



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών
“ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

“In vitro μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης
φυτοχημικών εκχυλισμάτων με συνδυασμό
τεχνικών.”

Κοντού Θωμάς

Λάρισα 2024



“In vitro study of the antioxidant potential of
phytochemical extracts using a combination of
assays”

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- **Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Βεσκούκης Αριστείδης**, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Σκαπέρδα Ζωή-Βασιλική**, Εντεταλμένη Διδάσκουσα, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω κ. Κουρέτα Δημήτριο για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία μου στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση του. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Βεσκούκη Αριστείδη και την κ. Σκαπέρδα Ζωή-Βασιλική για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να δώσω στην κ. Γκασδρόγκα Μαρία και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Περίληψη

Το ελαιόδενδρο και τα προϊόντα του αποτελούν το σήμα κατατεθέν της Μεσογειακής βλάστησης από αρχαιοτάτων χρόνων, έχοντας σημαντική συνεισφορά στην διαμόρφωση της πολιτιστικής κληρονομιάς των λαών που κατοίκησαν σε αυτή. Το φυτό και τα προϊόντα του έως και σήμερα είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι των λαών της Μεσογείου τόσο στον τομέα της οικονομίας όσο και στον τομέα της διατροφής. Οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιόδενδρου και των προϊόντων του είναι πολλές και μελετημένες λόγω των σημαντικών βιοδραστικών μορίων που περιέχουν, και για αυτό τον λόγο πέρα από τη χρήση τους στη διατροφή, τα προϊόντα του είναι χρήσιμα και από τις φαρμακοβιομηχανίες. Πιο γνωστό προϊόν, και συνάμα πιο εμπορευματοποιημένο, είναι το ελαιόλαδο το οποίο έχει κατακτήσει την παγκόσμια αγορά λόγω του γεγονότος πως έχει υψηλή διατροφική αξία. Η διαδικασία της ελαιοποίησης, ωστόσο, αφήνει πίσω της ένα μεγάλο αριθμό παραπροϊόντων τα οποία ως έναν βαθμό παραμένουν ανεκμετάλλευτα, παρά το πλούσιο βιοδραστικό τους περιεχόμενο. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων με προέλευση το ελαιόδενδρο, καθώς και παραπροϊόντων ελαιουργίας ως προς το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εμπορικών φυτοχημικών εκχυλισμάτων με διαφορετική περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς και δειγμάτων στερεών παραπροϊόντων προερχόμενων από τη διαδικασία ελαιοποίησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα δείγματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη ($\Delta 3$, $\Delta 5$) στις περισσότερες αντιοξειδωτικές μεθόδους (DPPH, ABTS, Reducing power assay), καθώς και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (Folin-Ciocalteu), ενώ τα δείγματα συνολικών παραπροϊόντων ελαιουργίας ($\Delta 1$, $\Delta 2$) παρουσίασαν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση στη μέθοδο Superoxide. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά για την αρχική αξιολόγηση των φυτοχημικών εκχυλισμάτων ελιάς, καθώς και των παραπροϊόντων ελαιουργίας καθώς δείχνουν τη σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων αυτών, κάνοντάς τα ικανά για την προσθήκη σε καινοτόμα προϊόντα διατροφής κτηνοτροφικών ζώων.

Λέξειςκλειδιά: Φυτοχημικά εκχυλίσματα, Αντιοξειδωτική δραστηριότητα, Παραπροϊόντα ελαιουργίας, Μελέτη *in vitro*, Πολυφαινολικό περιεχόμενο

Abstract

The olive tree and its products have been a trademark of Mediterranean vegetation since ancient times, significantly contributing to the cultural heritage of the people who inhabited this region. This plant and its products remain an integral part of the Mediterranean to this day, both in the fields of economy and nutrition. The beneficial properties of the olive tree and its products are numerous, which is why beyond the field of nutrition, its products are highly sought-after by pharmaceutical industries. The most well-known and highly commercialized product of the olive tree is olive oil, which has conquered the global market due to its high nutritional value. However, the production of olive oil through the process of olive pressing can lead to a large number of by-products, many of which remain underutilized to some extent. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant potential and total phenolic content of olive tree extracts and olive oil production by-products. An *in vitro* analysis was therefore conducted on extracts of different composition, with their differences being the percentage of olive phenolic compounds, as well on solid by-product samples derived from the olive pressing process.

The results showed that the extracts containing higher amounts of hydroxy-tyrosol (Sample 3, Sample 5) exhibited higher antioxidant capacity (DPPH and ABTS radical scavenging assays, Reducing power assay), as well as higher phenolic content (Folin-Ciocalteu method), while the total solid by-products resulting from the olive production process exhibited higher antioxidant capacity in the Superoxide radical scavenging assay. These results reveal an antioxidant potential of the samples, thus making them suitable for the use in innovative animal feed products as feed additives.

Key word: Phytochemical extracts, Antioxidant activity, Olive by-products, *In Vitro* study, Polyphenolic content

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	9
Η Ελιά	9
Ελεύθερες Ρίζες	12
Παραγωγή ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό	14
Χαρακτηριστικά ελευθέρων ριζών	16
Ελεύθερες ρίζες στη βιολογία	16
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	17
Πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου	18
Χημεία και βιοχημεία των δραστικών μορφών οξυγόνου	20
Οξειδωτικό Στρες	21
Οξειδωτικό στρες και ανθρώπινες νόσοι	22
Οξειδωτικό στρες και βλάβες στα μακρομόρια	24
1. Πρωτεΐνες	24
2. DNA	25
3. Λιπίδια	25
Αντιοξειδωτικά	26
Αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας	27
Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών	27
Αντιοξειδωτικά ένζυμα	29
Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	30
Φαινόλες	32
Πολυφαινολικές ενώσεις της ελιάς	33
Πολυφαινολικές ενώσεις της ελιάς	34
Σκοπός	37
2. Πειραματικό μέρος	38
2.1 Υλικά και μέθοδοι	38
2.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	38
Αρχή της μεθόδου	38
Πειραματική διαδικασία	39
2.1.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•	39
Αρχή της μεθόδου	39
Πειραματική διαδικασία	40

2.1.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ρίζας ABTS ^{•+}	41
Αρχή της μεθόδου	41
Πειραματική διαδικασία.....	41
2.1.4 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης του υπεροξειδικού ανιόντος (O ₂ ^{•-})	42
Αρχή της μεθόδου	42
Πειραματική διαδικασία.....	43
2.1.5 Προσδιορισμός της αναγωγικής ισχύος (Reducing power assay) μέσω της αναγωγής του Fe ³⁺	44
Αρχή της μεθόδου	44
Πειραματική διαδικασία.....	44
Στατιστική ανάλυση	45
Αποτελέσματα	46
Μέσοι όροι τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας IC ₅₀ (mg/ml), αναγωγικής ισχύος AU _{0.5} (mg/ml), και συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου TPC (mg GAE/g) για τα εξεταζόμενα δείγματα.....	46
Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων δειγμάτων.....	47
Συζήτηση	49
Βιβλιογραφία	61

1. Εισαγωγή

Η Ελιά

Ιστορική αναδρομή

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα από τα παλαιότερα δέντρα που καλλιεργήθηκαν από τον άνθρωπο στον κόσμο. Είναι πιθανό πως όταν ο άνθρωπος έκοψε για πρώτη φορά τα κλαδιά της αγριελιάς, είτε για να ανάψει φωτιά είτε για την δημιουργία όπλων, να παρατήρησε και τα μοναδικά χαρακτηριστικά που είχε το φυτό αυτό. Ο εξευγενισμός της αγριελιάς, λοιπόν, και η ανάδυση της καλλιεργούμενης ελιάς αντιπροσωπεύουν το θρίαμβο ενός αναπτυσσόμενου πολιτισμού. Το ελαιόδενδρο ξεκίνησε να καλλιεργείται περίπου πριν 6.000 χρόνια στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, και πιο συγκεκριμένα στις χώρες της ανατολής όπως είναι η Συρία, το Ισραήλ, ο Λίβανος, η Κύπρος και στην χώρα μας στο νησί της Κρήτης[1]. Από τον μινωικό πολιτισμό έχουν διασωθεί τοιχογραφίες οι οποίες εμφανίζουν τους ανθρώπους εκείνης της εποχής να καταναλώνουν ελιές, αλλά και να χρησιμοποιούν το ελαιόλαδο στο μαγείρεμα αλλά και ως καύσιμο σε λάμπες της εποχής. Πολλοί αρχαιολόγοι αναφέρουν πως ο πλούτος του μινωικού πολιτισμού οφειλόταν ιδιαίτερα στο επιτυχημένο εμπόριο του ελαιόλαδου. Έπειτα, η καλλιέργεια του ελαιόδενδρου σταδιακά πέρασε και στην ηπειρωτική Ελλάδα, και στην συνέχεια σε δυτικότερες χώρες όπως η Ιταλία, όπου κατά το 600π.Χ. η Ρωμαϊκή αυτοκρατορία επέκτεινε την καλλιέργειά του σε όλη την επικράτεια. Αργότερα, με την ανακάλυψη της Αμερικής, οι Ισπανοί άποικοι έφεραν την ελιά στην Καλιφόρνια γύρω στο 1.800μ.Χ. όπου και καλλιεργείται μέχρι και σήμερα[2].

Το ελαιόδενδρο είχε σημαντική επίδραση στον πολιτισμό της Αρχαίας Ελλάδας καθώς, σύμφωνα με τον μύθο, η ελιά αποτέλεσε το δώρο το οποίο έδωσε η θεά Αθηνά στους Αθηναίους για να ονομαστεί η πόλη με τον όνομα της. Ο Ηρόδοτος στα κείμενα του περιέγραφε την Αθήνα ως το κέντρο της καλλιέργειας της ελιάς, ενώ ο Αριστοτέλης ανέδειξε την καλλιέργειά της ως μία μορφής επιστήμη. Για τους αρχαίους Έλληνες η ελιά ήταν ο πνευματικός θησαυρός που χρησιμοποιούνταν σε γιορτές και κηδείες, ενώ τα στεφάνια των νικητών των Ολυμπιακών αγώνων φτιαχνόταν από κλαδιά και φύλλα αγριελιάς. Οι Έλληνες και μετέπειτα οι Ρωμαίοι

ανέπτυξαν όλες τις πτυχές της καλλιέργειας, παραγωγής και επεξεργασίας της ελιάς, με τους Ρωμαίους να εφευρίσκουν την υδραυλική πρέσα, που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ελαιόλαδου[3]. Το ελαιόλαδο είχε ιδιαίτερη θέση στις τελετές της Ορθόδοξης Εκκλησίας και στην Βίβλο, όπου το περιστέρι επέστρεψε στον Νώε με ένα κλαδί ελιάς.



Εικόνα 1. Εμβληματικό ελαιόδενδρο στην περιοχή Βούδες-Κρήτη[105]

Η καλλιέργεια της ελιάς σήμερα

Σήμερα η καλλιέργεια της ελιάς έχει εξαπλωθεί σε όλο τον πλανήτη, ωστόσο εμπορικά η ελιά καλλιεργείται μόνο σε 30 χώρες, με τον μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδενδρων να εντοπίζεται στην λεκάνη της Μεσογείου, αποτελώντας έτσι την κύρια ελαιοπαραγωγική περιοχή στον πλανήτη. Η Μεσόγειος διαθέτει τις κατάλληλες κλιματικές συνθήκες για να ευδοκιμήσει η καλλιέργεια της ελιάς καθώς διαθέτει τις ιδανικές ετήσιες θερμοκρασίες την περίοδο της άνοιξης (Απρίλιο και Μάιο) όπου και ανθίζει, καθώς και την ιδανική αναλογία βροχοπτώσεων που να μην επηρεάζουν σοβαρά τη διαδικασία επικονίασης[4]. Σημαντικό χαρακτηριστικό του δέντρου της ελιάς είναι πως είναι ιδιαίτερα ευπροσάρμοστο στο ημι-άνυδρο Μεσογειακό κλίμα καθώς μπορεί να ανεχθεί την χαμηλή διαθεσιμότητα νερού στο έδαφος μέσω φυσιολογικών, μορφολογικών, και βιοχημικών προσαρμογών που αποκτούνται ως αποτέλεσμα της λειψυδρίας κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού[5]. Η καλλιέργεια του ελαιόδενδρου περιορίζεται συχνά σε πλαγιές ή αρκετά τραχιά εδάφη, και καταλαμβάνει σημαντικά τμήματα βουνών και λόφων επειδή η καλλιέργεια της μπορεί να συμβάλει στη μείωση της διάβρωσης του εδάφους, ενώ ταυτόχρονα ευνοεί την διατήρηση της υψηλής βιοποικιλότητας, χαρακτηρίζοντας πλήρως το Μεσογειακό τοπίο. Επιπλέον, γηγενείς ποικιλίες ελιάς εντοπίζονται και σε χώρες που δεν βρέχονται από την Μεσόγειο όπως είναι η Ιορδανία, η Πορτογαλία, το Ιράν και

το Ιράκ. Κατά την εξέλιξη του ελαιόδενδρου δημιουργήθηκαν περισσότερες από 1.500 ποικιλίες, επιτρέποντας την εξάπλωση της και σε χώρες και εκτός της Μεσογείου. Πολλές ποικιλίες ελιάς έχουν αναπτυχθεί, με τις πιο κοινές για την παραγωγή του ελαιόλαδου να είναι η «Κορωνέικη» στην Ελλάδα, η «Φραντόιο» στην Ιταλία, η «Αρμπεκίνα» στην Ισπανία και η «Μίσιον» στις ΗΠΑ, ενώ οι καρποί τους διαφέρουν σε μέγεθος, χρώμα, περιεκτικότητα σε έλαια και ποιότητα[6].



Εικόνα 2: Παραδοσιακός Ελαιώνας [106]

Σήμερα, η παγκόσμια καλλιέργεια της ελιάς καταλαμβάνει περισσότερα από 9.800.000 εκτάρια, με μόνο το 15% των ελαιώνων παγκοσμίως να αρδεύονται ενώ το 20% αυτών να έχει χαμηλή παραγωγικότητα. Στην χώρα μας η παραγωγή ελαιόλαδου αντιπροσωπεύει το 10% της συνολικής γεωργικής παραγωγής και 9,4% του ελληνικού γεωργικού ΑΕΠ. Το 50% των ελαιώνων είναι παραδοσιακοί ελαιώνες, ενώ μόνο το 20% είναι σύγχρονοι, περιλαμβάνοντας νέες εντατικές μορφές καλλιέργειας που συνεισφέρουν περίπου το 50% των συνολικών προϊόντων ελιάς. Αναφορικά με τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, η Ισπανία είναι στην πρώτη θέση με 2.572.500 εκτάρια, με την χώρα μας να είναι τέταρτη έχοντας 900.000 εκτάρια που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια ελαιόδενδρων. Επιπλέον, η χώρα μας κατέχει την τρίτη θέση παγκοσμίως στην παραγωγή ελαιόλαδου και παράγει 300.000-400.000

τόνουζετησίως. Ωστόσο, περίπου το μισό από το παραγόμενο ελαιόλαδο εξάγεται σε χώρες του εξωτερικού, με το 75% να πηγαίνει στην Ιταλία, ωστόσο η πλειοψηφία αυτών των εξαγωγών δεν είναι ούτε συσκευασμένες, ούτε τυποποιημένες ποσότητες, ενώ η ποσότητες συσκευασμένων/τυποποιημένων ποσοτήτων που εξάγονται ανέρχονται στο 6% σύμφωνα με την ICAP[7]. Άλλες χώρες που διαθέτουν μεγάλες εκτάσεις για την καλλιέργεια της ελιάς είναι η Τυνησία, η Ιταλία, η Τουρκία και το Μαρόκο. Τις τελευταίες δεκαετίες, με την εντατικοποίηση της καλλιέργειας σε υπερεντατικούς γραμμικούς ελαιώνες, δημιουργήθηκαν νέες προοπτικές και δυνατότητες για γρήγορη επέκταση της παραγωγής σε χώρες με μεγάλες εκτάσεις γης αλλά με περιορισμένο ή ακριβό εργατικό δυναμικό[8].

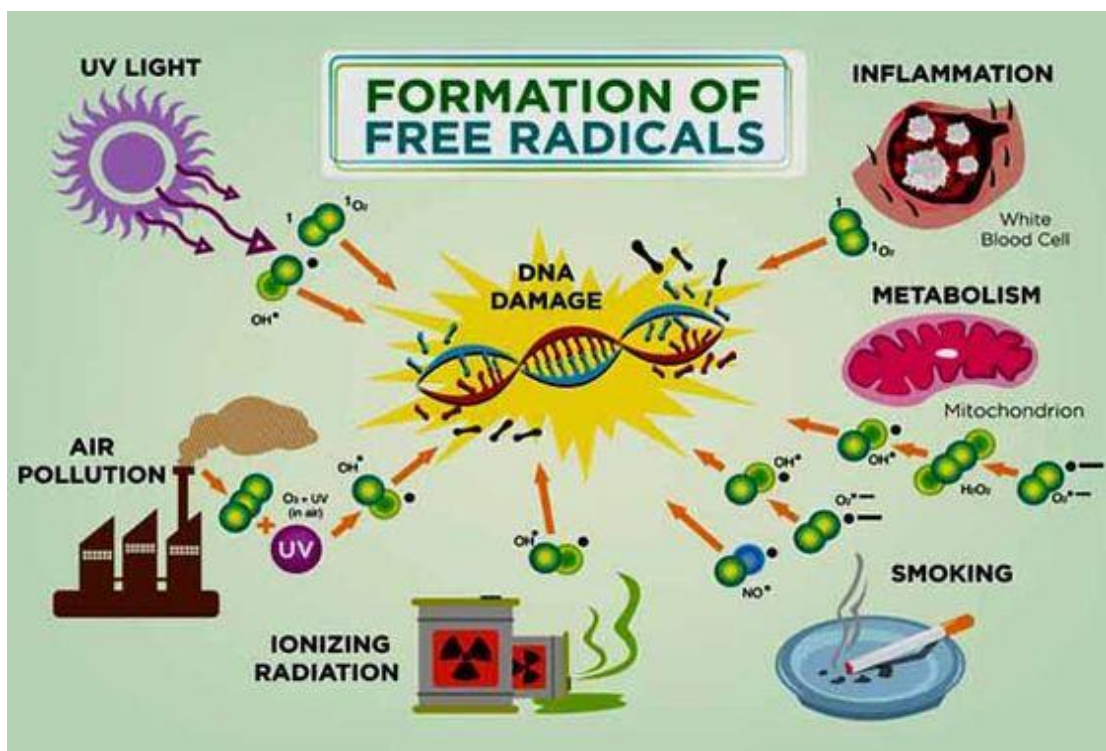
Ελεύθερες Ρίζες

Η έννοια της ελεύθερης ρίζας στα πρώτα χρόνια του 19ου αιώνα ήταν συνδεδεμένη με την ύπαρξη τμημάτων των μορίων τα οποία ανεξαρτητοποιούνταν από την υπόλοιπη δομή τους. Με την εξέλιξη της οργανικής χημείας παρατηρήθηκε πως τα μόρια κάτω από ορισμένες και μόνο συνθήκες έχουν την ικανότητα να είναι ανεξάρτητα. Αργότερα, στα μέσα του 20ου αιώνα ο Paul Flory, ο άνθρωπος που σύνδεσε το όνομα του με την χημεία των πολυμερών, μίλησε για την εισαγωγή του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών στον πολυμερισμό προσθήκης. Με αυτόν τον τρόπο θεσπίστηκε και η σύγχρονη έννοια της ελεύθερης ρίζας, δηλαδή όταν μιλάμε για ελεύθερες ρίζες εννοούμε την ύπαρξη ενός ή περισσοτέρων ατόμων (μόρια) τα οποία είτε είναι οργανικά είτε ανόργανα, και φέρουν ένα ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα το οποίο είναι ασύζευκτο[9]. Όπως είναι γνωστό, τα μόρια απαρτίζονται από ένα ή και περισσότερα άτομα, και η δομή τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ηλεκτρονίων που περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα τους. Ωστόσο, τα ηλεκτρόνια δεν περιφέρονται ελεύθερα στον χώρο αλλά βρίσκονται σε τροχιά γύρω από τον πυρήνα, διατηρώντας τις απαραίτητες αποστάσεις μεταξύ τους.

