



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
<<ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ >>

**<<Προσδιορισμός in vitro αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από φύκη του  
Αιγαίου Πελάγους >>**

**ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

Λάρισα, 2022

Προσδιορισμός in vitro αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από φύκη του Αιγαίου  
Πελάγους

Determination of in vitro antioxidant activity of extracts from Aegean Sea algae

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Μόσιαλος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αντώνιος Γιακούντης Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την περάτωση αυτής. Οι σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σ' ένα σωστό τρόπο σκέψης και μου προσέφεραν σημαντικά εφόδια για τη μετέπειτα ζωή μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Νικόλαο Γκουτζουρέλα για την αμέριστη βοήθεια του και τη στήριξη του κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Βαρβάρα Τραχανά αλλά και γενικότερα όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την όμορφη συνεργασία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κ. Παρασκευή Μαλέα από το Τμήμα Βιολογίας του Α.Π.Θ. που συνέλλεξε και ταυτοποίησε τα φύκη τα οποία μελετήθηκαν.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Μόσιαλο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αντώνιο Γιακούντη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την κατανόηση τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοτεχνολογίας- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν και τη συμβολή τους στη συνολικότερη πρόοδο μου ως άτομο.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες έρευνες αποδεικνύουν ότι οι ελεύθερες ρίζες αλλά και το οξειδωτικό στρες συνδέονται με πλήθος ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα ή ο καρκίνος. Τα φύκη από την άλλη πλευρά είναι γνωστό ότι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων όπως αντικές, αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα από 8 είδη θαλάσσιων φυκών και εξετάστηκε in vitro η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους DPPH, ABTS, αναστολή της ρίζας  $\text{OH}^\cdot$ , αναστολή της ρίζας  $\text{O}_2^{\cdot-}$  και με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγική δύναμης. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα εκχυλίσματα των φυκών *Ulva rigida*, *Ulva intestinalis*, *Codium fragile*, *Sargassum vulgare*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria gracilis* και *Colpomenia sinuosa*. Ως ισχυρότερο χαρακτηρίστηκε εκχύλισμα του φύκου *Ulva rigida* με **IC<sub>50</sub> 5.5 mg/mL** με τη μέθοδο DPPH, **IC<sub>50</sub> 0,95 mg/mL** με τη μέθοδο ABTS+, **IC<sub>50</sub> 0.7 mg/mL** με τη μέθοδο αναστολής ρίζας  $\text{OH}^\cdot$  και **RP<sub>0.5AU</sub> 1,37 mg/mL** για τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και συγκεκριμένα του *Ulva rigida* είχαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω για τις ευεργετικές τους δράσεις.

Λέξεις κλειδιά: οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικό, DPPH, ABTS+, Ρίζα σουπεροξειδίου, Ρίζα υδροξυλίου, Reducing power

## **ABSTRACT**

In recent years numerous studies have shown that both free radicals and oxidative stress are associated with diseases, such as cardiovascular diseases or cancer. Algae on the other hand are known to possess a wide range of physiological and biochemical properties such as antiviral, antioxidant and antifungal properties.

In this study, extracts from 8 species of marine algae were studied and their antioxidant capacity was examined in vitro by the DPPH, ABTS, OH<sup>•</sup> radical inhibition, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical inhibition and the reducing power determination method. Specifically, the extracts of the algae *Ulva rigida*, *Ulva intestinalis*, *Codium fragile*, *Sargassum vulgare*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria gracilis* and *Colpomenia sinuosa* were examined. *Ulva rigida* seaweed extract was characterized as more potent with an **IC<sub>50</sub> of 5,5 mg/mL** in the DPPH method, an **IC<sub>50</sub> of 0,95 mg/mL** in the ABTS+ method, an **IC<sub>50</sub> of 0,7 mg/mL** in OH radical inhibition method; and an **RP0.5AU of 1,37 mg/mL** for the reducing power method.

The results of the study showed that the tested extracts, specifically that one of *Ulva rigida*, had a remarkable antioxidant effect and should be further studied for their beneficial effects.

Key words: antioxidant, oxidative stress, free radicals, DPPH, ABTS+, Superoxide Radicals, Hydroxyl Radicals, Reducing Power

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες .....	9
1.1.1 Τύποι ελευθέρων ριζών.....	9
1.1.2 Ενδογενείς, εξωγενείς και φυσιολογικές πηγές ROS.....	10
1.1.3 ROS και παθογένεση.....	12
1.2 Οξειδωτικό στρες .....	12
1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	13
1.3.1 Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά.....	14
1.3.2 Αντιοξειδωτικά ως συμπληρώματα διατροφής .....	17
1.4 Βρωμοφαινόλες.....	17
1.5 Φύκη.....	22
1.5.1 Εισαγωγή.....	22
1.5.2 <i>Gracilaria gracilis</i> .....	22
1.5.3 <i>Gracilaria</i> sp. ....	24
1.5.4 <i>Ulva rigida</i> .....	24
1.5.5 <i>Codium fragile</i> .....	25
1.5.6 <i>Ulva intestinalis</i> .....	26
1.5.8 <i>Gracilaria bursa-pastoris</i> .....	28
1.5.9 <i>Sargassum vulgare</i> .....	29
2. Σκοπός του πειράματος.....	29
3. Υλικά και μέθοδοι.....	30
3.1 Παρασκευή Εκχυλισμάτων.....	30
3.2 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•.....	30
3.3 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+ .....	33
3.4 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	35
3.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• .....	37
3.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> •- ....	41

3.7 Στατιστική ανάλυση για εύρεση συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων.....	43
4. Αποτελέσματα .....	44
4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH .....	44
4.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+.....	50
4.3 Μέθοδος προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης.....	55
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•.....	61
4.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> •-.....	67
5. Συζήτηση .....	73
6. Βιβλιογραφία .....	77



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι **ελεύθερες ρίζες (ROS)**, παράγονται από διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές οξειδωτικές διεργασίες στο σώμα μας και συνδέονται με πολυάριθμες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες (Prasad S.,2017). Ένα μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του περίβλημα ονομάζεται ελεύθερη ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνουν το **υδροξύλιο ( $\text{OH}\cdot$ )**, το **υπεροξειδίο ( $\text{O}_2\cdot-$ )**, το **μονοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}\cdot$ )**, το **διοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}_2\cdot$ )**, το **υπεροξύλιο ( $\text{ROO}\cdot$ )** και το **υπεροξύλιο λιπιδίων ( $\text{LOO}\cdot$ )**. Επίσης, το **υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**, το **όζον ( $\text{O}_3$ )**, το **μονό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ )**, το **υποχλωριώδες οξύ ( $\text{HOCl}$ )**, το **νιτρώδες οξύ ( $\text{HNO}_2$ )**, το **υπεροξυνιτρώδες ( $\text{ONOO-}$ )**, το **τριοξειδίο του διαζώτου ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )**, το **υπεροξειδίο των λιπιδίων ( $\text{LOOH}$ )**, δεν είναι ελεύθερες ρίζες και γενικά ονομάζονται οξειδωτικά, αλλά μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς (Pham- Huy LA, et. al., 2008).

Η παραγωγή τους γίνεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, τόσο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών όσο και παθολογικών καταστάσεων. Παρά το γεγονός ότι αυτά τα οργανίδια έχουν μια εγγενή ικανότητα εξουδετέρωσης **ROS**, δεν αρκεί για να καλυφθεί η κυτταρική ανάγκη ώστε να εξουδετερωθεί η ποσότητα των **ROS** που παράγεται από τα μιτοχόνδρια (Pizzino et.al.,2017).

#### 1.1.1 Τύποι ελευθέρων ριζών

Σύμφωνα με τους Engwa, G. A. (2018), έχουν εντοπιστεί αρκετοί τύποι ελεύθερων ριζών σε ανθρώπους και σε άλλα θηλαστικά, που περιλαμβάνουν μόρια **υπεροξειδίου, ομάδες υδροξυλίου ( $\text{OH}$ )**, το **οξειδίο του αζώτου** και το **υπεροξειδίο του υδρογόνου**:

- Το **υπεροξειδίο**, είναι η πιο γνωστή ελεύθερη ρίζα από όλα τα είδη που προέρχονται από το οξυγόνο και είναι αναπόσπαστο μέρος της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης από τα λευκοκύτταρα. Τα **ανιόντα υπερροξειδίου ( $\text{O}_2\cdot-$ )** είναι ασθενή οξειδωτικά. Ωστόσο, παράγουν ισχυρές και επικίνδυνες ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) καθώς και το μονό μοριακό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ), που και τα δύο συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες (Gulcin et al., 2006a). Αυτές οι ρίζες είναι βιολογικά τοξικές και αναπτύσσονται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να σκοτώσουν τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς. Στα φαγοκύτταρα, παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από το ένζυμο οξειδάση **NADPH** που χρησιμοποιείται από εξαρτώμενους από το οξυγόνο μηχανισμούς

θανάτωσης παθογόνων που εισβάλλουν στον οργανισμό. Οι **ρίζες υπεροξειδίου** έχει παρατηρηθεί ότι σκοτώνουν τα κύτταρα, αδρανοποιούν τα ένζυμα και αποικοδομούν DNA, κυτταρικές μεμβράνες και πολυσακχαρίτες. Επίσης, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Ως εκ τούτου, η μελέτη των επιδράσεων σάρωσης των πεπτιδίων ασβεστίου καζεΐνης στις ρίζες υπεροξειδίου είναι ένας από τους πιο σημαντικούς τρόπους αποσαφήνισης του μηχανισμού της αντιοξειδωτικής δράσης.

- Το **υδροξύλιο** είναι η πιο τοξική ρίζα που βασίζεται στο οξυγόνο και προκαλεί σημαντικές βλάβες στα κύτταρα, ιδιαίτερα στα μακρομόρια.. Αυτή η ρίζα είναι εξαιρετικά δραστική, μετατρέπεται εύκολα σε υδροξυλομάδα και κατά συνέπεια είναι βραχύβια (Gulcin I., 2020) αλλά και η πιο επιβλαβής ρίζα στο σώμα (Engwa, G. A. 2018). Αποτελεί την ουδέτερη μορφή των ιόντων υδροξειδίου ( $\text{OH}^-$ ). Αντιδράει με τα νουκλεοτίδια και προκαλεί θραύση της αλυσίδας του DNA που οδηγεί σε καρκινογένεση, μεταλλαξιογένεση και κυτταροτοξικότητα. Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν περιστασιακά να παραχθούν ως υποπροϊόν της ανοσολογικής δράσης. Τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα δημιουργούν συχνά αυτή την ένωση όταν εκτίθενται σε πολύ συγκεκριμένα παθογόνα και ορισμένα βακτήρια (Gulcin I., 2020).
- Το **υπεροξείδιο του υδρογόνου** δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά ανήκει στην κατηγορία των δραστικών ειδών οξυγόνου.
- Το **μονοξείδιο του αζώτου** είναι άλλη μια φυσιολογική ελεύθερη ρίζα που παράγεται από το αγγειακό ενδοθήλιο ως χαλαρωτικός παράγοντας, καθώς και από τα φαγοκύτταρα και από τον εγκέφαλο. Έχει πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά η περίσσειά του μπορεί να είναι τοξική. Εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση κ.λπ. και σε πολλές άλλες βιολογικές επιδράσεις (π.χ. διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, σηματοδότηση). Το αυξημένο μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη οξειδωτικού στρες κατά τη γήρανση (Engwa, G. A., 2018).

### 1.1.2 Ενδογενείς, εξωγενείς και φυσιολογικές πηγές ROS

Τα **ROS** παράγονται μέσα στα κύτταρα τόσο από **ενδογενείς** όσο και από **εξωγενείς πηγές**, και από φυσιολογικές πηγές (Engwa, G. A., 2018):

- Οι **ενδογενείς πηγές** περιλαμβάνουν αντιδράσεις που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα, στο σύστημα του κυτοχρώματος P450, στη φαγοκυττάρωση και στη σύνθεση προσταγλανδινών. Μερικές από αυτές τις ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών περιλαμβάνουν αντιδράσεις στα μιτοχόνδρια, στα φαγοκύτταρα, στις αραχιδονικές οδούς, κ.λπ. Επίσης, αντιδράσεις που περιλαμβάνουν σίδηρο και άλλα μέταλλα μετάπτωσης, υπεροξειδιοσώματα, οξειδάση ξανθίνης, κ.λπ. είναι επίσης ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών.
- Οι **εξωγενείς πηγές** περιλαμβάνουν περιβαλλοντικούς ρύπους, καπνό τσιγάρου, αλκοόλ, ακτινοβολίες, όζον, υπεριώδες φως, φυτοφάρμακα, αναισθητικά, ορισμένα φάρμακα, βιομηχανικούς διαλύτες κ.λπ. Η ιονίζουσα ακτινοβολία παράγει ROS μέσω αλληλεπίδρασης με το νερό. Κατά την αλληλεπίδραση, το νερό χάνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται διαδοχικά σε ρίζα υδροξυλίου ( $\text{-OH}$ ), υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ρίζα υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ) και τελικά οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) (Prasad S., 2017) .
- Στις **φυσιολογικές πηγές** περιλαμβάνονται ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις ή διαδικασίες όπως το στρες, η γήρανση κ.λπ.. Η ψυχολογική κατάσταση και οι ασθένειες είναι επίσης υπεύθυνες για το σχηματισμό ελεύθερων ριζών.

### 1.1.3 ROS και παθογένεση

Τα **ROS** διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην **παθογένεση** διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών. Σε **χαμηλές συγκεντρώσεις**, τα **ROS** παρουσιάζουν ευεργετικά αποτελέσματα ρυθμίζοντας την ενδοκυτταρική σηματοδότηση και την ομοιόσταση (Prasad S., 2017). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, η ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων, η απόπτωση, η ανοσία και η διαφοροποίηση, εξαρτώνται όλες από την κατάλληλη παραγωγή **ROS** και την παρουσία τους μέσα στα κύτταρα που πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλό επίπεδο. Όταν η **παραγωγή ROS αυξάνεται**, αρχίζουν να παρουσιάζονται επιβλαβείς επιπτώσεις σε σημαντικές κυτταρικές δομές όπως στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα (Pizzino et.al.,2017). **Υψηλά επίπεδα ROS** σε οποιοδήποτε φυσιολογικό κύτταρο μπορεί να το μετατρέψει σε κακοήγη κύτταρο και επομένως παίζει σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια του καρκίνου. Η ανάπτυξη καρκίνου με τη μεσολάβηση **ROS** περιλαμβάνει διάφορα μόρια σηματοδότησης. Τα **ROS** έχουν πολύπλοκο ρόλο σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης καρκίνου. Εμπλέκονται στο μετασχηματισμό, στην επιβίωση του όγκου, στον πολλαπλασιασμό, στην εισβολή και στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Τα συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας στο ανθρώπινο σώμα διατηρούν την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της εξουδετέρωσης των **ROS** και περιλαμβάνουν για παράδειγμα την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx), την αναγωγή γλουταθειόνης (GR), τη S-τρανσφεράση γλουταθειόνης (GST) και τη γλουταθειόνη (GSH). Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών θρεπτικών ουσιών μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης καθώς και να βοηθήσει στη θεραπεία του καρκίνου (Prasad S.,2017).

### 1.2 Οξειδωτικό στρες

Το **οξειδωτικό στρες** είναι μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διακοπή της σηματοδότησης και του ελέγχου οξειδοαναγωγής ή/και μοριακής βλάβης (Sies H.,et al., 2017).

Το **οξειδωτικό στρες** είναι διπλής όψης. Ενώ η υπερβολική παραγωγή οξειδωτικών προκαλεί βλάβες στα βιομόρια, η διατήρηση ενός φυσιολογικού επιπέδου οξειδωτικής παραγωγής, που ονομάζεται οξειδωτικό eustress, είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση των διαδικασιών ζωής μέσω της σηματοδότησης οξειδοαναγωγής (Sies et.al.,2017). Το **οξειδωτικό στρες** μπορεί να ευθύνεται, σε διαφορετικό βαθμό, στην εμφάνιση ή/και στην εξέλιξη αρκετών

ασθενειών (δηλαδή καρκίνου, διαβήτη κ.α.). Πολλά αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την ευεργετική τους δράση κατά του **οξειδωτικού στρες**, όπως η βιταμίνη E, τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες. Ενώ το **οξειδωτικό στρες** περιγράφεται ως επιβλαβές για τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι επίσης αλήθεια ότι αξιοποιείται ως θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία κλινικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, με κάποιο βαθμό κλινικής επιτυχίας (Pizzino et.al.,2017).

### 1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στη χημεία το «**αντιοξειδωτικό**» νοείται απλώς ως «μία ένωση που αφαιρεί αντιδρώντα είδη, κυρίως εκείνα που προέρχονται από οξυγόνο», ενώ σε ένα κυτταρικό πλαίσιο, ο εννοιολογικός ορισμός ενός αντιοξειδωτικού είναι ελάχιστα κατανοητός (Salehi B.,et.al., 2018). Ένα **αντιοξειδωτικό** είναι ένα μόριο ικανό να αναστέλλει την οξείδωση άλλων μορίων. Σε έναν άλλο ορισμό (Halliwell, 1997), ένα αντιοξειδωτικό ορίζεται ως μία ουσία που καταστρέφει άμεσα τα **ROS** ή δρα έμμεσα για να αυξήσει την αντιοξειδωτική άμυνα ή να αναστέλλει την παραγωγή **ROS**».

Η λειτουργία τους μπορεί να ταξινομηθεί σε διακριτές αμυντικές γραμμές, σύμφωνα με τους μηχανισμούς δράσης τους σε (Salehi B.,et.al.,2018):

1. προληπτικούς παράγοντες που καταστέλλουν το σχηματισμό νέων ριζών.
2. παράγοντες εξουδετέρωσης των ριζών που αναστέλλουν την έναρξη και/ή τον πολλαπλασιασμό όπως γλουταθειόνη, λευκοματίνη, βιταμίνες C και E, καροτενοειδή και φλαβονοειδή.
3. επιδιόρθωση και de novo ένζυμα που επιδιορθώνουν και ανασυνθέτουν τις κυτταρικές μεμβράνες, που περιλαμβάνουν λιπάσες, πρωτεάσες, ένζυμα επιδιόρθωσης DNA, τρανσφεράσες και αναγωγάσες σουλφοξειδίου της μεθειονίνης.
4. παράγοντες προσαρμογής που δημιουργούν κατάλληλα αντιοξειδωτικά ένζυμα και τα μεταφέρουν στο βασικό σημείο δράσης. Η ισορροπία οξειδοαναγωγής είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του υγιούς κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος.

### 1.3.1 Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, τα οποία είναι προϊόντα του μεταβολισμού του σώματος, μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη.

Όπως παρουσιάζεται και στο σχεδιάγραμμα 1.3.1 ένα από τα **ενζυμικά** αντιοξειδωτικά που παίζουν σημαντικό ρόλο στην **πρώτη γραμμή** άμυνας του οργανισμού είναι η **υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)** (Babula P., et.al., 2012). Αυτό το ένζυμο υπάρχει σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, και μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ . Το μιτοχονδριακό και το βακτηριακό **SOD** περιέχει Mn, ενώ το κυτοσολικό **SOD** είναι ένα διμερές που περιέχει Cu και Zn. Καθώς το  $H_2O_2$  μπορεί ακόμα να αντιδρά με άλλα ROS, πρέπει να αποικοδομηθεί από ένα από τα άλλα δύο αντιοξειδωτικά ένζυμα, το **GSH-Px** ή την καταλάση (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernandez-Mej, C., 2013).

Η **υπεροξειδάση της GSH** βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Καταλύει την αποδόμηση του  $H_2O_2$  με αναγωγή, όπου δύο μόρια **γλουταθειόνης (GSH)** οξειδώνονται σε **δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG)**. Η αναγέννηση της **GSH** από την **GSH-αναγωγάση**, απαιτεί **NADPH**, η οποία οξειδώνεται σε **NADP+**. Η καταλάση, από την άλλη πλευρά, εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδισώματα και έτσι απομακρύνει το  $H_2O_2$  που διαχέεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, μετατρέποντάς το σε  $H_2O$  και μοριακό οξυγόνο (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernandez-Mej, C., 2013).

Η **GPX** είναι μια εξαρτώμενη από σελήνιο οξειδοοδουκτάση, η οποία χρησιμοποιεί  $H_2O_2$  ή οργανικό υδροϋπεροξείδιο ως οξειδωτικό και το τριπεπτίδιο **GSH** ως δότη ηλεκτρονίων, σε έναν τυπικό καταλυτικό κύκλο υπεροξειδάσης κατηγορίας I (αντιδράσεις 6 και 7).



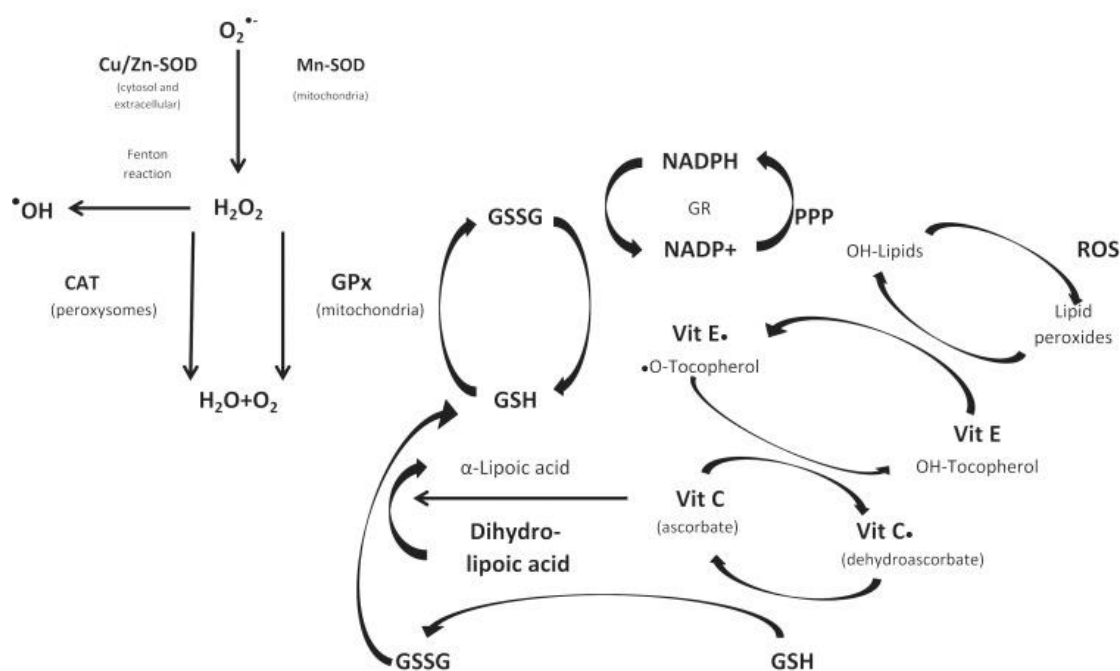
Η οικογένεια **GPX** αποτελείται από οκτώ ισοένζυμα (**GPX1-8**). Κάθε ένζυμο παρουσιάζει ιδιόμορφα χαρακτηριστικά. Τα **GPX 1, 2, 3** και **4** ενσωματώνουν σεληνοκυστεΐνη (ένα μη τυπικό αμινοξύ, όπου το άτομο θείου της κυστεΐνης αντικαθίσταται από σελήνιο). Το **GPX6** περιέχει σελήνιο μόνο στους ανθρώπους, αλλά όχι στα τρωκτικά, ενώ τα **GPX5, 7** και **8** δεν έχουν σελήνιο, αλλά μια «φυσιολογική» κυστεΐνη (Sharifi -Rad, M., 2020).

Άλλα σημαντικά **ενζυμικά** αντιοξειδωτικά στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού περιλαμβάνουν την **αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)** και τις **υπεροξειρεδοξίνες (Prxs)**.

Τα **μη ενζυμικά** αντιοξειδωτικά που συμμετέχουν στην πρώτη γραμμή άμυνας και ανήκουν σε προληπτικά αντιοξειδωτικά και στο πλάσμα του αίματος αντιπροσωπεύονται από τη σερουλοπλασμίνη, τη φερριτίνη, την τρανσφερρίνη και τη λευκωματίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες αναστέλλουν το σχηματισμό νέων δραστικών ειδών δεσμεύοντας ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (π.χ. σίδηρο και χαλκό). Επίσης, η μεταλλοθειονεΐνη παίζει ουσιαστικό ρόλο στην πρόληψη κατά των αντιδρώντων ειδών. Οι κύριες αντιοξειδωτικές της ιδιότητες προκύπτουν από την παρουσία μεγάλου αριθμού ομάδων -SH (Babula P., et.al., 2012).

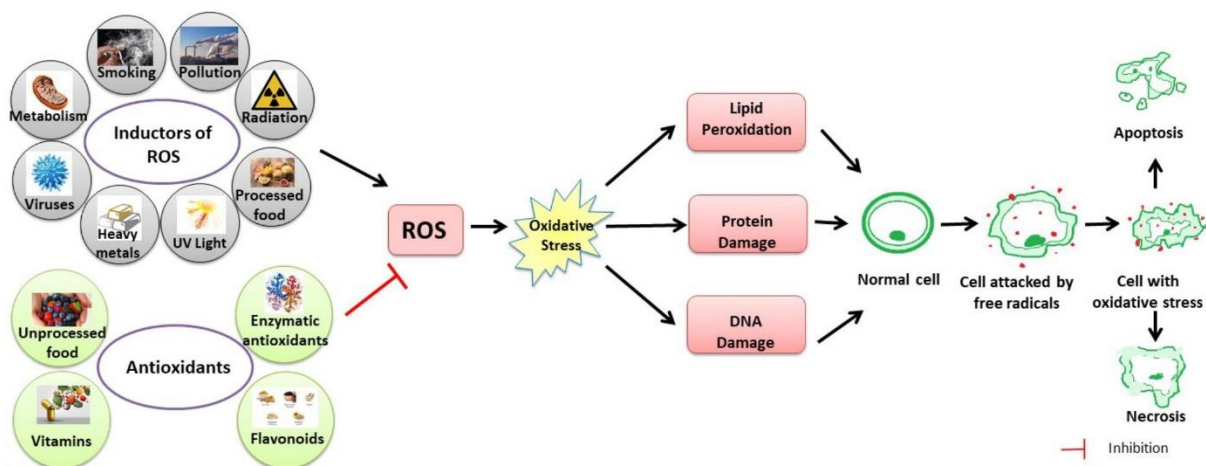
Η **δεύτερη γραμμή** άμυνας κατά των ROS περιλαμβάνει μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται από μόρια που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αδρανοποιούν γρήγορα τις ρίζες και τα οξειδωτικά (Mironczuk-Chodakowska, I., et.al., 2018).

