



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου
στον σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs)
κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100° C

Παναγιώτης Β. Καλκάνης

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου
στον σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs)
κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100° C

Study of the behavior of bioactive components of olive oil
in the formation of non-enzymatic glycation products (dAGEs)
during heat treatment at 100° C

Παναγιώτης Β. Καλκάνης

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Μαρία Καψοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου στο σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs) κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100° C

*ΠΜΣ Χημεία Τροφίμων & Διατροφή
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε η επίδραση της α -τοκοφερόλης (α -toc), της υδροξυτυροσόλης (HT) και του σκουαλενίου (Sq) στην εξέλιξη της αντίδρασης Maillard. Για την μελέτη της αντίδρασης παρασκευάστηκε ισομοριακό μίγμα (1:1) γλυκόζης : λυσίνης (0,1M) στο οποίο προστέθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις α -τοκοφερόλης: (15,4 μ M, 29 μ M και 58 μ M), σκουαλενίου (40,6 μ M, 1622,6 μ M και 2677,4 μ M) και υδροξυτυροσόλης (32,4 μ M, 116,7 μ M, και 233,5 μ M) (Η προσθήκη κάθε ουσίας έγινε ξεχωριστά). Τα συστήματα θερμάνθηκαν στους 100° C για 240 λεπτά. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με μη εκλεκτικές μεθόδους όπως η μέτρηση της έντασης της απορρόφησης στα 280nm, 360nm και 420nm και της έντασης του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η προσθήκη α -τοκοφερόλης παρεμπόδιζε αποτελεσματικότερα την εξέλιξη της αντίδρασης συγκριτικά με την προσθήκη σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης. Το σκουαλένιο έδρασε προωθητικά στην εξέλιξη της αντίδρασης Maillard. Επιπλέον η παρουσία αυτού του τριτερπενικού υδρογονάνθρακα προώθησε το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων, γεγονός που δεν μπορεί να εξηγηθεί από τη δομή του. Τέλος η προσθήκη της υδροξυτυροσόλης ανάσχεσε το σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης Maillard και μάλιστα η δράση αυτή δεν φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η θερμική επεξεργασία των 100°C, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, επιτάχυνε τις αντιδράσεις γλυκίωσης στα επόμενα στάδια και απέτρεψε τη παρεμποδιστική δράση της υδροξυτυροσόλης, η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία σε *in vitro* πειράματα υπό φυσιολογικές συνθήκες (37° C για 14 ημέρες).

Επιστημονική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Αντιδράσεις Maillard, Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (AGEs)

Study of the behavior of bioactive components of olive oil in the formation of non-enzymatic glycation products (dAGEs) during heat treatment at 100° C

*MSC Food Chemistry & Nutrition
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Chemistry & Analysis*

ABSTRACT

In the present study the effect of α -tocopherol (α -toc), hydroxytyrosol (HT) and squalene (Sq) on the evolution of the Maillard reaction was investigated. To study the effect, an equimolar mixture (1: 1) of glucose: lysine (0.1 M) was prepared and different concentrations of α -tocopherol: (15,4 μ M, 29 μ M και 58 μ M), squalene (40,6 μ M, 1622,6 μ M και 2677,4 μ M) and hydroxytyrosol (32,4 μ M, 116,7 μ M, και 233,5 μ M) were added (Each substance was added separately). The systems were heated to 100°C for 240 minutes. The reaction was monitored by non-specific methods such as measuring the absorption intensity at 280nm, 360nm and 420nm and the fluorescence intensity (excitation / emission 370 / 430nm), at 5 different time points: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min.

The results showed that the addition of α -tocopherol more effectively inhibited the evolution of the reaction compared with the addition of squalene and hydroxytyrosol. squalene acted as a promoter in all stages of the Maillard reaction. In addition, the presence of this triterpene hydrocarbon promoted the formation of fluorescent compounds, which cannot be explained by its structure. Finally, the addition of hydroxytyrosol inhibited the formation of the products of the initial stage of the Maillard reaction and in fact this action did not seem to depend on the concentration. The heat treatment at 100°C applied in the present work accelerated the glycation reactions in the next stages and prevented the inhibitory effect of hydroxytyrosol, which is reported in the literature in *in vitro* experiments under normal conditions (37°C for 14 days)

Scientific area: Food Chemistry

Keywords: Maillard reactions, Advanced Glycation End Products (AGEs)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω όλους όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εν προκειμένω μελέτης, ενώ νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω και τους ανθρώπους εκείνους που με ενθάρρυναν και με υποστήριξαν ηθικά κατά τη διεξαγωγή της.

Καταρχάς, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα **Χρυσουγή Γαρδέλη**, για το ενδιαφέρον και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της στην επιμέλεια συγγραφής αυτής της μελέτης. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. **Αθανάσιο Μαλλούχο** καθώς και την Καθηγήτρια κα. **Μαρία Καψοκεφάλου**, οι οποίοι ως μέλη της τριμελούς επιτροπής δέχθηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια Διδάκτορα Θεανώ Μικρού και την Άρτεμη Παπαντώνη (ΕΤΕΠ) για την αμέριστη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας τόσο για τις χρήσιμες οδηγίες τους όσον αφορά το πειραματικό μέρος όσο και για την εν γένει άψογη συνεργασία μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τη συνεργάτιδά μου Παρασκευή Καραμπα, όπως επίσης και την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Με την άδεια 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

