



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης προϊόντων ντομάτας στον μη ενζυματικό σχηματισμό τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε *in vitro* συστήματα

**Νικόλαος Ι. Πατραμάνης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μαρία Καυκοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης προϊόντων ντομάτας στον μη ενζυματικό σχηματισμό τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε *in vitro* συστήματα

“Effect of tomato products in the non enzymatic formation of Advanced glycation end-products (AGEs) in *in vitro* systems”

**Νικόλαος Ι. Πατραμάνης**

Εξεταστική επιτροπή:

Μαρία Καγοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Μελέτη της επίδρασης προϊόντων ντομάτας στον μη ενζυματικό σχηματισμό τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε *in vitro* συστήματα**

*ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

### **Περίληψη**

Η αντίδραση Maillard αποτελεί μια μη ενζυματική αντίδραση αμαύρωσης, η οποία κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βιομηχανία των τροφίμων και ως εκ τούτου έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ο λόγος που την καθιστά τόσο σημαντική είναι η επίδραση που έχει στο τρόφιμο, τόσο οργανοληπτικά όσο και στη θρεπτική του αξία, έπειτα από την επεξεργασία του. Είναι μια αντίδραση η οποία σχετίζεται άμεσα με την θερμοκρασία, το pH, την περιεκτικότητα σε νερό και την αναλογία των βασικών της συστατικών. Τα προϊόντα Maillard σχηματίζονται με μηχανισμούς οι οποίοι είναι γνωστοί, ωστόσο η ικανότητά τους να συμμετέχουν σε βιολογικά μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και μεταβολικές ή νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καθιστά την περεταίρω μελέτη τους επιθυμητή. Σε αυτό το πλαίσιο, στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε η παρεμποδιστική ικανότητα προϊόντων ντομάτας και μιας κατηγορίας βιοδραστικών συστατικών τους, όπως τα φαινολικά οξέα, σε ένα μοντελοποιημένο σύστημα τροφίμου αποτελούμενο από D-γλυκόζη και λυσίνη. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση των χρωστικών και φθορίζουσων ενώσεων που σχηματίστηκαν κατά την αντίδραση ήταν φασματομετρία ορατού και η φθορισμομετρία. Στα 360 nm παρατηρήθηκαν τα ενδιάμεσα προϊόντα γλυκοζυλίωσης και στα 420 nm τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους προϊόντα, τα οποία ευθύνονται για το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα της αντίδρασης και ονομάζονται μελανοειδίνες. Ως πιθανοί παρεμποδιστές της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα ντομάτας και συγκεκριμένα ένας διπλά συμπυκνωμένος χυμός και ένας πελτές ντομάτας, ενώ ακόμη αξιολογήθηκε η παρεμποδιστική ικανότητα και ενός πρότυπου διαλύματος των κυριότερων φαινολικών συστατικών της ντομάτας αποτελούμενο από καφεϊκό, p-κουμαρικό και φερουλικό οξύ, το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Τα αποτελέσματα έδωσαν στοιχεία που φανερώνουν πιθανή παρεμποδιστική ικανότητα τόσο των προτύπων φαινολικών ενώσεων, όσο και των προϊόντων ντομάτας. Ως εκ τούτου, η χρήση ντομάτας κατά την επεξεργασία τροφίμων θα μπορούσε να λειτουργήσει ως μια «προστασία» για το διατροφικό προφίλ του τροφίμου σε κάποιο βαθμό. Εντούτοις, για την εξαγωγή πιο βέβαιων συμπερασμάτων αναφορικά με τη δράση τους, θα ήταν απαραίτητη περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου συστήματος υπό μεγαλύτερο εύρος πειραματικών συνθηκών καθώς και μεθόδων ταυτοποίησης των σχηματιζόμενων προϊόντων.

**Επιστημονική περιοχή:** Παρεμπόδιση γλυκοζυλίωσης

**Λέξεις κλειδιά:** ντομάτα, γλυκοζυλίωση, AGEs, παρεμπόδιση

## **Effect of tomato products in the non enzymatic formation of Advanced glycation emd-products (AGEs) in *in vitro* systems**

*MSc Food Nutrition and Health*

*Department of Food Science and Human Nutrition*

*Laboratory of Food Chemistry and Analysis*

### **Abstract**

The Maillard reaction is a non enzymatic browning reaction which plays an important role in the food industry and therefore has been studied to a great extent. What renders it so important is the effect it has on the nutritional as well as organoleptic value of the food after its processing. It is a reaction highly correlated with the temperature, pH, water content and the ratios of its basic reactants. The Maillard products are formed with known mechanisms, however their ability to take part in biological pathways which are correlated with oxidative stress and metabolic or neurodegenerative diseases, makes their further study desirable. In this context, the specific study evaluated the inhibitory effect of some tomato products and a category of bioactive components such as phenolic acids, in a modeled food system, containing D-glucose and lysine. The methods that were used for the monitoring of the coloring and fluorescent compounds which were formed during the reaction, were the visible spectroscopy and fluorescence. The intermediate glycation products were monitored at 360 nm and at 420 nm the bigger molecular weight products, which are named melanoidins and are responsible for the distinctive brown color of the reaction. As potential inhibitors of the reaction, a double concentrated tomato juice and a tomato paste were used. Additionally, an evaluation took place, regarding the inhibitory effect of a standard solution containing the most common phenolic compounds found in tomatoes such as caffeic, p-coumaric and ferulic acid. The results exhibited a potential inhibition on behalf of the standard phenolic compounds as well as the tomato products. Consequently, the use of tomato during food processing could operate as a kind of 'protection' for the nutritional profile of the food to some extent. Nevertheless, for the draw of more clear conclusions regarding their action, a further research of this specific food system under a wider range of experimental conditions and with more identification methods for the forming products would be necessary.

**Scientific area:** Glycation inhibition

**Keywords:** tomato, glycation, AGEs, inhibition

## **Ευχαριστίες**

*Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, κατά το έτος 2021.*

*Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη δίχως την πολύτιμη υποστήριξη της επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου, Καθηγήτριας του ΓΠΑ, Κας Μαρίας Καψοκεφάλου. Επίσης, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αντώνη Βλασσόπουλο (Διπλωματούχος Διαιτολόγος-Διατροφολόγος Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, Μεταδιδακτορικός ερευνητής) για τη συνεργασία την οποία είχαμε, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε και τις συμβουλές του πάνω στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας.*

*Ευχαριστώ πολύ τον κύριο Αθανάσιο Μαλλούχο, Αναπληρωτή καθηγητή του ΓΠΑ και την κυρία Χρυσανγή Γαρδέλλη για όσα μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος καθώς και κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου μελέτης, όποτε το χρειάστηκα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τους γονείς μου οι οποίοι αποτέλεσαν μεγάλο στήριγμα για εμένα και τους οφείλω τη διαδρομή των σπουδών μου μέχρι σήμερα.*

*Πατραμάνης Νίκος*

*Αθήνα, Δεκέμβριος 2021*

*«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή .....	8
<b>Κεφάλαιο 1</b>	
<b>1.1 Αντίδραση Maillard – Γλυκοζυλίωση .....</b>	<b>9</b>
<i>1.1.1 Πορεία αντίδρασης .....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2 Σχηματισμός AGEs .....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3 Επίδραση της αντίδρασης Maillard στην ανθρώπινη υγεία .....</i>	<i>11</i>
<b>Κεφάλαιο 2</b>	
<b>2.1 Αναστολή σχηματισμού AGEs – Αντιοξειδωτικά .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Κατηγορίες αναστολέων AGEs .....</b>	<b>14</b>
<i>2.2.1 Συνθετικοί αναστολείς AGEs .....</i>	<i>14</i>
<i>2.2.2 Αναστολείς AGEs από φυσικά προϊόντα .....</i>	<i>15</i>
<b>2.3. Αναστολή AGEs από πολυφαινόλες .....</b>	<b>16</b>
<i>2.3.1 Φαινολικά οξέα .....</i>	<i>17</i>
<i>2.3.2 Φλαβονοειδή .....</i>	<i>19</i>
<i>2.3.3 Φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβονόνες .....</i>	<i>20</i>
<b>2.4 Πρόσληψη βιοδραστικών συστατικών μέσω της μεσογειακής διατροφής .....</b>	<b>21</b>
<b>Κεφάλαιο 3</b>	
<b>3.1 Ντομάτα και γλυκοζυλίωση .....</b>	<b>22</b>
<b>Κεφάλαιο 4 - Πειραματικό μέρος</b>	
<b>4.1 Πειραματικός σχεδιασμός .....</b>	<b>24</b>

<b>4.2 Όργανα και αντιδραστήρια .....</b>	<b>25</b>
4.2.1. Αντιδραστήρια .....	25
4.2.2. Υλικά .....	25
4.2.3. Όργανα .....	26
<b>4.3 Πειραματική διαδικασία .....</b>	<b>26</b>
4.3.1 Προετοιμασία πειραματικού μοντέλου γλυκοζυλίωσης .....	26
<b>4.4 Ανάλυση των δειγμάτων .....</b>	<b>28</b>
4.4.1 Μέτρηση φθορισμού AGEs .....	28
4.4.2 Φασματομετρία ορατού για προσδιορισμό AGEs .....	28
<b>4.5 Στατιστική ανάλυση .....</b>	<b>29</b>
<b>Κεφάλαιο 5 - Αποτελέσματα</b>	
<b>5.1 Παρακολούθηση επίδρασης παρεμποδιστών συστήματος μέσω φθορισμού .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Παρακολούθηση επίδρασης παρεμποδιστών συστήματος μέσω φασματομετρίας ορατού .....</b>	<b>33</b>
<b>Κεφάλαιο 6</b>	
<b>6.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων .....</b>	<b>36</b>
6.1.1 Δραστικότητα παρεμποδιστών .....	36
6.1.2 Σήμα – είδος σχηματιζόμενων προϊόντων .....	37
6.1.3 Μοριακή αναλογία .....	37
6.1.4 Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών .....	38
<b>6.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>38</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>40</b>
<b>Παράρτημα .....</b>	<b>43</b>

## Εισαγωγή

Η ντομάτα (*Solanum lycopersicum L.*) αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής, το οποίο έχει διακεκριμένο ρόλο λόγω της ευελιξίας της κατά το μαγείρεμα καθώς και των πολλών επεξεργασμένων προϊόντων που την περιέχουν όπως σάλτσες, σαλάτες και σούπες. Διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, καροτενοειδή και πολυφαινόλες. Αυτά τα συστατικά ευθύνονται για την εύρυθμη λειτουργία πολλών διεργασιών ενός οργανισμού, όπως η μείωση της αρτηριακής πίεσης και η διατήρηση της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ ανάλογη θετική επίδραση ενδέχεται να έχει η παρουσία τους σε τρόφιμα βελτιώνοντας την ποιότητά τους.

Η ποιότητα ενός τροφίμου είναι ένας χαρακτηρισμός ο οποίος βασίζεται τόσο σε κριτήρια που αφορούν το θρεπτικό προφίλ του, όσο και σε κριτήρια που αφορούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του όπως για παράδειγμα η εμφάνιση, η γεύση και η οσμή. Τα περισσότερα από αυτά επηρεάζονται σημαντικά κατά την θερμική επεξεργασία του, κυρίως εξαιτίας της αποκαλούμενης αντίδρασης Maillard. Η αντίδραση αυτή, η οποία είναι μια μη ενζυματική αμαύρωση, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1912 από τον Γάλλο χημικό Louis-Camille Maillard σε προϊόντα όπως ο καβουρδισμένος καφές, το ψωμί και το ψητό κρέας. Τα χρόνια που ακολούθησαν, έλαβαν χώρα πολλές μελέτες για την ταυτοποίηση των σχηματιζόμενων προϊόντων καθώς και των επιμέρους σταδίων που ακολουθεί ο σχηματισμός τους. Για την πραγματοποίηση της απαιτείται η παρουσία ενός αναγωγικού σακχάρου και μία αμινομάδα ενός αμινοξέος, μια πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου.

Η αντίδραση Maillard όμως εκτός από τα επιθυμητά αποτελέσματα που μπορεί να έχει σε ένα τρόφιμο όπως η οσμή και η γεύση, ευθύνεται και για την παραγωγή μη επιθυμητών προϊόντων γλυκοζυλίωσης ή αλλιώς τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs). Τα τελικά αυτά προϊόντα έχουν την τάση να συσσωρεύονται στον οργανισμό και έχουν συσχετιστεί με οξειδωτικό στρες καθώς και με χρόνιες παθήσεις όπως ο διαβήτης και η αθηροσκλήρωση. Πέρα από αυτό, η συσσώρευση AGEs που προέρχονται από τη διατροφή, έχει συσχετιστεί με την αύξηση της παραγωγής των ενδογενών AGEs που σχηματίζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στο ανθρώπινο σώμα. Έτσι, με τις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί από τις μελέτες πάνω στα βιοδραστικά συστατικά της ντομάτας και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και σε συνδυασμό με την ευρεία χρήση της στη μεσογειακή διατροφή, δημιουργούνται ερωτήματα και προοπτικές σχετικά με τη προσθήκη της σε συστήματα επεξεργασμένων τροφίμων με στόχο την παρεμπόδιση του σχηματισμού των συγκεκριμένων αυτών προϊόντων γλυκοζυλίωσης.



## Κεφάλαιο 1

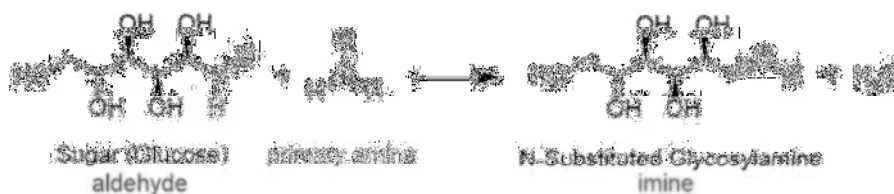
### 1.1 Αντίδραση Maillard – Γλυκοζυλίωση

Η θερμική επεξεργασία αποτελεί μια κοινή μέθοδο που εφαρμόζεται κατά την παραγωγή τροφίμων. Λόγω των τεχνικών που χρησιμοποιούνται και των υψηλών θερμοκρασιών τους, σχηματίζονται ουσίες οι οποίες επιφέρουν επιθυμητά αποτελέσματα και αυξάνουν την «ποιότητα» σε αρκετά τρόφιμα, προσδίδοντας άρωμα, γεύση και χρώμα.

Η αντίδραση στην οποία οφείλεται ο σχηματισμός των επιθυμητών αυτών προϊόντων είναι η λεγόμενη *αντίδραση Maillard*, ένας όρος που χρησιμοποιείται για μια σειρά μη ενζυματικών αντιδράσεων ξεκινώντας από την αντίδραση μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας ενός αναγωγικού σακχάρου και μιας ελεύθερης αμινομάδας μιας πρωτεΐνης, πεπτιδίου ή αμινοξέος. Έτσι, η αντίδραση Maillard μπορεί να χαρακτηριστεί, σε κάποιο βαθμό, ως θεμέλιο για την παραγωγή εύγεστων προϊόντων στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων και συνεπώς είναι ιδιαίτερης σημασίας για την επιστήμη τροφίμων (Nowotny et al., 2018).

