομή (Leitzmann, 2016). Συγκεκριμένα διακρίνονται σε 6 κύριες υποκατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του ετεροκυκλικού οξυγόνου: ανθοκυανίνες, φλαβανόνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβόνες, φλαβονόλες, και ισοφλαβόνες (Sá *et al.*, 2015). Η κατανάλωση φλαβονοειδών μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, καρδιαγγειακών και άλλων χρόνιων παθήσεων. Μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση φλαβονών μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό τα καρδιαγγειακά νοσήματα στις γυναίκες ενώ συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο ισχαιμικής καρδιακής νόσου, τόσο στους άνδρες όσο και τις γυναίκες (Sá *et al.*, 2015). Το τσάι, το κόκκινο κρασί, τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα φλαβονοειδών και αποτελεί έναν από τους λόγους που η συχνή κατανάλωση τους σχετίζεται με μείωση της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά (Egert and Rimbach, 2011).

1.3 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της διατροφικής αξίας των αφεψημάτων που προέρχονται από τα φύλλα επτά (7) διαφορετικών γονοτύπων γκότζι, εκ των οποίων οι έξι (6) ανήκουν στο είδος *L. barbarum* και ο ένας (1) *L. chinensis*. Συγκεκριμένα στα αφεψήματα μετρήθηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων και των φλαβονοειδών, εκτιμήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα τους με τη χρήση δύο μεθόδων (DPPH και FRAP), καθώς και η αντιοξειδωτική δραστικότητα των λιποπρωτεϊνών του όρου. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των απλών φαινολικών ενώσεων των αφεψημάτων.

2 Υλικά και μέθοδοι

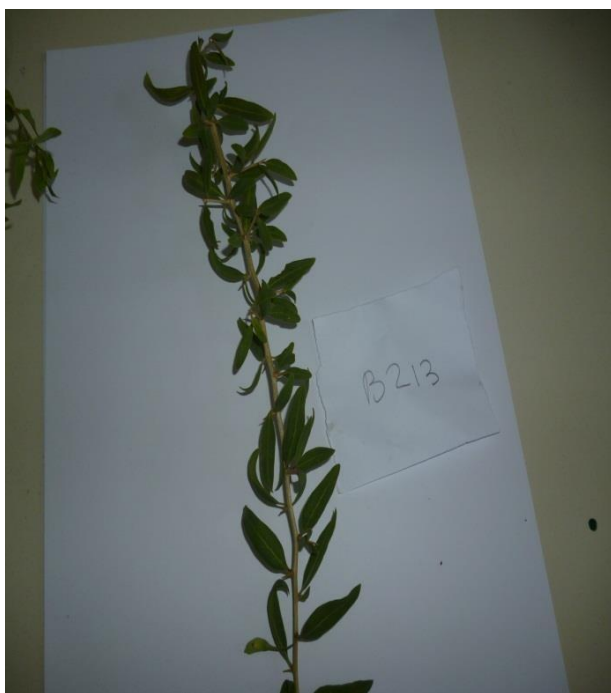
2.1 Φυτικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από 6 γονότυπους του *L. barbarum* και έναν του *L. chinensis*. Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες τόσο από τα φυτά όσο και τα φύλλα. Τα φυτά καλλιεργούνταν υπό τις ίδιες καλλιεργητικές τεχνικές σε αγρόκτημα στο Βραχάτι, Κορινθίας (37°57'N, 22°48'E, υψόμετρο: 9 m από το επίπεδο της θάλασσας). Η επιλογή των εξεταζόμενων γονοτύπων έγινε από τον παραγωγό, βάσει κυρίως των χαρακτηριστικών των καρπών.

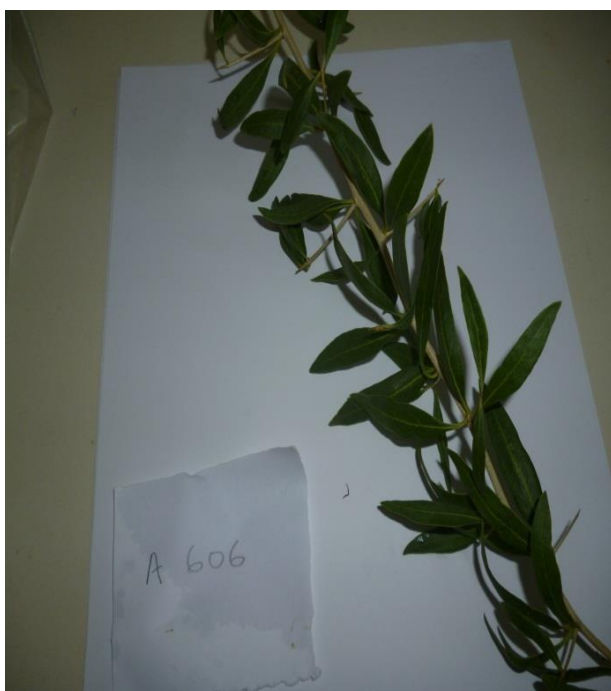
Στις παρακάτω φωτογραφίες απεικονίζονται τα δενδρύλλια και τα αντίστοιχα φύλλα των γονοτύπων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.



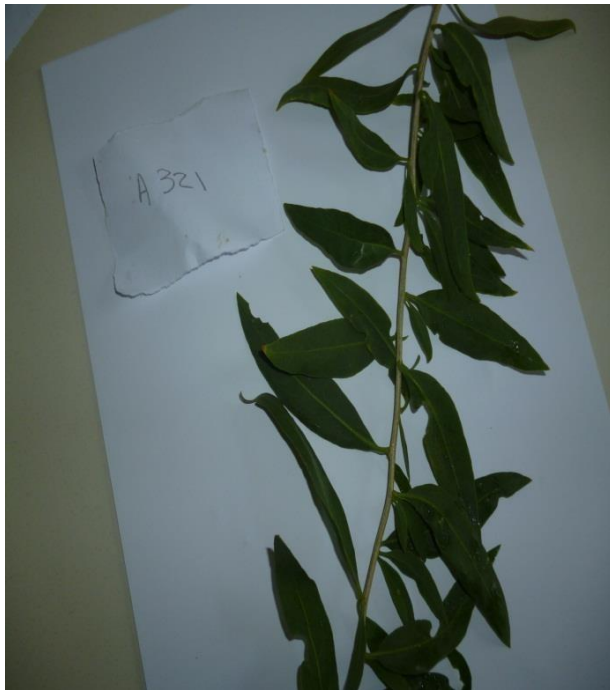
Εικόνα 2.1 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου A514/S.



Εικόνα 2.2 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου B213/S.



Εικόνα 2.3 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου A606/S.



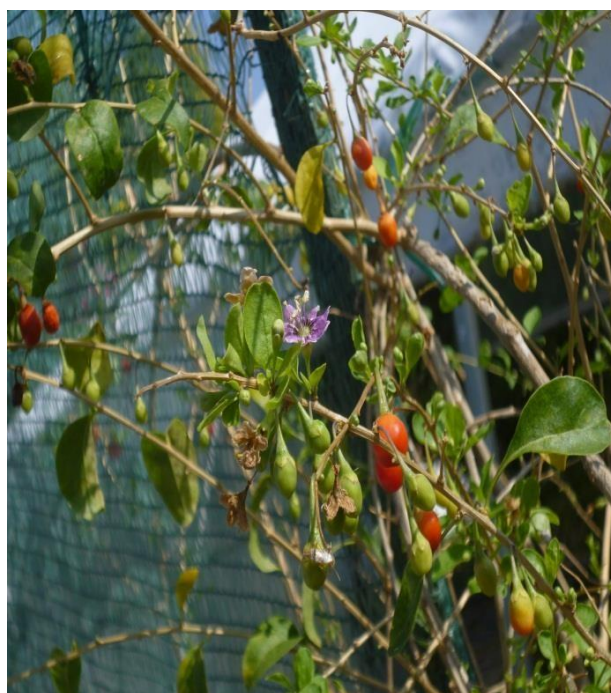
Εικόνα 2.4 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου A321/S.



Εικόνα 2.5 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου M123/S.



Εικόνα 2.6 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου A405/S.



Εικόνα 2.7 Δενδρύλλιο και φύλλα του γονότυπου C123/S.

