

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
Ι Δ Ρ Υ Μ Α



ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

« ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ
ΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ »

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΠΑΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

Επιβλέπων καθηγητής
Σπηλιόπουλος Ιωακείμ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2018

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
Ι Δ Ρ Υ Μ Α



ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

« ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ
ΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ »

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΠΑΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

Επιβλέπων καθηγητής
Σπηλιόπουλος Ιωακείμ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Κ. Σπηλιόπουλο Ιωακείμ, επίκουρο καθηγητή στο τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων για την απεριόστη καθοδήγηση και ενθάρρυνση στην υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον οι οποίοι με στήριξαν καθ 'όλη την διάρκεια εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλλοίωση των τροφίμων επιταχύνεται από την επίδραση χημικών αντιδράσεων. Η αντίδραση της οξείδωσης μειώνει την διάρκεια ζωής των λιπαρών τροφίμων. Για τον έλεγχο και τον περιορισμό την οξειδωτικής αντίδρασης χρησιμοποιούνται τα αντιοξειδωτικά τα οποία διακρίνονται σε φυσικά και συνθετικά. Σκοπός τους είναι να σταθεροποιήσουν τα λιπίδια στα τρόφιμα και παράλληλα να επιμηκύνουν την διάρκεια ζωής τους αναστέλλοντας τις διαδικασίες οξείδωσης.

Οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των διαφόρων αντιοξειδωτικών είναι πολυάριθμοι. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι η λεύκανση β-καροτένιου η οποία λειτουργεί σε ένα υδατικό γαλάκτωμα λινολεϊκού οξέος και β-καροτένιου το οποίο αποχρωματίζεται εξαιτίας της δημιουργίας ριζών από την οξείδωση του λιπιδίου με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες.

Ένας από τους παράγοντες που πιθανόν να επηρεάζει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων είναι η επίδραση του $NaCl$. Στην παρούσα εργασία μελετάται η επίδραση της αλατότητας στην αντιοξειδωτική δράση διαφόρων αντιοξειδωτικών σε pH 5.5, 6.5 και 7.4 με την μέθοδο της λεύκανση β-καροτένιου. Η αλατότητα προκαλεί μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης.

ΛΕΞΕΙΣ- ΚΛΕΙΔΙΑ

Λιπιδική οξείδωση

Αντιοξειδωτικά

Λεύκανση β-καροτενίου

Χλωριούχο νάτριο

ABSTACT

The alteration of food is accelerated by the effects of chemical reactions. The oxidation reaction reduces the shelf life of fatty foods. For controlling and limiting the oxidative reaction, antioxidants are used which are distinguished in natural and synthetic. Their purpose is to stabilize the lipids in food and at the same time to lengthen their lifespan by inhibiting the oxidation processes.

Methods of quantifying the antioxidant activity of various antioxidants are numerous. One of these methods is b-carotene bleaching which works in an aqueous emulsion of linoleic acid and b-carotene which discolorates due to the formation of radicals from the lipid oxidation by heating at elevated temperatures.

One of the factors likely to affect the antioxidant activity of antioxidant compounds is the effect of NaCl. In this paper we study the effect of salinity on the antioxidant activity of various antioxidants at pH 5.5, 6.5 and 7.4 by the b-carotene whitening method. Salinity causes a reduction in antioxidant activity.

KEY-WORDS

Lipid oxidation

Antioxidants

Bleaching b-carotene

Sodium Chloride

Περιεχόμενα

1	ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ	15
1.1	Δημιουργία ελευθέρων ριζών.....	15
1.2	Μηχανισμός αυτοξειδωσης	15
1.2.1	Παράγοντες που επιδρούν στην αυτοξειδωση	18
1.3	Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα ζωντανά συστήματα	19
2	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	20
2.1	Ορισμός και κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών.....	20
2.2	Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών	21
2.2.1	Φυσικά αντιοξειδωτικά.....	23
2.2.2	Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	29
3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	31
3.1	Γενικά.....	31
3.2	Μεθόδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	32
3.3	Λεύκανση β-καροτενίου	35
3.3.1	Γενικά.....	35
3.3.2	Αρχή της μεθόδου	36
4	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ NaCl ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ	39
5	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
5.1	Υλικά- Συσκευές	40
5.1.1	Όργανα- Συσκευές.....	40
5.2	Πειραματική διαδικασία	40
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
6.1	% Αντιοξειδωτική δραστικότητα και C_{AA} σε pH 5.5.....	48
6.2	% Αντιοξειδωτική δραστικότητα και C_{AA} σε pH 6.5.....	53
6.3	Σύγκριση αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και 6.5 και σε συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	58
6.4	Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστικότητας και C_{AA} σε pH 5,5 και 6,5	63
6.5	Αποτελέσματα υπολογισμού z-potential	74
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
7.1	% Αντιοξειδωτική δραστικότητα και σε pH 5,5.....	75
7.2	% Αντιοξειδωτική δραστικότητα και C_{AA} σε pH 6.5.....	76
7.3	Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστικότητας και C_{AA} pH 5.5, 6.5	76
7.4	Σύγκριση αντιοξειδωτικών σε pH 5,5 και 6,5.....	78

7.5	Αποτελέσματα υπολογισμού <i>z-potential</i>	79
8	ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80
9	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 3.2.1. Μεθόδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	32
Πίνακας 6.1: Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Gallic acid</i> σε pH 5.5.....	42
Πίνακας 6.2: Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Trolox</i> (μM) σε pH 5.5.....	43
Πίνακας 6.3 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>trans-Ferulic acid</i> (μM) σε pH 5.5.....	43
Πίνακας 6.4: Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Caffeic acid</i> (μM) σε pH 5.5.....	44
Πίνακας 6.5 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>p-Coumaric acid</i> (μM) σε pH 5.5.....	44
Πίνακας 6.6 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Gallic acid</i> (μM) σε pH 6.5.....	45
Πίνακας 6.7 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Trolox</i> (μM) σε pH 6.5.....	45
Πίνακας 6.8: Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>trans-Ferulic acid</i> (μM) σε pH 6.5.....	46
Πίνακας 6.9 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Caffeic acid</i> (μM) σε pH 6.5.....	46
Πίνακας 6.10 : Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>p-Coumaric acid</i> (μM) σε pH 6.5.....	47

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 6.1.1: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Gallic acid</i>	48
Σχήμα 6.1.2: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>Gallic Acid</i>	48
Σχήμα 6.1.3: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Trolox</i>	49
Σχήμα 6.1.4: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>Trolox</i>	49
Σχήμα 6.1.5: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>trans- Ferulic acid</i>	50
Σχήμα 6.1.6: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>trans- Ferulic acid</i>	50
Σχήμα 6.1.7: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Caffeic acid</i>	51
Σχήμα 6.1.8: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>Caffeic acid</i>	51
Σχήμα 6.1.9: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>p- Coumaric acid</i>	52
Σχήμα 6.1.10: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>p- Coumaric acid</i>	52
Σχήμα 6.2.1: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Gallic acid</i>	53
Σχήμα 6.2.2: Συντελεστής αντιοξειδωτικής ικανότητας <i>Gallic acid</i>	53
Σχήμα 6.2.3: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Trolox</i>	54
Σχήμα 6.2.4: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>Trolox</i>	54
Σχήμα 6.2.5: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>trans- Ferulic acid</i>	55
Σχήμα 6.2.6: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>trans- Ferulic acid</i>	55
Σχήμα 6.2.7: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>Caffeic acid</i>	56
Σχήμα 6.2.8: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας <i>Caffeic acid</i>	56
Σχήμα 6.2.9: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα <i>p- Coumaric acid</i>	57

Σχήμα 6.2.10: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>p-Coumaric acid</i>	57
Σχήμα 6.3.1: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	59
Σχήμα 6.3.2: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	60
Σχήμα 6.3.3: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0,0.1,0.5 M.....	61
Σχήμα 6.3.4: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0,0.1,0.5 M.....	62
Σχήμα 6.4.1: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Gallic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	64
Σχήμα 6.4.2: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Gallic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	65
Σχήμα 6.4.3: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Trolox</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	66
Σχήμα 6.4.4: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Trolox</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5M.....	67
Σχήμα 6.4.5: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>trans-Ferulic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	68
Σχήμα 6.4.6: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>trans-Ferulic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	69
Σχήμα 6.4.7: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Caffeic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	70
Σχήμα 6.4.8: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>Caffeic acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M.....	71

Σχήμα 6.4.9: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>p-Coumaric acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις <i>NaCl</i> 0, 0.1, 0.5 M.....	72
Σχήμα 6.4.10: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας <i>p-Coumaric acid</i> σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις <i>NaCl</i> 0, 0.1, 0.5 M.....	73
Σχήμα 6.5.1: <i>Z-potential</i> λινολεϊκού οξέος.....	74

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 2.2.1.1: Δομή υδροξυϋνναμικών οξέων (<i>Satish and Dilipkumar, 2015</i>).....	24
Εικόνα 2.2.1.2: Γενική δομή φλαβονοειδών.....	25
Εικόνα 2.2.1.3: Δομή βιταμίνης <i>E</i> (α- τοκοφερόλη).....	26
Εικόνα 2.2.1.4: Δομή βιταμίνης <i>C</i>	26
Εικόνα 2.1.5: Μηχανισμός εξολόθρευσης ριζών ασκορβικού οξέος (<i>Satish and Dilipkumar, 2015</i>).....	27
Εικόνα 3.2.1.6: Δομή β-καροτενίου και λυκοπενίου (<i>Laguerre et al, 2007</i>).....	28
Εικόνα 3.2.2.1 : Δομή <i>BHA, BHT, TBHQ, PG</i> (<i>Pisoschi and Negulescu, 2011</i>).....	30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιπαρά τρόφιμα είναι πιο ευάλωτα στην υποβάθμιση της ποιότητας τους μέσω αντιδράσεων οξειδωσης οι οποίες ενεργοποιούνται με την βοήθεια της θέρμανσης και της μακροχρόνιας αποθήκευσης τους. Τα προϊόντα της οξειδωσης που σχηματίζονται οδηγούν στην υποβάθμιση της θρεπτικής αξίας και ποιότητας των τροφίμων. Για το λόγο αυτό ο έλεγχος της λιπιδικής οξειδωσης αποτελεί κυρίαρχο στόχο των επιστημόνων. (*Pokorny et al, 2001*)

Μερικοί από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται με τον σκοπό τον έλεγχο της λιπιδικής οξειδωσης περιλαμβάνουν την πρόληψη του O_2 , την χρήση χαμηλών θερμοκρασιών και την απενεργοποίηση των ενζύμων. Επιπλέον μέθοδο αναστολής της αντίδρασης αποτελεί η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι χημικές ουσίες με δομή που ποικίλει και δρουν μέσω διαφόρων μηχανισμών. Διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες τα φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά. Χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην περίοδο του Δευτέρου Παγκοσμίου πολέμου με σκοπό την διατήρησή των τροφίμων. Οι φυσικές ουσίες αποτέλεσαν τα πρώτα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο με το πέρασμα του χρόνου άρχισε η αντικατάσταση τους από συνθετικές ουσίες οι οποίες πλεονεκτούσαν σε τιμή, ήταν χημικά καθαρές και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους ήταν πιο ομοιόμορφες. Ωστόσο η υπερβολική χρήση των συνθετικών ουσιών επέφερε την αμφισβήτηση, την ανησυχία και τελική την επιθυμία των καταναλωτών για την χρήση των φυσικών ουσιών ως αντιοξειδωτικά. (*Pokorny et al, 2001*).

Ο βασικός μηχανισμός δράσης είναι η αντίδραση τους με τις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων. Η δραστηριότητα των διαφορών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται βασίζεται στην λιπιδική σύνθεση, την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, την θερμοκρασία και την πίεση του O_2 . (*Pokorny et al, 2001*). Για να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται πολυάριθμοι μέθοδοι ποσοτικοποίησης της. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας βασίζονται στο είδος του υποστρώματος που οξειδώνεται, στο

είδος του αντιοξειδωτικού και σε ολόκληρο το σύστημα είτε αυτό είναι υδατικό, λιπιδικό, γαλάκτωμα ή πολυφασικό (*Prieto et al, 2012*)

Μελέτες που πραγματοποιούνται έχουν ως στόχο την αξιολόγηση και τον βαθμό επηρεασμού των διαφόρων παραγόντων στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των διαφόρων αντιοξειδωτικών. Η παρούσα εργασία διαπραγματεύεται το πως επηρεάζει η αλατότητα την αντιοξειδωτική δραστηριότητα των διαφορών αντιοξειδωτικών που προτίθενται στα τρόφιμα χρησιμοποιώντας ως μέθοδο ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας τη λεύκανση β-καροτενίου.

1 ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

1.1 Δημιουργία ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα τα οποία χαρακτηρίζονται ως ασταθείς και είναι ενεργά προς τις χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια. Οι πιο σημαντικές είναι αυτές που σχηματίζονται από τα στοιχεία του οξυγόνου, του αζώτου και τέλος του θείου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δραστικά είδη οξυγόνου (*ROS*), αζώτου (*RNS*) και θείου (*RSS*) αντίστοιχα. Παραδείγματα ελευθέρων ριζών (*ROS*) αποτελούν το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροϋπεροξυλίου (HO_2^-), η ρίζα υδροξυλίου ($\bullet OH$). (*Carocho et al, 2012*). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στα ζωντανά συστήματα είναι συνεχής αφού είναι αποτέλεσμα των βιοχημικών και φυσιολογικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται. Οι φυσιολογικές βιοχημικές διεργασίες έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (*ROS*) και αντιδραστικών ειδών αζώτου (*RNS*). (*Satish and Dilipkumar, 2015*).

Επιπλέον χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών αποτελεί και η υψηλή δραστηριότητά τους. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό προσδίδει στις ελεύθερες ρίζες την ιδιότητα να βλάπτουν τα κύτταρα. Στην περίπτωση που η συγκέντρωσή τους είναι μεγάλη και δεν είναι εφικτή η εξουδετέρωσή τους από τα φυσικά αντιοξειδωτικά των κυττάρων εμφανίζονται παθολογικές συνέπειες. Η οξειδωτική βλάβη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι ιδιαίτερα καταστροφική αφού εξελίσσεται σε αλυσιδωτή αντίδραση (*Satish and Dilipkumar, 2015*). Η δημιουργία ελευθέρων ριζών σχετίζεται και σε μεγάλο βαθμό με τα τρόφιμα και μέσω πολύπλοκων αντιδράσεων οδηγεί στην οξειδωτική τάγγιση. (*Σφλώμος, 2011*). Ταυτόχρονα τα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται είναι υπεύθυνα για την υποβάθμιση τους κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των τροφίμων που περιέχουν λιπίδια. (*Lucio et al, 2009*).

1.2 Μηχανισμός αυτοοξειδωσης

Μια από τις κυριότερες αιτίες υποβάθμισης της θρεπτικής ποιότητας των τροφίμων αποτελεί η οξείδωση των λιπιδίων. (*Yanishlieva & Marinova, 2001*).

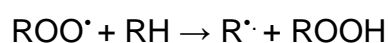
Ανήκει στην κατηγορία περίπλοκων διαδικασιών η οποία περιλαμβάνει μια σειρά αλληλένδετων αντιδράσεων όπου οδηγούν στον σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων. (Σφλώμος, 2011). Κατά την διαδικασία της αυτοξειδωσης το ατμοσφαιρικό οξυγόνο απορροφάται από την λιπαρά ύλη και έχει σαν αποτέλεσμα την τάγγιση του τροφίμου. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από την απορρόφηση του O_2 οφείλονται στον σχηματισμό και στην δράση που έχουν ορισμένα μοριακά τμήματα στα οποία εντοπίζεται το O_2 .

Πιο συγκεκριμένα στην κατηγορία των δραστικών οξυγονούχων τμημάτων ανήκουν η υδροξυλική ρίζα ($HO\bullet$), η υπεροξειδική ρίζα ($HOO\bullet$) ή η λιπο-υπεροξειδική ρίζα ($ROO\bullet$) οι οποίες είναι ελεύθερες ρίζες. Η αυτοξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων πραγματοποιείται στα παρακάτω τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο αποτελεί το στάδιο εκκίνησης. Στο στάδιο αυτό με την παρουσία και την βοήθεια φωτός, μετάλλων, αποσπάται ένα άτομο H και δημιουργείται ελεύθερη ρίζα σε μία μεθυλενομάδα ($-CH_2-$) η οποία είναι γειτονική στον διπλό δεσμό. Στο δεύτερο στάδιο η ρίζα αυτή αντιδρά με O_2 και δημιουργείται υπεροξειδική ρίζα ($ROO\bullet$), η οποία αντιδρά με άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ και σχηματίζεται υδρο-υπεροξείδιο ($ROOH$) και νέα ελεύθερη ρίζα και έτσι προκύπτουν αλυσιδωτές αντιδράσεις. Στο τρίτο στάδιο (στάδιο τερματισμού) πραγματοποιείται διάσπαση των υδρουπεροξειδίων και παράγονται σταθερές ενώσεις με ανεπιθύμητη γεύση και οσμή για το προϊόν. (Σφλώμος, 2011). Ο μηχανισμός δράσης της διαδικασίας της αυτοξειδωσης αναφέρεται συνοπτικά παρακάτω:

1. Στάδιο έναρξης

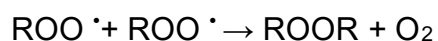
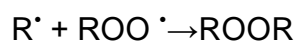


2. Στάδιο διάδοσης



3. Στάδιο τερματισμού

Δευτερεύοντα προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της οξειδωσης



Η οξειδωση όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιείται μέσω μιας ελεύθερης ρίζας και προχωρά σε τρία στάδια στα οποία διακρίνονται το στάδιο της έναρξης, διάδοσης και τερματισμού και καταλήγει σε μια σειρά πολύπλοκων χημικών αντιδράσεων. Τα πρωτογενή προϊόντα της αντίδρασης περιλαμβάνουν τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων και τα συζευγμένα διένια ή τριένια τα οποία στην συνέχεια καταστρέφονται από τα δευτερογενή προϊόντα στα οποία περιλαμβάνονται οι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες και πτητικά οργανικά οξέα. (*Lyras et al, 1997*). Η αντίδραση της οξειδωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί από το στάδιο της συγκομιδής, της επεξεργασίας μέχρι την αποθήκευση των τροφίμων όπου προκαλεί χημική αλλοίωση η οποία επηρεάζει την ποιότητα τους. Στην κατηγορία των τροφίμων που υποβαθμίζονται ανήκουν το κρέας, τα γαλακτομικά, τα φρούτα και τα λαχανικά. Αποτελεί ένα φαινόμενο που μελετάτε συνεχώς από τους επιστήμονες των τροφίμων.

Η διεργασία οξειδωσης των λιπιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλαπλούς μηχανισμούς στους οποίους ανήκουν η αυτοοξειδωση, η φωτοοξειδωση, η θερμική και η ενζυμική οξειδωση όπου περιλαμβάνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών ή άλλων δραστικών ειδών.

Η περίπτωση της αυτοοξειδωσης χαρακτηρίζεται ως αυθόρμητη αντίδραση μεταξύ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και των λιπιδίων και στην οποία οφείλονται βλάβες των τροφίμων και των βιολογικών συστημάτων. (*Shahidi & Zhong, 2005*). Η θερμική οξειδωση πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζονται ελεύθερα λιπαρά οξέα και πολικές ουσίες (*Perkins, 1992*). Η διαδικασία της φωτοοξειδωσης περιλαμβάνει την διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή και την μεταφορά της ενέργειας στα μόρια των λιπιδίων ή του O_2 . (*Shahidi & Zhong, 2015*). Επιπλέον η οξειδωση μπορεί να καταλυθεί από ένζυμα όπως είναι οι

λιποξυγενάσες οι οποίες αδρανοποιούνται μετά από την διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων.

