

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ»



ΣΙΟΛΕΤΙΤΣ ΡΟΖΛΙΝ

ΑΜ: 2011013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΙΟΛΕΤΙΤΣ ΡΟΖΛΙΝ

ΑΜ: 2011013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον κύριο Ι. Σπηλιόπουλο, υπεύθυνο καθηγητή για την πτυχιακή μου εργασία, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και τις συμβουλές του, καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού και γραπτού μέρους της εργασίας μου.

Για την ασταμάτητη υποστήριξη όλα τα χρόνια των φοιτητικών μου σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με βοήθησε να τα φέρω εις πέρας. Τέλος τα προσφιλή μου πρόσωπα για την υποστήριξή τους κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην Πτυχιακή μου Εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης του Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η Πτυχιακή Εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Υπογραφή

Σιόλετις Ροζλίν

..... - -2017

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 «ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ».....	10
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ.....	10
1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	12
1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	15
1.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	16
1.5 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	17
1.6 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΩΣ ΜΕΣΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	19
1.7 ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ»	22
2.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ	22
2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	24
2.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON.....	26
2.2.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΥ ΝΕΡΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ	26
2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΚΟΛΛΟΕΙΔΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑ	28
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	30
2.3.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	30
2.3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	31
2.3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΛΛΑΓΗΣ ΑΝΤΙΔΡΩΝΤΩΝ	31
2.3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ.....	32
2.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	35
2.3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	40
2.3.7 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ».....	43
3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	43
3.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	45
3.3 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	46

3.4 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	47
3.4.1 ΑΠΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	48
3.4.2 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	49
3.4.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 «ΕΥΡΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ».....	57
4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	57
4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ερευνήθηκε το ποσοστό οξείδωσης λιποσώματος από τα αντιοξειδωτικά ντομάτας . Αρχικά έγινε η προετοιμασία του λιποσώματος. Έπειτα από κάθε ποικιλία ντομάτας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των αντιοξειδωτικών τους και τοποθέτηση τους στο λιπόσωμα με σκοπό να διακρίνουμε την % οξείδωση που έχουμε με τα αντιοξειδωτικά άλλα και χωρίς αυτά. Τα αποτελέσματα που παίρνουμε είναι η αναστολή της οξείδωσης σε κάθε ποικιλία ντομάτας.

Λέξεις κλειδιά: αναστολή, οξείδωση, λιπόσωμα, εκχύλιση , αντιοξειδωτικά ντομάτας

ABSTRACT

The aim of the present study was investigated liposome oxidation rate of the tomato antioxidants. At first liposomes were prepared. After each tomato variety performed extraction of the antioxidants and placing them in the liposome in order to discern how the percentage % oxidation have with antioxidants and how without them. The results of the present study is the suspension of oxidation in each variety of tomato.

Keywords: suspension, oxidation, liposome, extraction, antioxidants of tomato

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τρόφιμα, μεταποιημένα ή μη, υφίστανται φυσικά κάποιες αντιδράσεις οξείδωσης ,με το πέρασμα του χρόνου, οι οποίες περιορίζουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής τους προκαλώντας τους αλλοιώσεις.

Η οξείδωση λιπιδίων υποδηλώνει την ποιότητα λιπών καθώς ο βαθμός και ο ρυθμός οξείδωσης επηρεάζεται από τη σύνθεση λιπαρών οξέων, τη συγκέντρωση οξυγόνου , τη θερμοκρασία επιφάνειας , την ενεργότητα νερού και την παρουσία προοξειδωτικών. Η οξείδωση λιπαρών ουσιών επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων καθώς έχει βλαβερές βιολογικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Η προσεκτική επιλογή των συστημάτων και οι συνθήκες αποθήκευσης είναι χρήσιμο εργαλείο ώστε να προσδιοριστούν οι ενώσεις που έχουν επίδραση στην οξειδωτική αστάθεια των λιπιδίων. Τα λιποσώματα έχουν το πλεονέκτημα ότι το ίδιο το μόριο χρησιμεύει ως οξειδωσιμο υπόστρωμα καθώς παρέχει πολύτιμες εφαρμογές στις μελέτες οξείδωσης λιπιδίων.

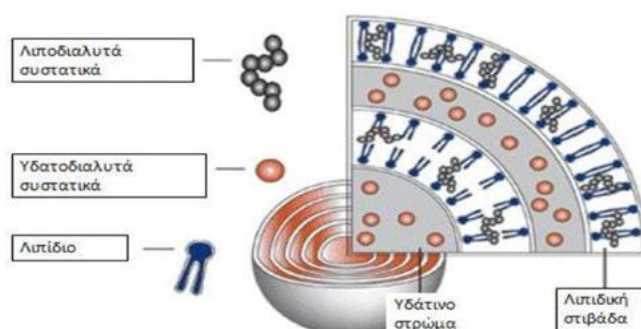
Ένας αξιόλογος και αποτελεσματικός τρόπος για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση της οξείδωσης λιπαρών ουσιών είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 «ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ»

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

Τα λιποσώματα είναι κυστίδια κυρίως λιπικής φύσεως που αναπτύχθηκαν αρχικά από τον Alec Bangham ως μοντέλο κυτταρικών μεμβρανών. Τη δεκαετία του 1970 άρχισαν να μελετώνται ως φορείς βιοδραστικών ενώσεων. Σε σχέση με άλλες φαρμακομορφές χαρακτηρίζονται από τα εξής πλεονεκτήματα : 1) Η ευέλικτη δομή τους μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με βάση την εκάστοτε εφαρμογή, 2) Είναι μη τοξικά , μη ανοσογόνα και πλήρως συμβατά και βιοαποικοδομήσιμα συστήματα 3) Διαθέτουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες περιοχές επιτρέποντας τη μεταφορά των υδρόφιλων και υδρόφοβων μορίων. Εκτός από τον τομέα χορήγησης βιοδραστικών ενώσεων τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται και ως μοντέλα βιολογικών μεμβρανών με σκοπό την αποσαφήνιση δομής και των λειτουργιών τους. (Mozafari, 2005)

Τα λιποσώματα ορίζονται ως κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος που αποτελούνται από μία ή και περισσότερες διπλοστιβάδες λιπιδίων, που εναλλάσσονται με υδατικά τμήματα. Στο εσωτερικό τους βρίσκεται ενθυλακωμένο υγρό στο οποίο συναντάμε διάφορες ουσίες όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, ορμόνες, ένζυμα, αντιβιοτικά, αντιμυκητιακά καθώς και αντικαρκινικούς παράγοντες. Τα λιποσώματα σχηματίζονται αυθόρμητα, κατά τη διασπορά λιπιδίων σε υδατικό μέσο. (Sipai et all, 2012)



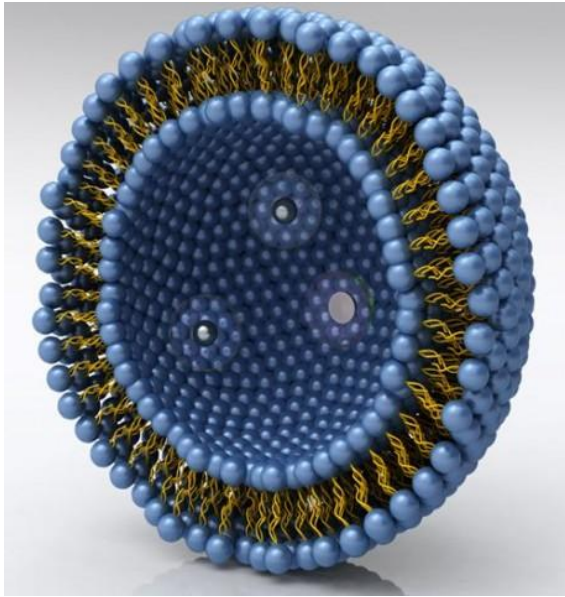
Εικόνα 1.1 Δομή λιποσώματος. Εγκλωβισμός λιποδιαλυτών και υδατοδιαλυτών ουσιών. (Singer & Nicolson,1972)

Το πάχος των διπλοστοιβάδων είναι περίπου 4 nm ενώ η διάμετρος των λιποσωμάτων κυμαίνεται από 25 με 50 nm ως μερικά μm.

Τα λιποσώματα μπορούν να κατασκευαστούν έτσι ώστε να παγιδεύσουν ποσότητες συστατικών είτε στην υδατική φάση είτε στην μεμβράνη. (εικόνα 1.1). Η αξία λιποσωμάτων ως μοντέλα μεμβρανικών συστημάτων προέρχεται από το γεγονός ότι τα λιποσώματα μπορεί να παρασκευαστούν από συστατικά φυσικής προέλευσης, έτσι ώστε η λιποσωμική μεμβράνη να σχηματίσει μια δομή διπλοστοιβάδας, η οποία σε βασικές γραμμές είναι πανομοιότυπη με το λιπιδικό τμήμα των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών (μοντέλο ρευστού μωσαϊκού κατά Singer και Nicolson). Η ομοιότητα αυτή δύναται να ενισχυθεί επιπλέον μέσω χημικής τροποποίησης της λιποσωμικής μεμβράνης. Η δυνατότητα αυτή καθιστά τα λιποσώματα πολύτιμο εργαλείο στη στόχευση βιοδραστικών ενώσεων σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες. (Singer & Nicolson,1972)

Ακόμα λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν και ως λιπόφιλοι φορείς φαρμάκων αλλά και ως υδρόφιλοι. Ανάλογα με τη διαλυτότητα και τα χαρακτηριστικά της κατανομής μιας δραστικής ουσίας, τα μόριά της εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία στο λιπόσωμα και έχουν διαφορετική παγίδευση και ιδιότητες απελευθέρωσης.

Στις μέρες μας τα σωματίδια αυτά αποτελούν χρήσιμο «εργαλείο» και αποτελεσματική ως μέθοδο σε πλήθος επιστημονικών κλάδων όπως είναι η χημεία, η βιοχημεία, η βιολογία κ.α. Τέλος τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο σύστημα για τον έλεγχο και την παρατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των διαφορετικών τύπων οξειδωτικού στρες. Αυτό προκύπτει από τ' ότι τα λιποσώματα χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική αστάθεια. (Αντιμησιάρη,2008 & Berg, 2005)



Εικόνα 1.2 Σφαιρική δομή λιποσώματος (Deamer,1980)

1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Με βάση τη δομή και το μέγεθος έχουμε την εξής διάκριση μεταξύ των διάφορων τύπων λιποσωμάτων:

- **Μονοστιβαδικά κυστίδια:**
 - Μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια (SUV- Small Unimellar Vesicles): το μέγεθος τους κυμαίνεται από 20-40nm.
 - Μεσαία μονοστρωματικά κυστίδια (MUV-Medium Unimellar Vesicles) : το μέγεθος τους κυμαίνεται από 40-80nm.
 - Μεγάλα μονοστιβαδικά κυστίδια (LUV- Large Unimellar Vesicles): το μέγεθος τους κυμαίνεται από 100 nm -1000nm
- **Πολυστιβαδικά κυστίδια:** (Multilamellar Vesicles, MLV)

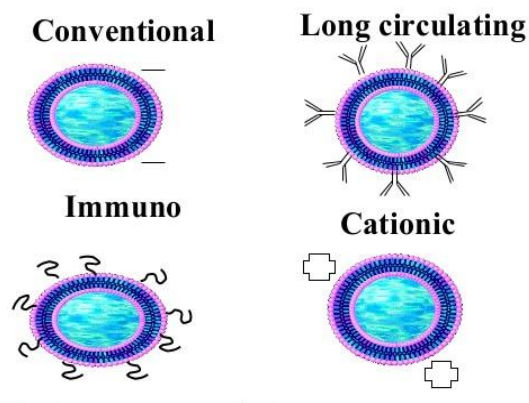
Το μέγεθος τους κυμαίνεται άνω των 500 nm. Έχουν πολλές διπλοστιβάδες καθώς διαφέρουν ανάλογα τον τρόπο με τον οποίο παρασκευάζονται. Οι ομόκεντρες σφαιρικές διπλοστιβάδες του LUV / MLV περικλείουν ένα μεγάλο αριθμό SUV.

- **Ολιγοστοιβαδικά κυστίδια (OLV- Oligolamellar Vesicles):** Αποτελούνται από 2-10 διπλοστοιβάδες λιπιδίων ,περικυκλωμένες από μεγάλο εσωτερικό όγκο.

Η ταξινόμηση των λιποσωμάτων με βάση τύπο δράσης και τις εφαρμογές τους είναι οι εξής:

- **Συμβατικά λιποσώματα (CL-Conventional Liposomes)**
Ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και χοληστερόλη.
- **Λιποσώματα Μακράς Κυκλοφορίας (LCL-Long Circulatory Liposomes)**
Περιέχουν παράγωγα πολυαιθυλογλυκόλης που συνδέονται με την επιφάνεια ώστε να μειώσουν την ανίχνευση τους στο σύστημα φαγοκυττάρων.
- **Ανοσο-λιποσώματα (Immuno-liposomes) :** CL ή LCL με συνδεδεμένο μονοκλωνικό αντίσωμα
- **Κατιονικά λιποσώματα (Cationic Liposomes)**
- **Λιποσώματα που επάγουν τη σύντηξη (Fusogenic Liposomes)**
- **Λιποσώματα ευαίσθητα στο Ph (Ph Sensitive Liposomes)**

Classes of Liposomes



εικόνα 1.3 τάξεις λιποσώματος (Deamer,1980)

Σύμφωνα με τα δομικά συστατικά των λιποσωμάτων έχουμε :

➤ **Φωσφολιπίδια**

Η γλυκερόλη που περιέχουν τα φωσφολιπίδια είναι το πιο συνηθισμένο στοιχείο του σκευάσματος των λιποσωμάτων και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 50% του βάρους των λιπιδίων σε βιολογικές μεμβράνες. Αυτά προέρχονται από φωσφατιδικό οξύ. Το πίσω οστό του μορίου είναι τμήμα γλυκερίνης.

➤ **Τα σφιγγολιπίδια**

Είναι σημαντικά συστατικά των φυτικών και ζωικών κυττάρων. Η βάση των σφιγγολιπιδίων είναι η σφιγγοσίνη.

➤ **Στερόλες**

Η χοληστερόλη και τα παράγωγα του συχνά περιλαμβάνονται στα λιποσώματα για :

- τη μείωση της ρευστότητας ή του μικρο-ιξώδους της διπλής στιβάδας
- τη μείωση διαπερατότητας της μεμβράνης στα διαλυτά μόρια νερού
- Σταθεροποίηση της μεμβράνης με την παρουσία βιολογικών υγρών όπως το πλάσμα

➤ **συνθετικά φωσφολιπίδια**

Κορεσμένα και ακόρεστα φωσφολιπίδια.

➤ **πολυμερή υλικά**

Συνθετικά φωσφολιπίδια με αλυσίδα υδρογονάνθρακων πολυμερίζονται όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οδηγώντας στο σχηματισμό πολυμερισμένων λιποσωμάτων που έχουν σημαντικά υψηλά εμπόδια διαπερατότητας σε παγιδευμένα υδατικά φάρμακα.

➤ **πολυμερές που φέρνουν λιπίδια**

Προσδίδουν μια σταθερότητα απωθητικών αλληλεπιδράσεων από ηλεκτροστατικές δυνάμεις . Αυτή η απώθηση μπορεί να προκληθεί από την επικάλυψη των επιφανειών των λιποσωμάτων με φορτισμένα πολυμερή λιπίδια.

➤ **κατιονικά λιπίδια**

➤ **άλλες ουσίες**

(Deamer,1980 & Charman , 1974)

1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Ο χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων , τόσο μετά την παρασκευή τους όσο και κατά την αποθήκευση τους είναι απαραίτητος προκειμένου να εξασφαλισθεί ο έλεγχος της ποιότητας του προϊόντος .Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό πρέπει να είναι πρέπει να είναι σχετικά φτηνές , γρήγορες και επαναλήψιμες. (Lindsey ,2000)

Τυπικές μέθοδοι χαρακτηρισμού χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση – διαστρωμάτωση των λιποσωμάτων με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου , ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR , τη δυναμική σκέδαση φωτός και το ψηφιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, την κατανομή μεγέθους, την κατανομή όγκου και διαστρωμάτωσης των λιποσωμάτων. Στη δυναμική σκέδαση φωτός ,μια πηγή λέιζερ χρησιμοποιείται για τη μέτρηση σκέδασης ενός αραιού εναιωρήματος λιποσωμάτων στην οποία τα σωματίδια υποτίθεται ότι κινούνται αλλά είναι ανεξάρτητες οντότητες οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους . Μετά τη λήψη μιας σειράς μετρήσεων ένα ιστόγραμμα είναι ικανό να μας δείξει τα μονοελασματικά λιποσώματα που εμφανίζονται, τη μέση υδροδυναμική ακτίνα (RH) που σηματοδοτεί τη μέση ακτίνα σωματιδίων και τον όρο πολυδιασποράς ο οποίος δίνει ένα μέτρο τυπικής απόκλισης. Στην ψηφιακή μικροσκοπία φθορισμού, μπορούν να ληφθούν εικόνες από το φθορισμό διέγερσης λιποσωμάτων και εκπομπής των κύματος τους. (Atkinson,1994., Mc Namara 1998)

1.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Η δυνατότητα αυθόρμητης συσσωμάτωσης που χαρακτηρίζει τα αμφίφιλα μόρια οφείλεται στον συνδυασμό των τμημάτων που τα απαρτίζουν καθώς και την ευελιξία που τα χαρακτηρίζει. Οι δυο ομάδες που απαρτίζουν ένα αμφίφιλο μόριο διαλυτοποιούνται σε διαλύτες με μεγάλη διαφορά πολικότητας . Συνεπώς η διάλυση τέτοιων ενώσεων σε μη πολικούς διαλύτες ή σε πολύ πολικούς διαλύτες όπως το νερό συνεπάγεται την αυτό-οργάνωση και την αυτό-δόμηση των μορίων αυτών κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα μη διαλυτά τμήματα να “κρύβονται ” από το περιβάλλον του διαλύτη.