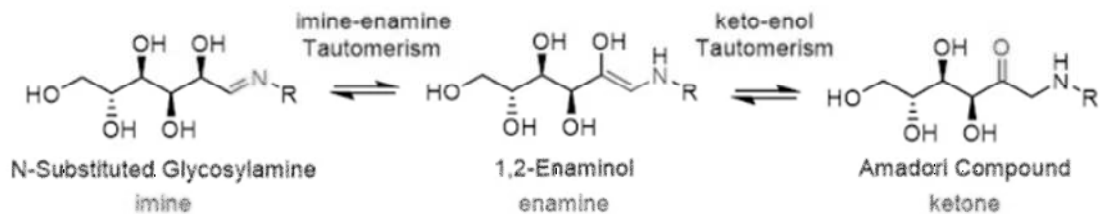
#### 1.1.1 Πορεία αντίδρασης

Γενικά, η αντίδραση Maillard μπορεί να θεωρηθεί ότι διακρίνεται σε τρία κύρια στάδια. Το πρώτο βήμα αυτής της αντίδρασης αποτελεί η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση, η οποία οδηγεί σε μη αντιστρεπτή χημική τροποποίηση, αμαύρωση, δημιουργία φθορισμού και διασύνδεση πρωτεϊνών. Οι ίδιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα και στο ανθρώπινο σώμα σε χαμηλότερες όμως θερμοκρασίες και σε βραδύτερο ρυθμό κατά την φυσιολογική γήρανση. Οι μη αντιστρεπτές αυτές προσθήκες και διασυνδέσεις πρωτεϊνών είναι γνωστές ως *τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης* (advanced glycation end products) ή AGEs. Αναλυτικότερα, πραγματοποιείται ομοιοπολική προσκόλληση αναγωγικών σακχάρων, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη ή 6-φωσφορική γλυκόζη, σε N-τερματικά υπολείμματα αμινοξέων ή αμινομάδες πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων, παράγοντας μια βάση Schiff, μια αναστρέψιμη και ασταθή N-υποκατεστημένη γλυκοσυλαμίνη (σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Αρχικό στάδιο αντίδρασης Maillard, σχηματισμός N-υποκατεστημένης γλυκοσυλαμίνης

Οι βάσεις Schiff αναδιατάσσονται στη συνέχεια παράγοντας σταθερότερα προϊόντα κετοζαμίνης ή Amadori (σχήμα 1.2). Τα προϊόντα κετοζαμίνης υφίστανται με τη σειρά τους περαιτέρω αφυδάτωση είτε για να σχηματίσουν ρεδουκτόνες και αφυδρο-ρεδουκτόνες, είτε για να μετατραπούν σε προϊόντα υδρολυτικής σχάσης βραχείας αλυσίδας όπως διακετύλιο ή πυροσταφυλική αλδεΐδη. Αυτές οι καρβονυλικές ενώσεις μπορούν περαιτέρω να εμπλακούν στην αποικοδόμηση Strecker, προκαλώντας μια σειρά πρόσθετων ενώσεων αρώματος. Ταυτόχρονα, τα ενδιάμεσα που σχηματίστηκαν στην αντίδραση Maillard συμπεριλαμβανομένων των αφυδρο-ρεδουκτόνων, των προϊόντων σχάσης και των προϊόντων αποδόμησης Strecker μπορούν επίσης να λάβουν μέρος στη συμπίκνωση αλδόλης και στη συμπίκνωση αλδεΐδης-αμίνης. Κατά αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται χρωστικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο και προσδίδουν χαρακτηριστικό καφέ χρώμα στα τρόφιμα (μελανοειδίνες) καθώς και μεταλλαξιγόνες ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις (Peng et al., 2011).



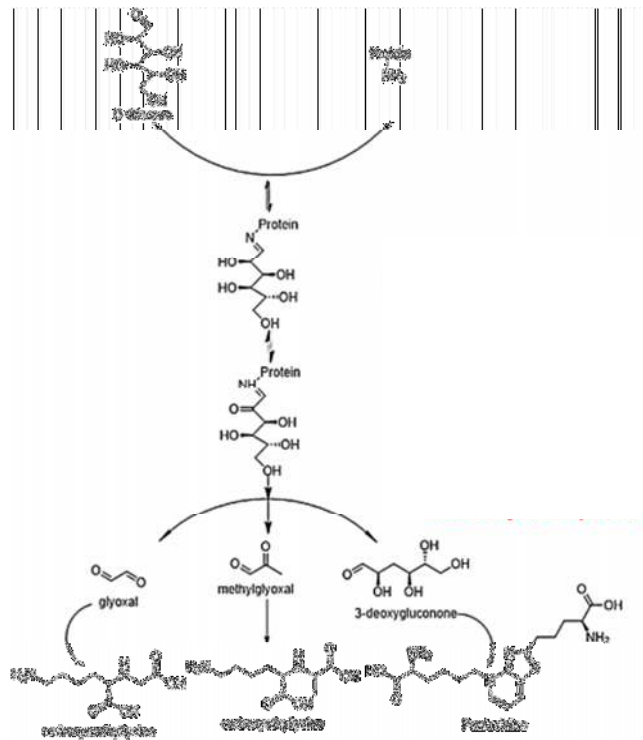
Σχήμα 1.2: Αναδιάταξη Amadori

### 1.1.2 Σχηματισμός AGEs

Τα περισσότερα AGEs σχηματίζονται από ένα συνδυασμό αντιδράσεων γλυκοζυλίωσης και οξείδωσης και ορίζονται ως *προϊόντα γλυκοοξείδωσης*. Ένα από τα χαρακτηριστικά τους αποτελεί η ικανότητα συσσώρευσής τους, η οποία πραγματοποιείται σταδιακά σε εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, ενώ επίσης ενδέχεται να σχηματιστούν από γλυκολυτικά ενδιάμεσα σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Ιδιαίτερα σημαντικό πρέπει να θεωρηθεί το γεγονός ότι αυξημένοι ρυθμοί σχηματισμού AGEs σε πρωτεΐνες ιστών κατά τη διάρκεια υπεργλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της γήρανσης και του διαβήτη και άλλων χρόνιων παθήσεων (Lima and Baynes, 2013).

Παρόμοια με τη διαδικασία της αντίδρασης Maillard, οι σχηματισμοί AGEs ξεκινούν με την αντίδραση μεταξύ αναγωγικών σακχάρων και αμινομάδων. Μετά τον σχηματισμό της βάσης Schiff και την αναδιάταξη Amadori, τα προϊόντα Amadori υφίστανται αφυδάτωση και αναδιάταξη προκειμένου να σχηματίσουν εξαιρετικά δραστικές ενώσεις δικαρβονυλίου συμπεριλαμβανομένων των 3-δεοξυγλυκοσόνης (3-DG), γλυοξάλης (GO) και μεθυλογλυοξάλης (MGO). Οι αντιδράσεις μεταξύ αυτών των προδρόμων AGEs και αμινο, σουλφύδρυλο και γουανιδίνο λειτουργικών ομάδων ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πρωτεϊνών έχουν ως

αποτέλεσμα τον σχηματισμό σταθερών και μη αναστρέψιμων AGEs, που αποτελούνται από καφέ και φθορίζουσες ενώσεις διασύνδεσης (crosslinking). Από αυτές τις ενώσεις πιο χαρακτηριστικές είναι η πεντοσιδίνη, τα μη φθορίζοντα προϊόντα διασύνδεσης όπως διμερή μεθυλογλυοξάλης-λυσίνης (MOLD), και επίσης τα μη φθορίζοντα, μη διασυνδεδεμένα προϊόντα προσθήκης όπως η καρβοξυμέθυλο λυσίνη (CML), η οποία αποτελεί το πιο διαδεδομένο AGE *in vivo* και η πυραλίνη. Η προαναφερθείσα αντίδραση μεταξύ πρόδρομων AGEs και πρωτεϊνών, κατά την οποία αλλάζουν οι δομές και οι λειτουργικές ιδιότητές τους, ενδέχεται να προωθήσει την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων καθώς επηρεάζει δυσμενώς τον κυτταρικό μεταβολισμό. Ακόμη, ένας άλλος τρόπος σχηματισμού AGEs μπορεί να πραγματοποιηθεί από προϊόντα Amadori απευθείας μέσω αναδιάταξης τόσο σε οξειδωτικές όσο και σε μη οξειδωτικές συνθήκες (Peng et al., 2011).



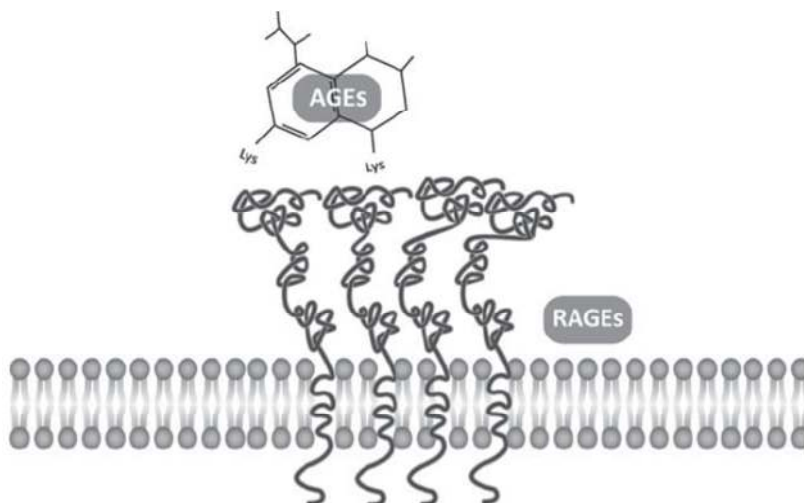
Σχήμα 1.3: Σχηματισμός τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (Khan et al., 2019)

### 1.1.3 Επίδραση της αντίδρασης Maillard στην ανθρώπινη υγεία

Τα AGEs συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά κυρίως λόγω της παραγωγής τους από πρόδρομες δικαρβόνυλο ενώσεις προερχόμενες από τη γλυκόζη και οι οποίες σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Αν και είναι πιθανό τα ενδοκυτταρικά AGEs να έχουν θετική επίδραση ως ερεθίσματα για την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης και την τροποποίηση της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, υπάρχει πληθώρα

αποδείξεων ότι η συσσώρευσή τους ενδέχεται να επηρεάζει αρνητικά τη δομή και τη λειτουργία πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση προϊόντων γλυκοζυλίωσης πιθανώς να σχετίζεται με διάφορες ασθένειες όπως ο διαβήτης και η διαβητική νεφροπάθεια, η μικροαγγειοπάθεια και η αθηροσκλήρωση.

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα AGEs περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με υποδοχείς οι οποίοι στην προκειμένη περίπτωση ονομάζονται RAGEs (σχήμα 1.4). Η αλληλεπίδραση αυτή των AGEs με τους RAGEs δημιουργεί οξειδωτικό στρες και πληθώρα άλλων ανεπιθύμητων επιδράσεων όπως αυξημένη γονιδιακή μεταγραφή προφλεγμονωδών και προ-ινωτικών κυτοκινών και χημειοκινών οδηγώντας σε φλεγμονώδη κατάσταση. Η κατάσταση αυτή με τη σειρά της προάγει τον κακοήθη μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην ογκογένεση (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015).



Σχήμα 1.4: Αλληλεπίδραση μεταξύ AGEs και υποδοχών RAGEs (Guedes-Martins et al., 2013)

Η γλυκοζυλίωση έχει ακόμη προταθεί επανειλημμένα ότι σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης. Συγκεκριμένα, κατά τη γήρανση έχει παρατηρηθεί συσσώρευση προϊόντων γλυκοζυλίωσης στους ιστούς των ζωντανών οργανισμών. Επιπλέον, πληθώρα δυσμενών αλλαγών που σχετίζονται με την ηλικία όπως η μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η συσσώρευση μοριακών αποβλήτων, η αλλοίωση των λειτουργικών πρωτεϊνών, οι λειτουργικές διαταραχές του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος ή ενεργοποίηση φλεγμονωδών οδών από ενδοκυτταρικά σήματα, οφείλονται ενδεχομένως σε αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Όλες αυτές οι αλλαγές αποτελούν συμπτώματα του «στρες γλυκοζυλίωσης».

Οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς προκειμένου να αποφύγουν μια ενδεχόμενη συσσώρευση AGEs, μεταβολίζοντας τα με ένζυμα πρωτεάσης και αποδόμησης οξειδωμένης πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μεταβολισμός τους από την οξειδωμένη

πρωτεΐση υδρολάση στο πρωτεΐσωμα και στη συνέχεια η απέκκριση τους. Δυστυχώς όμως η δράση των ενζύμων αυτών μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας.

Μια διαφορετική προσέγγιση περιλαμβάνει τη διατροφική πρόσληψη των AGEs, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με την φλεγμονώδη κατάσταση και το επίπεδο των AGEs που κυκλοφορούν στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, ο *περιορισμός της πρόσληψης AGEs* μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της φλεγμονής και των χρόνιων παθήσεων που σχετίζονται με την φλεγμονώδη κατάσταση. Επιπλέον, η μείωση της ποσότητας των AGEs που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής αποτρέπει σημαντικά τη συσσώρευση τους και ελαττώνει το οξειδωτικό στρες. Στους ανθρώπους, βραχυπρόθεσμες δοκιμές έδειξαν ότι μια δίαιτα χαμηλής AGEs συμβάλει στη μείωση του οξειδωτικού φορτίου και των φλεγμονώδων δεικτών (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015).

## Κεφάλαιο 2

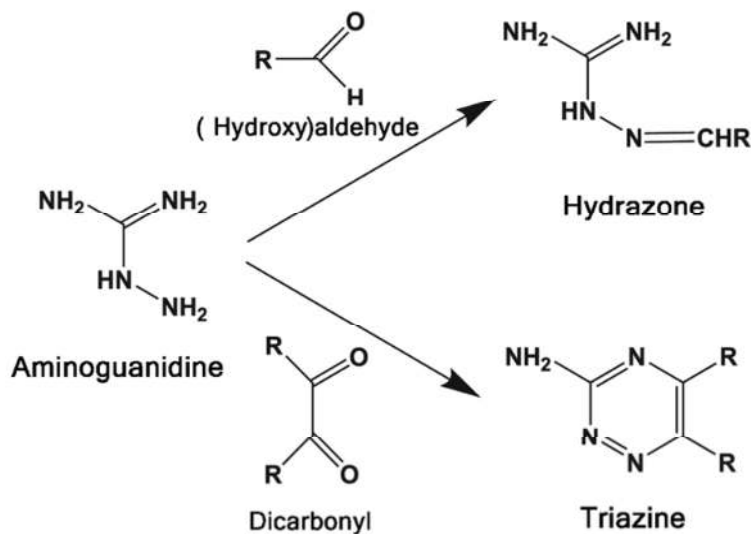
### 2.1 Αναστολή σχηματισμού AGEs - Αντιοξειδωτικά

Όπως έχει αναφερθεί, ο σχηματισμός των AGEs *in vivo* πιθανώς ευθύνεται για την παθογένεση ορισμένων χρόνιων παθήσεων, κυρίως διαβητικών επιπλοκών. Γι' αυτόν το λόγο, η ανακάλυψη και η διερεύνηση των αναστολέων AGEs μπορεί να προσφέρει μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την πρόληψη των διαβητικών ή άλλων επιπλοκών. Μέχρι στιγμής, έχουν προταθεί ορισμένοι πιθανοί αναστολείς AGEs και αρκετοί από αυτούς έχουν φτάσει στο στάδιο των κλινικών μελετών. Οι αναστολείς AGEs μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη προέλευσή τους: συνθετικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα. Σε γενικές γραμμές, οι υποκείμενοι μηχανισμοί των αναστολέων AGEs λειτουργούν κυρίως: α) αποτρέποντας την προσκόλληση σακχάρου σε πρωτεΐνες, β) εξασθενώντας τη γλυκοξείδωση και το οξειδωτικό στρες μέσω της δέσμευσης ή της απομάκρυνσης ορισμένων ενδιάμεσων συμπεριλαμβανομένων των δραστικών δικαρβονυλίων, των ελεύθερων ριζών και των ειδών αζώτου που παράγονται στη διαδικασία της γλυκοζυλίωσης και γ) καταστρέφοντας ήδη υπάρχοντες διασταυρωμένους δεσμούς AGEs. Ακόμη, κάποιοι πρόσθετοι τρόποι αναστολής ή προστασίας από AGEs μπορεί να περιλαμβάνουν τη δημιουργία αντισωμάτων για προϊόντα Amadori, τη χηλίωση μετάλλων μετάπτωσης, τη χρήση ενζύμων με αντιγλυκοζυλιωτική δράση ή την παρεμπόδιση των υποδοχέων RAGEs (Peng et al., 2011).

