



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οι ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία του *Mullus barbatus* και η χημική μελέτη τους σε δείγματα από τον Θερμαϊκό κόλπο.

GRADUATE THESIS

The beneficial properties for human health of *Mullus barbatus* and their chemical study in samples from the Thermaikos bay.



ΟΝΟΜΑ/NAMES OF STUDENTS

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΑΣΤΕΛΙΑΝΑΚΗ, ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΛΑΣΤΗΡΑΣ ΚΑΡΤΣΩΝΗΣ
STYLIANI KASTELIANAKI, NIKOLAOS PLASTYRAS KARTSONIS

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΤΡΑΠΑΛΗ ΜΑΡΙΑ
TRAPALI MARIA

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS
THE BENEFICIAL PROPERTIES FOR HUMAN HEALTH OF MULLUS BARBATUS AND THEIR CHEMICAL STUDY IN SAMPLES
FROM THE THERMAKOS BAY

STYLIANI KASTELIANAKI

20678106

stellakast@gmail.com

NIKOLAOS PLASTIRAS KARTSONIS

20678099

kartsonisn@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

SECOND SUPERVISOR

IOANNA KALANTZI

THIRD SUPERVISOR

PETROS KARKALOUSOS

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: <Γράψτε την ημερομηνία εξέτασης που φαίνεται στο πρόγραμμα>
Ονόματα εξεταστών Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής

ΜΑΡΙΑ ΤΡΑΠΑΛΗ

2^{ος} Εξεταστής

ΙΩΑΝΝΑ ΚΑΛΑΝΤΖΗ

3^{ος} Εξεταστής

ΠΕΤΡΟΣ ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Νικόλαος Πλαστήρας Καρτσώνης του Ζαχαρία, με αριθμό μητρώου 20678099 φοιτητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και η κάτωθι υπογεγραμμένη Στυλιανή Καστελιανάκη του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 20678106 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής δηλώνουν ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε 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, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Η Δηλούσα Καστελιανάκη Στυλιανή

Ο Δηλών Καρτσώνης Νικόλαος Πλαστήρας

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την καθηγήτρια κ. Μαρία Τράπαλη για την μεγάλη της συμβολή και καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και για την ψυχολογική υποστήριξη που προσέφερε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλουν να δωθούν στην κ. Ιωάννα Καλαντζήγια την πολύτιμη βοήθεια της και την λεπτομερή καθοδήγηση της στην παρούσα εργασία, καθώς και το ΕΛΚΕΘΕ του Ηρακλείου που μας παρείχαν τα δείγματα ώστε να πραγματοποιήσουμε την πτυχιακή μας. Επιπλέον, δεν μπορούμε παρά να εκφράσουμε την ευγνωμοσύνη μας στον καθηγητή κ. Πέτρο Καρκαλούσο για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων της μελέτης μας αλλά και για τις σημαντικές συμβουλές που προσέφερε για την ολοκλήρωση της ερευνητικής πτυχιακής μας εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στις οικογένειες και τους φίλους μας για την υποστήριξη και την αγάπη που μας έχουν δείξει καθόλη την διάρκεια των σπουδών μας.

Αφιέρωσεις

Την παρούσα πτυχιακή την αφιερώνουμε στις οικογένειες και στους φίλους μας.

Περίληψη

Αντικείμενο της εργασίας αποτελεί η μέτρηση των αντιοξειδωτικών παραγόντων σε αποξηραμένα δείγματα σάρκας του *Mullus barbatus*, με αποτέλεσμα να αξιολογηθούν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών του ψαριού και αντίστοιχα οι θετικές επιπτώσεις που προκαλούν στην υγεία.

Πυλώνας της καλής διατροφής είναι τα ψάρια, καθώς η κατανάλωση τους παρέχει θρεπτικά οφέλη που σχετίζονται με την αξιοποίηση πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, αλλά και ορισμένων μετάλλων και βιταμινών που περιέχονται σε αυτά. Τα ψάρια ή το ιχθυέλαιο περιέχουν ωμέγα-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που φαίνεται να διαδραματίζουν πολλούς ωφέλιμους ρόλους για την ανθρώπινη υγεία. Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται σε αυτά έχουν γίνει επιστημονικά ενδιαφέρουσες ενώσεις λόγω των πολλών οφελών τους, όπως η αντιγήρανση και η αντιφλεγμονώδης δράση. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να τονίσει, με τις τρέχουσες πληροφορίες, τη σημασία των αντιοξειδωτικών που παίζουν ρόλο στην κυτταρική απόκριση κατά του οξειδωτικού στρες, την δράση τους από την άμεση εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών έως την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών άμυνων και συνεπώς την καίρια σημασία τους στην σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης λήφθηκαν από τον Θερμαϊκό κόλπο 30 ψάρια του είδους *Mullus barbatus* διαφορετικών μεγεθών και φύλων. Κάθε δείγμα αποξηράθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) και έπειτα στάλθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών, όπου και φυλάσσονται στην κατάψυξη (-20°C) του Ερευνητικού Εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέθοδος εκχύλισης, FRAP, μέθοδος μέτρησης συνολικής φαινολικής δραστηριότητας, μέθοδος DPPH, ABTs, μέτρηση αντιδιαβητικής ικανότητας και τέλος ανάλυση στον αναλυτή LC-MS.

Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει μία ποσοτικοποιημένη ανάλυση των αντιοξειδωτικών που περιέχονται στους ιστούς του είδους *Mullus barbatus*. Μέσω των μεθόδων που

πραγματοποιήθηκαν μετρήθηκε η αναγωγική ικανότητα και πιο συγκεκριμένα οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, κυρίως φαινολικές ενώσεις και βιταμίνες, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της διατροφικής αξίας του είδους και την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Εμβαθύνοντας, με την μέθοδο φασματομετρίας μάζας (MS) ταυτοποιήθηκαν, το ασκορβικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το πυρογαλλικό, η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, η καμφερόλη και η κερσετίνη.

Με τις μεθόδους FRAP και ABTS, αλλά και με την στατιστική ανάλυση που ακολουθήσαμε, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει τάση υψηλότερης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα μικρότερα ψάρια συγκριτικά με τα μεγαλύτερα.

Λέξεις-κλειδιά: *Mullus barbatus* , Αντιοξειδωτικές δοκιμές, FRAP , Ελεύθερες ρίζες, Οξειδωτικό στρες

Abstract

The focus of this study is the quantification of antioxidant compounds in dried muscle samples of *Mullus barbatus*, aiming to assess the antioxidant levels in the fish and their corresponding health benefits.

Fish are fundamental to a balanced diet, providing nutritional advantages associated with the high biological value of their proteins, as well as various essential minerals and vitamins. Fish and fish oil are rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, which have been shown to play numerous beneficial roles in human health. The antioxidants present in fish have garnered significant scientific interest due to their diverse benefits, including anti-aging and anti-inflammatory effects. The objective of this study is to highlight, using current data, the importance of antioxidants in the cellular response to oxidative stress, their mechanisms ranging from the direct scavenging of free radicals to the enhancement of antioxidant defenses, and thus their critical role in maintaining human health.

In this study, 30 *Mullus barbatus* specimens of varying sizes and sexes were collected from the Thermaic Gulf. Each sample was dried at the Hellenic Centre for Marine Research (HCMR) and subsequently sent to the University of West Attica, Department of Biomedical Sciences, where they are stored at -20°C in the freezer of the Research Laboratory of Chemistry, Biochemistry, and Cosmetology. The samples underwent extraction procedures, the FRAP assay, total phenolic content measurement, DPPH assay, ABTS assay, evaluation of antidiabetic activity, and were ultimately analyzed using LC-MS.

The present study presents a quantified analysis of the antioxidants contained in the tissues of the species *Mullus barbatus* (red mullet). Through the methods carried out, the reducing capacity was measured, and more specifically the antioxidant factors, mainly phenolic compounds and vitamins, with the aim of better understanding the nutritional value of the species and the organism's antioxidant defense. Delving deeper, using mass spectrometry (MS), ascorbic acid, gallic acid, pyrogallol, catechin, caffeic acid, p-coumaric acid, kaempferol, and quercetin were identified.

Using the FRAP and ABTS methods, along with the statistical analysis that followed, we conclude that there is a tendency for higher concentrations of antioxidants in smaller fish compared to larger ones.

Key words: *Mullus barbatus*, Antioxidant assays, FRAP, Free radicals, Oxidative stress

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Περίληψη	vii
Abstract.....	ix
Συντομογραφίες.....	xvi
Πρόλογος	1
Κεφάλαιο 1 ^ο : <i>Mullus barbatus</i>	2
1.1.Εισαγωγή	3
1.2. Το Είδος <i>Mullus barbatus</i>	3
1.3. Θερμαϊκός Κόλπος	5
1.4. Διατροφική Αξία.....	7
1.5.Θρεπτικά Συστατικά Ψαριού	9
Κεφάλαιο 2 ^ο : Αντιοξειδωτικά.....	12
2.1. Γενικά.....	12
2.2. Ορισμός	12
2.3. Μηχανισμός Δράσης Αντιοξειδωτικών	13
2.4. Οξειδωτικό Στρες Και Μοριακή Βλάβη	14
2.5. Αντιοξειδωτική άμυνα.....	15
2.6. Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά	17
2.7. Οξειδωτικό Στρες Και Ανθρώπινες Ασθένειες	18
2.8. Αντιοξειδωτικά Και Τα Οφέλη Για Ασθένειες.....	19
2.8.1. Αντιοξειδωτικά Και Καρκίνος.....	19
2.8.2. Αντιοξειδωτικά Και Διαβήτης	20
2.8.3. Αντιοξειδωτικά Και Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες	20
2.8.4. Αντιοξειδωτικά Και Καρδιαγγειακές Νόσοι.....	21
2.9. Αντιοξειδωτικά Στα Ψάρια	23
2.9.1. Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά.....	24
2.9.2. Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά.....	26
2.10. Ελεύθερες Ρίζες.....	32
2.10.1 Ορισμός.....	32
2.10.2. Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών	32

Κεφάλαιο 3 ^ο : Πειραματικό Μέρος	Error! Bookmark not defined.
3.1. Τίτλος Μελέτης	Error! Bookmark not defined.
3.2. Σκοπός Της Έρευνας	36
3.3. Δειγματοληψία Και Προ-Επεξεργασία Δειγμάτων	36
3.4. Μεθοδολογία Πειραμάτων	38
3.4.1. Μέθοδος Εκχύλισης	39
3.4.1.1. Οργανολογία	39
3.4.1.2. Αντιδραστήρια	39
3.4.1.3. Πειραματική Πορεία Για Την Πραγματοποίηση Της Εκχύλισης	39
3.4.2. Δείκτης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)- Ικανότητα Μείωσης Σιδήρου Του Πλάσματος	40
3.4.2.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο	40
3.4.2.3. Αντιδραστήρια	42
3.4.2.4. Πειραματική Πορεία	43
3.4.3. Μέθοδος Μέτρησης Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC)	46
3.4.3.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο	46
3.4.3.2. Οργανολογία	47
3.4.3.4. Πειραματική Πορεία	48
3.4.5. Μέθοδος DPPH	52
3.4.5.1. Θεωρητικό υπόβαθρο	52
3.4.5.2. Οργανολογία	54
3.4.5.3. Αντιδραστήρια	55
3.4.5.4. Πειραματική Πορεία	55
3.4.6. Μέθοδος ABTS	56
3.4.6.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο	56
3.4.6.2. Οργανολογία	57
3.4.6.3. Αντιδραστήρια	58
3.4.6.4. Πειραματική Πορεία	58
3.4.7. LC-MS	61
3.4.7.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο	61
3.4.7.2. Οργανολογία	62
3.4.7.3. Αντιδραστήρια	62
Κεφάλαιο 4 ^ο : Αποτελέσματα	64
4.1. Στατιστική ανάλυση	64

4.1.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων FRAP.....	64
4.1.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων TPC.....	66
4.1.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων ABTS.....	67
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπέρασμα- Συζήτηση.....	70
5.1. Σημασία Του Μεγέθους Του Ψαριού Στην Αντιοξειδωτική Ικανότητα	70
5.2. Συγκέντρωση Αντιοξειδωτικών Στα Δείγματα <i>Mullus barbatus</i>	71
Bibliography.....	72

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Κουτσομούρα σε λασπώδη πυθμένα.....	4
Εικόνα 2: Χάρτης του θερμαϊκού κόλπου με τα κύρια σημεία περιβαλλοντικής πίεσης.....	6
Εικόνα 3: Τα κύρια λιπαρά οξέα και οι βασικές διατροφικές πηγές τους.	8
Εικόνα 4: Διατροφικά οφέλη των ψαριών.....	9
Εικόνα 5: Η απουσία Ω3 λιπαρών οξέων οδηγεί στη διάσπαση του AA σε παράγοντες που προκαλούν φλεγμονή.	10
Εικόνα 6: Η δράση των αντιοξειδωτικών.....	15
Εικόνα 7: Οι δομές των 4 συνθετικών αντιοξειδωτικών που έχουν κύρια εφαρμογή στη συντήρηση τροφίμων.	18
Εικόνα 8: Δημιουργία όγκου.	20
Εικόνα 9: Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών σε διάφορες ασθένειες.	23
Εικόνα 10: Κατηγοριοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών.	24
Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης $CAT.H_2O_2 + Fe(III)\text{-enzyme} \rightarrow H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-enzyme}$ $H_2O + Fe(III)\text{-enzyme} \leftarrow H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-enzyme}$. Ο μηχανισμός δράσης της καταλάσης περιλαμβάνει δύο στάδια: πρώτον, το ένζυμο αντιδρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σχηματίζοντας το Σύνθετο I. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο μόριο H_2O_2 χρησιμοποιείται για την αναγέννηση του ενζύμου, παράγοντας νερό και οξυγόνο, επιστρέφοντας το ένζυμο στην αρχική του κατάσταση.....	25
Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης SOD.....	26
Εικόνα 13: Αντιοξειδωτική συνεισφορά του ασκορβικού οξέος.....	27

Εικόνα 14: Δράση Γαλλικού και Πυρογαλλικού οξέος.	28
Εικόνα 15: Χημική δομή καφεϊκού οξέος.	29
Εικόνα 16: Χημική δομή κουμαρικού οξέος.	29
Εικόνα 17: Χημική δομή καμφερόλης.	30
Εικόνα 18: Τα πιθανά μονοπάτια αντίδρασης της κερσετίνης. (Α) ανταλλαγή e^- - p^+ προς τις υπεροξυλικές ρίζες από την κατεχόλη. (Β) διαδοχική απώλεια πρωτονίων και μεταφορά ηλεκτρονίου προς το νερό/υπεροξυλικές ρίζες.	31
Εικόνα 19: Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός της βιταμίνης Ε (α-τοκοφερόλη)	31
Εικόνα 20: Εξουδετέρωση ρίζας με τη προσφορά e^- από αντιοξειδωτικό.	32
Εικόνα 21: Μερικά Παραδείγματα ROS.	34
Εικόνα 22: Η παραγωγή ROS σεψάρια έπειτα την έκθεση σε τοξικούς παράγοντες (Cd^{2+})	34
Εικόνα 23: Παράγοντες σχηματισμού ελευθέρων ριζών στον οργανισμό.....	35
Εικόνα 24: Μηχανισμός δράσης FRAP με την χρωματική αλλαγή του δείγματος.	41
Εικόνα 25: Μηχανισμός δράσης FRAP σε μεγένθυση.....	42
Εικόνα 26: Διάγραμμα μορφής $y=ax+\beta$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση ένυδρου θειικού σιδήρου.	45
Εικόνα 27: Η μέθοδος αναγωγής του Folin-Ciocalteu.....	47
Εικόνα 28: Διάγραμμα μορφής $y=ax+\beta$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση GA.	50
Εικόνα 29: Μηχανισμός δράσης DPPH με μεταφορά ενός ατόμου H^+ , με τη χρωματική αλλαγή του δείγματος.	53
Εικόνα 30: Οι τρεις πιθανοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης του DPPH. (a) ιονταλλαγή ενός e^- και ενός p^+ , (b) μεταφορά ενός H^+ , (c) διαδοχική απώλεια p^+ και μεταφορά e^-	54
Εικόνα 31: Προϊοντα αναγωγής της ελεύθερης ρίζας $ABTS^{*+}$	57
Εικόνα 32: Διάγραμμα μορφής $y=ax+\beta$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση του Trolox.....	60
Εικόνα 33: Ιστόγραμμα FRAP.	65
Εικόνα 34: Ιστόγραμμα TPC.	67
Εικόνα 35: Ιστόγραμμα ABTS.	69

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: : Size class= τάξη μεγέθους(I -> μικρά, II -> μεσαία, III -> μεγάλα). M.Bar= Mullus barbatus, κουτσομούρα. MU= Muscle, Σάρκα. THE= Thermaikos Gulf, Θερμαϊκός κόλπος. TL= total length, ολικό μήκος ψαριού. TW= total weight, ολικό βάρος ψαριού. SEX= φύλλο[M=Male(αρσενικό), F=Female(θηλυκό), UN=Unidentified(ουδέτερο)].37	37
Πίνακας 2: Διαχωρισμός των ψαριών σε τάξεις μεγέθους με βάση το μήκος τους, η διακύμανση του βάρους τους και η μέση τιμή μήκους και βάρους των τάξεων καθώς και η τυπική τους απόκλιση (M: αρσενικό , F:θηλυκό, UN: Άγνωστο).....38	38
Πίνακας 3: Πίνακας συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP.45	45
Πίνακας 4: Πίνακας υπολογισμού συγκέντρωσης με τη μέθοδο TPC.50	50
Πίνακας 5: Πίνακας αναστολής της ρίζας DPPH.55	55
Πίνακας 6: Παρουσίαση απορροφήσεων έπειτα την εκκαθάριση του ABTS*59	59
Πίνακας 7: Πίνακας υπολογισμού συγκέντρωσης με τη μέθοδο ABTS.60	60
Πίνακας 8: Ταυτοποίηση βιταμινών και φαινολικών ενώσεων σε δείγματα Mullusbarbatus.....62	62
Πίνακας 9: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος FRAP.....64	64
Πίνακας 10: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος TPC.....66	66
Πίνακας 11: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος ABTS.....68	68

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma	Αναγωγική Ικανότητα Σιδήρου στο Πλάσμα
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl	1, 1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου
TPC	Total Phenolic Content	Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2, 2'-Αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρία Μάζας
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου
SOD	DuperOxyde Dismutase	Δισμουτάση του Υπεροξειδίου
CAT	Catalase	Καταλάση
GPx	Glutathione Peroxidase	Γλουταθειϊκή Υπεροξειδάση GPx
PUFAs	Polyunsaturated Fats	Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα
GA	Gallic Acid	Γαλλικό Όξι

Πρόλογος

Μια από τις σημαντικότερες πηγές τροφής, πλούσια σε θρεπτικά συστατικά αποτελούν τα ψάρια. Γνωρίζοντας ότι τα βρώσιμα μέλη των ψαριών προσφέρουν αποδεδειγμένα υψηλή διατροφική αξία, αντιλαμβανόμαστε την καίρια σημασία τους στην διατροφή (Kimbrough, 1991).

Το είδος *Mullus barbatus*, γνωστό ψάρι που καλείται αλλιώς και κουτσομούρα, βρίσκεται σε πολλές περιοχές της Μεσογείου θάλασσας, της Μαύρης θάλασσας και του ανατολικού Ατλαντικού ωκεανού (Panagiotounakou, 2024). Πιο συγκεκριμένα, εξαιτίας της μεγάλης ακτογραμμής της Ελλάδας, αλλά και το γεγονός ότι το είδος αυτό εντοπίζεται σε ρηχά παράκτια νερά (Tserpes, et al., 2002), η αλίευση αυτού του ψαριού είναι ευνοϊκή για την χώρα μας και αποτελεί μέρος της διατροφής των ανθρώπων καθώς περιλαμβάνεται στα δέκα εμπορικότερα είδη ψαριών (Evangelos, 2008). Οι βρώσιμοι ιστοί του *Mullus barbatus* είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες, μέταλλα (Se, Zn, Cu), αντιοξειδωτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Chen, et al., 2021). Η τακτική τους κατανάλωση προσδίδει επιπλέον νευρολογική και καρδιακή προστασία, καθώς έρευνες έχουν δείξει πως τα έλαια του ψαριού, αλλά και τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα που περιέχουν, παίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στην ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου, όσο και στην μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου (Chen, 2021). Αξίζει να σημειωθεί η αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Υπάρχουν αρκετές φυσικές ενώσεις που συμμετέχουν στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας των ψαριών. Αυτές περιλαμβάνουν ένζυμα, καροτενοειδή, πεπτίδια, αμινοξέα και φαινόλες, φυσικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται στο κυτταρικό πλάσμα, στα μιτοχόνδρια και στις κυτταρικές μεμβράνες (Bragadóttir, 2001).

Τα δείγματα στα οποία θα γίνει η χημική ανάλυση είναι από τον Θερμαϊκό κόλπο, περιοχή η οποία έχει πληγεί από συστηματική ρύπανση λόγω των αγροτικών και κτηνοτροφικών βιομηχανιών (Violintzis, Arditsoglou, & Voutsas, Elemental composition of suspended particulate matter and sediments in the coastal environment of Thermaikos Bay, Greece: Delineating the impact of inland waters and wastewaters, 2009). Η χημική

μελέτη που θα διεξαχθεί θα παράξει πολύτιμες πληροφορίες για την αντιοξειδωτική δράση του *Mullus barbatus*, ώστε να γίνει γνωστή η υψηλή διατροφική τους αξία και η θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Μία από τις τεχνικές μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα της σάρκας του ψαριού που θα πραγματοποιηθεί στην παρούσα έρευνα είναι η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μειώνουν το τρισθενές σίδηρο (Fe^{+3}) σε δισθενές σίδηρο (Fe^{+2}), δημιουργώντας ένα έντονα έγχρωμο σύμπλοκο. Επιπλέον μέθοδοι που θα διεξαχθούν είναι το DPPH, η μέθοδος μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC), το ABTS, η μέθοδος μέτρησης της αντιδιαβητικής ικανότητας και τέλος ο αναλυτής LC-MS υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας για την ανάλυση φυσικών προϊόντων (Kumarakuru , etal., 2023).

Συμπερασματικά, η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του *Mullus barbatus* από τον Θερμαϊκό κόλπο μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου και τις θεραπευτικές προοπτικές του.

Κεφάλαιο 1^ο: *Mullus barbatus*

1.1.Εισαγωγή

Τα ψάρια θεωρούνται μία από τις σημαντικότερες και διαχρονικότερες πηγές υψηλής διατροφικής αξίας, καθώς είναι πλήρη σε αντιοξειδωτικές ουσίες, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Σε βιολογικούς ιστούς, όπως είναι οι μύες των ψαριών, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα και το ασκορβικό οξύ που περιέχονται αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες για να τερματίσουν την αντίδραση τους. Εξαιτίας λοιπόν των ευεργετικών αποτελεσμάτων που προκαλούνται από τις αντιοξειδωτικές ουσίες, η μέτρηση τους έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας (Bragadóttir , 2001). Η κατανάλωση ψαριών οδηγεί στην αύξηση των αντιοξειδωτικών στον ανθρώπινο οργανισμό και συνεπώς στην αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας, την καλύτερη υγεία και την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης κάποιας ασθένειας (Benzie&Devaki , 2017). Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει την συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα, έχει γίνει γνωστό πως η μειωμένη έκθεση στις ελεύθερες ρίζες και η αυξημένη πρόσληψη τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο ενίσχυσης προβλημάτων υγείας που σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες.

1.2. Το Είδος *Mullus barbatus*

Το είδος *M. barbatus*, γνωστό στο ευρύ κοινό ως κουτσομούρα, είναι μέλος της οικογένειας των Μουλλιδών (*Mullidae*) και του γένους Μούλλος (*Mullus*). Πληθυσμοί του είδους *Mullus barbatus* εμφανίζονται στη Μεσόγειο, κατ' επέκταση και στη Μαύρη Θάλασσα, σε όλη την έκταση του ανατολικού ατλαντικού ωκεανού και από τη Βόρεια Θάλασσα ως τη Σενεγάλη (Tserpes, etal., 2002).

Είναι βενθικό ψάρι (εντοπίζεται στον πυθμένα της θάλασσας), με μέσο μήκος $13,21 \pm 0,13$ cm και μέσο βάρος $28,25 \pm 0,98$ g (Mehanna&Hassanien, 2023), το οποίο ζει σε αμμώδες και λασπώδες περιβάλλον (Tserpes, etal., 2002), όμως έχουν παρατηρηθεί πληθυσμοί του είδους και σε βραχώδες υπόστρωμα. Η κουτσομούρα καταδύεται σε

βάθος μέχρι 200m, και οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί ανευρίσκονται περίπου στα 100m από την επιφάνεια της θάλασσας (Mehanna&Hassanien, 2023). Το συγκεκριμένο είδος δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση σε περιοχές όπου η υφαλοκρηπίδα γίνεται ευρύτερη, δηλαδή σε ρηχά παράκτια νερά που ο βυθός εμφανίζει απότομη κλίση (30°-45°) (Παναγιωτάκου, 2024). Η διατροφή του *Mullus barbatus* δεν περιορίζεται σε ζωικούς ή φυτικούς οργανισμούς, καθώς είναι παμφάγο, ωστόσο εμφανίζει ιδιαίτερη προτίμηση σε καρκινοειδή και πολύχαιτους (παραφυλετική ομάδα δακτυλοσκωλήκων) (CHÉRIF, Amor, Selmi, & Cararé, 2011).

