

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ



<https://www.mcgill.ca/oss/article/controversial-science-food-health-supplements-toxicity/antioxidants-disappoint-again>

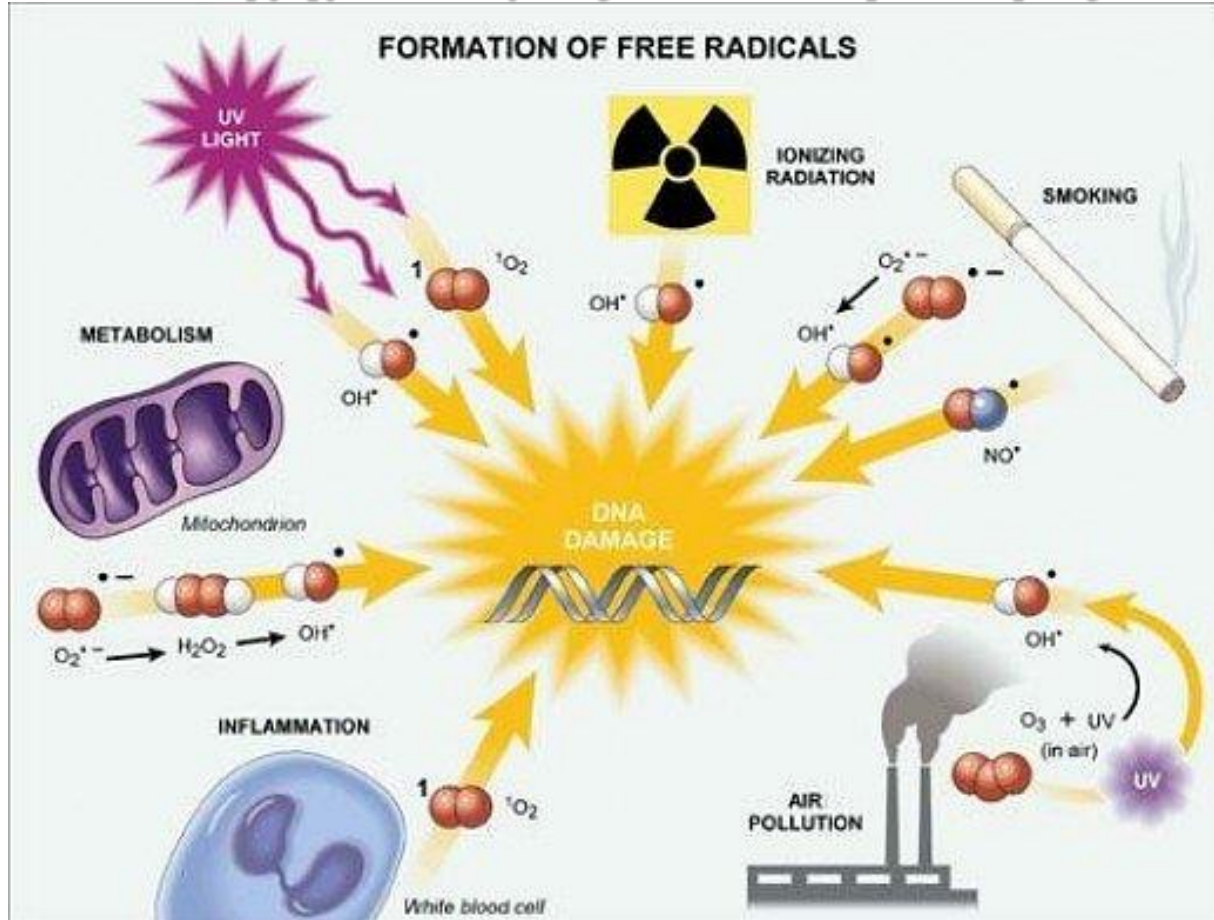
Ελεύθερες ρίζες

- Άτομα ή μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα.
- Δημιουργούνται στα κύτταρα διαμέσου αρκετών φυσικών και βιοχημικών διαδικασιών.

Οι ελεύθερες ρίζες

- αποτελούν ενδιάμεσες μορφές, αλλά και προϊόντα ενζυμικών αντιδράσεων,
- συμμετέχουν στην αντίδραση του οργανισμού σε περιπτώσεις εισόδου ξένων μικροοργανισμών,
- εμπλέκονται στον μεταβολισμό των εικοσανοειδών και, συγκεκριμένα, στα σημεία δράσης των ενζύμων “κυκλοοξυγονάση” και “λιποοξυγονάση”, καθώς και στην αντίδραση σχηματισμού των δεοξυριβονουκλεοτιδίων.
- παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η μεταγωγή του σήματος, και κατ' επέκταση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων.
- σχηματίζονται και μετά από έκθεση των οργανισμών σε υπεριώδεις και ιονίζουσες ακτινοβολίες, καθώς και σε υπερήχους

Σχηματισμός Ελεύθερων ριζών



Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – “Reactive Oxygen Species” (ROS)

Το οξυγόνο του αέρα που αναπνέουμε είναι ένα σχετικά μη δραστικό μόριο.

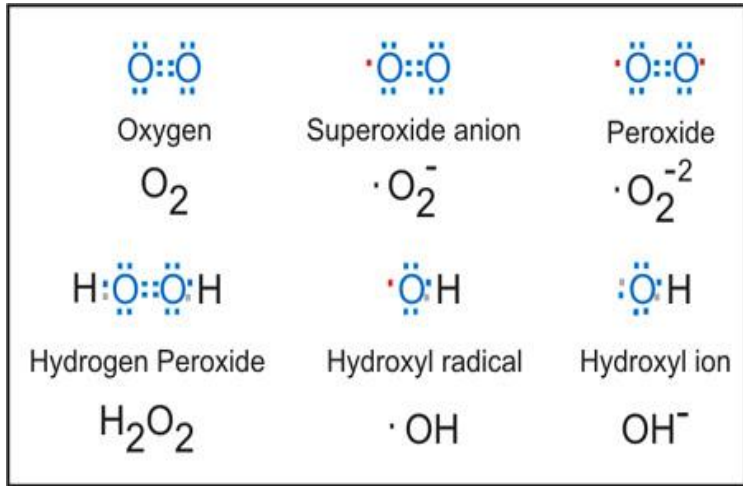
Όταν όμως εκτίθεται σε χημικές αντιδράσεις υψηλής ενέργειας ή μεταφοράς ηλεκτρονίων, μπορεί να μετατραπεί σε διάφορες πολύ δραστικές χημικές μορφές που ονομάζονται «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου».

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου είναι **τοξικές** για τους ζώντες οργανισμούς γιατί οξειδώνουν λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA, υδατάνθρακες και άλλα βιομόρια προκαλώντας προβλήματα στις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, των μεμβρανών και της αναπαραγωγής.

Τελικά, τα τοξικά επίπεδα ROS προκαλούν αλυσιδωτή αντίδραση κυτταρικής οξείδωσης, οδηγώντας σε ασθένειες και θνητότητα.

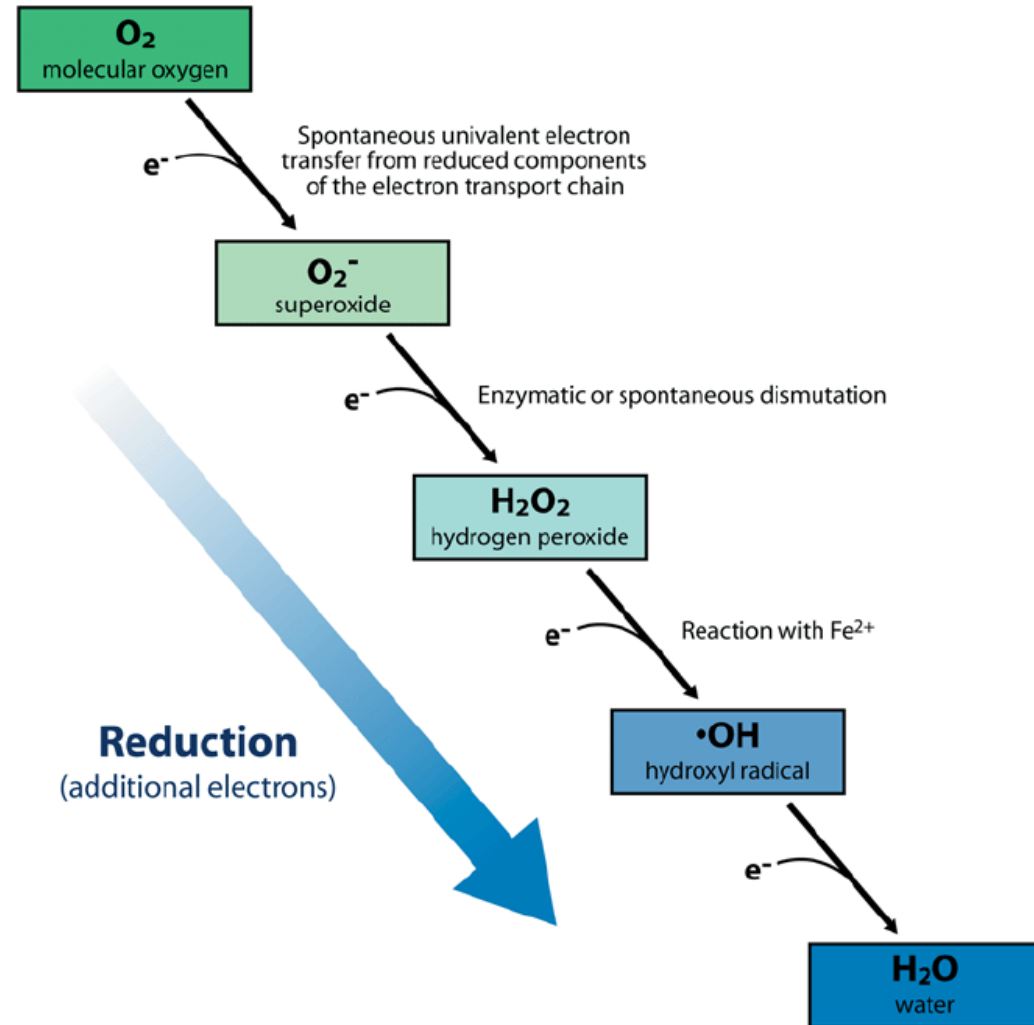
Οι ROS είναι αναπόφευκτα παραπροϊόντα των βιοχημικών μονοπατιών, όπως η γλυκόλυση και η φωτοσύνθεση, τα οποία έχουν κεντρικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας και τις αποθηκευτικές στρατηγικές των αερόβιων μικροβίων, ζώων και φυτών.

