



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πτυχιακή Εργασία

Θέμα:

Συγκριτική μελέτη και αποτίμηση *in vitro* μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης συστατικών τροφίμων.

Φοιτήτρια: Παπαμελετίου Μελπομένη

Αριθμός Μητρώου: 71614062

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σινάνογλου Βασιλεία

Αθήνα 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

Faculty of Food Science
Department of Science and Food Technology

Dissertation

Subject:

Comparative study and evaluation of *in vitro* methods for the determination of antioxidant and antiradical activity of food ingredients.

Student: Papameletiou Melpomeni

Registration Number: 71614062

Supervisor: Sinanoglou Vasillia

Athens 2021

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Βασιλεία Σινάνογλου

Καθηγήτρια

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Ειρήνη Στρατή

Επίκουρος Καθηγήτρια

Παναγιώτης Ζουμπουλάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής/Διπλωματικής Εργασίας

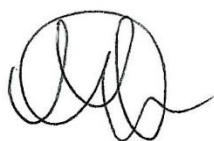
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μελομένη Παπαμελετίου του Αλεξάνδρου, με αριθμό μητρώου 71614062 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ του Τμήματος ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα,

Μελομένη Παπαμελετίου



Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, το οποίο με μεγάλη μου χαρά και υπερηφάνια ολοκληρώνω. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου και πρόεδρο του τμήματος Βασιλεία Σινάνογλου, η οποία με εμπιστεύτηκε στην ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, με στήριξε επιστημονικά και ηθικά κατά την εκπόνηση της εργασίας, αλλά ακόμα περισσότερο πίστεψε εξ' αρχής στις δυνατότητές μου και μου έδωσε πραγματικά κίνητρο να λάβω πρωτοβουλίες και να ολοκληρώσω αυτό το έργο. Από τα πρώτα έτη της φοίτησής μου, ο ζήλος και η όρεξη που μετέδιδε κατά την διδασκαλία της με έκαναν να αγαπήσω τον κλάδο της Χημείας και παράλληλα μου έδωσε ισχυρό κίνητρο να συνεχίσω τις σπουδές μου.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου Παπαμελετίου Αλέξανδρος και Ασπιώτη Βασιλική και τον αδελφό μου Παπαμελετίου Θεμιστοκλή, των οποίων η στήριξη δεν μπορεί να αποτυπωθεί και μέσα από την εμπιστοσύνη τους και την αγάπη τους καταφέρνω και εξελίσσομαι σαν άνθρωπος και σαν επιστήμονας.

Περίληψη

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η συγκριτική μελέτη των μεθόδων *in vitro* για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, αρχικά, γίνεται αναφορά σε βασικές έννοιες της οξειδωσης, της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και του σχηματισμού των ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, αποτυπώνονται οι βασικές κατηγορίες των αντιοξειδωτικών ενώσεων, ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η δράση τους και ο χαρακτηρισμός της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης και ικανότητας. Στο τρίτο κεφάλαιο ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες οι μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης με βάση τον μηχανισμό αντίδρασης που χρησιμοποιούν (SET – Single Electron Transfer ή HAT – Hydrogen Atom Transfer), καταγράφονται οι αρχές μεθόδων, τα πρωτόκολλα καθώς και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παραθέτονται πειραματικά δεδομένα και αποτελέσματα από την εφαρμογή των μεθόδων σε αντιοξειδωτικές ενώσεις και συστατικά τροφίμων, με σκοπό την σύγκριση και την αποτίμηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν και κατ'έκταση των μεθόδων, την εξαγωγή συμπερασμάτων σε σχέση με τον συσχετισμό που παρουσιάζουν οι μέθοδοι μεταξύ τους, καθώς και την εκτίμηση των μεθόδων ως προς την σχέση που εμφανίζουν με την βιολογική δράση *in vivo* των ενώσεων που μελετούν. Παράλληλα, αποτυπώνονται εφαρμογές από σύγχρονες τεχνολογίες. Τέλος το πέμπτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τα συμπεράσματα από την συγκριτική μελέτη των μεθόδων *in vitro* που συνοψίζονται στη σημασία της κατάλληλης επιλογής της μεθόδου και οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά για τον σχεδιασμό μεθόδου που έχει την δυνατότητα να προσδιορίζει με μεγάλη εγκυρότητα την βιολογική-αντιοξειδωτική δράση *in vivo* των ενώσεων και των συστατικών τροφίμων.

Abstract

In order to carry out the comparative study of assays *in vitro* for the determination of the antioxidant and antiradical activity, firstly, basic principles of oxidation, lipid peroxidation and free radical formation are mentioned. Moreover, there is the need to imprint the basic categories of antioxidant compounds, the mechanism of their action and the characterization of antioxidant and antiradical activity and capacity. In the third chapter, the assays for the determination of the antioxidant and antiradical activity are classified into two categories based on the reaction mechanism utilized (SET – Single Electron Transfer or HAT – Hydrogen Atom Transfer) and the principles, protocols, advantages and disadvantages of the assays are imprinted.

The fourth chapter includes experimental data and results from the application of the assays on antioxidant compounds and food ingredients, in order to compare and evaluate the results occurring and therefore the assays and to draw conclusions in relation to the correlation between the assays, as well as to assess the assays in relation to the biological activity *in vivo* of the antioxidant compounds and food ingredients studied. In addition, new and modern technologies and their applications are presented. In the fifth chapter, which is the last one, the conclusions of the comparative study of the assays *in vitro* are summarized into the importance of the appropriate choice of the assay and the parameters to be taken into consideration, while at the same time the characteristics for the design of an assay, are listed, which makes it possible to determine with good validity the biological-antioxidant activity *in vivo* of the antioxidant compounds and food ingredients.

Περιεχόμενα

Σκοπός της Μελέτης – Εισαγωγή	10
1. Οξειδωση: Βασικές Έννοιες	13
1.1 Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών	13
1.2 Οξειδωτικό Stress	14
1.3 Υπεροξειδωση Λιπιδίων	15
2. Αντιοξειδωτικές Ενώσεις	16
2.1 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών	17
2.2 Φαινολικές Ενώσεις	18
2.2.1 Φαινολικά Οξέα	18
2.2.2 Φλαβονοειδή	19
2.2.3 Τοκοφερόλες, Τοκοτριενόλες και Βιταμίνη Ε	20
2.3 Αντιοξειδωτική και Αντιριζική Δράση	22
2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση και Ικανότητα	23
2.3.2 Μηχανισμοί Δράσης των Αντιοξειδωτικών	23
2.3.3 Συσχετισμός <i>in vivo</i> και <i>in vitro</i> Αντιοξειδωτικής Δράσης	24
3. Μέθοδοι <i>in vitro</i> Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής και Αντιριζικής Δράσης	25
3.1 Καταγραφή και Ταξινόμηση Μεθόδων <i>in vitro</i>	27
3.2 Μέθοδοι SET – Single Electron Transfer	30
3.2.1 FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power	30
3.2.2 TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	31
3.2.3 DPPH – Free Radical Scavenging Assay	33
3.2.4 Folin-C – Total Phenolic Content by Folin-Ciocalteu	35
3.2.5 DMPD – Radical Cation Decolorization Assay	36
3.3 Μέθοδοι HAT – Hydrogen Atom Transfer	38
3.3.1 ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity	38
3.3.2 TRAP – Total Peroxyl Radical Trapping Potential	40
3.3.3 LPIC – Lipid Peroxidation Inhibition Capacity	42
3.3.4 ABTS – Radical Cation Decolorization Assay	44
3.3.5 Αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος	45
4. Σύγκριση και Εκτίμηση των Μεθόδων <i>in vitro</i>	49

4.1 Εφαρμογή των Μεθόδων <i>in vitro</i> σε Συστατικά Τροφίμων και Αντιοξειδωτικές Ενώσεις.....	49
4.1.1 DPPH, FRAP και Αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος για Φρούτα του Γένους <i>Crataegus</i>	49
4.1.2 ABTS, ORAC και FRAP για Στιλβένια	53
4.1.3 TEAC και ORAC για Πορτοκαλοχυμό και Αποβουτυρωμένο Γάλα.....	58
4.1.4 ABTS και DPPH για Κριθάρι και Βύνη.....	63
4.2 Σύγχρονες Τεχνολογίες και Εφαρμογές	66
4.2.1 Κυτταρική Αντιοξειδωτική Δράση (CAA – Cellular Antioxidant Activity).....	66
4.2.2 Κυκλική Βολταμμετρία (CV – Cyclic Voltammetry)	70
5. Συμπεράσματα και Συζήτηση	75
Βιβλιογραφία	79

Σκοπός της Μελέτης – Εισαγωγή

Το οξειδωτικό stress είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού και των οξειδωτικών παραγόντων. Μεγάλο μέρος των παραγόντων που προκαλούν οξείδωση είτε σε βιολογικά συστήματα, είτε σε τρόφιμα αποτελείται από τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο μόριό τους. Η ιδιότητα αυτή τις καθιστά ιδιαίτερα δραστικές έναντι των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών καθώς και έναντι του DNA, ενώ παράλληλα μπορούν να προκαλέσουν υπεροξείδωση των λιπιδίων με ταυτόχρονη υποβάθμιση των προϊόντων και οξειδωτική βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες.

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις δρουν έναντι των ελεύθερων ριζών και αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να αποτρέπουν την υποβάθμιση των προϊόντων και να προωθούν την σταθεροποίησή τους. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το πεδίο της Τεχνολογίας Τροφίμων. Παράλληλα, είναι γνωστές οι ευεργετικές ιδιότητες των αντιοξειδωτικών ενώσεων για την ανθρώπινη υγεία, καθώς η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής αλλά και μέσω των συμπληρωμάτων διατροφής βοηθά στην πρόληψη ασθενειών και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Γίνεται, επομένως, κατανοητή η ανάγκη για την μέτρηση της ισχύος μίας ένωσης ως αντιοξειδωτική, καθώς η δράση των ενώσεων με υψηλότερη αντιοξειδωτική ισχύ ή αλλιώς αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα, συνεπάγεται με περισσότερα οφέλη τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, λόγω της υψηλότερης ικανότητας να σταθεροποιούν τα συστήματα τροφίμων και φαρμάκων αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης σε ενώσεις ή συστατικά τροφίμων αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη αρκετοί παράγοντες, όπως ο σκοπός της μελέτης, ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης, τα χαρακτηριστικά των ενώσεων που μελετώνται και οι συνθήκες οι οποίες επικρατούν. Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης έχουν αναπτυχθεί πληθώρα μεθόδων, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης, χρησιμοποιούν διαφορετικά αντιδραστήρια,

πραγματοποιούνται σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασιών, pH και χρόνου και απευθύνονται σε ξεχωριστά είδη ενώσεων. Η πολυπλοκότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων, τόσο σε επίπεδο χημικών δομών όσο και σε επίπεδο υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας, είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη πολλών και ιδιαίτερων μεθόδων *in vitro* οι οποίες εξειδικεύονται σε συγκεκριμένο εύρος ενώσεων. Ως εκ τούτου, για την κατάλληλη επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί απαιτείται η γνώση των χαρακτηριστικών των ενώσεων που πρόκειται να μελετηθούν, ο μηχανισμός με τον οποίο αντιδρούν έναντι των ελεύθερων ριζών και οι συνθήκες αντίδρασης, με σκοπό να κριθεί η μέθοδος με την οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συμβατότητα, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να εμφανίζουν μεγαλύτερη εγκυρότητα. Επομένως, η συγκριτική μελέτη των μεθόδων *in vitro* για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης παρουσιάζει μεγάλη σημασία για την μελέτη των αντιοξειδωτικών ενώσεων, καθώς με αυτόν τον τρόπο ο μελετητής έχει την δυνατότητα να μελετήσει τις διαφορετικές παραμέτρους των μεθόδων, τις απαιτήσεις σε αντιδραστήρια και εξοπλισμό, τους μηχανισμούς αντίδρασης στους οποίους βασίζονται οι μέθοδοι, τις ενώσεις στις οποίες απευθύνονται, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου, με σκοπό να κρίνει και να επιλέξει τις καταλληλότερες μεθόδους για την μελέτη του.

Παράλληλα, μεγάλη σημασία παρουσιάζει ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων από την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης με την βιολογική δράση που παρουσιάζουν οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που μελετώνται *in vivo*. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης δεν αποδίδουν, απαραίτητα, αποτελέσματα που υποδεικνύουν την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση εντός ενός βιολογικού συστήματος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων, ενώ ταυτόχρονα είναι δυσκολότερο να προσομοιωθεί ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης που πραγματοποιείται εντός του βιολογικού συστήματος. Ωστόσο, είναι γνωστοί κάποιοι παράμετροι που υφίστανται εντός των βιολογικών συστημάτων, όπως η συνεχής παραγωγή ελεύθερων ριζών και ο σχηματισμός κυρίως δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα να μπορούν να εισαχθούν στις μεθόδους. Γίνεται κατανοητό ότι οι παράμετροι των μεθόδων, όπως τα είδη των ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται καθώς και ο ρυθμός με τον οποίο παράγονται, το pH και το περιβάλλον της αντίδρασης καθορίζουν τον συσχετισμό *in vivo* που εμφανίζουν οι

αντιοξειδωτικές ενώσεις. Προκύπτει ότι ένα περιβάλλον αντίδρασης μίας μεθόδου, το οποίο προσομοιώνει καλύτερα τις συνθήκες εντός του βιολογικού συστήματος, εξάγει αποτελέσματα αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης που αντιστοιχούν καλύτερα στις πραγματικές συνθήκες που επικρατούν *in vivo*. Επομένως, μέσω της συγκριτικής μελέτης μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για τον σχεδιασμό μεθόδων *in vitro* οι οποίες παρουσιάζουν καλύτερο συσχετισμό των αποτελεσμάτων τους *in vivo*.

1. Οξείδωση: Βασικές Έννοιες

Οι ζωντανοί οργανισμοί, με εξαίρεση ορισμένα αναερόβια βακτήρια, χρησιμοποιούν το O₂ για την παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα η διαδικασία που πραγματοποιείται για την παραγωγή ενέργειας από την κατανάλωση τροφίμων ονομάζεται οξείδωση και είναι ουσιώδης για πολλές βιολογικές διεργασίες όπως ρύθμιση του μεταβολισμού, ενεργοποίηση – απενεργοποίηση βιομορίων και έκφραση γονιδίων (Nunes et al., 2012).

1.1 Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών

Η διαδικασία της οξείδωσης συνδέεται άρρηκτα με την παραγωγή ελεύθερων ριζών, οι οποίες αποτελούν ενώσεις που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Karuna et al., 2018). Η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ελεύθερες ρίζες μεγάλου βαθμού δραστικότητα με αποτέλεσμα να αντιδρούν εύκολα με πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και DNA. Ως εκ τούτου, αντιδρούν με τα γειτονικά μόρια και δεσμεύουν το ηλεκτρόνιό τους με αποτέλεσμα τα μόρια αυτά να αποτελούν πλέον ελεύθερες ρίζες, πυροδοτώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση (Shalaby & Shanab, 2013). Μία ένωση μπορεί να μετατραπεί σε ελεύθερη ρίζα είτε χάνοντας ένα ηλεκτρόνιο δηλαδή προκαλώντας αναγωγή, είτε κερδίζοντας ένα ηλεκτρόνιο με οξείδωση (Yaman & Ayhanci, 2021). Είναι ευρέως γνωστή η αρνητική τους δράση στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς προωθούν την γήρανση, προκαλούν εκφυλιστικές ασθένειες όπως καρκίνος, καταρράκτης, καρδιαγγειακές παθήσεις, εγκεφαλικές δυσλειτουργίες αλλά και εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Menghani et al., 2011). Ταυτόχρονα οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να υποβαθμίσουν τα προϊόντα τροφίμων, υποβαθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους καθώς και την διάρκεια ζωής ή αλλιώς το shelf-life (Karuna et al., 2018).

Οι ελεύθερες ρίζες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την προέλευσή τους σε δραστικές μορφές οξυγόνου ή reactive oxygen species (ROS) στην περίπτωση που προέρχονται από το οξυγόνο και δραστικές μορφές αζώτου ή reactive nitrogen species (RNS) στην περίπτωση που προέρχονται από το άζωτο. Παραδείγματα ROS είναι το ανιόν υπεροξειδίου O₂⁻ (superoxide), η ρίζα υδροξυλίου HO· (hydroxyl), η ρίζα υδροϋπεροξειδίου HOO· (hydroperoxyl), η ρίζα υπεροξειδίου ROO· (peroxyl), η ρίζα αλκοξειδίου RO· (alkoxyl) ως ελεύθερες ρίζες και το υπεροξείδιο του υδρογόνου

H₂O₂ ως μη ρίζα. Ορισμένα παραδείγματα RNS είναι το μονοξειδίο του αζώτου NO[•] (nitric oxide), το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν ONOO⁻ (peroxy nitrate), το διοξειδίο του αζώτου NO₂ (nitrogen dioxide) και το τριοξειδίο του αζώτου N₂O₃ (dinitrogen trioxide) (Shalaby & Shanab, 2013).

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια και πιο σημαντική πηγή των ROS στα κύτταρα, όπου παράγονται διαρκώς. Υπό κανονικές συνθήκες λειτουργίας του μεταβολισμού ο συνεχής σχηματισμός των ROS και άλλων ελεύθερων ριζών είναι απαραίτητος και ουσιαστικός για τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων όπως παραγωγή του ATP, πληθώρα καταβολικών και αναβολικών διεργασιών και συμμετοχή σε οξειδοαναγωγικούς κύκλους. Ωστόσο, η εξαιρετική αύξηση του σχηματισμού αυτών των ενώσεων μπορεί να προκληθεί είτε από ενδογενείς βιολογικούς παράγοντες όπως υπεροξειδωση λιπιδίων, αντίδραση ανοσοποιητικού συστήματος σε παθογόνο και σε περίπτωση φλεγμονής, είτε από εξωγενείς περιβαλλοντικούς όπως έκθεση σε χημικές ουσίες, περιβαλλοντική μόλυνση και ακτινοβολία (Rahal et al., 2014; Yaman & Ayhanci, 2021).

1.2 Οξειδωτικό Stress

Τα ζωντανά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν εσωτερικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase - SOD), υπεροξειδάση γλουταθειόνης, καθώς και να παραλαμβάνουν από εξωτερικές πηγές μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως γλουταθειόνη, βιταμίνη C και E. Ωστόσο, εάν η παραγωγή των ελεύθερων ριζών υπερτερεί των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός βιολογικού συστήματος, τότε τα ROS και RNS μπορούν να αντιδράσουν με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA προκαλώντας σοβαρές δομικές και λειτουργικές βλάβες στα κυτταρικά ένζυμα και στο γενετικό υλικό. Η υπεροχή αυτών των οξειδωτικών ενώσεων και οι επιβλαβείς τους δράσεις χαρακτηρίζονται ως οξειδωτικό stress (Nunes et al., 2012). Επομένως, ως οξειδωτικό stress μπορεί να οριστεί η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων *in vivo* (Pinchuk et al., 2012). Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί αιτιολογικό και παθολογικό παράγοντα για την εκδήλωση

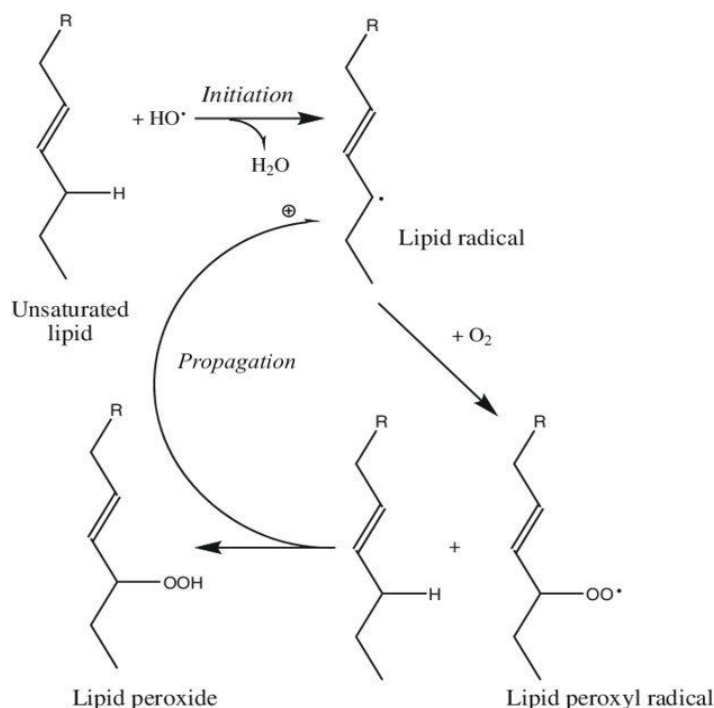
καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρκίνων, της νόσου Alzheimer, διαβήτη και πρόωρης γήρανσης (Nunes et al., 2012).

1.3 Υπεροξειδωση Λιπιδίων

Τα λιπίδια είναι τα πιο ευάλωτα βιομόρια στις επιδράσεις των ελεύθερων ριζών και ιδιαίτερα οι ακόρεστοι δεσμοί των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες αντιδρούν πολύ εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες, με αποτελέσματα τον σχηματισμό προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται κατανοητό ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή PUFA (polyunsaturated fatty acids) είναι τα περισσότερο ευαίσθητα στην υπεροξειδωση, για τον λόγο ότι περιέχουν παραπάνω από έναν διπλό δεσμό στο μόριό τους, ενώ ταυτόχρονα η ευαισθησία αυτή αυξάνεται με την αύξηση της ακορεστότητας, με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η διάσπαση των ατόμων υδρογόνου σε αυτά τα μόρια. Τα άλατα του Fe και του Cu αυξάνουν τον ρυθμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, καθώς τα υπεροξειδία που φυσικά απαντώνται στις κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζουν ρίζες θειυλίου $RS\cdot$ και ρίζες υπεροξειδίου $ROO\cdot$ υπό την παρουσία αυτών των μετάλλων. Κατά συνέπεια, μειώνεται η ρευστότητα και η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με κίνδυνο την ακεραιότητά της.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση που περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια τα οποία κατηγοριοποιούνται στα εξής: εκκίνηση, διάδοση, τερματισμός. Η εκκίνηση πραγματοποιείται με την απομάκρυνση του ατόμου υδρογόνου από την μεθυλενομάδα ($-CH_2-$) του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος ($LH\cdot$) από μια υψηλά δραστική ελεύθερη ρίζα όπως η υδροξυλική $HO\cdot$. Στο δεύτερο στάδιο της διάδοσης, αρχικά το άτομο υδρογόνου απομακρύνεται από το μόριο αποκτώντας ένα ηλεκτρονίο και ο άνθρακας του λιπαρού οξέος παραμένει με το άλλο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας ελεύθερη ρίζα με κεντρικό άτομο τον άνθρακα ($L\cdot$). Στη συνέχεια, η ρίζα αυτή αντιδρά με το οξυγόνο για να σχηματιστεί η υπεροξειδική ρίζα του λιπιδίου $LOO\cdot$. Στο σημείο αυτό ο ρόλος αυτής της ρίζας είναι σημαντικός, καθώς με τον σχηματισμό της ακολουθεί μια αλυσιδωτή αντίδραση που οδηγεί στην απομάκρυνση ατόμου υδρογόνου από άλλο λιπαρό οξύ. Τέλος στο στάδιο του τερματισμού, οι υπεροξειδικές ρίζες των λιπιδίων $LOO\cdot$ είτε υποβάλλονται σε αυτοκαταστροφή είτε σχηματίζουν μη ριζικά προϊόντα όπως υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων $LOOH$, τα οποία παραμένουν σταθερά σε φυσιολογικές θερμοκρασίες

(Yaman et al., 2021; Kelly et al., 1998). Στο **Σχήμα 1** παρουσιάζονται συνοπτικά τα τρία στάδια της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Σχήμα 1: Μηχανισμός υπεροξειδωσής των λιπιδίων σε ακόρεστο λιπαρό οξύ. Τα τρία βασικά στάδια: εκκίνηση (*Initiation*), διάδοση (*Propagation*) και τερματισμός (*Termination*) (Freinbichler et al., 2011).

Συμπερασματικά, η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες, κατακερματισμό του DNA, την γένεση πολλών ανθρώπινων ασθενειών, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να μειώσει ραγδαία το shelf-life τόσο των τροφίμων όσο και των φαρμάκων (Pinchuk et al., 2012).

2. Αντιοξειδωτικές Ενώσεις

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια ή ιόντα ή σχετικά σταθερές ρίζες που έχουν τη δυνατότητα να καθυστερούν ή να αποτρέπουν την οξείδωση μιας άλλης ουσίας (Pinchuk et al., 2012). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ζωντανοί οργανισμοί αναπτύσσουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με σκοπό να διατηρήσουν την ομοιόσταση μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ωστόσο, η παραλαβή αντιοξειδωτικών ουσιών από την διατροφή είναι πολύ σημαντική και είναι γνωστή η προληπτική δράση τους σε πληθώρα ασθενειών. Συγκεκριμένα, τα φυσικά αντιοξειδωτικά θεωρούνται ως πρόδρομες ουσίες για την σύνθεση περισσότερο

βιολογικά ενεργών προϊόντων, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχουν ενεργά στην αναστολή οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, κατέχουν αντιφλεγμονώδη δράση και αρκετές βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες σε συνδυασμό με την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών, όπου θα μελετηθεί στη συνέχεια (Sachdeva et al., 2014). Παράλληλα, τα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να παρατείνουν το shelf-life των τροφίμων και φαρμάκων με αποτέλεσμα να προωθούν την σταθεροποίησή τους (Pinchuk et al., 2012). Γίνεται, λοιπόν, κατανοητή η ανάγκη μελέτης των αντιοξειδωτικών ουσιών αλλά και της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής τους δράσης τόσο για τις ευεργετικές ιδιότητες που διαθέτουν για τον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και για την σταθεροποίηση και παράταση του χρόνου ζωής των τροφίμων και των φαρμάκων.