Ο αναπαραγωγικός κύκλος της κουτσομούρας χωρίζεται σε τρεις περιόδους. Η πρώτη περίοδος είναι αυτή της πρόωρης ωογένεσης (Νοέμβριος- Φεβρουάριος), ακολουθεί η περίοδος της βιταλλογένεσης (Φεβρουάριος- Απρίλιος), και τελικά η περίοδος της ωοτοκίας (Απρίλιος- Ιούνιος). Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του θαλάσσιου οικοσυστήματος φαίνεται να επηρεάζουν με άμεσο και έμμεσο τρόπο τον αναπαραγωγικό κύκλο των Μουλιδών. Πιο συγκεκριμένα, η θαλάσσια θερμοκρασία επηρεάζει την μάζα των γονάδων του ψαριού (↑ θερμοκρασία → ↑ γοναδοσωματικός δείκτης), αλλά και την επάρκεια τροφικών αποθεμάτων του βυθού, καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και ο πληθυσμός του ζωοπλαγκτόν (↑ θερμοκρασίας το καλοκαίρι → ↑ ζωοπλαγκτόν → περίοδος ωοτοκίας) (Carbonara, et al., 2015) (Melnikova&Kuzminova, 2020).



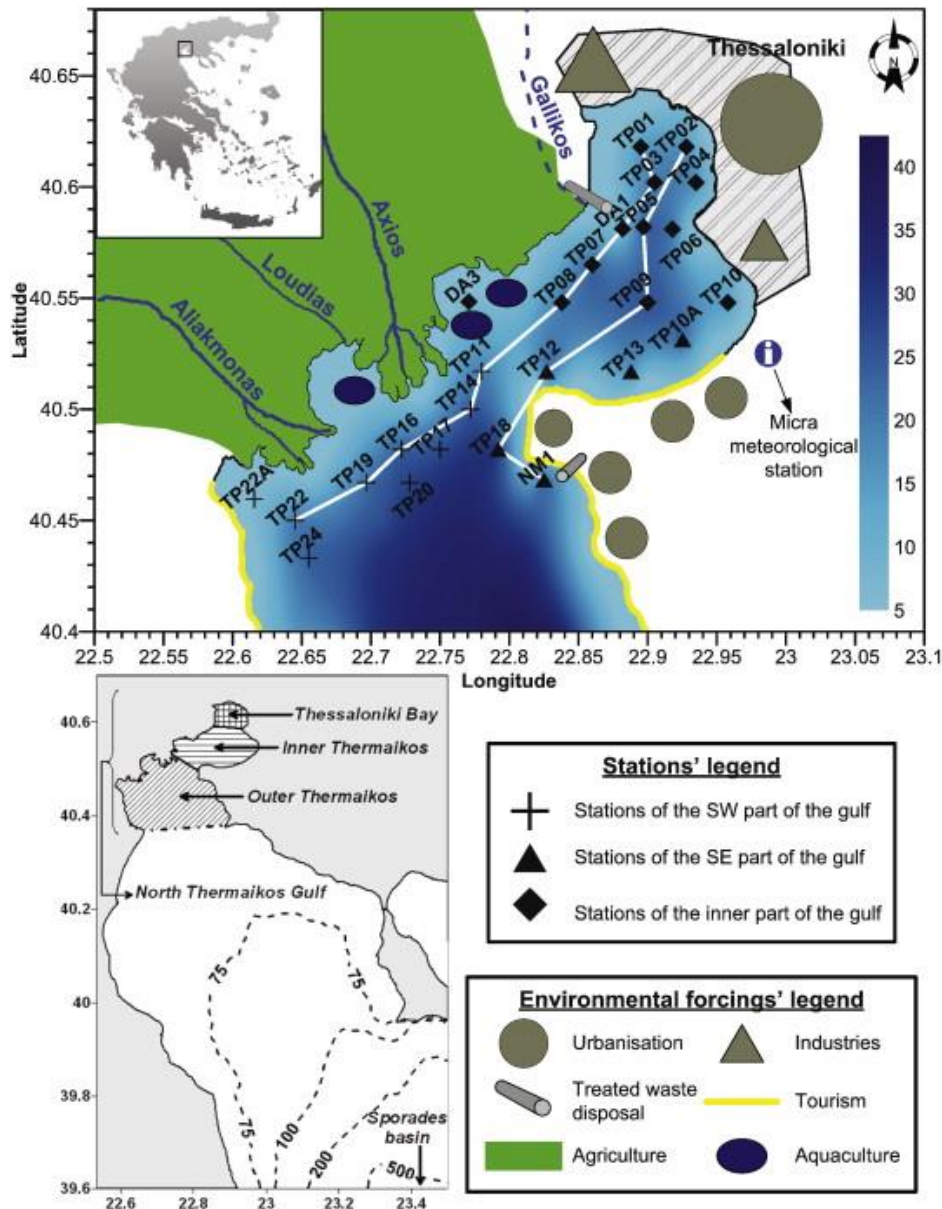
Εικόνα 1: Κουτσομούρα σε λασπώδη πυθμένα (Tserpes, Fiorentino, Levi, & Papaconstantinou, 2002).

1.3. Θερμαϊκός Κόλπος

Ο Θερμαϊκός Κόλπος είναι ένας από τους σημαντικότερους κόλπους της Ελλάδας, που εντοπίζεται στην ανατολική μεσόγειο θάλασσα, και πιο συγκεκριμένα στη βόρεια πλευρά του Αιγαίου Πελάγους. Περιβάλλεται από τη Μακεδονία και την Κεντρική Ελλάδα και είναι γνωστός για την ακτογραμμή του που περιλαμβάνει τη Θεσσαλονίκη, τη δεύτερη μεγαλύτερη πόλη της Ελλάδας. Ο κόλπος φιλοξενεί ποικιλία θαλάσσιων ειδών και αποτελεί σημαντικό βιότοπο για την αλιεία, ενώ επίσης υπάρχουν προστατευόμενες περιοχές που είναι σημαντικές για την βιοποικιλότητα.

Ο Θερμαϊκός ωστόσο, αντιμετωπίζει μεγάλες περιβαλλοντικές προκλήσεις. Οι κύριοι λόγοι ρύπανσης του κόλπου είναι το αστικό περιβάλλον, λόγω του κακού αποχετευτικού συστήματος, και τα προϊόντα των γειτονικών βιομηχανικών και γεωργικών περιοχών. Πιο συγκεκριμένα, μέσω των ποταμών και των ρεμάτων που εκβάλλουν σε ολόκληρη την ακτογραμμή του κόλπου, εναποθέτονται σε αυτόν γεωργικά, βιομηχανικά και κτηνοτροφικά απόβλητα με αποτέλεσμα την περιβαλλοντική πίεση του κόλπου (εικόνα 2) (Krestenitis , etal., 2012) (Androulidakis, etal., 2021).

Διαιρείται σε τρεις ζώνες, τον κόλπο της πόλης της Θεσσαλονίκης, τον εσωτερικό και τον εξωτερικό Θερμαϊκό κόλπο. Κάθε ζώνη του κόλπου δέχεται και διαφορετικού βαθμού οικολογική πίεση. Η μόλυνση του κόλπου της Θεσσαλονίκης και του εσωτερικού Θερμαϊκού κόλπου οφείλεται εν μέρη στον Γαλλικό ποταμό και σε μεγαλύτερο βαθμό, στο εμπορικό λιμάνι της Θεσσαλονίκης αλλά και στα λύματα, της πόλης, που διοχετεύονται στον κόλπομέσω του υποθαλάσσιου σωλήνα. Ο εξωτερικός Θερμαϊκός κόλπος αποτελεί το σημείο όπου εδράζονται τα δέλτα των ποταμών του Αξιού (προσφέρει περισσότερο από το 50% του γλυκού νερού στον κόλπο), του Αλιάκμονα και Λουδία με μεγάλο αντίκτυπο στον κόλπο. Άλλος ένας παράγοντας ρύπανσης είναι το λιμάνι της Μηχανιώνας (Krestenitis , etal., 2012).



Εικόνα 2: Χάρτης του θερμαϊκού κόλπου με τα κύρια σημεία περιβαλλοντικής πίεσης (Krestenitis , Kombiadou, & Androurlidaki, 2012).

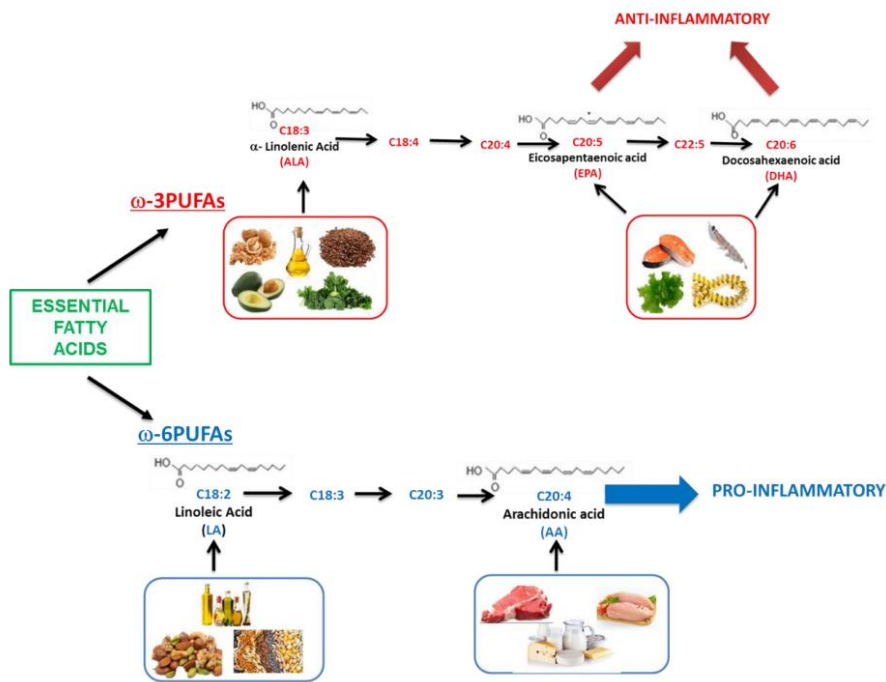
Υπάρχουν προσπάθειες για την προστασία και διαχείριση των υδάτων και των παράκτιων περιοχών του κόλπου, καθώς αποτελεί ζωτικής σημασίας περιοχή, τόσο για την οικονομική ανάπτυξη όσο και για την περιβαλλοντική ισορροπία της περιοχής, καθιστώντας τον ένα κρίσιμο μέρος της ελληνικής γεωγραφίας και κοινωνίας (Violintzis, Arditsoglou, & Voutsas, Elemental composition of suspended particulate matter and

sediments in the coastal environment of Thermaikos Bay, Greece: Delineating the impact of inland waters and wastewaters, 2009).

1.4. Διατροφική Αξία

Η ανάπτυξη, η εξέλιξη και τελικά η υγεία του οργανισμού καθορίζεται από τις τροφές που καταναλώνει. Συνεπώς, τροφές πλούσιες σε μικροθρεπτικά και μακροθρεπτικά στοιχεία, επιτυγχάνουν στο να μειώνουν τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα που προκύπτουν λόγω καρκίνων, καρδιαγγειακών και άλλων νοσημάτων (Chen, Jayachandran, Bai , & Xu, 2021).

Είναι ευρέως γνωστό πλέον ότι η συχνή κατανάλωση ψαριών και προϊόντων που προκύπτουν από αυτά λόγω των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσιάζονται ως εξαιρετικοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες για την καταπολέμηση παθήσεων σχετιζόμενων με φλεγμονές όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η ελκώδης κολίτιδα και η υπερλιπιδαιμία (Stenson, etal., 1992), (Eslick, etal., 2009), (Siscovick, etal., 2017). Τα σημαντικότερα για την υγεία λιπαρά οξέα που συναντάμε είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και πιο συγκεκριμένα οι υποομάδες Ω-3 και Ω-6 (εικόνα 3) (Bozzatello, etal., 2019). Τα Ω-3 λιπαρά οξέα περιλαμβάνουν το α-λινολενικό οξύ (ALA), το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Το κύριο Ω-6 PUFA είναι το αραχιδονικό οξύ (AA). Τα Ω-3 λιπαρά οξέα και κυρίως το EPA και DHA προσλαμβάνονται μέσω της κατανάλωσης ψαριών (Oh, 2005), ενώ τα Ω-6 δεν ανευρίσκονται τόσο συχνά σε θαλάσσιους οργανισμούς (Bozzatello, etal., 2019).

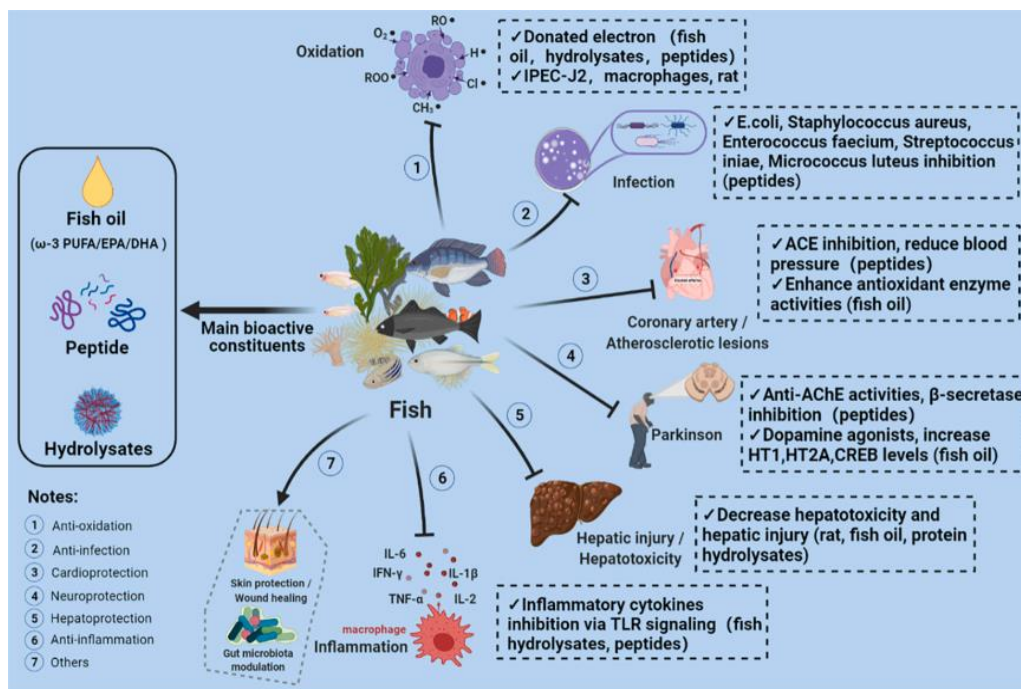


Εικόνα 3: Τα κύρια λιπαρά οξέα και οι βασικές διατροφικές πηγές τους (doi: [10.3390/nu12092751](https://doi.org/10.3390/nu12092751)).

Τα ψάρια και γενικότερα οι θαλάσσιοι οργανισμοί είναι ευρέως αναγνωρισμένοι για την πλούσια περιεκτικότητά τους σε απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, παραμένουν λιγότερο γνωστά τα οφέλη τους ως προς την αφθονία αντιοξειδωτικών παραγόντων και αντιμικροβιακών ουσιών που εμπεριέχονται σε αυτά. Πολλές έρευνες έχουν υποδείξει την πλούσια περιεκτικότητα των ψαριών σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Μπορούμε να εντοπίσουμε αντιοξειδωτική περιεκτικότητα τόσο στους βρώσιμους ιστούς των ψαριών, όσο και στους ιστούς που δεν συνηθίζεται να καταναλώνουμε όπως το συκώτι, τα κόκαλα το κεφάλι και το δέρμα (Chen, et al., 2021). Επιπροσθέτως, αναφέρεται χαρακτηριστικά σε *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε, ότι το λάδι ψαριών βελτιώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ των αρουραίων (Erdogan, et al., 2004).

Η θάλασσα αποτελεί ένα ανοιχτό περιβάλλον το οποίο αποικίζει πληθώρα μικροοργανισμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν άμεσο κίνδυνο τόσο για τους ζωικούς όσο και για τους φυτικούς οργανισμούς του θαλάσσιου οικοσυστήματος. Οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν καταφέρει να αναπτύξουν διάφορους μηχανισμούς άμυνας ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς

άμυνας έναντι των παθογόνων, όπως για παράδειγμα τις ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, που αποτελούνται από μια πεπτιδική αλυσίδα 20-40 αμινοξέων και έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν ταχύτατα μεγάλο φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών (Kang, et al., 2015). Στα ψάρια οι βασικές αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχονται είναι η πλευροσιδίνη και η β -defensin και περιέχονται κυρίως στο δέρμα των ψαριών (Chen, et al., 2021) (Kang, et al., 2015).



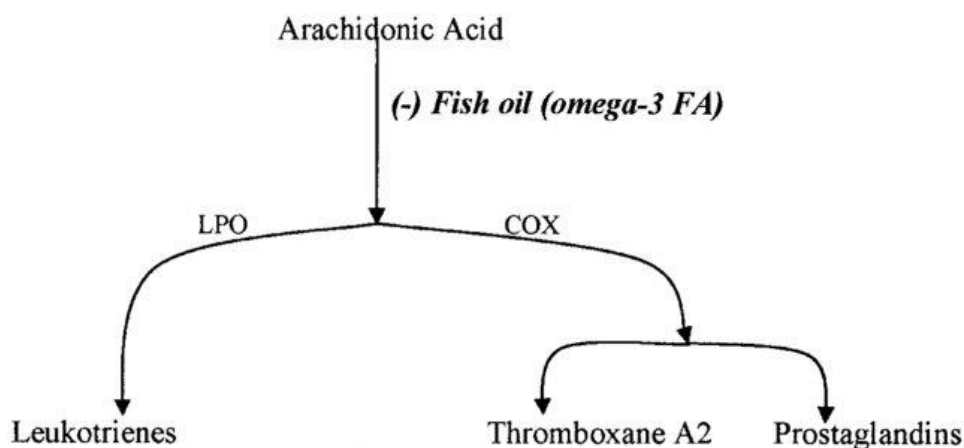
Εικόνα 4: Διατροφικά οφέλη των ψαριών (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874>).

1.5.Θρεπτικά Συστατικά Ψαριού

Η διατροφή αποτελεί βασικό πυλώνα της ανθρώπινης υγείας. Το ψάρι είναι μια σημαντική πηγή διατροφής για τον άνθρωπο, καθώς τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στα ψάρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων και στην πρόληψη πολλών ασθενειών που ενδέχεται να εμφανιστούν. Στα συστατικά αυτά συμπεριλαμβάνονται τα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (Balami, et al., 2019). Τα μακροθρεπτικά συστατικά είναι πρωτεΐνες, λιπίδια και πολύ μικρή ποσότητα υδατανθράκων, ενώ τα μικροθρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν βιταμίνες και μέταλλα, τα οποία είναι εξίσου σημαντικά (Mishra, 2020). Πιο

συγκεκριμένα τα ψάρια είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, ω-3 λιπαρά οξέα, βιταμίνη D, βιταμίνη A, ιώδιο και σελήνιο, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν σε έναν πιο υγιή μεταβολικό προφίλ (Tørris, etal., 2018). Η θρεπτική αξία και τα οφέλη για την υγεία από τα ψάρια συχνά δεν αναγνωρίζεται και υποτιμάται.

Ω-3 λιπαρά οξέα: Η αυξημένη πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων προσφέρει αντιφλεγμονώδη δράση στον οργανισμό, αναστέλλοντας την ενσωμάτωση του αραχιδονικού οξέος στις μεμβράνες των κυττάρων (εικόνα 5) (Oh, 2005). Σήμερα, τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν τα ευεργετικά αποτελέσματα των ω-3 λιπαρών οξέων στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, καθώς βοηθάνε σημαντικά στη μείωση των τριγλυκεριδίων, την αύξηση της HDL-C και τη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Tørris, etal., 2018). Επιπλέον, παρέχουν θερμίδες και έχουν πολλές λειτουργίες που σχετίζονται με τα αιμοφόρα αγγεία, τους πνεύμονες, το ανοσοποιητικό σύστημα και τα ενδοκρινή όργανα (Mishra, 2020).



Εικόνα 5: Η απουσία Ω3 λιπαρών οξέων οδηγεί στη διάσπαση του AA (Arachidonic acid) σε παράγοντες που προκαλούν φλεγμονή (Oh, 2005).

Πρωτεΐνες και αμινοξέα: Η αξία της πρωτεΐνης του ψαριού είναι πολύ υψηλή, καθώς έχει μια σταθερή σύνθεση απαραίτητων αμινοξέων, με ελαφρές ελλείψεις σε μεθειονίνη και θρεονίνη και περίσσεια λυσίνης. Το ψάρι έχει λιγότερες θερμίδες σε σύγκριση με άλλες τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες, όπως το κρέας και τα πουλερικά. Ως χαμηλό σε θερμίδες και εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης, βοηθά στη διατήρηση ενός υγιούς βάρους και αποτελεί υψηλής ποιότητας πηγή πρωτεΐνης, καθώς περιέχει σχεδόν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα (Mishra, 2020). Η ταυρίνη που εμπεριέχεται στα ψάρια αποτελεί ένα αμινοξύ

που προσφέρει ευεργετικές επιδράσεις στα λιπίδια του αίματος, αντι-αθηροσκληρωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι μειώνει την αρτηριακή πίεση και τους δείκτες φλεγμονής. Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται στη βελτιωμένη αγγειακή λειτουργία της ταυρίνης, πιθανώς μέσω της ανταγωνιστικής δράσης της έναντι της αγγειοτασίνης II, η οποία επηρεάζει την αρτηριακή πίεση (Tørris, etal., 2018).

Βιταμίνη D: Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που είναι σημαντική για την υγεία των οστών και την ομοιοστάση του ασβεστίου, ενώ μπορεί επίσης να έχει αντιφλεγμονώδη επίδραση στα ανθρώπινα ανοσοκύτταρα. Βρίσκεται φυσικά στα ψάρια και παράγεται επίσης στο δέρμα μέσω της επίδρασης των υπεριωδών ακτίνων από το ηλιακό φως (Tørris, etal., 2018).

Βιταμίνη A: Η βιταμίνη A βοηθά στην κανονική ανάπτυξη, στον σχηματισμό των οστών και των δοντιών, στην οικοδόμηση των κυττάρων, καθώς και στην πρόληψη προβλημάτων όρασης και στη θεραπεία πολλών οφθαλμικών ασθενειών (Mishra, 2020).

Ιώδιο και σελήνιο: Τόσο το ιώδιο όσο και το σελήνιο είναι ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένου. Ενώ το ιώδιο είναι σημαντικό για την κανονική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένου, μέσω της παραγωγής των ορμονών θυροξίνης (T4) και τριιωδοθυρονίνης (T3), οι κύριες λειτουργίες του σεληνίου είναι να λειτουργεί ως συν-παράγοντας σε αντιοξειδωτικές δραστηριότητες και στον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών (Tørris, etal., 2018).

Κεφάλαιο 2^ο: Αντιοξειδωτικά

2.1. Γενικά

Η ανθρώπινη υγεία είναι θεμελιώδης για την ανθρωπότητα, καθώς αποτελεί την βάση για την ευημερία και την πρόοδο της κοινωνίας. Η αλληλένδετη σχέση της με την τροφή αυξάνει όλο και περισσότερο την ανάγκη για την σωστή επιλογή τροφών που προσφέρουν στον οργανισμό τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την διατήρηση της υγείας.

Τα αντιοξειδωτικά, είναι ένζυμα και πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους ή ακόμα και μικρομοριακές βιταμίνες και ενώσεις. Η ανάπτυξη τους έχει αλλάξει ραγδαία την ποιότητα ζωής αυξάνοντας τον μέσο όρο ηλικίας, διατηρώντας σε φυσιολογική ισορροπία τις αντιδράσεις οξειδωσης που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Επιπλέον, παίζουν καίριο ρόλο στην άμυνα του οργανισμού και στην εξασφάλιση της υγείας, επισκευάζοντας την οξειδωτική ζημιά, καταστέλλοντας την παραγωγή οξειδωτικών και αντιμετωπίζοντας το οξειδωτικό στρες (Etsuo , 2016).

Έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες, ασταθή δηλαδή μόρια που βλάπτουν τα κύτταρα. Η βλάβη που σχετίζεται με τις ρίζες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια έχει προταθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ασθενειών που εξαρτώνται από την ηλικία, όπως ο καρκίνος, η αρτηριοσκληρίωση, η αρθρίτιδα, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και άλλες παθήσεις (Valko, etal., 2006).

2.2. Ορισμός

Ως αντιοξειδωτικά αναφέρονται μόρια υψηλού ή χαμηλού μοριακού βάρους που έχουν την ικανότητα να προσφέρουν ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα, καταστρέφοντας την

έτσι ώστε να εξαλειφθούν οι βλάβες που μπορεί να προκαλέσει (Ighodaro, 2018). Βασική προϋπόθεση για να δρα ένα αντιοξειδωτικό μόριο είναι αφενός να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου να σχηματίζει αδρανή προϊόντα από τις ρίζες που αδρανοποιεί. Γενικά, μια αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει να οξειδωση αυτού του υποστρώματος.