Οι οξειδωτικές αντιδράσεις σχετίζονται έντονα με την βιομηχανία τροφίμων επειδή τα λιπίδια τα οποία αποτελούν τα φυσικά συστατικά οξειδώνονται κατά την διάρκεια της υπεροξειδωσης και προκαλούν μεταβολές. (Chaillou et al, 2005)

1.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην αυτοοξειδωση

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ευάλωτα στην αποσύνθεση που προκαλεί η οξειδωση είτε εκείνα εντοπίζονται με την μορφή των ελεύθερων λιπαρών οξέων είτε βρίσκονται με την μορφή των τριγλυκεριδίων. (Pokorny et al, 2001). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοοξειδωση διακρίνονται παρακάτω:

- Η ύπαρξη ακόρεστων οξέων που εντοπίζονται στην λιπαρή ύλη αφού σύμφωνα με τον μηχανισμό της αυτοοξειδωσης ενεργοποιούνται οι γειτονικές μεθυλενομάδες ως προς τον διπλό δεσμό. Επομένως η ύπαρξη δυο γειτονικών διπλών δεσμών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της μεθυλενομάδας.
- Η παρουσία O_2 . Το O_2 είναι απαραίτητο για την έναρξη και εξέλιξη της αντίδρασης.
- Η θερμοκρασία καθώς και η ηλιακή ακτινοβολία επιδρούν καταλυτικά στην οξειδωση με την δημιουργία ελευθέρων ριζών και συνεπώς την έναρξη της. (Σφλώμος, 2011).
- Τα μέταλλα συμπεριλαμβανομένων του σιδήρου ή του χαλκού και το ένζυμο λιποξυγενάση δρουν ως καταλύτες της οξειδωσης (Pokorny et al, 2001).

1.3 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα ζωντανά συστήματα

Οι ελεύθερες ρίζες *ROS* και *RNS* αποτελούν αιτία εμφάνισης οξειδωτικού στρες σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Διαδραματίζουν ρόλο στην άμυνα του οργανισμού αφού καταπολεμούν τους παθογόνους μικροοργανισμούς με τα φαγοκύτταρα και ταυτόχρονα συμμετέχουν σε αντιδράσεις όπου πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009). Συνέπεια του οξειδωτικού στρες αποτελεί το γεγονός ότι καταστρέφει κυτταρικά συστατικά με αποτέλεσμα την πρόκληση διαφόρων ασθενειών (Satish and Dilipkumar, 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα επίδρασης των ελευθέρων ριζών στα ζωντανά συστήματα αποτελεί η προσβολή του *DNA* που οδηγεί σε καρκινογένεση, αλλά και η αντίδραση αυτών με την *LDL* χοληστερόλη που έχει ως συνέπεια την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας και αθηροσκλήρωσης. (Σφλωμος,2011).

Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι είναι σημαντικό για τον ανθρώπινο οργανισμό να διατηρεί σε ισορροπία τα προ-οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά μόρια. Με την διαταραχή της συγκεκριμένης ισορροπίας πραγματοποιείται αύξηση των προοξειδωτικών έναντι των αντιοξειδωτικών μορίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες. (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

2.1 Ορισμός και κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια τα οποία αναστέλλουν ή καταστέλλουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών και έτσι οδηγούν στην αναστολή της κυτταρικής βλάβης. (*Satish and Dilipkumar, 2015*). Έχουν την ικανότητα να ασκήσουν τις προστατευτικές του ιδιότητες σε διάφορα στάδια και με διάφορους μηχανισμούς κατά την διαδικασία της οξειδωσης. (*Koleva et al, 2002*). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι *Halliwel και Gutteridge (1995)* καθόρισαν τον όρο αντιοξειδωτικά ως την «οποιαδήποτε ουσία» η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με την εκείνη του υποστρώματος που οξειδώνεται έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή και να αναστέλλει την οξειδωση του υποστρώματος. Ωστόσο στην συνέχεια ο ίδιος *Halliwel (2007)* ξανά έδωσε τον ορισμό ο οποίος ανέφερε ότι «οποιαδήποτε ουσία η οποία καθυστερεί, αποτρέπει, ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» ορίζεται ως αντιοξειδωτικό. Ταυτόχρονα την ίδια χρονιά έδωσαν ένα ακόμη ορισμό για τα αντιοξειδωτικά ως «οποιαδήποτε ουσία η οποία καταστρέφει άμεσα τις ROS ή ενεργεί έμμεσα για να ρυθμίσει εκ των προτέρων την αντιοξειδωτική άμυνα ή να αναστείλει την παραγωγή ROS». (*Khlebnikov et al. 2007*).

Τα αντιοξειδωτικά έχουν ενζυμική ή μη ενζυμική φύση τόσο στο ενδοκυτταρικό όσο και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. (*Satish and Dilipkumar, 2015*). Χρησιμοποιούνται με σκοπό να αποτρέψουν την οξειδωση των λιπιδίων και να αποφευχθούν οι μεταβολές των αισθητικών ιδιοτήτων τους στα τρόφιμα όπως στο χρώμα, την γεύση καθώς και την θρεπτική αξία η οποία περιλαμβάνει της βιταμίνες. (*Chaillou et al, 2005*). Επιπλέον έχουν την ικανότητα σταθεροποίησης των λιπιδίων των τροφίμων και παράλληλα με αυτό τον τρόπο αποτρέπουν την υποβάθμιση της ποιότητας τους. Είναι ουσίες που με την παρουσία τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθυστερούν και ταυτόχρονα ελέγχουν ή αποτρέπουν τις οξειδωτικές διεργασίες. (*Shahidi & Zhong, 2015*)

Γενικότερα τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάση πολλών κριτηρίων. Αρχικά μπορούν να διακριθούν ανάλογα με την δράση τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Στην

πρώτη περίπτωση η δράση τους περιορίζεται στην διάσπαση και την αφαίρεση των ελεύθερων ριζών. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και στην συνέχεια σε νερό μέσω πολλαπλών σταδίων με την παρουσία συμπαραγόντων όπως είναι ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος και το μαγγάνιο. Η δράση των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών βασίζεται στην διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η βιταμίνη *E*, βιταμίνη *C*, οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή. (*Satish and Dilipkumar, 2015*).

Επιπλέον διάκριση των αντιοξειδωτικών αποτελεί η διαλυτότητά τους. Με αυτό το κριτήριο κατηγοριοποιούνται σε υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά των οποίων χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βιταμίνη *C* εντοπίζονται στα κύτταρα ενώ αντίθετα τα λιποδιαλυτά εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Παραδείγματα τέτοιων αποτελούν η βιταμίνη *E* και τα καροτενοειδή.

Τέλος η ταξινόμησή μπορεί να πραγματοποιηθεί και με βάση το μέγεθός τους σε αντιοξειδωτικά μικρού και μεγάλου μεγέθους αντίστοιχα. Του μικρού μεγέθους αντιοξειδωτικά έχουν το χαρακτηριστικό ότι εξουδετερώνουν τις *ROS* με την διαδικασία απομάκρυνσης ριζών τις οποίες μεταφέρει μακριά όπως είναι η βιταμίνη *C*, *E* και τα καροτενοειδή. Αντίστοιχα στην περίπτωση των αντιοξειδωτικών μεγάλου μεγέθους τα οποία είναι ένζυμα και πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να απορροφούν τις *ROS* και εμποδίζουν την επίθεση τους σε άλλες βασικές πρωτεΐνες. (*Satish and Dilipkumar, 2015*).

2.2 Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά όπως είναι γνωστό χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και η δραστηριότητα που παρουσιάζουν μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την θερμοκρασία, την σύνθεση και δομή των τροφίμων και την διαθεσιμότητα του O_2 . (*Pokony, et al 2001*). Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν με σκοπό την παρεμπόδιση της οξειδωτικής διεργασίας διακρίνονται παρακάτω :

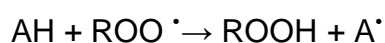
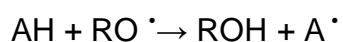
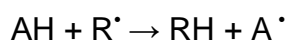
- I. Η καταστολή των ελεύθερων ριζών και άλλων δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)
- II. Η απενεργοποίηση του O_2
- III. Δέσμευση μεταλλικού ιόντος μέσω χηλικών ενώσεων
- IV. Παράγοντες απόσβεσης δευτερευόντων προϊόντων οξείδωσης
- V. Αναστολείς προ-οξειδωτικών ενζύμων

Η καταστολή των ελεύθερων ριζών γίνεται με τους διάφορους μηχανισμούς. (Shahidi & Zhong 2015). Πιο αναλυτικά το μόριο των αντιοξειδωτικών ενώσεων που είτε βρίσκονται είτε προστίθενται στα τρόφιμα προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα και στην συνέχεια εκείνη αδρανοποιείται. Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες διακρίνονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς.

Στα πρωτογενή αντιοξειδωτικά ανήκουν οι τοκοφερόλες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αναστολείς της αλυσιδωτής αντίδρασης αφού δρουν ως δότες υδρογόνου ή ως αποδέκτες ελεύθερων ριζών. Ο ανταγωνισμός που συμβαίνει στο στάδιο της διάδοσης κατά την διάρκεια αναστολής της οξειδωτικής αντίδρασης παράγει σταθερά προϊόντα τα οποία δεν είναι ικανά να ενισχύσουν έναρξη νέων αντιδράσεων οξείδωσης (Nawar, 1996).

Η δράση των δευτερογενών αντιοξειδωτικών εμφανίζεται με την επιβράδυνση της αντίδρασης καταστέλλοντας τους οξειδωτικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί προωθούν την οξείδωση και περιλαμβάνουν τα ιόντα μετάλλων, το O_2 απλού μορίου και τέλος τα προ-οξειδωτικά ένζυμα. Επιπλέον μπορεί να προάγουν την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων σε μη ριζικά είδη, να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και με αυτό τον τρόπο να προστατεύουν τα λιπίδια από την υπεριώδη φωτοοξείδωση. (Shahidi & Zhong, 2015)

Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο τρόπο με τον οποίο δρουν τα αντιοξειδωτικά και καταλήγουν στην δέσμευση των ελεύθερων ριζών:



AH: αντιοξειδωτικό, R[•], RO[•], ROO[•], ελεύθερες ρίζες, RH : λιπαρό οξύ, ROH: αλκοόλη, ROOH: υπεροξειδίο, A : ελεύθερη ρίζα του αντιοξειδωτικού.

2.2.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

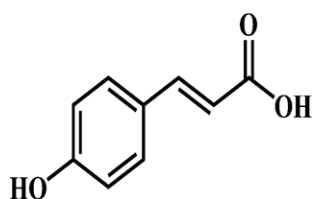
Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ανήκουν τα φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά. (*Satish and Dilipkumar, 2015*). Τα φυτά και τα διάφορα συστατικά τους αποτελούν πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Μερικά φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι τα εκχυλίσματα βοτάνων, το τσάι, τα σταφύλια, παράγωγα αυτών των προϊόντων καθώς και οι φλούδες των εσπεριδοειδών. (*Laguette et al, 2007*). Στα συστατικά ανήκουν τα καρτενοειδή, οι τοκοφερόλες και οι πολυφαινόλες οι οποίες είναι ευρέως διαδεδομένες.

Παράγωγα κυνναμικού και βενζοϊκού οξέος:

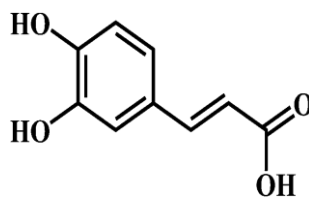
Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα που έχουν να εξαλείφουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι καθυστερούν την αυτοξειδωση των λιπιδίων. Μερικές φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στα φυτά προέρχονται από το κυνναμικό οξύ όπως φερουλικό, καφεϊκό, κουμαρικό, σιναπτικό οξύ και το βενζοϊκό οξύ όπως ελαγικά, γαλλικά, 4- υδροξυβενζοϊκά οξέα και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση που σχετίζεται με τον αριθμό και την υποκατάσταση των φαινολικών υδροξυλομάδων (*Chaillou et al, 2005*). Συναντώνται άφθονα σε μπαχαρικά, βότανα, φρούτα λαχανικά, σπόρους, τσάι και έλαια. Παράλληλα έχουν εξετασθεί και υποπροϊόντα από την βιομηχανία τροφίμων και τον τομέα της γεωργίας για την πιθανή χρήση τους ως αντιοξειδωτικά. (*Shahidi & Zhong 2015*). Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων αποτελούν οι φλοιοί, τα κελύφη και τα δέρματα των καρπών των δημητριακών, οι φλούδες και οι σπόροι των

εσπεριδοειδών οι οποίοι έχουν αποκτήσει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση. (Cumby, Zhong, Nacz, & Shahidi, 2008, Liyana-Pathirana, Dexter & Shahidi, 2006).

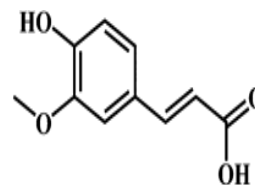
Τέλος στην κατηγορία των υδροξυκυκνναμικών οξέων ανήκουν το φερουλικό, καφεϊκό, p- κουμαρικό και το σιναπτικό οξύ. Η χαρακτηριστική αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν σχετίζεται με τα πρότυπα υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου. Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός τους μοιάζει με εκείνον των φλαβονοειδών αφού έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν το υδρογόνο και να συντονίζουν τις αντιοξειδωτικές ρίζες που σχηματίζονται. Ταυτόχρονα οι ο-διυδροξυ υποκαταστάτες έχουν τη ιδιότητα επίσης της χηλίωσης των μεταλλικού ιόντος (Satish and Dilipkumar, 2015)



Ferulic acid



Caffeic acid



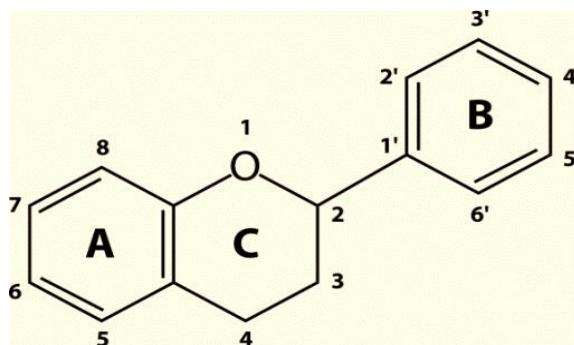
p-Coumaric acid

Εικόνα 2.2.1.1: Δομή υδροξυκυκνναμικών οξέων (Satish and Dilipkumar, 2015)

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν συστατικά των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών. Η διάκρισή τους περιλαμβάνει 14 τάξεις με βάση την οξειδωτική κατάσταση του ετεροκυκλικού τους δακτυλίου C. Οι κυριότερες τάξεις φλαβονοειδών που εντοπίζονται στις τροφές είναι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι κατεχίνες, οι φλαβανόνες και τα ισοφλαβονοειδή και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Η δράση τους περιλαμβάνει την δέσμευση ανιόντων υπεροξειδίων, υπεροξειδικών ριζών, υδροξυ-ριζών και άλλων ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τις τοκοφερόλες και την βιταμίνη C. Με αυτό

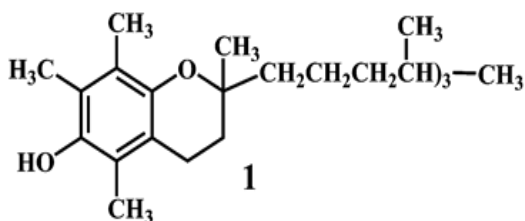
τον τρόπο ασκούν προστατευτικές ιδιότητες στους ιστούς από τις ελεύθερες ρίζες. (Σφλώμος, 2011). Τέλος παράλληλα με τις ιδιότητες δέσμευσης των ελεύθερων ριζών τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται και ως καλοί αναστολείς των λιποξυγενασών (LOX). (Shahidi & Zhong 2015).



Εικόνα 2.2.1.2: Γενική δομή φλαβονοειδών

Βιταμίνη Ε:

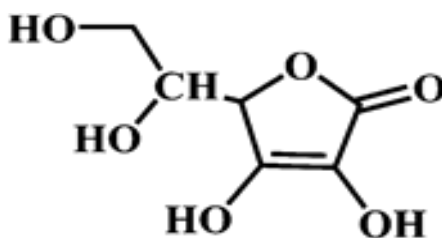
Ένα ακόμη φυσικό αντιοξειδωτικό είναι και η βιταμίνη *E* (α -τοκοφερόλη) η οποία είναι λιποδιαλυτή και η δράση της σχετίζεται με την διακοπή της αλυσίδας κατά την διάρκεια της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η λειτουργία που παρουσιάζει αφορά την παρεμπόδιση των ριζών λιποξειδούς υπεροξειδίου ($LOO\cdot$) και τον τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η ρίζα τοκοφεροξυλίου που προκύπτει παρουσιάζει σταθερότητα και σε κανονικές συνθήκες δεν είναι ικανή να λειτουργήσει ως εκκινητή της λιποξειδούς υπεροξειδωσης. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί κριτήριο ενός καλού αντιοξειδωτικού. Ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να δράσει και ως προ-οξειδωτικό γεγονός που οφείλεται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της. (Carocho *et al*, 2012). Με έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχει σημειωθεί ότι η βιταμίνη *E* παρέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο *in vivo* και *in vitro* συστήματα.



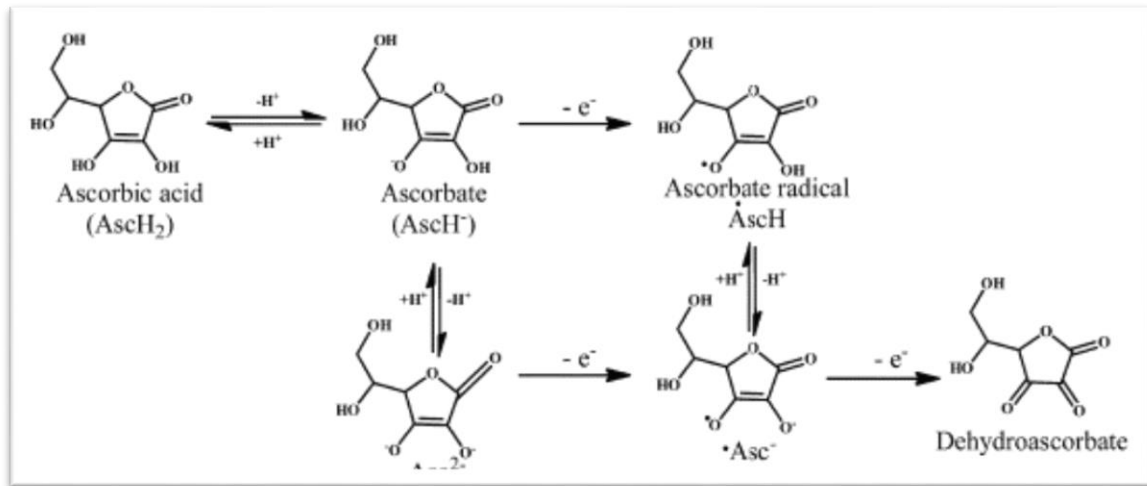
Εικόνα 2.2.1.3: Δομή βιταμίνης E (α- τοκοφερόλη)

Βιταμίνη C:

Η βιταμίνη C ανήκει στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών φυσικών αντιοξειδωτικών και η δράση της περιορίζεται στην καταστροφή των ριζών. Με σκοπό τον τερματισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης η ρίζα του ασκορβικού οξέος προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα του λιπιδικού υπεροξειδωσης. Τα ζεύγη των ριζών ασκορβικού οξέος που προκύπτουν αντιδρούν και σχηματίζεται ένα μόριο ασκορβικού και ένα μόριο δεϋδροασκορβικού. Το μόριο δεϋδροασκορβικού που προκύπτει δεν έχει αντιοξειδωτική δράση ωστόσο με την προσθήκη δυο ηλεκτρονίων μπορεί να μετατραπεί ξανά σε ασκορβικό. (Satish and Dilipkumar, 2015).



Εικόνα 2.2.1.4: Δομή βιταμίνης C



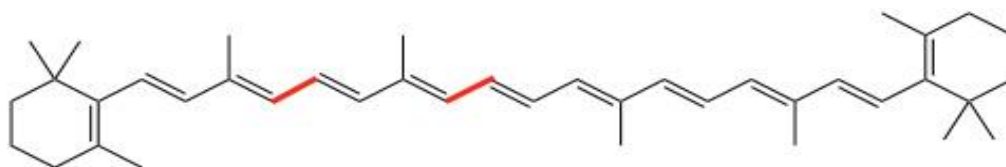
Εικόνα: 2.2.1.5: Μηχανισμός εξάλειψης ριζών ασκορβικού οξέος (Satish and Dilipkumar, 2015).