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – “Reactive Oxygen Species” (ROS)



Παραγωγή διαφορετικών ROS μέσω μεταφοράς ενέργειας ή διαδοχική αναγωγή του οξυγόνου.

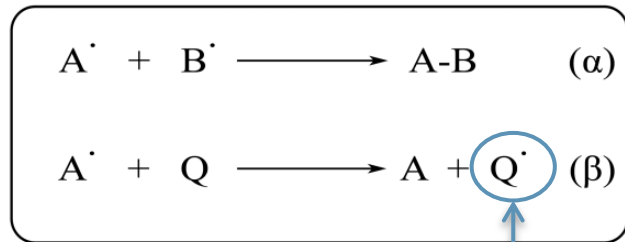
Η παραγωγή γίνεται στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισωμάτια, το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (CYP450), την κυτταρική μεμβράνη και τα φαγοκύτταρα.



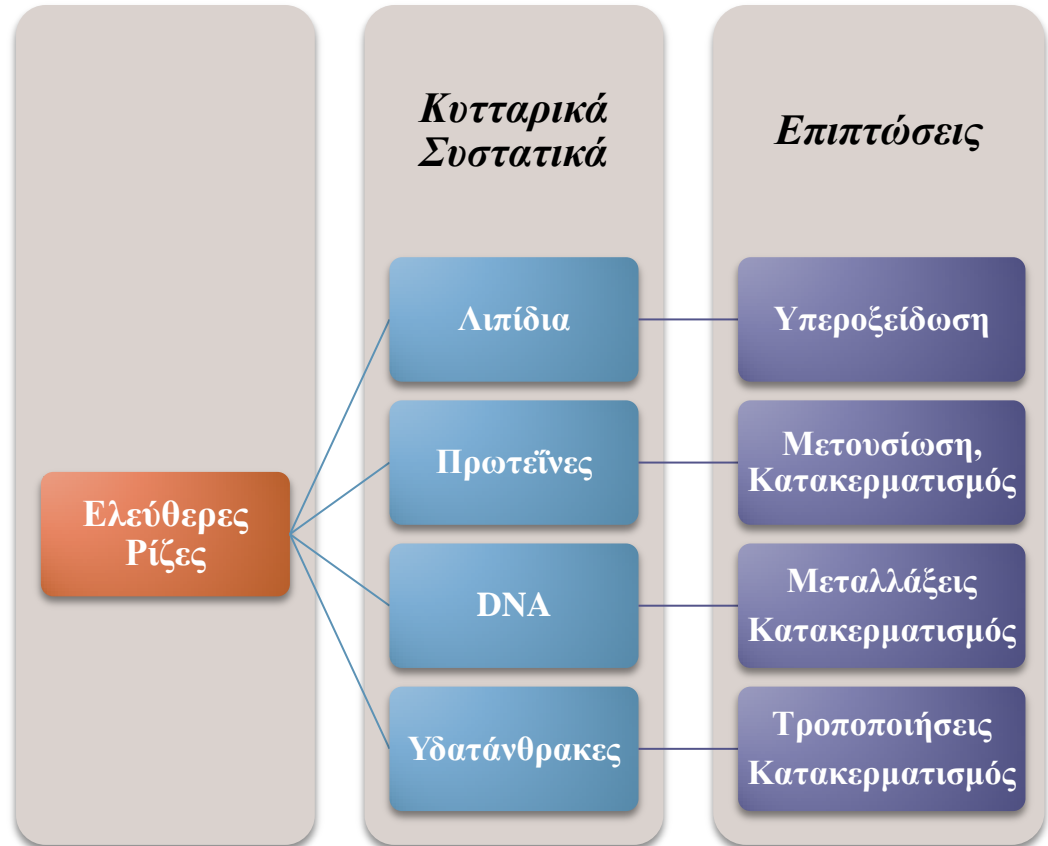
Επιπτώσεις στα κύτταρα και στα βιομόρια από τη δημιουργία ελευθέρων ριζών

- Οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών είναι αλυσιδωτές.
- Η μη αναστολή τους μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη καταστροφή του βιολογικού υλικού.

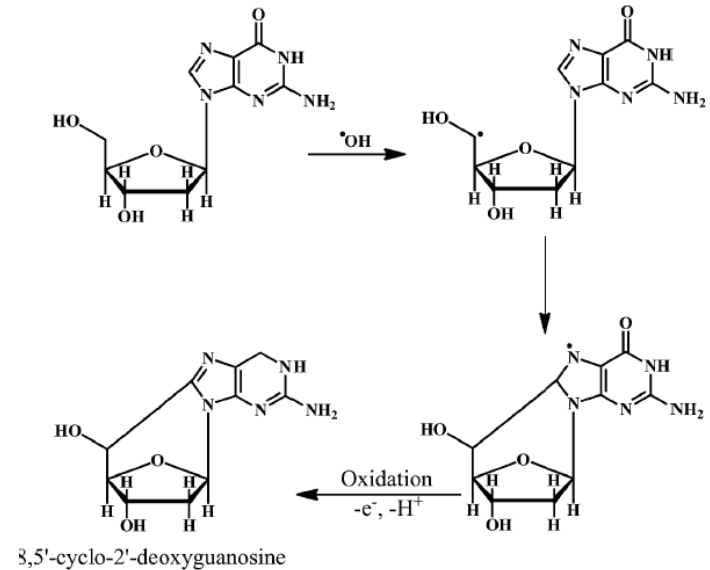
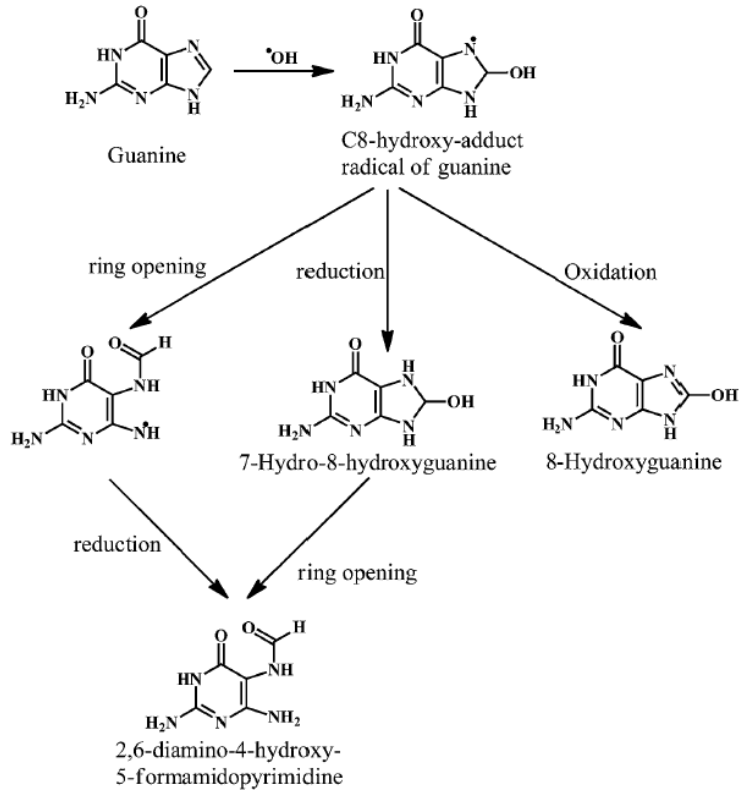
Αναστολή αλυσιδωτών αντιδράσεων



Μη δραστική ελεύθερη ρίζα
(πχ Βιταμίνη C, Βιταμίνη E)



Επιπτώσεις στα κύτταρα και στα βιομόρια από τη δημιουργία ελευθέρων ριζών



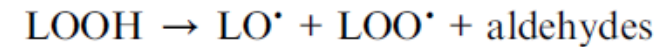
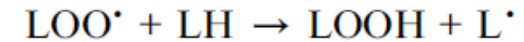
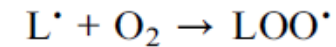
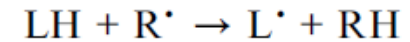
Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου με τα σάκχαρα του DNA

Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου με γουανίνη

Επιπτώσεις στα κύτταρα και στα βιομόρια από τη δημιουργία ελευθέρων ριζών

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την υπερπαραγωγή ROS σχετίζεται με χρόνιες παθήσεις όπως ο καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις και οστεοπόρωση.

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν όλες τις κύριες κατηγορίες βιομορίων και κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα [polyunsaturated fatty acids (PUFA)] των κυτταρικών μεμβρανών. Η οξειδωτική καταστροφή των PUFA, γνωστή ως λιπιδική υπεροξειδωση, έχει ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις γιατί είναι αλυσιδωτή αντίδραση που δύσκολα σταματά.



Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης

Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικά

- Είναι ενδογενή ή εξωγενή μόρια που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και χαρακτηρίζονται ως **αναγωγικές ουσίες**.
- Είναι ικανά να μειώσουν τις αιτίες ή τις επιδράσεις του **οξειδωτικού στρες** το οποίο μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, ασθένειες, λοίμωξη, φλεγμονή, γήρανση (παραγωγή ROS)
- Το σώμα παράγει μερικά **ενδογενή αντιοξειδωτικά**, αλλά τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τη διατροφή παρέχουν πρόσθετη γραμμή άμυνας
- Φλαβονοειδή, πολυφαινολικές ενώσεις, Βιταμίνες C & E, και καροτενοειδή είναι τα πιο κοινά αντιοξειδωτικά της διατροφής μας

Αμυντικό αντιοξειδωτικό σύστημα

- Το σύνολο των μηχανισμών που δρουν προασπιστικά επί των βιομορίων έναντι της βλαπτικής επίδρασης των ελεύθερων ριζών.
- Η αντιοξειδωτική άμυνα διακρίνεται σε : **Πρωτογενή και δευτερογενή**.