Στα υδατικά διαλύματα τα αμφίφιλα μόρια διαλύονται αρχικά ως μονομερή. Αύξηση της συγκέντρωσης πέραν μιας ορισμένης τιμής οδηγεί σε αυθόρμητη συσσωμάτωση με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις . Αυτή η αυτό-οργάνωση συνοδεύεται από αύξηση της εντροπίας του συστήματος. (Alberts et al,2002)

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων του νερού και των υδρογονανθράκων εξαναγκάζουν τα μόρια του νερού να διαταχθούν γύρω από το υδρόφοβο τμήμα όταν αμφίφιλα μόρια διασπείρονται ελεύθερα στον υδατικό μέσο ως μονομερή. Απελευθέρωση των διατεταγμένων μορίων νερού μπορεί να επιτευχθεί με την απομάκρυνση υδρόφοβων τμημάτων από το υδατικό περιβάλλον και τον διαχωρισμό τους εντός του συσσωματώματος. Η από- διάταξη των μορίων του νερού οδηγεί σε αύξηση της εντροπίας του συστήματος και συνεπώς σε μείωση της ελεύθερης ενέργειας. Για το λόγο αυτό η διαδικασία της συσσωμάτωσης γίνεται αυθόρμητα.

Η αυθόρμητη συσσωμάτωση δεν οφείλεται μόνο στο μηχανισμό που περιγράφεται παραπάνω αλλά και στις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals. Ενισχύεται και από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ πολικών κεφαλών και των μορίων του νερού.(Petty et al,1993)

1.5 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Τα λιποσώματα είναι μακροσκοπική δομή που αποτελούνται από μια ή περισσότερες διπλοστοιβάδες λιπιδίων. Ανακαλύφθηκε ότι όταν τα φωσφολιπίδια συνδυάστηκαν με νερό καθώς αυτά σχημάτισαν αμέσως μια σφαίρα. Τα λιποσώματα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως σωματίδια παρόμοια με τη δομή και τη σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται ακόμα κυρίως σαν ένα σύστημα της βιολογικής μεμβράνης για δοκιμή του λιπιδικής οξείδωσης, ειδικά κατά τη δοκιμή στα εκχυλίσματα και αιθέρια φυτά έλαια από την ένταση της οξείδωσης των λιπιδίων..

Ένα παράδειγμα των ωφελειών των λιποσωμάτων κατά τη διερεύνηση υπεροξείδωσης των λιπιδίων είναι η επίδραση ελεύθερων ριζών ότι μπορεί να διευρευνηθεί με απουσία χημικών συστημάτων που παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την επίδραση της δοκιμής. (Kujundzic,2002., Safer & Nughamish ,1999)

Οι μελέτες των λιπιδίων οξείδωσης σε συστήματα τροφίμων περιπλέκεται λόγω του πολύπλοκου χαρακτήρα των περισσότερων συστημάτων των τροφίμων με πολλά συστατικά που αλληλεπιδρούν και έχουν επιπτώσεις στην οξείδωση των λιπιδίων (Frankel, 2005). Ωστόσο, η προσεκτική επιλογή των συστημάτων ως μοντέλο και οι συνθήκες αποθήκευσης τους μπορεί να βοηθήσουν στο να προσδιοριστούν οι παράγοντες, δηλαδή ποιες ενώσεις και προϋποθέσεις έχουν επίδραση στην οξειδωτική αστάθεια των λιπιδίων, και υποδεικνύουν το οξειδωτικό μονοπάτι στην οξείδωση των λιπιδίων (Decker & Hultin, 1992). Με το συνδυασμό των αποτελεσμάτων από διαφορετικά συστήματα μοντέλων μπορεί να ληφθεί μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα.

Τα λιποσώματα ως πρότυπο συστήματος για μελέτες οξείδωσης λιπιδίων έχουν το πλεονέκτημα ότι το ίδιο μόριο χρησιμεύει ως οξειδώσιμο υπόστρωμα (λιπαρά οξέα) και γαλακτωματοποιητή . Αφού δεν υπάρχει ανάγκη για γαλακτωματοποιητή ,η επιρροή του γαλακτωματοποιητή για την οξείδωση αποφεύγεται. Χρησιμοποιώντας λιποσώματα σε μελέτες οξείδωσης λιπιδίων

επιτρέπουν τον εύκολο χειρισμό του λιπιδίου, σύνθεσης, pH, θερμοκρασίας, περιεκτικότητας σε διάφορα μέσα, όπως άλας, αντιοξειδωτικά, προοξειδωτικά κ.λπ. Η οξείδωση σε λιποσώματα θα μπορούσε επίσης να παρέχει σχετικές πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό που μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο από αντίδραση σε γαλακτώματα (Génot et al, 2003). Ως λιποσώματα έχουν υψηλή οξειδωτική αστάθεια, μπορούν να αξιοποιηθούν για την εξέταση των διαφόρων τύπων του οξειδωτικού στρες και στην αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών αποτελεσμάτων. Εξίσου τα λιποσώματα μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως πρότυπο συστήματος για τον έλεγχο αντιοξειδωτικής ικανότητας (Lovaas, 2006).

Τα λιποσώματα παρασκευάζονται από φωσφολιπίδια καθώς μιμούνται τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, όπου μπορούν να ενσωματωθούν μερικές πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικά. Οι μελέτες της επίδρασης της τοκοφερόλης, καροτενοειδή κλπ στην οξείδωση των λιπιδίων σε λιποσώματα, μπορεί να παρέχει γνώσεις σχετικά με την επιρροή τους στην οξείδωση σε κυτταρικές μεμβράνες (Azuma et al., 1999). Λιποσώματα με ενσωματωμένες πρωτεΐνες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη αλληλεπίδρασης λιπιδίου-πρωτεΐνης σε βιολογικές μεμβράνες. Η γνώση που λαμβάνεται από μελέτες της οξείδωσης των λιπιδίων σε λιποσώματα είναι επίσης χρήσιμη για την πρόσληψη λιποσωμάτων ως συμπλήρωμα ορισμένων βιταμινών, λιπαρών οξέων, ανόργανα άλατα κ.λπ. Η επιρροή του γαλακτωματοποιητή για την οξείδωση αποφεύγεται. . (Chatterjee & Agarwal, 1988)

1.6 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΩΣ ΜΕΣΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η φόρτωση φαρμάκου μπορεί να επιτευχθεί είτε παθητικά (δηλαδή, το φάρμακο εγκλείεται κατά το σχηματισμό λιποσωμάτων) είτε ενεργά (δηλαδή, μετά το σχηματισμό λιποσωμάτων). Οι περιορισμοί και τα οφέλη του μηχανισμού μεταφορών φαρμάκου σε λιποσώματα βρίσκονται σε κρίσιμο βαθμό από την αλληλεπίδραση λιποσωμάτων με τα κύτταρα. Οι μελέτες επαφών με τα κύτταρα έχουν δείξει ότι η κύρια αλληλεπίδραση λιποσωμάτων με τα κύτταρα είναι είτε απλή προσρόφηση (από ειδικές αλληλεπιδράσεις με τα συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας, ηλεκτροστατικές δυνάμεις, είτε από μη ειδικές ασθενείς υδρόφοβες ή ενδοκυττάρωση. (από φαγοκύτταρα κύτταρα όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα)

Τα λιποσώματα ενσωματώνουν μια περιοχή του υδατικού διαλύματος μέσα σε μια μεμβράνη απώθησης νερού. Η υδρόφοβη μεμβράνη δεν θα επιτρέψει την υδρόφιλη διαλυμένη ουσία να περάσει εύκολα μέσα από τα λιπίδια. Στα υδρόφοβα χημικά μπορεί η ουσία να διαλυθεί εκτός της μεμβράνης η οποία μετατρέπει το λιπόσωμα να μεταφέρει τόσο τα υδρόφοβα όσο και τα υδρόφιλα μόρια.

Στην ενδοκυττάρωση τα λιποσώματα μπορούν να γίνουν ως στόχοι για μακροφάγα στο σώμα. Ενδοκυττάρωση σε άλλα κύτταρα μπορεί να προκληθεί με χορήγηση λιποσωμάτων 'διακοσμημένα' με οψονίνες και συνδέτες. Τα τεχνητά κύτταρα συντίθεται με τη χρήση λιποσωμάτων ως μοντέλα. Το προσχέδιο τους μπορεί να αλλοιωθεί με τέτοιο τρόπο που να του επιτρέπει να παρέχει ειδικά φάρμακα με πολλούς άλλους τρόπους. (Charman & Gregoriadis, 1974)

Γενικά τα φάρμακα παραδίδονται μέσω μεθόδου σύντηξης κυττάρων. Τα λιποσώματα ως φάρμακα κατασκευάζονται έτσι ώστε να παρέχονται μέσω μεθόδου διάχυσης. Σε ορισμένα λιποσώματα υπάρχει διαλυμένο υδατικό φάρμακο όπου το ΡΗ εντός του λιποσώματος εξουδετερώνει φυσικά το φάρμακο και έτσι περνούν ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης.

Τα οφέλη μηχανισμού μεταφορών φαρμάκου σε λιποσώματα είναι:

- Λιπόσωμα ως μορφή αμφοτερικίνης β, κατάλληλη για αντιμυκητιασικές θεραπείες. Έχει παθητική στόχευση καθώς μειώνει την τοξικότητα του φαρμάκου.
- Λιπόσωμα ως μορφή ανθρακυκλίνης, κατάλληλη για αντικαρκινική θεραπεία.. Οι ανθρακυκλίνες είναι φάρμακα τα οποία σταματούν την ανάπτυξη των διαιρούμενων κυττάρων μέσω παρεμβολής στο DNA.
- Γονιδιακή θεραπεία
- Λιποσώματα ως φορείς για εμβόλια
- Κυτταρική βιολογική εφαρμογή
- Για διάφορες θεραπείες όπως : οφθαλμολογική , πνευμονική παράδοση , χορήγηση φαρμάκων από το στόμα, τοπικές εφαρμογές.

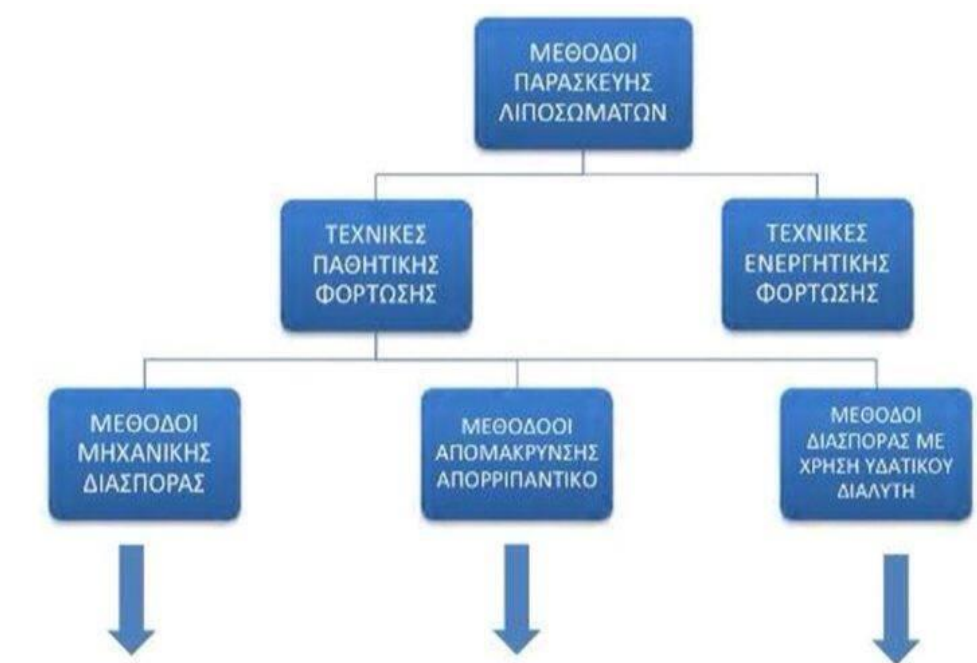
(Gomezzens & Fernandezromero, 2006)

1.7 ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την παρασκευή λιποσωμάτων όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.4* . Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται:

1. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συστατικών (λιποσώματος και βιοδραστικής ένωσης προς εγκλωβισμό)
2. Η τοξικότητα και τη συγκέντρωση της προς εγκλωβισμό ουσίας
3. Ο τύπος του μέσου στο οποίο διασπείρονται τα λιποσώματα
4. Το επιθυμητό μέγεθος και ο επιθυμητός χρόνος ημίσειας ζωής
5. Το κόστος, η αναπαραγωγικότητα και η δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή (Bozzuto & Molinari, 2015)

Πολλές μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων περιλαμβάνουν τα παρακάτω βασικά στάδια: i) Ξήρανση των λιπιδίων και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, ii) Διασπορά του λιπιδίου σε υδατικό μέσο, iii) Καθαρισμό του προκύπτοντος λιποσώματος και iv) Χαρακτηρισμό του τελικού προϊόντος.



- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Ενυδάτωση λεπτού υμενίου • Μικρογαλακτοποίηση • Λουτρό υπερήχων • Εξώθηση μέσω φίλτρων • Εξώθηση μέσω μεμβρανών • Ψύξη-απόψυξη-υπερήχηση • Αφυδατωμένα-Ενυδατωμένα • Σωματίδια | <ul style="list-style-type: none"> • διαπίδυση • χρωματογραφία στήλης • αραίωση (ή Dilution) | <ul style="list-style-type: none"> • έγχυση αιθανόλης • έγχυση αιθέρα • μέθοδος εξάτμισης αντίστροφης φάσης • σταθερά πολυστοιβαδικά |
|---|---|--|

εικόνα 1.4 Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων (Dwivedi et al.,2014)

Όλα Τα λιποσώματα στο τέλος χρησιμοποιούνται εντός μιας βδομάδας, με την αποθήκευση στους 4 ° C. (McNamara,1998)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ»

2.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ

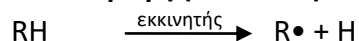
Πολλά συστατικά των τροφίμων οξειδώνονται κατά την έκθεσή τους στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τέτοια είναι τα λίπη, τα έλαια και τα αρωματικά έλαια τα οποία ταγγίζουν όταν εκτίθενται στον αέρα.

Η οξείδωση αποτελεί τη σημαντικότερη αλλοίωση των λιπών και ελαίων. Κατά την οξείδωση, με την καταλυτική δράση της θερμότητας, του φωτός, των μετάλλων και άλλων καταλυτών, ελεύθερη ρίζα υδρογόνου αποσπάται από ακόρεστα λιπαρά οξέα του τριγλυκεριδίου. Το τριγλυκερίδιο στην περίπτωση αυτή μεταπίπτει σε μια ασταθή κατάσταση, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων. Αυτές αντιδρούν έντονα με το οξυγόνο και σχηματίζουν ρίζες υπεροξειδίων. Οι ρίζες υπεροξειδίων αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα και σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων και υδροϋπεροξειδία. Τα τελευταία διασπώνται σε οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα και αλκοόλες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή, γεύση) στα λίπη και έλαια καθώς και στα τρόφιμα που περιέχουν λίπος. Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων που απαντούν στις λιπαρές ουσίες είναι μια αυτοκαταλυτική αντίδραση, κατά την οποία τα προϊόντα της οξείδωσης ενεργούν ως καταλύτες της ίδιας της αντίδρασης. (Μπλούκας, 2004., Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

Ο βαθμός και ο ρυθμός της οξείδωσης των λιπιδίων επηρεάζεται από τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, τη συγκέντρωση του οξυγόνου του παρόντος, τη θερμοκρασία, την επιφάνεια, την ενεργότητα νερού και την παρουσία των προοξειδωτικών (Fennema et al., 2007b). Η απορρόφηση του φωτός δεν μπορεί να επηρεάσει τα λιπίδια, εκτός αν αυτά είναι εκτεθειμένα σε άμεσο ηλιακό φως ή φως φθορισμού χωρίς την κατάλληλη προστασία (List et al., 2005)

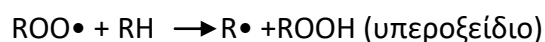
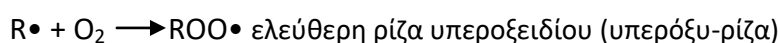
Σχηματικά τα στάδια του αυτοκαταλυτικού μηχανισμού της οξειδωσης, αποδίδονται ως εξής:

1.Εισαγωγή (initiation)

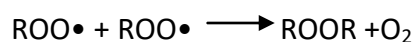
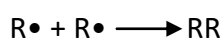


Ακόρεστο λιπαρό οξύ
Ελεύθερη ρίζα ακόρεστου λιπαρού οξέος

2.Διάδοση (propagation)



3.Τερματισμός (termination)



Όπου RH = λιπαρό οξύ

R•, ROO• = ελεύθερες ρίζες

ROOH = υπεροξείδια

RR, ROOR = προϊόντα τελικής αντίδρασης

(Κυριτσάκης, 2007)

Η οξείδωση των λιπαρών ουσιών, γνωστή ως **οξειδωτική τάγγιση** (oxidate rancidity), καθώς και των άλλων συστατικών των τροφίμων, όπως οι χρωστικές και οι βιταμίνες, επηρεάζει αρνητικά:

- Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων και κυρίως την οσμή και τη γεύση
- Το χρώμα
- Τη θρεπτική αξία

Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται ως ενδιάμεσα προϊόντα κατά την οξείδωση των λιπών είναι δυνατόν να αποτελέσουν την αιτία για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς και καρκίνο.