### 2.2 Κατηγορίες αναστολέων AGEs

#### 2.2.1 Συνθετικοί αναστολείς AGEs

Οι περισσότεροι συνθετικοί αναστολείς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του σχηματισμού AGEs στο τελευταίο στάδιο της γλυκοζυλίωσης, η οποία αποδίδεται κυρίως στην ιδιότητά τους να δεσμεύουν τόσο δραστικά καρβονύλια, όσο και ρίζες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της γλυκοζυλίωσης. Επιπλέον, η δράση τους επεκτείνεται και στην παρεμπόδιση του σχηματισμού ενδιάμεσων προϊόντων Amadori. Η αμινογουανιδίνη (AG) και η πυριδοξαμίνη, ενώσεις οι οποίες θεωρούνται ισχυροί δεσμευτές καρβονυλίου, έχουν διερευνηθεί ευρέως ως τυπικοί αναστολείς AGEs. Πιο συγκεκριμένα, η αμινογουανιδίνη, ένα παράγωγο πυρηνόφιλης υδραζίνης, παρουσιάζει ισχυρή ικανότητα αντίδρασης με ενδιάμεσα β-δικαρβονυλίου που σχηματίζονται κατά τη γλυκοζυλίωση, με τη δραστηριότητα αυτή να σχετίζεται στενά με την πρόληψη της ανάπτυξης διαβητικών επιπλοκών (σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης αμινογουανιδίνης ως δεσμευτής καρβονυλίων και δικαρβονυλίων. Στην πρώτη πορεία σχηματίζοντας υδραζίνη κατά την αντίδραση με καρβονυλικές ενώσεις. Στην δεύτερη πορεία αντιδρά με δικαρβονυλική ένωση σχηματίζοντας τριαζίνη (Nagai et al., 2012).

Παρόλο που οι παραπάνω συνθετικές ενώσεις έχουν δείξει ισχυρή ικανότητα αναστολής του σχηματισμού AGEs ή διάσπασης των διασυνδέσεων, ενδέχεται επίσης να προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αμινογουανιδίνη, ο πρώτος αναστολέας που συμμετείχε σε κλινικές δοκιμές οι οποίες όμως τερματίστηκαν πρόωρα, λόγω ανησυχιών για την ασφάλεια και ανεπαρκούς αποτελεσματικότητας. Οι σχετικές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν στις εν λόγω κλινικές δοκιμές αμινογουανιδίνης, συμπεριλάμβαναν γαστρεντερική διαταραχή, αναιμία και συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη. (Peng et al., 2011).

### 2.2.2 Αναστολείς AGEs από φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα έχουν αποδειχθεί σχετικά ασφαλή για κατανάλωση από τον άνθρωπο σε σύγκριση με τις συνθετικές ενώσεις. Τα τελευταία χρόνια ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα, κλάσματα και ενώσεις έχουν υποστεί δοκιμές προκειμένου να καθοριστεί η ικανότητά τους για αναστολή του σχηματισμού AGEs. Αυτή η ιδιότητα, έγκειται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων που περιέχονται στα εκχυλίσματα αυτά να προλαμβάνουν το σχηματισμό των AGEs, ο οποίος έχει την τάση να επιταχύνεται από το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η δράση κατά της γλυκοζυλίωσης τόσο των φυτικών προϊόντων όσο και των φυσικών φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Υπάρχουν πολλές αναφορές ορισμένων φυσικών ουσιών που έχουν απομονωθεί από φυτά με ανασταλτική δράση κατά των AGEs. Μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δείχνει ότι μια πληθώρα φυτοχημικών που απομονώνονται από κοινά φυτικά τρόφιμα, έχουν τη δυνατότητα παρεμπόδισης σχηματισμού προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, παράγοντες με αντιοξειδωτική ή μεταλλική χηλική ιδιότητα μπορεί να επιβραδύνουν τη διαδικασία σχηματισμού AGEs τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αποτρέποντας την περαιτέρω οξείδωση του προϊόντος Amadori και την οξείδωση γλυκόζης. Για παράδειγμα, η κερκετίνη από το θυμάρι βρέθηκε να είναι αναστολέας της γλυκοζυλίωσης. Μια άλλη ένωση με παρόμοιες ιδιότητες είναι η κουρκουμίνη η οποία απομονώνεται από το *Curcuma longa* (κουρκουμάς). Το τζίντζερ (*Zingiber officinale* Rosc.) είναι ένα άλλο φυσικό βρώσιμο προϊόν, χρήσιμο για τη διαβητική θεραπεία, ενώ επίσης εκχυλίσματα κρεμμυδιού (*Allium cepa* L.) και σκόρδου (*Allium sativum*) έχουν δείξει ότι επιδρούν στο σχηματισμό προϊόντων γλυκοζυλίωσης και Maillard (Ramkisson and Mahomoodally, 2012).

Μια κατηγορία ενώσεων στην οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, είναι οι πολυφαινόλες. Συνεπώς, έχουν την ικανότητα να παγιδεύσουν τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία του σχηματισμού AGEs για να μειώσουν έτσι τα τελικά επίπεδα τους. Ως εκ τούτου, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί άμεσα στις ανασταλτικές δραστηριότητες ορισμένων φυσικών πολυφαινόλων και των παραγώγων τους προκειμένου να ελεγχθεί μια ενδεχόμενη παρεμποδιστική δράση τους (Peng et al., 2011).

### **2.3. Αναστολή AGEs από πολυφαινόλες**

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια φυσικών οργανικών ενώσεων, οι οποίες απαρτίζονται από πολλαπλές φαινολικές μονάδες. Βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα φυτά, ενώ χαρακτηρίζονται ως βιοδραστικές ενώσεις, καθώς προσφέρουν πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων στον άνθρωπο. Ένα κύριο γνώρισμα τους αποτελούν οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, παρέχοντάς τους την ικανότητα να δεσμεύουν επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες, ενώ ακόμη σχετίζονται με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ορισμένων χρόνιων παθήσεων όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Ακόμη, οι πολυφαινόλες συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες, δρώντας ως αντιαλλεργικά, αντικοί/αντιβακτηριακοί παράγοντες, αντιμυκητιακοί/αντικαρκινικοί παράγοντες και με στόχο την πρόληψη διαφόρων ασθενειών.

Βρίσκονται σε μια μεγάλη μερίδα φυτικών προϊόντων όπως λαχανικά, φρούτα, δημητριακά ολικής αλέσεως και άλλα τρόφιμα και ποτά, όπως το τσάι, ο καφές και η σοκολάτα τα οποία επίσης είναι πλούσιες πηγές.



Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε ομάδες ανάλογα με την πηγή προέλευσης, τη βιολογική λειτουργία και τη χημική δομή όπως για παράδειγμα τον αριθμό φαινολικών δακτυλίων και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους. Επίσης, η πλειονότητα των πολυφαινολών στα φυτά υπάρχουν ως γλυκοζίτες με διαφορετικές μονάδες σακχάρου και με σάκχαρα ακυλιωμένα σε διαφορετικές θέσεις των σκελετών πολυφαινόλης. Έτσι, σύμφωνα με τη χημική δομή του άγλυκου τμήματος, οι πολυφαινόλες υποδιαιρούνται σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνάνες. Άξιο αναφοράς είναι και ότι η δομή των πολυφαινολών συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία αφορά την ικανότητά μιας ένωσης να δίνει ηλεκτρόνια ή υδρογόνο σε μόρια ελευθέρων ριζών και έτσι να τα καθιστά μη δραστικά.

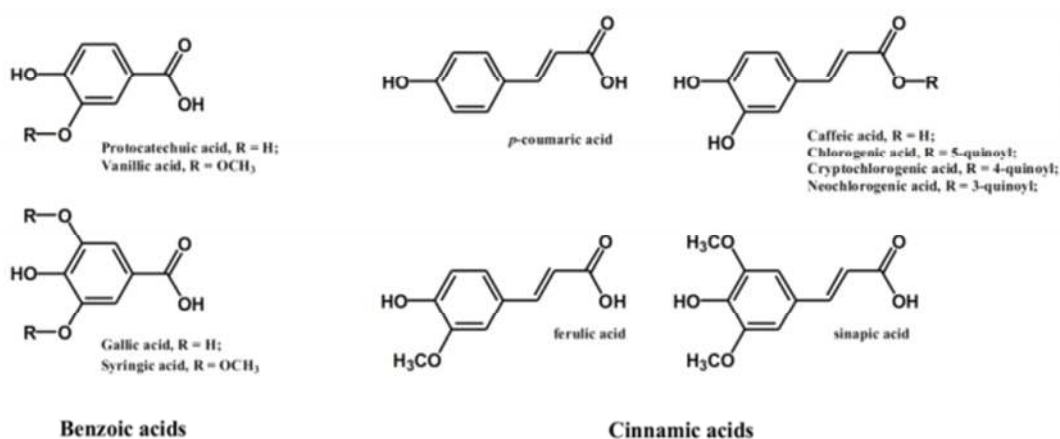
Εκτός όμως από την αντιοξειδωτική δράση, οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν επίσης κατά της γλυκοζυλίωσης. Ένα σχετικό παράδειγμα αποτελεί η *ρεσβερατρόλη*, ένα παράγωγο στυλβενίου που βρίσκεται στα σταφύλια, η οποία μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό AGEs και επίσης να μειώσει το οξειδωτικό στρες και τις φλεγμονές, έπειτα από μελέτες σε αρουραίους (Mizutani, Ikeda, & Yamori, 2000). Μία ακόμη σημαντική ένωση, η οποία βρίσκεται στα φύλλα και στον καρπό της ελιάς είναι η *υδροξυτυροσόλη* (HT) και αποτελεί συστατικό της ολευροπαΐνης. Η δράση της περιλαμβάνει την δέσμευση πρόδρομων ενώσεων των AGEs και αναστολή σταδίων της γλυκοζυλίωσης.

Οι πρόδρομοι των AGEs, όπως η γλυοξάλη (GO) και η μεθυλογλυοξάλη (MGO), έδειξαν επίσης να παρεμποδίζονται από πολυφαινόλες. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή της ανάπτυξης GO και MGO συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, η οποία αποδίδεται στην ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών από αυτές. Μειώνοντας το επίπεδο των δύο κύριων πρόδρομων ενώσεων των AGEs που βρίσκονται στον άνθρωπο (GO, MGO) φαίνεται πως έχει ιδιαίτερα θετική επίδραση στην παρεμπόδιση συσσώρευσης AGEs, καθώς μειώνεται ο ρυθμός μεταβολής των υπολειμμάτων λυσίνης και αργινίνης των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια ο σχηματισμός AGEs. Όσον αφορά τη δέσμευση MGO και GO, οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα συγκριτικά με τις ενώσεις ανταγωνιστές τους, τη λυσίνη και την αργινίνη αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη AGEs. Ενδεικτικό της ισχύος αναστολής τους είναι ότι ορισμένες πολυφαινόλες δεσμεύουν περισσότερο MGO από την αμινογουανιδίνη, έναν τυπικό συνθετικό παράγοντα αναστολής των AGEs, που αναφέρθηκε παραπάνω (Khan et al., 2019).

### 2.3.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά φυτοχημικά, τα οποία βρίσκονται φυσικά σε σχεδόν όλα τα λαχανικά και τα φρούτα. Η βιολογική τους δράση σχετίζεται στην λιποφιλικότητα τους και επηρεάζεται από την παρουσία ομάδων υδροξυλίου ως υποκαταστάτη δακτυλίου και, στην περίπτωση των πολυυδροξυλιωμένων φαινολικών εστέρων, από το μήκος του τμήματος εστέρα. Είναι μη-

φλαβονοειδείς πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος και κινναμικού οξέος με βάση τον ανθρακικό τους σκελετό. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, υδροβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ ή συστατικά των γαλοτανινών και των ελαγιτανινών. Τα υδροξυκινναμικά οξέα απαντώνται συνήθως σε διάφορες συζευγμένες μορφές όπως εστέρες υδροξυλίου. Οι απλοί εστέρες με υδροξυ καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη παράγονται συνήθως από υδροξυκινναμικό οξύ και σε αυτούς ανήκουν διαδεδομένες ενώσεις που συναντώνται στα τρόφιμα όπως το *κουμαρικό*, *καφεϊκό* και *φερουλικό οξύ*, οι οποίες απομονώνονται μέσω εκχύλισης σε ελεύθερες μορφές (Khan et al., 2019).



Σχήμα 2.2: Φαινολικά οξέα (αριστερά), Κινναμικά οξέα (δεξιά) (Ođjakova et al., 2012).

Αναφορικά με τη δράση των φαινολικών οξέων, αυτή περιλαμβάνει τόσο αναστολή σχηματισμού AGEs, όσο και ως αντιοξειδωτικά. Πιο συγκεκριμένα, δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συστήματα. Παρακάτω συνοψίζονται μερικά από τα κύρια φαινολικά οξέα για την αναστολή των AGEs.

Το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του είναι συχνά χαρακτηριστικά ενός φυτικού είδους ή ακόμη και ενός συγκεκριμένου τμήματος ή ιστού του φυτού. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τις φαρμακολογικές ιδιότητες του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοπροστατευτικών, αντιοξειδωτικών και αντιδιαβητικών δραστηριοτήτων. Πιο συγκεκριμένα, σε *in vitro* μελέτες γλυκοζυλίωσης της BSA, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του παρεμπόδισαν αποτελεσματικά τη διαδικασία και συνεπώς το σχηματισμό AGEs.

Εξίσου σημαντικό είναι και το *φερουλικό οξύ*, το οποίο είναι ένα υδροξυκινναμικό οξύ και βρίσκεται σε αφθονία στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων και σε πληθώρα ποτών και

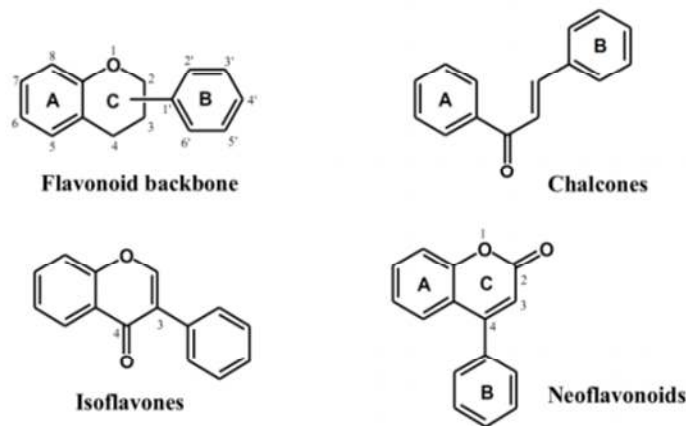
τροφίμων όπως ρύζι, σιτάρι, βρώμη και ορισμένα φρούτα και λαχανικά. Το φερουλικό οξύ αποτρέπει αποτελεσματικά την ανάπτυξη καρβόξυμεθυλο λυσίνης (CML) και καρβόξυαιθυλο λυσίνης (CEL) σε μοντελοποιημένα συστήματα. Ακόμη, έχει αντιγλυκοζυλιωτική δράση που αναστέλλει κυρίως την προχωρημένη φάση της γλυκοζυλίωσης. Έτσι, με βάση τα αποτελέσματα μιας μελέτης των Silván et al. (2011) προέκυψε ότι το φερουλικό οξύ μπορεί να αποτρέψει το σχηματισμό AGEs με μερικούς από τους ακόλουθους τρόπους: α) ενεργεί ως αντιοξειδωτικό, β) δεσμεύει αμινομάδες και αναστέλλει την οξείδωση του σακχάρου και την πρόωμη αποδόμηση των προϊόντων της αντίδρασης Maillard (MRP). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της αντιγλυκοζυλιωτικής δράσης από το φερουλικό οξύ απαιτεί περαιτέρω έρευνες.