2.3. Μηχανισμός Δράσης Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να δρουν σε διάφορα στάδια μιας οξειδωτικής ακολουθίας με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως:

1. αφαίρεση του οξυγόνου ή μείωση των τοπικών συγκεντρώσεων O_2^* ,
2. αφαίρεση καταλυτικών ιόντων μετάλλων,
3. αφαίρεση βασικών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) όπως το O_2^* και το H_2O_2 ,
4. εξουδετέρωση των αρχικών ριζών όπως οι ρίζες OH, $RO\cdot$, ROO ,
5. διακοπή της αλυσίδας μιας αρχικής ακολουθίας,
6. καταστολή ή εξουδετέρωση του μονοατομικού οξυγόνου.

Ο μεταβολισμός του οξυγόνου πραγματοποιείται μέσα στα κύτταρα, και εδώ περιμένουμε να βρούμε αντιοξειδωτικά που έχουν εξελιχθεί για να αντιμετωπίζουν γρήγορα και συγκεκριμένα τα μειωμένα ενδιάμεσα του οξυγόνου. Ένζυμα όπως οι υπεροξειδικές δισμουτάσες προωθούν γρήγορα τη δισμουτάση του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο με ρυθμό σημαντικά ταχύτερο από ότι συμβαίνει χωρίς καταλύτες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, προϊόν της αντίδρασης δισμουτάσης, μπορεί να καταστραφεί από δύο διαφορετικά ένζυμα, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο).

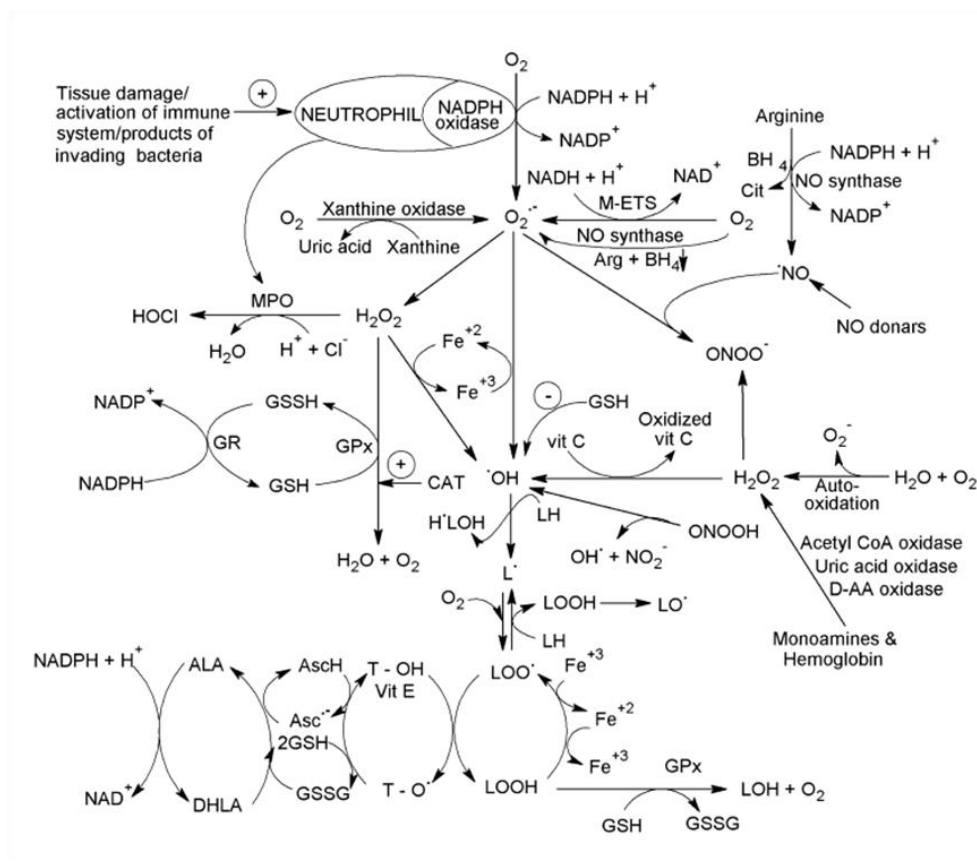
Κατά τη διάρκεια του κανονικού αερόβιου μεταβολισμού, αυτά τα ένζυμα λειτουργούν σε συνδυασμό για να εξαλείψουν τα τοξικά ενδιάμεσα του οξυγόνου μέσα στο κύτταρο, επιτρέποντας έτσι σε μια μικρή δεξαμενή σιδήρου χαμηλής μοριακής μάζας να υπάρχει με ασφάλεια για τη σύνθεση του DNA και την κατασκευή πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο.

Μέσα στο υδρόφοβο λιπιδικό εσωτερικό των μεμβρανών, σχηματίζονται διαφορετικοί τύποι λιπόφιλων ριζών από αυτούς που παρατηρούνται στο ενδοκυτταρικό υδατικό περιβάλλον. Οι λιπόφιλες ρίζες απαιτούν διαφορετικούς τύπους αντιοξειδωτικών για την απομάκρυνσή τους. Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, είναι ένας φτωχός αντιοξειδωτικός παράγοντας έξω από μια διπλοστιβάδα μεμβράνης, αλλά είναι εξαιρετικά αποτελεσματική όταν ενσωματώνεται στη μεμβράνη. Ένα σημαντικό μέρος της σταθερότητας και προστασίας της μεμβράνης είναι ο τρόπος με τον οποίο η μεμβράνη συναρμολογείται από τα λιπιδικά της συστατικά. Η δομική οργάνωση απαιτεί να υπάρχουν οι «σωστές» αναλογίες φωσφολιπιδίων προς χοληστερόλη, και ότι οι «σωστοί» τύποι φωσφολιπιδίων και τα λιπαρά οξέα τους είναι συνδεδεμένα (Gutteridge, 1994).

2.4. Οξειδωτικό Στρες Και Μοριακή Βλάβη

Η σχέση μεταξύ ελεύθερων ριζών και μοριακής βλάβης μπορεί να περιγραφεί με την έννοια του «οξειδωτικού στρες». Ο όρος αυτός έχει επινοηθεί για να περιγράψει την βλαβερή κατάσταση που δημιουργείται από την υπερβολική παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) σε συνδυασμό με τη μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών (Saikat&Chakraborty, 2011). Όταν εμφανίζεται οξειδωτικό στρες, τα κύτταρα προσπαθούν να αντισταθμίσουν τις οξειδωτικές επιδράσεις και να αποκαταστήσουν την ισορροπία του οξειδοαναγωγικού δυναμικού μέσω της ενεργοποίησης ή σίγασης γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες και δομικές πρωτεΐνες (Birben, etal., 2012). Οι βλάβες που μπορούν να δημιουργηθούν από τα ROS περιλαμβάνουν όλες τις κύριες βιομοριακές ομάδες, όπως τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Αντιδρούν με αρκετά κατάλοιπα αμινοξέων *in vitro*, παράγοντας ένα ευρύ

φάσμα προϊόντων από τροποποιημένα και λιγότερο ενεργά ένζυμα μέχρι αποδιαταγμένες, μη λειτουργικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, δημιουργούν λιπιδική υπεροξειδωση, προκαλώντας διαφορετική διάταξη στη διπλοστιβάδα των λιπιδίων της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των υποδοχέων και των ενζύμων που είναι συνδεδεμένα με τη μεμβράνη και προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των ιστών. Τέλος, οι τροποποιήσεις στο DNA περιλαμβάνουν την αποδόμηση βάσεων, μονοκλωνικές ή δίκλωνες θραύσεις του DNA, τροποποιήσεις που συνδέονται με πουρίνες, πυριμιδίνες ή σάκχαρα, μεταλλάξεις, διαγραφές ή μετατοπίσεις και τη διασταύρωση με πρωτεΐνες (Al-Dalaen&Al-Qtaitat, 2014).



Εικόνα 6: Η δράση των αντιοξειδωτικών (<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-2011-1083.ch001>).

2.5. Αντιοξειδωτική άμυνα

Το αμυντικό σύστημα δρα εναντίον των ελεύθερων ριζών ROS που αποτελούν δυνητικά επικίνδυνους παράγοντες. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει βιταμίνες, ένζυμα και μικροστοιχεία, τα οποία διακρίνονται με βάση την προέλευση τους (ενδογενή και

εξωγενή), την χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική) και την διαλυτότητά τους (υδρόφιλη ή υδρόφοβη).

Φυσικά, δύο τύποι αμυντικών συστημάτων κατά των ελεύθερων ριζών υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένων:

1. ενζυμικών αντιοξειδωτικών,
2. μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η γλουταθειόνη αναγωγάση, η θειορεδοξίνη και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αποτελούν το ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα, ενώ τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα περιλαμβάνουν βιταμίνες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C και φυτοχημικά όπως τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες και το άλφα λιποϊκό οξύ κ.λπ.

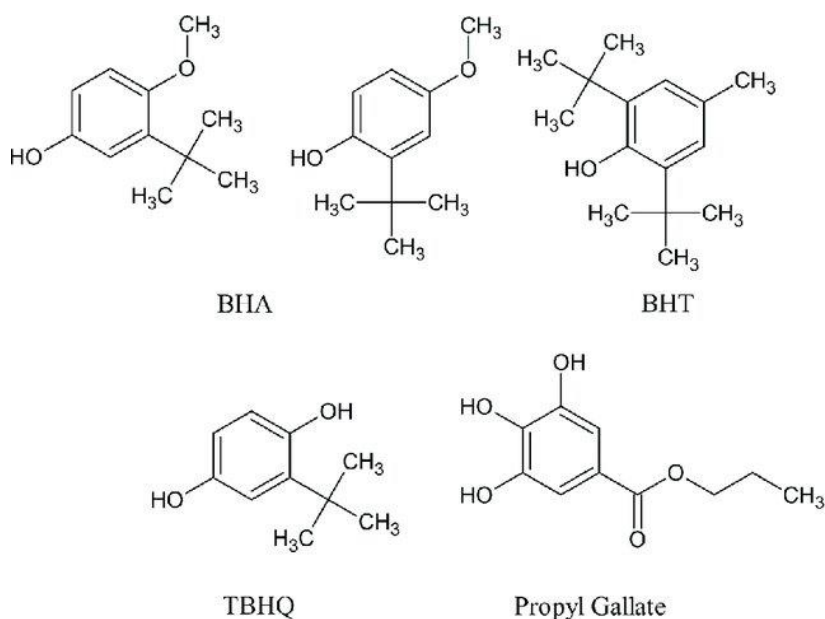
Ανάλογα με το επίπεδο δράσης τους οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες ταξινομούνται και ως πρώτη, δεύτερη, τρίτη και τέταρτη γραμμή άμυνας. Θεωρείται η καλύτερη ταξινόμηση των παραγόντων του αμυντικού συστήματος και αποτελείται από τους αναχαιτιστές των αντιοξειδωτικών, τους εκκαθαριστές των ελεύθερων ριζών, τους παράγοντες επανόρθωσης και τους ρυθμιστικούς παράγοντες (Γερογιάννη & Γουργουλιάνης, 2005). Η πρώτη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει ενώσεις όπως SOD, CAT και GPx οι οποίες εξουδετερώνουν οποιοσδήποτε αντιδραστικές μοριακές ενώσεις. Το SOD καταλύει την δισμουτάση O_2 σε H_2O_2 , το CAT καταλύει τη μείωση του H_2O_2 από τα υπεροξυσώματα σε νερό και O_2 και το GPx αποσυνθέτει το H_2O_2 σε νερό κυρίως από τα μιτοχόνδρια, και μερικές φορές ανταγωνίζεται την καταλάση στο κυτταρόπλασμα. Η δεύτερη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει τα λεγόμενα αντιοξειδωτικά καθαριστικά, που δρουν συλλαμβάνοντας ενεργές ρίζες για να εμποδίσουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτή η γραμμή περιλαμβάνει μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη και τα λιποδιαλυτά συστατικά. Η τρίτη γραμμή άμυνας είναι ο μηχανισμός για την επιδιόρθωση ή τη διόρθωση βλαβών που προκαλούνται από περίσσεια ενώσεων που αντιδρούν με το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Οι τύποι ενζύμων σε αυτό το σύστημα είναι οι πολυμεράσες, οι γλυκοζυλάσες και οι νουκλεάσες. Τέλος, η τέταρτη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει έναν μηχανισμό

προσαρμογής που διαμεσολαβείται από σήματα που παράγονται από τις ίδιες τις ελεύθερες ρίζες. Αυτά τα σήματα μπορούν να επάγουν τον σχηματισμό και τη μεταφορά αντιοξειδωτικών στον πληγέντα τόπο (Sandoval-Vargas, et al., 2020) (Ighodaro&Akinloye, 2019).

2.6. Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

Όσον αφορά την προέλευσή τους, τα αντιοξειδωτικά ταξινομούνται σε συνθετικά και φυσικά αντιοξειδωτικά. Ενώ τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως από τη βιομηχανία και αναγνωρίζονται από τις αρμόδιες αρχές για τη συντήρηση των τροφίμων, τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν λάβει αυξημένη προσοχή, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η μακροχρόνια πρόσληψή τους συνδέεται με τη διατήρηση της ευεξίας και την πρόληψη ασθενειών (Valko, et al., 2006).

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι χημικές ενώσεις οι οποίες δεν ανευρίσκονται στη φύση, σε αντίθεση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά, αλλά παρουσιάζουν ιδιότητες όμοιες με αυτές των φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά κατασκευάστηκαν με αρχικό σκοπό την παρεμπόδιση της οξείδωσης των μετάλλων, και στον βουλκανισμό του καουτσούκ, αλλά στη συνέχεια αποδείχτηκε η αποτελεσματικότητά τους στη συντήρηση των τροφών, δηλαδή στο να σταθεροποιούν και να αποτρέπουν την οξείδωση του λίπους και του λαδιού που περιέχονται στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, τα κυριότερα συνθετικά αντιοξειδωτικά (εικόνα 7) είναι το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), η tert-βουτυλυδροκινόνη (TBHQ), ο γαλλικός προπυλεστέρας (PG), ο γαλλικός δωδεκυλεστέρας (DG), το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό (EDTA) και ο οκτυλογαλλικός εστέρας (OG) (Wojcik, et al., 2010) (Atta, et al., 2017).



Εικόνα 7: Οι δομές των 4 συνθετικών αντιοξειδωτικών που έχουν κύρια εφαρμογή στη συντήρηση τροφίμων (DOI: [10.1080/87559129.2022.2039689](https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2039689)).

2.7. Οξειδωτικό Στρες Και Ανθρώπινες Ασθένειες

Έμμεσες αποδείξεις μέσω της παρακολούθησης βιοδεικτών, όπως η παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, και της αντιοξειδωτικής άμυνας υποδεικνύουν ότι η οξειδωτική βλάβη μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια ασθενειών. Ασθένειες όπως ο καρκίνος, η ελονοσία, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον, η νόσος του Αλτσχάιμερ και η νόσος του Χάντινγκτον φαίνεται να έχουν σχέση με τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (Rahman, et al., 2012). Επιπλέον, μερικές από τις ανθρώπινες ασθένειες όπου ο ρόλος των ελεύθερων ριζών είναι καλά τεκμηριωμένος περιλαμβάνουν και καρδιαγγειακές παθήσεις (αθηροσκλήρωση, ισχαιμική καρδιοπάθεια, καρδιακή υπερτροφία, υπέρταση, σοκ και τραύμα), πνευμονικές διαταραχές (φλεγμονώδεις πνευμονικές νόσοι όπως άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια), ασθένειες που σχετίζονται με πρόωρα βρέφη (βρογχοπνευμονική δυσπλασία, περιγερικολευκομαλακία, ενδοκοιλιακή αιμορραγία, αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας και νεκρωτική εντεροκολίτιδα), αυτοάνοσες ασθένειες (ρευματοειδής αρθρίτιδα), νεφρικές διαταραχές (σπειραματονεφρίτιδα, σωληναριακή διάμεση

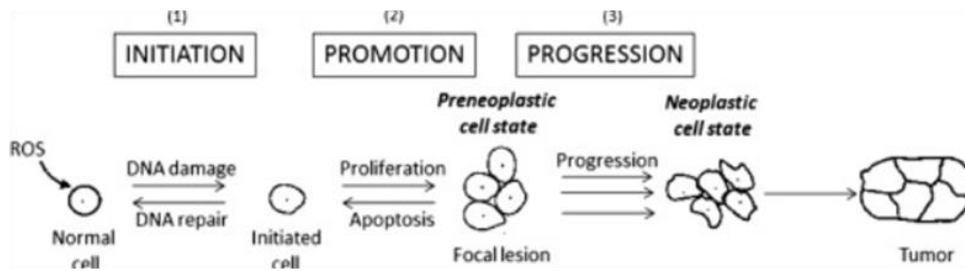
νεφρίτιδα, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, πρωτεϊνουρία, ουραιμία), γαστρεντερικές ασθένειες όπως έλκος, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και κολίτιδα, διαβήτης, όγκοι και καρκίνοι (Sen&Chakraborty, 2011).

2.8. Αντιοξειδωτικά Και Τα Οφέλη Για Ασθένειες

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί για την χρήση αντιοξειδωτικών στην θεραπεία ασθενειών, αλλά και για τον ρόλο τους στην πρόληψη της εξέλιξης ασθενειών στον άνθρωπο (Halliwell, 2000). Η ανακάλυψη του ρόλου των ελεύθερων ριζών στην παθογένεια ασθενειών οδήγησε σε μία ιατρική επανάσταση που χρησιμοποίησε τα αντιοξειδωτικά ως μέσο προφύλαξης και θεραπείας, καθώς λειτουργούν ως ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος (Saikat&Chakraborty, 2011). Δρουν άμεσα για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών αποτρέποντας την υπεροξειδάση των λιπιδίων και ενισχύοντας το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα καθιστώντας τα, καίριους παράγοντες για την καταπολέμηση και την θεραπεία ασθενειών.

2.8.1. Αντιοξειδωτικά Και Καρκίνος

Οι αντιοξειδωτικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα του ανθρώπινου καρκίνου. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί ανισορροπία του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού συστήματος και η τροποποίηση του γενετικού υλικού που προκύπτει από την οξειδωτική βλάβη είναι ένα ζωτικό βήμα στην καρκινογένεση. Αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών στο DNA έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους όγκους, εμπλέκοντας ισχυρά τέτοιου είδους βλάβες στην αιτιολογία του καρκίνου (Sen&Chakraborty, 2011) (Rajendran, etal., 2014). Τα ROS προκαλούν την ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος AP-1 (activator protein) και NF-κB (nuclear factor kappa B), τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της κυτταρικής ανάπτυξης και στην παθογένεια του καρκίνου (εικόνα 8) (Saikat&Chakraborty, 2011).



Εικόνα 8: Δημιουργία όγκου <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900712000925>.

2.8.2. Αντιοξειδωτικά Και Διαβήτης

Ένας από τους κύριους μηχανισμούς για την ανάπτυξη επιπλοκών του διαβήτη είναι μέσω του οξειδωτικού στρες (Yaribeygi, et al., 2020). Το οξειδωτικό στρες έχει καθοριστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των διαφόρων επιπλοκών του διαβήτη μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, της βλάβης του DNA αλλά και της δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου. Δρα ως μεσολαβητής της αντίστασης στην ινσουλίνη και η εξέλιξή του σε δυσανεξία στη γλυκόζη (Bandeira, et al., 2012). Η πρόσληψη διατροφικών αντιοξειδωτικών (συνολική βιταμίνη E, α-τοκοφερόλη, γ-τοκοφερόλη, β-τοκοτριενόλη και β-κρυπτοξανθίνη) συνδέθηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2, ενώ ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση αντιδιαβητικών και άλλων συνθετικών φαρμάκων με αντιοξειδωτική δράση, όπως οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, οι αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, η μελατονίνη, το α-λιποϊκό οξύ, η γλιβενκλαμίδα, η αλλοπουρινόλη, η μετφορμίνη, η ρεπαγλινίδα, ο φαινυλεστέρας του καφεϊκού οξέος και η καρβεδιλόλη, έχουν βρεθεί ευεργετικά στον διαβήτη και στην πρόληψη των διαβητικών επιπλοκών λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Saikat&Chakraborty, 2011).

2.8.3. Αντιοξειδωτικά Και Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες

Το νευρικό σύστημα είναι αρκετά ευάλωτο στην βλάβη από ελεύθερες ρίζες. Τα μεμβρανικά λιπίδια στον εγκέφαλο περιέχουν υψηλά επίπεδα αλυσίδων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι επιρρεπή σε επίθεση από ελεύθερες

ρίζες. Εκτός από την παρουσία εύκολα υπεροξειδιώσιμων λιπαρών οξέων, ο εγκέφαλος καταναλώνει επίσης μεγάλες ποσότητες συνολικού οξυγόνου σε σχέση με το σχετικά μικρό βάρος του, συμβάλλοντας περαιτέρω στον σχηματισμό αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Ταυτόχρονα, έχει αποδειχθεί ότι ο εγκέφαλος έχει χαμηλά ποσοστά ενζύμων όπως η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η γλουταθειόνη υπεροξειδάση, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ROS (Rao&Balachandran, 2013). Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες συμβάλλει σε αρκετές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος του Πάρκινσον, η νόσος του Αλτσχάιμερ, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, η νόσος του Χάντινγκτον, η γνωστική δυσλειτουργία στους ηλικιωμένους, η σχιζοφρένεια και η όψιμη δυσκινησία. Τα αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικοί παράγοντες στην πρόληψη της βλάβης των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA στους νευρώνες. Η αδρανοποίηση των οξυ-ριζών από διατροφικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και το β-καροτένιο μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική προσέγγιση για τη νευροπροστασία σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές (Saikat&Chakraborty, 2011).

2.8.4. Αντιοξειδωτικά Και Καρδιαγγειακές Νόσοι

Τα πρόσφατα πειραματικά δεδομένα όσον αφορά την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και τις επιδημιολογικές μελέτες που συνδέουν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο πλάσμα με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (DUTHIE, et al., 1989). Οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες αποτελούν έναν ελπιδοφόρο τομέα στην πρόληψη αυτών των παθήσεων. Ο προτεινόμενος μηχανισμός για ένα τέτοιο αποτέλεσμα προέρχεται από βασική έρευνα που δείχνει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αναστέλλουν την οξείδωση της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Manson, et al., 2013). Όσον αφορά τις αιτίες των καρδιαγγειακών παθήσεων, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι μία από τις κυριότερες. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, στην αποδιοργάνωση της διπλοστιβάδας των λιπιδίων της μεμβράνης και σε

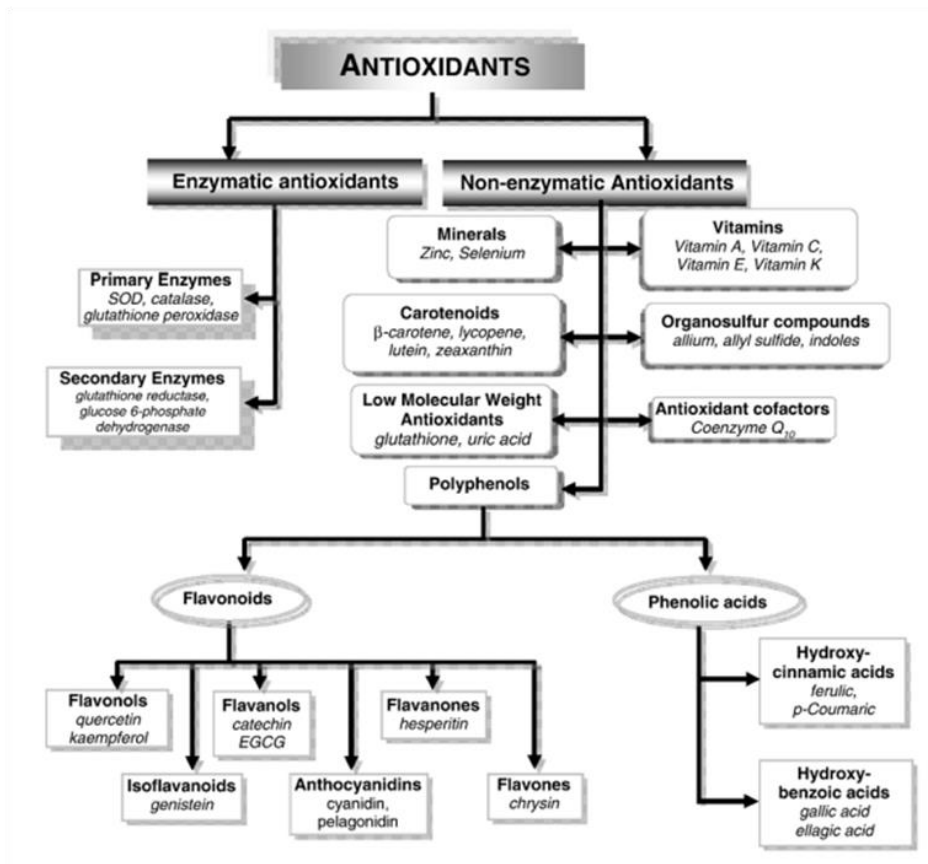
λειτουργικές τροποποιήσεις διαφόρων κυτταρικών πρωτεϊνών. Εμφανίζονται ανωμαλίες στη λειτουργία των μυοκυττάρων λόγω των αυξημένων επιδράσεων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα υποκυτταρικά οργανίδια. Πιστεύεται ότι η οξείδωση της LDL, η απώλεια μονοξειδίου του αζώτου και η αγγειακή φλεγμονή λόγω οξειδωτικού στρες υποδεικνύουν τη δυνατότητα των αντιοξειδωτικών θεραπειών να βελτιώσουν τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Sen&Chakraborty, 2011). Αρκετές μελέτες υποδηλώνουν ότι η βιταμίνη E μειώνει την ευαισθησία της LDL σε οξειδωτικές τροποποιήσεις. Το β-καροτένιο αποτελεί συστατικό της αντιοξειδωτικής άμυνας της LDL και έχει αποδειχθεί ότι καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL και ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL *in vitro*. Επιπλέον, μια σειρά πειραμάτων έχει δείξει ότι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) έχει επίσης σημαντική και ουσιαστική ανασταλτική δράση τόσο στην οξείδωση της LDL που καταλύεται από χαλκό όσο και στην οξείδωση που προκαλείται από μακροφάγα (Hercberg, et al., 1998). Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτών των μελετών δεν είναι απόλυτα συνεπή, αλλά γενικά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Καίρια σημασία αποτελεί η συνεχής μελέτη των αντιοξειδωτικών ως θεραπεία για αυτές τις παθήσεις.