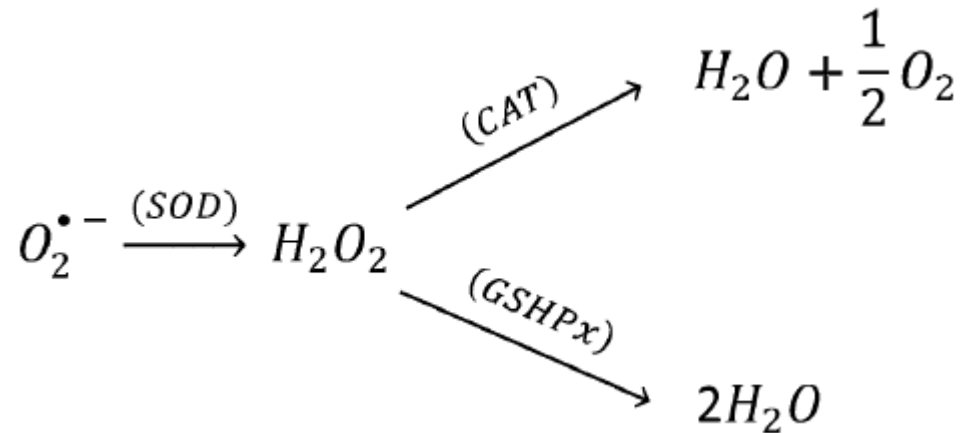
Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Το ανθρώπινο σώμα προστατεύεται από τις ROS χρησιμοποιώντας ενζυματικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι σημαντικά για την πρόληψη της λιπιδικής υπεροξειδωσης και τη διατήρηση της δομής και λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης.

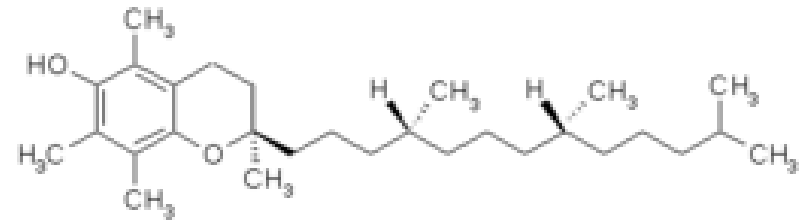
Παραδείγματα:

- Υπεροξειδική δισμουτάση [superoxide dismutase (SOD)]
- Καταλάση [catalase (CAT)],
- Δισμουτάση της γλουταθειόνης [glutathione peroxidase (GSHPx)]

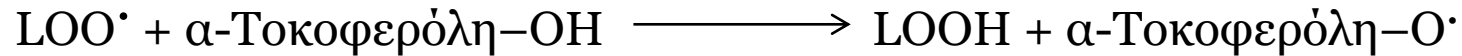


Φυσικά Αντιοξειδωτικά-Βιταμίνες

Η **βιταμίνη E (τοκοφερόλη)** είναι ένα πολύ αποτελεσματικό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που λειτουργεί ως «διακόπτης» της αλυσιδωτής αντίδρασης της λιπιδικής υπεροξειδωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και διάφορων λιπιδικών μορίων όπως η λιποπρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους (LDL).



Η Βιταμίνη E αντιδρά με τις ρίζες υπεροξειδίου και σταματά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσης:

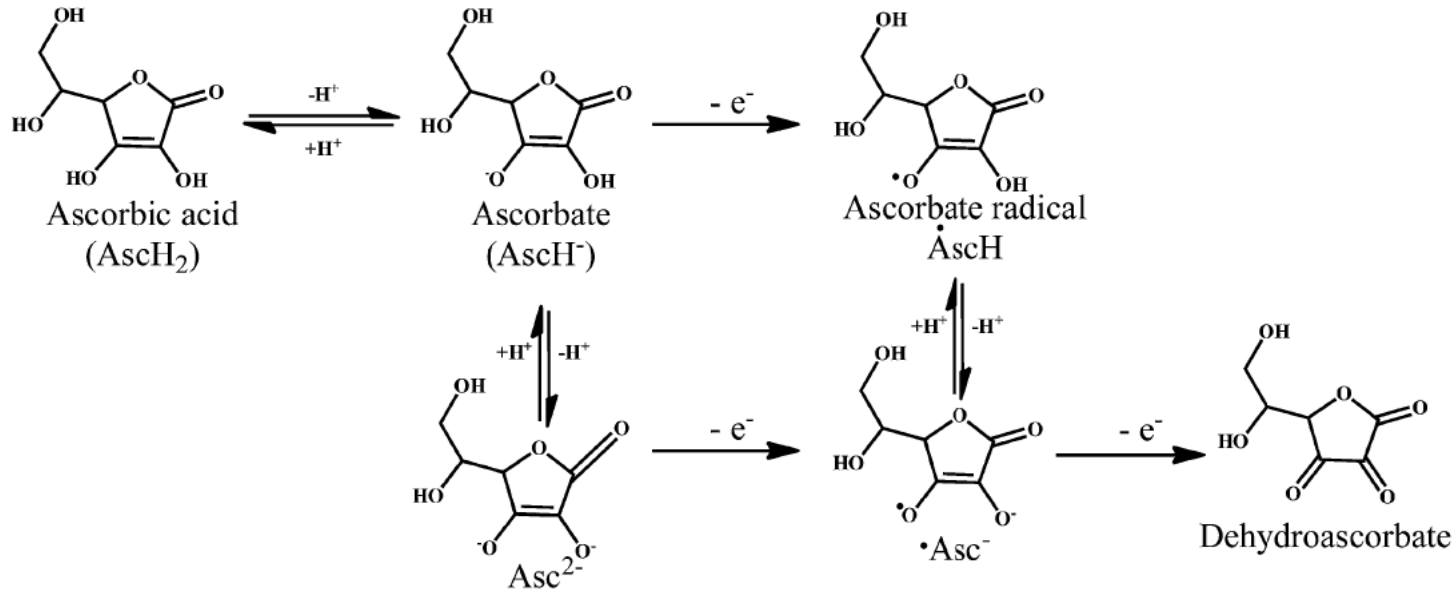


Η ρίζα που προκύπτει είναι σχετικά **σταθερή** και, υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν είναι αρκετά δραστική για να συνεχίσει την λιπιδική υπεροξειδωση.

Αυτό είναι ένα απαραίτητο χαρακτηριστικό για ένα καλό αντιοξειδωτικό!

Φυσικά Αντιοξειδωτικά-Βιταμίνες

Η **βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)** είναι ένας υδατοδιαλυτός σαρωτής ελευθέρων ριζών και αναγεννά τη βιταμίνη E στις κυτταρικές μεμβράνες.

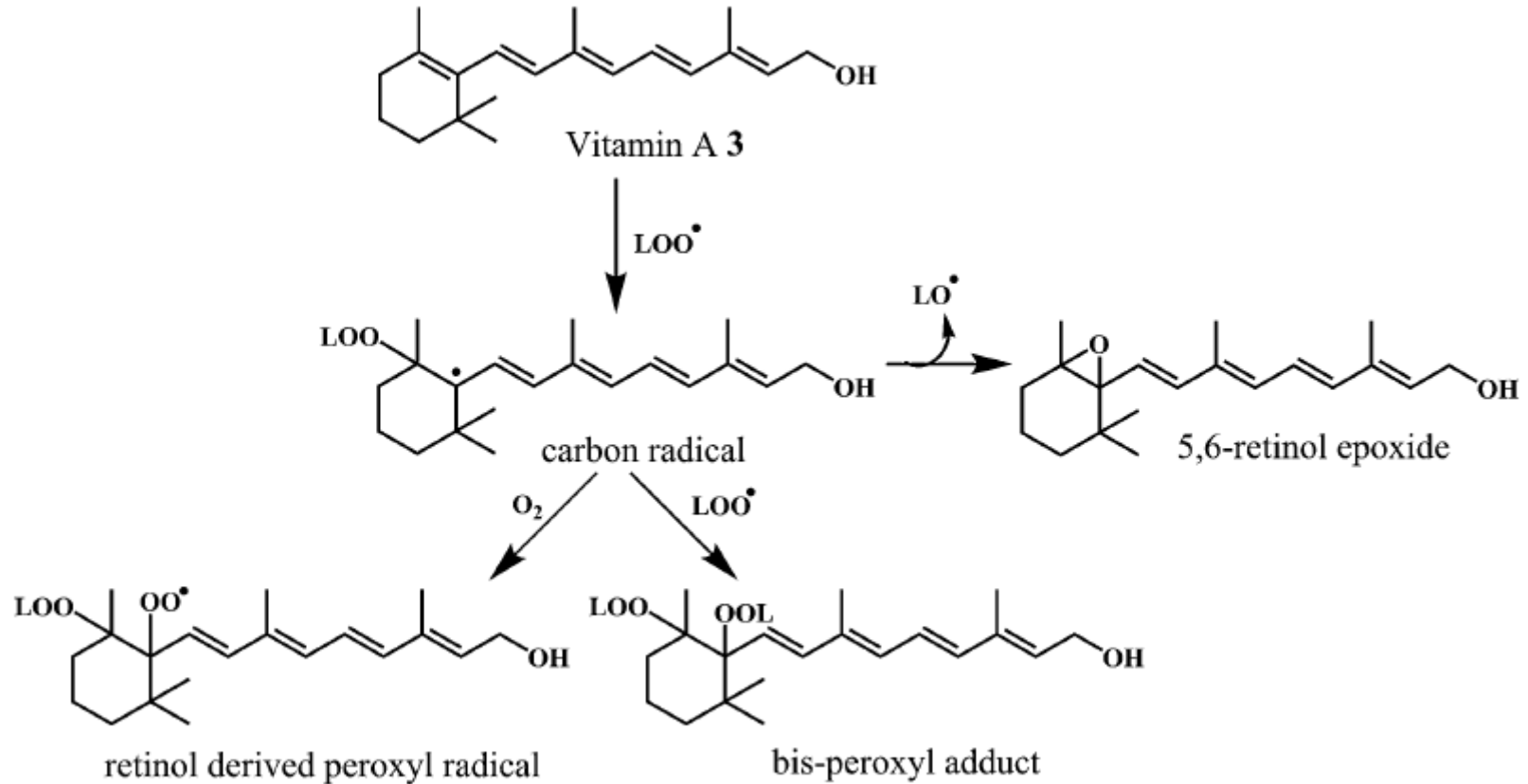


Η Βιταμίνη C μετατρέπεται στην ασκορβική ρίζα δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο στη λιπιδική ρίζα και τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Οι ρίζες ασκορβικού αντιδρούν ταχύτατα και παράγουν ένα μόριο ασκορβικού και ένα μόριο δεϋδροασκορβικού, το οποίο δεν έχει αντιοξειδωτική δράση και μετατρέπεται σε ασκορβικό με την προσθήκη δύο ηλεκτρονίων υπό την επίδραση οξειδοαναγωγάσης.