Έτσι παρά το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι αντιδράσεις οξείδωσης είναι ωφέλιμες για το τρόφιμο, ορισμένες μπορούν ν' αποδειχθούν επιβλαβείς. Ο έλεγχος και επιπλέον ο περιορισμός αυτών των επιβλαβών αντιδράσεων στα τρόφιμα επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

- Μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης των τροφίμων
- Απουσία οξυγόνου από το περιβάλλον του τροφίμου και ιδιαίτερα με τη συσκευασία του προϊόντος υπό κενό σε περιέκτη αδιαπέραστο στη διείσδυση του οξυγόνου
- Μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο προϊόν.

Αν τα παραπάνω μέτρα δεν είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν ή δεν είναι αποτελεσματικά, τότε ο μόνος τρόπος ελέγχου και αντιμετώπισης της οξειδωτικής τάγκισης είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. (Μπλούκας, 2004., Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με μονήρη ηλεκτρόνια, είναι ιδιαίτερα ασταθή και έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα παίρνοντας ένα ηλεκτρόνιο από τα γειτονικά τους μόρια και με αυτόν τον τρόπο ξεκινάνε αλυσιδωτές αντιδράσεις. Προέρχονται από τρία στοιχεία τα οποία είναι τα εξής:

- Οξυγόνο δημιουργώντας έτσι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Ο όρος ROS περιέχει όλες οι ρίζες που περιέχουν οξυγόνο, καθώς και όλες οι ενώσεις που μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές. Παραδείγματα αποτελούν το ανιόν υπεροξειδίου, η ρίζα υδροξυλίου, το μονοξειδίο του αζώτου κ.α.
- Άζωτο δημιουργώντας έτσι ενεργές μορφές αζώτου (RNS, nitrogen reactive oxygen species). Τα RNS προέρχονται από NO που αντιδρούν με το οξυγόνο. Το NO παράγεται με τη δράση του ενζύμου συνθάση του NO από αργινίνη.

- Θείο δημιουργώντας αντίστοιχα ενεργές μορφές θείου (RSS, reactive sulfur species) που σχηματίζονται εύκολα όταν αντιδρούν ROS με θειόλες.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργούνται είτε εσωτερικά στον οργανισμό ως φυσιολογική λειτουργία του μεταβολισμού (πχ μέσω διαδικασιών φλεγμονής, σωματικής άσκησης φαγοκυττάρωσης κ.α.), είτε από εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι κλπ.

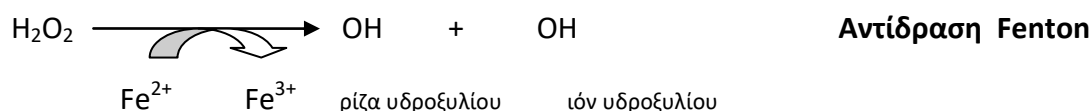
Οι ενεργές μορφές οξυγόνου, αζώτου και θείου εξουδετερώνονται με την βοήθεια ορισμένων ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά διατηρώντας μια ισορροπία. Αν αυτή η ισορροπία διαταραχθεί και τείνει στην υπερπαραγωγή ενεργών μορφών τότε τα κύτταρα αρχίζουν να επηρεάζονται από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Κύριοι στόχοι των ενεργών μορφών είναι οι πρωτεΐνες, τα μόρια του DNA και RNA, τα σάκχαρα και τα λιπίδια όπου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες. (Δημόπουλος & Αντωνοπούλου, 2009)

Επιβλαβείς αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών:

Προκαλείται από οξειδωτικό στρες συνδέεται με τις χρόνιες παθήσεις όπως ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος (CHD), και οστεοπόρωση . Ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε όλες τις μεγάλες κατηγορίες βιομορίων, κυρίως πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) των κυτταρικών μεμβρανών. Η οξειδωτική βλάβη των PUFA, που είναι γνωστή ως υπεροξείδωση λιπιδίων είναι ιδιαίτερα καταστρεπτική, επειδή προχωρεί σαν αλυσιδωτή αντίδραση διαιωσιζόμενη .(Babior,1999 & Knight,1999)

2.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON

Στην διαδικασία που είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton, η παραγωγή ριζών υδροξυλίου συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του χαλκού ή του σιδήρου. Σε παθολογικές καταστάσεις, που έχουν σχέση με το υπερβολικό φορτίο σιδήρου ή με τον μειωμένο διαχωρισμό του σιδήρου από τις πρωτεΐνες μεταφοράς ή αποθήκευσης του, αντίδραση Fenton είναι ένας σημαντικός παράγοντας σχηματισμού ROS 'in vivo'. Σε γενικές γραμμές η ρίζα HO που αναφέρθηκε παραπάνω είναι πάρα πολύ δραστική και μπορεί να αντιδρά με όλα τα μόρια του οργανισμού, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιποειδή και DNA. Το H₂O₂ αντιθέτως αν και χαρακτηρίζεται ως ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, μπορεί να μετατραπεί με την αντίδραση Fenton σε HO μη ενζυμικά, παρουσία ιόντων μετάλλων. Το H₂O₂ μπορεί να διαχέεται μέσω των μεμβρανών και να μετατρέπεται σε HO μέσα στα οργανίδια του κυττάρου, όπως τα μιτοχόνδρια.



(Δημόπουλος & Αντωνοπούλου 2009)

2.2.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΥ ΝΕΡΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ

Η παραδοσιακή χημεία υποστηρίζει ότι η κατάλυση σε ένα διφασικό σύστημα θα συμβεί στη φάση διεπαφής ή στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τα υπεροξείδια είναι πιο πολικά από μη οξειδωμένο λίπος και τείνουν να συσσωρευτούν κοντά στην επιφάνεια. Έτσι συνθήκες αντίδρασης, όπου αυξάνουν τη δέσμευση του σιδήρου στην επιφάνεια, θα αυξήσουν την προοξειδωτική επίδραση του σιδήρου (Schaich, 1992., Garnier-Suillerot et al., 1984).

pH

Η επίδραση του pH στην οξείδωση λιπιδίων σχετίζεται με επίδραση του pH στη διαθεσιμότητα των μετάλλων, τη δραστηριότητα επιφάνειας, και την ιοντική αλληλεπίδραση (Nawar, 1996). Η οξειδωτική δραστηριότητα του σιδήρου εξαρτάται από την χημική κατάσταση, τη διαλυτότητα, και τη φυσική τοποθεσία των σιδήρου (Mancuso et al., 2000). Σε χαμηλό pH όπου η διαλυτότητα του σιδήρου αυξάνεται, ο υψηλός βαθμός έχει αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων υδροϋπεροξειδίων και σιδήρου σε SDS . Στα σταθεροποιημένα (αρνητικά φορτισμένα) γαλακτώματα παρατηρήθηκαν αποσύνθεση υδρο-υπεροξειδίου σχεδόν τόσο γρήγορα όσο ο σχηματισμός τους (Mei et al., 1998a). Ο ρυθμός οξείδωσης στα γαλακτώματα φωσφολιπιδίων μειώθηκε με ακόλουθη σειρά: pH 5,8 > 7 > 8 (Kawakatsu et al, 1984).

Ωστόσο, στις μελέτες του Mancuso et al. (1999), το υψηλότερο ποσοστό οξείδωσης παρατηρήθηκε σε pH 7 από ότι σε pH 3. Αυτό εξηγείται στο ότι οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα του σιδήρου σε pH 7 με αποτέλεσμα την καθίζηση του μετάλλου στην επιφάνεια των λιπιδίων των σταγονιδίων, προσδίδοντας έτσι σίδηρο πιο κοντά στο λιπίδιο σε σύγκριση με pH 3, όπου η διαλυτότητα σιδήρου είναι αρκετά υψηλότερη.

ΑΛΑΤΑ (NaCl)

Τα Άλατα' είναι συνήθως παρούσα στα τρόφιμα. Άλατα προστίθεται σε τρόφιμα για μία ποικιλία σκοπών, όπως τη γεύση και την αναστολή των μικροοργανισμών . Ωστόσο , λίγα είναι ακόμα γνωστά για την επίδραση των διαφόρων ιόντων στην κινητική οξείδωσης των λιπιδίων και τα δεδομένα είναι συχνά αντιφατικά. Αρκετές μελέτες έχουν αναλύσει την επίδραση του NaCl για το σίδηρο που καταλύει την οξείδωση των λιπιδίων σε διαφορετικά γαλακτώματα. Η αντιοξειδωτική δράση του NaCl εξηγήθηκε από έλεγχο της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ φορτισμένων ομάδων (McClement και Decker, 2000, Mei et al., 1998a), με αποτέλεσμα μια μειωμένη τάση του σιδήρου να έρθει πιο κοντά στην επιφάνεια των σωματιδίων των λιπιδίων ή να μειώνεται η διαλυτότητα του οξυγόνου (Hunter, 1993). Ωστόσο, καμία επίδραση του αλατιού δεν παρατηρήθηκε σε οξείδωση των γαλακτωμάτων με θετικά φορτισμένους γαλακτωματοποιητές στις

μελέτες του Mei et al. (1998a), υποδεικνύοντας ότι ούτε νάτριο ούτε χλωριούχο ήταν ικανά να τροποποιήσουν την επιφάνεια με τρόπο που αυξάνεται ο σίδηρος με τις λιπιδικές αλληλεπιδράσεις. Μια οξειδωτική επίδραση του NaCl παρατηρήθηκε επίσης σε μερικές μελέτες. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των NaCl για να αυξηθεί η καταλυτική δράση του σιδήρου (Osinchak et al., 1992). Τα Υδρο-υπεροξειδία είναι πιο πολικά από τα λιπίδια από τα οποία προέρχονται, και στις ενώσεις ιόντων όπως αλάτων μπορεί να αλλάξει την υδροϋπεροξειδία διάπλαση και επίσης να επηρεάσει την κινητική της οξείδωσης (Calligaris & Nicoli, 2006)

2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΚΟΛΛΟΕΙΔΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑ

Μέθοδοι για τη μελέτη οξείδωση των λιπιδίων σε υδατικό κολλοειδές σύστημα. Ένας αριθμός διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της οξειδωτικής αλλοίωσης. Μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με το τι μετρούν :

(Dobarganes και Velasco, 2002):

- απορρόφηση του οξυγόνου,
- απώλεια αρχικού υποστρώματος
- σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης),
- σχηματισμός δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης.

Η πρώτη μέθοδος προσδιορίζει τον βαθμό υπεροξείδωσης των λιπιδίων, ο οποίος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του οξυγόνου που καταναλώνεται, με βάση την ακόλουθη έναρξη της διαδικασίας φάσης και επέκταση ελλείψεων των αντιοξειδωτικών. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση της απώλειας του υποστρώματος στα συστήματα όπως τα δείγματα των τροφίμων ή των βιολογικών δειγμάτων καθώς είναι περίπλοκα, επειδή είναι γεμάτα από πιθανά όξινα υποστρώματα που είναι δύσκολο να εντοπιστούν και να χαρακτηριστούν. Η τρίτη

μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση του σχηματισμού των προϊόντων πρωτογενούς οξείδωσης. Είναι μια μέθοδος που είναι προσαρμοσμένη για τη μελέτη συστημάτων σύνθετων μοντέλων και συχνά περιλαμβάνει τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του υδροϋπεροξειδίου και τα κυρίαρχα πρωτογενή προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. (Laguerre et al,2007)

Οι πιο κοινές μέθοδοι για τον προσδιορισμό πρωτογενής οξείδωσης προϊόντων είναι υπεροξειδία αξία (PV) και συζυγή διένια. Υπεροξειδία ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ιωδομετρικό, μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου. Οι παρατηρούμενες τιμές είναι σχετικές, επειδή έχουν παρατηρηθεί να διαφέρουν για τις διάφορες μεθόδους (Nielsen et al. 2003). Ο προσδιορισμός της αξίας υπεροξειδίου είναι χρήσιμος για τα έλαια που μπορούν να αναλυθούν απ'ευθείας. Για άλλα συστήματα τροφίμων όπως γαλακτώματα, κιμάς κτλ το λιπίδιο εκχυλίζεται με διαλύτες. Η εξάτμιση του διαλύτη θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά, χωρίς αποσύνθεση των υπεροξειδίων (Frankel 2005).

Ωστόσο, οι μέθοδοι που αναφέρονται παραπάνω έχουν κάποια προετοιμασία και / ή στάδια ανάπτυξης και είναι χρονοβόρα. Οι οδοί κατανομή των λιπιδίων οξείδωσης των προϊόντων μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τις φυσικές και χημικές συνθήκες υπό τις οποίες η οξείδωση λαμβάνει χώρα. Αλλαγές σε μονοπάτια την καθιστούν δύσκολη να στηριχθεί σε ένα ή μερικά προϊόντα οξείδωσης για την ποσοτικοποίηση οξείδωσης λιπιδίων . Επομένως είναι ενδιαφέρον η προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί το υπόστρωμα αντίδρασης ως δείκτης για την οξείδωση. (Shimada et al., 1996)

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

2.3.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η Οξείδωση των λιπιδίων είναι ένας σημαντικός δείκτης για να υποδηλώσει την ποιότητα των ελαίων και λιπών και τα προϊόντων που περιέχουν λιπίδια, διότι τα οξειδωμένα λιπίδια, όχι μόνο χαλούν την οσμή και την γεύση των προϊόντων, αλλά επίσης δημιουργούν πολλές βλαβερές βιολογικές επιδράσεις για την ανθρώπινη υγεία. Προϊόντα υπεροξείδωσης έχουν επισημανθεί ως επιβλαβή για την υγεία , λόγω αποδεικτικών στοιχείων για καρκινογενέσεις και αθηρωματικές διαταραχές, για την μεταβολή της σύνθεσης των κυτταρικών μεμβρανών ή για την μείωση στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας.

Ως εκ τούτου, η παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων και των επιπέδων της, καθώς και η παρακολούθηση της προόδου της οξείδωσης των λιπιδίων, είναι η καθημερινή μέριμνα των εταιρειών παραγωγής λιπών . Η ανάπτυξη γρήγορων, αξιόπιστων, εύκολων και ακριβών προηγμένων τεχνικών , είναι επίσης ένας σημαντικός τομέας της έρευνας.

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα. Ωστόσο , δεν υπάρχει ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος για την ανίχνευση όλων των οξειδωτικών αλλαγών σε όλα τα συστήματα τροφίμων , επομένως, είναι απαραίτητο να επιλέγουμε μια σωστή και κατάλληλη μέθοδο για την κάθε συγκεκριμένη εφαρμογή .

Οι διαθέσιμες μέθοδοι για την παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα, μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε ομάδες , με βάση το τι μετράται : η απορρόφηση του οξυγόνου, η απώλεια των αρχικών υποστρωμάτων , ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών , και ο σχηματισμός πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης .

Ένας αριθμός φυσικών και χημικών δοκιμών , συμπεριλαμβανομένων των εργαστηριακών αναλύσεων , έχουν χρησιμοποιηθεί στα εργαστήρια και στη βιομηχανία, για τη μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων οξείδωσης των λιπιδίων (Shahidi F. et al , 2005). Αυτές περιλαμβάνουν :

2.3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

- **Αύξηση βάρους :** Η απορρόφηση του οξυγόνου κατά το αρχικό στάδιο της οξείδωσης, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του βάρους του ελαίου ή του λίπους, το οποίο θεωρητικά παραπέμπει στον βαθμό οξείδωσής του. Θερμαίνοντας ένα έλαιο και ελέγχοντας περιοδικά την αύξηση του βάρους, είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους αξιολόγησης της σταθερότητας της οξείδωσης (Antolovich M. et al, 2002)
- **Μέθοδος πρόσληψης οξυγόνου του υπερκείμενου χώρου :** Εκτός από την μέθοδο αύξησης βάρους , η κατανάλωση οξυγόνου μπορεί να μετρηθεί άμεσα με την παρακολούθηση της πτώσης της πίεσης του οξυγόνου. Η ονομασία της συσκευής για την εν λόγω μέθοδο είναι ο Oxidograph , όπου η μεταβολή της πίεσης στο δοχείο αντίδρασης μετράται ηλεκτρονικά μέσω μετατροπών πίεσης (Shahidi F. et al., 2002, Gordon M., 2001b).