Role of free radicals in various diseases	
Diseases	Role of free radicals in pathophysiology
Atherosclerosis	Superoxide-mediated endothelial dysfunction, activation of macrophages
Myocardial infarction	ROS driven ischemic reperfusion injury and myocyte necrosis and/or apoptosis
Hypertension	ROS-mediated vascular smooth muscle cell proliferation, oxidant production via NADH/NADPH oxidase and endothelial dysfunction
Diabetes	ROS accelerated formation of advanced glycation end products (AGEs)
Aging	Superoxide-mediated endothelial dysfunction
Cancer	Cell damage and metabolic abnormalities ROS-mediated gene mutations (modification of pyridine and purine bases) and post-translational modifications leading disruption of cellular processes
Parkinson's disease	ROS-mediated mitochondrial dysfunction
Alzheimer's disease	Amyloid peptide and advanced glycation end products ROS-mediated neurotoxicity to hippocampal cells and the synaptosomal membranes
Huntington's disease	ROS-mediated transcriptional dysregulation and mitochondrial impairment
Autoimmune disorders	ROS-mediated inflammation and tissue destruction
Age-related macular degeneration	Photochemical reactions in the oxygen-rich environment of the outer retina lead to the liberation of cytotoxic (ROS)
Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, inflammation and hyperoxia	ROS-mediated inflammation and endothelial dysfunction

Εικόνα 9: Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών σε διάφορες ασθένειες (<https://doi.org/10.1016/j.iconrel.2006.04.015>).

2.9. Αντιοξειδωτικά Στα Ψάρια

Τα ψάρια περιέχουν διάφορα αντιοξειδωτικά για την προστασία των ακόρεστων λιπιδίων τους και άλλων θρεπτικών συστατικών από τις αντιδραστικές μορφές οξυγόνου. Υπάρχουν αρκετές φυσικές ενώσεις που συμμετέχουν στον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό τους. Αυτές περιλαμβάνουν ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδάση, γλουταθειόνη και υπεροξειδικήδισμουτάση), καρτενοειδή, πεπτίδια, αμινοξέα και φαινολικές ενώσεις (τοκοφερόλες, ουβικινόνες). Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και στα μιτοχόνδρια των κυτταρικών μεμβρανών (Bragadóttir, 2001).



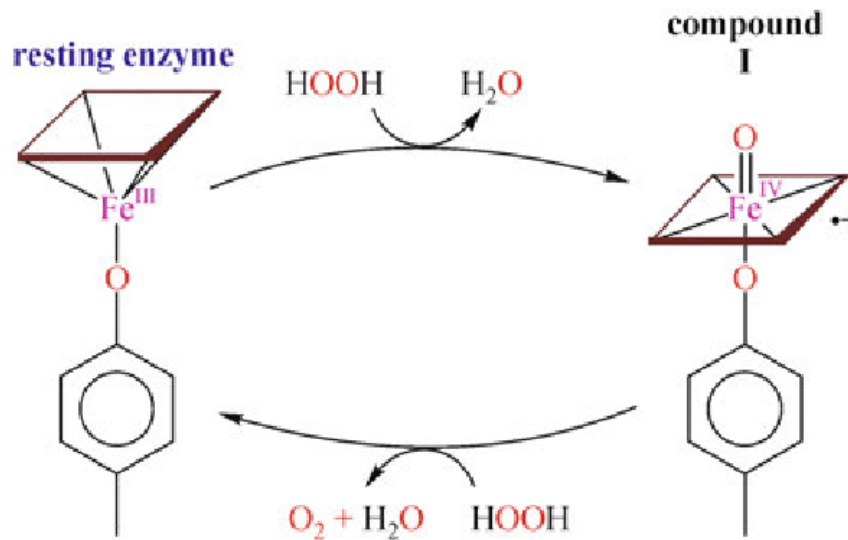
Εικόνα 10: Κατηγοριοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών (<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>).

2.9.1. Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Το επίπεδο της ενζυμικής δραστηριότητας ποικίλλει ανάλογα με το είδος και τον τύπο του μυός.

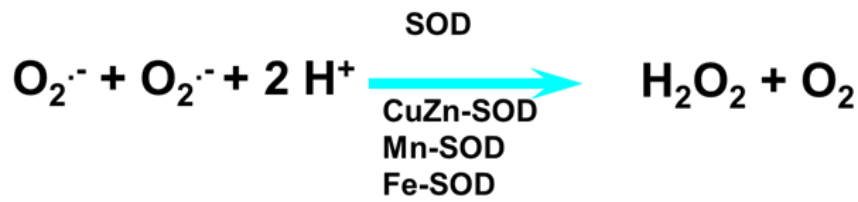
Καταλάση (CAT): Είναι ένα κοινό αντιοξειδωτικό ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς ιστούς που χρησιμοποιούν οξυγόνο. Το ένζυμο χρησιμοποιεί είτε σίδηρο είτε μαγγάνιο ως συμπράγοντα και καταλύει την αποδόμηση ή μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και μοριακό οξυγόνο, ολοκληρώνοντας έτσι τη διαδικασία αποτοξίνωσης που αρχίζει η SOD (υπεροξειδική δισμουτάση). Είναι άφθονο στα κύτταρα, όπου συνεχώς αναζητά μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου (Ighodaro&Akinloye, 2019). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα επιβλαβές παραπροϊόν πολλών φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, έτσι για να αποφευχθεί η

βλάβη, πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλες, λιγότερο επικίνδυνες ουσίες. Για τον σκοπό αυτό, η καταλάση χρησιμοποιείται συχνά από τα κύτταρα για να καταλύσει γρήγορα τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε λιγότερο αντιδραστικά αέρια μόρια οξυγόνου και νερού (εικόνα 11) (Gaetani, et al., 1996).



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης CAT. $H_2O_2 + Fe(III)\text{-enzyme} \rightarrow H_2O + O_2 + Fe(IV)\text{-enzyme} + H^+$
 $H_2O_2 + Fe(IV)\text{-enzyme} + H^+ \rightarrow H_2O + O_2 + Fe(III)\text{-enzyme}$. Ο μηχανισμός δράσης της καταλάσης περιλαμβάνει δύο στάδια: πρώτον, το ένζυμο αντιδρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σχηματίζοντας το Σύνθετο I. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο μόριο H_2O_2 χρησιμοποιείται για την αναγέννηση του ενζύμου, παράγοντας νερό και οξυγόνο, επιστρέφοντας το ένζυμο στην αρχική του κατάσταση. ([10.1007/s13238-010-0113-z](https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z))

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD): Είναι το πρώτο ένζυμο αποτοξίνωσης και το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό στο κύτταρο. Είναι ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο που λειτουργεί ως συστατικό της πρώτης γραμμής άμυνας κατά των αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Καταλύει την δισμουτάση δύο μορίων υπεροξειδίου του ανιόντος (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μοριακό οξυγόνο (O_2), καθιστώντας έτσι το δυνητικά επικίνδυνο υπεροξείδιο του ανιόντος λιγότερο επιβλαβές (εικόνα 12) (Ighodaro & Akinloye, 2019).



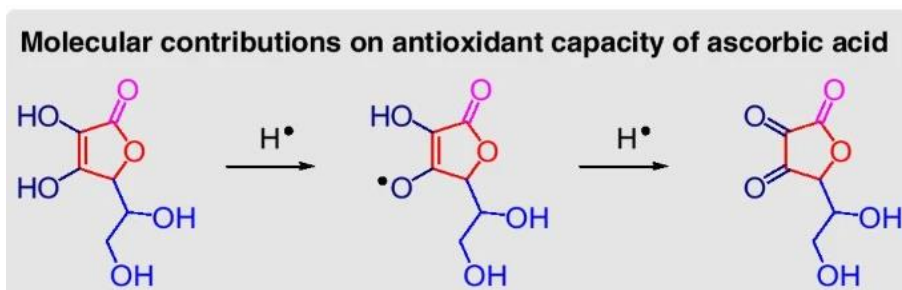
Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης SOD (Ighodaro & Akinloye, 2019).

Γλουταθειονική υπεροξειδάση (GPx): Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και τα λιπιδικά υπεροξείδια στα αντίστοιχα αλκοόλια τους, κυρίως στα μιτοχόνδρια και μερικές φορές στο κυτταρόπλασμα. Τις περισσότερες φορές, η δραστηριότητά της εξαρτάται από έναν μικροθρεπτικό συμπαράγοντα γνωστό ως σελήνιο. Για αυτόν τον λόγο, η GPx συχνά αναφέρεται ως σεληνοκυστεϊνική υπεροξειδάση. Το ένζυμο διαδραματίζει έναν πιο κρίσιμο ρόλο στην αναστολή της διαδικασίας υπεροξείδωσης των λιπιδίων και, επομένως, προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες (Ighodaro & Akinloye, 2019). Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ζώα (Brigelius-Flohé, 1999). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-1 είναι η πιο άφθονη και είναι ένας πολύ αποτελεσματικός αποδέκτης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-4 είναι πιο δραστική με τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στο ήπαρ και χρησιμεύουν επίσης στον μεταβολισμό της αποτοξίνωσης (Hayes, 2005).

2.9.2. Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Ασκορβικό οξύ: Το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς βιταμίνη C λειτουργεί ως ερυθροαναγωγικός συμπαράγοντας και καταλύτης σε ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών αντιδράσεων και διεργασιών (M, 2001). Αποτελεί αντιοξειδωτικό που βρίσκεται τόσο στα ζώα, όσο και στα φυτά. Στον άνθρωπο λαμβάνεται από την τροφή καθώς δεν μπορεί να συντεθεί στον οργανισμό του. Στα κύτταρα, διατηρείται στην ανηγμένη μορφή του μέσω αντίδρασης με τη γλουταθειόνη, η οποία μπορεί να καταλύεται από την πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση και τις γλουταρεδοξίνες. Η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C παρέχει ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα σε υδατική φάση, κυρίως μέσω της

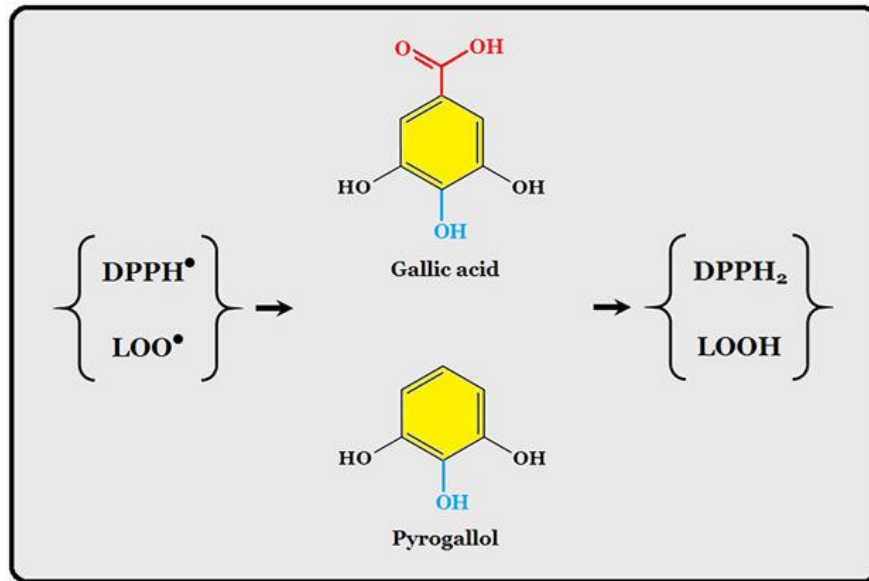
απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, καθώς λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας και μπορεί να μειώσει και έτσι να εξουδετερώσει τις ROS, όπως τουπεροξειδίου του υδρογόνου (Padayatty, et al., 2013).



Εικόνα 13: Αντιοξειδωτική συνεισφορά του ασκορβικού οξέος. ([10.1007/s00894-021-04994-9](https://doi.org/10.1007/s00894-021-04994-9))

Γαλλικό οξύ: Το γαλλικό οξύ (3, 4, 5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), μια φυσικώς απαντώμενη τριφαινολική ένωση χαμηλού μοριακού βάρους, έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και αποτελεσματικός παράγοντας επαγωγής απόπτωσης. Παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από αντιδραστικά είδη που συχνά απαντώνται στα βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ριζών υδροξυλίου (HO^\bullet), υπεροξειδίου (O_2^\bullet) και υπεροξυλίου (ROO^\bullet), καθώς και των μη ριζικών, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και υποχλωριώδους οξέος ($HOCl$) (εικόνα 12) (Padayatty, 2013) (Padayatty, et al., 2003).

Πυρογαλλικό οξύ: Είναι μία τριυδροξυφαινόλη που παράγεται με το γαλλικό οξύ όταν επιδρά σε αυτό θερμότητα. Όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία O_2 . Με την παρουσία του SOD η αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης αναστέλλεται λόγω της μετατροπής των ριζών O_2 σε H_2O_2 (Ζήκου, 2010).

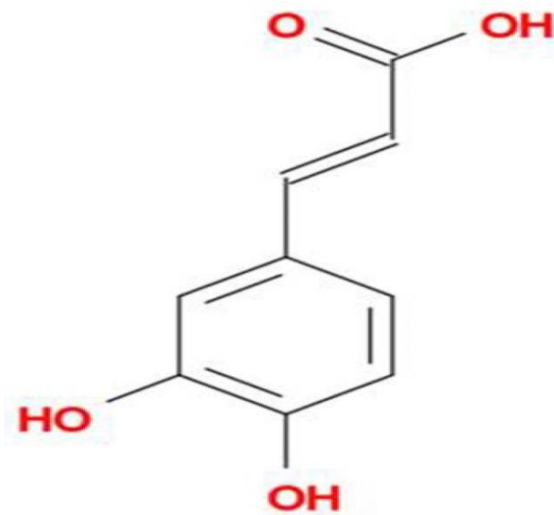


Εικόνα 14: Δράση Γαλλικού και Πυρογαλλικού οξέος.

Η απόδοση του γαλλικού οξέος και του πυρογαλλόλης στην εξουδετέρωση του 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH•) σε μεθανόλη και στην αναστολή του υπεροξυλικού ριζικού (LOO•). (<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800319>)

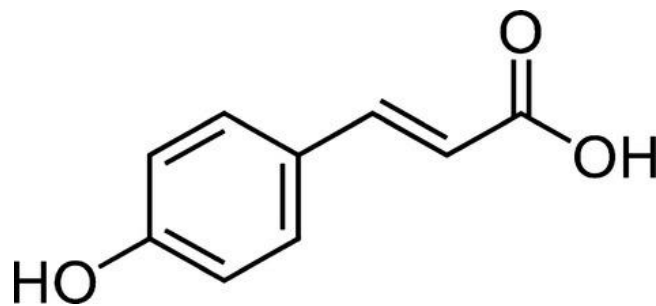
Κατεχίνη: Κλινικές μελέτες έχουν δείξει τα ευεργετικά αποτελέσματα της κατεχίνης λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης. Επηρεάζει τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και την πολυφαρμακευτική αντοχή σε καρκίνους και σχετιζόμενες διαταραχές (Zanwar, et al., 2014).

Καφεϊκό οξύ: Ανήκει στις πολυφαινολικές ενώσεις που καταναλώνουμε καθημερινά. Οι αντιοξειδωτικές του επιδράσεις παίζουν καίριο ρόλο στην ανθρώπινη υγεία, καθώς μπορούν να επηρεάσουν τον καρκίνο, τον διαβήτη, την αθηροσκλήρωση, την νόσο Αλτσχάιμερ, αλλά και βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις. Η δομή του καφεϊκού οξέος είναι αυτή που επιτρέπει την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, δίνοντας ένα υδρογόνο και λειτουργώντας έτσι ως ένας πρωτογενής αντιοξειδωτικός παράγοντας (εικόνα 15) (Pavlíková, 2023).



Εικόνα 15: Χημική δομή καφεϊκού οξέος. (Pavlikoná, 2023)

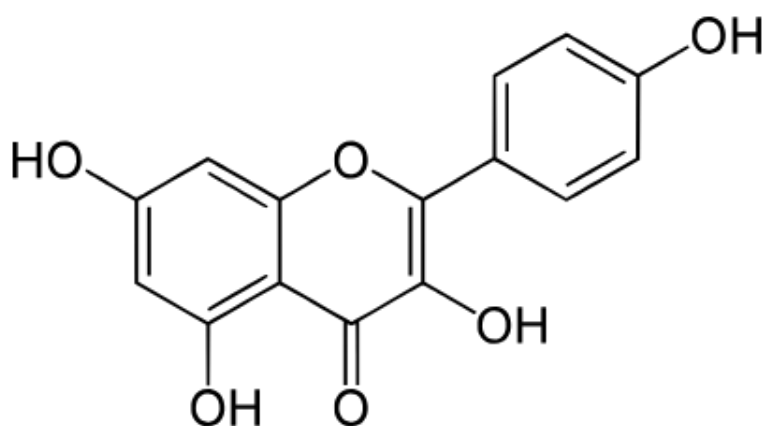
Κουμαρικό οξύ: Είναι ένα υδροξυπαράγωγο του κινναμικού οξέος και απαντάται σε τρία ισομερή: το ο-κουμαρικό, το μ-κουμαρικό και το π-κουμαρικό (p-CA) οξύ, με το τελευταίο να είναι το πιο άφθονο στη φύση. Η διαφορά μεταξύ αυτών των τριών μορίων έγκειται στη θέση της υδροξυλομάδας στον αρωματικό δακτύλιο (Ferreira, et al., 2018). Ανήκει στις φαινολικές ενώσεις και έχει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση νόσων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης και οι παθήσεις του νευρικού συστήματος (Chen, et al., 2024).



Εικόνα 16: Χημική δομή κουμαρικού οξέος (Chen, Zhang, Wang, Wang, & Mao, 2024).

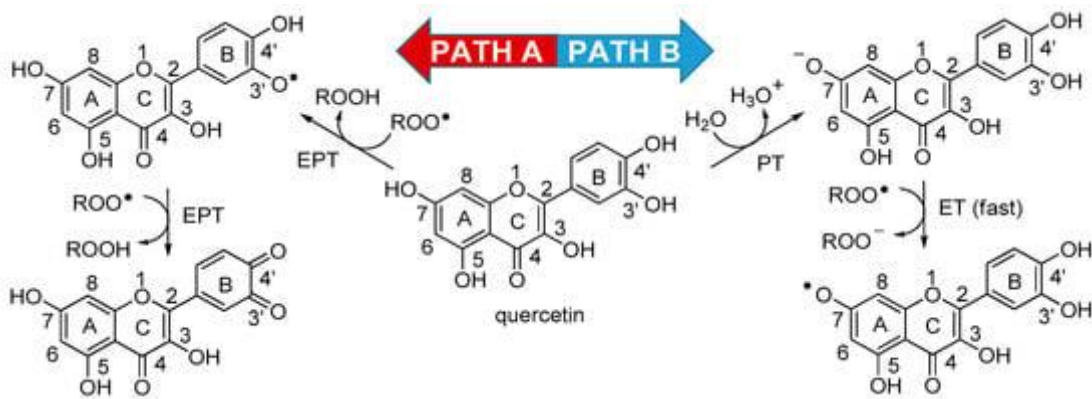
Καμφερόλη: Ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, υποομάδα των φαινολικών ενώσεων, εντοπίζονται σε πληθώρα τροφίμων και καταναλώνονται σε μεγάλο βαθμό από τον άνθρωπο (González, et al., 2011). Η καμφερόλη παρουσιάζεται ως ένα φυσικό αντιοξειδωτικό με μεγάλη αποτελεσματικότητα έναντι των ελευθέρων ριζών, μειώνοντας

έτσι το οξειδωτικό στρες και τις κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται από αυτές. Ρόλο κλειδί στην αποτελεσματικότητα της καμφερόλης έχει η δομή της· λόγω των πολλαπλών υδροξυλομάδων που περιέχει, μπορεί να διαθέσει πολλαπλά άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες και να τις καταστρέψει (Metwally, et al., 2023). Επιπροσθέτως, η καμφερόλη, έχει ενισχυτικό ρόλο στη δράση άλλων ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sharma, et al., 2021). Τέλος, η ικανότητα της να μειώνει το οξειδωτικό στρες, την καθιστά βασικό αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικό παράγοντα (Shi, et al., 2023).



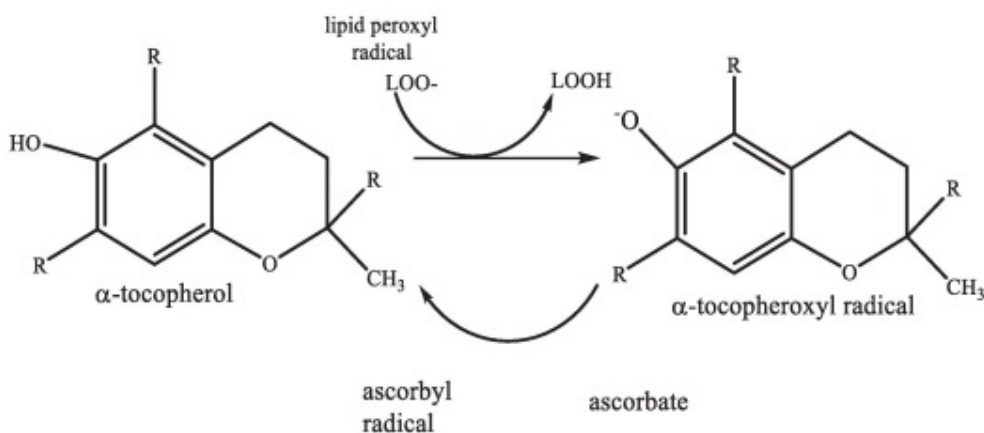
Εικόνα 17: Χημική δομή καμφερόλης (Shi, et al., 2023).

Κερσετίνη: Ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, όπως και η καμφερόλη, και αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα. Αντίστοιχα με την καμφερόλη, η κερσετίνη εμφανίζεται σε πολλά τρόφιμα με αποτέλεσμα να υπάρχει ικανοποιητικός βαθμός πρόσληψης από τον οργανισμό (Zhang, και συν., 2011). Η αντιοξειδωτική δράση της κερσετίνης, έχει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση και συνεπώς την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την προστασία του DNA από οξειδωτικές βλάβες. Επίσης, αποτελεί σημαντικό εύρημα η ικανότητα της κερσετίνης να αναστέλλει την παραγωγή νικτρικών οξειδίων (NO), συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στον περιορισμό της φλεγμονής (Zhang, et al., 2011) (Nyarko, 2024).



Εικόνα 18: Τα πιθανά μονοπάτια αντίδρασης της κερσετίνης. (Α) ανταλλαγή e^-p^+ προς τις υπεροξυλικές ρίζες από την κατεχόλη. (Β) διαδοχική απώλεια πρωτονίων και μεταφορά ηλεκτρονίου προς το νερό/υπεροξυλικές ρίζες. (<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>)

Τοκοφερόλες: Η βιταμίνη Ε είναι η συλλογική ονομασία για ένα σύνολο οκτώ συγγενικών τοκοφερόλων και τοκοτριενολών, οι οποίες είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, και αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι της βλάβης της μεμβράνης που προκαλείται από οξειδωτικά (Lobo, et al., 2010). Έχει υποστηριχθεί ότι η μορφή α τοκοφερόλης είναι το σημαντικότερο λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό και ότι προστατεύει τις μεμβράνες από την οξείδωση, αντιδρώντας με τις λιπιδικές ρίζες που παράγονται στην αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Traber&Atkinson, 2007).

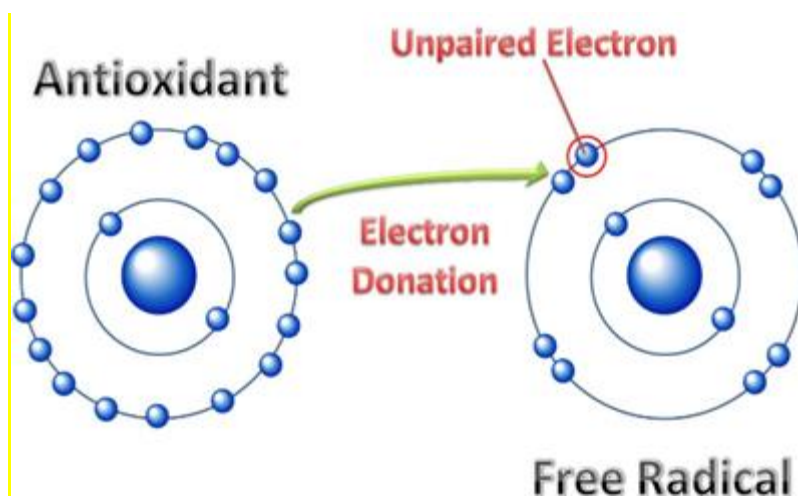


Εικόνα 19: Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός της βιταμίνης Ε (α-τοκοφερόλη) (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00066-5>).