Μετά τη συλλογή των φύλλων από το αγρόκτημα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν εντός 2 ωρών στο εργαστήριο Δενδροκομίας του ΓΠΑ, πλύθηκαν 2 φορές με νερό βρύσης και ακολούθως άλλες 2 με αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αφήθηκαν 1 ημέρα να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2 Προετοιμασία αφεψημάτων

Η παρασκευή των αφεψημάτων έγινε με την προσθήκη αποξηραμένων φύλλων γκότζι μπέρι σε βραστό νερό ($12 \text{ g } 1 \text{ L}^{-1}$). Στη συνέχεια τα αφεψήματα διηθήθηκαν από φίλτρο Watman No 1, τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα πλαστικά δοχεία, καταψύχθηκαν σε βαθιά ψύξη ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$), λυοφιλιώθηκαν και μετά το πέρας της λυοφιλίωσης ζυγίστηκαν ξανά. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα (στερεό υπόλειμμα) μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Falcon, σφραγίστηκαν με parafilm και φυλάχθηκαν σε βαθιά ψύξη ($-40 \text{ }^\circ\text{C}$) μέχρι να αναλυθούν. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 2 μηνών μετά το πέρας της λυοφιλίωσης (Kaliora et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ήταν το νερό, προκειμένου τα αφεψήματα να προσομοιάζουν κατά το δυνατόν με τα ροφήματα που παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται από τους καταναλωτές κατά τον παραδοσιακό τρόπο. Ωστόσο, βιβλιογραφικά, εκτός από το νερό (Triantaphyllou et al., 2001; Vgi et al., 2005; Kiselova et al., 2006), έχουν αναφερθεί και οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση των συστατικών από φύλλα, όπως η αιθανόλη (Djeridane et al., 2006; Conforti et al., 2011) και η μεθανόλη (Proestos et al., 2005; Shan et al., 2005; Wojdyło et al., 2007). Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την απόδοση του φυτικού ιστού σε στερεό υπόλειμμα. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη, τόσο μειώνεται η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (Nackz and Shahidi, 2006). Επομένως, η εκχύλιση με νερό αναμένεται να οδηγήσει σε μικρότερη απόδοση στερεού υπολείμματος συγκριτικά με τις αντίστοιχες μεθόδους με οργανικούς διαλύτες λόγω αυξημένης πολικότητας του μορίου του νερού. Επιπλέον, η απόδοση επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες που αφορούν στο ίδιο το φυτό, όπως είναι η κατάσταση του φυτού κατά τη συλλογή, ο χρόνος αποθήκευσής του πριν τη χρήση, η διάρκεια εκχύλισης, η ποσότητα ιστού που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση, καθώς και η περιεκτικότητα του ιστού σε φυτοχημικά (Nackz and Shahidi, 2006).

2.2.1 Πλεονεκτήματα της τεχνικής της λυοφιλίωσης

Η λυοφιλίωση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης των τροφίμων σε ήπιες συνθήκες, που ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο καταστροφής των ευαίσθητων συστατικών του δείγματος. Πλεονεκτεί των υπόλοιπων μεθόδων αφυδάτωσης διότι:

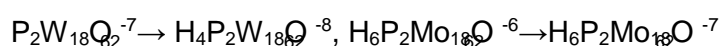
1. δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου,
2. διατηρεί σε σημαντικό βαθμό τα πτητικά αρωματικά συστατικά του,
3. συντηρεί καλύτερα τα χαρακτηριστικά της δομής και εμφάνισης του,
4. η συρρίκνωση είναι αμελητέα,
5. κατά τη λυοφιλίωση τα δείγματα δεν αφρίζουν, δεν σκληραίνουν, δεν οξειδώνονται και δεν υφίσταται καμία μεταβολή η μικροβιοχλωρίδα τους.

Η μέθοδος της ξήρανσης των τροφίμων με λυοφιλίωση, συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να προκύψει το αφυδατωμένο προϊόν. Η κλίση της τάσης των ατμών που είναι απαραίτητη για την εξάχνωση, επιτυγχάνεται με την διατήρηση ορισμένης ολικής πίεσης στον θάλαμο της ξήρανσης. Οι δημιουργούμενοι υδρατμοί απάγονται με ένα σύστημα συμπύκνωσης (ψυχρή παγίδα). Η πίεση του θαλάμου ξήρανσης ήταν μικρότερη του 1 mbar και η θερμοκρασία στην ψυχρή παγίδα -50 °C. Η όλη διαδικασία διήρκησε 72 ώρες.

2.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (FC)

2.3.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας δεν είναι γνωστή η στοιχειομετρία:



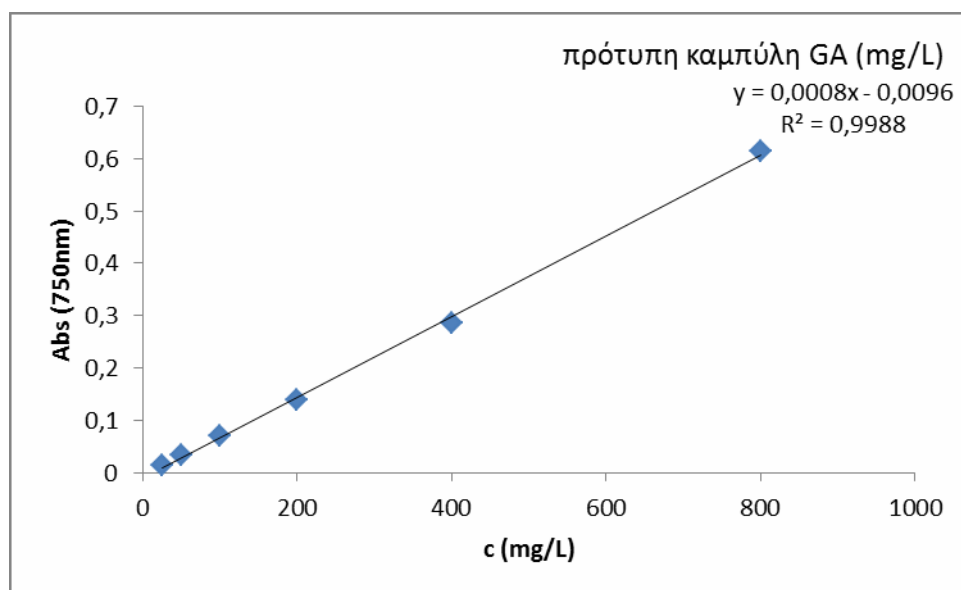
Το προϊόν είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε απόχρωσης που απορροφά στο ορατό (750nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων (Singleton and Rossi, 1965).

2.3.2 Αναλυτική Πορεία

Κατάλληλη ποσότητα λυοφυλιωμένου δείγματος διαλύεται σε απιονισμένο νερό (3 mg mL⁻¹), ενώ για την παρασκευή του τυφλού δείγματος χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μL αντιδραστηρίου FC, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και μετά το πέρας 1 min προστίθενται 150 μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃ (20% w/v). Το μίγμα αναδεύεται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος για 120 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης μετρείται στα 750 nm ως προς το τυφλό δείγμα, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (Arnous et al, 2002).

2.3.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος (GA) συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg L⁻¹. Ακολουθείται η διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του GA σε mg L⁻¹ και ψ η απορρόφηση στα 750 nm. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 750 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Γράφημα 2.1).



Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Gallic acid- GA) mg L⁻¹.

2.4 Προσδιορισμός συνολικού περιεχόμενου σε φλαβονειδή

2.4.1 Αρχή της Μεθόδου

Το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονειδή στα αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρρι προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη φασματοσκοπική μέθοδο χλωριούχου αλουμινίου η οποία περιγράφεται από τους Arnous et al (2002), έπειτα από τροποποιήσεις.

2.4.2 Αναλυτική πορεία

Κατάλληλη ποσότητα λυοφυλιωμένου δείγματος διαλύεται σε απιονισμένο νερό (3 mg mL⁻¹), ενώ για την παρασκευή του τυφλού δείγματος χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Έπειτα προστίθενται 30 μL διαλύματος NaNO² 5% και ακολουθεί η επώαση του παραπάνω διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, έπειτα προστίθενται 150 μL διαλύματος εξαένυδρου χλωριούχου αργιλίου (AlCl₃ · 6H₂O) 2%. Αφήνεται ξανά να επωαστεί το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 200 μL από 1 M υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε στα 360 nm στο φασματοφωτόμετρο.