Η **τρίτη γραμμή** άμυνας συνίσταται από μηχανισμούς επιδιόρθωσης έναντι των ζημιών που προκαλούνται από **ROS** και **ελεύθερες ρίζες**. Αυτή η μορφή προστασίας παρέχεται από ενζυμικά αντιοξειδωτικά, τα οποία μπορούν να επιδιορθώσουν το κατεστραμμένο DNA και τις πρωτεΐνες, να καταπολεμήσουν τα οξειδωμένα λιπίδια, να σταματήσουν τη διάδοση της αλυσίδας των ριζών υπεροξυλιπιδίων και να επιδιορθώσουν τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες και τα μόρια. Διαιτητικά αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη E, βιταμίνη C, καροτενοειδή, το α-λιπολικό οξύ, ορισμένα μέταλλα (π.χ. Zn, Mn, Cu, Se) και πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, στυλβένια, λιγνάνες) μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών (Muftuoglu M., et.al., 2014). Αν και όλες αυτές οι αντιοξειδωτικές άμυνες συνεργάζονται για την εξάλειψη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (και συνεπώς του υπεροξειδίου) από το κύτταρο, παρουσία ανηγμένων μετάλλων μετάπτωσης (Cu, Fe), το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να μετατραπεί σε OH<sup>•</sup> το οποίο είναι ένα εξαιρετικά αντιδραστικό **ROS**, με βάση την αντίδραση Fenton (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernandez-Mej, C., 2013).



Σχεδιάγραμμα 1.3.1 : Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής προστασίας (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernandez-Mej, C., 2013)

Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορεί να δράσουν συνεργικά για να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες σε φρούτα, λαχανικά, ποτά (χυμοί, τσάι, καφές), ξηρούς καρπούς και δημητριακά που καταναλώνονται συνήθως (Zujko et.al.,2012).



Εικόνα 1.3.1 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ ROS, οξειδωτικού στρες και των επιπτώσεών τους στον ανθρώπινο οργανισμό (Sharifi-Rad, M.,et.al.,2020).



### 1.3.2 Αντιοξειδωτικά ως συμπληρώματα διατροφής

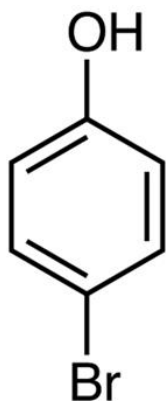
Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής λόγω του πιθανού προληπτικού τους ρόλου σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, που εμφανίζεται όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS είτε λόγω εξάντλησης των αντιοξειδωτικών ή λόγω συσσώρευσης ROS (Corsetto et.al.,2020). Τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται συχνά από τον παγκόσμιο πληθυσμό με βάση την πεποίθηση ότι ο καρκίνος, η φλεγμονή και οι εκφυλιστικές ασθένειες προκαλούνται από υψηλά επίπεδα ROS, και άρα μέσω της παρεμπόδισης της παραγωγής αντιδραστικών ειδών, οι ανισορροπίες/διαταραχές μπορούν να προληφθούν ή/και να αντιμετωπιστούν (Salehi B.,et.al.,2018). Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για φυσικά και ασφαλέστερα αντιοξειδωτικά που εφαρμόζονται στα τρόφιμα και μια αυξανόμενη τάση στις προτιμήσεις των καταναλωτών προς τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν δώσει ώθηση στις προσπάθειες εύρεσης φυσικών πηγών αντιοξειδωτικών (Gulcin I, 2020).

### 1.4 Βρωμοφαινόλες

Τα θαλάσσια φύκη είναι εξαιρετικά πλούσιες πηγές δομικά ποικίλων βιοδραστικών ενώσεων. Ένας αριθμός νέων ενώσεων που ονομάζονται **βρωμοφαινόλες (BPs)**.

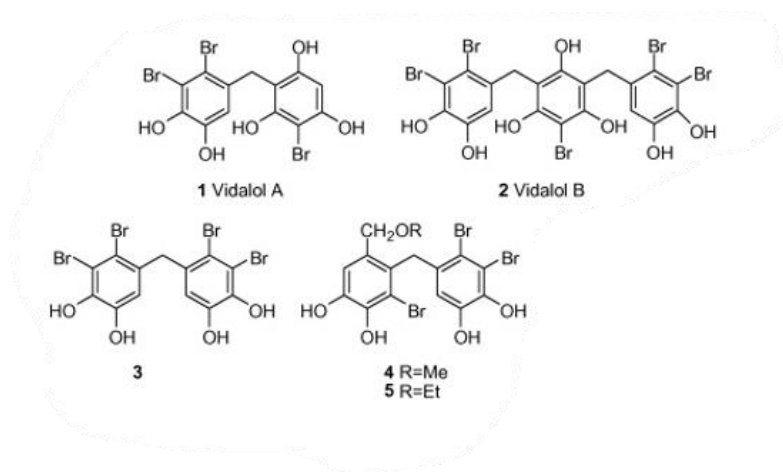
Παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δραστηριότητες και έχουν απομονωθεί από τα θαλάσσια φύκη. Αποτελούν κοινούς θαλάσσιους δευτερογενείς μεταβολίτες και βιοσυντίθενται παρουσία βρωμοϋπεροξειδασών, βρωμάσης, λακκάσης, υπεροξειδίου του υδρογόνου και βρωμιδίου (Dong H.,et.al.,2020).

Δομικά, οι **BPs** περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερους δακτυλίους βενζολίου και περιέχουν διαφορετικούς αριθμούς υδροξυλίου, βρωμίου ή άλλων ομάδων (Dong H.,et.al.,2020). Οι βρωμοφαινόλες παράγονται έπειτα από την ηλεκτροφιλική υποκατάσταση μιας φαινόλης με το βρώμιο.



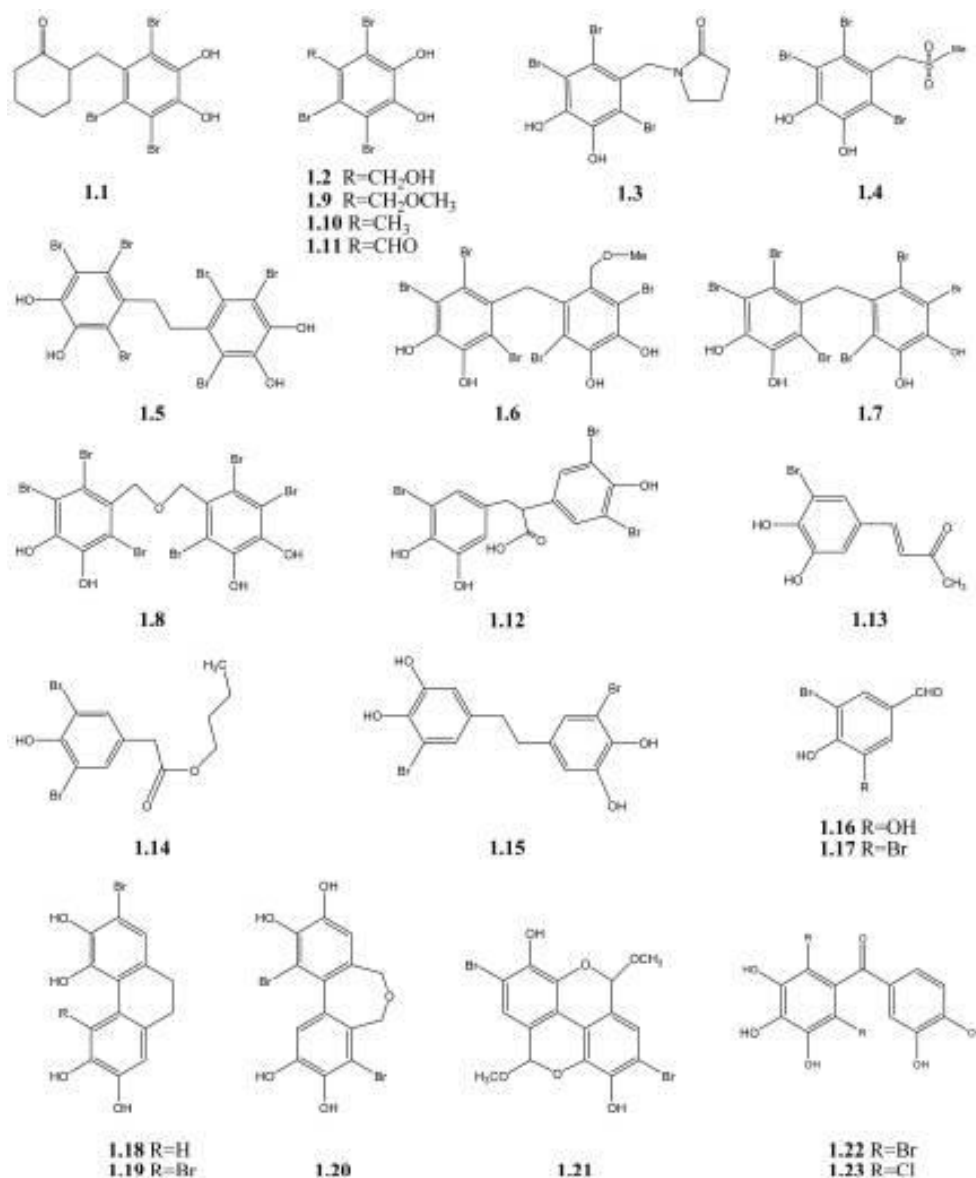
Εικόνα 1.4.1 Τυπική δομή βρωμοφαινόλης

Με την πάροδο των χρόνων, οι θαλάσσιες **BPs** έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή στον τομέα των τροφίμων και των φαρμακευτικών παραγόντων λόγω των ευεργετικών βιολογικών τους δραστηριοτήτων (Dong H., et.al.,2020). Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Liu Mi.,et.al., (2011), βρέθηκε ότι οι **BPs** έχουν ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες όπως αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες. Επίσης, εμφανίζουν ιδιότητες κατά της παχυσαρκίας, προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, προστασία από τη νόσο του Αλτσχάϊμερ και του Πάρκινσον και ενζυμικές ανασταλτικές δραστηριότητες (Dong H.,et.al., 2020). Για παράδειγμα, με βάση μια έρευνα από τους Blunt J.W.,et.al.,(2012) οι **BPs** *Vidalol A* (1) και *Vidalol B* (2), που απομονώθηκαν από το θαλάσσιο κόκκινο φύκος *Vidalia*, αποδείχθηκε ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Από την άλλη πλευρά, οι **BPs** **3-5** που απομονώθηκαν από το καφέ φύκος *Leathesia nana* παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δράση.



Εικόνα 1.4.2 Βρωμοφαινόλες απομονωμένες από τα φύκη *Vidalia* και *Leathesia nana* (Blunt J.W.,et.al.,2012)

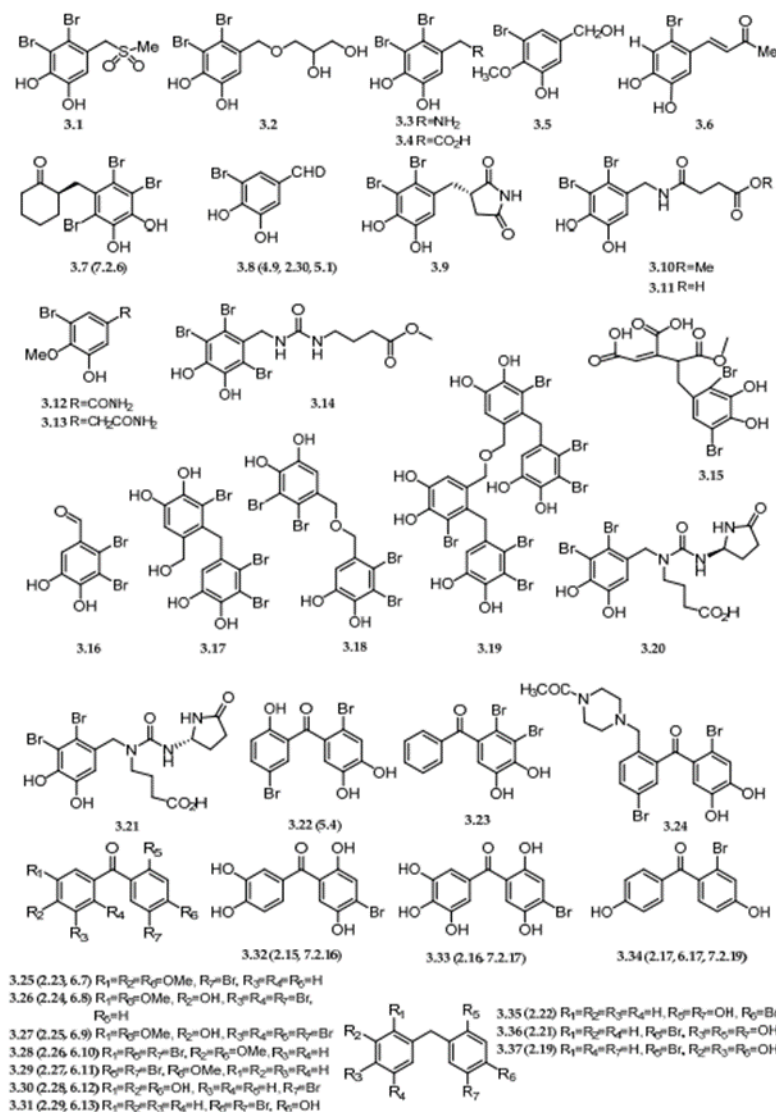
Οι Liu et.al, 2011, μελέτησαν έναν αριθμό **BPs** (Εικόνα 1.4.3) οι οποίες απομονώθηκαν από το κόκκινο φύκος *Symphyclocladia latiuscula* και μελέτησαν την αντιοξειδωτική τους δράση. Η ένωση 1.2 βρέθηκε ότι έχει την υψηλότερη δραστηριότητα ενώ η 1.11 την χαμηλότερη. Οι ενώσεις 1.18 και 1.19, οι οποίες έχουν και οι δύο τέσσερις ομάδες υδροξυλίου στα μόρια, είναι οι πιο δραστικές. Επομένως, ο αριθμός των υδροξυλομάδων στα μόρια έχει σημαντικό ρόλο για την αντιοξειδωτική δράση (Duan XJ,et.al., 2007). Επιπλέον, η 3,4-δυσδροξυ-2,5,6-τριβρωμοβενζυλοξυ μονάδα τους ή τα παράγωγά τους μπορεί να είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για τη δράση τους. Η βρωμίωση μειώνει ελαφρώς τη δραστηριότητα στην περίπτωση των 1.5 και 1.15, ενώ την αύξησε ελαφρά στο 1.19 έναντι του 1.18 (Liu et.al.,2011).



Εικόνα 1.4.3 Δομές βρωμοφαινόλων που απομονώθηκαν από το φύκος *Symphyclocladia latiuscula* (Liu et.al., 2011)

Η συγκριτική μελέτη από τους Dong et.al., (2020) επιβεβαίωσε περαιτέρω ότι οι **BPs** είναι ικανές για την πρόληψη χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Σε σύγκριση με πριν από δέκα χρόνια, εκτός από τις φυσικές **BPs**, παράγωγα **BPs** έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για τη δράση τους ενάντια των ελευθέρων ριζών. Στην παρακάτω εικόνα (1.4.4), παρουσιάζονται φυσικές βρωμοφαινόλες, που έχουν απομονωθεί από κόκκινα φύκη, αλλά και συνθετικές. Η ένωση 3.7 φαίνεται να έχει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση με IC<sub>50</sub>=8.5 μM ενώ η ένωση 3.8 παρουσιάζει ποικίλες δράσεις όπως να αναστέλλει σημαντικά την

παραγωγή **ROS**, την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τον κυτταρικό θάνατο στο οξειδωτικό στρες που διεγείρεται από  $H_2O_2$  σε έμβρυα ψαριών ζέβρα κ.α.



Εικόνα 1.4.4 Δομές βρωμοφαινόλων που απομονώθηκαν από κόκκινα φύκη (Dong et.al.,2020)

Τόσο in vivo όσο και in vitro μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση της δράσης των θαλάσσιων BPs κατά των ελευθέρων ριζών, παρέχοντας πειραματικά δεδομένα. Όμως η δημιουργία ενός εκλεκτικού, ασφαλούς και αποτελεσματικού νέου φαρμάκου που θα προέρχεται από τις BPs θαλάσσιων οργανισμών αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία (Dong et.al.,2020).

## 1.5 Φύκη

### 1.5.1 Εισαγωγή

Τα φύκη μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες ανάλογα με τη χρώση τους, σε καφέ, κόκκινα και πράσινα. Οι βοτανολόγοι αναφέρουν αυτές τις ευρείες ομάδες ως Phaeophyceae, Rhodophyceae και Chlorophyceae, αντίστοιχα (McHugh D., 2003).

Τα φύκη αποτελούν πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών και διαφορετικών ειδών βιοδραστικών ουσιών όπως οι φουκοϊδάνες, οι καροτενοειδείς χρωστικές κ.α (Rengasamy et.al.,2020).

Η χρήση και οι βιομηχανικές εφαρμογές των φυκών είναι άφθονες στις ανατολικές χώρες, ενώ στις δυτικές χώρες τα φύκη χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα για την παραγωγή φυκοκολλοειδών. Λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους σε πηκτή, οι πολυσακχαριτικές ίνες των φυκών, ιδιαίτερα το αλγινικό οξύ, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως σταθεροποιητικά και συγκρατητικά μέσα. Είναι πολύ σημαντικά βιομηχανικά συστατικά σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των καλλυντικών και φαρμακευτικών/ιατρικών προϊόντων, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων ως πυκνωτικά, πηκτώματα, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι βιολογικές δράσεις των φυκών υποστηρίζουν τον πιθανό ρόλο τους ως φυσικά αντιοξειδωτικά, τα εκχυλίσματα φυκών και οι καθαρές ενώσεις που περιέχονται σε αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργά συστατικά για τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας των λειτουργικών τροφίμων (Corsetto et.al.,2020).

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν 8 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους και αναφέρονται παρακάτω:

### 1.5.2 *Gracilaria gracilis*

Το ***Gracilaria gracilis*** είναι ένα θαλάσσιο κόκκινο μακροφύκος που ανήκει στα Rhodophyta. Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του σε άγαρ περιλαμβάνεται επίσης στα αγαρόφυτα. Έχει παγκόσμια κατανομή και αναπτύσσεται σε εύκρατα νερά (Guiry ,M.D.) σε βάθος μεταξύ 0 και 20 μέτρων. Ο κύκλος ζωής, η ανάπτυξη και η περιεκτικότητά του σε φυκοκολλοειδή εξαρτώνται από διαφορετικές παραμέτρους του θαλασσινού νερού, όπως η θερμοκρασία και η αλατότητα, η ακτινοβολία, τα διαλυμένα θρεπτικά άλατα όπως και η παρουσία άλλων ειδών φυκών και επίφυτων. Η βέλτιστη θερμοκρασία για ανάπτυξη τους

κυμαίνεται μεταξύ 19°C με 23°C. Τα φύκη καταπονούνται σε θερμοκρασίες άνω των 28°C (Polifrone M.,2006).

Πίνακας 1.5.2 Ταξινόμηση *Gracilaria Gracilis*

Division	Order	Class	Family
Rhodophyta	Floridae	Gigartinales	Gracilariaceae



Εικόνα 1.5.2 *Gracilaria gracilis*

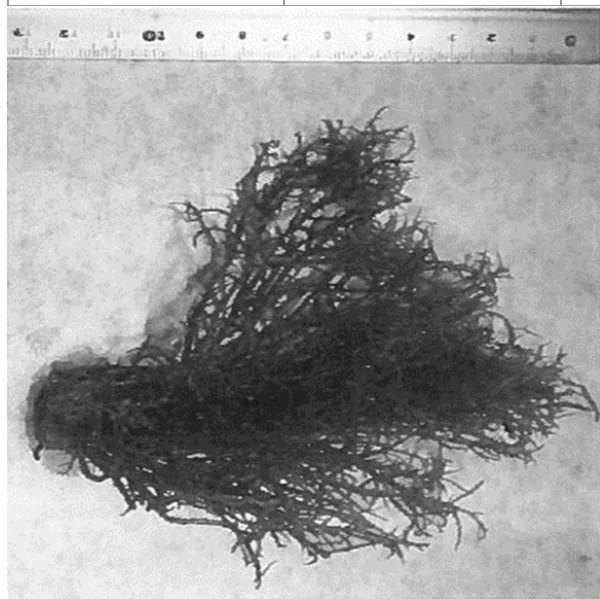


### 1.5.3 Gracilaria sp.

Το **Gracilaria sp.** είναι ένα θαλάσσιο κόκκινο μακροφύκος που ανήκει στα Rhodophyta. Ο θαλλός είναι όρθιος ή κατάκοιτος κατάκλινος, διακλαδισμένος υποδιχοτομικά, πλευρικά, ακτινωτά ή ακανόνιστα. Προσαρμόζεται σε συμπαγές υπόστρωμα με ένα μικρό δισκοειδές συγκρότημα ή ζει σε αμμώδη βυθό με ένα μέρος του θαλλού να είναι βυθισμένο στην άμμο. Μερικές φορές χαλαρά ξαπλωμένο ή επιπλέει σε ήρεμα νερά. Τα τυπικά ενδιαιτήματα αυτού του είδους είναι προστατευμένα περιβάλλοντα όπως όρμοι ή εκβολές ποταμών. Αναπτύσσεται σε διαπαλιρροιακά ή υποπαλιρροιακά βραχώδη, αμμώδη ή λασπώδη υποστρώματα ή σε βραχώδεις εκτάσεις που σχετίζονται με αμμώδη παραλία (FAO,2022).

*Πίνακας 1.5.3 Ταξινόμηση Gracilaria sp.*

Division	Order	Class	Family
Rhodophyta	Gracilariales	Florideophyceae	Gracilariaceae



*Εικόνα 1.5.3 Gracilaria sp*

### 1.5.4 Ulva rigida

Το **Ulva rigida** είναι ένα θαλάσσιο πράσινο μακροφύκος που ανήκει στα Chlorophyta. αναπαράγεται εγγενώς. Ο θαλλός είναι λεπτός, σαν φύλλο, σαν χλοοτάπητας, με τούφες ή μοναχικές λεπίδες, μεταβλητού σχήματος, ύψους έως 10 cm. Τα κρατήματα αποτελούνται από μικρά, σκληρά ριζοειδή. Το χρώμα τους είναι λαμπερό πράσινο έως σκούρο πράσινο, με χρυσό στα περιθώρια κατά την περίοδο της αναπαραγωγής. Μπορεί να είναι άχρωμο όταν βρίσκεται



κάτω από συνθήκες στρες. Το **Ulva rigida** βρίσκεται συνήθως σε διαπαλιρροιακούς βράχους, σε παλιρροϊκές πισίνες και σε υφάλους. Συχνά σε περιοχές με απορροή γλυκού νερού και με υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, όπως κοντά στα στόμια ρεμάτων και σε σωλήνες

απορροής

([https://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive\\_algae/chloro/ulva\\_rigida.htm](https://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/chloro/ulva_rigida.htm)).

Πίνακας 1.5.4 Ταξινόμηση *Ulva rigida*

Division	Order	Class	Family
Chlorophyta	Chlorophyceae	Ulvales	Ulvaceae



Εικόνα 1.5.4 *Ulva rigida*

#### 1.5.5 *Codium fragile*

Το **Codium fragile** είναι ένα είδος φυκίου που ανήκει στα Chlorophyta. Συνήθως, βρίσκεται ενδοπαλιρροιακά και υποπαλιρροιακά προσκολλημένο σε βράχους, θαλάσσιους τοίχους, προβλήτες και πλωτές αποβάθρες (Cohen, Carlton 1995) ενώ φαίνεται να προτιμά βράχους με ανατολική όψη. Μορφολογικά είναι ένα σκούρο πράσινο φύκι, ύψους από 10cm έως 40cm και αποτελείται από επαναλαμβανόμενα διακλαδιζόμενα κυλινδρικά τμήματα διαμέτρου. Το στήριγμα του είναι ένα φαρδύ σφουγγάρι που συνιστάται από ιστό. Το επιφανειακό στρώμα του φυτού καλύπτεται συχνά από άλλα μικρά επιφυτικά φύκια. Τα νεαρά

είδη του **Codium Fragile** στέκονται όρθια αλλά στη συνέχεια πέφτουν καθώς μεγαλώνουν. Το μήκος του μπορεί να ξεπεράσει τα 30 cm (Zaiko,2005).

Πίνακας 1.5.5 Ταξινόμηση *Codium fragile*

Phylum	Order	Class	Family
Chlorophyta	Bryopsidales	Ulvophyceae	Codiaceae



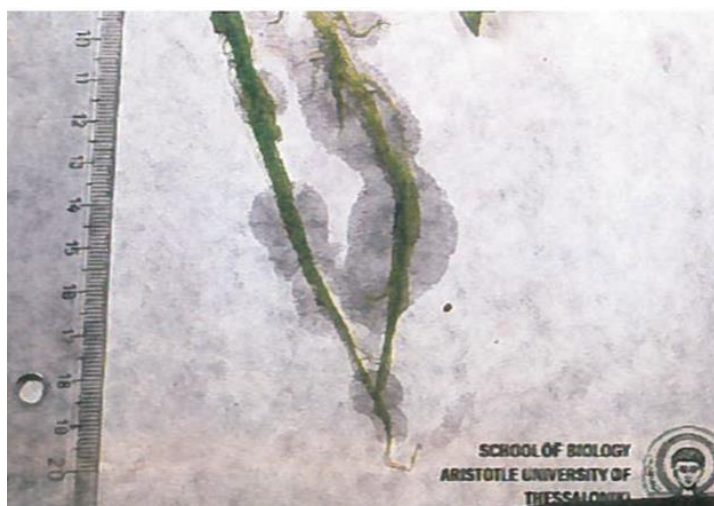
Εικόνα 1.5.5 *Codium fragile*

#### 1.5.6 *Ulva intestinalis*

Το **Ulva intestinalis** είναι ένα πράσινο φύκι που ανήκει στα Chlorophyta. Οι θαλλοί του είναι απλοί ή αραιοί, διακλαδιζόμενοι κοντά στη βάση, ή πολλαπλοί, πράσινοι έως κιτρινωπό-πράσινοι, 20–60 (80–100) cm ύψος, 0,5–1,0 (–6) cm πλάτος. Εντοπίζεται σε ρηχούς βράχους, σε νεκρούς κοραλλιογενείς όγκους, σε θραύσματα και σε νεκρά κοχύλια, σε υφάλμυρα νερά εκβολών ποταμών και κοντά σε πηγές οργανικής ρύπανσης. Ζουν επιφυτικά σε άλλα μεγάλα φύκια, που συχνά επιπλέουν (Titlyanov, E. A., et.al.,2017).