Χαρακτηριστικό, επίσης είναι πως τα ηλεκτρόνια πέρα από την περιστροφή τους γύρω από τον πυρήνα, περιστρέφονται και γύρω από τον εαυτό τους με αντίθετη κατεύθυνση. Όλα αυτά συντελούν στην σταθερότητα ενός ατόμου, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητά του στη βασική του κατάσταση. Όταν τα ηλεκτρόνια τα οποία δεν είναι συζευγμένα σε ένα μόριο ή άτομο, ειδικά όταν αυτά βρίσκονται στην εξωτερική στοιβάδα, τότε τα άτομα ή τα μόρια γίνονται πιο ασταθή και κατά συνέπεια πιο δραστικά[10], [11]. Τα άτομα τα οποία φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα έχουν συνεπώς την τάση να έλκουν τα ηλεκτρόνια των γειτονικών τους ατόμων, που έχει σαν αποτέλεσμα τα δυο άτομα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να ανταλλάσσουν ηλεκτρόνια. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, που χαρακτηρίζονται από την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ατόμων, ονομάζονται οξειδοαναγωγικές. Κοινό τους γνώρισμα σε πρώτο χρόνο είναι η οξείδωση, που οδηγεί στην απώλεια ηλεκτρονίων, και σε δεύτερο χρόνο γίνεται η συνεισφορά ηλεκτρονίων από το άτομο[12].

Με αυτόν τον τρόπο καταλήγουμε στον σημερινό ορισμό της ελεύθερης ρίζας δηλαδή, σε ένα άτομο ή μόριο το οποίο έχει ως χαρακτηριστικό γνώρισμα την ύπαρξη ενός ή περισσότερων ασύζευκτων ηλεκτρονίων, και την ταυτόχρονη ανεξάρτητη ύπαρξη στον χώρο. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να αντιδράσουν με τα γειτονικά τους μόρια σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Η πιο απλή δομή ελεύθερης ρίζας που μπορεί να βρεθεί στην φύση είναι το άτομο υδρογόνου. Επιπλέον, οι αντιδράσεις σχηματισμού των ελεύθερων ριζών μπορούν να οδηγήσουν μια αλυσιδωτή αντίδραση που σχηματίζει νέες ελεύθερες ρίζες, μέσω αλληπάλληλων αντιδράσεων.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με διάφορους τρόπους, ωστόσο οι πιο βασικοί είναι οι ομολυτικές διασπάσεις (χαρακτηρίζεται από τον ομολυτικό διαχωρισμό του ζεύγους ηλεκτρονίων), οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (χαρακτηρίζεται από μεταφορά ηλεκτρονίων) και αντιδράσεις ριζών με άλλες ενώσεις[13].



Εικόνα 3. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών [108]

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό αποτελεί είτε μία φυσιολογική λειτουργία που προέρχεται είτε από ενδογενείς παράγοντες, είτε επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες[14], [15]. Οι πιο σημαντικές από τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκύπτουν από την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού είναι:

- Ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αποτελούν προϊόν της αναπνευστικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων στα κύτταρα. Κατά την διαδικασία αυτή κάποια ηλεκτρόνια αποσπώνται από τα αρχικά τους μόρια και μεταφέρονται σε μόρια οξυγόνου μετατρέποντάς τα σε ρίζες υπεροξειδίου
- Ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από την φυσιολογική δράση των οξειδωτικών ενζύμων (λιποξυγονάσες, κυκλοοξυγονάσες, υπεροξειδάσες ή αφυδρογονάσες). Αναλυτικότερα, οι εν λόγω ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από ενζυμικές αντιδράσεις και αποτελούν τα παραπροϊόντα τους.
- Ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες είναι ιδιαίτερα δραστικές, και οι αντιδράσεις τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταλλικών ιόντων[16].
- Ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό συμβαίνει γιατί κάποια από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιούν ελεύθερες ρίζες, τις οποίες συνθέτουν με σκοπό την εξουδετέρωση βακτηρίων ή παθογόνων που προσβάλλουν τον οργανισμό. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις τους ωστόσο, μπορούν

να εκδηλωθούν όταν η διαδικασία αυτή τεθεί εκτός ελέγχου, όπως με την περίπτωση των αυτοάνοσων νοσημάτων, και οι ελεύθερες ρίζες ξεκινούν να προκαλούν βλάβες στα κύτταρα[17].

Μερικές ενδογενείς πηγές δημιουργίας ελευθέρων ριζών είναι:

- Τα μιτοχόνδρια, τα οποία είναι γνωστά για την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), κάτι το οποίο είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά την διάρκεια της μεταφοράς υπάρχουν απώλειες οι οποίες καταλήγουν στην δημιουργία του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την δράση της υπεροξειδικής δυσμουτάσης[18].
- Η οξειδάση της ξανθίνης, η οποία είναι ένα ένζυμο που παράγεται από τραυματισμένα κύτταρα. Η οξειδάση της ξανθίνης προκαλεί την δημιουργία του ουρικού οξέος, κατά την διάρκεια αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιεί οξυγόνο το οποίο μετά την αντίδραση καταλήγει να μετατρέπεται σε υπεροξειδικό ανιόν[18].
- Τα υπεροξεισώματα, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή H_2O_2 μέσω της αντίδρασης οξειδασών των υπεροξεισωμάτων (όπως η acyl-CoA)[19].
- Η εκδήλωση φλεγμονής λόγω της φαγοκυττάρωσης, κυρίως με την δράση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων, τα οποία παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου. Αυτή η αντίδραση του οργανισμού έχει ως σκοπό να υπάρξει ανταγωνισμός κατά των παθογόνων κατά την διάρκεια μίας μόλυνσης ή ενός τραύματος[20].
- Η άσκηση, μπορεί να αποτελέσει μία πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου λόγω της συνεργιστικής ιδιότητας της αυξημένης πρόσληψης οξυγόνου και της αυξημένης δραστηριότητας των μιτοχονδρίων[21].
- Η ισχαιμία / τραυματισμός επαναιμάτωσης[14], [22].

Στην δημιουργία ελευθέρων ριζών στο ανθρώπινο σώμα μπορούν να συμβάλλουν ωστόσο και εξωγενείς παράγοντες με τους οποίους ο οργανισμός έρχεται σε επαφή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εξωγενών παραγόντων που

έχουν τη δυνατότητα να προάγουν την δημιουργία των ελευθέρων ριζών αποτελούν η έκθεση σε υπεριώδη ή ιονίζουσα ακτινοβολία, ο καπνός που προέρχεται από το τσιγάρο, τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο ως φαρμακευτή αγωγή, αλλά και από την καταπολέμηση ασθενειών των φυτών, η ατμοσφαιρική ρύπανση αλλά και διάφορες άλλες χημικές ενώσεις και ξενοβιοτικά. Σημαντικό είναι να αναφερθούν ακόμα και οι μη ενζυμικές αντιδράσεις του οξυγόνου με οργανικά στοιχεία. Σημαντικό επίσης, είναι να σημειωθεί πως ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν και από παράγοντες όπως είναι το άγχος και η ψυχολογική πίεση που μπορεί να έχει ένας ανθρώπινος οργανισμός[23], [24].

Χαρακτηριστικά ελευθέρων ριζών

Στην περίπτωση των ελευθέρων ριζών, χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η σταθερότητα τους, η οποία στηρίζεται στην αμφίδρομη ιδιότητα την οποία έχουν σε σχέση με την ταχύτητα σχηματισμού και αποσύνθεσής τους, καθώς και τις συνθήκες που επικρατούν κατά το σχηματισμό τους. Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολο να σχηματιστεί. Ωστόσο είναι γνωστό πως είναι αρκετά ασταθείς δραστικές ενώσεις και αντιδρούν είτε μεταξύ τους, είτε με άλλες ενώσεις. Η σταθερότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από κανόνες θερμοδυναμικής και την κινητικής. Στην περίπτωση της θερμοδυναμικής σταθερότητας, η διάσπαση του δεσμού R-H είναι καθοριστική για τη σταθερότητα του μορίου. Στην περίπτωση της κινητικής, η σταθερότητα της ρίζας προκύπτει ως αποτέλεσμα στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα σταθερών ελευθέρων ριζών αποτελούν το διφαινυλοπικρυλυδραζύλιο (DPPH•), αλλά κάποια νιτροξειδία που φέρουν τον ιδιαίτερα σταθερό δεσμό N-O[25].

Ελεύθερες ρίζες στη βιολογία

Οι αντιδράσεις που προκαλούνται από τη δράση των ελευθέρων ριζών είναι πιθανό να παράγουν προοδευτικά δυσμενείς αλλαγές οι οποίες με την σειρά

τους συσσωρεύονται στο ανθρώπινο σώμα. Τέτοιες πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις όπως είναι οι βλάβες στο DNA αλλά και η κυτταρική βλάβη, είναι απόλυτα φυσιολογικές και συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς όσο μεγαλώνουν ηλικιακά και κατά συνέπεια αυξάνεται η συσσώρευσή τους. Παρόλα αυτά, παρατηρείται πως οι δυσμενείς αυτές επιδράσεις επηρεάζονται από ρυθμιστικούς παράγοντες που έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν τη συσσώρευση των ελευθέρων ριζών. Η συσσώρευση λοιπόν τέτοιων βλαβών μπορεί να χαρακτηριστεί από την εκδήλωση διάφορων παθοφυσιολογιών που σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες[23]. Ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση είναι δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ασθενειών που είναι πιθανό να εμπλέκονται με τη δράση των ελευθέρων ριζών. Μια άλλη πιθανή συσχέτιση η οποία εικάζεται πως υπάρχει συσχέτιση της κατανάλωσης λιπών και ελαίων με το ποσοστό θνησιμότητας σε άτομα άνω των πενήντα πέντε ετών, και πιθανώς οφείλεται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, μία αντίδραση που πραγματοποιείται από τις ελεύθερες ρίζες. Μελέτες που αφορούν την αθηροσκλήρωση ενισχύουν επίσης την πιθανότητα πως η νόσος αυτή μπορεί να οφείλεται σε αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ ελευθέρων ριζών και λιπιδίων που προέρχονται από την διατροφή, με αποτέλεσμα την πρόκληση ζημιάς σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σημαντικές αλλαγές στα αρτηριακά τοιχώματα[14], [23], [26].

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αναφέρεται στις ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν σαν χαρακτηριστικό την ύπαρξη οξυγόνου ως κεντρικό άτομο. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα των ROS είναι τα ανιόντα υπεροξειδίου(O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου($\bullet OH$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), και το μοριακό οξυγόνο (O_2).Ο ρόλος των ROS στα βιολογικά συστήματα είναι διπλός, δηλαδή υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να κρίνεται ευεργετικός, ενώ άλλες φορές να ασκεί επιβλαβείς επιπτώσεις. Οι ευεργετικές ιδιότητες που μπορούν να έχουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνουν φυσιολογικούς ρόλους της κυτταρικής απόκρισης, όπως είναι η άμυνα ενάντια σε παθογόνους παράγοντες, αλλά και η λειτουργία κυτταρικών συστημάτων σηματοδότησης. Επιπλέον, οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε μικρές

συγκεντρώσεις μπορούν να παρουσιάσουν επαγωγή της μιτογενικής απόκρισης, δηλαδή να επάγουν την ενεργοποίηση πρωτεϊνών καθώς και των βιοσυνθετικών μονοπατιών τους. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αποτελέσουν επιβλαβείς παράγοντες για τις κυτταρικές δομές, όπως τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, οι πρωτεΐνες, αλλά και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι δυσμενείς αυτές επιδράσεις, που είναι κοινώς γνωστές ως οξειδωτικό στρες, μπορούν να αντισταθμιστούν από αντιοξειδωτικά ένζυμα, αλλά και από την δράση μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μορίων. Παρόλο που τα κύτταρα του οργανισμού διαθέτουν έναν ενδογενή μηχανισμό επιδιόρθωσης ή αναστολής της οξειδωτικής βλάβης, είναι πιθανόν η συσσώρευση τέτοιων βλαβών σε όλη την διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού να οδηγήσει στις παραπάνω, επιβλαβείς για τα μεγαλομόρια συνέπειες, οδηγώντας πιθανώς και σε παθολογικές καταστάσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αρθρίτιδα κ.α.[14], [27].

Πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου

1. Μιτοχόνδρια

Η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου δε διαφέρει από αυτή των υπόλοιπων ελευθέρων ριζών. Τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθώς αυτή τροφοδοτεί τον οργανισμό με σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσιάζει την ιδιομορφία πως δε διαθέτει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και κατά συνέπεια δεν είναι ριζικό είδος. Σε κανονικές συνθήκες η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι περίπου το 2% της συνολικής πρόσληψης του οξυγόνου από τον οργανισμό. Παρόλα αυτά, η ανίχνευση της ρίζας αυτής σε ακέραια μιτοχόνδρια είναι σχετικά δύσκολη και παρουσιάζεται ως συνέπεια της ύπαρξης υπεροξειδικής δισμουτάσης, που θεωρείται μεγάλης δραστικότητας, και μαζί με διάφορα άλλα ένζυμα ξεκινούν το πρώτο βήμα της αποτοξίνωσης, και στη συνέχεια καταλάσες και διάφορες υπεροξειδάσες απομακρύνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η σχέση μεταξύ του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της ρίζας του υπεροξειδίου είναι πως το υπεροξείδιο του υδρογόνου

αποτελεί πρόδρομη ουσία του ριζικού υπεροξειδίου. Τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα να παράγουν 2-3nmol υπεροξειδίου/λεπτό, αναδεικνύοντας έτσι την σημαντικότητά τους ως πηγή αυτής της ρίζας στους οργανισμούς. Τα μιτοχόνδρια ως κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών, έχουν την δυνατότητα να εμπλουτίζονται με αντιοξειδωτικά και στις δύο πλευρές των μεμβρανών τους με σκοπό να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες που είναι δυνατόν να προκύψει. Κύρια αντιοξειδωτικά μόρια που συναντάμε στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων είναι η γλουταθειόνη (GSH), καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Με αυτόν τον τρόπο, οι ρίζες υπεροξειδίου που σχηματίζονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες εξουδετερώνονται σε πρώτη φάση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, και στην συνέχεια σε νερό μέσω της δράσης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου[16], [28].

2. Αντιδράσεις της οξειδάσης της ξανθίνης

Πέρα των μιτοχονδρίων, η οξειδάση της ξανθίνης (XO) αποτελεί σημαντική πηγή της ρίζας υπεροξειδίου. Η XO αποτελεί ένζυμο της φάσης 1, που καταλύει την υδροξυλίωση των πουρινών, και καταλύει την αντίδραση της μετατροπής της υποξανθίνης προς ξανθίνη και στην συνέχεια σε ουρικό οξύ, παράγοντας μέσω των αντιδράσεων αυτών ρίζες υπεροξειδίου[14].

3. Ανοσοποιητικό σύστημα

Επιπλέον ενδογενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα. Η δράση τους οφείλεται στην αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου, δημιουργώντας μια ποικιλία δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το μονοξείδιο του αζώτου, με στόχο την αντιμετώπιση παθογόνων μορίων ή οργανισμών που εισέρχονται στα κύτταρα[25], [29].

4. Κυτόχρωμα P450

Εξίσου σημαντική πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελεί το κυτόχρωμα P450. Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που οφείλεται στο κυτόχρωμα P450 προκύπτει από τις διαρροές του κύκλου αποτοξίνωσης από εξωγενής παράγοντες (π.χ. φάρμακα, ναρκωτικά και άλλες χημικές ουσίες) και μερικών ενδογενών υποστρωμάτων. Οι διαρροές αυτές παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου όπως το

υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου από το κυτόχρωμα P450 έχει την πιθανότητα να προκαλέσει λιπιδική υπεροξειδωση, κυτταρική τοξικότητα και κυτταρική απόπτωση[30].

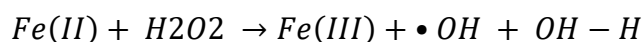
5. Υπεροξεισώματα

Επίσης σημαντικές πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελούν τα κυτταρικά οργανίδια μικροσώματα και τα υπεροξεισώματα. Τα πρώτα μπορούν να ευθύνονται για έως και το 80% της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου που προκύπτει στα κύτταρα, ενώ είναι γνωστό πως τα υπεροξεισώματα παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου, με κύριο τόπο παραγωγής το ήπαρ[31].

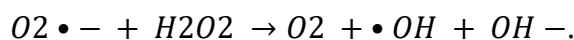
Χημεία και βιοχημεία των δραστικών μορφών οξυγόνου

Το ανιόν του υπεροξειδίου, που είναι αποτέλεσμα μεταβολικών διεργασιών ή προκύπτει ως αποτέλεσμα της δράσης της ακτινοβολίας στο οξυγόνο, εκτιμάται πως είναι η πρωταρχική δραστική μορφή οξυγόνου η οποία στην συνέχεια μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Οι διεργασίες αυτές συχνά γίνονται παρουσία μεταλλικών ιόντων. Σημαντική ιδιότητα του ανιόντος του υπεροξειδίου είναι πως δεν αντιδρά απευθείας με μακρομόρια όπως πεπτίδια, σάκχαρα ή νουκλεϊκά οξέα. Η εξάντληση του υπεροξειδίου γίνεται μέσω μιας αντίδρασης όπου το υπεροξειδίου μαζί με υδρογόνο αντιδρούν με την βοήθεια ενζύμων SOD, που επιταχύνουν την διαδικασία. Μαζί με τα ένζυμα της SOD μπορούν να λειτουργούν παράλληλα και άλλα ένζυμα, όπως η καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που συμβάλουν τελικά στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

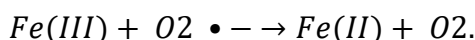
Η παραγωγή αρκετών ελευθέρων ριζών είναι στενά συνδεδεμένη με την παρουσία μεταλλικών ιόντων, όπως για παράδειγμα ιόντα σιδήρου. Θεωρείται πως η ρύθμιση του σιδήρου εξασφαλίζει ότι δεν θα απομείνει σίδηρος ελεύθερος εντός του ενδοκυτταρικού χώρου ώστε να συνεισφέρει στις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών. Τα μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος έχουν τη δυνατότητα να συμμετέχουν σε αντιδράσεις Fenton, μέσω των οποίων παράγεται η εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου:



Η ρίζα του υπεροξειδίου, επίσης, συμμετέχει στην αντίδραση Haber-Weiss:



Στην αντίδραση αυτή συνδυάζονται η αντίδραση Fenton και η αναγωγή του Fe(III) με υπεροξείδιο, δίνοντας:



Όσον αφορά την ρίζα υδροξυλίου, είναι γνωστό πως ο χρόνος ζωής της εντός υδατικού διαλύματος είναι πολύ μικρός (1 ns), με αποτέλεσμα αυτή να αντιδρά κοντά στο σημείο παραγωγής της. Η παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου μπορεί να επιτευχθεί μέσω μηχανισμών όπως για παράδειγμα η ιονίζουσα ακτινοβολία που προκαλεί την διάσπαση του νερού (H₂O) σε ένα άτομο υδρογόνου και μια ρίζα υδροξυλίου. Η ρίζα υδροξυλίου έχει την ικανότητα να αντιδράσει με το βάσεις του DNA οδηγώντας στην θραύση των κλώνων και των βάσεων του DNA[32].