2.4.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα κατεχίνης (CA) συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400 mg L⁻¹. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα της CA σε mg L⁻¹ και ψ η απορρόφηση στα 360 nm. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 360 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

2.5 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο- υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH[•])

2.5.1 Αρχή μεθόδου

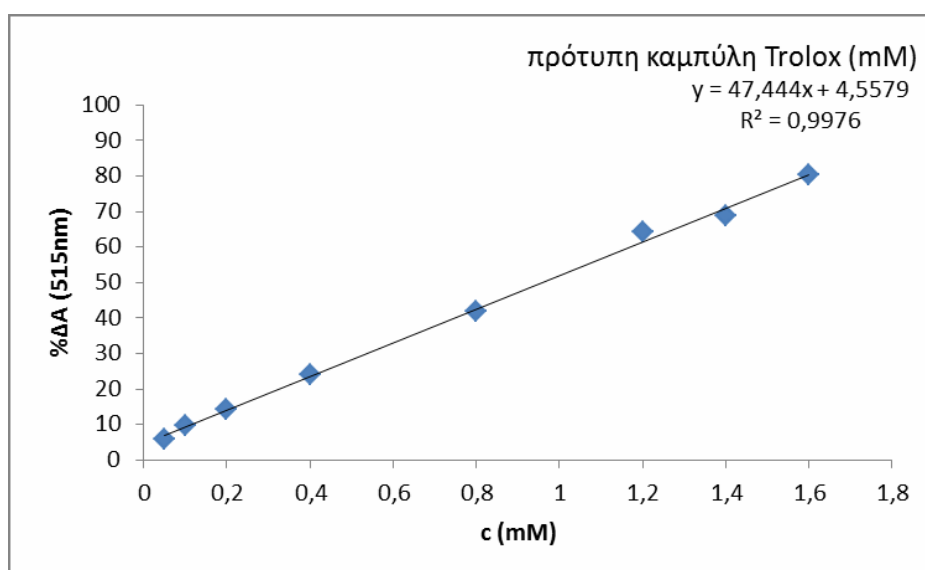
Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] (Brand-Williams *et al.*, 1995). Η δέσμευση αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης εκτιμάται στα 515 nm. Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με τους Arnous et al (2002) έπειτα από μερικές τροποποιήσεις.

2.5.2 Αναλυτική πορεία

Σε φιαλίδια Eppendorf προστίθενται 25 μL δείγματος –αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε νερό, συγκέντρωσης 3 mg mL^{-1} ή νερού για το λευκό προσδιορισμό και 975 μL DPPH•. Ακολουθεί ανάδευση και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Η απορρόφηση μετράται σε $t = 0 \text{ min}$ και $t = 30 \text{ min}$ στα 515 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω πρότυπης καμπύλης.

2.5.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την αξιολόγηση των μετρήσεων της απορρόφησης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της Βιταμίνης E) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (Trolox equivalents). Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,4, 1,6 mM. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε κατά τη μέτρηση των δειγμάτων. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του Trolox σε mM και ψ η % ΔA 515, όπου % ΔA 515 = $[(A_{0\ 515} - A_{30\ 515}) / A_{0\ 515}] \times 100$.



Γράφημα 2.2 Καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τα ισοδύναμα Trolox (mM).

2.6 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

2.6.1 Αρχή μεθόδου

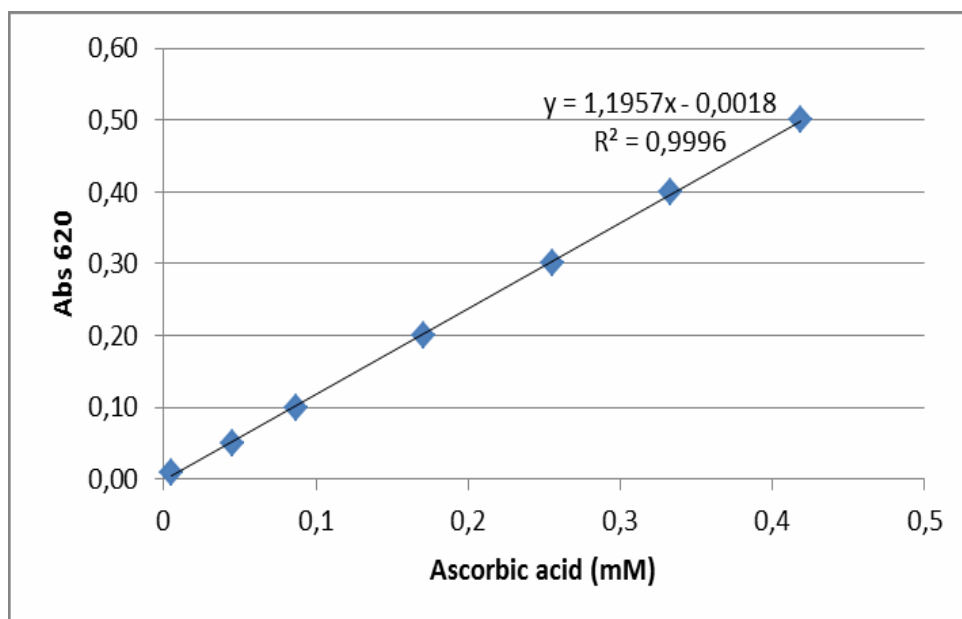
Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) εκτιμά την αντιοξειδωτική δράση όλων των συστατικών του διαλύματος που μπορούν να δράσουν αναγωγικά, μετρώντας την αναγωγική τους δύναμη. Η δοκιμή FRAP βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να ανάγουν το σύμπλοκο TPTZ-Fe (III) σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο TPTZ-Fe (II) (Benzie and Strain, 1996). Οι μετρήσεις στην παρούσα εργασία έγιναν σύμφωνα με τους Arnous et al (2002) έπειτα από μερικές τροποποιήσεις.

2.6.2 Αναλυτική πορεία

Σε ένα φιαλίδιο Eppendorf αναμιγνύονται 50 μL διαλύματος αφυδατωμένου αφεψήματος αναδιαλυμένου σε νερό, κατάλληλα αραιωμένου (3 mg mL^{-1}), με 50 μL FeCl_3 (3mM σε 5mM HCl) ή 50 μL απιονισμένο νερό για τη παρασκευή του λευκού δείγματος. Ακολουθεί καλή ανάδευση και το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει για 30 min σε υδατόλουτρο στους 37°C . Στη συνέχεια, προστίθενται 900 μL διαλύματος TPTZ και ακολουθεί ανάδευση. Ο Fe^{+2} που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ. Το δείγμα παραμένει για 10 min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 620 nm. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς βιταμίνης C (η βιταμίνη C ανάγει το Fe^{3+} σε Fe^{2+}) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE, ascorbic acid equivalents).

2.6.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mM. Ακολουθείται η διαδικασία της μέτρησης που περιεγράφηκε και για τα δείγματα. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του ασκορβικού οξέος σε mM και ψ η απορρόφηση στα 620nm



Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος σε mM

2.7 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των αφεψημάτων από φύλλα γκότζι μπέρρι στις λιποπρωτεΐνες του ορού

2.7.1 Παραλαβή ορού

Πραγματοποιείται αιμοληψία από υγιείς εθελοντές 22-50 ετών. Το αίμα (5 mL) καθιζάνει μόνο του (τα έμμορφα συστατικά του καθιζάνουν) για 30 min περίπου ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 rpm και στους 20 °C.

2.7.2 Αρχή της Μεθόδου

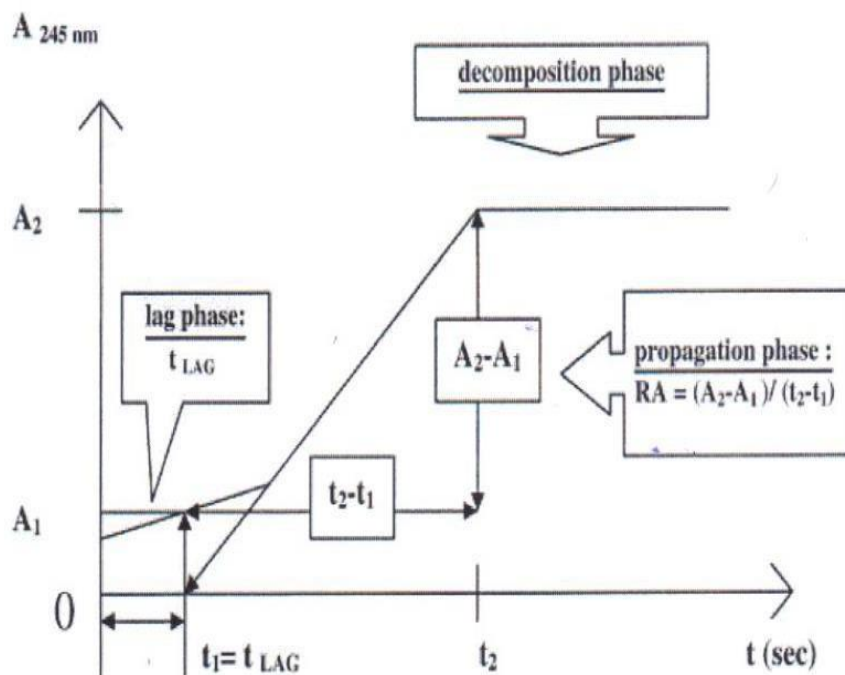
Το διάλυμα του θειικού χαλκού προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Η ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης (συζυγή διένια) γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Καταγράφεται φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των δειγμάτων μύρας στον ορό (Lag Time).