Το *καφεϊκό οξύ* ανήκει και αυτό στην οικογένεια των υδροξυκινναμικών οξέων και βρίσκεται σε όλα τα φυτά καθώς αποτελεί βασικό ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση της λιγνίνης, ενός από τα κύρια συστατικά της ξυλώδους φυτικής βιομάζας. Όπως και οι παραπάνω ενώσεις, έτσι και αυτό εμφανίζει παρεμπόδιση σχηματισμού AGEs και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από την αμινογουανιδίνη (Khan et al., 2019).

### 2.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα, διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6). Λόγω της ικανότητας υδροξυλίωσης και των παραλλαγών του δακτυλίου χρωμανίου, τα φλαβονοειδή μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους ομάδες όπως οι ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή υπάρχουν σε διάφορα είδη λαχανικών, στο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Πολλά από αυτά είναι γνωστά αντιοξειδωτικά, αποτελεσματικά στην παγίδευση των ελεύθερων ριζών και συνεπώς συμμετέχουν στη διατήρηση της συνολικής οξειδοαναγωγικής ομοιοστάσης των κυττάρων των φυτών. Η κύρια δομή των φλαβονοειδών (τρεις δακτύλιοι βενζολίου με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες) είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να περιλαμβάνει την ικανότητα των φλαβονοειδών να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες, τη χηλίωση των μεταλλικών ιόντων μετάπτωσης, την «εξοικονόμηση» αντιοξειδωτικών που σχετίζονται με την LDL και τη σύνδεση με μακρομόρια ή αλληλεπίδραση με άλλα είδη αντιοξειδωτικών (Ođjakova et al., 2012).



Σχήμα 2.3: Δομές φλαβονοειδών (Odjakova et al., 2012).

### 2.3.3 Φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβονόνες

Αυτές οι υποομάδες φλαβονοειδών είναι οι πιο κοινές σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο. Οι φλαβόνες και τα 3-υδροξυ παράγωγά τους που ονομάζονται φλαβονόλες, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοζιδίων, των μεθοξειδίων και άλλων ακυλιωμένων προϊόντων τους, την καθιστούν ως τη μεγαλύτερη υποομάδα μεταξύ όλων των πολυφαινόλων. Οι πιο συνηθισμένες αγλυκόνες φλαβονόλης είναι η κερσετίνη και η ρουτίνη.

Η *κερσετίνη* βρίσκεται στα εσπεριδοειδή, το φαγόπυρο και τα κρεμμύδια και έχει μελετηθεί επανειλημμένως προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητά της να προστατεύει από βλάβες πρωτεϊνών που συνδέονται με το σχηματισμό AGEs, χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλα συστημάτων.

Η *ρουτίνη*, αποτελεί ένα κοινό φλαβονοειδές και αντιοξειδωτικό, το οποίο προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής. Βρίσκεται σε φρούτα, λαχανικά και ροφήματα φυτικής προέλευσης όπως τσάι και κρασί. Οι μεταβολίτες της ρουτίνης ιδιαίτερα εκείνοι που περιλαμβάνουν γειτονικές υδροξυλομάδες στη δομή τους όπως το 3,4-διυδροξυφαινολοξικό οξύ (DHPAA) και το 3,4-διυδροξυτολουόλιο (DHT), είναι ισχυροί αναστολείς του σχηματισμού CML και φθοριζόντων παραγώγων (370-440 nm και 335-385 nm). Οι συγκεντρώσεις αυτών των μεταβολιτών της ρουτίνης στο πλάσμα έχουν την ικανότητα εξουδετέρωσης των συγκεντρώσεων πρόδρομων AGEs όπως η γλυοξάλη (GO) και η μεθυλογλυοξάλη (MGO) που βρίσκονται σ' αυτό. Η ρουτίνη σχετίστηκε επίσης με την αναστολή του σχηματισμού προϊόντων γλυκοζυλίωσης και χαρακτηρίστηκε ως ένας αποτελεσματικός αναστολέας της γλυκοζυλίωσης των λιποπρωτεϊνών αυξάνοντας την αντίσταση της LDL (Odjakova et al., 2012).

## 2.4 Πρόσληψη βιοδραστικών συστατικών μέσω της μεσογειακής διατροφής

Η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή αποτελεί μια σύγχρονη δίαιτα, η οποία έχει λάβει επιρροές από τις διατροφικές συνήθειες μεσογειακών λαών, όπως η Ελλάδα, νότια Ιταλία, Γαλλία και Ισπανία. Το διατροφικό μοντέλο αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης, όπως ελαιόλαδο, όσπρια, ανεπεξέργαστα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά, ταυτόχρονα με μια σχετικά χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος. Αποτέλεσμα της διαίτας αυτής αποτελεί η μειωμένη εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων όπως καρκίνος, στεφανιαία νόσος και διαβήτη μεταξύ άλλων, λόγω της χαμηλής πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών (Marti et al., 2016).

Αναλυτικότερα, η μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή πρόσληψη *φαινολικών ενώσεων*, οι οποίες υπάρχουν στα περισσότερα βασικά τρόφιμα αυτού του διατροφικού μοντέλου όπως είναι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, οι ξηροί καρποί, το κόκκινο κρασί, όσπρια, λαχανικά, φρούτα και δημητριακά ολικής άλεσης (Castro-Barquero et al., 2018).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόλο που τα βιοδραστικά συστατικά των φρούτων και λαχανικών μπορούν να προσληφθούν μέσω συμπληρωμάτων διατροφής, μελέτες φαίνεται να δείχνουν ότι η άμεση πρόσληψή τους μέσω του τροφίμου (φυσική μήτρα), έχει περισσότερα οφέλη για την υγεία σε σύγκριση με μεμονωμένη πρόσληψή τους σε συμπληρώματα διατροφής. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι αυτά τα μόρια έχουν την ικανότητα να δρουν συνεργιστικά με άλλα φυτοχημικά συστατικά στα φρούτα και στα λαχανικά με αποτέλεσμα να ενισχύεται η δράση τους και συνεπώς τα οφέλη για την υγεία (Marti et al., 2016).

Έτσι συμπεραίνουμε ότι μια διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά η οποία βασίζεται σε *παραδοσιακές μεσογειακές συνταγές και τεχνικές μαγειρέματος*, όπως για παράδειγμα η χρήση παρθένου ελαιολάδου αντί ζωικών λιπών και η χρήση βοτάνων και μυρωδικών, αποτελεί έναν από τους καλύτερους τρόπους να προσλάβει κανείς μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων.

## Κεφάλαιο 3

### 3.1 Ντομάτα και γλυκοζυλίωση

Η ντομάτα (*Solanum lycopersicum*) αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα λαχανικά παγκοσμίως, με την ετήσια παραγωγή της να ανέρχεται περίπου στους 180 εκατομμύρια τόνους. Εξαιτίας της περιεκτικότητάς της σε βιοδραστικά συστατικά, η κατανάλωσή της είναι στενά συνδεδεμένη με σημαντικά οφέλη στην υγεία, όπως η καλή καρδιαγγειακή λειτουργία και η πρόληψη νοσημάτων τα οποία σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Θεωρείται ως ένα από τα βασικότερα συστατικά της μεσογειακής διατροφής και έχει κυρίαρχο ρόλο σε μια μεγάλη ποικιλία γευμάτων, λόγω της ικανότητάς της να συνδυάζεται με άλλα προϊόντα αυτής της διατροφής και να έχει εξαιρετικά εύγευστα αποτελέσματα. Ένα σχετικό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός της ντομάτας με ελαιόλαδο και μυρωδικά, ο οποίος διευκολύνει την κατανάλωση λαχανικών και ταυτόχρονα παρέχει ικανή ποσότητα αντιοξειδωτικών συστατικών να προσφέρει οφέλη στην υγεία.

Η επεξεργασία της ντομάτας οδηγεί σε μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων όπως σάλτσες, κονσερβοποιημένες ντομάτες, κέτσαπ και χυμοί. Από τις διεργασίες όμως αυτές δημιουργούνται μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 25% της συνολικής παραγωγής ντομάτας υπόκειται σε επεξεργασία, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι τμήματα της ντομάτας όπως ο φλοιός, οι σπόροι και μικρές ποσότητες σάρκας απομακρύνονται και απορρίπτονται. Αυτά τα παραπροϊόντα μπορούν αποτελούν συνήθως το 5-30% του κυρίως προϊόντος και κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή ή λίπασμα, δημιουργώντας έτσι σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, παρά το γεγονός ότι θα μπορούσαν να αξιοποιούνται ως *πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων* για πληθώρα λειτουργικών τροφίμων (Szabo et al., 2019).

Στα φυτοχημικά που βρίσκονται στις βιομηχανικές ντομάτες και τα υποπροϊόντα τους, ανήκουν τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες, οι τοκοφερόλες, μερικά τερπένια και στερόλες. Αυτά τα βιοδραστικά μόρια, των οποίων η ποσότητα και η ποιότητα εξαρτώνται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το γενότυπο του φυτού, είναι σχετικά ανθεκτικά στη βιομηχανική επεξεργασία, καθιστώντας έτσι τα απόβλητα επεξεργασίας τομάτας ως πηγή φυσικών βιοδραστικών μορίων (Kalogeropoulos et al., 2012).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στις φαινολικές ενώσεις της ντομάτας. Αναλυτικότερα, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αρκετά διαδεδομένη στο ευρύ κοινό, λόγω των ενδείξεων που υπάρχουν σχετικά με την πρόληψη πληθώρας ασθενειών. Όσον αφορά τα φαινολικά συστατικά των υποπροϊόντων ντομάτας, αυτά τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τα *φαινολικά οξέα* (καφεϊκό, χλωρογενικό, p-κουμαρικό, φερουλικό και ροσμαρινικό οξύ) και οι *φλαβονόλες* (κερσετίνη και ρουτίνη) (Cetkovic et al., 2012).

Η αξιοποίηση των προϊόντων και παραπροϊόντων ντομάτας στη βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνει τη χρήση τους ως πρόσθετα σε προϊόντα κρέατος, αρτοποιίας, ζυμαρικών, γαλακτοκομικών και ελαίων καθώς και σε παγωτά και μαρμελάδες, προσδίδοντας τους λειτουργικές ιδιότητες, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Szabo et al., 2018).

Παρά την πληθώρα πληροφοριών και μελετών σχετικά με τα βιοδραστικά συστατικά των προϊόντων αυτών, εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια ερωτήματα, σχετικά με τη δράση τους σε συγκεκριμένα συστήματα. Η παρούσα μελέτη θέτει ως στόχο την αξιολόγηση των βιοδραστικών αυτών συστατικών και συγκεκριμένα των φαινολικών ενώσεων της ντομάτας ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης σχηματισμού τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), μέσα από την επίδρασή τους σε *in vitro* συστήματα.

## Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 4

#### 4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Η αξιολόγηση των βιοδραστικών συστατικών της ντομάτας ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης σχηματισμού AGEs, πραγματοποιήθηκε σε ένα *in vitro* σύστημα επώασης αποτελούμενο από ένα δραστικό αμινοξύ (L-λυσίνη) και ένα αναγωγικό σάκχαρο (D-γλυκόζη), το οποίο είναι αρκετά κοινό μεταξύ των τροφίμων, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0,1M και pH=7,6), με ή χωρίς την παρουσία παρεμποδιστών. Για το παρόν υπόστρωμα υπήρξαν δύο διαφορετικές συνθήκες, καθώς επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες μεταξύ D-γλυκόζης και L-λυσίνης (10:1 και 1:1). Οι τρεις πιθανοί παρεμποδιστές οι οποίοι δοκιμάστηκαν ήταν δύο διαφορετικά δείγματα συσκευασμένων προϊόντων ντομάτας (διπλά συμπυκνωμένος χυμός, πελτές ντομάτας), καθώς και ένα πρότυπο μίγμα φαινολικών ενώσεων. Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του παράγοντα συγκέντρωση στην παρεμποδιστική ικανότητα των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις: 2,28 και 4,76  $\mu\text{M}$  για το πρότυπο μίγμα φαινολικών και 0,005 και 0,01 % w/v για τον διπλά συμπυκνωμένο χυμό και πελτέ ντομάτας. Τέλος, η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (80°C), χρόνου (1,2,3 h) και ανάδευσης (140 rpm).

Μοριακή αναλογία συστήματος επώασης (Glu : Lys)	Χρόνος αντίδρασης	Είδος παρεμποδιστή	Συγκέντρωση παρεμποδιστή
1:1	1h	Πρότυπο μίγμα φαινολικών ενώσεων	Μίγμα φαινολικών (2,38 και 4,76 $\mu\text{M}$ )
10:1	2h	Διπλά συμπυκνωμένος χυμός ντομάτας	Διπλά συμπυκνωμένος χυμός ντομάτας (0,005 και 0,01 % w/v)
	3h	Πελτές ντομάτας	Πελτές ντομάτας (0,005 και 0,01 % w/v)

Σχήμα 4.1: Πειραματικές συνθήκες οι οποίες εξετάστηκαν



Η επικείμενη ικανότητα της ντομάτας για παρεμπόδιση του σχηματισμού AGEs, όπως έχει αναφερθεί, πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη αντιοξειδωτικών που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις όπως το λυκοπένιο και τα φαινολικά συστατικά. Έτσι προκειμένου να μελετηθεί η παρεμποδιστική δράση χρησιμοποιήθηκαν οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στα κλάσματα ντομάτας, δηλαδή το καφεϊκό οξύ (0,45 mg/100 g), p-κουμαρικό οξύ (0,13 mg/100 g) και το φερουλικό οξύ (0,27 mg/100 g). Εκτός από το πρότυπο μίγμα φαινολικών (2,38 και 4,76 μM) επιλέχθηκαν και δύο προϊόντα ντομάτας, όπως ο διπλά συμπυκνωμένος χυμός και ο πελτές σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, διπλάσιες μεταξύ τους (0,005 και 0,01 % w/v) προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση τους στο σύστημα γλυκοζυλίωσης, καθώς και αν η δράση τους είναι δόσοεξαρτώμενη.

Τέλος ο χαρακτηρισμός τους επιτεύχθηκε με μετρήσεις φασματοφωτομετρίας ορατού (360 nm, 420 nm) και φθορισμομετρίας (377/445 nm) ώστε να μελετηθούν τα σχηματιζόμενα προϊόντα σε κάθε στάδιο της αντίδρασης.