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	ii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	3
1.1 Μη ενζυματική αμαύρωση	3
1.2 Τα στάδια της αντίδρασης	5
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μη-ενζυματική αμαύρωση.....	8
1.4 Τα αντιδρώντα της MR	10
1.5 Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (Advanced Glycation End-products) AGEs	12
1.6 Σχηματισμός Καρβοξυμέθυλο-λυσίνης (CML)	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	17
2.1 Αναστολή των AGEs.....	17
2.2 Συνθετικοί αναστολείς	17
2.3 Φυσικοί αναστολείς	18
2.3.1 Φαινολικές ενώσεις στην αναστολή των AGEs.....	19
2.3.2 Οι τερπενοειδείς ενώσεις στην αναστολή των AGEs.....	22
2.3.3 Βιταμίνες ως αναστολείς των AGEs	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	27
3.1 Μέθοδοι ανάλυσης AGEs.....	27
3.1.1 Φθορισμός.....	27
3.2 Φασματομετρία ορατού-υπεριώδους (UV/Vis).....	30
3.2.1 Απορρόφηση – Νόμος Lambert-Beer.....	30
3.2.2 Αποκλίσεις Νόμου Lambert-Beer.....	32
3.2.3 Φασματοφωτόμετρα.....	32
3.2.4 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με φασματοφωτομετρία UV-Vis	34
3.3 Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού των AGEs.....	35
3.3.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	35
3.3.2 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	35
3.3.3 Ανοσοχημικός προσδιορισμός	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	37
ΣΚΟΠΟΣ	37
Πειραματικό μέρος.....	37
4.1 Το σύστημα της αντίδρασης	37
4.2. Υλικά και μέθοδοι.....	38

4.3 Παρασκευή διαλυμάτων	39
4.4 Προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης.....	40
4.4.1 Παρακολούθηση της αντίδρασης	41
4.4.2 Μέτρηση Απορρόφησης	42
4.4.3 Μέτρηση Φθορισμού	42
4.5 Στατιστική ανάλυση.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	44
5.1 Επίδραση στην εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR (Μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm)	44
5.2 Επίδραση στην εξέλιξη του ενδιάμεσου σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 360 nm).....	51
5.3 Επίδραση στην εξέλιξη του τελικού σταδίου της MR (Μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm)	58
5.4 Επίδραση στον σχηματισμό φθοριζουσών προϊόντων.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	73
6.1 Συζήτηση.....	73
6.2 Συμπεράσματα	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέσα από τους αιώνες, η ανάπτυξη του σύγχρονου κόσμου οδήγησε σε ποικίλα διατροφικά πρότυπα, προσαρμοσμένα εκάστοτε στις διατροφικές ανάγκες του ανθρώπου. Τις τελευταίες δεκαετίες ωστόσο έχει παρατηρηθεί η ανάγκη για καλύτερα ποιοτικά τρόφιμα. Η ποιότητα των τροφίμων εξαρτάται από τα θρεπτικά στοιχεία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως για παράδειγμα την εμφάνιση, το άρωμα και την γεύση. Η ευχάριστη γεύση αλλά και το χρώμα ενός τροφίμου βασίζεται στην θερμική επεξεργασία που αυτό υποβάλλεται, διασφαλίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την ασφάλεια και την ποιότητα του τροφίμου. Κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων δύο κύριες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα ,η αντίδραση Maillard και η υπεροξειδωση των λιπιδίων καθορίζοντας την ποιότητα και τη σταθερότητά τους.

Η αντίδραση Maillard είναι γνωστή και ως γλυκίωση πρωτεΐνης. Μέχρι και σήμερα έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για τον χαρακτηρισμό των σταδίων της αντίδρασης αλλά και για την αξιολόγηση των παραγόμενων ενώσεων. Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs) είναι μία από τις κατηγορίες ενώσεων που παράγονται κατά την θερμική επεξεργασία τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα αναγωγικών σακχάρων και πρωτεϊνών. Τα (AGEs) προσλαμβάνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της κατανάλωσης επεξεργασμένων τροφίμων αλλά σχηματίζονται και από την ενδογενή γλυκίωση των πρωτεϊνών στο σώμα του ανθρώπου (Ulibarri et al., 2015;Wei et al., 2018).

Ο αντίκτυπος στην ανθρώπινη υγεία των ενώσεων αυτών αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια καθώς η παρουσία τους έχει συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες, με χρόνιες ασθένειες όπως ο διαβήτης καθώς και με αυτοάνοσα και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (Ulibarri et al., 2015;Wei et al., 2018). Υπάρχει μεγάλος αριθμός διάφορων σημαντικών μελετών με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των AGEs σε διάφορα τρόφιμα που παράγονται μέσω διαφορετικών συνθηκών (Ulibarri et al., 2010). Στις μέρες μας , η γνώση του μηχανισμού αντίδρασης των παραμέτρων αλλά και των συνθηκών που επηρεάζουν τον σχηματισμό των AGEs, μπορεί να βοηθήσει τους ερευνητές να δημιουργήσουν μια στρατηγική αναστολής του σχηματισμού τους που θα επωφελήσει την υγεία του ανθρώπου.

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο το οποίο καταναλώνουμε καθημερινά αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής και είναι ευρέως διαδεδομένο (**Kouka et al., 2017**). Είναι επίσης πλούσιο σε βιοενεργά και αντιοξειδωτικά συστατικά όπως η α-τοκοφερόλη, το σκουαλένιο, φαινολικές ενώσεις όπως η υδροξυτυροσόλη και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δράση των: α-τοκοφερόλη, σκουαλένιο και υδροξυτυροσόλη στο σχηματισμό των AGEs κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων μη ενζυματικής αμαύρωσης σε συστήματα τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Μη ενζυματική αμαύρωση

Η αντίδραση MR αποτελεί ένα δίκτυο αλυσιδωτών χημικών αντιδράσεων που ευθύνεται για το άρωμα, το χρώμα και την γεύση πολλών θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων. Ευνοείται από την παρουσία οξυγόνου, ουδέτερου-βασικού pH, χαμηλής και μέσης ενεργότητας νερού και ήπιες συνθήκες θέρμανσης. Η MR περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Γάλλο χημικό Louis Camille Maillard το 1912, ο οποίος περιέγραψε την αντίδραση γλυκόζης-γλυκίνης και παρατήρησε την παραγωγή απαλού κίτρινου χρώματος σε διάλυμα νερού. Το 1953, ο Hodge πρότεινε ένα σχήμα (Εικόνα 1.1) το οποίο μέχρι και σήμερα θεωρείται το πιο κατάλληλο για την περιγραφή αυτής της αντίδρασης (**Rufian-Henares et al., 2016**).