2.1 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα φυσικά και τα συνθετικά. Τα φυσικά περιλαμβάνουν τις φαινολικές ενώσεις όπως τοκοφερόλες, βιταμίνη Ε, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, κινόνες, βενζοφαινόλες, κουμαρίνες, διτερπενικές αλκοόλες, τις αζωτούχες ενώσεις όπως αλκαλοειδή, παράγωγα της χλωροφύλλης, αμίνες και αμινοξέα, καθώς και καρροτενοειδή και ασκορβικό οξύ (Nunes et al., 2012; Kaurinovic & Vastag, 2018). Στα συνθετικά αντιοξειδωτικά αναφορικά ανήκουν οι φαινολικές δομές με υποκαταστάτες αλκυλίου όπως η βουτυλική υδροξυανισόλη (butylated hydroxyanisole – BHA) και το βουτυλικό υδροξυτολουόλιο (butylated hydroxytoluene – BHT).

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται κυρίως ως συντηρητικά τροφίμων και σταθεροποιητές, ωστόσο η χρήση τους είναι περιορισμένη καθώς μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση. Γι'αυτόν τον λόγο η αντικατάσταση των συνθετικών από τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορεί να έχει θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Λόγω της τοξικότητας των συνθετικών αντιοξειδωτικών οι έρευνες έχουν στραφεί στην δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών, που προέρχονται από φυτικά προϊόντα, έναντι των ελεύθερων ριζών. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, προανθοκυανιδίνες και ταννίνες που παραλαμβάνονται από φυτικά εκχυλίσματα και προϊόντα δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν την υπεροξείδωση λιπιδίων (Nunes et al., 2012).

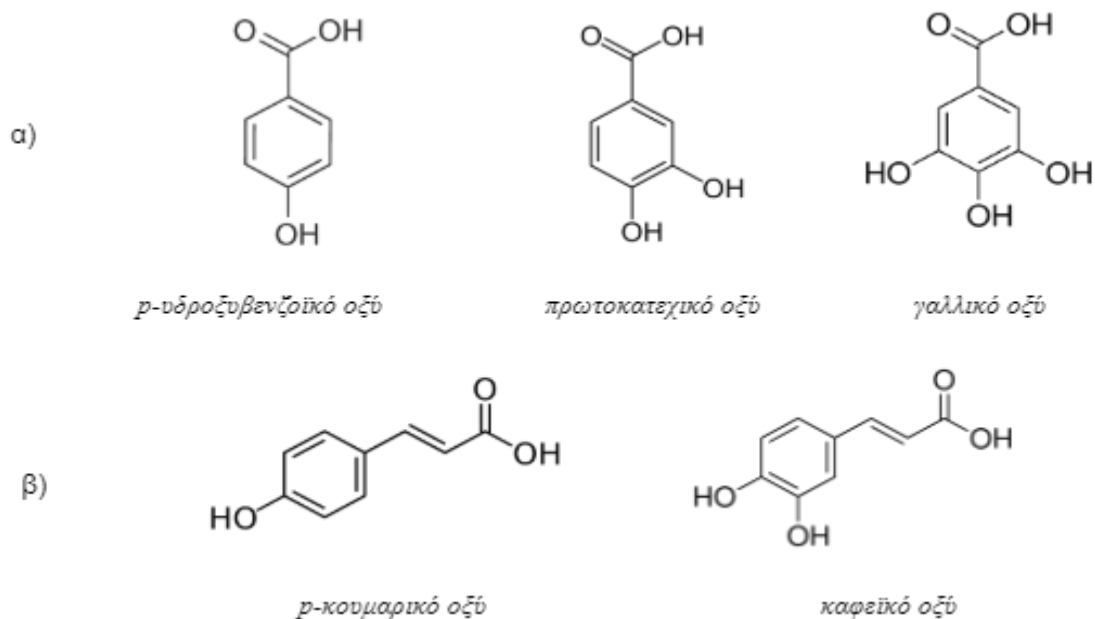
Τα αντιοξειδωτικά μπορούν, επίσης, να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το περιβάλλον στο οποίο διαλύονται. Ειδικότερα, τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν την βιταμίνη C και την πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων, ενώ τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά αποτελούνται κυρίως από τη βιταμίνη E και τα καροτενοειδή. Σε αντίθεση με τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, τα οποία δεν συσσωρεύονται στο ανθρώπινο σώμα, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να διεισδύουν με ευκολία στην λιποπρωτεϊνική κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα. Ως εκ τούτου, τόσο τα υδρόφιλα όσο και τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά κατέχουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα βιοχημικών και φυσιολογικών διεργασιών (Huang et al., 2002).

2.2 Φαινολικές Ενώσεις

Τα φυτά αναπτύσσουν αμυντικούς μηχανισμούς έναντι εξωτερικών βλαβερών παραγόντων όπως ορατό ή υπεριώδες φως και ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες περιλαμβάνουν μεγάλο εύρος φυτικών ουσιών και δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό έναν αρωματικό δακτύλιο με υποκαταστάτη μία ή παραπάνω υδροξυλομάδες και άλλες λειτουργικές ομάδες όπως εστέρες.

2.2.1 Φαινολικά Οξέα

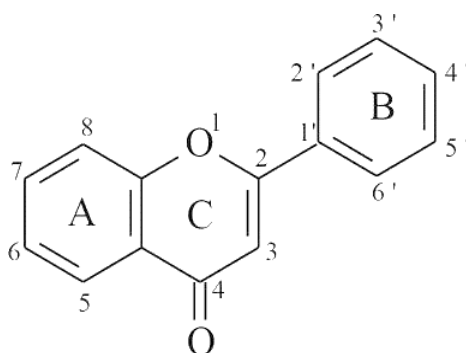
Στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων κατατάσσονται τα φαινολικά οξέα, τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες και αποτελούν παράγωγα από βενζοϊκό οξύ και κινναμωμικό οξύ. Ορισμένα παράγωγα από βενζοϊκό οξύ είναι το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, ενώ το p-κουμαρικό οξύ και το καφεϊκό οξύ προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ (**Σχήμα 2**). Τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και ειδικότερα τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα προάγουν την παραγωγή σημαντικών φαινολικών συστατικών για το φυτό, μέσω της συμμετοχής στον συνολικό μεταβολισμό των φαινυλοπροπανοειδών, που αποτελείται από πληθώρα βιοχημικών αντιδράσεων (Kaurinovic & Vastag, 2019).



Σχήμα 2: Παρατίθενται στην σειρά α) τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και στην σειρά β) τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (Προσαρμόστηκε από Kaurinovic & Vastag, 2019).

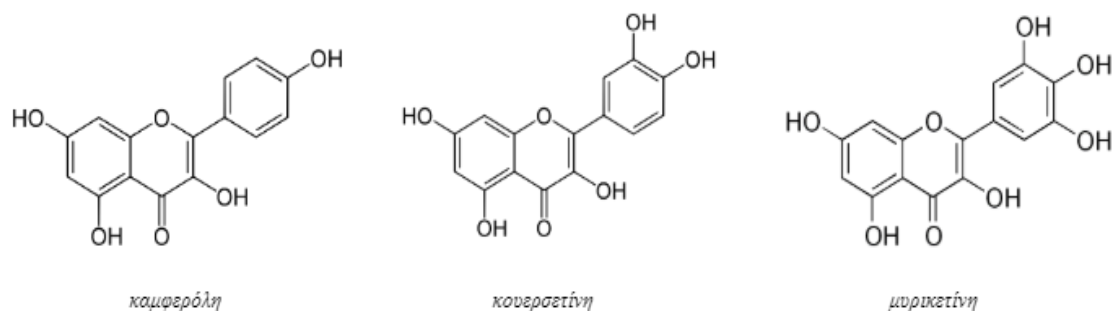
2.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν σημαντικές φυσικές οργανικές ενώσεις που προέρχονται από δευτερογενείς μεταβολίτες. Χημικά ανήκουν σε μία κατηγορία ενώσεων που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ατόμων άνθρακα (Σχήμα 2.1). Συχνά, ένα ή περισσότερα υδροξύλια που περιέχονται στην χημική δομή τους μπορούν να υποστούν μεθυλίωση, πρενυλίωση, ακετυλίωση και σουρλουρουλίωση. Με αυτόν τον τρόπο, τα φλαβονοειδή κατατάσσονται σε υποκατηγορίες και συγκεκριμένα στις φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβόνες και χαλκόνες (Feng et al., 2017).



Σχήμα 2.1: Βασική δομή των φλαβονοειδών (Kaurinovic & Vastag, 2019).

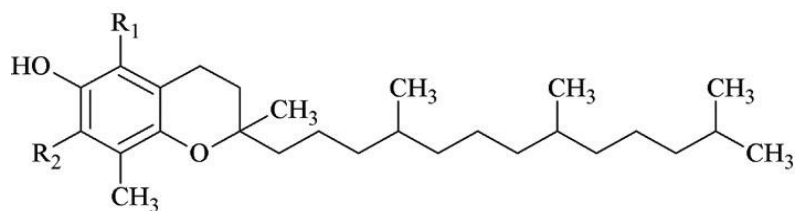
Οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες αποτελούν τις πιο διαδεδομένες δομές των φλαβονοειδών με κυρίαρχες την κουερσετίνη, την μυρικετίνη και την καμφερόλη, των οποίων η χημική δομή παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.2** (Kaurinovic & Vastag, 2019).



Σχήμα 2.2: Τα τρία πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή (Προσαρμόστηκε από Kaurinovic & Vastag, 2019).

2.2.3 Τοκοφερόλες, Τοκοτριενόλες και Βιταμίνη E

Οι τοκοφερόλες είναι και αυτές φυσικά αντιοξειδωτικά που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και βιοσυντίθενται στους ιστούς των φυτών. Αποτελούν αμφιπαθή μόρια, καθώς διαθέτουν έναν πολικό δακτύλιο και μία υδρόφοβη κορεσμένη ανθρακική αλυσίδα στο μόριό τους (**Πίνακας 2.3**). Στην φύση απαντώνται σε τέσσερις ισομερείς δομές την α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλη, οι οποίες διαφέρουν ως προς τον αριθμό και την θέση της μεθυλομάδας στον αρωματικό δακτύλιο. Η αντιοξειδωτική δράση των τοκοφερολών *in vitro* αυξάνεται με την σειρά από $\alpha < \gamma < \beta < \delta$, ενώ η βιολογική τους δράση *in vivo* αυξάνεται από $\delta < \gamma < \beta < \alpha$.

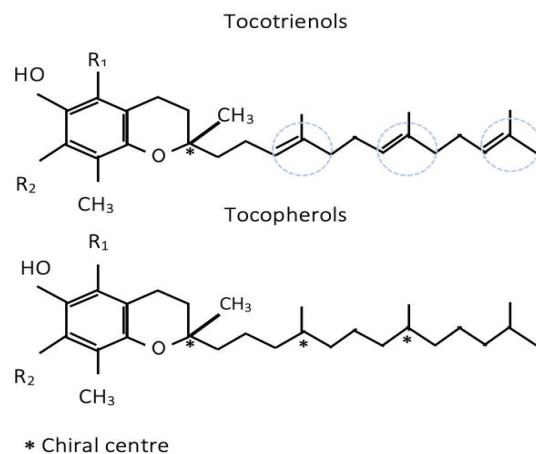


Tocopherol	R ₁	R ₂
α-	CH ₃	CH ₃
β-	CH ₃	H
γ-	H	CH ₃
δ-	H	H

Πίνακας 2.3: Η βασική δομή των τοκοφερολών και οι διαφορετικοί υποκαταστάτες που διαμορφώνουν τις ισομερείς δομές α-, β-, γ- και δ- (Šřika et al., 2016).

Ο πρωταρχικός ρόλος των τοκοφερολών είναι η προστασία των λιπιδίων από την υπεροξειδωση, ως εκ τούτου βρίσκονται σε αφθονία σε φυτικά τρόφιμα, ενώ η βασική πηγή των τοκοφερολών μέσω της διατροφής θεωρείται ότι αποτελούν τα φυτικά έλαια. Στα παρθένα ελαιόλαδα οι τοκοφερόλες κατανέμονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λόγω γεωπονικών, γεωγραφικών και τεχνολογικών παραγόντων, ωστόσο η α-τοκοφερόλη καταλαμβάνει περισσότερο από το 90% του συνολικού κλάσματος των τοκοφερολών (Šřika et al., 2016).

Οι τοκοτριενόλες διαχωρίζονται και αυτές σε τέσσερις ισομερείς δομές την α-, β-, γ- και δ-. Η διαφοροποίηση των τοκοτριενολών από τις τοκοφερόλες έγκειται στο γεγονός ότι οι τοκοφερόλες διαθέτουν μια μακριά κορεσμένη ανθρακική αλυσίδα η οποία περιέχει στερεογονικά κέντρα, ενώ οι τοκοτριενόλες περιέχουν τρεις διπλούς δεσμούς και ένα στερεογονικό κέντρο (Πίνακας 2.4). Αθροιστικά, οι οχτώ ισομερείς δομές των τοκοφερολών και τοκοτριενολών αποτελούν την βιταμίνη Ε. Ωστόσο, το πιο βασικό ισομερές που εντοπίζεται ως βιταμίνη Ε είναι η α-τοκοφερόλη. Η α-τοκοτριενόλη έχει βρεθεί ότι διαθέτει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την α-τοκοφερόλη, λόγω της καλύτερης κατανομής στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρά ευκολότερα με τις ελεύθερες ρίζες (Musa, 2021).



Isomer	R ₁	R ₂
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
σ	H	H

Πίνακας 2.4: Διαφορές στην χημική δομή μεταξύ τοκοφερολών και τοκοτριενολών και οι ισομερείς διαμορφώσεις τους (Musa, 2021). * *chiral centre* = στερεογονικό κέντρο

2.3 Αντιοξειδωτική και Αντιριζική Δράση

Οι ουσίες με αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση που περιέχονται σε συστατικά τροφίμων έχουν αναμφισβήτητα πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να αποτρέψουν την υποβάθμιση των τροφίμων και να βοηθήσουν στην σταθεροποίησή τους. Ωστόσο, είναι επιτακτική ανάγκη να προσδιορίσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους δρουν αυτές οι ουσίες και προσδίδεται σε αυτές η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Γενικά, οι αντιοξειδωτικές ουσίες μπορούν να αντιδράσουν σύμφωνα με πολλαπλούς μηχανισμούς ή με έναν βασικό μηχανισμό. Με την γνώση της χημικής δομής της αντιοξειδωτικής ουσίας γίνεται δυνατή η κατανόηση του μηχανισμού της αντίδρασης που πραγματοποιείται. Ως εκ τούτου είναι σημαντική η μελέτη των *in vitro* μηχανισμών αντιοξειδωτικής δράσης των οργανικών ενώσεων έναντι των ελεύθερων ριζών και άλλων προοξειδωτικών ενώσεων, με σκοπό να δημιουργηθεί η βάση για την εκτίμηση και κατανόηση των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης (Santos-Sánchez et al., 2019).

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση διαφοροποιείται από την αντιριζική δράση, καθώς αποτελούν δύο έννοιες οι οποίες δεν συμπίπτουν απαραίτητα. Συγκεκριμένα, ως αντιριζική δράση ορίζεται η ικανότητα των ενώσεων

να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, σε μία αντίδραση σχηματισμού ελεύθερης ρίζας, ενώ η αντιοξειδωτική δράση αντιπροσωπεύει την δυνατότητα των ενώσεων αυτών να αναστέλλουν την διαδικασία της οξείδωσης, η οποία συνήθως περιλαμβάνει περισσότερες από μία αντιδράσεις όπως στην περίπτωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Κατά συνέπεια, οι χημικές μέθοδοι προσδιορισμού που βασίζονται στον σχηματισμό σταθερής ελεύθερης ρίζας, όπως για παράδειγμα οι μέθοδοι DPPH και ABTS που θα μελετηθούν στην συνέχεια, δίνουν πληροφορίες για την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών ή για την αντιριζική δράση συγκεκριμένης ουσίας. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις δεν συμπίπτει με την αντιοξειδωτική δράση της δεδομένης ουσίας. Όσον αφορά την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την σταθεροποίηση των τροφίμων, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί μελέτη σε σχετικό περιβάλλον όπως λιποπρωτεΐνες και φυτικά λάδια για να υπάρχουν αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ως προς την αντιοξειδωτική δράση (Tirzitis & Bartosz, 2010).

2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση και Ικανότητα

Κατά την μελέτη ενός αντιοξειδωτικού είναι σημαντικό να καθοριστούν οι έννοιες αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα, καθώς αποτελούν διαφορετικές παραμέτρους για την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού. Η αντιοξειδωτική δράση αναφέρεται στην σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης της αντιοξειδωτικής ουσίας με μία οξειδωτική, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα αντιπροσωπεύει το μέτρο της ποσότητας μιας συγκεκριμένης ελεύθερης ρίζας η οποία μπορεί να δεσμευτεί από το δείγμα του αντιοξειδωτικού. Επομένως, κατά την επιλογή των μεθόδων προσδιορισμού οι παράμετροι αυτοί λαμβάνονται υπόψη για τον χαρακτηρισμό των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της ουσίας, που μπορεί να είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του οξειδωτικού υποστρώματος ή της συγκέντρωσης και του χρόνου που απαιτείται για την αναστολή ορισμένης συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών.

2.3.2 Μηχανισμοί Δράσης των Αντιοξειδωτικών

Οι μηχανισμοί με τους οποίους αντιδρούν οι αντιοξειδωτικές ενώσεις με τις ελεύθερες ρίζες σχετίζονται τόσο με την δραστικότητα και την χημική δομή των ελεύθερων ριζών, όσο και με το περιβάλλον όπου παράγονται. Επίσης, οι αντιδράσεις

μεταξύ αντιοξειδωτικών και ελεύθερων ριζών δεν εξαρτώνται μόνο από την συγκέντρωση των δύο παραγόντων, αλλά και από τις συνθήκες αντίδρασης. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν σύμφωνα με τους εξής μηχανισμούς: μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer – HAT) , μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer – SET) και χηλικοποίηση μεταβατικών μετάλλων. Με την δέσμευση των ελεύθερων ριζών αποφεύγεται η εκκίνηση της αλυσιδωτής αντίδρασης μέσω της εξουδετέρωσής τους ή της παροχής σε αυτές ηλεκτρονίων. Με αυτόν τον τρόπο οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ωστόσο είναι περισσότερο σταθερές και λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες και εξουδετερώνονται εύκολα από άλλα αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, η δράση τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με δευτερεύοντες μηχανισμούς όπως η απενεργοποίηση μετάλλων, η αναστολή του σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων μέσω της διακοπής της παραγωγής ανεπιθύμητων πτητικών ουσιών και η εξάλειψη του μονήρους οξυγόνου.

2.3.3 Συσχετισμός *in vivo* και *in vitro* Αντιοξειδωτικής Δράσης

Η δυνατότητα αναγωγής *in vitro* των ελεύθερων ριζών από μία ένωση δεν συσχετίζεται απαραίτητα με την αντιοξειδωτική της δράση *in vivo*. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ταχεία διασπορά των ελεύθερων ριζών, οι οποίες έχουν διάρκεια ζωής σε επίπεδο νανοδευτερολέπτων, με αποτέλεσμα να είναι αρκετά δύσκολο για την αντιοξειδωτική ουσία να βρίσκεται στο ίδιο περιβάλλον την ίδια χρονική στιγμή όπου πραγματοποιείται η οξειδωτική βλάβη (Santos-Sánchez et al., 2019). Επίσης, η ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να καθυστερεί την οξείδωση ενός οξειδωτικού συστατικού σε ένα τρόφιμο μπορεί να διαφέρει από την ικανότητά του να προστατεύει βιομεμβράνες από την οξειδωτική βλάβη *in vivo*. Σχετικά με το οξειδωτικό stress στον άνθρωπο, η ιδανική μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης βασίζεται στην επίδραση του αντιοξειδωτικού που παραλαμβάνεται από εξωτερική πηγή, στην υπεροξείδωση των PUFA (polyunsaturated fatty acids) είτε σε απλό μοντέλο μεμβράνης, είτε σε δείγματα ορού ή LDL (low density lipoprotein). Επομένως, δημιουργείται η ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων που στοχεύουν στην εκτίμηση της βιολογικής σημασίας των αντιοξειδωτικών, καθώς αυτές οι μέθοδοι απαιτούν συνθήκες που αντιστοιχούν σε διεπιφάνειες νερού/ελαίου όπως λιποπρωτεΐνες και μεμβράνες, ενώ οι μέθοδοι που

χρησιμοποιούνται συνήθως πραγματοποιούνται σε περιβάλλον διαλυμάτων με οξειδωτικό υπόστρωμα υδατοδιαλυτές ενώσεις (Pinchuk et al., 2012). Ωστόσο, οι μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, οι οποίες μελετώνται στο επόμενο κεφάλαιο, είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς ουσίες με χαμηλή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* πιθανότατα παρουσιάζουν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση *in vivo* (Nunes et al., 2012).

3. Μέθοδοι *in vitro* Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής και Αντιριζικής Δράσης

Σε αυτό το κεφάλαιο ταξινομούνται και καταγράφονται οι μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, ενώ ταυτόχρονα γίνεται μία πρώτη σύγκριση μεταξύ τους και δημιουργείται το υπόβαθρο για την διεξοδική συγκριτική μελέτη αυτών. Επιπλέον, αναγράφονται οι αρχές λειτουργίας που διέπουν τις μεθόδους, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται και οι συνθήκες που επικρατούν, οι κατηγορίες των ενώσεων για τις οποίες εφορμίζεται η κάθε μέθοδος, ενώ ταυτόχρονα καταγράφονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων. Στο τέλος του κεφαλαίου παρουσιάζεται ο **Πίνακας 3.6**, στον οποίο συνοψίζονται τα στοιχεία που προκύπτουν από τις μεθόδους που μελετώνται, με σκοπό να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση και ταξινόμηση των μεθόδων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν, στη συνέχεια, να διερευνηθούν τυχόν ελλείψεις και περιορισμοί των μεθόδων και να γίνουν προτάσεις για βελτίωση ή και για νέες τεχνολογίες.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης μιας ουσίας αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία καθώς εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων όπως οι ελεύθερες ρίζες και οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται, το είδος του υποστρώματος που οξειδώνεται, η παρουσία μεταβατικών μετάλλων, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επιταχύνεται η οξείδωση. Ως εκ τούτου έχουν αναπτυχθεί πάνω από είκοσι χημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικά κριτήρια. Η κατάλληλη επιλογή της μεθόδου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί εξαρτάται, επίσης, από τον σκοπό της μελέτης της αντιοξειδωτικής ουσίας. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που ο σκοπός είναι η αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών προτείνονται διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, σε σχέση με τη περίπτωση

που η μελέτη βασίζεται στην ανάγκη για εύρεση αντιοξειδωτικού το οποίο έχει τη δυνατότητα να μεγιστοποιήσει το shelf-life ορισμένου τροφίμου ή και φαρμάκου (Balogh et al., 2010; Pinchuk et al., 2012).

Οι περισσότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε μία συγκεκριμένη αντίδραση σχηματισμού ελεύθερης ρίζας, η οποία αναστέλλεται από την προσθήκη πιθανής αντιοξειδωτικής ένωσης. Ωστόσο, η χημική αντίδραση που πραγματοποιείται *in vitro* είναι αρκετά διαφορετική από τις αντιδράσεις σχηματισμού ελεύθερων ριζών που πραγματοποιούνται στα βιολογικά συστήματα, ενώ ταυτόχρονα οι στόχοι των ελεύθερων ριζών είναι διαφορετικοί σε σχέση με αυτούς που είναι σημαντικοί *in vivo*. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ότι η μέτρηση της «συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας» καθαρών ενώσεων αντιπροσωπεύεται καλύτερα από την «συνολική αντιριζική ικανότητα», η οποία αντικατοπτρίζει την ικανότητα της ένωσης να συμμετέχει σε μία αντίδραση σχηματισμού ελεύθερης ρίζας. Ο όρος «αντιριζική ικανότητα» μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραμέτρους που προσδιορίζονται με «χημικές» *in vitro* μεθόδους και η ικανότητα αυτή μπορεί να γίνει κατανοητή ως «πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητα» (Oliveira et al., 2014).

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πιο συνήθεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης παρουσιάζουν τρία κοινά προβλήματα. Το πρώτο σχετίζεται με το γεγονός ότι συνήθως εκτιμούν την επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ωστόσο αποτελούν μόνο ένα μέρος του αντιοξειδωτικού κλάσματος ενός οργανισμού, ενώ τα ένζυμα κατέχουν τον σημαντικότερο ρόλο. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί, η αντιοξειδωτική ικανότητα και η αντιοξειδωτική δράση των ουσιών που αξιολογούνται από πληθώρα μεθόδων, δεν συσχετίζονται απαραίτητα μεταξύ τους. Παράλληλα, οι περισσότερες εκτιμήσεις βασίζονται σε μεθόδους που πραγματοποιούνται σε περιβάλλον διαλύματος και επομένως δεν αντιστοιχούν απαραίτητα σε διαδικασίες που πραγματοποιούνται σε διεπιφάνειες ελαίου-νερού, οι οποίες συναντώνται σε μεμβράνες και μικρογαλακτώματα, όπως λιποπρωτεΐνες (Pinchuk et al., 2012). Επομένως, η επιλογή της κατάλληλης, σε κάθε περίπτωση, μεθόδου προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης καθίσταται σημαντική, καθώς πρέπει να ληφθούν υπόψη οι διαφορετικοί παράγοντες και ο σκοπός που χρειάζεται να επιτευχθεί στην εκάστοτε μελέτη.

