



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δράσης και φυσικοχημικών  
ιδιοτήτων φαινολικών ενώσεων με *in vitro* και *in silico*  
μεθόδους»**

**ΚΑΛΤΣΗΣ ΛΑΖΑΡΟΣ**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Ευτυχία Κρίτση**

**ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2021**

**Επιβλέπων καθηγητής**

**Ευτυχία Κρίτση**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής**

**Βασιλεία Σινάνογλου**

**Δήμητρα Λαντζουράκη**

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

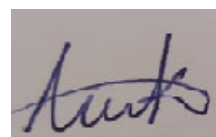
Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Καλτσής Λάζαρος του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 71617029, φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο Δηλών

Καλτσής Λάζαρος



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ευτυχία Κρίτση, PhD για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος καθώς και για την ανεκτίμητη βοήθειά της και τις πολύτιμες συμβουλές της για την ολοκλήρωσή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Δήμητρα Λαντζουράκη για τις συμβουλές της και τη συμβολή της στο κομμάτι της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και για τις παρατηρήσεις της καθώς επίσης και την Καθηγήτρια Βασιλεία Σινάνογλου για τις παρατηρήσεις της καθώς και τη συμμετοχή της ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Θάλεια Τσιάκα για τη βοήθειά της και τις συμβουλές της στο χρονικό διάστημα της διεκπεραίωσης της πτυχιακής.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....</b>	<b>6</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>9</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>Θεωρητικό μέρος .....</b>	<b>13</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή-Φαινολικές Ενώσεις.....</b>	<b>13</b>
1.1 Γενικά περί φαινολικών ενώσεων.....	13
1.2 Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και δράσεις.....	16
1.3. Χρήσεις φαινολικών ενώσεων στη βιομηχανία.....	26
1.3.1. Χρήσεις στη βιομηχανία τροφίμων .....	26
1.3.2 Χρήσεις στη βιομηχανία καλλυντικών.....	29
1.4 Πηγές φαινολικών ενώσεων.....	31
<b>Κεφάλαιο 2 : Αντιοξειδωτική δράση .....</b>	<b>35</b>
2.1: Αντιοξειδωτική δράση: Τι είναι και πού οφείλεται; .....	35
2.2 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης.....	37
2.2.1 Γενικοί μηχανισμοί .....	37
2.2.2 Μηχανισμοί δράσης υποστρωμάτων .....	40
<b>Κεφάλαιο 3: ΠοσοτικέςΣχέσειςΔομής-Δράσης(QSAR– QuantitativeStructure-Activity Relationship) .....</b>	<b>48</b>
3.1 Εισαγωγή.....	48
3.2 Μοριακές περιγραφικές παράμετροι (MolecularDescriptors) .....	49
3.2.1 Ορισμός.....	49
3.2.2 Κατηγορίες περιγραφικών παραμέτρων .....	50
3.2.3 Λογισμικά (Softwares) που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό περιγραφικών παραμέτρων.....	51
3.2.4 Στατιστικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται την αξιολόγηση και την ερμηνεία μοντέλων Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης .....	52
<b>Πειραματικό μέρος .....</b>	<b>55</b>
<b>Κεφάλαιο 4: Δημιουργία Ποσοτικών Μοντέλων Σχέσης Δομής-Δράσης φυσικών φαινολικών ενώσεων.....</b>	<b>55</b>
4.1 Εισαγωγή.....	55
4.2 Επιλογή και κατάλληλη προετοιμασία του δειγματοχώρου .....	55
4.3 Ελαχιστοποίηση της ενέργειας των φαινολικών ενώσεων του δειγματοχώρου .....	59
4.4 Πρόβλεψη περιγραφικώνπαραμέτρων (Prediction of the descriptors).....	67

4.5 Δημιουργία ποσοτικών μοντέλων QSAR βασιζόμενα στις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors).....	68
<b>Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....</b>	<b>78</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>80</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.1:** Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και παραδείγματα
- Πίνακας 1.2:** Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων με τις αντίστοιχες βιολογικές δράσεις και χρήσεις τους στη βιομηχανία καλλυντικών
- Πίνακας 1.3:** Παραδείγματα φρούτων και λαχανικών, υπολειμμάτων και αντιοξειδωτικών πολυφαινολών
- Πίνακας 3.1:** Οι χαρακτηριστικότεροι τοπολογικοί δείκτες και οι ορισμοί τους
- Πίνακας 3.2:** Οι χαρακτηριστικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες και οι ορισμοί τους
- Πίνακας 3.3:** Κατάλογος λογισμικών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μοριακών περιγραφικών παραμέτρων
- Πίνακας 4.1:** Οι πειραματικές τιμές  $IC_{50}$  των ενώσεων του δειγματοχώρου που προέκυψαν με εφαρμογή της μεθόδου DPPH
- Πίνακας 4.2:** Θεωρητικές τιμές ενέργειας των φυσικών ενώσεων μετά την εφαρμογή ελαχιστοποίησης της ενέργειας
- Πίνακας 4.3:** Λογαριθμημένες τιμές  $IC_{50}$  των φαινολικών ενώσεων,  $pIC_{50} = \log(1/IC_{50})$
- Πίνακας 4.4:** Καταμερισμός των φαινολικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$
- Πίνακας 4.5:** Καταμερισμός των δραστικών φαινολικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$
- Πίνακας 4.6:** Καταμερισμός των δραστικών φαινολικών ενώσεων έπειτα από αφαίρεση συνδυασμού δραστικών ενώσεων με έκτροπες τιμές (outliers) και μη δραστικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$

**Πίνακας 4.7:** Στατιστικά δεδομένα της εξίσωσης του μοντέλου

**Πίνακας 4.8:** Τιμές των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) για τις 25 φαινολικές ενώσεις

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1.1:** Σχηματική απεικόνιση βιοσύνθεσης πολυφαινολών από τη φαινυλοπροπανοειδή οδό

**Εικόνα 1.2:** Δομικός σκελετός φαινόλης

**Εικόνα 1.3:** Χημικές δομές α) Υδροξυβενζοϊκών και β) Υδροξυκιναμικών παραγώγων

**Εικόνα 1.4:** Χημικές δομές του δομικού σκελετού φλαβονοειδών

**Εικόνα 1.5:** Χημικές δομές παραδειγμάτων καροτενοειδών

**Εικόνα 1.6:** Δομικός Σκελετός Στιλβενίων και παραδείγματα

**Εικόνα 1.7:** Δομικός Σκελετός Κουμαρινών και παραδείγματα

**Εικόνα 1.8:** Χημικές δομές παραδειγμάτων Λιγνάνων

**Εικόνα 1.9:** Ταννίνες και κατηγορίες τους

**Εικόνα 1.10:** Χημική δομή της ΒΗΑ

**Εικόνα 1.11:** Χημική δομή της ΒΗΤ

**Εικόνα 1.12:** Χημική δομή της ΒΗQ

**Εικόνα 1.13:** Χημική δομή του ΡG

**Εικόνα 1.14:** Χημική δομή του ΟG

**Εικόνα 1.15:** Φρούτα, λαχανικά και παραπροϊόντα τους και οι φαινολικές ενώσεις που περιέχουν

**Εικόνα 2.1:** Αναπαράσταση των τριών μηχανισμών (1) HAT , (2) SPLET , (3) SET-PT

**Εικόνα 2.2:** Απεικόνιση αποδόμησης ABTS<sup>•+</sup>

**Εικόνα 2.3:** Γενική αντίδραση-μηχανισμός που ακολουθείται από τις φαινολικές ενώσεις με το ABTS<sup>•+</sup>.

**Εικόνα 2.4 :** Χημική δομή Trolox



**Εικόνα 2.5:** Απεικόνιση μηχανισμού (HAT) DPPH·

**Εικόνα 2.6:** Απεικόνιση μηχανισμού FRAP

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

**Σχήμα 4.1:** Οι χημικές δομές των φυσικών φαινολικών ενώσεων που απαρτίζουν το δειγματοχώρο

**Σχήμα 4.2:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 2,3,4-Trihydroxyacetophenone, 2,4-Dihydroxyflavone, 2,4,6-Trihydroxyacetophenone και 2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone

**Σχήμα 4.3:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 2-Hydroxy-3,4-dimethoxyflavone, 3',4'-Dihydroxyflavone, 5,3',4'-Trihydroxyflavone και 5,7,2'-Trihydroxyflavone

**Σχήμα 4.4:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavone, 6,3',4'-Trihydroxyflavone, 6,7,3'-Trihydroxyflavone και 7,2',4'-Trimethoxyflavone

**Σχήμα 4.5:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 7,3',4'-Trihydroxyflavone, Apigenin, 7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone και Biohanin A

**Σχήμα 4.6:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των (+/-)-Catechin, Chlorogenic acid, Chrysin και Daidzein

**Σχήμα 4.7:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Formonetin, Hesperidin, Galangin και Genistein

**Σχήμα 4.8:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Juglanin, Kaempferide, Kaempferol και Luteolin

**Σχήμα 4.9:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Naringenin, Naringin, Puerarin και Pyrogalllic acid

**Σχήμα 4.10:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Quercetin και Rutin

**Σχήμα 4.11:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης για όλες τις ενώσεις για τη μέθοδο DPPH

**Σχήμα 4.12:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης μόνο για τις δραστικές ενώσεις για τη μέθοδο DPPH

**Σχήμα 4.13:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης έπειτα από αφαίρεση συνδυασμού δραστικών και μη δραστικών ενώσεων για τη μέθοδο DPPH

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα, έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας δεδομένης της αποδεδειγμένης αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και της δράσης τους για την καταπολέμηση/πρόληψη χρόνιων ασθενειών που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες και την παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Λαμβάνοντας υπόψη το σημαντικό ρόλο των φαινολικών ενώσεων, στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση στοχεύοντας στη μελέτη των φαινολικών ενώσεων καθώς και στην περιγραφή των μηχανισμών αντιοξειδωτικής τους δράσης. Παράλληλα, δημιουργήθηκαν Ποσοτικά Μοντέλα Σχέσης Δομής-Δράσης (QSAR) συνδυάζοντας κατάλληλες *in vitro* και *in silico* μεθόδους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φαινολικές ενώσεις φυσικής προέλευσης από τη βιβλιογραφία, για τις οποίες πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) τους μέσω εφαρμογής αξιόπιστων υπολογιστικών εργαλείων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συσχετισμός τους με τις τιμές της μέσης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( $IC_{50}$ ), ο οποίος αντικατοπτρίζει την αντιοξειδωτική δράση, με απώτερο σκοπό την ανάδειξη των παραμέτρων που συνεισφέρουν στη δράση. Τα μοντέλα αναλύθηκαν στατιστικά ως προς την αξιοπιστία τους και την ικανότητα πρόβλεψής τους και στη συνέχεια για το βέλτιστο μοντέλο πραγματοποιήθηκε ενδεικτική σύγκριση μεταξύ φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην ίδια κατηγορία ως προς τις φυσικοχημικές περιγραφικές παραμέτρους (descriptors). Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι ακόμα και ενώσεις που ανήκουν στην ίδια κατηγορία δύναται να διαφέρουν ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους καθώς και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Επίσης, η φυσική σημασία των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων δύναται να αντικατοπτριστεί και στις διαφορές των μοριακών δομών των φαινολικών ενώσεων.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Αντιοξειδωτική δράση, Φαινολικές ενώσεις, Περιγραφικές μεταβλητές (Descriptors), Ποσοτικά Μοντέλα Σχέσης Δομής-Δράσης (QSAR)

## ABSTRACT

Nowadays, the interest of the scientific community is focused on phenolic compounds, which are found in abundance in plant-based foods, given their proven antioxidant capacity in the prevention and management of chronic diseases resulting from oxidative stress and free radicals production.

Considering the important role of phenolic compounds, in the present study a literature review was carried out aiming at the analysis of phenolic compounds as well as at the description of the applied methods for antioxidant activity evaluation. In parallel, Quantitative Structure-Activity Relationship Models (QSAR) were created combining *in vitro* and *in silico* methods. For the present purpose, phenolic compounds of natural origin were used from the literature and their physicochemical descriptors were predicted through the application of reliable computational tools.

In continuation, the  $IC_{50}$  values of the examined compounds, which determine their antioxidant activity, were correlated with predictive descriptors values, highlighting the descriptors that contribute to antioxidant activity. The created QSAR models were statistically analysed for their reliability and predictability and for the optimal model comparisons were performed between physicochemical descriptors of phenolic compounds bearing similar chemical groups, indicatively. The results indicate that phenolic compounds bearing similar scaffolds may present differences in their antioxidant activity and to their physicochemical profile.

**Keywords:** Antioxidant activity, Phenolic compounds, Descriptors, Quantitative Structure–Activity relationship models

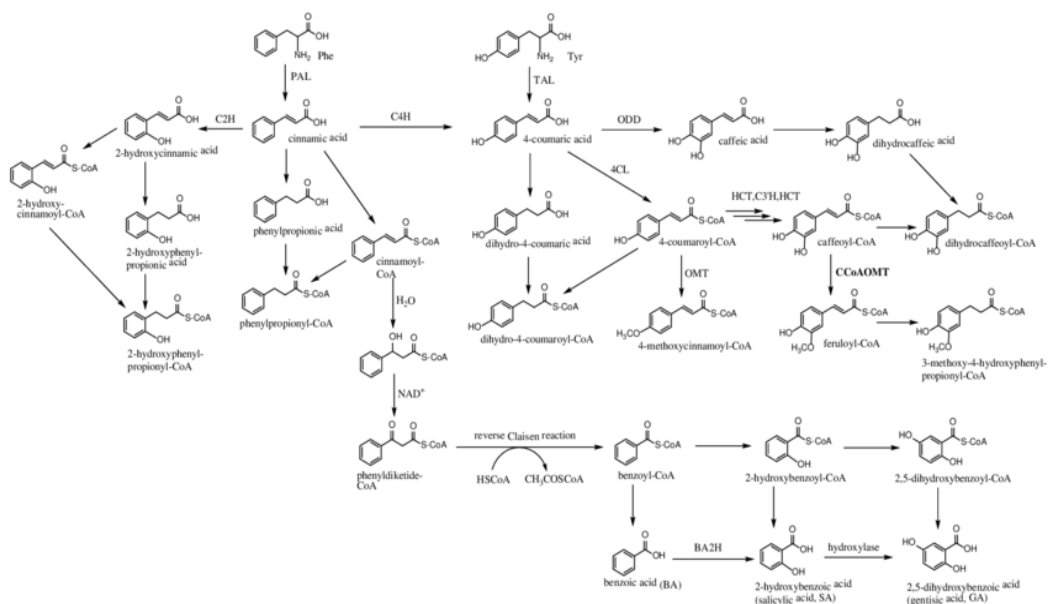
# Θεωρητικό μέρος

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή-Φαινολικές Ενώσεις

### 1.1 Γενικά περί φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες αποτελούν μία ευρεία ομάδα μεταβολιτών στη φύση, οι οποίοι προέρχονται από το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες σε βενζολικό δακτύλιο και διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι σε φυτικά παθογόνα και αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες (San Miguel-Chávez, 2017).

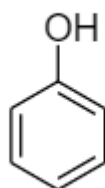
Έχει εκτιμηθεί ότι, υπάρχουν εκατό έως διακόσιες χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες και περίπου το 20% του άνθρακα που δημιουργείται κατά τη φωτοσύνθεση διοχετεύεται στην φαινυλοπροπανοειδή οδό (phenylpropanoid pathway), παράγοντας κατά αυτό τον τρόπο την πλειοψηφία των φυσικά-προκυπτόντων φαινολικών ενώσεων (Εικόνα 1.1), όπως τα φλαβονοειδή και τα στυλβένια (Pereira et al., 2009).



**Εικόνα 1.1:** Σχηματική απεικόνιση βιοσύνθεσης πολυφαινολών από τη φαινυλοπροπανοειδή οδό (Liao et al., 2018).

Ο δομικός σκελετός των φαινολικών ενώσεων αποτελείται από μια φαινολική ομάδα, η οποία είναι, ένα υδροξύλιο συνδεδεμένο σε έναν αρωματικό δακτύλιο (**Εικόνα 1.2**). Γενικά, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από χημικά ετερογενής (heterogeneous) ομάδες (group) με τις ακόλουθες χημικές ιδιότητες:

- ορισμένες ενώσεις είναι διαλυτές στο νερό,
- ορισμένες είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες,
- ορισμένες εντοπίζονται υπό την μορφή γλυκοζιτών και
- ορισμένες αποτελούν μεγάλα αδιάλυτα πολυμερή.



**Εικόνα 1.2:** Δομικός σκελετός φαινόλης.

Επιπρόσθετο και ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι η συγκεκριμένη χημική ομάδα παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση (San Miguel-Chávez, 2017).

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά με ποικίλους τρόπους:

➤ **Δότες Υδρογόνου**

Οι φαινολικές υδροξυλικές ομάδες είναι «καλοί» δότες υδρογόνου. Αντιοξειδωτικά τα οποία είναι δότες υδρογόνου δύναται να αντιδράσουν με ενεργές ομάδες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) καθώς και με ενεργές ομάδες αζώτου (Reactive Nitrogen Species - RNS), σε μια αντίδραση τερματισμού, η οποία απενεργοποιεί τον κύκλο παραγωγής νέων ριζών. Η επακόλουθη αλληλεπίδραση με τις προαναφερόμενες ενεργές ομάδες, δημιουργεί μια ριζική μορφή του φαινολικού αντιοξειδωτικού, η οποία διαθέτει μεγαλύτερη χημική σταθερότητα από την αρχική ρίζα των ενεργών ομάδων που προέρχεται από τον οργανισμό. Η αλληλεπίδραση των υδροξυλικών ομάδων των φαινολικών ενώσεων με τα π-ηλεκτρόνια του

βενζολικού δακτυλίου προσδίδει στα μόρια ειδικές ιδιότητες, με κυριότερη, την ικανότητα να παράγονται ελεύθερες ρίζες όπου οι ίδιες σταθεροποιούνται μέσω αποεντοπισμού του ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός αυτών των σχετικά μεγάλης διάρκειας ζωής φαινολικών ριζών προσδίδει τη δυνατότητα πρόληψης ή / και καταστολής του οξειδωτικού στρες που προέρχεται από ενεργές ομάδες οξυγόνου και αζώτου (San Miguel-Chávez, 2017).

#### ➤ **Ικανότητα χηλίωσης μεταλλικών ιόντων**

Η αντιοξειδωτική ισχύς των φαινολικών ενώσεων συνδέεται επίσης με την ικανότητα χηλίωσης μεταλλικών ιόντων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως προ-οξειδωτικά, χηλιώνοντας μέταλλα με τρόπο ώστε να διατηρείται ή να αυξάνεται η καταλυτική τους ικανότητα ή να ανάγουν τα μέταλλα με απότοκο την αύξηση της ικανότητας τους ως προς το σχηματισμό ελεύθερων ριζών (San Miguel-Chávez, 2017).

#### ➤ **Αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες**

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες, λόγω της ύπαρξης υδροφοβών βενζολικών δακτυλίων και της ικανότητας σχηματισμού δεσμού υδρογόνου των υδροξυλικών ομάδων. Αυτό τους προσδίδει αντιοξειδωτική ισχύ διότι αναστέλλουν ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν σε παραγωγή ριζών, όπως είναι ποικίλες λιποξυγενάσες, κυκλοοξυγενάσες και οξειδάσες της ξανθίνης (San Miguel-Chávez, 2017).

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τον αριθμό και την διάταξη των υδροξυλικών ομάδων στα μόρια τους. Είναι ανενεργά αντιοξειδωτικά εκτός αν με υποκατάσταση σε θέσεις όρθο (ortho) ή πάρα (para) αυξηθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην υδροξυλική ομάδα και μειωθεί η ενέργεια του δεσμού οξυγόνου-υδρογόνου, δηλαδή αυξηθεί η δραστηριότητα απέναντι σε λιπιδικές ελεύθερες ρίζες. Υποκατάσταση σε θέση μέτα (meta) διαθέτει αρκετά περιορισμένη επίδραση (Gulcin, 2020).

Παρόλο που υπάρχει μεγάλη ποικιλία φυτικών φαινολικών ενώσεων, οι περισσότερες από αυτές προκύπτουν από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη. Τα αναφερόμενα αμινοξέα απαμινώνονται σε κινναμικά οξέα, τα οποία εισέρχονται στην φαινυλοπροπανοειδή οδό. Σημείο-κλειδί σε αυτή τη βιοσυνθετική οδό αποτελεί η εισαγωγή ενός ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο. Απότοκος αυτών είναι η παραγωγή φαινολικών ενώσεων με ένα σύνηθες σύμπλεγμα ανθρακικού σκελετού: την C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> φαινυλοπροπανοειδή μονάδα (Phenylpropanoid unit) (Pereira et al., 2009).

Βιοσύνθεση που ακολουθεί τη συγκεκριμένη οδό παράγει μεγάλη ποικιλία φυτικών ενώσεων όπως είναι: φαινολικά οξέα (phenolic acids), φλαβονοειδή (flavonoids), προανθοκυανιδίνες (proanthocyanidins), κουμαρίνες (coumarins), στιλβένια (stilbenes) και λιγνάνες (lignans) (Pereira et al., 2009). Οι παραπάνω κατηγορίες ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, υπάρχουν και ενώσεις που ανήκουν στα συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως η Βουτυλιωμένη Υδροξυ-ανισόλη (**Εικόνα 1.10**), το Βουτυλιωμένο Υδροξυ-τολουόλιο (**Εικόνα 1.11**), η tert-Βουτυλο-Υδροξυ-κινόνη (**Εικόνα 1.12**), το Προπυλο-Γαλλικό οξύ (**Εικόνα 1.13**) και το Οκτυλο-Γαλλικό οξύ (**Εικόνα 1.14**). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν αναπτυχθεί για να εμφανίζουν δεδομένη αντιοξειδωτική δράση και να ενσωματώνονται σε τρόφιμα, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής τους. Τα περισσότερα επεξεργασμένα προϊόντα τροφίμων διαθέτουν ενσωματωμένα συνθετικά αντιοξειδωτικά που έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή, αν και πρόσφατες έρευνες παρουσιάζουν αντίθετα αποτελέσματα (Gulcin, 2020).

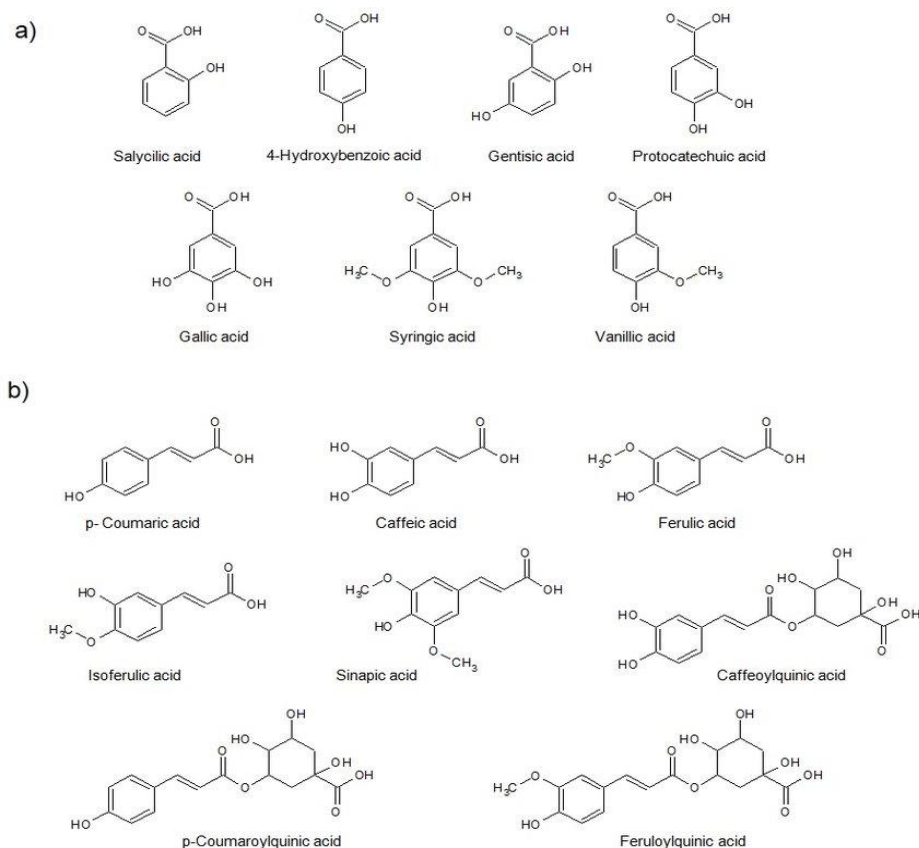
## 1.2 Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και δράσεις

### Φυσικά Αντιοξειδωτικά

**Φαινολικά οξέα (Phenolic acids):** Όπως αναφέρθηκε, στα φυσικά αντιοξειδωτικά ανήκουν τα φαινολικά οξέα. Τα φαινολικά οξέα ανιχνεύονται σχεδόν σε όλα τα φυτά και τα φυτοπαραγώμενα τρόφιμα και παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία στην ανθρώπινη διατροφή. Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος για τις ενώσεις αυτές προκύπτει από τον πιθανό προστατευτικό ρόλο, μέσω της λήψης τους από φρούτα και λαχανικά (μήλα, σταφύλια, βατόμουρα, χυμός ροδιού, πατάτες, κρεμμύδια,



μπρόκολο, σπαράγγια) έναντι ασθενειών που προκύπτουν από οξειδωτικές βλάβες όπως είναι η στεφανιαία νόσος, το εγκεφαλικό επεισόδιο και ο καρκίνος. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τα παράγωγα Υδροξυ-κινναμικού οξέος και τα παράγωγα Υδροξυ-βενζοϊκού οξέος, με τα Υδροξυ-κινναμικά να είναι ενεργότερα αντιοξειδωτικά συγκριτικά με τα Υδροξυ-βενζοϊκά παράγωγα (**Εικόνα 1.3**) (Gulcin, 2020).