Το κοινό μαύρισμα στα τρόφιμα συμβαίνει από την αντίδραση μεταξύ ενός αναγωγικού σακχάρου (όπως για παράδειγμα d-γλυκόζη) και της πρωτοταγούς αμινομάδας ενός ελεύθερου αμινοξέος ή της αμινομάδας που βρίσκεται σε πλευρική αλυσίδα κάποιας πρωτεΐνης. Για την πραγματοποίησή των αντιδράσεων αυτών απαραίτητη είναι η θερμική επεξεργασία των τροφίμων ή η μακρόχρονη αποθήκευσή τους. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται ως μη ενζυμική έτσι ώστε να διαφοροποιείται από την ενζυμική αμαύρωση η οποία εύκολα παρατηρείται σε φρεσκοκομμένα φρούτα αλλά και λαχανικά (**Fennema 2008**).

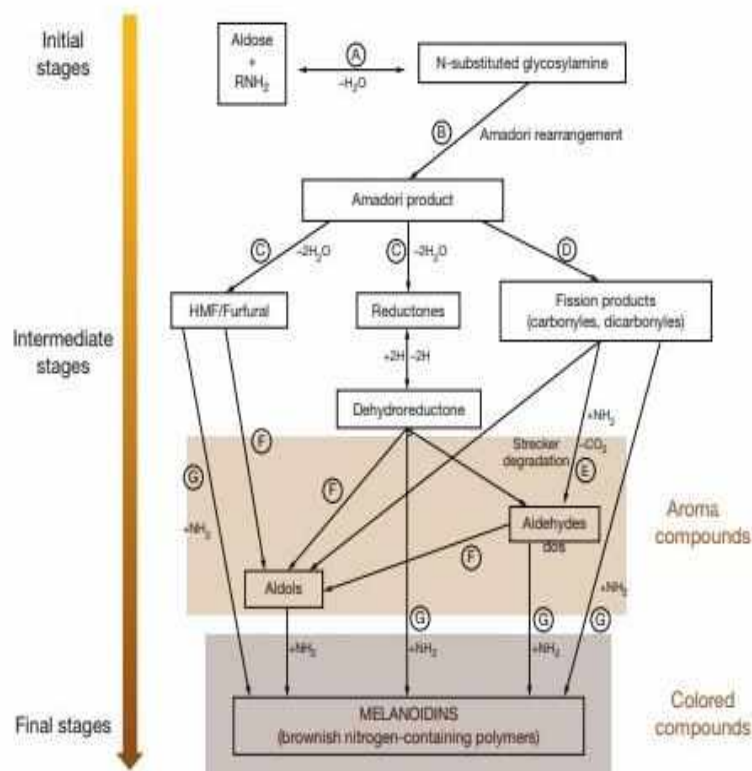
Η σημερινή μας διατροφή περιέχει πληθώρα τροφίμων που σχετίζονται με την αντίδραση Maillard όπως για παράδειγμα τα μπισκότα, το ψωμί, το τσάι, ο καφές, το τηγανιτό αλλά και το ψητό κρέας. Επιπλέον η μη ενζυματική αμαύρωση εκτός του ότι επηρεάζει το χρώμα αλλά και την οσμή των τροφίμων, έχει και ως αποτέλεσμα τη μείωση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων λόγω της απώλειας των πρωτεϊνών και των αμινοξέων (**Lin et al., 2018**).

Η αντίδραση Maillard διακρίνεται συνοπτικά σε τρία στάδια: το αρχικό, το ενδιάμεσο και το τελικό και μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε τρόφιμα όσο και *in vino*

1. Το αρχικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την συμπύκνωση αμίνης-σακχάρου για να σχηματιστεί τελικά η βάση Schiff η οποία

μέσα από διάφορες αναδιατάξεις σχηματίζει το λεγόμενο προϊόν Amadori.

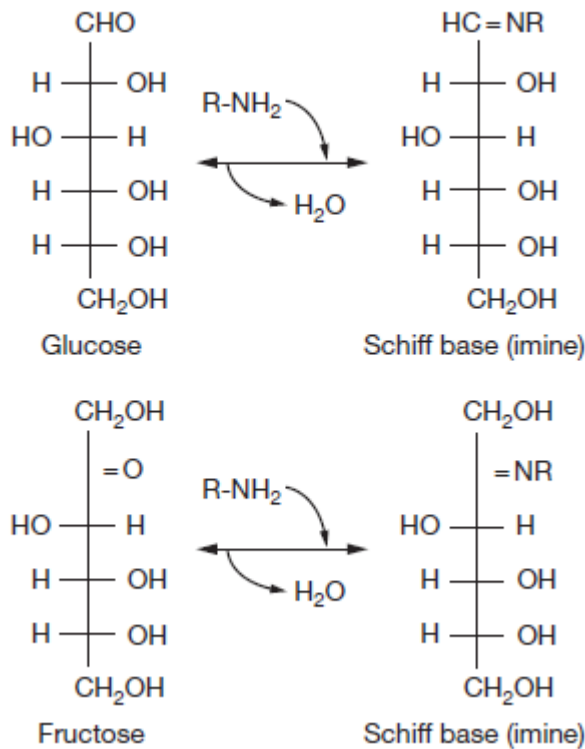
2. Το δεύτερο στάδιο ή ενδιάμεσο περιλαμβάνει την αφυδάτωση και τον κατακερματισμό του σακχάρου αλλά και την διάσπαση του προϊόντος Amadori σε διάφορες δικαυβονυλικές ενώσεις όπως την γλυοξάλη (GO), την μεθυλογλυοξάλη (MGO) και τις δεοξυγλυκοζόνες (3-DG) και ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες.
3. Το τελικό στάδιο της γλυκίωσης διακρίνεται από τον πολυμερισμό των ενδιάμεσων προϊόντων με σκοπό τον σχηματισμό έγχρωμων και φθορίζουσών ουσιών που ονομάζονται μελανοΐδινες. Οι κύριες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό είναι ο πολυμερισμός αλδεϋδών-αμινών που οδηγεί στον σχηματισμό αζωτούχων ετεροκυκλικών ενώσεων αλλά και η αλδολική συμπύκνωση (Hemmler et al., 2017; Khan et al., 2020; Nie et al., 2013).