Επιπλέον ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο και είναι δυνατό να παραχθούν σε ζωντανά συστήματα, είναι οι ρίζες περοξυλίου (ROO•) οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή ενέργεια. Αρκετά ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των ριζών περοξυλίου είναι η ποικιλομορφία των βιολογικών αντιδράσεων όπου και συμμετέχουν. Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων μπορεί να είναι βλάβες στο DNA, αλλά και τροποποίηση των πρωτεϊνών[14].

Οξειδωτικό Στρες

Ορισμός του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες σαν έννοια εισήχθη από τον Helmut Sies το 1985, ο οποίος έδωσε και τον πρώτο ορισμό του. Αυτό, αλλά και άλλα επιτεύγματα του Sies ενέπνευσαν αρκετές έρευνες που γύρω από το οξειδωτικό στρες, και κατέληξαν σε μία ευρέως αποδεκτή έννοια η οποία χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, όπως η βιολογία και η ιατρική. Η έννοια του οξειδωτικού στρες είναι σημαντική για την προσαρμογή των οργανισμών στο περιβαλλοντικό στρες. Για να προοδεύσει ο τομέας

του οξειδωτικού στρες είναι αναγκαίο να εκσυγχρονιστούν πολλά καθοριστικά σημεία. Ο ορισμός ο οποίος δόθηκε από τον Sies για το οξειδωτικό στρες είναι: «μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικού-αντιοξειδωτικού υπέρ του πρώτου, που οδηγεί σε βλάβη». Το σημείο κλειδί του ορισμού του Sies βρίσκεται στην διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών. Μετέπειτα ο Sies προχώρησε στην ενημέρωση του ορισμού που είχε δώσει σε: «μία ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που ενδεχομένως οδηγεί σε βλάβη, ονομάζεται οξειδωτικό στρες» [33]. Το αποτέλεσμα που προκύπτει λόγω της παραπάνω ανισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών, όπως για παράδειγμα των ελευθέρων ριζών, και της αντιοξειδωτικής άμυνας, είναι στενά συνδεδεμένο με βλάβες σε ένα μεγάλο φάσμα μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Το οξειδωτικό στρες βραχυπρόθεσμα μπορεί να εμφανιστεί στους ιστούς που έχουν υποστεί τραυματισμό, λοίμωξη, τραυματισμό λόγω έκθεσης σε θερμότητα, σε τοξίνες, αλλά και εξαιτίας της υπερβολικής άσκησης. Οι ιστοί που έχουν τραυματιστεί είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή αυξημένων ενζύμων παραγωγής ριζών (όπως είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η λιπογενάση και η κυκλοοξυγενάση), την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, την απελευθέρωση μεταλλικών ιόντων, ή την διαταραχή αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παράγοντας έτσι περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου[23].

Οξειδωτικό στρες και ανθρώπινες νόσοι

Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της φλεγμονής, και της διαδικασίας της γήρανσης. Το οξειδωτικό στρες πλέον πιστεύεται πως έχει σημαντική συμβολή σε φλεγμονώδεις ασθένειες (π.χ. αρθρίτιδα, αγγειίτιδα), ισχαιμικές παθήσεις (π.χ. εγκεφαλικά επεισόδια), καρδιακές παθήσεις, εντερική ισχαιμία, αιμοχρωμάτωση, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, αλλά και νευρολογικές

διαταραχές (νόσος Alzheimer, νόσος Parkinson). Σημαντική είναι, επίσης, η οξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες, που προκαλεί αλλαγές στην δομή και την λειτουργία τους, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε δυνητικά παθοφυσιολογικές καταστάσεις[14].

Αναφορικά με τις καρδιαγγειακές νόσους υπάρχει μεγάλος προβληματισμός, καθώς συνεχίζουν να αποτελούν την αιτία θανάτου περίπου του 50% των ανθρώπων στις μέρες μας. Τα οξειδωτικά αυτά γεγονότα είναι ικανά να επηρεάσουν την έκφραση των καρδιαγγειακών παθήσεων και ως εκ τούτου, η μείωση τους είναι ικανή να προσφέρει πολύ μεγάλα οφέλη για την υγεία και την διάρκεια ζωής του ανθρώπου. Σημαντικός είναι ο ρόλος των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς η οξειδωση των συγκεκριμένων λιπιδικών συστατικών παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Τα κύτταρα των αγγείων έχουν την ικανότητα να απελευθερώσουν ελεύθερες ρίζες οι οποίες οδηγούν σε υπεροξειδωση των λιπιδίων. Όταν το επίπεδο αυτών των οξειδωμένων λιπιδίων διατηρείται υψηλό, η βλάβη στα αιμοφόρα αγγεία συνεχίζεται και υπάρχει πλέον η πιθανότητα για την δημιουργία της αθηροσκλήρωσης[33].

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου σχετίζονται επίσης με τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, καθώς η αντίδραση των ελευθέρων ριζών με το DNA έχει ως αποτέλεσμα την θραύση των κλώνων του. Οι ελεύθερες ρίζες έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές πως σχετίζεται με την καρκινογένεση και την μεταλλαξιγένεση. Η επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης, που είναι η πιο γνωστή βιολογική επίδραση της ακτινοβολίας, προκαλείται κυρίως μέσω της βλάβης του DNA από τη ρίζα υδροξειδίου καθώς και από την απευθείας επίδραση της ακτινοβολίας στο DNA[34], [35], [36].

Μπορεί η γήρανση να μη συνιστά μια ασθένεια, ωστόσο είναι γνωστό πως το ανθρώπινο σώμα βρίσκεται σε μια μόνιμη σχέση μαζί της. Στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες, έρευνες έχουν δείξει πως τα κύτταρα που υπόκεινται σε βλάβες, λόγω των παραπάνω ελευθέρων ριζών, μπορούν να οδηγηθούν σε αλλαγές που σχετίζονται με τη γήρανση. Απόδειξη της διασύνδεσης, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μεταξύ των εν λόγω αντιδραστικών και δυνητικά καταστροφικών μορίων αποτελεί ο αυξανόμενος αριθμός διαταραχών και ασθενειών που παρατηρείται κατά τη γήρανση

των κυττάρων και των οργανισμών. Κύριος μηχανισμός της γήρανσης είναι η συσσώρευση βλαβών στα κύτταρα, και στις λειτουργίες τους αλλά και στο ίδιο το DNA. Στόχος της καθυστέρησης της γήρανσης σαν διαδικασία αποτελεί είτε η μείωση των ίδιων των ελευθέρων ριζών, είτε η μείωση του ρυθμού με τον οποίο παράγονται. Έρευνες έχουν δείξει πως το οξειδωτικό στρες μπορεί να εμφανιστεί κατά την διαδικασία της γήρανσης και η αντιοξειδωτική κατάσταση είναι ικανή να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό τις επιπτώσεις της οξειδωτικής βλάβης που συσχετίζεται με την πρόοδο της ηλικίας[14], [37].

Οξειδωτικό στρες και βλάβες στα μακρομόρια

1. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικούς στόχους των ελεύθερων ριζών, και μπορούν να τροποποιηθούν οξειδωτικά με τρεις τρόπους:

- Οξειδωτική τροποποίηση συγκεκριμένου αμινοξέος,
- Διάσπαση πεπτιδίων με μεσολάβηση ελευθέρων ριζών, και
- Σχηματισμός πρωτεϊνικής διασύνδεσης λόγω αντίδρασης με προϊόντα υπεροξείδωσης λιπιδίων.

Οι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν αμινοξέα όπως είναι η λυσίνη, η κυστεΐνη, η αργινίνη και η ιστιδίνη, έχει βρεθεί πως είναι οι πιο ευάλωτες στην οξείδωση. Η τροποποίηση των πρωτεϊνών με την μεσολάβηση των ελευθέρων ριζών αυξάνει την ευαισθησία στην ενζυμική πρωτεόλυση. Η βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στα πρωτεϊνικά μόρια μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των ενζύμων, καθώς και των υποδοχέων και της μεμβράνης. Τα προϊόντα των πρωτεϊνών τα οποία έχουν υποστεί βλάβες εξαιτίας του οξειδωτικού στρες είναι πιθανό να περιέχουν ιδιαίτερα δραστικές ομάδες που μπορεί να συμβάλλουν σε μη αναστρέψιμες βλάβες στις μεμβράνες και σε άλλες πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν βλάβες στις πρωτεΐνες σχηματίζοντας καρβονυλικές ομάδες, μία μη αναστρέψιμη διαδικασία. Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει το μηχανισμό μεταγωγής του σήματος, της ενζυμικής δραστηριότητας, και της ευαισθησίας στην πρωτεόλυση[38].

2. DNA

Στην προσπάθειά τους να προσλάβουν ένα ηλεκτρόνιο οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσβάλλουν το DNA οδηγώντας σε ρήξεις και βλάβες των μηχανισμών επιδιόρθωσής του. Η επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας αλλά και των ROS έχει την ικανότητα να οξειδώνει τις αζωτούχες βάσεις του DNA, και ιδιαίτερα τη γουανίνη προς σχηματισμό 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη. Το προϊόν αυτό, στην περίπτωση που δεν τροποποιηθεί από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, μπορεί να οδηγήσει σε πρόκληση μεταλλάξεων του γενετικού υλικού, οι οποίες όταν συσσωρευτούν μπορούν να επιφέρουν καρκινογένεση ή κυτταρική γήρανση[39]. Επιπλέον, μεταστροφή βάσεων μπορεί να συμβεί από την επίδραση των RNS στις βάσεις του DNA, με αποτέλεσμα σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες πιθανώς να επιφέρουν βλάβες στο κύτταρο εάν δεν επιδιορθωθούν. Οι μεταβολές αυτές που συμβαίνουν εξαιτίας της δράσης των ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της βλάβης του DNA λόγω οξειδωτικού στρες[14], [40]

3. Λιπίδια

Οι κυτταρικές μεμβράνες απαρτίζονται από λιπίδια, τα οποία σχηματίζουν δομές που διαχωρίζουν το εξωκυττάριο με το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Αποτελούν σημαντικούς στόχους των ROS, οδηγώντας σε αντιδράσεις υπεροξειδωσης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια διαδικασία η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω αντιδράσεις με άλλα βιομόρια, αποτελώντας το σημείο έναρξης ενός καταρράκτη αντιδράσεων, ενισχύοντας έτσι τις βιοχημικές αλλοιώσεις. Η λιπιδική υπεροξειδωση συμβαίνει κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία εξαιτίας της δομής τους αποτελούν συχνό στόχο των ελεύθερων ριζών. Αποτέλεσμα των μεταβολών αυτών είναι ο σχηματισμός ενώσεων, όπως είναι για παράδειγμα τα αλκάνια, η μαλαναλδεΐδη και τα ισοπροτάνια. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες της υπεροξειδωσης λιπιδίων και έχουν επαληθευτεί σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson, και το Alzheimer, αλλά και σε τραυματισμό ισχαιμικής επαναιμάτωσης, καθώς και στο διαβήτη[41].

Αντιοξειδωτικά

Ο όρος αντιοξειδωτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναφερθεί σε μια χημική ουσία με την ικανότητα να εμποδίζει την κατανάλωση οξυγόνου. Στα τέλη του 19ου αιώνα και στις αρχές του 20ου αιώνα, αφιερώθηκαν εκτεταμένες μελέτες για τις χρήσεις των αντιοξειδωτικών σε σημαντικές βιομηχανικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η πρόληψη της διάβρωσης των μετάλλων, ο βουλκανισμός του καουτσούκ, και ο πολυμερισμός των καυσίμων στη ρύπανση των κινητήρων εσωτερικής καύσης.

Άλλες πρώιμες έρευνες σχετικά με το ρόλο των αντιοξειδωτικών στη βιολογία επικεντρώθηκαν στη χρήση τους αναφορικά με την πρόληψη της οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η αναγνώριση των βιταμινών Α, Σ και Ε ως αντιοξειδωτικά ήταν αυτή που έφερε την επανάσταση στον τομέα, και οδήγησε στη συνειδητοποίηση της σημασίας των αντιοξειδωτικών στη βιοχημεία των ζωντανών οργανισμών. Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών διερευνήθηκαν για πρώτη φορά όταν αναγνωρίστηκε ότι μία ουσία με οξειδωτική δράση είναι πιθανό να είναι αυτή που οξειδώνεται εύκολα[42].

Ένα αντιοξειδωτικό είναι μία ουσία η οποία είναι αρκετά σταθερή, και έχει την ικανότητα να προσφέρει να ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντάς την, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητά της να προκαλέσει βλάβες. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να καθυστερούν ή αναστέλλουν την κυτταρική βλάβη λόγω ελευθέρων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες, τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση πριν καταστραφούν σημαντικά μεγαλομόρια. Κάποια από αυτά τα αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειόνης, της ουβικινόλης και του ουρικού οξέος, παράγονται κατά την διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού στο σώμα, ενώ υπάρχουν και αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής[43], [44].

Αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν στον οργανισμό ως συλλέκτες ελευθέρων ριζών, δότες υδρογόνου, δότες ηλεκτρονίων, αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων, ενώ είναι καλοί συνεργιστικοί και χηλικοί παράγοντες μετάλλων. Τόσο τα ενζυμικά όσο και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν παρουσία στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον για την εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου.

Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών

Αναφορικά με τους μηχανισμούς δράσης των αντιοξειδωτικών έχουν προταθεί δύο βασικοί μηχανισμοί. Ο πρώτος μηχανισμός είναι ένας μηχανισμός θραύσης αλυσίδας, σύμφωνα με τον οποίο το κύριο αντιοξειδωτικό μόριο προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στα συστήματα. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την απομάκρυνση των δραστικών μορφών οξυγόνου, καθώς και μορίων-εκκινητών των δραστικών μορφών αζώτου, μέσω της απομάκρυνσης του μορίου που εκκινεί την αλυσίδα. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να ασκήσουν την επίδραση τους στα βιολογικά συστήματα με διαφορετικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένης της προσφοράς ηλεκτρονίων, της συμπλοκής μεταλλικών ιόντων, καθώς και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης[45].

Τα αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν στα συστήματα άμυνας του οργανισμού έχουν την ιδιομορφία να δρουν σε διαφορετικά επίπεδα όπως είναι η πρόληψη, η απομάκρυνση, η επιδιόρθωση, και *de novo* σύνθεση, καθώς και η προσαρμογή που αποτελεί την τέταρτη γραμμή άμυνας. Η πρώτη γραμμή άμυνας του κυττάρου αποτελείται από τα αντιοξειδωτικά πρόληψης, τα οποία έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών. Για την καταστολή των αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών δρουν ορισμένα αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία μειώνουν εκ των προτέρων τον αριθμό των υδροϋπεροξειδίων και των υπεροξειδίων του υδρογόνου μετατρέποντάς τα σε αλκοόλες και νερό, αντίστοιχα, χωρίς την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση, η PHGPx

(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) είναι μερικά από τα ένζυμα που μετατρέπουν τα υπεροξειδία των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Η PHGPx είναι το μοναδικό αντιοξειδωτικό έχει την ικανότητα να απομακρύνει τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων που ενσωματώνονται στις βιομεμβράνες. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου στο νερό[46].

Η δεύτερη γραμμή άμυνας είναι τα αντιοξειδωτικά τα οποία σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες με σκοπό είτε να καταστείλουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων είτε να διακόψουν τις αντιδράσεις. Σήμερα είναι γνωστά πολλά αντιοξειδωτικά μόρια ριζικής απομάκρυνσης, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες που χαρακτηρίζονται από το αν είναι υδρόφιλα ή λιπόφιλα. Η βιταμίνη C, το ουρικό οξύ, η χολερίθρη, η αλβουμίνη και οι θειόλες είναι σημαντικά υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ενώ η βιταμίνη E και η ουβικινόλη είναι σημαντικά λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, με τη βιταμίνη E να αποτελεί το πιο δραστικό λιπόφιλο μόριο απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών.

Η τρίτη γραμμή άμυνας είναι τα αντιοξειδωτικά με ικανότητα να επιδιορθώνουν από την αρχή (*de novo*) τη βλάβη που έχει προκληθεί από τις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεϊνάσες, πρωτεάσες και πεπτιδάσες) που υπάρχουν στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων, τα οποία αναγνωρίζουν, αποσυνθέτουν, και τελικά απομακρύνουν οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη συσσώρευσή τους.

Καθοριστικό ρόλο στην όλη διαδικασία άμυνας έχουν και τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA κατά της οξειδωτικής βλάβης. Διάφορα είδη ενζύμων όπως είναι οι γλυκοζυλάσες και οι νουκλεάσες είναι γνωστές για την ικανότητά τους να επιδιορθώνουν το κατεστραμμένο DNA.

Άλλη μια σημαντική αμυντική λειτουργία αποτελεί αυτό που ονομάζεται προσαρμογή, όπου το σήμα για την παραγωγή και τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προκαλεί τον σχηματισμό και την μεταφορά του κατάλληλου αντιοξειδωτικού στη σωστή θέση[23].

Αντιοξειδωτικά ένζυμα

1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Τα κύτταρα μπορούν να προστατευτούν από το οξειδωτικό στρες μέσω ενός δικτύου στο οποίο αλληλεπιδρούν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Σε αυτό το δίκτυο, το υπεροξείδιο που απελευθερώνεται από διαδικασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση μπορεί να μετατραπεί αρχικά σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, και στη συνέχεια σε νερό, απομακρύνοντας με τον τρόπο αυτό το υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο μπορεί δυνητικά να προκαλέσει βλάβες. Η συγκεκριμένη οδός αποτοξίνωσης είναι αποτέλεσμα πολλαπλών ενζύμων, με την υπεροξειδική δισμουτάση που καταλύει το πρώτο βήμα και στη συνέχεια καταλάσες και διάφορες υπεροξειδάσες απομακρύνοντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs) είναι μια κατηγορία στενά συνδεδεμένων ενζύμων που καταλύουν την διάσπαση του ανιόντος υπεροξειδίου στα λιγότερο δραστικά μόρια οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες εντοπίζονται σε σχεδόν όλα τα αερόβια κύτταρα και στα εξωκυτταρικά υγρά. Υπάρχουν τρεις μεγάλες οικογένειες ισομορφών της υπεροξειδικής δισμουτάσης, και χαρακτηρίζονται από το μέταλλο το οποίο δεσμεύουν. Τέλος, ο τύπος που δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο εντοπίζεται στο κυτοσόλιο, στους χλωροπλάστες, υπεροξεισώματα και αποπλάστες. Αναφορικά με τον άνθρωπο, υπάρχουν τρεις ισομορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης, με την SOD1 (CuZn-SOD) που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, την SOD2(Mn-SOD)που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, και την SOD3 (EC-SOD)που εντοπίζεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον[47].