Πίνακας 1.5.6 Ταξινόμηση *Ulva intestinalis*

Division	Order	Class	Family
Chlorophyta	Dictyotales	Phaeophyceae	Dictyotaceae



Εικόνα 1.5.6 *Ulva intestinalis*

#### 1.5.7 *Colpomenia sinuosa*

Το φύκος ***Colpomenia sinuosa*** είναι ένας μοναχικός θαλλός, κοίλος, σφαιρικός, ημισφαιρικός, γίνεται λοβωτός ή ακανόνιστα διογκωμένος σε διάμετρο 10–30 cm, με ανοιχτό ή χρυσοκάστανο έως πρασινωπό-καφέ χρώμα. Η μεμβράνη του έχει πάχος 300–500  $\mu\text{m}$ . Έχει λεπτές, άχρωμες τρίχες σε τούφες, διάσπαρτες στην επιφάνεια του θαλλού. Αναπτύσσεται σε διαπαλιρροιακά και ρηγά υποπαλιρροιακά σκληρά υποστρώματα, συχνά επιφυτικά (Titlyanov, E. A., et.al., 2017).

#### Πίνακας 1.5.7 *Colpomenia sinuosa*

Phylum	Order	Class	Family
Ochrophyta	Ectocarpales	Phaeophyceae	Scytosiphonaceae



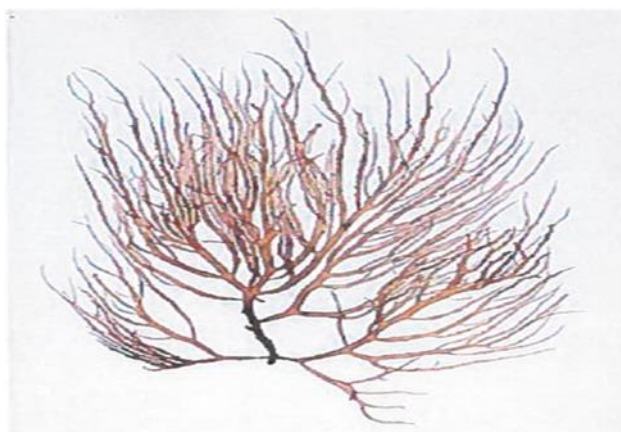
Εικόνα 1.5.7 *Colpomenia sinuosa*

#### 1.5.8 *Gracilaria bursa-pastoris*

Το ***Gracilaria bursa-pastoris*** είναι ένα κόκκινο φύκος που ανήκει στα Rhodophyta. Αναπτύσσεται σε τούφες μήκους 30 cm, πολύ διακλαδισμένες συνήθως απλά διχαλωτές ή εναλλάξ. Είναι κάπως συμπιεσμένο, αλλά όχι επίπεδο. Ο βιότοπος που αναπτύσσεται είναι επιλιθικός στον ανώτερο υποπαραθαλάσσιο (Morton, O. & Picton, B.E. 2016).

Πίνακας 1.5.8 *Gracilaria bursa-pastoris*

Phylum	Order	Class	Family
Rhodophyta	Gracilariales	Florideophyceae	Gracilariaceae



Εικόνα 1.5.8 *Gracilaria bursa-pastoris*

### 1.5.9 *Sargassum vulgare*

Το καφέ φύκι ***Sargassum vulgare*** είναι λιθόφυτο και αναπτύσσεται σε κοραλλιογενείς υφάλους, βράχους και πέτρες με κύριο άξονα μήκους περίπου 40 cm. Επιπλέει όρθιο μέσω κύστεων αερίων σε προστατευμένες ή εκτεθειμένες τοποθεσίες όλων των τροπικών και υποτροπικών ακτών από την υψηλή παλίρροια έως τις υποθαλάσσιες (Lawson G.W.,1956).

Πίνακας 1.5.9 Ταξινόμηση *Sargassum vulgare*

Phylum	Order	Class	Family
Ochrophyta	Fucales	Phaeophyceae	Sargassaceae



Εικόνα 1.5.9 *Sargassum vulgare*

## 2. Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων 8 ειδών θαλάσσιων φυκιών των *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis* και *Sargassum vulgare* με τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους DPPH, ABTS, Reducing power, ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου και ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών σουπεροξειδίου.



### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Παρασκευή Εκχυλισμάτων

Η συλλογή και η ταυτοποίηση των φυκών έγινε από την Καθηγήτρια κ. Παρασκευή Μαλέα του Τμήματος Βιολογίας του Α.Π.Θ.

Η απομόνωση των εκχυλισμάτων από τα θαλάσσια μακροφύκη πραγματοποιήθηκε αρχικά με την άλεση τους. Έπειτα, εμποτίστηκαν σε διάλυμα μεθανόλης 80% (αναλογία ξηρού βάρους φύκους / διαλύτη δείγμα 1:30), υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με συσκευή υπερήχων (20 κύκλοι, 70 % πλάτος, 30 λεπτά) και εκχυλίστηκαν στους 25°C υπό περιστροφή (150 rpm) για 48 ώρες. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί whatman. Ο διαλύτης αφαιρέθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στους 30°C (150 rpm) με περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολούθησε ξήρανση με κατάψυξη για 24 h, έτσι ώστε το εκχύλισμα να παραχθεί σε μορφή σκόνης. Η ξηρά σκόνη ζυγίστηκε για να αξιολογηθεί η εκατοστιαία απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

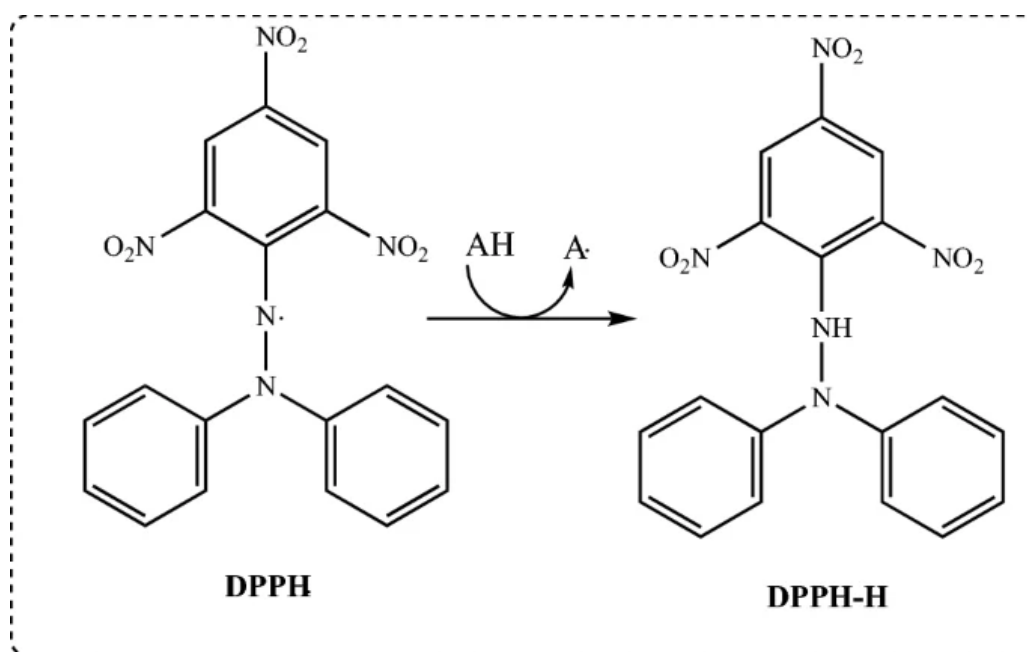
Πίνακας 3.1. Είδη φυκών

Είδη Φυκών	Οικογένεια
Codium Fragile	Codiaceae
Colpomenia sinuosa	Scytosiphonaceae
Ulva intestinalis	Dictyotaceae
Ulva rigida	Dictyotaceae
Gracilaria sp	Gracilariaceae
Gracilaria bursa pastoris	Gracilariaceae
Gracilaria gracilis	Gracilariaceae
Sargassum vulgare	Sargassaceae

#### 3.2 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•

Η ρίζα DPPH• προτάθηκε για πρώτη φορά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά σχεδόν πριν από μισό αιώνα, όταν ο Blois χρησιμοποίησε το αμινοξύ κυστεΐνη που περιέχειθειόλη ως πρότυπο αντιοξειδωτικό (Blois M.S.,1958). Η μέθοδος 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) είναι μία από τις πιο συχνά

χρησιμοποιούμενες μεθόδους ως μια πρώτη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης και χαρακτηρίζεται ως μια σταθερή ελεύθερη ρίζα. Η ρίζα DPPH είναι μια από τις λίγες σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, η οποία έχει βαθύ μωβ χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών έναντι της DPPH· (Gulcin I, 2020).



Εικόνα 3.2.1 Μηχανισμοί εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από ένα αντιοξειδωτικό (AH) (Gulcin I., 2020).

Κατά τη διαδικασία προσδιορισμού, αρχικά, παρασκευάστηκε το διάλυμα DPPH·, όπου σε 25,4 mL μεθανόλης προστέθηκαν 20mg DPPH. Το διάλυμα καλύφτηκε με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Η συντήρηση του γίνεται στους +4°C έως και 3 ημέρες. Έπειτα, προετοιμάστηκαν τα διαλύματα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Όλα τα δείγματα είχαν τελικό όγκο 1mL. Το blank περιείχε μόνο μεθανόλη (1 mL), το δείγμα ελέγχου (control) περιείχε μεθανόλη και DPPH και τα διαλύματα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων αποτελούνταν από μεθανόλη, εκχύλισμα και DPPH. Τα αρνητικά δείγματα περιείχαν μόνο μεθανόλη και εκχύλισμα. Πρώτα, προστέθηκαν τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.1.

Πίνακας 3.2.1: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C <sub>χ</sub>
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL
<b>Μεθανόλη</b>	1mL	950μL	850μL	850μL	850μL	850μL	850μL
<b>DPPH•</b>	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
<b>Βτελ</b>	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Πίνακας 3.2.2: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	C1	C2	C3	C4	C <sub>χ</sub>
<b>Εκχύλισμα</b>	100μL	50μL	50μL	50μL	50μL
<b>Μεθανόλη</b>	900μL	950μL	950μL	950μL	950μL
<b>Βτελ</b>	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 20 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φωτομετρήθηκαν στα 517 nm. Η διαδικασία ξεκίνησε με το μηδενισμό του φωτόμετρου με το δείγμα blank και ολοκληρώθηκε με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

#### Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100 \text{ όπου:}$$

A<sub>0</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A<sub>δ</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

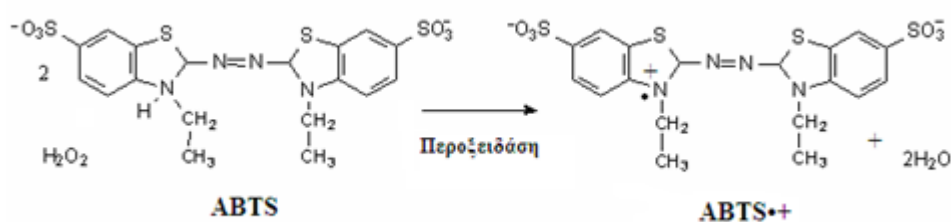
Επιπλέον, υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub>, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

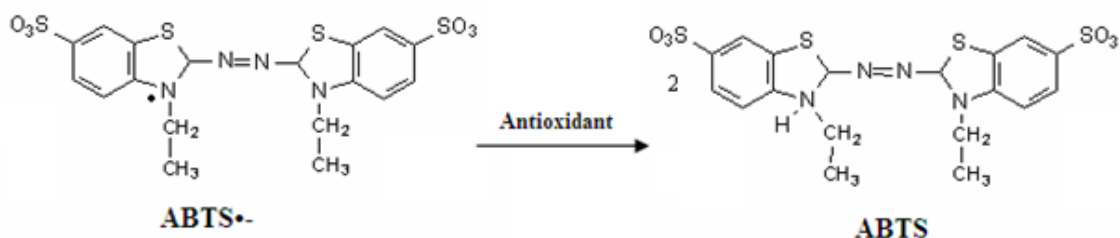


### 3.3 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+

Η μέθοδος ABTS•+ χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS•+. Η ρίζα του ABTS•+ παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS•+) μέσω δράσης της περοξειδάσης (Horse Radish Peroxidase) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας (Εικόνα 3.3.1) και στη συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα του ABTS•+ είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του ABTS•+ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (Εικόνα 3.3.2).



Εικόνα 3.3.1 Παραγωγή της ρίζας του ABTS+ μέσω της δράσης της περοξειδάσης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Εικόνα 3.3.2 Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα του ABTS+

**Διάλυμα ABTS•+ (MW: 548.68):** Για τελική συγκέντρωση ABTS•+ 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500  $\mu$ L) παρασκευάστηκε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίστηκαν 10.97 mg ABTS•+ και διαλύθηκαν στο H<sub>2</sub>O.

**Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM τελική συγκέντρωση) :** Για τελική συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μL) παρασκευάστηκε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 600 μM. Από το stock διάλυμα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8.8 M έγινε αραίωση με dH<sub>2</sub>O ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάστηκε την ημέρα του πειράματος.

**Διάλυμα HRP:** Διαλύθηκε 1mg του ενζύμου (Sigma cat.no. 125K7415) σε 10mL dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια αραίωση 1/20 και χρησιμοποιήθηκε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση (π.χ. 100 μL stock + 1900 μL H<sub>2</sub>O). Τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάστηκαν την ημέρα του πειράματος επειδή είναι φωτοευαίσθητα και διατηρούνται στον πάγο.

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πλαστικά erpendorf 1.5 mL, με τελικό όγκο 1 mL στο οποίο εμπεριέχονταν ABTS•+ 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM και HRP 6 μM. Τα διαλύματα προστέθηκαν με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.1.

*Πίνακας 3.3.1: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων*

3χ	Blank	Control	C1	C2	C3	C <sub>χ</sub>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 μL	450 Ml	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
<b>ABTS•+</b>	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
<b>HRP</b>	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
<b>Βτελ</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 45 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολούθησε η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον πίνακα. Ακολούθησε η ανάδευση και η μέτρηση της απορρόφησης τους στα 730 nm.. Η διαδικασία της φωτομέτρησης ξεκίνησε με το μηδενισμό του φωτόμετρου με το blank. Ολοκληρώθηκε με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Όλα τα

δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, με τουλάχιστον τρία πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

*Πίνακας 3.3.2 Προσθήκης διαλυμάτων καμπύλης ουσίας*

3χ	Blank	C1	C2	C3	C <sub>χ</sub>
H <sub>2</sub> O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS•+	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Βτελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

### Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [ (A_0 - A_\delta) / A_0 ] \times 100$$

όπου:

A<sub>0</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A<sub>δ</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Επιπλέον, υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub>, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

### 3.4 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Η μείωση της ισχύος σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να χρησιμεύσει ως σημαντική ένδειξη της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι ενώσεις με αναγωγική ισχύ υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να μειώσουν τις ελεύθερες ρίζες (π.χ. τα οξειδωμένα ενδιάμεσα των διεργασιών υπεροξειδωσής των λιπιδίων), έτσι ώστε να μπορούν να λειτουργήσουν ως πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του διαλύματος δοκιμής αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με τη αναγωγική ισχύ κάθε ένωσης. Η παρουσία αναγωγικών

ουσιών προκαλεί τη μετατροπή του συμπλόκου  $\text{Fe}^{3+}$ /σιδηροκυανιούχου που χρησιμοποιείται σε αυτή τη μέθοδο στη σιδηρούχα μορφή. Με τη μέτρηση του σχηματισμού του Pearl's  $\gamma$ -Prussian blue στα 700 nm, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ιόντος  $\text{Fe}^{3+}$ .

Για το **διάλυμα 0.2M Phosphate buffer** pH 6.6 χρειάστηκε η παρασκευή των διαλυμάτων 0.2M Monobasic stock και 0.2M Dibasic stock. Για το 0.2M Monobasic stock διαλύθηκαν 13.90g sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) σε 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  ενώ για το 0.2M Dibasic stock διαλύθηκαν 26,825 g sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, προστέθηκαν 62,50 mL 0.2M monobasic stock και 37.50 mL 0.2M dibasic stock σε 200 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στα 6.6.

**Διάλυμα Potassium ferricyanide (1% w/v)** : Διαλύθηκαν 0,1 g Potassium ferricyanide σε 10 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ . Το διάλυμα τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

**Διάλυμα Ferric chloride (0.1 % w/v)**: Διαλύθηκαν 0,01 g σε 10 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ . Το διάλυμα τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

**Διάλυμα Trichloroacetic acid (10% w/v)** : Διαλύθηκαν 50 g TCA σε 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ .

**Διάλυμα Ascorbic acid 1%**: Το ασκορβικό οξύ σε 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600  $\mu\text{g/mL}$  χρησιμοποιήθηκε ως τυπική καμπύλη.

Αρχικά, το δείγμα διαλύθηκε σε 0.2M phosphate buffer (pH 6.6). Έπειτα, προστέθηκαν 2.5 mL από το διάλυμα του δείγματος σε 2.5 mL potassium ferricyanide 1%.

*Πίνακας 3.4.1: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων*

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
<b>Protein</b>	-	-	+	+	+
<b>Phosphate buffer (0.2M,pH 6.6)</b>	5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
<b>Potassium ferricyanide</b>	-	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL

Τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 min. Εφόσον κρύωσαν προστέθηκαν 2.5 mL TCA 10%.

Πίνακας 3.4.2: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
TCA	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL

Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 rpm για 10 min. Στα υπερκείμενο (2.5 mL) προστέθηκαν 2.5 mL dH<sub>2</sub>O και 0.5 mL ferric chloride 0.1 %.

Πίνακας 3.4.3: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
dH <sub>2</sub> O	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Ferric Chloride	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

Τέλος, αφού αφέθηκαν για 10 min φωτομετρήθηκαν στα 700 nm. Η διαδικασία της φωτομέτρησης ξεκίνησε με το μηδενισμό του φωτόμετρου με το blank. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 700 nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

### Υπολογισμός της Αναγωγικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

Για τη μέθοδο της αναγωγικής δύναμης προσδιορίστηκε η τιμή RP<sub>0.5AU</sub>, η συγκέντρωση που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm από διάγραμμα συσχέτισης της απορρόφησης με τη συγκέντρωση.

### 3.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH<sup>•</sup>

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στις ρίζες υδροξυλίου προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη αποικοδομείται κατά την έκθεση σε ρίζες υδροξυλίου.

Για το διάλυμα **Sodium phosphate buffer (0.2M, pH 7,4)** αναμείχθηκαν 62,50 mL 0.2M monobasic stock (13.90g sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) σε 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  και 37,50 mL 0.2M dibasic stock (26,825 g sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ ) σε 200 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  . Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στα 7,4.

Για 10 mL διαλύματος **2-deoxyribose (10mM) MW=134,13 g/mol** ζυγίστηκαν 13,413mg ουσίας.

Για το διάλυμα  **$\text{FeSO}_4$  (MW=278,01)-EDTA (MW=372,24) (10mM)** παρασκευάστηκαν 450 mL από το κάθε διάλυμα. Για το  $\text{FeSO}_4$  ζυγίστηκαν 1,251 g και διαλύθηκαν σε 450 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Για το **EDTA** διαλύθηκαν 1,6751 g σε 450 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Το EDTA θερμάνθηκε έως το σημείο βρασμού, προστέθηκε στο  $\text{FeSO}_4$  και έβρασαν μαζί για 1 h. Στη συνέχεια, εφόσον κρυσταλλώσει πλήρως το τοποθετούμε στους  $4^\circ\text{C}$ .

Για το διάλυμα  **$\text{H}_2\text{O}_2$  (10mM) MW=34,01 g/mol** : Για την παρασκευή 50 mL διαλύματος 10mM προστίθενται 57μL από stock 8,82 M και 49,943 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### **Διάλυμα TCA 2.8%**

**Διάλυμα TBA 1%** το οποίο διαλύεται σε NaOH 50mM

Στα 100 mL  $\rightarrow$  1 g

Στα 20 mL  $\rightarrow$  0,2 g

Για το διάλυμα **NaOH (50mM)**: Για την προετοιμασία 50 mL διαλύματος προστίθενται 2,5 mL από stock 1 M και 47,5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### **Ascorbic acid (positive control 0,05-0,250 mg/mL)**

Στα eppendorf προστέθηκαν 450 μL sodium phosphate buffer 0.2 M pH 7,4, 150 μL 10 mM 2-deoxyribose, 150 μL 10 mM  $\text{FeSO}_4$ - EDTA, 525 μL  $\text{H}_2\text{O}$ , 75 μL δείγματος και 150 μL  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Πίνακας 3.5.1: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
<b>Phosphate buffer (0.2M,pH 7.4)</b>	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL
<b>2-deoxyribose 10 mM</b>	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
<b>FeSO4-EDTA 10 mM</b>	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
<b>H2O2 10 mM</b>	-	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
<b>dH2O</b>	750 µL	600 µL	525 µL	525 µL	525 µL
<b>Δείγμα</b>	-	-	75 µL	75 µL	75 µL

Αφού επωάστηκαν τα δείγματα για 4 h στους 37°C έπειτα προστέθηκαν 750 µL TCA 2.8 % και 750 µL TBA 1 %.

Πίνακας 3.5.2: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
<b>TCA 2.8%</b>	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL
<b>TBA 1%</b>	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL

Στη συνέχεια, το μίγμα έβρασε για 10 λεπτά και κρύωσε σε πάγο. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 520 nm. Η διαδικασία της φωτομέτρησης ξεκίνησε με το μηδενισμό του φωτόμετρου με το blank. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 520 nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

### **Υπολογισμοί- Στατιστική ανάλυση**

% Hydroxyl radical scavenging activity =  $(1 - \text{absorbance of sample} / \text{absorbance of control}) \times 100$

Επιπλέον, υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του υδροξυλίου κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub>, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.



### 3.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

Η ικανότητα δέσμευσης ριζών ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) αξιολογήθηκε με τη μέθοδο των Gulcin et al. (2004) με μικρή τροποποίηση. Οι ρίζες ανιόντων σουπεροξειδίου δημιουργούνται σε συστήματα PMS-NADH με την οξείδωση του NADH και προσδιορίζονται με την αναγωγή του NBT. Το  $O_2^{\cdot-}$  μειώνει την κίτρινη απόχρωση ( $NBT_2^+$ ) για την παραγωγή της μπλε φορμαζάνης, η οποία μετράτε φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν τον σχηματισμό μπλε NBT. Η μείωση της απορρόφησης στα 560 nm από τα αντιοξειδωτικά υποδηλώνει την κατανάλωση του ανιόντος του σουπεροξειδίου κατά την αντίδραση (Parejo et al. 2002).

Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 1M (250mL) και ρυθμίστηκε το pH=8 με την προσθήκη HCL.

Υπολογισμοί:

$$1000\text{mL} \rightarrow 1 \cdot 121.4\text{g}$$

$$250\text{mL} \rightarrow x=30.285\text{g}$$

Μέσω της εξίσωσης  $C_1V_1=C_2V_2 \rightarrow 1000\text{mM} \cdot V_1=16\text{mM} \cdot 150\text{mL} \rightarrow V_1=2.4\text{mL}$  βρέθηκε ότι από το αρχικό 1M χρειάζονται 2.4 mL για να παρασκευαστούν 150mL διαλύματος

Για το διάλυμα **NBT (nitroblue tetrazolium) (300  $\mu\text{M}$ ), MW=81,7** προστέθηκαν 20mg NBT σε 20 mL  $H_2O$

Για το **διάλυμα NADH (468  $\mu\text{M}$ ), MW=709.4** ζυγίστηκαν 13,28 mg NADH με τελικό όγκο 40 mL

Για 20 mL **διαλύματος PMS (phenazine methosulfate) (60 $\mu\text{M}$ ), MW=306,34** ζυγίστηκαν 0,368 mg PMS.

Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (25-175  $\mu\text{g/mL}$ )

Σε 2,5 mL Tris-HCl (16mM, pH 8,0) προστέθηκαν 0.5 mL NBT (300  $\mu\text{M}$ ), 0.5 mL NADH (468  $\mu\text{M}$ ) και 250  $\mu\text{L}$  δείγματος. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 0.5 mL PMS (60  $\mu\text{M}$ ) στο μίγμα.

Πίνακας 3.6.1: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
<b>Δείγμα</b>	-	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	50 $\mu$ L	-	-	-
<b>Tris-HCl (16mM,pH 8.0)</b>	650 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<b>NBT (300<math>\mu</math>M)</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
<b>NADH (468<math>\mu</math>M)</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
<b>PMS (60<math>\mu</math>M)</b>	-	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Πίνακας 3.6.2: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

3X	Blank	C1	C2	C3
<b>Protein</b>	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	-
<b>Tris-HCl (16mM,pH 8.0)</b>	0.65 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL
<b>NBT (300<math>\mu</math>M)</b>	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
<b>NADH (60<math>\mu</math>M)</b>	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

Τα δείγματα επωάστηκαν για 5 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Η διαδικασία της φωτομέτρησης ξεκίνησε με το μηδενισμό του φωτόμετρου με το blank. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 560 nm, μετρήθηκε η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ανιόντων σουπεροξειδίου.

### **Υπολογισμοί-Στατιστική ανάλυση**

% Scavenging effect=  $[(A0-A1)/A0] \times 100$ ,

όπου A0 είναι η απορρόφηση του control και A1 είναι η απορρόφηση του δείγματος.