Φυσικά Αντιοξειδωτικά-Βιταμίνες

Η **βιταμίνη A** συνεισφέρει σημαντικά ως αντιοξειδωτικό στην προστασία της ανθρώπινης LDL από την οξείδωση που επάγεται από ιόντα χαλκού.



Πηγές Φυσικῶν Αντιοξειδωτικῶν



Κατεχίνες
Τανίνες



Ελλαγικό Οξύ



Φαινολικά οξέα
Ανθοκυανίνες
Κερκετίνη
Ρεσβερατρόλη



Φλαβονοειδή
Ταννίνες



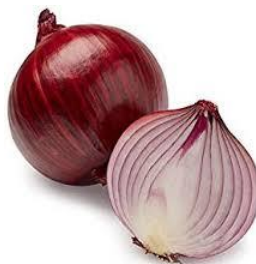
Πολυφαινόλες
Ταννίνες
Γαλλικό Οξύ



Φλαβονοειδή
Ταννίνες
Ρεσβερατρόλη



Vitamin C



Κερκετίνη



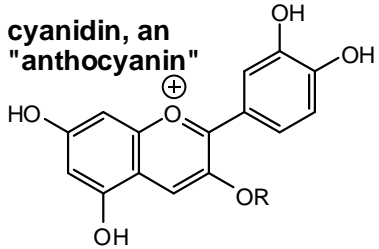
Κατεχίνες



Καροτενοειδή
Λυκοπένιο

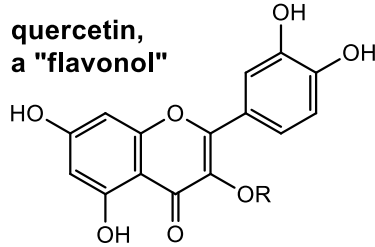
Πολυφαινολικά Αντιοξειδωτικά που Βρίσκονται σε Φρούτα, Λαχανικά & Όσπρια

cyanidin, an "anthocyanin"



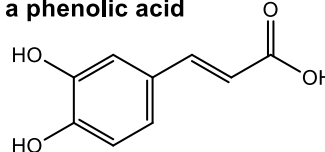
Βρίσκεται σε blueberries, blackberries & cranberries

quercetin, a "flavonol"



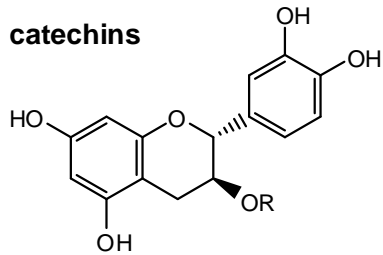
Βρίσκεται σε μούρα, κρεμμύδια & εσπεριδοειδή

caffeic acid, a phenolic acid



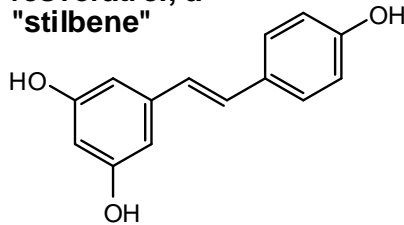
Βρίσκεται σε βότανα, καφέ και φρούτα

catechins



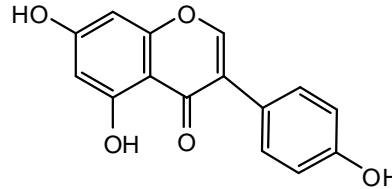
Βρίσκεται στη σοκολάτα και το τσάι

resveratrol, a "stilbene"



Βρίσκεται στο κόκκινο κρασί και τα φιστίκια

genistein, an "isoflavone"



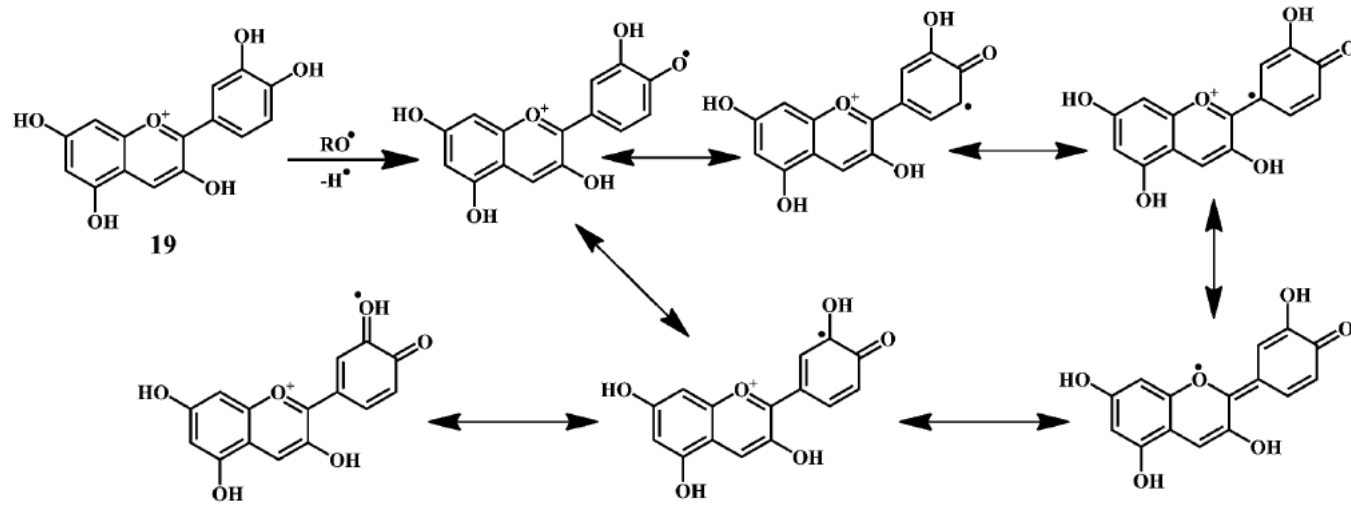
Βρίσκεται σε προϊόντα σόγιας & όσπρια

Τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά λόγω των δομικών τους χαρακτηριστικών :

- Συζυγία
- ο-διυδροξυ-υποκατεστημένος δακτύλιος B
- α, β-ακόρεστη κετόνη
- 3-OH υποκατάσταση σε C-δακτύλιο

Επίσης, διαμορφώνουν κυτταρικές βιοχημικές αντιδράσεις και την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες

Πολυφαινολικά Αντιοξειδωτικά: μηχανισμός δράσης

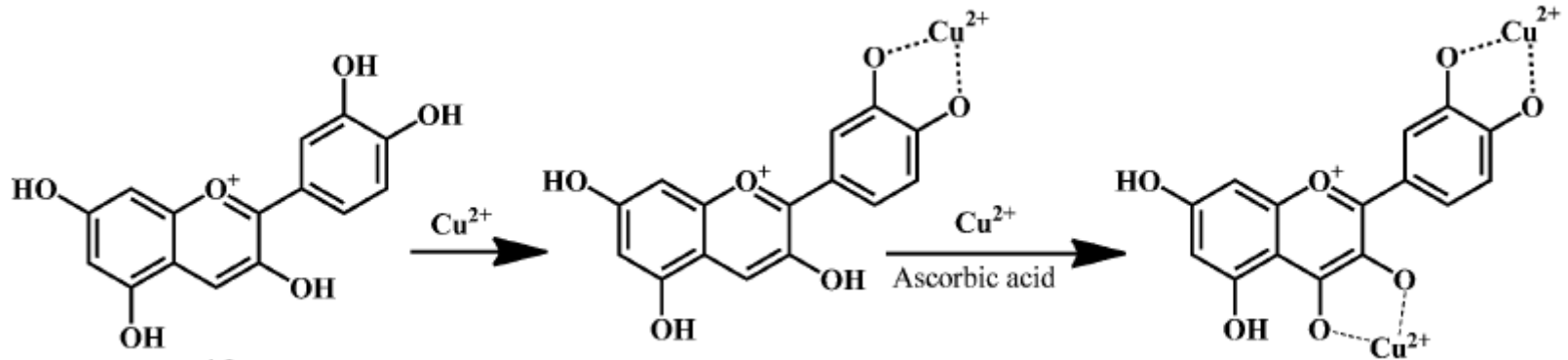
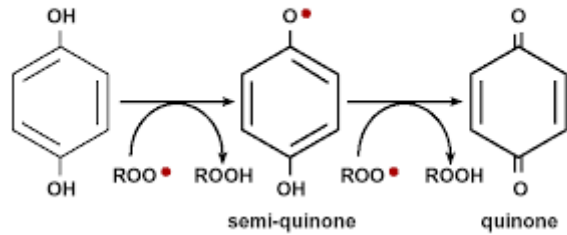


Οι ανθοκυανιδίνες (π.χ. η κυανιδίνη) δίνουν ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο (από μια ομάδα φαινολικού OH) σε μια ελεύθερη ρίζα. Το ηλεκτρόνιο αυτό σταθεροποιεί και απενεργοποιεί την ελεύθερη ρίζα.

Η αρυλοξυ-ρίζα που σχηματίζεται είναι σταθερότερη, λόγω δομών συντονισμού, από την ελεύθερη ρίζα με την οποία αντέδρασε. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι ο τερματισμός των αλυσιδωτών αντιδράσεων παραγωγής ελευθέρων ριζών.