2.10. Ελεύθερες Ρίζες

2.10.1 Ορισμός

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή ένα μόριο που μεταφέρει ένα ή περισσότερα αζευγάρωτα ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική του στιβάδα. Ο μονός αριθμός ηλεκτρονίων τις καθιστά ιδιαίτερα ασταθή και αντιδραστικές, και σε αυτό το χαρακτηριστικό τους οφείλονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούν. Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες τείνουν να αποσπούν ή να δίνουν ένα ηλεκτρόνιο σε γειτονικά μόρια-στόχους, ώστε να εξασφαλίσουν τη δική τους σταθερότητα, και έτσι τα μόρια-στόχοι με τη σειρά τους γίνονται νέες ρίζες (εικόνα 20). Ως αποτέλεσμα επέρχεται διαταραχή της μοριακής τάξης που οδηγεί σε κυτταρικές βλάβες, με κυριότερες αυτές των βιομορίων όπως του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπαρών οξέων (DiMeo&Venditti, 2020) (Θεοδόση, 2017).

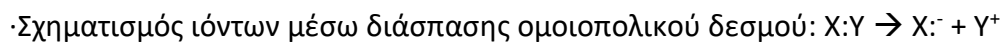
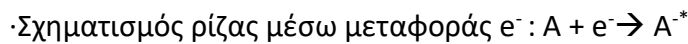


Εικόνα 20: Εξουδετέρωση ρίζας με τη προσφορά ενός e^- από αντιοξειδωτικό (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antioxidants_Free_radicals_Lobo_et_al.,.png).

2.10.2. Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών

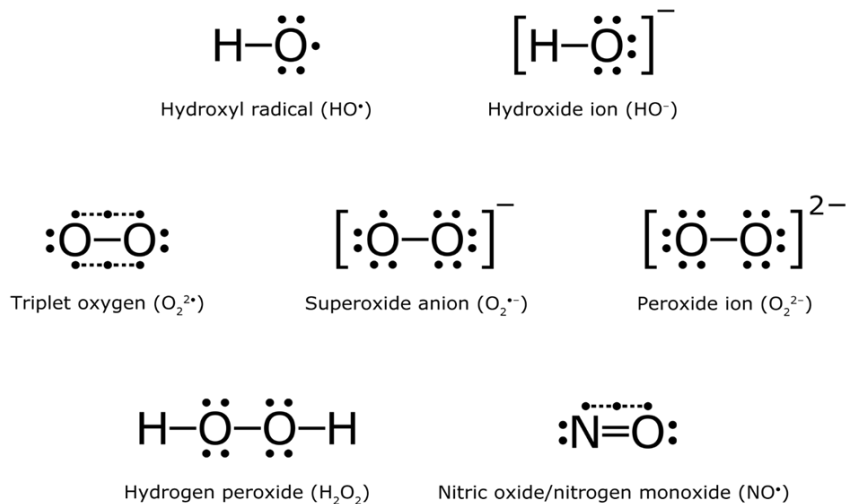
Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι στενά συνδεδεμένη με τη ζωή, καθώς οι παραγόμενες ρίζες είναι αποτέλεσμα είτε φυσιολογικών διαδικασιών του οργανισμού, είτε σπανιότερα περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι φυσιολογικές διαδικασίες που μπορεί

να οδηγήσουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, είναι οι χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό μας και είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τη φυσιολογική λειτουργία του (Γερογιάννη & Γουργουλιάνης, 2005). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η μόλυνση από βαρέα μέταλλα, οι υψηλές θερμοκρασίες, η υπεριώδης και ιονίζουσα ακτινοβολία, έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού και τη δημιουργία είτε δύο ελεύθερων ριζών, είτε την δημιουργία ιόντων (Martemucci, et al., 2022).

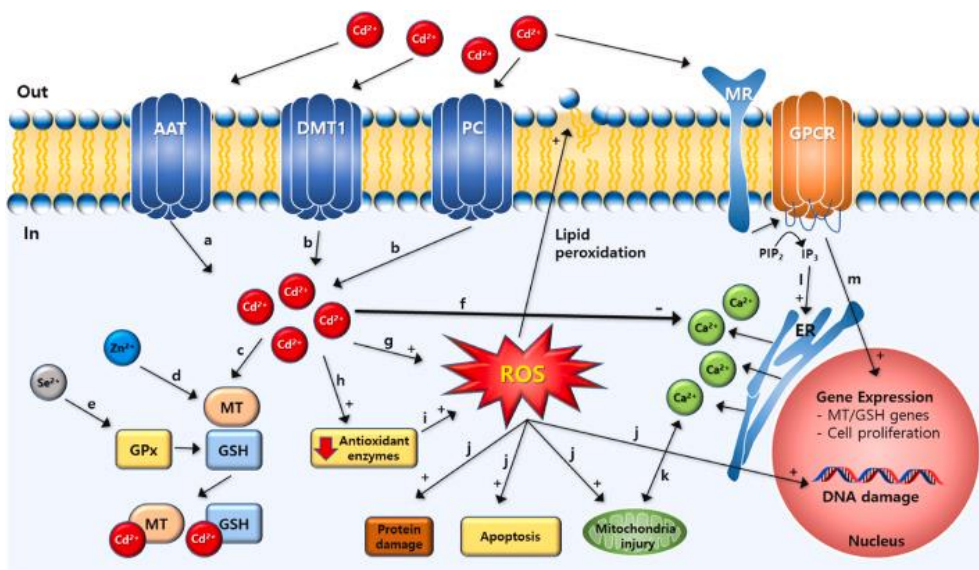


Η κύρια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών, που παράγονται μέσω φυσιολογικών διαδικασιών από τον οργανισμό, είναι τα μιτοχόνδρια. Έχει βρεθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, το 1-2% των ηλεκτρονίων προσφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας στο μοριακό οξυγόνο, αντί στη δημιουργία ατόμων νερού, με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών οξυγόνου (ROS) (Γερογιάννη & Γουργουλιάνης, 2005). Άλλα ενδεικτικά παραδείγματα φυσικής παραγωγής ελεύθερων ριζών, είναι κατά την αυτοοξείδωση χημικών μορίων όπως της αιμοσφαιρίνης και του ασκορβικού οξέος, και κατά τον μεταβολισμό ξένων ουσιών από ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Cheeseman, 1993).

Ενδοκυτταρικά οι συχνότερα εμφανιζόμενες ρίζες είναι οι δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) (Di Meo & Venditti, 2020). Ο όρος δραστικές ρίζες οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις που προκύπτουν μετά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από ένα έως τρία ηλεκτρόνια. Στις ROS συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξειδίου (OH^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), αλλά και τα παράγωγα οξυγόνου όπως, υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) (Martemucci, et al., 2022).



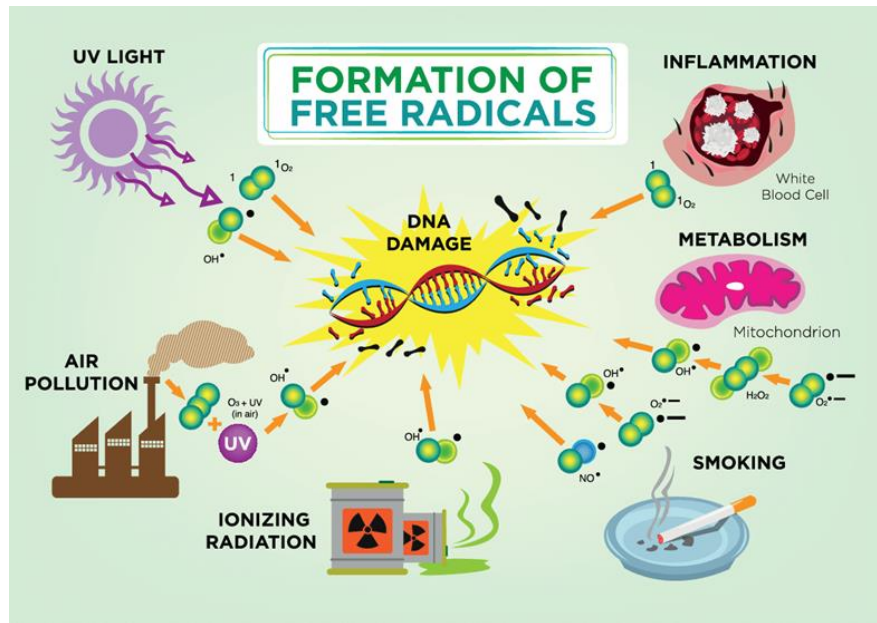
Εικόνα21: Μερικά παραδείγματα ROS. ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reactive_oxygen_species_\(ROS\)_%E2%80%93_some_examples_with_Lewis_structures_\(English_labels\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reactive_oxygen_species_(ROS)_%E2%80%93_some_examples_with_Lewis_structures_(English_labels).png))



Εικόνα 22: Η παραγωγή ROS σε ψάρια έπειτα την έκθεση σε τοξικούς παράγοντες (Cd^{+2}) (<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116600>).

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν τα βιομόρια του οργανισμού, είναι υπεύθυνες για την πρόωρη γήρανση και συχνά υπεύθυνες για πολλά νοσήματα όπως νόσο του Crohn, νόσο του Parkinson, ρευματοειδή αρθρίτιδα κ. ά. (Γερογιάννη & Γουργουλιάνης, 2005). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι λοιμώξεων. Πιο

συγκεκριμένα, τα φαγοκύτταρα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες έναντι των μικροβίων με σκοπό την καταστροφή και εξασθένηση τους ώστε να ολοκληρωθεί η φαγοκυττάρωση (Cheeseman&Slater, 1993) (Γερογιάννη & Γουργουλιάνης, 2005).



Εικόνα 23: Παράγοντες σχηματισμού ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. (https://solesence.com/wp-content/uploads/2017/12/shutterstock_295823912.png)

Κεφάλαιο 3^ο: Πειραματικό Μέρος

3.1. Τίτλος Μελέτης

“Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών παραγόντων σε αποξηραμένα δείγματα σάρκας του *Mullus barbatus* .”

3.2. Σκοπός Της Έρευνας

Σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν είναι να μελετηθεί (1) η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (FRAP) της σάρκας του ψαριού *Mullus barbatus*, (2) να γίνει μέτρηση της συνολικής φαινολικής δραστηριότητας τους, καθώς τα φαινολικά μόρια έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα , και συνεπώς να μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων του ψαριού.

3.3. Δειγματοληψία Και Προ-Επεξεργασία Δειγμάτων

Για τον σκοπό της παρούσας μελέτης λήφθηκαν από τον Θερμαϊκό κόλπο 30 ψάρια *Mullus barbatus* διαφορετικών μεγεθών και φύλων. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τον Φεβρουάριο του 2022 στο εξωτερικό Θερμαϊκό κόλπο. Τα 30 ψάρια που συλλέχθηκαν ζυγίστηκαν και μετρήθηκε το μήκος τους στο εργαστήριο. Έπειτα διαχωρίστηκαν με βάση το μήκος σε 3 τάξεις μεγέθους των 10 ατόμων. Ακολούθησε η αναγνώριση φύλου και η τοποθέτηση των διαφορετικών ιστών, ύστερα από τεμαχισμό, σε ξεχωριστά σακουλάκια (σάρκα, συκώτι, βράγχια, γονάδες) τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έπειτα περιλάμβανε τη ζύγιση κάθε ιστού, την λυοφυλίωση με το freeze-dryer, όπου τα δείγματα ξηραίνονται και την επαναζύγιση για να μπορέσει να υπολογισθεί το ποσοστό υγρασίας τους από τον τύπο $[(\text{υγρό βάρος} - \text{ξηρό βάρος}) * 100] / \text{υγρό βάρος}$. Έπειτα ακολούθησε η ομογενοποίηση όπου τα δείγματα γίνονται σκόνη με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) και έπειτα τα δείγματα στάλθηκαν στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών

επιστημών, όπου και φυλάσσονται στην κατάψυξη (-20°C) του Ερευνητικού Εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέθοδος εκχύλισης, μέθοδος FRAP, μέθοδος μέτρησης συνολικής φαινολικής δραστηριότητας (TPC), μέθοδος DPPH, μέθοδος ABTs και τέλος ανάλυση στον αναλυτή LC-MS.

Η μέθοδος FRAP πραγματοποιείται με σκοπό την μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων. Βασίζεται στην μετατροπή του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{+2}) (Prior, et al., 2005). Όσον αφορά την μέθοδο TPC το βασικό αντιδραστήριο είναι το FOLIN και στοχεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων. Σε αυτά ανήκουν τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι τανίνες, ενώ μπορεί να ανιχνευτεί βιταμίνη C και E (Prior, et al., 2005). Η μέθοδος DPPH•+ μετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, υπολογίζοντας την δυνατότητα εκκαθάρισης των ριζών του αντιδραστηρίου. Προσδιορίζει την οικογένεια των φαινολών, τις βιταμίνες C και E και τα καροτενοειδή (Yamauchi, et al., 2024) (Rubab, Chelliah, & Oh, 2022). Η μέθοδος ABTS•+, ομοιάζει με αυτή της DPPH, με διαφορά στην ευαισθησία και μέσω της κατανάλωσης του αντιδραστηρίου λόγω της αντίδρασης με φαινολικές ενώσεις εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων (Villano, et al., 2004). Με σκοπό την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων και των βιταμινών που ανιχνεύονται με τις παραπάνω μεθόδους έγινε χρήση του αναλυτή LC-MS.

Πίνακας 1.: Sizeclass= τάξη μεγέθους (I -> μικρά, II -> μεσαία, III -> μεγάλα). M.Bar= *Mullus barbatus*, κουτσομούρα. MU= Muscle, Σάρκα. THE= ThermaikosGulf, Θερμαϊκός κόλπος. TL= total length, ολικό μήκος ψαριού. TW= total weight, ολικό βάρος ψαριού. SEX= φύλλο [M=Male(αρσενικό), F=Female(θηλυκό), UN=Unidentified(ουδέτερο)]. (Παναγιωτάκου, 2024).

Size class	Number	Fish	Tissue	Origin	TL	TW	Sex	grams without the zip bag	conversion to milligrams
II	1.1	M.Bar	MU	THE	15.5	36.48	M	0.2003	200.3
I	2.1	M.Bar	MU	THE	14.5	31.7	UN	0.2024	202.4
I	3.1	M.Bar	MU	THE	12.5	26.02	M	0.1993	199.3
I	4.1	M.Bar	MU	THE	15.1	34.65	M	0.2009	200.9
I	5.1	M.Bar	MU	THE	14.7	32.79	M	0.208	208
I	6.1	M.Bar	MU	THE	14.1	30.89	M	0.2164	216.4
I	7.1	M.Bar	MU	THE	13.2	27.08	M	0.209	209
I	8.1	M.Bar	MU	THE	14.7	35.33	M	0.2005	200.5
I	9.1	M.Bar	MU	THE	14.5	33.37	F	0.2095	209.5
I	10.1	M.Bar	MU	THE	12.5	20.66	UN	0.1999	199.9

III	11.1	M.Bar	MU	THE	18.9	62.26	F	0.2105	210.5
II	12.1	M.Bar	MU	THE	16	44.4	F	0.2065	206.5
II	13.1	M.Bar	MU	THE	17.2	58.28	F	0.2022	202.2
II	14.1	M.Bar	MU	THE	16.4	48.61	M	0.2098	209.8
II	15.1	M.Bar	MU	THE	17.7	59.77	F	0.2038	203.8
II	16.1	M.Bar	MU	THE	17.8	62.47	F	0.2015	201.5
II	17.1	M.Bar	MU	THE	18	63.01	F	0.2149	214.9
I	18.1	M.Bar	MU	THE	15.1	37.85	F	0.2008	200.8
III	19.1	M.Bar	MU	THE	18.5	71.38	F	0.2009	200.9
III	20.1	M.Bar	MU	THE	21.5	121.95	F	0.21	210
III	21.1	M.Bar	MU	THE	20.1	87.9	F	0.2282	228.2
III	22.1	M.Bar	MU	THE	20.2	91.36	F	0.2018	201.8
II	23.1	M.Bar	MU	THE	18.3	68.5	F	0.2003	200.3
II	24.1	M.Bar	MU	THE	17.5	55.99	F	0.2052	205.2
III	25.1	M.Bar	MU	THE	19.7	93.7	F	0.2013	201.3
III	26.1	M.Bar	MU	THE	19.2	85.73	F	0.2079	207.9
III	27.1	M.Bar	MU	THE	20.4	112.55	F	0.2695	269.5
III	28.1	M.Bar	MU	THE	22.7	143.82	F	0.2466	246.6
II	29.1	M.Bar	MU	THE	17.5	59.23	F	0.2005	200.5
III	30.1	M.Bar	MU	THE	20.8	97.88	F	0.2013	201.3

Πίνακας 2: Διαχωρισμός των ψαριών σε τάξεις μεγέθους με βάση το μήκος τους, η διακύμανση του βάρους τους και η μέση τιμή μήκους και βάρους των τάξεων καθώς και η τυπική τους απόκλιση (M: αρσενικό, F: θυληκό, UN: Άγνωστο).

Τάξη μεγέθους	Μήκος (εκ.)	Βάρος (γρ.)	Μέσος όρος μήκους (\pm STDEV)	Μέσος όρος βάρους (\pm STDEV)	M/ F/UN (n)
1	12.5-15.1	20.66-37.85	14.1 \pm 1	31 \pm 5.1	6/2/2
2	15.5-18.3	36.48-68.5	17.2 \pm 0.9	55.7 \pm 9.7	2/8/0
3	18.5-22.7	71.38-143.82	20.2 \pm 1.3	96.9 \pm 24	0/10/0

3.4. Μεθοδολογία Πειραμάτων

3.4.1. Μέθοδος Εκχύλισης

Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση του πειράματος είναι η ομογενοποίηση των δειγμάτων, τα οποία είναι φυλαγμένα στην κατάψυξη, με σκοπό την δημιουργία υπερκείμενου μέσα στο οποίο βρίσκονται οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες που πρόκειται να μελετηθούν. Η εκχύλιση είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων.

3.4.1.1. Οργανολογία

1. αναλυτικός ζυγός KERN ABJ-NM/ABS-N,
2. δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες,
3. erpendorf,
4. πιπέτες 20:200, 100-1000 μL ,
5. ρύγχη για πιπέτα 100-1000 μL ,
6. ποτήρι ζέσεως 1000 μL ,
7. vortex,
8. φυγόκεντρος,
9. λουτρό υπερήχων,
10. σπάτουλα.

3.4.1.2. Αντιδραστήρια

1. μεθανόλη CH_3OH (Fisher Scientific, $\geq 99.8\%$),
2. υπερκαθαρό νερό H_2O HPLC (Chem-Lab NV).

Παρασκευή διαλύτη

1. σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 16mL μεθανόλη (CH_3OH),
2. στον δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε και 4 mL HPLC H_2O .

3.4.1.3. Πειραματική Πορεία Για Την Πραγματοποίηση Της Εκχύλισης

1. προσθέτουμε σε ένα erpendorf 50mg από κάθε δείγμα (1.1-30.1) αποξηραμένου μυϊκού ιστού,
2. από τον διαλύτη μεθανόλη-νερό 80:20 παίρνουμε με πιπέτα 500μL και προσθέτουμε σε κάθε erpendorf,
3. ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 δευτερόλεπτα,
4. ακολουθεί εφαρμογή της υποβοηθούμενης με υπερήχους εκχύλισης. Τα erpendorf τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά όπου με την κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αρραίωσης αλλά και με την αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας λόγω διάχυσης και διαλυτοποίησης πραγματοποιείται η εκχύλιση των δειγμάτων,
5. τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 5500 στροφές,
6. το τελικό υπερκείμενο που έχει δημιουργηθεί σε κάθε erpendorf συλλέγεται και τοποθετείται εκ νέου σε ένα καινούριο αφού πρώτα έχει αριθμηθεί,
7. φυλάσσεται στην κατάψυξη.

3.4.2. Δείκτης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας FRAP (FerricReducingAbility of Plasma)-Ικανότητα Μείωσης Σιδήρου Του Πλάσματος

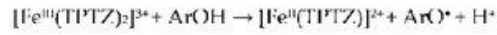
Έπειτα τη διαδικασία εκχύλισης και απομόνωσης του υπερκείμενου διαλύματος, στο οποίο εμπεριέχονται οι αντιοξειδωτικοί που πρόκειται να μελετηθούν, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας FRAP. Τα δείγματα είναι φυλαγμένα στην κατάψυξη του εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας.

3.4.2.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Κατά την αντίδραση FRAP πραγματοποιείται, σε συνθήκες χαμηλού pH και παρουσίας αντιοξειδωτικών, αναγωγή του ηλεκτρικού φορτίου, Fe(III) σε Fe(II). Η αναγωγή αυτή, στη συνέχεια, οδηγεί την αντίδραση σε παραγωγή Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-thiazine) και τελικά στη μετατροπή του σε Fe(II)-TPTZ. Αποτέλεσμα της μεθόδου είναι το δείγμα, έπειτα τη προσθήκη του αντιδραστήριου FRAP, να παίρνει ένα μπλε χρώμα του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της ποσότητας των αντιοξειδωτικών του δείγματος. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων, σε μήκος κύματος $\lambda = 593\text{nm}$, με σκοπό τον προσδιορισμό

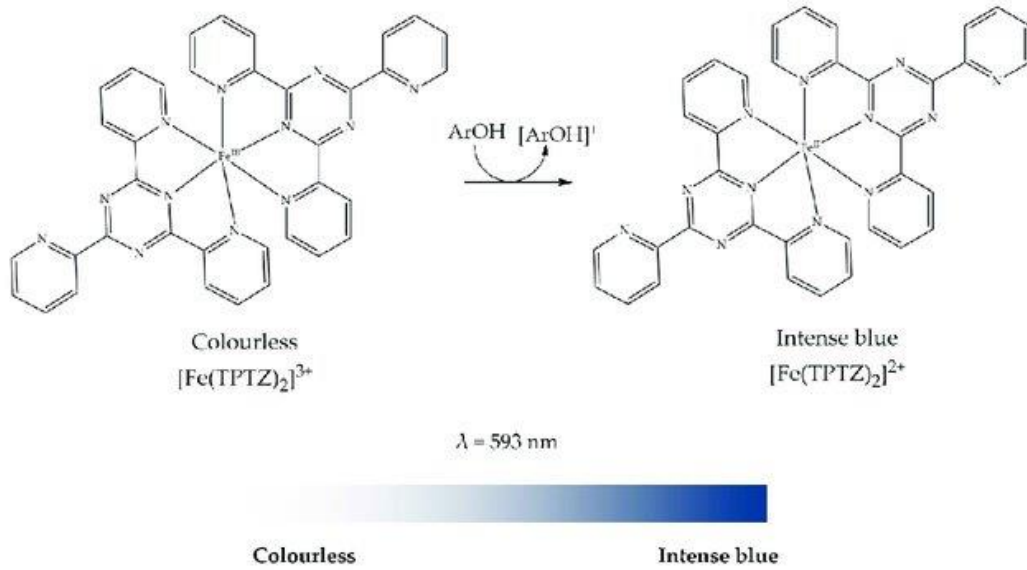
της ποσότητας των αντιοξειδωτικών του δείγματος. Είναι λογικό πως όσο πιο έντονο είναι το χρώμα του δείγματος, τόσο μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα εμφανίζει (εικόνα 24) (Benzie&Strain, 1996) (Κούρτη, 2019).

Chemical reaction:

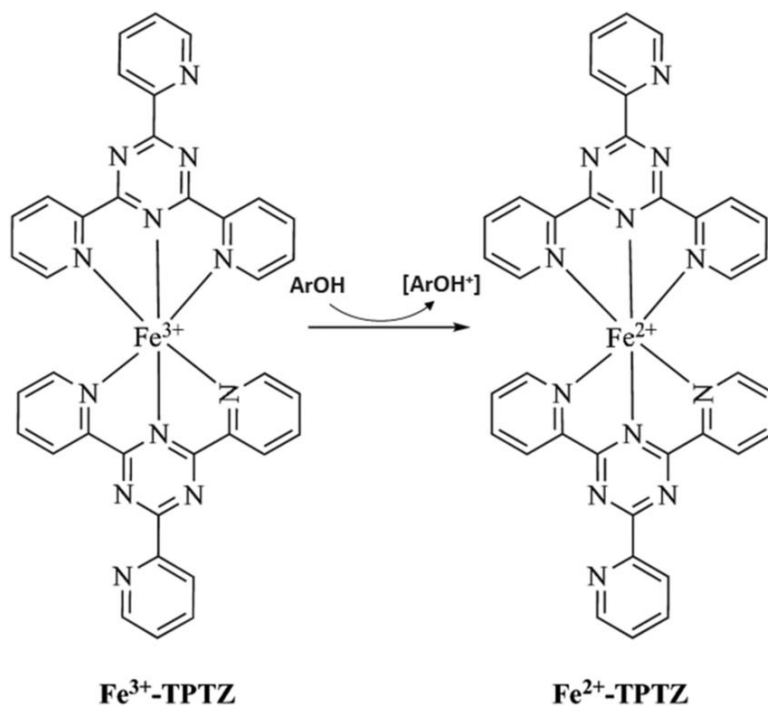


Scheme 12

Mechanism of reaction:



Εικόνα 24: Μηχανισμός δράσης FRAP με την χρωματική αλλαγή του δείγματος (Benzie & Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, 1996*).



Εικόνα 25: Μηχανισμός δράσης FRAP σε μεγένθυση.