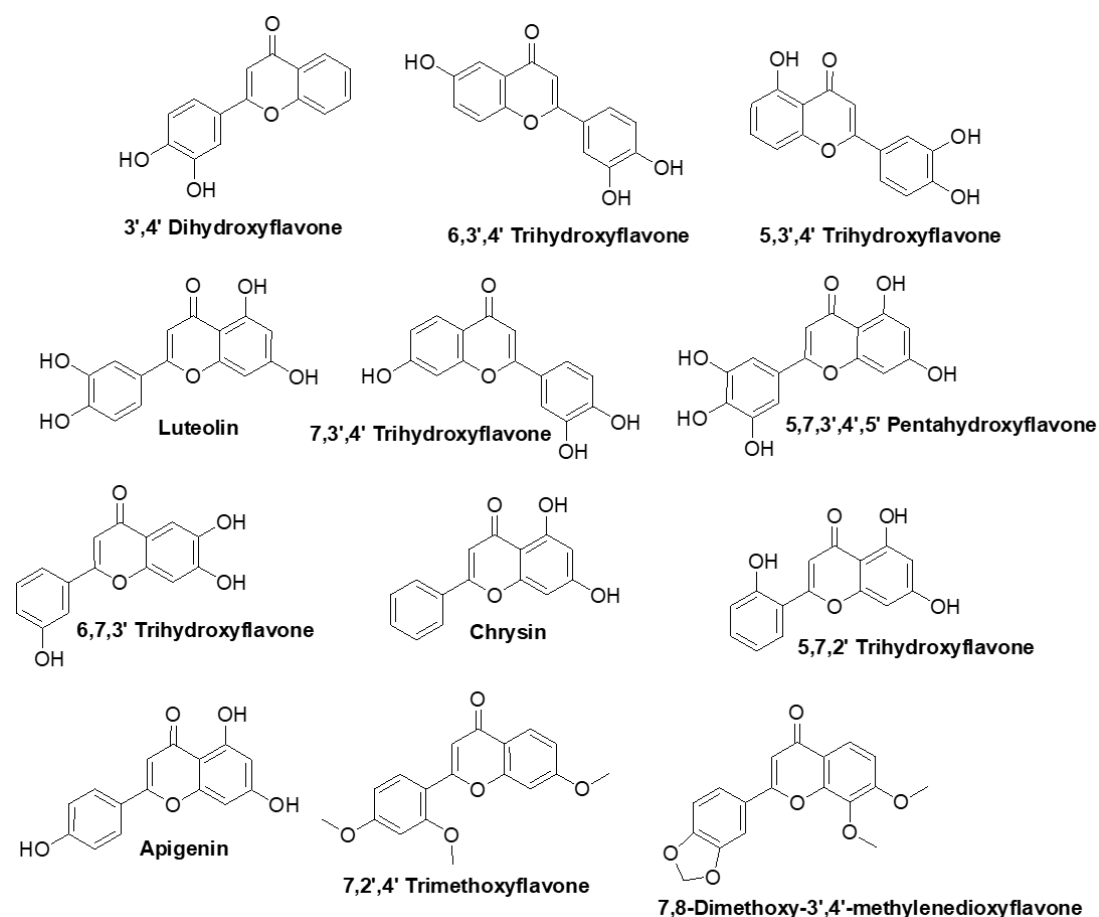


**Εικόνα 1.3:** Χημικές δομές α) Υδροξυβενζοϊκών και β) Υδροξυκινναμικών παραγώγων (Ciulueta*l.*, 2018).

**Φλαβονοειδή (Flavonoids):** Τα φλαβονοειδή (**Εικόνα 1.4**), τα οποία ανήκουν επίσης στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών, είναι κυκλικά διφαινυλο-προπάνια που απαντώνται σε φυτά και κυρίως σε φυτικά τρόφιμα (όπως μήλα, πορτοκάλια, σταφύλια, μπρόκολο, κρεμμύδια). Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών. Περισσότερα από 4,000 φλαβονοειδή έχουν ανιχνευθεί σε ποικίλα είδη φυτών καθώς επίσης έχουν απομονωθεί από όλα σχεδόν τα μέρη των φυτών όπως είναι τα φύλλα, οι

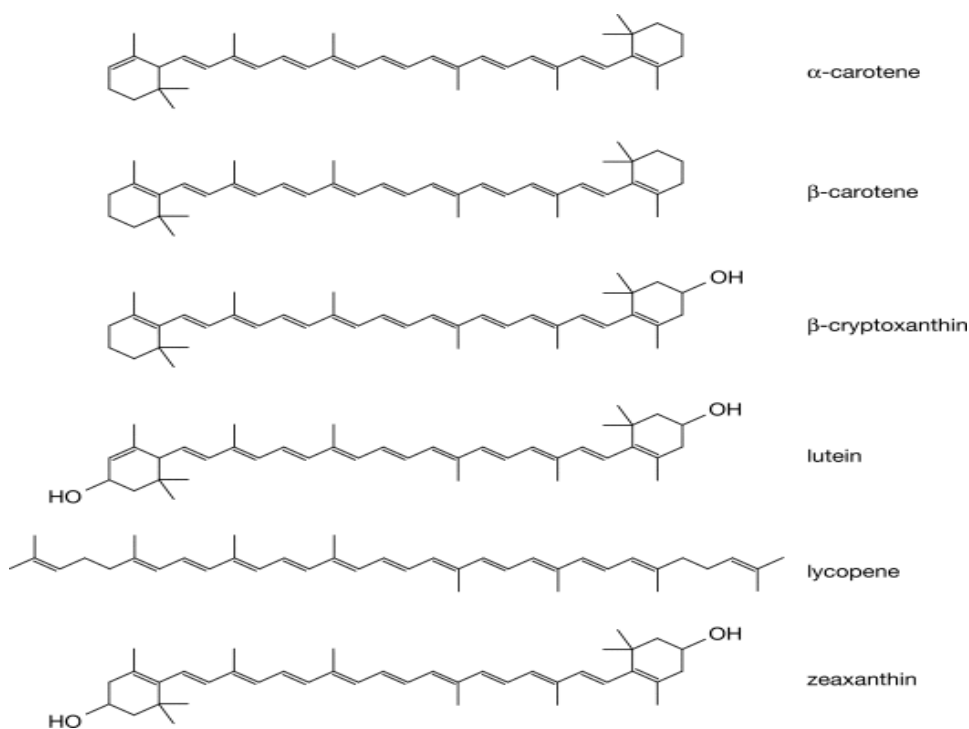
βλαστοί, οι ρίζες, τα φρούτα και οι καρποί. Τα φλαβονοειδή σχηματίζονται στα φυτά από αμινοξέα όπως η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη. Εντοπίζονται, επίσης, σε ανώτερους φυτικούς ιστούς και χωρίζονται σε κατηγορίες όπως είναι: φλαβονόλες (flavonols), φλαβονονόλες (flavononols), φλαβόνες (flavones), φλαβανόλες (flavanols), φλαβανόνες (flavanons), ανθοκυανιδίνες (anthocyanidins) και ισοφλαβόνες (isoflavones) (Gulcin, 2020).

Στα πλεονεκτήματα τους κατατάσσονται (α) η προστασία έναντι οξειδωτικών ασθενειών, (β) η ικανότητά τους να ρυθμίζουν τη δράση ποικίλων ενζύμων, (γ) η αλληλεπίδραση με ειδικούς υποδοχείς και (δ) η προστασία έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων μειώνοντας την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.4:** Χημικές δομές του δομικού σκελετού φλαβονοειδών.

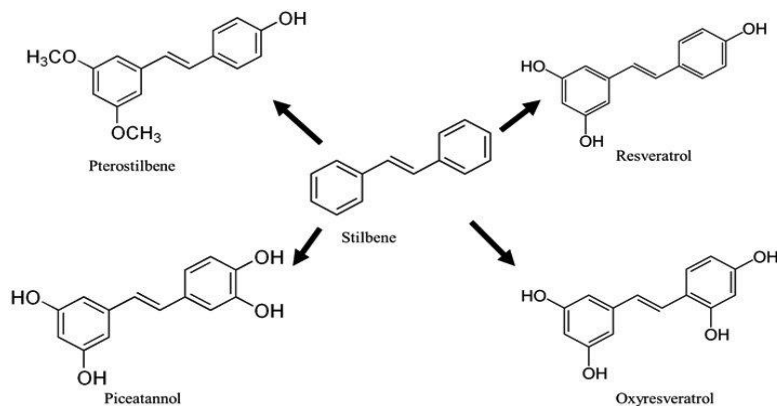
**Καροτενοειδή (Carotenoids):** Επόμενη κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα καροτενοειδή (**Εικόνα 1.5**), εκ των οποίων ορισμένα κατατάσσονται στις φαινολικές ενώσεις. Είναι φυσικές λιποδιαλυτές χρωστικές ουσίες με χαρακτηριστική αντιοξειδωτική δράση. Η βασική τους δομή αποτελείται από ένα σκελετό με 40 άτομα άνθρακα που περιέχει διπλούς δεσμούς. Συντίθενται από φυτά ή μικροοργανισμούς αλλά όχι από ζώα και συνήθως απαντώνται εστεροποιημένα με λιπαρά οξέα, είτε μη εστεροποιημένα. Διαθέτουν ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως είναι η ρύθμιση των παραγόντων ανάπτυξης, η δράση της προβιταμίνης A, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, η κυτταρική διαφοροποίηση και η διατήρηση του κυτταρικού κύκλου. Μειώνουν επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, οφθαλμολογικών και καρδιαγγειακών παθήσεων (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.5:** Χημικές δομές παραδειγμάτων καροτενοειδών (Ellison, 2016).

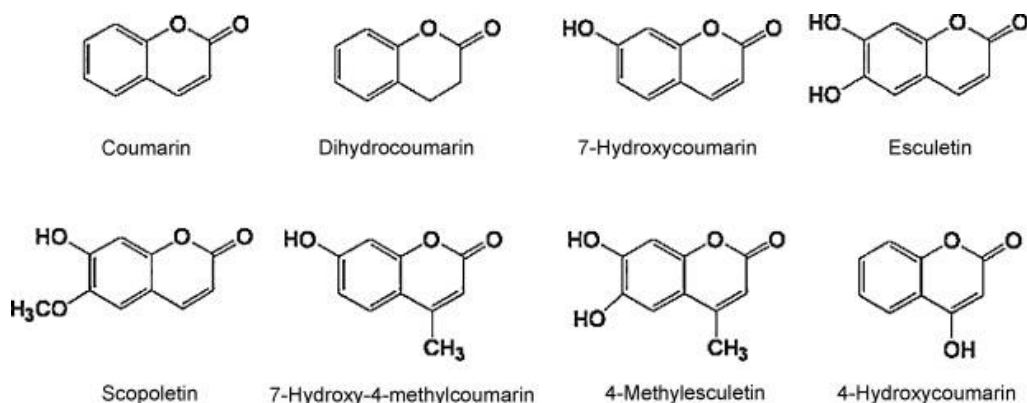
**Στιλβένια (Stilbenes):** Τα στιλβένια (**Εικόνα 1.6**) αποτελούν μικρή ομάδα φαινυλοπροπανοειδών και η βάση της δομής τους είναι το 1,2 διφαινυλοαιθυλένιο. Περιέχουν έναν *cis* ή *trans* διπλό δεσμό, ο οποίος είναι υποκατεστημένος με φαινύλια και στα δύο άτομα άνθρακα του διπλού δεσμού. Τα στιλβένια και

ειδικά η *trans*- ρεσβερατρόλη και ο γλυκοζίτης της επωφελούν την υγεία προσδίδοντας αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές (anticancer) και αντιογκολογικές (antitumor) ιδιότητες (Gulcin, 2020).



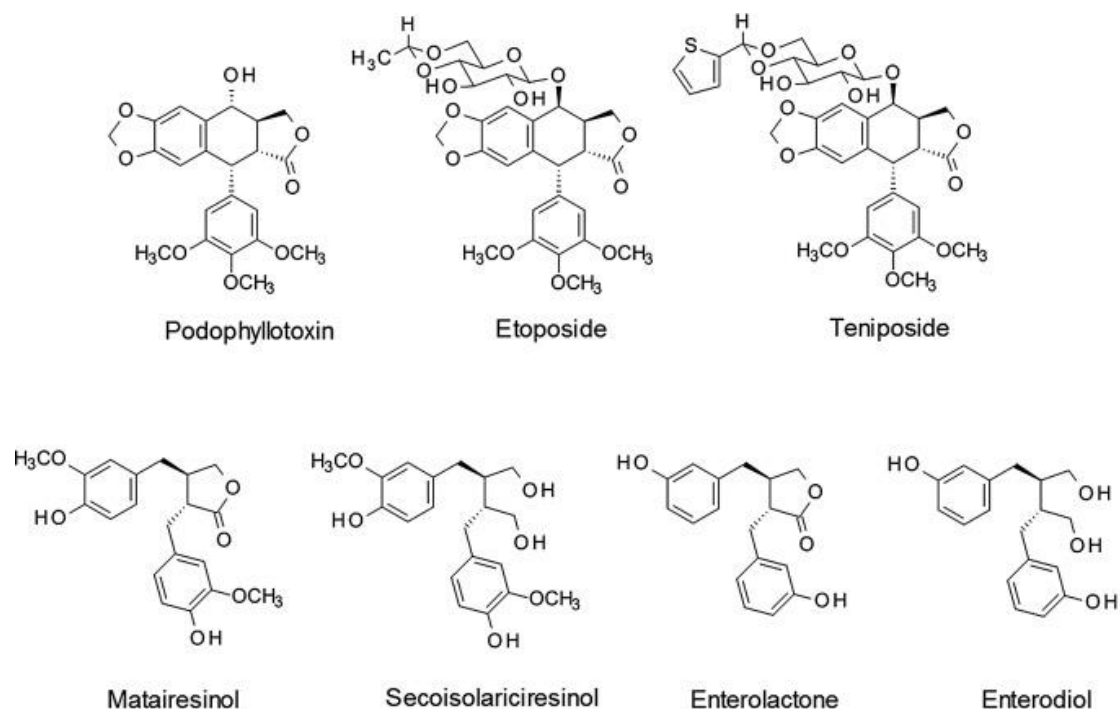
**Εικόνα 1.6:** Δομικός Σκελετός Στυλβενίων και παραδείγματα (Nagaran et al., 2018).

**Κουμαρίνες:** Οι κουμαρίνες (Εικόνα 1.7) απαντώνται φυσικά σε ανώτερα φυτά αλλά και σε μικροοργανισμούς ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Θεωρούνται ως βενζολικά μόρια με δύο γειτονικά άτομα υδρογόνου, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση από μία λακτονοειδή αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα δεύτερο εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο ο οποίος μοιράζεται δύο άνθρακες με το βενζολικό δακτύλιο. Διαθέτουν αντιογκολογικές (antitumor), αντιμικροβιακές (antimicrobiological), αντικαρκινικές (anticancer) και αντιοξειδωτικές (antioxidant) ιδιότητες (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.7:** Δομικός Σκελετός Κουμαρινών και παραδείγματα (Lin et al., 2008).

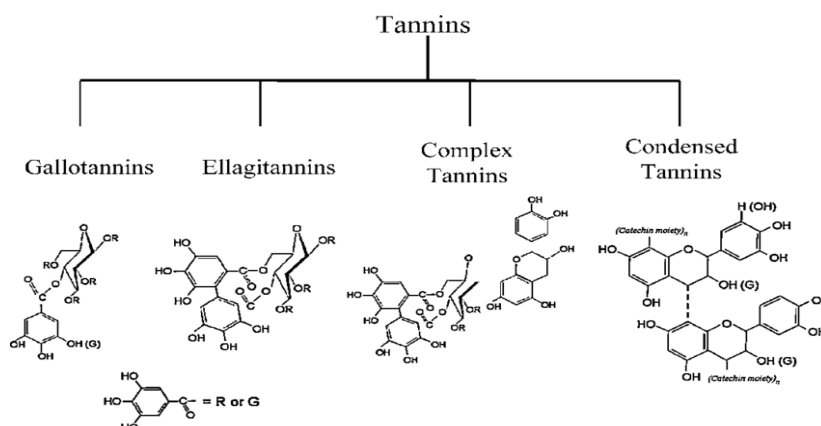
**Λιγνάνες (Lignans):** Αποτελούν μία πολυπληθή ομάδα φυσικώς προκυπτόντων πολυφαινολών που παράγονται από τη βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος (shikimic acid) και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών στα φυτά και στις πηγές τροφίμων. Οι λιγνάνες (**Εικόνα 1.8**) απαντώνται σε περισσότερες από 70 οικογένειες φυτών καθώς επίσης έχουν χαρακτηριστεί σε περισσότερες από 100 νεολιγνάνες και 200 κλασσικές λιγνάνες. Είναι φαινολικές ουσίες παραγόμενες από φαινυλαλανίνη διαμέσου διμερίωσης υποκατεστημένων κινναμικών αλκοολών σε ένα διβένζυλο-βουτανικό σκελετό, διμερίωση η οποία καταλύεται από οξειδατικά ένζυμα. Διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντιαποπτωτικές και αντι-αυτοφαγωτικές ιδιότητες (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.8:** Χημικές δομές παραδειγμάτων Λιγνάνων (Simpson & Amos, 2017).

**Ταννίνες (Tannins):** Οι ταννίνες (**Εικόνα 1.9**) κατηγοριοποιούνται ως συμπυκνωμένες ή υδατοδιαλυτές προανθοκυανιδίνες που εξαρτώνται από τηχημική τους δομή. Ανιχνεύονται σε πληθώρα ειδών φυτών, προσφέροντας προστασία από φυτοφάρμακα και βοηθώντας στην ομαλή ανάπτυξη αυτών. Οι ταννίνες είναι ολιγομερή ή πολυμερή των φλαβονοειδών, κύρια των φλαβάν-3-ολών, ενώ οι υδατοδιαλυτές είναι γλυκοσυλιωμένα γαλλικά οξέα. Το ταννικό οξύ, αποτελεί μια από τις πλέον γνωστές ταννίνες, είναι υδατοδιαλυτό και ανιχνεύεται

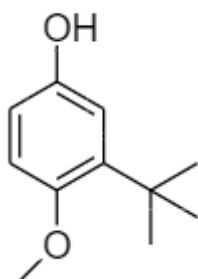
σε πολλά φυτά και φρούτα όπως σε μπανάνες, σταφίδες, σταφύλια, σπανάκι, καφέ, τσάι. Διαθέτει αντικαρκινογόνες και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες (Gulcin, 2020)



**Εικόνα 1.9:** Ταννίνες και κατηγορίες τους (Aguilar et al., 2007).

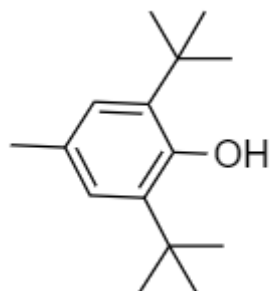
### Συνθετικά Αντιοξειδωτικά

**Βουτυλιωμένη Υδροξυ-Ανισόλη (Butylated Hydroxy- Anisole):** Είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό (**Εικόνα 1.10**), ιδιαίτερα αποτελεσματικό για τον έλεγχο της οξείδωσης των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (short-chain fatty acids). Έχει αναφερθεί ως προοξειδωτικό, αντιοξειδωτικό και αντικαρκινογόνο. Οι αντικαρκινικές της ιδιότητες έχουν ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις που είναι κοντά σε αυτές που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα τρόφιμα (Gulcin, 2020). Η συγκέντρωσή της έχει ανώτατο επιτρεπόμενο όριο που κυμαίνεται σε εύρος από 2 έως 5000 ppm ανάλογα με το τρόφιμο. Σε έρευνα γνωστή και ως Netherlands Cohort Study που πραγματοποιήθηκε στον πληθυσμό, δεν υπήρχε αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου από την λήψη κανονικών επιπέδων του συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού με τους συγγραφείς να αναφέρουν ότι είναι πολύ πιθανό να αναστέλλουν την καρκινογένεση στις καθορισμένες συγκεντρώσεις (Felter et al., 2021).



**Εικόνα 1.10:** Χημική δομή της BHA.

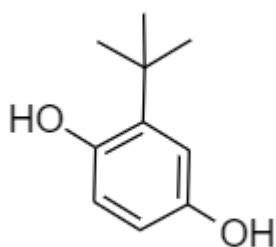
**Βουτυλιωμένο Υδροξυ-Τολουόλιο (Butylated Hydroxy-Toluene) (Εικόνα 1.11):** Ανήκει επίσης στην κατηγορία των συνθετικών αντιοξειδωτικών. Συγκρινόμενο, με τη Βουτυλιωμένη Υδροξυ-Ανισόλη παρουσιάζει μειωμένη αποτελεσματικότητα, λόγω της εμφάνισης δύο *tert*-βουτυλικών ομάδων που του προσδίδουν μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.11:** Χημική δομή της BHT.

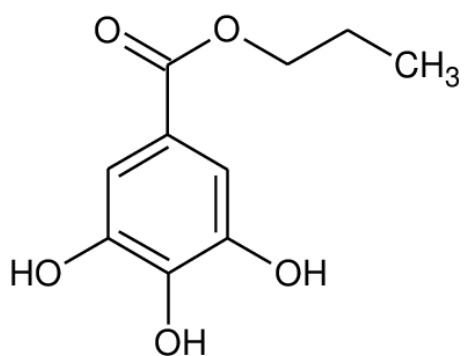
***tert*-Βουτυλο-Υδροξυ-Κινόνη (*tert*-Butylated-Hydro-Quinone) (Εικόνα 1.12):** Αποτελεί ένα αρκετά αποτελεσματικό συντηρητικό για πολλά βρώσιμα ζωικά λιπαρά, ακόρεστα φυτικά λάδια και προϊόντα κρέατος. Συντηρεί και σταθεροποιεί τη φρεσκότητα, τη θρεπτική αξία, το χρώμα και τη γεύση τροφίμων ζωϊκής προέλευσης. Δεν προκαλεί αποχρωματισμό ακόμα και υπό την παρουσία σιδήρου.

Επιπρόσθετα, δεν προκαλεί αλλαγή στη γεύση ή στην οσμή του προϊόντος στο οποίο προστίθεται. Έχει παρατηρηθεί ότι είναι αποτελεσματικότερο αντιοξειδωτικό από τη Βουτυλιωμένη Υδροξυ-Ανισόλη και το Βουτυλιωμένο Υδροξυ-Τολουόλιο και η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στις δύο υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται σε θέση πάρα (*para*) στο μόριο του (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.12:** Χημική δομή της BHQ.

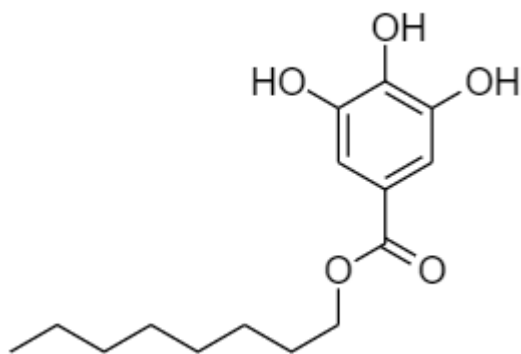
**Πρόπυλο – Γαλλικό οξύ (Propyl - Gallate) (Εικόνα 1.13):** Γενικά αναγνωρίζεται ως ένα ασφαλές αντιοξειδωτικό, το οποίο προστατεύει τα έλαια, τα λιπίδια και τα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρά από το τάγγισμα που είναι αποτέλεσμα σχηματισμού υπεροξειδίων. Χρησιμοποιείται από το 1948 για τη σταθεροποίηση υλικών συσκευασίας τροφίμων, τροφίμων πλούσιων σε λίπη και ως πρόσθετο στα βρώσιμα λιπίδια, στα έλαια, στη μαγιονέζα, στο μαγειρικό λίπος, στα κολλοειδή συστήματα που είναι ευαίσθητα στην πίεση και στα ψημένα προϊόντα. Ωστόσο έχουν πραγματοποιηθεί αναφορές ότι το Πρόπυλο – Γαλλικό οξύ και οι μεταβολίτες του επιφέρουν τοξικότητα στο συκώτι καθώς και προδιάθεση καρκινογένεσης (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.13:** Χημική δομή του PG.

**Όκτυλο – Γαλλικό Οξύ (Octyl- Gallate) (Εικόνα 1.14):** Αποτελεί έναν εστέρα της 1 – οκτανόλης με το γαλλικό οξύ και χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό και

συντηρητικό τροφίμων. Δεν είναι ευρέως διαδεδομένο και δεν χρησιμοποιείται συχνά καθώς υπάρχουν συνθετικά αντιοξειδωτικά με παρόμοιες ιδιότητες (Gulcin, 2020).



**Εικόνα 1.14:** Χημική δομή του OG.



Παρόλο που τα συνθετικά αντιοξειδωτικά κατέχουν ιδιαίτερους ρόλους ως συντηρητικά και αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα, έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να σχηματίζουν μοριακά σύμπλοκα με δομές νουκλεϊκών οξέων προκαλώντας βλάβες στη δομή της διπλής έλικας του DNA. Για παράδειγμα, η Βουτυλιωμένη Υδροξυ – Ανισόλη και το Βουτυλιωμένο Υδροξυ-Τολουόλιο έχουν απαγορευθεί από νομοθετικούς κανόνες λόγω τοξικότητας και καρκινογένεσης (Gulcin, 2020).

Οι κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και παραδείγματα αυτών αναπαρίστανται στον **Πίνακα 1.1**.