2.3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΛΛΑΓΗΣ ΑΝΤΙΔΡΩΝΤΩΝ

Η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί επίσης να αξιολογηθεί με ποσοτική μέτρηση της απώλειας των αρχικών υποστρωμάτων. Σε τρόφιμα που περιέχουν λίπη ή έλαια, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι τα κύρια αντιδρώντα , των οποίων η σύνθεση αλλάζει σημαντικά κατά τη διάρκεια της οξείδωσης . Οι αλλαγές αυτές παρέχουν ένα έμμεσο τρόπο μέτρησης της έκτασης της οξείδωσης των λιπιδίων (Melton S. L., 1983). Στη μέθοδο αυτή, τα λιπίδια εκχυλίζονται από τα τρόφιμα, εάν είναι απαραίτητο, και εν συνεχεία μετατρέπονται σε παράγωγα, κατάλληλα για χρωματογραφική ανάλυση. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη, λόγω της αδυναμίας της να χρησιμεύσει ως δείκτης οξείδωσης για περισσότερα κορεσμένα λιπίδια (Shahidi F. et al., 2002).

2.3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Αριθμός υπεροξειδίων / Peroxide value (PV)

Η οξείδωση των λιπιδίων περιλαμβάνει το συνεχή σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων ως πρωταρχικά προϊόντα οξείδωσης, τα οποία μπορούν να διασπώνται σε μια ποικιλία μη-πτητικών και πτητικών δευτερογενών προϊόντων (Melton S. L., 1983). Ο ρυθμός σχηματισμού των υπεροξειδίων αντισταθμίζει τον ρυθμό της αποσύνθεσής τους κατά τη διάρκεια του αρχικού σταδίου της οξείδωσης, και αντιστρέφεται σε μεταγενέστερα στάδια. Ως εκ τούτου, η τιμή υπεροξειδίου (PV) είναι ένας δείκτης της οξειδωτικής αλλαγής στα αρχικά στάδια. Ωστόσο, μπορεί κανείς να εκτιμήσει αν ένα λιπίδιο είναι στο στάδιο ανάπτυξης ή μείωσης της συγκέντρωσης των υδροϋπεροξειδίων, με την παρακολούθηση της ποσότητας των υδροϋπεροξειδίων ως συνάρτηση του χρόνου (Shahidi F. et al., 2002).

Αναλυτικές μέθοδοι για τη μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων σε λίπη και έλαια μπορούν να ταξινομηθούν σε εκείνα που προσδιορίζουν το συνολικό ποσό των υδροϋπεροξειδίων και σε αυτά που βασίζονται σε χρωματογραφικές τεχνικές, δίνοντας λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή και την ποσότητα των ειδικών υδροϋπεροξειδίων που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο δείγμα ελαίων (Dobarganes M. C. et al, 2002).

Το PV αντιπροσωπεύει τη συνολική περιεκτικότητα υδροϋπεροξειδίων και είναι ένας από τους πιο κοινούς ποιοτικούς δείκτες των λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή και την αποθήκευση (Antolonich M. et al, 2002). Ένας αριθμός μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της PV, μεταξύ των οποίων οι πιο κοινές που χρησιμοποιούνται είναι : η ιωδομετρική τιτλοδοτήση, η φασματοφωτομετρική μέτρηση ιόντων τρισθενούς σιδήρου και η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Yildiz G., 2003)

Οι λιπαρές ύλες υπόκεινται εύκολα σε αλλοιώσεις. Η τάγγιση τους προκαλείται είτε από υδρολύσεις (υδρολυτικό τάγγισμα) είτε από τη δράση του αέρα (οξειδωτική τάγγιση) είτε από τη δράση μικροοργανισμών (κετονική τάγγιση).

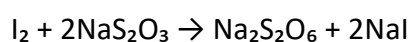
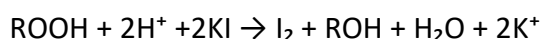
Μια μέθοδος διαπίστωσης της αλλοίωσης της λιπαρής ύλης είναι ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων, που αποτελούν τα πρώτα προϊόντα οξείδωσης της.

Ο αριθμός υπεροξειδίων (Α.Υ.) εκφράζει τα χιλιοστοϊσοδύναμα (mgreq) υπεροξειδίου ανά 1kg λιπαρής ύλης. (Σφλώμος, 2011)

➤ Ιωδομετρική Τιτλοδότηση

Η Ιωδομετρική μέθοδος τιτλοδότησης, βασίζεται στην οξείδωση του ιόντος I⁻ από τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) και είναι η βάση των πρόσφατων πρότυπων μεθόδων προσδιορισμού του PV (Antolovich M. et al, 2002). Στη μέθοδο αυτή, ένα κορεσμένο διάλυμα ιωδιούχου καλίου προστίθεται σε δείγματα ελαίου για να αντιδράσει με τα υδροϋπεροξειδία.

Το ιώδιο που ελευθερώνεται (I₂) τιτλοδοτείται στη συνέχεια με ένα τυποποιημένο διάλυμα θειικού νατρίου και άμυλο ως δείκτη τελικού σημείου (Antolovich M. et al, 2002/ Shahidi F. et a., 2002). Το PV λαμβάνεται με υπολογισμό και καταγράφεται σε χιλιοστοϊσοδύναμα οξυγόνου ανά χιλιόγραμμο δείγματος (meq / kg). Ο επίσημος προσδιορισμός περιγράφεται κατά IUPAC. Οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι ακόλουθες:



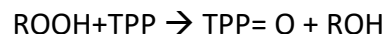
Αν και είναι η πιο κοινή μέθοδος για την μέτρηση του PV, έχει αρκετά μειονεκτήματα: η διαδικασία είναι χρονοβόρα και με πολύ εργασία. Όπως περιγράφεται από τους Riuz et al. 2001, η δοκιμασία περιλαμβάνει έξι στάδια: ακριβή ζύγιση του δείγματος, διάλυση των λιπιδίων σε χλωροφόρμιο, οξίνιση με οξικό οξύ, προσθήκη ιωδιούχου καλίου, επώαση για 5 λεπτά ακριβώς και τιτλοδότηση με θειικό νάτριο. Απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος και παράγεται σημαντική ποσότητα των αποβλήτων (Ruiz et al, 2001).

➤ **Σύμπλοκα Ιόντων Σιδήρου (FOX)**

Μετράει με φασματοφωτομετρία την ικανότητα των υδροϋπεροξειδίων να οξειδώσουν τα ιόντα δισθενούς σιδήρου, τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα είτε με θειοκυανικό είτε με πορτοκαλί ξυλενόλη. (Eymard S. et al, 2003., Jiang Z. Y. et al, 1991., Wolff S. P., 1994). Τα σύμπλοκα σιδήρου με θειοκυανικό είναι κόκκινο-ιώδη και δείχνουν ισχυρή απορρόφηση στα 500-510 nm (Dobarganes M. C. et al, 2002). Η μέθοδος αυτή είναι απλή, αναπαραγώγιμη και πιο ευαίσθητη από την πρότυπη ιωδομετρική μέθοδο κι έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της οξείδωσης των λιπιδίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, λίπη, έλαια και λιποσώματα (Dobarganes M. C. et al, 2002).

➤ **Μέθοδος μετασχηματισμού υπέρυθρης φαρματοσκοπίας**

Τα υδροϋπεροξειδία μπορούν να προσδιορισθούν ποσοτικά με φασματοσκοπία υπέρυθρου IR, μέσω της μέτρησης των χαρακτηριστικών τους O-H στη ζώνη που εκτείνεται η απορρόφησή τους (Sedman J. et al 1997). Μία ταχεία μέθοδος (FTIR) με βάση την στοιχειομετρική αντίδραση της τριφαινυλοφωσφίνης (TPP) με υδροϋπεροξειδία, έχει αναπτυχθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό του PV των βρώσιμων ελαίων (Dong J. et al, 1997), παράγουν οξείδιο τριφαινυλοφωσφίνης (TPPO), το οποίο έχει έντονη απορρόφηση στην ζώνη 542 cm⁻¹, στο φάσμα του μέσου IR (Dobarganes M. C. et al, 2002/ Ruiz et al. 2001). Η ένταση της ζώνης μετράται και μετατρέπεται σε τιμή υπεροξειδίων. Η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ακόλουθη:



Η φασματοσκοπία FTIR είναι μια απλή, γρήγορη και πολύ ακριβής μέθοδος. Δείχνει άριστη συσχέτιση με την ιωδομετρική μέθοδο και αποφεύγονται τα προβλήματα διάθεσης του διαλύτη και του αντιδραστήριου που σχετίζονται με την πρότυπη υγρή χημική (Ruiz et al, 2001/ Dong J. et al, 1997).

Μέτρηση συζυγών διενίων και τριενίων

Ο σχηματισμός των συζευγμένων διενίων σε λίπη ή έλαια, δημιουργεί μια κορυφή απορρόφησης στα 230-235 nm στην υπεριώδη (UV) περιοχή και αποτελεί χρήσιμη τεχνική για την μελέτη της οξείδωσης των λιπιδίων (Antolovich M. et al, 2002). Η υπεριώδης ανίχνευση των συζυγών διενίων είναι απλή, γρήγορη, δεν απαιτεί χημικά αντιδραστήρια και απαιτούνται μικρές ποσότητες δειγμάτων . Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει λιγότερη εξειδίκευση και ευαισθησία από ό, τι η μέτρηση PV (Dobarganes M. C. et al , 2002/ Gordon M., 2001,a). Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεαστούν από την παρουσία ενώσεων που απορροφούν στην ίδια περιοχή, όπως καροτενοειδή (Shahidi F. et al, 2002).

2.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης (υδροϋπεροξειδία) είναι ασταθή και επιρρεπή σε διάσπαση. Ένα πολύπλοκο μείγμα πτητικού, μη πτητικού και πολυμερούς, δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, σχηματίζεται μέσω αντιδράσεων αποσύνθεσης, παρέχοντας διάφορους δείκτες οξείδωσης των λιπιδίων. Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης περιλαμβάνουν αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, πτητικά οργανικά οξέα και εποξικές ενώσεις, μεταξύ άλλων. Μέθοδοι για την εκτίμηση της οξείδωσης των λιπιδίων με βάση τον σχηματισμό τους είναι:

Αριθμός ανισιδίνης (p-Anv)

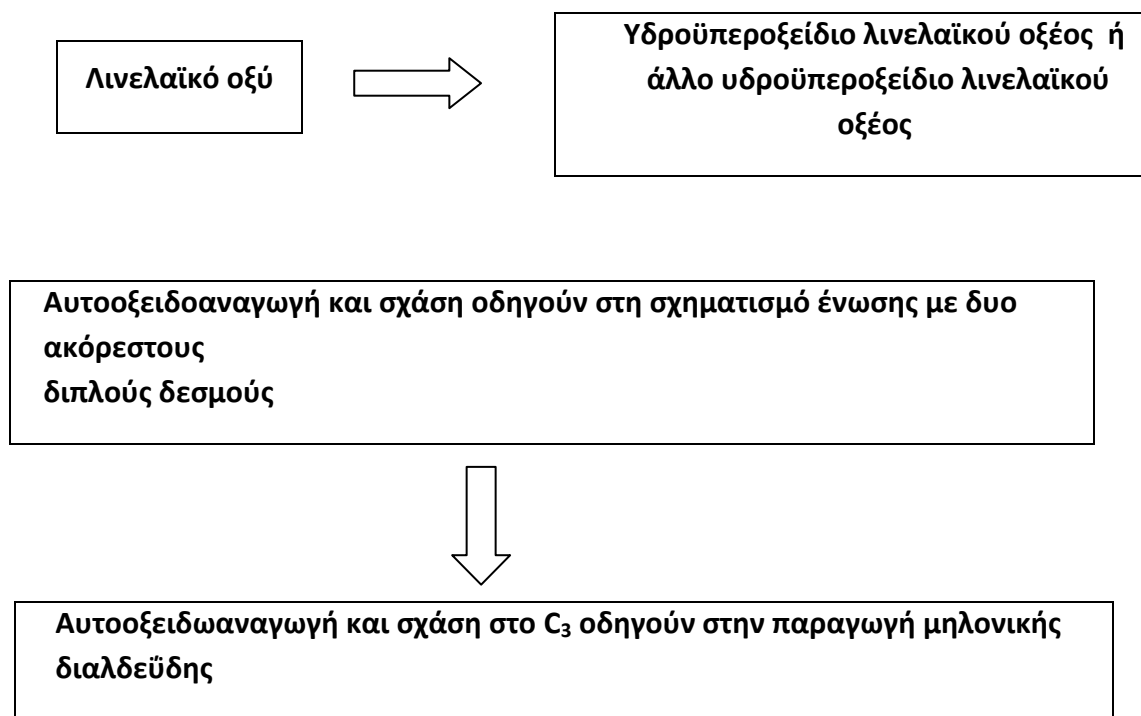
Η μέθοδος μέτρησης της τιμής της p-ανισιδίνης (p-AnV) μετρά την περιεκτικότητα σε αλδεΐδες (κυρίως 2-αλκάνια και 2,4-αλκαδιένια) , που παράγονται κατά την αποδόμηση των υπεροξειδίων των υδρογονανθράκων. Βασίζεται στην χρωματική αντίδραση p-μεθοξυανιλίνης (ανισιδίνης) με αλδεϋδικές ενώσεις (Doleschall F. et al , 2002). Η αντίδραση αυτή υπό όξινες συνθήκες, αποδίδει κιτρινωπά προϊόντα, που απορροφούν στα 350 nm (Shahidi F. et al, 2002/

Gordon M., 2001). Το χρώμα ποσοτικοποιείται και μετατρέπεται σε p-AnV, που ορίζεται ως η απορρόφηση του διαλύματος που προκύπτει από την αντίδραση 1 g λίπους στο διάλυμα ισοοκτανίου (100 ml) με p-ανισιδίνη (0,25% σε παγόμορφο οξικό οξύ) (Gordon M., 2001). Αυτή η δοκιμή είναι περισσότερο ευαίσθητη σε ακόρεστες αλδεΐδες, παρά σε κορεσμένες αλδεΐδες, γιατί τα χρωματισμένα προϊόντα από ακόρεστες αλδεΐδες απορροφούν πιο έντονα σ' αυτό το μήκος κύματος (Gordon M., 2001). Ωστόσο, συσχετίζεται καλά με την ποσότητα των συνολικών πτητικών ουσιών (Doleschall F. et al, 2002). Το p-AnV είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της οξειδωτικής τάγγισης σε λίπη και έλαια και λιπαρά τρόφιμα (van der Merwe G. H. et al , 2003). Μια πολύ σημαντική συσχέτιση μεταξύ του p-AnV και τιμών οσμής και PV έχει βρεθεί (List G.R. et al, 1974). Παρ' όλα αυτά, μερικοί συγγραφείς έχουν δηλώσει ότι η p-AnV είναι συγκρίσιμη μόνο εντός του ίδιου τύπου ελαίου , γιατί η αρχική AnV ποικίλλει μεταξύ των πηγών ελαίου (Guillen et al 2002). Για παράδειγμα, έλαια με υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μπορεί να έχουν υψηλότερο AnV ακόμα και όταν είναι φρέσκα (White P. J., 1995). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά στη Βόρεια Αμερική, αλλά ευρέως στην Ευρώπη (Dong J. et al, 1997), ιδίως ως μέρος του αριθμού ολικής οξείδωσης. Προσοχή πρέπει να υπάρχει κατά την εκτέλεση της δοκιμής αυτής, λόγω της τοξικότητας της ανισιδίνης (Doleschall F. et al , 2002).

Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA Τεστ)

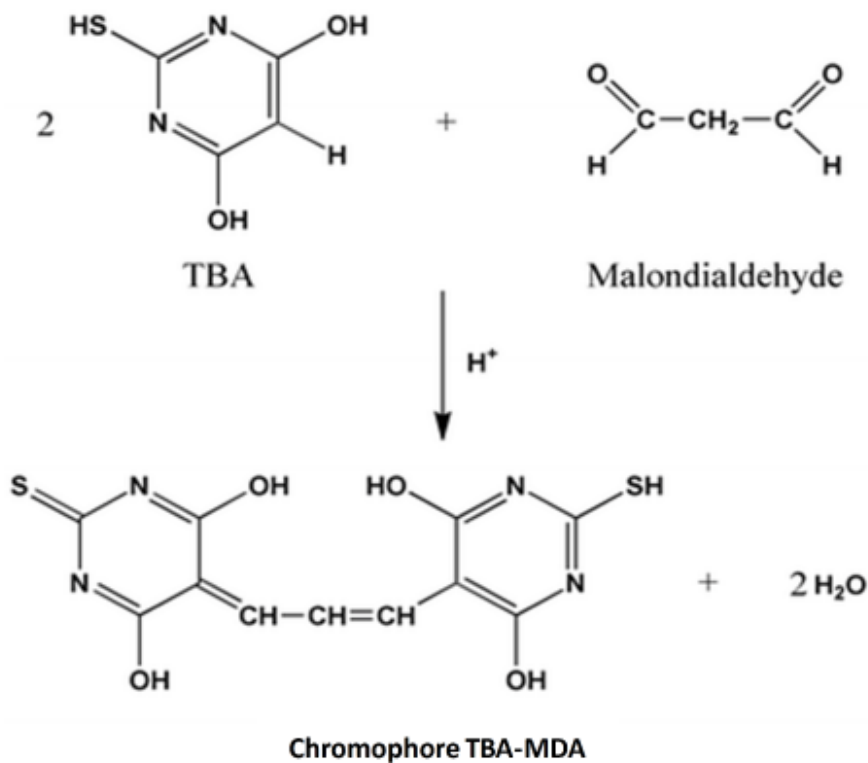
Με την δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος ανιχνεύονται δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης. Είναι ευαίσθητη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο του βαθμού οξείδωσης ζωικών λιπαρών υλών (πχ ιχθυελαίων ,λίπους αλλαντικών) (κυριτσακης,2007). Η μέθοδος μέτρησης της τιμής της p-ανισιδίνης (p-AnV) μετρά την περιεκτικότητα σε αλδεΐδες, που παράγονται κατά την αποδόμηση των υπεροξειδίων των υδρογονανθράκων. Βασίζεται στην χρωματική αντίδραση p-μεθοξανιλίνης (ανισιδίνης) με αλδεϋδικές ενώσεις (Doleschall F. et al 2002). Η αντίδραση αυτή υπό όξινες συνθήκες, αποδίδει κιτρινωπά προϊόντα, που απορροφούν στα 350 nm (Shahidi F. et al, 2002/ Gordon M., 2001) και εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης 530 nm .