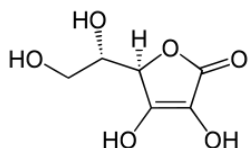
Πολυφαινολικά Αντιοξειδωτικά: μηχανισμός δράσης

Phenolic antioxidant mechanism



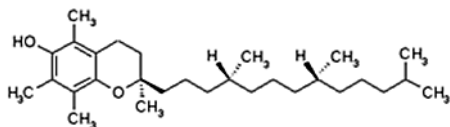
Αντιοξειδωτικά ως Πρόσθετα Τροφίμων

Antioxidant E-number Typical foods



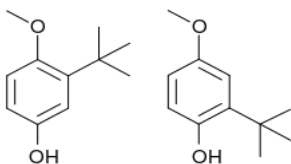
Ascorbic acid
(vitamin C) E300

Beers, cut fruits, jams, dried potato. Helps to prevent cut and pulped foods from going brown by preventing oxidation reactions that cause the discolouration. Can be added to foods, such as potato, to replace vitamin C lost in processing.



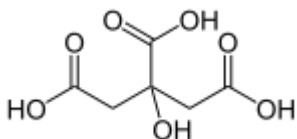
Tocopherols
(Vitamin E) E306

Oils, meat pies. Obtained from soya beans and maize. Reduces oxidation of fatty acids and some vitamins.



Butylated
hydroxyanisole
(BHA) E320

Oils, margarine, cheese, crisps. Helps to prevent the reactions that break down fats and cause the food to go rancid .



Citric acid E330

Jam, tinned fruit, biscuits, alcoholic drinks, cheese, dried soup. Naturally-occurring in citrus fruits like lemons. Helps to increase the anti-oxidant effects of other substances. Helps to reduce the reactions that can discolour fruits. May also be used to regulate pH in jams and jellies.

Αντιοξειδωτικά

Κριτήρια για την βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση:

1. Εξειδίκευση στη σάρωση των ελευθέρων ριζών
2. Επίτευξη ικανοποιητικής συγκέντρωσης στον επιθυμητό τόπο δράσης
3. Δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων με μέταλλα Fe^{+2} , Cu^{+2} , τα οποία ευνοούν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών
4. Συνεργιστική δράση με άλλα αντιοξειδωτικά
5. Σταθερότητα της ρίζας που παράγεται από την δράση του αντιοξειδωτικού παράγοντα
6. Ικανοποιητική απορρόφηση, βιοδιαθεσιμότητα και απουσία τοξικότητας.

Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης (In vitro)

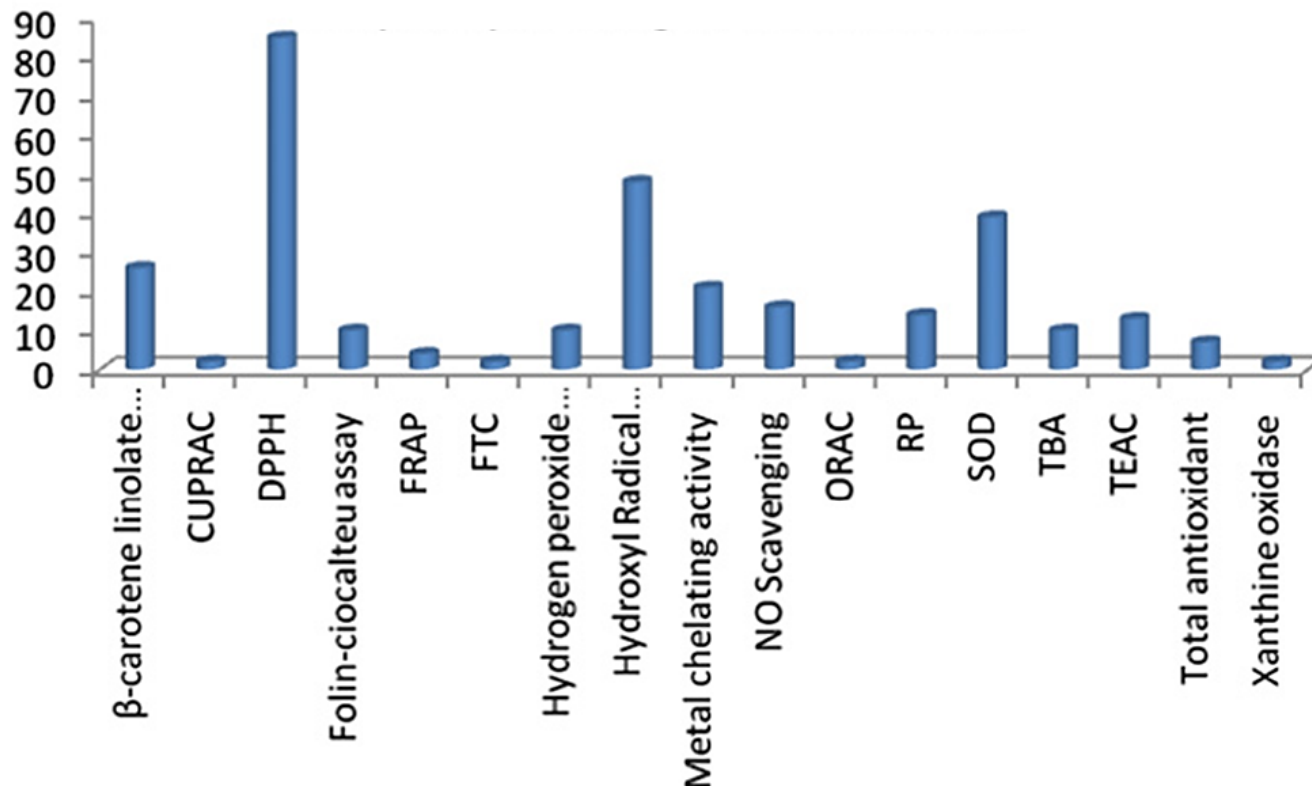
Μια σειρά από φασματοφωτομετρικές μεθόδους χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάποιες εξ αυτών:

- Μέθοδος DPPH
- Μέθοδος ABTS
- Μέθοδος FRAP
- Μέθοδος ORAC
- Μέθοδος TRAP
- Μέθοδος TBARS

Οι μέθοδοι **DPPH** και **ABTS** είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι → σταθερές ρίζες, είναι ευαίσθητες, γρήγορες, απλές & με χαμηλό κόστος

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

Συχνότητα Χρήσης των In Vitro Μεθόδων



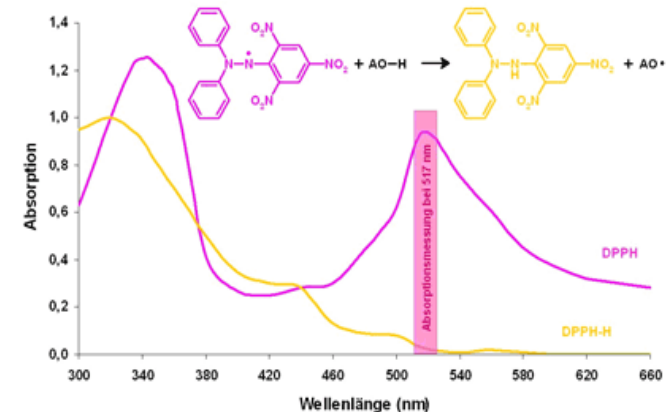
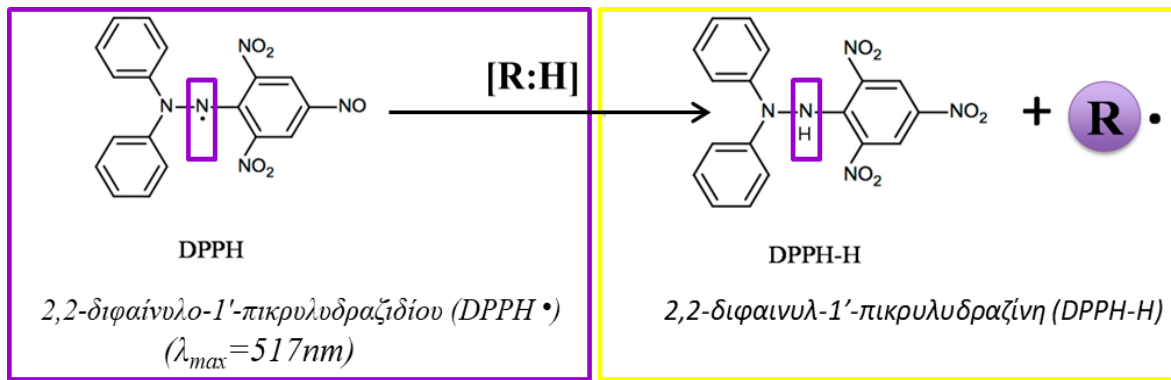
Μέθοδος DPPH

Η Μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Blois το 1958

Η σταθερή ρίζα DPPH• αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται):

- είτε μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, **SET**)
- είτε μέσω μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, **HAT**)

Με φασματοφωτομετρία (απορρόφηση στα **517 nm**) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας DPPH• μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



Χαρακτηριστικά Μεθόδου

Αξιόπιστη – Εύκολη - Οικονομική – Ταχεία – Εφαρμογή μόνο σε οργανικούς διαλύτες

Μέθοδος DPPH

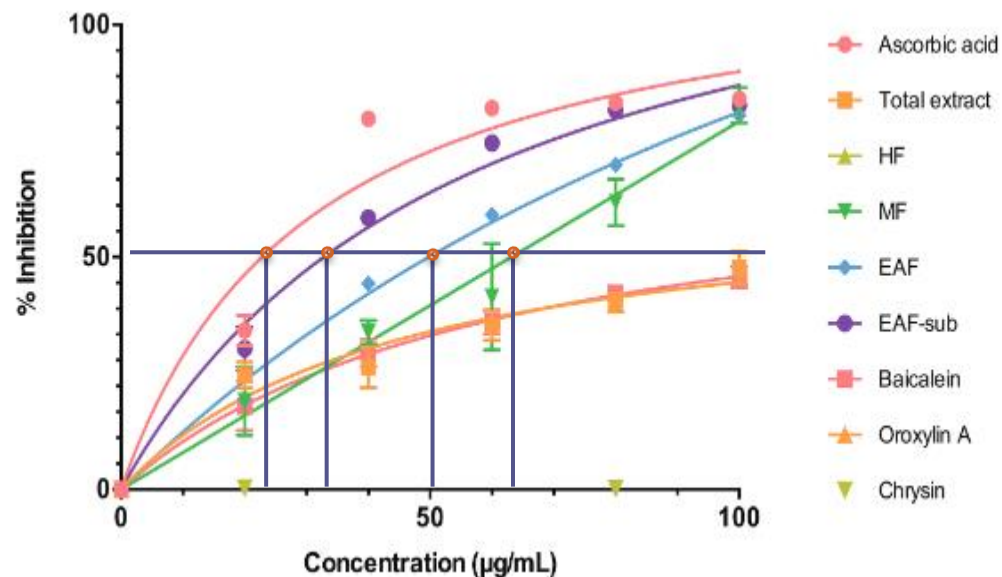
Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας

DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{RSC}\% = (\text{A}_{\text{control}} - \text{A}_{\text{sample}}) / \text{A}_{\text{control}} \times 100$$

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται με τον δείκτη **IC50**, δηλαδή τη συγκέντρωση που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%.

Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το % ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας



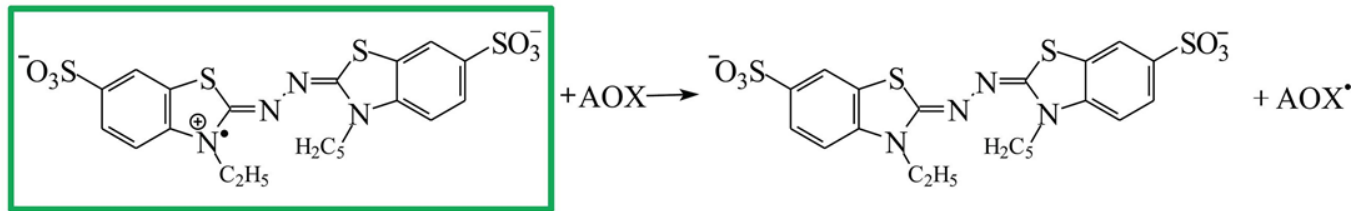
<http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000117178>

Μέθοδος ABTS

Το ABTS (2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazolin)- 6-sulfonat acid) οξειδώνεται με την προσθήκη ενός χημικού οξειδωτικού παράγοντα (π.χ. $K_2S_2O_8$) και δημιουργείται η δραστική ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Με φασματοφωτομετρία (μέτρηση της απορρόφησης στα **734 nm**) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.

Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ ανάγεται και από μπλε/πράσινο χρώμα, αποχρωματίζεται.



ABTS radical (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid)

Blue - Green

$\lambda_{max}=734 \text{ nm}$

ABTS
colorless

Χαρακτηριστικά Μεθόδου

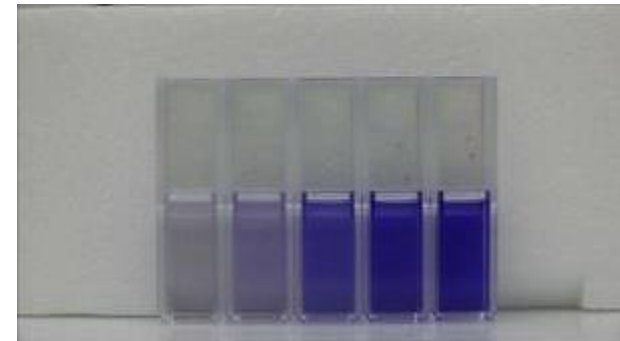
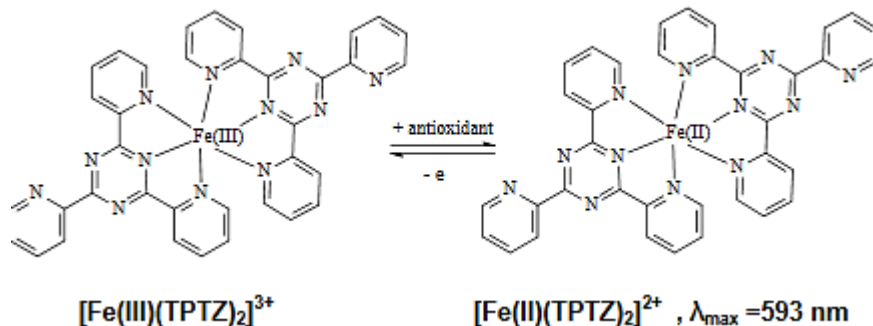
Ευαίσθητη – Εύκολη – Ταχεία – Εφαρμογή σε υδρόφιλα και υδρόφοβα αντιοξειδωτικά – Εφαρμογή σε μεγάλο εύρος pH

Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος Αντιοξειδωτικής Ισχύος Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου – Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Αναγωγή της ρίζας με μηχανισμό μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, *SET*)

- Σε χαμηλές τιμές pH συμβαίνει αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου (Fe-TPTZ, TPTZ= 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη) προς Fe → μπλέ χρώμα (φωτομετρία στα **593 nm**).
 - μεταβολή χρώματος → παρουσία αντιοξειδωτικού



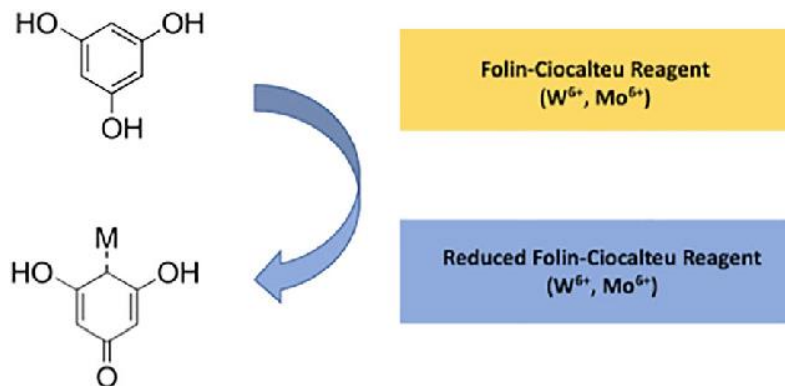
Χαρακτηριστικά Μεθόδου

Οικονομική – Αξιόπιστη – Τα αποτελέσματα συνήθως εκφράζονται ως ισοδύναμα βιταμίνης C
Μειονέκτημα: δεν προσδιορίζει τις θειολικές ομάδες

Μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC)

Η μέθοδος προσδιορισμού ολικού φαινολικού περιεχομένου (FC):

- Βασίζεται στην αντίδραση φαινολικών συστατικών με χρωματομετρικό αντιδραστήριο
- Βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων (μηχανισμός μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου / single electron transfer, *SET*) σε αλκαλικό περιβάλλον (pH~10) από φαινολικές ενώσεις σε φωσφομολυβδικά / φωσφοβολφραμικά όξινα σύμπλοκα για να σχηματίσει σύμπλοκα μπλε χρώματος που προσδιορίζονται φασματοσκοπικά στα **750-765 nm**



Σύγκριση Μεθόδων DPPH, ABTS & FRAP



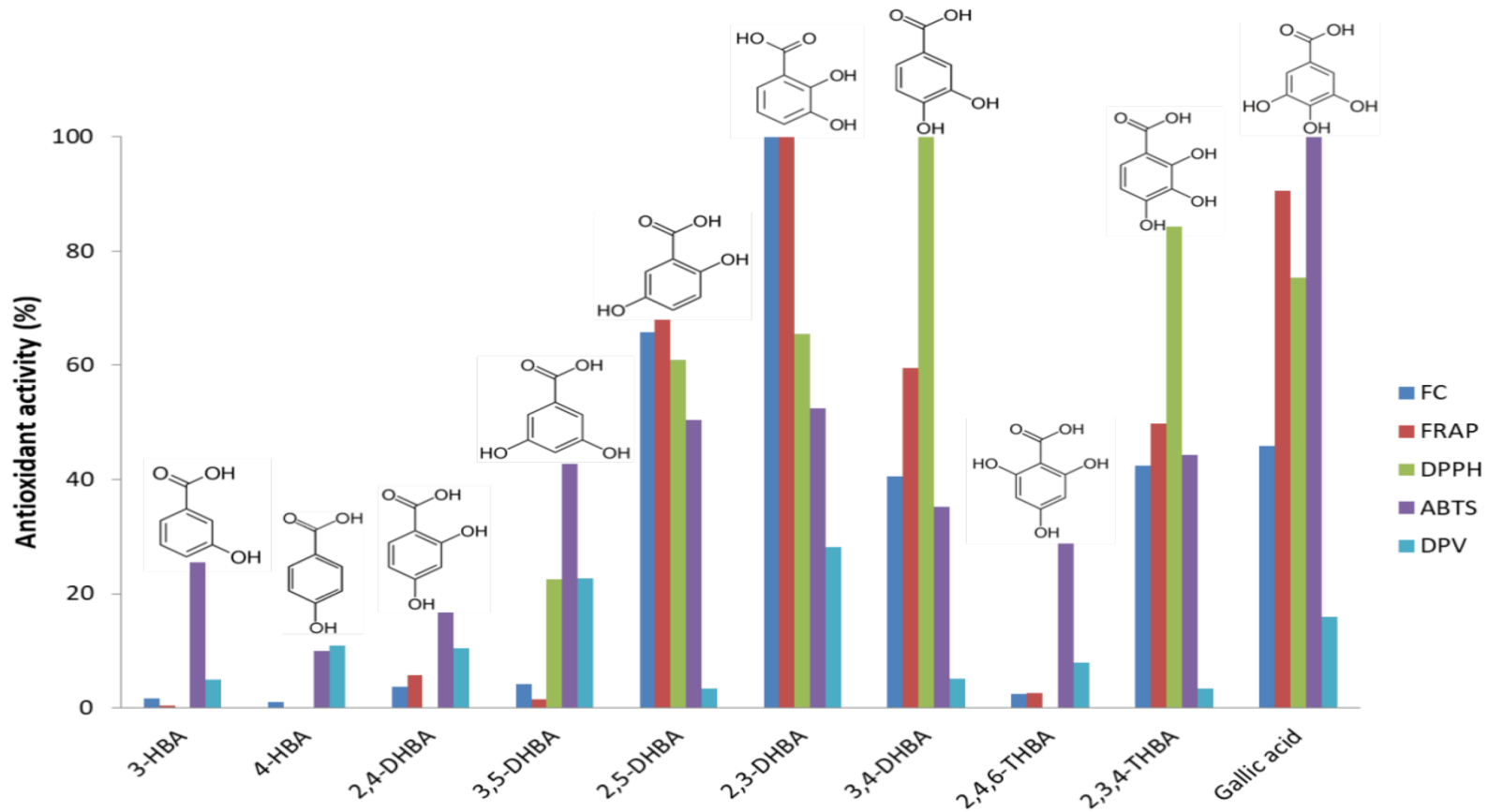
Εκχύλιση φρούτων Guava

Antioxidant activities of guava fruit extracts as determined by the ABTS, DPPH, and FRAP assays based on dichloromethane extraction from four guava genotypes