**Πίνακας 1.1:** Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και παραδείγματα

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ
Φαινολικά οξέα	Παράγωγα Υδροξυ-κινναμικών οξέων	Καφεϊκό οξύ Σιναπικό οξύ Φερουλικό οξύ Ροσμαρινικό οξύ Χλωρογενικό οξύ Καφεοϋλοκινικό οξύ ο-κουμαρικό οξύ π-κουμαρικό οξύ
	Παράγωγα Υδροξυ-βενζοϊκών οξέων	Γαλλικό οξύ π-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ 3,4-Διϋδροξυ-βενζοϊκό οξύ Βανιλλικό οξύ Πρωτοκατεχικό οξύ Βερατρικό οξύ
Φλαβονοειδή	Φλαβονόλες	Δατισεΐνη Κερκεΐνη Μυρισεΐνη Καεμπερόλη
	Φλαβονονόλες	Ταξιφοΐνη
	Φλαβόνες	Απιγενΐνη Χρυσΐνη Λουτεοΐνη
	Φλαβανόλες	Τανΐνες
	Φλαβανόνες	Εσπερεΐνη Ναρινγενΐνη
	Ανθοκυανιδΐνες	Πελαργονιδΐνη Κυανιδΐνη Πεονιδΐνη Πετουνιδΐνη Μαλβιδΐνη

	Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη Γενιστίνη Βιοχανίνη Α Φορμονονετίνη
Καροτενοειδή	-	β-Κρυπτοξανθίνη Λουτεΐνη Ζεαξανθίνη Ασταξανθίνη
Στιλβένια	-	<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη <i>trans</i> - Πτεροστιλβένιο Αστρινγίνη Ραποντίνη

**Συνέχεια Πίνακα 1.1**

Κουμαρίνες	-	Σκοπαρόνη Φραξετίνη Δαφνετίνη Ουμπελιφερόνη Εσκουλετίνη Σκοπλετίνη
Λιγνάνια	-	Πινορεσινόλη Λαρισιρεσινόλη Σησαμίνη Σησαμόλη Σησαμινόλη
Συνθετικές	-	Βουτυλιωμένη Υδροξυ- ανισόλη Βουτυλιωμένο Υδροξυ- τολουόλιο tert-Βούτυλο-Υδροξυ- κινόνη Πρόπυλο - Γαλλικό οξύ Όκτυλο - Γαλλικό οξύ

### 1.3. Χρήσεις φαινολικών ενώσεων στη βιομηχανία

#### 1.3.1. Χρήσεις στη βιομηχανία τροφίμων

Αρκετές φαινολικές ενώσεις αποτελούν αποτελεσματικό αντιμικροβιακό παράγοντα. Μέχρι σήμερα, οι μηχανισμοί των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο η επικρατέστερη υπόθεση είναι ότι αποσταθεροποιούν τη μικροβιακή κυτταρική επιφάνεια και τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των μικροβίων. Το γεγονός αυτό δύναται να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμες βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά και στα ενδοκυτταρικά

οργανίδια και σε αναστολή ενδοκυτταρικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, οι υδρόφοβες φαινολικές ενώσεις δεσμεύονται από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας τη δομική διαταραχή της και την απώλεια της ακεραιότητάς της. Επιπρόσθετα, ο φαινολικός δακτύλιος, εξαιτίας της υδροξυλικής ομάδας και των απαραίτητων διπλών δεσμών, διαθέτει την ικανότητα να δρα ως διαμεμβρανικός μεταφορέας κατιόντων, προκαλώντας μαζική εισροή κατιόντων υδρογόνου ( $H^+$ ), εκροή κατιόντων καλίου ( $K^+$ ) και καταστολή της σύνθεσης ATP (Kalogianni et al., 2020).

Η καταστροφή των ενδοκυτταρικών μεμβρανών απελευθερώνει ρίζες που προκαλούν βλάβες στο DNA και λιπιδική οξειδωση. Ως προσαρμοστική απάντηση, τα μικρόβια κατευθύνουν την έκφραση των γονιδίων για την αύξηση αντιοξειδωτικών και επιδιορθωτικών ενζύμων, μειώνοντας παράλληλα τον αερόβιο μεταβολισμό. Καταστολή του αερόβιου μεταβολισμού απαγορεύει τη μικροβιακή κινητικότητα που είναι αναγκαία για επιβίωση (Kalogianni et al., 2020).

Αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί *in vitro* έχουν αναδείξει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυσικών φαινολικών ενώσεων έναντι τροφιμογενών παθογόνων. Ανεξάρτητα από τη χημική τους δομή, οι φαινολικές ενώσεις δρουν αποτελεσματικά έναντι *Gram*-θετικών βακτηρίων και λιγότερο έναντι *Gram*-αρνητικών βακτηρίων που βρίσκονται στα τρόφιμα. Τα *Gram*-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στη μικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων, εξαιτίας της υδρόφιλης εξωτερικής μεμβράνης τους, η οποία αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες, εμποδίζοντας την είσοδο λιπόφιλων φαινολικών ενώσεων (Kalogianni et al., 2020).

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί *in situ* για την επιβεβαίωση της μικροβιακής δράσης των φαινολικών ενώσεων σε προϊόντα που έχουν ως βάση το κρέας. Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονταν με τη μορφή αιθέριων ελαίων και φυτικών εκχυλισμάτων και η αποτελεσματικότητά τους σε ευρύ φάσμα παθογόνων εκτιμήθηκε υπό ποικίλους συνδυασμούς ενώσεων, συγκεντρώσεων και ειδών κρέατος. Πρόσθετα που περιέχουν φαινολικές ενώσεις μπορούν να ενσωματωθούν απ'ευθείας σε προϊόντα με βάση το κρέας ή σε βιο-βασισμένα λειτουργικά υλικά συσκευασίας. Μυρωδικά και μπαχαρικά ή εκχυλισμένα έλαια αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα αλλά η σωστή εφαρμογή εξαρτάται από τις

φαινολικές ενώσεις των εκχυλισμένων ελαίων και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Εκτός από τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που διαθέτουν, οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν και ως ενισχυτικά γεύσεων στα κρεατοσκευάσματα (Kalogianni et al., 2020).

Επίσης, φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Αποτρέπουν την αλυσίδα οξειδωτικών αντιδράσεων δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας το οξυγόνο, χηλιώνοντας μεταλλικά ιόντα, απαλείφοντας υδροϋπεροξειδία και απορροφώντας υπεριώδη ακτινοβολία.

Η αντιοξειδωτική τους δράση είναι αποτελεσματική και οφείλεται στην ικανότητά τους να απενεργοποιούν και να σταθεροποιούν ελεύθερες ρίζες και να τις ενσωματώνουν στο βενζολικό δακτύλιο που διαθέτουν. Ωστόσο, οι συνθετικές φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων επί δεκαετίες ενοχοποιούνται για καρκινογένεση και τοξικότητα, με αποτέλεσμα η χρήση των φυσικών φαινολικών ουσιών να αποτελεί επιτακτική ανάγκη καθώς επιφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στην υγεία του ανθρώπου προστατεύοντάς τον από χρόνιες ασθένειες που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες (Kalogianni et al., 2020).

Η ενεργή συσκευασία τροφίμων (active food packaging), στην οποία χρησιμοποιούνται βιο-βασιζόμενα υλικά τα οποία διαθέτουν ενσωματωμένες φαινολικές ενώσεις, αποτελεί μια αναδυόμενη τεχνολογία στη βιομηχανία των τροφίμων. Το υλικό συσκευασίας σε αυτές τις περιπτώσεις προστατεύει το κρέας από οξείδωση και αλλοιώσεις (Kalogianni et al., 2020).

Σήμερα, η ενεργή συσκευασία (Active food packaging) περιλαμβάνει εφαρμογές που βασίζονται σε συσκευασίες οι οποίες σταδιακά απελευθερώνουν φαινολικές ενώσεις, προστατευτικά επικαλύματα με ενσωματωμένες φαινολικές ενώσεις και άμεση επαφή με το προϊόν, βρώσιμα λεπτά στρώματα πολυαιθυλενίου επικαλυμμένα με αιθέρια έλαια. Κατά την κατασκευή των ενεργών συσκευασιών, πραγματοποιείται νάνο-ενθυλάκωση των φαινολικών ενώσεων για να προστατευτεί η μοριακή δομή τους καθώς και η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Εφαρμογές νάνο-ενθυλακώσεων στα τρόφιμα περιλαμβάνουν 1) βιοπολυμερή και 2) με βάση τα λιπίδια α) νάνο-σωματίδια και κυκλοδεξτρίνες, β) νάνο-γαλακτώματα και γ) νάνο-ξήρανση με ψεκασμό. Αυτές οι εφαρμογές εξασφαλίζουν τη μεταφορά των φαινολικών ενώσεων, προστατεύοντας αυτές από ευμετάβλητες συνθήκες που επικρατούν στο τρόφιμο, όπως το pH και η θερμοκρασία. Συμπληρωματικά, βελτιώνουν τη διαλυτότητα και μετριάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης δυσάρεστων γεύσεων (Kalogianni et al., 2020).

Παραδείγματα φυσικών φαινολικών ενώσεων με χρήσιμες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων αποτελούν τα φαινολικά οξέα με έναν αρωματικό δακτύλιο, όπως τα Υδροξυ-βενζοϊκά (γαλλικό, βανιλικό, συριγγικό) αλλά και τα Υδροξυ-κινναμικά (*p*-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό), φλαβονοειδή, κινόνες, ταννίνες, κουμαρίνες, λιγνάνες και στιλβένια (Kalogianni et al., 2020).

Τα αιθέρια έλαια που προστίθενται στα τρόφιμα αποτελούνται από συνδυασμό φαινολικών ενώσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα αιθέρια έλαια προερχόμενα από ρίγανη (καρβακρόλη, θυμόλη), γαρύφαλο (ευγενόλη), κόλιανδρο (λιναλόλη), δεντρολίβανο (καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ) και δυόσμο (μενθόλη) (Kalogianni et al., 2020).

### 1.3.2 Χρήσεις στη βιομηχανία καλλυντικών

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οι πλέον μελετημένες φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιγηραντική δράση και διεισδύουν στο δέρμα (Soto et al., 2015).

Σήμερα, επικρατεί μία παγκόσμια τάση για την ανάπτυξη αντιηλιακών με αποτελεσματική προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία καθώς η εμφάνιση καρκίνου του δέρματος παρουσιάζει αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Ενώσεις που παραλαμβάνονται με φυσικό τρόπο, όπως οι φαινολικές ενώσεις έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον καθώς παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και περαιτέρω προστασία από τις επιβλαβείς συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η χρήση φυσικών ενώσεων σε συνδυασμό με συνθετικές ενώσεις αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική (Soto et al., 2015).

Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή χρησιμοποιούνται για την αποτελεσματική προστασία, καθώς μειώνουν το οξειδωτικό στρες, τις φλεγμονές και την ανοσοκαταστολή και χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά για τη φροντίδα του δέρματος μετά από έκθεση στον ήλιο. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στη συστηματική και τοπική εφαρμογή πολυφαινολών για προστασία του δέρματος από τον ήλιο. Τα σταφύλια και τα παράγωγα προϊόντα και υποπροϊόντα τους, αποτελούν χαρακτηριστικές φυσικές πηγές φαινολικών ενώσεων με φωτοπροστατευτικές ιδιότητες (Soto et al., 2015).

Αντιγηραντικά προϊόντα τα οποία παρασκευάζονται με φυσικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν αποτελεσματική προστασία από ρυτίδες και βλάβες οι οποίες προκύπτουν από έκθεση στον ήλιο (Soto et al., 2015).

Οι φυσικές πολυφαινόλες διαθέτουν την ικανότητα να δεσμεύουν ενεργές ομάδες οξυγόνου, γεγονός που τους προσδίδει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αντιγηραντικών προϊόντων σε καλλυντικά. Έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν την προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία και την επιδερμική αντιοξειδωτική δράση, αντιμετωπίζοντας συμπτώματα επιδερμικής γήρανσης. Μερικά εμπορικά προϊόντα που περιέχουν φαινολικές ενώσεις από σταφύλι, όπως προανθοκυανιδίνες, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη ή και μελατονίνη είναι αποτελεσματικά στην καθυστέρηση της εμφάνισης ποικίλων δερματικών ασθενειών που συνδέονται με την ηλικία (Soto et al., 2015).

Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων με την αντίστοιχη βιολογική τους δράση καθώς και τη χρήση τους στην βιομηχανία των καλλυντικών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.2**.

**Πίνακας 1.2:** Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων με τις αντίστοιχες βιολογικές δράσεις και χρήσεις τους στη βιομηχανία καλλυντικών

Φαινολικές ενώσεις	Βιολογικές Δράσεις	Χρήσεις στα καλλυντικά
Ανθοκυανίνες Γαλλικό οξύ Κατεχίνη Επικατεχίνη Φλαβονοειδή	Αντιοξειδωτικές και περισυλλογή ριζών  Έλεγχος κυτταρικής	Αντιγήρανση  Επαναδόμηση

Προανθοκυανιδίνες Ρεσβερατρόλη Μελατονίνη	ανάπτυξης	Συντηρητικά
Φερουλικό οξύ Καφεϊκό οξύ Γαλλικό οξύ Προανθοκυανιδίνες Ρεσβερατρόλη	Φωτοπροστατευτικές	Προστασία έναντι στον ήλιο  Μετά την αλληλεπίδραση με τον ήλιο (After-sun)  Προστασία λιποζάν

#### 1.4 Πηγές φαινολικών ενώσεων

Η φύση αποτελεί σημαντική και πλούσια πηγή αμέτρητων συστατικών τα οποία συνεισφέρουν ως παράγοντες βελτίωσης της υγείας. Οι περισσότερες από αυτές τις φυσικές πηγές περιλαμβάνουν φρούτα, λαχανικά, βότανα, μπαχαρικά και βρώσιμα μανιτάρια και αποτελούν σημαντικό μέρος της καθημερινής διατροφής. Μία από τις πιο ωφέλιμες επιδράσεις των φυσικών αυτών πηγών οφείλεται στις πιθανές αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Σχετικά με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, οι ερευνητές πραγματοποιούν έρευνες για την ανίχνευση των πιθανότερων πηγών παράλληλα με τα ενεργά συστατικά τους. (Anwar et al., 2018).

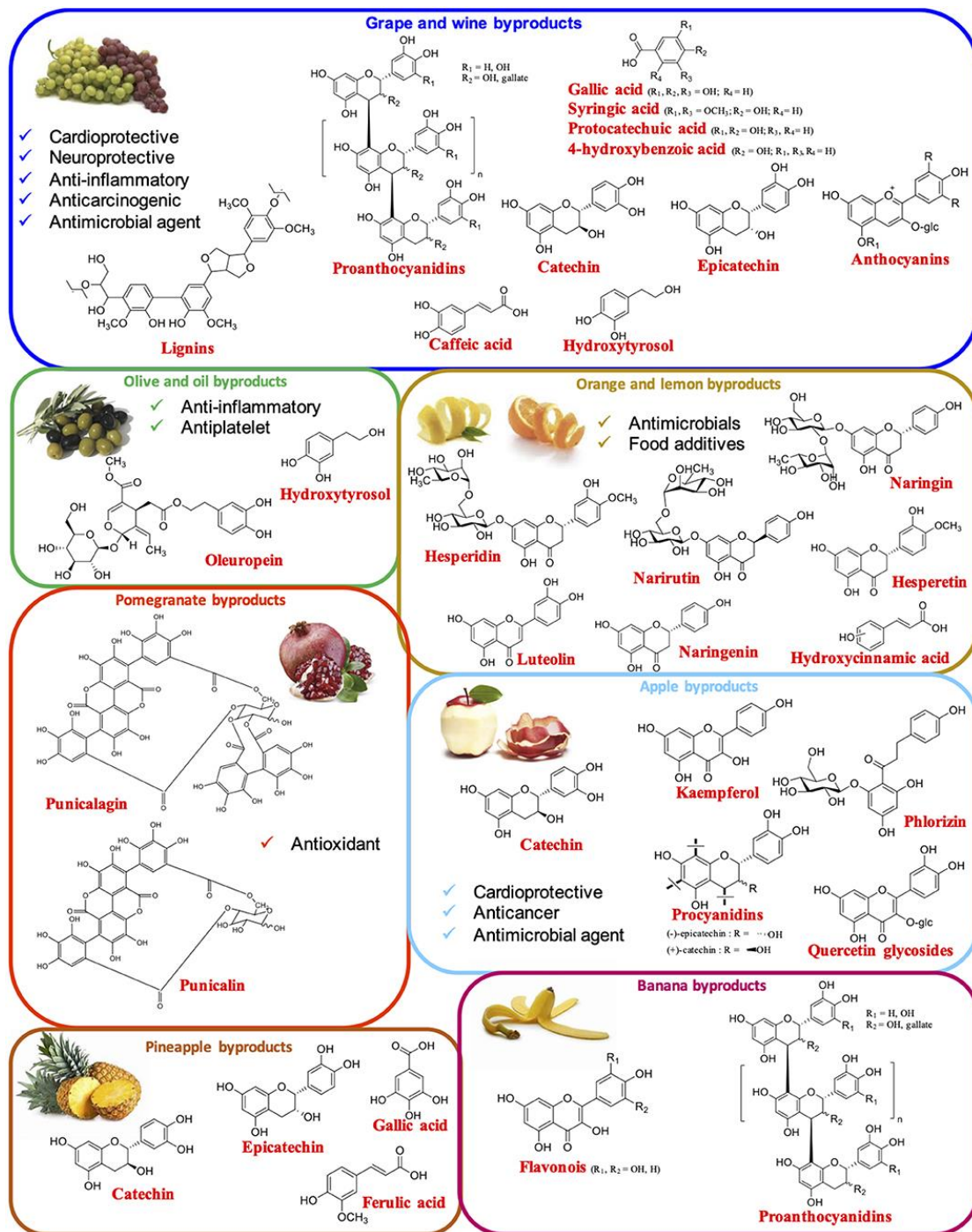
Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι ευρέως συνιστώμενα διατροφικά συστατικά, τα οποία είναι γνωστό ότι βελτιώνουν την υγεία καθώς επίσης ότι παρέχουν ιδιαίτερη διατροφική αξία. Επιπλέον, έχουν ουσιώδη σημασία ως συμβατικά συστατικά, διότι αποτελούν πλούσια πηγή ιχνοστοιχείων (με κυριότερους τους ηλεκτρολύτες), βιταμινών (με κυριότερες τις βιταμίνες C και E), ενώ ορισμένες πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τα φυτοχημικά συστατικά τους που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι αντιοξειδωτικές αυτές ουσίες δεσμεύουν τα οξειδωτικά ή τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξειδωτικό στρες και τις εκφυλιστικές διεργασίες, όπως είναι ο διαβήτης, οι διάφοροι τύποι καρκίνου και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη διαδικασία, η συστηματική κατανάλωση φρούτων και λαχανικών δύναται να μειώσει τον κίνδυνο θνησιμότητας από τέτοιου είδους παθήσεις. Τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τα λαχανικά και τα φρούτα

διαθέτουν στην πλειονότητά τους φαινολικό δομικό σκελετό, όπως είναι βιταμίνες και πολυφαινόλες (Anwar et al.,2018).

Τα φλαβονοειδή, μία σημαντική ομάδα αντιοξειδωτικών πολυφαινολών, παρουσιάζονται σε πολλά τρόφιμα όπως πατάτες, σιτάρι, τομάτες, κόκκινα μούρα, ροδάκινα και αμύγδαλα. Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν μία υποκατηγορία φλαβονοειδών που υπάρχουν σε κόκκινα μούρα και το κόκκινο κρασί (Anwar et al., 2018).

Απόβλητα φρούτων και λαχανικών παράγονται κατά την καλλιέργεια, βιομηχανική αξιοποίηση, επεξεργασία, συντήρηση και διανομή τους. Τα απόβλητα συμπεριλαμβάνουν φλούδες, υπολείμματα, κελύφη, σπόρους, βλαστούς και υπολλείματα πολτών και αποτελούντο 25-30 % . Σύμφωνα με έρευνες, μεγαλύτερες ποσότητες φαινολών και ασκορβικών οξέων έχουν αναφερθεί σε απόβλητα φρούτων από ότι σε πολτούς και στην άγουρη μορφή από ότι στην ώριμη. Οι περισσότερες φλούδες φρούτων περιέχουν 2 έως 27 φορές περισσότερα αντιοξειδωτικά από ότι ο πολτός τους. Σημαντικές ποσότητες βιοενεργών φυτοχημικών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες απομονώνονται από απόβλητα τομάτας, όπως είναι τα καροτένια, οι τοκοφερόλες, τα τερπένια, οι στερόλες και οι πολυφαινόλες (Anwar et al., 2018) **(Εικόνα 1.15)**.





**Εικόνα 1.15:** Φρούτα, λαχανικά και παραπροϊόντα τους και οι φαινολικές ενώσεις που περιέχουν (Panzella et al., 2020).

Παραδείγματα φρούτων και λαχανικών, υπολειμμάτων και αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.3** (Anwar et al., 2018).

**Πίνακας 1.3:** Παραδείγματα φρούτων και λαχανικών, υπολειμμάτων και αντιοξειδωτικών πολυφαινολών

<b>Φρούτα</b>	<b>Υπολείμματα</b>	<b>Αντιοξειδωτικά</b>
Μπανάνα	Άγουρο (πράσινο) φρούτο και φλούδα	Φαινόλες και φλαβονοειδή
Μάνγκο	Φλούδα και πυρήνας	Γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ, γαλλοταννίνε , συμπυκνωμένες ταννίνες
Καρπούζι	Φλούδα και φλοιός	Λυκοπένιο, φαινόλε , φλαβονοειδή
Καφές	Υπολείμματα καφέ	Πολυφαινόλες, ταννίνες, γαλλικό οξύ
Μήλο	Φλούδα	Επικατεχίνη, κατεχίνες, ανθοκυανίνες, γλυκοζίτες κερκετίνης, χλωρογενικό οξύ, υδροξυκιναμικά, προκυανιδίνες
Σταφύλι	Φλούδα και Σπόροι	Κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κινναμικό οξ , π-Υδροξυ-Βενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, γαλλικό οξύ, προανθοκυανδίνες, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη
Γκουάβα	Φλούδα και Σπόροι	Κατεχίνη γαλανίνη, γαλλικό οξύ, καεμφερόλη
Ρόδι	Φλούδα και περικάρπιο	Γαλλικό οξύ, 3,5 Κυανιδίνο-διγλυκοζίτης
<b>Λαχανικά</b>	-	-
Καρότο	Φλούδα	Φαινόλες και β- καροτένιο
Αγγούρι	Φλούδα	Φλαβονοειδή και φαινόλες
Πατάτα	Φλούδα	Χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, φαινόλες
Τομάτα	Φλούδα	Φαινόλες και καροτενοειδή

Πηγές φαινολικών ενώσεων αποτελούν επίσης και τα δημητριακά με κυρίαρχες να είναι τα φαινολικά οξέα. Το φερουλικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο σιτάρι, με το βανιλλικό, π-κουμαρικό, σιναπικό και καφεϊκό οξύ να βρίσκονται σε σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά. Η ποσότητα των φλαβονοειδών στο μωβ, κίτρινο και κόκκινο σιτάρι είναι υψηλότερη από ότι στο λευκό σιτάρι. Παρόμοιες φαινολικές ενώσεις περιέχονται στο ρύζι και στην κινόα (Amarowicz & Pegg, 2019).

## Κεφάλαιο 2 : Αντιοξειδωτική δράση

### 2.1: Αντιοξειδωτική δράση: Τι είναι και πού οφείλεται;

Πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν ποικίλους όρους για να περιγράψουν την αντιοξειδωτική δράση συμπεριλαμβάνοντας τη συνολική αντιοξειδωτική απόδοση, την αποτελεσματικότητα, τη δράση και την ισχύ. Η αντιοξειδωτική δράση και η αντιοξειδωτική ισχύς αποτελούν όρους που χρησιμοποιούνται συχνά ως ισοδύναμοι, όμως ερμηνεύονται διαφορετικά. Η «δράση» ενός χημικού μορίου θα ήταν ανούσια χωρίς συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης όπως είναι η πίεση και η θερμοκρασία. Η αντιοξειδωτική ισχύς προσφέρει πληροφορίες για τη διάρκεια ενώ η δράση περιγράφει τη δυναμική εκκίνησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Η αντιοξειδωτική ισχύς σε πολύπλοκα ετερογενή τρόφιμα και βιολογικά συστήματα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τον διαχωρισμό των αντιοξειδωτικών σε λιπαρές και υδατίνες φάσεις, τις συνθήκες οξείδωσης και τη φυσική κατάσταση του οξειδώσιμου υποστρώματος. Για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική προστασία διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (Karadag et al., 2009).

Στην επιστήμη των τροφίμων, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται η ουσία η οποία, όταν περιέχεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με αυτές ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, μειώνει σημαντικά ή αποτρέπει τις αρνητικές επιδράσεις από ενεργές ομάδες, όπως ενεργές ομάδες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) ή ενεργές ομάδες αζώτου (Reactive Nitrogen Species), σε έναν λειτουργικά φυσιολογικό ανθρώπινο οργανισμό. Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, δεν θεωρούνται όλα τα αναγωγικά συστατικά που εμπλέκονται σε χημικές αντιδράσεις ως αντιοξειδωτικά. Μόνο οι ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να προστατεύσουν το βιολογικό οργανισμό-στόχο από οξείδωση συναντούν αυτό το κριτήριο (αντιοξειδωτικά) (Karadag et al., 2009).

Ο όρος «αντιοξειδωτικό» καθίσταται σημαντικότερος καθημερινά στη σημερινή κοινωνία από τη στιγμή που συνδέεται με μια σειρά προνομίων για την ανθρώπινη υγεία. Εκτός από εφαρμογές που σχετίζονται με τη βελτίωση της ανθρώπινης

υγείας, τα αντιοξειδωτικά εφαρμόζονται σε πεδία όπως η βιομηχανία χημικών, όπου χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε ελαστικά και πλαστικά για την καθυστέρηση της φθοράς από την δράση του οξυγόνου. Επίσης στη βιομηχανία τροφίμων, η χρήση των αντιοξειδωτικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής, ιδίως των λιπαρών, τα οποία ταγγίζουν σε αντιδράσεις με ενεργές ομάδες οξυγόνου/αζώτου (San Miguel-Chávez, 2017).