Καροτενοειδή:

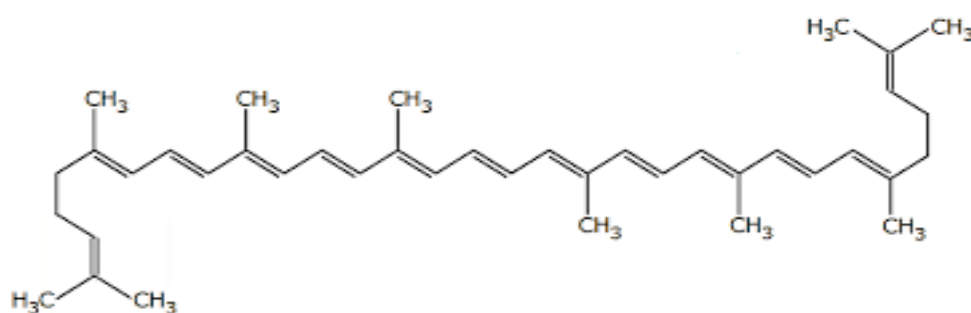
Τα καροτενοειδή είναι από τα πιο γνωστά λιποδιαλυτά φυτικά συστατικά. Το φυσικό χαρακτηριστικό τους χρώμα οφείλεται στους συζυγείς δεσμούς που διαθέτουν. Οι περισσότεροι δεσμοί βρίσκονται σε *trans* διαμόρφωση μέσω του συζυγιακού φαινομένου. (Σφλώμος, 2011). Κατηγοριοποιούνται σε δυο μεγάλες ομάδες, τους καροτενοειδείς υδρογονάνθρακες γνωστοί και ως καροτένια στα οποία ανήκουν το λυκοπένιο και το β-καροτένιο και τα οξυγονωμένα καροτενοειδή γνωστά ως ξανθοφύλλες στα οποία ανήκουν ζεαξανθίνη και λουτεΐνη. (Carocho et al, 2012). Η δράση των καροτενοειδών είναι γνωστή αφού καταστρέφουν τις ρίζες του υπεροξυλίου οι οποίες παράγονται κατά την διαδικασία της λιπιδικής υπεροξειδωσης. (Σφλώμος, 2011).

Αναλυτικότερα τα καροτενοειδή αντιδρούν με τις ρίζες σχηματίζοντας σταθεροποιημένες ρίζες και με αυτό τον τρόπο τις απενεργοποιούν και αποτρέπουν την βλάβη των λιπιδίων. Η αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών με βάση αποτελέσματα ερευνών και δοκιμών *in vitro* σχετίζεται ποσοτικά με την δομή τους δηλαδή τον βαθμό ακορεστότητας, την παρουσία των κυκλοπεντανικών δακτυλίων και δραστικών ομάδων που διαθέτει το μόριο τους. (Σφλώμος, 2011). Ωστόσο μπορούν να παρουσιάσουν και προ-οξειδωτική συμπεριφορά μέσω της αυτοξειδωσης με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ριζών υδροξυλίου που

σχηματίζουν οξυγόνο. (Young and Lowe, 2001). Τα καροτενοειδή με την προσθήκη τους στα τρόφιμα αποτρέπουν την αποικοδόμηση άλλων συστατικών τους. (Σφλώμος, 2011). Πιο συγκεκριμένα το β-καροτένιο και το λυκοπένιο είναι οι ενώσεις που ξεχωρίζουν από ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων. Το β-καροτένιο είναι ένα φυσικό καροτενοειδές με πορτοκαλί χρώμα το οποίο εντοπίζεται άφθονο σε κίτρινους-πορτοκαλί καρπούς, φρούτα και στα σκούρα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Επιπλέον χαρακτηρίζεται και από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η παρουσία των συζευγμένων διπλών δεσμών του λυκοπενίου οδηγούν στην σβέση του απλού οξυγόνο. (Satish and Dilipkumar, 2015).



B-carotene



Lycopene

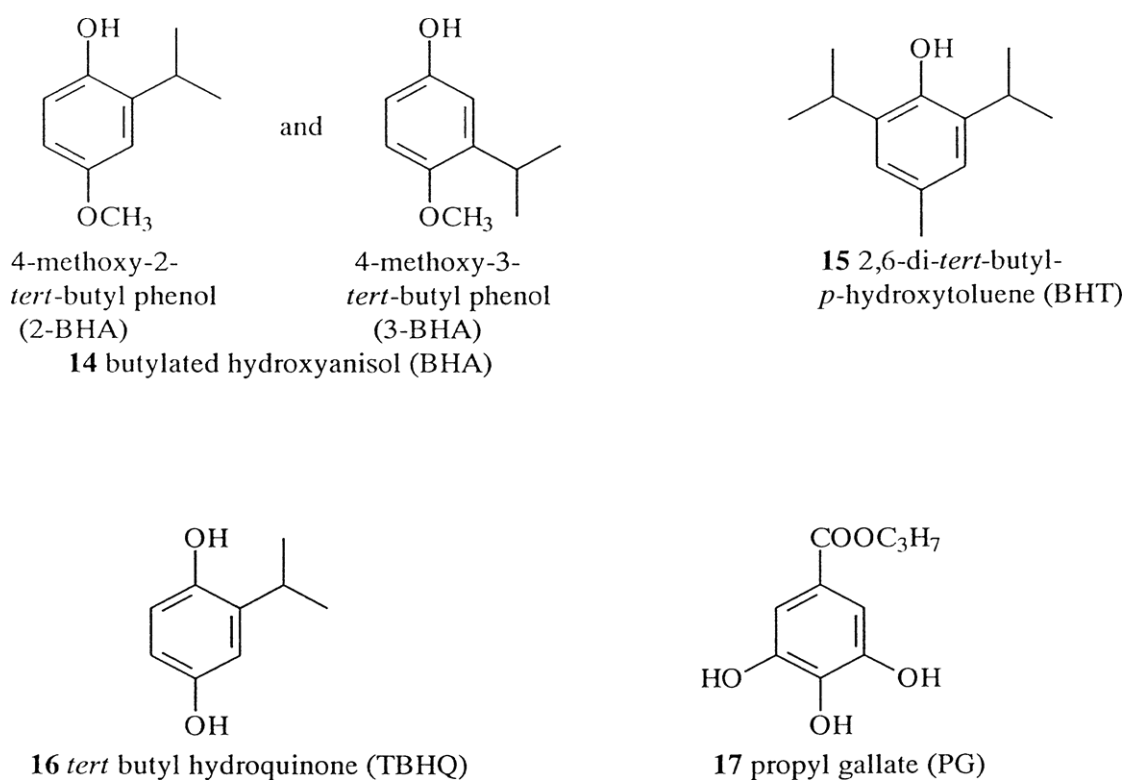
Εικόνα 2.2.1.6: Δομή β-καροτενίου και λυκοπενίου (Laguerre et al, 2007)

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να απομονωθούν από την πρώτη ύλη ως καθαρές ενώσεις για πιθανές μελλοντικές χρήσεις και εφαρμογές. Εναλλακτικά τα εκχυλίσματα φυτικής ή ζωικής προέλευσης τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών χρησιμοποιούνται άμεσα με σκοπό τις πιθανές συνεργαστικές δράσεις τους για την αναστολή *in vivo* και *in vitro* οξειδωσης. (Moure et al, 2005).

2.2.2 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Η χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών αποσκοπεί στην πρόληψη της οξείδωσης των τροφίμων και πιο συγκεκριμένα των λιπαρών οξέων. (Carocho et al, 2012). Για να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως να μην είναι τοξικές ενώσεις, να είναι δραστικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις και να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της λιπαρής ύλης. Όσα αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν ισχυρή λιπόφιλη συμπεριφορά είναι συνήθως κατάλληλα για χρήση σε γαλακτώματα τύπου λάδι σε νερό. (Σφλώμος, 2011). Στην κατηγορία των συνθετικών αντιοξειδωτικών ανήκουν η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), ο γαλλικός προπυλεστέρας (PG) και η τριπ-βουτυλδροκινόνη (TBHQ) και έχουν χρησιμοποιηθεί ως ισχυρές ενώσεις για την διατήρηση μεγάλης ποικιλίας τροφίμων για χρόνια. (Moure et al, 2005). Με σκοπό την βελτίωση της διαλυτότητας τόσο σε λίπη όσο και σε έλαια των φαινολικών συνθετικών αντιοξειδωτικών πραγματοποιείται υποκατάσταση από αλκύλια. (Pokony et al, 2001). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά ανάλογα με την συγκέντρωση που εντοπίζονται στα τρόφιμα επιβραδύνουν το στάδιο της προαγωγής της οξείδωσης. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του αντιοξειδωτικού BHA σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 0,1% σε μαγειρικό λίπος είναι ικανό να επιμηκύνει τουλάχιστον το χρόνο ανάλωσης των τροφίμων τα οποία παρασκευάζονται από το συγκεκριμένο λιπίδιο. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα στα οποία ανήκουν το BHA (*t*-βουτυλο-*p*-ανισόλη), PG (γαλλικός προπυλεστέρας), και BHT (2,6-δι-(τριτοταγές) βουτυλο-*p*-υδροξυ-τολουόλιο) προστίθενται στα διάφορα λίπη σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπερνούν στα 200 ppm. (Σφλώμος, 2011).

Ωστόσο η ζήτηση τους και η χρήση τους έχει μειωθεί για το γεγονός ότι οι καταναλωτές ζητούν φυσικά συστατικά αφού έχουν προκληθεί ανησυχίες σχετικά με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. (Sherwin, 1990, Wattenberg, 1986). Γι' αυτό το λόγο η χρήση τους περιορίζεται και ταυτόχρονα ρυθμίζεται από τη υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) η αναζήτηση αντιοξειδωτικών με αποτελεσματική δράση από φυσικές πηγές. Η χρήση πρωτεϊνών και υπολειμμάτων αυτών για εφαρμογή στα τρόφιμα ή τα καλλυντικά παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με κάποια άλλα αντιοξειδωτικά αφού προσδίδουν επίσης και θρεπτικές λειτουργίες. Στον τομέα αυτό τα μη ραφινάρισμα προϊόντα που προκύπτουν από υδρόλυση μπορεί να παρουσιάσουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα καθαρισμένα κλάσματα. (Moure et al, 2005).



Εικόνα 2.2.2.1 : Δομή BHA, BHT, TBHQ, PG (Pisoschi and Negulescu, 2011).

3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

3.1 Γενικά

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση και την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής και προοξειδωτικής δραστηριότητας είναι πολυάριθμοι. Η λειτουργία τους βασίζεται σε συγκεκριμένους παράγοντες. Στους παράγοντες αυτούς διακρίνονται το είδος του υποστρώματος το οποίο οξειδώνεται, το είδος του αντιοξειδωτικού και όλο το σύστημα υδατικό, λιπιδικό, γαλάκτωμα ή πολυφασικό. (Prieto *et al*, 2012). Παρόλο όμως τον μεγάλο αριθμό των μεθόδων δεν υπάρχει μια δοκιμασία που να μπορεί να δώσει πλήρως σαφή αποτελέσματα και για το λόγο αυτό συνίσταται η εφαρμογή συνδυασμού διαφόρων μεθόδων. (Carocho *et al*, 2012)

Πιο συγκεκριμένα διακρίνονται σε δυο κατηγορίες τις άμεσες και τις έμμεσες μεθόδους. Οι άμεσοι μέθοδοι χρησιμοποιούν ένα υπόστρωμα το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει μεμονωμένα ή μικτά λιπίδια, φυτικές πρωτεΐνες, DNA. Εκτιμάται με αυτό τον τρόπο η ανασταλτική επίδραση μιας πιθανής αντιοξειδωτικής ουσίας στην οξειδωτική αποικοδόμηση ενός υποστρώματος σε ένα σύστημα στο οποίο οι συνθήκες οξείδωσης είναι είτε φυσικές είτε επιταχυνόμενες. (Laguerre *et al*, 2007). Αντίστοιχα οι έμμεσες μέθοδοι χρησιμοποιούνται με σκοπό να μετρηθεί η ικανότητα που έχει το μόριο να μειώνει μια τεχνική ελεύθερη ρίζα με την μεταφορά υδρογόνου ή ηλεκτρονίων ή ένα μεταβατικό μέταλλο με την μεταφορά ηλεκτρονίων.

Στην κατηγορία των τεχνικών που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ανήκουν η μέθοδος καταστροφής της ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλικής ρίζας (DPPH), η μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης –FRAP (Ferric Reducing Activity Power-FRAP), και η μέθοδος λεύκανσης β-καροτενίου.

3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Πίνακας 3.2.1. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας

Antioxidant capacity assay	Principle of the method	End-product determination
Spectrometry		
DPPH	Antioxidant reaction with an organic radical	Colorimetry
ABTS	Antioxidant reaction with an organic cation radical	Colorimetry
FRAP	Antioxidant reaction with a Fe(III) complex	Colorimetry
PFRAP	Potassium ferricyanide reduction by antioxidants and subsequent reaction of potassium ferrocyanide with Fe ³⁺	Colorimetry
CUPRAC	Cu (II) reduction to Cu (I) by antioxidants	Colorimetry
ORAC	Antioxidant reaction with peroxy radicals, induced by AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane)	Loss of fluorescence of fluorescein
HORAC	Antioxidant capacity to quench OH radicals generated by a Co(II) based Fenton-like system	Loss of fluorescence of fluorescein
TRAP	Antioxidant capacity to scavenge luminol-derived radicals, generated from AAPH decomposition	Chemiluminescence quenching
Fluorimetry	Emission of light by a substance that has absorbed light or other electromagnetic radiation of a different wavelength	Recording of fluorescence excitation/ emission spectra

Μέθοδος DPPH

Η *DPPH* (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ) είναι σταθερή ρίζα. Με αυτό τον τρόπο η *DPPH* δεν διμερίζεται, φαινόμενο που εμφανίζεται στις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Το διάλυμα *DPPH* έχει μωβ χρώμα με μια ζώνη απορρόφησης με μέγιστο μήκος κύματος περίπου 520 nm. (Pisoschi and Negulescu, 2011).

Η μέθοδος καταστροφής της ελεύθερης ρίζας (*DPPH*) βασίζεται στον καθορισμό της ικανότητας που έχει μια καθαρή ουσία ή τα ακατέργαστα εκχυλίσματα να παγιδεύουν τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια με την δωρεά ηλεκτρονίων προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της ρίζας και το σχηματισμό λιγότερων δραστικών ειδών που προέρχονται από το αντιοξειδωτικό. (Chaillou et al, 2005). Όταν η *DPPH* αντιδρά με ένα δότη υδρογόνου προκύπτει η

ανηγμένη (μοριακή) μορφή *DPPH* η οποία προκαλεί εξαφάνιση του ιωδούς χρώματος. (*Pisoschi and Negulescu, 2011*). Το διάλυμα χάνει το χρώμα του αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού. (*Satish and Dilipkumar, 2015*).

Έτσι πραγματοποιείται ο έλεγχος της ικανότητας των ουσιών να δρουν ως απαλλαγείς των ελεύθερων ριζών και η μείωση των ριζών αυτών παρακολουθείτε φασματοφωτομετρικά με την μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 517 nm. (*Satish and Dilipkumar, 2015*).

Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος ABTS (2,2'-αζινο -δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) βασίζεται στην απορρόφηση της ρίζας-κατιόν (ABTS^{•+}). Η ρίζα κατιόντων ABTS απορροφάται στα 743 nm όπου προσδίδει ένα μπλε-πράσινο χρώμα. Παρουσία αντιοξειδωτικών τα οποία δρουν ως δότες υδρογόνου η ελεύθερη ρίζα καταστρέφεται με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος.

Μέθοδος FRAP

Είχε πρώτη εφαρμογή στο πλάσμα και πλέον χρησιμοποιείται σε ένα μεγάλο εύρος μορίων (*Carocho et al, 2012*). Η μέθοδος *FRAP* βασίζεται στην αναγωγή που προκαλούν τα αντιοξειδωτικά στο πολύπλοκο ιόν τρισθενούς σιδήρου- TPTZ (2,4,6-τρι (2-πυριδύλ) , 5-τριαζίνη). Η δημιουργία του έντονου μπλε χρώματος οφείλεται στην δέσμευση του Fe²⁺ στον προσδετή. Η απορρόφηση μπορεί να συσχετισθεί με την ποσότητα του αντιοξειδωτικού. (*Pisoschi and Negulescu, 2011*).

Δοκιμασία OPAC

Η δοκιμασία *OPAC* (ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου) χρησιμοποιείται με σκοπό την μέτρηση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών έναντι της ρίζας υπεροξυλίου η οποία προκαλείται από 2,2'-αζωδις- (2-αμιδινο-προπανο) διυδροχλωρίδιο (*AAPH*) στους 37 ° C. Χρησιμοποιείται ως φθορίζων ανιχνευτής η φλουορεσκεΐνη. Η απώλεια του φθορισμού αποτελεί δείκτη της έκτασης αποσύνθεσής της που πραγματοποιείται από την αντίδραση με την υπεροξυλική ρίζα. (*Pisoschi and Negulescu, 2011*).

Δοκιμασία HORAC

Η δοκιμασία *HORAC* (ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου) βασίζεται στη μέτρηση της δραστηριότητας χηλικοποίησης μετάλλων των αντιοξειδωτικών, υπό τις συνθήκες αντιδράσεων του τύπου *Fenton*. Η τεχνική χρησιμοποιεί ένα σύμπλοκο *Co(II)* και σκοπό έχει την αξιολόγηση την προστατευτική ικανότητα έναντι του σχηματισμού ρίζας υδροξυλίου. (*Pisoschi and Negulescu, 2011*).

Δοκιμασία TRAP

Η δοκιμασία *TRAP* (ολικός παράγων υπεροξυλικής παγίδευσης αντιοξειδωτικών παραμέτρων) βασίζεται στην εκμετάλλευση της χημειοφωταύγειας λουμινόλης (*CL*) με σκοπό την παρακολούθηση των αντιδράσεων που εμπλέκουν την ρίζα υπεροξυλίου Η χημειοφωταύγεια της *CL* καταστρέφεται από την παραγωγή ριζών οι οποίες προέρχονται από τη θερμική αποσύνθεση του *APPH*. Η τιμή *TRAP* προσδιορίζεται από την χρονική διάρκεια της περιόδου κατά την οποία το δείγμα έσβησε το σήμα της χημειοφωταύγειας, λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών. (*Pisoschi and Negulescu, 2011*).

3.3 Λεύκανση β-καροτενίου

3.3.1 Γενικά

Η δοκιμασία λεύκανσης β-καροτενίου ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στον τομέα των τροφίμων. Ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων που βασίζονται μεταφορά ατόμου υδρογόνου (*hydrogen atom transfe - HAT*). (Prior et al, 2005). Χρησιμοποιείται σε φυσικά εκχυλίσματα, δείγματα τροφίμων, κόκκων, φρούτων, λαχανικών και σε διάφορους τύπους χημικών ενώσεων. Η συγκεκριμένη μέθοδο αποτελεί αναφορά για τις επόμενες τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν οι οποίες περιλάμβαναν την απλοποίηση της μεθόδου και στη συνέχεια τη μεταφορά της σε μικροπλακίδια. Μερικές από εκείνες σχετίζονται με διαφορές στην παρασκευή και στην διατήρηση των αντιδραστηρίων, στο pH, τη θερμοκρασία, και μερικές φορές των διαλυτών οι οποίοι αποτελούν εμπόδιο στην άμεση σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων. (Prieto et al, 2012).

Πλεονεκτήματα μεθόδου

Η μέθοδος λεύκανσης β-καροτενίου φαίνεται να ευνοεί σε ένα λιπιδικό γαλάκτωμα την δράση των άπολων αντιοξειδωτικών συγκριτικά με την δράση πολικών αντιοξειδωτικών. (Prieto et al, 2012). Η εφαρμογή της υπό συγκεκριμένες συνθήκες είναι ικανή να παρέχει ισχυρά κριτήρια τα οποία ευνοούν την λεπτομερειακή σύγκριση των χαρακτηριστικών των διάφορων αντιοξειδωτικών καθώς και ορισμένων προοξειδωτικών. Έχουν διεξαχθεί έρευνες όπου εξετάζονται οι παράγοντες που πιθανόν να επιδρούν στην αναπαγωγικότητα της μεθόδου και με αυτό τον τρόπο έχουν βρεθεί τα κατάλληλα μοντέλα τα οποία εφαρμόζονται με στόχο την εκτίμηση τόσο της αντιοξειδωτικής όσο και της προοξειδωτικής δράσης με την αναπαραγωγή της μεθόδου. (Prieto et al, 2012)

Μειονεκτήματα μεθόδου

Παρά την χρησιμότητάς της έχει κριθεί εξαιτίας του γεγονότος ότι παρουσιάζει χαμηλή αναπαραγωγικότητα, προβληματική ποσοτικοποίηση σε σύνθετα παρασκευάσματα αντιδραστηρίων από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένου της θερμοκρασίας, του pH, διαλυτών και μετάλλων. (Prieto et al, 2012)

Η μέθοδος έχει επικριθεί διότι θεωρείται ότι η αντίδραση του β-καροτενίου δεν είναι αντιπροστατευτική της οξειδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα. Αφορμή για την συγκεκριμένη διαφωνία είναι η μορφή με την οποία εντοπίζονται τα λιπίδια σε αυτά δηλαδή με την μορφή των τριγλυκεριδίων. Παράλληλα οι παράγοντες τροποποίησης της οξειδωσης μπορεί να προκαλούν συνεργαστικές ή ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον ότι το β-καροτένιο είναι ευαίσθητο στο O_2 και την υψηλή θερμοκρασία είτε με την παρουσία είτε με την απουσία του λινολεϊκού οξέος. Η χαμηλή αναπαραγωγικότητα της δοκιμασίας είναι πιθανόν να οφείλεται στην πολυπλοκότητα του αντιδραστήριου και στις μη κατάλληλες συνθήκες επαγωγής της θερμότητας η οποία μπορεί να επιφέρει ως αποτέλεσμα τη δράση των ελεύθερων ριζών ως εκκινητές.