3.1 Καταγραφή και Ταξινόμηση Μεθόδων *in vitro*

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται κατανοητό το γεγονός ότι δεν υπάρχει μία διεθνής μέθοδος που να χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων και των αντιοξειδωτικών ενώσεων, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνητικών ομάδων. Ως εκ τούτου, απαιτείται η συγκριτική μελέτη αρκετών μεθόδων *in vitro*, με σκοπό να αναπτυχθεί μία πρότυπη μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ευρέως από ερευνητές και από την βιομηχανία (Ndhlala et al., 2010). Σύμφωνα με τον Huang et al. (2005), ένα γενικό πρωτόκολλο που προτείνεται ως προς την καταλληλότητα μίας μεθόδου περιλαμβάνει την επιλογή σχετικού βιολογικά υποστρώματος, την εξέταση σε διάφορες οξειδωτικές συνθήκες, την μέτρηση τόσο των αρχικών όσο και των δευτερευόντων οξειδωτικών προϊόντων, την σύγκριση των αντιοξειδωτικών σε ίδιες μοριακές συγκεντρώσεις των ενεργών συστατικών, ενώ παράλληλα η ποσοτικοποίηση να πραγματοποιείται σε βάση επαγωγικής περιόδου, ποσοστιαίας αναστολής, σε βαθμούς σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων, ή σε τιμές IC₅₀, που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για επίτευξη 50% αναστολής του οξειδωτικού.

Η κύρια ταξινόμηση των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης σχετίζεται με τον μηχανισμό αντίδρασης στον οποίο βασίζονται οι μέθοδοι. Συγκεκριμένα, η πρώτη κατηγορία μεθόδων βασίζεται στην μεταφορά ενός ηλεκτρονίου ή single electron transfer (SET), η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου ή hydrogen atom transfer (HAT) και η τρίτη κατηγορία αποτελείται από μεθόδους που στηρίζονται τόσο σε SET όσο και σε HAT μηχανισμούς αντίδρασης. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε HAT μηχανισμούς μετρούν την ανταγωνιστική κινητική, η οποία αποτελείται από συνθετικό εκκινητή που προκαλεί την παραγωγή ελεύθερης ρίζας, οξειδωτικό μοριακό ανιχνευτή και από μία αντιοξειδωτική ένωση. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι συσχετίζουν την αντιοξειδωτική δράση των ουσιών με την ικανότητά τους να αναστέλλουν την αλυσιδωτή αντίδραση από την οποία παράγονται οι ελεύθερες ρίζες, εφόσον η μεταφορά ατόμου υδρογόνου αποτελεί βασικό στάδιο στην αλυσιδωτή αντίδραση. Σε αντίθεση, οι μέθοδοι που στηρίζονται σε SET μηχανισμούς περιλαμβάνουν μία αντίδραση οξειδοαναγωγής στην οποία το οξειδωτικό είναι, επίσης, ο ανιχνευτής που

ελέγχει την αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση και αποτελείται από το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό (ανιχνευτής):

Ανιχνευτής (οξειδωτικό) + e^- (από αντιοξειδωτικό) \rightarrow ανηγμένος ανιχνευτής + οξειδωμένο αντιοξειδωτικό

Όταν το οξειδωτικό (ανιχνευτής) απομακρύνει ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό παρουσιάζεται αλλαγή χρώματος στον ανιχνευτή, ο βαθμός της οποίας είναι ανάλογος με την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που εμπεριέχονται στο δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο, στις μεθόδους αυτές προσδιορίζεται η ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει ένα οξειδωτικό, το οποίο όταν ανάγεται αλλάζει χρώμα. Η μεταβολή στην απορρόφηση σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού και η κλίση της ευθείας αντικατοπτρίζει την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού, η οποία εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox (TE – Trolox Equivalent) ή ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE – Gallic Acid Equivalent). Το τέλος της αντίδρασης σηματοδοτείται από την σταθεροποίηση της αλλαγής του χρώματος (Ndhlala et al., 2010; Huang et al., 2005). Επιπλέον, για την σύγκριση της αντιριζικής ικανότητας σε καθαρές ενώσεις έχει εισαχθεί η παράμετρος n , η οποία αντικατοπτρίζει τον αριθμό των ελεύθερων ριζών που μπορούν να δεσμευθούν από ένα μόριο αντιριζικής ένωσης, ενώ παράλληλα με την παράμετρο n γίνεται δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων για ίδιες ενώσεις, αλλά με διαφορετική μέθοδο. Ως εκ τούτου, προκύπτει ότι για χρωματομετρικές μεθόδους οι τιμές n για ίδιες ενώσεις είναι παραπλήσιες, ενώ για ενώσεις των οποίων η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται με την μέθοδο χημειοφωταύγειας με λουμινόλη, οι τιμές n είναι σημαντικά χαμηλότερες (Oliveira et al., 2014).

Οι πιο συνήθεις μέθοδοι που ανήκουν στην κατηγορία του SET μηχανισμού αντίδρασης περιλαμβάνουν τις: FRAP (ferric reducing ability of plasma), Folin-C (Folin-Ciocalteu), TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) και DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging), ενώ ορισμένες από τις μεθόδους που βασίζονται σε HAT μηχανισμό αντίδρασης είναι οι: ORAC (oxygen radical absorbance capacity), μέθοδοι φωτο-χημειοφωταύγειας (photo-chemiluminescence), μέθοδος αποχρωματισμού β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος και αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Οι μέθοδοι DPPH, TEAC και Folin-C ανήκουν, επίσης, στην τρίτη κατηγορία καθώς χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς αντίδρασης

HAT και SET. Ωστόσο, ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο λειτουργούν σε μεγαλύτερο βαθμό είναι ο μηχανισμός μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, δηλαδή SET (Balogh et al., 2010; Ndhlala et al., 2010). Γενικά, ο προσδιορισμός ολικών φαινολικών από την μέθοδο Folin-C χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού να ανάγει ένα οξειδωτικό, ενώ η μέθοδος ORAC προσδιορίζει ποσοτικά την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας υπεροξειδίου (ROO·) (Huang et al., 2005). Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται αναφορικά οι μέθοδοι *in vitro* και οι κατηγορίες στις οποίες ανήκουν.

I Single electron transfer methods (SET)

- 1 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) decolourization
- 2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)
- 3 DPPH free radical scavenging assay
- 4 Copper (II) reduction capacity
- 5 Total phenols by Folin-Ciocalteu
- 6 N,N-dimethyl-p-Phenylenediamine (DMPD) assay

II Hydrogen atom transfer methods (HAT)

- 1 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method
- 2 Lipid peroxidation inhibition capacity (LPIC) assay
- 3 Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)
- 4 Inhibited oxygen uptake (IOC)
- 5 Crocin bleaching Nitric oxide radical inhibition activity
- 6 Hydroxyl radical scavenging activity by p-NDA
- 7 Scavenging of H₂O₂ radical
- 8 ABTS radical scavenging method
- 9 Scavenging of super oxide radical formation by alkaline SASA

III Other assays

- 1 Total oxidant scavenging capacity (TOSC)
 - 2 Inhibition of Briggs – Rauscher oscillation reaction
 - 3 Chemiluminescence
 - 4 Electrochemiluminescence
 - 5 Fluorometric Analysis
 - 6 Enhanced chemiluminescence (ECL)
 - 7 TLC bioautography
 - 8 Cellular antioxidant activity (CAA) assay
 - 9 Dye-substrate oxidation method
-

Πίνακας 3: Μέθοδοι *in vitro* προσδιορισμού αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης (Προσαρμόστηκε από Shalaby & Shanab, 2013).

3.2 Μέθοδοι SET – Single Electron Transfer

3.2.1 FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

Η μέθοδος FRAP προσδιορίζει την ικανότητα αναγωγής του σιδήρου από αντιοξειδωτικές ενώσεις σε εκχυλίσματα (Nyau et al., 2015). Σε συνθήκες χαμηλού pH, η αναγωγή του συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη) από δείγμα αντιοξειδωτικού στην σιδηρούχο του μορφή, δηλαδή στο αντίστοιχο δισθενές ιόν σιδήρου Fe^{2+} , συνεπάγεται με αλλαγή του χρώματος σε έντονο μπλε και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 593nm (Benzie & Strain, 1996). Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του άλατος Fe^{3+} είναι +0,70 V και το pH στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση βρίσκεται στο 3,6.

Αρχικά, τα δείγματα και τα πρότυπα αντιοξειδωτικά, όπως ασκορβικό οξύ, διαλυτοποιούνται σε 50% υδατικό διάλυμα μεθανόλης (Ndhlala et al., 2010). Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το αντιδραστήριο FRAP αναμειγνύοντας 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού ιόντος (300 mM και pH 3,6) με 2,5 mL διάλυμα τρισθενούς χλωριούχου σιδήρου και 2,5 mL διάλυμα TPTZ, ενώ το μείγμα αφήνεται σε υδατόλουτρο για 10 min στους 37°C. Έπειτα, 1 mL νερού και 80 μL δείγματος μεταφέρονται με πιπέτα σε κυψελίδα και 600 μL από το αντιδραστήριο FRAP προστίθενται στην κυψελίδα και αναμειγνύονται. Για τον λευκό προσδιορισμό η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με την διαφορά ότι τα 80 μL δείγματος αντικαθίστανται από 80 μL νερού. Η διαφορά στην απορρόφηση παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά μετά από 4 min. Η ποσότητα του δισθενή σιδήρου Fe^{2+} που παράγεται από την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου Fe^{3+} από το αντιοξειδωτικό, υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη διαλύματος δισθενούς θειικού σιδήρου, και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\text{mg Fe}^{2+} / 100 \text{ g}$ ξηρού δείγματος (Nyau et al., 2015).

Η μέθοδος FRAP είναι απλή, γρήγορη και έγκυρη για τον ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων που εμπεριέχουν τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Ταυτόχρονα, βασίζεται στο γεγονός ότι οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ολοκληρώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα, εντός 4 min, ωστόσο δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις καθώς ορισμένες φαινολικές ενώσεις καθυστερούν να αντιδράσουν και απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης. Ορισμένοι περιορισμοί

της μεθόδου FRAP περιλαμβάνουν το γεγονός ότι ενώσεις με χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό από +0,70 V μπορούν να ανάγουν τον σίδηρο, χωρίς να δρουν ως αντιοξειδωτικά *in vivo*, ενώ παράλληλα σημαντικά αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη, που ανήκει στις θειόλες, και η αλβουμίνη δεν δύναται να αξιολογηθούν με την μέθοδο FRAP. Επιπλέον, η μέθοδος πραγματοποιείται σε μη φυσιολογικές συνθήκες pH, και το ιόν σιδήρου που σχηματίζεται δεν είναι βιολογικά σχετικό (Ndhkala et al., 2010; Pinchuk et al., 2012). Η μέθοδος FRAP εκτιμά την ικανότητα μιας ένωσης να ανάγει, καθώς αυτή η δυνατότητα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για να χαρακτηριστεί ένα αντιοξειδωτικό ως ισχυρό. Παράλληλα, η αντιοξειδωτική δράση ενός αντιοξειδωτικού σχετίζεται με την αναγωγική ικανότητα που παρουσιάζει, επομένως με την μέθοδο FRAP παρέχεται αξιόπιστη μελέτη για την αντιοξειδωτική δράση πολλών ενώσεων (Raudonis et al., 2012).

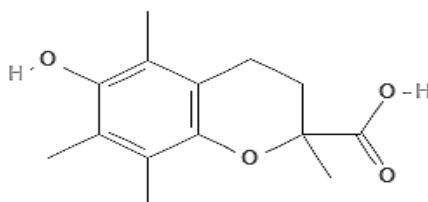
3.2.2 TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

Η μέθοδος TEAC χρησιμοποιείται ευρέως και εφαρμόζεται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού, δηλαδή την ποσότητα των ελεύθερων ριζών που είναι ικανό να δεσμεύσει. Τα αντιοξειδωτικά που μελετώνται προστίθενται σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει την ρίζα του μορίου ABTS (2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Μετά την πάροδο ορισμένου χρόνου, η εναπομείνουσα ρίζα ABTS· προσδιορίζεται ποσοτικά με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Η μείωση στην συγκέντρωση της ρίζας ABTS· που προκαλείται από συγκεκριμένη ποσότητα αντιοξειδωτικής ουσίας σχετίζεται με την μείωση που προκαλεί το αντιοξειδωτικό Trolox και με αυτόν τον τρόπο ορίζεται η τιμή TEAC του εκτιμώμενου αντιοξειδωτικού.

Συγκεκριμένα για τον σχηματισμό της ρίζας ABTS·, σε διάλυμα 7 mM ABTS, που έχει διαλυθεί σε νερό, προστίθεται υπερθειικό κάλιο με συγκέντρωση 2,45 mM και επωάζει για 12 – 16 h σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σκουρόχρωμο μπλε διάλυμα. Έπειτα, το διάλυμα αραιώνεται σε αιθανόλη ή ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,4), έως ότου επιτευχθεί απορρόφηση 0,7 στα 734 nm. Τα διαλύματα που περιέχουν τα αντιοξειδωτικά προετοιμάζονται σε διάλυμα αιθανόλης και σε σκοτεινό χώρο. Για δεδομένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού η ρίζα ABTS· προστίθεται σε μεταβλητές συγκεντρώσεις μέχρι 45 μM και για διάφορες επωάσεις.

Στους 37°C μετά από 6 min προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 734 nm. Η μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας ABTS[•] ως προς την αρχική της συγκέντρωση παριστάνεται με την μορφή καμπύλης σύμφωνα με την εκθετική συνάρτηση $y = C(1 - e^{-b \cdot x})$, όπου y = μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας ABTS[•], x = η αρχική συγκέντρωση της ρίζας ABTS[•] και C = η μέγιστη ποσότητα της ρίζας ABTS[•] που μπορεί να δεσμευθεί από το αντιοξειδωτικό στη δεδομένη του συγκέντρωση. Για έγκυρα αποτελέσματα η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 25 μM. Η τιμή TEAC προκύπτει από την διαίρεση του C για το κάθε αντιοξειδωτικό προς την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού προς 1,9, που αντιπροσωπεύει τον αριθμό των μορίων που δεσμεύονται από ένα μόριο Trolox. Γίνεται κατανοητό ότι η τιμή TEAC μιας ένωσης είναι αδιάστατο μέγεθος (Arts et al., 2004; Huang et al., 2005).

Το Trolox (**Σχήμα 3.1**) αποτελεί υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα των θηλαστικών τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, καθώς δρα ως αναστολέας της οξειδωτικής βλάβης των κυτταρικών μεμβρανών (Forrest et al., 1994).



Σχήμα 3.1: Χημική δομή του Trolox
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>).

Η μέθοδος TEAC είναι απλή, γρήγορη και τα αποτελέσματα της εκτίμησης των αντιοξειδωτικών ουσιών συσχετίζονται με την βιολογική τους δράση. Το δυνατό σημείο αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε υδατοδιαλυτά όσο και σε λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, υπό τις συνθήκες που πραγματοποιείται η μέθοδος, η αντίδραση μεταξύ των περισσότερων αντιοξειδωτικών και της ρίζας ABTS[•] δεν ολοκληρώνεται εντός του χρονικού διαστήματος που εφαρμόζεται, με

αποτέλεσμα να υποεκτιμάται η τιμή TEAC αυτών των αντιοξειδωτικών. Επιπλέον, ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την μέθοδο TEAC είναι οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα της ίδιας διεργασίας για την ίδια αντιοξειδωτική ένωση. Παραδειγματικά, η τιμή TEAC για την κουερσετίνη κυμαίνεται από 3,1 μέχρι 6,4, ενώ έχει βρεθεί ότι για συγκεντρώσεις κουερσετίνης 1,5 ή 1,0 μM οι τιμές TEAC βρίσκονται αντίστοιχα 5,6 ή 6,4 (Arts et al., 2004; Pinchuk et al., 2012). Γίνεται, λοιπόν, κατανοητή η εξάρτηση της τιμής TEAC από την συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της δεδομένη ουσίας. Ταυτόχρονα, οι τιμές TEAC για καθαρές αντιοξειδωτικές ενώσεις δεν σχετίζονται με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που οι ενώσεις αυτές μπορούν να δώσουν, καθώς οι τιμές TEAC για την κουερσετίνη και την καμπερόλη, που διαθέτουν παρόμοια χημική δομή, είναι αντίστοιχα 3,00 και 1,00 (Huang et al., 2005).

3.2.3 DPPH – Free Radical Scavenging Assay

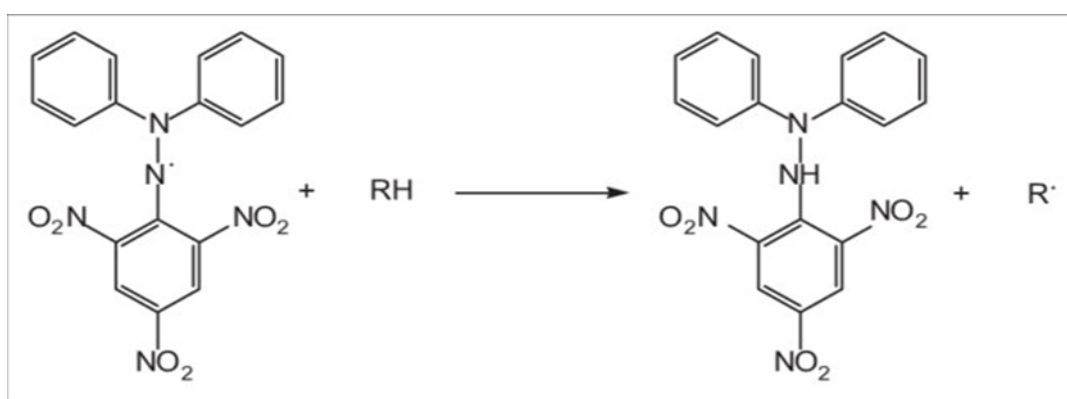
Η μέθοδος DPPH (2,2,-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζυλιο) προσδιορίζει την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH \cdot και θεωρείται από τις πρότυπες και εύκολες χρωματομετρικές μεθόδους που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση των καθαρών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η ρίζα DPPH \cdot , η οποία αποτελεί σταθερή ρίζα και σε διάλυμα μεθανόλης έχει χρώμα μωβ με μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm, δεχόμενη ένα άτομο H από μία αντιοξειδωτική ένωση ανάγεται από DPPH \cdot σε DPPH $_2$, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αλλαγή χρώματος από μωβ σε κίτρινο με αντίστοιχη μείωση της απορρόφησης στα 515 nm, ενώ η αλλαγή αυτή παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά (**Σχήμα 3.2**). Η μέθοδος αυτή ολοκληρώνεται σε καθορισμένο χρόνο αντίδρασης, συνήθως στα 20-30 min, χωρίς να ολοκληρώνεται η αντίδραση οξειδοαναγωγής.

Ειδικότερα για την παρασκευή των διαλυμάτων που περιέχουν τα αντιοξειδωτικά, τα συγκεκριμένα διαλύονται αντίστοιχα σε μεθανόλη με τελική συγκέντρωση 10 mM. Στη συνέχεια, 1,5 mL του κάθε διαλύματος αντιοξειδωτικού προετοιμάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου/δισόξινου φωσφορικού καλίου (pH

7,5) και αναμειγνύεται με 1,5 mL μεθανολικό διάλυμα DPPH· 100 μM. Τέλος, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και η μείωση της απορρόφησης παρακολουθείται στα 515 nm (Mishra et al., 2012). Τα αντιοξειδωτικά BHA, BHT και Trolox μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις (Nunes et al., 2012). Η αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο DPPH συχνά αναφέρεται ως EC₅₀, που εκφράζει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση της DPPH· κατά 50%. Παράλληλα, το T_{EC50} αντιπροσωπεύει τον χρόνο για την επίτευξη σταθερής κατάστασης με συγκέντρωση αντιοξειδωτικού EC₅₀. Οι δύο αυτοί παράγοντες συνδυάζονται σύμφωνα με την σχέση:

$$AE = (1/EC_{50}) T_{EC50}$$

όπου το AE – Antiradical Efficiency ορίζεται ως η αντιριζική ικανότητα του αντιοξειδωτικού (Shahidi & Zhong, 2015).



Σχήμα 3.2: Η αναγωγή της ρίζας DPPH· χρώματος μωβ (αριστερά) από ένα αντιοξειδωτικό, το οποίο παρέχει το υδρογόνο, με την δέσμευση του υδρογόνου από το ελεύθερο ηλεκτρόνιο της ρίζας και τον σχηματισμό του DPPH2 χρώματος κίτρινου (δεξιά) (Dureja & Dhiman, 2012).

Η ρίζα DPPH· παρουσιάζει ελάχιστες ομοιότητες με τις ρίζες υπεροξειδίου (ROO·), ωστόσο με την μέθοδο αυτή μπορεί να μετρηθεί το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του σιταριού, πίτουρου, των λαχανικών, βοτάνων, βρώσιμων σπορέλαιων, αλεύρων και του συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (CLA), σε διαφορετικά συστήματα διαλυτών όπως αιθανόλη, βενζόλιο, υδατική ακετόνη και αλκοόλη και μεθανόλη. Ως επί το πλείστον θεωρείται απλή μέθοδος, ωστόσο λόγω του γεγονότος ότι η ρίζα DPPH· αποτελεί σταθερή αζωτούχο ρίζα, πολλά αντιοξειδωτικά αντιδρούν με διαφορετική

κινητική ή μπορεί και να μην αντιδρούν. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αντιστρεψιμότητα της αντίδρασης και συγκεκριμένα μεταξύ της ρίζας DPPH· και της ανηγμένης της μορφής DPPH₂, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πρόβλημα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων για φαινολικές ενώσεις με παρόμοια μοριακή δομή με την ευγενόλη, καθώς παρουσιάζονται χαμηλότερες τιμές από τις πραγματικές (Mishra et al., 2012; Huang et al., 2005). Λόγω της έλλειψης ρίζας οξυγόνου στην μέθοδο, η δέσμευση της ρίζας DPPH· δεν αντικατοπτρίζει με ακρίβεια τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται η αντιριζική δράση των αντιοξειδωτικών σε περιβάλλον τροφίμου και στα βιολογικά συστήματα. Ως εκ τούτου, η μέθοδος βασίζεται στην υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται με την ικανότητα παροχής ηλεκτρονίων ή αλλιώς με την αναγωγική δύναμη της αντιοξειδωτικής ουσίας (Shahidi & Zhong, 2015). Επιπλέον, η μέθοδος DPPH μπορεί να εμφανίσει ψευδή αποτελέσματα σε ενώσεις που απορροφούν σε μήκος κύματος 515 nm, όπως τα καροτενοειδή (Balogh et al., 2010).

3.2.4 Folin-C – Total Phenolic Content by Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-C χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών που βρίσκονται σε τρόφιμα όπως λαχανικά, φρούτα, δημητριακά, καθώς και σε συμπληρώματα διατροφής. Αρχικά οι φαινόλες εξάγονται και διαλύονται στο νερό, έπειτα οξειδώνονται σε αλκαλικό διάλυμα με την προσθήκη του αντιδραστήριου Folin-C, το οποίο αποτελείται από φωσφοβολφραμικά και φωσφομολυβδενικά ετεροπολυμερή οξέα, υπό την παρουσία ανθρακικού νατρίου σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο χρώματος μπλε (Kurina et al., 2018; Luis et al., 2009). Τα μπλε χρωμοφόρα που σχηματίζονται, παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση εξαρτώμενη από την ποιοτική και την ποσοτική σύσταση των φαινολικών μειγμάτων, καθώς και από το pH των διαλυμάτων το οποίο ρυθμίζεται με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου (Luis et al., 2009). Με αυτόν τον τρόπο, το pH βρίσκεται περίπου στο 10 και υπό αυτές τις βασικές συνθήκες πραγματοποιείται αποσύνδεση του φαινολικού υδρογόνου με αποτέλεσμα να σχηματίζεται φαινολικό ιόν, το οποίο ανάγει το αντιδραστήριο Folin-C (Sánchez-Rangel et al., 2013). Ωστόσο, η ένταση

του χρώματος είναι ανάλογη με την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα και προσδιορίζεται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η βαθμονόμηση με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ σε γνωστές συγκεντρώσεις (Kurina et al., 2018).

Ειδικότερα, η τυπική διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την αραιώση σε νερό (450 μ L) μεθανολικού διαλύματος του εκχυλίσματος με το αντιοξειδωτικό (50 μ L), προσθήκη 2,50 mL 0,2 N αντιδραστηρίου Folin-C και ακολουθεί ανάδευση για 5 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL ανθρακικού νατρίου (7,5 g/L) και αναδεύονται για 5 min, καθώς μετά το πέρας 1,5 h στους 30°C μετράται η απορρόφηση στα 765 nm στους 25°C. Το φαιολικό περιεχόμενο υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg ισοδύναμα του γαλλικού οξέος προς 1 g ξηρής ύλης (Faustino et al., 2010).