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση Αντίδρασης Maillard (Hodge 1953).

1.2 Τα στάδια της αντίδρασης

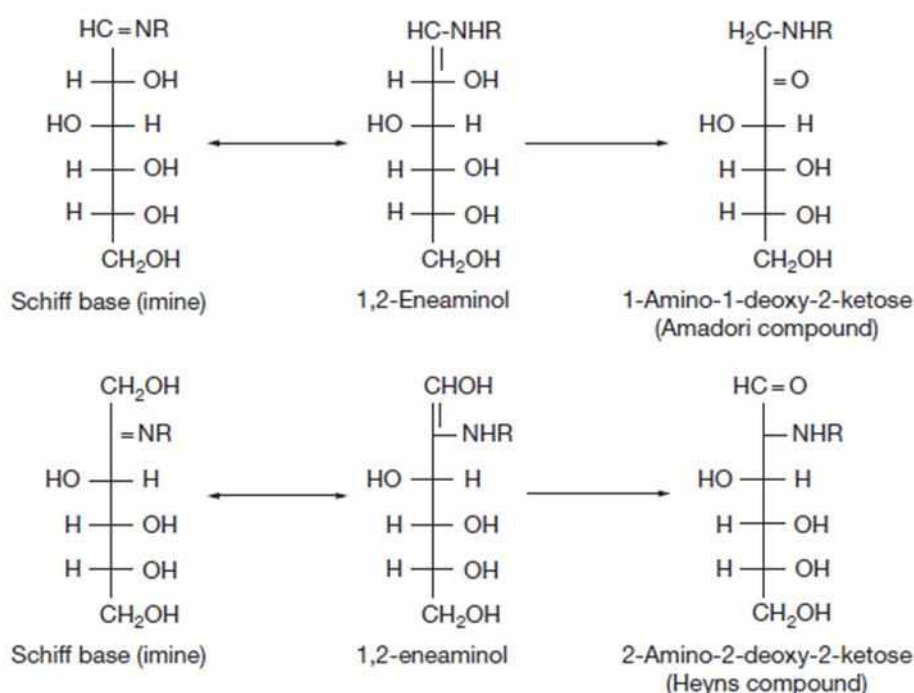
Το πρώτο βήμα της MR αποτελείται από την πυρηνόφιλη συμπύκνωση μιας καρβονυλομάδας και μιας αμινομάδας έτσι ώστε να σχηματιστεί μια ασταθής βάση μετά από αφυδάτωση, ή σε N-υποκατεστημένη-γλυκοζυλαμίνη ή σε μίνη γνωστή σαν βάση Schiff (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Σχηματισμός Schiff base από γλυκόζη και φρουκτόζη αντίστοιχα (Rufian-Henares et al., 2016).

Στην περίπτωση της καρβονυλομάδας έχουμε συνήθως αναγωγικά σάκχαρα αλλά κάποιες φορές την θέση της καρβονυλομάδας μπορεί να πάρουν ενώσεις καρβονυλίου από ενδιάμεσα στάδια της MR ή από την οξείδωση των λιπιδίων. Από την άλλη πλευρά η αμινομάδα μπορεί να είναι είτε ελεύθερο αμινοξύ, είτε η αμινομάδα του τερματικού αμινοξέος της πρωτεΐνης είτε πλευρικές ομάδες αμινοξέων ενσωματωμένες στην πρωτεΐνη όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της λυσίνης. Στη συνέχεια η N-υποκατεστημένη-γλυκοζυλαμίνη υφίσταται μια μη αναστρέψιμη αναδιάταξη. Εξαιτίας της ομάδας υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση α, η βάση Schiff διευθετείται εκ νέου στις αντίστοιχες 1,2-ενεδιόλες (Εικόνα 1.3).

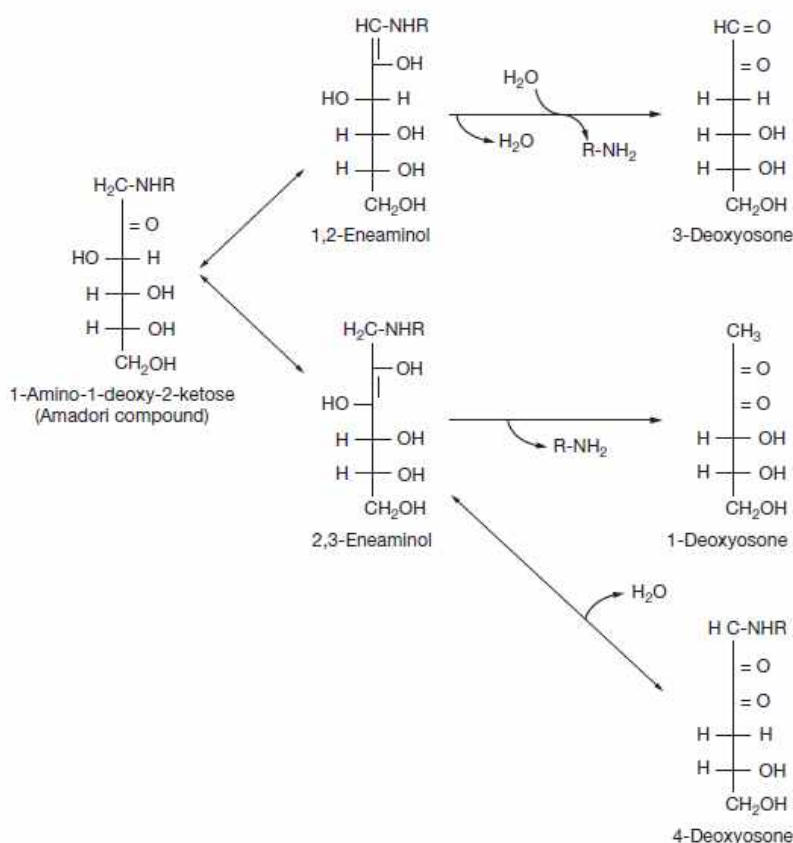
Όταν το αρχικό προϊόν είναι μια N-υποκατεστημένη-κετοζυλαμίνη προκύπτει η ένωση 2-αμινο-2-δεοξυ-2-κετόζη μέσω της αναδιάταξης Heyns (προϊόν Heyns). Από την άλλη πλευρά όταν το αρχικό προϊόν είναι μια N-υποκατεστημένη-αλδοζυλαμίνη, προκύπτει η ένωση 1-αμινο-1-δεοξυ-2-κετόζη μέσω της αναδιάταξης Amadori (προϊόν Amadori). Τα προϊόντα Amadori χαρακτηρίζονται από σταθερότητα σε σύγκριση με τις βάσεις Schiff, καθώς είναι οι πρώτες ενώσεις της MR που είναι μετρήσιμες στα τρόφιμα (Brandy 2013; Sadowska Bartosz and Bartosz., 2015a; Rufian-Henares et al., 2016).