## 4.2 Όργανα και αντιδραστήρια

### 4.2.1. Αντιδραστήρια

- D-Γλυκόζη (Mr= 180,16, Sigma-Aldrich, CAS: 50-99-7)
- L-Λυσίνη μονοϋδροχλωρίδιο (Mr= 182.65, Sigma-Aldrich, CAS: 657-27-2)
- PBS, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/άλατος (Bectron, Dickinson and Company)
- Καφεϊκό οξύ (Mr =180,16, Sigma Aldrich, CAS: 331-39-5)
- Φερουλικό οξύ (Mr = 194,19, Alfa Aesar, CAS: 537-98-4)
- P-κουμαρικό οξύ (Mr =164,16, Sigma Aldrich, CAS: 501-98-4)
- Αιθανόλη απόλυτη (Mr = 46,07, Sigma Aldrich, CAS: 64-17-5)
- Δύο δείγματα ντομάτας (Διπλά συμπυκνωμένος χυμός ντομάτας Pummaro, πελτές ντομάτας Pummaro)

### 4.2.2. Υλικά

- Ογκομετρικές φιάλες (25, 50, 100, 500, 1000 mL)
- Ποτήρια ζέσεως (50, 100, 250 mL)
- Σιφόνια (2, 10 mL)
- Ογκομετρικός κύλινδρος (100 mL)
- Φιαλίδια Eppendorf (1,5 mL)
- Μαγνητικός αναδευτήρας

#### 4.2.3. Όργανα

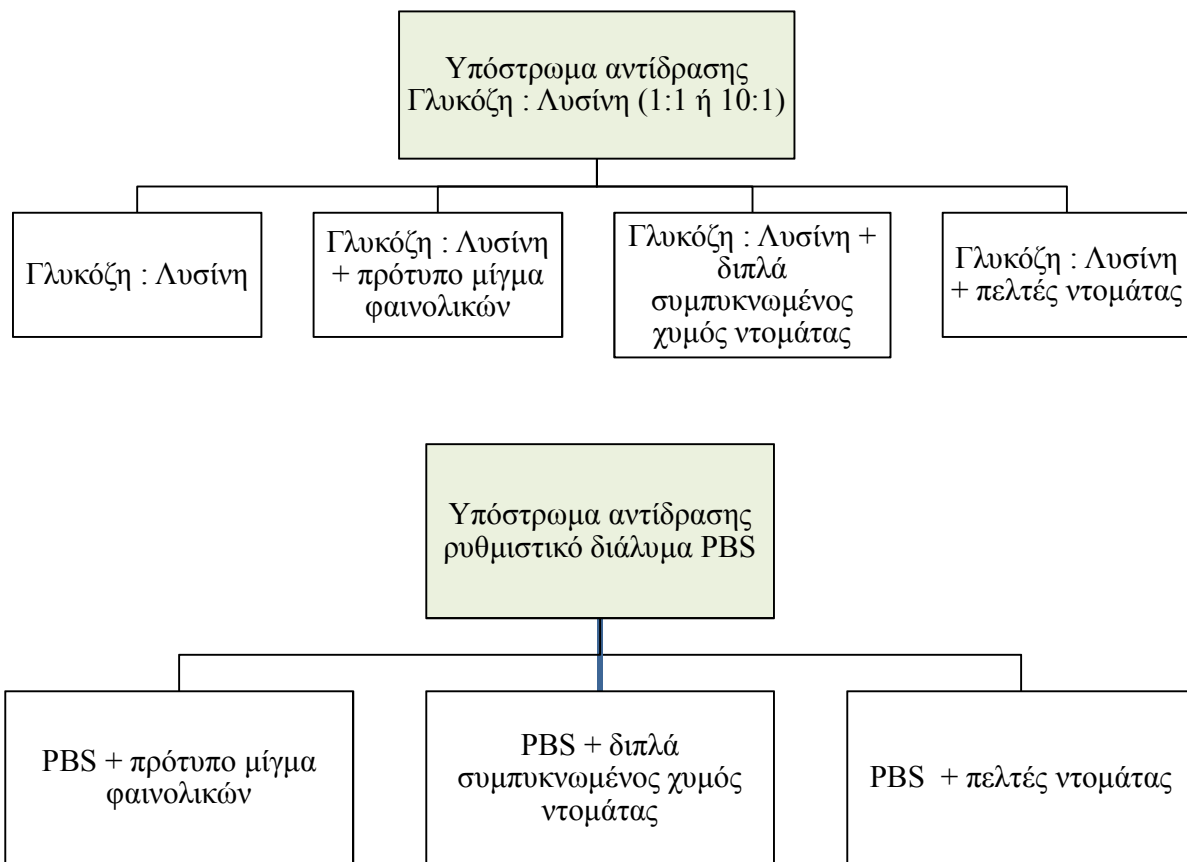
- Μηχανικό σιφόνιο (1000, 200  $\mu$ L)
- Αναλυτικός ζυγός AE20 (METTLER TOLEDO, Ohio, USA)
- Θερμαντική πλάκα (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Φυγόκεντρος K-80 (Hellenic Labware, Greece)
- Επωαστήρας ES-20/60 (BIOSAN, USA)
- Φασματοφωτόμετρο EPOCH 2 Microplate Reader (BioTek, Vermont, USA)
- Φθορισμόμετρο 2030 VICTOR X2 (Perkin-Elmer, UK)

### 4.3 Πειραματική διαδικασία

#### 4.3.1 Προετοιμασία πειραματικού μοντέλου γλυκοζυλίωσης

Ως μοντέλο γλυκοζυλίωσης, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα αποτελούμενο από D-γλυκόζη : λυσίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0,1M και pH=7,6), με ή χωρίς την παρουσία παρεμποδιστών. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μοριακές αναλογίες D-γλυκόζης : λυσίνης (1:1 και 10:1). Το διάλυμα λυσίνης σε PBS (pH = 7,6) με σταθερή συγκέντρωση 0,1M και το διάλυμα γλυκόζης σε PBS (pH = 7,6) με συγκεντρώσεις 0,1M και 1M αντίστοιχα. Το αμινοξύ, το σάκχαρο και ο παρεμποδιστής εισέρχονται στο σύστημα επώασης ταυτόχρονα. Ως παρεμποδιστές στο παρόν σύστημα λειτουργούν το διάλυμα πρότυπων φαινολικών οξέων και τα προϊόντα ντομάτας, ενώ ακόμη πραγματοποιούνται αντιδράσεις ελέγχου (control) παρουσία μόνο D-γλυκόζης και λυσίνης.

Συνολικά για κάθε βιολογική επανάληψη προετοιμάστηκαν 10 φιαλίδια Eppendorf, εκ των οποίων τα 9 επώαστηκαν και το 1 τοποθετήθηκε απευθείας στην κατάψυξη (χρονικό σημείο  $t=0$ ). Κάθε πειραματική συνθήκη πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε γραμμομοριακή αναλογία (1:1 και 10:1) και για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις παρεμποδιστών. Πιο συγκεκριμένα τα συστήματα επώασης που εφαρμόστηκαν στο πείραμα παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2: Συστήματα επώασης που εφαρμόστηκαν

Η επώαση των παραπάνω διαλυμάτων – συστημάτων πραγματοποιείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση και σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες υποστρώματος, συγκεντρώσεις παρεμποδιστών και χρόνο. Πιο αναλυτικά, 1 mL από το εκάστοτε σύστημα τοποθετείται σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5 mL και τα δείγματα θερμαίνονται στους 80°C, σε μια σταθερή στα 140 rpm ταχύτητα περιστροφής. Η συνολική διάρκεια της επώασης ανέρχεται στις 3 ώρες (180 min) και ανά χρονικό διάστημα μίας ώρας, δηλαδή στα χρονικά σημεία (1h, 2h, 3h) αφαιρούνται 3 δείγματα από κάθε πειραματική συνθήκη τα οποία μεταφέρονται απευθείας στην κατάψυξη (-80°C), έως ότου αναλυθούν, ώστε να σταματήσει η πραγματοποίηση της αντίδρασης. Όλες οι πειραματικές συνθήκες εκτελέστηκαν εις τριπλούν. Τα δείγματα τα οποία δεν επώαστηκαν (t=0) λειτούργησαν ως control για κάθε συνθήκη.

#### 4.4 Ανάλυση των δειγμάτων

Προτού πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις των δειγμάτων, είναι απαραίτητη η απόψυξή τους καθώς και η φυγοκέντρησή τους (5 min, 13000 rpm) προκειμένου να διαχωριστούν τα στερεά σωματίδια που μπορεί να προέρχονται από τα δείγματα ντομάτας και τα οποία ενδέχεται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα και το σήμα που θα ληφθεί.

##### 4.4.1 Μέτρηση φθορισμού AGEs

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος, είναι μη ειδική καθώς μπορεί να προσδιορίσει το σύνολο των ενώσεων που εμφανίζουν φθορισμό κατά την ανάλυση και επομένως μπορεί να παρέχει πληροφορία για τα προϊόντα που σχηματίζονται σε κάθε στάδιο της αντίδρασης (Wei, et al., 2018).

Στο παρόν πείραμα, ο σχηματισμός των AGEs εκτιμήθηκε με τη μέθοδο του χαρακτηριστικού φθορισμού σε μήκος κύματος διέγερσης 377 nm και εκπομπής στα 445 nm. Από κάθε δείγμα, 200  $\mu$ L τοποθετήθηκαν με αυτόματη πιπέτα σε ένα μικροπλακίδιο 96 κοιλωμάτων για τον σκοπό της μέτρησης. Η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού του δείγματος μετρήθηκε έναντι της αντίστοιχης του δείγματος ελέγχου (control), χρησιμοποιώντας ένα φθορισμόμετρο 2030 VICTOR X2 (Perkin-Elmer, UK).

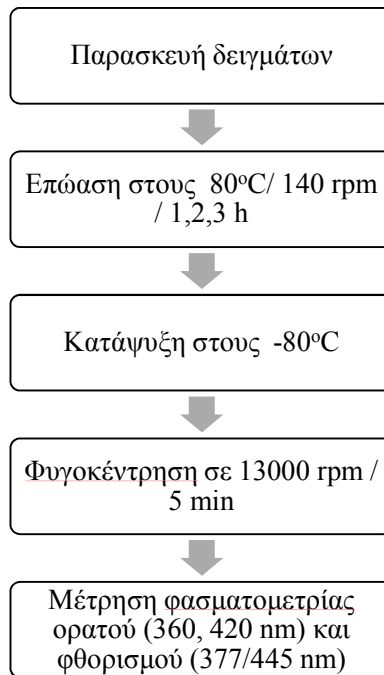
$$\text{Arbitrary Units (A.U.)} = \text{Fluorescence Intensity}_{\text{sample}} - \text{Fluorescence Intensity}_{\text{control}}$$

##### 4.4.2 Φασματομετρία ορατού για προσδιορισμό AGEs

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης προϊόντων της αντίδρασης Maillard, χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία ορατού, σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (360 και 420 nm). Τα δύο μήκη κύματος αυτά επιλέχθηκαν προκειμένου να μετρηθούν προϊόντα σε διαφορετικά στάδια της αντίδρασης Maillard. Πιο συγκεκριμένα, ενδιάμεσα προϊόντα όπως ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις, δικαρβονύλια, δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και φουράνια τα οποία προκύπτουν από αφυδάτωση, οξείδωση και θραυσματοποίηση των αρχικών προϊόντων, μετρήθηκαν στα 360nm. Αντίστοιχα, στα 420nm προσδιορίστηκαν τα τελικά προϊόντα της μη ενζυματικής αμαύρωσης, όπως προϊόντα διασταυρωμένων δεσμών (cross-linked), αρωματικές ενώσεις και έγχρωμα πολυμερή, με πιο χαρακτηριστικές τις μελανοειδίνες.

Τα δείγματα βρίσκονταν εντός εύρους γραμμικότητας του νόμο Beer – Law, επομένως δεν υπήρξε η ανάγκη για τροποποίηση της συγκέντρωσής τους. Έτσι ομοίως με τη φθορισμομετρία, 200  $\mu$ L από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν με αυτόματη πιπέτα σε ένα μικροπλακίδιο 96 κοιλωμάτων για τον σκοπό της μέτρησης. Το μήκος κύματος είναι σταθερό για κάθε μέτρηση στα 360 ή 420 nm. Το σήμα απορρόφησης για κάθε δείγμα προκύπτει από την αφαίρεση του αντίστοιχου δείγματος με PBS (control).

$$ABS_{\text{final}} = ABS_{\text{sample}} - ABS_{\text{control}}$$



Σχήμα 4.2: Διάγραμμα ροής πειραματικού σχεδιασμού

#### 4.5 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο γραφικό περιβάλλον του λογισμικού Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc.). Τα πειραματικά δεδομένα εκφράστηκαν ως Μέση Τιμή ± Τυπική απόκλιση (Mean ± Standard Deviation). Οι στατιστικές αποκλίσεις προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης (Multifactor ANOVA) καθώς και μέσω των δοκιμασιών πολλαπλού εύρους (Multiple Range Tests), όπου ήταν απαραίτητο. Διαφορές μεταξύ μέσων σε επίπεδο  $P < 0,05$  θεωρήθηκαν ως σημαντικές. Τέλος, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης του χρόνου, του εκάστοτε παρεμποδιστή και της συγκέντρωσης του παρεμποδιστή στην εξέλιξη της αντίδρασης Maillard.

## Κεφάλαιο 5 - Αποτελέσματα

### 5.1 Παρακολούθηση επίδρασης παρεμποδιστών συστήματος μέσω φθορισμού

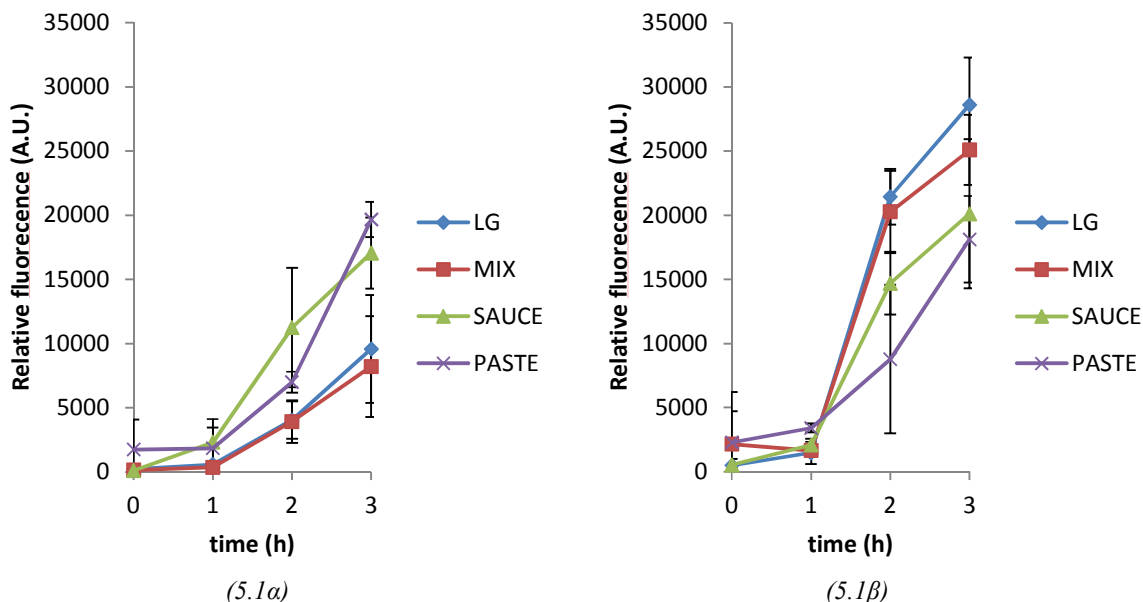
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα της έντασης φθορισμού, η οποία εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units), ως προς τον χρόνο επώασης του συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των τυπικών τους αποκλίσεων. Η πειραματική διαδικασία διαχωρίστηκε σε δύο σκέλη, καθώς χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις παρεμποδιστών, η μία διπλάσια της άλλης. Κάθε διάγραμμα απεικονίζει μια γραμμομοριακή αναλογία και μια συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Στο σχήμα 5.1α παρουσιάζεται η ένταση φθορισμού του συστήματος Γλυκόζης : Λυσίνης (1:1) χωρίς ή με την παρουσία κάποιου πιθανού παρεμποδιστή σχηματισμού προϊόντων AGEs κατά την αντίδραση Maillard, στους 80°C. Οι πιθανοί αυτοί παρεμποδιστές είναι ένα μίγμα φαινολικών συστατικών (καφεϊκό, φερουλικό, p-κουμαρικό οξύ), ένας διπλά συμπυκνωμένος χυμός ντομάτας (sauce) καθώς και ένας πελτές ντομάτας (paste).