Κατά τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-C παρουσιάζεται ένα βασικό πρόβλημα. Λόγω της ύπαρξης σε αφθονία άλλων ενώσεων που έχουν την δυνατότητα να ανάγουν το αντιδραστήριο Folin-C, όπως ανάγοντα σάκχαρα, αμινοξέα και ασκορβικό οξύ, τα αποτελέσματα διαστρεβλώνονται εμφανίζοντας θετικό σφάλμα. Ωστόσο, έχουν προταθεί ορισμένες διαφορετικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις όπως μερική κάθαρση των φαινολικών εκχυλισμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσης στήλης πριν την μέθοδο Folin-C, υπολογισμός διορθωμένης τιμής μέσω του υπολογισμού και της αφαίρεσης της αναγωγικής δράσης των παρεμβολέων, όπως τα αμινοξέα, από την τιμή της μεθόδου και η προσθήκη οξειδωτικών παραγόντων πριν την μέθοδο Folin-C με σκοπό την οξείδωση των ενώσεων που προκαλούν την αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος Folin-C μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση υδρόφιλων αλλά και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών (Sánchez-Rangel et al., 2013).

3.2.5 DMPD – Radical Cation Decolorization Assay

Η μέθοδος αποχρωματισμού DMPD (διμεθυλο-4-φαινυλενοδιαμίνη) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων τροφίμων και βασίζεται στην παραγωγή του κατιόντος της ρίζας $DMPD^{\cdot+}$, μέσω της αντίδρασης μεταξύ

DMPD και υπερθειικού καλίου. Μετά τον σχηματισμό της, η ρίζα ανάγεται από τα αντιοξειδωτικά, τα οποία παρέχουν το υδρογόνο και παρουσιάζεται μέγιστη απορρόφηση μεταξύ 517,4 και 552 nm. Η μείωση της συγκέντρωσης του κατιόντος της ρίζας $\text{DMPD}^{\cdot+}$ μετά την προσθήκη των αντιοξειδωτικών εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, την αντιοξειδωτική τους δράση και την χρονική διάρκεια της αντίδρασης.

Συγκεκριμένα, για την παραγωγή του κατιόντος ρίζας $\text{DMPD}^{\cdot+}$ παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα DMPD 100 mM και από αυτό το διάλυμα αντιδρούν 100 μL με 50 μL διαλύματος υπερθειικού καλίου 0,4 mM, φτάνοντας σε τελικό όγκο 10 mL με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος οξικού ιόντος pH 5,6. Το διάλυμα επωάζει σε σκοτεινό χώρο στους 25°C για 3-4 h πριν χρησιμοποιηθεί και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C. Στη συνέχεια, 3,49 mL του διαλύματος της ρίζας $\text{DMPD}^{\cdot+}$ προστίθενται σε 10 μL αραιωμένων δειγμάτων ή πρότυπων διαλυμάτων Trolox και η απορρόφηση μετριέται μετά το πέρας 6 min στους 30°C, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται λευκός προσδιορισμός. Το μέγεθος του αποχρωματισμού που προκαλείται από την προσθήκη πρότυπων διαλυμάτων με γνωστή συγκέντρωση και δειγμάτων εκφράζεται σε ποσοστό αναστολής, που προκύπτει από τη συνάρτηση της συγκέντρωσης ως προς τον χρόνο. Ταυτόχρονα, υπολογίζεται η τιμή TEAC και συγκρίνεται το ποσοστό αναστολής που προκαλείται από το Trolox σε σχέση με το ποσοστό αναστολής που προκαλούν οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που μελετώνται, κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κατιόντος της ρίζας $\text{DMPD}^{\cdot+}$ είναι συμβατό με αυτό των υπεροξειδικών και αλκοξειδικών ριζών, με αποτέλεσμα η μέθοδος DMPD να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης αρκετών βιολογικών συστημάτων. Επιπλέον με αυτήν την μέθοδο, γίνεται δυνατή η φασματοφωτομετρική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ασταθών σουλφιδίων σε πρωτεΐνες, υδατοδιαλυτών συστατικών τομάτας, κόκκινων κρασιών, εκχυλισμάτων πράσινου τσαγιού, καθώς και της οξειδωτικής κατάστασης ανθρώπινου πλάσματος. Η διαδικασία της μεθόδου είναι γρήγορη, έχει χαμηλό κόστος και παρουσιάζει τόσο ευαισθησία όσο και παραγωγικότητα για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης υδρόφιλων και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών ενώσεων (Asghar et al., 2007). Η μέθοδος DMPD δεν είναι εξειδικευμένη και ενώσεις οι οποίες απορροφούν σε μήκος κύματος 505 nm μπορούν να παρουσιάσουν θετικό σφάλμα στα αποτελέσματα. Επιπλέον, η

προσθήκη των αντιοξειδωτικών ενώσεων στο ανθρώπινο πλάσμα πριν την μετρηση, για την παρακολούθηση της συμβολής των αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στο πλάσμα, υποδεικνύει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος και η μείωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης κατά πέντε φορές του φυσιολογικού επιπέδου τους, δεν επηρεάζει την μέτρηση της οξειδωτικής κατάστασης του πλάσματος (Verde et al., 2002).

3.3 Μέθοδοι HAT – Hydrogen Atom Transfer

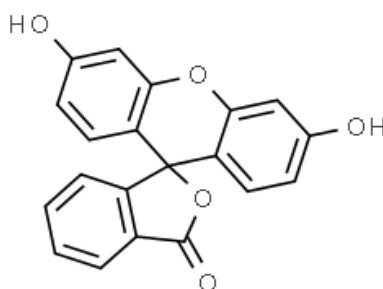
3.3.1 ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

Η ικανότητα μιας ένωσης να δεσμεύει τις υπεροξειδικές ρίζες, οι οποίες παράγονται από την αποσύνθεση του μορίου AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), εκφράζεται σε ισοδύναμα πρότυπων ουσιών και πραγματοποιείται με την μέθοδο ORAC (Kaushik et al., 2015). Η μέθοδος ORAC βασίζεται στην ανίχνευση της χημικής βλάβης που υφίσταται η φλουορεσκεΐνη, με την μείωση της εκπομπής φθορισμού (**Σχήμα 3.3**). Όταν η ένωση αυτή εκτεθεί σε ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται από την θερμική αποσύνθεση του μορίου AAPH, η μείωση του φθορισμού της παρουσιάζει γραμμική σχέση ως προς τον χρόνο. Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης της ένωσης που μελετάται, εκτιμάται με την σύγκριση της περιοχής κάτω από την καμπύλη μείωσης του φθορισμού (AUC – Area Under the Curve) του δείγματος σε σχέση με αυτήν του λευκού προσδιορισμού στον οποίο δεν περιέχεται το αντιοξειδωτικό (Dávalos et al., 2004).

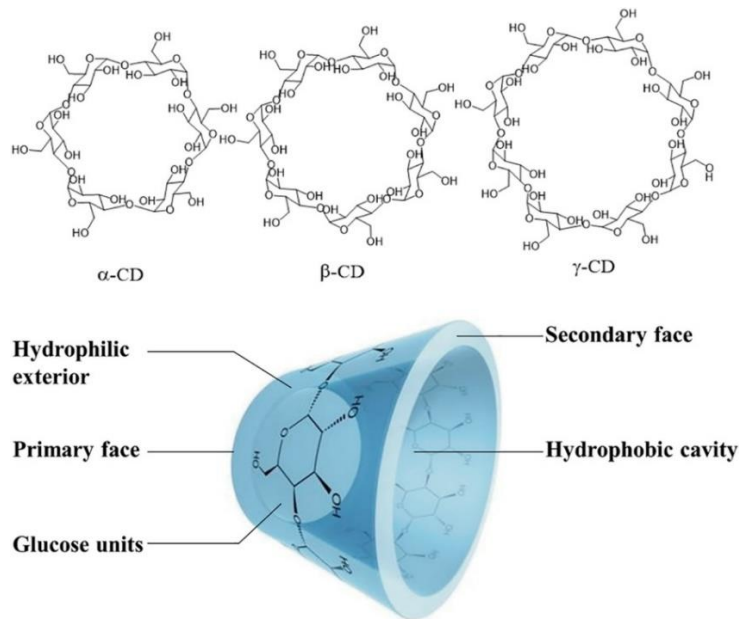
Ειδικότερα, 0,5 mL των δειγμάτων, αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος 75 mM και pH 7,2 με αναλογία 1:25-100 v/v, αναμειγνύονται με 3,0 mL διάλυμα φλουορεσκεΐνης και επωάζουν για 10 min στους 37°C. Έπειτα, προστίθενται 0,5 mL διαλύματος AAPH και παρατηρείται άμεση μείωση του φθορισμού, η οποία παρακολουθείται κάθε 1 min για χρονικό διάστημα 35 min. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται η αντίδραση στους 37°C για πρότυπο διάλυμα Trolox (1 μM) και τα

αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol ισοδύναμα Trolox ανά g ($\mu\text{mol TE/g}$) (Kaushik et al., 2015; Scalzo et al., 2012).

Στο παρελθόν, η μέθοδος ORAC είχε εφαρμογή σε υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ωστόσο ο περιορισμός αυτός ξεπεράστηκε με την εισαγωγή της μεθυλιωμένης- β -κυκλοδεξτρίνης που δρα ως ενισχυτής της διαλυτότητας των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών σε υδατικό διάλυμα. Οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες, με γλυκοζιτικό δεσμό α -1,4, της α -D-γλυκοπυρανόζης και περιέχουν ένα υδρόφοβο κέντρο και μία υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια (**Σχήμα 3.4**) (Huang et al., 2002). Πλέον, η μέθοδος ORAC χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της αντιριζικής ικανότητας και μπορεί να εφαρμοστεί σε ανθρώπινο πλάσμα, πρωτεΐνες, DNA, καθαρές αντιοξειδωτικές ενώσεις και σε αντιοξειδωτικά τρόφιμα. Η φλουορεσκεΐνη σε αντίθεση με την φυκοερυθρίνη, η οποία κατείχε τον ρόλο της φλουορεσκεΐνης στο αρχικό πρωτόκολλο της μεθόδου ORAC, παρουσιάζει εξαιρετική φωτοσταθερότητα, δεν αντιδρά με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις και μειώνει σημαντικά το κόστος της διεργασίας (Dávalos et al., 2004). Η μέθοδος ORAC παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς αποτελεί την μόνη μέθοδο κατά την οποία ολοκληρώνεται η αντίδραση σχηματισμού ελεύθερης ρίζας και παράλληλα με τον υπολογισμό του εμβαδού της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση, συνδυάζοντας σε μία ποσότητα το ποσοστό της αναστολής και την χρονική διάρκεια της δράσης (Nunes et al., 2012).



Σχήμα 3.3: Χημική δομή της φλουορεσκεΐνης (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.15968.html>).



Σχήμα 3.4: Οι δομές της α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης (CD- cyclodextrin). Η κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, στην ιατρική και στο περιβάλλον (Tian et al., 2020).

3.3.2 TRAP –Total Peroxyl Radical Trapping Potential

Η μέθοδος TRAP εφαρμόζεται για την εκτίμηση του χρόνου που απαιτείται για την εξ' ολοκλήρου κατανόηση της ποσότητας των αντιριζικών ενώσεων που απαντώνται σε συγκεκριμένο δείγμα, μετρώντας με αυτόν τον τρόπο την αντιριζική ικανότητα σε δείγματα πλάσματος. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε διαρκή ρυθμό από το μόριο AAPH, που λειτουργεί ως εκκινητής, σε ένα σύστημα που πραγματοποιείται υπεροξείδωση των λιπιδίων. Παράλληλα, η μέθοδος TRAP βασίζεται στην οξείδωση της λουμινόλης από το μόριο AAPH, το οποίο παράγει τις ελεύθερες ρίζες. Η οξείδωση της λουμινόλης από το υπεροξείδιο του υδρογόνου υπό την παρουσία μεταβατικού μετάλλου ως καταλύτη σε υδατικό αλκαλικό μέσο, οδηγεί στον σχηματισμό 3-αμινοφθαλικού οξέος και μοριακού αζώτου με παράλληλη εκπομπή φθορισμού στα 420 nm, που προκαλείται από το 3-αμινοφθαλικό οξύ. Ειδικότερα, η αντίδραση μεταξύ μιας αντιριζικής ένωσης και των ελεύθερων ριζών αναστέλλει την εκπομπή χημειοφωταύγειας για ορισμένο χρόνο, που χαρακτηρίζεται ως χρόνος επαγωγής και είναι ανάλογος με την συγκέντρωση και την αντιριζική ικανότητα της ένωσης. Ο χρόνος επαγωγής προσδιορίζεται σε σχέση με αυτόν που προκαλείται από πρότυπο διάλυμα του αντιοξειδωτικού Trolox. Η μέθοδος TRAP

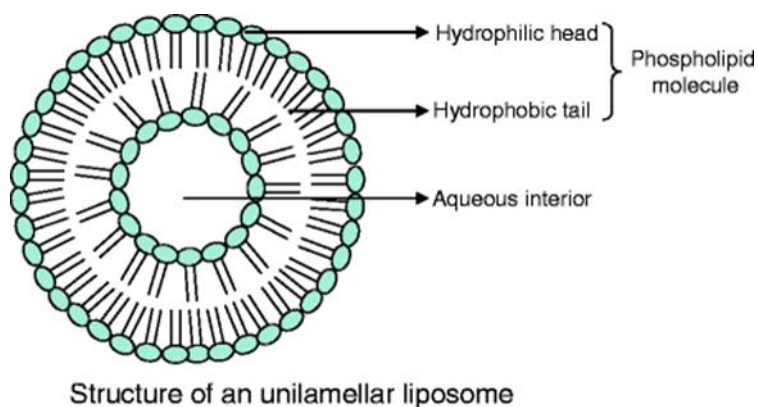
εφαρμόζεται, επίσης, για τον προσδιορισμό της αντιριζικής ικανότητας πολύπλοκων μειγμάτων που περιέχουν αντιοξειδωτικά, ενώ η ικανότητα αυτή μπορεί να εκφραστεί ως mg / L της αντιριζικής ένωσης που αντιστοιχεί στην καταστολή της εκπομπής φωταύγειας που προκαλείται από την προσθήκη 1,0 μM Trolox (Oliveira et al., 2014).

Κατά την διαδικασία της μεθόδου αναμειγνύονται 750 μL λουμινόλης, 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος με pH 7,0 και 50 μL διαλύματος αντιοξειδωτικού σε κυψελίδα και παραμένουν για 10 min στους 37°C. Η οξείδωση ξεκινά με την προσθήκη 26 mM διαλύματος AAPH και η μείωση της φωταύγειας παρακολουθείται κάθε 5 min, μέχρι την απότομη μείωσή της όπου σταματά η μέτρηση (Schlesier et al., 2002). Με την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ενώσεων, οι οποίες δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται, πραγματοποιείται αναγωγή της ποσότητας των ριζών και επομένως αναστολή της εκπομπής χημειοφωταύγειας, που προκύπτει από την οξείδωση της λουμινόλης. Όταν ολόκληρη η ποσότητα των αντιριζικών ενώσεων καταναλωθεί από τις σταθερά σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες, εκπέμπεται φωταύγεια υπό την απουσία, πλέον, του αντιριζικού δείγματος.

Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, ο προσδιορισμός της αντιριζικής ικανότητας βασίζεται στην περιοχή της καταστολής της εκπομπής του φωτός που προκαλείται από το αντιοξειδωτικό, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον ακριβή προσδιορισμό της αντιριζικής ικανότητας σε μείγματα αντιοξειδωτικών με διαφορετικές αντιριζικές δράσεις, αλλά και σε καθарές ενώσεις. Η μέθοδος TRAP εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της αντιριζικής δράσης ενώσεων ή μειγμάτων που εξάγονται από φυτά όπως χαλκόνες και φυσικά λιπίδια που απαντώνται σε φυτικά έλαια. Ταυτόχρονα, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και απλότητα και βασίζεται στην μέτρηση της συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Ο συνεχής σχηματισμός των ριζών οξυγόνου αναστέλλεται από την προσθήκη των αντιριζικών ενώσεων, καθώς σε φυσιολογικές συνθήκες οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μειώνουν με τον ίδιο τρόπο την συγκέντρωση των σταθερά σχηματιζόμενων *in vivo* ριζών οξυγόνου. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται κατανοητός ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την μέθοδο TRAP για τις αντιριζικές ενώσεις, με την *in vivo* αντιριζική και αντιοξειδωτική τους δράση (Oliveira et al., 2014).

3.3.3 LPIC – Lipid Peroxidation Inhibition Capacity

Τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως τα καροτενοειδή και οι τοκοφερόλες, έχουν την δυνατότητα να προστατεύουν τις μεμβράνες από την υπεροξειδωση. Ως εκ τούτου, η μέθοδος LPIC προσδιορίζει την ικανότητα αναστολής της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που παρουσιάζουν τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, καθώς η ικανότητα αυτή σχετίζεται με τη βιολογική σημασία τους *in vivo*. Η μέθοδος LPIC αντικατοπτρίζει την αντίδραση των ελεύθερων ριζών με τις κυτταρικές μεμβράνες και την βλάβη που υφίστανται, ενώ παράλληλα μετριέται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να επεμβαίνουν στην διαδικασία αυτή και να προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, χωρίς την βοήθεια του αίματος ή του ιστού (Zhang et al., 2006). Προκειμένου να υπάρχει συσχετισμός με την *in vivo* δράση των αντιοξειδωτικών που μελετώνται παρασκευάζεται ένα πρότυπο σύστημα μεμβρανών, συγκεκριμένα λιποσώματα ή κυστίδια που αποτελούνται από διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων (Σχήμα 3.5), τα οποία προσομοιώνουν την κυτταρική μεμβράνη των βιολογικών συστημάτων (Zhang et al., 2006; Moscho et al., 1996).



Σχήμα 3.5: Βασική δομή ενός λιποσώματος με μία διπλοστοιβάδα που αποτελείται από φωσφολιπίδιο. Το φωσφολιπίδιο αποτελείται από μία υδρόφιλη κεφαλή και από μία υδρόφοβη ουρά (Swaminathan & Ehrhardt 2011).

Η αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο LPIC μπορεί να προσδιοριστεί είτε με την ανάμειξη των αντιοξειδωτικών ενώσεων με τα προσχηματισμένα λιποσώματα, είτε με την ενσωμάτωσή τους στο λιποσωματικό σύστημα. Για την ενσωμάτωση των

αντιοξειδωτικών σε λιποσωματικό σύστημα, διαλύονται σε χλωροφόρμιο το λιπόσωμα DOPC (διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη) 5,0 mM με τον φθορίζων ανιχνευτή C₁₁-BODIPY, που αποτελεί λιπαρό οξύ και προστίθενται τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά όπως β-καροτένιο, σε φιάλη με στρογγυλό πυθμένα. Το χλωροφόρμιο απομακρύνεται με τη χρήση αζώτου και παραμένει στο τοίχωμα της φιάλης μία λεπτή λιπιδική στρώση, στην οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM, pH 7,4 μέχρι τον αρχικό όγκο, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα προστίθενται τα υδατοδιαλυτά δείγματα, όπως ασκορβικό οξύ. Έπειτα η φιάλη υποβάλλεται σε υπερήχους για 60 sec για να δημιουργηθεί εναιώρημα της λιπιδικής στρώσης. Το τελικό μείγμα (1.840 μL), το οποίο αποτελείται από κυστίδια με διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων όγκου 1.000 μL (2,5 mM DOPC και 2,4 μM C₁₁-BODIPY), περιλαμβάνει το αντιοξειδωτικό και 840 μL του ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37°C και ταυτόχρονη ανάδευση για 15 min για την εξισορρόπηση μεταξύ του ρυθμιστικού διαλύματος και των κυστιδίων. Η εκκίνηση της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη 160 μL AAPH 500 mM, καθώς καταγράφεται ο φθορισμός σε χρόνο μηδέν με φασματοφωτόμετρο στα 540-600 nm και έπειτα μετριέται κάθε 1 min μέχρι να μειωθεί στο αρχικό σημείο. Η θερμόλυση που υφίσταται το μόριο AAPH οδηγεί στην παραγωγή υπεροξειδικών ριζών, οι οποίες στην συνέχεια προκαλούν οξείδωση του C₁₁-BODIPY με ταυτόχρονη μείωση του φθορισμού του, η οποία είναι ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του AAPH. Για τον λευκό προσδιορισμό ακολουθείται η ίδια διαδικασία, χωρίς την προσθήκη του αντιοξειδωτικού. Η τιμή LPIC προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του Trolox και εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox.

Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται όπως στην μέθοδο ORAC, δηλαδή με τον υπολογισμό της διαφοράς της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) της μείωσης τους φθορισμού του ανιχνευτή C₁₁-BODIPY υπό την παρουσία του αντιοξειδωτικού, σε σχέση με αυτήν του λευκού προσδιορισμού. Όπως προαναφέρθηκε στην μέθοδο ORAC, η τεχνική της περιοχής κάτω από την καμπύλη εκτιμά σε μία ποσότητα τόσο το ποσοστό αναστολής της δράσης των ελεύθερων ριζών που προκαλεί το αντιοξειδωτικό, όσο και τον χρόνο αναστολής. Παράλληλα, η μέθοδος LPIC με την τεχνική της ανάμειξης των αντιοξειδωτικών με τα προσχηματισμένα λιποσώματα δεν δύναται να εφαρμοστεί για λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, καθώς δεν προστίθεται κατά την διαδικασία γαλακτωματοποιητής. Τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά αντιδρούν είτε με μία

μικρή ποσότητα υπεροξειδικών ριζών που παράγονται από το AAPH στην υδατική φάση, αφού το AAPH είναι υδατοδιαλυτό, είτε στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, με τις αρχικά παραγόμενες υπεροξειδικές ρίζες ή με τις υπεροξειδικές ρίζες των λιπιδίων. Επομένως, τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά δεν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην επιφάνεια των μεμβρανών, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προστατέψουν αποτελεσματικά τον ανιχνευτή από την οξείδωση καθώς δεν αρκεί η συγκέντρωσή τους για την ταχεία κατανάλωση υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών (Zhang et al., 2006).

3.3.4 ABTS – Radical Cation Decolorization Assay

Η μέθοδος ABTS περιλαμβάνει την παραγωγή του κατιόντος της ρίζας ABTS·⁺ (ABTS·⁺) χρώματος μπλε ή πράσινου, που προκύπτει από την αντίδραση του ABTS με το υπερθειικό κάλιο. Το κατιόν της ρίζας ABTS·⁺ παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα μήκη κύματος 645 nm, 734 nm και 815nm, ενώ συχνά εφαρμόζεται μήκος κύματος στα 415 nm. Με την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ενώσεων, οι οποίες παρέχουν στο προσχηματισμένο κατιόν ρίζας ABTS·⁺ άτομο υδρογόνου, αυτό ανάγεται σε τέτοιο βαθμό που εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, την αντιοξειδωτική τους δράση και τον χρόνο της αντίδρασης, ενώ η αναγωγή του κατιόντος της ρίζας ABTS·⁺ συνοδεύεται από τον αποχρωματισμό του. Ο βαθμός του αποχρωματισμού που υφίσταται εκφράζεται ως ποσοστό αναστολής του κατιόντος της ρίζας ABTS·⁺ και προσδιορίζεται με την γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού ως προς τον χρόνο σε σχέση με αυτήν του Trolox ως πρότυπο αντιοξειδωτικό, υπό τις ίδιες συνθήκες.

Για τον σχηματισμό του κατιόντος ρίζας ABTS·⁺ αναμειγνύονται και αντιδρούν πρότυπο διάλυμα ABTS με 2,45 mM υπερθειικού καλίου και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό χώρο για 12-16 h. Το διάλυμα του κατιόντος ρίζας ABTS·⁺ αραιώνεται σε αιθανόλη με απορρόφηση 0,70 (±0.02) στα 734 nm και παραμένει στους 30°C. Έπειτα, προστίθεται 1 mL διαλύματος κατιόντος ρίζας ABTS·⁺ σε 10 μL δειγμάτων αντιοξειδωτικών ενώσεων και πρότυπου Trolox και η

απορρόφηση μετριέται στα 734 nm στους 30°C μετά από 1 min από την προσθήκη και στη συνέχεια για πάνω από 6 min. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται οι λευκοί προσδιορισμοί με τον ίδιο τρόπο αλλά χωρίς τα δείγματα των αντιοξειδωτικών. Το ποσοστό αναστολής της απορρόφησης υπολογίζεται, όπως προαναφέρθηκε, με την σύγκριση της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων ως προς τον χρόνο με αυτήν πρότυπου Trolox ως σημείο αναφοράς.

Η μέθοδος ABTS μπορεί να εφαρμοστεί για την μελέτη υδρόφιλων αλλά και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών, καθαρών ενώσεων, τροφίμων και ορισμένων αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στο πλάσμα. Παρατηρείται ότι για τον σχηματισμό του κατιόντος ρίζας $ABTS^{\cdot+}$ απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ λόγω της στοιχειομετρίας της αντίδρασης μεταξύ ABTS και υπερθειικού καλίου 1:0,5, η οξείδωση του ABTS είναι ημιτελής. Παρ'όλα αυτά η οξείδωση του ABTS πραγματοποιείται άμεσα, ωστόσο για να επιτευχθεί μέγιστη απορρόφηση και να σταθεροποιηθεί η ρίζα απαιτούνται τουλάχιστον 6 h. Σε αυτήν την μορφή το κατιόν ρίζας $ABTS^{\cdot+}$ μπορεί να παραμείνει σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό χώρο για περισσότερο από δύο ημέρες. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα να υπολογιστεί η τιμή TEAC και να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC), ως εναλλακτικοί τρόποι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων (Re et al., 1999).