Εικόνα 1.3 Σχηματισμός ενώσεων Amadori και Heyns (Rufian-Henares et al., 2016).

Έπειτα, τα προϊόντα Amadori και Heyns αποσυντίθεται ανάλογα με το pH και την θερμοκρασία του μέσου, ευνοώντας τον σχηματισμό διαφορετικών ενδιάμεσων ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το τελικό άρωμα και το χρώμα των θερμικά επεξεργασμένων τροφών. Διαφορετικές ενώσεις όπως για παράδειγμα η 1-,3-,ή 4-δεοξυοζόνη αλλά και ρεδουκτόνες σχηματίζονται, οι οποίες και πάλι διασπώνται και αντιδρούν στο ενδιάμεσο στάδιο της MR. Ο σχηματισμός των δεοξυοζονών επιτυγχάνεται σε pH μεταξύ 4 και 7. Το προϊόν Amadori 1-αμινο-1-δεοξυ-2-κετόζη μπορεί να μετατραπεί σε 2,3-ενεαμινόλη καθώς και σε 1,2-ενεαμινόλη, που με τη σειρά τους διασπώνται για να σχηματιστεί μια δεοξυοζόνη -όπως φαίνεται και στην

(Εικόνα 1.4). Η απώλεια νερού από την 1,2-εναμινόλη και η υδρόλυση του κατιόντος της ιμίνης έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία της 3-δεοξυοζόνης. Από την 2,3-εναμινόλη μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών και απώλεια νερού, σχηματίζονται η 1-δεοξυοζόνη και η 4-δεοξυοζόνη (Rufian-Henares et al., 2016).



Εικόνα 1.4 Σχηματισμός δεοξυοζονών (Rufian-Henares et al., 2016).

Η περαιτέρω διάσπαση των 3-δεοξυοζονών σε χαμηλό pH, μέσω της 1,2-ενολοποίησης, ευνοεί τον σχηματισμό φουρανικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα την 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) και φουρφουράλη από τις αντίστοιχες εξόζες και πεντόζες. Η 2,3-ενολοποίηση πραγματοποιείται σε βασικό pH παράγοντας πυρανόνες και πυρρόλες. Οι σχηματιζόμενες ρεδουκτόνες αφυδατώνονται ξανά για να σχηματίσουν δεϋδρορεδουκτόνες, οι οποίες σχηματίζουν πολυμερή μέσω της αντίδρασης με τις αμινομάδες στα προχωρημένα στάδια της MR. Οι ενώσεις Amadori μπορούν να διασπαστούν επίσης σε διαφορετικά προϊόντα σχάσης, όπως ακετάλες ή αλδεΐδες (Rufian-Henares et al., 2016; Troise et al., 2019; Martins et al., 2000).

Η αλληλεπίδραση των αμινοξέων με δικαρβονυλικές ενώσεις, όπως δεϋδρορεδουκτόνες ή προϊόντα σχάσης, είναι γνωστή ως αποικοδόμηση Strecker, η

οποία συνεπάγει την απώλεια αμινοξέων στα τρόφιμα. Ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης Strecker, σχηματίζονται νέες αλδεύδες με ένα άτομο άνθρακα λιγότερο. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε τρόφιμα με υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων και κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας. Οι σχηματιζόμενες αλδεύδες (όπως για παράδειγμα η φαινυλακεταλδεύδη, η μεθιονάλη και η 3-μεθυλοβουτανάλη), έχουν έντονο άρωμα, ανάλογα με το αμινοξύ που διασπάται **(Rufian-Henares et al., 2016; Fennema 2008)**.

Κατά το τελικό στάδιο της MR σχηματίζονται δύο ειδών ενώσεων: οι μελανοϊδίνες και πτητικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, οι πτητικές ενώσεις σχηματίζονται απευθείας από τα προϊόντα Amadori και δεν χρειάζονται την συμμετοχή των ελεύθερων αμινοξέων. Παρ'όλα αυτά, μόλις το 1% των συνολικών πτητικών ενώσεων μπορούν να παραχθούν από την αντίδραση των αμινοξέων με την 2-δεοξυγλυκόζη, ενώ αντίθετα στην περίπτωση της αποικοδόμησης Strecker, πολλές διαφορετικές ενώσεις με έντονη οσμή μπορούν να προκύψουν, όπως για παράδειγμα, οι πυρρόλες, θειαζόλες και οι πυραζίνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αλκυλοπυραζίνες που δίνουν γεύση στο ψητό κρέας.

Όσον αφορά τις μελανοϊδίνες, αυτές είναι καφέ πολυμερείς ενώσεις που παράγονται μέσω της συμπύκνωσης των αμινοπροϊόντων των ενδιάμεσων σταδίων της MR όπως για παράδειγμα της 2-φουραλδεύδης, και τις N-υποκατεστημένες-πυρρόλες. Οι μελανοϊδίνες έχουν ένα ευρύ μοριακό βάρος και διαφορετικά φάσματα απορρόφησης **(Rufian-Henares et al., 2016; Wang, et al., 2011)**.