Η μηλονική διαλδεΐδη είναι προϊόν αποικοδόμησης των υδροϋπεροξειδίων του λινολενικού οξέος διαμέσου των σταδίων για τα οποία φαίνονται σχηματικά παρακάτω (για το λινελαϊκό οξύ) :



Δυο μόρια 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος αντιδρούν με 1 μόριο μηλονικής διαλδεΐδης προς ένα έγχρωμο παράγωγο. Η αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος με τη μηλονική διαλδεΐδη έχει ως εξής:

(Κυριτσάκης 2007)



Σχήμα 2.3.5.1 Αντίδραση TBA με MDA

Τιμή TOTOX

Η τιμή Totox, είναι η μέτρηση της συνολικής οξείδωσης, συμπεριλαμβανομένων των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Είναι ένας συνδυασμός των PV και p-AnV:

$$\text{Totox value} = 2 \text{ PV} + \text{p-AnV}$$

Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων, συχνά παρατηρείται ότι το PV ανεβαίνει πρώτα και στη συνέχεια πέφτει ως διάσπαση υδροϋπεροξειδίων (Stauffer C., 1996). Οι PV και p-AnV αντικατοπτρίζουν το επίπεδο οξείδωσης σε πρώιμα και μεταγενέστερα στάδια της αντίδρασης οξείδωσης, αντίστοιχα. Η τιμή Totox μετρά και τα υδροϋπεροξειδία και τα προϊόντα διάσπασής τους και παρέχει μια καλύτερη εκτίμηση της προοδευτικής οξειδωτικής φθοράς των λιπών και ελαίων (Stauffer C., 1996). Ωστόσο, η τιμή ολικής οξείδωσης δεν έχει καμία επιστημονική βάση, γιατί είναι ένας συνδυασμός δύο δεικτών με διαφορετικές διαστάσεις (7). Πρόσφατα, οι Wanasundara U. N. et al., 1995,b χρησιμοποίησαν τιμές TBA και όρισαν το Totox TBA ως $2\text{PV} + \text{TBA}$ χρησιμοποιώντας τη δοκιμή TBA στη θέση της δοκιμασίας p-AnV.

Καρβονύλια

Οι ενώσεις καρβονυλίου, συμπεριλαμβανομένων των αλδευδών και των κετονών, είναι τα δευτερεύοντα προϊόντα οξείδωσης που παράγονται από την αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων και υποδηλώνεται ότι είναι οι κύριοι συντελεστές για την απόκλιση σε επίπεδο γεύσης, που σχετίζονται με την τάγγιση πολλών προϊόντων διατροφής (Antolovich M. et al, 2002) .

Δείκτης σταθερότητας ελαιολάδου / oil stability index (OSI)

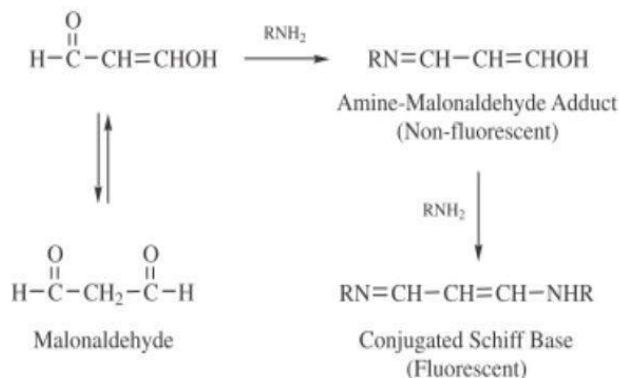
Η τιμή OSI ορίζεται ως το σημείο της μέγιστης μεταβολής του ρυθμού οξείδωσης, που οφείλεται στην αύξηση της αγωγιμότητας από το σχηματισμό των πτητικών οργανικών οξέων κατά την οξείδωση των λιπιδίων. Η μέθοδος απαιτεί ένα υψηλότερο επίπεδο οξείδωσης ($PV > 100$) για να ληφθούν μετρήσιμα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες μεθόδους στις οποίες τα υδροϋπεροξειδία είναι τα πιο σημαντικά προϊόντα που σχηματίζονται και ανιχνεύονται .Η μέθοδος OSI διαφοροποιείται από την αποθήκευση σε συνθήκες περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας μια ροή αέρα και υψηλές θερμοκρασίες για την επιτάχυνση της οξείδωσης (de la Presa-Owens et al, 1995). Επίσης είναι μια αυτοματοποιημένη ανάπτυξη της μεθόδου του ενεργού οξυγόνου (AOM), παρ 'όλα αυτά, μετρά τις μεταβολές στην αγωγιμότητα που προκαλείται από ιοντικά πτητικά οξέα, ενώ το PV καθορίζεται στην AOM (Shahidi F. et al, 2002).

Υδρογονάνθρακες και μέθοδος φθορισμού

Ο σχηματισμός των κορεσμένων υδρογονανθράκων, ειδικά βραχείας αλυσίδας (C1-C5) υδρογονανθράκων, όπως αιθάνιο, προπάνιο και πεντάνιο, μπορεί να μετρηθεί για την παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων, όταν αλδεΐδες είναι είτε απύσες ή μη ανιχνεύσιμες (Melton S. L., 1983/ Shahidi F. et al, 2002).

Έχει παρατηρηθεί ότι το περιεχόμενο των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, όπως η μαλοναλδεΐδη (MA), μειώνεται με την αυξημένη οξείδωση των λιπιδίων, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από την περαιτέρω αντίδραση του MA με πρωτεΐνες. Το MA αντιδρά με ενώσεις που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες (πρωτεΐνες, αμινοξέα, DNA, φωσφολιπίδια), για να σχηματίσει φθορίζοντα

προϊόντα (Wold J. P. et al, 2000). Μία δοκιμασία φθορισμού έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων σε τρόφιμα με μυϊκό ιστό και βιολογικούς ιστούς.



Σχήμα 2.3.5.2 : Το MA αντιδρά με ενώσεις που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες (πρωτεΐνες, αμινοξέα, DNA, φωσφολιπίδια), για να σχηματίσει φθορίζοντα προϊόντα

Εκτός από την MA, υδροϋπεροξειδία και άλλες αλδεΐδες αντιδρούν επίσης με αμινο-ενώσεις παράγοντας διάφορα προϊόντα φθορισμού με διαφορετική διέγερση και μέγιστα εκπομπής (Wold J. P. et al, 2000). Σημαντικές συσχετίσεις υπήρχαν μεταξύ αυτής της μεθόδου και της τιμής TBA καθώς και το επίπεδο απορρόφησης οξυγόνου, και φαίνεται να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της οξειδωτικής επιδείνωσης των μυών σε τρόφιμα, ειδικά σε λυοφιλιωμένα προϊόντα (Wold J. P. et al, 2000).

2.3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Τα αρχικά βήματα της λιπιδικής οξειδωσης περιλαμβάνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ως σημαντικά βραχύβια ενδιάμεσα προϊόντα. Το επίπεδο οξειδωσης των λιπών και ελαίων μπορεί να μετρηθεί άμεσα με την ανίχνευση του σχηματισμού ριζών. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση ριζών ή στην τάση για το σχηματισμό των ριζών, παρέχουν μια καλή ένδειξη για την έναρξη της οξειδωσης των λιπιδίων. (Andersen M.L. et al , 2002., Carlsen C. U. et al, 2001).

Το Electron Spin Resonance (ESR), που αναφέρεται επίσης κι ως Electron paramagnetic resonance (EPR), βασίζεται στις παραμαγνητικές ιδιότητες των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων σε ρίζες και έχει αναπτυχθεί για την εκτίμηση του σχηματισμού των ελεύθερων ριζών που προέρχονται από τα πρώτα στάδια της οξειδωσης και την έναρξη της πρωτογενούς οξειδωσης (Andersen M.L. et al, 2002). Η δοκιμασία μετρά την απορρόφηση της ενέργειας μικροκυμάτων όταν ένα δείγμα τοποθετείται σε ένα μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο (Shahidi F et al, 2002). Ωστόσο, οι σύντομες διάρκειες ζωής και η χαμηλή συγκέντρωση σταθερής κατάστασης των υψηλά αντιδρώντων ριζών που προέρχονται από τα λιπίδια, καθιστούν δύσκολο τον προσδιορισμό αυτών των ριζών σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από την ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση των 10^{-9} M (Andersen M.L. et al, 2002).

Η τεχνική παγίδευσης spin επιτρέπει τη συσσώρευση των ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων των μακροβιότερων ριζών με προσθήκη σε δείγματα ενός παράγοντα παγίδευσης spin, η οποία αντιδρά με ελεύθερες ρίζες για να σχηματίσει πιο σταθερές προσαγωγές spin, αλλά συχνά εις βάρος της ικανότητας να εντοπίσει την αρχική ρίζα (Antolovich M. et al, 2002/ Andersen M.L. et al, 2002).

2.3.7 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης / Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των λιπιδίων, τα λίπη ή τα έλαια εμφανίζουν μια σειρά από θερμικά επαγόμενες μεταβάσεις, όπως η μεταφορά των μορίων οξυγόνου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Εξώθερμη διεργασία). Η τεχνική θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSC), η οποία βασίζεται στην απελευθέρωση θερμότητας από αντιδράσεις οξειδωσης, έχει τη δυνατότητα αξιολόγησης της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπών και ελαίων, υποδεικνύοντας την έναρξη της προηγμένης οξειδωσης (τερματισμός) (Velasco J. et al, 2004). Παρέχει πληροφορίες για τη θερμοκρασία και τη ροή θερμότητας που συνδέονται με την οξείδωση των λιπιδίων, ως συνάρτηση του χρόνου και της θερμοκρασίας.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ισοθερμικές ή μη ισοθερμικές συνθήκες και μια ροή οξυγόνου ως αέριο καθαρισμού, με θερμοδομετρητή, που μετρά την ροή θερμότητας εντός (ενδοθερμική) ή εκτός (εξώθερμη) του δείγματος ελαίου που υποβάλλεται σε αλλαγές οξείδωσης (Velasco J. et al, 2004).

Το DSC είναι ένα μια ευαίσθητη, αποτελεσματική και συνεπής μέθοδος για τον χαρακτηρισμό της ποιότητας των λαδιών σε διαφορετικά στάδια της οξείδωσης (Kiritsakis A. et al, 2002) . Είναι απλή και γρήγορη, και δεν απαιτεί διαλύτη ή χημικό αντιδραστήριο.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού / Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της οξειδωτικής υποβάθμισης των λιπών και ελαίων. Η αρχή της NMR είναι ότι τα άτομα υδρογόνου σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφούν ενέργεια, στο εύρος ραδιοσυχνοτήτων, ανάλογα με το μοριακό περιβάλλον τους, όπου οι αλλαγές γίνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οξείδωσης. (Shahidi F. et al, 2002). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να παρακολουθηθούν με φασματοσκοπία NMR ως αντανάκλαση του επιπέδου οξείδωσης των λιπιδίων των τροφίμων. Η φασματοσκοπία NMR είναι μια ταχεία, μη καταστρεπτική και αξιόπιστη τεχνική για την μέτρηση της οξείδωσης των λιπιδίων. Μετρά ταυτόχρονα τόσο τις πρωτογενείς, όσο και τις δευτερογενείς οξειδωτικές μεταβολές στα έλαια και παρέχει συγκεκριμένες πληροφορίες για το οξειδωτικό περιεχόμενα στα μόρια TAG. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR θεωρείται το πιο κατάλληλο μέσο για την εκτίμηση της οξείδωσης των λιπιδίων από τους χημικούς προσδιορισμούς (Diehl B. W. L., 1998/ Medina I. et al, 1998)

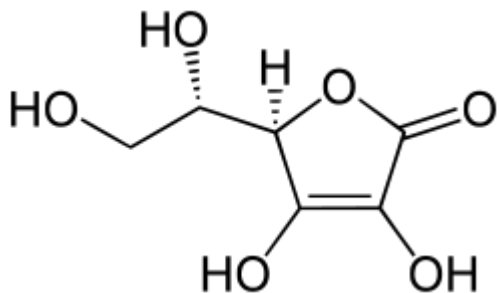
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ»

3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

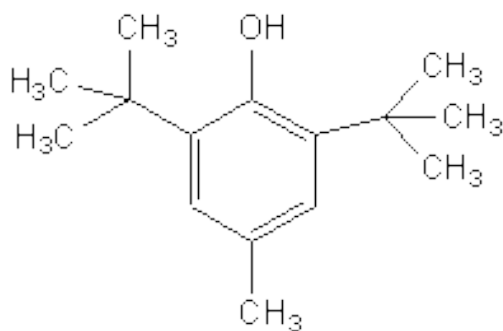
Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από ένα μόριο στόχο. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα σημαντική, επειδή καταστέλλει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Πρόσφατα ο όρος «αντιοξειδωτικά» έχει επεκταθεί και σε εκείνες τις ενώσεις που διακόπτουν την αλυσίδα αντιδράσεων στην οξείδωση των λιπιδίων ή απενεργοποιούν το οξυγόνο. (Αρβανιτογιάννης et al., 2001)

Πολλές λιπαρές ύλες, ιδίως όταν δεν έχουν υποστεί εξευγενισμό παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα στην οξείδωση. Αυτό οφείλεται στην παρουσία συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο τα περισσότερα λίπη, έλαια και τα λιπαρά τρόφιμα ζωικής προέλευσης περιέχουν μόνο μικρές ποσότητες αντιοξειδωτικών, λόγω της επεξεργασίας στην οποία για να καταστούν εδώδιμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι επιρρεπή στην οξείδωση. (Satue et al., 1995)

Πρόκειται για φυσικές (**φυσικά αντιοξειδωτικά**) ή συνθετικές οργανικές ουσίες (**συνθετικά αντιοξειδωτικά**) που περιέχουν στο μόριό τους μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλεται και η αντιοξειδωτική τους δράση. Ένα παράδειγμα φυσικού αντιοξειδωτικού είναι η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ, ενώ η βουτυλική υδρόξυανισόλη (BHA) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως προαναφέρθηκε αποτελούν αμφιλεγόμενο ζήτημα για τους επιστήμονες διότι άλλοι τα θεωρούν ασφαλή για την υγεία του ανθρώπου και άλλου όχι.



Σχήμα 3.1.1 φυσικού αντιοξειδωτικού : Βιταμίνη C



Σχήμα 3.1.2 συνθετικού αντιοξειδωτικού (BHT)

Ακολουθεί πίνακας όπου παρουσιάζονται οι έξι γενικές κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται τα αντιοξειδωτικά, ο τρόπος δράσης τους καθώς και οι ενώσεις οι οποίες ανήκουν σε κάθε μια κατηγορία. (Αρβανιτογιάννης et al., 2001, Carocho et al., 2012)

Πινάκας 3.1.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΕΝΩΣΕΙΣ
Πρωτοταγή	Αναστέλλουν αντιδράσεις οξειδωσης παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες.	Φαινολικές ενώσεις (BHA, BHT, TBHQ, PG, τοκοφερόλες, καφεϊνικό οξύ, καρσονόλη)
Δεσμευτές οξυγόνου	Αντιδρούν με το οξυγόνο και ελαττώνουν την συγκέντρωσή του σε ένα κλειστό σύστημα.	Ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του
Δεσμευτές μετάλλων	Δεσμεύουν μέταλλα των οποίων η μεταφορά ηλεκτρονίων μπορεί να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες.	Οξέα ή παράγωγα που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις π.χ. EDTA, κιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ, άλατα
Αναγωγικά	Συnergειακή δράση (αναγέννηση φαινολών).	Ασκορβικό οξύ
Απενεργοποιητές μονήρους οξυγόνου		Τοκοφερόλες και β-καροτένια
Ένζυμα	Απομάκρυνση ενεργών ειδών οξυγόνου.	