Ένα διατροφικό αντιοξειδωτικό μπορεί να καταστραφεί για να δεσμεύσει ενεργές ομάδες οξυγόνου/αζώτου ώστε να αποτρέψει τις ριζικές αλυσιδωτές αντιδράσεις και θεωρείται ως πρωταρχικό αντιοξειδωτικό που σπάζει αλυσίδες ή συλλέκτες ελεύθερων ριζών. Επίσης, μπορούν να αποτελέσουν αναστολές στο σχηματισμό δραστικών οξειδωτικών, τα οποία θεωρούνται δευτερεύοντα ή προληπτικά αντιοξειδωτικά. Τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά όταν παρίστανται σε ανιχνεύσιμες ποσότητες, είτε καθυστερούν είτε αναστέλλουν το πρώτο βήμα της αντίδρασης απενεργοποιώντας ή δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες. Συνεπώς λαμβάνει χώρα αναστολή της εκκίνησης και της αναπαραγωγής των αντιδράσεων μέσω αντίδρασης με τις υπεροξειδικές ή αλκοξειδικές ρίζες (Karadag et al., 2009).

Η αντιοξειδωτική απόδοση εξαρτάται από την ικανότητα των συλλεκτών ελεύθερων ριζών (Free Radical Scavengers – FRS) να προσφέρουν ένα πρωτόνιο ( $H^+$ ) στις ελεύθερες ρίζες. Καθώς μειώνεται η ενέργεια του δεσμού υδρογόνου του συλλέκτη (FRS), η μεταφορά του πρωτονίου στην ελεύθερη ρίζα είναι ενεργειακά πιο εφικτή και ταχεία. Η ικανότητα μεταφοράς ενός πρωτονίου μπορεί να προβλεφθεί από θεμελιώδη μοντέλα αναγωγής ενός ηλεκτρονίου. Οι αποδοτικοί συλλέκτες (FRS) παράγουν ρίζες (FRS·) οι οποίες δεν αντιδρούν ταχέως με το οξυγόνο για να δημιουργηθούν υπεροξείδια. Στα τρόφιμα, η αποδοτικότητα των φαινολικών συλλεκτών των ριζών εξαρτάται από την πτητικότητα, το pH, την ευαισθησία και την πολικότητα (Karadag et al., 2009).

Υπάρχουν ποικίλες προληπτικές αντιοξειδωτικές οδοί διότι υπάρχει μεγάλο εύρος διαθέσιμων οξειδωτικών εκκινήτων στις αντιδράσεις οξείδωσης. Οι οδοί αυτές συμπεριλαμβάνουν την χηλίωση μετάλλων, την απενεργοποίηση μονήρους οξυγόνου, την αποτοξίνωση ενζυματικών ενεργών ομάδων οξυγόνου, το φιλτράρισμα υπεριώδους ακτινοβολίας, την αναστολή προοξειδωτικών ενζύμων

καθώς και αντιοξειδωτικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες. Οι μεταλλικοί χηλικοποιητές είναι αντιοξειδωτικά που δρουν προληπτικά σχηματίζοντας σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, εμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τις μέταλλο-καταλυόμενες αντιδράσεις. Στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστίθενται και η απενεργοποίηση μονήρους οξυγόνου και η δέσμευση οξυγόνου. Τα διατροφικά αντιοξειδωτικά συνήθως λειτουργούν ως αναστολείς ριζικών αλυσιδωτών αντιδράσεων, μεταλλικοί χηλικοποιητές αναστολείς οξειδωτικών ενζύμων αλλά και ως συμπαράγοντες ενζύμων (Karadag et al., 2009).

## 2.2 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης

### 2.2.1 Γενικοί μηχανισμοί

Δεδομένου ότι επικρατεί σύγχυση στη βιβλιογραφία σχετικά με τους μηχανισμούς αντίδρασης, η πρόβλεψη ενός πρωτοκόλλου το οποίο συμπεριλαμβάνει μετρήσεις για περισσότερες από μία ιδιότητες εξαιτίας των πολλαπλών δραστηριοτήτων των πολυφαινολών και της επικρατούσας δραστηριότητας που εξαρτάται από το μέσο και τον τύπο του αντιοξειδωτικού αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Η απόκριση του αντιοξειδωτικού στις διάφορες ριζικές ή οξειδωτικές πηγές μπορεί να διαφέρει. Για παράδειγμα, τα καροτενοειδή δεν παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα στην αναστολή υπεροξειδικών ριζών αλλά είναι εξαιρετικά στη δέσμευση μονήρους οξυγόνου. Ωστόσο, καμία μέθοδος από μόνη της δεν επαρκεί για να αντικατοπτρίσει με ακρίβεια το μηχανισμό δράσης όλων των ριζών ή όλων των αντιοξειδωτικών σε ένα πολύπλοκο σύστημα (Karadag et al., 2009).

Σε γενικά πλαίσια, ποικίλες *in vitro* αντιοξειδωτικές διεργασίες πρέπει να πραγματοποιούνται για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των δειγμάτων της έρευνας. Βέβαια, είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί σύγκριση μίας μεθόδου με άλλη αντίστοιχη. Για το σκοπό αυτό, οι ερευνητές πρέπει να επικυρώνουν και να επαναπραγματοποιούν τις μεθόδους ανάλυσης πριν ληφθεί απόφαση για την καταλληλότητα της κάθε μεθόδου. Ωστόσο, η ιδανική μέθοδος για την αποτίμηση και τον υπολογισμό των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων, πρέπει να αντικατοπτρίζει την επίδραση μίας ένωσης που υπάρχει στα τρόφιμα σε συνθήκες

αντίδρασης που ομοιάζουν με εκείνες που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες *in vivo* από τις αντίστοιχες ενεργές ομάδες οξυγόνου / αζώτου.

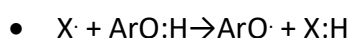
Οι μέθοδοι διαχωρίζονται σύμφωνα με τους μηχανισμούς αντίδρασης σε μέθοδο Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer – HAT) και σε μέθοδο Μεταφοράς Μονήρους Ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer – SET) (Gulcin, 2020).

Το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο, ανεξαρτήτως του μηχανισμού, αλλά η κινητική και η πιθανότητα παράπλευρων αντιδράσεων διαφέρει ανάμεσα στις μεθόδους. Οι μέθοδοι βασιζόμενες σε SET μηχανισμό ανιχνεύουν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για να ανάγει ενώσεις, όπως είναι μέταλλα, καρβονύλια και ρίζες. Επίσης, στη συγκεκριμένη μέθοδο παρουσιάζεται μεταβολή του χρώματος καθώς το οξειδωτικό ανάγεται. Οι μέθοδοι βασιζόμενες σε HAT μηχανισμό μετρούν την κλασσική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να αναστέλλει μία ελεύθερη ρίζα μέσω μεταφοράς υδρογόνου. Οι HAT αντιδράσεις είναι ανεξάρτητες από το pH και το διαλύτη και είναι συνήθως ιδιαίτερα ταχείες, φέροντας αποτελέσματα σε δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά (Gulcin, 2020).

#### ➤ **Μηχανισμός Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου ή Hydrogen Atom Transfer (HAT)**

Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό το φαινολικό αντιοξειδωτικό αντιδρά κατευθείαν με την ελεύθερη ρίζα η οποία εξουδετερώνεται και μία ριζική μορφή του αντιοξειδωτικού δημιουργείται. Αξιοσημείωτη παράμετρος που σχετίζεται με αυτόν τον μηχανισμό είναι η Ενθαλπία Απόσπασης Δεσμού (Bond Dissociation Enthalpy – BDE). Όσο χαμηλότερη είναι η παράμετρος BDE τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Alicja Urbaniak et al., 2012).

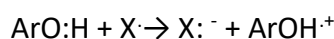
Συντονισμένη κίνηση ενός πρωτονίου και ενός ηλεκτρονίου σε ένα βήμα κινητικής (single step kinetics): X· : Ελεύθερη ρίζα , ArOH: Αντιοξειδωτικό



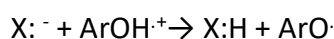
➤ **Μηχανισμός Μεταφοράς Μονήρους Ηλεκτρονίου - Μεταφορά Πρωτονίου  
ή Single Electron Transfer- Proton Transfer (SET-PT)**

Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει αντίδραση δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα ένα φαινολικό αντιοξειδωτικό αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα και δημιουργείται μία μορφή κατιονικής ρίζας του αντιοξειδωτικού και μία ανιονική μορφή της ρίζας. Αυτό το βήμα είναι θερμοδυναμικά σημαντικό σε αυτό το μηχανισμό δύο βημάτων. Στο δεύτερο βήμα, η κατιονική ρίζα του αντιοξειδωτικού αποσυντίθεται σε φαινολική ρίζα και πρωτόνιο. Μία αξιοσημείωτη παράμετρος για το πρώτο βήμα του μηχανισμού SET- PT είναι η Αδιαβατική Ικανότητα Ιοντισμού (Adiabatic Ionization Potential – AIP) και για το δεύτερο βήμα είναι η Ενθαλπία Απόσπασης Πρωτονίου (Proton Dissociation Enthalpy – PDE) (Alicja Urbaniak et al., 2012).

- Βήμα 1: Μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου και παραγωγή κατιονικής ρίζας



- Βήμα 2: Μεταφορά πρωτονίου και μετατροπή της κατιονικής ρίζας σε φαινοξειδική ρίζα



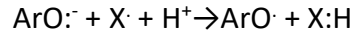
➤ **Μηχανισμός Διαδοχικής Απώλειας Πρωτονίου – Μεταφοράς Ηλεκτρονίου  
ή Sequential Proton Loss – Electron Transfer (SPLET)**

Ο μηχανισμός SPLET αποτελείται από 2 βήματα. Στο πρώτο βήμα το αντιοξειδωτικό διασπάται σε ανιονική μορφή και σε ένα πρωτόνιο (ιοντίζεται) και τα ιόντα που σχηματίζονται αντιδρούν με την ελεύθερη ρίζα. Σε αυτή την αντίδραση δημιουργούνται μία ριζική μορφή του αντιοξειδωτικού και ένα ουδέτερο μόριο. Αξιοσημείωτη παράμετρος η οποία σχετίζεται με το πρώτο βήμα είναι η χημική συγγένεια του πρωτονίου (Proton Affinity–PA) και για το δεύτερο βήμα η Ενθαλπία Μεταφοράς Ηλεκτρονίου (Electron Transfer Enthalpy–ETE) (Alicja Urbaniak et al., 2012).

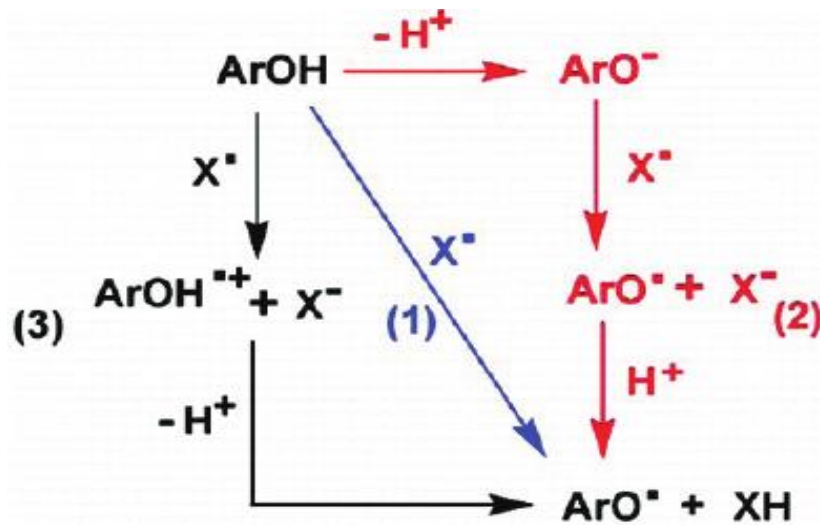
- Βήμα 1: Ιοντισμός φαινολικού αντιοξειδωτικού



- Βήμα 2: Διαδοχική μεταφορά ηλεκτρονίου από το φαινολικό ανιόν στην ελεύθερη ρίζα και πρωτονίωση προς σχηματισμό φαινοξειδικής ρίζας



Σχηματική αναπαράσταση των τριών μηχανισμών (1) HAT , (2) SPLET , (3) SET-PT παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.1**.



**Εικόνα 2.1:** Αναπαράσταση των τριών μηχανισμών (1) HAT , (2) SPLET , (3) SET-PT (Alicja Urbaniak et al., 2012).

### 2.2.2 Μηχανισμοί δράσης υποστρωμάτων

#### ➤ Μηχανισμός ABTS<sup>·+</sup> (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid))

Το 1993, οι Miller και Rice Evans ήταν οι πρώτοι που έκαναν αναφορά της μεθόδου ABTS<sup>·+</sup>, γνωστή και ως TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Όμως, η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε από τον Re και τους συνεργάτες του το 1999. Η βελτιστοποίηση σχετιζόταν με τον τρόπο παραγωγής του ABTS<sup>·+</sup> (Bibi Sadeer et al., 2020).

Η μέθοδος ABTS, η οποία είναι γνωστή και ως ριζική μέθοδος ABTS<sup>·+</sup>, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενώσεων που περιλαμβάνονται σε τρόφιμα και σε αναψυκτικά, κυρίως λόγω της εφαρμοσιμότητάς της σε υδατικές αλλά και λιπαρές φάσεις. Η πρωτότυπη μέθοδος



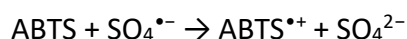
ABTS βασίζεται στην ενεργοποίηση της μεταμυογλοβίνης (Met-Mb) από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) παρουσία ABTS. Στη βελτιστοποιημένη μέθοδο, μία σταθερή κατιονική ρίζα, η οποία διαθέτει πράσινο-μπλε χρωμοφόρο απορρόφηση, παράγεται από οξείδωση του ABTS με υπερθειικό κάλιο (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) πριν την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων καροτενοειδών, φαινολικών ενώσεων και ορισμένων αντιοξειδωτικών πλάσματος, καθορίζεται από τον αποχρωματισμό του ABTS, μετρώντας την αναγωγή της κατιονικής ρίζας ως το ποσοστό αναστολής της απορρόφησης στα 734 nm (Moon & Shibamoto, 2009).

Το ABTS αντιδρά με το υπερθειικό κάλιο (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) μέσω απλής διμοριακής αντίδρασης για να δημιουργηθεί η κατιονική ρίζα (ABTS<sup>•+</sup>) με ταυτόχρονη αλλαγή χρώματος από σχεδόν άχρωμο σε πράσινο-μπλε. Το εύρος pH από 2,0 - 10,5 δεν επηρεάζει την αντίδραση οξείδωσης από το υπερθειικό κάλιο (Ilyasov et al., 2020).

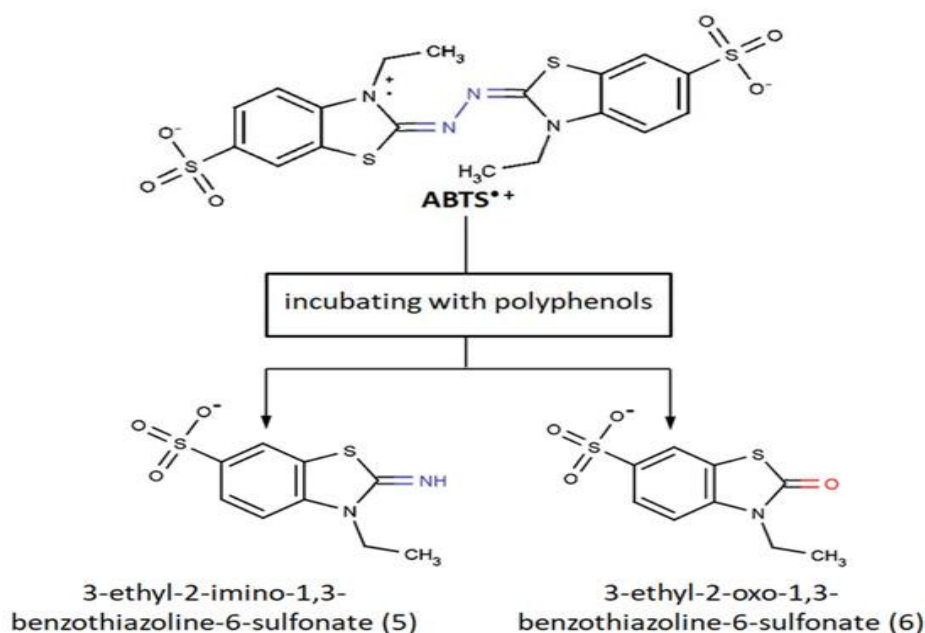
- Βήμα 1: Αντίδραση περίσσειας ποσότητας ABTS με την υπερθειική ρίζα και παραγωγή κατιονικής ρίζας (ABTS<sup>•+</sup>) και θειικής ρίζας.



- Βήμα 2: Αντίδραση ABTS με την θειική ρίζα



Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι κατά την αντίδραση του ABTS<sup>•+</sup> με φαινολικές ενώσεις υπόκειται σε περαιτέρω αποδόμηση δημιουργώντας δύο διαφορετικά παράγωγα. Το ένα παράγωγο είναι το 3-αίθυλο-2-ίμινο-1,3-βενζοθειαζόλινο-6-σουλφονικό οξύ και το δεύτερο παράγωγο είναι το 3-αίθυλο-2-όξο-1,3-βενζοθειαζόλινο-6-σουλφονικό οξύ (Ilyasov et al., 2020). Τα δύο αναφερόμενα παράγωγα απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.2**.



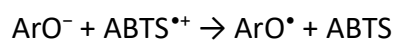
**Εικόνα 2.2:** Απεικόνιση αποδόμησης  $ABTS^{\bullet+}$  (Ilyasov et al., 2020).

Ποικίλες έρευνες παρουσιάζουν τους πιθανούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην μέθοδο  $ABTS^{\bullet+}$ , προτείνοντας το συνδυασμό μεταφοράς ατόμου υδρογόνου / μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου (HAT/SET) ως μηχανισμό αντίδρασης, τη σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίου – μεταφορά πρωτονίου (ET-PT) και τη συντονισμένη μεταφορά ηλεκτρονίου-πρωτονίου (CEP) με νερό ως υποδοχέα πρωτονίου. Οι μηχανισμοί δύναται να δράσουν παράλληλα ή σε άλλη περίπτωση να επικρατεί κάποιος. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός του  $ABTS^{\bullet+}$  διαρκεί χιλιοστοδευτερόλεπτα, είναι δύσκολη η διευκρίνιση μεταξύ των πιθανών μηχανισμών και η επιλογή του επικρατέστερου. Συνεπώς, περαιτέρω ταχείες τεχνικές μίξεως απαιτούνται για να εξακριβωθεί ο επικρατών μηχανισμός. Ωστόσο, είναι σημαντικό να θεωρηθεί ότι οι πολυφαινόλες, ως οι συνηθέστερες ενώσεις, και το νερό (συνήθως με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7,4) ή οι αλκοόλες ως συνηθέστεροι διαλύτες, υιοθετούν το μηχανισμό διαδοχικής απώλειας πρωτονίου – μεταφορά ηλεκτρονίου (SPLET) ως πιθανό μηχανισμό (Ilyasov et al., 2020).

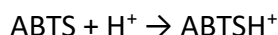
- Βήμα 1: Ιοντισμός φαινολικής ένωσης.



- Βήμα 2: Αντίδραση φαινολικού ανιόντος με την κατιονική ρίζα του  $ABTS$  προς σχηματισμό φαινοξειδικής ρίζας



- Βήμα 3: Πρωτονίωση παραγόμενου ABTS



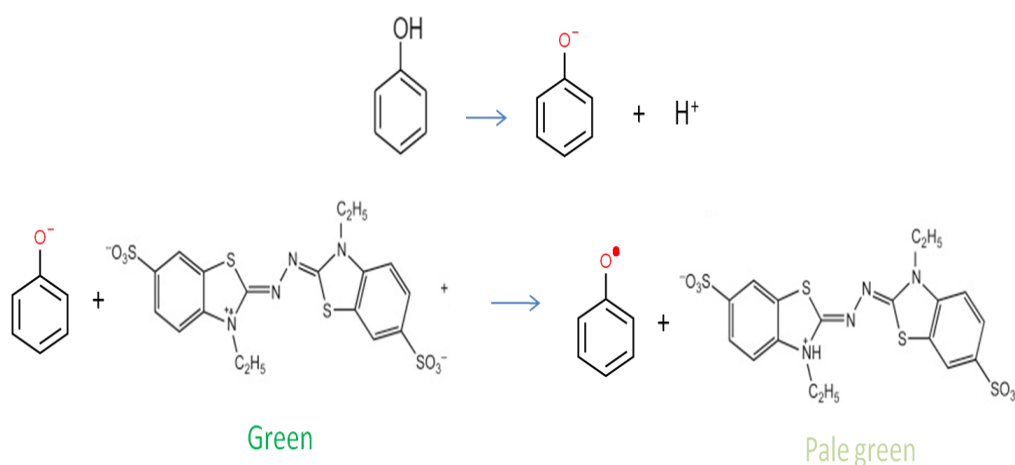
- Βήμα 4: Επακολουθεί σταθεροποίηση της φαινοξειδικής ρίζας μέσω δομών συντονισμού και εκ νέου αντίδραση με το  $\text{ABTS}^{*\bullet}$  και σχηματισμός συζευγμένου παραγώγου (coupling adduct).

- Βήμα 5: Διάσπαση συζευγμένου παραγώγου σε 2 κατηγορίες.

Κατηγορία 1: Ιμινο-ειδές παράγωγο + 3-αιθυλο- 2 -ίμινο- 1,3 - βενζοθειαζόλινο- 6- σουλφονικό οξύ

Κατηγορία 2: Υδραζινοδιυλιδενο-ειδές παράγωγο +

3-αιθυλο - 2 – όξο - 1,3 -βενζοθειαζόλινο- 6- σουλφονικό οξύ.



**Εικόνα 2.3:** Γενική αντίδραση-μηχανισμός που ακολουθείται από τις φαινολικές ενώσεις με το  $\text{ABTS}^{*\bullet}$ .

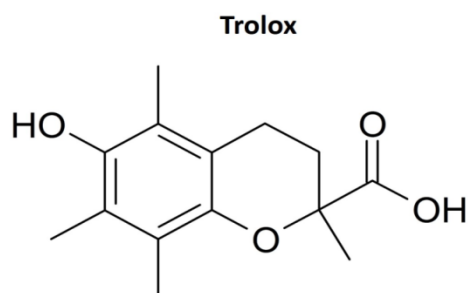
#### ➤ Μηχανισμός DPPH· (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Assay)

Πρόσφατα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί σε μελέτες για φυσικά αντιοξειδωτικά με τη μέθοδο DPPH·. Ένας λόγος είναι ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι απλή και εξαιρετικά ευαίσθητη. Βασίζεται στη θεωρία ότι ένας δότης υδρογόνου δρα ως αντιοξειδωτικό. Το DPPH· αποτελεί μία από τις σταθερότερες και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Η αντιοξειδωτική δράση

αντικατοπτρίζεται με βάση την εξαφάνιση του DPPH· στα δείγματα τα οποία μελετώνται. Ποικίλες μέθοδοι οι οποίες ποσοτικοποιούν τη ρίζα έχουν αναφερθεί:

- Φασματοσκοπία συντονισμού περιστροφής ηλεκτρονίου (Electron Spin Resonance Spectroscopy - ESR)/φυτικές σκόνες,
- Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR)/κατεχίνες και
- Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (Ultra Violet Spectrophotometry)/πολυφαινόλες.

Ωστόσο, ο προσδιορισμός της DPPH· με φασματογράφο υπεριώδους ακτινοβολίας αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη και απαντώμενη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται λόγω της απλότητας και της ακρίβειάς της. Η ρίζα εμφανίζει ισχυρό μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm (μωβ). Το χρώμα μετατρέπεται από μωβ σε κίτρινο ακολουθούμενο από σχηματισμό DPPH με απορρόφηση του υδρογόνου από ένα αντιοξειδωτικό. Η αντίδραση είναι στοιχειομετρική και ανάλογη με τον αριθμό των πρωτονίων που απορροφούνται. Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί ακολουθώντας τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων από ποικίλες μελέτες, έχει χρησιμοποιηθεί η ισοδύναμη μονάδα Trolox. Το Trolox είναι μία εμπορική υδατοδιαλυτή βιταμίνη E (**Εικόνα 2.4**). Η αντιοξειδωτική δράση ενός δείγματος εκφράζεται σε micromoles ισοδύναμων Trolox ανά 100 g δείγματος. Αποτελέσματα έχουν επίσης αναφερθεί ως EC<sub>50</sub>, το οποίο αντιστοιχεί στην ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι αναγκαία για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH· κατά 50% (Moon & Shibamoto, 2009).

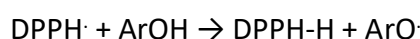


**Εικόνα 2.4 :** Χημική δομή Trolox (Giordano et al., 2020).

Η περιγραφόμενη μέθοδος θεωρείται ως απλή και ακριβής για χρήση σε εκχυλίσματα φρούτων και λαχανικών. Επίσης, πολλές μελέτες που συνδέονται με αυτή τη μέθοδο συμπεριλαμβάνουν φρούτα και λαχανικά, φαρμακευτικά φυτά, δημητριακά και φασόλια, μπαχαρικά και βότανα, τσάι και φύλλα (Moon & Shibamoto, 2009).