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μη-ενζυματική αμάρωση

Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση Maillard είναι μεταξύ άλλων η θερμοκρασία, η ενεργότητα του νερού, ο τύπος του αντιδρώντος, η αναλογία αμινοξέων-σακχάρων, το pH καθώς και η παρουσία μετάλλων ή και η παρουσία οποιουδήποτε ανασταλτικού παράγοντα της αντίδρασης όπως είναι το διοξείδιο του θείου **(Nie et al., 2013)**.

Πιο συγκεκριμένα:

(α) Η θερμοκρασία και ο χρόνος. (Με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η ταχύτητα των αντιδράσεων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και ο μηχανισμός της αντίδρασης). Η απώλεια αμινοξέων είναι μεγαλύτερη κατά την διάρκεια θέρμανσης υψηλής εντάσεως σε μικρό χρόνο και όχι με μία πιο ήπια θερμική επεξεργασία για μεγάλο χρονικό διάστημα

(β) Το pH. (Οξύνο pH ή μείωσή του παρεμποδίζει ή επιβραδύνει την αμαύρωση καθώς η αμινομάδα των αμινοξέων πρωτονιώνεται και έτσι δεν σχηματίζεται γλυκοζυλαμίνη). Γενικά η επίδραση του pH είναι πολύπλοκη καθώς κάθε στάδιο της αντίδρασης Maillard έχει μία βέλτιστη τιμή pH. Σε $pH < 3$ ο ρυθμός της αντίδρασης είναι πολύ χαμηλός και αυξάνεται με την αύξηση του pH με μέγιστη τιμή το 10. Για τιμές μεγαλύτερες του $pH=10$ ο ρυθμός της αντίδρασης μειώνεται. Η δραστηριότητα της αμινομάδας εξαρτάται από την μορφή του αμινοξέος καθώς παρατηρείται αύξηση όταν το αμινοξύ βρίσκεται στην ανιονική μορφή του (βασίζεται στον χαρακτήρα οξέος-βάσεως του αμινοξέος). Έτσι για τα βασικά αμινοξέα (λυσίνη-αργινίνη απαιτείται $pH=10$ σε αντίθεση με τα όξινα αμινοξέα (ασπαρτικό-γλουταμινικό οξύ) όπου η ανιονική μορφή επιτυγχάνεται σε $pH=3$. Από τα παραπάνω προκύπτει, ότι το αρχικό pH του προϊόντος αλλά και η ρυθμιστική ικανότητα του συστήματος καθορίζουν την ένταση της αντίδρασης Maillard. Έτσι τα τρόφιμα μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες σε σχέση με το pH και την δραστηριότητα:

- Τρόφιμα με pH 6-8 (αυγά, γάλα, κρέας και δημητριακά). Στην περίπτωση αυτή η αντίδραση Maillard ευνοείται
- Τρόφιμα με μέσες τιμές pH (μέλι, σάλτσες, σούπες και κονσερβοποιημένα λαχανικά). Στην περίπτωση αυτή μπορεί να συμβεί η αντίδραση Maillard ενώ ταυτόχρονα μπορεί να λάβει χώρα και η αποδόμηση του ασκορβικού οξέος
- Τρόφιμα με pH 2.5-3.5 (όξινοι χυμοί και συμπυκνωμένα φρούτα). Στην περίπτωση αυτή η αντίδραση Maillard δεν λαμβάνει χώρα καθώς τα προϊόντα αυτά είναι φτωχά σε αμινοξέα. Η αμαύρωση του προκαλείται οφείλεται στην αποδόμηση του ασκορβικού οξέος αλλά και την καραμελοποίηση.

(γ) Η ενεργότητα του νερού στα τρόφιμα. Η ένταση της αντίδρασης MR εξαρτάται από την ποσότητα νερού που υπάρχει στο τρόφιμο. Η μέγιστη δραστηριότητα επιτυγχάνεται σε 50–70% σχετική υγρασία (10–15% νερό στο προϊόν ή όταν η

ενεργότητα του (a_w) έχει τιμή 0,67-0,7). Όσο υψηλότερη είναι η υγρασία τόσο μειώνεται ο ρυθμός της αντίδρασης Maillard ενώ δεν λαμβάνει χώρα απουσία νερού (Rufian-Henares et al., 2016).

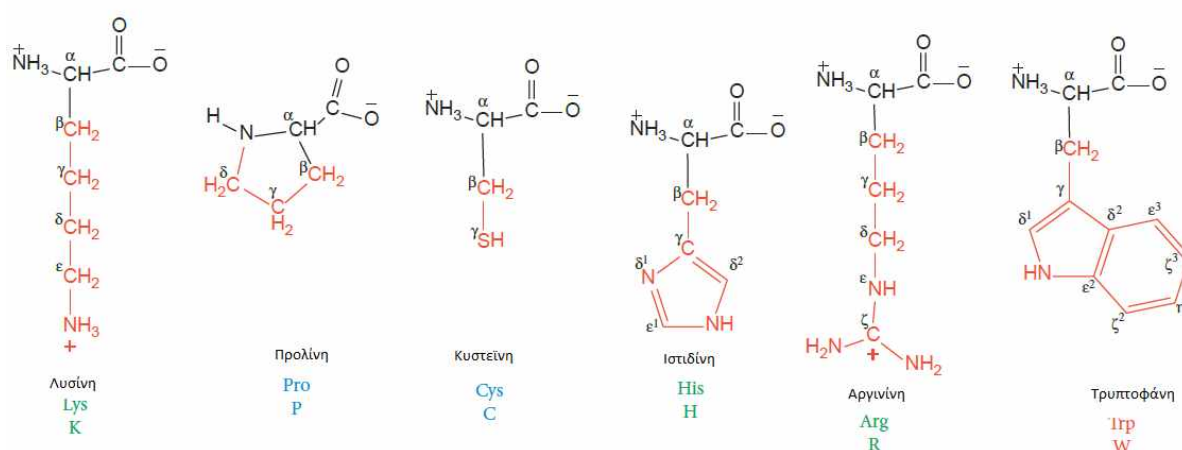
(δ) Η παρουσία μετάλλων (για παράδειγμα χαλκού ή σιδήρου καταλύει την αντίδραση)

(ε) Η δομή του σακχάρου (με σειρά δραστηριότητας)

- Πεντόζες > εξόζες > Δισακχαρίτες > Ολιγοσακχαρίτες).
- Επίσης από της κετόζες η φρουκτόζη είναι λιγότερο δραστική από την γλυκόζη(αλδόζες)
- α-δικαρβονυλικές ενώσεις .> αλδεΐδες > κετόνες > αναγωγικά σάκχαρα (Rufian-Henares et al., 2016).