Η συγκεκριμένη θερμικά επαγόμενη μέθοδος είναι αρκετά μη συγκεκριμένη και μπορεί να περιλαμβάνει και την θερμική υποβάθμιση του β-καροτενίου. Η θερμική επεξεργασία οδηγεί στην παραγωγή ισομερισμού καροτενοειδών στο πρώτο στάδιο και έτσι δημιουργεί προϊόντα με διαφορετικές αντιδραστικές ικανότητες παρόλο που η απορρόφησή τους κυμαίνεται κοντά σε εκείνη του β-καροτενίου. (*Chaillou et al, 2005*). Επιπλέον τα αποτελέσματα της δεν μπορούν ερμηνευτούν τόσο εύκολα γιατί και το ίδιο το β-καροτένιο είναι αντιοξειδωτικό το οποίο είναι ευαίσθητο στο O_2 . (*Chaillou et al, 2005*).

3.3.2 Αρχή της μεθόδου

Η λεύκανση του β-καροτενίου που περιεγράφηκε σχετίζεται με την μέτρηση της λεύκανσης του β-καροτενίου στα 470 *nm* η οποία προκύπτει από την οξειδωση του β-καροτενίου από τα προϊόντα της αποικοδόμησης του λινολεϊκού οξέος. Το *Tween* είναι γαλακτοματοποιητής που χρησιμοποιείται για την διασπορά του λινολεϊκού οξέος και του β-καροτενίου στην υδατική φάση. (*Laguerre et al, 2007*).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον αποχρωματισμό του κιτρινωπού χρώματος του β-καροτενίου (*Ueno et al, 2014*). Αποτελεί μια μέθοδο παρεμπόδισης της λεύκανσης του β-καροτενίου σε συζευγμένη οξειδωση του λινολεϊκού οξέος. Ανήκει στην κατηγορία των φασματοφωτομετρικών τεχνικών

όπου παρακολουθείται η λεύκανση του καροτενοειδούς που προκαλείται από την αλληλεπίδρασή του με ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται κατά την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος. Η παρακολούθηση της λεύκανσης πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 470 nm . (Chaillou et al, 2005) Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα γαλακτοποιημένο λιπαρό οξύ, το λινολεϊκό οξύ. Οι ρίζες που παράγονται από την διαδικασία αυτοοξειδωσης του λινολεϊκού οξέος με θέρμανση σε θερμοκρασία $50\text{ }^\circ\text{C}$ και σε ατμοσφαιρικό αέρα καταστρέφουν το β-καροτένιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει αποτελέσματα μετρώντας την μείωση της απορρόφησης του β-καροτενίου σε μήκος κύματος 470 nm η οποία επιβραδύνεται με την παρουσία αντιοξειδωτικών. Η λεύκανση του β-καροτενίου αποτελεί μια διαδικασία όπου κάθε προσδιορισμός επιβάλλει αναμονή 2 ωρών στην θερμοκρασία των $50\text{ }^\circ\text{C}$ και η χρήση της περιορίζεται στην περίπτωση που ο αριθμός των δειγμάτων είναι μεγάλος.

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για το υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας περιγράφεται παρακάτω:

C_{AA} : *Antioxidant activity coefficient* (συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας)

$$CAA: = 1 - \frac{\{As\ 470nm\ (t = 0) - As\ 470nm(t = 120)\}}{\{Ac\ 470nm\ (t = 0) - Ac\ 470nm(t = 120)\}}$$

- $As(t=0)$, $As(t=120)$ απορρόφηση δείγματος σε χρόνους 0 και 120 λεπτά
- $A_c(t=0)$, $A_c(t=120)$ απορρόφηση control σε χρόνους 0 και 120 λεπτά

$\%AA$: *Antioxidant activity*

$$AA = \frac{\{degradation\ rate\ of\ control - deagradation\ rate\ of\ sample\}}{\{degradation\ rate\ of\ control\}} \times 100$$

Όπου $rate\ of\ b\text{-Carotene}\ bleaching = \ln\left\{\frac{A(t=0)}{A(t=120)}\right\} \times \frac{1}{120}$

Η μέθοδος παρουσιάζει ευαισθησία εξαιτίας της ισχυρής απορρόφησης που παρουσιάζει το β-καροτένιο. Η φασματοσκοπική αυτή τεχνική εξετάζει την

λεύκανση του καροτενοειδούς. Επιπλέον χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας σε περιπτώσεις αντιοξειδωτικών τα οποία δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνου. (*Prieto et al, 2012*)

Όπως έχει προαναφερθεί ιδιαίτερο στην συγκεκριμένη μέθοδο ενδιαφέρον παρουσιάζει το φαινόμενο το οποίο ονομάζεται «πολικό παράδοξο» (*Porter, 1993; Frankel et al., 1994*). Έχει παρατηρηθεί ότι τα άπολα αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε γαλακτώματα εξαιτίας της συγκέντρωσής τους στην λιπιδική επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο προστατεύουν σε υψηλό βαθμό το ίδιο το γαλάκτωμα. Αντίθετα στην περίπτωση των πολικών αντιοξειδωτικών τα οποία παραμένουν στην υδατική φάση παρατηρείται λιγότερη αποτελεσματική προστασία του λιπιδίου. (*Koleva et al, 2002*). Παραδείγματα αποτελούν η α-τοκοφερόλη αφού ως μη πολικό αντιοξειδωτικό είναι λιγότερο αποτελεσματικό σε έλαιο αλλά είναι σε μεγάλο βαθμό αποτελεσματικό σε γαλάκτωμα ελαίου σε νερό ενώ το ασκορβικό οξύ ή το *Trolox* τα οποία είναι πολικά αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά σε έλαιο συγκριτικά με γαλάκτωμα. (*Pokony et al, 2001*).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία σε έρευνα που έχει διεξαχθεί με σκοπό την μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν τα φυτικά εκχυλίσματα έχει αποδειχθεί ότι περισσότερο δραστικοί αναστολείς για την λεύκανση του β-καροτενίου ήταν κυρίως τα άπολα εκχυλίσματα ενώ τα πολικά παρουσίαζαν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Ακόμη τα υδατικά εκχυλίσματα έδειξαν και προοξειδωτική δραστηριότητα. (*Koleva et al, 2002*). Επιπλέον μετά από έρευνες έχει βρεθεί και ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει ένα αντιοξειδωτικό σχετίζονται περισσότερο με τη δραστηριότητα του συγκριτικά με την πολικότητα του. (*Pratt and Birac, 1979*). Ο τρόπος με τον οποίο διασπείρεται το αντιοξειδωτικό στις διάφορες φάσεις σε ένα γαλάκτωμα φαίνεται να επηρεάζει στην δραστηριότητα του. (*Koleva et al, 2002*).

4 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ NaCl ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ

Η προσθήκη NaCl στα τρόφιμα πραγματοποιείται με σκοπό την ανάδειξη της γεύσης και παράλληλα την παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης σε αυτά. Ωστόσο σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές και αποτελέσματα ερευνών έχει διαπιστωθεί μια ακόμη χαρακτηριστική ιδιότητα του NaCl. Η ιδιότητα αυτή περιλαμβάνει την επίδραση του στη λιπιδική οξείδωση. Οι απόψεις φαίνεται να είναι αντιφατικές. Μέσω διεξαγωγής ερευνών έχει αποδειχθεί ότι το NaCl παρουσιάζει ρόλο επιταχυντή στην λιπιδική οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα σε προϊόντα βόειου κρέατος, χοιρινού, κοτόπουλου και ψαριού φαίνεται ότι η προσθήκη του NaCl προκάλεσε διέγερση της λιπιδικής οξείδωσης. Ωστόσο άλλες έρευνες δείχνουν αναστολή των ποσοστών οξείδωσης των λιπιδίων με την παρουσία του στα τρόφιμα. Ταυτόχρονα αναφέρεται ότι η οξείδωση των λιπιδίων που ενεργοποιείται από το NaCl όταν προτίθεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να αναστέλλεται όταν η συγκέντρωση του είναι μεγαλύτερη από 2% στο χοιρινό κρέας. (Osinchak et al, 1991).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την μελέτη της ικανότητας του NaCl να επιδρά στην κατάλυση της οξείδωσης σε μυϊκούς ιστούς σε ψάρι σκουμπρί τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική διαφορά συγκριτικά με την απουσία του στους μυϊκούς ιστούς. Ο ρυθμός και η ταχύτητα οξείδωσης με την προσθήκη του NaCl αυξάνεται με μεγάλο βαθμό. Ταυτόχρονα έχει αναγνωριστεί ότι το NaCl ανήκει στην κατηγορία των προ-οξειδωτικών γεγονός που διαπιστώνεται και στην συγκεκριμένη πειραματική έρευνα. (Osinchak et al, 1991).

5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Υλικά- Συσκευές

- *B-Carotene*
- *Linoleic acid*
- *Chloroform*
- Διάλυμα αντιοξειδωτικών *Gallic acid, Trolox, trans- Ferulic acid, Caffeic acid, p- Coumaric acid 32 mM* σε μεθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα *Britton (10 mM)* σε *pH 5.5, 6.5* με συγκεντρώσεις *NaCl* 0, 0.1 και 0.5 M αντίστοιχα

5.1.1 Όργανα- Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο *Thermo-scientific, Evolution 201*
- Συσκευή μέτρησης μεγέθους σωματιδίων και z-δυναμικού *Malvern Zetasizer Nano ZS*

5.2 Πειραματική διαδικασία

A. Λεύκανση β-καροτενίου

I. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος Britton

Για τη παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται 0,6183 g Βορικό οξύ (H_3BO_3), 0,574 mL *Glacial* οξικό οξύ (CH_3COOH), 0,684 mL Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) σε όγκο διαλύματος 1000 mL . Μετρίεται το pH και για την ρύθμιση της τιμής του αντίστοιχα σε 5.5 ή 6.5, προστίθενται *NaOH*

II. Παρασκευή διαλύματος καροτενίου

Σε ογκομετρική φιάλη 20 mL προστίθενται 0,0200 g καροτενίου και 4 mL *Tween 80* και ακολουθεί συμπλήρωση με *Chloroform* και αποθηκεύεται στην κατάψυξη τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο.

Παρασκευάζονται δυο αιωρήματα. Το ένα αιώρημα περιέχει καροτένιο και το δεύτερο χρησιμοποιείται ως τυφλό και δεν περιέχει καροτένιο. Στο αιώρημα που περιέχει καροτένιο προστίθενται 1 mL από διάλυμα καροτενίου, 20 μL linoleic acid, και 50 mL ρυθμιστικό διάλυμα στην αντίστοιχη συγκέντρωση 0, 0.1 και 0.5 M NaCl και τιμή pH 5.5, 6.5 σε κάθε περίπτωση. Παράλληλα στο τυφλό αιώρημα προστίθενται οι ίδιες ποσότητες εκτός από την προσθήκη του διαλύματος καροτενίου.

Ακολουθεί εξάτμιση του χλωροφόρμιου από την πρώτη φιάλη σε υπό κενό βρύση για 5 λεπτά και οι δυο φιάλες αναδεύονται. Στην συνέχεια σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται μεθανολικό διάλυμα αντιοξειδωτικού ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 50, 100, 200, 400, 600 και 800 mM, ρυθμιστικό διάλυμα, γαλάκτωμα και με την βοήθεια VORTEX αναδεύονται. Σε 7ο δοκιμαστικό σωλήνα δεν προστίθεται αντιοξειδωτικό και χρησιμοποιείται ως control.

Οι σωλήνες φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 470 nm και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 50 °C όπου παραμένουν για 2 ωρών. Μετα οι σωλήνες τοποθετούνται σε παγόλουτρο με σκοπό την διακοπή της οξείδωσης και ακολουθεί ξανά φωτομέτρηση στα 470 nm.

B. Προσδιορισμός μεγέθους σωματιδίων και z- δυναμικού

Για τον προσδιορισμό του z-δυναμικού παρασκευάστηκαν αιωρήματα τα οποία περιείχαν 20 μL linoleic acid και 200 μL Tween 80 και ρυθμιστικό διάλυμα Britton σε συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M αντίστοιχα και αναδεύτηκαν. Στην συνέχεια ρυθμίστηκε η τιμή του pH με την προσθήκη HCl και NaOH υπό την συνεχή ανάδευση. Για την μέτρηση του z-δυναμικού προστέθηκε αιώρημα στην κυβελίδα η οποία τοποθετήθηκε στην συσκευή μέτρησης z-δυναμικού. Το z-δυναμικό μετρήθηκε σε διάφορες τιμές ξεκινώντας από τιμές όξινου pH και φθάνοντας σε βασικές τιμές pH.

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την παραπάνω πειραματική διαδικασία και αφορούν την επι της % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και τον συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των διαφόρων αντιοξειδωτικών.

Πίνακας 6.1: Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *Gallic acid* σε pH 5.5

<i>Gallic acid</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	20.13 \pm 15.16	-0.01 \pm 0.07
100	14.83 \pm 20.01	-0.02 \pm 0.01
200	23.58 \pm 15.10	-0,04 \pm 0.05
400	43.82 \pm 20.89	-0.20 \pm 0.11
600	52.97 \pm 12.89	-0.29 \pm 0.06
800	62.98 \pm 15.70	-0.42 \pm 0.11
NaCl 0,1M		
50	-18.77 \pm 0.70	-0.20 \pm 0.03
100	-16.26 \pm 4.30	-0.17 \pm 0.01
200	-13.10 \pm 12.47	-0.13 \pm 0,08
400	-12.81 \pm 8.43	-0.08 \pm 0.06
600	21,40 \pm 5.78	-0.16 \pm 0.03
800	27.74 \pm 3.34	-0.22 \pm 0.01
NaCl 0,5M		
50	-17.92 \pm 0.24	-0.31 \pm 0.13
100	-22.09 \pm 17.26	-0.24 \pm 0.15
200	1.08 \pm 31.72	-0.05 \pm 0.31
400	15.29 \pm 26.11	0.07 \pm 0.30
600	28.40 \pm 24.93	0.14 \pm 0.37
800	36.02 \pm 25.87	0.25 \pm 0.35

Πίνακας 6.2: Αντιοξειδωτική δραστηριότητα Trolox (μM) σε pH 5.5

<i>Trolox</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	79.03 \pm 3.28	0.65 \pm 0.02
100	83.28 \pm 2.90	0.72 \pm 0.02
200	85.08 \pm 1.12	0.74 \pm 0.02
400	87.94 \pm 1.06	0,79 \pm 0.02
600	92.13 \pm 2.31	0.87 \pm 0.04
800	94.23 \pm 2.07	0.90 \pm 0.03
NaCl 0,1M		
50	45.13 \pm 4.48	0.29 \pm 0.07
100	51.47 \pm 5.03	0.37 \pm 0.07
200	57.83 \pm 8.89	0.52 \pm 0.08
400	69.84 \pm 7.19	0.65 \pm 0.07
600	68.82 \pm 4.51	0.64 \pm 0.05
800	73.12 \pm 2.68	0.68 \pm 0.03
NaCl 0,5M		
50	12.34 \pm 1.83	0.08 \pm 0.18
100	22.89 \pm 5.60	0.14 \pm 0.06
200	40.16 \pm 11.42	0.37 \pm 0.09
400	49.55 \pm 14.45	0.49 \pm 0.08
600	69.05 \pm 10.62	0.65 \pm 0.11
800	73.29 \pm 10.59	0.70 \pm 0.11

Πίνακας 6.3 : Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *trans Ferulic acid* (μM) σε pH 5.5

<i>trans- Ferulic acid</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	45.84 \pm 6.02	0.29 \pm 0.06
100	58.09 \pm 4.31	0.40 \pm 0.07
200	66.27 \pm 3.87	0.50 \pm 0.07
400	75.22 \pm 3.46	0.60 \pm 0.04
600	79.67 \pm 1.52	0.66 \pm 0.02
800	83.65 \pm 1.31	0.73 \pm 0.04
NaCl 0,1M		
50	3.21 \pm 1.04	-0.01 \pm 0.00
100	16.70 \pm 4.34	0.12 \pm 0.01
200	19.57 \pm 2.03	0.15 \pm 0.01
400	28.68 \pm 6.92	0,24 \pm 0.06
600	37.05 \pm 7.12	0.29 \pm 0.03
800	38.25 \pm 5.10	0.31 \pm 0.02
NaCl 0,5M		
50	-2.71 \pm 0.68	-0.03 \pm 0.02
100	-1.23 \pm 4.60	-0.08 \pm 0.06
200	4.72 \pm 1.48	0.08 \pm 0.07
400	15.79 \pm 3.05	0.10 \pm 0.01
600	21.24 \pm 3.20	0.18 \pm 0.02
800	26.48 \pm 4.38	0.24 \pm 0.04

Πίνακας 6.4: Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *Caffeic acid* (μM) σε pH 5.5

<i>Caffeic acid</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	46.08 \pm 0.97	0.24 \pm 0.01
100	53.68 \pm 1.93	0.32 \pm 0.02
200	60.91 \pm 3.64	0.39 \pm 0.05
400	73.67 \pm 2.07	0.59 \pm 0.02
600	77.42 \pm 4.20	0.66 \pm 0.06
800	79.89 \pm 3.23	0.68 \pm 0.04
NaCl 0,1M		
50	-20.73 \pm 5.60	-0.25 \pm 0.06
100	-14.61 \pm 3.40	-0.18 \pm 0.03
200	-6.10 \pm 8.51	-0.09 \pm 0.07
400	19.56 \pm 3.85	0.09 \pm 0.17
600	31.79 \pm 3.29	0.28 \pm 0.03
800	37.14 \pm 8.19	0.24 \pm 0.05
NaCl 0,5M		
50	-36.07 \pm 7.80	-0.26 \pm 0.15
100	-24.01 \pm 3.82	-0.19 \pm 0.09
200	1.71 \pm 2.10	-0.12 \pm 0.09
400	13.38 \pm 1.56	0.13 \pm 0.01
600	19.63 \pm 0.92	0.23 \pm 0.01
800	31.74 \pm 7.51	0.28 \pm 0.02

Πίνακας 6.5 : Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *p- Coumaric acid* (μM) σε pH 5.5

<i>p- Coumaric acid</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	6.57 \pm 4.35	-0.04 \pm 0.04
100	14.04 \pm 1.30	0.02 \pm 0.00
200	25,10 \pm 2.02	0.09 \pm 0.02
400	30.67 \pm 1.53	0.13 \pm 0.01
600	41.29 \pm 2.61	0.23 \pm 0.01
800	46.24 \pm 1.63	0.28 \pm 0.02
NaCl 0,1M		
50	-2.57 \pm 1.44	-0.05 \pm 0.02
100	2.88 \pm 0.18	0.00 \pm 0.00
200	18.13 \pm 7.24	0.07 \pm 0.04
400	23.26 \pm 2.39	0.19 \pm 0.01
600	23.30 \pm 6.33	0.20 \pm 0.06
800	25.89 \pm 6.66	0.23 \pm 0.06
NaCl 0,5M		
50	-11.32 \pm 2.59	-0.13 \pm 0.02
100	-3.77 \pm 3.59	-0.07 \pm 0.03
200	6.35 \pm 3.26	0.03 \pm 0.05
400	9.69 \pm 0.79	0.04 \pm 0.01
600	12.26 \pm 2.63	0.11 \pm 0.03
800	16.64 \pm 1.74	0.15 \pm 0.02