3.3.5 Αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος

Η μέθοδος αποχρωματισμού του β-καροτενίου αποτελεί μία από τις πιο συνήθεις μεθόδους για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης στο πεδίο της χημείας τροφίμων. Η αρχή στην οποία βασίζεται η μέθοδος περιλαμβάνει τον αποχρωματισμό του διαλύματος β-καροτενίου χρώματος κίτρινου, λόγω της προσθήκης λιπιδίου (L^{\cdot}) ή υπεροξειδικής ρίζας λιπιδίου (LOO^{\cdot}) με ταυτόχρονο σπάσιμο του διπλού δεσμού $C=C$ του β-καροτενίου, ενώ οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από την αυτοοξείδωση του λινολεϊκού οξέος υπό θέρμανση και ατμοσφαιρικό αέρα. Με την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ενώσεων ο αποχρωματισμός του β-καροτενίου καθυστερείται καθώς τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν και ανταγωνίζονται την αντίδραση μεταξύ του β-καροτενίου και των ελεύθερων ριζών (Ueno et al., 2014). Ο αποχρωματισμός

παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά κάθε 15 min για χρονικό διάστημα 2 h. Παράλληλα, μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με πρότυπα αντιοξειδωτικά όπως βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA), βουτυλικό υδροξυτολουόλιο (BHT), Trolox, γαλλικό οξύ και κουερσετίνη, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονται με την τιμή IC₅₀ (μg/mL), που αποδίδει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να αναστείλει κατά 50% τον αποχρωματισμό του β-καροτενίου (Nunes et al., 2012).

Η τυπική διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει, αρχικά, την παρασκευή πρότυπου διαλύματος β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος με την ανάμειξη 0,5 mg β-καροτενίου διαλυμένου σε 1 mL χλωροφόρμιο με 25 μL λινολεϊκού οξέος και 200 mg γαλακτωματοποιητή. Στη συνέχεια το χλωροφόρμιο εξατμίζεται σε εξατμιστήρα κενού και 100 mL απεσταγμένου νερού κορεσμένο με οξυγόνο προστίθενται με έντονη ανάμειξη. Τα δείγματα των αντιοξειδωτικών ποσότητας 350 μL διαλυμένα σε αιθανόλη (2 g/L) μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 2,5 mL από το διάλυμα β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολουθώντας επώαση για 48 h. Για τον λευκό προσδιορισμό πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι στους δοκιμαστικούς σωλήνες περιέχονται 350 μL αιθανόλης και ταυτόχρονα εφαρμόζεται η διαδικασία για πρότυπο διάλυμα BHT. Τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων αντιοξειδωτικών, του λευκού προσδιορισμού και του BHT στα 490 nm και συγκρίνονται οι αντιοξειδωτικές ικανότητες (Mraihhi et al., 2013).

Το β-καροτένιο εμφανίζει παρόμοια χημική δομή με το φουλερένιο, καθώς περιέχει πολλούς συζευγμένους διπλούς δεσμούς και με αυτόν τον τρόπο η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μεγάλη συμβατότητα για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης και ικανότητας μορίων με πολλούς συζευγμένους διπλούς δεσμούς, όπως το φουλερένιο. Ειδικότερα, το φουλερένιο αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως αντιοξειδωτικό νέας κατηγορίας, καθώς αντιδρά πολύ εύκολα με τα είδη των ελεύθερων ριζών και παρουσιάζεται η ανάγκη για ανάπτυξη βιοσυμβατών, μη τοξικών και υδατοδιαλυτών παραγώγων του φουλερενίου. Η φουλερενόλες, δηλαδή οι πολυδροξυλιωμένες μορφές του φουλερενίου, παρουσιάζουν βιολογικό, φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον, λόγω της υψηλής υδροφιλικότητας και της χαμηλής τοξικότητας που εμφανίζουν, ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν ιδιαίτερη σφαιρική δομή με διάμετρο 1 nm (Ueno et al., 2014). Λόγω του σχηματισμού υπεροξειδικής ρίζας λιπιδίου (LOO·)

μπορεί να ειπωθεί ότι τα αποτελέσματα της μεθόδου αποχρωματισμού β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος παρουσιάζουν σχετικά καλό συσχετισμό με την βιολογική τους δράση *in vivo*.

Πίνακας 3.6: Καταγραφή, ταξινόμηση και σύγκριση των μεθόδων *in vitro* για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης.

Μέθοδος	Μηχανισμός Αντίδρασης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Συσχετισμός <i>in vivo</i> *
FRAP	SET	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Απλή / Έγκυρη	Ακατάλληλη για θειόλες και αλβουμίνη. / Ενώσεις με $E_0 < +0,70$ V ανάγουν τον σίδηρο χωρίς να παρουσιάζουν απαραίτητα αντιοξειδωτική δράση <i>in vivo</i> .	1
TEAC	SET	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Απλή / Γρήγορη	Η αντίδραση μεταξύ της ρίζας ABTS- και των αντιοξειδωτικών δεν ολοκληρώνεται και τα αποτελέσματα υποτιμούνται.	2
DPPH	SET	Απλή Χρωματομετρική Μέθοδος / Γρήγορη	Διαστρέβλωση αποτελεσμάτων για ενώσεις που απορροφούν στα 515 nm. / Μικρό εύρος ενώσεων αντιδρούν με την αζωτούχο ρίζα DPPH·. / Η ρίζα DPPH· δεν αντιδρά με φαινολικά οξέα.	1
Folin-C	SET	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Ποσοτικοποίηση Πολυφαινολών	Διαστρέβλωση αποτελεσμάτων από την ύπαρξη μη φαινολικών ενώσεων που ανάγουν το αντιδραστήριο Folin-C, όπως ανάγοντα σάκχαρα, αμινοξέα και ασκορβικό οξύ.	2
DMPD	SET	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Χαμηλό Κόστος / Γρήγορη / Ευαισθησία	Μη εξειδίκευση / Ενώσεις που απορροφούν στα 505 nm μπορούν να προκαλέσουν θετικό σφάλμα στα αποτελέσματα.	3
ORAC	HAT	Υδρόφιλες Ενώσεις / Ολοκλήρωση της αντίδρασης σχηματισμού ελεύθερης ρίζας / Τεχνική Area Under the Curve	Για λιπόφιλες ενώσεις απαιτείται η χρήση μεθυλιωμένης-β-κυκλοδεξτρίνης ως ενισχυτής διαλυτότητας των ενώσεων αυτών.	3
TRAP	HAT	Λιπόφιλες Ενώσεις / Μείγματα Αντιοξειδωτικών Ενώσεων / Αντιριζική Ικανότητα / Υψηλή Ευαισθησία	Εφαρμογή σε περιορισμένο εύρος ενώσεων.	3
LPIC	HAT	Λιπόφιλες Ενώσεις / Προσομοίωση Κυτταρικής Μembrάνης με την χρήση Λιποσωμάτων / Τεχνική Area Under the Curve	Η τεχνική ανάμειξης των αντιοξειδωτικών με τα λιποσώματα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. / Τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στην επιφάνεια των μεμβρανών με αποτέλεσμα να μην μπορούν να τις προστατέψουν από την οξείδωση.	3
ABTS	HAT	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Απλή Χρωματομετρική Μέθοδος / Τεχνική Area Under the Curve	Το κατιόν της ρίζας ABTS ^{·+} απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα για να σχηματιστεί και είναι αρκετά ασταθές. / Ενώσεις που έχουν μέγιστη απορρόφηση στα 415 nm προκαλούν διαστρέβλωση των αποτελεσμάτων.	1
Αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος	HAT	Υδρόφιλες + Λιπόφιλες Ενώσεις / Μεγάλη συμβατότητα με ενώσεις που περιέχουν πολλούς συζυγικούς διπλούς δεσμούς	Απαιτείται αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα για την επίωση των δειγμάτων με το διάλυμα β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος (48 h).	2

* 1 = Μη επαρκής 2 = Επαρκής 3 = Πολύ καλός

4. Σύγκριση και Εκτίμηση των Μεθόδων *in vitro*

Έχοντας αποδώσει τα χαρακτηριστικά των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, τις αρχές λειτουργίας που τις διέπουν, καθώς και τους μηχανισμούς αντίδρασης στους οποίους βασίζονται, γίνεται δυνατή η περαιτέρω αξιολόγηση αυτών. Ως εκ τούτου, πραγματοποιείται σε αυτό το κεφάλαιο σύγκριση και ταυτόχρονη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, τα οποία προκύπτουν από την εφαρμογή των μεθόδων που μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Γι' αυτόν τον σκοπό παρατίθενται πειραματικά δεδομένα και αποτελέσματα από εφαρμογές των μεθόδων σε συστατικά τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν διατροφικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής τους δράσης. Παράλληλα, μελετάται η έκφραση των αποτελεσμάτων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης για ίδια δείγματα, αλλά με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων. Επιπλέον, η συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων *in vitro* και η μελέτη των αποτελεσμάτων σε συστατικά τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση αλλά και στον σχεδιασμό των χαρακτηριστικών των μεθόδων που συσχετίζουν την αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση των ενώσεων ως προς την αναστολή του οξειδωτικού stress στα βιολογικά συστήματα *in vivo*.

4.1 Εφαρμογή των Μεθόδων *in vitro* σε Συστατικά Τροφίμων και Αντιοξειδωτικές Ενώσεις

4.1.1 DPPH, FRAP και Αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος για Φρούτα του Γένους *Crataegus*

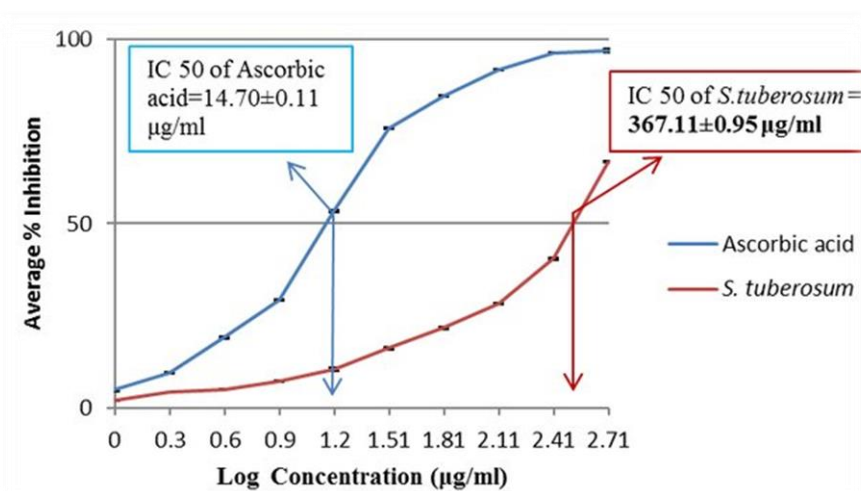
Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης σε δείγματα κράταιγου, συγκεκριμένα φρούτων των ειδών *Crataegus monogyna* (κόκκινα) και *Crataegus azarolus* (κίτρινα), εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι DPPH, FRAP και αποχρωματισμός β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος για τους σπόρους, το πολτό και τις φλούδες. Αρχικά, με την μέθοδο Folin-C προσδιορίζεται το φαινολικό περιεχόμενο για τους αντίστοιχους σπόρους, πολτούς και τις φλούδες των δύο ποικιλιών. Με αυτόν τον τρόπο βρέθηκε

ότι η κόκκινη ποικιλία του κράταιγου *Crataegus monogyna* παρουσιάζει μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο από την κίτρινη ποικιλία *Crataegus azarolus*, με μεγαλύτερη τιμή πολυφαινολών να κατέχει η φλούδα της κόκκινης ποικιλίας (123,35 mg γαλλικού οξέος/100 g ξηρού βάρους). Σύμφωνα με το φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε με την μέθοδο Folin-C αναμένεται υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση για τις φλούδες της κόκκινης ποικιλίας σε σχέση με τον πολτό και τους σπόρους.

Τα αποτελέσματα από την μέθοδο DPPH υπολογίζονται με το ποσοστό ανασταλτικής δράσης που βρίσκεται από την παρακάτω σχέση:

$$I(\%) = 100 \times \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

όπου το A_0 αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού και το A_1 την απορρόφηση των δειγμάτων. Η τιμή IC_{50} , που αποτελεί την συγκέντρωση του δείγματος για επίτευξη αναστολής κατά 50%, υπολογίζεται από το γράφημα του ποσοστού αναστολής προς την συγκέντρωση του δείγματος (**Σχήμα 4**) (Mraihi et al., 2013).



Σχήμα 4: Σε αυτό το παράδειγμα παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH ως προς την συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος και του βοτάνου *Solanum tuberosum*. Τα σημεία τομής της γραμμής που ξεκινά από την τιμή $y=50$ με τις εκάστοτε καμπύλες αντιπροσωπεύουν τις τιμές IC_{50} για τα αντίστοιχα δείγματα (Mondal et al., 2017).

Παράλληλα πραγματοποιείται η μέθοδος FRAP, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς το πρότυπο διάλυμα δισθενούς θεικού σιδήρου και ειδικότερα ως προς τη συγκέντρωση των δειγμάτων που παρουσιάζουν ικανότητα αναγωγής του σιδήρου ίση με αυτήν 1 mmol/L δισθενούς θεικού σιδήρου. Επιπλέον, για την μέθοδο β-

καροτενίου/λινολεϊκού οξέος προσδιορίζονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων, του πρότυπου διαλύματος βουτυλικού υδροξυτολουολίου - BHT και του λευκού προσδιορισμού που περιέχει μόνο αιθανόλη στα 490 nm.

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.1** παρατηρείται ότι η ικανότητα δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH· από τα δείγματα του κράταιγου παρουσιάζει σταθερή αύξηση και οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονται μεταξύ 240 και 800 µg/mL. Ταυτόχρονα, οι σπόροι από την κίτρινη ποικιλία κατέχουν μεγαλύτερη τιμή IC₅₀ (780 µg/mL) από την φλούδα της κόκκινης ποικιλίας (750 µg/mL), καθώς το φαινολικό περιεχόμενο που έχει προσδιοριστεί νωρίτερα με την μέθοδο Folin-C είναι υψηλότερο στον πολτό και στην φλούδα της κόκκινης ποικιλίας του κράταιγου. Προκύπτει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα δέσμησης της ρίζας DPPH·, τόσο μικρότερη ποσότητα του δείγματος χρειάζεται για την αναστολή του σχηματισμού της. Επομένως, η IC₅₀ εμφανίζεται μικρότερη για δείγματα που έχουν υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο, άρα και υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση.

Στον **Πίνακα 4.1** παρουσιάζονται, επίσης, οι τιμές FRAP για τα αντίστοιχα δείγματα και οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 5,44 – 8,88 mM Trolox/100 g ξ.β. και 5,68 – 9,12 mM ασκορβικού οξέος/100 g ξ.β. για την κόκκινη ποικιλία και μεταξύ 4,64 – 7,13 mM Trolox/100 g ξ.β. και 4,4 – 6,89 mM ασκορβικού οξέος/100 g ξ.β. για την κίτρινη ποικιλία. Η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση των δειγμάτων κράταιγου σύμφωνα με την μέθοδο FRAP ακολουθεί την παρακάτω σχέση και για τις δύο ποικιλίες: φλούδα > πολτό > σπόροι. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από τις τιμές που προκύπτουν από την μέθοδο DPPH.

DPPH

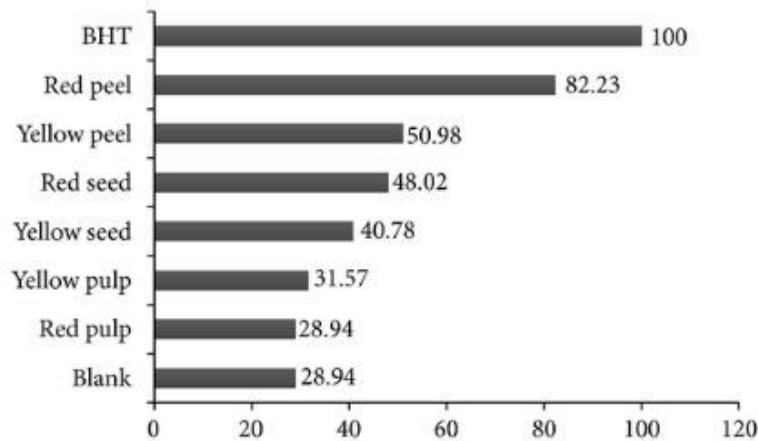
FRAP

FRAP

		IC ₅₀ (μg/mL)	(mM Trolox)	(mM AA)
<i>C. monogyna</i>	Peel	750	8.88	9.12
	Pulp	720	5.44	5.68
	Seed	540	5.71	5.95
<i>C. azarolus</i>	Peel	780	6.89	7.13
	Pulp	560	4.40	4.64
	Seed	240	6.15	6.39
Control	BHT	820	-	-

Πίνακας 4.1: Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των μεθόδων DPPH και FRAP για δείγματα των φρούτων του γένους *Crataegus* και για πρότυπα διαλύματα Trolox και ασκορβικού οξέος (Mraihhi et al., 2013).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου αποχρωματισμού του β-καροτενίου αποδίδονται στο **Σχήμα 4.2** όπου παριστάνεται η μείωση της απορρόφησης του β-καροτενίου, δηλαδή ο αποχρωματισμός του, υπό την επίδραση της ελεύθερης ρίζας του λινολεϊκού οξέος και με την παρουσία των εκχυλισμάτων του κράταιγου. Σύμφωνα με το **Σχήμα 4.2** παρατηρείται συσχέτιση με τα αποτελέσματα των μεθόδων DPPH και FRAP, καθώς η σχετική αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φλούδας της κόκκινης ποικιλίας υπολογίζεται στο 82,23% , ενώ ακολουθεί το εκχύλισμα φλούδας της κίτρινης ποικιλίας με 50,98% σχετική αντιοξειδωτική δράση. Ως εκ τούτου, αποδίδεται η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στην φλούδα της κόκκινης ποικιλίας *Crataegus monogyna*, γεγονός που οφείλεται στο υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων αυτών.



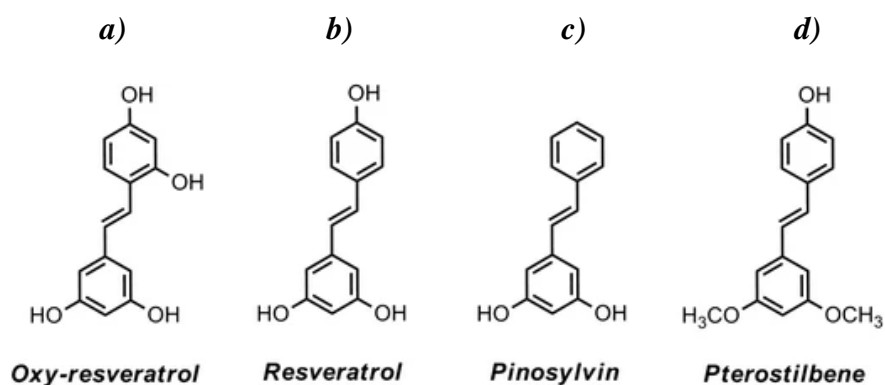
Σχήμα 4.2: Σχετική αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος των εκχυλισμάτων *Crataegus monogyna* (κόκκινα) και *Crataegus azarolus* (κίτρινα) ως προς το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT και τον λευκό προσδιορισμό (blank) (Mraihi et al., 2013).

Το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο που διαθέτει η ποικιλία *Crataegus monogyna* οδηγεί σε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των μεθόδων DPPH, FRAP και β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος σε σχέση με την ποικιλία *Crataegus azarolus*. Οι μέθοδοι συσχετίζονται μεταξύ τους καθώς αποδεικνύουν αυτό το πόρισμα. Παράλληλα, παρουσιάζεται γραμμική σχέση με τις τιμές TEAC και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, το οποίο προσδιορίζεται με την μέθοδο Folin-C, τόσο για την κόκκινη όσο και για την κίτρινη ποικιλία των φρούτων του γένους *Crataegus*. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων φρούτων δεν οφείλεται μόνο στην παρουσία των πολυφαινολών, αλλά και στην επίδραση δευτερογενών μεταβολιτών που δρουν ως αντιοξειδωτικά όπως φλαβονοειδή, προανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (Mraihi et al., 2013).

4.1.2 ABTS, ORAC και FRAP για Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούν ομάδα ενώσεων που διαθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι ενώνονται με μία γέφυρα μεθυλενίου (**Σχήμα 4.3**) και είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από είδη φυτών. Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων ανήκουν η ρεσβερατρόλη, η οξυ-ρεσβερατρόλη, η πινοσυλβίνη και η περοστιλβίνη

οι οποίες διαθέτουν ευεργετικές ιδιότητες και βρίσκονται σε μούρα, φυστίκια, βατόμουρα, πεύκα και φυτά που χρησιμοποιούνται στην ανατολική παραδοσιακή ιατρική.



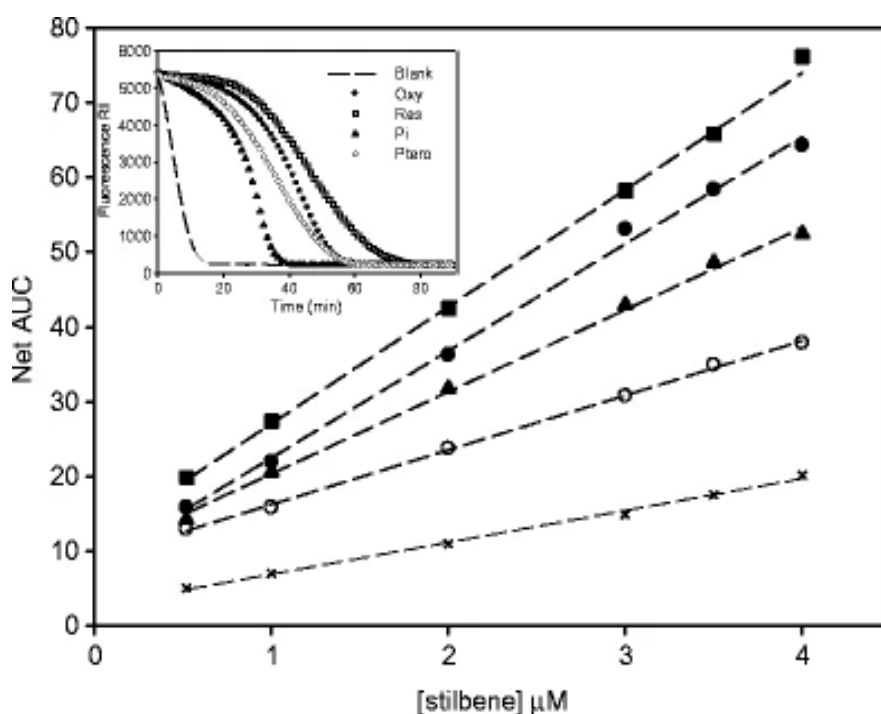
Σχήμα 4.3: Δομές ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των στυλβένιων: *a)* οξυ-ρεσβερατρόλη, *b)* ρεσβερατρόλη, *c)* πινοσυλβίνη, *d)* πτεροστιλβένη (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτών των τεσσάρων στυλβένιων εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι ABTS, ORAC και FRAP. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ORAC υπολογίζονται από την εξίσωση της περιοχής κάτω από την καμπύλη:

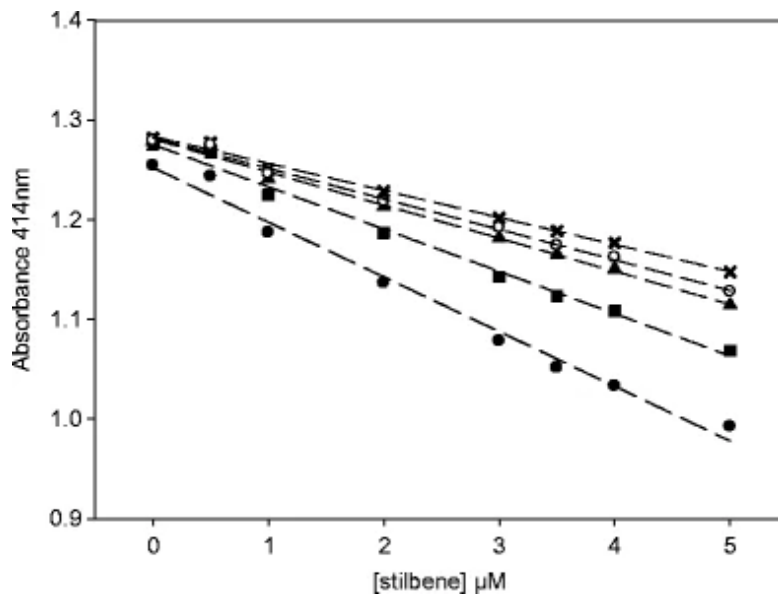
$$AUC = 1 + \sum_{i=1,14}^{i=120} \frac{fi}{f0}$$

όπου f_0 είναι ο αρχικός φθορισμός σε χρόνο 0 και f_i αντιπροσωπεύει τον φθορισμό σε χρόνο i . Ο φθορισμός παρακολουθείται με φασματοφωτόμετρο κάθε 1,14 min για 120 min. Η μέθοδος πραγματοποιείται για λευκό δείγμα και για οχτώ γνωστές συγκεντρώσεις του Trolox για την βαθμονόμηση της καμπύλης μείωσης του φθορισμού, ενώ η τιμή AUC που αντιστοιχεί στο δείγμα υπολογίζεται από την αφαίρεση της τιμής AUC που αντιστοιχεί στον λευκό προσδιορισμό. Στο **Σχήμα 4.4** αποδίδεται η επίδραση της αυξανόμενης συγκέντρωσης των στυλβένιων στην τιμή AUC. Η αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο ABTS εκφράζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί την ίδια αναστολή με 1 mM Trolox και τα ισοδύναμα Trolox υπολογίζονται από την σύγκριση των διαφορών $A_0 - A_f$ του

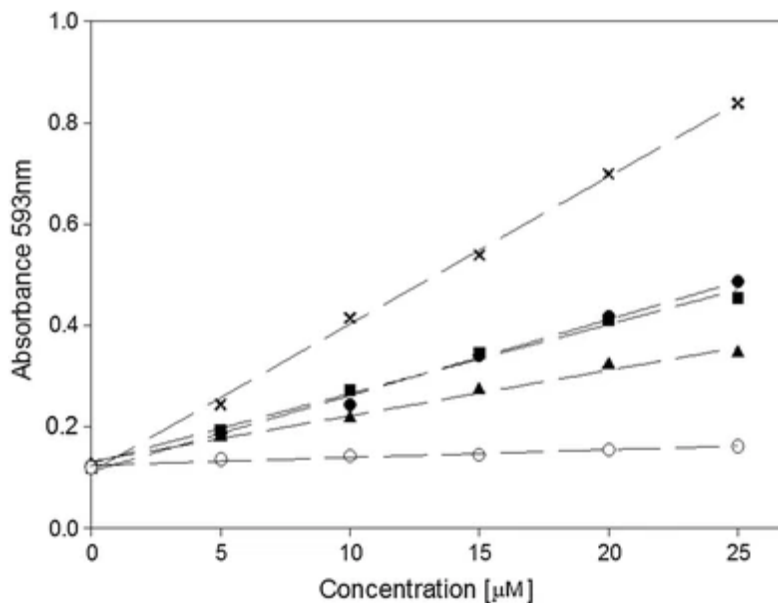
δείγματος και του αντίστοιχου $A_0 - A_f$ των πρότυπων διαλυμάτων Trolox, όπου A_0 αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του λευκού προσδιορισμού και A_f την απορρόφηση του δείγματος αντιοξειδωτικού. Στο **Σχήμα 4.5** παρουσιάζεται γραφικά η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης των στιλβένιων στον αποχρωματισμό του κατιόντος ρίζας $ABTS^{\cdot+}$. Η αναγωγή του σιδήρου που προκαλείται από τα αντιοξειδωτικά παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 593 nm, για την μέθοδο FRAP, ενώ παράλληλα για την βαθμονόμηση της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα δισθενούς θεικού σιδήρου ($FeSO_4$). Στο **Σχήμα 4.6** παριστάνονται τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP για τα τέσσερα στιλβένια (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).