Παρατηρείται και στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες μια σταδιακή αύξηση του σήματος φθορισμού με το πέρασμα του χρόνου επώασης. Επιπλέον, άξιο προσοχής είναι το αρκετά υψηλότερο σήμα που παράγεται από τα δείγματα που περιέχουν προϊόντα ντομάτας ως παρεμποδιστές (sauce, paste), ιδίως μετά το πέρας της πρώτης ώρας επώασης. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα καροτενοειδή, όπως το λυκοπένιο, το β-καροτένιο και η λουτεΐνη τα οποία βρίσκονται στη ντομάτα και εμφανίζουν φθορισμό στο εύρος των 400 – 600 nm (Gillbro et. al., 1989). Συγκεκριμένα, το λυκοπένιο αποκτά υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα κατά τη διάρκεια της θέρμανσης καθώς αποσπάται από το πλέγμα φυτικών ιστών του τροφίμου στο οποίο είναι δεσμευμένο και γι' αυτό το λόγο εμφανίζει υψηλότερο σήμα φθορισμού με την πάροδο του χρόνου και όχι εξ' αρχής. Επομένως, οι συγκεκριμένες ενώσεις παράγουν μεγαλύτερο σήμα από εκείνο που προκύπτει από την αντίδραση Maillard και επομένως δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για την ικανότητα ανάλυσης που έχουν στη συγκεκριμένη γραμμομοριακή αναλογία. Από την άλλη πλευρά, παρουσιάζεται μια μικρή μείωση του σήματος στα δείγματα που περιέχουν το πρότυπο μίγμα φαινολικών (Mix), η οποία είναι εμφανής μετά το πέρας της δεύτερης ώρας επώασης.

Στο σχήμα 5.1β που παρουσιάζει την ένταση φθορισμού για το σύστημα Γλυκόζης : Λυσίνης (10:1), παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στο σήμα του control (LG) συγκριτικά με εκείνο στη γραμμομοριακή αναλογία 1:1 (σχήμα 5.1α). Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι η αντίδραση γλυκοζυλίωσης πραγματοποιείται σε αρκετά μεγαλύτερο βαθμό στη συγκεκριμένη αναλογία, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του αναγωγικού σακχάρου στο υπόστρωμα. Όσον αναφορά τα προστιθέμενα δείγματα, παρατηρείται παρεμποδιστική δράση, κυρίως μετά το πέρασμα 2 ωρών, και στις τρεις περιπτώσεις, με τον χρόνο επώασης να έχει επίδραση στο σήμα που λαμβάνεται ( $p < 0,05$ ). Σημαντικότερα επίπεδα ανάλυσης φαίνεται να έχουν τα προϊόντα

ντομάτας (sauce, paste), συγκριτικά με το μίγμα φαινολικών, το σήμα των οποίων κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με εκείνα στην αναλογία 1:1.

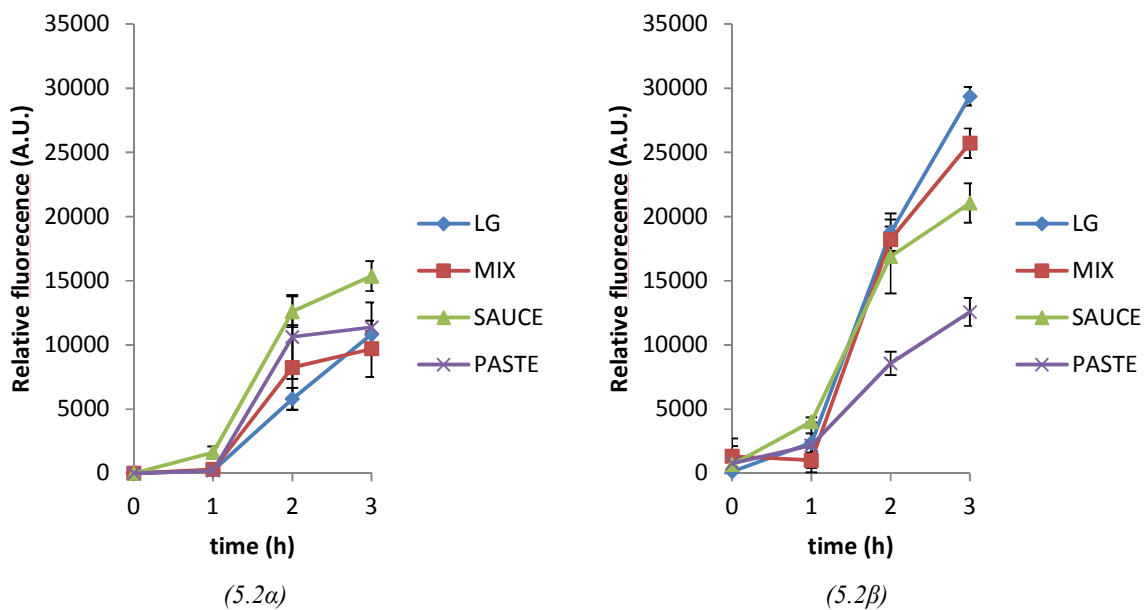


Σχήμα 5.1: Διαγράμματα έντασης φθορισμού και επίδρασης παρεμποδιστών για συγκεντρώσεις 2,38  $\mu\text{M}$  μίγματος φαινολικών (MIX) / 0,005% w/v πελτέ (PASTE) και χυμού ντομάτας (SAUCE), σε γραμμομοριακές αναλογίες Λυσίνης Γλυκόζης (LG) 1:1 και 10:1 (υποσχήματα 5.1α και 5.1β αντίστοιχα).

Το σχήμα 5.2α απεικονίζει την ένταση φθορισμού του συστήματος Γλυκόζης : Λυσίνης (1:1) αυτή τη φορά όμως στις διπλάσιες συγκεντρώσεις (4,76  $\mu\text{M}$  Μίγματος Φαινολικών / 0,01 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας). Όπως και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (σχήμα 5.1), έτσι και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται το ίδιο μοτίβο στο οποίο τα δείγματα χυμού και πελτέ έχουν υψηλότερο σήμα κατά την εξέλιξη της επώασης. Επίσης το σήμα που προκύπτει από το δείγμα ελέγχου (LG) καθώς και το μίγμα φαινολικών βρίσκεται χαμηλότερα, λόγω μη πραγματοποίησης της αντίδρασης σε σημαντικό βαθμό.

Στο σχήμα 5.2β (10:1 γραμμομοριακή αναλογία, συγκεντρώσεις 4,76  $\mu\text{M}$  Μίγματος Φαινολικών / 0,01 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας) παρατηρείται σημαντική αύξηση του σήματος ελέγχου (LG) καθώς και του μίγματος φαινολικών συστατικών στο διάστημα μεταξύ της πρώτης και τρίτης ώρας επώασης. Ο πελτές ντομάτας εμφανίζει το χαμηλότερο σήμα και συνεπώς την μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση από τους τρεις πιθανούς παρεμποδιστές, με τον συμπυκνωμένο χυμό ντομάτας να ακολουθεί και το μίγμα φαινολικών να εμφανίζει την μικρότερη δράση. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ( $p < 0,05$ ) επιβεβαιώνουν λοιπόν ότι ο παράγοντας παρεμποδιστής παρουσιάζει στατιστικά σημαντική επίδραση στο σήμα που λαμβάνεται και άρα στην ικανότητα ανάσχεσης.

Σε κάθε περίπτωση, συγκριτικά με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις οποίες εκτελέστηκε το πείραμα (2,38  $\mu\text{M}$  Μίγματος Φαινολικών / 0,005 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας), δεν φαίνεται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των σημάτων των τριών πιθανών παρεμποδιστών (mix, sauce, paste). Συνεπώς, η παρεμποδιστική δράση σχηματισμού προϊόντων AGEs στις δεδομένες συγκεντρώσεις δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως δόσοεξαρτώμενη (dose-response). Όπως αποδεικνύεται και από την ανάλυση δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση ( $p = 0,8988$ ) του παράγοντα συγκέντρωση στην παρεμποδιστική ικανότητα των δειγμάτων.



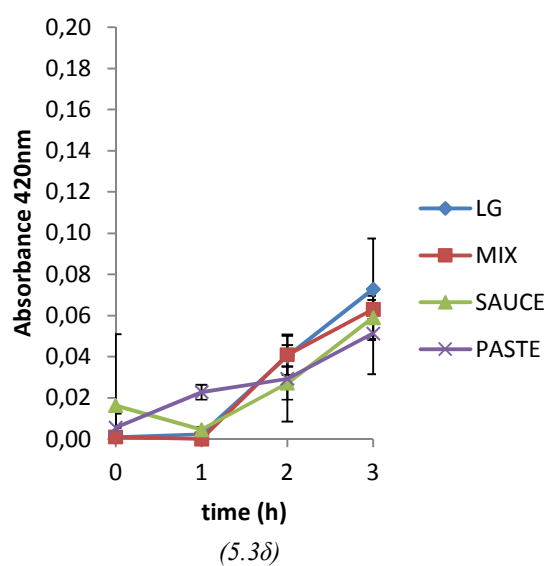
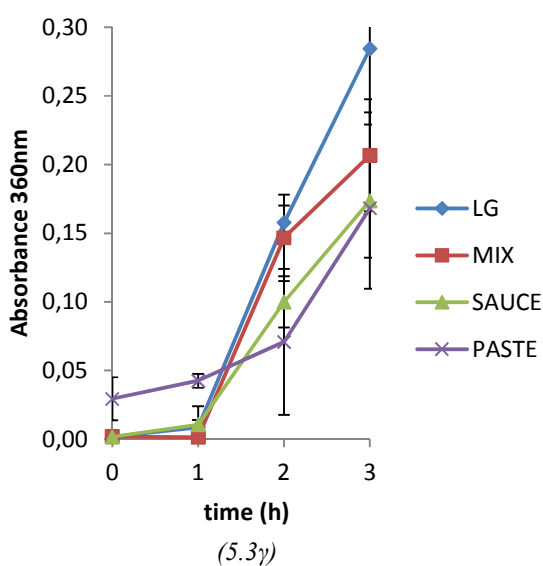
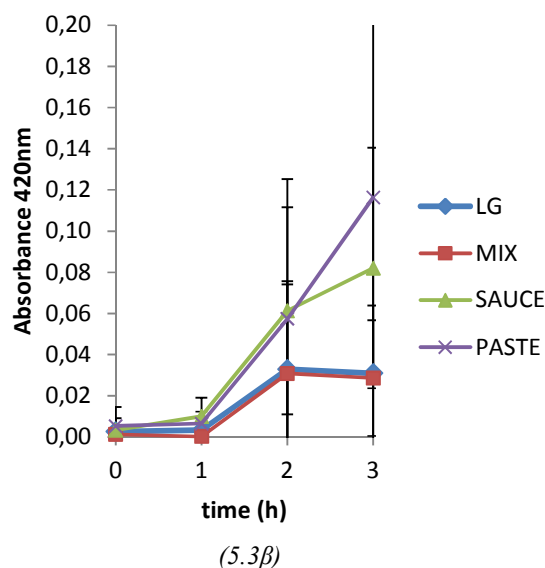
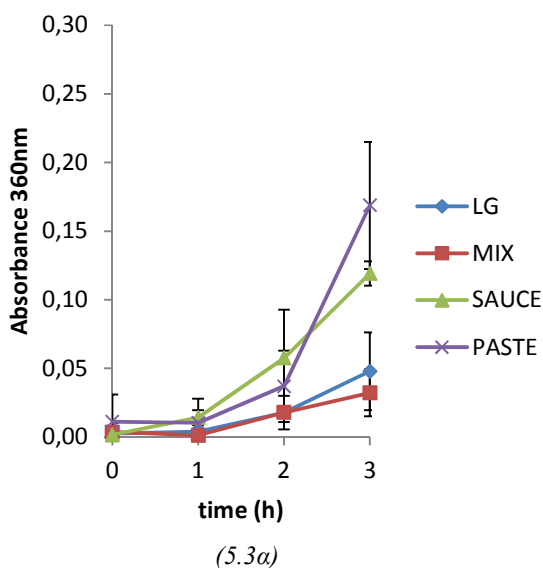
Σχήμα 5.2: Διαγράμματα έντασης φθορισμού και επίδρασης παρεμποδιστών για συγκεντρώσεις 4,76  $\mu\text{M}$  μίγματος φαινολικών (MIX) / 0,01% w/v πελτέ (PASTE) και χυμού ντομάτας (SAUCE), σε γραμμομοριακές αναλογίες Λυσίνης Γλυκόζης (LG) 1:1 και 10:1 (υποσχήματα 5.2α και 5.2β αντίστοιχα).



## 5.2 Παρακολούθηση επίδρασης παρεμποδιστών συστήματος μέσω φασματομετρίας ορατού

Οι μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στα 360 και 420 nm προκειμένου να μετρηθούν ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της αντίδρασης όπως τα AGEs και τα έγχρωμα πολυμερή, με πιο διαδεδομένες τις μελανοειδίνες. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η απορρόφηση στο εκάστοτε μήκος κύματος ως προς τον χρόνο επώασης, μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις. Κάθε διάγραμμα απεικονίζει μια γραμμομοριακή αναλογία, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και μια συγκέντρωση παρεμποδιστών.

Στο σχήμα 5.3 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 360 και 420 nm με (mix, sauce, paste) ή χωρίς την παρουσία πιθανών παρεμποδιστών (LG). Οι συγκεντρώσεις τους είναι 2,38  $\mu\text{M}$  για το πρότυπο μίγμα φαινολικών και 0,005 % w/v για τον πελτέ και χυμό ντομάτας. Από τα δεδομένα απορρόφησης των διαγραμμάτων παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του σήματος του control (LG) και του προτύπου μίγματος φαινολικών (mix), μετά το πέρας της πρώτης ώρας επώασης, στο molar ratio 10:1 τόσο στα 360 όσο και στα 420 nm. Αυτή η έντονη αύξηση υποδεικνύει ενδεχομένως την παραγωγή AGEs υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, στη μοριακή αναλογία 1:1 η απορρόφηση των αντίστοιχων δειγμάτων είναι πολύ χαμηλότερη και το σήμα των προϊόντων ντομάτας (sauce, paste) αρκετά μεγαλύτερο, πιθανώς λόγω ορισμένων χρωμοφόρων ενώσεων της ντομάτας που απορροφούν σε κοντινά μήκη κύματος, όπως το λυκοπένιο. Τέλος, όσον αφορά τα δείγματα προϊόντων ντομάτας, στη μοριακή αναλογία 10:1 γίνεται εμφανής η ικανότητα παρεμπόδισης της αντίδρασης καθώς το σήμα τους βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από το δείγμα ελέγχου και είναι ορατή μετά το χρονικό σημείο της πρώτης ώρας επώασης.