2.7.3 Αναλυτική πορεία

Αρχικά παρασκευάζουμε το μητρικό διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάζεται το

διάλυμα εργασίας CuSO_4 συγκέντρωσης 200 μM με αραιώση 1:100 του μητρικού διαλύματος CuSO_4 με απιονισμένο νερό. Ακολούθως, παρασκευάζεται το μίγμα από το διάλυμα εργασίας CuSO_4 και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate buffered saline) με τελική συγκέντρωση 10 μM (αραιώση 1:20). Γίνεται αραιώση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή για όλα τα δείγματα αφεψημάτων. Αρχικά τοποθετούνται στο ειδικό UV 96-well plate 20 μL από το αραιωμένο δείγμα ορού. Έπειτα, τοποθετείται 1 μL από τα αναδιαλυμένα αφεψήματα (3 $\text{mg mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) και τέλος προστίθενται 230 μL του μίγματος CuSO_4 και PBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στο Elisa Reader για 4 τουλάχιστον ώρες (μετρήσεις λαμβάνονται κάθε 2 min) και σε τελικό στάδιο λαμβάνουμε γραφήματα από τα οποία προκύπτει η μέτρηση του LagTime (χρόνος αντίστασης ορού στην οξειδωση).



Kinetics of copper-induced oxidation of serum lipids in vitro.
 t_{LAG} represents the concentration of serum antioxidants.
 RA represents the transformation of polyunsaturated fatty acids to lipid hydroperoxides (conjugated dienes).
 A = absorbance, t = time

Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της μεθόδου

2.8 Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών

Ο προσδιορισμός των απλών πολυφαινολών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνουν οι Kaliora et al (2014) με κάποιες τροποποιήσεις. Αναλυτικά η πορεία της μεθόδου αναφέρεται παρακάτω.

2.8.1 Αναλυτική πορεία

2.8.1.1 Αντίδραση σιλυλίωσης

Στην αρχή της μεθόδου επαναλήφθηκε η διαδικασία προετοιμασίας αφεψημάτων όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2. Η συγκέντρωση του αφεψήματος που παραλείφθηκε ήταν 1 g αποξηραμένων φύλλων 50 mL⁻¹ αφεψήματος και στη συνέχεια ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση των απλών πολυφαινολών με αέρια χρωματογραφία, μέσω της αντίδρασης της σιλυλίωσης. Συγκεκριμένα, 50 μL από κάθε αφέψημα μεταφέρονται σε φιαλίδια (vials) για σιλυλίωση σε κάθε vial προστίθενται 50 μL εσωτερικού προτύπου (Internal Standard) 3-(4- υδροξυφαινυλο)-1- προπανόλη (19,2 μg mL⁻¹). Στη συνέχεια τα vials τοποθετούνται στον εξατμιστήρα Speed Vac για εξάτμιση μέχρι ξηρού. Μετά το πέρας της εξάτμισης, στα ξηρά εκχυλίσματα προστίθενται 250 μL σιλυλιωτικού αντιδραστήριου BSTFA (bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, δις-τριμεθυλοσιλυλ-τριφθοροακεταμίδιο) σε πυριδίνη, το οποίο μετατρέπει τις πολυφαινόλες και τα τυχόν τερπενικά οξέα σε πτητικά παράγωγα, και συγκεκριμένα στους τριμεθυλοσιλυλιωμένους αιθέρες (TMS) τους. Τέλος, τα vials σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υδρόλουτρο για 20 λεπτά στους 70 °C, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση σιλυλίωσης, τα δείγματα αφού ψυχθούν, είναι έτοιμα να μετρηθούν με GC/ MS.

2.8.1.2 Αέρια Χρωματογραφία / φασματοσκοπία μάζας (GC/ MS) για τον προσδιορισμό πολυφαινολών

Ο διαχωρισμός των πολυφαινολικών συστατικών των αφεψημάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία, ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με φασματογράφο μάζας. Για την ανάλυση 1 μL από τα σιλυλιωμένα δείγματα εισαγόταν με ένεση στον αέριο χρωματογράφο. Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP Series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγέα split – splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683.

Για τον διαχωρισμό των πολυφαινολών χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη HP-5 MS με επικάλυψη 5% phenyl – 95% methyl siloxane, μήκους 30 m, με εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και πάχος εσωτερικής επίστρωσης 0,25 μm. Ο εισαγωγέας τέθηκε στους 250 °C και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αεριο-χρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300 °C.

Η εισαγωγή 1 μL δείγματος έγινε με σχάση δείγματος 20:1 (split ratio 20:1). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ροή 0.6 mL min^{-1} . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του χρωματογράφου που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό ήταν: 70°C για 5 min, $70 - 130^\circ\text{C}$ με ρυθμό ανόδου $15^\circ\text{C min}^{-1}$, $130 - 160^\circ\text{C}$ με ρυθμό ανόδου 4°C min^{-1} και παραμονή για 15 min και τέλος άνοδος από $160 - 300^\circ\text{C}$ με ρυθμό $10^\circ\text{C min}^{-1}$ και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 15 min.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολικών έγινε με την τεχνική της εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring). Συγκεκριμένα, η ανίχνευση των πολυφαινολών (ποιοτικός προσδιορισμός) βασίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων (θραυσμάτων), με ανοχή $\pm 0.05 \times \text{RT}$ όπου RT είναι ο αναμενόμενος χρόνος κατακράτησης των συστατικών από πρότυπα διαλύματα, και ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε ένα από τα τρία ιόντα που ορίζεται ως «ιόν στόχος» (target), ενώ επιβεβαιώνεται από τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (qualifiers) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με την μέθοδο εσωτερικού προτύπου. Ως τέτοιο επελέγη η 3- (4- υδρόξυ – φαινυλο) -1- προπανόλη. Μια σειρά προτύπων διαλυμάτων – μιγμάτων των συστατικών που προσδιορίζονται – οδήγησε στην κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς για κάθε συστατικό σε περιοχή συγκεντρώσεων από $80 - 3500 \text{ ng mL}^{-1}$. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές με καλούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης ($R^2 > 0.996$) για όλες τις ουσίες που προσδιορίστηκαν. Οι ποσοτικοί υπολογισμοί έγιναν βάσει των ιόντων στόχων (target ions) ενώ χρησιμοποιήθηκαν και 1 – 2 ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) η αναλογία των σημάτων των οποίων επιβεβαιώνει ή απορρίπτει την υπόθεση ταυτοποίησης του κάθε συστατικού. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές m/z των ιόντων-στόχων (T) και των ιόντων επιβεβαίωσης (Q1 και Q2):

Πίνακας 2.1 Απλές πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν με GC/MS.

Πολυφαινόλη	Ιόν-στόχος	Ιόντα επιβεβαίωσης
	(target ion) (m/z) ^a	(qualifier ions) (m/z) ^a
Τυροσόλη	179	267, 282
<i>p</i> -Υδροξυβενζοϊκό οξύ	267	223, 193
3-(4-Υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη (εσωτερικό πρότυπο)	206	191, 179
Βανιλλικό οξύ	297	267, 312
<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	293	308, 147
Προτοκατεχικό οξύ	193	355, 370
Συριγγικό οξύ	327	342, 312
Φερουλικό οξύ	338	323, 308
Καφεϊκό οξύ	396	219, 381
Σιναπικό οξύ	368	353, 338
Χρυσίνη	383	384
Καμφερόλη	559	560
Χλωρογενικό οξύ	345	307, 324
Κερκετίνη	647	559, 575