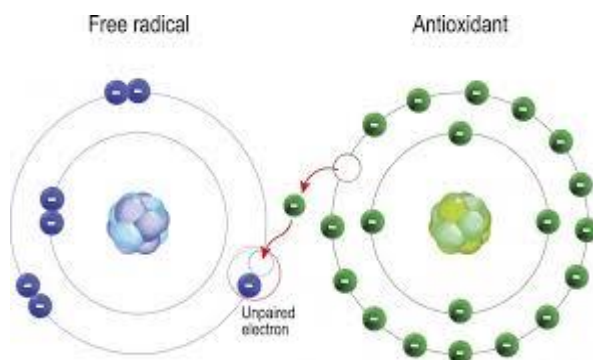
2. Καταλάση(CAT)

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο που εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς, οι οποίοι εκτίθενται στο οξυγόνο. Βασική λειτουργία του είναι η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως έχει αναφερθεί, είναι ένα επιβλαβές προϊόν πολλών φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών και για να αποφευχθεί η οποιαδήποτε βλάβη, πρέπει να μετατραπεί το συντομότερο δυνατό σε άλλες, λιγότερο δραστικές ουσίες. Για τον σκοπό αυτό η καταλάση χρησιμοποιείται σε τακτικό βαθμό από τα κύτταρα για να

καταλύσει γρήγορα τη μετατροπή αυτή. Όλα τα ζώα χρησιμοποιούν την καταλάση σε όλα τους τα όργανα, με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις να εντοπίζονται στο ήπαρ[48].

3. Ένζυμα του συστήματος της γλουταθειόνης

Αυτό το σύστημα εντοπίζεται στα ζώα, στα φυτά και στους μικροοργανισμούς. Περιλαμβάνει τη γλουταθειόνη (ένα μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό), την αναγωγή της γλουταθειόνης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, και τις S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο το οποίο περιέχει τέσσερις συμπράγοντες σεληνίου που καταλύουν την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων. Στα ζώα υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα ισοένζυμα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 αποτελεί το πιο άφθονο από αυτά τα ισοένζυμα και είναι ένας πολύ αποτελεσματικός καθαριστής του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 4 είναι η πιο δραστική έναντι των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων. Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα με υπεροξείδια λιπιδίων. Αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στο ήπαρ και χρησιμεύουν επίσης στην αποτοξίνωση[47].



Εικόνα 4: Λειτουργία αντιοξειδωτικών[107]

Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

1. Βιταμίνη C

Το ασκορβικό οξύ, το οποίο είναι κοινώς γνωστό και ως βιταμίνη C, είναι ένας μονοσακχαρίτης ο οποίος εντοπίζεται σε ζώα και φυτά. Ωστόσο στον άνθρωπο δεν είναι δυνατή η σύνθεση του και λαμβάνεται αποκλειστικά από την διατροφή.

Βασική λειτουργία του ασκορβικού οξέως είναι η αναγωγή που οδηγεί στην εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, καθιστώντας το έναν σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα. Επιπρόσθετα, πέρα από τις άμεσες αντιοξειδωτικές του επιδράσεις, το ασκορβικό οξύ αποτελεί επίσης υπόστρωμα για το αντιοξειδωτικό ένζυμο ασκορβική υπεροξειδάση, της οποίας η λειτουργία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αντοχή στο οξειδωτικό στρες στα φυτά[49].

2. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα πεπτίδιο που περιέχει κυστεΐνη και βρίσκεται στις περισσότερες μορφές της αερόβιας ζωής. Συντίθεται στα κύτταρα από αμινοξέα του οργανισμού, καθώς και από αυτά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές της οφείλονται στην ομάδα της θειόλης που περιέχει στο τμήμα της κυστεΐνης, καθώς αυτή είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει οξείδωση και αναγωγή. Στα κύτταρα η γλουταθειόνη διατηρείται στην ανοιγμένη μορφή της (GSH) από το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης, και με την σειρά της μπορεί να ανάγει άλλους μεταβολίτες και ενζυμικά συστήματα καθώς, και να αντιδρά άμεσα με οξειδωτικά μόρια όπως οι ρίζες υδροξυλίου. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσής της και του ρόλου που διαδραματίζει στην διατήρηση της οξειδαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου, η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά των κυττάρων[50].

3. Μελατονίνη

Η μελατονίνη (N-ακετυλο-5-μεθοξυτρυπταμίνη) είναι μια φυσικά προερχόμενη ορμόνη που εντοπίζεται στα ζώα και σε ορισμένους άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των αλγών. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που έχει την ιδιότητα να διασχίζει τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς και το προστατευτικό υγρό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά, η μελατονίνη δεν υφίσταται κύκλο οξειδαναγωγής, δηλαδή δεν υφίσταται επαναλαμβανόμενη μείωση και οξείδωση. Η μελατονίνη όταν

οξειδώνεται δεν μπορεί να επιστρέψει στην προηγούμενη κατάστασή της, διότι σχηματίζει αρκετά σταθερά τελικά προϊόντα όταν αντιδρά με ελεύθερες ρίζες, και για αυτό τον λόγο ονομάζεται και τερματικό αντιοξειδωτικό[51].

4. Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε είναι μία συλλογική ονομασία η οποία αναφέρεται σε ένα σύνολο οκτώ τοκοφερολών και τοκοτριενολών, οι οποίες είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Από αυτές, η α-τοκοφερόλη είναι αυτή που έχει μελετηθεί περισσότερο, καθώς έχει την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα, με το σώμα να απορροφά και να μεταβολίζει κατά προτίμηση αυτή την μορφή. Έχει υποστηριχθεί ότι η α-τοκοφερόλη είναι το πιο σημαντικό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό και πως έχει την ικανότητα να προστατεύει τις μεμβράνες από οξείδωση, αντιδρώντας με ελεύθερες ρίζες λιπιδίων που είναι αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Με αυτό τον τρόπο, η α-τοκοφερόλη αφαιρεί τα ενδιάμεσα προϊόντα των ελευθέρων ριζών και εμποδίζει την συνέχιση της αλυσιδωτής αντίδρασης. Αποτέλεσμα της παραπάνω αντίδρασης είναι η παραγωγή οξειδωμένων ριζών α-τοκοφερολοξυλίου που μπορούν να ανακυκλωθούν πίσω στην αρχική τους μορφή μέσω της αναγωγής από άλλα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ, η ρετινόλη και η ουβικινόλη. Επιπλέον, η βιταμίνη Ε έχει ενεργό ρόλο στην πρόληψη διάφορων καρδιαγγειακών παθήσεων[52].

5. Ουρικό οξύ

Ακόμη ένας μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός παράγοντας είναι το ουρικό οξύ, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου τη μισή αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος.. Ωστόσο, όπως και το ασκορβικό οξύ, μπορεί να μεσολαβήσει στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου.

Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου και ενός υδροξυλίου, που έχει με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ιδιότητες των αρωματικών ενώσεων και των αλκοολών. Οι φαινόλες ανήκουν στην ομάδα των αλκοολών και συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης και σχηματισμού

εστέρων, ενώ η ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου επιτρέπει τη συμμετοχή τους σε αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης[46].

Οι φαινόλες είναι από τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά και κατηγοριοποιούνται στα πρωτογενή αντιοξειδωτικά. Η ύπαρξη του υδροξυλίου είναι αυτή που καθορίζει τη δραστηριότητά τους, και χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτογενών αντιοξειδωτικών είναι πως εξαρτώνται από την ελεύθερη ρίζα που δημιουργείται. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν υψηλή δραστηριότητα κατέχουν δύο ομάδες υδροξυλίου. Οι ενώσεις αυτές έχουν σημαντικό πλεονέκτημα το γεγονός πως είναι αποτελεσματικές σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις, ενώ μερικές από αυτές με την αύξηση της συγκέντρωσης τους φαίνεται να χάνουν την δραστηριότητά τους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, επίσης, κάποιες από αυτές μπορούν να επιταχύνουν τον ρυθμό οξείδωσης[53].

Οι πολυφαινόλες είναι φυσικές ενώσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών με μια ευρεία ποικιλία χημικών δομών. Η παραγωγή τους στα φυτά δεν είναι διόλου τυχαία καθώς οι ενώσεις αυτές έχουν αντιοξειδωτική δράση, και παράγονται ως ένα μέσο προστασίας των φυτών ενάντια σε ασθένειες, στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ προσδίνουν χαρακτηριστικό χρώμα και οσμή, ικανά να προσελκύουν επικονιαστές. Οι πολυφαινόλες έχουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιθηρογόνες, και αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις. Άξιο αναφοράς είναι πως η βιολογική δραστηριότητα των πολυφαινολών σχετίζεται κατά βάση με την δυνατότητα τους να εξουδετερώνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχουν οξειδοαναγωγική βάση, τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να παίξουν κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη και την καταστολή τους. Με αυτόν τον τρόπο, τα πρόσφατα στοιχεία που υπάρχουν επισημαίνουν τον πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο που έχουν οι πολυφαινόλες, και πιο συγκεκριμένα κατά νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως της νόσου Alzheimer[54], [55].

Πολυφαινολικές ενώσεις της ελιάς

Γενικά

Η σύνθεση των πολυφαινολών στον καρπό της ελιάς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η γεωγραφική ζώνη, οι αγροκλιματικές συνθήκες, η ωριμότητα του καρπού, οι ποικιλίες, οι συνθήκες αποθήκευσης ακόμη και οι διαδικασίες κατεργασίας του τελικού προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, οι γενετικές παραλλαγές μεταξύ των ποικιλιών φαίνεται να επηρεάζουν την ποσότητα αλλά και το είδος των πολυφαινολών που υπάρχουν στον καρπό και μεταφέρονται το παραγόμενο τελικό προϊόν[56]. Ως εκ τούτου, οι πολυφαινολικές ενώσεις εμφανίζουν τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές διακυμάνσεις μεταξύ των ποικιλιών, των καρπών και του τελικού προϊόντος του ελαιόλαδου. Επιπρόσθετα, η σύνθεση των πολυφαινολών μπορεί να μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του καρπού, κυρίως κατά τα στάδια της συμπίεσης και της μάλαξης, λόγω της δραστηριότητας ενζύμων ή της διάσπασης των ενώσεων που υπάρχουν στον αρχικό ελαιόκαρπο. Με αυτόν τον τρόπο, μορφές αγλυκόνης της ελευροπαΐνης, όπως είναι η ολεασίνη και η ολεοκανθάλη, καθώς και η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη παρουσιάζουν αύξηση κατά την παραγωγή του ελαιόλαδου. Κατά συνέπεια, οι διαφορετικές τεχνολογικές διαδικασίες μπορούν να επιφέρουν διαφορετικές επιπτώσεις στην περιεκτικότητα των πολυφαινολών. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι μόνο το 0,3-1,5% των πολυφαινολών μεταφέρεται από τον αρχικό ελαιόκαρπο στο ελαιόλαδο, ενώ το 40% καταλήγει στα απόβλητα των ελαιοτριβείων[57], [58].

Πολυφαινολικές ενώσεις της ελιάς

Περισσότερες από 8000 φαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί στα φυτά, ενώ στο ελαιόδενδρο μπορούν να εντοπιστούν στα φύλλα, στα άνθη, στον κορμό και φυσικά στον ελαιόκαρπο[59]. Πολυφαινολικές ενώσεις όπως λιγνάνες και γλυκοσίδια εντοπίζονται κυρίως στον κορμό, ενώ στα φύλλα της ελιάς έχουν βρεθεί φαινολικές αλκοόλες και οξέα, φλαβονοειδή, και σεκοϊριδοειδή, με τις συγκεντρώσεις τους ωστόσο να φτάνουν σε υψηλότερα επίπεδα στον καρπό. Στον καρπό υπάρχουν επίσης μεγάλες ποσότητες ανθοκυανινών, οι οποίες προσδίδουν και το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα στον ώριμο καρπό, ενώ τα άνθη περιέχουν επίσης φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

Στον ελαιόκαρπο οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε παράγωγα σεκοϊριδοειδών, φαινολικές αλκοόλες και φαινολικά οξέα[60], [61].

1. Σεκοϊριδοειδή

Οι ενώσεις αυτές παράγονται από το πρόδρομο μόριο ελενολικό οξύ κατά το μεταβολισμό των τερπενίων, με την ελευρωπαΐνη (3,4 διυδροξυφαινυλαιθανολ-ελενολικό οξύ), και το λιγκουστροζίτη να είναι τα περισσότερο συχνά απαντώμενα μόρια στον ελαιόκαρπο. Η ελευρωπαΐνη συντίθεται μέσω του μεβαλονικού οξέος, ενώ ο λιγκουστροζίτης αποτελεί πρόδρομο μόριό της, και εμφανίζεται σε μεγάλες ποσότητες ακόμα και σε αρχικά στάδια ωρίμανσης του ελαιόκαρπου (~14%). Ευθύνεται για την πικρή γεύση του καρπού, ενώ κατά την ωρίμανσή του μετατρέπεται σε νέες ενώσεις, με αποτέλεσμα τη μικρή ποσότητά της στον ώριμο καρπό. Συγκεκριμένα, κατά την ωρίμανση υδρολύεται σε υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ, και άγλυκο της ελευρωπαΐνης, ενώ μπορεί επίσης να μετατραπεί και σε διμεθυλελευρωπαΐνη[62]. Στο ελαιόλαδο η υδροξυτυροσόλη είναι ο κύριος μεταβολίτης της ελευρωπαΐνης που ανιχνεύεται.

2. Φαινολικές αλκοόλες

Οι σημαντικότερες φαινολικές αλκοόλες στον ελαιόκαρπο είναι η τυροσόλη (p-υδροξυφαινυλαιθανόλη ή p-HPEA), και η υδροξυτυροσόλη (3,4 διυδροξυφαινυλαιθανόλη ή 3,4 DHPEA). Παρά τη σχετικά μικρή συγκέντρωσή τους στον καρπό, μπορεί να αυξηθεί η ποσότητά τους κατά την αποθήκευση λόγω της υδρόλυσης των σεκοϊριδοειδών. Το γεγονός πως οι ενώσεις αυτές έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευσή τους στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων[63], [64]. Η υδροξυτυροσόλη είναι ένα ισχυρό βιοδραστικό μόριο με οφέλη για την υγεία, αλλά κακή βιοδιαθεσιμότητα σε ελεύθερη μορφή. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης οφείλεται σε φαρμακοκινητικές παραμέτρους που αφορούν την πρόσληψη του ελαιολάδου από τον οργανισμό[65].

3. Φαινολικά οξέα

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν κυρίως παράγωγα του βενζοϊκού οξέος. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ και το βανιλλικό οξύ.

Επιπλέον, παράγωγα του κινναμωμικού οξέος έχουν εντοπιστεί στον καρπό της ελιάς. Στην ελιά επίσης εντοπίζονται το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ μπορεί να παρέχει αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων καθώς επίσης και αντιοξειδωτική δράση, αυξάνοντας την διατροφική αξία [66].

4. Άλλες φαινολικές ενώσεις

Στον ελαιόκαρπο απαντώνται επίσης φλαβονοειδή, τα οποία συνήθως τροποποιούνται περαιτέρω μέσω γλυκοζυλίωσης, οδηγώντας σε νέες ενώσεις όπως φλαβόνες και φλαβονόνες. Αναφορικά στον ελαιόκαρπο τα φλαβονοειδή που συναντώνται συχνότερα είναι η λουτεολίνη και απιγενίνη, που με την τροποποίηση τους μετατρέπονται σε λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη και απιγενίνη-7-γλυκοσίδη αντίστοιχα. Επιπλέον, λιγνάνες μπορούν να ανιχνευθούν και στον πυρήνα του ελαιόκαρπου[67], [68]. Οι λιγνάνες αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των φαινολών του ελαιόλαδου, παρόλο που το γιατί δεν είναι ξεκάθαρο. Οι ενώσεις αυτές δεν εντοπίζονται στα φύλλα και τα κλαδιά του ελαιόδεντρου. Οι ενώσεις που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι η 1-ακετοξυπινορεσινόλη και η 1-πινορεσινόλη[69].

Σκοπός

Η διαδικασία της ελαιοποίησης είναι η μέθοδος κατεργασίας κατά την οποία ο καρπός της ελιάς γίνεται ελαιόλαδο. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας είναι δυνατόν να προκύψουν διάφορα παραπροϊόντα, αλλά και απόβλητα τα οποία είναι ανάγκη να βρεθεί ένας τρόπος να αξιοποιηθούν, καθώς είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά. Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος διάφορων φυτοχημικών εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε ενώσεις που εντοπίζονται σε τέτοιου είδους προϊόντα, καθώς και συνολικών παραπροϊόντων ελαιουργίας, με στόχο την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης *in vitro*. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με ένα εύρος αντιοξειδωτικών μεθόδων (μέθοδοι DPPH•, ABTS^{•+}, Superoxideradical, Reducingpowerassay), ενώ έγινε και εκτίμηση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (μέθοδος Folin-Ciocalteu).

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Πίνακας 1. Χημική σύσταση των εξεταζόμενων δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ	% ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ /ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ
Δ3	Υδροξυ-τυροσόλη 5%	14.4
Δ4	Υδροξυ-τυροσόλη 2%	14.0
Δ5	Υδροξυ-τυροσόλη 4%	14.2
Δ6	Υδροξυ-τυροσόλη 2%	13.8
Δ7	5% Μασλινικό οξύ 1% Ελευρωπαΐνη	10.3

2.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu

Αρχή της μεθόδου

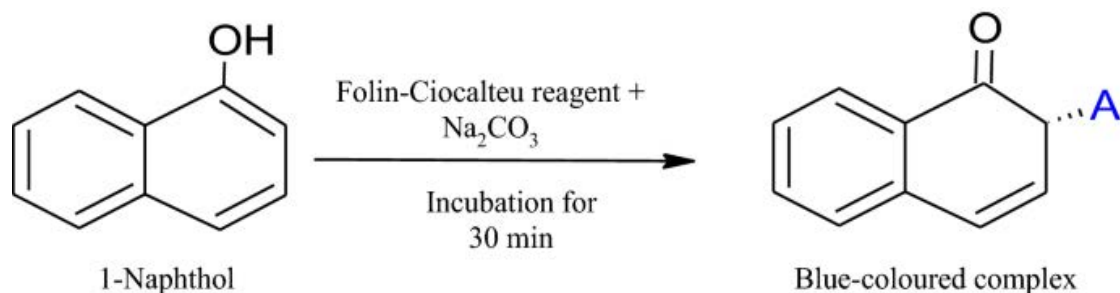
Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξειδαναγωγική αντίδραση των πολυφαινολικών συστατικών των δειγμάτων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (ένα μίγμα φωσφομολυβδαινικών και φωσφοβολφραμικών ενώσεων), προκαλώντας την αλλαγή χρώματος προς ένα μπλε σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου, το οποίο μπορεί να μετρηθεί μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού φωτός. Η ένταση του μπλε χρώματος το οποίο δημιουργείται εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων γίνεται στα 765nm και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη παρασκευασμένη από γαλλικό οξύ.