Genotype	Antioxidant activity ($\mu\text{M TE/g FM}$)			Genotypic mean ($P = 0.11$)
	ABTS	DPPH	FRAP	
Allahabad Safeda	0.38 ± 0.10	0.20 ± 0.06	0.25 ± 0.06	0.28 ± 0.09
Fan Retief	0.42 ± 0.06	0.35 ± 0.28	0.12 ± 0.01	0.30 ± 0.16
Ruby Supreme	0.58 ± 0.15	0.39 ± 0.19	0.13 ± 0.02	0.37 ± 0.23
Advanced selection	0.38 ± 0.10	0.15 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.14
Assay mean ($P = 0.01$)	0.44 ± 0.10 a	0.27 ± 0.12 b	0.16 ± 0.06 c	

K. Thaipong et al. / *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2006) 669–675

Σύγκριση Αντιοξειδωτικής Δράσης Υδροξυ-βενζοϊκών Οξέων



Μέθοδος PFRAP

Η μέθοδος PFRAP (potassium ferricyanide reducing power) συσχετίζει την αύξηση της απορρόφησης με την αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών.



Το τελευταίο αντιδρά με τον FeCl_3 , αποδίδοντας σιδηροκυανιούχο σίδηρο (μπλε χρωματισμένο σύμπλεγμα) με μέγιστη απορρόφηση στα **700 nm**

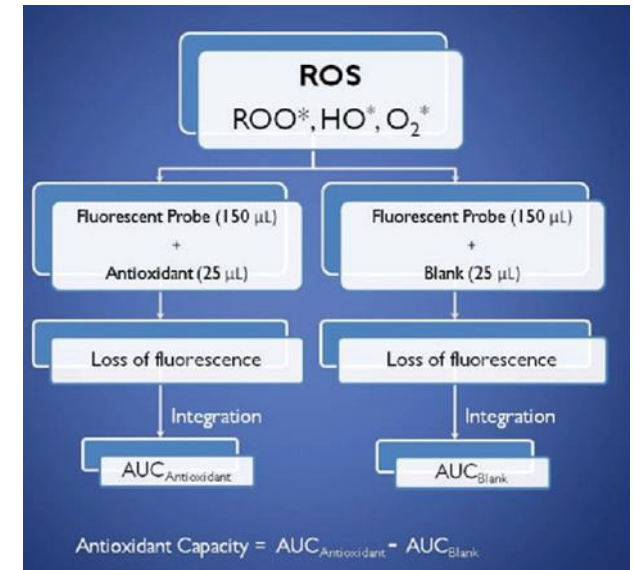
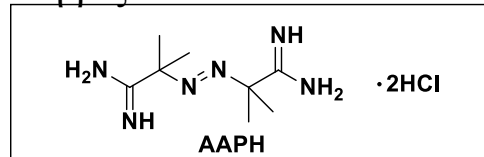
Ανάλογα με το βαθμό αναστολής από τα αντιοξειδωτικά του δείγματος, το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος μετατρέπεται σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε.

Μέθοδος ORAC

Η Μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity / Ικανότητα Απορροφητικότητας Ριζών Οξυγόνου) αναπτύχθηκε από Dr. Guohua Cao το 1992. Το 1995, ο Dr. Cao συνεργάστηκε με την ομάδα του Dr. Ronald L. Prior's και ανέπτυξαν την ημι-αυτόματη μέθοδο ORAC.

Μηχανισμός μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, *HAT*)

- Στηρίζεται στην ελάττωση του φθορισμού ορισμένων ουσιών (φυκοερυθρίνες) με την προσθήκη ελευθέρων ριζών. Η δράση των ελευθέρων ριζών αναστέλλεται παρουσία των αντιοξειδωτικών.
- Βασίζεται στην αναστολή της οξειδωσης των ριζών υπεροξυλίου που προκύπτει από τη θερμική αποσύνθεση αζο-ενώσεων όπως το **AAPH**
- Η απώλεια φθορισμού είναι δείκτης της έκτασης της αποσύνθεσης από την αντίδρασή της με την υπεροξυλική ρίζα.



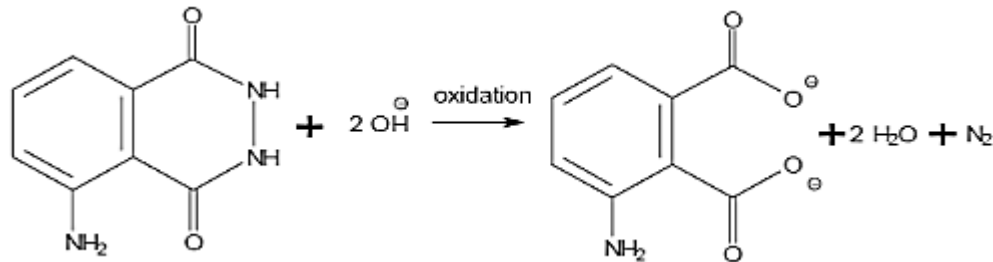
$$AUC = \left(\frac{R_1}{R_1}\right) + \left(\frac{R_2}{R_1}\right) + \left(\frac{R_3}{R_1}\right) + \dots + \left(\frac{R_n}{R_1}\right) \quad (\text{Eq. 1})$$

Where R_1 is the fluorescence reading at the initiation of the reaction and R_n is the last measurement. 30

Μέθοδος TRAP

Η μέθοδος TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential / Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου):

- Βασίζεται στην αντίδραση ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου με τη λουμινόλη (5-αμινο-2,3-διυδρο-1,4-φθαλαζινεδιόνη). Το προϊόν της αντίδρασης είναι μία ρίζα λουμινόλης η οποία εκπέμπει φως (χημειοφωταύγεια) το οποίο και μετράται.
- Παρουσία αντιοξειδωτικών, η χημειοφωταύγεια ελαττώνεται. Η λουμινόλη υφίσταται οξείδωση παρουσία ελευθέρων ριζών και η οξείδωσή της συνοδεύεται από αύξηση της απορρόφησης στα **425 nm** (Stottand Kricka, 1987).



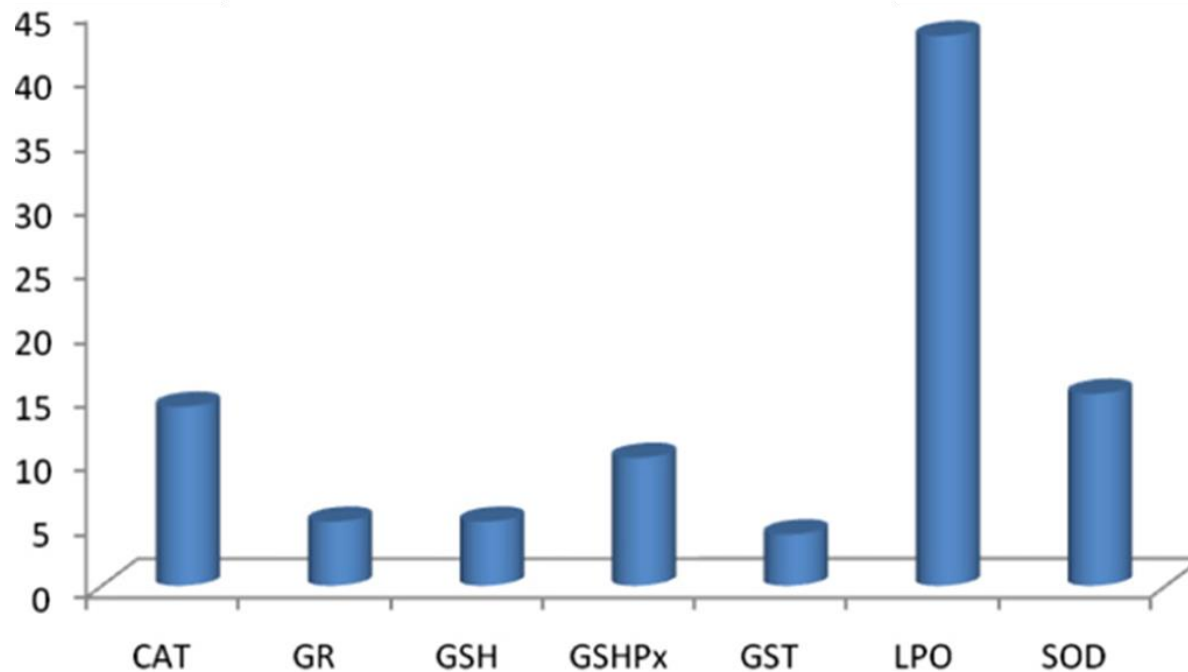
Μειονεκτήματα Μεθόδου

Η λουμινόλη είναι αδιάλυτη στο νερό, ευαίσθητη στο φως και την παρουσία μεταλλικών κατιόντων
→ δυσχερής χρήση σε in vivo πειραματικές συνθήκες

Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης (In vivo)

- Ferric reducing ability of plasma
- Reduced glutathione (GSH)
- Glutathione peroxidase (GSHPx)
- Glutathione-S-transferase (GSt)
- Superoxide dismutase (SOD)
- Catalase (CAT)
- c-Glutamyl transpeptidase activity (GGT)
- Glutathione reductase (GR)
- Lipid peroxidation (LPO)
- LDL

Συχνότητα Χρήσης των In Vivo Μεθόδων

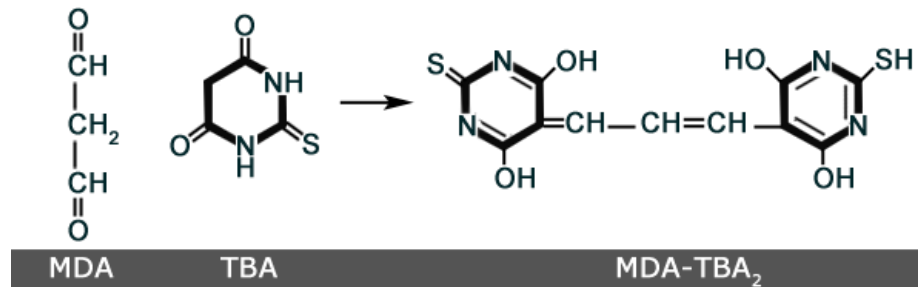


Μέθοδος LPO

Η μέθοδος προσδιορισμού λιπιδικής υπεροξείδωσης
(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)

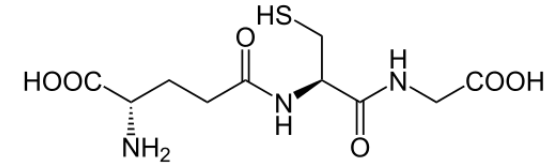
Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κυρίως των κυτταρικών μεμβρανών.