2.9 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

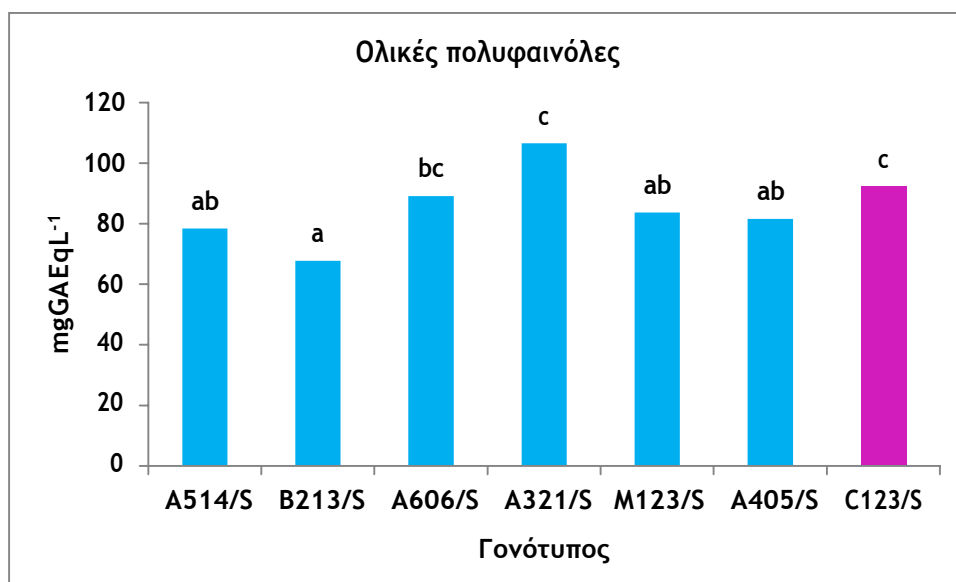
Η επίδραση του παράγοντα του γονοτύπου επί των χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν εκτιμήθηκε με μόνο-παραγοντικές αναλύσεις της διασποράς (ANOVA). Οι συγκρίσεις των μέσων για όλες έγιναν με βάση τη μέθοδο τη μεθόδου Duncan σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό JMP 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου πολυφαινολών

Οι τιμές των TP κυμάνθηκαν μεταξύ 67,8 και 106,6 ισοδύναμα mg GA L⁻¹ αφεψήματος (Γράφημα 3.1), επιπλέον παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αφεψημάτων από διαφορετικούς γονότυπους ($P < 0,05$) (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, τα αφεψήματα που προέκυψαν από τους γονότυπους A321/S και C123/S παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές συνολικών πολυφαινολών, αντίθετα με την τιμή που παρατηρήθηκε στο αφέψημα του B213/S. Τέλος, στα αφεψήματα των υπολοίπων γονοτύπων εκτός του A606/S οι τιμές των συνολικών πολυφαινολών εκτιμήθηκαν σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των γονοτύπων A321/S και C123/S.



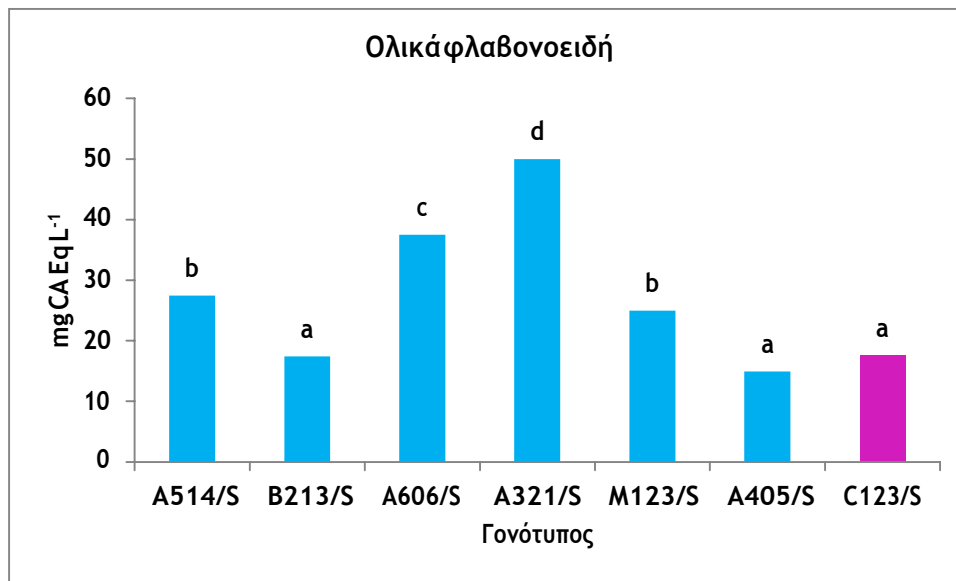
Γράφημα 3.1 Συγκέντρωση συνολικών πολυφαινολών σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

Άλλες παράμετροι που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση των πολυφαινολών είναι ο χρόνος και ο τρόπος συλλογής, καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης του φυτικού ιστού (*Herrera Carrera et al., 2015*). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποσότητα ιστού που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή του αφεψήματος, ο χρόνος βρασμού καθώς και η θερμοκρασία επιδρούν σημαντικά στο στη συγκέντρωση των πολυφαινολών (*Dai and Mumper, 2010*).

Πίνακας 3.1 Πιθανότητες της επίδρασης του γονοτύπου επί των συγκεντρώσεων των ολικών πολυφαινόλων, των ολικών φλαβονοειδών, της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκτιμώμενη με τις μεθόδους DPPH και FRAP και της οξειδωσης του ορού σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του <i>L. barbarum</i> και 1 του <i>L. chinensis</i> .						
Πιθανότητα	Ολικές πολυφαινόλες	Ολικά φλαβονοειδή	DPPH	FRAP	Οξειδωση ορού	Άθροισμα Απλών φαιολικών ουσιών
<i>P</i>	*†	***	***	***	***	***
† *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.						

3.2 Προσδιορισμός συνολικού περιεχόμενου σε φλαβονοειδή

Η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών εκτιμήθηκε μεταξύ 14,9 και 50 ισοδύναμα mg CA L⁻¹ (Γράφημα 3.2) και η επίδραση του γονότυπου εκτιμήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0,001$) (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών παρατηρήθηκε στο αφέψημα του γονότυπου A321/S, αντίθετα, στα αφεψήματα από B213/S, A405/S και C123/S εκτιμήθηκαν οι χαμηλότερες τιμές ολικών φλαβονοειδών. Ενδιάμεσες τιμές ολικών φλαβονοειδών παρατηρήθηκαν στα αφεψήματα από τους γονότυπους A606/S, A514/S και M123/S, ωστόσο η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στο αφέψημα από τον A606/S ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με των υπολοίπων δύο.



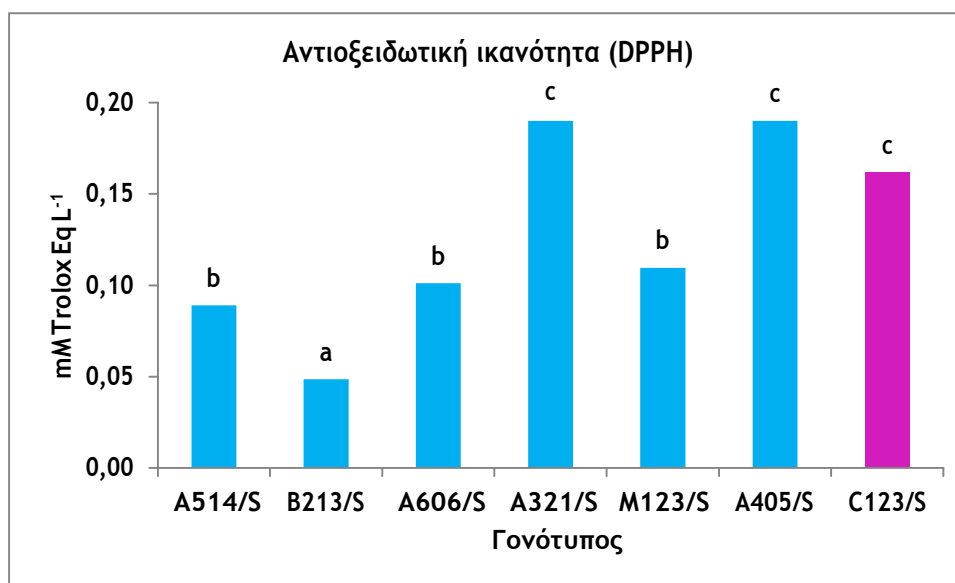
Γράφημα 3.2 Συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπερί, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδων σε φύλλα του *L. barbarum* κυμαίνεται από 17-22 mg/g (Amagase and Farnsworth, 2011). Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια υποκατηγορία των φαινολικών ενώσεων, στις οποίες ανήκουν ουσίες όπως η κερκετίνη, η καμφερόλη, η μυρισετίνη και η ρουτίνη και αποτελούν τα πιο συχνά απαντώμενα φλαβονοειδή στα τρόφιμα (Theodoratou *et al.*, 2007). Έχει αναφερθεί, μάλιστα, ότι τα διάφορα φλαβονοειδή που περιέχονται στα φυτά είναι εκείνα που ευθύνονται για την αποτελεσματική τους δράση όσον αφορά στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών (Spencer, 2010). Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν την ευεργετική επίδραση των φλαβονοειδών σε περιπτώσεις καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η κερκετίνη και η καμφερόλη είναι σε θέση να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και επίδρασης σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Ackland *et al.*, 2005; Dihal *et al.*, 2006). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι συνθήκες εκχύλισης του αφεψήματος, όπως ο διαλύτης που χρησιμοποιείται και ο χρόνος εκχύλισης, ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση σε ολικά φλαβονοειδή (Rusak *et al.*, 2008).