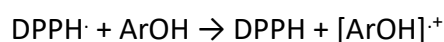
Δύο μηχανισμοί επικρατούν: ο ένας είναι HAT και ο άλλος SET

- Μηχανισμός HAT (1 γρήγορο βήμα)

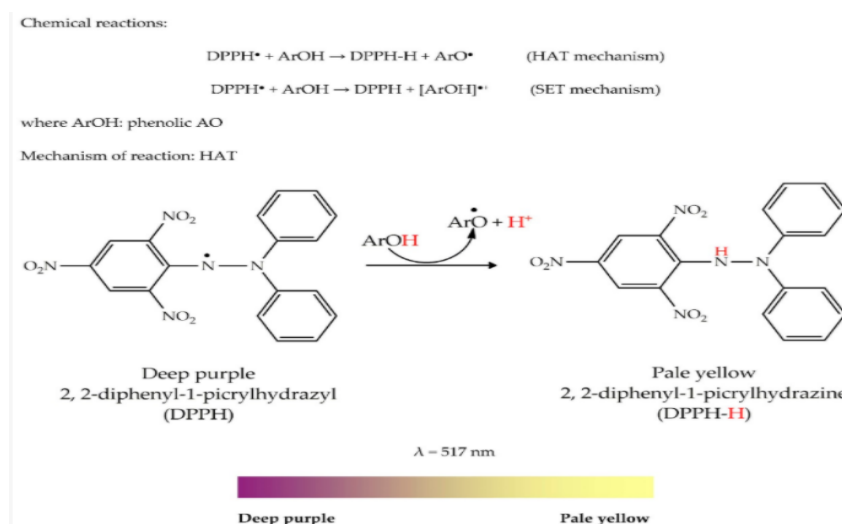
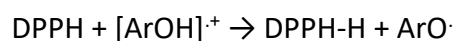


- Μηχανισμός SET (2 αργά βήματα)

- Βήμα 1: Αντίδραση  $DPPH^{\bullet}$  με τη φαινολική ένωση και μεταφορά του ηλεκτρονίου με σχηματισμό ασταθούς κατιονικής ρίζας της φαινολικής ένωσης.



- Βήμα 2: Απόσπαση πρωτονίου από το κατιόν της φαινολικής ένωσης με σχηματισμό φαινοξειδικής ρίζας και  $DPPH-H$



**Εικόνα 2.5:** Απεικόνιση μηχανισμού (HAT)  $DPPH^{\bullet}$  (Bibi Sadeer et al., 2020).

### ➤ Μηχανισμός FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay)

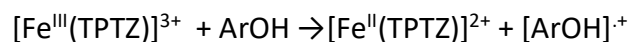
Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain το 1996 στοχεύοντας στη μέτρηση της αναγωγικής ισχύος του σιδήρου στο πλάσμα του αίματος του ανθρώπου (Amarowicz & Pegg, 2019).

Όταν ένα σύμπλοκο  $\text{Fe}^{3+}$ - TPTZ (Iron[III]-2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine) ανάγεται στη  $\text{Fe}^{2+}$  μορφή από ένα αντιοξειδωτικό υπό όξινες συνθήκες, ένα έντονο μπλε χρώμα δημιουργείται με μέγιστο απορρόφησης στα 593 nm. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση (αναγωγική ικανότητα) μπορεί να εκτιμηθεί εντοπίζοντας το σχηματισμό  $\text{Fe}^{2+}$ - TPTZ συμπλόκου με φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος FRAP προσφέρει γρήγορα, αναπαραγωγήσιμα αποτελέσματα και το μοναδικό της μειονέκτημα είναι ότι το σύστημα πρέπει να βρίσκεται σε υδατινό περιβάλλον. Δηλαδή, το αναφερόμενο αντιοξειδωτικό πρέπει να είναι υδατοδιαλυτό, όπως είναι το ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ ή Trolox.

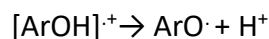
Επισημαίνεται ότι, μικρός αριθμός μελετών βασίζονται μόνο σε αυτή τη μέθοδο. Συνήθως, μελέτες σε φυτά και τρόφιμα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες αντιοξειδωτικές μελέτες.(Amarowicz & Pegg, 2019).

Ο κύριος μηχανισμός για αυτή τη μέθοδο είναι SET ( 2 αργά βήματα)

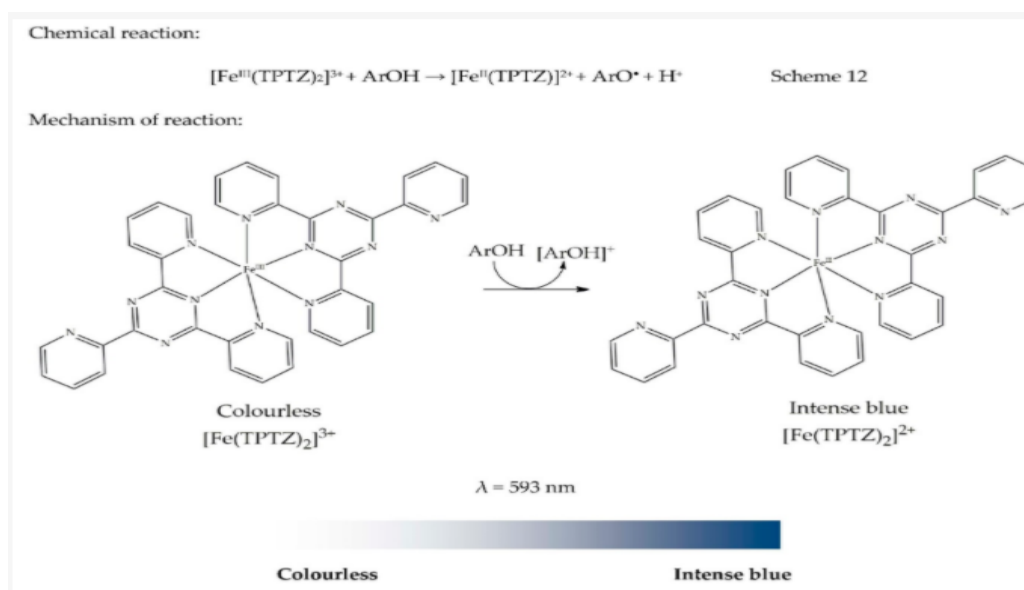
- Βήμα 1: Μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από τον τρισθενή σίδηρο στην φαινολική ένωση με ταυτόχρονη αναγωγή του σε δισθενή και σχηματισμός ασταθούς κατιονικής ρίζας.



- Βήμα 2: Απελευθέρωση πρωτονίου και δημιουργία σταθερής φαινοξειδικής ρίζας.



Απεικόνιση του μηχανισμού παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.5**.



**Εικόνα 2.6:** Απεικόνιση μηχανισμού FRAP (BiBi Sadeer et al., 2020).

## Κεφάλαιο 3: Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (QSAR– Quantitative Structure-Activity Relationship)

### 3.1 Εισαγωγή

Οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης έχουν ως κύριο σκοπό την εξαγωγή εξισώσεων (ή μοντέλων), οι οποίες δύνανται να συσχετίσουν τη βιολογική δράση μιας ένωσης με τη δομή της. Συγκεκριμένα, αποτελούν τη μαθηματική έκφραση της μεταβολής της βιολογικής δράσης μιας σειράς ομόλογων ενώσεων σε συνάρτηση με παράγοντες που αφορούν τη δομή τους. Απώτερος σκοπός είναι η άντληση και η αξιοποίηση πλήθους πληροφοριών, ώστε να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίησή τους μέσω εφαρμογής στατιστικής επεξεργασίας.

Η εξίσωση (1) περιγράφει τη σχέση μεταξύ μιας καθορισμένης δράσης, η οποία χαρακτηρίζεται ως εξαρτημένη μεταβλητή ( $Y$  – dependent variable), και συγκεκριμένων ιδιοτήτων (ανεξάρτητες μεταβλητές –  $X$  – independent variables) σειράς εξεταζόμενων μορίων τα οποία φέρουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά:

$$\text{Βιολογική Δράση} = \alpha_0 + (\alpha_1 \cdot P_1) + (\alpha_2 \cdot P_2) + \dots + (\alpha_n \cdot P_n) \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

Συγκεκριμένα, οι συντελεστές  $\alpha_0 - \alpha_n$  αποτελούν σταθερές της εξίσωσης, ο υπολογισμός των οποίων πραγματοποιείται μέσω πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression – MLR) και οι μεταβλητές  $P_1 - P_n$  αντιπροσωπεύουν συγκεκριμένες ιδιότητες των εξεταζόμενων ενώσεων (πχ διαλυτότητα, λιποφιλικότητα), οι οποίες συσχετίζονται με τη δράση. Οι μεταβλητές αυτές είναι γνωστές με τον όρο περιγραφικές μεταβλητές (**descriptors**) και δύνανται να προσδιοριστούν είτε πειραματικά είτε θεωρητικά μέσω εφαρμογής υπολογιστικών τεχνικών.

Οι υπολογιστικές τεχνικές (*in silico*), δηλαδή οι τεχνικές οι οποίες διεξάγονται με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον θεωρητικό προσδιορισμό των περιγραφικών μεταβλητών. Οι υπολογιστικές τεχνικές προσφέρουν τη δυνατότητα **πρόβλεψης** τιμών πληθώρας παραμέτρων (ιδιοτήτων) ενώσεων, όπως η λιποφιλικότητα, οι οποίες συσχετίζονται με τη βιολογική δράση της ένωσης.



Η **αξιοπιστία** των εξισώσεων τύπου (1) και κατ'επέκταση των **QSAR μοντέλων**, εκτιμάται μέσω στατιστικών παραμέτρων, οι οποίες εξάγονται από την εξίσωση τύπου (1) και περιλαμβάνουν στοιχεία, όπως ο συντελεστής συσχέτισης ( $R$  ή  $R^2$  – Correlation coefficient), ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης ( $Q^2$  – cross validated correlation coefficient), η τυπική απόκλιση ( $s$ ), η δοκιμασία Fisher κ.α. Τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία θα αναλυθούν εκτενώς σε υποκεφάλαιο που ακολουθεί (**Υποκεφάλαιο 3.2.4**). Επίσης, η αξιοπιστία του μοντέλου εξαρτάται από το πλήθος των ενώσεων που εξετάζονται καθώς επίσης και από το εύρος των τιμών της δράσης τους. Στην ιδανική περίπτωση ο αριθμός των ενώσεων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερος και οι τιμές της δράσης να παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή, ώστε να παρουσιάζουν τιμές δραστηριότητας από πολύ χαμηλές έως πολύ υψηλές.

## 3.2 Μοριακές περιγραφικές παράμετροι (Molecular Descriptors)

### 3.2.1 Ορισμός

Οι μοριακές περιγραφικές παράμετροι (molecular descriptors), οι οποίες μπορούν να προβλεφθούν και να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός QSAR μοντέλου, είναι αριθμητικές αναπαραστάσεις που αντιστοιχούν σε δομές μορίων (Lučić et al., 2008). Ανάλογα με την επιλεγμένη αναπαράσταση των μορίων, ένα μόριο μπορεί να περιγραφεί είτε μέσω πειραματικών περιγραφικών παραμέτρων είτε μέσω θεωρητικών περιγραφικών παραμέτρων.

Οι πειραματικές περιγραφικές παράμετροι αποτελούν τις πειραματικές μετρήσεις όπως για παράδειγμα, ο συντελεστής διαχωρισμού οκτανόλης - νερού, η μοριακή ικανότητα διάθλασης, η ικανότητα πόλωσης και σε γενικά πλαίσια, οι φυσικοχημικές ιδιότητες που υπολογίζονται από μία εξειδικευμένη πειραματική πορεία. Αντιθέτως, οι θεωρητικές περιγραφικές παράμετροι εξάγονται με τη βοήθεια αξιόπιστων αλγορίθμων εφαρμόζοντας τεχνικές χημειοπληροφορικής (chemoinformatics) (Mauri et al., 2017).

### 3.2.2 Κατηγορίες περιγραφικών παραμέτρων

#### ➤ Τοπολογικοί δείκτες (Topological Indices – TIs)

Οι τοπολογικοί δείκτες είναι μοναδικές γραφικές σταθερές που προέρχονται από τη γραφική αναπαράσταση μίας μοριακής δομής. Οι τοπολογικοί δείκτες συνήθως υπολογίζονται σε ένα μοριακό γράφημα με λιγοστά υδρογόνα (H-depleted molecular graph) και ανάλογα με τον ορισμό τους, αντικατοπτρίζουν τη δομή μίας ή περισσότερων μοριακών δομών, όπως είναι το μέγεθος, η συμμετρία, το σχήμα καθώς και τα χαρακτηριστικά του δακτυλικού συστήματος. Οι τοπολογικοί δείκτες, οι οποίοι λαμβάνουν υπόψιν πληροφορίες για τη δομή αναφέρονται ως τοποδομικοί δείκτες, ενώ αυτοί που λαμβάνουν υπόψιν πληροφορίες για τη χημεία του μορίου όπως είναι, το είδος των ατόμων ή η κατάσταση υβριδοποίησης, αναφέρονται ως τοποχημικοί δείκτες (Mauri et al., 2017).

Οι τοπολογικοί δείκτες παράγονται και με εφαρμογή μαθηματικών τελεστών άμεσα σε ένα γραφικό-θεωρητικό πίνακα όπως, ο τελεστής Wiener ο οποίος αποτελείται από το ημι-άθροισμα των στοιχείων του πίνακα ή την εφαρμογή μαθηματικών συναρτήσεων σε τοπικές σταθερές κορυφές σε ένα γράφημα (Mauri et al., 2017).

Στον **Πίνακα 3.1** παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικότεροι τοπολογικοί δείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία (Rastija & Medić-Šarić, 2009).

**Πίνακας 3.1:** Οι χαρακτηριστικότεροι τοπολογικοί δείκτες και οι ορισμοί τους

Τοπολογικοί δείκτες	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
$W(G)$	Wiener index	Δείκτης Wiener
${}^0\chi(G)$	Zero-order connectivity index	Δείκτης συνδεσιμότητας μηδενικής τάξης
${}^1\chi(G)$	First-order connectivity index	Δείκτης συνδεσιμότητας πρώτης τάξης
$J(G)$	Balaban index	Δείκτης Balaban
$J_m(G)$	Balaban-type index from mass-weighted distance matrix	Δείκτης τύπου Balaban από μήτρα απόστασης μαζικής στάθμησης
$I(G)$	Information-theoretical index	Πληροφοριακός -θεωρητικός δείκτης
MTI	Schultz index	Δείκτης Schultz

### ➤ Φυσικοχημικές περιγραφικές παράμετροι

Οι χαρακτηριστικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες με ευρεία εφαρμογή στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2** (Rastija & Medić-Šarić, 2009); (Ritchie & Mcdonald, 2014).

**Πίνακας 3.2:** Οι χαρακτηριστικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες και οι ορισμοί τους

Φυσικοχημικές παράμετροι	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
M	Molecular weight	Μοριακό βάρος
logP(ALOGP,CLOGP,MLOGP)	Partition coefficient	Συντελεστής διαχωρισμού
MR	Molar refractivity	Μοριακή ικανότητα διάθλασης
PSA	Polar surface area	Πολική επιφανειακή περιοχή
V <sub>w</sub>	van der Waals volume	Όγκος van der Waals
AROM,NAR	Number of aromatic rings	Αριθμός αρωματικών δακτυλίων
ARR	Number of aromatic bonds/number of total bonds	Αριθμός αρωματικών δεσμών/αριθμός συνολικών δεσμών
Ar/HA	Number of aromatic atoms/number of heavy atoms	Αριθμός αρωματικών ατόμων/ Αριθμός βαρέων ατόμων

### 3.2.3 Λογισμικά (Softwares) που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό περιγραφικών παραμέτρων

Η προσέγγιση των ποσοτικών σχέσεων δομής – δράσης (QSAR) χρησιμοποιεί πειραματικά δεδομένα που συμπεριλαμβάνουν τη βιολογική δράση των χημικών ενώσεων, τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά τα οποία παρουσιάζονται ως μοριακές περιγραφικές παράμετροι (molecular descriptors) καθώς και στατιστικές μεθόδους για τη συσχέτιση των μοριακών περιγραφικών παραμέτρων με τη βιολογική δράση. Οι μοριακές περιγραφικές παράμετροι αποτελούν αριθμητικές τιμές και διακρίνονται σε μίας διάστασης (1D), δύο διαστάσεων (2D) και τριών διαστάσεων (3D) ανάλογα με τον τύπο της πληροφορίας που λαμβάνεται.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία λογισμικών (software) και διαδικτυακών εργαλείων διαθέσιμων για τον υπολογισμό των μοριακών περιγραφικών παραμέτρων και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3** (Kazmi et al., 2019).

**Πίνακας 3.3:** Κατάλογος λογισμικών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μοριακών περιγραφικών παραμέτρων (Kazmi et al., 2019)

Λογισμικό	Σύστημα λειτουργίας	Άδεια
ADAPT	Unix/Linux	Δωρεάν
ADMET Predictor (PCB Molecule)	Windows	Εμπορική
ChemAxon (Calculator plugins)	Windows/Unix/Linux	Εμπορική
Codessa	Windows	Εμπορική
Corina Symphony	Windows	Εμπορική
DRAGON 7.0	Windows/Unix/Linux	Εμπορική
E-Dragon	Web service	Δωρεάν
MOE	Windows/Unix/Linux	Εμπορική
Molconn-Z	Windows/Unix/Linux	Εμπορική
MOLGEN QSPR	Windows	Εμπορική
PaDEL-descriptor (CDK)	Java JRE	Δωρεάν
PowerMV	Windows	Μερικώς Δωρεάν
PreADMET	Windows	Εμπορική
Open Babel	Windows/Linux	Δωρεάν
Qikprop	Windows/Linux	Εμπορική
ACD Labs/Percepta	Web service & modules	Δωρεάν
MOPAC	Windows/Linux	Δωρεάν
EPI Suite	Windows	Δωρεάν

### 3.2.4 Στατιστικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται την αξιολόγηση και την ερμηνεία μοντέλων Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης

Οι στατιστικοί δείκτες χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για την εκτίμηση της αξιοπιστίας ενός μοντέλου.

Οι κοινότεροι και συχνότερα χρησιμοποιούμενοι στατιστικοί δείκτες είναι: ο συντελεστής προσδιορισμού προσαρμογής ( $R^2$ ), οι αποκλίσεις (RMSE, SD), η ομοιότητα δεδομένων (Τιμή  $\rho$ ), η ικανότητα πρόβλεψης ( $Q^2$ ), η εφαρμοσιμότητα ( $h_i$ ) καθώς και η ανίχνευση των ακραίων τιμών. Τα όρια για τις τιμές  $R^2$  και  $Q^2$  συνήθως συνήθως λαμβάνουν τιμές μεγαλύτερες του 0,6 (Chen et al., 2015).

### **Συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης – Multi-correlation coefficient (R<sup>2</sup>)**

Αντικατοπτρίζει τη σχέση μεταξύ μίας εξαρτημένης μεταβλητής  $y$  και των ανεξάρτητων μεταβλητών  $x_1, x_2, \dots$ . Οι τιμές που λαμβάνει κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1. Η τιμή του αυξάνεται με την ενσωμάτωση περισσότερων μεταβλητών (Chen et al., 2015).

$$R^2 = \frac{\sum_1^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_1^N (y_i - \bar{y})^2}$$

### **Τυπική απόκλιση – Standard Deviation (SD)**

Παρουσιάζει το επίπεδο της απόκλισης ή της διασποράς από τη μέση τιμή. Όσο μικρότερη είναι, τόσο εγγύτερα βρίσκεται στη μέση τιμή (Chen et al., 2015).

$$SD = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^N (y_i - \bar{y})^2}{N-1}}$$

### **Μέσο Τετραγωνικό Σφάλμα – Root Mean Square Error (RMSE)**

Υπολογίζει το σφάλμα ως την τετραγωνική ρίζα του μέσου όρου του τετραγώνου των καταλοίπων. Η RMSE είναι περιγραφική, όταν συγκρίνεται η ικανότητα πρόβλεψης μεταξύ των δεικτών πρόβλεψης (Darnag et al., 2012).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{m=1}^N (y_m - \hat{y}_m)^2}$$

### **Συντελεστής συσχέτισης εξωτερικών δεδομένων επαλήθευσης – Correlation coefficient of external validation data (Q<sup>2</sup>)**

Η προγνωστική ισχύς ενός μοντέλου Ποσοτικής Σχέσης Δομής – Δράσης (QSAR) που δημιουργείται σύμφωνα με τη δομή επιλεγμένων ενώσεων (training set) υπολογίζεται μέσω προβλέψεων της δράσης μιας σειράς ενώσεων δοκιμής (test set) και εξετάζεται μέσω δοκιμών διασταυρούμενων επαληθεύσεων με τη χρήση του Q<sup>2</sup>. (Darnag et al., 2012).

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{m=1}^N (\hat{y}_m - y_m)^2}{\sum_{m=1}^N (y_m - \bar{y})^2}$$

### **Συντελεστής συσχέτισης Pearson – Pearson correlation coefficient (r-Pearson)**

Αντικατοπτρίζει τη σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών και παίρνει τιμές από 0 έως 1 (Chen et al., 2015).

$$r = \frac{\sum_1^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_1^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_1^N (y_i - \bar{y})^2}$$

### **Αναλογία Fisher – Fisher ratio (F,P)**

Ελέγχει τη σημαντικότητα των ανεξάρτητων μεταβλητών ως προς την εξαρτημένη μεταβλητή. Αν το F αυξάνεται, η εξίσωση είναι σημαντική (Chen et al., 2015).

$$F = \frac{\sum_1^N (\widehat{y}_i - \bar{y})^2 / p}{\sum_1^N (y_i - \widehat{y}_i)^2 / (N - p - 1)}$$

### **Σύμβολα εξισώσεων**

$y_i, \widehat{y}_i, \bar{y}$ : Τιμές μετρήσεων, τιμές πρόβλεψης και μέση τιμή των εξαρτημένων μεταβλητών, αντίστοιχα

$y_m, \widehat{y}_m, \bar{y}$ : Τιμές μετρήσεων, τιμές πρόβλεψης και μέση τιμή των εξαρτημένων μεταβλητών, αντίστοιχα

N : Αριθμός των training set

p: Αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών

$x_i, \bar{x}$  : Τιμές μετρήσεων και μέση τιμή των ανεξάρτητων μεταβλητών, αντίστοιχα.

## Πειραματικό μέρος

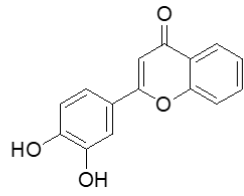
### Κεφάλαιο 4: Δημιουργία Ποσοτικών Μοντέλων Σχέσης Δομής-Δράσης φυσικών φαινολικών ενώσεων

#### 4.1 Εισαγωγή

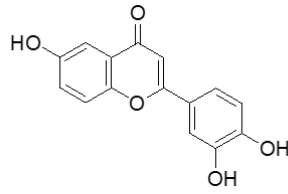
Στο πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάλυση των βημάτων που ακολουθήθηκαν, καθώς και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη δημιουργία Ποσοτικών Μοντέλων Σχέσης Δομής-Δράσης (QSARmodels) σειράς φαινολικών ενώσεων φυσικής προέλευσης. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε συνδυασμός κατάλληλων *in vitro* και *in silico* μεθόδων στοχεύοντας στη συσχέτιση μεταξύ δομής-δράσης και στη δημιουργία ενός «εργαλείου πρόβλεψης», το οποίο δύναται να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την προτεραιοποίηση της εξέτασης της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών ενώσεων, μέσω υπολογισμού περιγραφικών ιδιοτήτων (descriptors).

#### 4.2 Επιλογή και κατάλληλη προετοιμασία του δειγματοχώρου

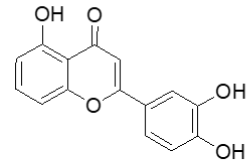
Η επιλογή των φυσικών φαινολικών ενώσεων που απαρτίζουν το δειγματοχώρο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε μέσω εκτενούς βιβλιογραφικής αναζήτησης. Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης προέκυψαν συνολικά **34 φαινολικές ενώσεις**, η αντιριζική δράση των οποίων προσδιορίστηκε με χρήση της μεθόδου DPPH (Zheng et al., 2010). Οι χημικές δομές των εξεταζόμενων ενώσεων καθώς και οι πειραματικές τιμές της μέσης ανασταλτικής τους συγκέντρωσης (Half maximal inhibitory concentration-IC<sub>50</sub>) παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4.1** και στον **Πίνακα 4.1**, αντίστοιχα.