- Το κύριο προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η λιπιδική υπεροξείδωση.
- Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), κατά την οποία παράγεται ένα προϊόν (TBARS) που απορροφά στα **530 nm**.



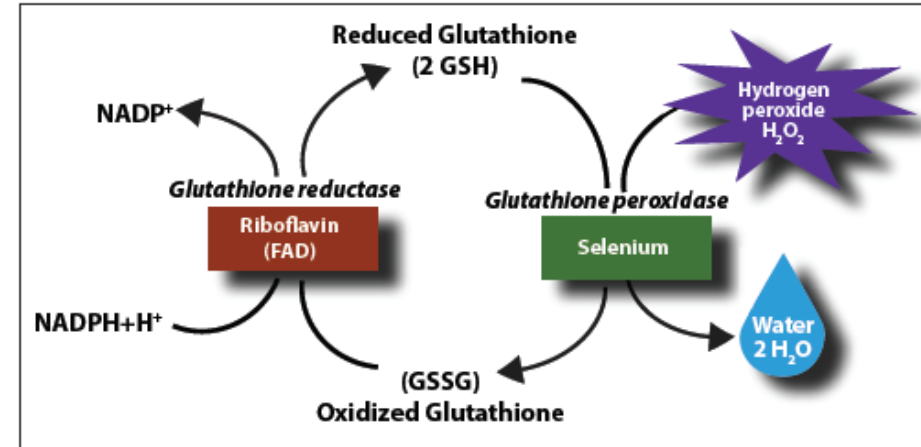
Για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξείδωσης, το TBA προστίθεται στο πλάσμα και μετά από επώαση γίνεται φωτομέτρηση στα 530nm.

Μέθοδος GSH



Η μέθοδος προσδιορισμού επιπέδων γλουταθειόνης (GSH):

- Η GSH ανάγει τις ROS δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων και μετατρέπεται σε GSSG
- Η GSSG ανάγεται πάλι σε GSH από τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης που χρησιμοποιεί NADPH ως δότη ηλεκτρονίων
- GSH και GSH/GSSG → δείκτες οξειδωτικού στρες
- Ο προσδιορισμός της GSH στο αίμα βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]
- Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας 2-nitro-5-thiobenzoic acid που προσδιορίζεται φωτομετρικά στα **412 nm**

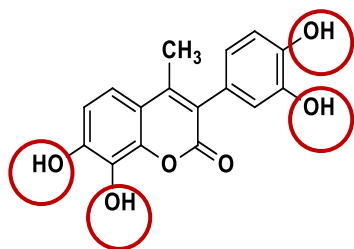


Μέθοδος CAT

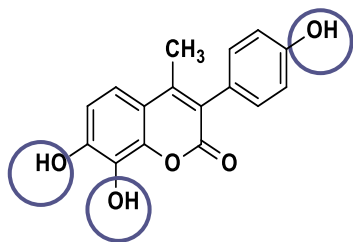
Η μέθοδος προσδιορισμού της δράσης της καταλάσης (CAT):

- Καταλάση → αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο
- Ο προσδιορισμός δράσης της CAT στο αίμα γίνεται σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και βασίζεται στον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 με φασματοφωτομετρία στα **240 nm**

Αντιοξειδωτικά Μελέτη Δομής - Δράσης



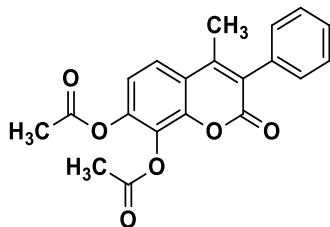
DPPH IC₅₀ 5.3 μM
AAPH 42%
LOX IC₅₀ 52.5 μM



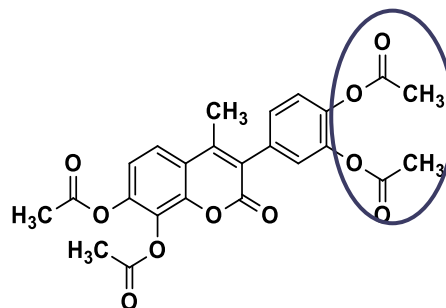
DPPH IC₅₀ 8.7 μM
AAPH 78%
LOX IC₅₀ 52 μM

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας,
Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

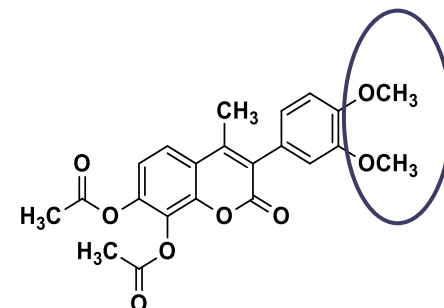
Βιοδραστικότητα υδροξυ-
κουμαρινικών αναλόγων



AAPH 68.1%
LOX IC₅₀ 19 μM



AAPH 95.1%
LOX IC₅₀ 56 μM

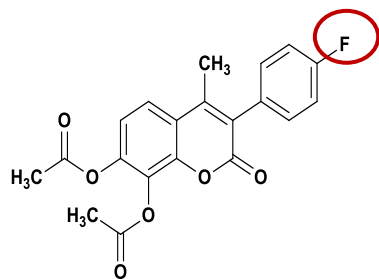


AAPH 88.9%
LOX IC₅₀ 52.5 μM

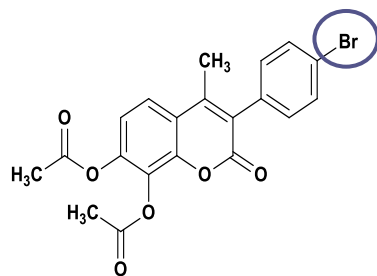
Βιοδραστικότητα ακετυλοξυ-
κουμαρινικών αναλόγων

Αντιοξειδωτικά Μελέτη Δομής - Δράσης

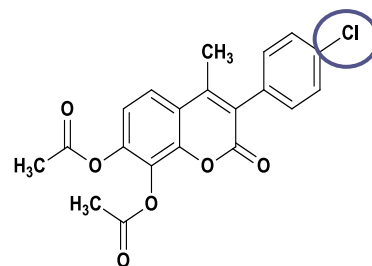
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας,
Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ



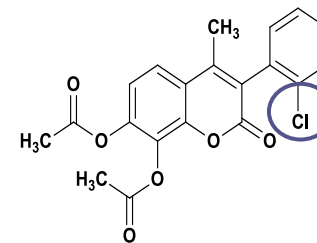
LOX 67.5 μ M
AAPH 45%



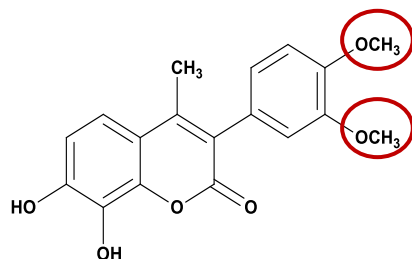
LOX no
AAPH 45%



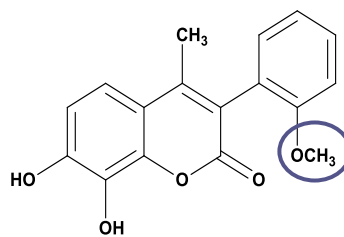
LOX 100 μ M
AAPH 95.3%



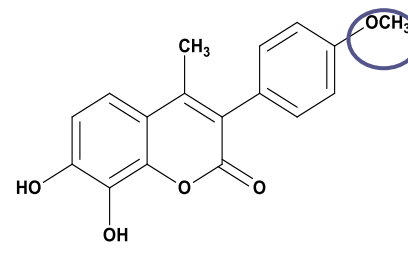
LOX no



LOX 85 μ M



LOX no
AAPH 53%

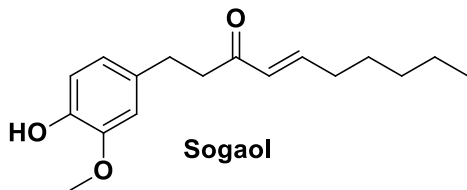


LOX no
AAPH 19%

Αντιοξειδωτικά Μελέτη Δομής - Δράσης

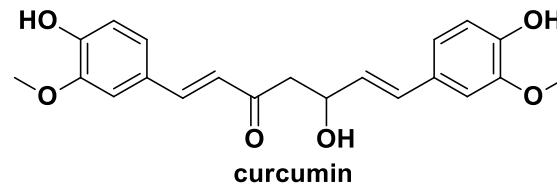
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας,
Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

Απομόνωση σογκαόλης από εκχύλισμα Ginger



Sogaol

IC₅₀
(μg/mL) 4.63



curcumin

IC₅₀
(μg/mL) 0.99

Εκχύλισμα από εκχύλιση πρόπολης με UAE (DES:H₂O)

IC₅₀ 62 μg/mL

εκχύλιση Ginger με UAE (DES:H₂O)

IC₅₀ 88 μL/mL

Εκχύλισμα από εκχύλιση πρόπολης με UAE (DES:H₂O)

IC₅₀ 28 μg/L