Επιπλέον, υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του σουπεροξειδίου κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub>, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

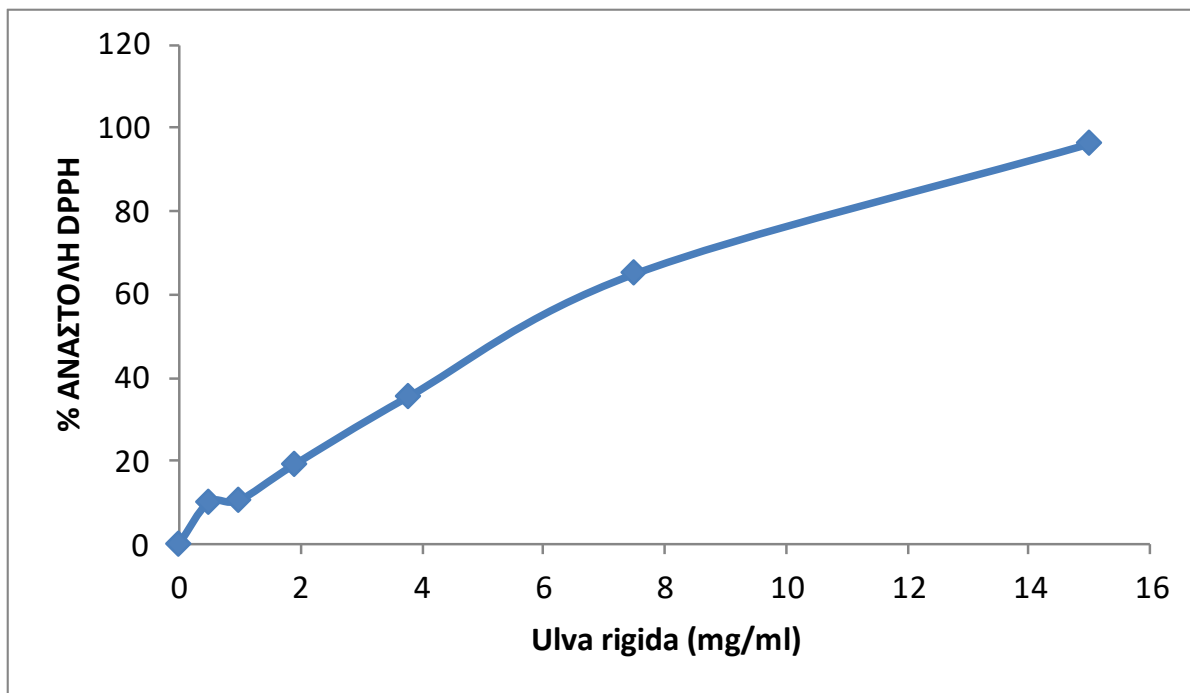
### **3.7 Στατιστική ανάλυση για εύρεση συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων.**

Η διερεύνηση για ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των χρησιμοποιούμενων μεθόδων έγινε με τη μέθοδο Spearman correlation με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

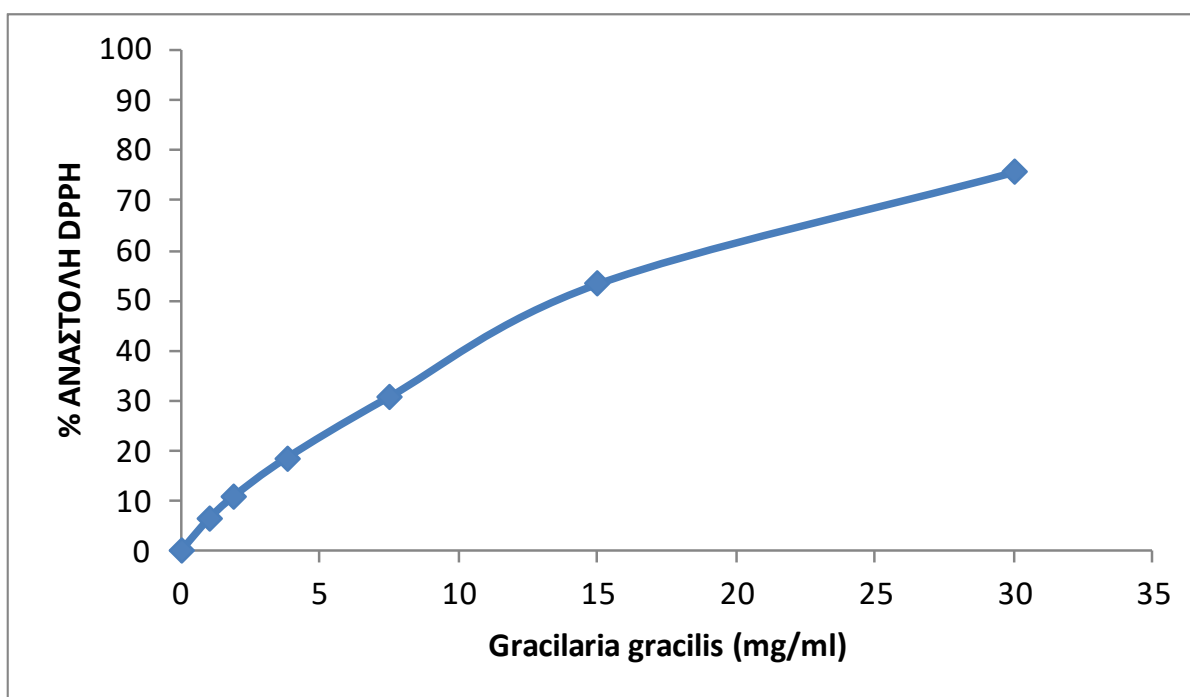
#### 4. Αποτελέσματα

##### 4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH

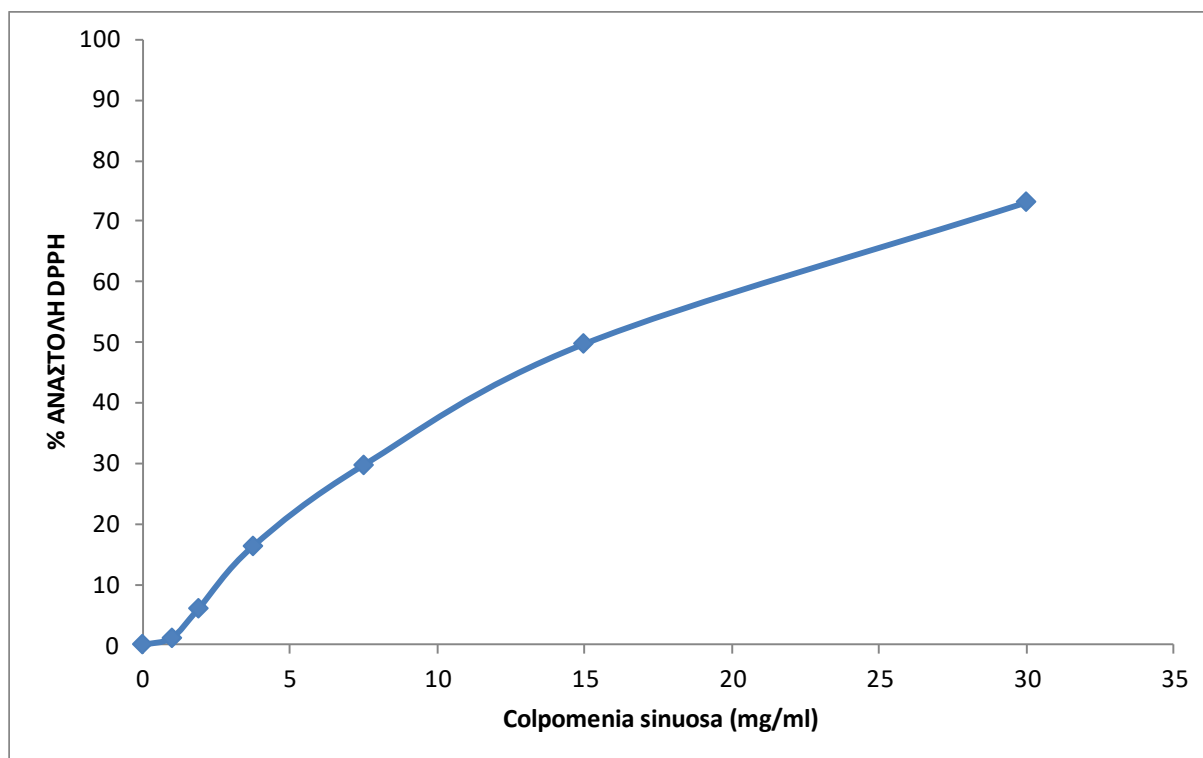
Συνολικά μελετήθηκαν 8 εκχυλίσματα από τα είδη θαλάσσιων φυκιών *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis*, *Sargassum vulgare*. και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από **1-15 mg/mL**. Οι τιμές **IC<sub>50</sub>** όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.1.9 και αντικατοπτρίζουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή **IC<sub>50</sub>** τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των **IC<sub>50</sub>** κυμαίνονται από **5,5 mg/mL** έως **79 mg/mL**. Το πιο δραστικό εκχύλισμα στην συγκεκριμένη μέθοδο ήταν του θαλάσσιου φύκου *Ulva rigida* (**IC<sub>50</sub>=5,5 mg/mL**) και ακολούθησαν το *Sargassum vulgare* (**IC<sub>50</sub>=8,2 mg/mL**), το *Gracilaria bursa pastoris* (**IC<sub>50</sub>=9,2 mg/mL**), το *Gracilaria sp* και το *Ulva intestinalis* (**IC<sub>50</sub>=10 mg/mL**), το *Gracilaria gracilis* (**IC<sub>50</sub>=13,5 mg/mL**), το *Colpomenia sinuosa* (**IC<sub>50</sub>=15 mg/mL**) και τέλος το *Codium fragile* (**IC<sub>50</sub>= 79 mg/mL**).



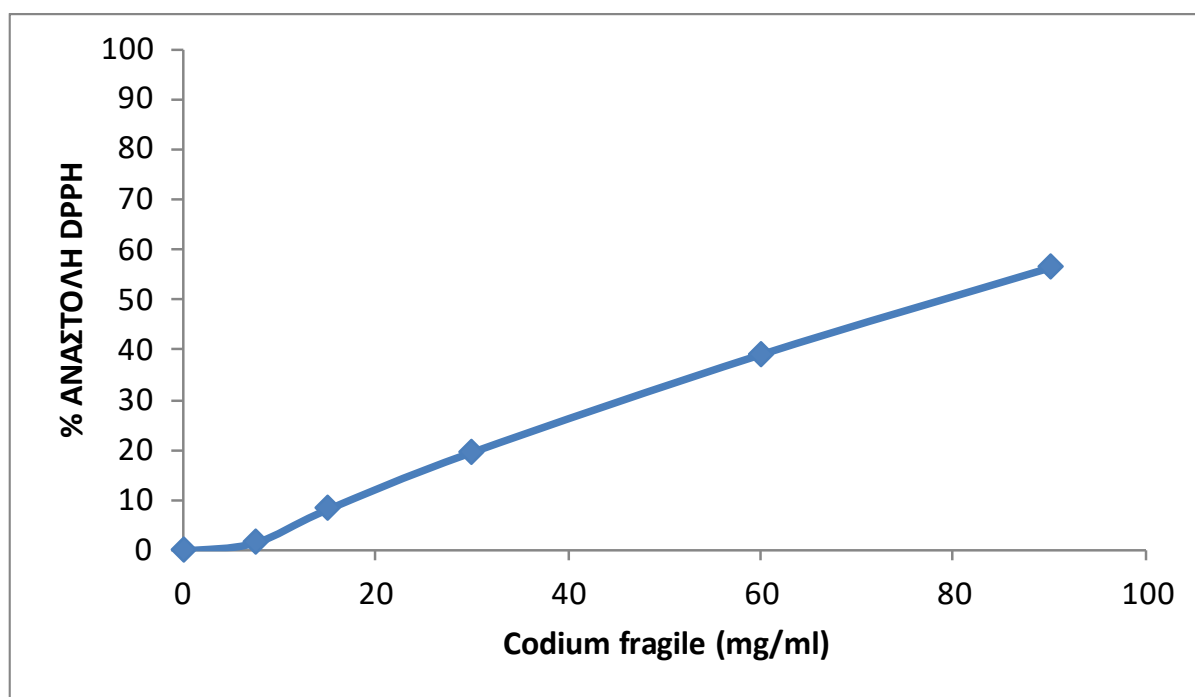
Διάγραμμα 4.1.1 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκους *Ulva rigida*



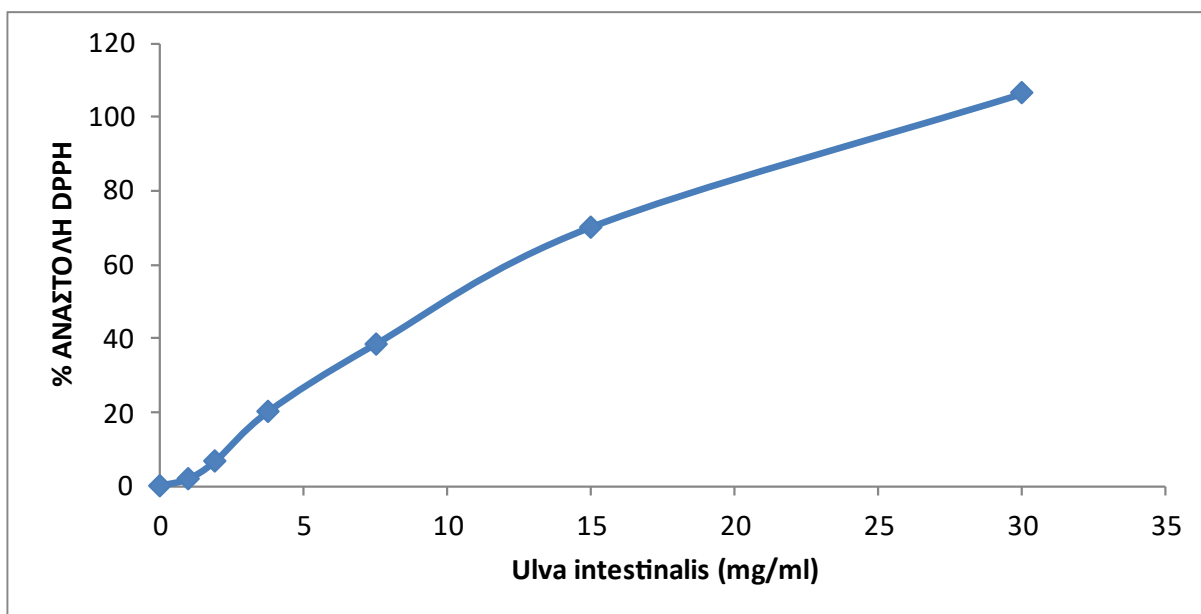
Διάγραμμα 4.1.2 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκους *Gracilaria gracilis*



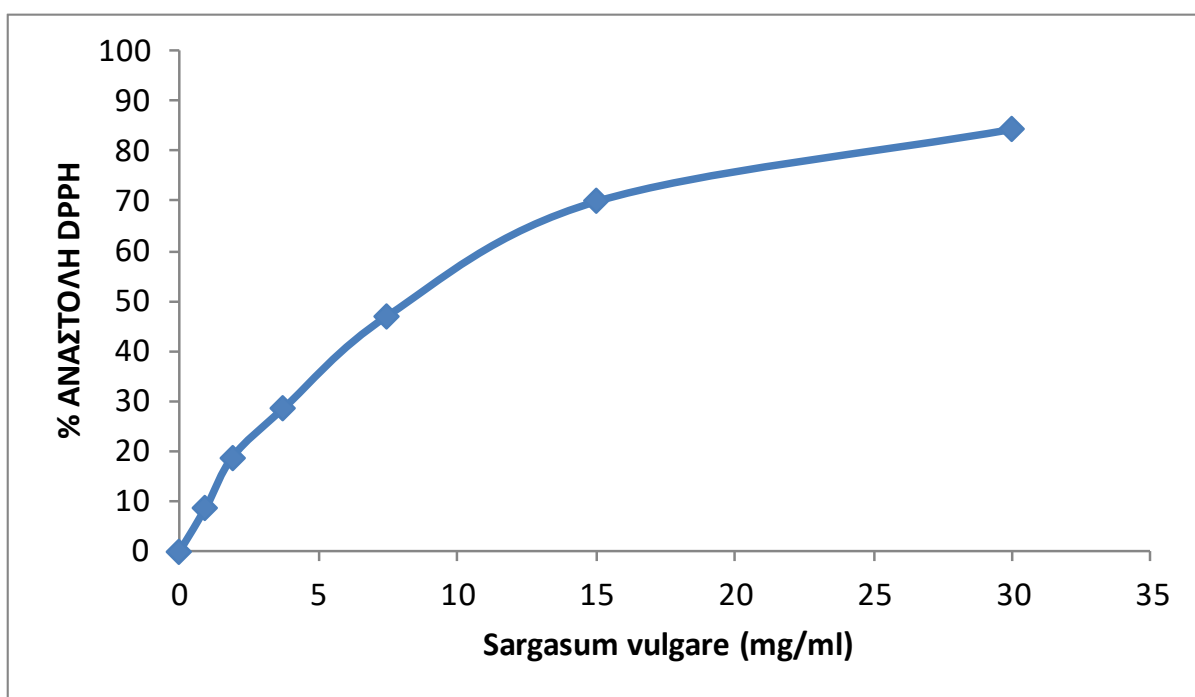
Διάγραμμα 4.1.3 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Colpomenia sinuosa*



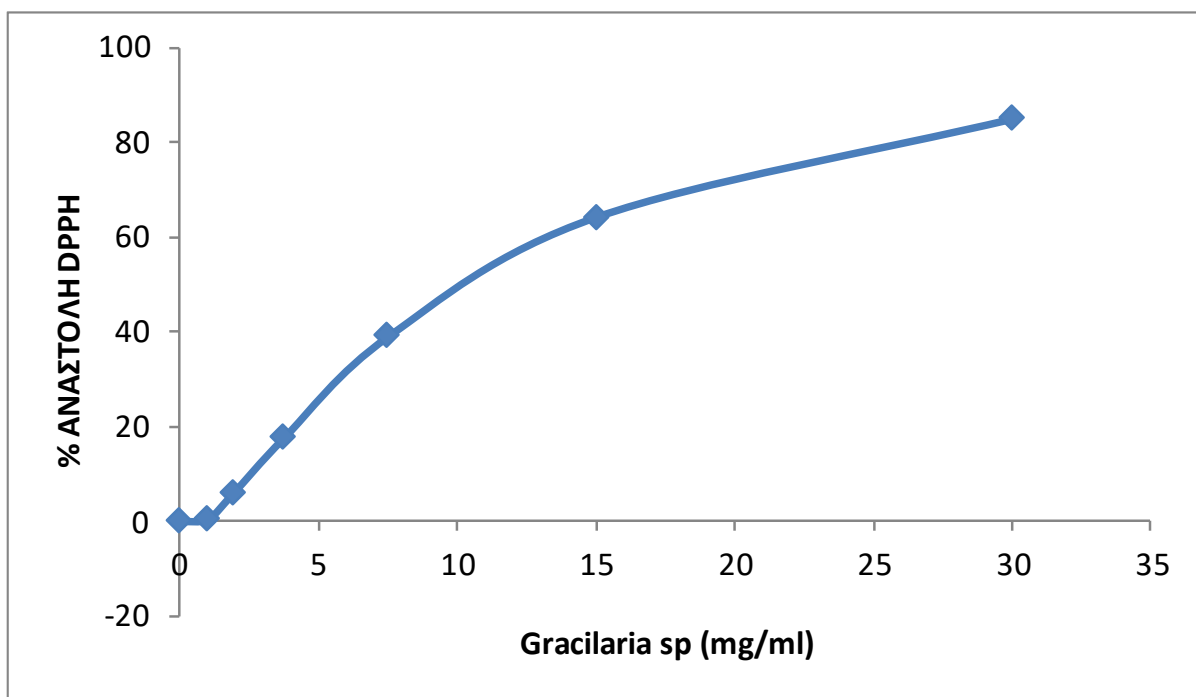
Διάγραμμα 4.1.4 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Codium Fragile*



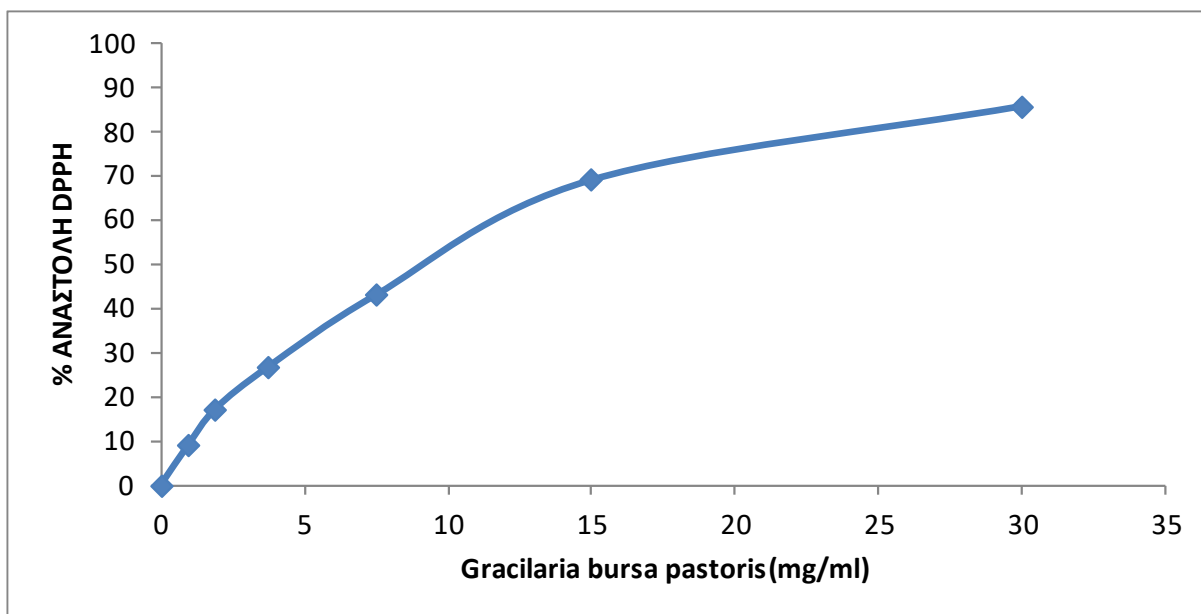
Διάγραμμα 4.1.5 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Ulva intestinalis*



Διάγραμμα 4.1.6 Απεικόνισης της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Sargassum vulgare*

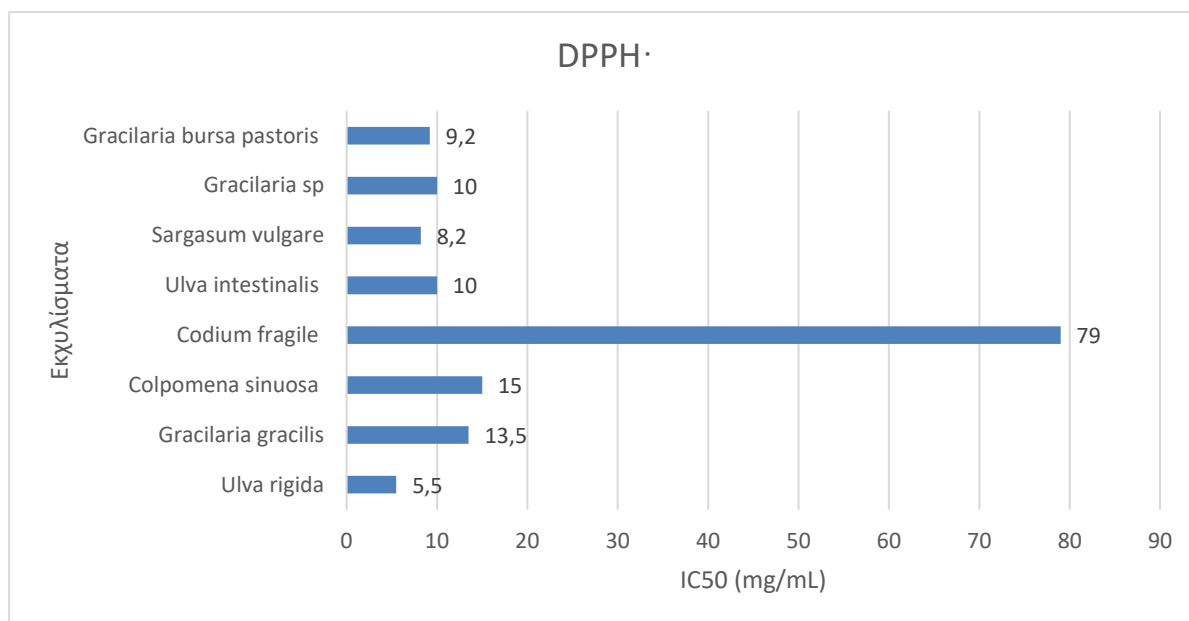


Διάγραμμα 4.1.7 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria gracilis*



Διάγραμμα 4.1.8 Απεικόνιση της % αναστολής – εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria bursa pastoris*

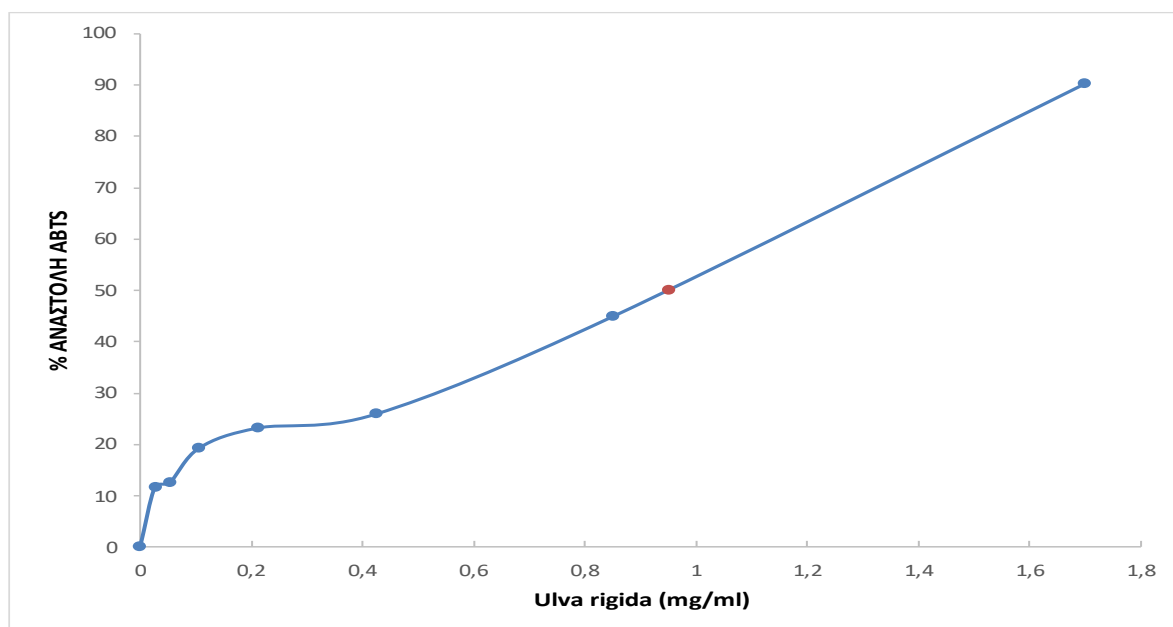




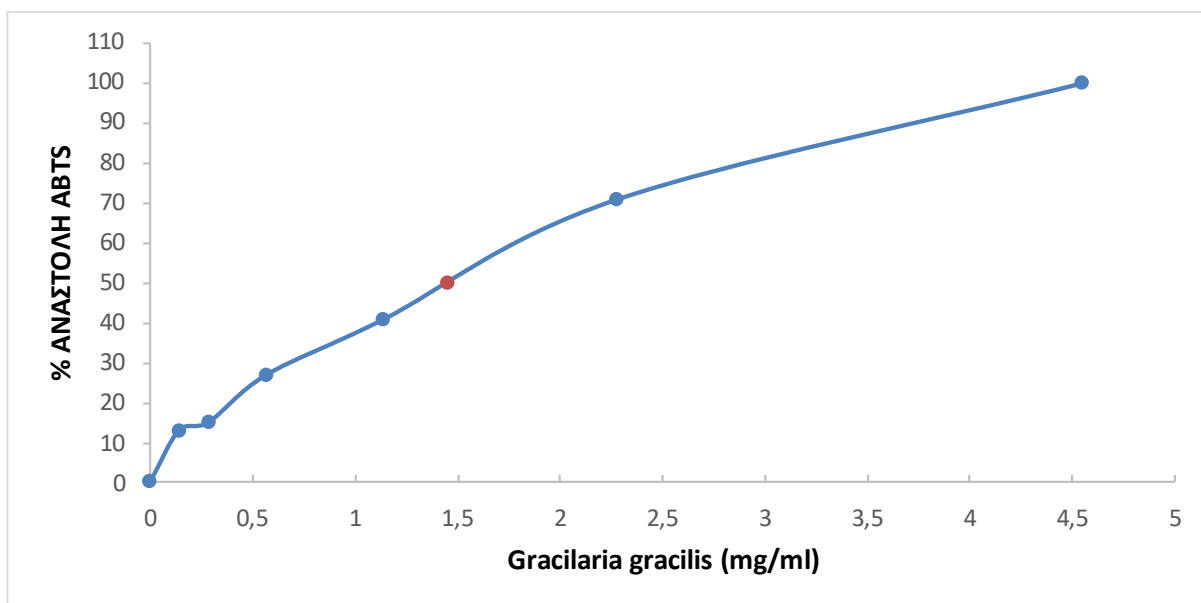
*Διάγραμμα 4.1.9 Απεικόνιση τιμών IC<sub>50</sub> που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα*