Σχήμα 4.4: Στο εσωτερικό γράφημα παριστάνεται η μείωση την απορρόφησης, δηλαδή η μείωση της εκπομπής φθορισμού του λευκού δείγματος και των τεσσάρων στιλβένιων με την μέθοδο ORAC. Παράλληλα, αποδίδεται η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης των στιλβένιων στην περιοχή κάτω από την καμπύλη. (μαύρο τετράγωνο) ρεσβερατρόλη, (μαύρος κύκλος) οξύ-ρεσβερατρόλη, (μαύρο τρίγωνο) πινοσυλβίνη και (λευκός κύκλος) περοστιλβίνη (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).



Σχήμα 4.5: Η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης των στιλβένιων και του Trolox στον αποχρωματισμό του κατιόντος ρίζας ABTS⁺ στα 414 nm. (x) Trolox, (λευκός κύκλος) πτεροστιλβίνη, (μαύρο τρίγωνο) πινοσυλβίνη, (μαύρο τετράγωνο) ρεσβερατρόλη και (μαύρος κύκλος) οξυ-ρεσβερατρόλη (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).



Σχήμα 4.6: Η αντιοξειδωτική δράση των τεσσάρων στιλβένιων με την μέθοδο FRAP (φασματοφωτομετρικά στα 593 nm) με βάση την πρότυπη καμπύλη. (x) Trolox, (μαύρος κύκλος) οξυ-ρεσβερατρόλη, (μαύρο τετράγωνο) ρεσβερατρόλη, (μαύρο τρίγωνο) πινοσυλβίνη και (λευκός κύκλος) πτεροστιλβίνη (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).

Το Σχήμα 4.4 αποτελεί ένα σημαντικό παράδειγμα για να γίνει κατανοητή η σημασία και η χρησιμότητα της τεχνικής της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στην καμπύλη μείωσης του φθορισμού παριστάνεται η αναστολή της αποσύνθεσης της φλουορεσκεΐνης, όπου κατά την αποσύνθεσή της

μειώνεται ο φθορισμός της και επομένως η απορρόφηση που παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά. Τα αντίστοιχα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την αποσύνθεση της φλουορεσκεΐνης, δηλαδή παρατείνουν την μείωση της απορρόφησης σε τέτοιο βαθμό που είναι ανάλογος από την συγκέντρωσή τους και την αντιοξειδωτική και αντιριζική τους δράση. Επίσης, παρατηρείται γραμμική σχέση μείωσης της εκπομπής φθορισμού ως προς τον χρόνο για την φλουορεσκεΐνη, υπό την απουσία αντιοξειδωτικής ένωσης, που προαναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι όσο μεγαλύτερη είναι η περιοχί κάτω από την καμπύλη μείωσης του φθορισμού για την εκάστοτε αντιοξειδωτική ένωση, τόσο περισσότερο αναστέλλεται η αποσύνθεση της φλουορεσκεΐνης και τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση. Με βάση τα δεδομένα της περιοχής κάτω από την καμπύλη για την κάθε αντιοξειδωτική ένωση συγκρίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης, που παρουσιάζεται και αποδίδεται η αντιοξειδωτική ένωση με την υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο ORAC αποδίδεται στην ρεσβερατρόλη και ακολουθούν με φθίνουσα σειρά η οξυ-ρεσβερατρόλη, η πινοσυλβίνη και η περοστιλβίνη.

Η μέθοδος ABTS εκφράζει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να ανάγουν το κατιόν της ρίζας $ABTS^{\cdot+}$, που συνεπάγεται με τον αποχρωματισμό του και την μείωση της απορρόφησης. Επομένως, η αντιοξειδωτική ένωση που παρουσιάζει την μεγαλύτερη μείωση της απορρόφησης στα 414 nm κατέχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Σύμφωνα με τα δεδομένα του **Σχήματος 4.5** η οξυ-ρεσβερατρόλη έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και ακολουθούν η ρεσβερατρόλη, η πινοσυλβίνη και η περοστιλβίνη.

Με την μέθοδο FRAP εκτιμάται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή σίδηρο με ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος σε έντονο μπλε. Ως εκ τούτου, αναμένεται αύξηση της απορρόφησης υπό την επίδραση των αντιοξειδωτικών, με υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση να κατέχει η αντιοξειδωτική ένωση που προκαλεί την μεγαλύτερη αύξηση της απορρόφησης στα 593 nm. Επομένως, σύμφωνα με το **Σχήμα 4.6** την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν με φθίνουσα πορεία η οξυ-ρεσβερατρόλη, η ρεσβερατρόλη, η πινοσυλβίνη και η περοστιλβίνη.

Τα αποτελέσματα των μεθόδων ORAC και ABTS δεν συμπίπτουν καθώς στην μέθοδο ORAC την υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση κατέχει η ρεσβερατρόλη, ενώ στην μέθοδο ABTS εμφανίζει η οξυ-ρεσβερατρόλη. Η διαφορά αυτή οφείλεται στον διαφορετικό μηχανισμό αντίδρασης στον οποίο βασίζονται οι δύο μέθοδοι, ειδικότερα η μέθοδος ORAC βασίζεται σε μεταφορά ατόμου υδρογόνου (HAT), ενώ η μέθοδος ABTS σε μηχανισμό μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (SET). Τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP συμπίπτουν με αυτά της ABTS, καθώς και με την μέθοδο FRAP η υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση αποδίδεται στην οξυ-ρεσβερατρόλη, γεγονός που οφείλεται στον μηχανισμό αντίδρασης της μεθόδου FRAP, ο οποίος είναι ο ίδιος με την μέθοδο ABTS, δηλαδή SET μηχανισμός. Γι' αυτόν τον λόγο δεν συνίσταται να εφαρμόζονται τυχαία μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης σε ενώσεις, ενώ ταυτόχρονα είναι ωφέλιμο να προσδιορίζονται οι συνθήκες και ο στόχος της μελέτης.

Η παρουσία των υδροξυλομάδων στη δομή των στυλβένιων επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών, ενώ ταυτόχρονα είναι πιθανό να υπάρχει συσχέτιση με την ποσότητα των υδροξυλομάδων και την αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα της ένωσης. Παρατηρείται ότι η οξυ-ρεσβερατρόλη που διαθέτει στο μόριό της τέσσερεις υδροξυλομάδες, παρουσιάζει την υψηλότερη αντιριζική δράση και ακολουθούν τα υπόλοιπα στυλβένια με 3, 2 και 1 υδροξυλομάδα αντίστοιχα. Επιλέον, η δομή των στυλβένιων εξαρτάται από το pH του μέσου, καθώς σε τιμές pH μεγαλύτερες από 8,0 τα στυλβένια υφίστανται αποπροτονίωση και με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η αντιοξειδωτική και αντιριζική τους δράση (Rodríguez-Bonilla et al., 2017).

4.1.3 TEAC και ORAC για Πορτοκαλοχυμό και Αποβουτυρωμένο Γάλα

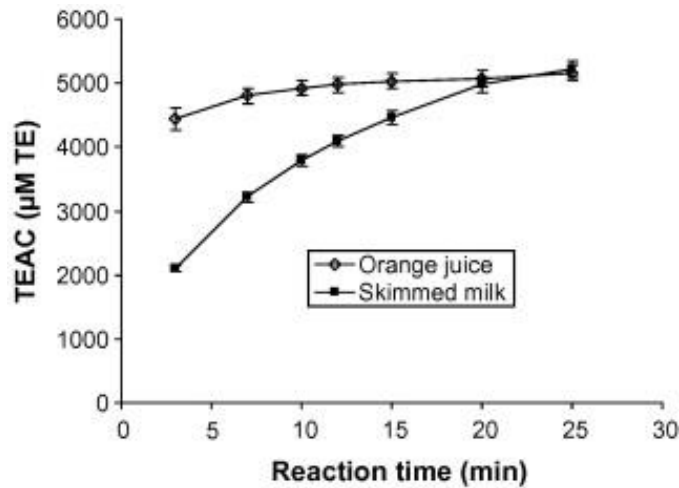
Ο πορτοκαλοχυμός είναι πλούσιος σε αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως βιταμίνη C, καροτενοειδή και φαινολικές ενώσεις, ωστόσο το γάλα παρουσιάζει, επίσης, αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα από ένα κλάσμα ενώσεων που περιέχονται σε αυτό, όπως καζεΐνες ορού γάλακτος, λακτοφερίνη και αλβουμίνη. Στην μελέτη αυτή προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση πορτοκαλοχυμού και

αποβουτυρωμένου γάλακτος με τις μεθόδους TEAC και ORAC, οι οποίες βασίζονται σε SET και HAT μηχανισμό αντίδρασης αντίστοιχα.

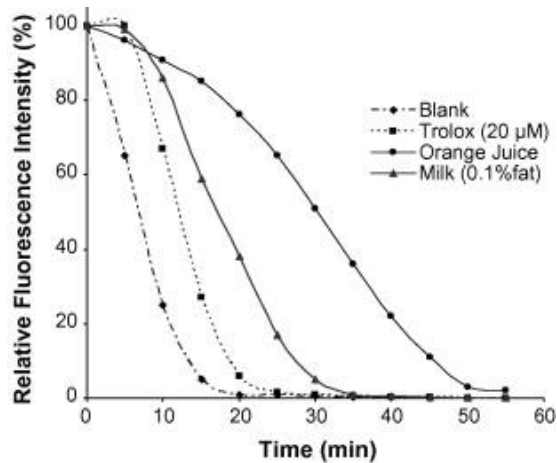
Με την μέθοδο TEAC προσδιορίζεται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να δεσμεύουν και να ανάγουν το κατιόν της ρίζας ABTS^{•+}, καθώς με την αναγωγή της ρίζας προκαλείται αποχρωματισμός της και μείωση της απορρόφησης, η οποία παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 734 nm. Ταυτόχρονα, η μέθοδος πραγματοποιείται για πρότυπα διαλύματα Trolox (0-250 μM), με σκοπό την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης και στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ισοδύναμα Trolox (μM TE) με βάση το ποσοστό αναστολής που προκαλείται από τα δείγματα. Η μεταβολή των ισοδύναμων Trolox ως προς τον χρόνο της αντίδρασης παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.7**. Η μέθοδος ORAC πραγματοποιείται με την γνωστή πλέον διαδικασία και τα αποτελέσματα εκφράζονται με την τεχνική της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) για τα δείγματα, για πρότυπα διαλύματα Trolox και για τον λευκό προσδιορισμό. Ωστόσο, για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων, πραγματοποιείται μετατροπή σε ισοδύναμα Trolox (μM TE) σύμφωνα με την εξής σχέση:

$$ORAC (\mu M TE) = \frac{C_{Trolox} \cdot (AUC_{Sample} - AUC_{Blank}) \cdot k}{(AUC_{Trolox} - AUC_{Blank})}$$

όπου C_{Trolox} είναι η συγκέντρωση του Trolox (20 μM), k ο παράγοντας αραίωσης των δειγμάτων και οι τιμές AUC αντιπροσωπεύουν την περιοχή κάτω από την καμπύλη της μείωσης του φθορισμού για τα δείγματα, το Trolox και τον λευκό προσδιορισμό αντίστοιχα. Στο **Σχήμα 4.8** παριστάνεται η καμπύλη μείωσης του φθορισμού από την οποία προκύπτουν οι τιμές AUC.



Σχήμα 4.7: Μεταβολή των ισοδύναμων Trolox του πορτοκαλοχυμού και του αποβουτυρωμένου γάλακτος (συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει την ίδια αναστολή με 1 mM Trolox) ως προς τον χρόνο με την μέθοδο TEAC (Zulueta et al., 2009).

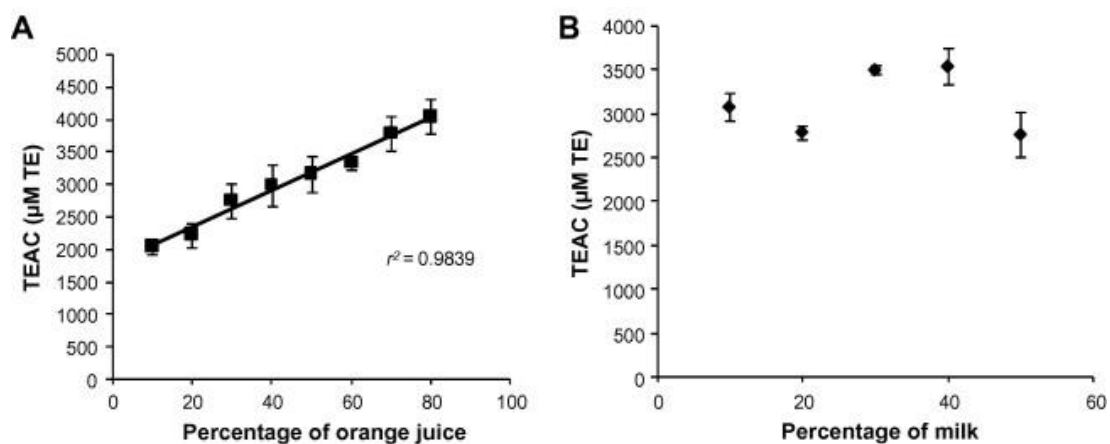


Σχήμα 4.8: Μεταβολή του ποσοστού αναστολής της μείωσης του φθορισμού της φλουορεσκεΐνης υπό την παρουσία πορτοκαλοχυμού και γάλακτος 0,1% σε λιπαρά (Zulueta et al., 2009).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του **Σχήματος 4.7**, όπου οι μετρήσεις καταγράφονται κάθε 3 min, γίνεται κατανοητό ότι ο πορτοκαλοχυμός αναστέλλει πολύ άμεσα την ρίζα $ABTS^{\cdot+}$ καθώς το ποσοστό αναστολής παραμένει σταθερό με την πάροδο του χρόνου, ενώ το γάλα παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό αναστολής τα πρώτα λεπτά και στη συνέχεια αυξάνεται σταδιακά φτάνοντας σε 20 min το 100% της αναστολής που προκαλεί ο πορτοκαλοχυμός. Επιπλέον, τα δεδομένα από το **Σχήμα 4.8** από την μέθοδο ORAC υποδεικνύουν ότι το ποσοστό αναστολής της μείωσης του φθορισμού για τον πορτοκαλοχυμό παρουσιάζεται μεγαλύτερο από το ποσοστό αναστολής του γάλακτος, γεγονός που συμπίπτει με τα αποτελέσματα από την μέθοδο TEAC. Ωστόσο, έπειτα από 8-10 min το ποσοστό αναστολής της μείωσης του φθορισμού

είναι μεγαλύτερο για το γάλα σε σχέση με τον πορτοκαλοχυμό, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τρόφιμα υπό ιδιαίτερες και διαφορετικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να αντιδρούν με διαφορετική κινητική. Επιπλέον, η μέθοδος ORAC συνδυάζει, όπως έχει προαναφερθεί, το ποσοστό αναστολής και τον χρόνο που διαρκεί η αναστολή σε μία ποσότητα με την τεχνική AUC και με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η αντίδραση όλων των αντιοξειδωτικών ενώσεων με τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες.

Παράλληλα οι μέθοδοι ORAC και TEAC εφαρμόστηκαν σε ρόφημα πορτοκαλοχυμού και γάλακτος, όπου σύμφωνα με το **Σχήμα 4.9** στην περίπτωση Α αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις του πορτοκαλοχυμού και παρέμεινε σταθερή η συγκέντρωση του γάλακτος (20% v/v) και στην περίπτωση Β οι μετρήσεις έγιναν για αυξανόμενες συγκεντρώσεις του γάλακτος με σταθερή την συγκέντρωση του πορτοκαλοχυμού (50% v/v). Σύμφωνα με το **Σχήμα 4.9** βρέθηκε ότι για αυξανόμενες συγκεντρώσεις πορτοκαλοχυμού η αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο TEAC αυξάνεται και τα δεδομένα ισοδύναμων Trolox και συγκεντρώσεων του πορτοκαλοχυμού παρουσιάζουν γραμμική σχέση. Ωστόσο, η ανάλυση για το γάλα έδειξε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του γάλακτος δε αποδίδεται η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης και τα δεδομένα δεν εμφανίζουν γραμμική σχέση μεταξύ τους. Παρ' όλα αυτά, η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ORAC και τα αποτελέσματα υποδεικνύουν γραμμική σχέση και για τα δύο τρόφιμα, ενώ ταυτόχρονα η αντιοξειδωτική δράση εμφανίζεται μεγαλύτερη και στις δύο περιπτώσεις. Η γραμμική σχέση που εμφανίζεται στην μέθοδο TEAC ως προς τον πορτοκαλοχυμό, είναι δυνατό να οφείλεται στο ασκορβικό οξύ, το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο αντιοξειδωτικό, καθώς αντιδρά άμεσα με την ρίζα ABTS \cdot και ευνοείται από την αντίδραση οξειδοαναγωγής της μεθόδου TEAC. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του γάλακτος αποδίδεται σε λιποδιαλυτές ενώσεις και στο πρωτεϊνικό κλάσμα όπως αμινοξέα, τα οποία δρουν ως δότες ατόμων υδρογόνου. Η μέθοδος ORAC βασίζεται σε μηχανισμό αντίδρασης που περιλαμβάνει μεταφορά ατόμου υδρογόνου, επομένως παρουσιάζει μεγαλύτερη συμβατότητα για το γάλα, με αποτέλεσμα να προκύπτει γραμμική σχέση (Zulueta et al., 2009).



Σχήμα 4.9: Επίδραση της αύξησης των συγκεντρώσεων του πορτοκαλοχυμού (A) και του γάλακτος (B) εντός του ροφήματος στις τιμές TEAC (Zulueta et al., 2009).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης στο πλάσμα, βρέθηκε ότι με την μέθοδο TEAC υποτιμάται η αντιοξειδωτική δράση μετά το πέρας 3 min, ενώ χρειάστηκαν τουλάχιστον 30 min για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση και τελικά η αντίδραση έφτασε σε πλατώ. Επιπλέον, ο συσχετισμός των δύο μεθόδων δεν είναι υψηλός, ωστόσο σε υψηλότερες τιμές ORAC και TEAC (8 mM TE) ο συσχετισμός είναι υψηλότερος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις διαφορετικές ρίζες που σχηματίζονται στις δύο μεθόδους, καθώς με την μέθοδο TEAC σχηματίζονται εξωγενείς ρίζες ABTS[•], ενώ η μέθοδος ORAC χρησιμοποιεί ρίζες υπεροξειδίου (ROO[•]). Παράλληλα, η μέθοδος ORAC αποτυπώνει τον μηχανισμό της αντιοξειδωτικής δράσης που πραγματοποιείται εντός των βιολογικών συστημάτων, καθώς οι υπεροξειδικές ρίζες αποτελούν τις πιο συνήθεις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στο ανθρώπινο σώμα (Wang et al., 2004).

Ο συσχετισμός των δύο μεθόδων ORAC και TEAC παρουσιάζεται υψηλός σε τρόφιμα των οποίων οι κύριες αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές. Για φρούτα και λαχανικά οι μέθοδοι ORAC και TEAC εμφανίζουν υψηλό συσχετισμό, ενώ ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης για 15 φυτά από την Βραζιλία υπέδειξε χαμηλό συσχετισμό μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μέθοδος ORAC μπορεί να θεωρηθεί καλύτερη από την TEAC, καθώς μετράει την αντιοξειδωτική δράση περισσότερων αντιοξειδωτικών όπως φαινολικές ενώσεις, γεγονός που δεν παρατηρείται από την μέθοδο TEAC και ταυτόχρονα είναι πιο εξειδικευμένη μέθοδος (Zulueta et al., 2009).

4.1.4 ABTS και DPPH για Κριθάρι και Βύνη

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του κριθαριού και της βύνης θεωρείται σημαντικός, καθώς σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα των τελικών προϊόντων όπως η μύρα (Mareček et al., 2017). Το φαινολικό περιεχόμενο, το οποίο αποδίδεται κατά 70% στο κριθάρι και κατά 30% στον λυκίσκο, και η αντιοξειδωτική δράση της μύρας εξαρτάται από την ποιότητα και την ποσότητα των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται καθώς και από την διαδικασία της ζυθοποιίας. Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στο χρώμα, την γεύση και την σταθερότητα της μύρας είναι γνωστός, ωστόσο οι μύρες με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές αντιοξειδωτικές ενώσεις παρουσιάζουν υψηλότερη ποιότητα και σταθερότητα ως προς το άρωμα και την γεύση, σταθερότητα του αφρού και μεγαλύτερο shelf-life σε σχέση με μύρες οι οποίες εμφανίζουν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Piazzon et al., 2010).

Σε αυτήν την μελέτη προσδιορίζεται η ικανότητα του κριθαριού και της βύνης να δεσμεύουν και να ανάγουν τις ρίζες ABTS \cdot και DPPH \cdot . Οι δύο μέθοδοι βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης, καθώς η μέθοδος DPPH βασίζεται σε SET μηχανισμό αντίδρασης όπου η ένωση ή το συστατικό τροφίμου που μελετάται παρέχει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα DPPH \cdot η οποία ανάγεται με ταυτόχρονη αλλαγή χρώματος (αποχρωματισμό). Η μέθοδος ABTS βασίζεται σε HAT μηχανισμό αντίδρασης κατά τον οποίο η αντιοξειδωτική ένωση παρέχει ένα άτομο υδρογόνου στο προσχηματισμένο κατιόν της ρίζας ABTS \cdot^+ και στη συνέχεια ανάγεται με ταυτόχρονο αποχρωματισμό του. Γίνεται κατανοητό ότι οι δύο μέθοδοι, παρ'όλο που χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης, αποτελούν χρωματομετρικές μεθόδους και η αναγωγή των ριζών ABTS \cdot και DPPH \cdot από τα αντιοξειδωτικά που μελετώνται συνοδεύεται από τον αποχρωματισμό τους, δηλαδή από την μείωση της απορρόφησης σε δεδομένα μήκη κύματος αντίστοιχα.