Πίνακας 6.6 : Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *Gallic acid* (μM) σε pH 6.5

<i>Gallic acid</i> (μM)	% antioxidant activity	antioxidant activity coefficient
NaCl 0 M		
50	42.13 \pm 3.76	0.10 \pm 0.01
100	59.82 \pm 2.15	0.28 \pm 0.02
200	74.98 \pm 3.71	0.48 \pm 0.04
400	82.29 \pm 1.79	0.61 \pm 0.01
600	85.33 \pm 2.19	0.67 \pm 0.03
800	87.49 \pm 1.15	0.72 \pm 0.02
NaCl 0,1M		
50	-26.87 \pm 2.07	-0.21 \pm 0.04
100	-9.27 \pm 0.03	-0.11 \pm 0.01
200	6.35 \pm 2.27	0.01 \pm 0.02
400	34.48 \pm 1.98	0.25 \pm 0.02
600	43.76 \pm 6.22	0.34 \pm 0.06
800	49.50 \pm 5.70	0.40 \pm 0.06
NaCl 0,5M		
50	-2.25 \pm 2.05	-0.07 \pm 0.01
100	19.09 \pm 6.62	0.06 \pm 0.03
200	34.46 \pm 0.12	0.28 \pm 0.01
400	45.89 \pm 3.74	0.39 \pm 0.05
600	54.41 \pm 5.86	0.42 \pm 0.12
800	58.73 \pm 3.06	0.49 \pm 0.07

Πίνακας 6.7 : Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *Trolox* (μM) σε pH 6.5

<i>Trolox</i> (μM)	% antioxidant activity	antioxidant activity coefficient
NaCl 0 M		
50	87.37 \pm 0.93	0.65 \pm 0.03
100	88.67 \pm 1.10	0.69 \pm 0.04
200	89.47 \pm 0.95	0.71 \pm 0.03
400	90.23 \pm 0.84	0.74 \pm 0.03
600	90.80 \pm 0.57	0.75 \pm 0.02
800	91.04 \pm 0.58	0.76 \pm 0.02
NaCl 0,1M		
50	51.60 \pm 0.76	0.39 \pm 0.00
100	54.98 \pm 5.66	0.46 \pm 0.01
200	61.53 \pm 4.82	0.50 \pm 0.06
400	66.64 \pm 3.87	0.56 \pm 0.05
600	70.70 \pm 3.37	0.61 \pm 0.04
800	73.09 \pm 3.26	0.64 \pm 0.04
NaCl 0,5M		
50	38.52 \pm 1.86	0.32 \pm 0.03
100	47.30 \pm 1.64	0.41 \pm 0.01
200	53.76 \pm 2.08	0.48 \pm 0.02
400	57.44 \pm 5.88	0.52 \pm 0.06
600	65.08 \pm 1.45	0.60 \pm 0.01
800	69.38 \pm 6.20	0.65 \pm 0.07

Πίνακας 6.8: Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *trans-Ferulic acid* (μM) σε pH 6.5

<i>trans-Ferulic acid</i> (μM)	% antioxidant activity	antioxidant activity coefficient
NaCl 0 M		
50	37.69 \pm 6.62	0.05 \pm 0.04
100	47.98 \pm 3.93	0.13 \pm 0.01
200	61.07 \pm 1.05	0.27 \pm 0.02
400	70.78 \pm 3.04	0.40 \pm 0.04
600	77.59 \pm 2.09	0.51 \pm 0.03
800	81.01 \pm 2.14	0.58 \pm 0.05
NaCl 0,1M		
50	20.62 \pm 1.35	0.14 \pm 0.04
100	23.06 \pm 3.65	0.15 \pm 0.04
200	29.27 \pm 4.97	0.21 \pm 0.05
400	34.57 \pm 3.49	0.26 \pm 0.04
600	40.84 \pm 5.09	0.33 \pm 0.05
800	42.36 \pm 6.53	0.35 \pm 0.07
NaCl 0,5M		
50	11.81 \pm 2.09	0.07 \pm 0.02
100	17.89 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01
200	21.19 \pm 4.02	0.15 \pm 0.04
400	24.29 \pm 1.17	0.19 \pm 0.01
600	29.62 \pm 0.58	0.24 \pm 0.01
800	31.89 \pm 1.28	0.27 \pm 0.01

Πίνακας 6.9 : Αντιοξειδωτική δραστηριότητα *Caffeic acid* (μM) σε pH 6.5

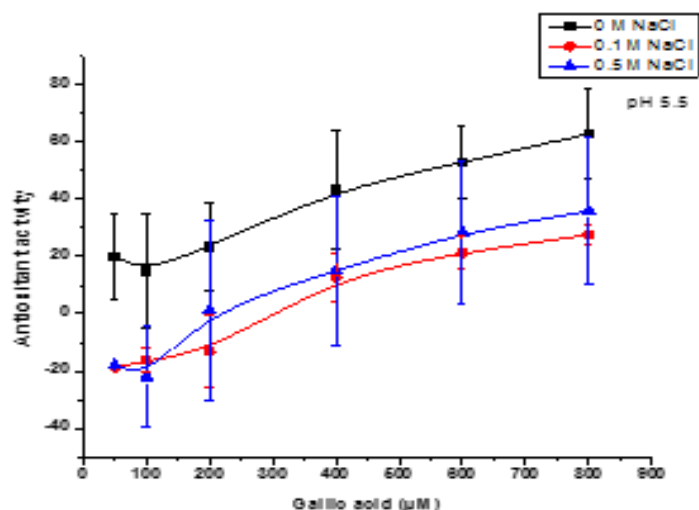
<i>Caffeic acid</i> (μM)	% antioxidant activity	antioxidant activity coefficient
NaCl 0 M		
50	68.41 \pm 2.18	0.31 \pm 0.02
100	76.11 \pm 1.97	0.44 \pm 0.02
200	82.62 \pm 1.53	0.57 \pm 0.01
400	87.64 \pm 1.75	0.67 \pm 0.03
600	87.90 \pm 2.19	0.69 \pm 0.04
800	89.90 \pm 1.62	0.73 \pm 0.03
NaCl 0,1M		
50	-5.69 \pm 1.32	-0.11 \pm 0.03
100	6.47 \pm 1.68	0.00 \pm 0.00
200	16.46 \pm 1.12	0.08 \pm 0.00
400	28.12 \pm 0.67	0.19 \pm 0.01
600	35.95 \pm 2.23	0.26 \pm 0.02
800	42.32 \pm 2.04	0.32 \pm 0.03
NaCl 0,5M		
50	-5.10 \pm 0.69	-0.09 \pm 0.02
100	-4.10 \pm 2.32	-0.06 \pm 0.02
200	7.07 \pm 1.23	0.04 \pm 0.01
400	22.10 \pm 5.70	0.17 \pm 0.06
600	31.89 \pm 1.75	0.23 \pm 0.07
800	36.34 \pm 5.19	0.26 \pm 0.09

Πίνακας 6.10 : Αντιοξειδωτική δραστηρότητα *p-Coumaric acid* (μM) σε pH 6.5

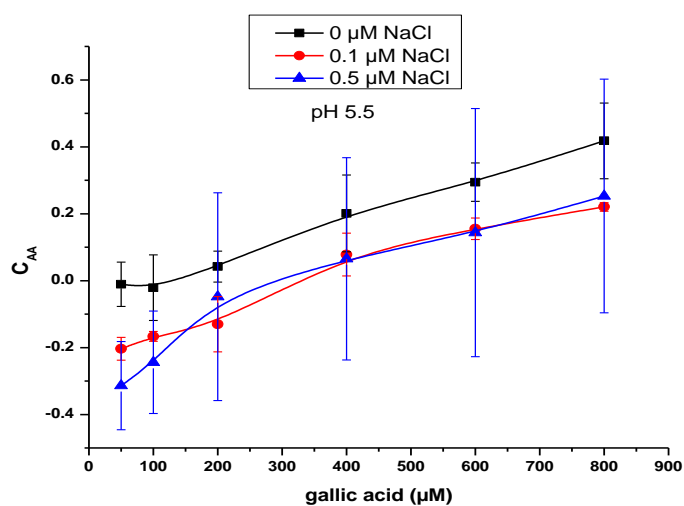
<i>p-Coumaric acid</i> (μM)	% <i>antioxidant activity</i>	<i>antioxidant activity coefficient</i>
NaCl 0 M		
50	10.38 \pm 4.53	-0.05 \pm 0.04
100	17.43 \pm 1.76	-0.02 \pm 0.02
200	33.56 \pm 7.09	0.06 \pm 0.03
400	43.20 \pm 7.38	0.11 \pm 0.06
600	52.14 \pm 7.36	0.18 \pm 0.07
800	54.80 \pm 7.45	0.24 \pm 0.07
NaCl 0,1M		
50	4.49 \pm 1.72	-0.01 \pm 0.01
100	6.89 \pm 1.75	0.02 \pm 0.02
200	13.16 \pm 0.52	0.06 \pm 0.01
400	20.34 \pm 1.58	0.13 \pm 0.02
600	25.43 \pm 1.92	0.18 \pm 0.02
800	27.81 \pm 1,76	0.20 \pm 0.02
NaCl 0,5M		
50	4,48 \pm 0.18	-0.00 \pm 0.01
100	5.71 \pm 0.20	0.02 \pm 0.00
200	11.40 \pm 0.66	0.08 \pm 0.01
400	13.90 \pm 1.80	0.10 \pm 0.02
600	17.06 \pm 2.27	0.13 \pm 0.02
800	19.07 \pm 1.93	0.16 \pm 0.02

6.1 % Αντιοξειδωτική δραστηριότητα και C_{AA} σε pH 5.5

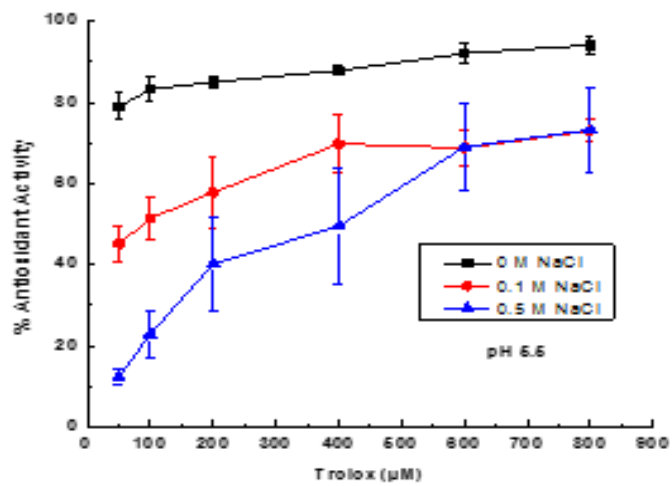
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα που αντιστοιχούν στην επί της % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και στον συντελεστή αντιοξειδωτικής ικανότητας σε pH 5.5 για κάθε αντιοξειδωτικό αντίστοιχα.



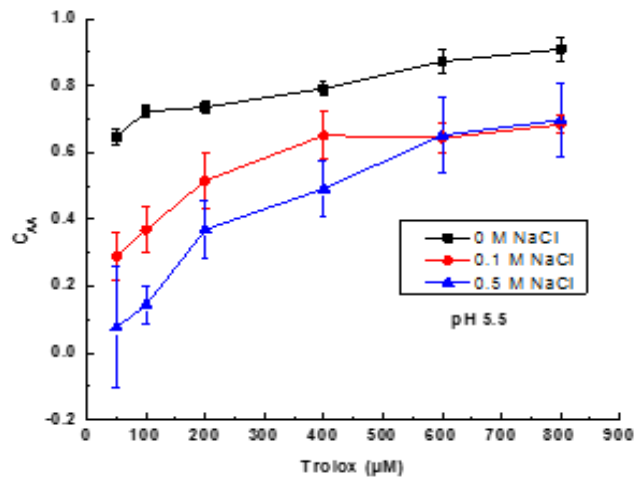
Σχήμα 6.1.1: % Αντιοξειδωτική δραστηριότητα Gallic acid



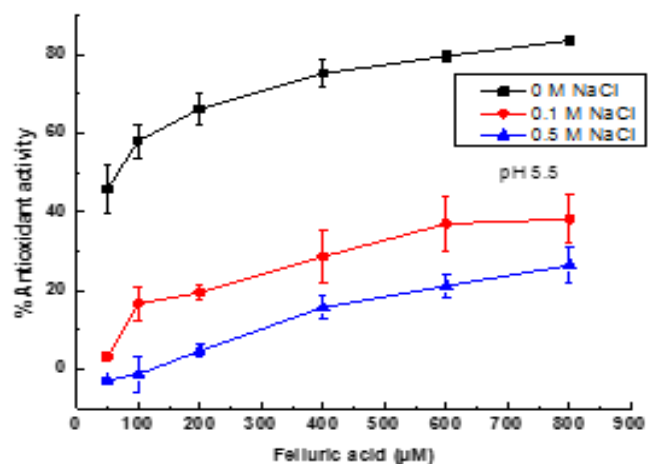
Σχήμα 6.1.2: Συντελεστής αντιοξειδωτικής ικανότητας Gallic acid



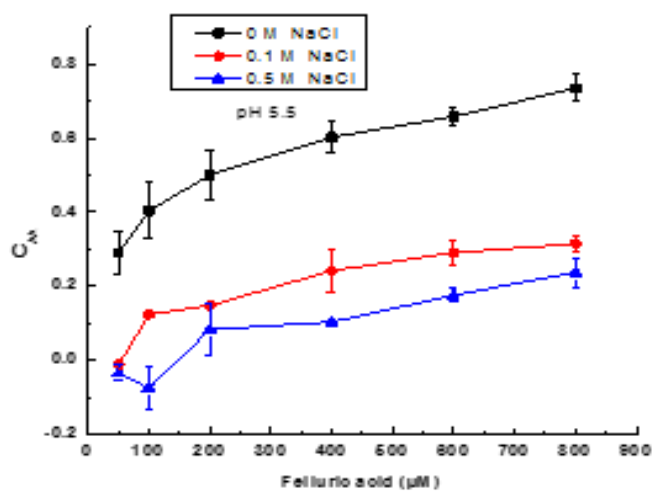
Σχήμα 6.1.3: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα Trolox



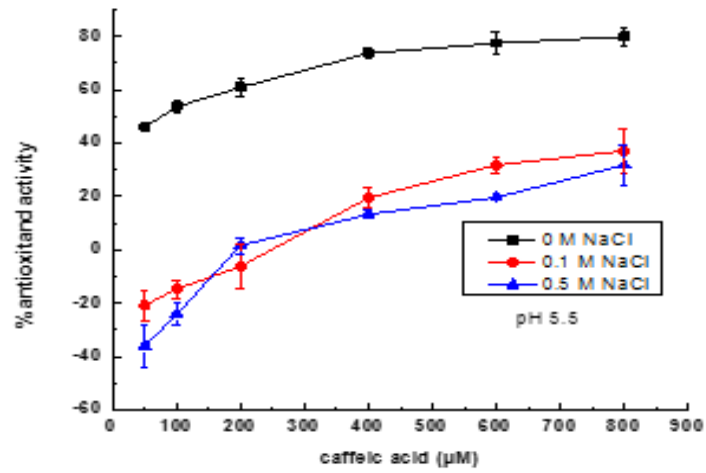
Σχήμα 6.1.4: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας Trolox



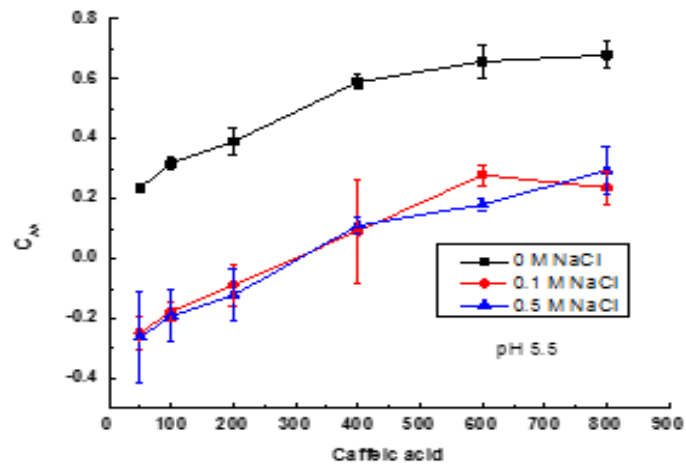
Σχήμα 6.1.5: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *trans-Ferulic acid*



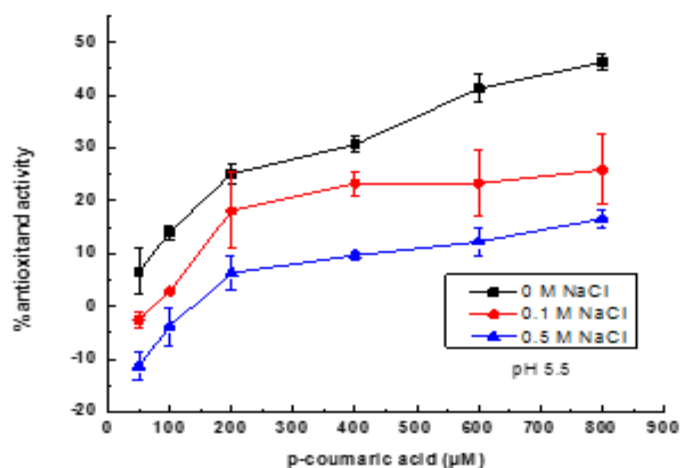
Σχήμα 6.1.6: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *trans-Ferulic acid*



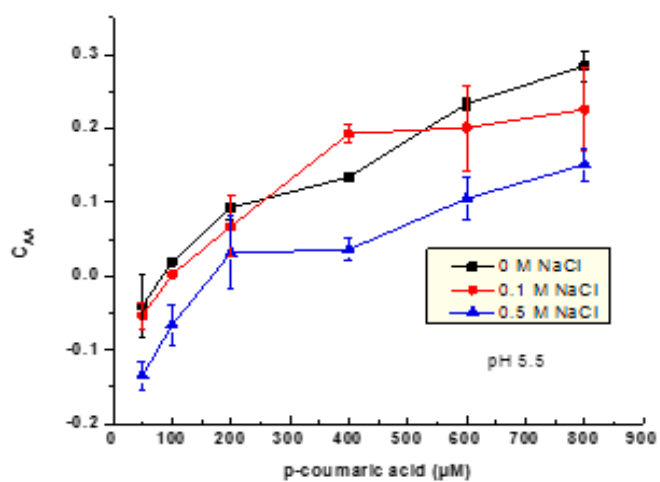
Σχήμα 6.1.7: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *Caffeic acid*



Σχήμα 6.1.8: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *Caffeic acid*



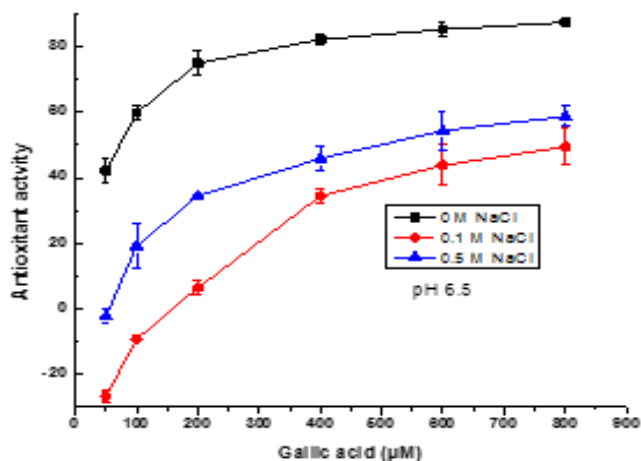
Σχήμα 6.1.9: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *p*- Coumaric acid



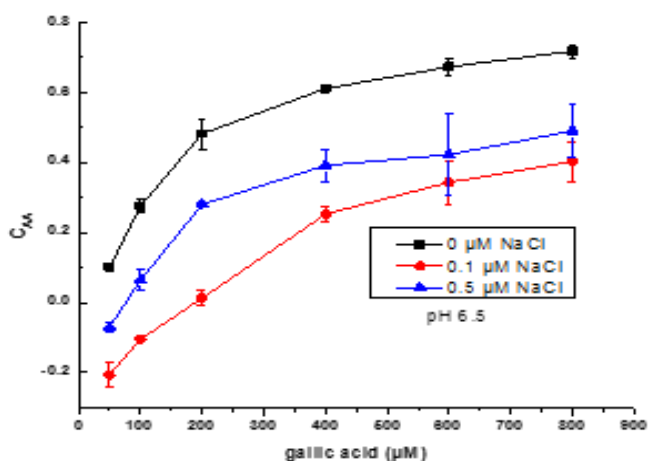
Σχήμα 6.1.10: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *p*- Coumaric acid

6.2 % Αντιοξειδωτική δραστικότητα και C_{AA} σε pH 6.5

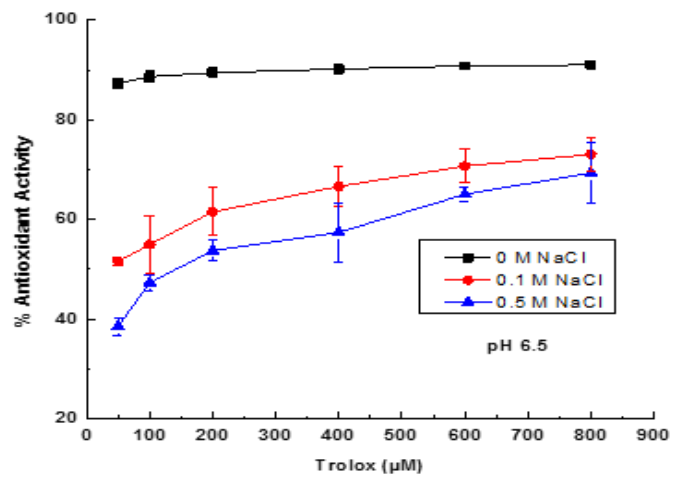
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα αντίστοιχα της επί της % αντιοξειδωτικής δραστικότητας και του συντελεστή αντιοξειδωτικής ικανότητας σε pH 6.5.