#### 4.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+

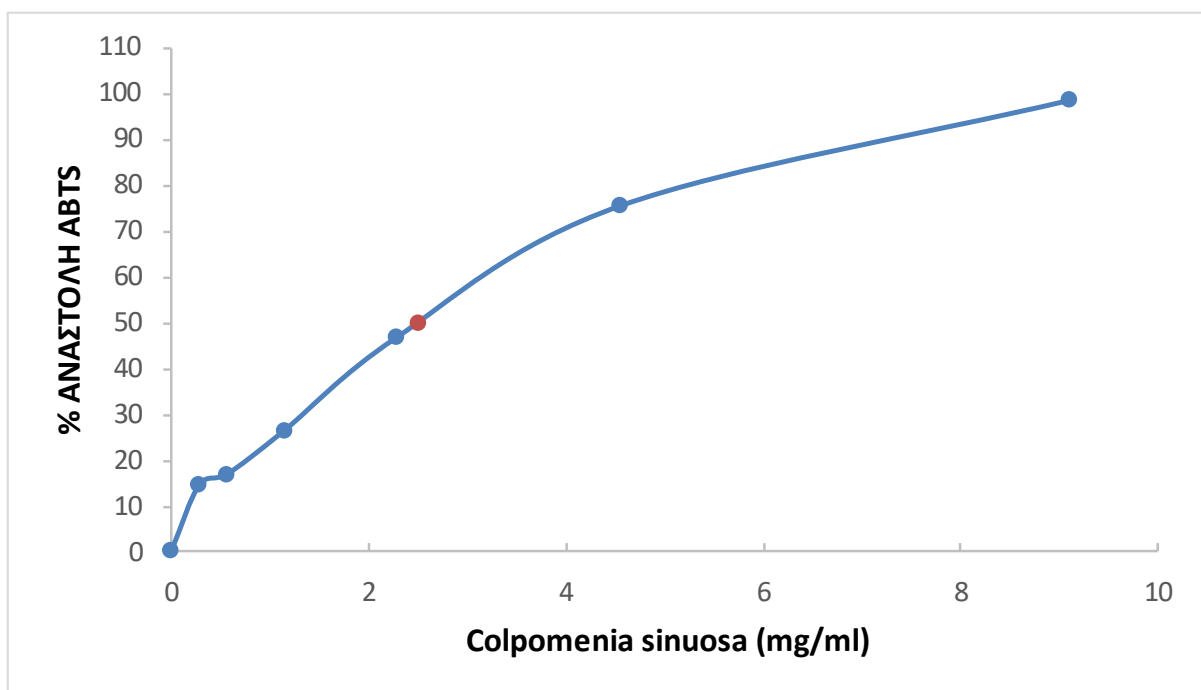
Συνολικά μελετήθηκαν 8 εκχυλίσματα από τα είδη θαλάσσιων φυκιών *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis*, *Sargassum vulgare* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από **0,027- 45,5 mg**. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος ABTS στα 730nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 4.2.9 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από **0,47 mg/mL** έως **15 mg/mL** (διάγραμμα 4.2.9). Συγκεκριμένα το πιο δραστικό εκχύλισμα στη μέθοδο ABTS+ είναι του θαλάσσιου φύκου *Gracilaria sp* (IC<sub>50</sub>=**0,47 mg/mL**) και ακολουθούν το εκχύλισμα *Ulva rigida* (IC<sub>50</sub>=**0,95 mg/mL**), το *Ulva intestinalis* (IC<sub>50</sub>=**0,98 mg/mL**), το *Sargassum vulgare* (IC<sub>50</sub>=**1,4 mg/mL**), το *Gracilaria gracilis* (IC<sub>50</sub>=**1,45 mg/mL**), το *Gracilaria bursa pastoris* (IC<sub>50</sub>= **1,6 mg/mL**), το *Colpomenia sinuosa* (IC<sub>50</sub>= **2,5 mg/mL**) και τέλος το εκχύλισμα του *Codium Fragile* (IC<sub>50</sub>= **15 mg/mL**).



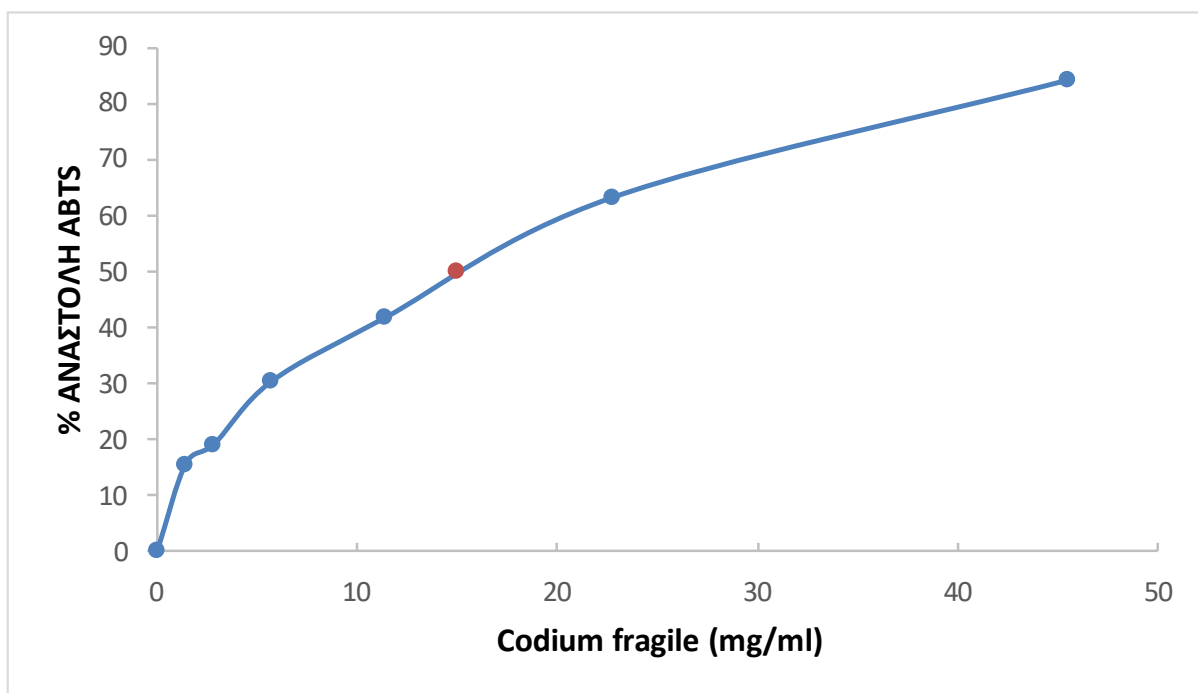
Διάγραμμα 4.2.1 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Ulva rigida*



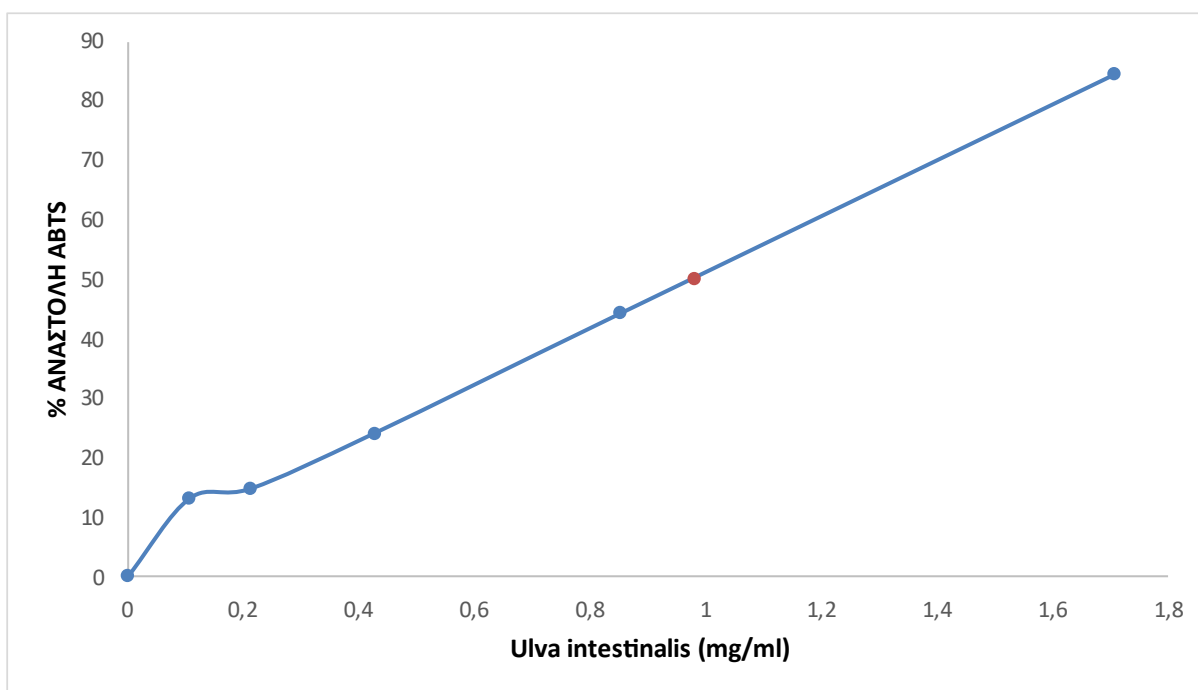
Διάγραμμα 4.2.2 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria gracilis*



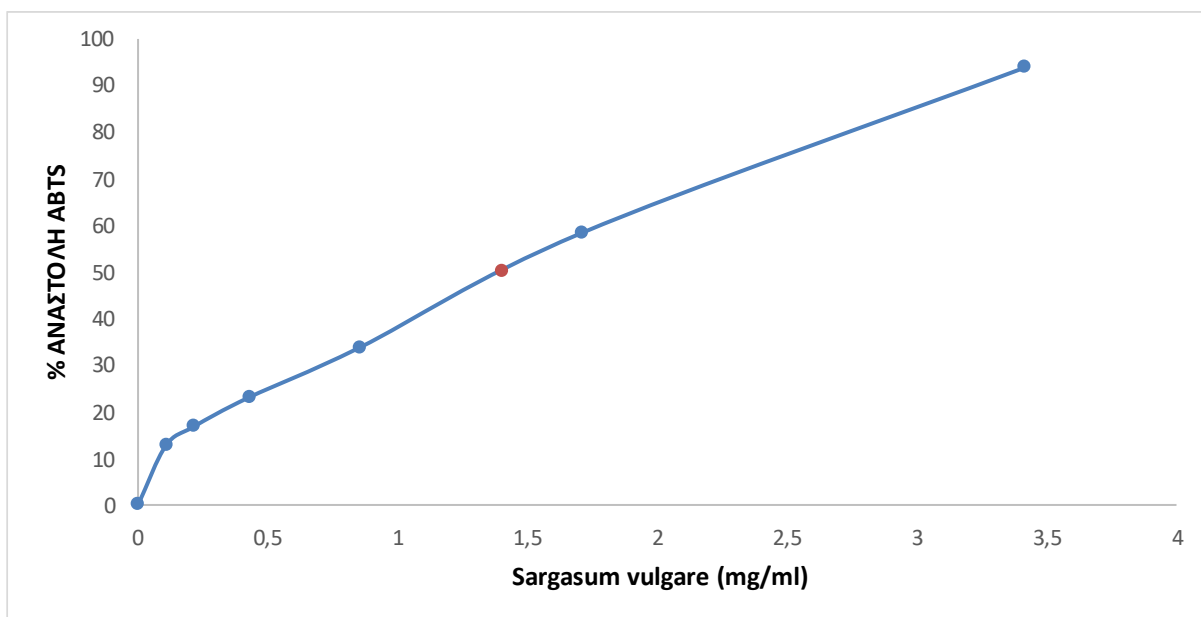
Διάγραμμα 4.2.3 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Colpomenia sinuosa*



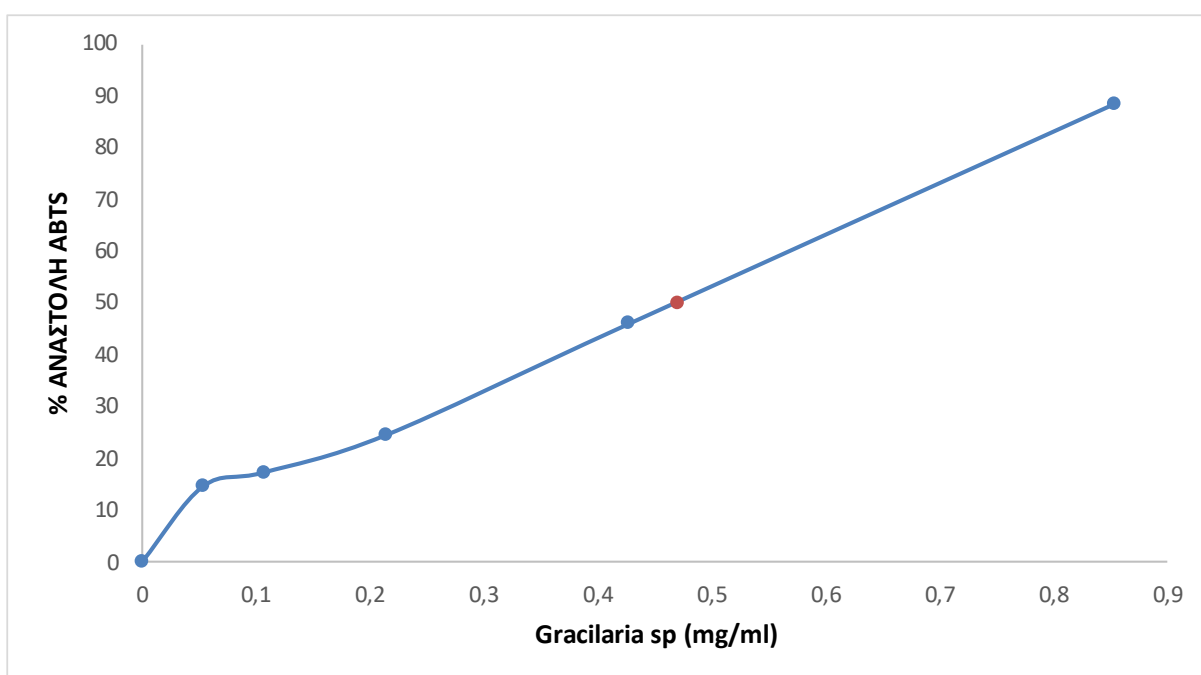
Διάγραμμα 4.2.4 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Codium fragile*



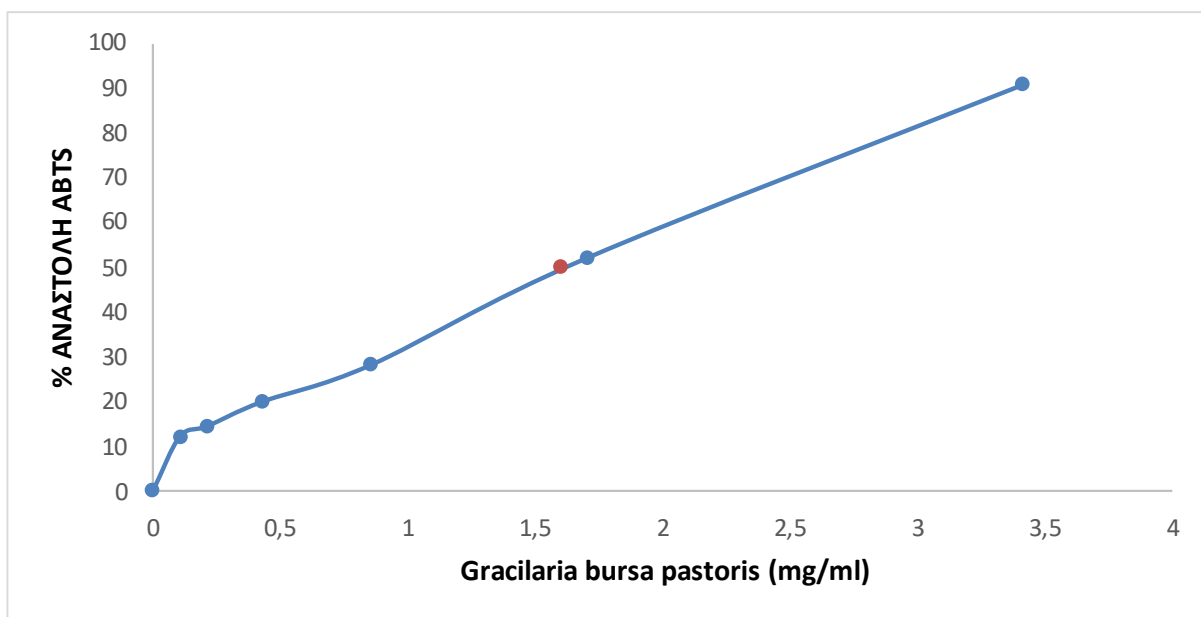
Διάγραμμα 4.2.5 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Ulva intestinalis*



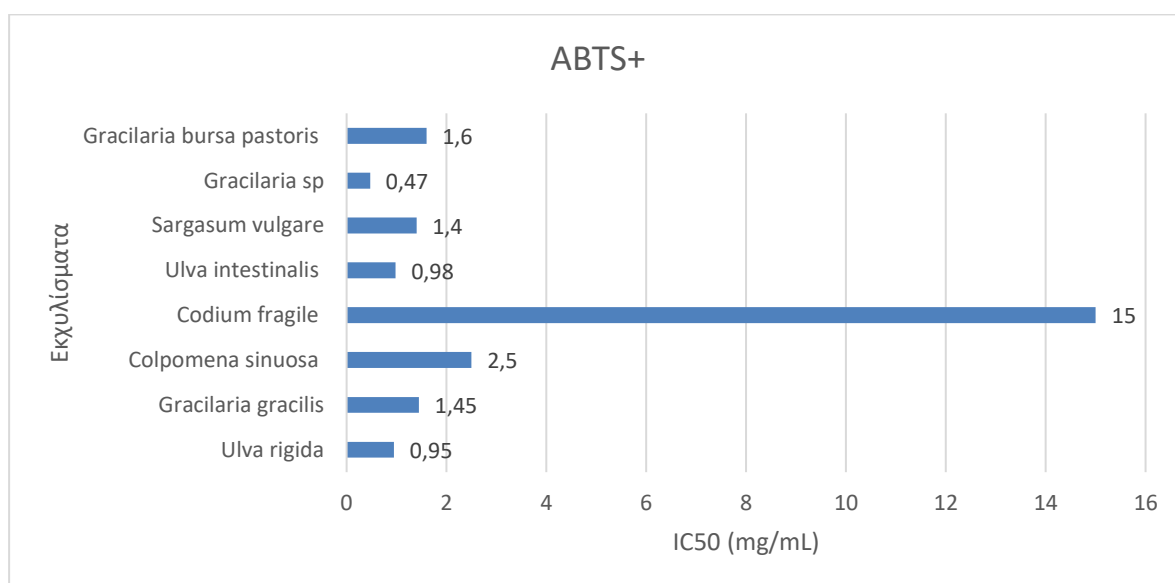
Διάγραμμα 4.2.6. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Sargassum vulgare*



Διάγραμμα 4.2.7. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria sp*



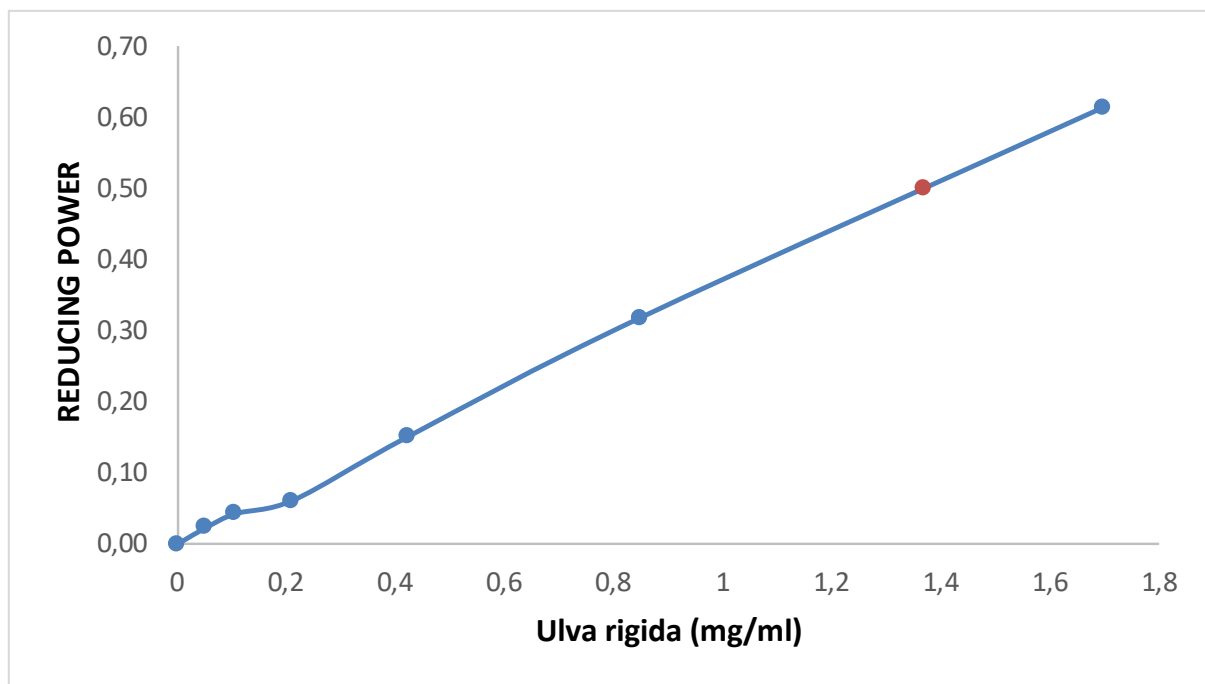
Διάγραμμα 4.2.8. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ABTS+ από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria bursa pastoris*



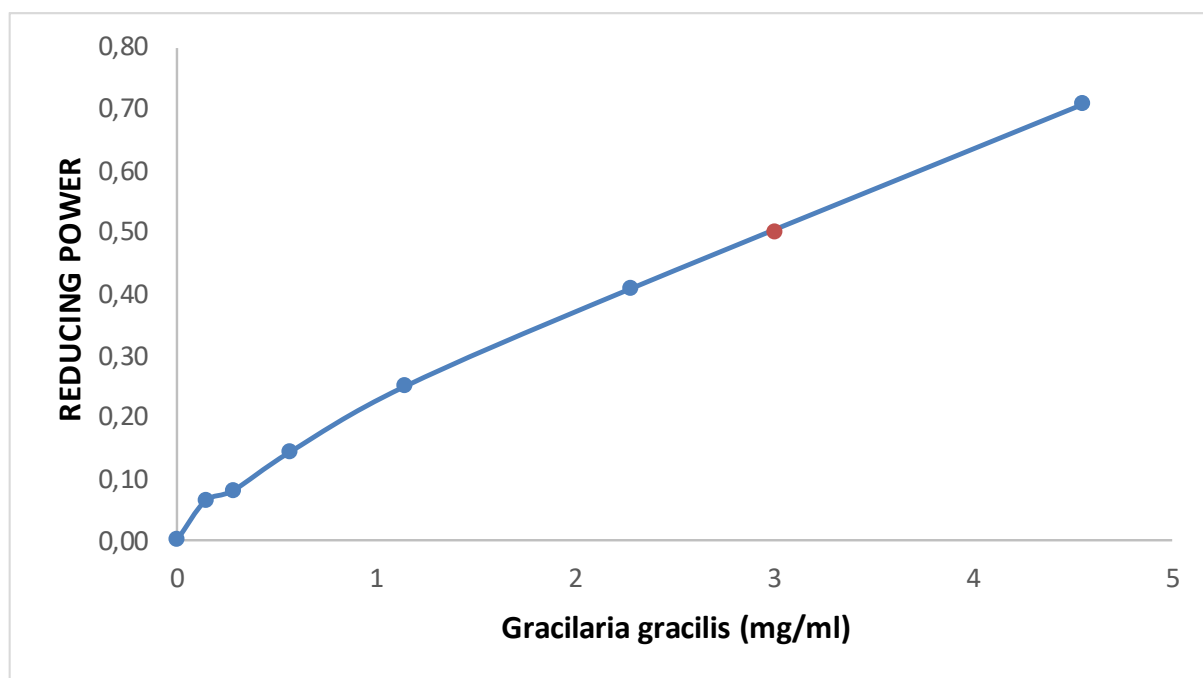
Διάγραμμα 4.2.9 απεικόνισης τιμών  $IC_{50}$  που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS<sup>+</sup> από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα

#### 4.3 Μέθοδος προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης

Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής δύναμης εξετάστηκαν 8 εκχυλίσματα των θαλάσσιων φυκιών *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis*, *Sargassum vulgare* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από **0,027 – 9,1 mg/mL**. Προσδιορίστηκε η τιμή **RP<sub>0.5</sub>AU**, δηλαδή η συγκέντρωση που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm. Η σειρά κατάταξης των εκχυλισμάτων, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.3.9, από το πιο ισχυρό στο πιο αδύναμο ήταν η εξής : *Ulva rigida* (**RP<sub>0.5</sub>AU = 1,37 mg/mL**)> *Ulva intestinalis* (**RP<sub>0.5</sub>AU =1,6 mg/mL**)> *Sargassum vulgare* (**RP<sub>0.5</sub>AU=1,8 mg/mL**)> *Gracilaria bursa pastoris* (**RP<sub>0.5</sub>AU = 2,29 mg/mL**)> *Gracilaria sp* (**RP<sub>0.5</sub>AU = 2,5 mg/mL**)> *Gracilaria gracilis* (**RP<sub>0.5</sub>AU= 3 mg/mL**)> *Colpomenia sinuosa* (**RP<sub>0.5</sub>AU= 5,2 mg/mL**)> *Codium Fragile* (**RP<sub>0.5</sub>AU =15 mg/mL**).