1.4 Τα αντιδρώντα της MR

Οι αντιδράσεις Maillard είναι κοινές στα τρόφιμα, επειδή πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν τις πρωτεΐνες, κυρίως η λυσίνη και η προλίνη περιέχουν ελεύθερες αμινομάδες. Οι αντιδράσεις MR λαμβάνουν χώρα ευκολότερα με πρωτοταγείς αμίνες, όπως η αμινομάδα της λυσίνης από ότι με τις δευτεροταγείς αμίνες όπως η προλίνη.



Εικόνα 1.5 Αμινοξέα στην αντίδραση Maillard

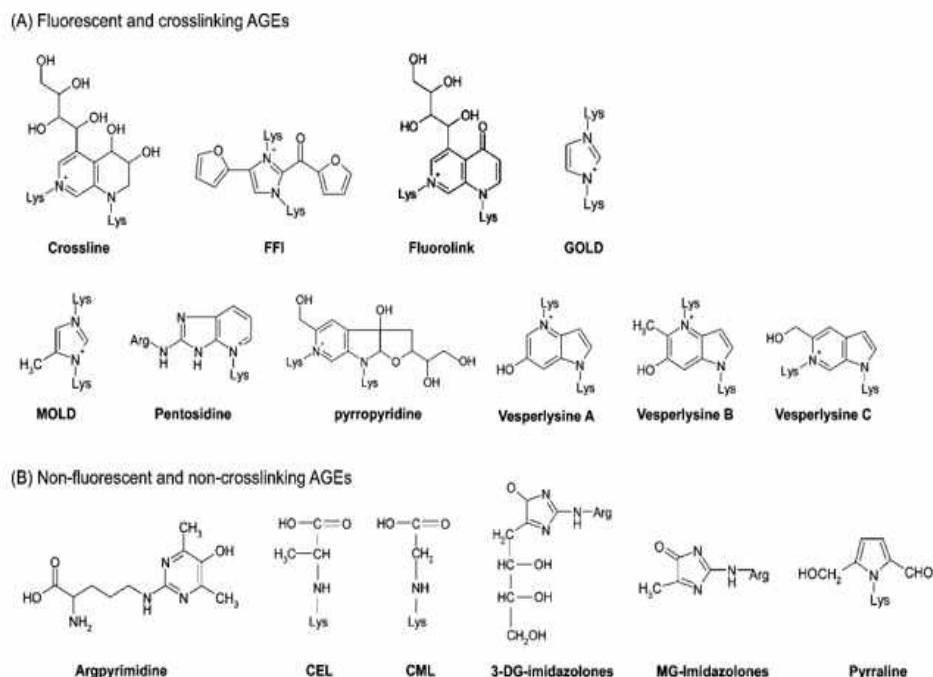
Ωστόσο μελέτες της αντίδρασης διάφορων καταλοίπων αμινοξέων με αναγωγικά σάκχαρα διαπίστωσαν υψηλή δραστικότητα των πλευρικών αλυσίδων επιπλέον των προηγούμενων αμινοξέων και της κυστεΐνης, ιστιδίνης καθώς και των αμινομάδων των *N*-τερματικών αμινοξέων πρωτεϊνών και πεπτιδίων (**Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015a**). Η τρυπτοφάνη σε πρωτεϊνικές ή πολυπεπτιδικές αλυσίδες δεν είναι ιδιαίτερα δραστική ενώ η ελεύθερη τρυπτοφάνη έχει καλή δραστικότητα (**Brady, 2013**). Το κατάλοιπο αργινίνης πολυπεπτιδίων ή πρωτεϊνών όπως και της λυσίνης μπορεί να υποστεί σημαντική τροποποίηση μέσω των MR. Ωστόσο επειδή η αργινίνη δεν είναι απαραίτητο αμινοξύ, η απώλειά της δεν είναι διατροφικά τόσο σημαντική όσο η απώλεια της λυσίνης. Η κυστεΐνη επίσης δεν μπορεί να συμμετέχει άμεσα στις MR, εντούτοις απελευθερώνει υδρόθειο κατά τη θερμική κατεργασία το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ενδιάμεσα προϊόντα της MR.

Εκ των σακχάρων, στις MR εμπλέκονται κυρίως η φρουκτόζη, η γλυκόζη και οι δισακχαρίτες λακτόζη και μαλτόζη και λιγότερο πεντόζες και γλυκοζιδικά συνδεδεμένα μόρια, όπως πολυφαινόλες, γλυκοζίτες, γλυκοπρωτεΐνες και σακχαρόζη που απαιτούν διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού (**Troise et al., 2019**). Η σχέση μεταξύ της δομής του σακχάρου και της επιδεκτικότητας στις MR έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο *in vivo* όσο και στα τρόφιμα (**Vistoli et al., 2013**). Παρόλο που η κυκλική μορφή των σακχάρων ευνοείται θερμοδυναμικά, η χημική δραστικότητα των μονοσακχαριτών σχετίζεται άμεσα με την αφθονία της ανοικτής αλυσίδας τους, η οποία κυμαίνεται από 0.0002% για τη γλυκόζη έως 0.7% για τη φρουκτόζη. Αυτό εξηγεί εύκολα γιατί η γλυκόζη, λόγω της σταθερότητας της μορφής πυρανόζης, είναι το λιγότερο δραστικό σάκχαρο, ενώ η φρουκτόζη της οποίας η κυκλική μορφή φουρανόζης είναι «κατά κάποιον τρόπο» λιγότερο σταθερή είναι περίπου 7,5 φορές πιο δραστική από τη γλυκόζη (**Vistoli et al., 2013**). Εκτός από την αφθονία της μορφής ανοικτής αλυσίδας, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την συμμετοχή στην αντίδραση Maillard περιλαμβάνουν το μήκος του σακχάρου και τη δραστικότητα των λειτουργικών ομάδων. Έτσι, οι αλδόζες είναι πιο δραστικές από τις κετόζες, επειδή η αλδεϋδομάδα είναι περισσότερο ηλεκτρονιόφιλη από την κετονομάδα (**Vistoli et al., 2013**).