(Πηγή Αρβανιτογιάννης et al, 2001)

3.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

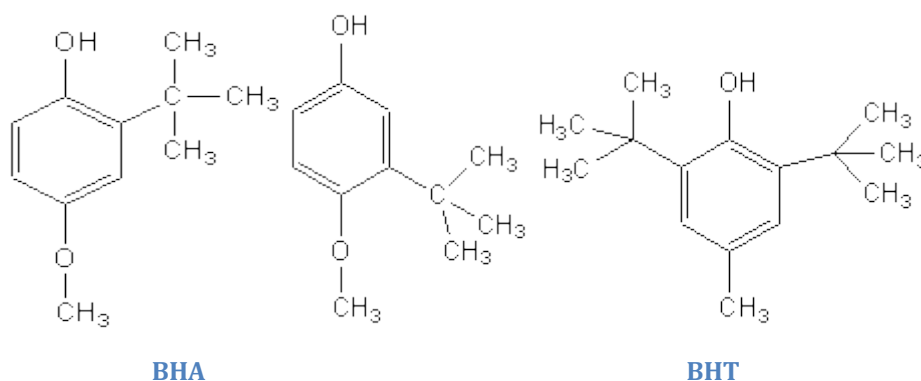
Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι φαινολικά παράγωγα κι έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την αντίδραση των ελεύθερων ριζών των λιπαρών οξέων με το οξυγόνο χάριν της φαινολικής δομής που διαθέτουν. Αυτές οι ενώσεις προσθέτονται στα τρόφιμα ώστε αυτά να μπορούν να αντέχουνε διάφορες μεταχειρίσεις και συνθήκες, καθώς και να παρατείνεται η ζωή στο ράφι. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πρόκειται για ενώσεις που παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπου δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 200ppm (100-200ppm) καθώς και να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της λιπαρής φάσης. (Σφλώμος, 2011.,Carocho et al, 2012)

Η φαινόλη που περιέχεται στο μόριο αυτών των αντιοξειδωτικών ενεργεί ως δότης πρωτονίων και εμποδίζει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αυτοοξειδωσης των λιπών. Οι ελεύθερες ρίζες του αντιοξειδωτικού που σχηματίζονται κατά την αντίδραση αυτή είναι σταθερές και συνεπώς δεν έχουν την ικανότητα της παραπέρα οξείδωσης των λιπών και ελαίων. Κατά συνέπεια, τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι τόσο αποτελεσματικότερα, όσο γρηγορότερα προσθέτονται στο τρόφιμο, ώστε να εμποδίσουν το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών στα λιπαρά οξέα. Ακόμα επιβραδύνουν την οξείδωση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. (Μπλούκας, 2004., & Σφλώμος, 2011)

Πρόσφατα γίνονται έρευνες για την τοξικότητα των συνθετικών αντιοξειδωτικών που ίσως οδηγεί σε καρκινογενέσεις. Παρόλο που ήδη γίνεται η προσπάθεια να αντικατασταθούν πλήρως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά με τα φυσικά, η ολοκληρωτική απαγόρευσή τους δεν φαίνεται πιθανή στο άμεσο μέλλον.

Τα πιο συχνά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι τα παρακάτω:

- E310 Γαλλικός προπυλεστέρας
 - E311 Γαλλικός οκτυλεστέρας
 - E312 Γαλλικός δωδεκυλεστέρας
 - E320 Βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA) (1,0 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)
 - E321 Βουτυλικό υδροξυτολουόλιο (BHT) (0,25 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)
- Τριτογενής-βουτυλο-υδροξινόνη
(Μπλούκας, 2004., Σφλώμος, 2011., Carocho et al., 2012)



3.3 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα φυτά, τα ζώα αλλά και ο άνθρωπος διαθέτουν κάποιες ποσότητες αντιοξειδωτικών και ενζύμων, ενδογενώς, για την προστασία των λιπιδίων τους από την οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα του ανθρώπου χωρίζεται και δυο μεγάλες ομάδες, τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Παρά την αξιοσημείωτη δράση του ενδογενούς συστήματος σε πολλές περιπτώσεις δεν επαρκεί και γι αυτό το λόγο οι άνθρωποι εξαρτώνται από διάφορων ειδών αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα τρόφιμα έτσι ώστε να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων ριζών σε χαμηλά επίπεδα.

Λόγω του ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δεν είναι βέβαιο ότι δεν επιδρούν αρνητικά στην υγεία του ανθρώπου, η προσοχή στράφηκε στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αυτά είναι φυσικές οργανικές ουσίες που περιέχουν στο μόριό τους μια φαινολική ομάδα, στην οποία οφείλεται και η αντιοξειδωτική τους δράση. (Dai et al., 2010.,Carocho et al., 2012)

3.4 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων, που έχει ως κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους την ύπαρξη ενός ή και παραπάνω αρωματικού δακτυλίου που έχει υποκαταστάτη υδροξυλομάδα.

Οι φαινολικές ενώσεις κυριαρχούν στο φυτικό βασίλειο, γι αυτό και είναι αναπόσπαστο μέρος της διατροφής του ανθρώπου, και είναι γνωστό ότι υπάρχουν περισσότερες από 8.000 φαινολικές δομές που μπορούν να είναι είτε απλά μόρια είτε σύνθετα. Είναι ευρέως διαδεδομένες ως συστατικά των φυτικών τροφών (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, ελαιόλαδο κλπ.) των ποτών (τσάι, καφές, μπύρα, κρασί κλπ.) και εν μέρει ευθύνονται για οργανοληπτικές ιδιότητες αυτών. Για παράδειγμα φαινολικά συμβάλλουν στην πικρή και στυφή γεύση των φρούτων και λαχανικών.

Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να καταταχθούν σε:

- **Απλές φαινόλες**, όταν έχουν ένα φαινολικό δακτύλιο (φαινολικά οξέα και κουμαρίνες)
- **Πολυφαινόλες**, όταν διαθέτουν δυο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους (φλαβονοειδή, στυλβένια, λιγνάνια, ταννίνες)

Οι φαινόλες αποκτούν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών και λοιπών σημαντικών ιδιοτήτων τους. (Δημόπουλος et al, 2009; Dai et al, 2010)

3.4.1 ΑΠΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

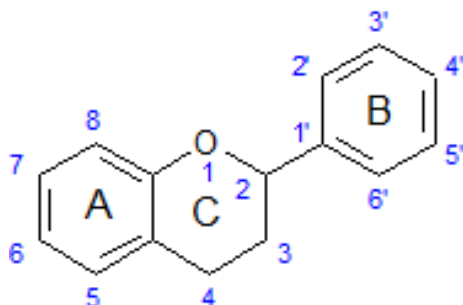
Οι απλές φαινόλες όπως η φαινόλη, η θυμόλη, η κρεσόλη, η ορκινόλη, η ρεζορκινόλη, η υδροκινόνη και διάφορα παράγωγα όπως η αρμπουτίνη και η σησαμόλη, είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα αρωματικά φυτά. Φαινολικά παράγωγα όπως τα υδροξυβενζοϊκά ή φαινολικά οξέα (βανιλλικό, γαλλικό) και οι αλδεΐδες, όπως η βανιλίνη, απαντούν σε ανώτερα φυτά και φτέρες. Ανευρίσκονται στη φύση ελεύθερες ή και με τη μορφή μεθυλο- και αιθυλο-εστέρων και γλυκοζιτών (Harborne, 1989).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Heim, et. al., 2002). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίου/υδρογόνου και παράγοντες αδρανοποίησης δραστικών μορφών οξυγόνου. Έχουν επίσης ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με ιόντα μετάλλων και παρεμπόδισης της αντίδρασης Fenton.

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε: i) υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή καθώς και ως εστέρες ή γλυκοζίτες όπως το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το συριγκικό οξύ και το βανιλλικό οξύ, ii) σε υδροξυλιωμένα παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C6-C3) κυρίως απαντούν με την μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών, όπως το καφεϊκό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Και τέλος γλυκοζιτικοί, φαινυλοξικοί εστέρες. (Dai et al, 2010)

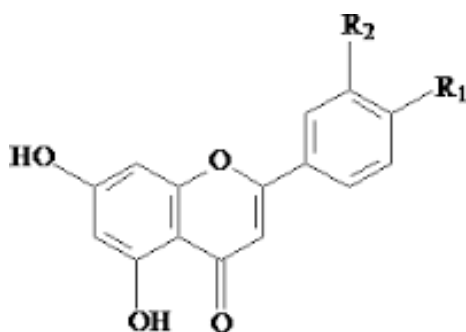
3.4.2 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ



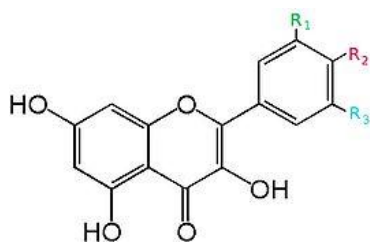
Σχήμα 3.4.2.1 Χημική δομή φλαβονοειδών (Dai et al, 2010)

Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων και επομένως και των πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή. Αποτελούνται από μια μεγάλη αντιοξειδωτική ομάδα χαμηλού μοριακού βάρους πολυφαινολών. Η χημική δομή των φλαβονοειδών στηρίζεται στην ύπαρξη του φλαβανικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους Α και Β και από έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο, ο οποίος φέρει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορούν να διακριθούν σε έξι (6) υποομάδες οι οποίες είναι: φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβαν-3-όλες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες. (Carocho et al, 2012; Leopoldini et al, 2010)



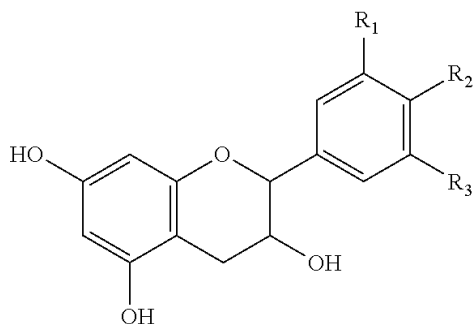
Σχήμα 3.4.2.2 Χημική δομή φλαβόνης (Πηγή Dai et al, 2010)

Φλαβόνες	R ₁	R ₂
Απιγενίνη	H	H
Λουτεολίνη	H	OH



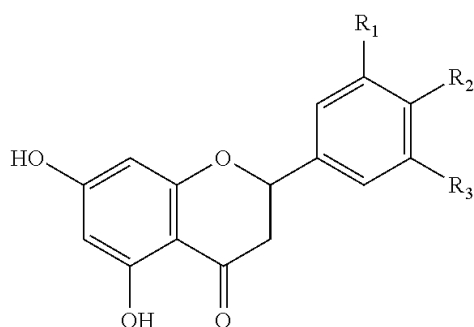
Φλαβονόλες	R ₁	R ₂	R ₃
Καμπεφερόλη	H	OH	H
Κερκετίνη	OH	OH	H
Μυρικετίνη	OH	OH	OH

Σχήμα 3.4.2.3 Χημική δομή φλαβονόλης (Πηγή Dai et al, 2010)



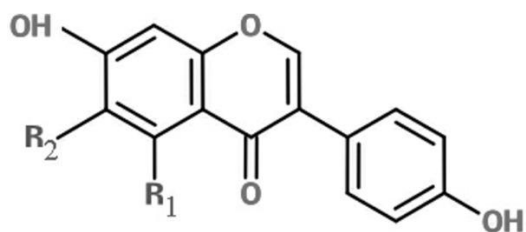
Φλαβανόλες	R ₁	R ₂	R ₃
Κατεχίνη	OH	OH	H
Γαλλοκατεχίνη	OH	OH	OH

Σχήμα 3.4.2.4 Χημική δομή φλαβανόλης (Πηγή Dai et al, 2010)



Φλαβανόνες	R ₁	R ₂
Εσπερετίνη	OH	OCH ₃
Εριοδικτυόλη	OH	OH
Ναρινγενίνη	H	OH

Σχήμα 3.4.2.5 Χημική δομή φλαβανόνης (Πηγή Dai et al, 2010)



Ισοφλαβόνες	R ₁
Δαιδζεΐνη	H
Γενιστεΐνη	OH

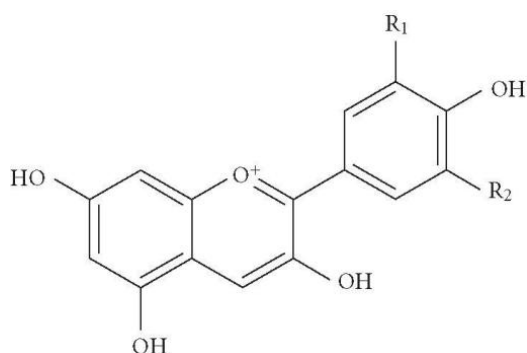
Σχήμα 3.4.2.6 Χημική δομή ισοφλαβόνων(Πηγή Dai et al, 2010)

Τα δομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση είναι: α) η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ C-2 και C-3 και καρβονυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου β) η παρουσία υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C και γ) η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου B. Τα φλαβονοειδή δρουν με δυο μηχανισμούς ως αντιοξειδωτικά. Κυρίως διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξείδωσης δίνοντας άτομα υδρογόνου στις ρίζες, όπως όλα τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση. Στο σχηματισμό συμπλόκων συμμετέχουν το υδροξύλιο στη θέση 3 και το καρβονύλιο στη θέση 4 των φλαβονολών ή το καρβονύλιο στη θέση 4 και ένα υδροξύλιο στη θέση 5 των φλαβονολών, των φλαβονών και των φλαβανινών. Μερικά από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή είναι η κατεχίνη, η γαλλική κατεχίνη, η κερκετίνη και η καμπεφερόλη.(Carocho et al, 2012., Leopoldini et al, 2010)

Οι φλαβονόλες διαφέρουν από τις φλαβανόνες λόγω μιας ομάδας υδροξυλίου στη θέση C3, και από έναν C2-C3 διπλό δεσμό. Οι φλαβανόνες και οι φλαβόνες συνήθως βρίσκονται στα ίδια φρούτα και συνδέονται με συγκεκριμένα ένζυμα, ενώ οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες σπανίως βρίσκονται μαζί. Οι ανθοκυανίνες επίσης απουσιάζουν από φυτά πλούσια σε φλαβανόνες ενώ είναι υπεύθυνες για το πορτοκαλί, κόκκινο, μπλε, και μωβ χρώμα σε πολλά φρούτα και λαχανικά.

Οι ανθοκυανίνες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυσικών φλαβονοειδών χρωστικών. Στα φυτά βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών, κυρίως στη θέση C3, των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανίνες και προκύπτουν με όξινη υδρόλυση των πρώτων. Ο θεμελιώδης πυρήνας των ανθοκυανιδίων είναι το χλωριούχο βανζοπυρίλιο, αλλά η μητρική τους ουσία είναι το χλωριούχο 2-φαινυλοβενζοπυρίλιο ή αλλιώς χλωριούχο φλαβύλιο. Κύριος εκπρόσωπος είναι η κυανιδίνη. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις και έχουν επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα.

Τα όξινα άλατα είναι συνήθως κόκκινα και τα μεταλλικά συνήθως μπλε. (Carocho et al, 2012., Leopoldini et al, 2010., Σφλώμος, 2011)



Ανθοκυανίνες	R ₁	R ₂
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Παιονιδίνη	OCH ₃	H
Πετουνιδίνη	OCH ₃	OH
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃

Σχήμα 3.4.2.7 Χημική δομή ανθοκυανίνων (Πηγή Dai et al, 2010)

TANNINESΣ

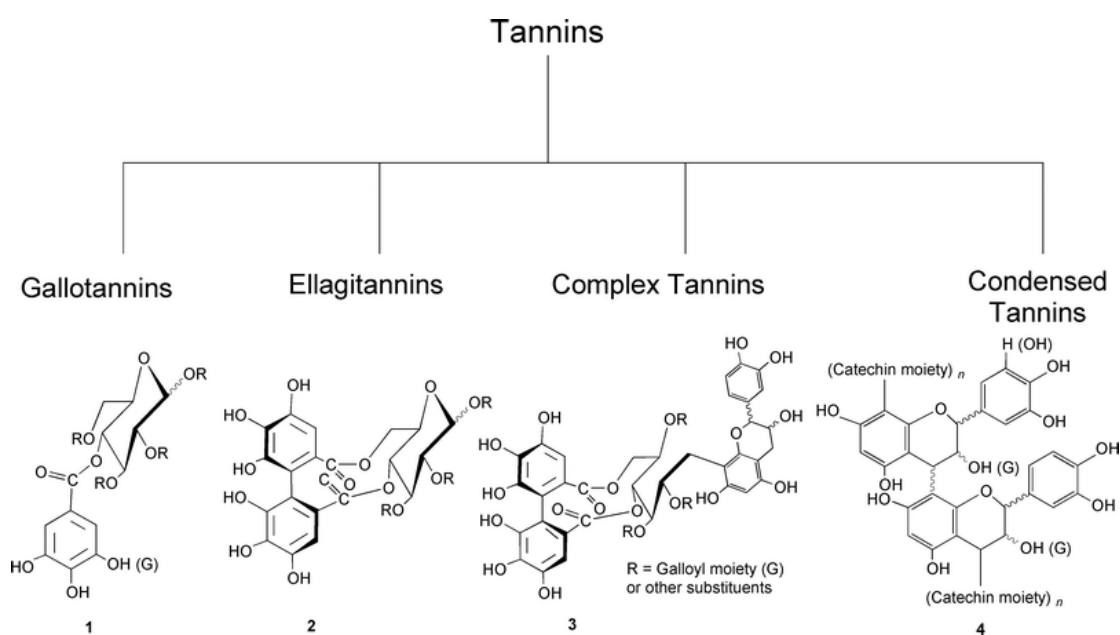
Οι ταννίνες είναι μια ακόμα σημαντική κατηγορία των πολυφαινολών. Είναι σημαντικές για την διατροφή του ανθρώπου και συνήθως χωρίζονται σε δυο ομάδες οι οποίες είναι :

- A) οι υδρολυόμενες ταννίνες και
- B) οι μη υδρολυόμενες ταννίνες

Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι ενώσεις που περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή άλλης πολυόλης εστεροποιημένης με γαλλικό οξύ. Η μεγάλη

ποικιλία στη δομή αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές δυνατότητες στο σχηματισμό οξειδωτικής σύνδεσης.