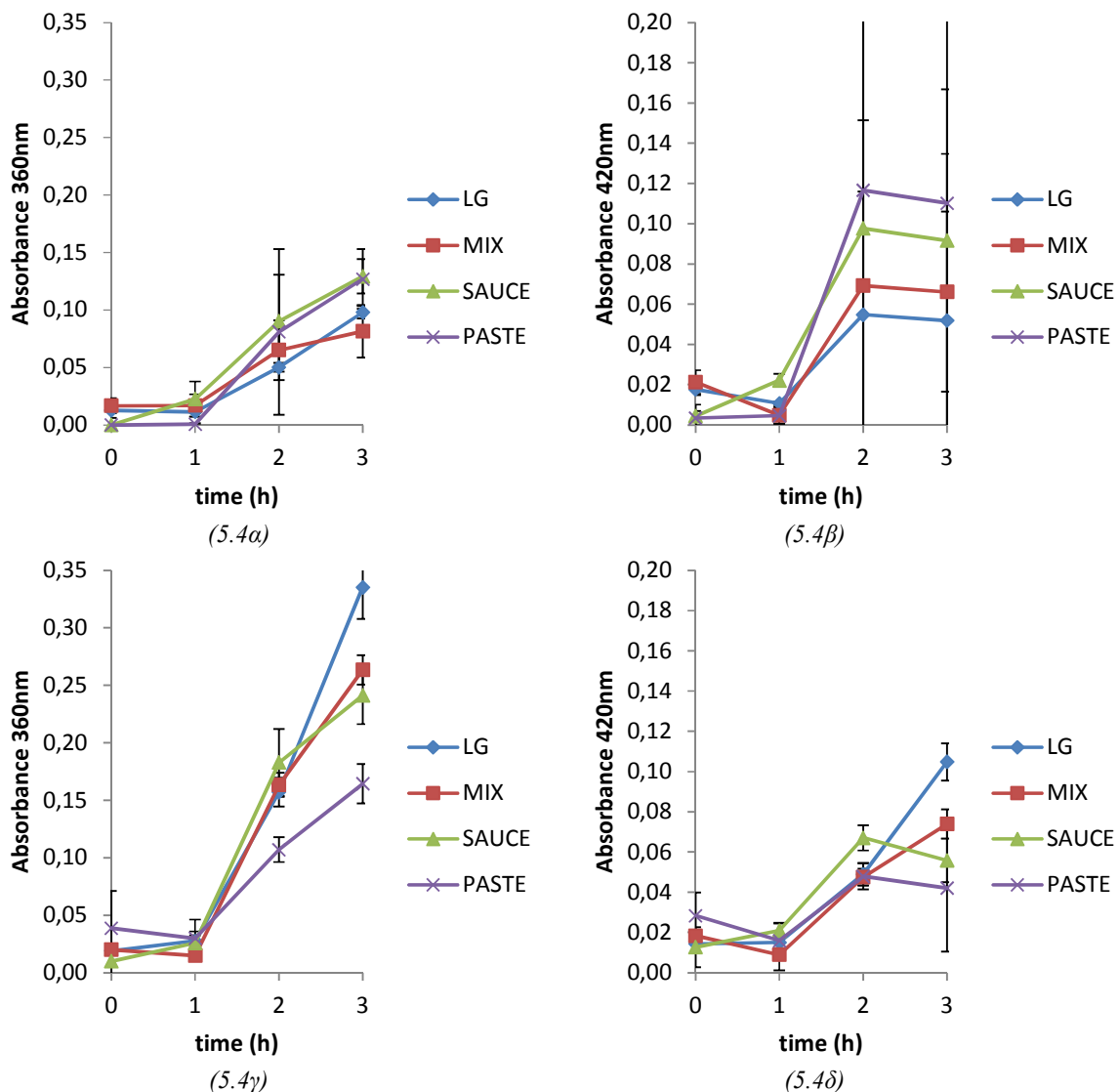


Σχήμα 5.3: Διαγράμματα απορρόφησης φασματομετρίας ορατού (360 και 420nm) και επίδρασης παρεμποδιστών, στους 80°C για συγκεντρώσεις 2,38 μM μίγματος φαινολικών (MIX) / 0,005% w/v πελτέ (PASTE) και χυμού ντομάτας (SAUCE), σε γραμμομοριακές αναλογίες Λυσίνης Γλυκόζης (LG) 1:1 και 10:1. Αναλυτικά τα υποσχήματα: (5.3α): 1:1 στα 360nm, (5.3β): 1:1 στα 420nm, (5.3γ): 10:1 στα 360nm και (5.3δ): 10:1 στα 420nm.

Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 360 και 420 nm με (mix, sauce, paste) ή χωρίς την παρουσία πιθανών παρεμποδιστών (LG). Οι συγκεντρώσεις τους είναι 4,76 μM για το Μίγμα Φαινολικών και 0,01 % w/v για τον πελτέ και χυμό ντομάτας. Όπως και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις πιθανών παρεμποδιστών, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο στις απορροφήσεις των δειγμάτων με το διάλυμα ελέγχου και το μίγμα φαινολικών να έχει σταθερά μικρότερη απορρόφηση από τα δείγματα ντομάτας στη μοριακή αναλογία 1:1 (360 και 420 nm).

Από την άλλη πλευρά, στην 10:1 η απορρόφησή τους αυξάνεται σημαντικά και γίνεται ευκολότερα αντιληπτή η παρεμποδιστική δράση των δειγμάτων τα οποία κατατάσσονται με αυξανόμενη σειρά δραστηριότητας ως εξής: πρότυπο μίγμα φαινολικών συστατικών, συμπυκνωμένος χυμός ντομάτας και πελτές ντομάτας, με την επίδραση τους να χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ).

Ακόμη, συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (σχήμα 5.3 και 5.4), δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα η ποσότητα που χρησιμοποιείται στο εκάστοτε σύστημα με την αναμενόμενη παρεμποδιστική δράση ( $p = 0,8794$ ), καθώς τα σήματα απορροφήσεων και στις δύο περιπτώσεις κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα. Επομένως δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως δοσοεξαρτώμενη (dose – response).



Σχήμα 5.4: Διαγράμματα απορρόφησης φασματομετρίας ορατού (360 και 420nm) και επίδρασης παρεμποδιστών, στους 80°C για συγκεντρώσεις 4,76 μM μίγματος φαινολικών (MIX) / 0,01% w/v πελτέ (PASTE) και χυμού ντομάτας

(SAUCE), σε γραμμομοριακές αναλογίες Λυσίνης Γλυκόζης (LG) 1:1 και 10:1. Αναλυτικά τα υποσχήματα: (5.4α): 1:1 στα 360nm, (5.4β): 1:1 στα 420nm, (5.4γ): 10:1 στα 360nm και (5.4δ): 10:1 στα 420nm.

## Κεφάλαιο 6

### 6.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Οι ντομάτες περιέχουν αρκετά βιοδραστικά συστατικά όπως τα φαινολικά οξέα, με τα οποία ασχολείται αυτή η μελέτη και τα οποία παρέχουν πληθώρα από οφέλη στην υγεία καθώς συνδέονται με τη μείωση κινδύνου εμφάνισης συγκεκριμένων νόσων. Αρκετές από αυτές τις παθήσεις του πληθυσμού είναι χρόνιες και σε αυτές συγκαταλέγονται ο διαβήτης και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τα οποία μπορούν να προκύψουν από εξωγενείς παράγοντες όπως η διατροφή. Σε αυτό το πλαίσιο, η συσσώρευση τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) μέσω των τροφών που λαμβάνονται, ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά τον οργανισμό, οπότε έχει ιδιαίτερη αξία η μείωση πρόσληψής τους και η παρεμπόδιση σχηματισμού τους όποτε είναι εφικτό.

Τα AGEs προκύπτουν από τα ενδιάμεσα προϊόντα διαφόρων σταδίων της αντίδρασης Maillard, η οποία αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες αντιδράσεις στα επεξεργασμένα τρόφιμα και ιδίως κατά το μαγείρεμα, όπου αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες είναι ευνοϊκές για αυτήν. Στη συγκεκριμένη μελέτη δόθηκε έμφαση στην πορεία της αντίδρασης σχηματισμού AGEs υπό διαφορετικές συνθήκες όπως το είδος και η συγκέντρωση του πιθανού παρεμποδιστή, η μοριακή αναλογία του υποστρώματος της αντίδρασης (αναγωγικό σάκχαρο, αμινοξύ) και ο χρόνος επώασης.

#### 6.1.1 Δραστικότητα παρεμποδιστών

Η προσθήκη του πρότυπου μίγματος φαινολικών συστατικών στο σύστημα D-γλυκόζης : λυσίνης φαίνεται να έχει μια μικρή σχετικά ικανότητα παρεμπόδισης σχηματισμού προϊόντων γλυκοζυλίωσης τα οποία απορροφούν τόσο κατά τη φασματομετρία ορατού (360 και 420 nm), όσο και κατά τη φθορισμομετρία. Σε κάθε περίπτωση, η δράση του είναι αισθητή κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 2 και 3 ωρών. Ωστόσο, τα προϊόντα ντομάτας που χρησιμοποιήθηκαν όπως ο συμπυκνωμένος χυμός και ο πελτές εμφάνισαν εντονότερη παρεμποδιστική δράση, με τον πελτέ να δίνει το χαμηλότερο σήμα φθορίζοντων προϊόντων. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελέσει το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα ντομάτας περιέχουν μεγαλύτερη ποικιλία βιοδραστικών συστατικών, πέρα από τα τρία φαινολικά συστατικά τα οποία βρίσκονται στο μίγμα. Αυτά είναι τα καροτενοειδή, το ασκορβικό οξύ, το λυκοπένιο, οι τοκοφερόλες και οι ανθοκυανίνες τα οποία διακρίνονται για την αντιοξειδωτική τους δράση και σε συνδυασμό με τα

ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα και λιπαρά οξέα που βρίσκονται στη μήτρα τροφίμου (food matrix), μπορούν να δράσουν μεμονωμένα ή και συνεργιστικά και ενδεχομένως να συμβάλουν με θετικό τρόπο στην παρεμπόδιση σχηματισμού ανεπιθύμητων προϊόντων γλυκοζυλίωσης και κατά συνέπεια στην υγεία του οργανισμού (Ali et al., 2020).

### *6.1.2 Σήμα – είδος σχηματιζόμενων προϊόντων*

Αναφορικά με την κατηγορία και το στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα προϊόντα γλυκοζυλίωσης που σχηματίζονται κατά την αντίδραση, μια γενική εικόνα μπορεί να ληφθεί μέσω της μεθόδου φασματομετρίας ορατού, η οποία τα προσδιορίζει σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Το υψηλότερο σήμα που παρατηρείται στα 360 nm, συγκριτικά με τα 420 nm, κατά την φασματομετρία ορατού, υποδεικνύει την παρουσία περισσότερων ενδιάμεσων προϊόντων όπως οι ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις, δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και φουράνια που προκύπτουν κατά την αφυδάτωση, οξειδωση και θραυσματοποίηση αρχικών προϊόντων. Αντιθέτως, το χαμηλό σήμα στα 420 nm δείχνει μια μικρότερη ποσότητα τελικών προϊόντων της μη ενζυματικής αμαύρωσης όπως τα προϊόντα διασταυρωμένων δεσμών (cross-linked), αρωματικές ενώσεις και έγχρωμα πολυμερή. Ως μια πιθανή εξήγηση, μπορεί να θεωρηθεί η παρεμπόδιση του σχηματισμού AGEs, από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, σε ενδιάμεσα στάδια της αντίδρασης και ως εκ τούτου να μην προχωράει ο σχηματισμός τελικών προϊόντων.

### *6.1.3 Μοριακή αναλογία*

Η μοριακή αναλογία των αντιδρώντων του υποστρώματος (λυσίνη, D-γλυκόζη) φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον βαθμό που πραγματοποιείται η αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη θέρμανση στην ίδια θερμοκρασία των 80°C, η μοριακή αναλογία (10:1) μεταξύ του αναγωγικού σακχάρου και του αμινοξέος έδινε υψηλότερο σήμα και στις δύο μετρήσεις. Η αντίδραση επομένως ευνοείται και πραγματοποιείται σε σημαντικότερο βαθμό, συγκριτικά με τη μοριακή αναλογία 1:1, παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης αναγωγικού σακχάρου ως υπόστρωμα.

Ταυτόχρονα, το σήμα απορρόφησης από τα δείγματα προϊόντων ντομάτας παρέμεινε συγκριτικά σταθερό και στις δύο γραμμομοριακές αναλογίες, με το δείγμα ελέγχου και το μίγμα φαινολικών να εναλλάσσονται υψηλότερα ή χαμηλότερα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αιτιολογηθεί από την παρουσία ενώσεων που προσδίδουν το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στην ντομάτα. Καροτενοειδή όπως το α-καροτένιο και η λουτεΐνη παρουσιάζουν απορρόφηση στα 420 και 444 nm, ενώ το λυκοπένιο, το οποίο συμβάλει περισσότερο στο χρώμα απορροφά στα 470 και 500 nm (Suica-Bunghez et al., 2011). Επομένως, δεν μπορεί να ειπωθεί ότι το σήμα είναι τόσο ισχυρό στα 360 και 420 nm ώστε να μην είναι ορατή η παρεμποδιστική δράση των δειγμάτων.

#### 6.1.4 Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών

Οι διπλάσιες συγκεντρώσεις παρεμποδιστών δεν φάνηκαν να παρουσιάζουν ισχυρότερη δραστηριότητα, καθώς το σήμα που λήφθηκε και στις δύο συγκεντρώσεις κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα. Κάτι τέτοιο έρχεται να απορρίψει τον ισχυρισμό ότι ενδέχεται να είναι δοσοεξαρτώμενη η παρεμποδιστική ικανότητα των δειγμάτων, τουλάχιστον στις δεδομένες συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (μοριακή αναλογία 10:1) οδηγούν σε πραγματοποίηση της αντίδρασης σε μεγαλύτερο βαθμό και πιο ορατής παρεμποδιστικής δράσης των αντιδρώντων. Τα φαινορικά συστατικά δείχνουν να έχουν τη χαμηλότερη παρεμποδιστική ικανότητα από τους τρεις πιθανούς παρεμποδιστές, καθώς η δράση των προϊόντων ντομάτας πιθανώς να ενισχύεται από τα υπόλοιπα βιοδραστικά συστατικά όπως για παράδειγμα τα καροτενοειδή που περιέχονται σε αυτά. Τέλος, οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των παρεμποδιστών που χρησιμοποιήθηκαν, δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον σχηματισμό AGEs στον παρόν σύστημα και επομένως η δράση τους δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως δοσοεξαρτώμενη.

Μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα μπορεί να αποκτηθεί σε μελλοντικές μελέτες με περισσότερες και υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης κατά την αντίδραση Maillard, οι οποίες να προσομοιάζουν σε καλύτερο βαθμό τις συνθήκες μαγειρέματος του τροφίμου, ώστε να σχηματιστεί ένα πληρέστερο προφίλ για την αντίδραση σχηματισμού AGEs και την παρεμπόδιση σχηματισμού τους σε ένα ρεαλιστικό σύστημα τροφίμων. Ακόμη, ιδιαίτερα χρήσιμο θα ήταν να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση που έχει η συγκέντρωση ενός παρεμποδιστή της αντίδρασης. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την πραγματοποίηση αντίστοιχων επώασεων για μεγαλύτερο πλήθος συγκεντρώσεων όπως η πενταπλάσια, δεκαπλάσια και εικοσαπλάσια της αρχικής. Επιπροσθέτως, η χρήση μιας πιο επιλεκτικής μεθόδου όπως η HPLC για τον προσδιορισμό της CML στα δείγματα που έχουν επωαστεί, θα προσέδιδε περισσότερες πληροφορίες πάνω στην παρεμποδιστική δράση των επικείμενων βιοδραστικών ενώσεων μέσα από ένα πιο λεπτομερές κινητικό μοντέλο για την αντίδραση.

## 6.2 Συμπεράσματα

Η αντίδραση Maillard, η οποία είναι μια από τις πιο διαδεδομένες αντιδράσεις κατά τη θερμική επεξεργασία τροφίμων, εκτός από τα οφέλη που προσφέρει στο τελικό προϊόν όσον αφορά τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, είναι υπεύθυνη και για το σχηματισμό μη επιθυμητών τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs). Η συσσώρευση των AGEs στον οργανισμό έχει ενοχοποιηθεί για πληθώρα χρόνιων ασθενειών, επομένως η μείωση της πρόσληψής τους ή η παρεμπόδιση σχηματισμού τους σε ένα σύστημα τροφίμων έχει καταστεί ιδιαίτερα σημαντική. Στο πλαίσιο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη, αξιολογήθηκαν οι συνθήκες σχηματισμού των

προϊόντων αυτών, καθώς και η ενδεχόμενη παρεμποδιστική ικανότητα κάποιων σκευασμάτων ντομάτας, εξαιτίας των βιοδραστικών συστατικών που περιέχουν.