3.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινόλο-2-πικρλο- υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH[•])

Η δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο αξιολόγησης της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να δεσμεύουν και να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες. Η συγκεκριμένη ελεύθερη ρίζα λειτουργεί ως οξειδωτικό υπόστρωμα αλλά και ως μόριο-δείκτης της αντίδρασης (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτιμώμενη με τη μέθοδο DPPH, κυμάνθηκαν μεταξύ 0,05 και 0,18 ισοδύναμα mM Trolox L⁻¹ αφεψήματος (Γράφημα 3.3), επιπλέον παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αφεψημάτων από διαφορετικούς γονότυπους ($P < 0,001$) (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, τα αφεψήματα που προέκυψαν από τους γονότυπους A321/S, A405/S και C123/S παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας, αντίθετα με την τιμή που παρατηρήθηκε στο αφέψημα του B213/S. Τέλος, στα αφεψήματα των υπολοίπων γονοτύπων παρατηρήθηκαν ενδιάμεσες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας.



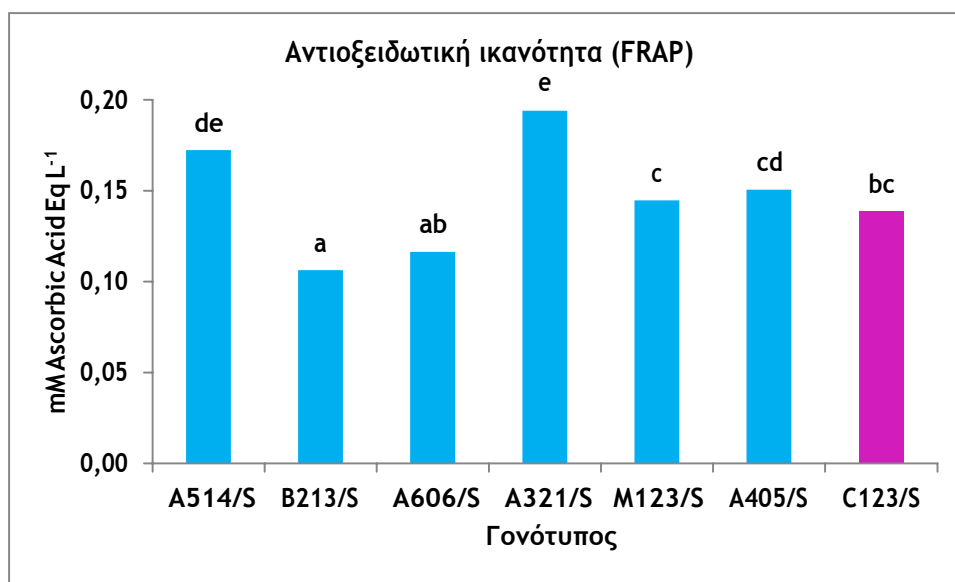
Γράφημα 3.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

Τα παρόντα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών στους γονότυπους A321/S και C123/S, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του A321/S με την DPPH είναι πολύ κοντά σε εκείνα των Li *et al.* (2013). Στη παρούσα περίπτωση όμως, ο γονότυπος C123/S του *L. chinense* έχει πολύ μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τον αντίστοιχο γονότυπο που ανέλυσαν οι Li *et al.* (2013).

3.4 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

Είναι γνωστό ότι οι φυτικοί ιστοί περιέχουν σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ενώσεων, πολλές από τις οποίες εκδηλώνουν ικανότητα σύμπλεξης με κατιόντα μετάλλων (Karavoltsos *et al.*, 2014).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα, με τη μέθοδο FRAP, εκτιμήθηκε μεταξύ 0,11 και 0,19 ισοδύναμα mM ασκορβικού οξέος L^{-1} (Γράφημα 3.4) και η επίδραση του γονότυπου εκτιμήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0,001$) (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε στο αφεψήμα από τον γονότυπο A321/S και ήταν στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη με τις τιμές των υπόλοιπων γονοτύπων εκτός του A514/S.

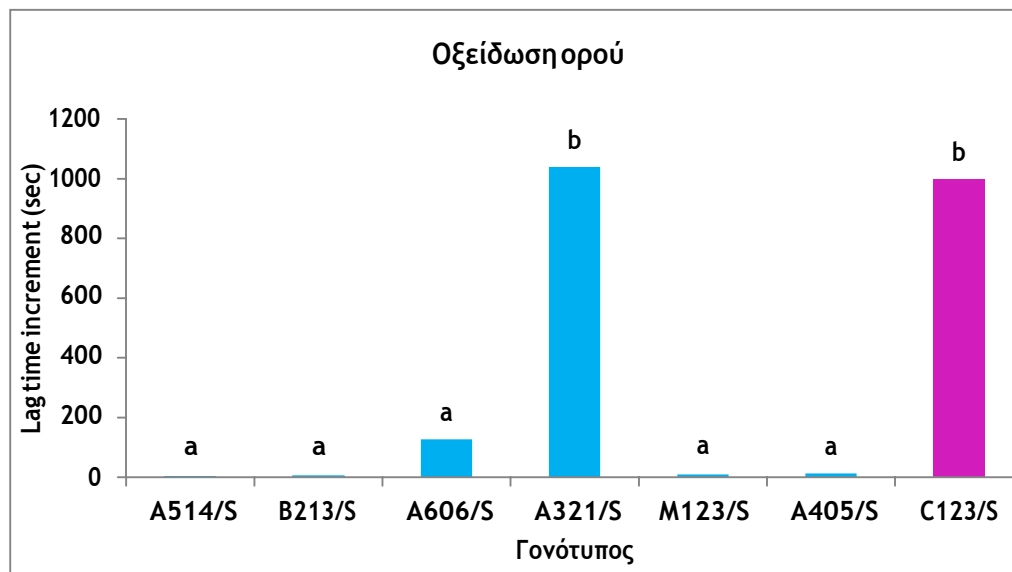


Γράφημα 3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

Οι διαφορές μεταξύ FRAP και DPPH είναι αναμενόμενες εξαιτίας της αρχής της μεθόδου στην οποία βασίζονται. Παρόμοιες διαφορές μεταξύ των μεθόδων της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρουσιάζονται και σε άλλα αφεψήματα (Bender *et al.*, 2014). Συγκριτικά, αφεψήματα με τσάι (μαύρο και πράσινο), δενδρολίβανο και φασκόμηλο είναι μεταξύ αυτών που εμφανίζουν τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές ικανότητες (Bender *et al.*, 2014; Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Ωστόσο, οι γονότυποι A321/S, A405/S και C123/S έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με το τσάι (Bender *et al.*, 2014).

3.5 Αντιοξειδωτική δραστικότητα των λιποπρωτεϊνών του ορού

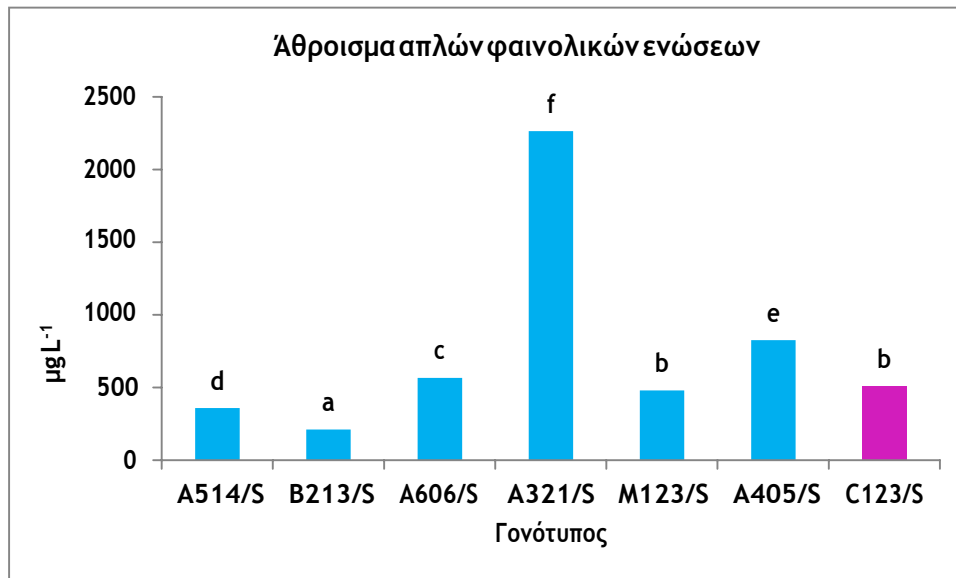
Ο προσδιορισμός του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime) πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με το διάλυμα του θειικού χαλκού το οποίο προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Συγκεκριμένα, ο υψηλότερος χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση παρατηρήθηκε στα αφεψήματα των γονοτύπων A321/S και C123/S (Γράφημα 3.5) και ήταν στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη με τις τιμές των υπόλοιπων γονοτύπων ($P < 0,001$) (Πίνακας 3.1).