3.4.2.2. Οργανολογία

1. επωστικός κλίβανος WTCbinder,
2. αναλυτικός ζυγός KERN ABJ-NM/ABS-N,
3. δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες,
4. erpendorf,
5. ποτήρια ζέσεως 1000μL,
6. πιπέτες 20:200, 100:1000μL,
7. ρύγχη για πιπέτες των 20:200μL και 100:1000μL,
8. φωτόμετροUltrospect 2100 pro,
9. κυψελίδες,
10. vortex.

3.4.2.3. Αντιδραστήρια

Για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος buffer οξικού οξέος 300mM και pH=3,6:

1. υπερκαθαρό H₂O για HPLC (Chem-Lab NV),

2. καθαρό CH_3COOH ,
3. ένυδρο $\text{CH}_3\text{COONA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Chem-Lab NV).

Για τη δημιουργία διαλύματος TPTZ 100mM:

1. TPTZ,
2. καθαρό HCl.

Για τη δημιουργία διαλύματος $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mM:

1. καθαρό ένυδρο $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ένυδρου $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mM:

1. καθαρό ένυδρο $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.4.2.4. Πειραματική Πορεία

Για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος buffer οξικού οξέος 300mM και pH=3,6:

1. σε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 98,4mL H_2O HPLC (Chem-Lab NV),
2. στον δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 1,6mL CH_3COONA ,
3. ζυγίζουμε 0,31g CH_3COONA και προσθέτουμε στον δοκιμαστικό σωλήνα,
4. αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Για τη δημιουργία διαλύματος TPTZ 100mM:

1. προσθέτουμε 6,7 ml H_2O HPLC σε δοκιμαστικό σωλήνα,
2. προσθέτουμε σε αυτόν 3, 3ml καθαρό HCl (Chem-Lab NV),
3. ζυγίζουμε 0, 312 gr TPTZ (Cayman CHEMICAL) και το προσθέτουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα,
4. αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Για τη δημιουργία διαλύματος $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mM:

1. προσθέτουμε 10mL HPLC H₂O σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα,
2. προσθέτουμε 0, 54gr FeCl₃ 6H₂O (Chem-Lab NV),
3. αποθηκεύουμε στο ψυγείο.

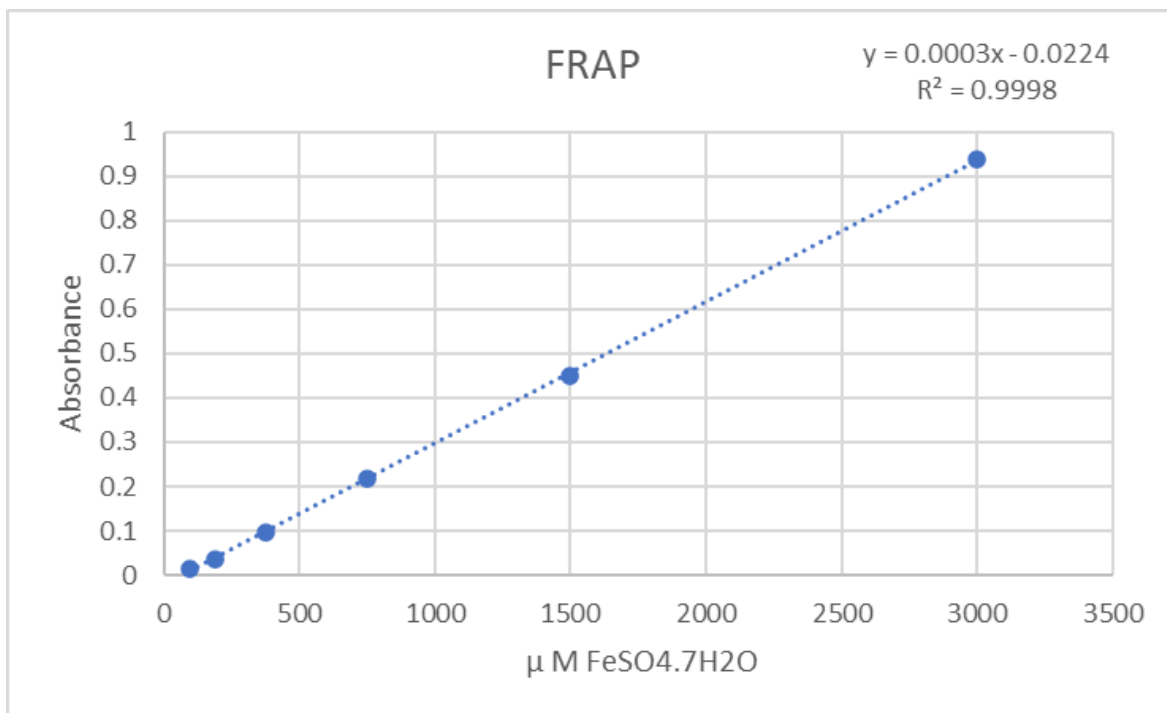
Για τη δημιουργία ένυδρου FeSO₄7H₂O 3mM:

1. προσθέτουμε 20, 38ml HPLC H₂O,
2. προσθέτουμε 0, 01 gr FeSO₄ 7H₂O (Chem-Lab NV).

Για την πρότυπη καμπύλη:

1. πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις 1:2, σε Eppendorf, από αρχικό πυκνό διάλυμα FeSO₄ 7H₂O 3000μM έως 93, 75μM,
2. σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες πραγματοποιήθηκε προσθήκη 40μL FeSO₄7H₂O και 40μL για το τυφλό,
3. προστέθηκαν στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 1, 2mL αντιδραστηρίου FRAP (200μL FeCl₃, 200μL TPTZ, 3600μL H₂O, 20ml Buffer),
4. κάναμε ανάδευση για 3'',
5. επωάζουμε τα γυάλινα σωληνάκια για 5' στους +40°C σε κλίβανο,
6. μεταφέρουμε δείγματος από τα σωληνάκια σε κυψελίδα,
7. κάνουμε φωτομέτρηση σε μήκος κύματος λ=593nm.

Πραγματοποιώντας την παραπάνω διαδικασία προκύπτει η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



Εικόνα 26: Διάγραμμα μορφής $y=ax+b$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση ένυδρου θειικού σιδήρου.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της αναγωγικής ικανότητας στα δείγματα *Mullus barbatus* :

1. πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με την πρότυπη καμπύλη, όμως αντί για το διάλυμα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, προστέθηκαν 40μL υπερκείμενο διάλυμα από την εκχύλιση του δειγμάτων *Mullus barbatus*,
2. με βάση την εξίσωση που προέκυψε ($y = 0.0003x - 0.0224$) από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζουμε την συγκέντρωση κάθε δείγματος, βάζοντας όπου y την αντίστοιχη τιμή του μέσου όρου απορρόφησης, έτσι προκύπτει ο παρακάτω πίνακας.

Πίνακας 3: Πίνακας συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP.

SIZE	CODE	A1	A2	M.O.	C (mM)	C (ppm)
I	2.1	0.194	0.185	0.1895	706.33	192.64
I	3.1	0.339	0.338	0.3385	1203.00	328.09
I	4.1	0.155	0.15	0.1525	583.00	159.00
I	5.1	0.083	0.086	0.0845	356.33	97.18

I	6.1	0.142	0.144	0.143	551.33	150.36
I	7.1	0.207	0.228	0.2175	799.67	218.09
I	8.1	0.098	0.109	0.1035	419.67	114.45
I	9.1	0.122	0.124	0.123	484.67	132.18
I	10.1	0.199	0.228	0.2135	786.33	214.45
I	18.1	0.208	0.233	0.2205	809.67	220.82
II	1.1	0.15	0.177	0.1635	619.67	169.00
II	12.1	0.067	0.068	0.0675	299.67	81.73
II	13.1	0.14	0.156	0.148	568.00	154.91
II	14.1	0.196	0.216	0.206	761.33	207.64
II	15.1	0.126	0.133	0.1295	506.33	138.09
II	16.1	0.171	0.204	0.1875	699.67	190.82
II	17.1	0.09	0.076	0.083	351.33	95.82
II	23.1	0.112	0.09	0.101	411.33	112.18
II	24.1	0.15	0.133	0.1415	546.33	149.00
II	29.1	0.168	0.187	0.1775	666.33	181.73
III	11.1	0.102	0.105	0.1035	419.67	114.45
III	19.1	0.074	0.093	0.0835	353.00	96.27
III	20.1	0.178	0.202	0.19	708.00	193.09
III	21.1	0.155	0.13	0.1425	549.67	149.91
III	22.1	0.187	0.163	0.175	658.00	179.45
III	25.1	0.115	0.108	0.1115	446.33	121.73
III	26.1	0.163	0.155	0.159	604.67	164.91
III	27.1	0.068	0.065	0.0665	296.33	80.82
III	28.1	0.094	0.079	0.0865	363.00	99.00
III	30.1	0.142	0.139	0.1405	543.00	148.09

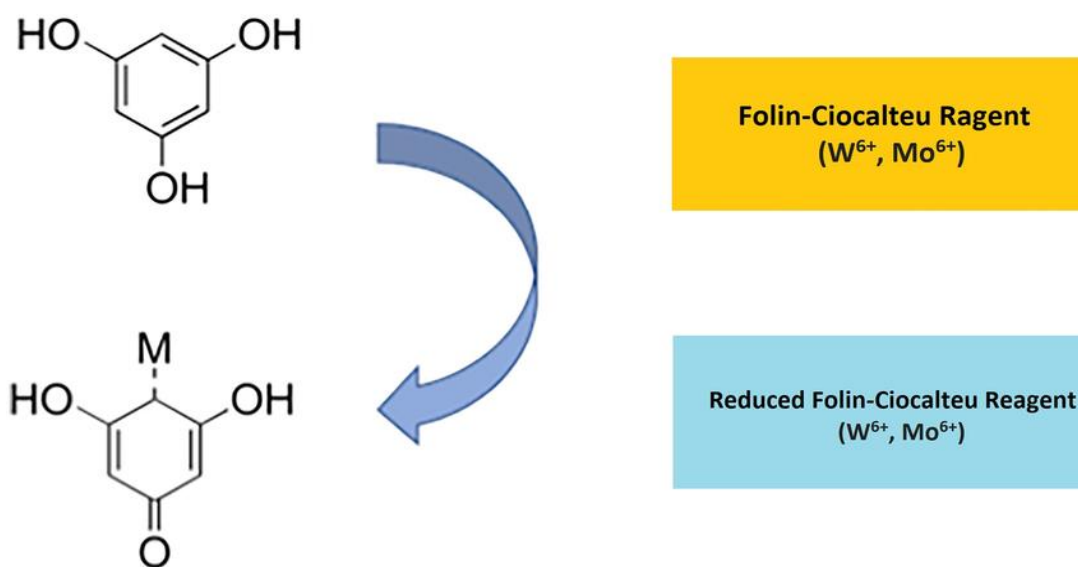
3.4.3. Μέθοδος Μέτρησης Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC)

3.4.3.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η μέτρηση συνολικής φαινολικής δραστηριότητας παρουσιάζει τεράστια σημασία. Αναφέρεται ότι τα φαινολικά μόρια έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, εμφανίζοντας τεράστια επιτυχία στην ουδετεροποίηση των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό (Sánchez-Rangel, et al., 2013).

Η μέθοδος βασίζεται στην ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του κύριου αντιδραστηρίου, Folin-Ciocalteu, και των μορίων που υποψιαζόμαστε ότι υπάρχουν και επιθυμούμε να μετρήσουμε, φαινόλες (εικόνα 27). Το Folin-Coicalteu (F-C) υπάρχει διαθέσιμο σε πυκνό

σκεύασμα στην αγορά, αλλά μπορεί να φτιαχτεί και στο εργαστήριο. Για την παρασκευή του, χρησιμοποιείται βολφραμικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), μολυβδαινικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και απεσταγμένο νερό. Σε τελικό στάδιο το αντιδραστήριο οξινίζεται με HCl και φωσφορικό οξύ και προστίθεται Θεικό Λίθιο ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Η αντίδραση του F-C είναι σημαντικό να πραγματοποιείται σε βασικό περιβάλλον, σε τιμή pH κοντά στο 10, καθώς μόνο κάτω από βασικές συνθήκες γίνεται η απομάκρυνση των φαινολικών πρωτονίων και ο τελικός σχηματισμός των φαινολικών ιόντων. Το βασικό περιβάλλον επιτυγχάνεται με τη προσθήκη Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3) στην αντίδραση. Δεν έχει αποσαφηνιστεί η τελική δομή του F-C, αλλά πιστεύεται ότι κατά την επαφή με φαινολικά προϊόντα, το φωσφοβολφραμικό και το φωσφομολυβδαινικό οξύ, που έχουν παραχθεί, ανάγονται και τελικά από ένα έντονο κίτρινο διάλυμα μετατρέπεται σε κυανό. Η ένταση του κυανού χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των Φαινολικών ενώσεων που έχουν αντιδράσει (Παπααγαθοκλέους, 2021) (Pérez, et al., 2023).



Εικόνα 27: Η μέθοδος αναγωγής του Folin-Ciocalteu. (DOI: 10.1007/s11356-022-23337-6)

3.4.3.2. Οργανολογία

1. αναλυτικός ζυγός KERN ABJ-NM/ABS-N,
2. δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες,

3. eppendorf,
4. ποτήρια ζέσεως 1000μL,
5. πιπέτες 20:200, 100:1000μL,
6. ρύγχη για πιπέτες των 20:200μL και 100:1000μL,
7. φωτόμετροUltrospect 2100 pro,
8. κυψελίδες,
9. vortex
10. φωτόμετροUltrospect 2100 pro.

3.4.3.3. Αντιδραστήρια

Για τη δημιουργία διαλύματος Folin-Ciocalteu 1N

1. πυκνό διάλυμα Folin-Ciocalteu 2N,
2. υπερκαθαρό H₂O HPLC

Για τη δημιουργία διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃) 35%

1. πέρλες Ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃),
2. υπερκαθαρό H₂O HPLC.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης Γαλλικού οξέος (GA)

1. γαλλικό οξύ,
2. καθαρή μεθανόλη HPLC.

3.4.3.4. Πειραματική Πορεία

Για τη δημιουργία διαλύματος Folin-Ciocalteu 1N:

1. προσθέτουμε ίση ποσότητα πυκνού Folin-Ciocalteu και υπερκαθαρού H₂O HPLC σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.

Για τη δημιουργία διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃) 35%:

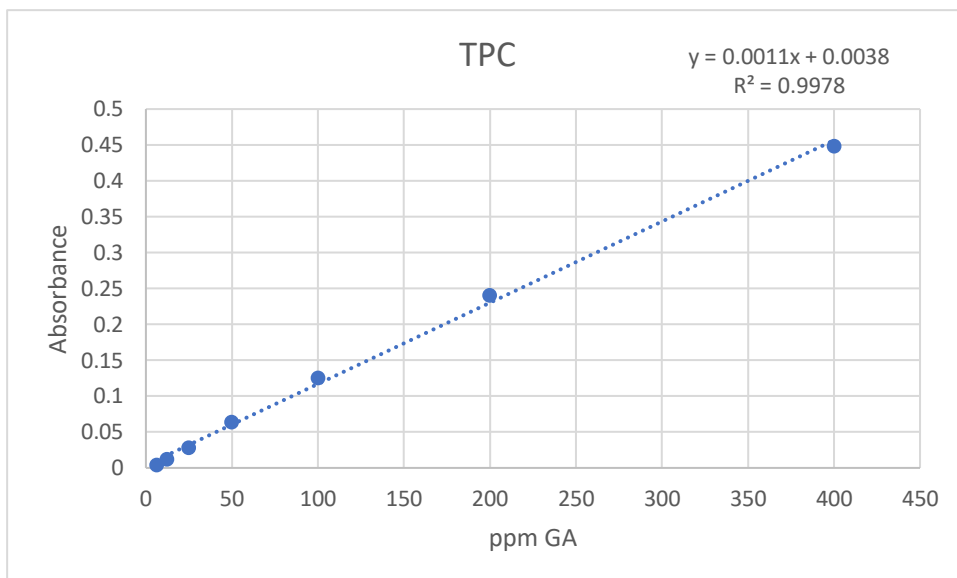
1. ζυγίζουμε σε ζυγό 8, 7g Na₂CO₃,
2. διαλύουμε με τη βοήθεια υπερήχων, σε 25mL υπερκαθαρού H₂O HPLC.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης Γαλλικού οξέος (GA):

1. σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζουμε 4mg Γαλλικού οξέος,
2. το διαλύουμε σε 10mL καθαρής μεθανόλης.

Για τη πρότυπη καμπύλη:

1. πραγματοποιήθηκαν 6 διαδοχικές αραιώσεις 1:2, σε eppendorf, από αρχικό πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος 400 ppm ή μg/mL έως 0, 0045 ppm ή μg/mL,
2. σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100μL από κάθε αραιώση του του Γαλλικού οξέος και στο τυφλό ίση ποσότητα H₂O,
3. προστέθηκαν στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 2500μL H₂O,
4. προστέθηκαν στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 250μL F-C,
5. κάναμε ανάδευση,
6. επωάζουμε τα γυάλινα σωληνάκια για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου,
7. προσθέτουμε στα σωληνάκια 500μL Na₂CO₃,
8. προσθέτουμε στα σωληνάκια 1650μL H₂O,
9. επωάζουμε για 60 λεπτά,
10. προσθέτουμε περίπου 1100μL σε κάθε κυψελίδα,
11. φωτομετρούμε σε λ=725nm.



Εικόνα 28: Διάγραμμα μορφής $y=ax+b$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση GA.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών μορίων στα δείγματα *Mullus barbatus*:

1. πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με την πρότυπη καμπύλη, όμως αντί για το διάλυμα γαλλικού οξέος, προστέθηκαν 100μL υπερκείμενο διάλυμα από την εκχύλιση των δειγμάτων *Mullus barbatus*,
2. με βάση την εξίσωση που προέκυψε ($y=0.0011+0.0038$) από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζουμε την συγκέντρωση κάθε δείγματος, βάζοντας όπου y την αντίστοιχη τιμή απορρόφησης.

Πίνακας 4: Πίνακας υπολογισμού συγκέντρωσης με τη μέθοδο TPC.

SIZE	CODE	A1	A2	M. O.	C (ppm)
II	1.1	0.054	0.057	0.0555	47
I	2.1	0.068	0.076	0.072	62
I	3.1	0.126	0.144	0.135	119.2727
I	4.1	0.041	0.047	0.044	36.54545

I	5.1	0.086	0.083	0.0845	73.36364
I	6.1	0.071	0.081	0.076	65.63636
I	7.1	0.112	0.116	0.114	100.1818
I	8.1	0.061	0.062	0.0615	52.45455
I	9.1	0.064	0.077	0.0705	60.63636
I	10.1	0.063	0.07	0.0665	57
III	11.1	0.057	0.058	0.0575	48.81818
II	12.1	0.045	0.048	0.0465	38.81818
II	13.1	0.065	0.068	0.0665	57
II	14.1	0.12	0.13	0.125	110.1818
II	15.1	0.071	0.078	0.0745	64.27273
II	16.1	0.074	0.085	0.0795	68.81818
II	17.1	0.04	0.047	0.0435	36.09091
I	18.1	0.105	0.109	0.107	93.81818
III	19.1	0.059	0.098	0.0785	67.90909
III	20.1	0.108	0.13	0.119	104.7273
III	21.1	0.072	0.076	0.074	63.81818
III	22.1	0.087	0.099	0.093	81.09091
II	23.1	0.043	0.049	0.046	38.36364
II	24.1	0.058	0.064	0.061	52
III	25.1	0.03	0.03	0.03	23.81818
III	26.1	0.074	0.083	0.0785	67.90909
III	27.1	0.033	0.028	0.0305	24.27273
III	28.1	0.034	0.053	0.0435	36.09091
II	29.1	0.102	0.1	0.101	88.36364
III	30.1	0.043	0.046	0.0445	37

3.4.5. Μέθοδος DPPH

3.4.5.1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Το αντιδραστήριο DPPH (1, 1-διφαινύλο-2-πικρυλυδραζυλίου), παρουσιάζει πληθώρα προτερημάτων καθώς, πέραν του χαμηλού κόστους και της ανίχνευσης μεγάλης ποικιλίας αντιοξειδωτικών ουσιών, η ρίζα του DPPH εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα. Η σταθερότητα της ρίζας οφείλεται κυρίως στην στερεοχημική δομή της (λόγω του στερικού συντονισμού των ομάδων των βενζολικώνδακτυλίων και του δισθενούς N (Foti, 2015)).

Η μέθοδος DPPH βασίζεται στην ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών του αντιδραστηρίου με τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου από την αντιοξειδωτική ουσία προς την ελεύθερη ρίζα. Στην περίπτωση του DPPH, τα κύρια αντιοξειδωτικά που λειτουργούν ως ηλεκτρονιοδότες ή δότες υδρογόνου είναι οι φαινόλες, ωστόσο ανιχνεύονται επίσης οι αρωματικές αμίνες και οι θειόλες (Foti, 2015) (Gaetani, et al., 1996). Η μεταφορά του ηλεκτρονίου ή υδρογόνου από τον δότη στη ρίζα, εκφράζεται με την αλλαγή χρώματος στο εξεταζόμενο δείγμα (εικόνα 29). Πιο συγκεκριμένα, η ρίζα του 1, 1-διφαινύλο-2-πικρυλυδραζυλίου όταν διαλύεται σε πολικό διαλύτη εμφανίζει μια βαθιά μωβ απόχρωση (απορρόφηση στα 517nm), ενώ έπειτα τον εμβολιασμό με την αντιοξειδωτική ουσία, λόγω της προσφοράς ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου, το χρώμα του διαλύματος μεταπίπτει σε κίτρινο κάνοντας τη μετατροπή DPPH* → DPPH-H (απορρόφηση στα 517nm) (Καλλιτσουνάκης, 2016) (Yeo&Shahidi, 2019).

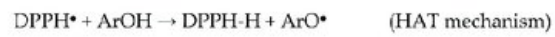
Η ικανότητα εκκαθάρισης ριζών του δείγματος εκφράζεται ποιοτικά, με βάση την αλλαγή χρώματος στο διάλυμα μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα, αλλά και ποσοτικά. Για την ποσοτική έκφραση του αποτελέσματος πρέπει να υπολογιστεί το ποσοστό αναστολής της δράσης του DPPH, η % αναστολή μας δίνεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_c - A_s) * 100 / A_c$$

A_c : Οπτική απορρόφηση control.

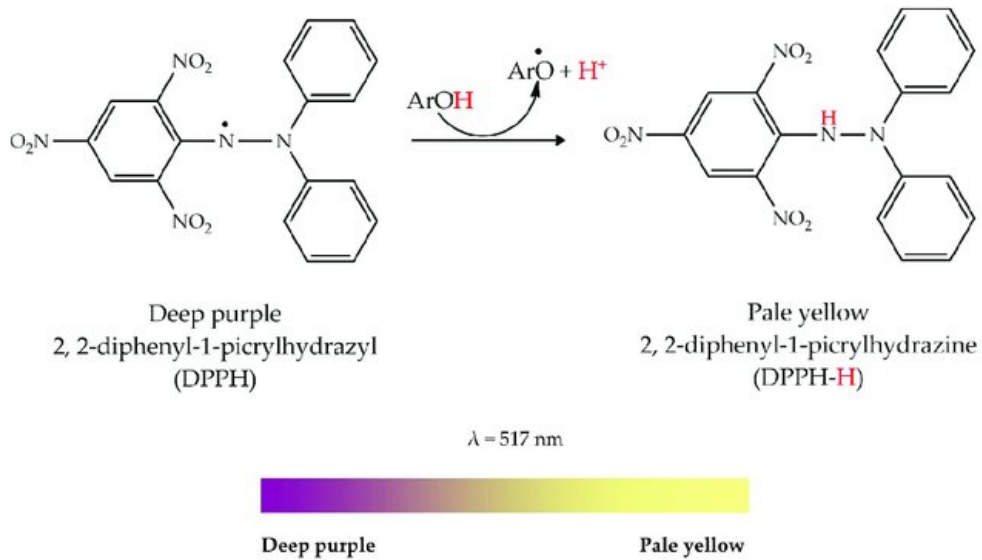
A_s : οπτική απορρόφηση δείγματος.