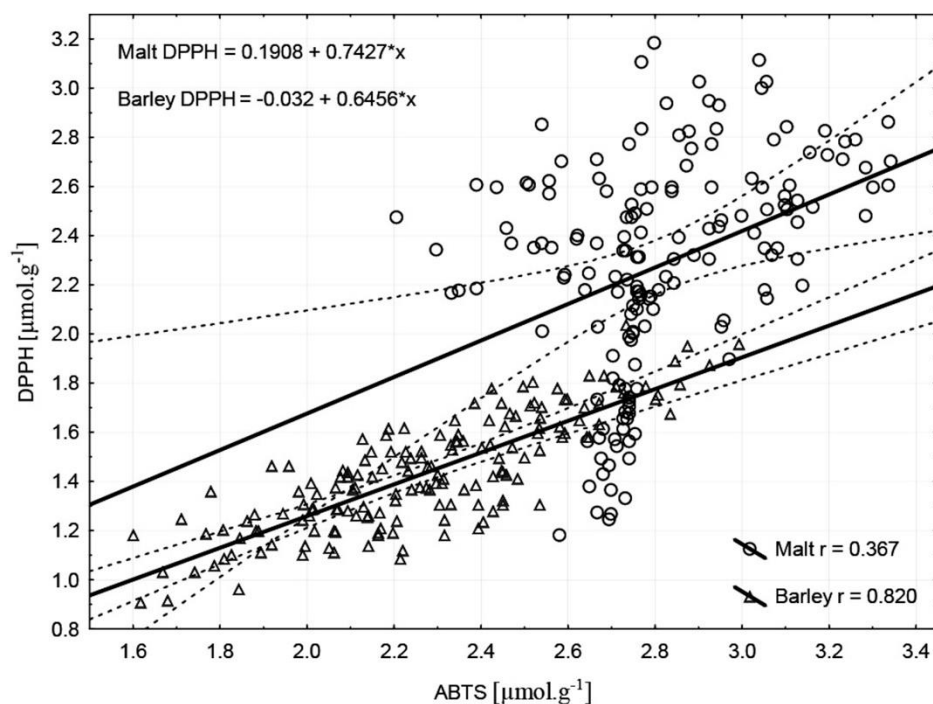
Οι τιμές TEAC με την μέθοδο ABTS για το κριθάρι και την βύνη κυμαίνονται μεταξύ 1,6 – 3,0 $\mu\text{mol/g}$ και 2,2 – 3,3 $\mu\text{mol/g}$ αντίστοιχα, ενώ με την μέθοδο DPPH οι τιμές TEAC αντιστοιχούν για τον κριθάρι 0,9 – 2,0 $\mu\text{mol/g}$ και για την βύνη 1,2 – 3,2 $\mu\text{mol/g}$. Με την μέθοδο ABTS η βύνη παρουσιάζεται με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από το κριθάρι κατά 24%, ενώ η διαφορά αυτή με την μέθοδο DPPH ανέρχεται στο 59%. Η βύνη εμφανίζει και στις δύο μεθόδους υψηλότερη

αντιοξειδωτική δράση από το κριθάρι γεγονός που προκύπτει λόγω της μεταβολής του αντιοξειδωτικού περιεχομένου κατά το στάδιο της βυνοποίησης και κυρίως κατά την βλάστηση και την φρύξη του κριθαριού (Mareček et al., 2017). Ειδικότερα, κατά την φρύξη απελευθερώνονται οι φαινολικές ενώσεις, κυρίως τα φαινολικά οξέα όπως λιγνίνη και αραβινοξυλάνη, που είναι συνδεδεμένες στις κυτταρικές δομές με την βοήθεια υδρολυτικών ενζύμων. Παράλληλα, πραγματοποιείται η αντίδραση Maillard μέσω της αντίδρασης των αναγωγικών σακχάρων με τα αμινοξέα τα οποία σχηματίζονται από την βλάστηση του κριθαριού και στη συνέχεια παράγονται τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και χαμηλής υγρασίας κατά την φρύξη (Maillard et al., 1996). Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται από το πρωτεϊνικό περιεχόμενο και ειδικότερα όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, τόσο χαμηλότερη αναμένεται η αντιοξειδωτική δράση.

Οι τιμές εκφρασμένες ως προς το Trolox με την μέθοδο DPPH εμφανίζονται χαμηλότερες, καθώς η ρίζα DPPH· παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα από την ρίζα ABTS· γεγονός που συνεπάγεται με χαμηλότερη αντιδραστικότητα. Επίσης, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της ρίζας DPPH· είναι -1,2V, ενώ της ρίζας ABTS· -0,67V, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ρίζα ABTS· παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα ηλεκτρόνια, επομένως έχει μεγαλύτερη τάση να αναχθεί σε σχέση με την ρίζα DPPH·. Παράλληλα, η ρίζα DPPH· έχει την δυνατότητα να αντιδράσει με πολυφαινόλες όπως κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες, ωστόσο δεν αντιδρά με φαινολικά οξέα και σάκχαρα. Με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται το εύρος αντιοξειδωτικών ενώσεων στις οποίες έχει εφαρμογή η μέθοδος DPPH, ενώ ταυτόχρονα η μέθοδος ABTS εφαρμόζεται για μεγαλύτερο εύρος ενώσεων. Η ρίζα ABTS· παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιδραστικότητα, ωστόσο η προετοιμασία του αντιδραστήριου ABTS είναι δύσκολη, απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα και η ρίζα που σχηματίζεται είναι λιγότερο σταθερή σε σχέση με την ρίζα DPPH·.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 4.10** ο συσχετισμός για τις μεθόδους ABTS και DPPH, εκφρασμένες σε τιμές TEAC ($\mu\text{mol/g}$) σε σχέση με το κριθάρι (barley) είναι ισχυρός με συντελεστή συσχέτισης $r = 0,820$ και οι τιμές TEAC με την μέθοδο ABTS είναι κατά 58% υψηλότερες από τις τιμές TEAC που προκύπτουν με την μέθοδο DPPH. Ο συντελεστής συσχέτισης σε σχέση με την βύνη (malt) είναι μικρότερος και

υπολογίζεται $r = 0,367$, ενώ ταυτόχρονα η μέση τιμή TEAC με την μέθοδο ABTS είναι 23% υψηλότερη από την αντίστοιχη της μεθόδου DPPH (Mareček et al., 2017).



Σχήμα 4.10: Γραμμικός συσχετισμός των τιμών TEAC που προκύπτουν από τις μεθόδους ABTS και DPPH για το κριθάρι (barley) και την βύνη (malt) (Mareček et al., 2017).

Κατά την εφαρμογή των μεθόδων ABTS και DPPH εντοπίζεται ένας βασικός περιορισμός. Η εφαρμογή των μεθόδων σε αντιοξειδωτικές ενώσεις οι οποίες, ή τα προϊόντα οξείδωσής τους απο την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα μήκη κύματος όπου πραγματοποιείται η φασματοφωτομετρική παρακολούθηση, δημιουργεί διαστρέβλωση των αποτελεσμάτων. Η παρουσία αυτών των ενώσεων προκαλεί σφάλματα στην μέτρηση της απορρόφησης, με αποτέλεσμα να μην δύναται να υπολογιστεί η μείωση της απορρόφησης που προκαλείται από τον αποχρωματισμό των ριζών ABTS· και DPPH· και επομένως η πραγματική αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση των ενώσεων. Σε αυτήν την περίπτωση προτείνεται η μέτρηση σε διαφορετικό μήκος κύματος, από το φάσμα απορρόφησης της χρωμοφόρου ρίζας, ωστόσο η φασματοφωτομετρική παρακολούθηση μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ίδιο μήκος κύματος, που υποδεικνύει η μέθοδος, στην περίπτωση που η αντιοξειδωτική ένωση έχει καταναλωθεί πλήρως από την αντίδραση με την ελεύθερη ρίζα και τα προϊόντα της αντίδρασης επιτρέπουν την φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της

εξουδετέρωσης των ριζών ABTS· και DPPH·. Παράλληλα, η διαφορά στην συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών μπορεί να παρακολουθείται μετά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών που εμποδίζουν την μέτρηση του συστήματος (Olszowy & Dawidowicz, 2018).

4.2 Σύγχρονες Τεχνολογίες και Εφαρμογές

4.2.1 Κυτταρική Αντιοξειδωτική Δράση (CAA – Cellular Antioxidant Activity)

Η χρήση των χημικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης είναι ευρέως διαδεδομένη και παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών, ωστόσο η συσχέτιση της *in vivo* δράσης που προκύπτει από τα αποτελέσματα είναι αμφισβητήσιμη. Σε πολλές χημικές μεθόδους, όπως αποτυπώθηκε παραπάνω, οι συνθήκες pH και θερμοκρασίας δεν είναι φυσιολογικές, ενώ σε καμία μέθοδο δεν λαμβάνεται υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα, η πρόσληψη και ο μεταβολισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Παράλληλα, στα πρωτόκολλα των μεθόδων δεν περιλαμβάνονται βιολογικά υποστρώματα, τα οποία χρήζουν προστασίας, σχετικά οξειδωτικά σώματα, ή ενώσεις που συμμετέχουν σε αντιδράσεις τόσο στην υδατική όσο και στην λιπιδική φάση. Γίνεται σαφές ότι τα βιολογικά συστήματα παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγαλύτερη πολυπλοκότητα σε σχέση με τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε *in vitro* περιβάλλον και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν με πολλαπλούς μηχανισμούς. Παρουσιάζεται, επομένως, η ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδου που θα αντικατοπτρίζει με καλύτερο τρόπο την *in vivo* δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων.

Τα μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας προσεγγίζουν τα προβλήματα της πρόσληψης, της κατανομής και του μεταβολισμού των αντιοξειδωτικών, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν σχετικά χαμηλό κόστος. Γι' αυτόν τον σκοπό έχει αναπτυχθεί η μέθοδος κυτταρικής αντιοξειδωτικής δράσης (CAA – Cellular Antioxidant Activity), η οποία αντιπροσωπεύει καλύτερα την πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων σε σχέση με τις ευρέως διαδεδομένες χημικές μεθόδους και αποτελεί σημαντικό

εργαλείο για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σε τρόφιμα, φυτοχημικά και συμπληρώματα διατροφής με πιθανή βιολογική δράση.

Η μέθοδος CAA χρησιμοποιεί καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ήπατος HepG2, στα οποία προστίθενται οι αντιοξειδωτικές ενώσεις ή τα εκχυλίσματα φρούτων και ο ανιχνευτής φθορισμού DCFH-DA (2',7'-διχλωροδιυδροφλουορεσκεΐνη διοξική). Τα αντιοξειδωτικά συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη και ένα μέρος τους την διαπερνά και παραμένει εντός του κυττάρου. Το μόριο DCFH-DA διαχέεται εντός του κυττάρου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης όπου οι κυτταρικές εστεράσες το διασπούν στο πιο πολικό DCFH, το οποίο παραμένει, επίσης, εντός του κυττάρου. Στη συνέχεια, προστίθεται στην κυτταρική καλλιέργεια το μόριο AAPH, το οποίο διαχέεται εντός του κυττάρου και αποσυντίθεται με τον σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου. Με την σειρά τους οι ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου αντιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας, με αυτόν τον τρόπο, περισσότερες ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την οξείδωση του ενδοκυτταρικού DCFH στο φθορίζων DCF (2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνη διοξική). Τα αντιοξειδωτικά αποτρέπουν την οξείδωση του DCFH και των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τον σχηματισμό του DCF και επομένως την εκπομπή φθορισμού του (Wolfe & Liu, 2007). Η εκπομπή φθορισμού μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 538 nm μετά από διέγερση στα 485 nm κάθε 5 min για 1 h.

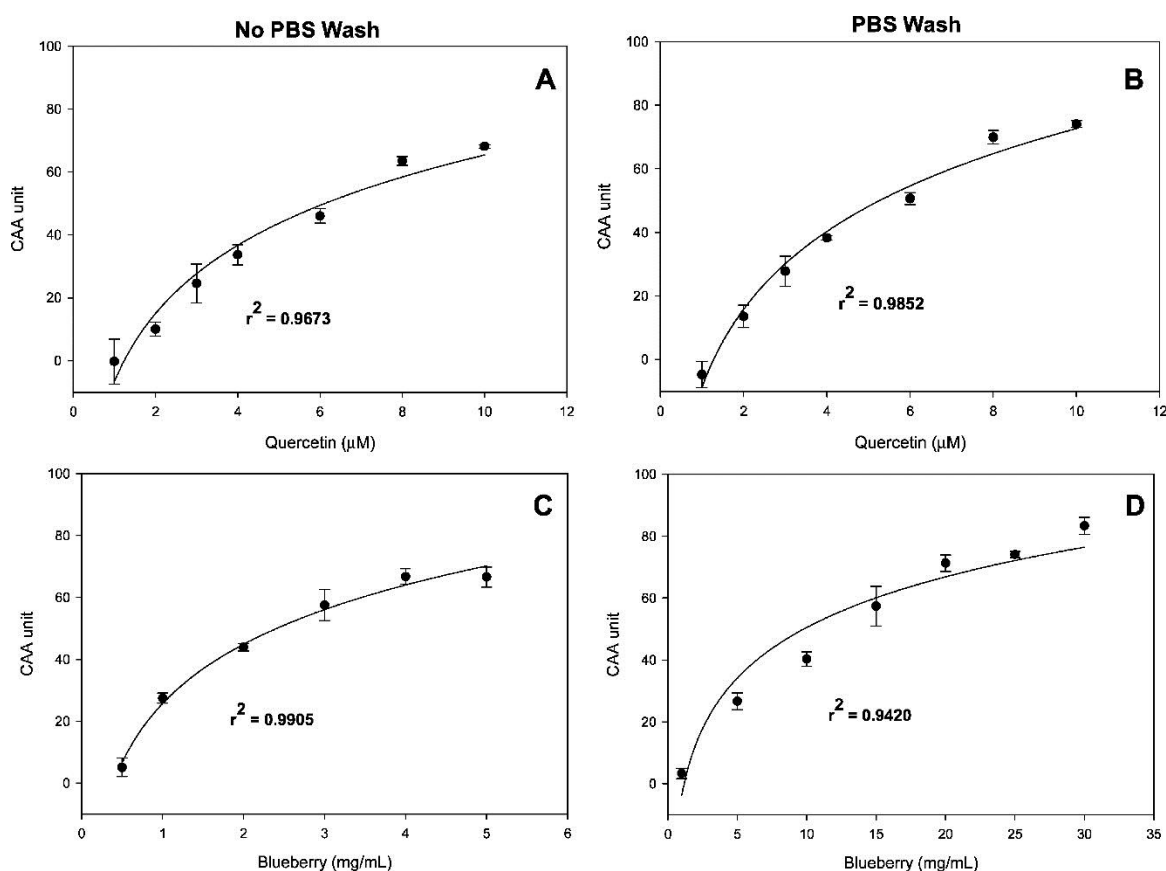
Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων εφαρμόζεται η τεχνική AUC – Area Under the Curve που χρησιμοποιείται στην μέθοδο ORAC και ειδικότερα υπολογίζεται η τιμή CAA για τα δείγματα σύμφωνα με την σχέση:

$$CAA\ unit = 1 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right)$$

όπου $\int SA$ η περιοχή κάτω από την καμπύλη φθορισμού των δειγμάτων και $\int CA$ η περιοχή κάτω από την καμπύλη φθορισμού του λευκού προσδιορισμού. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η τιμή EC_{50} για κάθε δείγμα από την γραφική παράσταση του $\log(f_a/f_u)$ ως προς το $\log(C)$ όπου f_a το κλάσμα που επηρεάζεται (*CAA unit*) και f_u το κλάσμα που δεν επηρεάζεται ($1 - CAA\ unit$) από την επίδραση των δειγμάτων. Οι τιμές EC_{50} μετατρέπονται σε τιμές CAA και εκφράζονται σε μmol ισοδύναμα κουερσετίνης

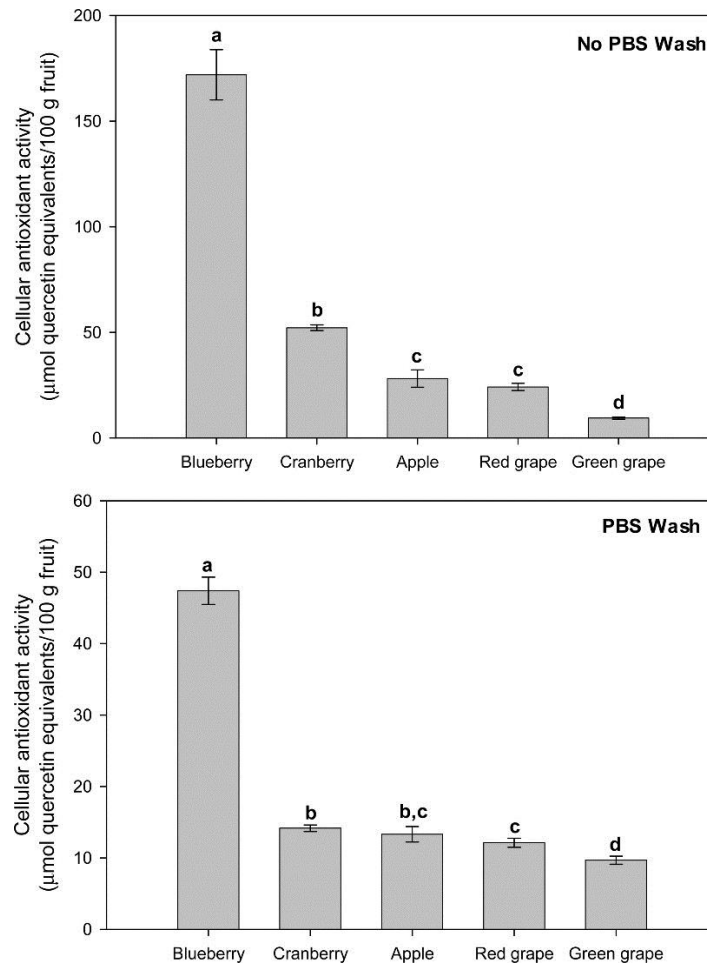
(QE) ανά 100 g δείγματος, χρησιμοποιώντας την μέση τιμή EC_{50} της κουερσετίνης από πέντε διαφορετικά πειράματα (Wolfe et al., 2008).

Η εφαρμογή της μεθόδου CAA σε εκχυλίσματα φρούτων και στην κουερσετίνη πραγματοποιείται με την έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS πριν την προσθήκη των αντιοξειδωτικών και πριν την προσθήκη του μορίου AAPH, που προκαλεί τον σχηματισμό υπεροξειδικών ριζών, και χωρίς την προσθήκη του PBS. Τα αποτελέσματα σε μονάδες CAA αποδίδονται στο **Σχήμα 4.11**.



Σχήμα 4.11: Η μέθοδος CAA σε κουερσετίνη και μπλε μύρτιλο χωρίς την έκπλυση με PBS (A,C) και με την έκπλυση με PBS αντίστοιχα (B,D) (Wolfe & Liu, 2007).

Από τα δεδομένα των γραφημάτων υπολογίζονται οι τιμές EC_{50} για CAA unit = 50 και στο **Σχήμα 4.12** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετατροπής των τιμών EC_{50} σε ισοδύναμα κουερσετίνης για εκχυλίσματα φρούτων.



Σχήμα 4.12: Η μέθοδος CAA για μπλε μύρτιλο (*blueberry*), φίγγι (*cranberry*), μήλο (*apple*), κόκκινο σταφύλι (*red grape*) και πράσινο σταφύλι (*green grape*) με την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PBS και χωρίς. Οι μπάρες με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p < 0,05$) (Wolfe & Liu, 2007).

Σύμφωνα με το **Σχήμα 4.12** το μπλε μύρτιλο παρουσιάζει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ως προς την αναστολή της οξειδωσης του DCFH από τις υπεροξειδικές ρίζες και ακολουθούν το φίγγι, το κόκκινο σταφύλι και τελευταίο το πράσινο σταφύλι. Η σειρά της αποτελεσματικότητας δεν διαφοροποιείται στην περίπτωση της χρήσης του ρυθμιστικού διαλύματος PBS, ωστόσο τα δείγματα φρούτων παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές EC_{50} στο πρωτόκολλο που δεν χρησιμοποιείται έκπλυση με PBS σε σχέση με αυτό στο οποίο χρησιμοποιείται.

Σύμφωνα με το μοντέλο CAA, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να δράσουν με δύο διαφορετικούς τρόπους. Είναι δυνατό να δράσουν στην επιφάνεια του κυττάρου διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση των υπεροξειδικών ριζών ή μπορούν να αντιδράσουν ενδοκυτταρικά με τα ROS που σχηματίζονται. Επομένως, η δυνατότητα των ενώσεων να συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη και να διαχέονται εντός του

κυττάρου, σε συνδυασμό με την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της εξεταζόμενης ένωσης. Επιπλέον, οι υδρόφοβες ενώσεις ενσωματώνονται περισσότερο εντός των κυτταρικών μεμβράνων, όπου μπορούν να διακόψουν οξειδωτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις, ενώ οι πιο υδρόφιλες ενώσεις αντιδρούν με τις επιφάνειες των μεμβράνων μέσω δεσμών υδρογόνου, με αποτέλεσμα να τις προστατεύουν από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό stress (Wolfe & Liu, 2007).

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε για 25 κοινά φρούτα υπέδειξε ότι οι τιμές CAA σχετίζονται σημαντικά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με την μέθοδο Folin-C και τις τιμές ORAC, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης των τιμών CAA σε σχέση με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φρούτων βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος από αυτόν των τιμών CAA σε σχέση με τις τιμές ORAC (Wolfe et al., 2008).

4.2.2 Κυκλική Βολταμμετρία (CV – Cyclic Voltammetry)

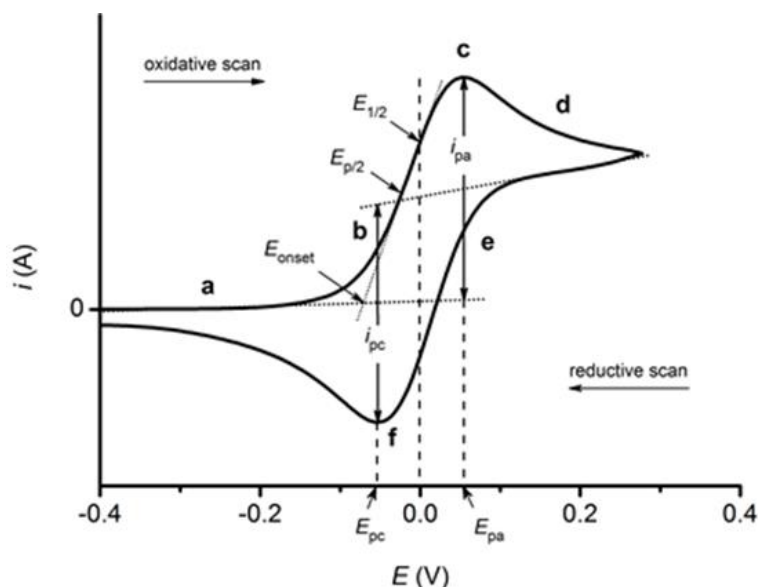
Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις δρουν ως αναγωγικά σώματα και με αυτόν τον τρόπο είναι ηλεκτροχημικά ενεργές. Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των ενώσεων αυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της ένωσης και τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας και δύναμης. Επομένως, η ηλεκτροχημική ανάλυση παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ενώσεων, καθώς οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι γρήγορες, έχουν ευαισθησία και σχετικά χαμηλό κόστος. Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων με ηλεκτροχημικές μεθόδους μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την μέτρηση της ηλεκτροχημικής οξείδωσης στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων, είτε με την ηλεκτροχημική μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης που προκύπτουν από την βιοκαταλυτική μετατροπή με την χρήση ενζύμου οξειδάσης ή υπεροξειδάσης, που βρίσκονται ακινητοποιημένα στα ηλεκτρόδια (Arak et al., 2017).

Η κυκλική βολταμμετρία αποτελεί ηλεκτροχημική μέθοδο και εκτιμά την αναγωγική δύναμη, δηλαδή την ικανότητα μιας ένωσης να προκαλεί αναγωγή και να χάνει ηλεκτρόνια. Με βάση αυτή τη μεθοδολογία καθίσταται δυνατή η άμεση μέτρηση της ικανότητας της ένωσης να δίνει ηλεκτρόνια, η οποία οξειδώνεται, ενώ παράλληλα

είναι δυνατό να μετρηθεί η συνολική συγκέντρωση των αναγωγικών σωμάτων στο δείγμα χωρίς την μέτρηση συγκεκριμένων ενώσεων.

Η διαδικασία της κυκλικής βολταμετρίας περιλαμβάνει την κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων και την εισαγωγή τους σε κυψέλη, στην οποία τοποθετούνται τρία ηλεκτρόδια: το ηλεκτρόδιο εργασίας, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το αντίθετο ηλεκτρόδιο. Το δυναμικό εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας με σταθερό ρυθμό (V/sec) προς την φορά του θετικού δυναμικού, όπου προσδιορίζονται τα αναγωγικά σώματα, ή προς την φορά του αρνητικού δυναμικού, όπου μετρώνται τα οξειδωτικά σώματα. Κατά την διαδικασία της κυκλικής βολταμετρίας σχεδιάζεται το βολταμμογράφημα, το οποίο έχει στον άξονα των τιμών x τις τιμές του δυναμικού (E) σε V και στον άξονα των τιμών y τις τιμές του ηλεκτρικού ρεύματος (i) σε A. Η αναγωγική δύναμη της ένωσης, δηλαδή η ικανότητά της να παρέχει ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο εργασίας, υπολογίζεται από το βολταμμογράφημα και ειδικότερα από τις τιμές μέγιστου δυναμικού ($E_{p(a)}$) και από το ρεύμα ανόδου (AC). Επιπλέον, η μέτρηση του δυναμικού κατά την μισή αύξηση του ρεύματος, στο ανοδικό κύμα (AW), αντιστοιχεί στην τιμή δυναμικού $E_{1/2}$ η οποία είναι μοναδική για κάθε ένωση και όσο χαμηλότερη είναι, τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα της ένωσης να δράσει ως αναγωγικό σώμα. Ταυτόχρονα, όσο χαμηλότερο είναι το μέγιστο δυναμικό $E_{p(a)}$ στο ανοδικό κύμα που αντιστοιχεί στην ένωση, τόσο υψηλότερη είναι η δυνατότητα της ένωσης να παρέχει τα ηλεκτρόνιά της και επομένως η αναγωγική της δύναμη (Kohen et al., 1999).