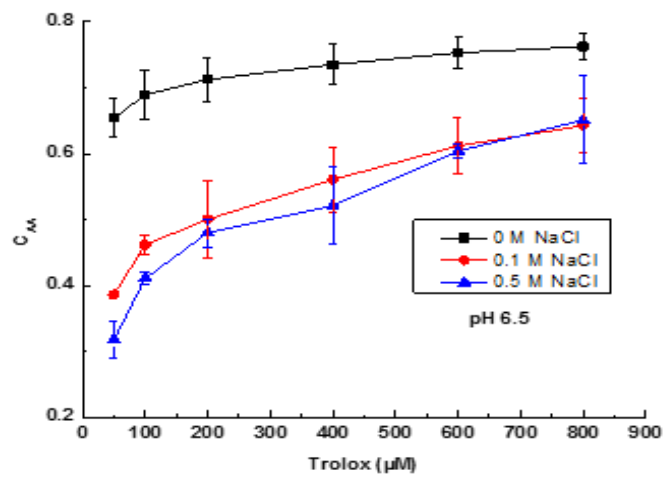
Σχήμα 6.2.1: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *Galic acid*



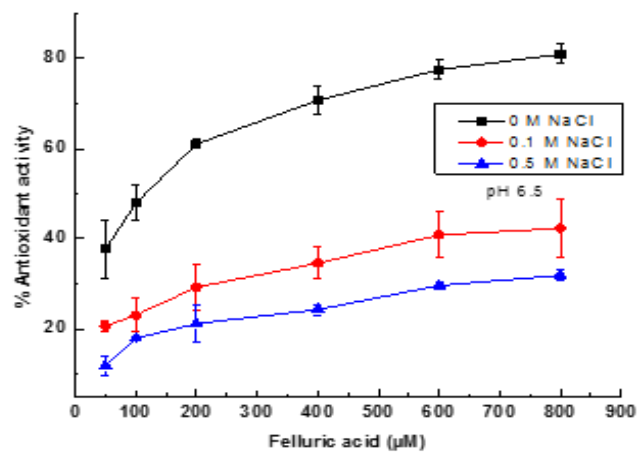
Σχήμα 6.2.2: Συντελεστής αντιοξειδωτικής ικανότητας *Galic acid*



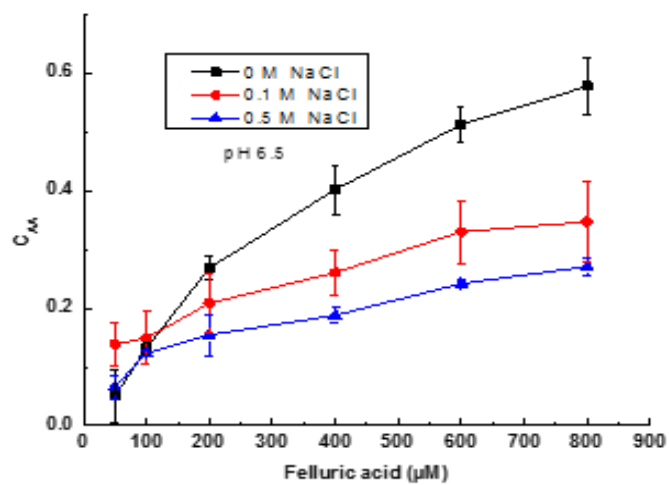
Σχήμα 6.2.3: % Αντιοξειδωτική δραστηριότητα Trolox



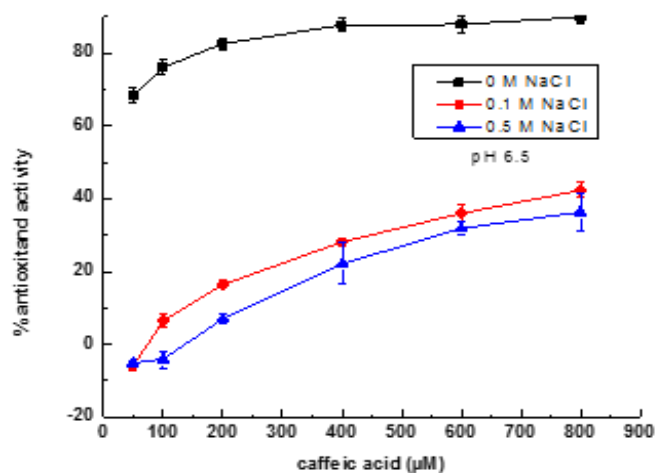
Σχήμα 6.2.4: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας Trolox



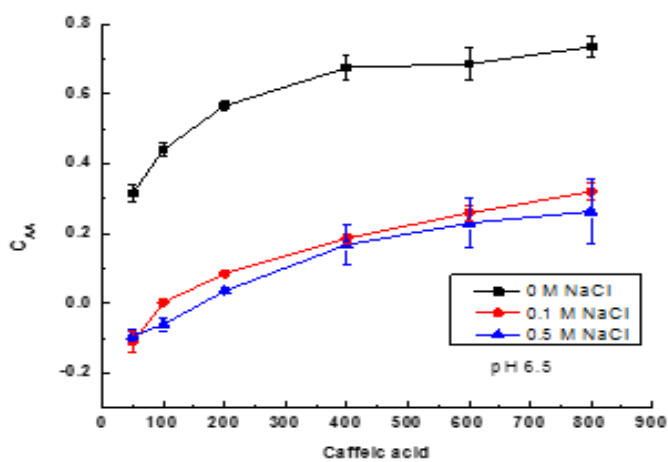
Σχήμα 6.2.5: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *trans-Ferulic acid*



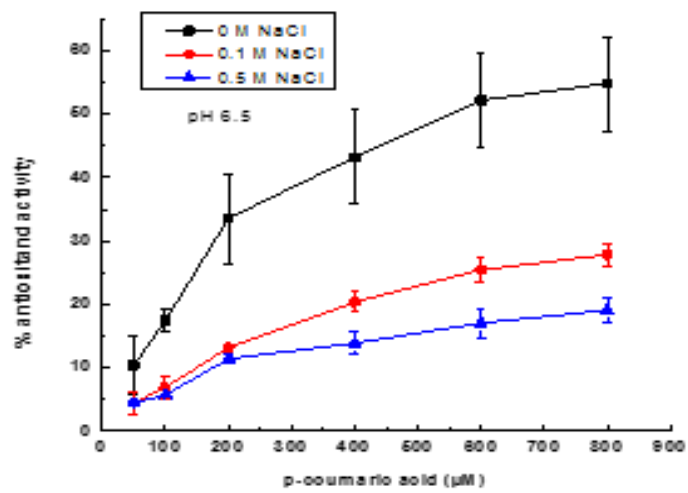
Σχήμα 6.2.6: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *trans-Ferulic acid*



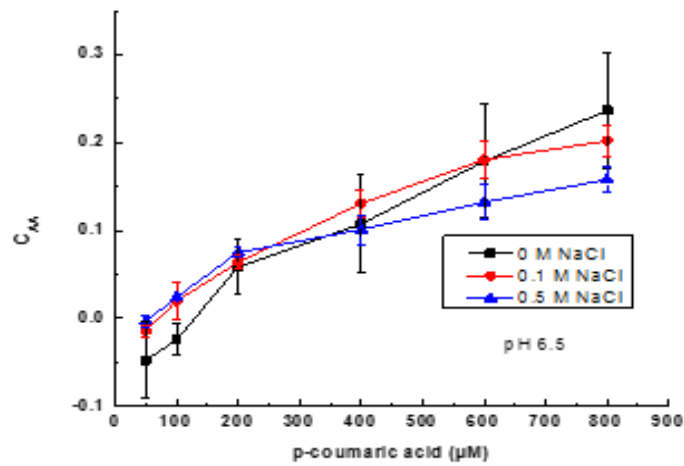
Σχήμα 6.2.7: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *Caffeic acid*



Σχήμα 6.2.8: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *Caffeic acid*



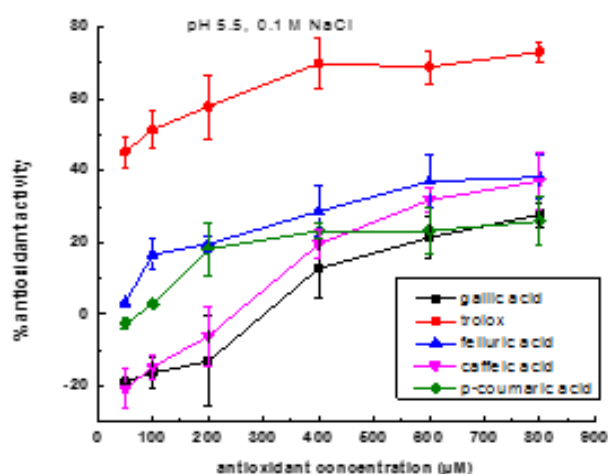
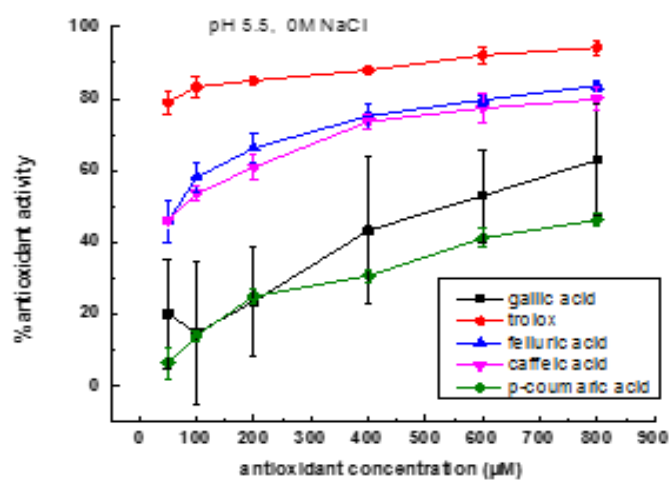
Σχήμα 6.2.9: % Αντιοξειδωτική δραστικότητα *p-Coumaric acid*

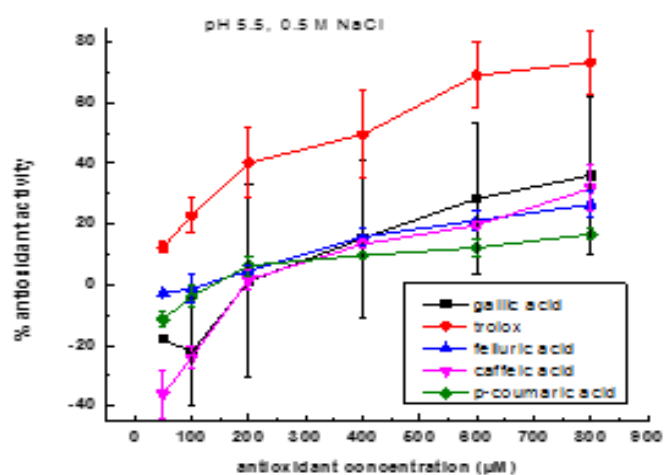


Σχήμα 6.2.10: Συντελεστής αντιοξειδωτικής δραστικότητας *p-Coumaric acid*

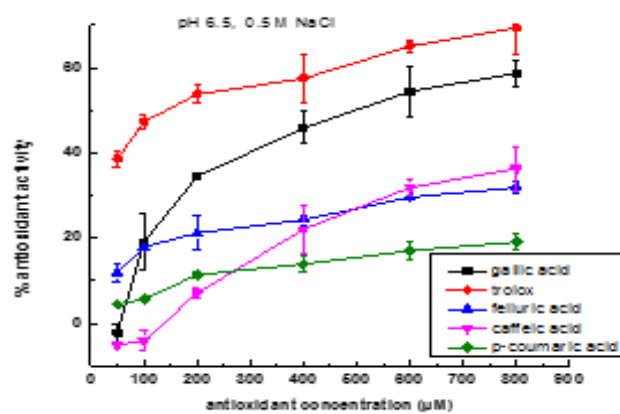
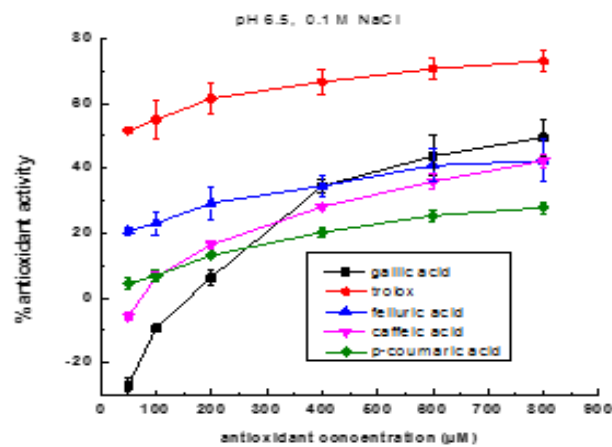
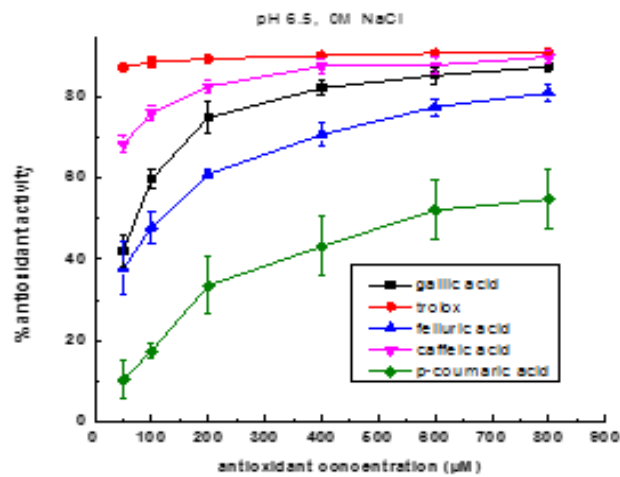
6.3 Σύγκριση αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και 6.5 και σε συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα τα οποία απεικονίζουν την σύγκριση των αντιοξειδωτικών σε pH 5.5, 6.5 και σε συγκέντρωση NaCl 0, 0.1, 0.5 M

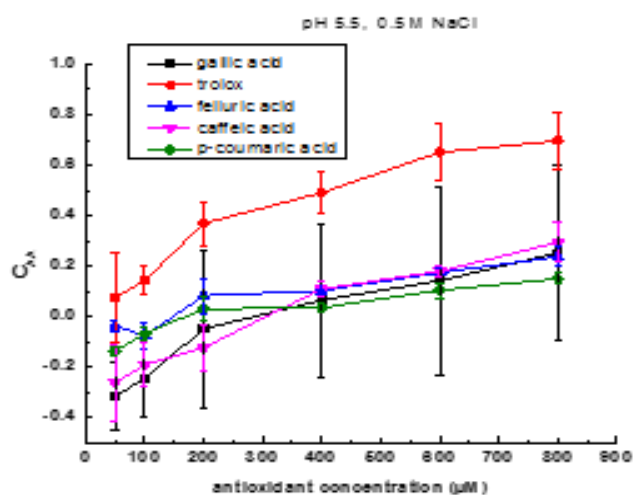
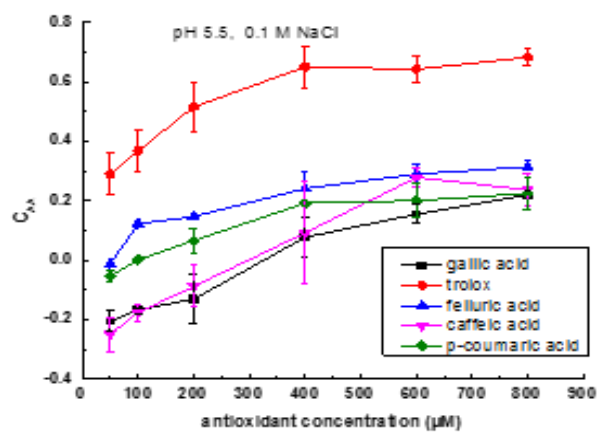
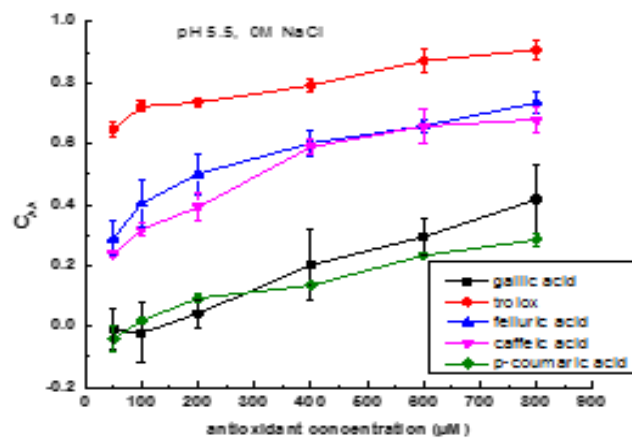




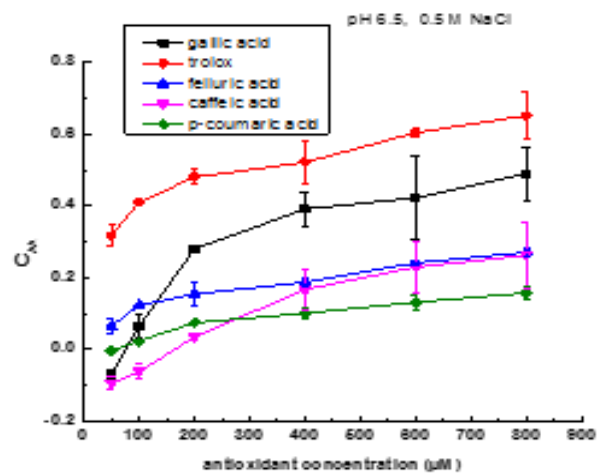
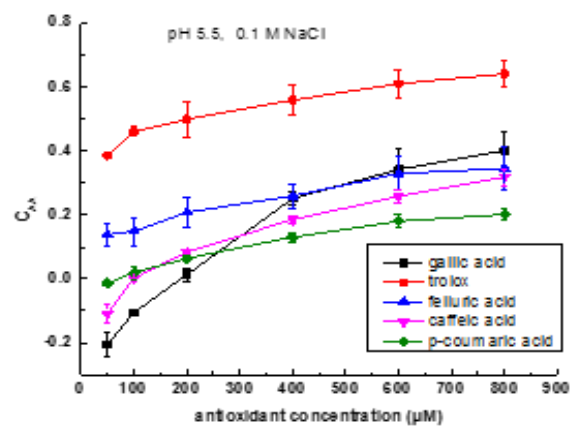
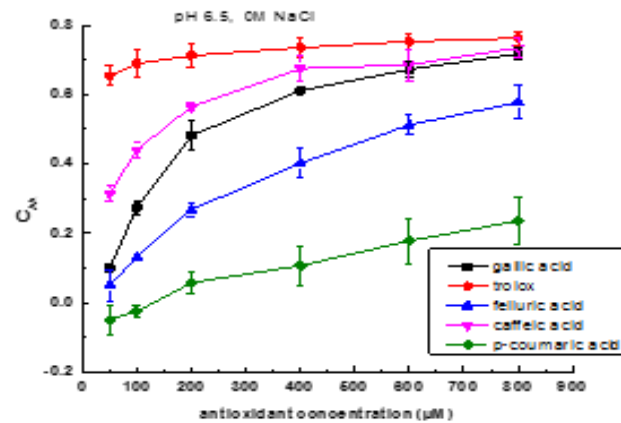
Σχήμα 6.3.1: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