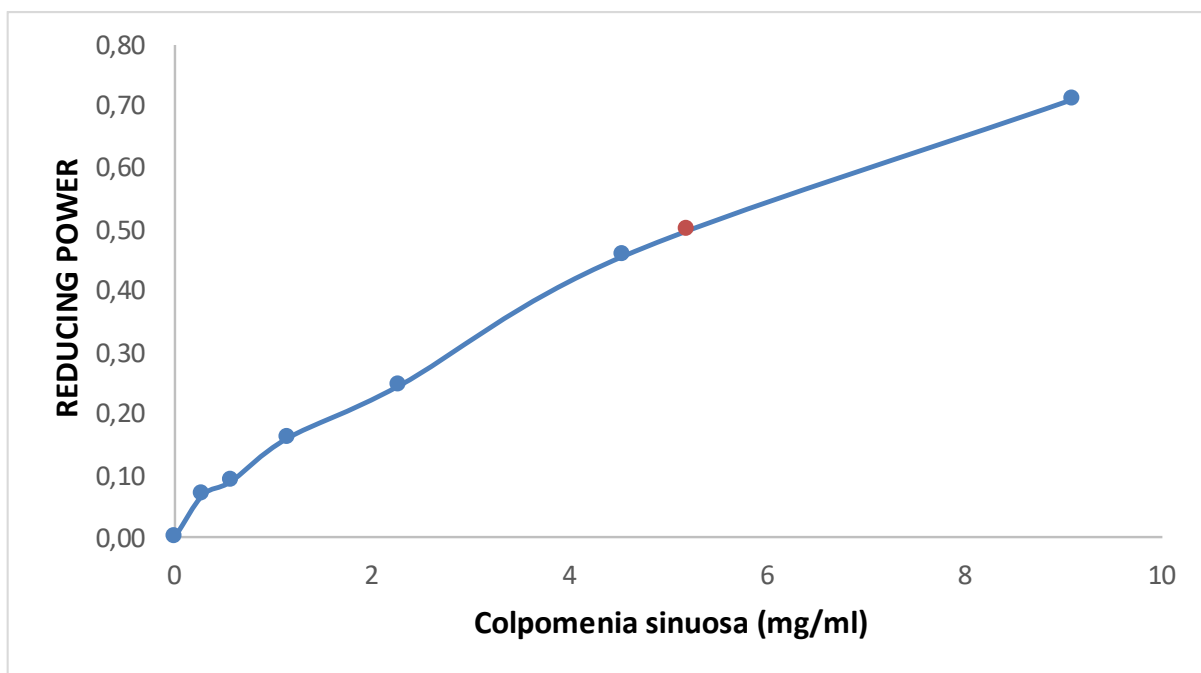


Διάγραμμα 4.3.1 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Ulva rigida*.

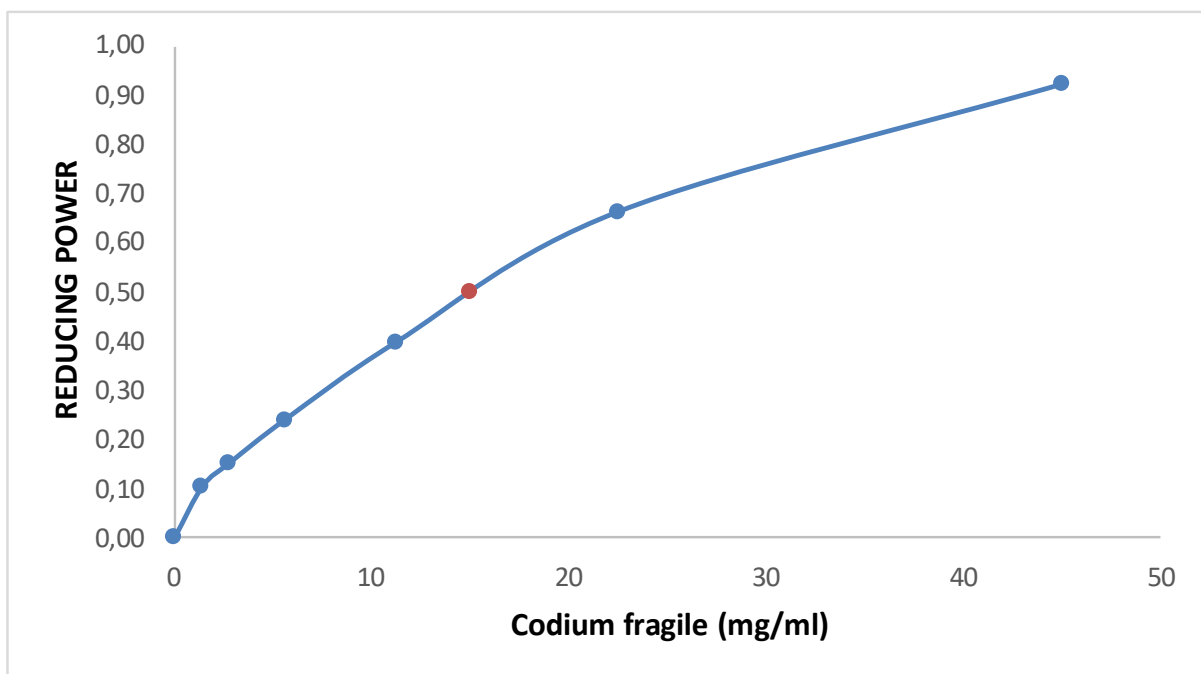


Διάγραμμα 4.3.2 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Gracilaria gracilis*

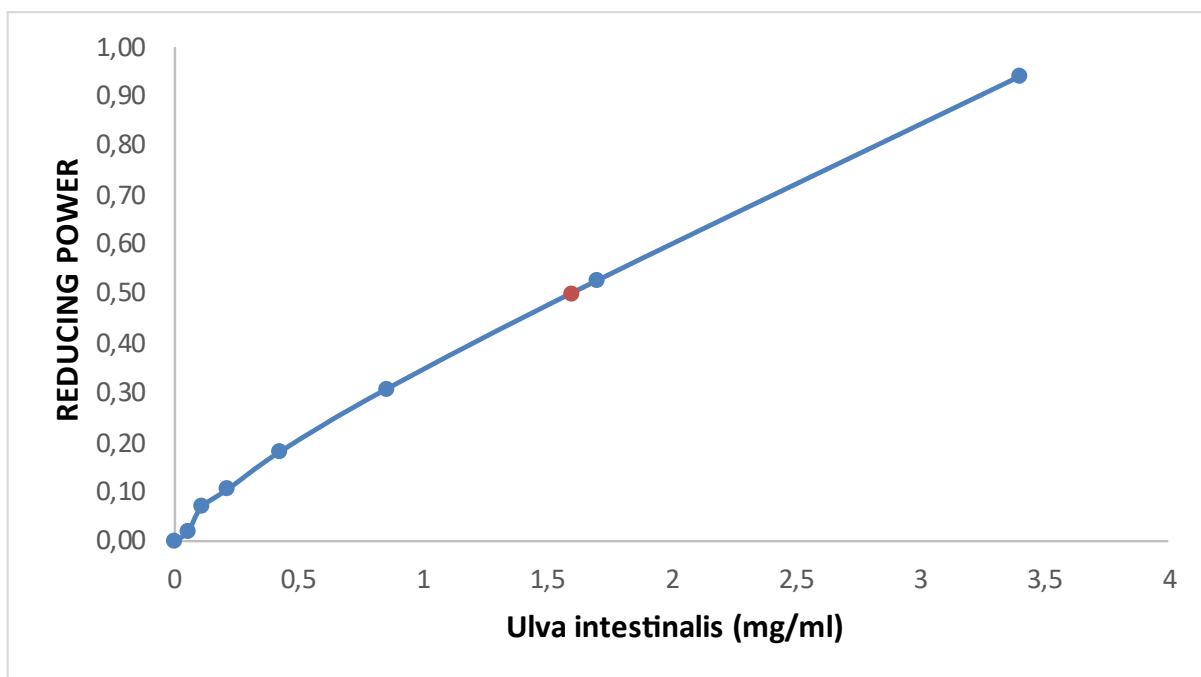




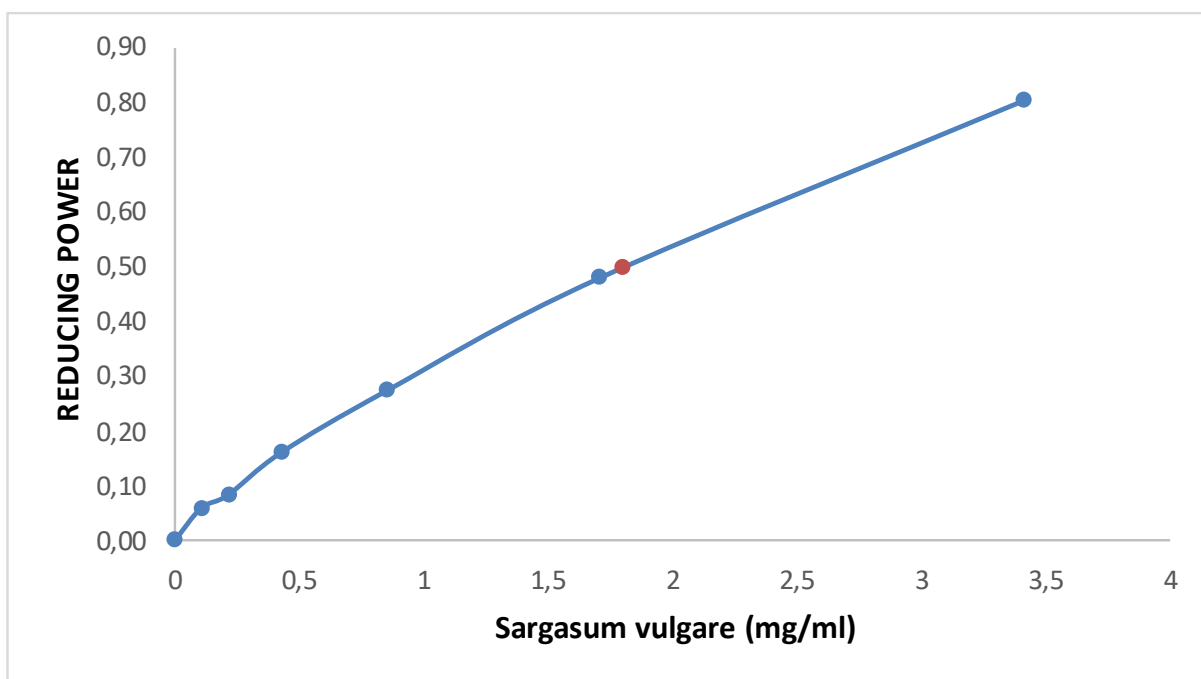
Διάγραμμα 4.3.3 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Colpomenia sinuosa*



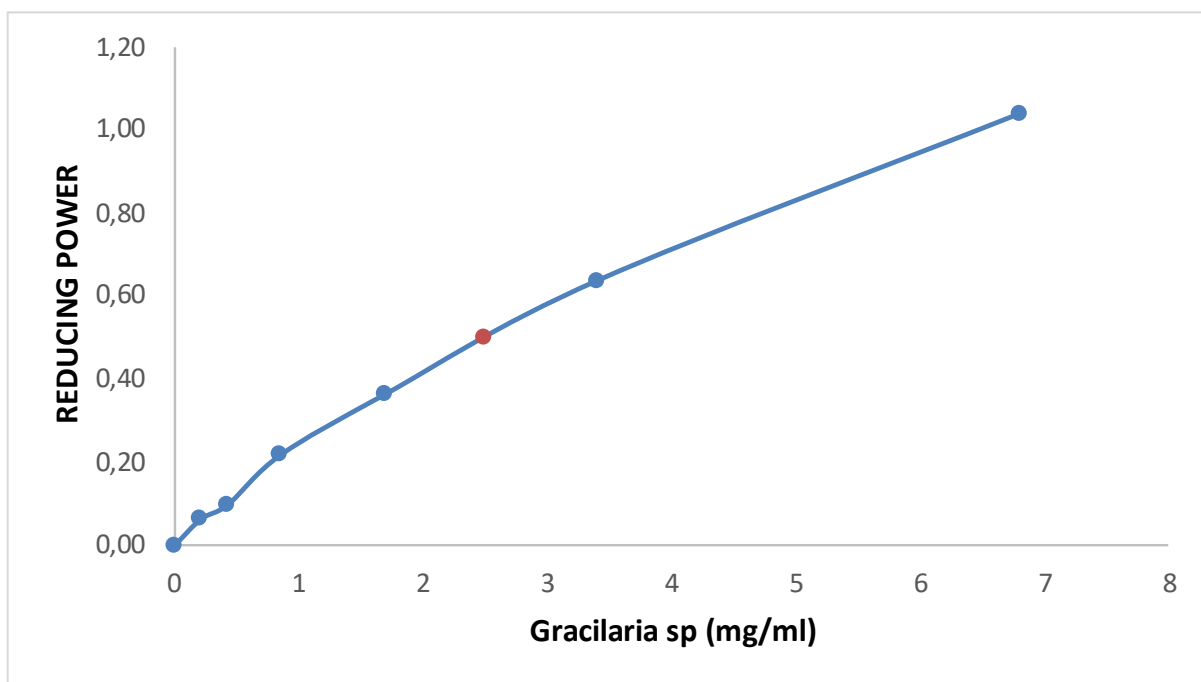
Διάγραμμα 4.3.4 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Codium fragile*



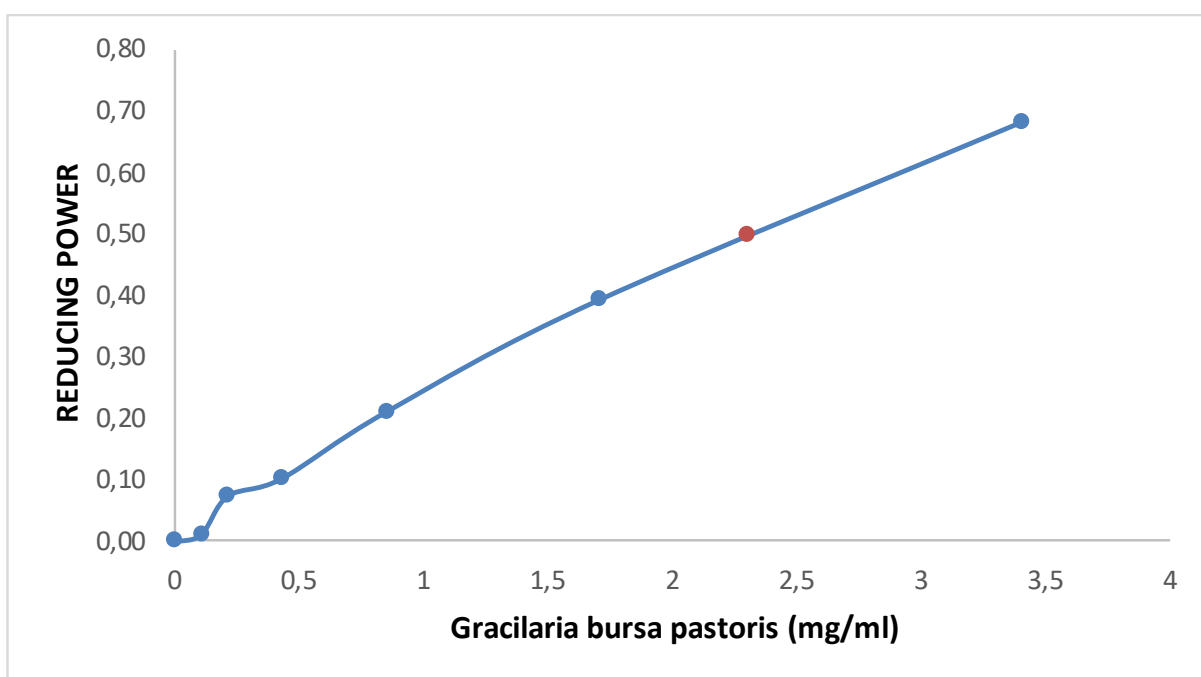
Διάγραμμα 4.3.5 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Ulva intestinalis*



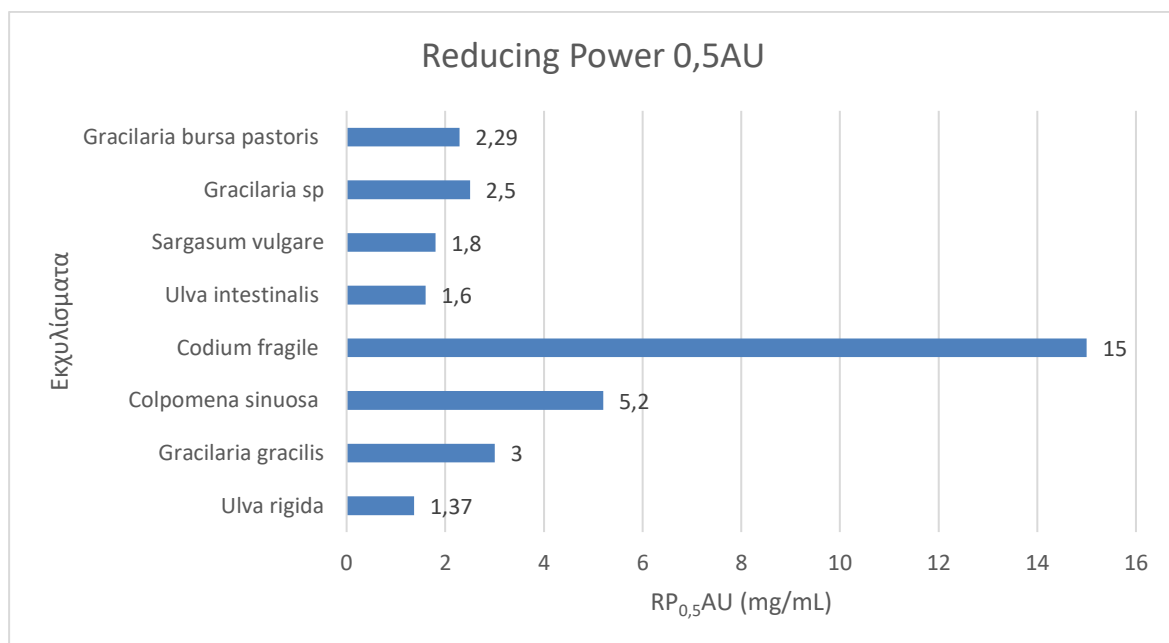
Διάγραμμα 4.3.6 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Sargasum vulgare*



Διάγραμμα 4.3.7 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Gracilaria sp*



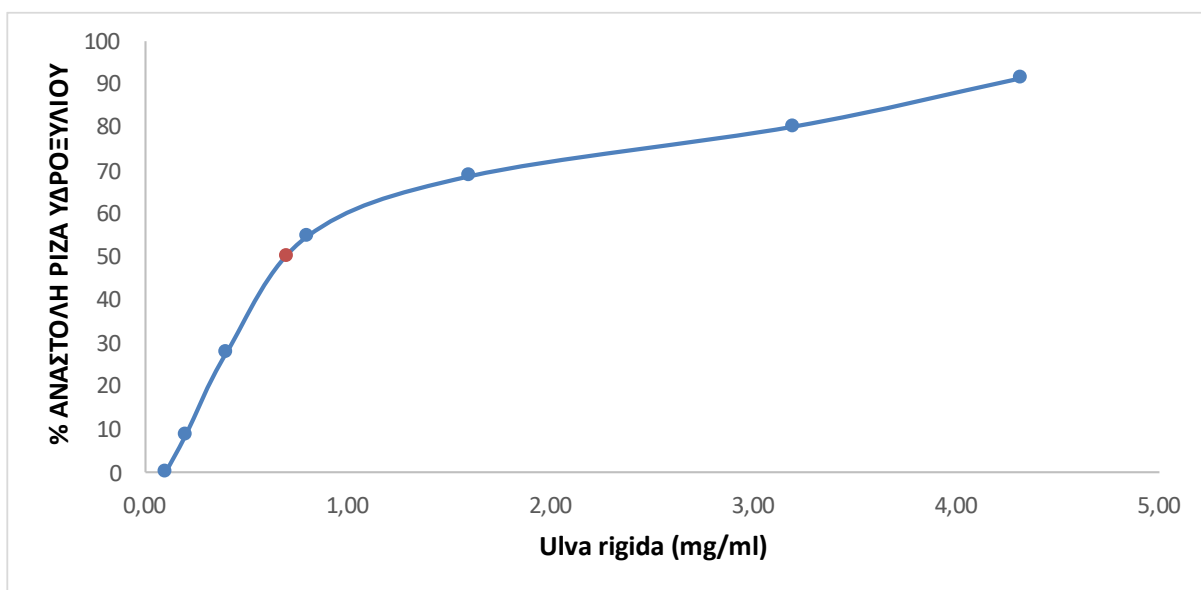
Διάγραμμα 4.3.8 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 700nm, σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Gracilaria bursa pastoris*.



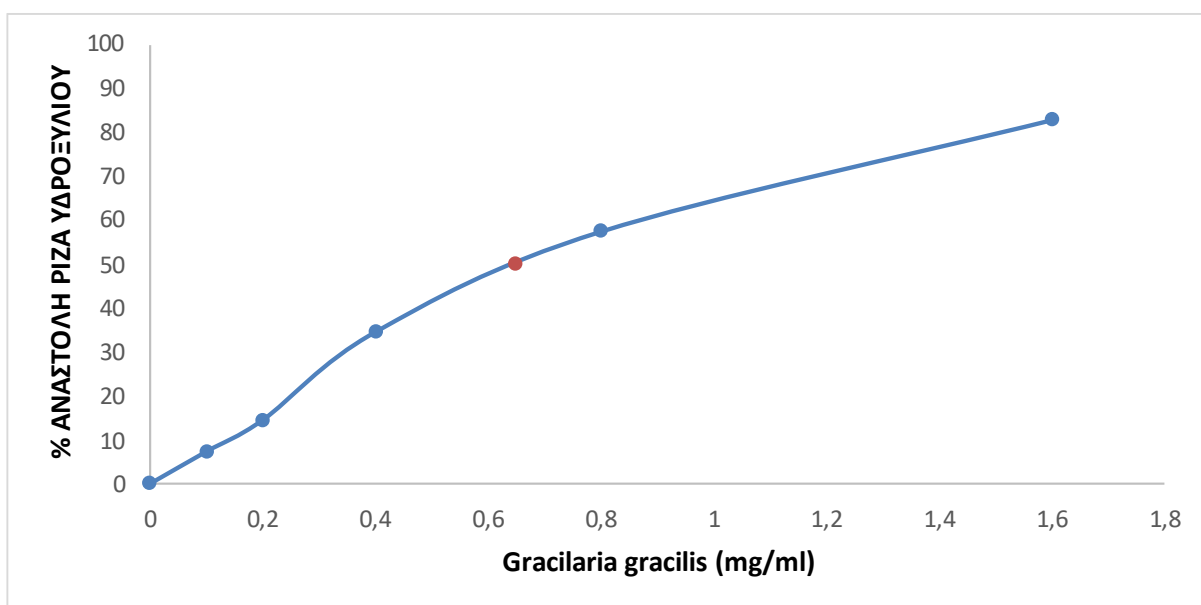
*Διάγραμμα 4.3.9. Απεικόνιση της συγκέντρωσης στην οποία η απορρόφηση έχει τιμή 0,5 για τα υπό εξέταση εκχυλίσματα*

#### 4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $\text{OH}\cdot$

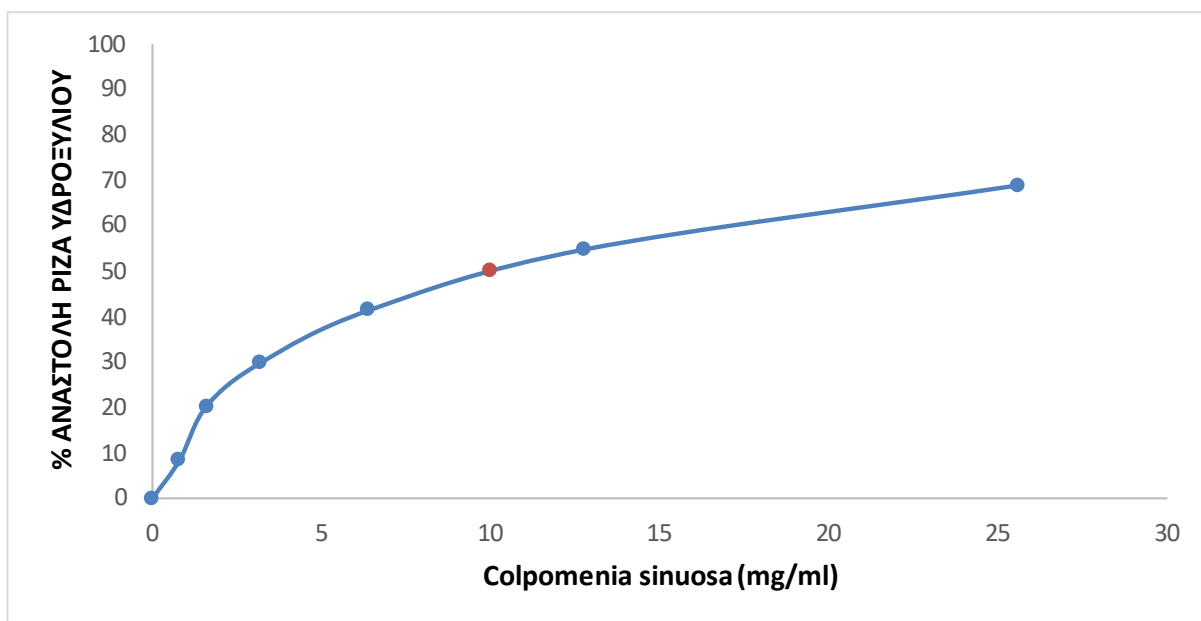
Συνολικά μελετήθηκαν 8 εκχυλίσματα από τα είδη των θαλάσσιων φυκών *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis*, *Sargassum vulgare* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από **0,05-25,6 mg/mL**. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος  $\text{O}_2\cdot^-$  στα 560nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα  $\text{O}_2\cdot^-$ , δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές **IC<sub>50</sub>** όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.4.9 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή **IC<sub>50</sub>** τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των **IC<sub>50</sub>** κυμαίνονται από **0,45 mg/mL** έως **10 mg/mL** (Διάγραμμα. 4.4.9). Το δραστικότερο εκχύλισμα ήταν του θαλάσσιου φύκου *Ulva intestinalis* (**IC<sub>50</sub>= 0,45 mg/mL**), ακολούθησε το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria gracilis* (**IC<sub>50</sub>= 0,65 mg/mL**), του *Ulva rigida* (**IC<sub>50</sub>=0,7 mg/mL**), του *Gracilaria sp* (**IC<sub>50</sub>= 1,1 mg/mL**), του *Sargassum vulgare* (**IC<sub>50</sub>=1,3 mg/mL**), του *Gracilaria bursa pastoris* και του *Codium fragile* (**IC<sub>50</sub>= 1,7 mg/mL**) και του *Colpomenia Sinuosa* (**IC<sub>50</sub>= 10 mg/mL**).