Chemical reactions:

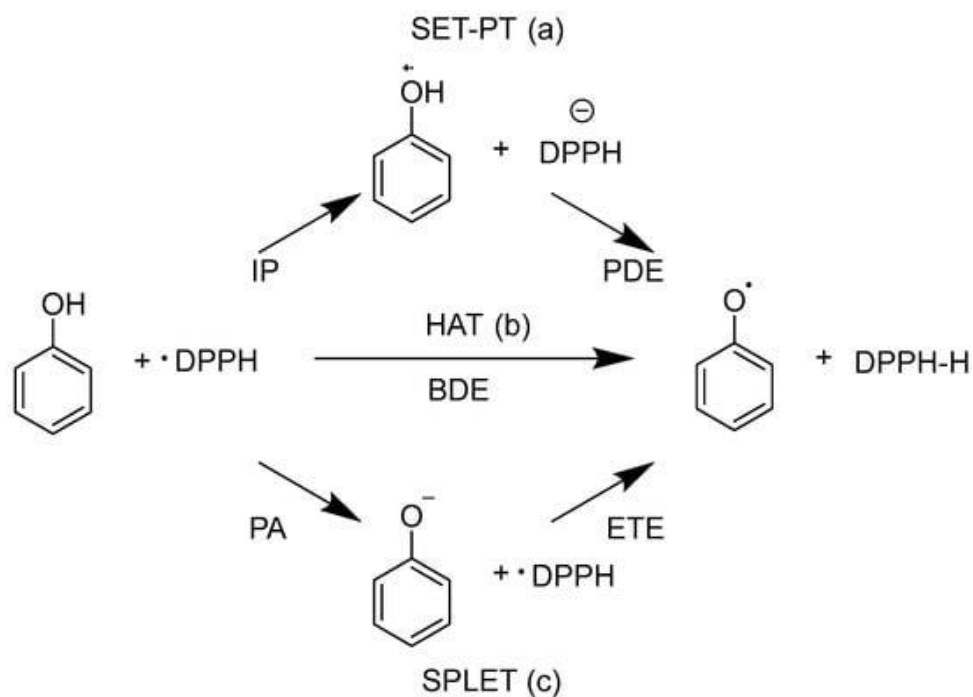


where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT



Εικόνα 29: Μηχανισμός δράσης DPPH με μεταφορά ενός ατόμου H^\bullet , με τη χρωματική αλλαγή του δείγματος. (<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>)



Εικόνα 30: Οι τρεις πιθανοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης του DPPH. (a) ιονταλλαγή ενός e^- και ενός p^+ , (b) μεταφορά ενός H^+ , (c) διαδοχική απώλεια p^+ και μεταφορά e^- . (doi.org/10.3390/antiox13030309)

3.4.5.2. Οργανολογία

1. αναλυτικός ζυγός KERN ABJ-NM/ABS-N,
2. δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες,
3. Eppendorf,
4. ποτήρια ζέσεως 1000μL,
5. πιπέτες 20:200, 100:1000μL,
6. ρύγχη για πιπέτες των 20:200μL και 100:1000μL,
7. φωτόμετρο Ultrospect 2100 pro,
8. κυψελίδες,
9. vortex,
10. ογκομετρικός κύλινδρος 25mL.

3.4.5.3. Αντιδραστήρια

Για τη δημιουργία διαλύματος DPPH

1. ζυγίζουμε 5 mg DPPH (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO.),
2. προσθέτουμε 30mL αιθανόλη HPLC (Chem-Lab NV).

3.4.5.4. Πειραματική Πορεία

1. παρασκευάζουμε και φωτομετρούμε το διάλυμα DPPH σε $\lambda=517\text{nm}$,
Η απορρόφηση του διαλύματος πρέπει να είναι μεταξύ 0,8 – 1,2. Αν η τιμή της απορρόφησης είναι εκτός αυτών των ορίων, πραγματοποιούμε αραιώση με αιθανόλη και επαναλαμβάνουμε τη φωτομέτρηση.
2. προσθέτουμε 30μL δείγμα σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα,
(Για το πείραμα χρησιμοποιήσαμε ενδεικτικά ένα δείγμα από κάθε ομάδα μεγέθους)
3. στον γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 1020μLDPPH.
4. παρασκευάζουμε το control διάλυμα (A_c) προσθέτοντας 30μL αιθανόλη και 1020μLDPPH,
5. επωάζουμε για 60' σε σκοτεινό μέρος,
6. για τυφλό διάλυμα χρησιμοποιούμε καθαρή αιθανόλη,
7. μεταφέρουμε τα διαλύματα σε κυψελίδες και φωτομετράμε σε $\lambda=517\text{nm}$. Για τον υπολογισμό της % αναστολής χρησιμοποιούμε τον τύπο % αναστολή= $(A_c - A_s) * 100 / A_c$.

Ακολουθώντας τις παραπάνω διαδικασίες προκύπτει ότι:

Πίνακας 5: Πίνακας αναστολής της ρίζαςDPPH.

Ac	Column1	A1	A2	M. O.	$(A_c - A_s) * 100 / A_c$
1.899	size:I Code:5	1.699	1.701	1.700	10.479

	size:I Code:3	1.649	1.645	1.647	13.270
λ=517nm	size:II Code:24	1.716	1.732	1.724	9.215
	size:II Code:15	1.738	1.762	1.750	7.846
	size:III Code:25	1.755	1.758	1.757	7.504
	size:III Code:26	1.737	1.725	1.731	8.847

Το ποσοστό αναστολής είναι χαμηλό, οπότε δεν συνεχίστηκε η μελέτη των υπόλοιπων δειγμάτων.

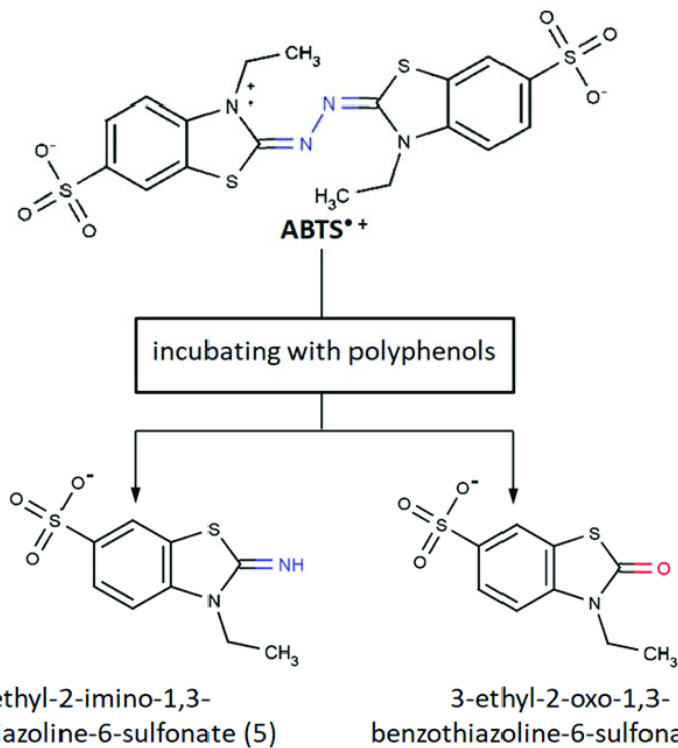
3.4.6. Μέθοδος ABTS

3.4.6.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η μέθοδος εκκαθάρισης του 2, 2'-Αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS) βασίζεται στην αντίδραση αποχρωματισμού που συμβαίνει στις ρίζες ABTS* όταν έρθουν σε επαφή με αντιοξειδωτικά, κυρίως φαινολικά προϊόντα.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος. Η μέθοδος ABTS, ομοιάζει με αυτή της DPPH ως προς τον τρόπο εκκαθάρισης των ριζών, δηλαδή μέσω την προσφοράς, από το αντιοξειδωτικό, ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου με σκοπό την αναγωγή και εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας. Το αντιδραστήριο ABTS, σε αντίθεση με αυτό του DPPH, δεν παραλαμβάνεται σε μορφή ρίζας, για αυτό το λόγο πραγματοποιούμε την οξείδωση του ώστε να πάρει τη μορφή σταθερής κατιονικής ρίζας. Η διαδικασία οξείδωσης του ABTS μπορεί να γίνει με χημικό τρόπο κατά τη προσθήκη υπερθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ή υπερθειικού καλίου (K_2SO_5) ώστε τελικά $\text{ABTS} \rightarrow \text{ABTS}^{*+}$ (Fernández-Marín, et al., 2020). Έπειτα την οξείδωση και παραγωγή του ABTS^{*+} , το διάλυμα έχει ένα βαθύ κυανό χρώμα με πολύ υψηλή οπτική απορρόφηση. Η απορρόφηση που επιθυμούμε είναι κοντά στο 1, έτσι πραγματοποιούμε αραιώση του πυκνού διαλύματος με αιθανόλη.

Κατά την προσθήκη του δείγματος που θέλουμε να μελετήσουμε αναμένουμε να συμβεί αποχρωματισμός του διαλύματος. Ο αποχρωματισμός που συμβαίνει είναι ανάλογος της περιεκτικότητας του δείγματος σε αντιοξειδωτικά προϊόντα.



Εικόνα 31: Προϊόντα αναγωγής της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}. (DOI: [10.3390/ijms21031131](https://doi.org/10.3390/ijms21031131))

3.4.6.2. Οργανολογία

1. αναλυτικός ζυγός KERN ABJ-NM/ABS-N,
2. δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες,
3. erpendorf,
4. ποτήρια ζέσεως 100μL,
5. πιπέτες 20:200, 100:1000μL,
6. ρύγχη για πιπέτες των 20:200μL και 100:1000μL,
7. φωτόμετρο Ultrospect 2100 pro,
8. κυψελίδες,
9. vortex.

3.4.6.3. Αντιδραστήρια

Για τη δημιουργία διαλύματος ABTS/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ συγκέντρωσης 7mM και 2.45mM αντίστοιχα.

1. σε ποτήρι ζέσης 100μL προσθέτουμε υπερκαθαρό H_2O για HPLC (Chem-Lab NV),
2. ζυγίζουμε 5. 83 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (TermoPasty) και τα προσθέτουμε στο ποτήρι ζέσης,
3. ζυγίζουμε 38.4mg ABTS (Cayman CHEMICALS) και τα προσθέτουμε στο ποτήρι ζέσης,
4. αποθηκεύουμε σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 16 ώρες.

Για τη δημιουργία του πρότυπου διαλύματος Trolox 6mM.

1. σε ποτήρι ζέσης, και σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζουμε 14mg σκόνης Trolox (Cayman CHEMICALS),
2. ογκομετρείται αιθανόλη HPLC(Chem-Lab NV) σε τελικό όγκο 10mL,
3. δαλύουμε το Trolox στην αιθανόλη και αποθηκεύουμε στην κατάψυξη.

Το τυφλό διάλυμα αποτελείται από καθαρή αιθανόλη HPLC

Για τη δημιουργία Control διαλύματος (Δ_c)

1. σε γυάλινο σωλήνα προσθέτουμε 20μL αιθανόλη HPLC,
2. προσθέτουμε 1000μL ABTS^{*+},
3. επωάζουμε σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3.4.6.4. Πειραματική Πορεία

Για την πρότυπη καμπύλη με Trolox:

1. πραγματοποιήθηκαν 6 αραιώσεις σε διάλυμα Trolox 6mM σε Eppendorf,

·1)Διάλυμα Trolox 6mM.

·2) 200 μL διαλύματος 1 + 200μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 3mM.

- 3) 200 μL διαλύματος 2 + 200μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 1, 5mM.
- 4) 200 μL διαλύματος 3 + 100μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 1mM.
- 5) 150μL διαλύματος 4 + 150μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 0, 5mM.
- 6) 150μL διαλύματος 5 + 150μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 0, 25mM.
- 7) 100μL διαλύματος 6 + 25μL αιθανόλης. Τελική συγκέντρωση 0, 2mM.

2. αραιώνουμε το διάλυμα ABTS^{*+} με καθαρή αιθανόλη HPLC κατάλληλα μέχρι η τιμή οπτικής απορρόφησης να φτάσει $A_{734}=0, 90\pm 0, 20$,
3. σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε 20μL τα 7 διαλύματα Trolox/αιθανόλης,
4. προσθέτουμε στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 1mL διαλύματος ABTS^{*+},
5. πραγματοποιούμε ανάδευση,
6. επωάζουμε σε σκοτεινό χώρο και θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5',
7. φωτομετράμε σε πλαστικές κυψελίδες σε $\lambda=734\text{nm}$ τις πρότυπες αραιώσεις Trolox,
8. φωτομετράμε σε πλαστική κυψελίδα το Control διάλυμα Δ_c ,
9. αφαιρούμε από την οπτική απορρόφηση του $\Delta_c(A_c)$ τις οπτικές απορροφήσεις των πρότυπων δειγμάτων Trolox (A_1-A_7). (πίνακας 3)

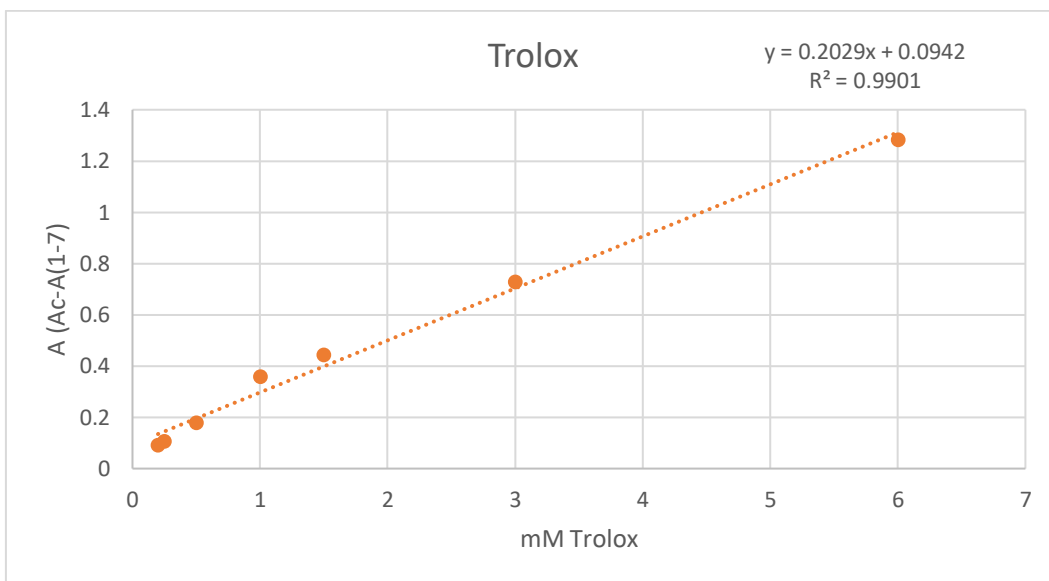
Πραγματοποιώντας την παραπάνω διαδικασία προκύπτει ο παρακάτω πίνακας και η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:

Πίνακας 6: Παρουσίαση απορροφήσεων έπειτα την εκκαθάριση του ABTS.*

$A_c=1.306$

	1η φωτομέτρηση	2η φωτομέτρηση	M.O	$A=A_c-A_v$	C (mM)
A1	0.029	0.018	0.0235	1.2825	6
A2	0.582	0.573	0.5775	0.7285	3
A3	0.862	0.864	0.863	0.443	1.5
A4	0.937	0.96	0.9485	0.3575	1
A5	1.125	1.13	1.1275	0.1785	0.5

A6	1.205	1.196	1.2005	0.1055	0.25
A7	1.214	1.217	1.2155	0.0905	0.2



Εικόνα 32: Διάγραμμα μορφής $y=ax+b$. Όπου στον y άξονα αναγράφονται οι τιμές της απορρόφησης, και στον x άξονα η συγκέντρωση του Trolox.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα δείγματα *Mullus barbatus*:

1. πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με την πρότυπη καμπύλη, όμως αντί για το διαλύματα Trolox, προστέθηκαν 20μL υπερκείμενο διάλυμα από την εκχύλιση του δειγμάτων *Mullus barbatus*.
2. με βάση την εξίσωση που προέκυψε ($y = 0.2029x + 0.0942$) από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζουμε την συγκέντρωση κάθε δείγματος, βάζοντας όπου y την αντίστοιχη οπτική απορρόφηση που προκύπτει από την αφαίρεση του κάθε δείγματος από την οπτική απορρόφηση του Control διαλύματος.

Πίνακας 7: Πίνακας υπολογισμού συγκέντρωσης με τη μέθοδο ABTS.

SIZE	CODE	A1	A2	M.O.	Ac-A	C (mM)	C (ppm)
II	1.10	1.05	1.02	1.04	0.2685	0.859044	217.875

I	3.10	1.08	1.05	1.06	0.2440	0.738295	187.25
I	4.10	1.16	1.17	1.17	0.1395	0.223263	56.625
I	5.10	1.11	1.06	1.09	0.2195	0.617546	156.625
I	6.10	0.97	1.07	1.02	0.2865	0.947758	240.375
I	7.10	1.01	1.00	1.01	0.2995	1.011828	256.625
I	8.10	0.91	1.00	0.95	0.3530	1.275505	323.5
I	9.10	1.10	1.10	1.10	0.2075	0.558403	141.625
I	10.10	1.08	1.03	1.05	0.2520	0.777723	197.25
III	11.10	1.17	1.11	1.14	0.1660	0.353869	89.75
II	12.10	1.20	1.23	1.21	0.0940	-0.00099	-0.25
II	13.10	1.16	1.13	1.15	0.1605	0.326762	82.875
II	14.10	0.97	0.94	0.96	0.3495	1.258255	319.125
II	15.10	1.13	1.10	1.12	0.1870	0.457368	116
II	16.10	1.08	1.07	1.07	0.2325	0.681617	172.875
II	17.10	1.12	1.16	1.14	0.1675	0.361262	91.625
I	18.10	1.00	1.03	1.01	0.2935	0.982257	249.125
III	19.10	1.09	1.11	1.10	0.2075	0.558403	141.625
III	20.10	1.02	1.00	1.01	0.2945	0.987186	250.375
III	21.10	1.11	1.13	1.12	0.1840	0.442583	112.25
III	22.10	1.02	1.06	1.04	0.2675	0.854115	216.625
II	23.10	1.16	1.17	1.17	0.1380	0.21587	54.75
II	24.10	1.01	1.07	1.04	0.2620	0.827008	209.75
III	25.10	1.17	1.18	1.18	0.1295	0.173977	44.125
III	26.10	1.09	1.11	1.10	0.2100	0.570724	144.75
III	27.10	1.23	1.22	1.22	0.0850	-0.04534	-11.5
III	28.10	1.20	1.19	1.19	0.1145	0.100049	25.375
II	29.10	1.15	1.05	1.10	0.2065	0.553475	140.375
III	30.10	1.18	1.15	1.16	0.1435	0.242977	61.625

3.4.7. LC-MS

3.4.7.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Ο αναλυτής LC-MS καταφέρνει να συνδυάσει τη χρωματογραφία υγρών (LC) και την φασματομετρία μάζας (MS) με αποτέλεσμα να δημιουργεί ένα ιδανικό εργαλείο ερευνητικής ανάλυσης.

Με σκοπό την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα δείγματα μας, χρησιμοποιήσαμε τη φασματογραφία μάζας του LC-MS. Με λίγα λόγια, η λειτουργία του φασματομετρία μάζας είναι να μετατρέπει την υπό ανάλυση ουσία σε

μία ιονισμένη μορφή. Τα ιονισμένα μόρια, και τυχόν θραύσματα που προκύπτουν, παίρνουν τη μορφή σταγονιδίων από την διαδικασία του ιονισμού. Τα φορτισμένα σταγονίδια εξατμίζονται λόγω της υψηλής θερμότητας και της παρουσίας του ξηρού αζώτου, στη συνέχεια διασχίζουν έναν τετραπολικό αναλυτή ο οποίος αποτελείται από 4 παράλληλες μεταλλικές ράβδους που δημιουργούν ένα ιοντικό κανάλι. Μέσα στο ιοντικό κανάλι, υπάρχει μια συνεχώς μεταβαλλόμενη ηλεκτρική τάση που κάνει δυνατό τον διαχωρισμό των ιοντισμένων σωματιδίων βάση τον λόγο μάζα προς φόρτιση (m/z).

3.4.7.2. Οργανολογία

1. πιπέτες 2:20, 20:200, 100:1000 μL ,
2. ρύγχη για πιπέτες των 2:20, 20:200 μL και 100:1000 μL ,
3. LC-MS (SHIMADJU LC MS – 2020).

3.4.7.3. Αντιδραστήρια

Για τη δημιουργία αραιωμένου εκχυλίσματος *Mullus barbatus* 200ppm:

1. σε φιαλίδιο LC-MS προσθέτουμε 2 μL εκχύλισμα *Mullus barbatus* 10mg/mL,
2. προσθέτουμε 998 μL H₂O HPLC (Chem-Lab NV).

Από την ανάλυση του δείγματος SIZE I, βρέθηκαν τα παρακάτω φαινολικά στους αντίστοιχους χρόνους

Από την ανάλυση των τριών τάξεων μεγέθους (I,II,III) των δειγμάτων *Mullus barbatus* πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των παρακάτω βιταμινών και φαινολικών ενώσεων στους αντίστοιχους χρόνους (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Ταυτοποίηση βιταμινών και φαινολικών ενώσεων σε δείγματα *Mullus barbatus*.

AscorbicAcid	m/z=175.0	Retentiontime: 2, 8 \pm 0, 01
GallicAcid	m/z=169.17	Retentiontime: 4.4 \pm 0, 001

PyrogalicAcid	m/z=125.0	Retentiontime: 5.4±0,01
Catechin	m/z=289.0	Retentiontime: 12,8±0,01
CaffeicAcid	m/z=179.15	Retentiontime: 16.1±0,01
CoumaricAcid	m/z=163.0	Retentiontime: 24,8±0,01
Kaempferol	m/z=285.0	Retentiontime: 50.0±0,01
Quercetin	m/z=300.5	Retentiontime: 23.2±0,001

Κεφάλαιο 4^ο: Αποτελέσματα

4.1. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και τα διαγράμματα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel 2019.

4.1.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων FRAP

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο FRAP, ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών σε σχέση με τη τάξη μεγέθους των δειγμάτων. Η στατιστική διαφορά μεταξύ των τάξεων μεγέθους, ανιχνεύεται με την δημιουργία ενός t-Test. Αν η τιμή P που θα λάβουμε από το t-Test είναι μεγαλύτερη του 0,05 ($>0,05$), τότε δεν υπάρχει στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δύο τάξεις μεγέθους, και η διαφορά τους δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Από την ανάλυση προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 9: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος FRAP.

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

SIZE	I	II
Mean	670.000	542.999
Variance	61368.395	23174.078
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	42271.236	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	18.000	
t Stat	1.381	
P(T<=t) one-tail	0.092	
t Critical one-tail	1.734	
P(T<=t) two-tail	0.184	
t Critical two-tail	2.101	

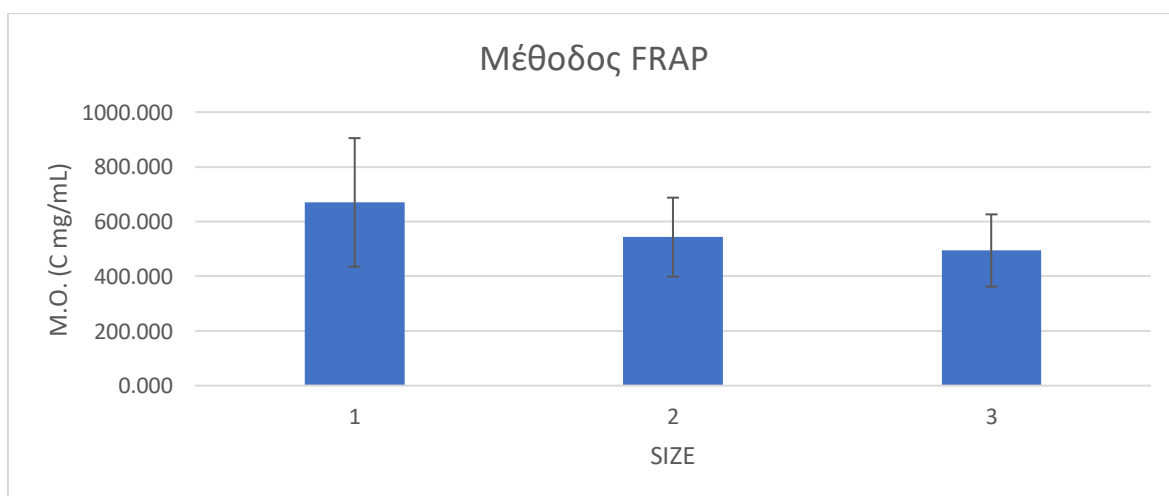
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

SIZE	I	III
Mean	670.000	494.167
Variance	61368.395	19372.253
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	40370.324	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	18.000	
t Stat	1.957	
P(T<=t) one-tail	0.033	
t Critical one-tail	1.734	
P(T<=t) two-tail	0.066	
t Critical two-tail	2.101	

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

SIZE	II	III
Mean	542.999	494.167
Variance	23174.078	19372.253
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	21273.165	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	18.000	
t Stat	0.749	
P(T<=t) one-tail	0.232	
t Critical one-tail	1.734	
P(T<=t) two-tail	0.464	
t Critical two-tail	2.101	

Η τιμή P εμφανίζεται μεγαλύτερη του 0,05 σε όλες τις περιπτώσεις σύγκρισης, οπότε καταλαβαίνουμε ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ των τριών μεγεθών.



Εικόνα 33: Ιστόγραμμα FRAP.

Διάγραμμα παρουσίασης του μέσου όρου συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών των τριών τάξεων μεγέθους των δειγμάτων, σε συνδυασμό με την τυπική τους απόκλιση.

4.1.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων TPC

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο TPC, ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών σε σχέση με τη τάξη μεγέθους των δειγμάτων. Η ανάλυση έγινε, όπως και στην μεθόδου FRAP, με την πραγματοποίηση t-Test.

Πίνακας 10: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος TPC.