Πειραματική διαδικασία

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα Na_2CO_3 25% w/v
- Διάλυμα Folin-Ciocalteu

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την παρασκευή του διαλύματος Na_2CO_3 . Στην συνέχεια σε πλαστικό σωληνάκι Eppendorf των 2ml προστέθηκαν 1.000μl απιονισμένου νερού, 100μl αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, και 20μl του εξεταζόμενου δείγματος. Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε ένα αρνητικό δείγμα (απουσία του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu), με προσθήκη 1100μl απιονισμένου νερού και 20μl του εξεταζόμενου δείγματος, ενώ το τυφλό περιείχε 20μl απιονισμένο νερό. Έπειτα από τρίλεπτη επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν 280μl Na_2CO_3 , και 600 μl απιονισμένο νερό. Τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex, και έγινε επώαση για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/ml εκχυλίσματος με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για δύο διαφορετικές επαναλήψεις.



Εικόνα 4: Αντίδραση Folin-Ciocalteu [74]

2.1.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας $\text{DPPH}^\bullet$

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH• (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλνυδραζύλιο), η οποία μπορεί να προσλάβει ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο από τα αντιοξειδωτικά μόρια, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της, καθιστώντας την ιδανικό μόριο για τον έλεγχο ουσιών που μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική δράση. Όταν το DPPH• βρεθεί εντός ενός διαλύματος που μπορεί να περιέχει μία ουσία ικανή να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε το βιολετί χρώμα που έχει αποχρωματίζεται, και το ίδιο το DPPH• μετατρέπεται σε DPPH-H (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλνυδραζίνη), το οποίο χαρακτηρίζεται από κίτρινο χρωματισμό. Η ελάττωση της οπτικής απορρόφησης μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm.

Πειραματική διαδικασία

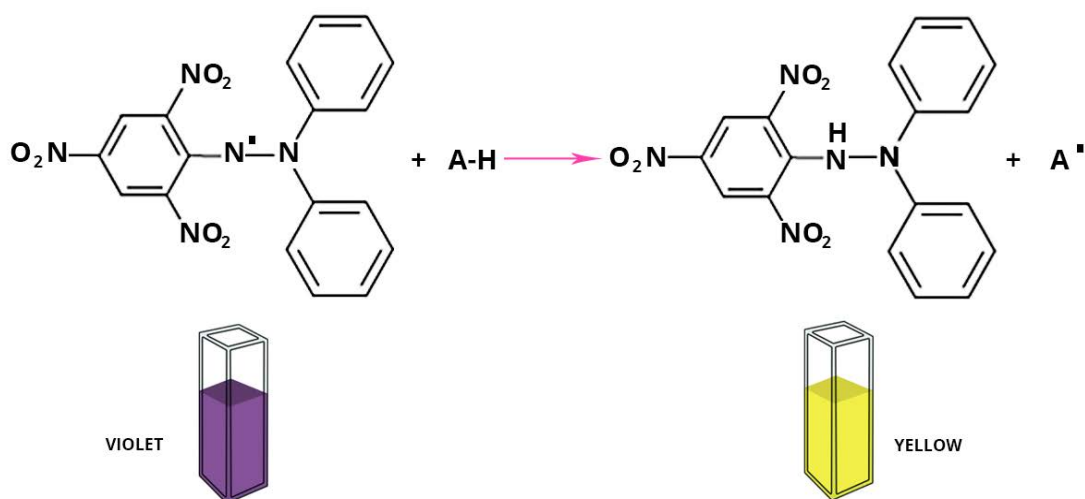
Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα DPPH•(2mM)

Σε πλαστικά σωληνάκια erppendorf των 1,5mlπροστέθηκαν 50 μl του εξεταζόμενου δείγματος σε διαδοχικές αραιώσεις, 950μl μεθανόλη για τα αρνητικά δείγματα και στο μάρτυρα , 900μl μεθανόλη και 50 μl διαλύματος DPPH• (2mM) στα θετικά δείγματα και το μάρτυρα. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε 1ml μεθανόλης. Μετά από ανάδευση με vortex, , επώαση για 520 minστο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και φυγοκέντρωση στα 3000rpm, 20°C, 3min, έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm.Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν σε % ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και υπολογίστηκαν από τον τύπο :

$$\%RSC=(\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας})/\text{απορρόφηση control} * 100.$$

Από τον τύπο αυτό υπολογίστηκε η τιμή IC50, δηλαδή η συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος, ικανή να επιφέρει εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%. Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ (0.4 mg/ml), και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για τουλάχιστον δύο διαφορετικές επαναλήψεις.



Εικόνα 5: Αντίδραση DPPH[74]

2.1.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ρίζας ABTS^{•+}

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων του εξεταζόμενου δείγματος με τη σταθερή αυτή ρίζα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ευρύ φάσμα δειγμάτων, καθώς παρουσιάζει διαλυτότητα σε οργανικούς όσο και σε υδατικούς διαλύτες, και σταθερότητα σε ένα ευρύ φάσμα pH. Η ρίζα αυτή είναι τεχνητή και παράγεται από την οξείδωση του ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)), μέσω της δράσης υπεροξειδάσης (HRP, Horse radish peroxidase) παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Το διάλυμα αυτό φέρει πράσινο χρώμα, ενώ όταν προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση, η οπτική απορρόφηση στα 730 nm ελαττώνεται, εμφανίζοντας διαβαθμίσεις του πράσινου.

Πειραματική διαδικασία

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα ABTS(1mM)

- Διάλυμα H_2O_2 (30 μM)
- HRP (6 μM)

Σε πλαστικά σωληνάκια Eppendorf των 1,5ml 0,400 ml απιονισμένο νερό, 0,500 ml διάλυμα ABTS 1mM, 0,050 ml διάλυμα H_2O_2 30 μM και 0,050 ml διάλυμα HRP 6 mM για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης του δείγματος, ενώ Ίδιες ποσότητες των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή του θετικού μάρτυρα. Αρνητικά δείγματα παρασκευάστηκαν με 0,450 ml απιονισμένο νερό, 0,500 ml διάλυμα ABTS 1mM, και 0,050 ml διάλυμα H_2O_2 30 μM , καθώς και για το τυφλό. Μετά από ανάδευση και 45min επώαση στο σκοτάδι προστέθηκαν 0,050 ml διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος στα θετικά δείγματα και στους αρνητικούς μάρτυρες. Τα δείγματα αναδεύθηκαν, και έπειτα από φυγοκέντρηση τους για τρία λεπτά στα 3.000 rpm ακολούθησε μέτρηση της απορροφησής τους στα 730 nm. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν σε % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας και υπολογίστηκαν από τον τύπο :

$$\% \text{RSC} = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100.$$

Από τον τύπο αυτό υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος, ικανή να επιφέρει εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%. Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ (0.4 mg/ml), και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για τουλάχιστον δύο διαφορετικές επαναλήψεις.

2.1.4 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης του υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot -}$)

Αρχή της μεθόδου

Το υπεροξείδιο ($\text{O}_2^{\cdot -}$) είναι μια δραστική μορφή οξυγόνου η οποία παράγεται σε κύτταρα με αερόβιο μεταβολισμό, συμβάλλοντας στην οξειδοαναγωγική ανισορροπία και οι επιδράσεις του εξουδετερώνονται από συγκεκριμένα ένζυμα. Το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται στα συστήματα PMS-NADH, και ο προσδιορισμός

του γίνεται μέσω της αναγωγής του κίτρινου NBT που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε φορμαζάνης. Το μπλε αυτό διάλυμα που προκύπτει από την αντίδραση αυτή μετράται φασματοσκοπικά στα 560nm.

Πειραματική διαδικασία

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα Tris-HCl (16mM, 8.0 pH)
- Διάλυμα NBT (nitroblue tetrazolium) (300μM)
- Διάλυμα NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) (468μM)
- Διάλυμα PMS (phenazine methosulfate) (60μM)

Σε πλαστικά σωληνάκια eppendorf των 1,5ml προστέθηκαν 0,050 ml διαδοχικών αραιώσεων δείγματος στο θετικό δείγμα και στο αρνητικό δείγμα ελέγχου και 0,050 ml dH₂O προστέθηκαν στον θετικό μάρτυρα. Έπειτα, έγινε προσθήκη του διαλύματος Tris-HCl 16 mM 0,800 ml στο τυφλό, 0,650 ml στο θετικό δείγμα και στον θετικό μάρτυρα και 0,750 ml στο αρνητικό δείγμα ελέγχου. Ακολούθησε προσθήκη 0,125 ml διαλύματος NBT 300 μM και 0,125 ml διαλύματος NADH 468 μM σε όλα τα δείγματα, και 0,125 ml διαλύματος PMS στο δείγμα και στον θετικό μάρτυρα. Τέλος, έγινε ανάδευση των δειγμάτων με vortex, επώαση για 5 min στο σκοτάδι, φυγοκέντρωση τους για τρία λεπτά στα 3.000 rpm, και μέτρηση της απορρόφησης στα 560 nm. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν σε % ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και υπολογίστηκαν από τον τύπο :

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100.$$

Από τον τύπο αυτό υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος, ικανή να επιφέρει εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%. Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ (1mg/ml), και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για τουλάχιστον δύο διαφορετικές επαναλήψεις.

2.1.5 Προσδιορισμός της αναγωγικής ισχύος (Reducing power assay) μέσω της αναγωγής του Fe^{3+}

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή η οποία σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση ενός δείγματος, καθώς ουσίες με αναγωγική ισχύ υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξείδωσης, δρώντας ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Ενώσεις με πιθανή αναγωγική ικανότητα αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , που δίνει ένα σύμπλοκο με τον χλωριούχο σίδηρο, το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700 nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας.

Πειραματική διαδικασία

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (0.2M, pH 6.6)
- Potassium ferricyanide (1% w/v)
- Ferric chloride (0.1% w/v)
- Trichloroacetic acid (TCA) (10% w/v)

Σε πλαστικά σωληνάκια Eppendorf των 1,5ml προστέθηκαν 500μl διαλύματος φωσφορικών για το τυφλό, 250μl διαλύματος για το θετικό μάρτυρα, 200μl διαλύματος για το δείγμα, και 450μl διαλύματος για το αρνητικό δείγμα. Ακολούθησε προσθήκη 250 μl διαλύματος potassium ferricyanide στο θετικό μάρτυρα και στο δείγμα, και επώαση στους 50°C για είκοσι λεπτά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 250 μl διαλύματος TCA, και φυγοκέντρηση για δέκα λεπτά στα 3.000 rpm. 700μl υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάκια όπου προστέθηκαν 250 μl απιονισμένο νερό και 50 μl διάλυμα iron chloride. Αφού έμειναν σε σκοτάδι για δέκα λεπτά τα δείγματα μετρήθηκαν φασματοσκοπικά στα 700nm.

Η αναγωγική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

AU 0,5= απορρόφηση ουσίας -απορρόφηση control

Όπου: AU = absorbance unit, η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που επιφέρει οπτική απορρόφηση 0,500. Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ (0.4 mg/ml), και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για τουλάχιστον δύο διαφορετικές επαναλήψεις.

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος της κατανομής των δειγμάτων μέσω του τεστ Shapiro-Wilk, και στη συνέχεια ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα One-way ANOVA, με σκοπό τον έλεγχο της διαφοράς των μέσων όρων των δειγμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε τεστ για τον έλεγχο της διαφοράς μεταξύ των μέσων όρων των επιμέρους δειγμάτων, μέσω Dunn's ή Holm-Sidak test κατά περίπτωση. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο υπολογιστικό πρόγραμμα Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean $\pm$ SD, και οι διαφορές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

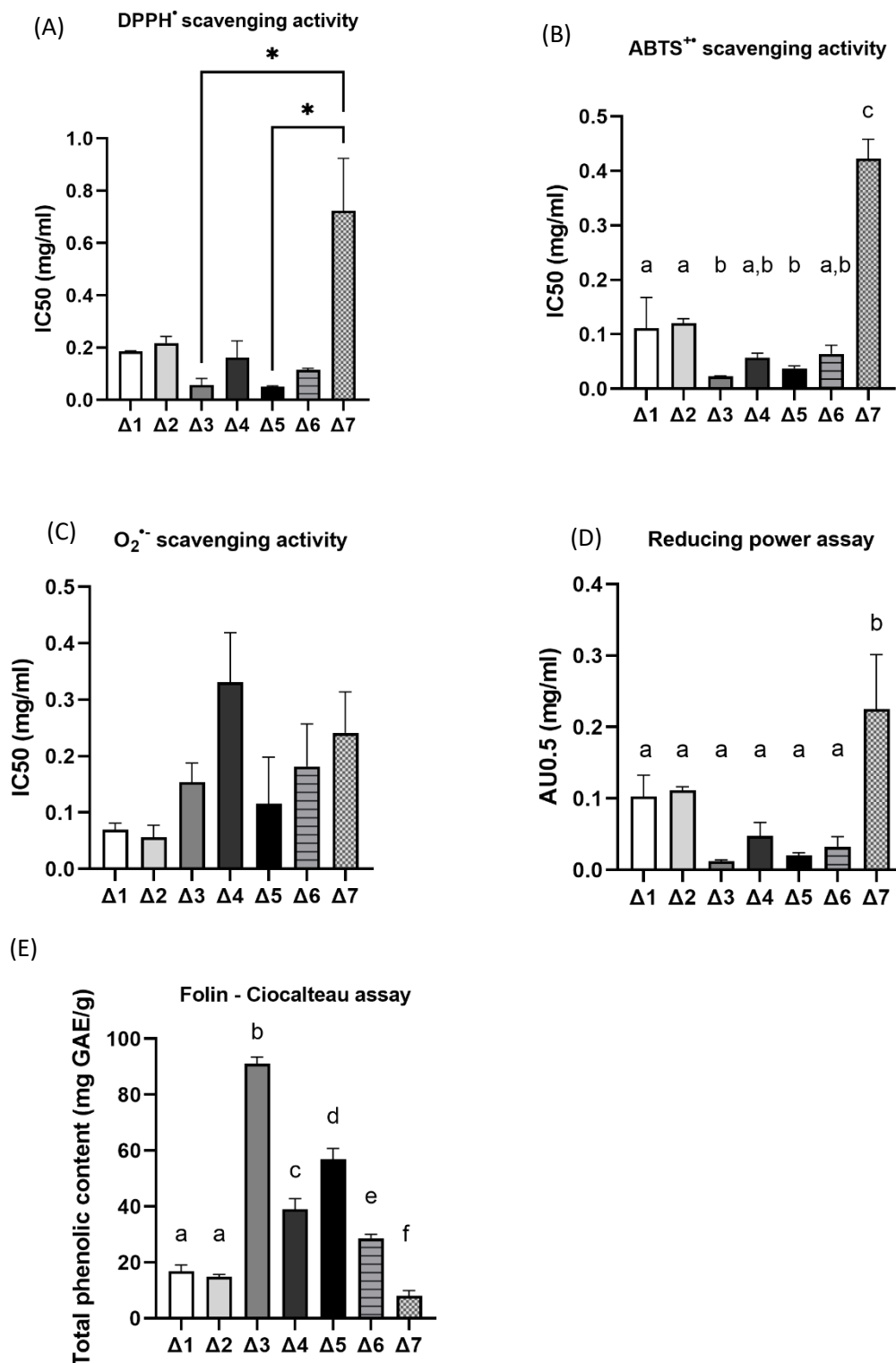
Αποτελέσματα

Μέσοι όροι τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας IC50 (mg/ml), αναγωγικής ισχύος AU0.5 (mg/ml), και συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου TPC (mg GAE/g) για τα εξεταζόμενα δείγματα

Πίνακας 2. Μέσοι όροι των υπολογιζόμενων τιμών IC50, AU0,5 (mg/ml), TPC (mgGAE/g) για τα εξεταζόμενα δείγματα

Δείγμα	DPPH•	ABTS ^{•+}	O ₂ ^{•-}	Reducing power	Folin-Ciocalteu
	IC 50 (mg/ml)		AU 0,5 (mg/ml)		TPC (mg GAE / g)
Δ1	0,1865	0,1110	0,0692	0,1029	16,8379
Δ2	0,2181	0,1201	0,0563	0,1313	15,8773
Δ3	0,0563	0,0232	0,1541	0,0369	91,056
Δ4	0,1991	0,0568	0,3304	0,0473	39,0654
Δ5	0,0496	0,0371	0,1151	0,02	56,8732
Δ6	0,1155	0,064	0,1818	0,0325	28,620
Δ7	0,724	0,4228	0,2411	0,2251	8,0226

Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων δειγμάτων



Γράφημα 1. Αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών μεθόδων για τα εξεταζόμενα δείγματα για τις μεθόδους (A) DPPH[•], (B) ABTS^{•+}, (C) Superoxide (O₂^{•-}), αναγωγικής ισχύος (D) Reducingpower, και συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (E) Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\pm$ SD με επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ενώ διαφορετικό γράμμα υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όπως φαίνεται από το Γράφημα 1, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων στις περισσότερες αντιοξειδωτικές μεθόδους, καθώς και αναφορικά με το πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Γράφημα 1Α, στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ των δειγμάτων Δ3-Δ7 ($p=0.0333$), Δ5-Δ7 ($p=0.0166$), με το δείγμα Δ7 να παρουσιάζει υψηλότερη τιμή IC₅₀ στη μέθοδο DPPH•. Αναφορικά με τη μέθοδο ABTS^{•+}, σύμφωνα με το Γράφημα 1Β, στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των δειγμάτων Δ1 και Δ3 ($p=0.0162$), Δ5 ($p=0.0485$), Δ7 ($p<0.0001$), Δ2 και Δ3 ($p=p=0.0077$), Δ5 ($p=0.023$), Δ7 ($p<0.0001$), Δ3 και Δ7 ($p<0.0001$), Δ4 και Δ7 ($p<0.0001$), Δ5 και Δ7 ($p<0.0001$), και Δ6 και Δ7 ($p<0.0001$), με το δείγμα Δ7 να παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή IC₅₀. Στη μέθοδο Superoxide (O₂^{•-}), όπως παρατηρείται στο Γράφημα 1C, δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στη μέθοδο Reducing power, και σύμφωνα με το Γράφημα 1D οι διαφορές αυτές εντοπίζονται μεταξύ των δειγμάτων Δ1 και Δ7 ($p=0.0109$), Δ2 και Δ7 ($p=0.0413$), Δ3 και Δ7 ($p<0.0001$), Δ4 και Δ7 ($p=0.0004$), Δ5 και Δ7 ($p<0.0001$), και Δ6 και Δ7 ($p=0.002$), με το δείγμα Δ7 να έχει την υψηλότερη τιμή AU_{0.5}. Τέλος, στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ των δειγμάτων αναφορικά με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενό τους. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 1Ε, εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων Δ1 και Δ3 ($p<0.0001$), Δ4 ($p<0.0001$), Δ5 ($p<0.0001$), Δ6 ($p=0.0003$), Δ7 ($p=0.0028$), Δ2 και Δ3 ($p<0.0001$), Δ4 ($p<0.0001$), Δ5 ($p<0.0001$), Δ6 ($p<0.0001$), Δ7 ($p=0.0116$), Δ3 και Δ4 ($p<0.0001$), Δ5 ($p<0.0001$), Δ6 ($p<0.0001$), και Δ7 ($p<0.0001$), Δ4 και Δ5 ($p<0.0001$), Δ6 ($p=0.0009$), Δ7 ($p<0.0001$), Δ5 και Δ6 ($p<0.0001$), Δ7 ($p<0.0001$), και Δ6 και Δ7 ($p<0.0001$), με το δείγμα Δ3 να εμφανίζει το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC, mg GAE/ g), και το δείγμα Δ7 να εμφανίζει το χαμηλότερο.