Οι **μη υδρολυόμενες ταννίνες** είναι ολιγομερή ή πολυμερή φλαβαν-3-όλης συνδεδεμένη μέσω ενός δεσμού άνθρακα. Αναφέρονται επίσης ως προανθοκυανιδίνες επειδή αποσυντίθενται σε ανθοκυανιδίνες μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της όξινης καταλάσης υπό θέρμανση σε όξινα διαλύματα αλκοόλης. (Dai et al., 2010., Carocho et al., 2012., Leopoldini, et al., 2010)



Σχήμα 3.4.2.8 Χημική δομή υδρολυόμενων ταννίνων (γαλλοταννίνες, ελλαγιταννίνες) και μη υδρολυόμενων ταννίνων (condensed tannins) (Πηγή Khanbabaee et al, 2001)

3.4.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι διαλύτες εκχυλίσαις χρησιμοποιούνται για διαδικασίες προετοιμασίας εκχυλισμάτων από φυτικά υλικά λόγω της ευκολίας της χρήσης τους, της αποτελεσματικότητας, και της ευρείας εφαρμογής. Είναι γενικά γνωστό ότι η απόδοση των χημικών εκχύλισης εξαρτάται από τον τύπο διαλυτών με ποικίλες πολικότητες, του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας, την αναλογία του δείγματος προς διαλύτη, καθώς και από τη χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Η διαλυτότητα του φαινολικών διέπεται από τη χημική φύση του δείγματος του φυτού, καθώς και την πολικότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Τα υλικά φυτικής εκχύλισης μπορεί να περιέχουν φαινολικά που κυμαίνονται από απλές (π.χ., φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες) σε εξαιρετικά πολυμερισμένο ουσίες (π.χ., Μόρια 2010, 157317 ταννίνες) σε διαφορετικές ποσότητες. Επιπλέον, φαινολικά μπορούν επίσης να συνδέονται με άλλα φυτικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει καμία καθολική διαδικασία εκχύλισης κατάλληλο για την εκχύλιση όλων των φυτικών φαινολικών. Ανάλογα με το σύστημα του διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της, ένα μίγμα φαινολικών οξέων διαλυτό στον διαλύτη θα εξαχθούν από φυτικά υλικά. Μπορεί επίσης να περιέχει κάποιες μη-φαινολικές ουσίες, όπως ζάχαρη, οργανικά οξέα και τα λίπη. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να χρειαστεί να αφαιρεθεί μια ποσότητα ανεπιθύμητων συστατικών.

Οι διαλύτες, όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, και οι συνδυασμοί τους έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών από φυτικά υλικά, συχνά με διαφορετικές αναλογίες νερού. Η επιλογή του σωστού διαλύτη επηρεάζει το ποσό και το ποσοστό των πολυφαινολών. Ειδικότερα, η μεθανόλη είναι η πιο αποτελεσματική στην εκχύλιση των πολυφαινολών χαμηλότερου μοριακού βάρους, ενώ οι υψηλότερες φλαβανόνες μοριακού βάρους είναι καλύτερα να εκχυλίζονται με υδατική ακετόνη. Η αιθανόλη είναι επίσης καλός διαλύτης για την εκχύλιση πολυφαινολών και είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο . (Shi et al., 2005)

Η προετοιμασία του δείγματος , από το φυτό στο εργαστήριο, είναι αρκετά σημαντική διότι οι συγκεντρώσεις αυτές και η ποσοτικοποίηση τους εξαρτώνται και φυσικά μεταβάλλονται από τον τρόπο ή τους τρόπους που θα διαχειριστείς το φρούτο. Συνήθως τα δείγματα αντιμετωπίζονται με άλεση και ομογενοποίηση, η οποία προηγείται της ξήρανσης. Η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους, οι οποίοι είναι ξήρανση υπό αέρα και ξήρανση με ψύξη. Σε γενικές γραμμές η ξήρανση με ψύξη διατηρεί υψηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών σε δείγματα φυτών σε σχέση με εκείνα που έχουν ξηρανθεί με αέρα. Ωστόσο, οι διεργασίες ξήρανσης, συμπεριλαμβανομένης και της ξήρανσης με ψύξη, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες επιδράσεις στα χαρακτηριστικά των φρούτων. (Dai et al, 2010)

Ο τρόπος της εκχύλισης αποτελεί επίσης έναν πολύ σημαντικό και βασικό παράγοντα που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα, καθώς κάποιες μέθοδοι είναι αποτελεσματικότεροι από άλλους. Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι είναι:

- a) Ο τύπος των διαλυτών με ποικίλες πολικότητες,
- b) Ο χρόνος εκχύλισης,
- c) Η θερμοκρασία
- d) Η αναλογία δείγματος προς διαλύτη
- e) Η χημική σύνθεση του δείγματος
- f) Τα φυσικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Ένας άλλος σημαντικός λόγος που ο τρόπος εκχύλισης είναι βασικός, είναι το ότι επειδή τα φυτικά υλικά περιέχουν φαινολικές ομάδες από απλές έως και πολύ σύνθετες, αλλά και το ότι μπορούν να συνδέονται και με άλλα συστατικά (πχ υδατάνθρακες και πρωτεΐνες), δεν υπάρχει διαδικασία καθολικής εξόρυξης κατάλληλη για την εκχύλιση όλων των φαινολικών συστατικών. Έτσι λοιπόν ανάλογα με το τι θέλουμε να εκχυλίσουμε χρησιμοποιούμε διαφορετική μέθοδο και συνεπώς διαφορετικό διαλύτη και διαφορετικές συνθήκες, αναλόγως με το τι δρα αποτελεσματικότερα με κάθε συστατικό.

Οι διαλύτες όπως είναι η μεθανόλη, η ακετόνη, η αιθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας καθώς και οι συνδυασμοί τους, χρησιμοποιούνται ευρέως για εκχυλίσματα από φυτικά υλικά, συχνά με διαφορετικές αναλογίες νερού. Η επιλογή του διαλύτη λοιπόν επηρεάζεται από το ποσό και το ποσοστό των πολυφαινολών που εξάγονται. Ενδεικτικά:

- Η μεθανόλη είναι αποτελεσματικότερη σε εκχυλίσματα πολυφαινολών με χαμηλό μοριακό βάρος, ενώ οι υψηλότερου μοριακού βάρους εκχυλίζονται αποτελεσματικότερα με υδατικό διάλυμα ακετόνης.
- Για εκχύλιση ανθοκυανίνων από φυτικά δείγματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά συνήθως χρησιμοποιείται μεθανόλη ή ακετόνη.
- Μίγμα ακετόνης νερού, έχει αποδειχθεί πως έχει τα καλύτερα αποτελέσματα σε εκχυλίσματα υδροξυκινναμικών οξέων, σε σχέση με διαλύτη υδατικής μεθανόλης.
- Ο υδατικός διαλύτης μεθανόλης όμως, είναι αποτελεσματικότερος της υδατικής ακετόνης όταν πρόκειται για εκχύλιση φλαβαν-3-ολών και προκυανιδίων.
- Η αιθανόλη αποτελεί καλό διαλύτη για την εκχύλιση πολυφαινολών και είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Όλα τα εκχυλίσματα επαναδιαλύονται σε νερό, με μια τελική συγκέντρωση 50mg/ml. (Dai et al, 2010., Fortalezas et al, 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 «ΕΥΡΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ»

4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στην παρούσα πτυχιακή έγινε μελέτη της αναστολής οξείδωσης λιποσώματος από αντιοξειδωτικά ντομάτας που εκχυλιστήκαν από τέσσερις ποικιλίες που βρίσκονταν στο στάδιο ωρίμανσης brake και red ripe. Ανά στάδια στο πείραμα έχουμε : την εκχύλιση των ποικιλιών ντομάτας ανά δύο σε κάθε μελέτη, την παρασκευή λιποσώματος και την οξείδωση λιποσώματος. Τέλος μετράμε την απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα δείγματα που έχουμε κάνει οξείδωση, αλλά και σε αυτά που δεν έχουμε κάνει και τα συγκρίνουμε.

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΔΡΟΦΙΛΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

1. Λαμβάνεται $2.00 \pm 0,01$ gr ντομάτας ,τοποθετείται σε falcon 50ml και προστίθεται 10 ml νερό.
2. Το μείγμα ομογενοποιείται με Vortex για 2 min ,
3. Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 15 min

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ

1. Λαμβάνονται 1280 μ L από το 5% stock διάλυμα λεκιθίνης και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 5 Ml
2. Προστίθεται 1500 μ L chloroform και Vortex 2 sec.

3. Η φιάλη συνδέεται στο rotary evaporator και εξατμίζεται μόνο με κενό, χωρίς θέρμανση με μεγάλη ταχύτητα περιστροφής. Αναμονή 30 λεπτά.
4. Προστίθεται 3200 μL ρυθμιστικό Tris και αναδεύεται έντονα με Vortex 5 λεπτά και κατόπιν τοποθετείται σε υπερήχους για 30 λεπτά.
5. Το διάλυμα μοιράζεται σε erendof, 500 μL ακριβώς στο καθένα.
6. Στα erendof προστίθεται 10 μL εκχυλίσματος ντομάτας ενώ σε ένα erendof προστίθεται 10 μL ρυθμιστικό Tris.
7. Vortex για 3 sec το καθένα
8. Στα erendof προστίθεται 80 μL AAPH Μμ.
9. Όλα τα erendof θερμαίνονται για 1 ώρα στους 37°C
10. Vortex για 3 sec το καθένα.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ

11. Σε όλα τα erendof προστίθεται 20 μL διάλυμα 0,2 BHT και 700 μL TBA αντιδραστήριο.
12. Οι σωλήνες τοποθετούνται για 30 min σε νερό που βράζει.
13. Κατόπιν ψύχονται σε νερό / πάγο
14. Φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 min
15. Λαμβάνεται με προσοχή το υπερκείμενο και τοποθετείται σε κυβέτα του 1,5 mL για φωτομέτρηση στα 533 nm.

Ως τυφλό για μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα Tris.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και τα παρακάτω αποτελέσματα εκφράζονται σε επί τοις εκατό % αναστολή. Όπως αναφέρεται και παραπάνω στα προηγούμενα κεφάλαια η εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε ήταν υδρόφιλη με διαλύτη το νερό. Έτσι λοιπόν προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.1

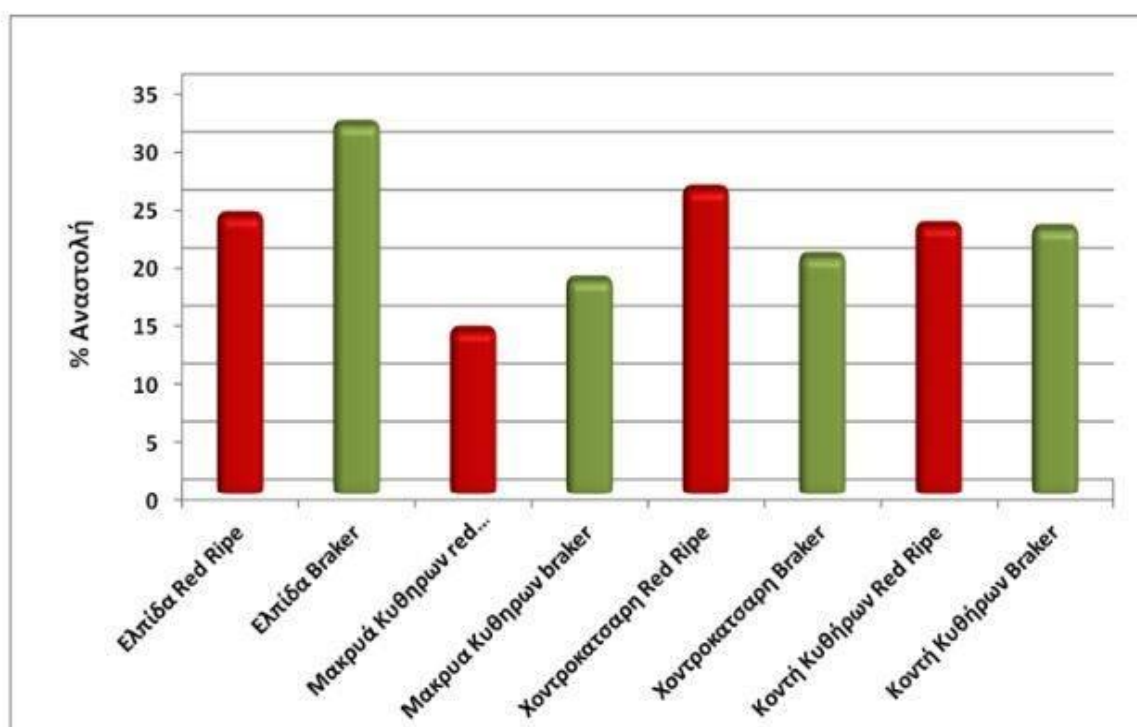
Ποικιλία	% Αναστολή
Ελπίδα Red Ripe	23,84±5,7
Ελπίδα Braker	31,72±5,6
Μακρὰ Κυθήρων red ripe	13,92±3,8
Μακρὰ Κυθήρων braker	18,29±4,6
Χοντροκάτσαρη Red Ripe	26,12±4,1
Χοντροκάτσαρη Braker	20,30±3,4
Κοντή Κυθήρων Red Ripe	22,98±1,0
Κοντή Κυθήρων Braker	22,72±6,2

πίνακας 4.3.1: μέτρηση αναστολής και αντίστοιχου σφάλματος των ποικιλιών ντομάτας

Με βάση τον παραπάνω πίνακα και συγκρίνοντας τις ποικιλίες και τα στάδια ωριμότητας τους, εύκολα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι την υψηλότερη αναστολή, ανάμεσα στις Braker ποικιλίες, παρουσιάζει η Ελπίδα με ποσοστό 31,72% και ποσοστό σφάλματος $\pm 5,6$. Επόμενη και με αισθητή διαφορά, ακολουθεί η ποικιλία της Κοντής Κυθήρων με αναστολή της τάξης του 22,72% και με ποσοστό σφάλματος $\pm 6,2$. Τα ποσοστά των υπολοίπων ποικιλιών είναι πιο κοντά μεταξύ τους με την Χοντροκάτσαρη να παρουσιάζει ποσοστό $20,3 \pm 3,4$ και τελευταία την Μακρὰ Κυθήρων με ποσοστό $18,29 \pm 4,6$.

Όσον αφορά τις ποικιλίες κατά το στάδιο Red Ripe όπως είναι φυσικό υπάρχουν ποσοστιαίες διαφοροποιήσεις σε σχέση με το Braker. Σε αυτό λοιπόν το στάδιο την πρωτιά και το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζει η Χοντροκάτσαρη με

26,12 ± 4,1. Ακολουθεί με μικρή απόκλιση η ποικιλία Ελπίδα με αναστολή 23,84% και πιθανότητα σφάλματος ±5,7. Αμέσως μετά την Ελπίδα μεγαλύτερη αναστολή παρουσιάζει η Κοντή Κυθήρων με ποσοστό 22,98±1, ενώ με μεγάλη και αισθητή απόκλιση από τις υπόλοιπες η Μακρυά Κυθήρων εμφανίζει ποσοστό απόκλισης μόλις 13,92 ± 3,8. Παρακάτω φαίνονται και σχηματικά οι ποικιλίες και τα ποσοστά αναστολής των σταδίων ωρίμανσής τους.



Σχήμα 4.3.2 :- αναστολή % της οξείδωσης λιπιδίων από τα αντιοξειδωτικά των ποικιλιών ντομάτας

Γενικά σε όλων των ειδών τις ποικιλίες που μελετήθηκαν παρατηρούμε ποσοστιαίες διαφορές ανάμεσα στα δυο στάδια. Η αναστολή από το στάδιο Braker στο στάδιο Red Ripe μειώνεται στις ποικιλίες Ελπίδα και Μακρυά Κυθήρων. Αντιθέτως, στην ποικιλία Χοντροκάτσαρη κατά το στάδιο Red Ripe η αναστολή είναι υψηλότερη από εκείνη του braker. Σχεδόν ίδια ποσοστά με ανεπαίσθητη διαφορά μεταξύ των δυο σταδίων είναι η Κοντή Κυθήρων. Όλα τα παραπάνω φαίνονται και στο σχήμα 4.3.1

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από το πείραμα που διεξήχθη με σκοπό τον υπολογισμό της αναστολής οξειδωσης λιποσώματος από τα αντιοξειδωτικά ποικιλιών ντομάτας έχουμε τα εξής αποτελέσματα. Το υψηλότερο ποσοστό αναστολής ανάμεσα στις braker ποικιλίες το έχει ελπίδα με 31,72% καθώς το χαμηλότερο με 18,29% η Μακρυά Κυθήρων με 18,29%. Ωστόσο στις Red Ripe ποικιλίες πρώτη με ποσοστό αναστολής είναι η Χοντροκάτσαρη με 26,12% ενώ τελευταία βρίσκεται η Μακρυά Κυθήρων με 13,92%

Ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αποκτήσουν εικόνα για το πώς διάφοροι παράγοντες αλληλεπιδρούν και επηρεάζονται μεταξύ τους και πως η μεταβλητότητα στις μετρήσεις είναι επίσης ενδιαφέρον. Από την υπεροξείδωση των λιπιδίων προκαλεί οξειδωτική βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες και όλα τα άλλα συστήματα που περιέχουν λιπίδια, σε κάθε έρευνα της συνολικής αντιοξειδωτικής δράση των εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων.(Kagan VE, 1988).