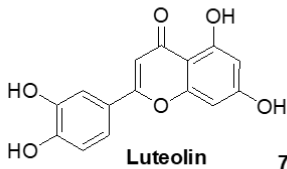
**3',4' Dihydroxyflavone**



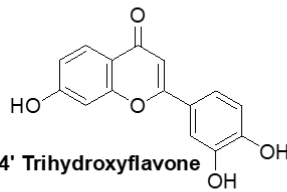
**6,3',4' Trihydroxyflavone**



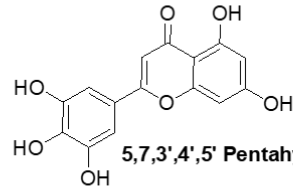
**5,3',4' Trihydroxyflavone**



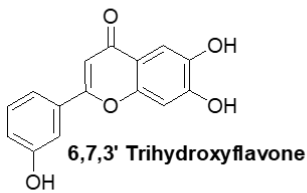
**Luteolin**



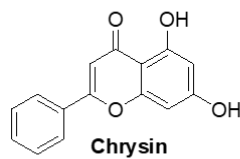
**7,3',4' Trihydroxyflavone**



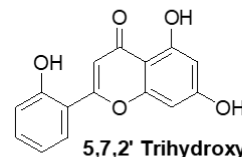
**5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone**



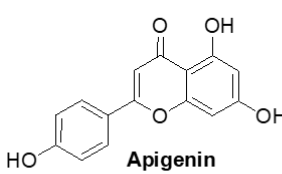
**6,7,3' Trihydroxyflavone**



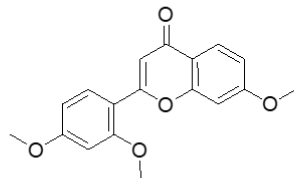
**Chrysin**



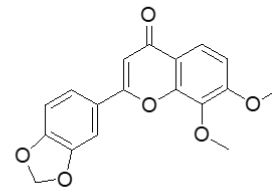
**5,7,2' Trihydroxyflavone**



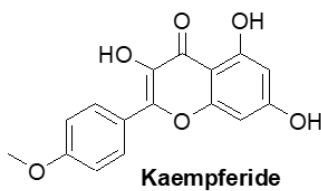
**Apigenin**



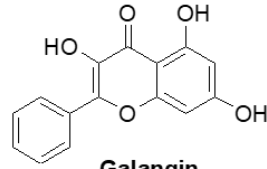
**7,2',4' Trimethoxyflavone**



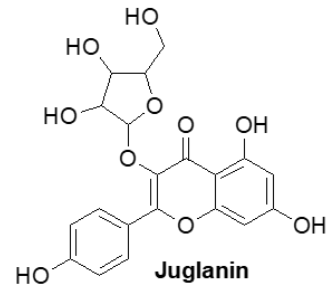
**7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone**



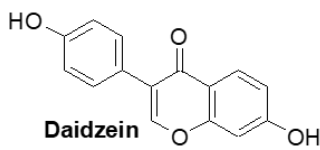
**Kaempferide**



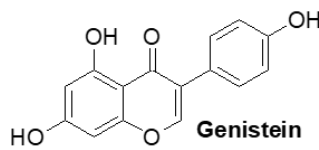
**Galangin**



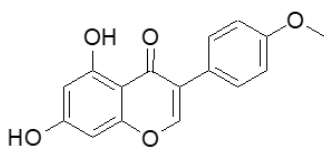
**Juglanin**



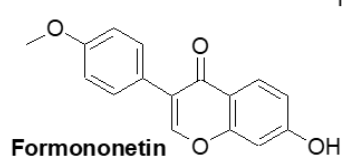
**Daidzein**



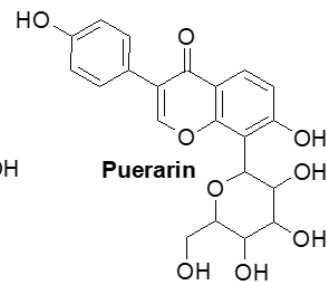
**Genistein**



**Biochanin A**

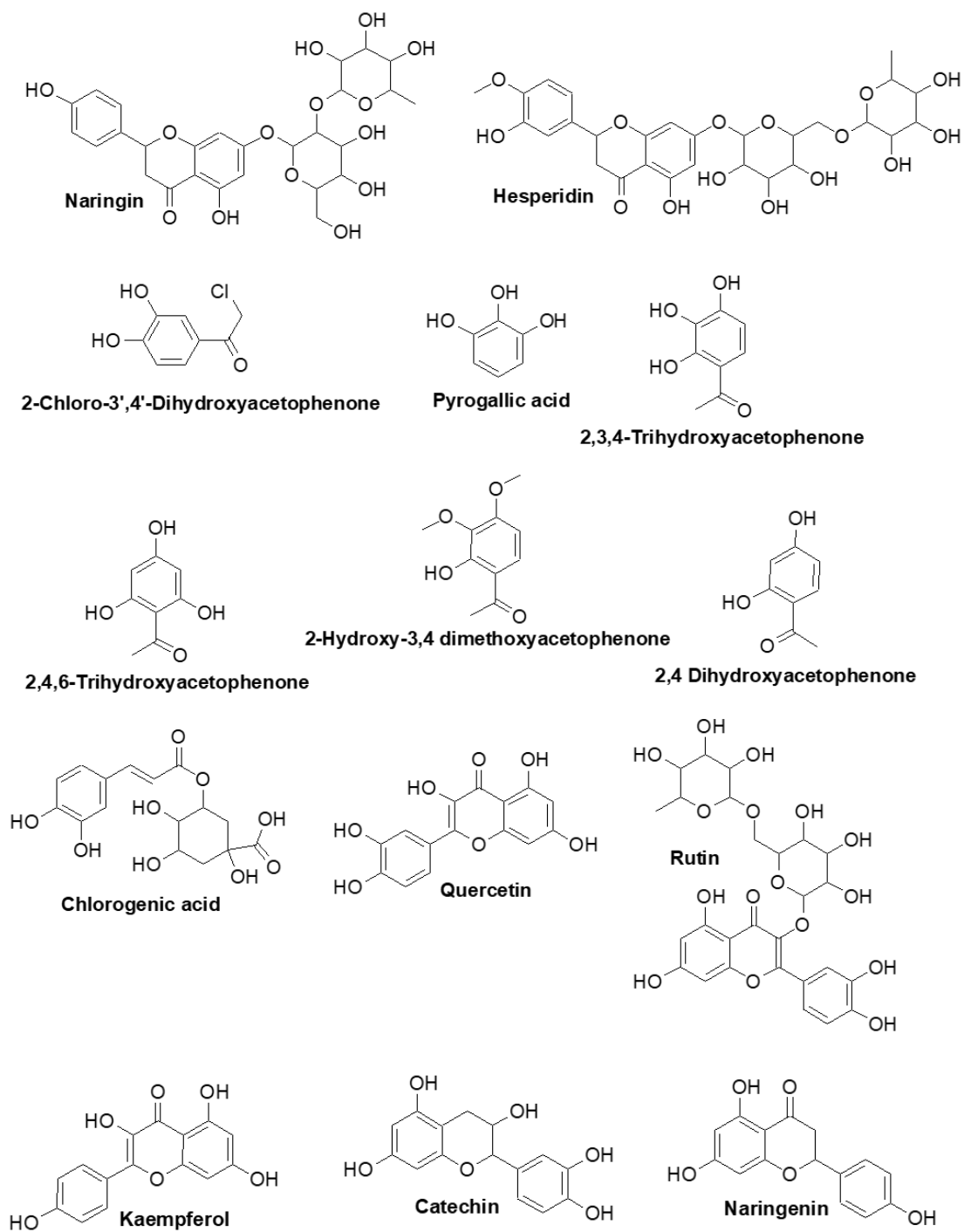


**Formononetin**



**Puerarin**





**Σχήμα 4.1:** Οι χημικές δομές των φυσικών φαινολικών ενώσεων που απαρτίζουν το δειγματοχώρο.

**Πίνακας 4.1:** Οι πειραματικές τιμές  $IC_{50}$  των ενώσεων του δειγματοχώρου που προέκυψαν με εφαρμογή της μεθόδου DPPH (Zheng et al.,2010)

Ένωση	Τιμές $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	Ένωση	Τιμές $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
3',4' Dihydroxyflavone	4,8 $\pm$ 0,1	Biochanin A	>100
6,3',4' Trihydroxyflavone	5,0 $\pm$ 0,1	Formononetin	>100
5,3',4' Trihydroxyflavone	5,9 $\pm$ 0,1	Puerarin	>100
Luteolin	6,6 $\pm$ 0,1	Naringin	>100
7,3',4' Trihydroxyflavone	6,8 $\pm$ 0,1	Hesperidin	>100
5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone	15,8 $\pm$ 0,2	2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone	4,9 $\pm$ 0,1
6,7,3' Trihydroxyflavone	18,6 $\pm$ 0,3	Pyrogalllic acid	6,8 $\pm$ 0,0
Chrysin	>100	2,3,4-Trihydroxyacetophenone	11,4 $\pm$ 0,1
5,7,2' Trihydroxyflavone	>100	2,4,6-Trihydroxyacetophenone	>100
Apigenin	>100	2-Hydroxy-3,4-dimethoxyacetophenone	>100
7,2',4' Trimethoxyflavone	>100	2,4 Dihydroxyacetophenone	>100
7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone	>100	Chlorogenic acid	6,9 $\pm$ 0,1
Kaempferide	21,0 $\pm$ 0,1	Quercetin	3,2 $\pm$ 0,0
Galangin	36,9 $\pm$ 0,6	Rutin	4,9 $\pm$ 0,1
Juglanin	>100	Kaempferol	13,2 $\pm$ 0,1
Daidzein	>100	(+/-)-Catechin	6,2 $\pm$ 0,0
Genistein	>100	Naringenin	>100

Η επιλογή των φαινολικών ενώσεων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.1** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το δομικό τους σκελετό, όλες φέρουν φαινολικό δακτύλιο καθώς και με την κατηγορία στην οποία ανήκουν. Από το σύνολο των **34 ενώσεων**, 14 δομές ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονών, 4 ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών (Quercetin, Rutin, Galangin, Juglanin), 5 ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονών (Daidzein, Genistein, Biohanin A, Formononetin, Puerarin), 3 ανήκουν στην κατηγορία των φλαβανονών (Naringin, Naringenin, Hesperidin), 5 ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών κετονών (2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone, 2,3,4-Trihydroxyacetophenone, 2,4,6-Trihydroxyacetophenone, 2-Hydroxy-3,4-dimethoxyacetophenone, 2,4 Dihydroxyacetophenone), 1 ανήκει στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων (Pyrogalllic acid), 1 ανήκει στην κατηγορία των υδροξυκινανναμικών οξέων

(Chlorogenic acid) και 1 ανήκει στην κατηγορία των Φλαβαν-3-ολών (Catechin). Όσον αφορά το δομικό σκέλετο, εκτός από το φαινολικό δακτύλιο, οι προαναφερθέντες ενώσεις παρουσιάζουν και ποικιλομορφία στους υποκαταστάτες τους. Κατά αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται σύγκριση ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες μεταξύ των ενώσεων. Επιπρόσθετα, υπάρχει συνδυασμός δραστικών και μη δραστικών ενώσεων ο οποίος οδηγεί στη δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης το οποίο δεν είναι καθοδηγούμενο και δεν αντικατοπτρίζει τη συσχέτιση μόνο των δραστικών ενώσεων.

### 4.3 Ελαχιστοποίηση της ενέργειας των φαινολικών ενώσεων του δειγματοχώρου

Οι **34 ενώσεις** που απαρτίζουν το δειγματοχώρο, αρχικά σχεδιάστηκαν σε δισδιάστατη μορφή (2D), με την εισαγωγή των αντίστοιχων αρχείων SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετατροπή τους σε τριδιάστατη μορφή (3D).

Ακολούθως, οι ενώσεις ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (Energy Minimization) στοχεύοντας στην απαλοιφή των στερεοχημικών παρεμποδίσεων ή επαφών μεταξύ των ατόμων που δύναται να προκαλέσουν απώσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης PRCG (Polak-Ribier Conjugate Gradient), ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των αλγορίθμων πρώτης τάξης. Με την εφαρμογή του αλγορίθμου αυτού προσδιορίζονται περισσότερα του ενός ενεργειακά τοπικά ελάχιστα ή ακόμα και το τοπικό μέγιστο, χρησιμοποιώντας την πρώτη παράγωγο της συνάρτησης της δυναμικής ενέργειας (Μαυρομούστακος, 2008). Επιπλέον, για την πρόβλεψη της θεωρητικής τιμής της ενέργειας των ενώσεων εφαρμόστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

- Πεδίο Δυνάμεων (Force Field): OPLS3
- Αριθμός επαναλήψεων (Iterations): 10,000
- Κριτήριο Σύγκλισης (Convergence threshold): 0,001 kJ

Η θεωρητική τιμή της ενέργειας υπολογίζεται από το άθροισμα των επιμέρους ενεργειών, οι οποίες προκύπτουν από ενδομοριακές και μη δεσμικές

αλληλεπιδράσεις (Μαυρομούστακος, 2008). Συγκεκριμένα, η ενέργεια δίνεται από το ακόλουθο άθροισμα:

$$E_{\text{δυν}} = E_{\text{τάσης δεσμού}} + E_{\text{κάμψης δεσμού}} + E_{\text{δίεδρων γωνιών}} + E_{\text{ηλεκτροστατικών δεσμών}} + E_{\text{vanderWaals}} + E_{\text{δεσμοί υδρογόνου}} + E_{\text{περιοριστικών συνθηκών}}$$

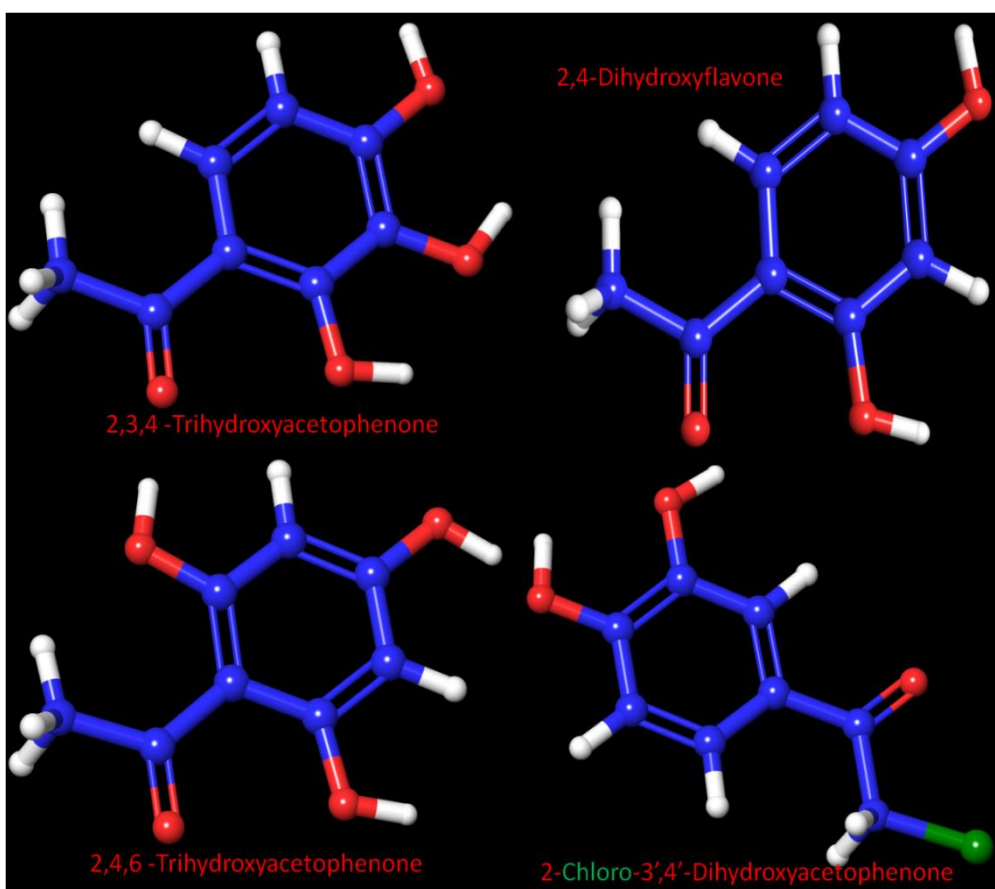
Στην παραπάνω εξίσωση, οι τρεις πρώτοι όροι ( $E_{\text{τάσης δεσμού}}$ ,  $E_{\text{κάμψης δεσμού}}$ ,  $E_{\text{δίεδρων γωνιών}}$ ) αποτελούν τις εσωτερικές συντεταγμένες της ενέργειας ενώ οι τρεις επόμενοι όροι ( $E_{\text{ηλεκτροστατικών δεσμών}}$ ,  $E_{\text{van der Waals}}$ ,  $E_{\text{δεσμοί υδρογόνου}}$ ) τις εξωτερικές συντεταγμένες της ενέργειας. Ο τελευταίος όρος ( $E_{\text{περιοριστικών συνθηκών}}$ ) αναφέρεται στις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις και αντικατοπτρίζει την ενέργεια λόγω περιοριστικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων (Leach, 2001).

Οι θεωρητικές τιμές της ενέργειας των εξεταζόμενων φαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.2** και στα **Σχήματα 4.2-4.10** απεικονίζονται οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά φαινολικές ενώσεις.

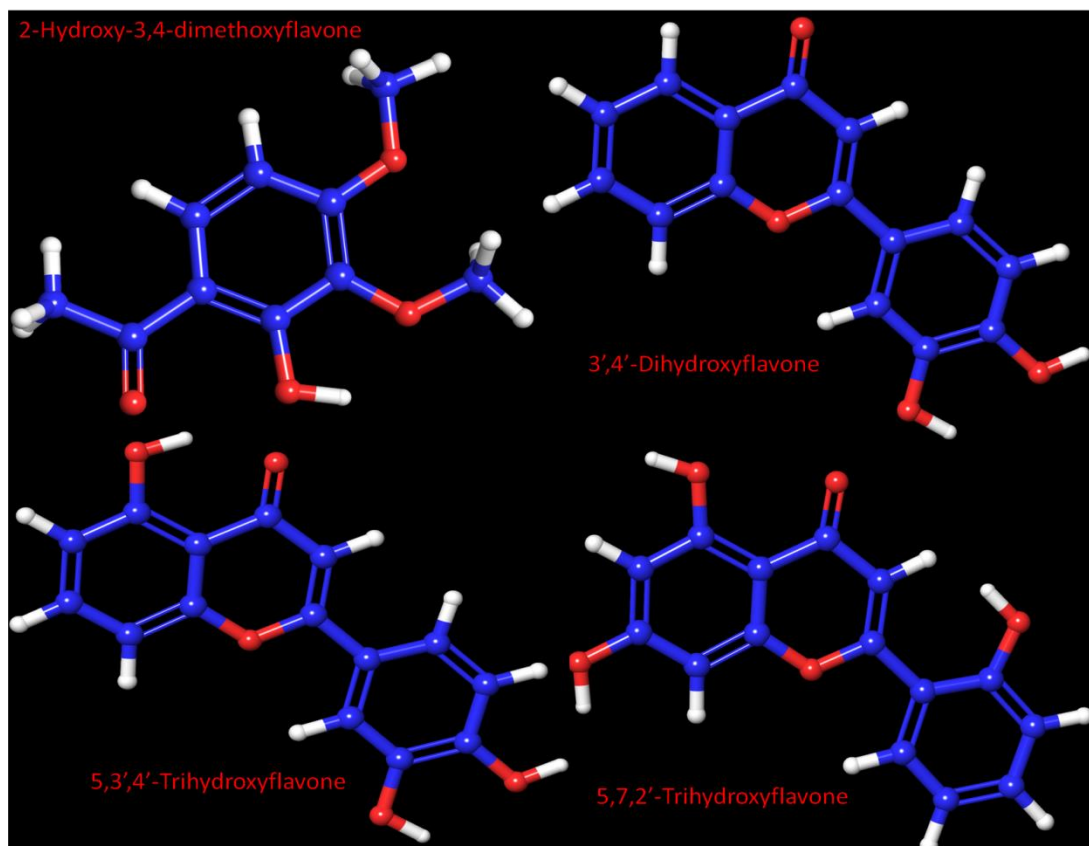
**Πίνακας 4.2:** Θεωρητικές τιμές ενέργειας των φυσικών ενώσεων μετά την εφαρμογή ελαχιστοποίησης της ενέργειας

Ονοματολογία ένωσης	Θεωρητική τιμή Δυναμικής ενέργειας (kJ/mol)	Θεωρητική τιμή Δυναμικής ενέργειας (kcal/mol)
3',4' Dihydroxyflavone	-31,94	-7,627
6,3',4' Trihydroxyflavone	-70,213	-16,767
5,3',4' Trihydroxyflavone	-199,367	-47,609
Luteolin	-381,022	-90,988
7,3',4' Trihydroxyflavone	-186,671	-44,577
5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone	-386,51	-92,299
6,7,3' Trihydroxyflavone	-126,24	-30,146
Chrysin	-362,292	-86,515
5,7,2' Trihydroxyflavone	-395,138	-94,359
Apigenin	-474,615	-113,338
7,2',4' Trimethoxyflavone	-98,318	-23,478
7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	124,44	29,716
Kaempferide	-249,549	-59,592
Galangin	-204,212	-48,766
Juglanin	-202,822	-48,434
Daidzein	-184,402	-44,035
Genistein	-426,668	-101,888
Biochanin A	-363,166	-86,724
Formononetin	-120,794	-28,846
Puerarin	-0,245	-0,059
Naringin	-217,247	-51,879
Hesperidin	-131,867	-31,489

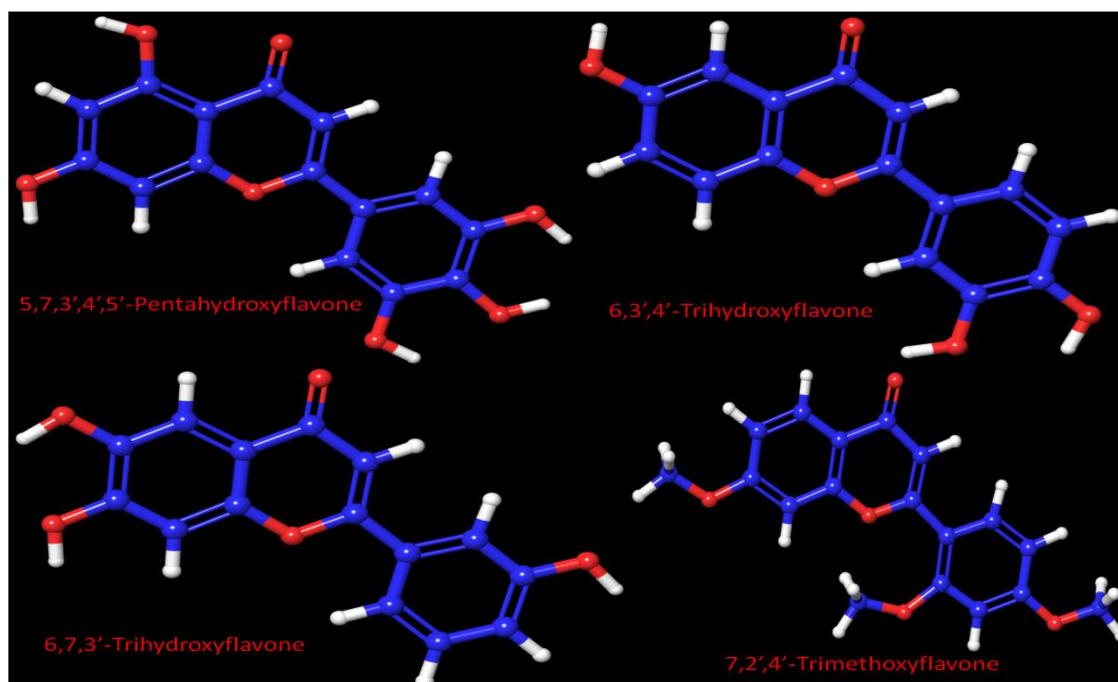
2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone	63,153	15,081
Pyrogalllic acid	48,997	11,700
2,3,4-Trihydroxyacetophenone	-32,661	-7,799
2,4,6-Trihydroxyacetophenone	-531,605	-126,947
2-Hydroxy-3,4-dimethoxyacetophenone	-10,487	-2,504
2,4 Dihydroxyacetophenone	-282,172	-67,383
Chlorogenic acid	-54,913	-13,113
Quercetin	-232,026	-55,408
Rutin	30,331	7,243
Kaempferol	-313,897	-74,959
(+/-)-Catechin	-245,975	-58,739
Naringenin	-685,737	-163,754



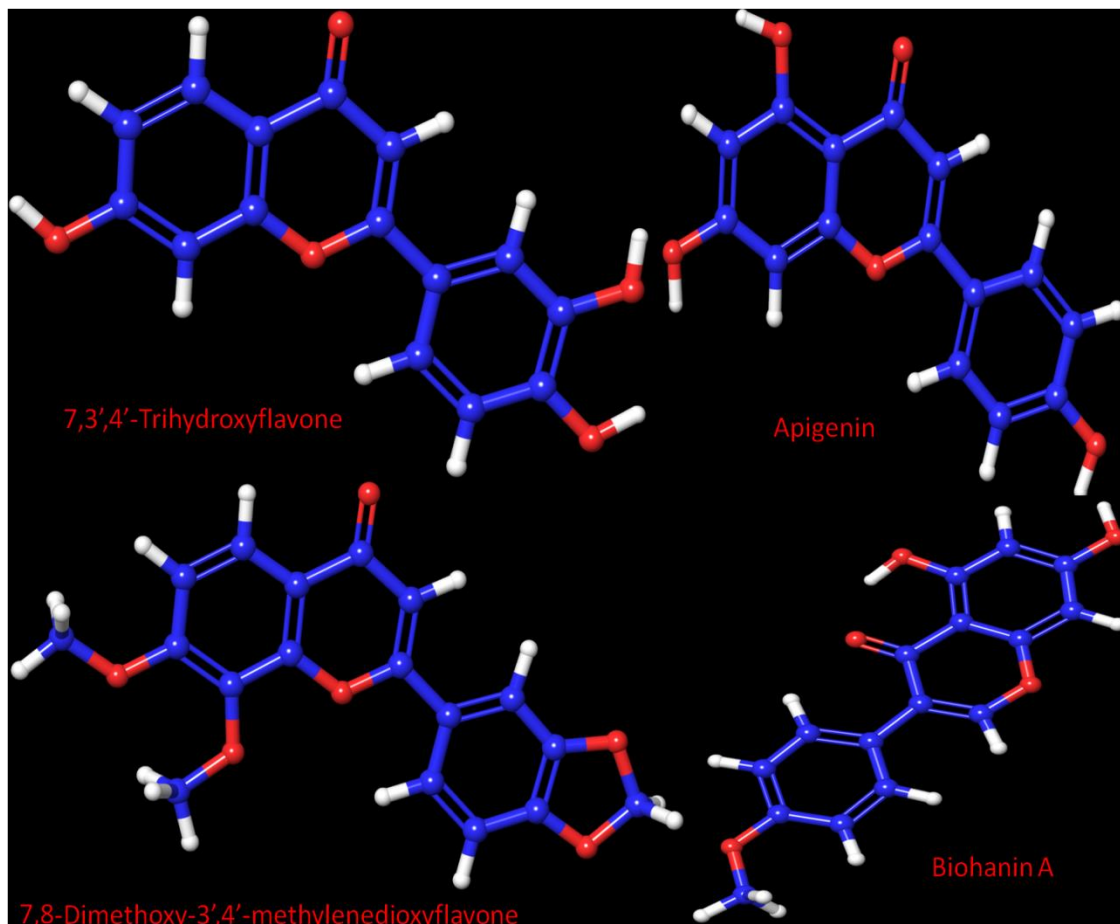
**Σχήμα 4.2:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 2,3,4-Trihydroxyacetophenone, 2,4-Dihydroxyflavone, 2,4,6-Trihydroxyacetophenone και 2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone.