Συζήτηση

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εμπορικών φυτοχημικών εκχυλισμάτων, καθώς και δειγμάτων στερεών παραπροϊόντων προερχόμενων από τη διαδικασία ελαιοποίησης. Τα εκχυλίσματα αυτά είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις και με διαφορετικό προφίλ πολυφαινολικών ενώσεων. Ο λόγος για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής αποτέλεσε η ύπαρξη βιοδραστικών συστατικών στα παραπροϊόντα αυτά, με σκοπό την αξιοποίησή τους ως πρόσθετα στην παραγωγή ζωοτροφών από τις βιομηχανίες. Τα πειραματικά πρωτόκολλα τα οποία εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι ευρέως διαδεδομένες τεχνικές που ελέγχουν την αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι αναγωγής των σταθερών ελευθέρων ριζών DPPH[•], ABTS^{•+} και Superoxide, η μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου Folin-Ciocalteu, καθώς και η μέθοδος εκτίμησης της αναγωγικής ισχύος Reducing power assay.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως υπήρξαν διαφορές μεταξύ των υπολογιζόμενων τιμών IC₅₀ και AU_{0,5} (με το IC₅₀ να είναι η συγκέντρωση μίας ουσίας που έχει την ικανότητα να αναστείλει το 50% μια συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας σε ένα σύστημα, ενώ το AU_{0,5} είναι η συγκέντρωση του δείγματος που δίνει απορρόφηση ίση με 0,5) είναι μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων στις αντιοξειδωτικές μεθόδους, καθώς και ως προς το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH[•] έδειξε πως το δείγμα Δ5 (4% υδροξυ-τυροσόλη) εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα σε αυτή τη μέθοδο, καθώς εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ (Γράφημα 1Α). Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ρίζας ABTS^{•+} έδειξε πως δραστικότερο δείγμα ήταν το δείγμα Δ3 (5% υδροξυ-τυροσόλη), καθώς εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ (Γράφημα 1Β). Για την μέθοδο εξουδετέρωσης του υπεροξειδικού ανιόντος O₂^{•-} (Γράφημα 1C) παρατηρείται ότι το πιο δραστικό δείγμα στη μέθοδο αυτή είναι το Δ2 (παραπροϊόν ελαιουργίας), με τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀. Επιπλέον, στη μέθοδο εκτίμησης της αναγωγικής

ισχύος(Reducing Power Assay)παρατηρήθηκε πως το δείγμα με την υψηλότερη δραστικότητα είναι και σε αυτή τη μέθοδο το Δ5 (4% υδροξυ-τυροσόλη) καθώς είχε την μικρότερη τιμή AU_{0,5} (Γράφημα 1D). Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω αναγωγής του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, και παρατηρήθηκε πως το δείγμα Δ3 (5% υδροξυ-τυροσόλη) εμφάνισε το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g) (Γράφημα 1E).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, τα δείγματα παρουσιάζουν διαφορές ως προς την περιεκτικότητα των δραστικών πολυφαινολικών συστατικών τους, αλλά και ως προς το σύνολο των αντιοξειδωτικών συστατικών που περιέχουν. Σύμφωνα με το Γράφημα E, το οποίο παρουσιάζει το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων μέσω αναγωγής του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, η οποία είναι η μόνη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη που δεν στοχεύει στην μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά στοχεύει στη μέτρηση του συνολικού αριθμού πολυφαινολικών ενώσεων εντός του εκάστοτε δείγματος μέσω οξείδωσης των πολυφαινολικών ενώσεων[70], το δείγμα Δ3 (5% υδροξυ-τυροσόλη) έχει την μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολικών ενώσεων (>90mg GAE/g), ενώ στο δείγμα Δ5 (4%υδροξυ-τυροσόλη) η συνολική ποσότητα των πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στο δείγμα είναι περίπου στα 56 mg GAE/g. Τα δείγματα Δ4 (2% υδροξυ-τυροσόλη) και Δ6 (2% υδροξυ-τυροσόλη) ακολουθούν με ποσότητες στα περίπου 40mgGAE/gκαι 30mg GAE/gαντίστοιχα, με την διαφορά τους να σχετίζεται πιθανώς με την τιμή των συνολικών βιοδραστικών/ αντιοξειδωτικών συστατικών που περιέχουν, η οποία διαφέρει, αν και σε εξαιρετικά μικρό ποσοστό (Δ4=14%, Δ6=13,8%) , ενώ τα υπόλοιπα τρία δείγματα Δ1, Δ2 (παραπροϊόντα ελαιουργίας) και Δ7 (5% μασλινικό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη) παρουσίασαν πολυφαινολικό περιεχόμενο που κυμαίνεται σε τιμές κάτω από τα 20mg GAE/g.

Πιο αναλυτικά, στο Γράφημα 1A παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μέσω της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH• από αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Η ρίζα DPPH• μειώνεται με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου ή με την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου από έναν αντιοξειδωτικό παράγοντα που υπάρχει στο δείγμα, με αποτέλεσμα να αποχρωματίζεται[71]. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (Δ3-Δ7, Δ5-Δ7), και πιο συγκεκριμένα πως η μικρότερη τιμή IC₅₀ (mg/ml) ήταν αυτή του

δείγματος Δ5 (4% υδροξυ-τυροσόλη), γεγονός που σημαίνει ότι είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το δείγμα Δ3 (5% υδροξυ-τυροσόλη) παρόλο που δεν έχει την μεγαλύτερη τιμή συνολικών πολυφαινολικών ενώσεων σύμφωνα με το Γράφημα 1E (Folin-Ciocalteu). Αυτό το φαινόμενο πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός πως η σταθερή ρίζα DPPH• έχει αναφερθεί πως δεν είναι πάντα συνεπής με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα επειδή ορισμένες πολυφαινολικές ενώσεις μπορεί να είναι ανενεργές και να μην συμμετέχουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών DPPH•[72], όπως επίσης πρέπει να μπει στην εξίσωση και το γεγονός πως ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μεθανόλη, ένας οργανικός διαλύτης ο οποίος ευνοεί τον ιονισμό[73], [74]. Άλλοι πιθανοί λόγοι για τους οποίους μπορεί να συμβεί αυτό το φαινόμενο, δηλαδή το δείγμα με μικρότερη περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη να εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα (Δ5 σε σχέση με Δ3), είναι πιθανώς η αλληλεπίδραση των συνολικών αντιοξειδωτικών μορίων του δείγματος μεταξύ τους, παρουσιάζοντας ένα συνεργιστικό φαινόμενο που να έχει πιθανώς σαν αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητά τους, και άρα μεγαλύτερη εξουδετέρωση της ρίζας DPPH•[75]. Επιπλέον, όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο διαλύτης της μεθόδου αυτής είναι η μεθανόλη, δηλαδή ένας οργανικός διαλύτης, ο οποίος ευνοεί την καλύτερη διάλυση οργανικών μορίων. Συνεπώς, είναι πιθανό το Δ5 να περιέχει περισσότερα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά μόρια, με αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητά του έναντι του Δ3[75]. Από την άλλη μεριά, η χαμηλή δραστηριότητα του δείγματος Δ7 μπορεί να εξηγηθεί από το πολύ χαμηλό συνολικό πολυφαινολικό του περιεχόμενο (Γράφημα 1E). Αναφορικά με τα δείγματα ίδιας περιεκτικότητας σε υδροξυ-τυροσόλη Δ6- Δ4 (2% υδροξυτυροσόλη), το Δ6 εμφάνισε ελαφρά χαμηλότερη τιμή IC₅₀ (0,11mg/ml), με αποτέλεσμα να είναι δραστικότερο σε σχέση με το Δ4 (~0,2mg/ml), παρά την ίδια περιεκτικότητά τους σε αυτή την πολυφαινολική ένωση. Η διαφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στη διαφορά σε συνολικά βιοδραστικά/ αντιοξειδωτικά συστατικά που περιέχονται στα δείγματα αυτά. Επιπλέον, καθώς τα δείγματα αυτά προέρχονται από πρώτη ύλη τον ελαιόκαρπο μέσω διαδικασιών εκχύλισης και απομόνωσης, είναι δυνατόν παράγοντες όπως καλλιεργητικές συνθήκες, πεδοκλιματικοί παράγοντες, γενετικοί παράγοντες ή/και ο βαθμός ωρίμανσης του αρχικού προϊόντος, να επηρεάσουν τη συνολική σύσταση του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, η συγκομιδή των ελαιόκαρπων σε πιο πρώιμο στάδιο ωρίμανσης, καθώς και η διαφορετικές ποικιλίες είναι δυνατό να μεταβάλλουν τη σύσταση του καρπού, παρουσιάζοντας έτσι

υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό είτε λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, είτε λόγω της διαφορετικής σύστασης των δειγμάτων. Επιπλέον, οι βιομηχανικές συνθήκες, όπως η μέθοδος εξαγωγής του ελαιόλαδου, η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιούνται οι μέθοδοι επεξεργασίας και απομόνωσης, ακόμη και οι συνθήκες αποθήκευσης των αρχικών και τελικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, στον αέρα ή την ακτινοβολία, είναι δυνατόν να επηρεάσουν σημαντικά τη δραστηριότητα του προϊόντος, επιταχύνοντας τη διαδικασία αποδόμησης των δραστικών ενώσεων που περιέχει [62], [76], [77]. Επιπρόσθετα, τα δείγματα Δ1, Δ2, δηλαδή τα συνολικά παραπροϊόντα της διαδικασίας ελαιοποίησης, παρουσίασαν διαφορές στις τιμές IC50 (αν και μη σημαντικές), με το Δ1 να είναι δραστικότερο. Καθώς η συγκεκριμένη σύσταση των δειγμάτων αυτών είναι άγνωστη, είναι πιθανό οι παράγοντες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, δηλαδή εδαφοκλιματικές συνθήκες, γενετικοί και καλλιεργητικοί παράγοντες, καθώς και μέθοδοι επεξεργασίας, να έχουν σημαντική συμβολή στη σύσταση, και τελικά στη δραστηριότητα των δειγμάτων αυτών. Τέλος το δείγμα Δ7 (5% μασлинικό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη) ήταν αυτό που παρουσίασε την υψηλότερη τιμή IC50 (0,724 mg/ml). Το γεγονός πως το δείγμα αυτό δεν επέδειξε την υψηλότερη δραστηριότητα, παρά την υψηλή περιεκτικότητά του σε μασлинικό οξύ σε συνδυασμό με την ελευρωπαΐνη, υποδεικνύει πιθανώς είτε τη χαμηλή λιποδιαλυτότητα των συστατικών αυτών, είτε την αρνητική δράση που επέρχεται από το συνδυασμό των συστατικών, με αποτέλεσμα τη μειωμένη εξουδετέρωση της ρίζας DPPH•.

Στο Γράφημα 1B παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ABTS^{•+}, η οποία βασίζεται στην οξείδωση του υποστρώματος ABTS μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης, που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία της ρίζας ABTS^{•+} [78]. Σύμφωνα με το γράφημα αυτό, υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με το δείγμα Δ7 να έχει την υψηλότερη τιμή IC50. Στη μέθοδο αυτή το δείγμα Δ3 (5% υδροξυ-τυροσόλη) εμφάνισε την μικρότερη τιμή IC50, γεγονός που σημαίνει ότι έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ το δείγμα Δ5 (4% υδροξυ-τυροσόλη) είναι το δεύτερο πιο δραστικό. Αναφορικά με τα δείγματα Δ4, Δ6 τα οποία έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη (2% υδροξυ-τυροσόλη), στη συγκεκριμένη μέθοδο παρουσίασαν παρόμοιες τιμές IC50, με το Δ4 να είναι δραστικότερο. Στην περίπτωση των δύο

αυτών δειγμάτων, όπου έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη, σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (Γράφημα 1E), βρέθηκε πως έχουν διαφορετικό συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ($\Delta 4=39,065\text{mg GAE/g}$, $\Delta 6=28,62\text{mg GAE/g}$). Συνεπώς, η διαφορά αυτή στην αντιοξειδωτική ικανότητα οφείλεται πιθανώς στην διαφορετική περιεκτικότητα των υπόλοιπων δραστικών αντιοξειδωτικών πολυφαινολών (και μη) που εμπεριέχονται στο δείγμα $\Delta 4$, τα οποία πιθανώς να έχουν την ικανότητα να είναι πιο δραστικά ως προς την ρίζα του $\text{ABTS}^{\cdot+}$ [79]. Στο ίδιο γράφημα φαίνεται πως τα δείγματα $\Delta 2$ και $\Delta 1$, δηλαδή τα παραπροϊόντα ελαιουργίας, παρουσίασαν παρόμοιες τιμές IC_{50} στη συγκεκριμένη μέθοδο. Τέλος το δείγμα $\Delta 7$ (5% μασлинκό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη) είναι το λιγότερο δραστικό έχοντας την υψηλότερη τιμή IC_{50} . Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, στη μέθοδο αυτή παρατηρούμε ότι, συγκριτικά με την μέθοδο του DPPH, τα εξεταζόμενα δείγματα έχουν τιμές IC_{50} οι οποίες είναι στο σύνολό τους χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν στη μέθοδο DPPH. Μία πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι η χρήση διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις δύο δοκιμασίες, καθώς για την μέθοδο του ABTS γίνεται χρήση απιονισμένου νερού ως διαλύτη, ενώ για την μέθοδο του DPPH γίνεται χρήση μεθανόλης -δηλαδή μίας οργανικής ένωσης- ως διαλύτη. Είναι γνωστό πως οι πολυφαινολικές ενώσεις όπως για παράδειγμα η υδρόξυτυροσόλη, είναι στην πλειοψηφία τους υδατοδιαλυτές. Ως αποτέλεσμα, τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν και είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη έδωσαν μικρότερες τιμές IC_{50} (mg/ml) που σημαίνει πως έδειξαν μεγαλύτερη δραστικότητα ως προς την μέθοδο ABTS, καθώς τα συστατικά τους είναι καλύτερα διαλυτά στο μέσο αυτής της δοκιμασίας[62], [80].

Στο Γράφημα 1C παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης του υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot-}$), η οποία μετράει την ικανότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων να αναστέλλουν το σχηματισμό σουπεροξειδικών ιόντων, μέσω αναγωγής του αντιδραστηρίου NBT. Παρά το γεγονός πως δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, παρουσιάστηκε διαφορετική δραστικότητα μεταξύ των δειγμάτων[81]. Σύμφωνα με το ίδιο γράφημα πιο δραστικό δείγμα στη μέθοδο αυτή είναι το $\Delta 2$, το οποίο δεν έχει γνωστή σύσταση (παραπροϊόν ελαιουργίας). Αναφορικά με τα δείγματα $\Delta 4$, $\Delta 6$, τα οποία περιέχουν ίδια περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσόλη (2% υδροξυ-

τυροσόλη), παρατηρήθηκαν επίσης διαφορετικές τιμές IC50, ενώ και σε αυτή την αντιοξειδωτική μέθοδο το ασθενέστερο δείγμα ήταν το Δ7 (5% μασλινικό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως στη μέθοδο αυτή τα δραστικότερα δείγματα ήταν τα παραπροϊόντα ελαιουργίας (Δ1,Δ2), παρά το γεγονός πως παρουσίασαν το χαμηλότερο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu) σύμφωνα με το Γράφημα 1E, γεγονός που υποδεικνύει πως αν και περιέχουν χαμηλότερα ποσοστά σε πολυφαινολικές ενώσεις, πιθανώς περιέχουν άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία είναι ικανά να επάγουν την αναστολή του σχηματισμού σουπεροξειδικών ανιόντων, είτε η σύστασή τους είναι τέτοια που αν και δε περιέχουν σημαντική ποσότητα πολυφαινολών, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, το είδος των ενώσεων που περιέχουν είναι ιδιαίτερα δραστικό στο περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η αντιοξειδωτική αυτή μέθοδος. Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η υδροξύ-τυροσόλη μπορεί να εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς την εξουδετέρωση των σουπεροξειδικών ιόντων, με αποτέλεσμα τα δείγματα που έχουν υψηλά ποσοστά της να μην είναι τόσο δραστικά, σε σχέση με άλλα που περιέχουν διαφορετικού τύπου ενώσεις[82], [83].

Στο Γράφημα 1D παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής ικανότητας (Reducing Power Assay). Με αυτή την μέθοδο εξετάζεται η ικανότητα ενός δείγματος/ εξεταζόμενης ουσίας να επιφέρει την αναγωγή του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή, γεγονός που μαρτυρά την αντιοξειδωτική της δράση[84]. Σύμφωνα με το ίδιο γράφημα, παρατηρούμε ότι την χαμηλότερη τιμή AU0.5, και συνεπώς την υψηλότερη δραστικότητα, στο δείγμα Δ5 (4% υδροξύ-τυροσόλη)(AU0.5=0,02 mg/ml), ενώ το δείγμα Δ3 (5% υδροξύ-τυροσόλη) ήταν το δεύτερο δραστικότερο (AU0.5 =0,03 mg/ml). Τα δύο αυτά δείγματα παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές AU0.5, με ταυτόχρονο υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο (Γράφημα 1E). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μία συσχέτιση μεταξύ των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχει ένα δείγμα και της αναγωγικής του ικανότητας. Πράγματι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντική αναγωγική ικανότητα, και σε κάποιες περιπτώσεις είναι ακόμη και πιο ικανές να ανάγουν τα υποστρώματα σε σχέση με γνωστά αντιοξειδωτικά μόρια όπως για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ. Ωστόσο, η αναγωγική τους αυτή ικανότητα είναι στενά συνδεδεμένη με το είδος της ένωσης, καθώς η δομή κάθε ένωσης επηρεάζει σημαντικά τη δραστικότητά της [85].

Αναφορικά με τα δείγματα Δ4,Δ6, δηλαδή με την ίδια περιεκτικότητα σε υδροξυ-τυροσώλη (2% υδροξυ-τυροσώλη), το Δ6 παρουσίασε χαμηλότερη τιμή AU0.5, αν και μη στατιστικά σημαντική, παρά το χαμηλότερο πολυφαινολικό του περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu), καθώς το δείγμα αυτό περιέχει πιθανώς αντιοξειδωτικά ή άλλα μόρια που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το σίδηρο, αποτρέποντας έτσι την αναγωγή του. Επιπλέον, τα δύο δείγματα παραπροϊόντων ελαιουργίας Δ1, Δ2 εμφάνισαν υψηλότερες τιμές AU0.5, και συνεπώς τη χαμηλότερη αναγωγική δύναμη, γεγονός που πιθανώς συνδέεται με το χαμηλό τους συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, ενώ αντίστοιχα το ίδιο συνέβη και με το Δ7 (5% μασлинκό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη)[86].