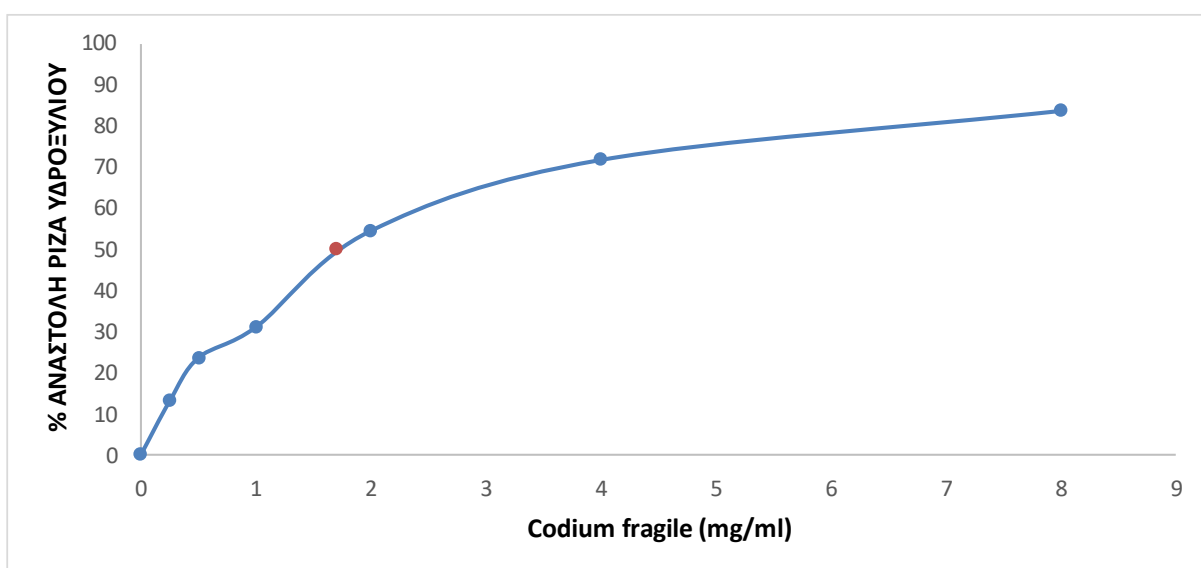
Διάγραμμα 4.4.1 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκους *Ulva rigida*



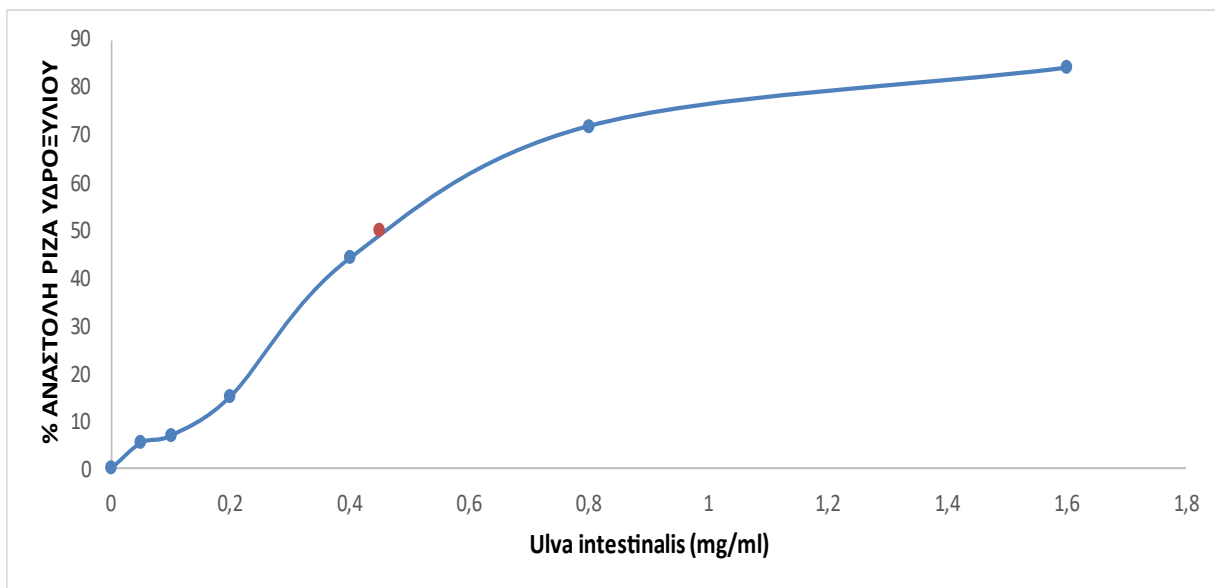
Διάγραμμα 4.4.2. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκους *Gracilaria gracilis*



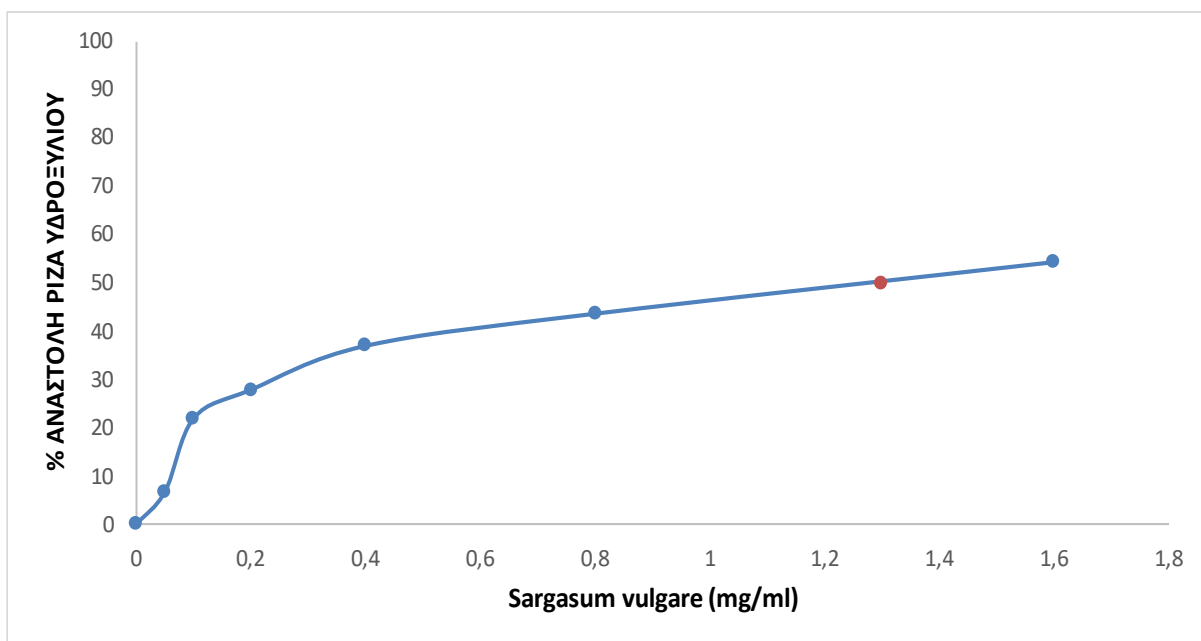
Διάγραμμα 4.4.3 απεικόνισης της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα του φύκους *Colpomenia sinuosa*



Διάγραμμα 4.4.4 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας ΟΗ· από το εκχύλισμα του φύκους *Codium fragile*

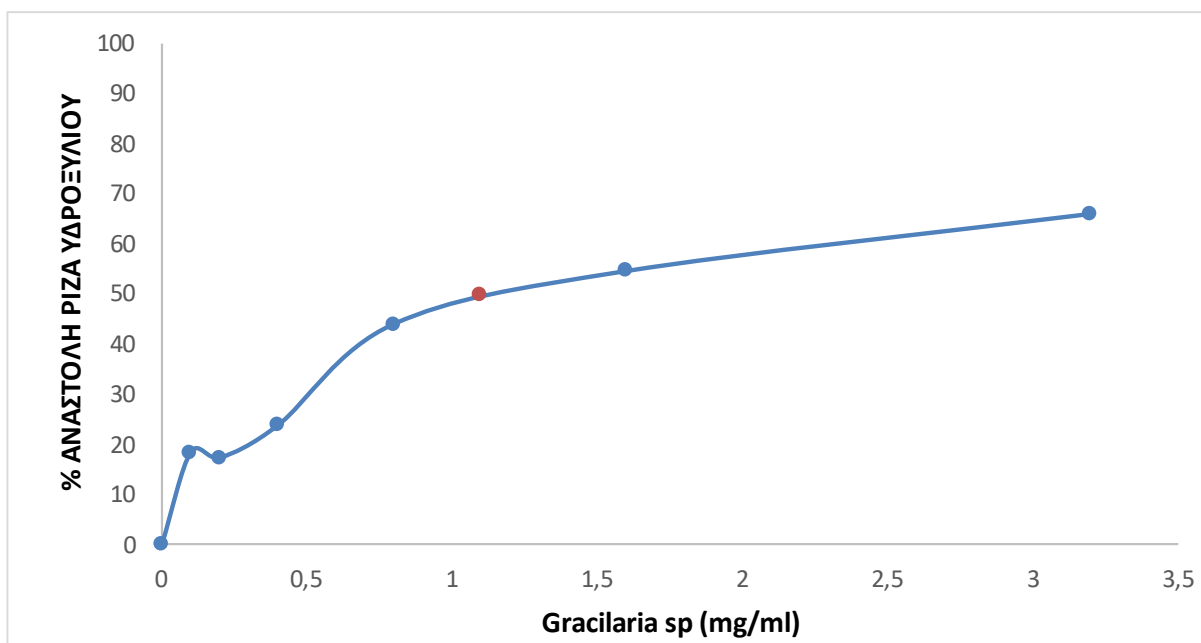


Διάγραμμα 4.4.5 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκου *Ulva intestinalis*

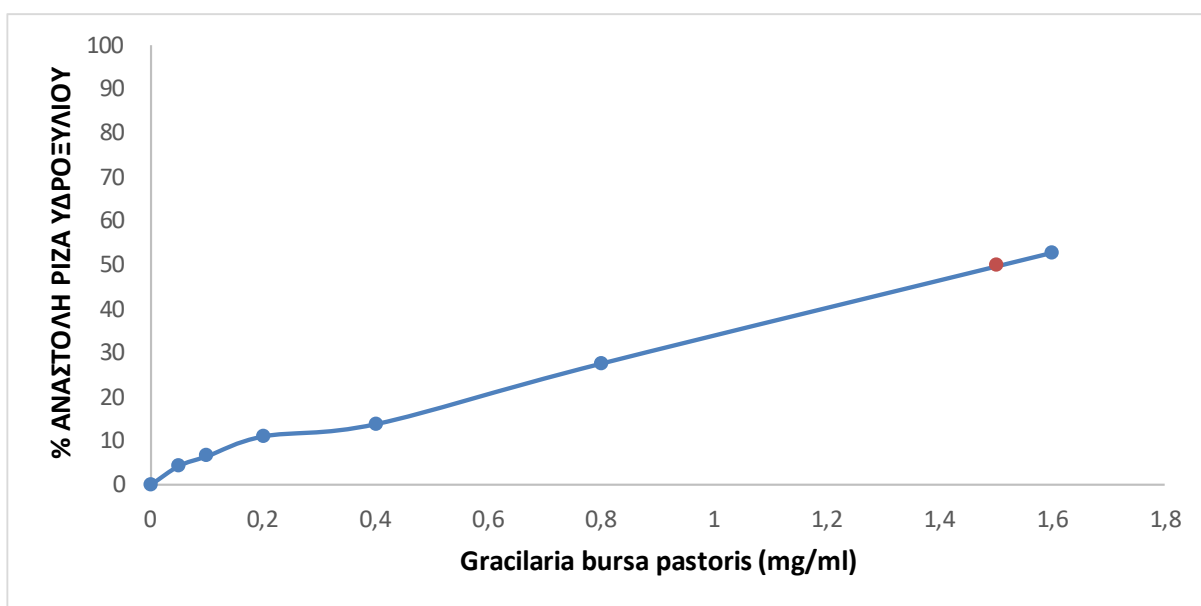


Διάγραμμα 4.4.6 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκου *Sargassum vulgare*

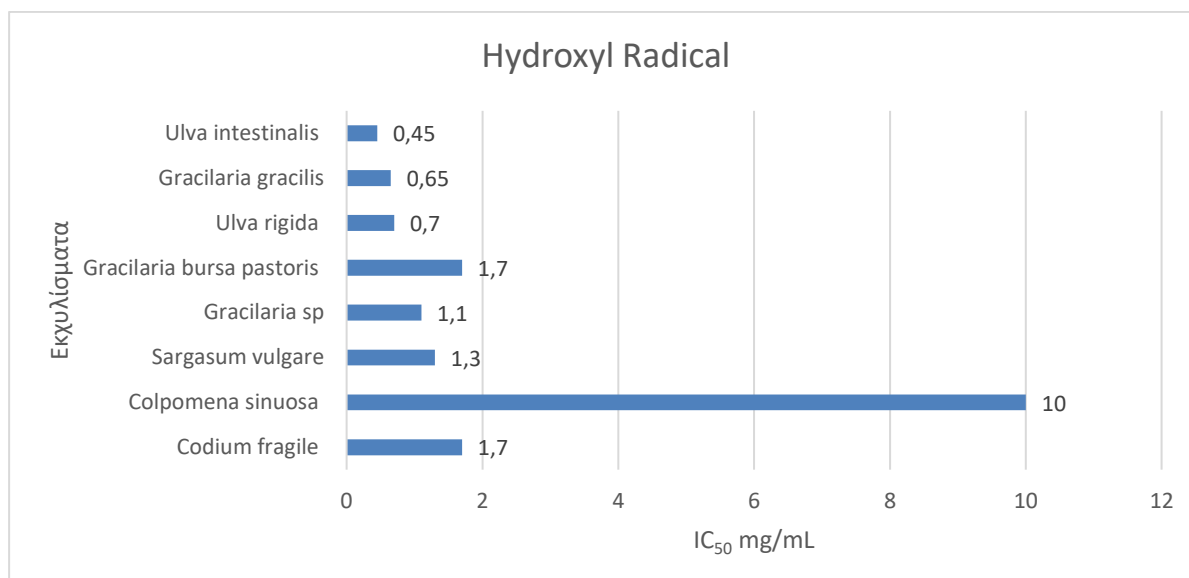




Διάγραμμα 4.4.7 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria sp*



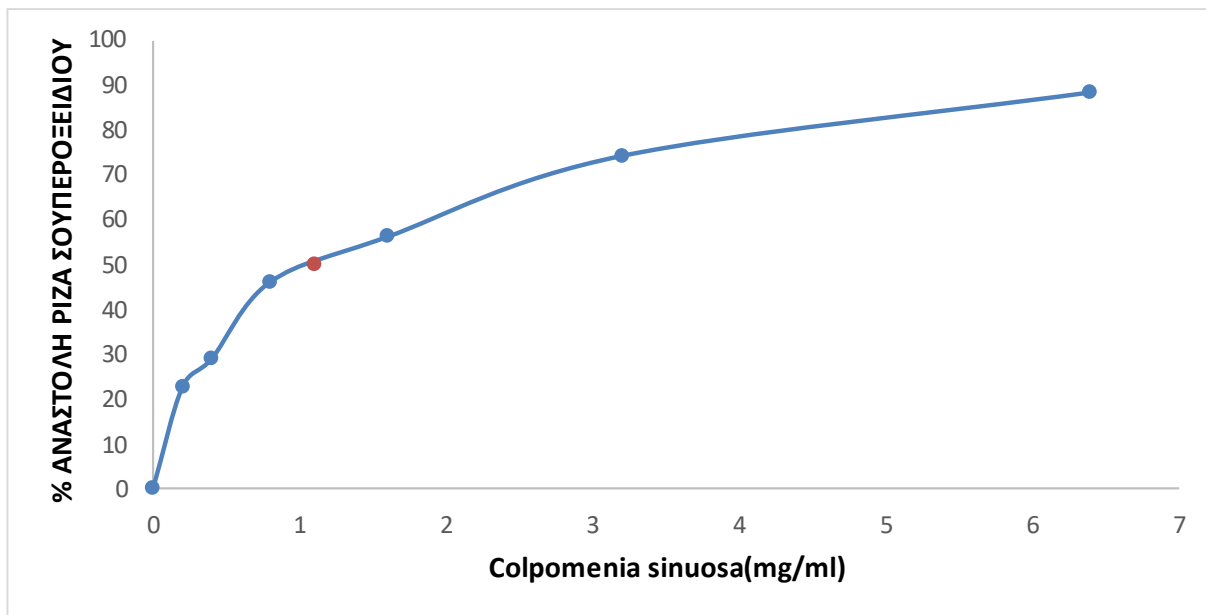
Διάγραμμα 4.4.8 Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας OH· από το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria bursa pastoris*



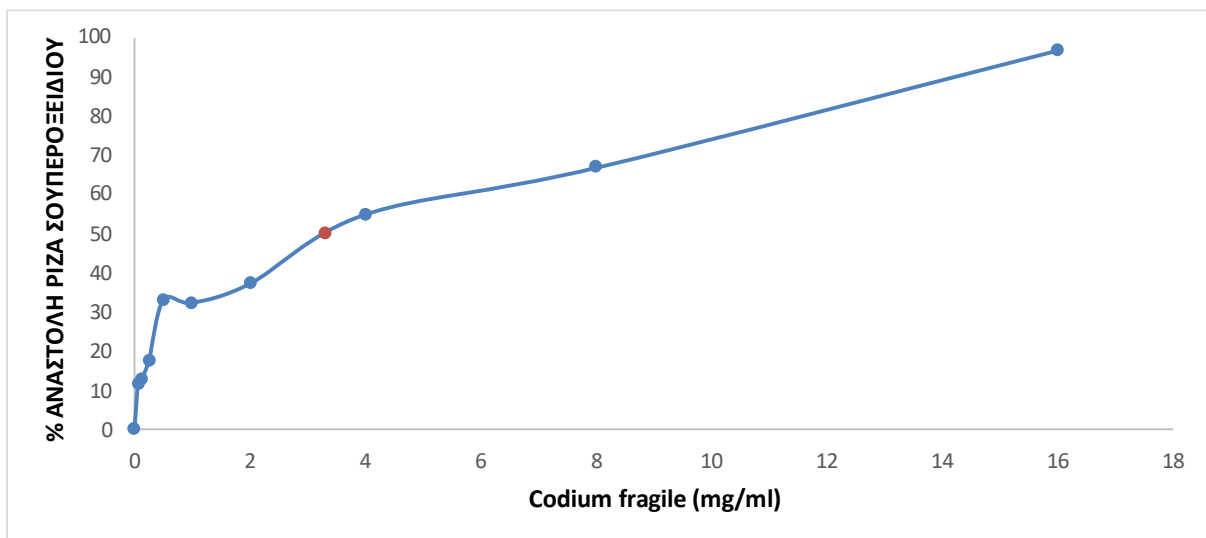
*Διάγραμμα 4.4.9. Απεικόνιση τιμών IC<sub>50</sub> που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας OH από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα*

#### 4.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

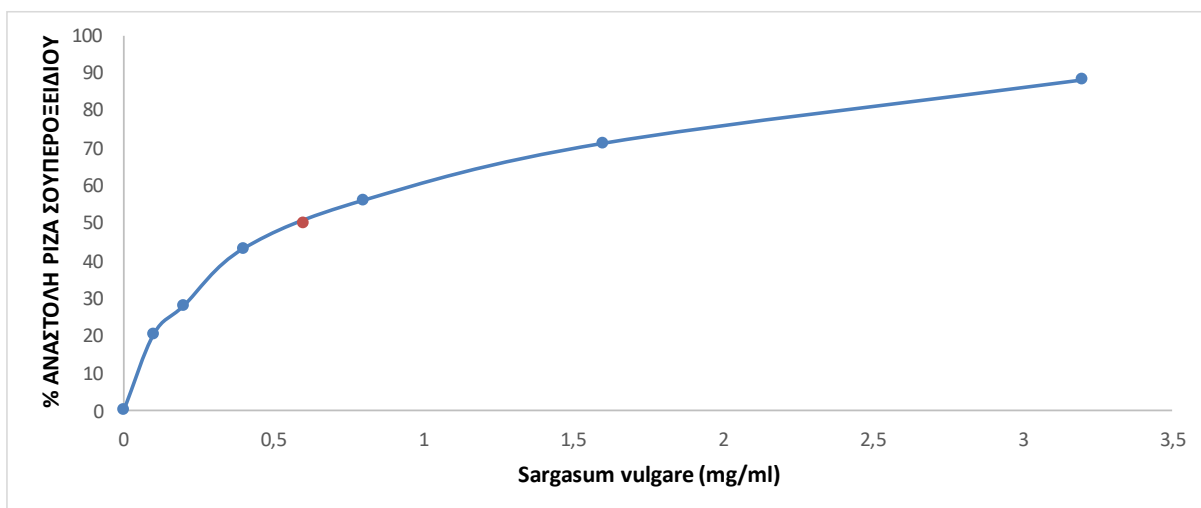
Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα  $O_2^{\cdot-}$  εξετάστηκαν 8 εκχυλίσματα από τα είδη των θαλάσσιων φυκών *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Gracilaria gracilis*, *Sargassum vulgare* και μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από **0,03-16 mg/mL**. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος  $O_2^{\cdot-}$  στα 560nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα  $O_2^{\cdot-}$ , δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές  $IC_{50}$  όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.5.5 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των  $IC_{50}$  κυμαίνονται από **0,3 mg/mL** έως **3,3 mg/mL** (Διάγραμμα, 4.5.6). Η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων από το ισχυρότερο στο ασθενέστερο είναι η ακόλουθη: *Gracilaria bursa pastoris* ( $IC_{50}= 0,14 \text{ mg/mL}$ ), *Gracilaria sp* ( $IC_{50}= 0,36 \text{ mg/mL}$ ), *Sargassum vulgare* ( $IC_{50}= 0,6 \text{ mg/mL}$ ), *Colpomenia sinuosa* ( $IC_{50}= 1,1 \text{ mg/mL}$ ), *Codium fragile* ( $IC_{50}= 3,3 \text{ mg/mL}$ ), *Gracilaria gracilis* ( $IC_{50}=6,37 \text{ mg/mL}$ ). Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα των θαλάσσιων φυκιών *Ulva rigida* και *Ulva intestinalis* ακόμα και στη μέγιστη συγκέντρωση δεν εξουδετέρωσαν την ρίζα  $O_2^{\cdot-}$  κατά 50%. Συγκεκριμένα, το *Ulva rigida* έδειξε **αναστολή 36,6%** σε συγκέντρωση **0,4 mg/mL** και το *Ulva intestinalis* έδειξε **αναστολή 43,2%** σε συγκέντρωση **0,2 mg/mL**.



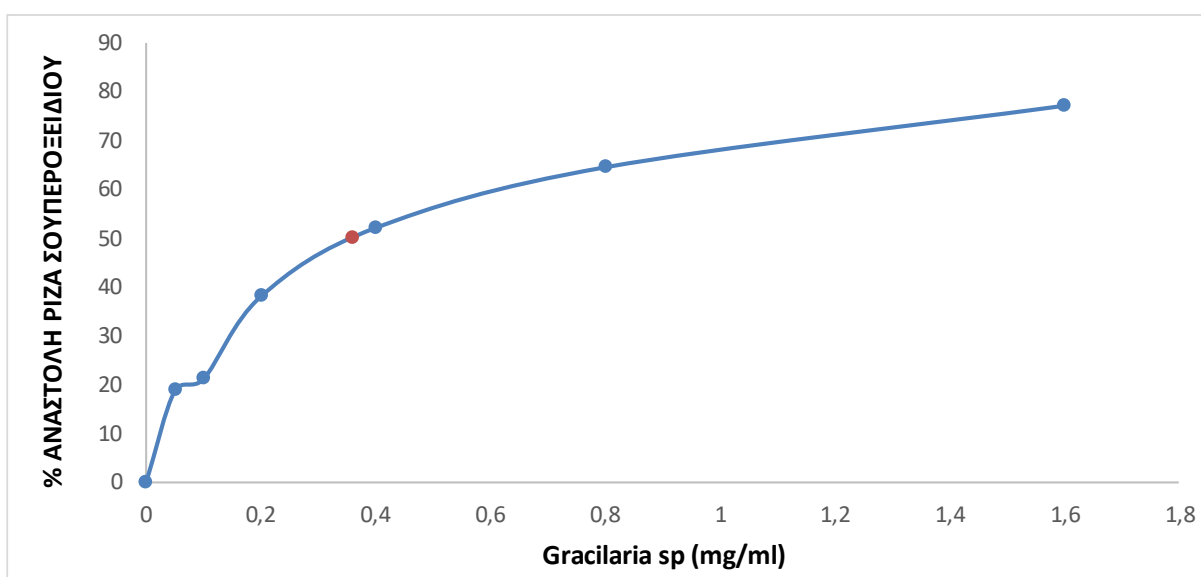
Διάγραμμα 4.5.1. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Colpomenia sinuosa*.