Το **Σχήμα 4.13** αποτελεί ένα παράδειγμα βολταμμογραφήματος στο οποίο αποτυπώνεται ο τρόπος με τον οποίον προκύπτουν οι τιμές δυναμικού και ρεύματος, ενώ ταυτόχρονα κατά το ανοδικό κύμα πραγματοποιείται η οξείδωση της ένωσης, όπου χάνει ηλεκτρόνια και παρέχονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας, ενώ κατά το καθοδικό κύμα η αναγωγή της κατά την οποία δέχεται ηλεκτρόνια. Γίνεται κατανοητό το γεγονός ότι για τον προσδιορισμό της αναγωγικής δύναμης, δηλαδή της ικανότητας της ένωσης να προκαλεί αναγωγή και να οξειδώνεται, σημαντικότερη είναι η τιμή δυναμικού ανόδου E_{pa} από την αντίστοιχη καθόδου E_{pc} .



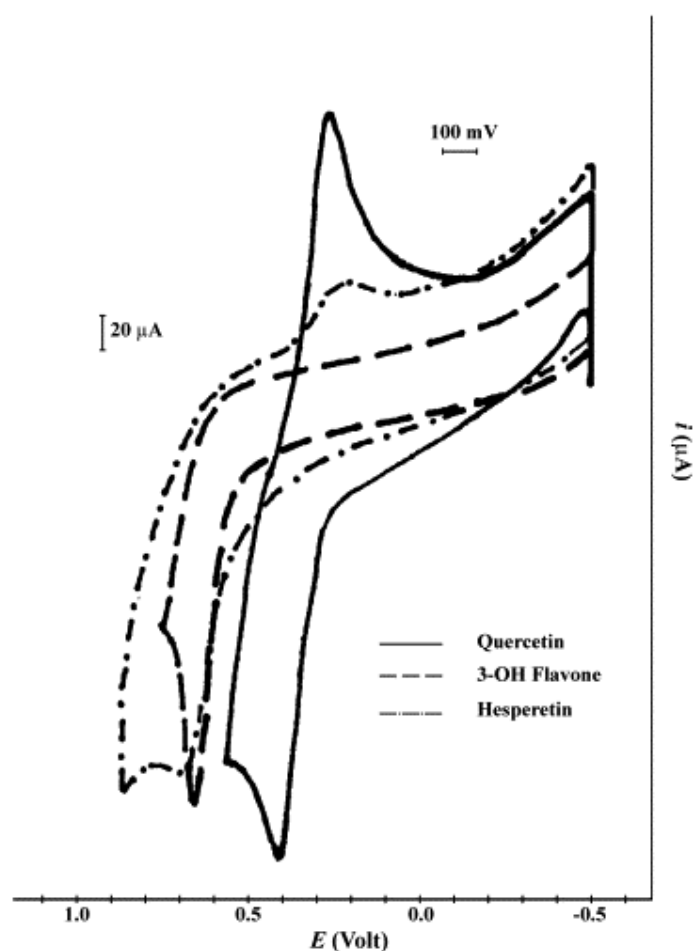
Σχήμα 4.13: Τυπικό βολταμμογράφημα στο οποίο υποδεικνύονται οι τιμές δυναμικού ανόδου (E_{pa}) και το ρεύμα ανόδου (i_{pa}) κατά την οξειδωτική σάρωση και οι τιμές δυναμικού καθόδου (E_{pc}) και το ρεύμα καθόδου (i_{pc}) κατά την αναγωγική σάρωση (<https://www.ossila.com/pages/cyclic-voltammetry>).

Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής δύναμης και της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης των φλαβονοειδών, εφαρμόστηκαν η μέθοδος FRAP και η κυκλική βολταμμετρία. Τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των φλαβονοειδών, τα οποία προσδιορίζονται με την μέθοδο της κυκλικής βολταμμετρίας, στοχεύουν στην σύγκριση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς τους σε σχέση με τα δεδομένα που προκύπτουν από την μέθοδο FRAP. Η μέθοδος FRAP πραγματοποιείται με την γνωστή, πλέον, διαδικασία που καταγράφεται στο κεφάλαιο 3 και παράγραφο 3.2.1, με την διαφορά ότι η απορρόφηση παρακολουθείται στα 595 nm αντί στα 593 nm. Για την εφαρμογή της κυκλικής βολταμμετρίας χρησιμοποιούνται τρία ηλεκτρόδια, ειδικότερα ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο άνθρακα, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο καλώδιο πλατίνας και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος (SCE – saturated calomel electrode). Πριν από κάθε μέτρηση το ηλεκτρόδιο εργασίας στιλβώνεται με ύφασμα στίλβωσης και διάλυμα αλουμίνας σε διαφορετικές διαστάσεις (1,0, 0,3 και 0,05 μm). Το διάλυμα περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα οξικού ιόντος 300 mM και pH = 3,6 και HCl 20 mM για να διατηρούνται οι ίδιες συνθήκες που επικρατούν στην μέθοδο FRAP. Ο τρισθενής σίδηρος Fe^{3+} αναλύεται υπό την παρουσία του μορίου TPTZ με σκοπό να προκύψει

το δυναμικό καθόδου (E_{pc}), στις ίδιες συνθήκες της μεθόδου FRAP. Το φλαβονοειδές προστίθεται στο διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 0,1 mM.

Βρέθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης στα 595 nm και της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών, εκτός από την χρυσίνη, την 5-υδροξυφλαβόνη και την 7-υδροξυφλαβόνη που παρουσιάστηκαν ανενεργές. Η διαφορά της απορρόφησης μετά από 4 min στους 37°C για το πιο ενεργό φλαβονοειδές, την κουερσετίνη, ως προς την συγκέντρωσή της είναι γραμμική. Ωστόσο, το Trolox, ο δισθενής θεικός σίδηρος και το ουρικό οξύ προκαλούν ταχεία αύξηση της απορρόφησης και πριν το πέρας 4 min φτάνουν σε πλατώ. Τα υπόλοιπα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη εμφανίζουν αύξηση της απορρόφησης μετά το πέρας 4 min.

Στο **Σχήμα 4.14** παρουσιάζονται τρία τυπικά βολταμμογραφήματα για την κουερσετίνη, την 3-υδροξυφλαβόνη και την εσπερετίνη.



Σχήμα 4.14: Βολταμμογραφήματα με την μέθοδο της κυκλικής βολταμμετρίας για την κουερσετίνη (*quercetin*), την 3-υδροξυφλαβόνη (*3-OH flavone*) και την εσπερετίνη (*hesperetin*) (Firuzi et al., 2005).

Όλες οι ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσίασαν μέγιστο δυναμικό ανόδου μεταξύ +0,30 και +1,20 V σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς SCE (Firuzi et al., 2005). Σύμφωνα με το βολταμμογράφημα του **Σχήματος 4.14** η κουερσετίνη εμφανίζει το μεγαλύτερο δυναμικό ανόδου E_{pa} και ακολουθούν εσπερετίνη και 3-υδροξυφλαβόνη. Ως εκ τούτου, η αναγωγική δύναμη ακολουθεί την αντίστροφη κατεύθυνση με υψηλότερη της 3-υδροξυφλαβόνης, καθώς όσο υψηλότερη είναι η τιμή δυναμικού ανόδου E_{pa} τόσο χαμηλότερη είναι η ικανότητα της ένωσης να προκαλεί αναγωγή και να οξειδώνεται. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η αύξηση στη ποσότητα των υδροξυλίων στους υποκαταστάτες των φλαβονοειδών προκαλεί γραμμική μείωση του μέγιστου δυναμικού ανόδου E_{pa} . Επομένως, φλαβονοειδή με περισσότερα υποκατεστημένα υδροξύλια παρουσιάζουν υψηλότερη αναγωγική δύναμη. Παράλληλα, με την αύξηση των υποκατεστημένων υδροξυλίων αυξάνονται γραμμικά οι τιμές FRAP που μετρούνται στα 4 min. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει ότι όσο περισσότερα υποκατεστημένα υδροξύλια περιέχει στο μόριό του ένα φλαβονοειδές, τόσο υψηλότερη είναι η αναγωγική του δύναμη και η αντιοξειδωτική του δράση. Παράλληλα, η μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ ενός οξειδωτικού και ενός αναγωγικού σώματος διευκολύνεται όταν το δυναμικό καθόδου E_{pc} του οξειδωτικού είναι μεγαλύτερο από το δυναμικό ανόδου E_{pa} του αναγωγικού, ωστόσο η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και στην αντίστροφη περίπτωση με τον όρο ότι η διαφορά να μην ξεπερνά τα 0,4 V. Επομένως, για την μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ του Fe^{3+} ($E_{pc} = +0,18$) και των αντιοξειδωτικών ενώσεων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενώσεις των οποίων τα δυναμικά ανόδου E_{pa} να μην ξεπερνούν το +0,7 V.

Η συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου FRAP και της κυκλικής βολταμμετρίας είναι αντίστροφη και γραμμική και τα αποτελέσματα συγκλίνουν μεταξύ των μεθόδων (Firuzi et al., 2005). Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί ότι η ακινητοποίηση της ρίζας DPPH· στο ηλεκτρόδιο εργασίας για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων, προσφέρει υψηλότερα ρεύματα οξειδοαναγωγής, βελτιώνει την αντιστρεψιμότητα του ηλεκτροχημικού συστήματος και μειώνει σημαντικά την αντίσταση στην μεταφορά του ηλεκτρικού φορτίου στο ηλεκτρόδιο. Επιπλέον, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με την αντίδραση των αντιοξειδωτικών ενώσεων με την ρίζα DPPH·. Αυτή η τεχνική είναι αξιόπιστη, απλή και απαιτεί μικρότερη κατανάλωση αντιδραστήριου (2 μ L από 3

mL), ενώ ταυτόχρονα εξαλείφει τους περιορισμούς που δημιουργούνται με την κλασική φασματοφωτομετρική μέθοδο DPPH, που περιλαμβάνουν την αστάθεια του αντιδραστηρίου, μετρήσεις μόνο στο οργανικό μέσο και επιπλοκές που προκύπτουν από την ανάλυση έγχρωμων δειγμάτων (Ziyatdinova et al., 2017).

5. Συμπεράσματα και Συζήτηση

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης συστατικών τροφίμων και καθαρών αντιοξειδωτικών ενώσεων απασχολεί μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας. Η αντιοξειδωτική και η αντιριζική δράση και ικανότητα μιας ένωσης ή ενός συστατικού τροφίμου συνδέεται με πολλαπλά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία και παράλληλα παρουσιάζει μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς οι ενώσεις με υψηλή αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση προσφέρουν υψηλότερη σταθεροποίηση στα τρόφιμα και στα φάρμακα. Ωστόσο, όπως γίνεται κατανοητό, η μελέτη αυτή απαιτεί την κατάλληλη γνώση των παραμέτρων που διέπουν την εκάστοτε μέθοδο, των χαρακτηριστικών των ενώσεων που πρόκειται να μελετηθούν και την διευκρίνιση του σκοπού της μελέτης.

Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται πάνω από μία μέθοδος για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, με σκοπό συγκριθούν τα αποτελέσματα και να εκτιμηθεί η ένωση με βάση διαφορετικά χαρακτηριστικά τα οποία της προσδίδουν την αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Παραδειγματικά, η μέθοδος FRAP προσδιορίζει την ικανότητα μίας ένωσης να ανάγει το σίδηρο, μία ικανότητα που είναι πολύ σημαντική για μια αντιοξειδωτική ένωση, καθώς οι αντιοξειδωτικές ενώσεις δρουν ως αναγωγικά σώματα και η αναγωγική τους δύναμη αποτελεί μέτρο της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Ωστόσο, η μέτρηση μόνο αυτής της παραμέτρου της ένωσης δεν επαρκεί για την συνολική της αξιολόγηση ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί δεύτερη μέθοδος για την αξιολόγηση, όπως για παράδειγμα η μέθοδος DPPH, η οποία προσδιορίζει την ικανότητα της ένωσης να ανάγει την αζωτούχο ρίζα DPPH· σε DPPH₂ με ταυτόχρονη αλλαγή χρώματος. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή του

συνδυασμού των μεθόδων δεν πρέπει να γίνεται τυχαία. Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι DPPH και FRAP παρουσιάζουν καλό συσχετισμό μεταξύ τους, καθώς τα αποτελέσματά τους, όπως αποτυπώθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, συμπίπτουν και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στον ίδιο μηχανισμό αντίδρασης. Επομένως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο συσχετισμός μεταξύ των μεθόδων και η παράμετρος της αντιοξειδωτικής ένωσης που προσδιορίζουν.

Για την έκφραση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής, στις μεθόδους ORAC, LPIC και ABTS, της τεχνικής της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC), με κύρια εκπρόσωπο την μέθοδο ORAC. Η τεχνική AUC αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, καθώς συνδυάζει σε μία ποσότητα τόσο το ποσοστό αναστολής που προκαλεί η αντιοξειδωτική ένωση, όσο και τον χρόνο της αναστολής. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν εύκολα να συγκριθούν διαφορετικά δείγματα, στα οποία εφαρμόζεται η ίδια μέθοδος. Στην μέθοδο ORAC, η ένωση με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση προκαλεί καλύτερη αναστολή της αποσύνθεσης της φλουορεσκεΐνης, με αποτέλεσμα να παρατείνεται ο χρόνος που απαιτείται για την μείωση της εκπομπής φθορισμού, δηλαδή της απορρόφησης, ενώ ταυτόχρονα το εμβαδόν της καμπύλης που αντιπροσωπεύει την απορρόφηση ως προς τον χρόνο για την δεδομένη ένωση είναι μεγαλύτερο. Επομένως, προκύπτει ότι όσο μεγαλύτερη εμφανίζεται η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) μείωσης της εκπομπής φθορισμού, στην περίπτωση της μεθόδου ORAC, για την αντιοξειδωτική ένωση που μελετάται, τόσο υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει αυτή η ένωση. Με τον ίδιο τρόπο η τεχνική AUC μπορεί να εφαρμοστεί στις μεθόδους ABTS, όπου το κατιόν της ρίζας ABTS^{•+} ανάγεται από τα αντιοξειδωτικά και αποχρωματίζεται και στην LPIC, όπου η μείωση του φθορισμού οφείλεται στην οξείδωση του C₁₁-BODIPY από τις υπεροξειδικές ρίζες του μορίου AAPH.

Επιπλέον, βρέθηκε συσχετισμός του αριθμού των υδροξυλομάδων που περιέχονται στην αντιοξειδωτική ένωση με την αντιοξειδωτική και αντιριζική της δράση. Ειδικότερα, στο κεφάλαιο 4.1.2 όπου πραγματοποιείται μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης για τέσσερα στιλβένια με διαφορά στον αριθμό των υδροξυλομάδων με τις μεθόδους ORAC, ABTS και FRAP βρέθηκε ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση αποδίδεται στο στιλβένιο με τις περισσότερες υδροξυλομάδες (οξυ-ρεσβερατρόλη, 4 -OH). Οι μέθοδοι ABTS και FRAP

συμπίπτουν μεταξύ τους, ενώ η μέθοδος ORAC εμφανίζει την ρεσβερατρόλη, η οποία περιέχει τρεις υδροξυλομάδες στο μόριό της, ως ισχυρότερο αντιοξειδωτικό. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος ORAC βασίζεται σε HAT μηχανισμό αντίδρασης, ενώ η FRAP και η ABTS σε SET μηχανισμό. Παράλληλα, από το κεφάλαιο 4.2.2 όπου μελετάται η αντιοξειδωτική δράση με την ηλεκτροχημική μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας σε φλαβονοειδή, προκύπτει ότι η αύξηση των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων στα φλαβονοειδή συνεπάγεται με υψηλότερη αναγωγική δύναμη και επομένως με υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση.

Το βασικό πρόβλημα που εντοπίζεται από την συγκριτική μελέτη των μεθόδων *in vitro* είναι ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν για τις ενώσεις ή τα συστατικά τροφίμων με την βιολογική τους δράση εντός ενός πολύπλοκου βιολογικού συστήματος, όπως είναι ο άνθρωπος. Γίνεται σαφές ότι μία αντιοξειδωτική ένωση ή ένα συστατικό τροφίμου που παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση *in vitro*, εμφανίζει μεγάλες πιθανότητες να παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση *in vivo*. Επομένως, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης με τις γνωστές μεθόδους αποδίδει σημαντικά αποτελέσματα για την πρόβλεψη της βιολογικής δράσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων *in vivo*. Ωστόσο, δημιουργείται η ανάγκη για τον προσανατολισμό της έρευνας στον σχεδιασμό μεθόδου, η οποία έχει τη δυνατότητα να προσομοιώνει καλύτερα και σε μεγαλύτερο βαθμό ένα βιολογικό σύστημα. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.6** όπου καταγράφονται και συγκρίνονται η μέθοδοι που μελετώνται, προκύπτει ότι οι μέθοδοι ORAC, DMPD, TRAP και LPIC κατέχουν πολύ καλό συσχετισμό *in vivo*. Τα χαρακτηριστικά που αποδίδουν αυτό το σημαντικό πλεονέκτημα ταξινομούνται: στον σχηματισμό υπεροξειδικών ριζών ή ριζών με παρόμοιο οξειδοαναγωγικό δυναμικό με τις υπεροξειδικές και αλκοξειδικές ρίζες, στην χρήση σχετικών βιολογικά οξειδωτικών υποστρωμάτων, στην συνεχή παραγωγή ελεύθερων ριζών και στην χρήση πρότυπων συστημάτων μεμβρανών, όπως λιποσώματα με διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, τα οποία προσομοιώνουν την κυτταρική μεμβράνη. Παράλληλα, έχει αναπτυχθεί η μέθοδος CAA η οποία με την χρήση κυτταρικών καλλιεργειών αποτυπώνει σε μεγάλο βαθμό την βιολογική δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων.

Επομένως, η ενσωμάτωση αυτών των παραμέτρων σε συνδυασμό με φυσιολογικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό μίας κατάλληλης μεθόδου που θα προσδιορίζει με σιγουριά την βιολογική δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων και των συστατικών τροφίμων. Σε κάθε περίπτωση, για τον σχεδιασμό μίας νέας μεθόδου με τις προδιαγραφές που προαναφέρθηκαν απαιτείται εργαστηριακή έρευνα και πληθώρα πειραματικών δοκιμών με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου και την συγκριτική μελέτη με τις υπόλοιπες μεθόδους προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης.

Βιβλιογραφία

1. **Apak**, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (Eds.). (2017). Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications.
2. **Arts**, M. J., Dallinga, J. S., Voss, H. P., Haenen, G. R., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567-570.
3. **Asghar**, M. N., Khan, I. U., Arshad, M. N., & Sherin, L. (2007). Evaluation of Antioxidant Activity Using an Improved DMPD Radical Cation Decolorization Assay. *Acta Chimica Slovenica*, 54(2).
4. **Balogh**, E., Hegedűs, A., & Stefanovits-Bányai, É. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia horticulturae*, 125(3), 332-336.
5. **Benzie**, I. F., & **Strain**, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
6. **Dávalos**, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 48-54.
7. **Dureja**, A. G., & **Dhiman**, K. (2012). Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 6(3).
8. **Faustino**, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308-9322.

9. **Feng, W.**, Hao, Z., & Li, M. (2017). Isolation and structure identification of flavonoids. *Flavonoids, from biosynthesis to human health/Ed. by Justino GC Intech Open*, 17-43.
10. **Firuzi, O.**, Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1-3), 174-184.
11. **Forrest, V. J.**, Kang, Y. H., McClain, D. E., Robinson, D. H., & Ramakrishnan, N. (1994). Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 675-684.
12. **Freinbichler, W.**, Colivicchi, M. A., Stefanini, C., Bianchi, L., Ballini, C., Misini, B., ... & Della Corte, L. (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cellular and molecular life sciences*, 68(12), 2067-2079.
13. **Huang, D.**, Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
14. **Huang, D.**, Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815-1821.
15. **Karuna, D. S.**, Dey, P., Das, S., Kundu, A., & Bhakta, T. (2018). In vitro antioxidant activities of root extract of *Asparagus racemosus* Linn. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(1), 60-65.
16. **Kaurinovic, B.**, & **Vastag, D.** (2019). Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. In *Antioxidants* (pp. 1-20). London, UK: IntechOpen.
17. **Kaushik, V.**, Chaudhary, G., Ahmad, S., & Saini, V. (2015). Assays for Natural Antioxidant. *Global Journal of Biology Agriculture and Health Sciences*, 4(3), 130-136.

18. **Kelly**, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental health perspectives*, 106(7), 375-384.
19. **Kohen**, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M., & Tirosh, O. (1999). Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in enzymology*, 300, 285-296.
20. **Kupina**, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, First action 2017.13. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1466-1472.
21. **Luis**, A., Domingues, F., Gil, C., & Duarte, A. P. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 886-893.
22. **Maillard**, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., & Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *LWT-Food science and Technology*, 29(3), 238-244.
23. **Mareček**, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science*, 73, 40-45.
24. **Menghani**, E., Sudhanshu, R. N., & Mittal, S. (2011). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of *Onosma bracteatum*. *Int. J. Pharm. Res. Dev*, 4, 16-20.
25. **Mishra**, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
26. **Mondal**, B., Ramproshad, S., Mondal, M. & Hossain, Md. (2017). Evaluation of edible herb *Solanum tuberosum* L. to be used as nutraceuticals. *International Journal of Pharmacy*, 7(3), 1-9.

27. **Moscho**, A., Orwar, O., Chiu, D. T., Modi, B. P., & Zare, R. N. (1996). Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11443-11447.
28. **Mraïhi**, F., Journi, M., Chérif, J. K., Sokmen, M., Sokmen, A., & Trabelsi-Ayadi, M. (2013). Phenolic contents and antioxidant potential of Crataegus fruits grown in Tunisia as determined by DPPH, FRAP, and β -carotene/linoleic acid assay. *Journal of chemistry*, 2013.
29. **Musa**, A. F. (2021). Tocotrienol: An Underrated Isomer of Vitamin E in Health and Diseases. In *Vitamin E in Health and Disease-Interactions, Diseases and Health Aspects*. IntechOpen.
30. **Ndhlala**, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?. *Molecules*, 15(10), 6905-6930.
31. **Nunes**, X. P., Silva, F. S., Almeida, J. R. G. D. S., Barbosa Filho, J. M., de Lima, J. T., de Araújo Ribeiro, L. A., & Júnior, L. J. Q. (2012). Biological oxidations and antioxidant activity of natural products (pp. 1-20). New York: *INTECH Open Access Publisher*.
32. **Nyau**, V., Prakash, S., Rodrigues, J., & Farrant, J. (2015). Antioxidant activities of Bambara groundnuts as assessed by FRAP and DPPH assays. *Am. J. Food Nutr*, 3, 7-11.
33. **Oliveira**, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
34. **Olszowy**, M., & **Dawidowicz**, A. L. (2018). Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds?. *Chemical Papers*, 72(2), 393-400.
35. **Piazzon**, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10677-10683.

36. **Pinchuk**, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and physics of lipids*, 165(6), 638-647.
37. **Rahal**, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.
38. **Raudonis**, R., Raudone, L., Jakstas, V., & Janulis, V. (2012). Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. *Journal of Chromatography A*, 1233, 8-15.
39. **Re**, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
40. **Rodríguez-Bonilla**, P., Gandía-Herrero, F., Matencio, A., García-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2017). Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Analytical Methods*, 10(9), 2994-3000.
41. **Sachdeva**, M., Karan, M., Singh, T., & Dhingra, S. (2014). Oxidants and antioxidants in complementary and alternative medicine: A review. *Spatula DD*, 4(1), 1-16.
42. **Sánchez-Rangel**, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
43. **Santos-Sánchez**, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism (pp. 1-28). London, UK: IntechOpen.
44. **Scalzo**, R., Morassut, M., & Rapisarda, P. (2012). Oxygen radical scavenging capacity of phenolic and non-phenolic compounds in red and white wines. *Open Life Sciences*, 7(1), 146-158.

45. **Schlesier**, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
46. **Shahidi**, F., & **Zhong**, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
47. **Shalaby**, E. A., & **Shanab**, S. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 7(10), 528-539.
48. **Špika**, M. J., Kraljić, K., & Škevin, D. (2016). Tocopherols: Chemical structure, bioactivity, and variability in Croatian virgin olive oils. In *Products from Olive Tree* (p. 317). BoD–Books on Demand.
49. **Swaminathan**, J., & **Ehrhardt**, C. (2011). Liposomes for pulmonary drug delivery. In *Controlled pulmonary drug delivery* (pp. 313-334). Springer, New York, NY.
50. **Tian**, B., Xiao, D., Hei, T., Ping, R., Hua, S., & Liu, J. (2020). The application and prospects of cyclodextrin inclusion complexes and polymers in the food industry: A review. *Polymer International*, 69(7), 597-603.
51. **Tirzitis**, G., & **Bartosz**, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2).
52. **Ueno**, H., Yamakura, S., Arastoo, R. S., Oshima, T., & Kokubo, K. (2014). Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using β -carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials*, 2014.
53. **Verde**, V., Fogliano, V., Ritieni, A., Maiani, G., Morisco, F., & Caporaso, N. (2002). Use of N, N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma. *Free Radical Research*, 36(8), 869-873.
54. **Wang**, C. C., Chu, C. Y., Chu, K. O., Choy, K. W., Khaw, K. S., Rogers, M. S., & Pang, C. P. (2004). Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry*, 50(5), 952-954.

55. **Wolfe**, K. L., & **Liu**, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 8896-8907.
56. **Wolfe**, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., & Liu, R. H. (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8418-8426.
57. **Yaman**, S. O., & **Ayhanci**, A. (2021). Lipid Peroxidation. In *Lipid Peroxidation*. IntechOpen.
58. **Zhang**, J., Stanley, R. A., & Melton, L. D. (2006). Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membranes. *Molecular nutrition & food research*, 50(8), 714-724.
59. **Ziyatdinova**, G., Snegureva, Y., & Budnikov, H. (2017). Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH-modified electrode. *Electrochimica Acta*, 247, 97-106.
60. **Zulueta**, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*, 114(1), 310-316.