Σχήμα 6.3.2: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



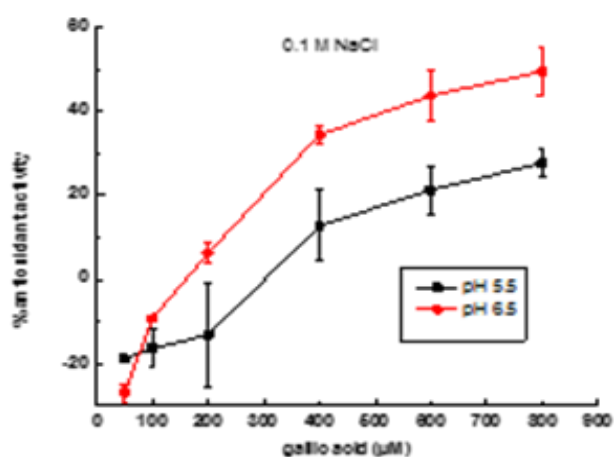
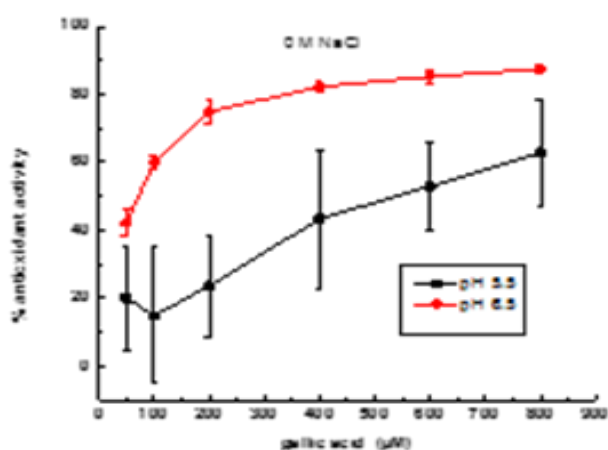
Σχήμα 6.3.3: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηκότητας σε pH 5.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M

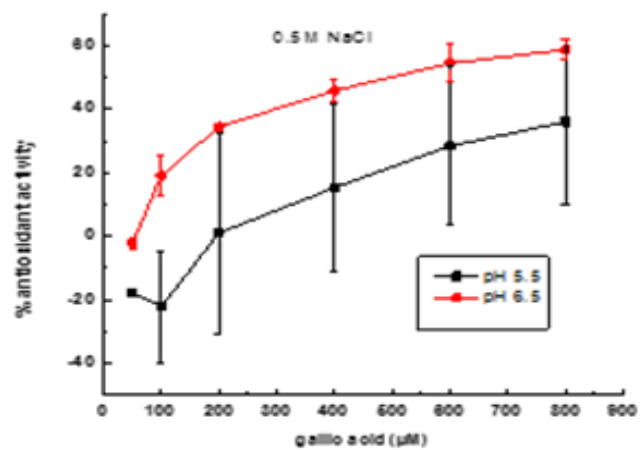


Σχήμα 6.3.4: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών σε pH 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M

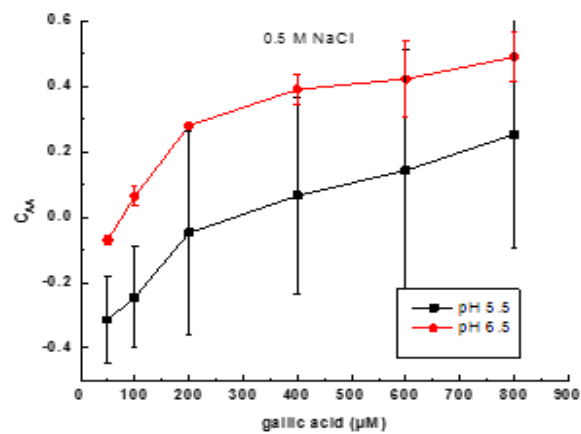
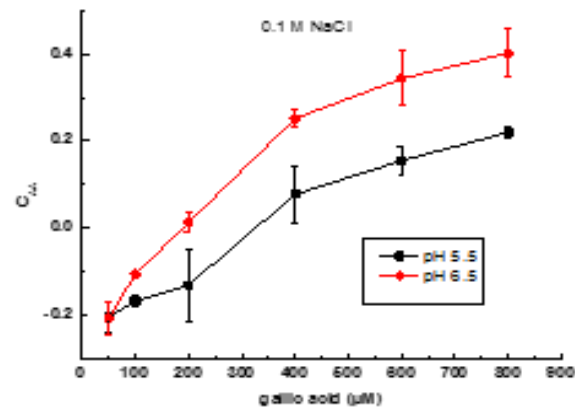
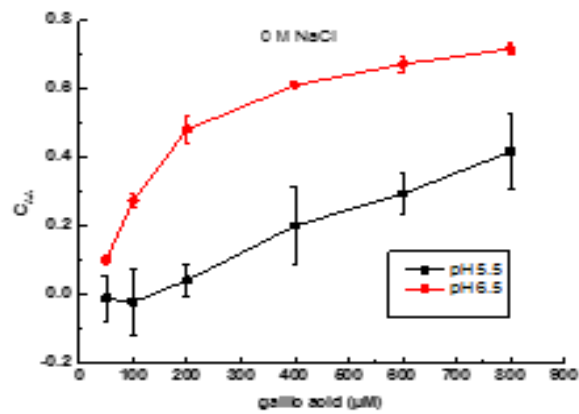
6.4 Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και C_{AA} σε pH 5.5 και 6.5

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα τα οποία απεικονίζουν την σύγκριση της % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και του συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών σε pH 5.5 και 6.5

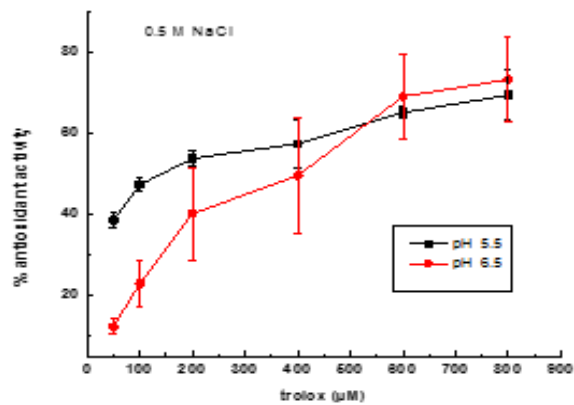
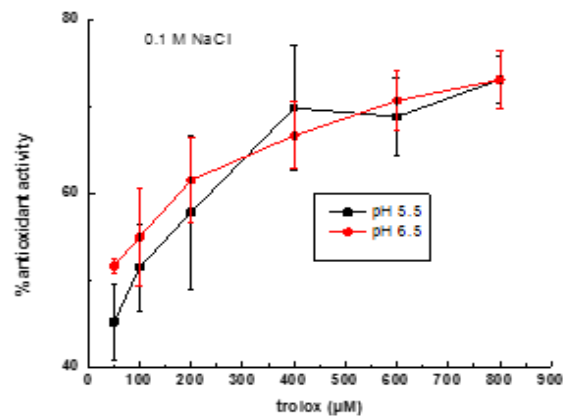
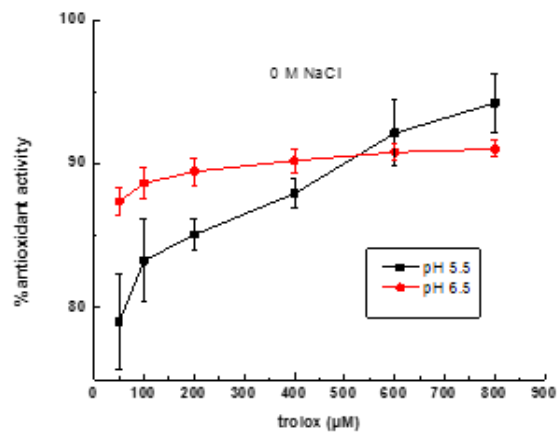




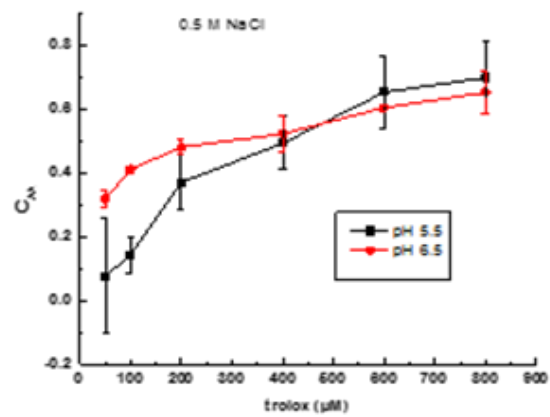
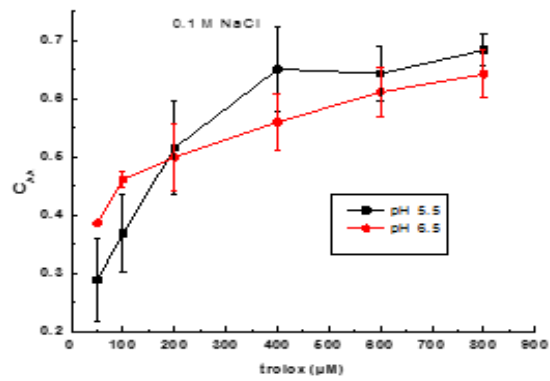
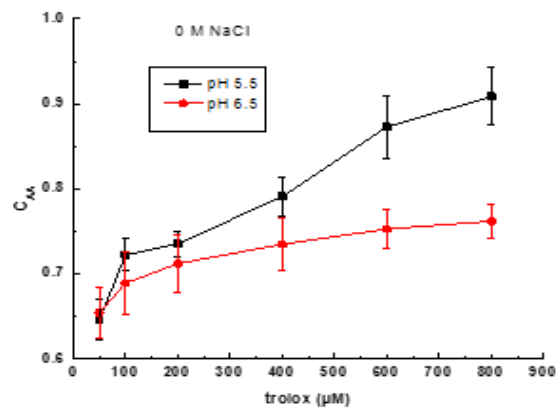
Σχήμα 6.4.1: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *Gallic acid* σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



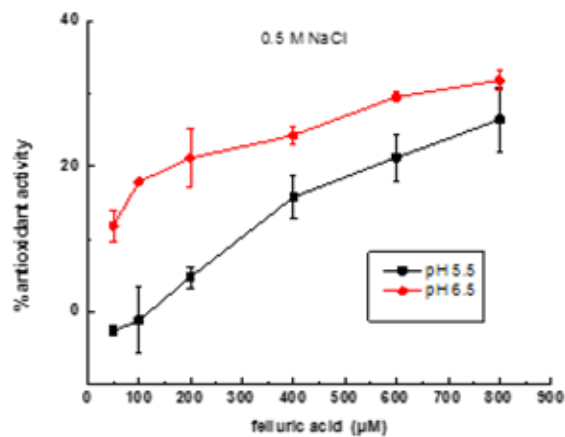
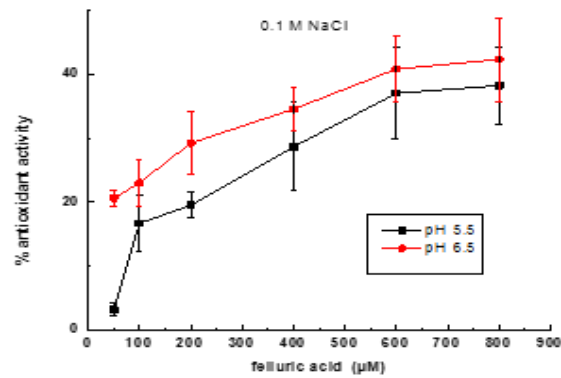
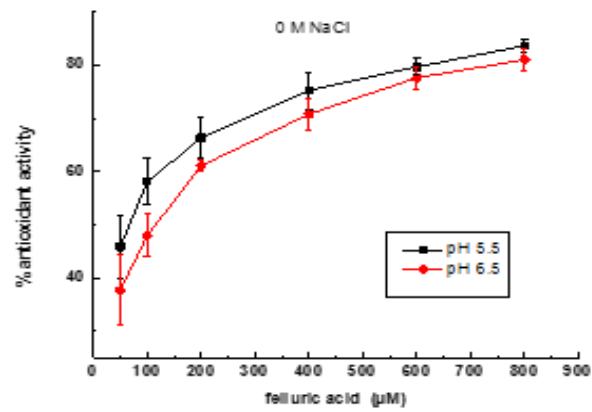
Σχήμα 6.4.2: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *Gallic acid* σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



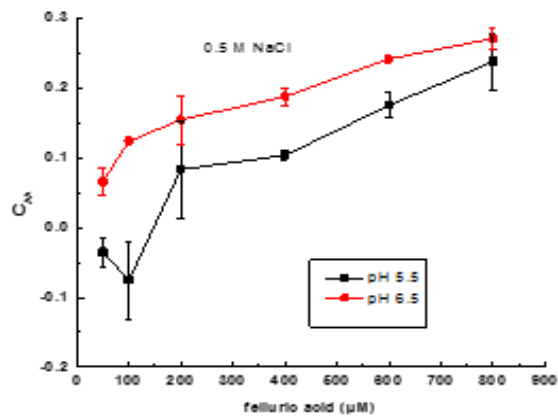
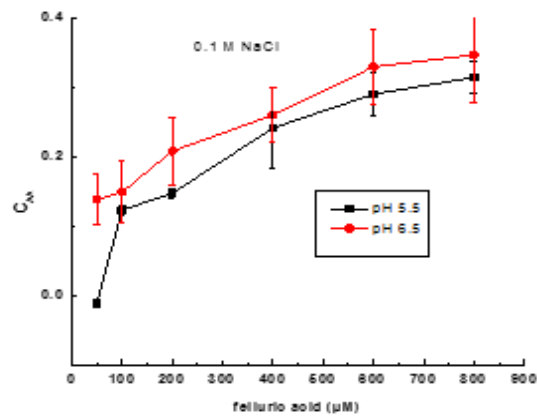
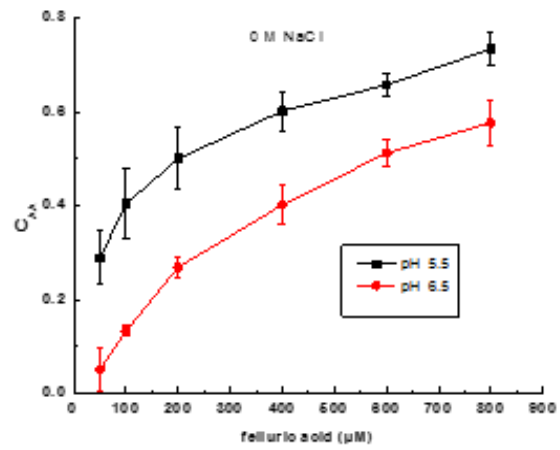
Σχήμα 6.4.3: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας Trolox σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



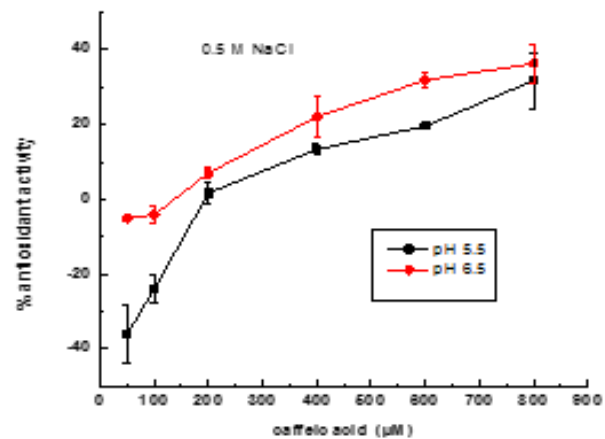
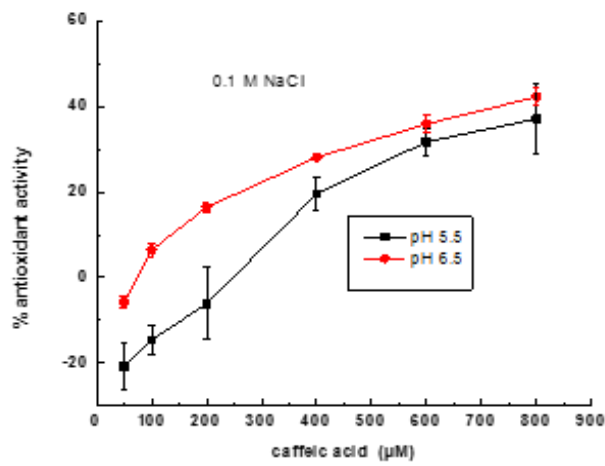
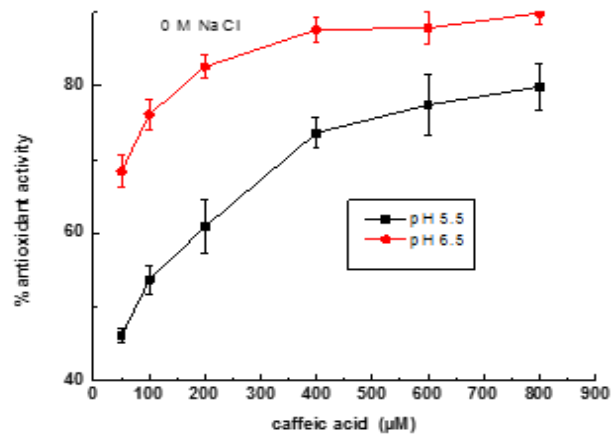
Σχήμα 6.4.4: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας Trolox σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



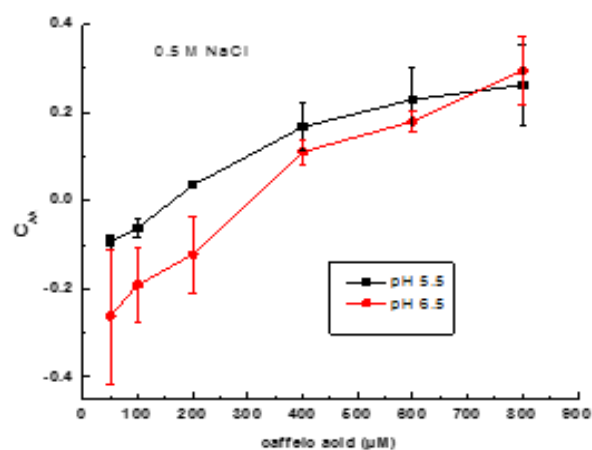
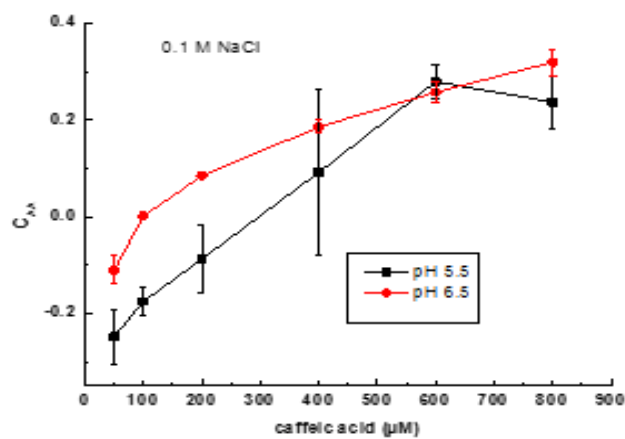
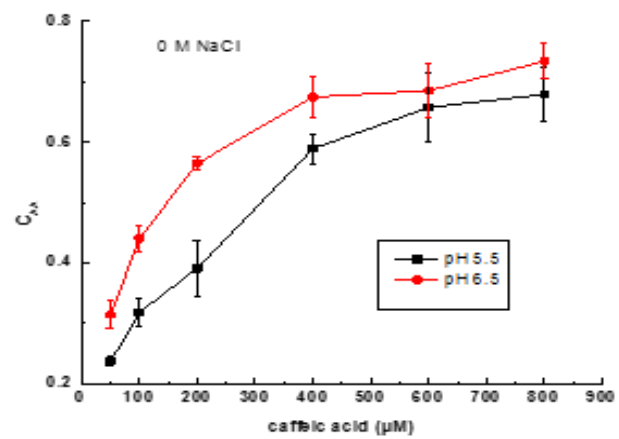
Σχήμα 6.4.5: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *trans*-Ferulic acid σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