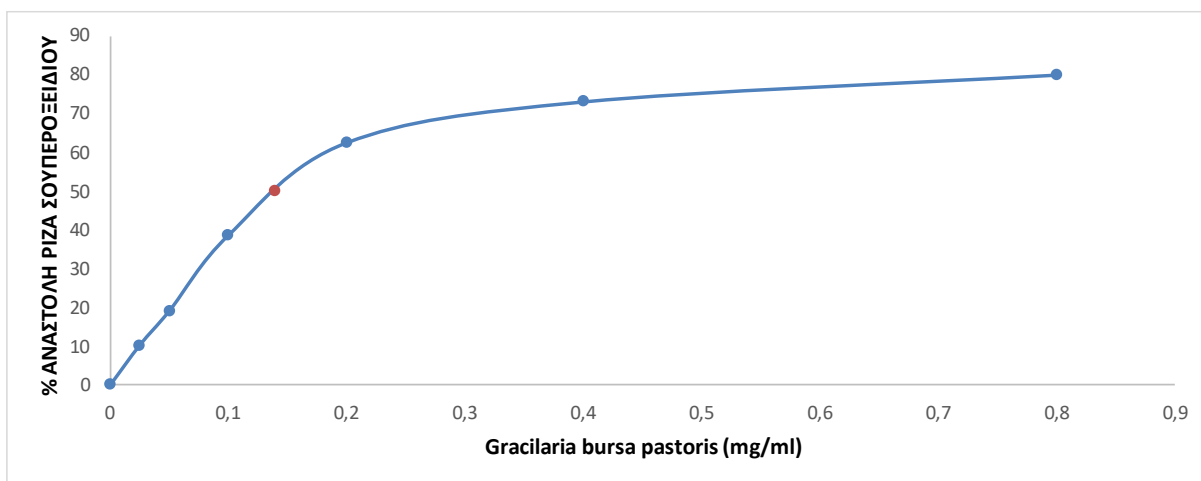
Διάγραμμα 4.5.2. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Codium fragile*



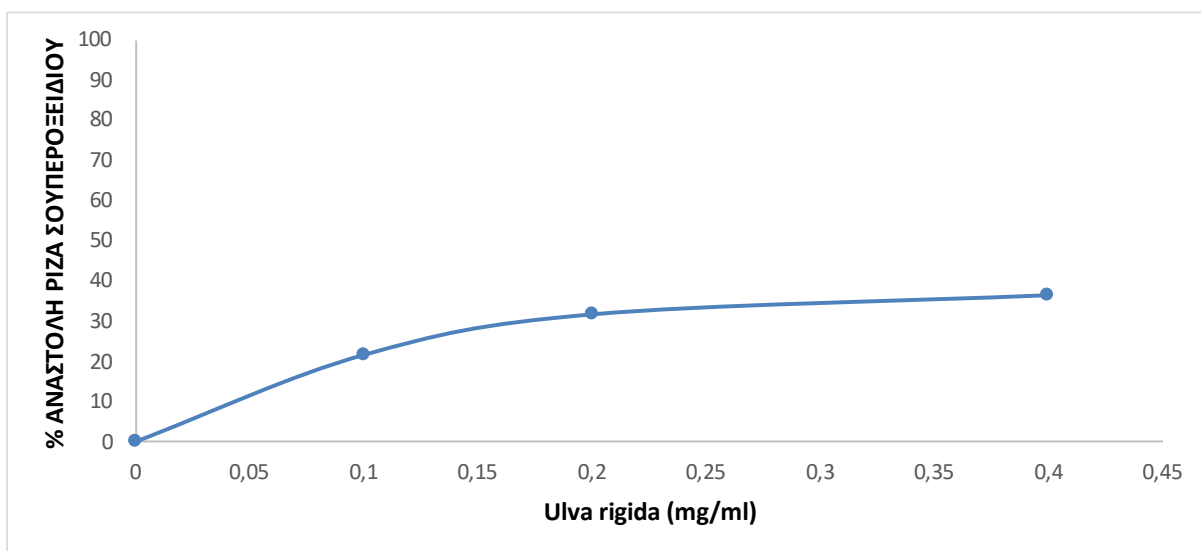
Διάγραμμα 4.5.3. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2\cdot^-$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Sargassum vulgare*



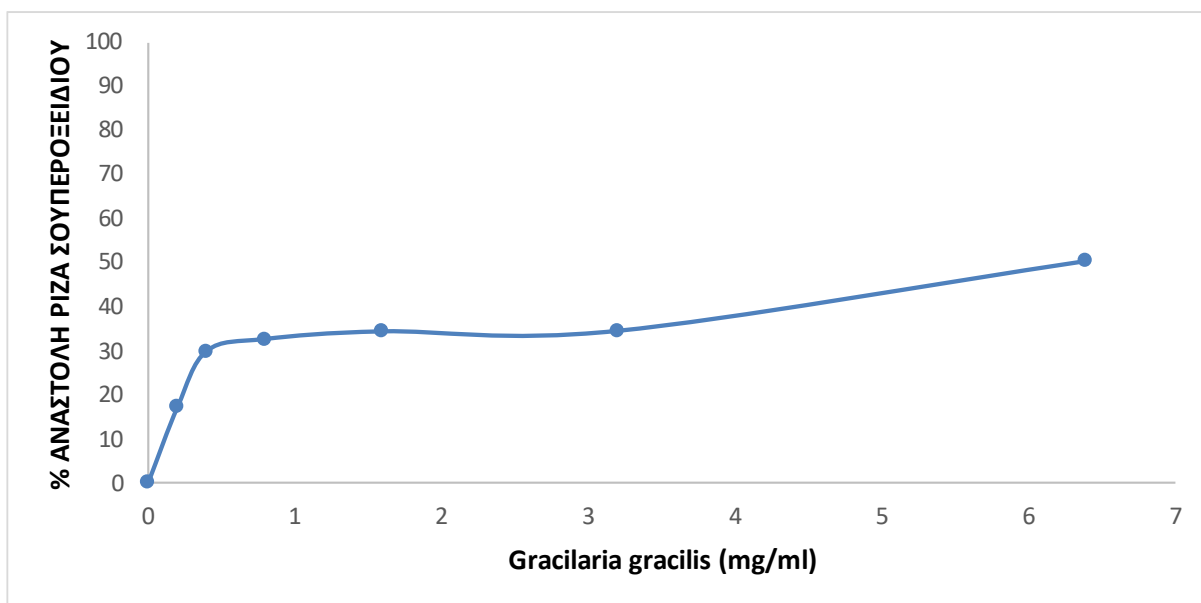
Διάγραμμα 4.5.4. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2\cdot^-$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Gracilaria sp.*



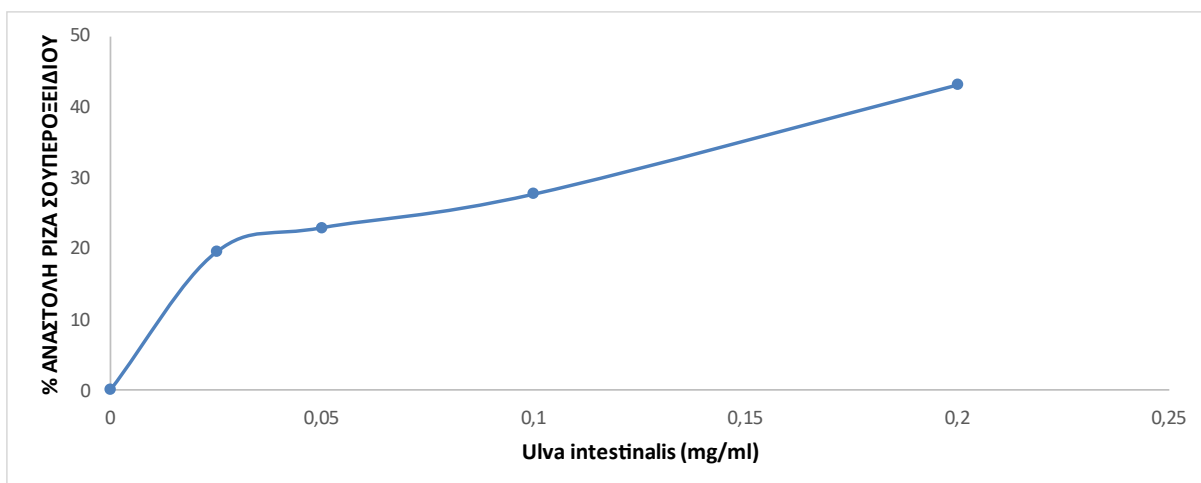
Διάγραμμα 4.5.5. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Gracilaria bursa pastoris*



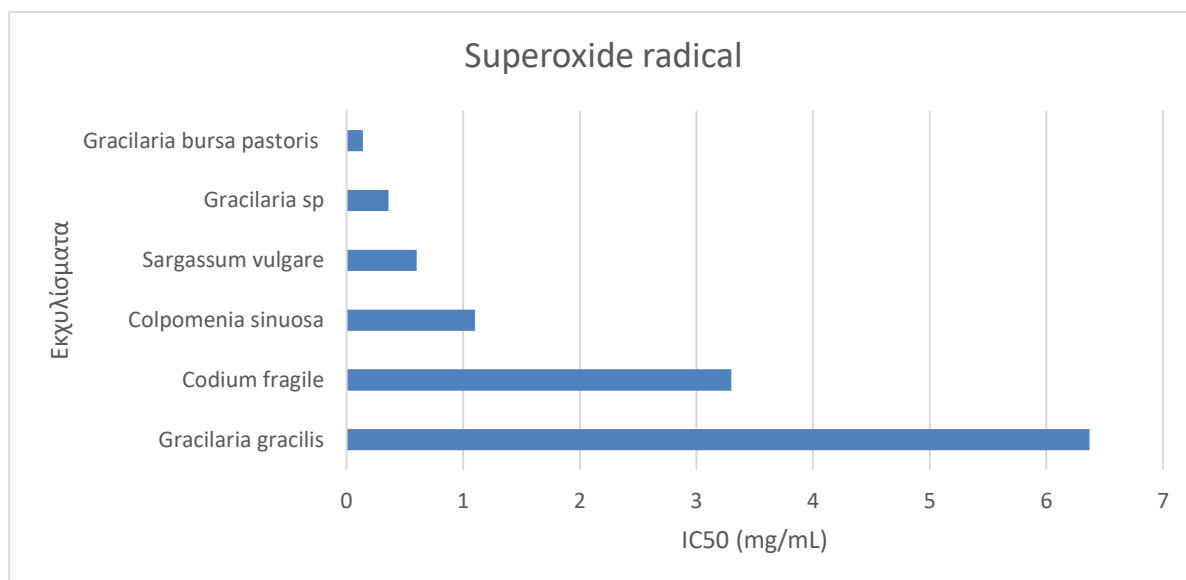
Διάγραμμα 4.5.6. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Ulva rigida*.



Διάγραμμα 4.5.7. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Gracilaria gracilis*



Διάγραμμα 4.5.8. Απεικόνιση της % αναστολής (εξουδετέρωση) της ρίζας  $O_2^{\cdot-}$  από το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Ulva intestinalis*



Διάγραμμα 4.5.9. Απεικόνιση της συγκέντρωσης που μειώνει κατά 50% την απορρόφηση για τα υπό εξέταση εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα των φυκών *Ulva rigida* και *Ulva intestinalis* δεν εξουδετέρωσαν την ρίζα κατά 50%. Παρουσίασαν μέγιστη αναστολή της τάξης 36,2 % και 43,3% σε συγκεντρώσεις 0,4 και 0,2 mg/mL αντίστοιχα.



## 5. Συζήτηση

Τα φύκη αποτελούν μια πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών, αλλά είναι επίσης μια σημαντική πηγή διαφορετικών ειδών βιοδραστικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των θειϊκών πολυσακχαριτών, των καροτενοειδών χρωστικών και των βρωμοφαινόλων, με πιθανά οφέλη για την υγεία (Corsetto P.A. et.al.,2020). Οι βρωμοφαινόλες όπως αναφέρθηκε έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες όπως αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιδιαβητικές (Liu M.et.al.,2011).

Με τη βοήθεια ενός ευρέος φάσματος φασματοφωτομετρικών δοκιμασιών μπορεί να προσδιοριστεί το επίπεδο των αντιοξειδωτικών από υλικά φυτικής προέλευσης, εκχυλίσματα τροφίμων και βιολογικά δείγματα (Apak et.al.,2016). Με βάση τους μηχανισμούς αντίδρασης κατατάσσονται στις μεθόδους μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και μεταφοράς απλού ηλεκτρονίου (SET). Οι μέθοδοι που βασίζονται στα SET ανιχνεύουν την ικανότητα ενός πιθανού αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο για την αναγωγή οποιασδήποτε ένωσης, συμπεριλαμβανομένων μετάλλων, καρβονυλίων και ριζών. Οι μέθοδοι που βασίζονται στο HAT μετρούν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες με δωρεά υδρογόνου  $AH + X \cdot \rightarrow A \cdot + XH$  (Huang et al. 2005 ;Apak et.al.,2016).

Στην παρούσα μελέτη σκοπός ήταν ο *in vitro* προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από 8 θαλάσσια φύκη του Αιγαίου Πελάγους. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα θαλάσσια φύκη *Ulva rigida*, *Codium fragile*, *Gracilaria gracilis*, *Colpomenia sinuosa*, *Ulva intestinalis*, *Sargassum vulgare*, *Gracilaria sp* και *Gracilaria bursa pastoris*. Για την εξέτασή τους χρησιμοποιήθηκαν 5 φασματοφωτομετρικές μέθοδοι. Οι τέσσερις από αυτές προσδιορίζουν την ικανότητα μιας ουσίας να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα τις ρίζες DPPH, ABTS, σουπεροξειδίου και υδροξυλίου. Η πέμπτη μέθοδος προσδιορίζει την αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας, δηλαδή την ικανότητά της να δρα ως δότης υδρογόνου που είναι ένδειξη αντιοξειδωτικής δράσης.

Στη μέθοδο DPPH τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρουσίασαν ένα εύρος τιμών **IC<sub>50</sub>** που κυμαίνονταν από **5,5 –79 mg/mL**. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν του φύκου *Ulva rigida* με **IC<sub>50</sub> =5,5 mg/mL**, ακολούθησε το *Sargassum vulgare* με **IC<sub>50</sub> =8,2 mg/mL**, ενώ τα πιο αδύναμα εκχυλίσματα ήταν του φύκου *Colpomenia sinuosa* **IC<sub>50</sub> =15 mg/mL** και *Codium fragile* με **IC<sub>50</sub> =79 mg/mL**. Μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Bourguiba I et.al., (2017), αξιολογήθηκε το φύκος *Ulva rigida* με τη βοήθεια της μεθόδου DPPH και έδειξε ότι

το εκχύλισμα από αυτό θαλάσσιο φύκος εμφάνισε κυτταροπροστασία έναντι της βλάβης που προκαλείται από το  $H_2O_2$  σε κύτταρα ζυμομύκητα και σε έμβρυα του ψαριού ζέβρα.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα **ABTS<sup>+</sup>** παρουσίασε εύρος τιμών **IC<sub>50</sub>** που κυμαινόταν από **0,47 mg/mL - 15 mg/mL**. Το εκχύλισμα του φύκου *Gracilaria sp* ήταν το πιο ισχυρό με **IC<sub>50</sub>= 0,45 mg/mL**, ενώ ακολούθησε το εκχύλισμα του φύκου *Ulva rigida* με **IC<sub>50</sub>= 0,95 mg/mL**. Πιο αδύναμα παρουσιάστηκαν τα εκχυλίσματα των θαλάσσιων φυκών *Colpomenia sinuosa* και *Codium fragile* με **IC<sub>50</sub> =2,5 mg/mL** και **15 mg/mL**, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκου *Ulva rigida* παρουσίασε μικρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας **ABTS<sup>+</sup>** σε αντίθεση με τα ευρήματα της DPPH. Η διαφορά αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι δύο εξεταζόμενες ρίζες έχουν διαφορετική χημική δομή. Επιπλέον, στη μέθοδο DPPH ο διαλύτης είναι η μεθανόλη και άρα πιο δραστικές είναι μη πολικές αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ στη μέθοδο ABTS ο διαλύτης είναι το νερό και πιο δραστικές είναι πολικές ενώσεις.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η εξέταση των δειγμάτων με τη ρίζα **OH<sup>·</sup>**. Η ρίζα **OH<sup>·</sup>** μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα βιομόρια όπως υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και στο DNA. Η αντίδραση της ρίζας **OH<sup>·</sup>** με δεσοξυριβόζη ή νουκλεοτίδια στο DNA προκαλεί θραύση των κλώνων οδηγώντας σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα (Halliwell B.,2001). Οπότε, καθίσταται σημαντική η εύρεση ενώσεων που θα εξουδετερώνουν τη **OH<sup>·</sup>**. Το εύρος των τιμών του **IC<sub>50</sub>** σε αυτή τη μέθοδο να κυμαίνεται από **0,45-10 mg/mL**. Σε αυτή τη μέθοδο το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν του φύκου *Ulva intestinalis* με **IC<sub>50</sub>= 0,45 mg/mL** και έπειτα ακολούθησε του *Gracilaria gracilis* με **IC<sub>50</sub>= 0,65 mg/mL**. Πιο αδύναμα ήταν τα εκχυλίσματα των θαλάσσιων φυκών *Codium fragile* και *Colpomenia sinuosa* με **IC<sub>50</sub> 1,7 mg/mL** και **10 mg/mL**, αντίστοιχα. Η σειρά δραστηριότητας σε αυτή τη μέθοδο ήταν παραπλήσια με αυτή της μεθόδου ABTS<sup>+</sup>, γεγονός που δείχνει ότι πιθανόν παρόμοιες ουσίες των εκχυλισμάτων εξουδετερώνουν τις δύο ρίζες. Αυτό είναι πιθανό γιατί ο διαλύτης και στις δύο μεθόδους είναι το νερό οπότε δρουν κυρίως υδρόφιλες ενώσεις.

Επιπλέον, εξετάστηκαν τα δείγματα με τη ρίζα **O<sub>2</sub><sup>·-</sup>**. Η ρίζα **O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** είναι μια από τις πιο κοινές ελεύθερες ρίζες που βρίσκονται σε ζωντανούς οργανισμούς και παράγεται in vivo από τις αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, στα φαγοκύτταρα, από ενζυμικές αντιδράσεις και κατά τις αντιδράσεις αυτοοξειδωσης των βιομορίων. Η ρίζα **O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, και έχει παρατηρηθεί ότι οι βλάβες αυτές αυξάνονται με τη γήρανση. Επομένως, για την πρόληψη ασθενειών που

προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες είναι χρήσιμο να βρεθούν ενώσεις που να εξουδετερώνουν τη ρίζα  $O_2^{\cdot-}$  (Stagkos et.al.,2018). Στη μέθοδο αυτή παρουσιάστηκε ένα εύρος τιμών  $IC_{50}$  από **0,3-3,3 mg/mL**. Πιο ισχυρά παρουσιάστηκαν τα εκχυλίσματα του φύκους *Gracilaria bursa pastoris* με  $IC_{50}=0,14$  mg/mL και του *Gracilaria sp* με  $IC_{50}=0,36$  mg/mL. Τα πιο αδύναμα εκχυλίσματα ήταν και σε αυτή τη μέθοδο ήταν του φύκους *Codium fragile* και *Gracilaria gracilis* με  $IC_{50}=3,3$  mg/mL και **6,37 mg/mL**. Το εκχύλισμα του φύκους *Ulva rigida* καθώς και το εκχύλισμα του *Ulva intestinalis* δεν παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του  $O_2^{\cdot-}$  και δεν ανέστειλαν της ρίζα κατά 50% ούτε στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, το *Ulva rigida* έδειξε **αναστολή 36,6%** σε συγκέντρωση **0,4 mg/mL** και το *Ulva intestinalis* έδειξε **αναστολή 43,2%** σε συγκέντρωση **0,2 mg/mL**.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η **μέθοδος της αναγωγικής δύναμης** που εμφάνισε ένα εύρος τιμών  $RP_{0.5AU}$  από **1,37-15 mg/mL**. Όπως και οι τιμές  $IC_{50}$ , όσο χαμηλότερη είναι η τιμή  $RP_{0.5AU}$ , τόσο μεγαλύτερη είναι η αναγωγική δράση. Πιο ισχυρό παρουσιάστηκε το εκχύλισμα του φύκους *Ulva rigida* με  $RP_{0.5AU}=1,37$  mg/mL και του *Ulva intestinalis* με  $RP_{0.5AU}=1,6$  mg/mL. Από την άλλη πλευρά πιο αδύναμα εμφανίστηκαν για ακόμα μια φορά τα εκχυλίσματα *Colpomenia sinuosa* και *Codium fragile* με  $RP_{0.5AU}=1,1$  mg/mL και **3,3 mg/mL**, αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν είδη φυκών που ανήκαν στο ίδιο γένος. Τέτοια παραδείγματα είναι το *Ulva rigida* και το *Ulva intestinalis* τα οποία είχαν παραπλήσιες τιμές  $IC_{50}$  σε όλες τις μεθόδους γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των δύο φυκών να ήταν υπεύθυνες για την παρατηρούμενη δράση. Από το γένος *Gracilaria* εξετάστηκαν τα είδη *Gracilaria sp*, *Gracilaria gracilis* και το *Gracilaria bursa pastoris* με το  $IC_{50}$  να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό σε κάποιες μεθόδους όπως για παράδειγμα στη μέθοδο αναστολής της **ρίζας  $OH^{\cdot}$** . Όπου οι τιμές  $IC_{50}$  ήταν **1,1 mg/mL**, **0,65 mg/mL** και **1,7 mg/mL**, αντίστοιχα. Ο λόγος για τον οποίο οι τιμές  $IC_{50}$  διαφέρουν τόσο πολύ ενώ ανήκουν στο ίδιο γένος δεν είναι γνωστός οπότε θα ήταν χρήσιμη η περαιτέρω διερεύνηση ιδιαίτερα της χημικής τους σύστασης.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ιδιαίτερα το εκχύλισμα του θαλάσσιου φύκους *Ulva rigida* παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Θα ήταν χρήσιμο λοιπόν να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση και ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική του δράση.

Επίσης, θα πρέπει να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί αυτών των συστατικών σε ανθρώπινα κύτταρα και σε *in vivo* πειράματα. Η κατανόηση της δράσης και η αξιοποίηση των ωφέλιμων ιδιοτήτων του εκχυλίσματος αυτού του θαλάσσιου φύκου θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων όπως είναι τα βιολειτουργικά τρόφιμα, φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα και συμπληρώματα διατροφής.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Apak R, Ozyurek M, Güçlü K, Capanoğlu E (2016) Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* 64:997–1027
2. Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., ... Kizek, R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 4(8), 739. doi:10.1039/c2mt20081c
3. Berker Isil, Güçlü, K., Tor, K., Demirata, I., & Apak, B., R. (2009). Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Analytical Methods*, 3(3), 154–168. doi:10.1007/s12161-009-9117-9
4. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. 2174 *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
5. Bourguiba, I., Zahlila, A., Bouaïcha, N., Amri, M., & Mezghani, S. (2017). Antioxidant effect of the marine green alga *Ulva rigida* ethanolic precipitate in yeast cells and zebrafish embryos. *South African Journal of Botany*, 113, 253–260. doi:10.1016/j.sajb.2017.09.001
6. Corsetto, P. A., Montorfano, G., Zava, S., Colombo, I., Ingadottir, B., Jonsdottir, R., ... Rizzo, A. M. (2020). Characterization of Antioxidant Potential of Seaweed Extracts for Enrichment of Convenience Food. *Antioxidants*, 9(3), 249. doi:10.3390/antiox9030249
7. Dong, H., Dong, S., Erik Hansen, P., Stagos, D., Lin, X., & Liu, M. (2020). Progress of Bromophenols in Marine Algae from 2011 to 2020: Structure, Bioactivities, and Applications. *Marine Drugs*, 18(8), 411. doi:10.3390/md18080411
8. Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*. doi:10.5772/intechopen.76719
9. © FAO 2022. *Gracilaria* spp. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Santelices, B.. Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. Updated 2014-05-12 [Cited Friday, July 8th, 2022]. [https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/gracilaria\\_spp/en9](https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/gracilaria_spp/en9).
10. Guiry, M.D.; Guiry, G.M. *Algae Base* (2014). World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; (Accessed on June 30, 2022)

11. Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-020-02689-3
12. Halliwell B (1997) Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nut* 16:33–50
13. Halliwell, B. (2001). Role of Free Radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716. doi:10.2165/00002512-200118090-00004
14. Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841–1856
15. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernández-Mej, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role of Vitamins with Antioxidant Actions. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. doi:10.5772/51788
16. Lawson G.W. (1956). Rocky Shore Zonation on the Gold Coast. *Journal of Ecology*, Vol. 44, No. 1, pp. 153-170
17. Liu, M.; Hansen, P.E.; Lin, X.K, (2011). Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Mar. Drugs*, 9, 1273–1292.
18. McHugh D., 2003. A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper* 441. School of Chemistry, University College University of New South Wales and Australian Defence Force Academy Canberra Australia
19. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.005
20. M. Muftuoglu, M.P. Mori, N.C. de Souza-Pinto (2014). Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA Mitochondrion, 17, pp. 164-181
21. Mut-Salud, N.; Álvarez, P.J.; Garrido, J.M.; Carrasco, E.; Aránega, A.; Rodríguez-Serrano, F. Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, 6719534
22. Morton, O. & Picton, B.E. (2016). *Gracilaria bursa-pastoris* (S Gmelin) P Silva. [In] *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland*. <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZM5460> Accessed on 2022-07-09
23. Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C (2002) Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem* 50:6882–6890

24. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96.
25. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. doi:10.1155/2017/8416763
26. Polifrone, M.; De Masi, F.; Gargiulo, G.M. Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). *Aquaculture*, 2006, 261, 1003-1013.
27. Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290–4302
28. Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042
29. Rengasamy, K.R.; Mahomoodally, M.F.; Aumeeruddy, M.Z.; Zengin, G.; Xiao, J.; Kim, D.H. Bioactive compounds in seaweeds: An overview of their biological properties and safety. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 135, 111013
30. Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P., ... Sharifi-Rad, J. (2018). Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*, 8(4), 124. doi:10.3390/biom8040124
31. Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11. doi:10.3389/fphys.2020.00694
32. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715–748. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037 Assessment. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01832
33. Stagos D., Balabanos D., Savva S., Skaperda Z., Priftis, Kerasioti A.E., Mikropoulou E.V., Vougiotiannopoulou K., Mitakou S., Halabalaki M., Kouretas D., (2018). Extracts from the Mediterranean Food Plants *Carthamus lanatus*, *Cichorium intybus*, and *Cichorium spinosum* Enhanced GSH Levels and Increased Nrf2 Expression in Human Endothelial

Cells, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2018, Article ID 6594101, 14 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6594101>

34. Zaiko A. 2005. *Codium fragile*. In: Baltic Sea Alien Species Database. <http://www.corpi.ku.lt/nemo/mainnemo.html>. (Accessed 1/7/22)
35. M.E. Zujko, A.M. Witkowska, A. Waśkiewicz, E. Sygnowska (2012). Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Adv Med Sci*, 57 (2), pp. 375-384

#### Ιστότοποι

1. [https://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive\\_algae/chloro/ulva\\_rigida.htm](https://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/chloro/ulva_rigida.htm)