Αναφορικά με το Γράφημα 1E, στο οποίο παρουσιάζεται το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων δειγμάτων μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, υπήρξαν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων, και εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των δειγμάτων με εξαίρεση τα δείγματα Δ1 και Δ2 (παραπροϊόντα ελαιουργίας). Συγκεκριμένα, το Δ3 (5% υδροξυ-τυροσώλη) παρουσίασε το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, όπως να ήταν και πιθανώς αναμενόμενο και από τις αντιοξειδωτικές μεθόδους όπου παρουσίασε χαμηλές τιμές IC50 και AU0.5, ενώ ακολουθεί το Δ5 (4% υδροξυ-τυροσώλη). Σχετικά με τα δύο δείγματα ίδιας περιεκτικότητας σε υδροξυ-τυροσώλη (2%) Δ4, Δ6, παρουσιάστηκαν διαφορετικές τιμές πολυφαινολικού περιεχομένου, ενώ τα δύο δείγματα παραπροϊόντος ελαιουργίας Δ1, Δ2 δεν παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση. Τέλος, το Δ7 (5% μασлинκό οξύ, 1% ελευρωπαΐνη) εμφάνισε το χαμηλότερο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες, παρά το αυξημένο ποσοστό σε μασлинκό οξύ (5%) και την παρουσία ελευρωπαΐνης. Αξίζει λοιπόν να σημειωθεί πως η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και δεν αποτελεί μία ειδική για τις πολυφαινόλες μέθοδο. Αυτό σημαίνει πως άλλες ενώσεις με αναγωγικό δυναμικό είναι ικανές να παρεμβάλλονται στην αντίδραση και να επηρεάζουν την τελική τιμή. Επιπλέον, για την εξακρίβωση της ύπαρξης συγκεκριμένων πολυφαινολών (εκτός από των καταγεγραμμένων για κάθε δείγμα) με πιθανή αντιοξειδωτική ισχύ, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή πιο ειδικών μεθόδων.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί πως οι διαφορές που παρουσιάστηκαν μεταξύ των υπολογισμένων τιμών αντιοξειδωτικού δυναμικού πιθανώς να οφείλονται επίσης και στα διαφορετικά υποστρώματα κάθε αντιοξειδωτικής μεθόδου, στο χρόνο

επώασης που επικρατεί, στα διαφορετικά αντιδραστήρια, αλλά και συνθήκες pH στις οποίες πραγματοποιείται κάθε μέθοδος, παράγοντες οι οποίοι συντελούν στην τελική τιμή IC₅₀, AU_{0.5}, και για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητο να γίνεται χρήση περισσότερων από μίας μεθόδου ώστε να προκύψει μία περισσότερο σφαιρική εικόνα για το αντιοξειδωτικό δυναμικό κάθε εξεταζόμενου δείγματος.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν εφελκυστήριο για την ενσωμάτωση των συγκεκριμένων φυτοχημικών εκχυλισμάτων σε πρόσθετα της βιομηχανίας ζωοτροφών ή/και συμπληρωμάτων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως ακόμα και μικρές μεταβολές στη σύσταση των δειγμάτων είναι ικανές να επιφέρουν διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα, επηρεάζοντας έτσι το βαθμό στον οποίο κάθε δείγμα είναι ικανό να εξουδετερώσει τεχνητές αλλά και φυσικά παραγόμενες ελεύθερες ρίζες.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων του ελαιόδενδρου είναι γνωστή εδώ και πολλές δεκαετίες, με πλήθος μελετών να έχουν γίνει με σκοπό να αναδείξουν την αντιοξειδωτική δράση τόσο μεμονωμένων συστατικών όσο και συνολικών μιγμάτων ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν αποδείξει τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολικών ενώσεων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων, μεταβάλλοντας έτσι σημαντικά την επίδραση των μιγμάτων σε σχέση με τις μεμονωμένες ουσίες [87]. Επιπλέον, μη πολυφαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί στα διαφορετικά μέρη της ελιάς, όπως χλωροφύλλες, σάκχαρα του καρπού, τριτερπενικά οξέα, καροτενοειδή κ.α, επιδεικνύουν αποδεδειγμένα αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το μασλινικό οξύ, το οποίο υπήρχε σε ποσοστό 5% σε ένα από τα εξεταζόμενα δείγματα (Δ7), είναι ένα τριτερπενοειδές το οποίο έχει εντοπιστεί σε διάφορα μέρη της ελιάς, όπως τα φύλλα, ο καρπός και ο πυρήνας, έχοντας πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα η αντιοξειδωτική ικανότητα που επιδεικνύει, έχοντας την ικανότητα να εξουδετερώνει πλήθος ελεύθερων ριζών[84]. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως από μελέτη του μασλινικού οξέος σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα βρέθηκε πως έχει την ικανότητα να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα [88], να προσφέρει αυξημένη αντίσταση στις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, καθώς και να εμφανίζει επιλεκτική κυτταροτοξική δράση ανάλογα με το είδος του κυττάρου, σε μελέτες που περιλαμβάνουν κυτταρικές σειρές [89], [90]. Επίσης το μασλινικό οξύ σε υψηλότερες δόσεις είναι ικανό να παρουσιάσει επιδράσεις που μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν

στην αύξηση των επιπέδων των ενδοκυτταρικών δραστικών μορφών οξυγόνου[91]. Η ελευρωπαΐνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι από τα πιο συχνά απαντώμενα σεκοϊριδοειδή στον ελαιόκαρπο, και είναι γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση[92]. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως έχουν επίσης παρατηρηθεί ανταγωνιστικά φαινόμενα μεταξύ των πολυφαινολικών ενώσεων, ειδικά σε λιπιδικά περιβάλλοντα, γεγονός που πιθανώς εξηγεί τη μειωμένη δραστηριότητα κάποιων περίπλοκων δειγμάτων ή/και μιγμάτων τους [93].

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η *in vitro* μελέτη εμπορικών φυτοχημικών εκχυλισμάτων με πρώτη ύλη την ελιά, καθώς και παραπροϊόντων ελαιουργίας, με στόχο την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους ως πρόσθετα σε εμπορικές ζωοτροφές, κατατάσσοντάς τα σε πρόσθετα υψηλής προστιθέμενης αξίας, και μειώνοντας την απόρριψή τους.

Είναι γνωστό πως κατά την κατεργασία του ελαιόκαρπου, εκτός από το 20% που παράγεται και είναι ελαιόλαδο, το υπόλοιπο 80% που προκύπτει είναι παραπροϊόντα όπως ο ελαιοπυρήνας και στερεά ή υγρά απόβλητα, τα οποία προκαλούν πλήθος περιβαλλοντικών ζητημάτων[94]. Προκειμένου να καταπολεμηθεί η κλιματική αλλαγή, να μειωθούν οι απώλειες κατά την επεξεργασία τροφίμων, αλλά και να μειωθεί η σπατάλη τροφίμων, είναι ζωτικής σημασίας να παρέχονται κατάλληλα κίνητρα για την αξιοποίηση των περιβαλλοντικών υπηρεσιών που παρέχονται από τη γεωργία για τη διαφύλαξη της βιοποικιλότητας, του υδροφόρου ορίζοντα, και της παραγωγής τροφίμων μέσω της χρήσης βιώσιμων μορφών τεχνολογίας. Από αυτή την άποψη, η αξιοποίηση των παραπροϊόντων που προκύπτουν από τη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου θα είναι ένα κρίσιμο πρώτο βήμα για τη μετάβαση προς ένα σχέδιο που θα περιλαμβάνει την κυκλική οικονομία και την πολιτική βιώσιμων πόρων. Λόγω της τεράστιας ποσότητας αποβλήτων η διαχείρισή τους κρίνεται ένα σημαντικό ζήτημα για τα ελαιοτριβεία και, κατά συνέπεια, ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου, καθώς σε αυτή παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό ελαιόλαδου και βρώσιμης ελιάς[95], [96].

Είναι γνωστό ότι τα απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν υψηλή συγκέντρωση οργανικής ουσίας, λιπιδίων, φαινολικών ενώσεων (φαινολικές αλκοόλες, οξέα, σεκοϊριδοειδή, φλαβονοειδή) και άλλες φυτοχημικές ενώσεις, και έτσι η λανθασμένη διαχείρισή τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε ιδιαίτερα σοβαρά

περιβαλλοντικά προβλήματα όπως για παράδειγμα φυτοτοξικότητα, υποβάθμιση των χαρακτηριστικών του εδάφους και της ρύπανσης του αέρα και του υδάτινου περιβάλλοντος. Έτσι, για να μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της επεξεργασίας της ελιάς, είναι επιτακτική ανάγκη να σχεδιαστεί η κατάλληλη χρήση των φυσικών πόρων με βιώσιμο τρόπο και να γίνει αποτελεσματική διαχείριση των απορριμμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι επιστημονικές και ερευνητικές μέθοδοι που σχετίζονται με τεχνικές επεξεργασίας αποβλήτων που επιχειρούν να μειώσουν το ρυπογόνο τους φορτίο και να τις εκμεταλλευτούν εμπορικά για την παρασκευή ή την απομόνωση χρήσιμων χημικών ενώσεων, ιδιαίτερα για την ενσωμάτωσή τους σε εμπορικές ζωοτροφές παραγωγικών ζώων.

Η απόδοση της ζωικής παραγωγής μπορεί να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται τα ζώα, γεγονός που οδηγεί τόσο σε μειωμένη απόδοση όσο και σε σημαντικές απώλειες της παραγωγής. Τα παραγωγικά ζώα προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν φυσιολογικές προσαρμογές για να μετριάσουν το στρες σε κάποιο βαθμό. Από την άλλη πλευρά, οι δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξής τους μπορεί να αυξήσουν άμεσα τις διατροφικές τους ανάγκες ή να μειώσουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών, εξαιτίας της μειωμένης πρόσληψης τροφής. Μαζί με αυτούς τους παράγοντες, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει απαγορεύσει τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία[97]. Οι ανησυχίες για την ασφάλεια και την ποιότητα των ζωικών προϊόντων που παράγονται έχουν επίσης αυξηθεί, και ως αποτέλεσμα, η επιστημονική κοινότητα αναζητά νέες και εναλλακτικές λύσεις που υποστηρίζουν την καλή διαβίωση των ζώων προσφέροντας βέλτιστη διατροφή, κατάλληλες πρακτικές διαχείρισης και υγειονομική περίθαλψη.

Σε αυτή την κατεύθυνση, ουσίες φυτικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα οι πολυφαινόλες, αλλά και παραπροϊόντα του αγροδιατροφικού κλάδου τα οποία συνήθως απορρίπτονται, μπορούν να αποτελέσουν σημαντική διατροφική πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων, βοηθώντας στην καταπολέμηση ή/και την πρόσληψη της οξειδωτικής βλάβης. Τα φαινολικά συστατικά των προϊόντων ελιάς έχουν συσχετιστεί με οφέλη στην καρδιαγγειακή υγεία, με μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης, και μακροζωία. Πλήθος ενώσεων με αντιοξειδωτική δραστηριότητα έχουν ανιχνευθεί στον ελαιόκαρπο, και κατά συνέπεια στα παραπροϊόντα της παραγωγής ελαιόλαδου, όπως η υδροξυτυροσόλη, ολευρωπεΐνη, τυροσόλη, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ βερμπασκοσίδη, και ελενολικό οξύ [98]. Συνεπώς, Η προσθήκη παραπροϊόντων ελιάς

στη διατροφή χοίρων μπορεί να αποτελέσει μία βιώσιμη προσέγγιση για τη μείωση του κόστους παραγωγής, ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, με την ταυτόχρονη βελτίωση της ποιότητας και του αντιοξειδωτικού δυναμικού του παραγόμενου κρέατος, μειώνοντας τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, και αυξάνοντας τα ακόρεστα. Επιπλέον, στα κοτόπουλα (broilers) βελτιωμένος ρυθμός ανάπτυξης, αλλά και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων έχουν παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα της διατροφής με παραπροϊόντα ελαιόκαρπου [99].

Επιπλέον, τα αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα αποτελούν μία λιγότερο δαπανηρή εναλλακτική συγκριτικά με τις ζωοτροφές που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά [100]. Η συμβολή των πολυφαινολικών ενώσεων στο ανοσοποιητικό, στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή άμυνα, αλλά και στη γενικότερη απόδοση μονογαστρικών παραγωγικών ζώων έχει διαπιστωθεί με *in vitro* και *in vivo* μελέτες [101], [102]. Επιπλέον, ο εμπλουτισμός των ζωοτροφών με πολυφαινολικές ενώσεις μπορεί να βελτιώσει και την οξειδωτική σταθερότητα των παραγόμενων ζωικών προϊόντων [103], συμβάλλοντας έτσι και στην υγεία των καταναλωτών. Συνεπώς, η ενσωμάτωση αυτών των παραπροϊόντων στη διατροφή των ζώων θα μπορούσε να μετριάσει το περιβαλλοντικό φόρτο, και να ελαχιστοποιήσει το κόστος που σχετίζεται με την παραγωγή ζωοτροφών, και τη διαχείριση των αποβλήτων, αποτελώντας ταυτόχρονα μία λιγότερο δαπανηρή εναλλακτική συγκριτικά με τις ζωοτροφές που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά. Επιπλέον, μια ζωοτροφή εμπλουτισμένη με πολυφαινόλες θα μπορούσε να αποτελέσει μια βιώσιμη προσέγγιση για τη βελτίωση της θρεπτικής σύνθεσης, της διάρκειας ζωής του κρέατος και των παραγόμενων προϊόντων και, κατά συνέπεια, της ποιότητας της ανθρώπινης διατροφής και της υγείας.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη, είναι διαθέσιμη μια ποικιλία βιοαναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτοχημικών εκχυλισμάτων, και των παραπροϊόντων που προκύπτουν κατά την διάρκεια της ελαιοποίησης. Οι συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης, τα μέσα οξείδωσης και τους στόχους, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις και την μορφή έκφρασης των αποτελεσμάτων. Παρόλο που οι εν λόγω μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων, η σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι σχετικά δύσκολη, και για το λόγο αυτό

προτείνεται ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας[86], [104]. Ως εκ τούτου, όλα τα εξεταζόμενα δείγματα – φυτοχημικά εκχυλίσματα και παραπροϊόντα ελαιουργίας- επέδειξαν αντιοξειδωτική δράση, μέσω εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών, αλλά και αναγωγική ικανότητα, κάνοντας τα έτσι κατάλληλους υποψήφιους για την ενσωμάτωση σε καινοτόμες ζωοτροφές με στόχο τη βελτίωση της μεταβολικής υγείας των παραγωγικών ζώων. Επιπλέον, για την πλήρη και πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τη σύσταση των παραπροϊόντων ελαιουργίας κρίνεται απαραίτητα η χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, όπως για παράδειγμα η χρήση HPLC. Σκόπιμη θα ήταν επίσης, η δοκιμή των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων των δειγμάτων σε *in vitro* συστήματα κυττάρων, για την καλύτερη κατανόηση των ευεργετικών ιδιοτήτων που μπορεί να προσφέρουν προτού αυτά ενσωματωθούν σε ζωοτροφές.

Βιβλιογραφία

- [1] H. Sales, Z. Šatović, M. L. Alves, P. Fevereço, J. Nunes, and M. C. Vaz Patto, "Accessing Ancestral Origin and Diversity Evolution by Net Divergence of an Ongoing Domestication Mediterranean Olive Tree Variety," *Front Plant Sci*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.688214.
- [2] O. Barazani, A. Dag, and Z. Dunseth, "The history of olive cultivation in the southern Levant," *Front Plant Sci*, vol. 14, Feb. 2023, doi: 10.3389/fpls.2023.1131557.
- [3] A. Bombarely, A. G. Doulis, K. K. Lambrou, C. Zioutis, E. Margaritis, and G. Koubouris, "Elucidation of the Origin of the Monumental Olive Tree of Vouves in Crete, Greece," *Plants*, vol. 10, no. 11, p. 2374, Nov. 2021, doi: 10.3390/plants10112374.
- [4] A. Loumou and C. Giourga, "Olive groves: 'The life and identity of the Mediterranean,'" *Agric Human Values*, vol. 20, no. 1, pp. 87–95, 2003, doi: 10.1023/A:1022444005336.
- [5] D. Kaniewski *et al.*, "Climate change threatens olive oil production in the Levant," *Nat Plants*, vol. 9, no. 2, pp. 219–227, Jan. 2023, doi: 10.1038/s41477-022-01339-z.
- [6] G. Banilas, E. Korkas, P. Kaldis, and P. Hatzopoulos, "Olive and Grapevine Biodiversity in Greece and Cyprus – A Review," in *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2009, pp. 401–428. doi: 10.1007/978-90-481-2716-0_14.
- [7] "TRADE BALANCE".
- [8] C. Torrecillas and C. Martínez, "Patterns of specialisation by country and sector in olive applications," *Technol Soc*, vol. 70, p. 102003, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.techsoc.2022.102003.
- [9] P. J. Flory, "The Mechanism of Vinyl Polymerizations 1," *J Am Chem Soc*, vol. 59, no. 2, pp. 241–253, Feb. 1937, doi: 10.1021/ja01281a007.
- [10] A. Santo, H. Zhu, and Y. R. Li, "Free Radicals: From Health to Disease," *Reactive Oxygen Species*, 2016, doi: 10.20455/ROS.2016.847.
- [11] G. C. Yen and D. Pin-Der, "Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species," *J Agric Food Chem*, vol. 42, no. 3, pp. 629–632, Mar. 1994, doi: 10.1021/JF00039A005.
- [12] A. P. Wickens, "Ageing and the free radical theory," *Respir Physiol*, vol. 128, no. 3, pp. 379–391, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0034-5687(01)00313-9.

- [13] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, "Free Radicals in Biology and Medicine," *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oct. 2015, doi: 10.1093/ACPROF:OSO/9780198717478.001.0001.
- [14] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem Biol Interact*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [15] F. Ahmadinejad, S. G. Møller, M. Hashemzadeh-Chaleshtori, G. Bidkhor, and M. S. Jami, "Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress," *Antioxidants*, vol. 6, no. 3, Sep. 2017, doi: 10.3390/ANTIOX6030051.
- [16] D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release," *Physiol Rev*, vol. 94, no. 3, pp. 909–950, Jul. 2014, doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
- [17] A. Shahzad, S. Hussain, N. Anwar, A. Karim, U. Aeman, and M. J. Iqbal, "An overview of free Radicals & antioxidants and its Deleterious actions.," *FRONTIERS IN CHEMICAL SCIENCES*, vol. 2, no. 2, pp. 147–164, Dec. 2021, doi: 10.52700/fcs.v2i2.32.
- [18] E. Cadenas and K. J. A. Davies, "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging11This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us.," *Free Radic Biol Med*, vol. 29, no. 3–4, pp. 222–230, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
- [19] H. K. Delille, N. A. Bonekamp, and M. Schrader, "Peroxisomes and disease - an overview.," *Int J Biomed Sci*, vol. 2, no. 4, pp. 308–14, Dec. 2006.
- [20] Y. Yu *et al.*, "Roles of reactive oxygen species in inflammation and cancer.," *MedComm (Beijing)*, vol. 5, no. 4, p. e519, Apr. 2024, doi: 10.1002/mco2.519.
- [21] N. B. J. Vollaard, J. P. Shearman, and C. E. Cooper, "Exercise-Induced Oxidative Stress," *Sports Medicine*, vol. 35, no. 12, pp. 1045–1062, 2005, doi: 10.2165/00007256-200535120-00004.
- [22] C. Giorgi *et al.*, "Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases," 2018, pp. 209–344. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.05.006.
- [23] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health," *Pharmacogn Rev*, vol. 4, no. 8, p. 118, 2010, doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- [24] B. Halliwell, "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?," *Biochemical Journal*, vol. 401, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2007, doi: 10.1042/BJ20061131.