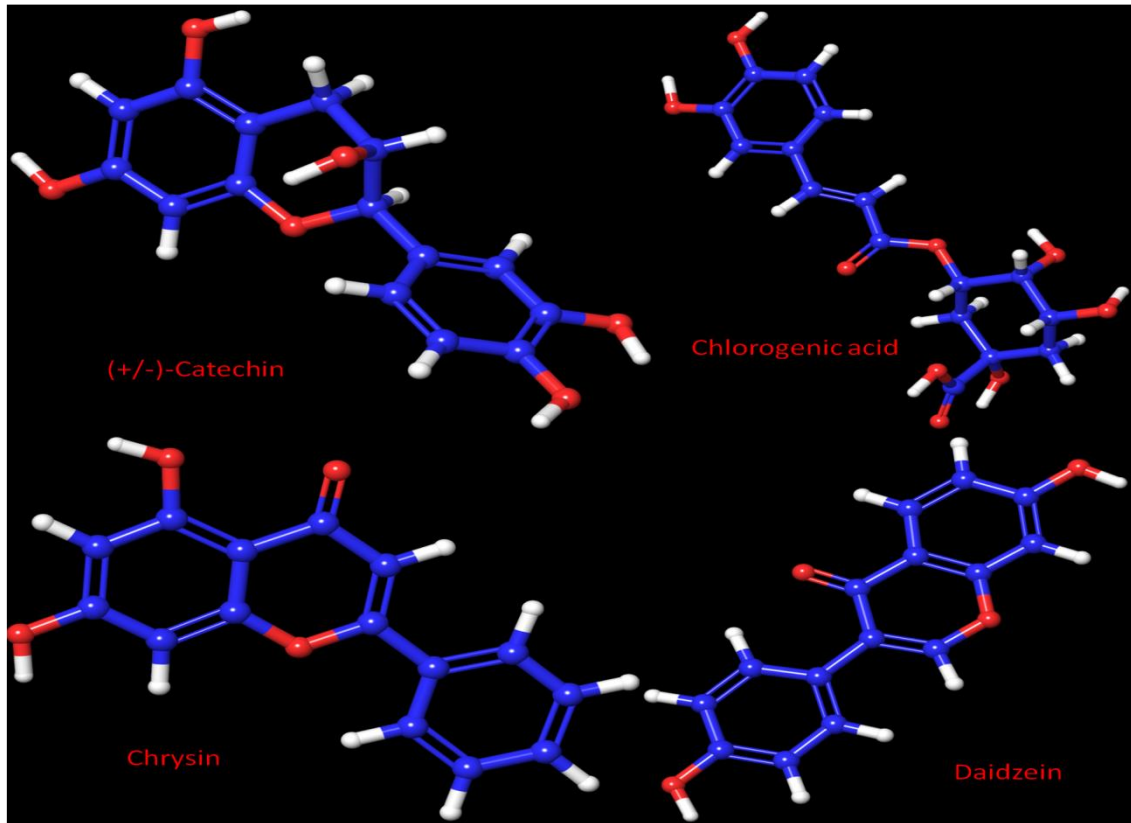
**Σχήμα 4.3:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 2-Hydroxy-3,4-dimethoxyflavone, 3',4'-Dihydroxyflavone, 5,3',4'-Trihydroxyflavone και 5,7,2'-Trihydroxyflavone.



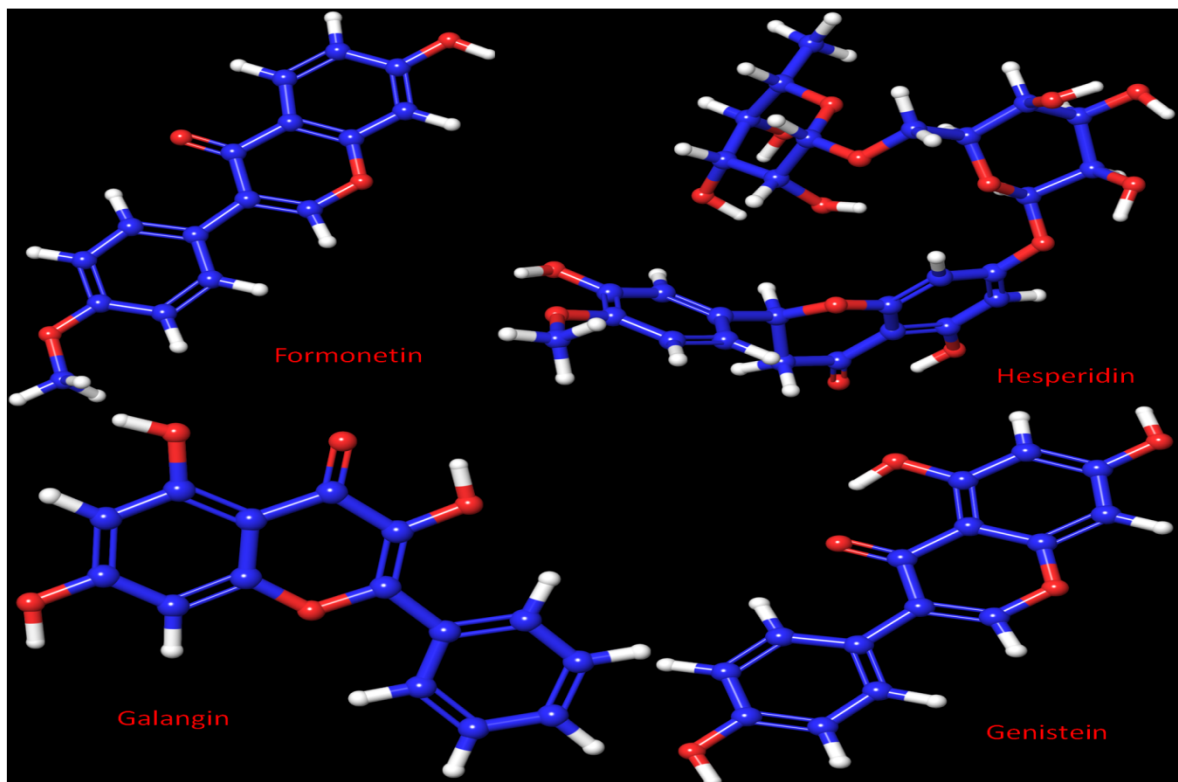
**Σχήμα 4.4:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavone, 6,3',4'-Trihydroxyflavone, 6,7,3'-Trihydroxyflavone και 7,2,4'-Trimethoxyflavone.



**Σχήμα 4.5:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των 7,3',4'-Trihydroxyflavone, Apigenin, 7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone και Biohanin A.

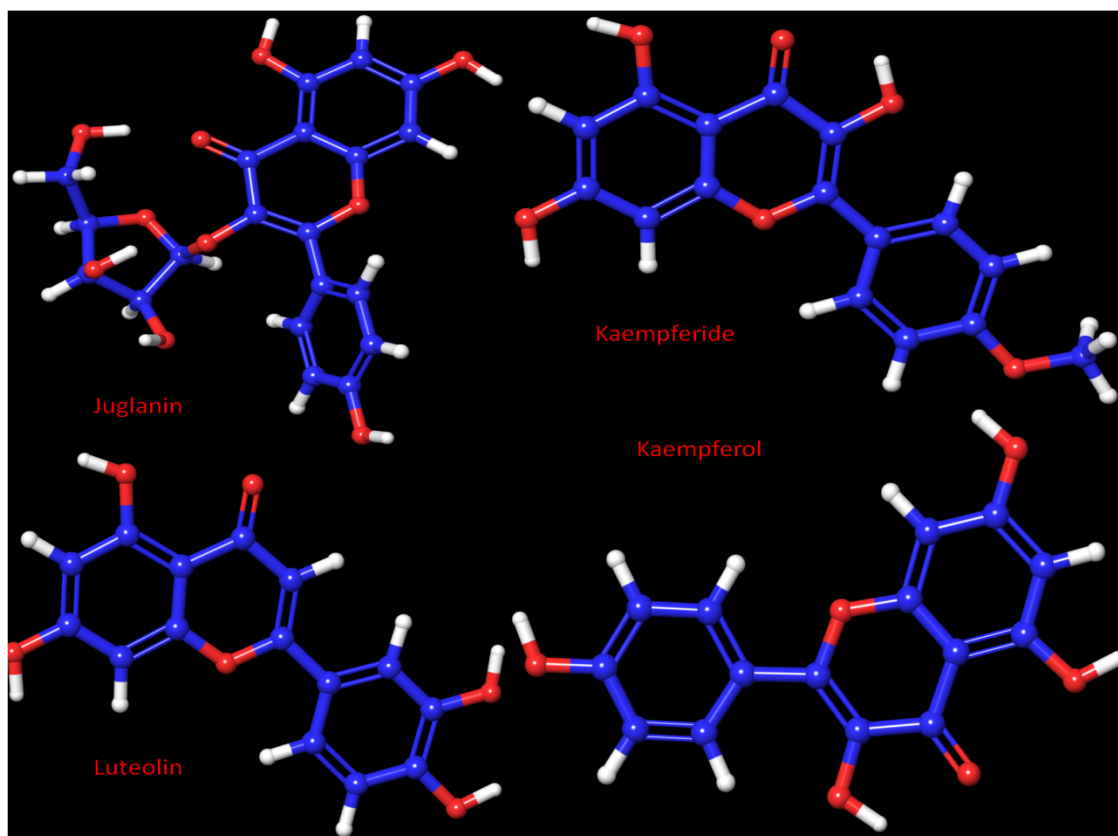


*Σχήμα 4.6: Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των (+/-)-Catechin, Chlorogenic acid, Chrysin και Daidzein.*

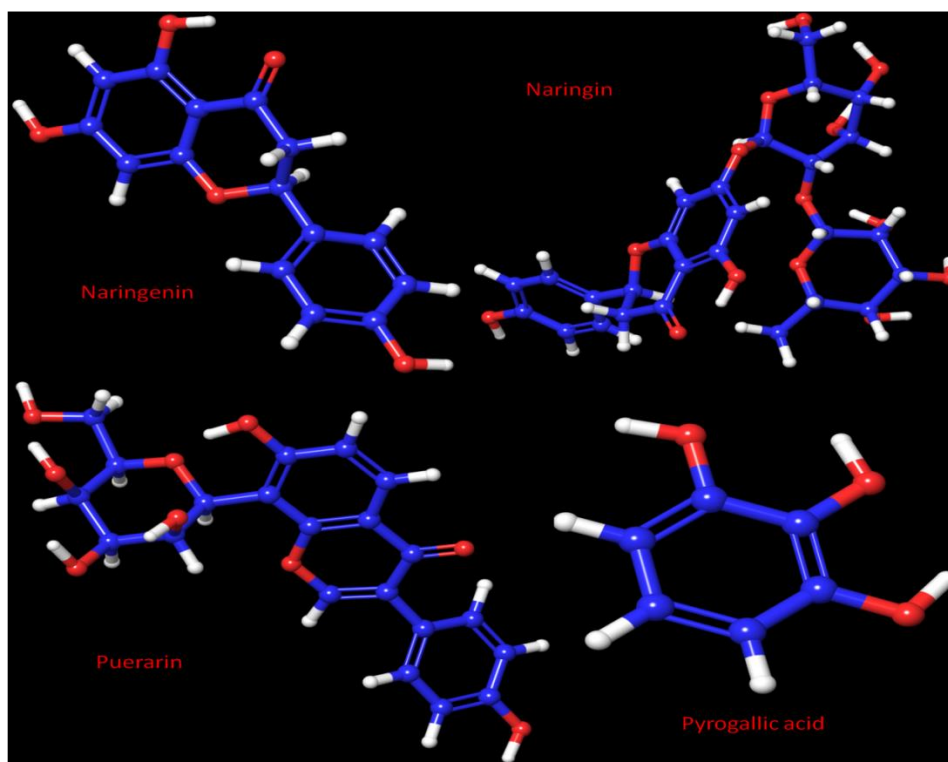




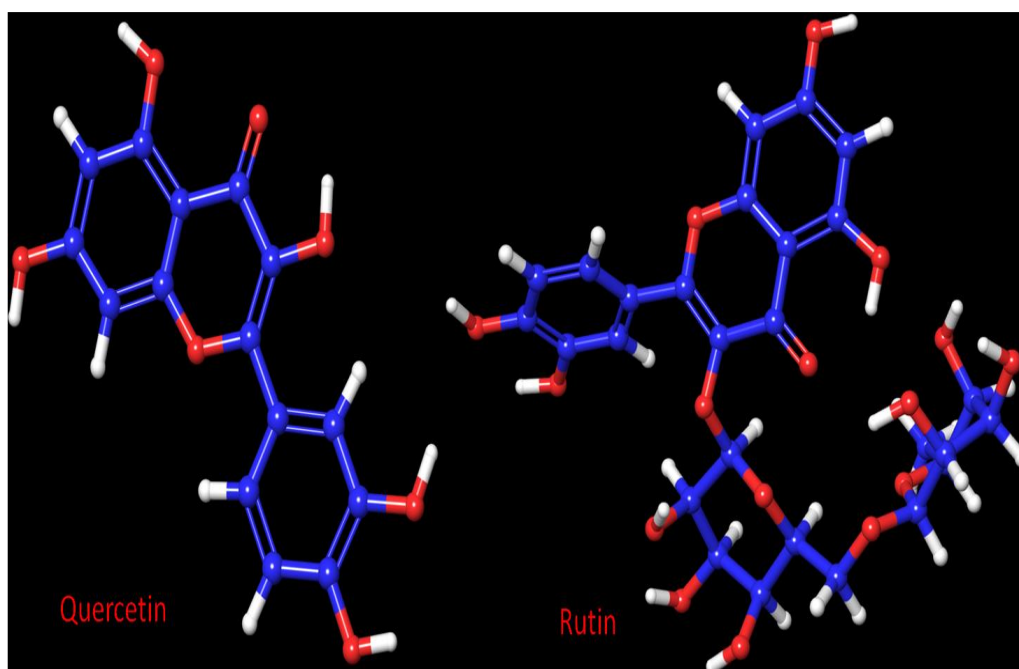
**Σχήμα 4.7:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των *Formonetin*, *Hesperidin*, *Galangin* και *Genistein*.



**Σχήμα 4.8:** Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των *Juglanin*, *Kaempferide*, *Kaempferol* και *Luteolin*.



*Σχήμα 4.9: Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Naringenin, Naringin, Puerarin και Pyrogalllic acid.*



*Σχήμα 4.10: Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις των Quercetin και Rutin.*

#### 4.4 Πρόβλεψη περιγραφικών παραμέτρων (Prediction of the descriptors)

Έπειτα από τη μετατροπή των δομών των φαινολικών ενώσεων σε τριδιάστατη μορφή (3D) και την ελαχιστοποίηση της ενέργειας τους, πραγματοποιήθηκε θεωρητικός υπολογισμός πλήθους περιγραφικών μεταβλητών (φυσικοχημικών και τοπολογικών), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο στάδιο της μελέτης.

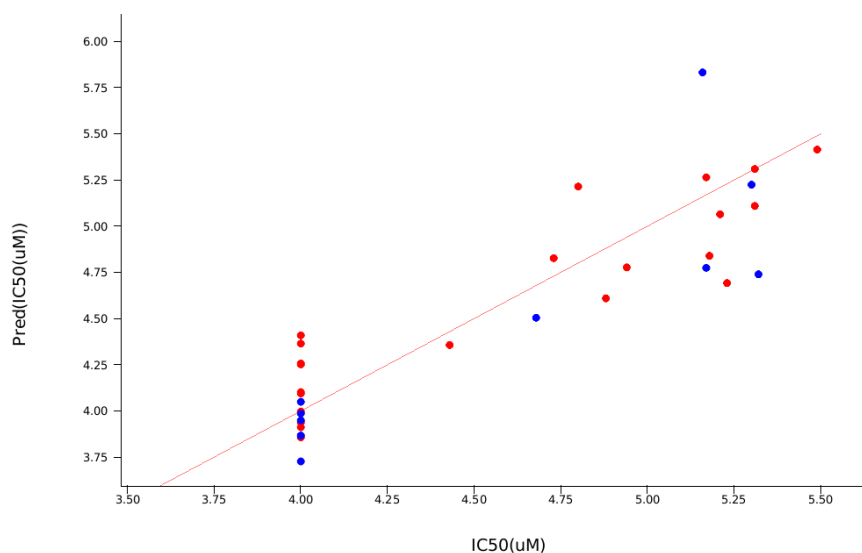
Παράλληλα, οι τιμές  $IC_{50}$  των φαινολικών ενώσεων εκφράστηκαν σε λογαριθμικές μονάδες και συγκεκριμένα με τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο,  $pIC_{50} = \log(1/IC_{50})$  (Πίνακας 4.3).

**Πίνακας 4.3:** Λογαριθμημένες τιμές  $IC_{50}$  των φαινολικών ενώσεων,  $pIC_{50} = \log(1/IC_{50})$

Ένωση	Τιμές $pIC_{50}$	Ένωση	Τιμές $pIC_{50}$
3',4' Dihydroxyflavone	5,320	Biochanin A	4,000
6,3',4' Trihydroxyflavone	5,300	Formononetin	4,000
5,3',4' Trihydroxyflavone	5,230	Puerarin	4,000
Luteolin	5,180	Naringin	4,000
7,3',4' Trihydroxyflavone	5,170	Hesperidin	4,000
5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone	4,800	2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone	5,310
6,7,3' Trihydroxyflavone	4,730	Pyrogalllic acid	5,170
Chrysin	4,000	2,3,4-Trihydroxyacetophenone	4,940
5,7,2' Trihydroxyflavone	4,000	2,4,6-Trihydroxyacetophenone	4,000
Apigenin	4,000	2-Hydroxy-3,4 dimethoxyacetophenone	4,000
7,2',4' Trimethoxyflavone	4,000	2,4 Dihydroxyacetophenone	4,000
7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	4,000	Chlorogenic acid	5,160
Kaempferide	4,680	Quercetin	5,490
Galangin	4,430	Rutin	5,310
Juglanin	4,000	Kaempferol	4,880
Daidzein	4,000	(+/-)-Catechin	5,210
Genistein	4,000	Naringenin	4,000

#### 4.5 Δημιουργία ποσοτικών μοντέλων QSAR βασιζόμενα στις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors)

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε δοκιμή δημιουργίας ενός ποσοτικού μοντέλου με συμμετοχή του συνόλου των φαινολικών ενώσεων που απαρτίζουν το δειγματοχώρο (**Σχήμα 4.1**) δεδομένου ότι παρουσιάζουν διαφοροποιημένους δομικούς σκελετούς και ποικιλομορφία στους υποκαταστάτες τους. Για την παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε ανάλυση με Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση (Multiple Linear Regression) για να ποσοτικοποιηθεί η σχέση μεταξύ γραμμικών συνδυασμών της εξαρτώμενης μεταβλητής  $IC_{50}$  και η στατιστική σημασία των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων. Η επικύρωση του μοντέλου είναι σημαντική διότι κατά αυτόν τον τρόπο, αναγνωρίζεται και δύναται να εκτιμηθεί η ικανότητα πρόβλεψής του. Οι 34 φαινολικές ενώσεις οι οποίες απαρτίζουν το δειγματοχώρο διαχωρίζονται τυχαία σε training set (70%) που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία του μοντέλου και σε test set (30%) που είναι υπεύθυνο για την επικύρωση του μοντέλου. Στο **Σχήμα 4.11** παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών τιμών των φαινολικών ενώσεων με τις τιμές πρόβλεψης για τη μέθοδο DPPH.



**Σχήμα 4.11:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης για όλες τις ενώσεις για τη μέθοδο DPPH.

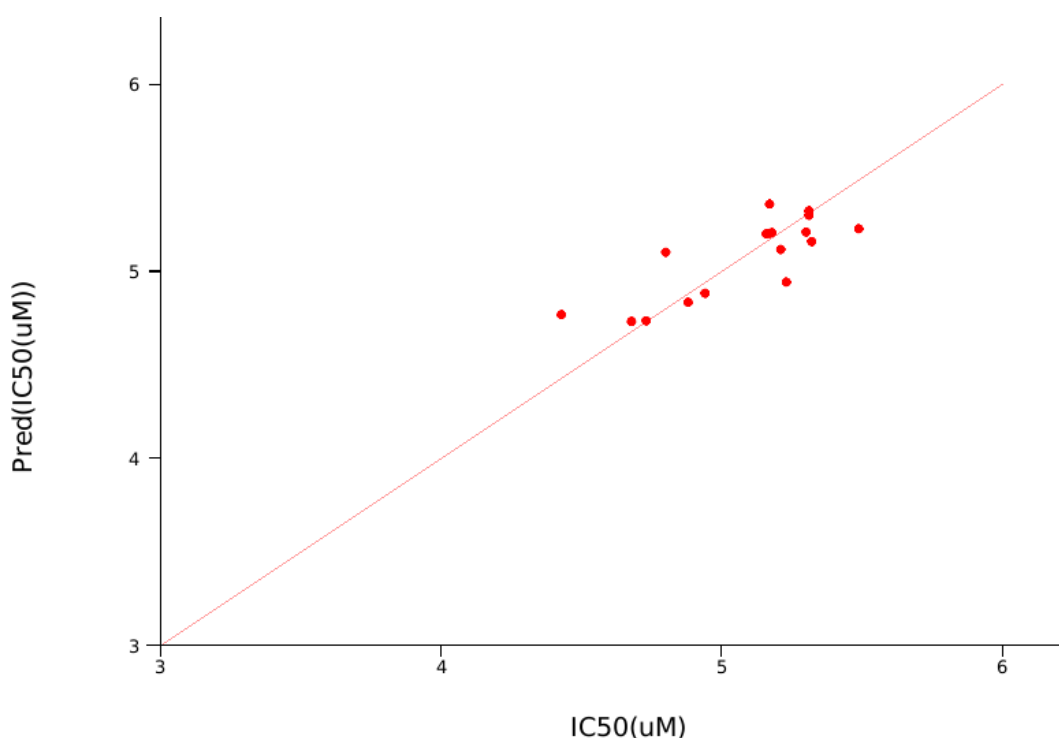
Τα στατιστικά δεδομένα και συγκεκριμένα ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  ( $R^2 = 0,834$ ) και ο συντελεστής συσχέτισης ικανότητας πρόβλεψης  $Q^2$  ( $Q^2 = 0,723$ ), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο φέρει περιθώρια βελτίωσης. Στον **Πίνακα 4.4** παρουσιάζονται οι φαινολικές ενώσεις, ο καταμερισμός τους σε training set και test set και παράλληλα αναγράφονται οι λογαριθμημένες τιμές ( $pIC_{50}$ ) και οι τιμές πρόβλεψης.

**Πίνακας 4.4:** Καταμερισμός των φαινολικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$

Όνομα ένωσης	Ομαδοποίηση	$pIC_{50}$	Pred- $pIC_{50}$
3',4' Dihydroxyflavone	Test	5,320	4,787
6,3',4' Trihydroxyflavone	Test	5,300	5,261
5,3',4' Trihydroxyflavone	Training	5,230	4,700
Luteolin	Training	5,180	4,885
7,3',4' Trihydroxyflavone	Training	5,170	5,353
5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone	Training	4,800	5,223
6,7,3' Trihydroxyflavone	Training	4,730	4,834
Chrysin	Test	4,000	3,761
5,7,2' Trihydroxyflavone	Training	4,000	4,407
Apigenin	Training	4,000	3,965
7,2',4' Trimethoxyflavone	Test	4,000	4,018
7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	Training	4,000	3,912
Kaempferide	Test	4,680	4,458
Galangin	Training	4,430	4,334
Juglanin	Training	4,000	4,270
Daidzein	Training	4,000	4,090
Genistein	Training	4,000	4,243
Biochanin A	Test	4,000	3,931
Formononetin	Training	4,000	3,793
Puerarin	Training	4,000	4,080
Naringin	Test	4,000	4,023
Hesperidin	Training	4,000	4,038
2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone	Training	5,310	5,240
Pyrogalllic acid	Test	5,170	4,818
2,3,4-Trihydroxyacetophenone	Training	4,940	4,760
2,4,6-Trihydroxyacetophenone	Training	4,000	3,934
2-Hydroxy-3,4 dimethoxyacetophenone	Test	4,000	3,932
2,4 Dihydroxyacetophenone	Training	4,000	4,281
Chlorogenic acid	Test	5,160	5,814
Quercetin	Training	5,490	5,406

Rutin	Training	5,310	5,110
Kaempferol	Training	4,880	4,574
(+/-)-Catechin	Training	5,210	5,069
Naringenin	Training	4,000	4,177

Σε δεύτερο στάδιο δημιουργήθηκε ποσοτικό μοντέλο από το οποίο αφαιρέθηκαν όλες οι μη δραστικές ενώσεις ( $pIC_{50}=4,000$ ). Με την ίδια ακριβώς μέθοδο όπως και στο πρώτο μοντέλο πραγματοποιήθηκε καταμερισμός των ενώσεων που απέμειναν σε training test (70%) και test set (30%). Στο **Σχήμα 4.12** παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών τιμών των φαινολικών ενώσεων, εκτός των μη δραστικών, με τις τιμές πρόβλεψης για τη μέθοδο DPPH.