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	I	II
Mean	72.091	60.091
Variance	626.713	572.121
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	599.417	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	18.000	
t Stat	1.096	
P(T<=t) one-tail	0.144	
t Critical one-tail	1.734	
P(T<=t) two-tail	0.288	
t Critical two-tail	2.101	

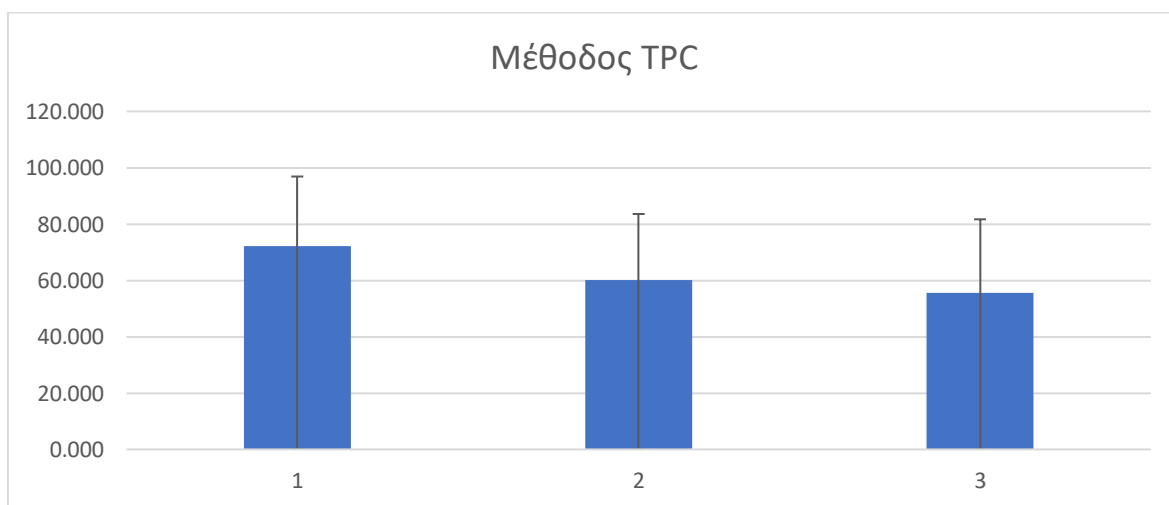
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	I	III
Mean	72.091	55.545
Variance	626.713	688.650
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	657.681	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	18.000	
t Stat	1.443	
P(T<=t) one-tail	0.083	
t Critical one-tail	1.734	
P(T<=t) two-tail	0.166	
t Critical two-tail	2.101	

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	//	///
Mean	60.091	55.545
Variance	572.12	688.650
Observations	10.000	10.000
Pooled Variance	630.38	
Hypothesized Mean Difference	6	
df	0.000	
t Stat	18.000	
P(T<=t) one-tail	0.405	
t Critical one-tail	0.345	
P(T<=t) two-tail	1.734	
t Critical two-tail	0.690	
	2.101	

Η τιμή P εμφανίζεται μεγαλύτερη του 0,05 σε όλες τις περιπτώσεις σύγκρισης, οπότε καταλαβαίνουμε ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ των τριών μεγεθών.



Εικόνα 34: Ιστόγραμμα TPC.

Διάγραμμα παρουσίασης του μέσου όρου συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών των τριών τάξεων μεγέθους των δειγμάτων, σε συνδυασμό με την τυπική τους απόκλιση.

4.1.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων ABTS

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο ABTS, ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών σε σχέση με τη τάξη μεγέθους των δειγμάτων. Η ανάλυση έγινε, όπως και στις προηγούμενες δύο μεθόδους, με την πραγματοποίηση t-Test.

Πίνακας 11: Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ των τάξεων μεγέθους του δείγματος. Μέθοδος ABTS.

t-Test: Paired Two Sample for Means

	I	II
Mean	0.793	0.520
Variance	0.094	0.137
Observations	9.000	9.000
Pearson Correlation	0.034	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	8.000	
t Stat	1.728	
P(T<=t) one-tail	0.061	
t Critical one-tail	1.860	
P(T<=t) two-tail	0.122	
t Critical two-tail	2.306	

t-Test: Paired Two Sample for Means

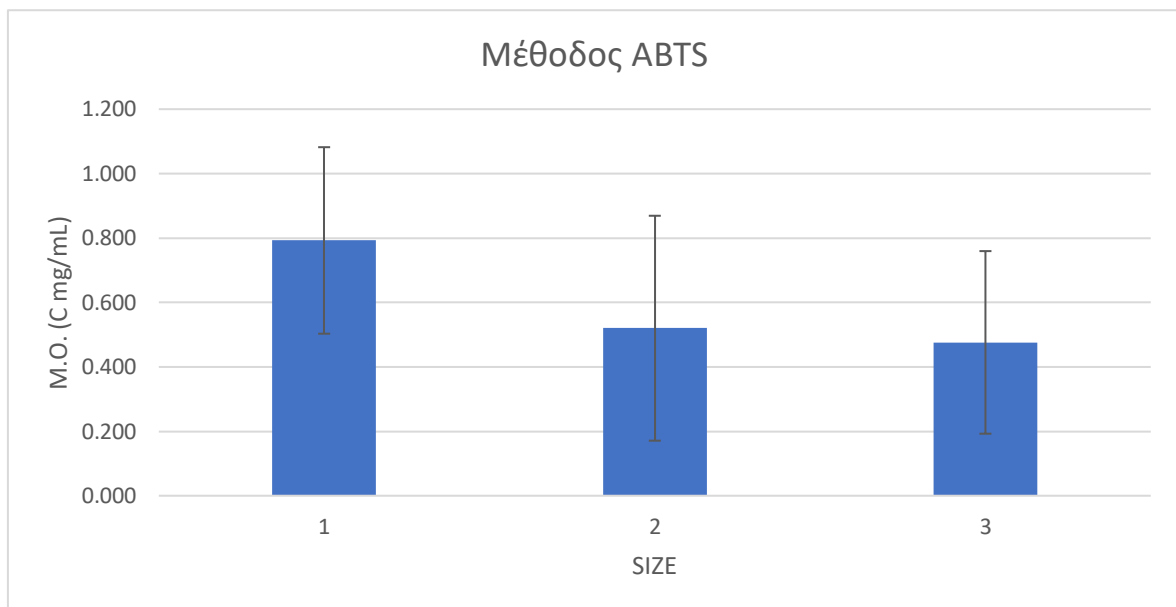
	I	III
Mean	0.793	0.476
Variance	0.094	0.090
Observations	9.000	9.000
Pearson Correlation	-0.350	
Hypothesized Mean Difference	0.000	
df	8.000	
t Stat	1.902	
P(T<=t) one-tail	0.047	
t Critical one-tail	1.860	
P(T<=t) two-tail	0.094	
t Critical two-tail	2.306	

t-Test: Paired Two Sample for Means

	II	III
Mean	0.520	0.476
Variance	0.137	0.090
Observations	9.000	9.000
Pearson Correlation	0.431	
Hypothesized Mean Difference	0.000	

df	8.000
t Stat	0.365
P(T<=t) one-tail	0.362
t Critical one-tail	1.860
P(T<=t) two-tail	0.725
t Critical two-tail	2.306

Η τιμή P εμφανίζεται μεγαλύτερη του 0,05 σε όλες τις περιπτώσεις σύγκρισης, οπότε καταλαβαίνουμε ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ των τριών μεγεθών.



Εικόνα 35: Ιστόγραμμα ABTS.

Διάγραμμα παρουσίασης του μέσου όρου συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών των τριών τάξεων μεγέθους των δειγμάτων, σε συνδυασμό με την τυπική τους απόκλιση.

Κεφάλαιο 5^ο: Συμπέρασμα- Συζήτηση

5.1. Σημασία Του Μεγέθους Του Ψαριού Στην Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Μετά την λεπτομερή ανάλυση των αποτελεσμάτων των μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των ψαριών, φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών σε σύγκριση με την τάξη μεγέθους των ψαριών, καθώς το P value (two tails) είναι μεγαλύτερο του 0,05 στις μεθόδους FRAP, TPC και ABTS (πίνακας 7, 8, 9). Παρόλα αυτά παρατηρούμε ότι στις μεθόδους FRAP και ABTS συγκρίνοντας τα ψάρια τάξης μεγέθους I και III οι τιμές P value (two tails) τείνουν προς το 0,05. Ως αποτέλεσμα, διαπιστώνουμε ότι τα ψάρια μικρότερης τάξης μεγέθους φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών σε σχέση με τα ψάρια μεγαλύτερης τάξης μεγέθους.

Άλλωστε, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το μήκος του ψαριού μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική δράση. Κατά την έκθεση σε τοξικούς παράγοντες τα μικρότερα ψάρια φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ενζυμικής δράσης, ενώ στα μεγαλύτερα η αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη του E.G. Kanak αποδεικνύει πως τα μικρότερα ψάρια εμφανίζονται πιο ευαίσθητα στην έκθεση τοξικών παραγόντων, συνεπώς η ενζυμική τους δραστηριότητα είναι αυξημένη (Kanak, et al., 2014).

Επιπλέον, τα μικρότερα ψάρια φαίνεται να παρουσιάζουν καλύτερη λειτουργία μιτοχονδρίων και υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια τους έχουν υψηλότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, με αποτέλεσμα να επηρεάζει τον τρόπο δράσης τους, ενισχύοντας την αποδοτικότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων και μειώνοντας την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Σε συνδυασμό λοιπόν και με τα υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση, τα μικρότερα σε μέγεθος ψάρια φαίνεται να εξουδετερώνουν καλύτερα τα ROS και να προστατεύονται από το οξειδωτικό στρες (Filho, 2007).

Παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει πως όσο μικρότερο είναι το ψάρι, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των τοξικών παραγόντων στους ιστούς τους, με αποτέλεσμα να αυξάνονται και τα αντιοξειδωτικά τους επίπεδα (Παναγιωτάκου, 2024). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μεγαλύτερα ψάρια έχουν υψηλότερο ποσοστό υγρασίας και έτσι οι τοξικοί παράγοντες βρίσκονται σε αραιωμένη μορφή στους ιστούς των ψαριών (Sofoulaki, et al., 2019). Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του ψαριού, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική του δράση.

5.2. Συγκέντρωση Αντιοξειδωτικών Στα Δείγματα *Mullus barbatus*

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 12), παρατηρείται διαφορά στους μέσους όρους των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών στις διαφορετικές μεθόδους που πραγματοποιήθηκαν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε μέθοδος έχει διαφορετικό μηχανισμό και ανιχνεύει διαφορετικούς παράγοντες. Η μέθοδος FRAP είναι αυτή με τον μεγαλύτερο μέσο όρο αντιοξειδωτικών, καθώς στοχεύει ενώσεις που μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες, μετρώντας την συνολική αναγωγική ισχύ, η οποία περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών (Nemati, et al., 2024). Στην μέθοδο TPC μετρήθηκε μικρότερη συγκέντρωση, καθώς μετρά κυρίως τις φαινολικές ενώσεις οι οποίες αποτελούν υποσύνολο των συνολικών αντιοξειδωτικών. Τέλος, στην μέθοδο ABTS παρατηρείται ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών να είναι κοντά σε αυτόν της FRAP, διότι η μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη σε ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών, τόσο των λιπόφιλων όσο και των υδρόφιλων ενώσεων (Rácz, et al., 2015).

Πίνακας 12: Μέσος όρος συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών.

Μέθοδοι	Μ.Ο. συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών των δειγμάτων σε ppm
FRAP	155,2 ppm
TPC	62,57 ppm
ABTS	147,9 ppm

Bibliography

1. Al-Dalaen, S., & Al-Qtaitat, A. (2014). Oxidative Stress Versus Antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering* , 2 (5).
2. Androulidakis, Y., Kolovoyiannis, V., Makris, C., Krestenitis, Y., Baltikas, V., Stefanidou, N., et al. (2021). Effects of ocean circulation on the eutrophication of a Mediterranean gulf with river inlets: The Northern Thermaikos Gulf. *Continental Shelf Research* , 221.
3. Atta, E., Mohamed, N., & Abdelgawad, A. (2017). Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types. *European Chemical Bulletin* , 6 (8).
4. Balami, S., Sharma, A., & Karn, R. (2019). Significance Of Nutritional Value Of Fish For Human Health. *Malaysian Journal of Halal Research Journal* , 2 (2).
5. Bandeira, S., Guedes, G., Fonseca, L., Pires, A., Gelain, D., Moreira, J., et al. (2012, November 8). Characterization of Blood Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: Increase in Lipid Peroxidation and SOD Activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* .
6. Benzie, I., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* .
7. Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* , 5 (1), 9-19.
8. Bozzatello, P., Rocca, P., Mantelli, E., & Bellino, S. (2019). Polyunsaturated Fatty Acids: What is Their Role in. *Internation journal of molecular sciences* , 20 (21).
9. Bragadóttir , M. (2001). Endogenous antioxidants in fish. *Department of Food Science University of Iceland* .
10. Brigelius-Flohé, R. (1999, November). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* , 915-1134.

11. Carbonara, P., Intini, S., Modugno, E., Maradonna, F., Spedicato, M., Lembo, G., et al. (2015). Reproductive biology characteristics of red mullet (*Mullus barbatus* L., 1758) in Southern Adriatic Sea and management implications. *Aquatic Living Resources* , 28 (1), 21-31.
12. Cheeseman, K. H., & Slater, T. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* .
13. Chen, F., Zhang, X., Wang, J., Wang, F., & Mao, J. (2024). P-coumaric Acid: Advances in Pharmacological Research Based on Oxidative Stress. *Current topics in medical chemistry* , 24 (5), 416-436.
14. Chen, J., Jayachandran, M., Bai , W., & Xu, B. (2021, August 16). A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. *Food Chemistry* .
15. CHÉRIF, M., Amor, M., Selmi, S., & Capapé, C. (2011). FOOD AND FEEDING HABITS OF THE RED MULLET, *MULLUS BARBATUS* (ACTINOPTERYGII: PERCIFORMES: MULLIDAE), OFF THE NORTHERN TUNISIAN COAST (CENTRAL MEDITERRANEAN). *ACTA ICHTHYOLOGICA ET PISCATORIA* .
16. Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* , 1 (1).
17. DUTHIE, G., WAHLE, K., & JAMES , W. (1989). OXIDANTS, ANTIOXIDANTS AND CARDIOVASCULAR DISEASE . *Nutrition Research Reviews* , 2, 51-62.
18. Erdogan, H., Fadillioglu, E., Ozgocmen, S., Sogut, S., Ozyurt, B., Akyol, O., et al. (2004). Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* , 71 (3), 149-152.
19. Eslick, G., Howe, P., Smith, C., Priest, R., & Bensoussan, A. (2009). Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology* , 4 (16), 4-16.

20. Etsuo , N. (2016). Antioxidant capacity of foods for scavenging reactive oxidants and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. *Food & Function* (5).
21. Fernández-Marín, R., Fernandes, S., McReynolds, C., Labidi, J., & Sánchez, M. (2020). Chitosan-based materials as templates for essential oils. In *Handbook of Chitin and Chitosan* (pp. 689-720).
22. Ferreira, P., Victorelli, F., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2018). A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* , 49 (1), 21-31.
23. Filho, D. (2007). Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* , 1 (12), 1229-1237.
24. Foti, M. (2015). Use and Abuse of the DPPH• Radical. *Journal Agricultural and Food Chemistry* , 63 (40).
25. From fish chemical characterisation to the benefit-risk assessment – Part A2012 *Food Chemistry* 1371-499-107
26. Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., & Kirkman, H. (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *blood* , 87 (4).
27. González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., et al. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition* , 51 (4), 331-362.
28. Gutteridge, J. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* , 91 (2-3), 133-140.
29. Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet* , 355 (9210), 1179-1180.
30. Hayes, J. D. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. *ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY* .

31. Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Alfarez, M.-J., & Vazquez, C. (1998). The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. *Nutrition*, 14 (6), 513-520.
32. Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 656-662.
33. Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2019). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54 (4), 287-293.
34. Kanak, E., Dogan, Z., Eroglu, A., Atli, G., & Canli, M. (2014). Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40 (4), 1083-1091.
35. Kang, H., Seo, C., & Park, Y. (2015). Marine peptides and their anti-infective activities. *Marine Drugs*, 13 (1), 618-654.
36. Kashtoh, H., & Baek, K.-H. (2023). New Insights into the Latest Advancement in α -Amylase Inhibitors of Plant Origin with Anti-Diabetic Effects. *New Insights in the Research of Bioactive Compounds from Plant Origin with Nutraceutical and Pharmaceutical Potential II*, 12 (16).
37. Kimbrough, R. (1991). Consumption of fish: Benefits and perceived risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 33 (1), 81-91.
38. Krestenitis, Y., Kombiadou, K., & Androulidaki, Y. (2012). Interannual variability of the physical characteristics of North Thermaikos Gulf (NW Aegean Sea). *Journal of Marine Systems*, 96 (97), 132-151.
39. Kumarakuru, K., Vasanthakumari, P., Sundar, K., & Javith, H. (2023). Nutritional Profile, Antioxidant Capacity and Physicochemical Properties of Processed Labeo bata. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 13 (1), 27-36.

40. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews* , 4 (8), 118-126.
41. Manson, J., Gaziano, J., Jonas, M., & Hennekens, C. (2013). Antioxidants and cardiovascular disease: a review. *Journal of the American College of Nutrition* , 12 (4), 426-432.
42. Manubolu, M., Lee, J., Riedl, K., Kua, Z., Collart, L., & Ludsin, S. (2018). Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS. *Harmful Algae* , 76, 47-57.
43. Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *oxygen* , II (2), 48-78.
44. Mehanna, S., & Hassanien, E. (2023). Age, Growth, Mortality and Reproductive Dynamics of the Red Mullet *Mullus barbatus* in the Delta Adjacent Waters, Mediterranean Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology And Fisheries* , 27 (1), 217-233.
45. Melnikova, E., & Kuzminova, N. (2020). Influence of Climatic Factors on the Interannual Changes of Gonadosomatic Index of the Red Mullet *Mullus barbatus ponticus* in the Coastal Crimean Waters. *Ecologica Montenegrina* , 31.
46. Metwally, S., El-Gowily, A., Abosheasha, M., Ali, A., & Loutfy, S. (2023, December 19). Kaempferol: Advances on Resources, Biosynthesis Pathway, Bioavailability, Bioactivity, and Pharmacology. *Handbook of Dietary Flavonoids* , 1-34.
47. Mishra, S. (2020). Significance of fish nutrients for human health. *International Journal of Fisheries and Aquatic Research* , 5 (3), 47-49.
48. Nemati, M., Shahosseini, S., & Ariaii, P. (2024). Review of fish protein hydrolysates: production methods, antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation. *Food Science and Biotechnology* , 33 (7), 1789-1803.

49. Nyarko, K. (2024, September 4). Investigating the Antioxidant Properties of Quercetin. *Quercetin - Effects on Human Health* .
50. Oh, R. (2005). *Clinical Review* , 18 (1), 28-36.
51. Oh, R. (2005). *The journal of American board of family practice* , 18 (1), 28-36.
52. Padayatty, S. J. (2013). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition* .
53. Padayatty, S., Katz, J., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., & Lee, J.-H. (2013, June 19). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition* , 18-35.
54. Padayatty, S., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., & Lee, J.-H. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition* , 22 (1).
55. Panagiotounakou, G. (2024). Βιοσυσσώρευση μετάλλων σε κουτσομούρες από τον Θερμαϊκό κόλπο και εκτίμηση κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων από τη κατανάλωσή τους.
56. Pavlíková, N. (2023). Caffeic Acid and Diseases—Mechanisms of Action. *International journal of molecular sciences* , 24 (1), 588.
57. Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* , 71 (46), 17485-18086.
58. Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53 (10).
59. Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53 (10).

60. Rácz, A., Papp, N., Balogh, E., Fodor, M., & Héberger, K. (2015). Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Analytical Methods*, 7 (10).
61. Rahman, T., Hosen, I., Islam, M., & Shekhar, H. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3 (7A).
62. Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E., Gopas, J., et al. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332-347.
63. Rao, A., & Balachandran, B. (2013, September 5). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Diseases. *Nutritional Neuroscience*, 291-309.
64. Rubab, M., Chelliah, R., & Oh, D.-H. (2022, January 1). Screening for Antioxidant Activity: Diphenylpicrylhydrazine (DPPH) Assay. *Methods in Actinobacteriology*, 453-454.
65. Saikat, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1083, 1-37.
66. Sánchez-Rangel, J., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5 (21), 5990-5999.
67. Sandoval-Vargas, L., Jiménez, M., González, J., Villalobos, E., Cabrita, E., & Isler, I. (2020). Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 13 (1), 365-387.
68. Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1083, 1-37.
69. Sharma, N., Biswas, S., Al-Dayyan, N., Alhegaili, A., & Sarwat, M. (2021). Antioxidant Role of Kaempferol in Prevention of Hepatocellular Carcinoma. *Antioxidants*, 10 (9).

70. Shi, Y., Guo, Y.-D., Mi, Y.-D., Cheng, J., Dong, W., Zhang, G.-F., et al. (2023). Potential of UV-Vis Spectroscopy for Determining the Mechanism of the Synergistic Antioxidant Process of Kaempferol with Three Other Flavonoids and β -Carotene. *Journal of Applied Spectroscopy* , 90 (4), 883-892.
71. Siscovick, D., Barringer, T., Fretts, A., Wu, J., Lichtenstein, A., Costello, R., et al. (2017). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil). *Circulation* , 135 (15), 867-884.
72. Sofoulaki, K., Kalantzi, I., Machias, A., Pergantis, S., & Tsapakis, M. (2019). Metals in sardine and anchovy from Greek coastal areas: Public health risk and nutritional benefits assessment. *Food and Chemical Toxicology* , 123, 113-124.
73. STEINBERG, F., & RUCKER, R. (2001). Ascorbic Acid. In *HANDBOOK OF VITAMINS* (Vol. III, pp. 529-554).
74. Stenson, W., Cort, D., Rodgers, J., Burakoff, R., DeSchryver-Kecsckemeti, K., Gramlich, T., et al. (1992). Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Annals of Internal Medicine* , 116 (8), 609-614.
75. Tebbi, S., Trapali, M., & Letsiou, S. (2023). Exploring the Anti-Diabetic, Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Clematis flammula L. Leaves and Pistacia lentiscus L. Fruits Using Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvent. *Waste and Biomass Valorization* , 15, 2869-2879.
76. 2017The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications John Wiley & Sons Ltd.
77. Tørris, C., Småstuen, M., & Molin, M. (2018). Nutrients in Fish and Possible Associations with Cardiovascular Disease Risk Factors in Metabolic Syndrome. *Nutrients* , 10 (7).
78. Traber, M., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* , 43 (1), 4-15.

79. Tserpes, G., Fiorentino, F., Levi, D., & Papaconstantinou, C. (2002). Distribution of *Mullus barbatus* and *M. surmuletus* (Osteichthyes: Perciformes) in the Mediterranean continental shelf: Implications for management. *Scientia Marina* , 66 (2), 39-54.
80. Tzanatos , E., Somarakis, S., Tserpes, G., & Koutsikopoulos, C. (2008). Catch length analysis, relation to minimum landing sizes and management implications from a Mediterranean small-scale fishery (Patraikos Gulf, Greece). *Fisheries Research* , 93 (1-2), 125-134.
81. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* , 160 (1), 1-40.
82. Villano, J., Husain, A., Stadler, W., Hanson, L., Vogelzang, N., & Kindler, H. (2004). A Phase II trial of imatinib mesylate in patients (pts) with malignant mesothelioma (MM). *Journal of Clinical Oncology* , 22.
83. Violintzis, C. (2008). Elemental composition of suspended particulate matter and sediments in the coastal environment of Thermaikos Bay, Greece: Delineating the impact of inland waters and waste waters. *Journal of Hazardous Materials* .
84. Violintzis, C., Arditoglou, A., & Voutsas, D. (2009). Elemental composition of suspended particulate matter and sediments in the coastal environment of Thermaikos Bay, Greece: Delineating the impact of inland waters and wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* , 166 (2-3), 1250-1260.
85. Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., & Wozniak, L. (2010). A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current Medicinal Chemistry* , 17 (28), 3262-3288.
86. Yamauchi, M., Kitamura, Y., Nagano, H., Kawatsu, J., & Gotoh, H. (2024). DPPH Measurements and Structure—Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols. *Antioxidants* , 13 (3).

87. Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S., & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020 (1).
88. Yeo, J., & Shahidi, F. (2019). Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of Pigments Affects the Results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (26), 7526-7529.
89. Zanwar, A., Badole, S., Shende, P., Hegde, M., & Bodhankar, S. (2014). Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 1, pp. 267-271).
90. Zhang, M., Swarts, S., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., et al. (2011, January 1). Antioxidant Properties of Quercetin. *Oxygen Transport to Tissue XXXII*, 283-289.
91. Zhu, Y., Zhao, J., Luo, L., Gao, Y., Bao, H., Zhang, H., et al. (2021). Research progress of indole compounds with potential antidiabetic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 223.
92. Γερογιάννη, Ε., & Γουργουλιάνης, Κ. (2005, Ιούνιος 13). Οξειδωτικό stress και παθήσεις του πνεύμονα. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*.
93. Δημακοπούλου, Α. (2014). Επίδραση των μεθόδων εκχύλισης στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων στέβιας. *ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ*.
94. Ζήκου, Μ. (2010). Επίδραση εκχυλισμάτων ψυχανθών στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*.
95. Θεοδόση, Α. (2017). Υπολογισμός αναγωγικής δύναμης σε πλάσμα ανθρώπου μετά από έκκεντρη άσκηση σε ισοκινητικό δυναμόμετρο.
96. Καλλιτσουνάκης, Γ. (2016). Εκχύλιση φύλλων ιπποφαούς σε θειωμένους και αθείωτους οίνους και μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης.
97. Κούρτη, Π. (2019). Φυτοχημική μελέτη σπερμάτων ελληνικού υβριδίου *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). *Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*.

98. Παναγιωτάκου, Γ. (2024). Βιοσυσσώρευση μετάλλων σε κουτσομούρες από τον Θερμαϊκό κόλπο και εκτίμηση κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων από τη κατανάλωσή τους. *Εργαστήρια Χημείας, Βιοχημείας και Κοσμετολογίας* .
99. Παπααγαθοκλέους, Χ. Ξ.–Α. (2021). Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Επίδρασης των Βοτάνων Αγριμόνιο – Αγγελική στον Οίνο. *Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής* .