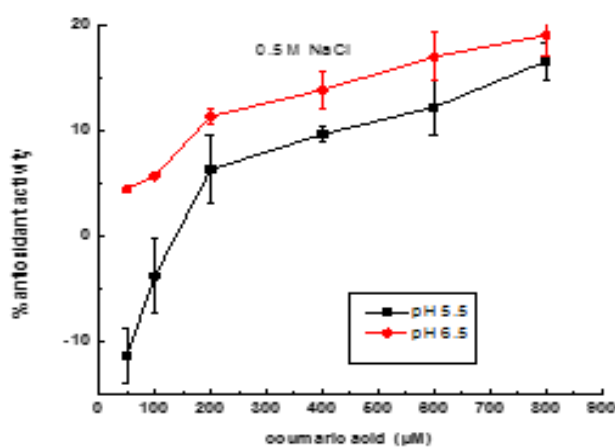
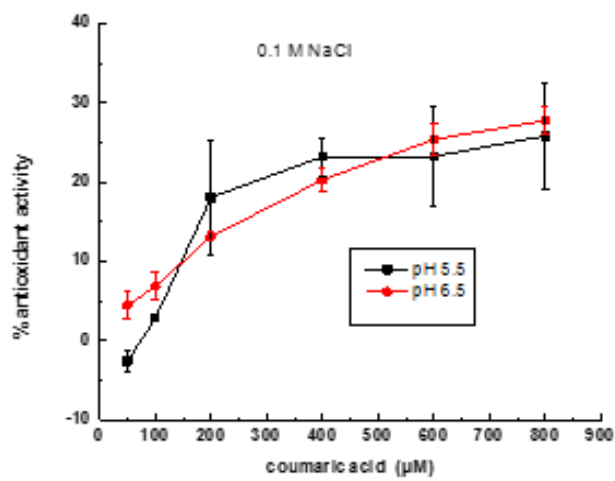
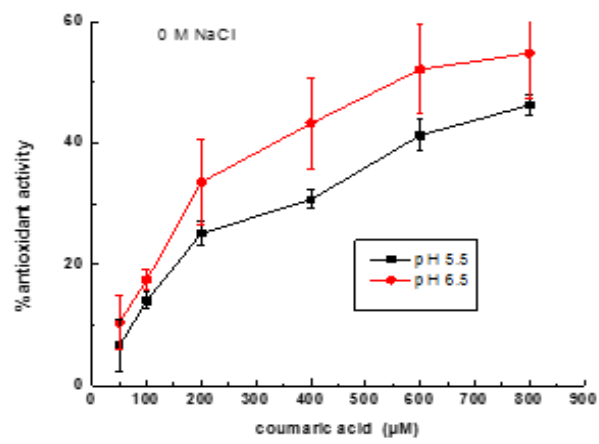
Σχήμα 6.4.6: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *trans*-Ferulic acid σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



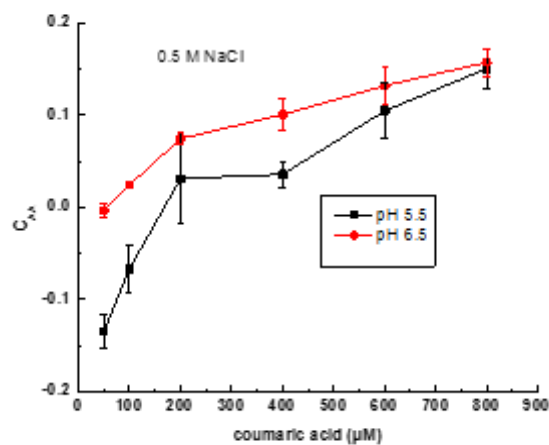
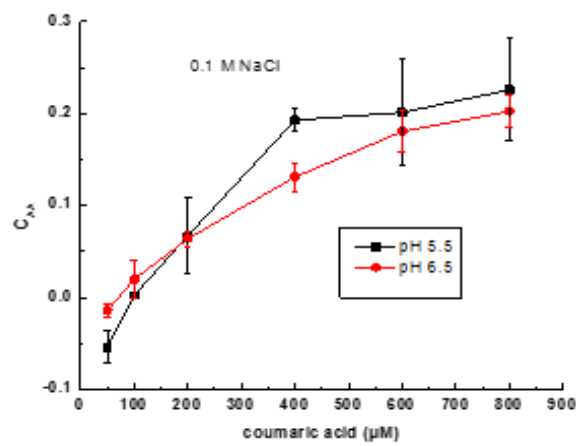
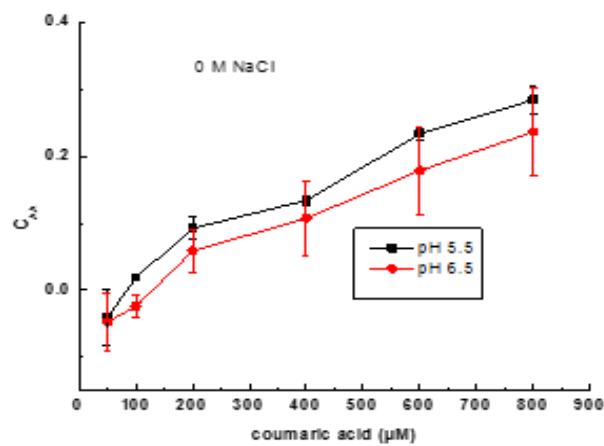
Σχήμα 6.4.7: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηρότητας *Caffeic acid* σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



Σχήμα 6.4.8: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *Caffeic acid* σε pH 5,5 και 6,5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0,1, 0,5M



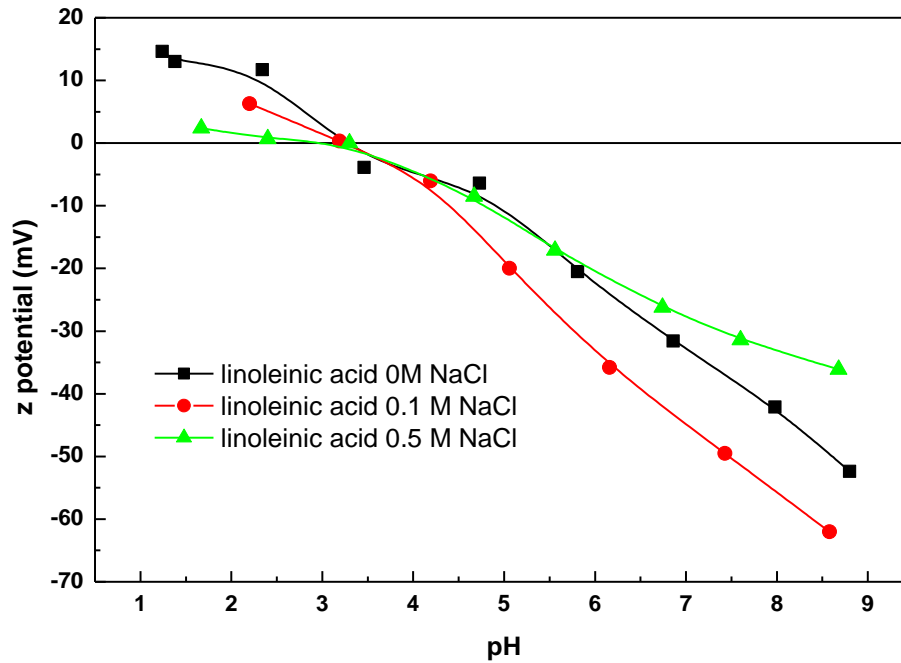
Σχήμα 6.4.9: Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *p*-Coumaric acid σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M



Σχήμα 6.4.10: Σύγκριση συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *p*-Coumaric acid σε pH 5.5 και 6.5 και συγκεντρώσεις NaCl 0, 0.1, 0.5 M

6.5 Αποτελέσματα υπολογισμού z-potential

Τα αποτελέσματα υπολογισμού του z-δυναμικού του λινολεϊκού οξέος σε συγκεντρώσεις $NaCl$ 0, 0.1 0.5 M δίνονται στο σχήμα 7.5.1 παρακάτω :



Σχήμα 6.5.2: Z-potential λινολεϊκού οξέος

7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική δραστικότητα που παρουσιάζεται στα διαγράμματα εκφρασμένη ως % αντιοξειδωτική δραστικότητα και ως συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστικότητας (C_{AA}) των διαφορών αντιοξειδωτικών προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα. Αρχικά σε pH 5.5 σε όλες τις περιπτώσεις των αντιοξειδωτικών παρατηρείται ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα εντοπίζεται σε 0 M NaCl. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού φαίνεται η αναλογική αύξηση και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας. Ωστόσο με την επίδραση της αλατότητας η αντιοξειδωτική δραστικότητα των αντιοξειδωτικών μειώνεται συγκριτικά με την απουσία του NaCl.

7.1 % Αντιοξειδωτική δραστικότητα και σε pH 5,5

Gallic acid

Πιο συγκεκριμένα σε pH 5.5 το αντιοξειδωτικό *Gallic acid* παρουσιάζει μεγαλύτερη % αντιοξειδωτική δραστικότητα και συντελεστή αντιοξειδωτικής δραστικότητας (C_{AA}) απουσίας του NaCl η οποία αυξάνοντας τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού αυξάνεται. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl σε 0.1 M και 0.5 M η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μειώνεται χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει ιδιαίτερη διαφορά στις δυο συγκεντρώσεις NaCl.

Trolox

Στην περίπτωση του αντιοξειδωτικού *Trolox* παρατηρείται ότι η % αντιοξειδωτική δραστικότητα και ο C_{AA} σε 0 M NaCl ακολουθεί ένα σταθερό ρυθμό και δεν αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της συγκεντρώσεως του αντιοξειδωτικού. Σε συγκέντρωση 0.1 M NaCl η αντιοξειδωτική δραστικότητα και ο (C_{AA}) είναι μικρότεροι και όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl δηλαδή σε 0.5 M NaCl η δράση μειώνεται περισσότερο. Ωστόσο στις υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού φαίνεται να ταυτίζεται τόσο σε 0.1 M όσο και σε 0.5 M NaCl.

trans- Ferulic acid

Παρόμοιο φαινόμενο εντοπίζεται και στην περίπτωση της % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και του C_{AA} αντιοξειδωτικού *Ferulic acid* όπου σε 0 M NaCl είναι υψηλότερη και ακολουθεί αυξητικό ρυθμό αυξάνοντας την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Σε 0.1 M και 0.5 M NaCl είναι μειωμένη.

Caffeic acid

Η % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και ο C_{AA} του αντιοξειδωτικού *Caffeic acid* σε 0.1 M και 0.5 M NaCl φαίνεται να μην παρουσιάζει αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ τους αφού σχεδόν ταυτίζονται μεταξύ τους. Τέλος διακρίνεται η μέγιστη % αντιοξειδωτική του δραστηριότητα και ο C_{AA} απουσίας του NaCl.

p- Coumaric acid

Στην περίπτωση του αντιοξειδωτικού *p-Coumaric acid* % αντιοξειδωτική δραστηριότητα φαίνεται να είναι υψηλότερη σε 0 M NaCl και να μειώνεται με την επίδραση της αλατότητας.

7.2 % Αντιοξειδωτική δραστηριότητα και C_{AA} σε pH 6.5

Σε ότι αφορά την % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και τον C_{AA} των αντιοξειδωτικών σε τιμή pH 6.5 παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά δράσης με εκείνη σε pH 5.5. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς και ο C_{AA} που παρουσιάζουν σε 0 M NaCl είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με εκείνη σε 0.1 M και 0.5 M.

7.3 Σύγκριση % αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και C_{AA} pH 5.5, 6.5

Στα σχήματα 6.3.1 ως 6.3.4 συγκρίνεται η % αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς ο C_{AA} των αντιοξειδωτικών μεταξύ τους και σε τιμές pH 5.5 και 6.5. Παρατηρείται ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε pH 5.5 και σε όλες τις συγκεντρώσεις του NaCl παρουσιάζει το αντιοξειδωτικό Trolox. Ακολουθούν σε 0 M NaCl με μικρότερη και παρόμοια δράση τα αντιοξειδωτικά *trans- Ferulic* και

Caffeic acid. Τα αντιοξειδωτικά *Gallic* και *p-Coumaric acid* φαίνεται να έχουν την μικρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα και C_{AA} .

Σε συγκέντρωση $0.1\ M\ NaCl$ το αντιοξειδωτικό *Trolox* συνεχίζει να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ακολουθεί όπως και στην περίπτωση του $0\ M\ NaCl$ το *trans-Ferulic acid* του οποίου η δράση στις υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει μικρή κάμψη. Ωστόσο το *Caffeic acid* φαίνεται να έχει μικρότερη αντιοξειδωτική δράση και ακολουθεί το *Gallic acid* με την μικρότερη % αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Σε συγκέντρωση $0.5\ M\ NaCl$ ξεχωρίζει για την αντιοξειδωτική του δράση το *Trolox* ενώ για τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά διακρίνεται μόνο η παρόμοια δράση τους και η ταύτιση σε κάποιες τιμές των συγκεντρώσεων.

Σε $pH\ 6.5$ με την απουσία του *NaCl* το αντιοξειδωτικό *Trolox* συνεχίζει να παρουσιάζει την υψηλότερη % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και C_{AA} . Ωστόσο με μικρότερη διαφορά συγκριτικά με $pH\ 5.5$ ακολουθεί το *Caffeic acid* και στην συνέχεια το *Gallic acid* που παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε αυτήν την τιμή pH . Την φθίνουσα σειρά ακολουθεί το *trans-Ferulic acid* και τέλος το *p-Coumaric acid* το οποίο παρουσιάζει αντίστοιχη δράση με εκείνη σε $pH\ 5.5$. Επιπλέον φαίνεται η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών στην συγκεκριμένη τιμή pH να είναι πιο διακριτή και εκφράζεται καλύτερα.

Σε συγκέντρωση $0.1\ M\ NaCl$ το *Trolox* εξακολουθεί να παρουσιάζει την υψηλότερη % αντιοξειδωτική δραστηριότητα ή C_{AA} και ακολουθούν τα υπόλοιπα με χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Παρατηρείται στο διάγραμμα που εκφράζεται η % αντιοξειδωτική δράση του *Gallic acid* στις χαμηλές συγκεντρώσεις να είναι μικρότερη και στις υψηλότερες να αυξάνεται έντονα και ξεπερνά τι τιμές των υπολοίπων.

Σε συγκέντρωση $0.5\ M\ NaCl$ το *Trolox* παρουσιάζει την ίδια δράση ωστόσο το *Gallic acid* φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα συγκριτικά με το *trans-Ferulic acid*, *Caffeic acid*, *p-Coumaric acid* των οποίων η δράση είναι παρόμοια.

7.4 Σύγκριση αντιοξειδωτικών σε pH 5,5 και 6,5

Επιπλέον στα διαγράμματα 6.4.1 έως 6.4.6 συγκρίνεται η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών στις τιμές pH 5.5 και pH 6.5. Διακρίνεται αρχικά ότι το *Gallic acid* έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε pH 6.5 σε σχέση με pH 5.5 απουσία του NaCl καθώς και στις συγκεντρώσεις 0.1 M και 0.5 M NaCl.

Το Trolox έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα ή C_{AA} σε pH 5.5. Ωστόσο σε 0.1 M και 0.5 M NaCl δεν διακρίνεται διαφορά μεταξύ των δυο τιμών pH. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα και ο C_{AA} του αντιοξειδωτικού *Ferulic acid* ενώ σε 0 M NaCl είναι υψηλότεροι στο pH 5.5 στην συνέχεια σε 0.1 M και 0.5 M NaCl αντιστρέφεται και είναι υψηλότεροι σε pH 6.5 χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Στην συνέχεια φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση του *Caffeic acid*. Η % αντιοξειδωτική δραστηριότητα και ο C_{AA} να είναι υψηλότεροι απουσία NaCl και σε pH 6.5. Στην περίπτωση συγκέντρωσης 0.1 M NaCl δεν παρουσιάζεται διακριτή διαφορά στην δράση του στις δυο διαφορετικές τιμές pH. Τέλος σε συγκέντρωση 0.5 M NaCl η αντιοξειδωτική δραστηριότητα και ο C_{AA} είναι υψηλότεροι σε pH 6.5 ωστόσο όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις η διαφορά μεταξύ τους μικραίνει και σχεδόν ταυτίζονται.

7.5 Αποτελέσματα υπολογισμού *z-potential*

Σύμφωνα με το διάγραμμα 6.5.1 υπολογισμού του *z-potential* του λινολεϊκού οξέος φαίνεται ότι τα σωματίδια του αιωρήματος του λινολεϊκού οξέος εμφανίζουν μηδενικό φορτίο περίπου σε pH 3.5. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε pH 5.5 και 6.5 όποτε τα σωματίδια του λινολεϊκού οξέος είναι αρνητικά φορτισμένα και εξαλείφεται ο παράγοντας πιθανόν διαφοροποιήσεων στις προσροφητικές ιδιότητες των σωματιδίων που να επίδρασαν στις μετρήσεις. Επίσης πειράματα του προσδιορισμού μεγέθους σωματιδίων *tween*/λινολεϊκού οξέος δείχνουν ότι αυτά είναι συγκρίσιμα ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του $NaCl$ ή του pH , οπότε στα πειράματα δεν εισέρχονται περιορισμοί λόγω διαφορετικού μεγέθους των σωματιδίων του γαλακτώματος

8 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Prieto M.A, Rodriguez-Amado I, Vazquez J.A, and Murado M.A, 2012, b-Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate, *Journal Agricultural Food Chemistry* **60**,8983-8984
- ✓ Ueno H., Yamakura S., Arastoo S. Rlya, Oshima T, and Kokubo K., 2014, Systematic Evaluation and Mechanistic Investigation of Antioxidant Activity of Fullerenols Using b-Carotene Bleaching Assay, *Journal of Nanomaterials*, 1-2
- ✓ Koleva I., A. van Beek T., Linssen P. H, J., Aede de G. and Evstatieva N.L., 2002, Screening of Plant Extracts for Antioxidants Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, *phytochemical analysis* **13**, 8-10,12-15
- ✓ Moure A., Dominguez., and Parajo C. J, 2006, Antioxidants properties of ultrafiltration- recovered soy protein fraction from industrial effluents and their hydrolysates, *Process Biochemistry* **41**, 448-450
- ✓ Lucrecia L. Nazareno A. C and M., 2006, New method To Determine Antioxidant Activity of Polyphenols, *Journal Agricultural Food Chemistry* **54** 8397- 8398
- ✓ Shahidi F., Zhong., 2015, Measurement of antioxidant activity, *Journal of functional foods* **18**, 757-762
- ✓ Lucio M, Nunes C, Gaspar D, Ferreira H, Lima, L. F. C.J., and Reis S., 2009, Antioxidants Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro, *Food Biochemistry* **4**, 312-313
- ✓ Satish B.N., Dilipkumar 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *Royal Society Chemistry Advance*, **5**, 27986- 28000

- ✓ Carochó M., Ferreira I, 2012, A review on antioxidants, prooxidants related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Toxicology* **51**, 16-19
- ✓ Laguerre M. Lecomte J., and Villeneuve P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in Lipid Research* **46**, 244-264
- ✓ Osinchak E. J., Hultin O.H., T. O., Kelleher D.S., and Huang C., 1991, Effect of NaCl on catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle, *Free Radical Biology & Medicine*, **12**, 35-38
- ✓ Pokorny J, Yanishlieva M., and Gordon M., 2001, Antioxidants in food, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 7-9,
- ✓ Pisoschi M.A., Negulescu P.G, 2011 Methods For Total Antioxidant Activity Determination: A review., *Biochemistry and Analytical Biochemistry* **1**, 2-4
- ✓ Prior, WU X., SCHAICH K., 2005 Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements *Journal Agricultural Food Chemistry* **53**, 4290-4302

9 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Σφλώμος Γ. Κωνσταντίνος, 2011, *ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ με Στοιχεία Διατροφής*, Β ΕΚΔΟΣΗ Τόμος Ι, *ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*, ΑΘΗΝΑ. 267, 268, 270, 273, 274, 277, 278, 425,426,427, 428

- ✓ Δημόπουλος Κ. και Αντωνοπούλου Σ. (2009) *Βασική Βιοχημεία*. 2η έκδοση με βελτιώσεις και προσθήκες. Αθήνα 63-69 (παράρτημα).