**Σχήμα 4.12:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης μόνο για τις δραστικές ενώσεις για τη μέθοδο DPPH.

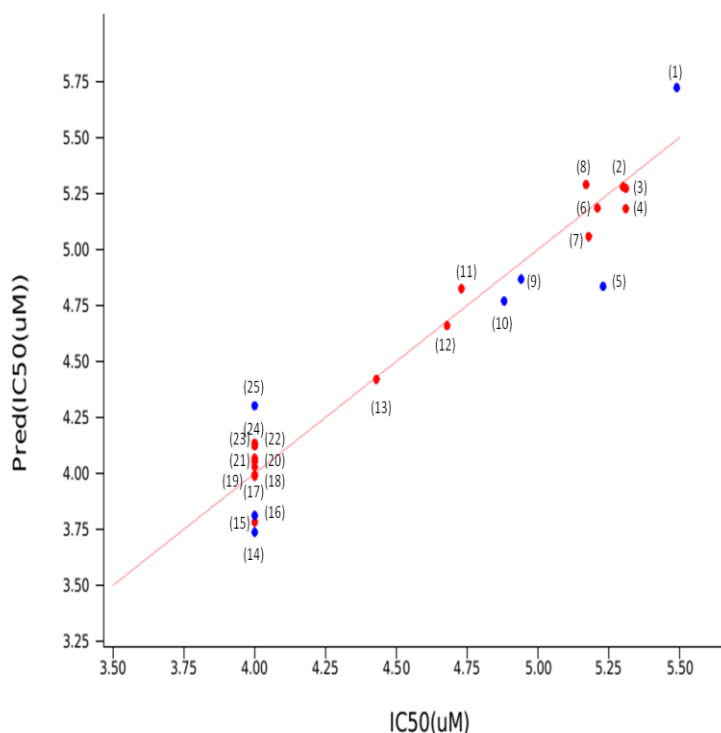
Τα στατιστικά δεδομένα για το δεύτερο μοντέλο και συγκεκριμένα ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  ( $R^2 = 0,833$ ), ο συντελεστής συσχέτισης ικανότητας πρόβλεψης  $Q^2$  ( $Q^2 = -27449$ ) και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson ( $r$ -Pearson = 0,087) έκριναν ότι το μοντέλο ως ακατάλληλο και μη αξιόπιστο για περαιτέρω ανάλυση. Επιπρόσθετα, συγκριτικά με το πρώτο μοντέλο, η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου μειώθηκε δραματικά. Στον **Πίνακα 4.5** παρουσιάζονται οι δραστικές φαινολικές ενώσεις, ο

καταμερισμός τους σε training set και test set και παράλληλα αναγράφονται οι λογαριθμημένες τιμές ( $pIC_{50}$ ) και οι τιμές πρόβλεψης.

**Πίνακας 4.5:** Καταμερισμός των δραστικών φαινολικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$

Όνομα ένωσης	Ομαδοποίηση	$pIC_{50}$	Pred- $pIC_{50}$
3',4' Dihydroxyflavone	Test	5,320	5,344
6,3',4' Trihydroxyflavone	Test	5,300	5,106
5,3',4' Trihydroxyflavone	Training	5,230	4,974
Luteolin	Training	5,180	5,385
7,3',4' Trihydroxyflavone	Training	5,170	5,157
5,7,3',4',5' Pentahydroxyflavone	Training	4,800	4,930
6,7,3' Trihydroxyflavone	Training	4,730	4,806
Kaempferide	Test	4,680	6,264
Galangin	Training	4,430	4,530
2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone	Training	5,310	5,327
Pyrogalllic acid	Test	5,170	91,165
2,3,4-Trihydroxyacetophenone	Training	4,940	4,923
Chlorogenic acid	Test	5,160	8,576
Quercetin	Training	5,490	5,421
Rutin	Training	5,310	5,309
Kaempferol	Training	4,880	4,853
(+/-)-Catechin	Training	5,210	5,063

Στο τρίτο στάδιο δημιουργήθηκε ποσοτικό μοντέλο από το οποίο αφαιρέθηκε ένας συνδυασμός από δραστικές ενώσεις με έκτροπες τιμές (outliers) και μη δραστικές ενώσεις. Με την ίδια ακριβώς μέθοδο όπως και στα 2 προηγούμενα μοντέλα, πραγματοποιήθηκε καταμερισμός των ενώσεων που απέμειναν σε training test (70%) και test set (30%). Στο **Σχήμα 4.13** παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών τιμών των φαινολικών ενώσεων, έπειτα από αφαίρεση δραστικών και μη δραστικών ενώσεων με τις τιμές πρόβλεψης για τη μέθοδο DPPH.



(1)-Quercetin, (2)- 2-Chloro-3',4' Dihydroxyacetophenone, (3)- 6,3',4'-Trihydroxyflavone, (4)-Rutin, (5)- 5,3',4'-Trihydroxyflavone, (6)- Catechin (7)-Luteolin, (8)- 7,3',4'-Trihydroxyflavone, (9)- 2,3,4-Trihydroxyflavone, (10)- Kaempferol, (11)- 6,7,3'-Trihydroxyflavone, (12)- Kaempferide (13)- Galangin, (14)- 7,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone, (15)- Formonetin, (16)- Naringin, (17)-Apigenin, (18)- 7,2',4'-Trimethoxyflavone (19)- 2-Hydroxy-3,4-dimethoxyacetophenone, (20)- Puerarin, (21)- Daidzein, (22)- 2,4,6-Trihydroxyacetophenone, (23) – Hesperidin, (24)- Naringenin (25)- 2,4-Dihydroxyacetophenone

**Σχήμα 4.13:** Συσχέτιση πειραματικών τιμών και τιμών πρόβλεψης έπειτα από αφαίρεση συνδυασμού δραστικών και μη δραστικών ενώσεων για τη μέθοδο DPPH.

Τα στατιστικά δεδομένα για το τρίτο μοντέλο και συγκεκριμένα ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  ( $R^2 = 0,975$ ), ο συντελεστής συσχέτισης ικανότητας πρόβλεψης  $Q^2$  ( $Q^2 = 0,826$ ) και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson ( $r$ -Pearson = 0,929), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο είναι κατάλληλο και αξιόπιστο για ανάλυση και περαιτέρω χρήση. Επιπρόσθετα, συγκριτικά με τα 2 προηγούμενα μοντέλα, η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου αυξήθηκε. Στον **Πίνακα 4.6** παρουσιάζονται οι φαινολικές ενώσεις μετά από την αφαίρεση συνδυασμού δραστικών ενώσεων με έκτροπες τιμές (outliers) και μη δραστικών ενώσεων, ο καταμερισμός τους σε training set και test set και παράλληλα αναγράφονται οι λογαριθμημένες τιμές ( $\rho IC_{50}$ ) και οι τιμές πρόβλεψης.



**Πίνακας 4.6:** Καταμερισμός των δραστικών φαινολικών ενώσεων έπειτα από αφαίρεση συνδυασμού δραστικών ενώσεων με έκτροπες τιμές (outliers) και μη δραστικών ενώσεων σε training set και test set και οι τιμές  $pIC_{50}$  – τιμές πρόβλεψης  $pIC_{50}$

Ονοματολογία ένωσης	Ομαδοποίηση	$pIC_{50}$	Pred- $pIC_{50}$	Διαφορά $pIC_{50}$ - Pred- $pIC_{50}$
6,3',4'- Trihydroxyflavone	Training	5,300	5,280	0,020
5,3',4' -Trihydroxyflavone	Test	5,230	4,833	0,387
Luteolin	Training	5,180	5,057	0,123
7,3',4'- Trihydroxyflavone	Training	5,170	5,288	-0,118
6,7,3'- Trihydroxyflavone	Training	4,730	4,824	-0,094
Apigenin	Training	4,000	3,987	0,013
7,2',4'- Trimethoxyflavone	Training	4,000	3,989	0,011
7,8-Dimethoxy-3',4'- methylenedioxyflavone	Test	4,000	3,735	0,265
Kaempferide	Training	4,680	4,660	0,020
Galangin	Training	4,430	4,420	0,010
Daidzein	Training	4,000	4,051	-0,051
Formonetin	Training	4,000	3,782	0,218
Puerarin	Training	4,000	4,029	-0,029
Naringin	Test	4,000	3,810	0,190
Hesperidin	Training	4,000	4,120	-0,120
2-Chloro-3',4'- Dihydroxyacetophenone	Training	5,310	5,272	0,038
2,3,4- Trihydroxyacetophenone	Test	4,940	4,865	0,075
2,4,6- Trihydroxyacetophenone	Training	4,000	4,066	-0,066
2-Hydroxy-3,4- dimethoxyacetophenone	Training	4,000	3,995	0,005
2,4- Dihydroxyacetophenone	Test	4,000	4,301	-0,301
Quercetin	Test	5,490	5,720	-0,230
Rutin	Training	5,310	5,182	0,128
Kaempferol	Test	4,880	4,768	0,112
Catechin	Training	5,210	5,184	0,026
Naringenin	Training	4,000	4,134	-0,134

Οι ενώσεις οι οποίες αφαιρέθηκαν για να δημιουργηθεί το συγκεκριμένο μοντέλο είναι οι ακόλουθες:

- 3',4'- Dihydroxyflavone (Έκτροπη τιμή-Outlier)
- 5,7,3',4',5' –Pentahydroxyflavone (Έκτροπη τιμή-Outlier)
- Chrysin (Μη δραστική)
- Juglanin (Μη δραστική)
- Genistein (Μη δραστική)
- Biohanin A (Μη δραστική)
- Pyrogalllic acid (Έκτροπητιμή-Outlier)
- Chlorogenic acid (Έκτροπητιμή-Outlier)
- 5,7,2' –Trihydroxyflavone (Μη δραστική)

Η εξίσωση του μοντέλου, βασιζόμενη στις φυσικοχημικές περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) έπειτα από επιλογή αυτών με την μεγαλύτερη τιμή, είναι η εξής:

$$pIC_{50} = 4,103 (\pm 0,153) + 2,355 (\pm 0,206) EA(eV) + 0,103 (\pm 0,013) QPlogPo/w - 0,394 (\pm 0,034) QPlogPoct - 1,110 (\pm 0,283) dip^2/V + 1,639 (\pm 0,128) donorHB$$

Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται τα στατιστικά δεδομένα της ανωτέρω εξίσωσης.

**Πίνακας 4.7:** Στατιστικά δεδομένα της εξίσωσης του μοντέλου

N	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	F	RMSE
25	0,975	0,826	89,103	0,247

N= Αριθμός φαινολικών ενώσεων

R<sup>2</sup> = Συντελεστής συσχέτισης

Q<sup>2</sup> = Συντελεστής συσχέτισης ικανότητας πρόβλεψης

F = Αναλογία Fisher

RMSE = Ρίζα μέσου τετραγωνικού σφάλματος

Αναφορικά για την εξίσωση, το θετικό πρόσημο (+) έχει θετική συνεισφορά στο μοντέλο. Η θετική συνεισφορά αντικατοπτρίζει μεγαλύτερο λογάριθμο ( $pIC_{50}$ ), ο οποίος με τη σειρά του αντιστοιχεί σε καλύτερη δράση των φαινολικών ενώσεων. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερη τιμή έχει μία φυσικοχημική περιγραφική παράμετρος (descriptor), τόσο μεγαλύτερη είναι η συνεισφορά και αναλογικά αυξάνεται και ο λογάριθμος ο οποίος “μεταφράζεται” σε καλύτερη δράση της ένωσης. Το αντίθετο ισχύει στην περίπτωση του αρνητικού προσήμου (-) όπου έχει αρνητική συνεισφορά. Στον **Πίνακα 4.8** παρουσιάζονται οι τιμές των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) για τις 25 φαινολικές ενώσεις.

**Πίνακας 4.8:** Τιμές των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) για τις 25 φαινολικές ενώσεις

Ονοματολογία ένωσης	EA(eV)	QPlogPo/w	QPlogPoct	dip <sup>2</sup> /V	donorHB
6,3',4'- Trihydroxyflavone	0,989	1,041	16,556	0,022	3
5,3',4' -Trihydroxyflavone	1,071	1,651	14,701	0,041	2
Luteolin	0,862	0,92	16,33	0,013	3
7,3',4'- Trihydroxyflavone	0,934	1,041	16,265	0,001	3
6,7,3'- Trihydroxyflavone	0,99	1,038	17,516	0,093	3
Apigenin	0,782	1,597	15,027	0,061	2
7,2',4'- Trimethoxyflavone	0,812	3,136	12,925	0,005	0
7,8-Dimethoxy-3',4'- methylenedioxyflavone	0,898	2,751	13,869	0,026	0
Kaempferide	0,776	1,818	15,076	0,015	2
Galangin	0,826	1,693	14,335	0,028	2
Daidzein	0,665	1,727	14,285	0,040	2
Formonetin	0,651	2,556	13,138	0,034	1
Puerarin	0,53	-0,413	29,64	0,065	6
Naringin	0,858	-1,493	37,536	0,003	7
Hesperidin	0,816	-1,277	38,735	0,025	7
2-Chloro-3',4'- Dihydroxyacetophenone	0,691	0,768	10,413	0,018	2
2,3,4- Trihydroxyacetophenone	0,466	0,142	10,366	0,093	2
2,4,6- Trihydroxyacetophenone	0,274	0,593	7,795	0,051	1
2-Hydroxy-3,4- dimethoxyacetophenone	0,36	1,636	8,288	0,073	0
2,4- Dihydroxyacetophenone	0,352	1,329	7,928	0,054	1

Quercetin	0,857	0,317	18,06	0,011	4
Rutin	0,839	-2,015	41,142	0,010	9
Kaempferol	0,79	0,965	16,551	0,046	3
Catechin	0,012	0,471	19,522	0,004	5
Naringenin	0,584	1,619	14,452	0,007	2

Ερμηνεία των φυσικοχημικών περιγραφικών παραμέτρων (descriptors):

- **EA(eV):** Υπολογισμένη ηλεκτρονιακή συγγένεια
- **QPlogPo/w:** Συντελεστής πρόβλεψης διαχωρισμού οκτανόλης/νερού (λιποφιλικότητα)
- **QPlogPoct:** Συντελεστής πρόβλεψης διαχωρισμού οκτανόλης/αερίου
- **dip<sup>2</sup>/V:** Τετράγωνο της διπολικής ροπής διαιρεμένο με το μοριακό όγκο
- **donorHB:** Εκτιμώμενος αριθμός των δεσμών υδρογόνου που προσφέρονται από τη διαλύμενη ουσία στα μόρια του νερού σε ένα υδατικό διάλυμα

Στο σημείο αυτό, σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκαν δοκιμές δημιουργίας μοντέλου και με τη χρήση τοπολογικών περιγραφικών παραμέτρων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έκριναν ότι κανένα από τα μοντέλα δεν αποτελεί αξιόπιστο «εργαλείο» και δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ενδεικτική σύγκριση μεταξύ ορισμένων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες απαρτίζουν το δειγματοχώρο του τελικού μοντέλου, ως προς την αντιριζική δράση.

- **Σύγκριση 6,3',4' –Trihydroxyflavone και 6,7,3' – Trihydroxyflavone**

Όπως προαναφέρθηκε, το θετικό πρόσημο (+) στην εξίσωση του μοντέλου προσδίδει θετική συνεισφορά. Οι τιμές των περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) EA(eV) και QPlogPo/w των δύο ενώσεων είναι παραπλήσιες οπότε δεν παρουσιάζεται σημαντική διαφορά ως προς αυτούς. Ως προς τις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) QPlogPoct και dip<sup>2</sup>/V οι οποίες με βάση την εξίσωση έχουν αρνητική συνεισφορά, προκύπτει ότι η ένωση με τη μεγαλύτερη τιμή θα έχει μικρότερη αντιριζική δράση λόγω του αρνητικού προσήμου. Ως προς την περιγραφική παράμετρο (descriptor) donorHB παρουσιάζονται ίδιες τιμές. Εν

κατακλείδι, η 6,7,3' – Trihydroxyflavone που έχει μεγαλύτερες τιμές στις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) με αρνητική συνεισφορά αναμένεται να έχει μικρότερη ικανότητα αντιριζικής δράσης από την 6,3',4' – Trihydroxyflavone. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.6**, αυτό επιβεβαιώνεται από τις τιμές  $pIC_{50}$ , διότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αρνητικός λογάριθμος του  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιριζική δράση.

- **Σύγκριση Quercetin και Rutin**

Για τιμές των περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) EA(eV) και QPlogPo/w οι οποίες έχουν θετική συνεισφορά, παρατηρείται ότι η Quercetin παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές σε σύγκριση με την Rutin. Ως προς τις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) QPlogPoct και  $dip^2/V$  οι οποίες έχουν αρνητική συνεισφορά, η Rutin παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή για την QPlogPoct ενώ για την  $dip^2/V$  παρουσιάζονται παραπλήσιες τιμές. Για την donorHB η οποία έχει θετική συνεισφορά, η Rutin έχει μεγαλύτερη τιμή. Συμπερασματικά, η Quercetin η οποία έχει μεγαλύτερες τιμές στις 2 πρώτες θετικές περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) (EA(eV) και QPlogPo/w) και μικρότερη τιμή στην αρνητική (QPlogPoct) ανάμενεται να έχει συνολικά μεγαλύτερη αντιριζική δράση από την Rutin, παρόλο που η Rutin έχει μεγαλύτερη τιμή στην τελευταία θετική περιγραφική παράμετρο (descriptor). Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.6**, αυτό επιβεβαιώνεται από τις τιμές  $pIC_{50}$ .

- **Σύγκριση 2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone και 2,3,4-Trihydroxyacetophenone**

Για τιμές των περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) EA(eV) και QPlogPo/w οι οποίες έχουν θετική συνεισφορά, παρατηρείται ότι η 2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές σε σύγκριση με την 2,3,4-Trihydroxyacetophenone. Ως προς τις περιγραφικές παραμέτρους (descriptors) QPlogPoct και  $dip^2/V$  οι οποίες έχουν αρνητική συνεισφορά, η 2-Chloro-3',4'-Dihydroxyacetophenone παρουσιάζει ελάχιστα μεγαλύτερη τιμή για την QPlogPoct αλλά αρκετά μικρότερη για την  $dip^2/V$ , συγκριτικά με την 2,3,4-Trihydroxyacetophenone. Για τη μεταβλητή donorHB η οποία έχει θετική συνεισφορά, έχουν παρόμοιες τιμές. Συμπερασματικά, η 2-Chloro-3',4'-

Dihydroxyacetophenone ως προς το σύνολο των περιγραφικών παραμέτρων (descriptors) αναμένεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιριζική δράση από την 2,3,4- Trihydroxyacetophenone. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.6**, αυτό επιβεβαιώνεται από τις τιμές  $ρIC_{50}$ .

Εν κατακλείδι, οι τιμές των descriptors δύναται να αποδωθούν και στη διαφορά της δομής μερικών φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, η Rutin επειδή έχει σαν υποκαταστάτη στο μόριο της τον δισακχαρίτη ρουτινόζη, ο οποίος διαθέτει αρκετούς δότες δεσμού υδρογόνου, παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή ως προς την περιγραφική παράμετρο  $donorHB$  έναντι της Quercetin (9 έναντι 4, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, επειδή η Rutin έχει μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηριστικών ομάδων και συγκεκριμένα υδροξυλίων (-OH) αναμένεται να έχει μικρότερη τιμή λιποφιλικότητας (μεγαλύτερη τιμή υδροφιλικότητας) ως προς την Quercetin. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον **Πίνακα 4.8**, ως προς τη περιγραφική μεταβλητή  $QPlogPo/w$  όπου για την Rutin η τιμή είναι -2,015 ενώ για την Quercetin 0,317.

### Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Σήμερα, η μελέτη του ρόλου των φυσικών φαινολικών ενώσεων στην Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων αποτελεί επιτακτική ανάγκη δεδομένης της αντιοξειδωτικής-αντιριζικής δράσης που προσφέρουν. Έχοντας ως γνώμονα την παραπάνω διαπίστωση, στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική σάρωση. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αναδείχθηκε η αντιοξειδωτική - αντιριζική δράση των φαινολικών ενώσεων καθώς και των μηχανισμών που υπόκεινται σε αυτή. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε χρήση φαινολικών ενώσεων στον σχεδιασμό και στην ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων με λειτουργικές ιδιότητες.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής-αντιριζικής δράσης και των φυσικοχημικών παραμέτρων σειράς φυσικά απαντώμενων φαινολικών ενώσεων, μέσω *in silico* τεχνικών και Ποσοτικών Μοντέλων Δομής-Δράσης (QSAR). Τα αποτελέσματα προέκριναν ότι προκύπτουν πέντε φυσικοχημικές παράμετροι ( $EA(eV)$ ,  $QPlogPo/w$ ,  $QPlogPoct$ ,  $dip^2/V$ ,  $donorHB$ ) οι οποίες σχετίζονται

με την αντιοξειδωτική δράση. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι ακόμα και ενώσεις που φέρουν όμοια δομικά χαρακτηριστικά δύναται να διαφέρουν ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους καθώς και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Ακόμη, η φυσική σημασία των φυσικοχημικών παραμέτρων δύναται να αντικατοπτριστεί και στις διαφορές των μοριακών δομών των φαινολικών ενώσεων.

Απώτερος σκοπός της εργασίας ήταν η δημιουργία ενός «εργαλείου πρόβλεψης» της αντιοξειδωτικής - αντιριζικής δράσης, ώστε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την προτεραιοποίηση της εξέτασης της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών ενώσεων, μέσω υπολογισμού περιγραφικών ιδιοτήτων.

## Βιβλιογραφία

### Άρθρο Περιοδικού

- Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L. A., Ramírez-Coronel, A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2007). Microbial tannases: Advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 47–59. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2>
- Alicja Urbaniak, Marcin Molski, & Małgorzata Szeląg. (2012). Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of trans-p-coumaric Acid and trans-sinapinic Acid. *Computational methods in Science and Technology*, 18, 117-128. <https://dx.doi.org/10.12921/cmst.2012.18.02.117-128>
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2019). Natural antioxidants of plant origin. In *Advances in Food and Nutrition Research*, 90, 1–81. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.011>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9, 709-748. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Chen, B., Zhang, T., Bond, T., & Gan, Y. (2015). Development of quantitative structure activity relationship (QSAR) model for disinfection byproduct (DBP) research: A review of methods and resources. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 260–279. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.054>
- Ciulu, M., Cádiz-Gurrea, M. L., & Segura-Carretero, A. (2018). Extraction and Analysis of Phenolic Compounds in Rice: A Review. *Molecules*, 23, 2890-2910. <https://doi.org/10.3390/molecules23112890>



- Darnag, R., Minaoui, B., & Fakir, M. (2017). QSAR models for prediction study of HIV protease inhibitors using support vector machines, neural networks and multiple linear regression. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.10.021>
- Ellison, S. L. (2016). Carotenoids: Physiology. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* 670–675. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00120-3>
- Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C. (2021). Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, 104887-104895. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104887>
- Giordano, M. E., Caricato, R., & Lionetto, M. G. (2020). Concentration Dependence of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Trolox in HeLa Cells: Involvement in the Induction of Apoptotic Volume Decrease. *Antioxidants*, 9, 1058-1070. <https://doi.org/10.3390/antiox9111058>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A., & Terekhov, R. P. (2020). ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1131-1158. <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>
- Kalogianni, A. I., Lazou, T., Bossis, I., & Gelasakis, A. I. (2020). Natural Phenolic Compounds for the Control of Oxidation, Bacterial Spoilage, and Foodborne Pathogens in Meat. *Foods*, 9, 794-822. <https://doi.org/10.3390/foods9060794>

- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Kazmi, S. R., Jun, R., Yu, M.-S., Jung, C., & Na, D. (2019). In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. *Computers in Biology and Medicine*, 106, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2019.01.008>
- Liao, G., Dong, W.-H., Yang, J.-L., Li, W., Wang, J., Mei, W.-L., & Dai, H.-F. (2018). Monitoring the Chemical Profile in Agarwood Formation within One Year and Speculating on the Biosynthesis of 2-(2-Phenylethyl)Chromones. *Molecules*, 23, 1261-1290. <https://doi.org/10.3390/molecules23061261>
- Lin, H.-C., Tsai, S.-H., Chen, C.-S., Chang, Y.-C., Lee, C.-M., Lai, Z.-Y., & Lin, C.-M. (2008). Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*, 75, 1416–1425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.11.023>
- Lučić, B., Amić, D., & Trinajstić, N. (2008). Antioxidant QSAR Modeling as Exemplified on Polyphenols. In D. Armstrong (Ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress I* 477, 207–218. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-517-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-517-0_16)
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Nagapan, T. S., Ghazali, A. R., Basri, D. F., & Lim, W. N. (2018). Photoprotective Effect of Stilbenes and its Derivatives Against Ultraviolet Radiation-Induced Skin Disorders. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11, 1199–1208. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1481>

- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7, <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00060>
- Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., & Andrade, P. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Rastija, V., & Medić-Šarić, M. (2009). QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.001>
- Ritchie, T. J., & Macdonald, S. J. F. (2014). Physicochemical Descriptors of Aromatic Character and Their Use in Drug Discovery: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 7206–7215. <https://doi.org/10.1021/jm500515d>
- Simpson, D., & Amos, S. (2017). Other Plant Metabolites. In S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy*, 12, 267–280. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00012-3>
- Soto, M., Falqué, E., & Domínguez, H. (2015). Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, 2, 259–276. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259>
- Zheng, C.-D., Li, G., Li, H.-Q., Xu, X.-J., Gao, J.-M., & Zhang, A.-L. (2010). DPPH-Scavenging Activities and Structure-Activity Relationships of Phenolic Compounds. *Natural Product Communications*, 5, 1759–1765. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501112>

## Βιβλία

- Anwar, H., Hussain, G., & Mustafa, I. (2018). Antioxidants from Natural Sources. In E. Shalaby & G. M. Azzam (Eds.), *Antioxidants in Foods and Its Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75961>
- Mauri, A., Consonni, V., & Todeschini, R. (2017). Molecular Descriptors. In J. Leszczynski, A. Kaczmarek-Kedziera, T. Puzyn, M. G. Papadopoulos, H. Reis, & M. K. Shukla (Eds.), *Handbook of Computational Chemistry* 2065–2093. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27282-5\\_51](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27282-5_51)
- San Miguel-Chávez, R. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. In M. Soto-Hernández, M. Palma-Tenango, & M. del R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds—Biological Activity*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66897>
- Θ. Μαυρομούστακος και Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή Μοντελοποίηση: Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*, Εκδόσεις Παρισιάνος, 2008, σ. 84-148.
- A.R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Pearson Education, 2001, p. 784.