Γράφημα 3.5 Οξείδωση ορού σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

3.6 Προσδιορισμός απλών φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των απλών πολυφαινολών προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία, μέσω της αντίδρασης της σιλυλίωσης. Συγκεκριμένα, τα αφεψήματα όλων των γονοτύπων διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους με εξαίρεση τους γονότυπους M123/S και C123/S (Γράφημα 3.6) ($P < 0,001$) (Πίνακας 3.1). Η υψηλότερη συγκέντρωση απλών φαινολικών παρουσιάστηκε στον γονότυπο A321/S



Γράφημα 3.6 Άθροισμα απλών φαινολικών ενώσεων σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*. Οι στήλες με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά.

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των απλών φαινολικών ουσιών στα αφεψήματα που προήλθαν από φύλλα γκότζι μπέρι. Συγκεκριμένα, στα αφεψήματα των φύλλων του γονότυπου A321/S παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της τυροσόλης, καθώς και των *p*- υδροξυβενζοϊκού, βανιλικού, προτοκατεχικού, συριγγικού, φερουλικού και καφεϊκού οξέος σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γονοτύπους. Στα αφεψήματα από φύλλα με γονοτύπους A514/S, A321/S, A405/S δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση καμπεφερόλης, αντιθέτως στο αφέψημα από φύλλα με γονότυπο A606/S ανιχνεύτηκε η καμφερόλη σε υψηλή συγκέντρωση. Στα αφεψήματα από φύλλα με γονοτύπους A321/S, C123/S όπου δε διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους περιείχαν την υψηλότερη συγκέντρωση χλωρογενικού οξέως, σε αντίθεση με τα αφεψήματα από φύλλα με γονοτύπους B213/S και A606/S που περιείχαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση κερκετίνης βρέθηκε υψηλότερη στο αφέψημα από φύλλα με γονότυπο A514/S και χαμηλότερη στο αφέψημα από φύλλα με γονότυπο C123/S. Οι

πιθανότητες της επίδρασης του γονοτύπου επί των συγκεντρώσεων των απλών πολυφαινολών, καθώς και του αθροίσματός τους σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις απλές πολυφαινόλες σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,001$. Οι Christen και Karetanidis (1987) απομόνωσαν τις εξής φαινολικές ουσίες από φύλλα γκότζι:

ρουτινοζίδιο της κερκετίνης, καμφερόλη, ρουτίνη, κερκετίνη, ισοκερκετίνη κλπ. Οι Zhao et al (1987) ανίχνευσαν βανιλλικό και σαλικυλικό οξύ. Ακόμη, παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο τρόπος ξήρανσης και αποθήκευσης, η εποχή που έγινε η συλλογή του φυτικού ιστού, καθώς και το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να επηρεάσουν τα φαινολικά συστατικά που θα εκχυλιστούν από το δείγμα (Bergonzi et al., 2001; Wang and Zheng, 2001; Skotti et al., 2014). Επιπλέον, η διαφορά ως προς την ειδικότητα των μεθόδων εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν όπως και η επιλογή του διαλύτη μπορεί να συμβάλλουν στην παρατήρηση διαφορετικών αποτελεσμάτων (Dastmalchi et al., 2008).

Πίνακας 3.2 Συγκεντρώσεις απλών πολυφαινολών σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*.

Γονότυπος	Τυροσόλη ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ α φεψήματος)	Βανιλλικό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Προτοκατεχικό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Συριγγικό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)
A514/S	1,01b†	81,08d	45,10c	50,79c	86,49d
B213/S	0,63ab	22,53b	20,08a	16,00a	20,66b
A606/S	1,89c	67,72c	25,22ab	29,09b	32,36c
A321/S	5,37d	125,06e	104,90d	100,95d	175,33f
M123/S	1,12b	22,73b	30,61b	16,08a	10,25a
A405/S	2,05c	90,55d	47,58c	34,71b	95,16e
C123/S	0,26a	10,4a	47,43c	13,32a	6,68a
<i>p</i>	***	***	***	***	***

† Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο πεζό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες στην ίδια στήλη. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Duncan σε $\alpha = 0,05$.

Πίνακας 3.2 (συνέχεια). Συγκεντρώσεις απλών πολυφαινολών σε αφεψήματα από φύλλα γκότζι μπέρι, συγκεκριμένα 6 γονοτύπων του *L. barbarum* και 1 του *L. chinensis*.

Γονότυπος	Φερουλικό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Καφεϊκό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Καμφερόλη ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Χλωρογενικό οξύ ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)	Κερκετίνη ($\mu\text{g L}^{-1}$ αφεψήματος)
A514/S	34,07ab	142,82b	-	120,50b	128,20e
B213/S	12,25a	51,78a	14,27ab	75,50a	53,92cd
A606/S	25,01ab	75,80a	188,97c	67,35a	54,03cd
A321/S	574,47c	787,17d	-	333,36d	58,77d
M123/S	10,82a	50,75a	7,48ab	280,37c	47,51bc
A405/S	72,69b	343,107c	-	131,65b	40,20b
C123/S	9,81a	20,83a	16,07b	346,85d	25,45a
<i>p</i>	***	***	***	***	***

† Οι τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο πεζό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες στην ίδια στήλη. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Duncan σε $\alpha = 0,05$.

Η διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ των ολικών πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν φωτομετρικά και του άθροίσματος των φαινολικών ενώσεων με αέριο-υγροχρωματογραφία πιθανόν δικαιολογείται λόγω του μη προσδιορισμού ορισμένων φαινολικών ενώσεων μετά τη συλιλίωση.

Η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του γονότυπου A321/S πιθανόν δικαιολογείται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων. Η κερκετίνη, που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στον γονότυπο A321/S, είναι πιθανό να συμβάλλει σημαντικά στην υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα του συγκριτικά με άλλους γονότυπους, καθότι η κερκετίνη εμφανίζει ως ένωση υψηλότερη ικανότητα από άλλες φαινολικές ενώσεις (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Ωστόσο, μεγάλη σημασία στην αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε ένωσης έχει η συνύπαρξη άλλων ενώσεων οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μπορεί να αυξήσουν ή να μειώσουν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του αφεψήματος σε σχέση με το άθροισμα της ικανότητας της κάθε ένωσης (Bender et al., 2014). Εκτός από την αντιοξειδωτική ικανότητα, τα συστατικά του αφεψήματος μπορεί να επηρεάσουν και άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα, οι Ren et al. (2017), παρουσίασαν την σημαντική συμβολή των πολυσακχαριτών των φύλλων γκότζι στην πρόσληψη του ασβεστίου και τη μεταφορά στον ορό του αίματος, τουλάχιστο σε πειραματόζωα.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα νωπά φρούτα του A321/S παρουσίασαν συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών μεταξύ των υψηλότερων και στατιστικά ίδιων με τα φρούτα των γονοτύπων A405/S, M123/S και C123/S. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητα των φρούτων του A321/S *in vitro* ήταν μικρότερη σημαντικά από εκείνη του C123/S και του A405/S (Kafkaletou *et al.*, 2018).

Η *in vivo* αντιοξειδωτική ικανότητα στις λιποπρωτείνες του ορού ήταν πολύ ικανοποιητική. Σε μελέτη με πράσινο τσάι, το lag time ήταν περίπου 600 sec, μικρότερο από τους γονότυπους γκότζι A321/S και C123/S. Πρόσφατη έρευνα παρουσίασε τη συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* με της *in vivo* και επιβεβαίωσε τα θετικά αποτελέσματα που έχει η διατροφή με τροφές πλούσιες σε φαινολικές ουσίες με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα για την υγεία του ανθρώπου (Amarowicz and Pegg, 2017).