Έπειτα από επώαση σε σύστημα γλυκοζυλίωσης *in vitro*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο χρόνος που πραγματοποιείται η αντίδραση επηρεάζει το σχηματισμό προϊόντων, δίνοντας στατιστικά υψηλότερα αποτελέσματα με την πάροδό του ( $p < 0,05$ ). Η μοριακή αναλογία έδειξε και εκείνη να έχει επίδραση στην αντίδραση, με την αναλογία 10:1 να δίνει υψηλότερο σήμα και συνεπώς να φανερώνει ενδεχομένως την παρουσία ενός αρκετά σύνθετου μηχανισμού σχηματισμού τελικών προϊόντων, ο οποίος να μη βασίζεται απαραίτητα στη στοιχειομετρία, τουλάχιστον στην παρούσα θερμοκρασία των 80°C. Η παρουσία και συγκεκριμένα το είδος των παρεμποδιστών εμφάνισε επίσης επίδραση στην αντίδραση σχηματισμού AGEs, με τα αποτελέσματα να δίνουν στατιστικά χαμηλότερο σήμα στη φασματομετρία ορατού όσο και στη φθορισμομετρία, στα δείγματα που περιέχονταν ( $p < 0,05$ ). Ο πελτές ντομάτας έδειξε την ισχυρότερη παρεμποδιστική δράση, με τον συμπυκνωμένο χυμό ντομάτας και το πρότυπο μίγμα φαινολικών οξέων να ακολουθούν. Τέλος, η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος παρεμποδιστή δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση στο σχηματισμό AGEs ( $p = 0,8988$ ).

Από τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνουμε ότι η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει μια βάση για περαιτέρω μελέτες στο μέλλον οι οποίες θα εξετάζουν διεξοδικότερα την αντιγλυκοζυλιωτική δράση προϊόντων ντομάτας. Περισσότερες θερμοκρασίες επώασης οι οποίες να προσομοιάζουν συνθήκες μαγειρέματος, μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων παρεμποδιστή καθώς και πιο επιλεκτικές μέθοδοι ανάλυσης όπως η HPLC για την καρβόξυμεθυλο λυσίνη (CML), θα μπορούσαν να δώσουν ένα πιο ολοκληρωμένο κινητικό μοντέλο της αντίδρασης και περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με την παρεμποδιστική ικανότητα της ντομάτας και των βιοδραστικών συστατικών της.

## **Βιβλιογραφία**

- Al Jitan, S., Alkhoori, S. and Yousef, L., 2018. Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. *Studies in Natural Products Chemistry*, pp.389-417.
- Ali, M., Sina, A., Khandker, S., Neesa, L., Tanvir, E., Kabir, A., Khalil, M. and Gan, S., 2020. Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Tomatoes and Their Impact on Human Health and Disease: A Review. *Foods*, 10(1), p.45.
- Błaszczak, W., Jeż, M. and Szwengiel, A., 2020. Polyphenols and inhibitory effects of crude and purified extracts from tomato varieties on the formation of advanced glycation end products and the activity of angiotensin-converting and acetylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, 314, p.126181.
- Castro-Barquero, S., Lamuela-Raventós, R., Doménech, M. and Estruch, R., 2018. Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*, 10(10), p.1523.
- Cetkovic, G.; Savatovic, S.; Canadanovic-Brunet, J.; Djilas, S.; Vulic, J.; Mandic, A.; Cetojevic-Simin, D., 2012. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*, 133, 938–945.
- Gillbro, T. and Cogdell, R., 1989. Carotenoid fluorescence. *Chemical Physics Letters*, 158(3-4), pp.312-316.
- Guedes-Martins, L., Matos, L., Soares, A., Silva, E. and Almeida, H., 2013. AGEs, contributors to placental bed vascular changes leading to preeclampsia. *Free Radical Research*, 47(sup1), pp.70-80.
- Drakou, M., Birmpa, A., Koutelidakis, A., Komaitis, M., Panagou, E. and Kapsokefalou, M., 2015. Total antioxidant capacity, total phenolic content and iron and zinc dialyzability in selected Greek varieties of table olives, tomatoes and legumes from conventional and organic farming. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(2), pp.197-202.
- Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Pyriochou, V.; Peristeraki, A.; Karathanos, V.T., 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 49, 213–216.



- Khan, M., Liu, H., Wang, J. and Sun, B., 2020. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, 130, p.108933.
- Khanam, A., Ahmad, S., Husain, A., Rehman, S., Farooqui, A. and Yusuf, M., 2020. Glycation and Antioxidants: Hand in the Glove of Antiglycation and Natural Antioxidants. *Current Protein & Peptide Science*, 21(9), pp.899-915.
- Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K. and Inakuma, T., 2004. Tomato Paste Fraction Inhibiting the Formation of Advanced Glycation End-products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), pp.200-205.
- Luthria, D., Mukhopadhyay, S. and Krizek, D., 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), pp.771-777.
- Martí, R., Roselló, S. and Cebolla-Cornejo, J., 2016. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers*, 8(6), p.58.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y. and Yamori, Y., 2000. Resveratrol Attenuates Ovariectomy-Induced Hypertension and Bone Loss in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46(2), pp.78-83.
- Nagai, R., Murray, D., Metz, T. and Baynes, J., 2012. Chelation: A Fundamental Mechanism of Action of AGE Inhibitors, AGE Breakers, and Other Inhibitors of Diabetes Complications. *Diabetes*, 61(3), pp.549-559.
- Nowotny, K., Schröter, D., Schreiner, M. and Grune, T., 2018. Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Research Reviews*, 47, pp.55-66.
- Odjakova, M., Popova, E., Al, M. and Mironov, R., 2012. Plant-Derived Agents with Anti-Glycation Activity. *In Tech*, pp.223-256.
- Peng, X., Ma, J., Chen, F. and Wang, M., 2011. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*, 2(6), p.289.

Ramkissoon, J., Mahomoodally, F., Ahmed, N. and Subratty, H., 2012. Natural inhibitors of advanced glycation end-products. *Nutrition & Food Science*, 42(6), pp.397-404.

Sadowska-Bartosz, I. and Bartosz, G., 2015. Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecules*, 20(2), pp.3309-3334.

Silván, J., Assar, S., Srey, C., Dolores del Castillo, M. and Ames, J., 2011. Control of the Maillard reaction by ferulic acid. *Food Chemistry*, 128(1), pp.208-213.

Suica-Bunghez, I., Raduly, M. and Doncea, S., 2011. Lycopene determination in tomatoes by different spectral techniques (UV-VIS, FTIR and HPLC). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Vol. 6(No 3, July-September 2011), pp.p. 1349-1356.

Szabo, K., Cătoi, A. and Vodnar, D., 2018. Bioactive Compounds Extracted from Tomato Processing by-Products as a Source of Valuable Nutrients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4), pp.268-277.

Wei, Q., Liu, T. and Sun, D., 2018. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, pp.32-45.

## Παράρτημα

Παρακάτω παρατίθενται όλα τα δεδομένα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των διαγραμμάτων της παρούσας μελέτης.

### Φθορισμομετρία

Πίνακας 1: Μέσες τιμές σήματος φθορισμού (A.U.  $\pm$  SD) στους 80°C για συγκεντρώσεις 2,38  $\mu$ M Μίγματος Φαινολικών / 0,005 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας

Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
0	202,00 ( $\pm$ 184,62)	134,67 ( $\pm$ 231,52)	106,00 ( $\pm$ 183,60)	1739,00 ( $\pm$ 2323,62)
1	579,28 ( $\pm$ 130,98)	344,83 ( $\pm$ 301,22)	2295,39 ( $\pm$ 1820,09)	1841,11 ( $\pm$ 1622,87)
2	4034,78 ( $\pm$ 1460,64)	3909,00 ( $\pm$ 1672,05)	11235,44 ( $\pm$ 4641,35)	6980,78 ( $\pm$ 811,58)
3	9575,44 ( $\pm$ 4204,63)	8207,44 ( $\pm$ 3922,56)	17047,22 ( $\pm$ 2764,43)	19658,39 ( $\pm$ 1365,38)
Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
0	493,00 ( $\pm$ 133,90)	2147,00 ( $\pm$ 2563,89)	531,33 ( $\pm$ 476,05)	2301,67 ( $\pm$ 3919,25)
1	1479,67 ( $\pm$ 866,25)	1666,89 ( $\pm$ 439,31)	2089,83 ( $\pm$ 489,99)	3415,44 ( $\pm$ 354,73)
2	21450,00 ( $\pm$ 2168,71)	20268,00 ( $\pm$ 3201,77)	14703,33 ( $\pm$ 2462,74)	8784,56 ( $\pm$ 5801,36)
3	28617,33 ( $\pm$ 3684,99)	25083,11 ( $\pm$ 2734,21)	201114,78 ( $\pm$ 5802,42)	18122,28 ( $\pm$ 3379,76)

Πίνακας 2: Μέσες τιμές σήματος φθορισμού (A.U.  $\pm$  SD) στους 80°C για συγκεντρώσεις 4,76  $\mu$ M Μίγματος Φαινολικών / 0,01 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας.

Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
0	0 ( $\pm$ 0)	0 ( $\pm$ 0)	0 ( $\pm$ 0)	0 ( $\pm$ 0)
1	198,61 ( $\pm$ 200,53)	291,78 ( $\pm$ 505,37)	1616,67 ( $\pm$ 452,43)	190,22 ( $\pm$ 329,47)
2	5785,17 ( $\pm$ 850,90)	8231,17 ( $\pm$ 3322,22)	12378,11 ( $\pm$ 1205,78)	10609,89 ( $\pm$ 3261,23)
3	10813,44 ( $\pm$ 246,57)	9681,94 ( $\pm$ 2200,18)	15349,61 ( $\pm$ 1159,34)	11361,78 ( $\pm$ 1949,18)
Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
0	122,67 ( $\pm$ 212,46)	1319,67 ( $\pm$ 1382,11)	673,33 ( $\pm$ 146,68)	768,00 ( $\pm$ 1330,22)
1	2363,39 ( $\pm$ 741,73)	1002,50 ( $\pm$ 953,06)	4009,78 ( $\pm$ 335,95)	2167,94 ( $\pm$ 1774,54)
2	18771,50	18210,61	16877,33	8551,78

	(±1456,69)	(±995,88)	(±2881,07)	(±911,79)
3	29355,44 (±726,12)	2569,61 (±1158,41)	21041,83 (±1531,64)	12560,00 (±1094,25)

### Φασματομετρία ορατού

Πίνακας 3: Μέσες τιμές απορρόφησης ( $ABS \pm SD$ ) συστήματος 1:1 στα 360 και 420 nm, στους 80°C και για συγκεντρώσεις 2,38  $\mu M$  Μίγματος Φαινολικών / 0,005 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας.

360 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0027 (±0,0046)	0,0037 (±0,0064)	0,0017 (±0,0029)	0,0113 (±0,0196)
	1	0,0041 (±0,0047)	0,0013 (±0,0022)	0,0143 (±0,0139)	0,0103 (±0,0092)
	2	0,0178 (±0,0020)	0,0179 (±0,0123)	0,0576 (±0,0351)	0,0370 (±0,0259)
	3	0,0479 (±0,0283)	0,0322 (±0,0172)	0,1191 (±0,0089)	0,1688 (±0,0463)
420 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0027 (±0,0021)	0,0013 (±0,0023)	0,0033 (±0,0058)	0,0053 (±0,0092)
	1	0,0033 (±0,0034)	0,0003 (±0,0003)	0,0100 (±0,0091)	0,0066 (±0,0058)
	2	0,0329 (±0,0428)	0,0309 (±0,0432)	0,0613 (±0,0503)	0,0574 (±0,0677)
	3	0,0310 (±0,0329)	0,0286 (±0,0280)	0,0821 (±0,0584)	0,1163 (±0,0847)

Πίνακας 4: Μέσες τιμές απορρόφησης ( $ABS \pm SD$ ) συστήματος 10:1 στα 360 και 420 nm, στους 80°C και για συγκεντρώσεις 2,38  $\mu M$  Μίγματος Φαινολικών / 0,005 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας.

360 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0017 (±0,0015)	0,0020 (±0,0020)	0,0017 (±0,0029)	0,0293 (±0,0157)
	1	0,0086 (±0,0054)	0,0013 (±0,006)	0,0107 (±0,0134)	0,0424 (±0,0050)
	2	0,1576 (±0,0125)	0,1467 (±0,0314)	0,0999 (±0,0187)	0,0708 (±0,0531)
	3	0,2843 (±0,0552)	0,2067 (±0,0408)	0,1737 (±0,0643)	0,1681 (±0,0360)

420 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0010 (±0,0010)	0,0010 (±0,0046)	0,0163 (±0,0345)	0,0057 (±0,0067)
	1	0,0023 (±0,0002)	0,0001 (±0,0001)	0,0046 (±0,012)	0,0228 (±0,0036)
	2	0,0404 (±0,0053)	0,0410 (±0,0098)	0,0272 (±0,0081)	0,0293 (±0,02085)
	3	0,0728 (±0,0246)	0,0629 (±0,0046)	0,0591 (±0,0105)	0,0513 (±0,0198)

Πίνακας 5: Μέσες τιμές απορρόφησης ( $ABS \pm SD$ ) συστήματος 1:1 στα 360 και 420 nm, στους 80°C και για συγκεντρώσεις 4,76  $\mu M$  Μίγματος Φαινολικών / 0,01 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας.

360 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0127 (±0,067)	0,0167 (±0,0064)	0 (±0)	0 (±0)
	1	0,0114 (±0,0009)	0,0168 (±0,0097)	0,0225 (±0,0153)	0,0006 (±0,0010)
	2	0,0501 (±0,0038)	0,0651 (±0,0260)	0,0903 (±0,0405)	0,0809 (±0,0720)
	3	0,0979 (±0,0053)	0,0814 (±0,0228)	0,1292 (±0,0150)	0,1269 (±0,0260)
420 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (1:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0177 (±0,029)	0,0213 (±0,0059)	0,0043 (±0,0058)	0,0033 (±0,0035)
	1	0,0107 (±0,0009)	0,0048 (±0,0042)	0,0222 (±0,0032)	0,0046 (±0,0040)
	2	0,0548 (±0,0612)	0,0692 (±0,0821)	0,0977 (±0,1218)	0,1166 (±0,1494)
	3	0,0518 (±0,0542)	0,0661 (±0,0686)	0,09417 (±0,0751)	0,1102 (±0,1197)

Πίνακας 6: Μέσες τιμές απορρόφησης ( $ABS \pm SD$ ) συστήματος 10:1 στα 360 και 420 nm, στους 80°C και για συγκεντρώσεις 4,76  $\mu M$  Μίγματος Φαινολικών / 0,01 % w/v πελτές και χυμός ντομάτας.

360 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0190 ( $\pm 0,0017$ )	0,0200 ( $\pm 0,0026$ )	0,0100 ( $\pm 0,0125$ )	0,0387 ( $\pm 0,0323$ )
	1	0,0276 ( $\pm 0,0047$ )	0,0148 ( $\pm 0,0023$ )	0,0259 ( $\pm 0,0098$ )	0,0298 ( $\pm 0,0163$ )
	2	0,1570 ( $\pm 0,0127$ )	0,1633 ( $\pm 0,0105$ )	0,1838 ( $\pm 0,0292$ )	0,1071 ( $\pm 0,0108$ )
	3	0,3353 ( $\pm 0,0275$ )	0,2634 ( $\pm 0,0128$ )	0,2412 ( $\pm 0,0251$ )	0,1644 ( $\pm 0,0170$ )
420 nm	Χρόνος (h)	Glu:Lys (10:1)	Mix φαινολικών	Χυμός ντομάτας	Πελτές ντομάτας
	0	0,0143 ( $\pm 0,0040$ )	0,0183 ( $\pm 0,0012$ )	0,0127 ( $\pm 0,0100$ )	0,0283 ( $\pm 0,0115$ )
	1	0,0150 ( $\pm 0,0028$ )	0,0089 ( $\pm 0,0077$ )	0,0209 ( $\pm 0,0038$ )	0,0159 ( $\pm 0,0086$ )
	2	0,0489 ( $\pm 0,0054$ )	0,0474 ( $\pm 0,0042$ )	0,0671 ( $\pm 0,0063$ )	0,0478 ( $\pm 0,0065$ )
	3	0,1048 ( $\pm 0,0092$ )	0,0739 ( $\pm 0,0073$ )	0,0558 ( $\pm 0,0180$ )	0,0421 ( $\pm 0,0316$ )