Οι μετρήσεις απορρόφησης οξειδωσης έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες για την αξιολόγηση της κινητικής της οξειδωσης (Yamamoto et al. 1984, Yoshida και 1992) καθώς τα αποτελέσματα της επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικά (Génot et al., 1994, Yamamoto et al. 1988) ή σε υδατικά προοξειδωτικά συστήματα μοντέλων μεμβράνης.

Η δοκιμή TBA πραγματοποιήθηκε για την εξέταση των λιπιδίων οξειδωσης , λόγω της απλότητας της μεθόδου. Παρ 'όλα αυτά υπάρχει το πλεονέκτημα ότι το λιποσωμικό σύστημα παραμένει διαφορετικό από το φυσικό κυτταρικό συστήματα. Για το λόγο αυτό, ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη δοκιμή των λιποσωμάτων, δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν στο σύστημα φυσικού μεμβράνης, αλλά μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες.

Ως εκ τούτου, τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται ακόμα κυριως σαν ένα σύστημα της βιολογικής μεμβράνης για δοκιμή του λιπιδικής οξειδωσης, ειδικά κατά τη δοκιμή στα εκχυλίσματα και αιθέρια φυτά έλαια από την ένταση της οξειδωσης των λιπιδίων .

Αυτές οι μελέτες είναι σημαντικές διότι στην οξείδωση των λιπιδίων τα συστατικά των ελεύθερων τροφίμων είναι ένα σημαντικό στρατηγικό πρόβλημα των παραγωγών τροφίμων. Ο βαθμός της οξείδωσης των λιπαρών οξέων και οι εστέρες τους σε τρόφιμα εξαρτάται από τη χημική δομή των λιπαρών οξέων, τη τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων, τη θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύεται τρόφιμα ή παρασκευάζονται για φαγητό και την παρουσία αντιοξειδωτικών. Τα συνθετικά, αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά τρόφιμα για να επιβραδύνει ανεπιθύμητες αλλαγές ως αποτέλεσμα της οξείδωσης. Επίσης Χημικά, όπως tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) και tert-butyl hydroxytoluene (BHT), μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά μέσα. (Safer et.al., 1999., Rice-Evans 1996)

Η αναστολή της λιπιδικής οξείδωσης προσδιορίστηκε μετρώντας το σχηματισμό δευτερογενών στοιχείων (μηλονοδιαλδεΐδης) της οξειδωτικής διαδικασίας, με τη χρήση λιποσωμάτων ως ένα οξειδώσιμο υπόστρωμα. Ωστόσο, επειδή η δοκιμή θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) δεν είναι ειδικό για MDA, άλλες μη λιπιδικές ουσίες που υπάρχουν στο φυτό-εκχυλίσματα ή τα προϊόντα υπεροξείδωσης άλλων μηλονοδιαλδεΐδων, θα μπορούσαν να αντιδρούν θετικότερα με TBA. Αυτά παρεμποδίζουν τις ενώσεις που στρεβλώνουν τα αποτελέσματα και ως εκ τούτου, όλα τα τελικά αποτελέσματα των διερευνηθέντων εκχυλισμάτων έχουν διορθωθεί χρησιμοποιώντας τις απορροφήσεις των διερευνηθέντων εκχυλισμάτων μετά το TBA –τεστ. (χωρίς λιποσώματα) (Janero, 1990)

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berg J.M , Tymoczko J.L, Stryer L . 'Βιοχημεία' (Μετάφραση στα ελληνικά: Α.Αλετράς, Θ.Βαλκανά, Δ.Δράινας, Η.Κούβελας, Γ.Κ παπαδόπουλος, Μ.Φράγκου-Λαζαρίδη, Επιστημονική επιμέλεια : Α.Καραμανλίδης, Γ.Κ Παπαδόπουλος.) Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2005
- Αντιμησιάρη Σ.Γ, Σημειώσεις Φαρμακευτικής Τεχνολογίας ΙΙ.' Μορφές Χορήγησης Φαρμάκων- Εισαγωγή στην Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία', Πανεπιστήμιο Πατρών, 2008
- Αρβανιτογιάννης Σ., Βαρζάκας Θ. & Τζίφα Κ. (2008)' Έλεγχος Ποιότητας Τροφίμων' , Αθήνα : Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε
- Αρβανιτογιάννης Σ. & Μποσνέα Λ. (2001), 'Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης & Συσκευασίας Τροφίμων', Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press Α.Ε.
- Αρβανιτογιάννης Σ., Σάνδρου Δ. & Κούρτης Λ. (2001), 'Ασφάλεια Τροφίμων', Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press Α.Ε
- Δημόπουλος Κ. & Αντωνοπούλου Σ. (2009), 'Βασική Βιοχημεία '(2η έκδοση), Αθήνα: Εκδόσεις Κ. Δημόπουλος- Σ. Αντωνοπούλου (Αυτοέκδοση)
- Κυριτσάκης Α. (2007), 'Ελαιόλαδο'(4η έκδοση), Θεσσαλονίκη: Copy City Digital.
- Μπλούκας , Ι. (2004), 'Επεξεργασία και συντήρηση Τροφίμων' , Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Σφλώμος, Κ. (2011), 'Χημεία Τροφίμων', Τόμος 1ος (2η έκδοση), Αθήνα: Εκδόσεις ΝΟΤΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B., Johnson A. , Lewis J. , Raff M. , Roberts K. , Walter P., 'Molecular Biology of the Cell' , Garland science 4th Chapter 10, 2002.
- Andersen M.L και Skibsted L.H (2002) : EUR J. 'Lipid Sci Technol ' .104, 65-68
- Antolovich M, Prenzler P.D, Patsalides E., Mcdonald S & Robards K. (2002) 'Analyst ' 127, 183-198
- Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J (1999) 'Evaluation of antioxidative activity of vegetables extracts in Linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers'. J.Sci. Food Agric 79, 2010-2016.
- Atkinson, R.A., Janet, 'Environmental Health Perspectives Supplements.' 1994, 102,117-126.
- Babior B.M, 'Blood' (1999) , 93, 1464-1476.
- Bozzuto G, Molinari A., (2015). 'Liposomes as nanomedical devices. International Journal of Nanomedicine', Issue 10, pp 975-99.
- Carlsen C.u, Andersen M.L and Skibsted L.H(2001) : 'EUR food Res Technol'., 213, 170-173
- Calligaris S, Nicoli MC (2006) 'Effect of selected ions from lyotropic series on lipid oxidation'. Food Chem.94, 130-134.
- Carocho M. & Ferreira I. (2012), ' A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, Elsevier, Food and chemical toxicology', 51, 15-25.
- Chaize B, Colletier J.P, Winterhatler M., Fournier D., 'Encapsulation of Enzymes Liposomes: High Encapsulation Efficiency'.
- Chapman Allison C.J, A.C., Gregoriadis G.,(1974). 'Liposome as immunological'. Adjuvant.Nature 252-256.
- Chatterjee SN, Agarwal S (1988) 'Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation'. Free radic. Biol. Med.4, 51-72
- Dai J. & Mumper R. (2010), 'Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties', Molecules, 15, 7313-7352.

- Deamer D. and Uster P., 'Liposome preparation methods and monitoring liposome fusion. In: Baserga R., Crose, C and Royeza G. Introduction of Macromolecules into viable Mammalian cells', Alan R. Liss, New York, 1980 , p.p 205-220
- Decker EA, Mc Clements J(2001). 'Transition Metals and hydroperoxide interactions Q an important determinant in the oxidative stability of lipid dispersions'. In form 12, 251-255.
- De la Presa-Owens S., Lopez- Sabater M.C and Rivero-Urgell M.(1995) : J. Agric. 'Food Chem ', 43 , 2879-2882
- Diehl B.W.L (1998) : ' Lipid Analysis in Oils and Fats.' In R.J Hamilton, ed. Blackie Academic & Professional, London pp 87-135
- Dobarganes MC, Velasco J, (2002) 'Analysis of lipid hydroperoxides'. Eur . J. Lipid Sci Technol. 104, 420-428
- Doleschall F., Kemeny Z., Recseg K and Kovari K (2002) : Eur. J. Lipid Sci. Technol., 104, 14-18
- Dong J. , Ma K., van de Voort F.R and Ismail A.A (1997) : J.AOAC Int., 80,345-352
- Dwivedi, Sahu , Prasad, 2014.' Role of liposome in nove ldrug delivery. Journal of Drug Delivery and Therapeutics', 4(2), pp 116-119.
- Eymard S. and Genot C.(2003) : 'Eur. J. Lipid.SCI.Technol'.,105,497-501. Fennema, O.R., Parkin, K.L & Srinivasan D, 2007b.
- Fennemas 'Food Chemistry', Madison, WINCONSIN, USA, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Fortalezas S., Tavares L., Pimpão R., Tyagi M., Pontes V., Alves P. et.al (2010), 'Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit' (Arbutus unedo), Nutrients, 2, 214-229.
- Frankel EN(2005) 'Lipid Oxidation '.Oily Press, Dundee (Scotland)
- Garnier- Suillerot A., Tosi L., Paniago E (1984) 'Kinetic and Mechanism of vesicle lipoperoxide decomposition by fe'.(II). Biochim. Biophys. Acta 794, 307-312

- Genot C, Kansci G, Laroche M (1994) 'Measurement of phospholipid oxidation in model membranes by determination of oxygen consumption with a semi-automatic polarographic method'. *Sciences des aliments* 14:673-682
- Gomezzens A., Fernandezromero J. 'Analytical methods for the control of liposomal delivery systems'. *Trac Trends in Analytical Chemistry*. 25(2), 2006, 167.
- Gordon M (2001 a,b) : 'Antioxidants in Food : Practical Applications' in Pokorny. J., N.Yanishlieva and M.Gordon, eds., Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, England ,pp 7-21, 71-74'
- Guillen M.D and N. Cabo N. (2002): ' *Food Chem* ' , 77, 503-510
- Harbome, J. B. (1997), 'Plant Phenolics in Methods in Plant Biochemistry', Academy Press, pp. 197-199, London
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002), 'Flavonoid Antioxidants:Chemistry Metabolism and Structure-activity Relationships', *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 13, pp. 572-584
- Hunter RJ (1993) *Introduction to Modern Colloid Chemistry*. Oxford University Press, Oxford (UK) 199
- Janero DR (1990) 'Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury'. *Free rad. biol. med.* 9:5 15-540
- Jiang Z.Y., Woollard A.C.S and Wolff. Sp (1991) : 'Lipids', 26,853-856 Knight J.A , in *Free Radical, antioxidants, aging and disease*, AACC Press, Washington, 1999.
- Khanbabaee K. & Ree T. (2001), 'Tannins: classification and definition', *The Royal Society of Chemistry*, 18, 641-649.
- Knight J.A , in : 'Free Radical, antioxidants, aging and disease', AACC Press, Washington, 1999.
- Kujundzic S (20012) 'Biochemical Investigation of plant Species from the Apiaceae Family ' (In Serbian).Master thesis. Novi Sad: PMF.48
- Languerre M., Lecomte J, Villeneuve P (2007) 'Evaluation of the Ability of Antioxidants to Counteract Lipid Oxidation : Existing Methods, new Trends and Challenges'. *Prog.Lipid res* 46: 244-282.

- Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2010), 'The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, Elsevier, Food Chemistry' , 125, 288-306.
- Lindsey , M.E.T.,Matthew,A., 'Environmental Science and Technology'. 2000a, 34, 444-449.
- List G.R, Evans C.D , Kwolek W.F., Warner K. and Boundy B.k (1974) : J.Amer. 'Oil Chem'. , SOC. 52, 17-21
- List, G.R , Wang T. & Shukla , V.KS. 2005. 'Storage, Handling and Transport of Oils and Fats'. Bailey's Industrial Oil and Fat Product.
- Løvaas E (2006) 'Marine phospholipids (MPL): resources, applications and markets. In: Seafood research from fish to dish: quality, safety and processing of wild and farmed fish'. Ed. Luten, J. B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Sæbø, A., Oehlenschläger, J., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands 2006
- Mancuso Jr, Mc Clements DJ, Decker EA (2000) , 'Iron-accelerated cumene hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurine emulsions'. J. Agric Food. Chem 46. 5072-5077
- Medina I., Sacchi R., Giudiciami I. and Aubourg S.(1998): 'J.Amer.Oil Chem'.SOC, 75, 147-154
- Mei L, McClements J, Decker EA (1998b) 'Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation'. J. Agric. Food Chem. 46, 5072-5077
- Melton S.L (1983) : 'Food Technol.' 37 105-111
- Mc Clements DJ, Decker EA (2000) 'Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems'. J Food Sci.65 (8), 1270-1282
- Mc Namara, K.P.R., 'Z.Analytical Chemistry' 1998, 70, 4853-4859.
- Mozafari M.R., 'Liposomes : An overview of manufacturing techniques', Cellular and Molecular Biology letters 10, 711-719, 200
- Nawar WW (1996) 'Lipids. In: Food chemistry'. Ed. Fennema OR., Marcel Dekker, New York (USA) 225-319
- Nielsen Ns, Timm-Heinrich M. Jacobsen C(2003) 'Comparison of wet – chemical methods for determination of lipid hydroxides'. J Food Lipids. 10, 35-50

- Osinchak Je, Hultin HO, Zajicek OT, Kelleher SD, Huang Ch (1992) 'Effect of NaCl Catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle'. *Free Radical Biol Med* 12, 35-41
- Petty H.R , 'Molecular biology of membranes: structure and function', Plehum Press 18-19, 1993.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) 'Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids'. *Free radic. Biol. Med.* 20: 933-956.(24)
- Riuz A and Ayora M.J (2001) : Canada, and B. Iendl, 'Analyst' 126, 242-246.
- Safer AM, Al-Nughamish AJ (1999) 'Hepatotoxicity Induced by the Antioxidant Food Additive Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats : An Electron Microscopical Study' . *Histol. Histopathol.* 197: 391-406. (17)
- Satue, M.T., Huang, S-W. and Frankel, E.N 1995. 'Effect of Natural Antioxidants in virgin Olive Oil an Oxidative stability of Refined, Bleached and Deodorized Olive oil', *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1131
- Schaich KM (1992) 'Metals and lipid Oxidation'. *Contemporary issues. Lipids.* 27(3) ,209-218
- Sedman J., Van de Voort F.R and Ismail A.A (1997) : 'New Techniques and Applications in Lipid Analysis' , in R.E Mc Donald and M.M Mossoba, eds, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997, pp 283-324
- Shahidi F. and Zhong Y. (2005) : Memorial University of Newfoundland, St. John's, New Foundland,Canada: 'Lipid Oxidation: Measurement Methods'. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set.* Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright 2005, John Wiley & Sons Inc.
- Shahidi F. and Wanasundara U.N (2002) : 'Food Lipids : Chemistry, Nutrition and Biotechnology' in C.C Akoh and D.B. Min , eds, Marcel Dekker Inc, New York, pp 465-487
- Shi, J.; Nawaz, H.; Pohorly, J.; Mittal, G.; Kakuda, Y.; Jiang, Y. 'Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology'. *Food Rev. Int.* (2005), 21, 139-166
- Shimada K, Okada H, Matsuo K, Yoshioka S (1996). 'Involvement of chelating action and viscosity in the antioxidative effect of xanthan in an oil/water ' . *Emulsion. Biochem* 60(1), 125-127

- Singer S.J , Nicolson G.L. , ‘The fluid Mosaic Model of the structure pf Cell Membranes’, Science, New Series, 175, 720-731, 1972
- Sipai Atal Bhai.M, Vandana, Yadv, Mamatha. Y, Prasanth V.V, ‘Liposomes : an otherview, Journal of Pharmaceutical and Scientific’. Innovation 1, 13-21, 2012
- Stauffer C (1996) : ‘Fats and Oils’ , Eagan Press, St Paul, Minnessota, PP 15-27
- Tan C.P and Che Man Y.B (1999): ‘Food Chem’. 67, 177-184
- Van de Merwe G.H., dv Plessis L.M and Taylor K.RN (2003) : J.Sci. Food agric., 84, 52-58
- Velasco J., Andersen M.L and Skibsted L.H (2004) : ‘Food Chem’., 67, 177-184
- Wanasundara U.N.,Shahidi F and Jablonski C.R (1995b) : ‘J. Food Lipids’ 2, 73-86
- White P.J (1995) : ‘Methods to Access Quality and Stability of oils and Fat containing Foods’ in K.Warner and N.A.M Eskin .eds, AOCS Press,Champaign, Illinois, 1995 pp 159-178
- Wold J.P and Mielnik M(2000) : J.Food Sci., 65, 87-95
- Wolf S.P (1994) : ‘Methods Enzymol. ’ 233, 182-189
- Yamamoto Y, Niki E (1988) ‘Interaction of α -tocopherol with iron: antioxidant and prooxidant effects of α -tocopherol in the oxidation of lipids in aqueous dispersions in the presence of iron’. Biochim. Biophys. Acta. 958, 19-23
- Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Shimasaki H (1984) ‘Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and water dispersion’. Biochim. Biophys. Acta. 795, 332-340
- Yildiz G. ,Wehling R.L and Cuppett S.L (2003) : J.Amer,Oil chem.SOC. 80, 103-107 Yoshida Y, Niki E (1992) ‘Oxidation of methyl linoleate in aqueous dispersions induced by copper and iron’. Arch Biochem Biophys 295: 107-114