- [25] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 30, no. 1, pp. 11–26, Jan. 2015, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- [26] P. Chaudhary *et al.*, "Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases," *Front Chem*, vol. 11, May 2023, doi: 10.3389/fchem.2023.1158198.
- [27] R. Li, Z. Jia, and M. A. Trush, "Defining ROS in Biology and Medicine," *React Oxyg Species (Apex)*, vol. 1, no. 1, p. 9, Jan. 2016, doi: 10.20455/ROS.2016.803.
- [28] D. Trachootham, J. Alexandre, and P. Huang, "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 8, no. 7, pp. 579–591, Jul. 2009, doi: 10.1038/nrd2803.
- [29] T. O. J. Cockram, J. M. Dundee, A. S. Popescu, and G. C. Brown, "The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells," *Front Immunol*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.629979.
- [30] F. P. Guengerich, M. R. Waterman, and M. Egli, "Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 37, no. 8, pp. 625–640, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.tips.2016.05.006.
- [31] T. O. J. Cockram, J. M. Dundee, A. S. Popescu, and G. C. Brown, "The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells," *Front Immunol*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.629979.
- [32] J. Chen, C.-L. Chen, B. R. Alevriadou, J. L. Zweier, and Y.-R. Chen, "Excess no predisposes mitochondrial succinate–cytochrome c reductase to produce hydroxyl radical," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1807, no. 5, pp. 491–502, May 2011, doi: 10.1016/j.bbabo.2011.03.001.
- [33] K. B. S. Volodymyr I. Lushchak, "Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated," *EXCLI J*, vol. 20, pp. 956–967, 2021.
- [34] T. Rahman, I. Hosen, M. M. T. Islam, and H. U. Shekhar, "Oxidative stress and human health," *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol. 2012, no. 07, pp. 997–1019, Nov. 2012, doi: 10.4236/ABB.2012.327123.
- [35] B. L. Tan, M. E. Norhaizan, and W. P. P. Liew, "Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe?," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/9719584.
- [36] G. Pizzino *et al.*, "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/8416763.
- [37] B. L. Tan, M. E. Norhaizan, W.-P.-P. Liew, and H. Sulaiman Rahman, "Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases," *Front Pharmacol*, vol. 9, Oct. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01162.

- [38] A. S. Veskokis, A. M. Tsatsakis, and D. Kouretas, "Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration," *Cell Stress Chaperones*, vol. 17, no. 1, pp. 11–21, Jan. 2012, doi: 10.1007/s12192-011-0293-3.
- [39] A. S. Veskokis, A. M. Tsatsakis, and D. Kouretas, "Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration," *Cell Stress Chaperones*, vol. 17, no. 1, pp. 11–21, Jan. 2012, doi: 10.1007/s12192-011-0293-3.
- [40] H. Zhang and R. Tsao, "Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects," *Curr Opin Food Sci*, vol. 8, pp. 33–42, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.COFS.2016.02.002.
- [41] H. Yin, L. Xu, and N. A. Porter, "Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis," *Chem Rev*, vol. 111, no. 10, pp. 5944–5972, Oct. 2011, doi: 10.1021/cr200084z.
- [42] G. N. Sharma, G. Gupta, and P. Sharma, "A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments," *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, vol. 28, no. 2, pp. 139–154, 2018, doi: 10.1615/CRITREVEUKARYOTGENEEXPR.2018022258.
- [43] S. Losada-Barreiro, Z. Sezgin-Bayindir, F. Paiva-Martins, and C. Bravo-Díaz, "Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications," *Biomedicines*, vol. 10, no. 12, p. 3051, Nov. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10123051.
- [44] M. Oroian and I. Escriche, "Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis".
- [45] S. Hrelia and C. Angeloni, "New Mechanisms of Action of Natural Antioxidants in Health and Disease II," *Antioxidants*, vol. 10, no. 8, p. 1200, Jul. 2021, doi: 10.3390/antiox10081200.
- [46] A. Zeb, "Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods," *J Food Biochem*, vol. 44, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.1111/jfbc.13394.
- [47] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem Biol Interact*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [48] Js. Jeeva, J. Sunitha, R. Ananthalakshmi, S. Rajkumari, M. Ramesh, and R. Krishnan, "Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases," *J Pharm Bioallied Sci*, vol. 7, no. 6, p. 331, 2015, doi: 10.4103/0975-7406.163438.
- [49] A. Gegotek and E. Skrzydlewska, "Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid," *Antioxidants*, vol. 11, no. 10, p. 1993, Oct. 2022, doi: 10.3390/antiox11101993.

- [50] C. Gaucher, A. Boudier, J. Bonetti, I. Clarot, P. Leroy, and M. Parent, "Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies," *Antioxidants*, vol. 7, no. 5, p. 62, Apr. 2018, doi: 10.3390/antiox7050062.
- [51] R. J. Reiter, J. C. Mayo, D. Tan, R. M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, and L. Qin, "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers," *J Pineal Res*, vol. 61, no. 3, pp. 253–278, Oct. 2016, doi: 10.1111/jpi.12360.
- [52] M. G. Traber and J. Atkinson, "Vitamin E, antioxidant and nothing more," *Free Radic Biol Med*, vol. 43, no. 1, pp. 4–15, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024.
- [53] G. Wypych, "PRINCIPLES OF STABILIZATION," in *PVC Degradation and Stabilization*, Elsevier, 2015, pp. 287–412. doi: 10.1016/B978-1-895198-85-0.50013-3.
- [54] B. Singh, J. P. Singh, A. Kaur, and N. Singh, "Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel," *Food Research International*, vol. 132, p. 109114, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109114.
- [55] P. Kouka *et al.*, "The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/1870965.
- [56] B. Lanza and P. Ninfali, "Antioxidants in Extra Virgin Olive Oil and Table Olives: Connections between Agriculture and Processing for Health Choices," *Antioxidants*, vol. 9, no. 1, p. 41, Jan. 2020, doi: 10.3390/antiox9010041.
- [57] P. Munekata, G. Nieto, M. Pateiro, and J. Lorenzo, "Phenolic Compounds Obtained from *Olea europaea* By-Products and Their Use to Improve the Quality and Shelf Life of Meat and Meat Products—A Review," *Antioxidants*, vol. 9, no. 11, p. 1061, Oct. 2020, doi: 10.3390/antiox9111061.
- [58] C. Saglam, Y. T. Tuna, U. Gecgel, and E. S. Atar, "Effects of Olive Harvesting Methods on Oil Quality," *APCBEE Procedia*, vol. 8, pp. 334–342, 2014, doi: 10.1016/j.apcbee.2014.03.050.
- [59] P. Kouka *et al.*, "Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines," *Oncol Rep*, Oct. 2019, doi: 10.3892/or.2019.7386.
- [60] M. Bucciandini, M. Leri, P. Nardiello, F. Casamenti, and M. Stefani, "Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties," *Antioxidants*, vol. 10, no. 7, p. 1044, Jun. 2021, doi: 10.3390/antiox10071044.
- [61] J. Rocha, N. Borges, and O. Pinho, "Table olives and health: a review," *J Nutr Sci*, vol. 9, p. e57, Dec. 2020, doi: 10.1017/jns.2020.50.

- [62] M. Kourti *et al.*, “Antioxidant and DNA-Protective Activity of an Extract Originated from Kalamon Olives Debittering,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 2, p. 333, Jan. 2023, doi: 10.3390/antiox12020333.
- [63] T. Grubić Kezele and B. Ćurko-Cofek, “Neuroprotective Panel of Olive Polyphenols: Mechanisms of Action, Anti-Demyelination, and Anti-Stroke Properties,” *Nutrients*, vol. 14, no. 21, p. 4533, Oct. 2022, doi: 10.3390/nu14214533.
- [64] P. Paraskeva and E. Diamadopoulos, “Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 81, no. 9, pp. 1475–1485, Sep. 2006, doi: 10.1002/jctb.1553.
- [65] T. A. Wani *et al.*, “Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 77, pp. 77–90, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.001.
- [66] D. Sun-Waterhouse, J. Zhou, G. M. Miskelly, R. Wibisono, and S. S. Wadhwa, “Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid,” *Food Chem*, vol. 126, no. 3, pp. 1049–1056, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.124.
- [67] A. Romani *et al.*, “Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L.,” *Nutrients*, vol. 11, no. 8, p. 1776, Aug. 2019, doi: 10.3390/nu11081776.
- [68] I. Gouveias *et al.*, “Critical Review on the Significance of Olive Phytochemicals in Plant Physiology and Human Health,” *Molecules*, vol. 22, no. 11, p. 1986, Nov. 2017, doi: 10.3390/molecules22111986.
- [69] A. Yorulmaz, E. S. Poyrazoglu, M. M. Ozcan, and A. Tekin, “Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils,” *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 114, no. 9, pp. 1083–1093, Sep. 2012, doi: 10.1002/ejlt.201100186.
- [70] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, “Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.,” *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013, doi: 10.3390/molecules18066852.
- [71] M. S. BLOIS, “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical,” *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958, doi: 10.1038/1811199a0.
- [72] A. García, M. Brenes, M. C. Dobarganes, C. Romero, and M. V. Ruiz-Méndez, “Enrichment of pomace olive oil in triterpenic acids during storage of ‘Alpeorujo’ olive paste,” *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 110, no. 12, pp. 1136–1141, Dec. 2008, doi: 10.1002/ejlt.200800070.
- [73] R. R. Kotha, F. S. Tareq, E. Yildiz, and D. L. Luthria, “Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 12, 2022, doi: 10.3390/antiox11122388.

- [74] N. B. Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin, and M. F. Mahomoodally, "The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations," *Antioxidants*, vol. 9, no. 8, pp. 1–39, Aug. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9080709.
- [75] L. Lam Hon Wah, S. Reyes Flores, O. K. Mosibo, T. H. Fatoki, R. E. Aluko, and C. C. Udenigwe, "Peptide–Polyphenol Interactions: The Antagonistic Effect of Pea Pentapeptide (VNRFR) on the Antioxidant Properties of Quercetin and Rutin in *Caenorhabditis elegans*," *ACS Food Science & Technology*, vol. 0, no. 0, p. null, doi: 10.1021/acsfoodscitech.4c00172.
- [76] S. Beteinakis, A. Papachristodoulou, G. Gogou, S. Katsikis, E. Mikros, and M. Halabalaki, "NMR-Based Metabolic Profiling of Edible Olives-Determination of Quality Parameters," *Molecules*, vol. 25, no. 15, Aug. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25153339.
- [77] D. Boskou, "Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents," in *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, Elsevier, 2015, pp. 1–30. doi: 10.1016/B978-1-63067-041-2.50007-0.
- [78] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic Biol Med*, vol. 26, no. 9, pp. 1231–1237, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [79] O.-H. Lee, B.-Y. Lee, Y.-C. Kim, K. Shetty, and Y.-C. Kim, "Radical Scavenging-Linked Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Diverse Types of Extra Virgin Olive Oils," *J Food Sci*, vol. 73, no. 7, pp. C519–C525, 2008, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00865.x>.
- [80] J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, 1969, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- [81] J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, 1969, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- [82] Y. O'Dowd *et al.*, "Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils," *Biochem Pharmacol*, vol. 68, no. 10, pp. 2003–2008, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.023>.
- [83] Y. Sueishi and R. Nii, "A comparative study of the antioxidant profiles of olive fruit and leaf extracts against five reactive oxygen species as measured with a multiple free-radical scavenging method," *J Food Sci*, vol. 85, no. 9, pp. 2737–2744, 2020, doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15388>.

- [84] C. Zhang *et al.*, "Comparative Evaluation of the Phytochemical Profiles and Antioxidant Potentials of Olive Leaves from 32 Cultivars Grown in China," *Molecules*, vol. 27, no. 4, 2022, doi: 10.3390/molecules27041292.
- [85] R. Pulido, L. Bravo, and F. Saura-Calixto, "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay," *J Agric Food Chem*, vol. 48, no. 8, pp. 3396–3402, Aug. 2000, doi: 10.1021/jf9913458.
- [86] I. Gülçin, Ö. I. Küfrevioğlu, M. Oktay, and M. E. Büyükkokuroğlu, "Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.)," *J Ethnopharmacol*, vol. 90, no. 2–3, pp. 205–215, Feb. 2004, doi: 10.1016/J.JEP.2003.09.028.
- [87] R. D. T. B. E. F. N. A. J. C. I. A. T. E. T. A. M. I. Saikat Mitra Abu Montakim Tareq and J. Simal-Gandara, "Polyphenols: A first evidence in the synergism and bioactivities," *Food Reviews International*, vol. 39, no. 7, pp. 4419–4441, 2023, doi: 10.1080/87559129.2022.2026376.
- [88] R. B. M. F. R. V. H. Blessing N. Mkhwanazi Metse R. Serumula and C. T. Musabayane, "Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function," *Ren Fail*, vol. 36, no. 3, pp. 419–431, 2014, doi: 10.3109/0886022X.2013.867799.
- [89] M. A. Hashmi, A. Khan, M. Hanif, U. Farooq, and S. Perveen, "Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, no. 1, p. 541591, 2015, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/541591>.
- [90] K. Mokhtari, A. Pérez-Jiménez, L. García-Salguero, J. A. Lupiáñez, and E. E. Rufino-Palomares, "Unveiling the Differential Antioxidant Activity of Maslinic Acid in Murine Melanoma Cells and in Rat Embryonic Healthy Cells Following Treatment with Hydrogen Peroxide," *Molecules*, vol. 25, no. 17, 2020, doi: 10.3390/molecules25174020.
- [91] Y. He *et al.*, "Maslinic Acid: A New Compound for the Treatment of Multiple Organ Diseases," *Molecules*, vol. 27, no. 24, 2022, doi: 10.3390/molecules27248732.
- [92] N. Vyas, M. Khan, S. Panchal, A. Butani, and K. Vimal, "*Olea europea*- A Phytopharmacological Review," *Pharmacogn Rev*, vol. 1, pp. 112–116, Aug. 2007.
- [93] L. Lam Hon Wah, S. Reyes Flores, O. K. Mosibo, T. H. Fatoki, R. E. Aluko, and C. C. Udenigwe, "Peptide–Polyphenol Interactions: The Antagonistic Effect of Pea Pentapeptide (VNRFR) on the Antioxidant Properties of Quercetin and Rutin in *Caenorhabditis elegans*," *ACS Food Science & Technology*, Aug. 2024, doi: 10.1021/acsfoodscitech.4c00172.
- [94] F. Rivero-Pino, M. C. Millan-Linares, A. Villanueva-Lazo, Á. Fernandez-Prior, and S. Montserrat-de-la-Paz, "In vivo evidences of the health-promoting properties of

- bioactive compounds obtained from olive by-products and their use as food ingredient,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, pp. 1–13, Apr. 2023, doi: 10.1080/10408398.2023.2203229.
- [95] D. Restuccia, S. A. Prencipe, M. Ruggeri, and U. G. Spizzirri, “Sustainability Assessment of Different Extra Virgin Olive Oil Extraction Methods through a Life Cycle Thinking Approach: Challenges and Opportunities in the Elaio-Technical Sector,” *Sustainability*, vol. 14, no. 23, p. 15674, Nov. 2022, doi: 10.3390/su142315674.
- [96] L. Fernández-Lobato, Y. López-Sánchez, G. Blejman, F. Jurado, J. Moyano-Fuentes, and D. Vera, “Life cycle assessment of the Spanish virgin olive oil production: A case study for Andalusian region,” *J Clean Prod*, vol. 290, p. 125677, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.125677.
- [97] “New European Union rules on farm antibiotic use”, Accessed: Aug. 25, 2024. [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics->
- [98] O. Tzamaloukas, M. C. Neofytou, and P. E. Simitzis, “Application of Olive By-Products in Livestock with Emphasis on Small Ruminants: Implications on Rumen Function, Growth Performance, Milk and Meat Quality,” *Animals*, vol. 11, no. 2, p. 531, Feb. 2021, doi: 10.3390/ani11020531.
- [99] A. Tsala, V. Mpekeli, G. Karvelis, P. Tsikakis, M. Goliomytis, and P. Simitzis, “Effects of Dried Olive Pulp Dietary Supplementation on Quality Characteristics and Antioxidant Capacity of Pig Meat,” *Foods*, vol. 9, no. 1, p. 81, Jan. 2020, doi: 10.3390/foods9010081.
- [100] A. Vastolo *et al.*, “In Vitro Fermentation and Chemical Characteristics of Mediterranean By-Products for Swine Nutrition,” *Animals*, vol. 9, no. 8, p. 556, Aug. 2019, doi: 10.3390/ani9080556.
- [101] K. Lipiński, M. Mazur, Z. Antoszkiewicz, and C. Purwin, “Polyphenols in Monogastric Nutrition – A Review,” *Annals of Animal Science*, vol. 17, no. 1, pp. 41–58, Jan. 2017, doi: 10.1515/aoas-2016-0042.
- [102] S. Mahfuz, Q. Shang, and X. Piao, “Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: a review,” *J Anim Sci Biotechnol*, vol. 12, no. 1, p. 48, Apr. 2021, doi: 10.1186/s40104-021-00565-3.
- [103] K. Starčević *et al.*, “Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds,” *J Sci Food Agric*, vol. 95, no. 6, pp. 1172–1178, Apr. 2015, doi: 10.1002/jsfa.6805.
- [104] A. Veskoukis *et al.*, “A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue,” *Curr Opin Toxicol*, vol. 13, pp. 99–109, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.COTOX.2018.10.001.

- [105] "Vouves Ancient Olive Tree in Chania - AllinCrete Travel Guide for Crete." Accessed: Sep. 09, 2024. [Online]. Available: <https://www.allincrete.com/vouves-ancient-olive-tree/>
- [106] "Ο παραδοσιακός ελαιώνας απορροφά τις μεγαλύτερες ποσότητες CO2 - olivenews.gr." Accessed: Sep. 09, 2024. [Online]. Available: <https://www.olivenews.gr/el/episthmh/kalliergeia/o-paradosiakos-elaionas-aporrofa-tis-megalyteres-posotites-co2/>
- [107] "Healthline." Accessed: Sep. 09, 2024. [Online]. Available: <https://anon.healthline.com/>
- [108] A. L. Zamora-Perez *et al.*, "Periodontal Disease and Nuclear and Oxidative DNA Damage," *Insights into Various Aspects of Oral Health*, Sep. 2017, doi: 10.5772/INTECHOPEN.68446.