3.7 Συμπεράσματα

Παρασκευάστηκαν αφεψήματα από έξι γονοτύπους *L. barbarum* και ένα *L. Chinense* σε νερό προκειμένου τα αφεψήματα να προσομοιάζουν με αυτά που παρασκευάζονται με τον παραδοσιακό τρόπο.

Στα αφεψήματα, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των λιποπρωτεϊνών του ορού αίματος και έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων.

Οι τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων κυμάνθηκαν μεταξύ 67,8 και 106,6 ισοδύναμα mg GA L⁻¹ αφεψήματος, των ολικών φλαβονοειδών μεταξύ 14,9 και 50 ισοδύναμα mg CA L⁻¹, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτιμώμενη με τη μέθοδο DPPH και FRAP, μεταξύ 0,4 και 0,18 ισοδύναμα mM trolox L⁻¹ αφεψήματος και 0,11 και 0,19 ισοδύναμα mM ασκορβικού οξέος L⁻¹, αντίστοιχα. Οι υψηλότερες τιμές των παραπάνω χαρακτηριστικών παρατηρήθηκαν στα αφεψήματα από τον γονότυπο A321/S. Επιπλέον, υψηλή συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικής ικανότητας (με τη μέθοδο DPPH) μετρήθηκε στο αφέψημα του C123/S. Ο υψηλότερος χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση παρατηρήθηκε στα αφεψήματα των γονοτύπων A321/S και C123/S. Η υψηλότερη συγκέντρωση του αθροίσματος των απλών φαινολικών, της τυροσόλης, καθώς και των p-υδροξυβενζοϊκού, βανιλικού, προτοκατεχικού, συριγγικού, φερουλικού και καφεϊκού οξέος παρουσιάστηκε στον γονότυπο A321/S σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γονοτύπους. Στα αφεψήματα από τους γονοτύπους A514/S, A321/S, A405/S δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση καμπεφρόλης, ενώ στο αφέψημα του A606/S ανιχνεύτηκε η καμπεφρόλη σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με των υπολοίπων γονοτύπων. Τέλος, τα αφεψήματα των A321/S και C123/S περιείχαν³⁷ την υψηλότερη συγκέντρωση χλωρογενικού οξέος, σε αντίθεση με τα αφεψήματα των B213/S και A606/S που περιείχαν τις χαμηλότερες

συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, η επιλογή των κατάλληλων γονοτύπων γκότζι μπέρρις που καλλιεργούνται στην Ελλάδα περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτική ικανότητα στα φύλλα τους και τα αντίστοιχα αφεψήματα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως λειτουργικά ροφήματα.

4.Βιβλιογραφία

- Ackland, M.L., Van De Waarsenburg, S.I., Jones, R. (2005). Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In vivo*. 19: 69-76.
- Amagase, H., and Farnsworth, N.R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44: 1702–1717.
- Amarowicz, R. and Pegg, R.B. (2017). The potential protective effects of phenolic compounds against low- density lipoprotein oxidation. *Current Pharmaceutical Design*, 23, Number 19.
- Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P. (2002). Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 655-665.
- Bender, C., Graziano, S., Zimmerman, B.F., Weidlich, H.H. (2014). Antioxidant potential of aqueous plant extracts assessed by the cellular antioxidant activity assay. *American Journal of Biology and Life Sciences*, 2: 72-79.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measurement of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D., Vincieri, F.F. (2001). Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug development and industrial pharmacy*, 27: 491-7.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT–Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Chanda, S., Dave, R., Kaneria, M. (2011). In vitro antioxidant property of some Indian medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5(2): 169-179.
- Christen, P., Kapetanidis, I. (1987). Flavonoids from *Lycium halimifolium*. *Planta medica*, 53(06): 571-572.
- Conforti, F., Marrelli, M., Menichini, Fed., Tundis, R., Statti, G.A., Solimene, U., Menichini, (*Origanum heracleoticum* L.) ethanolic extract on oxidative damage and on inhibition of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 26(3): 404-411.

- Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H.J., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., (2008) Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis*) extract. *Food Science and Technology*, 41: 391-400.
- Dihal, A.A., de Boer, V.C., van der Woude, H., Tilburgs, C., Bruijntjes, J.P., Alink, G.M., Rietjens, I.M., Woutersen, R.A., Stierum, R.H. (2006). Quercetin, but not its glycosidated conjugate rutin, inhibits azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in F344 rats. *The Journal of nutrition*, 136: 2862- 7.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., *et al.*, (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds., *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- Dong, J.Z., Wang, S.H., Zhu L., Wang Y. (2012). Analysis on the main active components of *Lycium barbarum* fruits and related environmental factors. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2276- 2283.
- Egert, S., Rimbach, G., (2011). Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements?. *Advances in Nutrition*, 2(1): 8-14.
- Fukuda, T., Yokoyama, J., Ohashi, H. (2001). Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 246–258.
- Herrera-Carrera, E., Moreno-Jiménez, M.R., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., DiazRivas, J.O., Gamboa-Gómez, C.I., Francisco, R. (2015) Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. *Cogent Food & Agriculture*, 1: 1059033.
- Kafkaletou, M., Christopoulos, M.V., Tsantili, E. (2017). Short-term treatments with high CO₂ and low O₂ concentrations on quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L.) during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 5194-5201.
- Kafkaletou, M., Christopoulos, M.V., Tsaniklidis, G., Papadakis, I., Ioannou, D., Tzoutzoukou, C., Tsantili, E. (2018). Nutritional value and consumer-perceived quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L. and *L. chinense* L.) from plants cultivated in Southern Europe. *Fruits*, 73: 5-12.

- Kaliora, A.C., Kogiannou, D.A.A., Kefalas, P., Papassideri, I.S., Kalogeropoulos, N., (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chemistry*, 142: 233-241.
- Karavoltsos, S., Plavsic, M., Kalogeropoulos, N., Kogiannou, D.A.A., Strmecki, S., Sakellari, A., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2014) Copper complexing properties and physico-chemical characterization of the organic matter in Greek herbal infusions. *Food Chemistry*, 160: 53- 60.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., *et al.* (2006) Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs., *Phytotherapy Research*, 20: 961-965.
- Leitzmann, C. (2016). Characteristics and health benefits of phytochemicals. *Complementary Medicine Research*, 23(2): 69-74.
- Levin, B., Lieberman, D.A., McFarland, B., Amdreus, K.S., Brooks, D., Bond, J., *et al.* (2008) Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps. A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology. *Journal of Gastroenterology*, 134: 1570- 1595.
- Nackz, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:1523-1542.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., Komaitis M., (2005) RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4):1190-1195.
- Ren, L., Li, J., Xiao, Y., Zhang, Y., Fan, J., Zhang, B., Wang, L., Shen, X. (2017). Polysaccharide from *Lycium barbarum* L. leaves enhances absorption of endogenous calcium, and elevates cecal calcium transport protein levels and serum cytokine levels in rats. *Journal of Functional Foods*, 33: 227– 23.
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110: 852-8.
- Li, S., Li, S-K., Gan, R-Y., Song, F-L., Kuang, L., Li, H-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51:289–298.

- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P.A. (2014) Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53: 46-54.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820-897.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7749–7759.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
- Suzuki-Sugihara, N. et al. (2016). Green tea catechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low-density lipoprotein particles in humans. *Nutrition Research*, 36: 16-23.
- Theodoratou, E., McNeill, G., Cetnarskyj, R., Farrington, S.M., Tenesa, A., Barnetson, R., Porteous, M., Dunlop, M., Campbell, H. (2007) Dietary Fatty Acids and Colorectal Cancer: A Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology*, 166: 181–195.
- Triantaphyllou, K., Blekas, G., Boskou, D., (2001) Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of Lamiaceae. *International Journal of Food Sources and Nutrition*, 52(4): 313-317.
- Vgi, E., Rapavan, E., Hadolin, M., Perdi, K.V., Balzs, A., Blzovics, A. Simndi, (2005) Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 17-21.
- Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949.
- Wu, T.J., Sempos, C.T., Freudenheim, J.L., Muti, P., Smith, E. (2004) Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Annals of Epidemiology*, 14: 195–201.
- Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 5165-70.
- Zhao, Q., Li, C., & Zhou, D. (1987). Chemical constituents of Gouqi (*Lycium barbarum*) leaf. *Zhongcaoyao*, 18: 104-133.
- Ρούσσοσ, Π. (2013). Γκότζι μπέρρυ. Εργαστηριακές σημειώσεις.