1.5 Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (Advanced Glycation End-products) AGEs

Τα AGEs, δηλαδή τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης συνιστούν μια ετερογενή ομάδα ενώσεων που σχηματίζονται μέσω της MR μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων και των καρβονυλικών ομάδων των αναγωγικών σακχάρων ή και των λιπιδίων, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες ενότητες (Chen et al., 2018). Ο σχηματισμός των AGEs γίνεται *in vivo* και *in vitro* μέσα από μια σειρά μονοπατιών, όπως οι αντιδράσεις μεταξύ των προδρόμων AGEs και των προϊόντων Amadori, αλλά και μέσω της αποικοδόμησης της βάσης Schiff ή των προϊόντων Amadori (Qais et al., 2019).

Επιπρόσθετα, τα AGEs μπορούν να ομαδοποιηθούν σε φθορίζοντα και μη φθορίζοντα AGEs, καθώς και AGEs διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking) και μη (non-cross-linking). Ορισμένα AGEs εμφανίζουν ιδιότητες φθορισμού και διασταυρούμενης σύνδεσης, ενώ άλλα δεν παρουσιάζουν κανένα από τα αναφερόμενα χαρακτηριστικά (Nowotny et al., 2018) (Εικόνα 1.6). Τα AGEs διασταυρούμενης σύνδεσης αναφέρονται σε γλυκιωμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια ενώ γίνεται αναφορά και στα ελεύθερα AGEs τα οποία είναι ενώσεις γλυκιωμένων αμινοξέων με μικρά μόρια.



Εικόνα 1.6 Γνωστά AGEs με χαρακτηριστικά(φθορίζοντα και διασταυρούμενης σύνδεσης και μη φθορίζοντα-μη διασταυρούμενης σύνδεσης) (Wu et al.,2011)

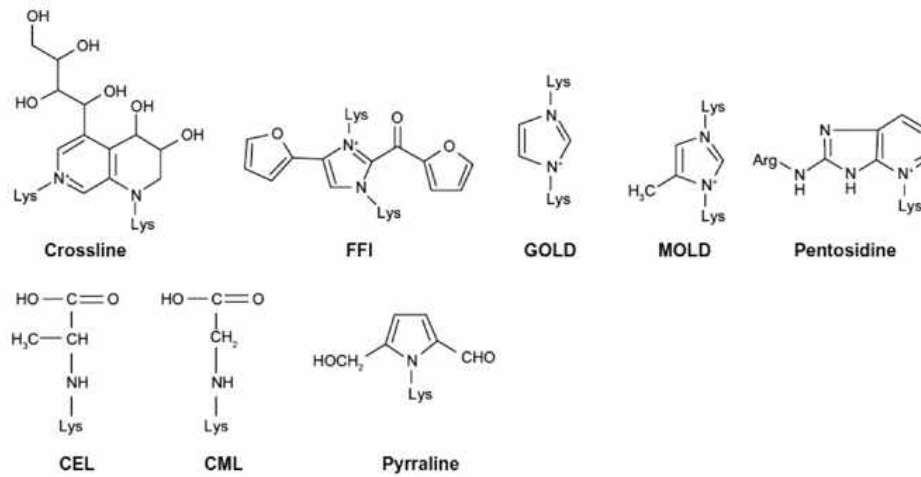
Τα AGEs μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε τοξικά ή μη. Έχει διαπιστωθεί ότι ενώσεις όπως η N^ε-καρβοξυμέθυλο-λυσίνη (CML), η N^ε-καρβοξυαίθυλο-λυσίνη (CEL) και η πυραλίνη είναι μη τοξικά AGEs σε αντίθεση με AGEs που συνήθως προέρχονται από γλυκεραλδεύδη ή γλυκολαλδεύδη που χαρακτηρίζονται ως τοξικά. Η δομή των τελευταίων δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί (Chen et al., 2018).

Τα AGEs έχουν ταυτοποιηθεί σε ιστούς, πλάσμα, ούρα και δάκρυα διαβητικών ασθενών, ενώ η συγκέντρωσή τους στο ανθρώπινο σώμα αυξάνεται με την ηλικία (Uribarri et al.; 2010). Εκτός από τα AGEs που σχηματίζονται εντός του σώματος, αυτή η κατηγορία ενώσεων έχει βρεθεί και στα τρόφιμα. Αναφορές υπάρχουν σχετικά με την παρουσία τους ακόμα και σε μη επεξεργασμένα (άψητα) ζωικά προϊόντα ενώ κυρίως τα AGEs σχηματίζονται κατά το μαγείρεμα των τροφίμων. Συγκεκριμένα, το ψήσιμο στη σχάρα, το μαγείρεμα σε κατσαρόλα ή στο φούρνο και το τηγάνισμα ευνοούν το σχηματισμό νέων AGEs, τα οποία χαρακτηρίζονται ως διατροφικά παραγόμενα Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (dAGEs) (Wei et al., 2018). Οι Zhu et al. (2011) διαπίστωσαν, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία φθορισμού ότι η συγκέντρωση των AGEs ήταν αυξημένη σε τρόφιμα θερμικά επεξεργασμένα. Με την ίδια τεχνική οι Fang et al. (2014) διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε AGEs σε τρόφιμα υψηλής υγρασίας (μήλο, ζύμη και κοκ) ήταν σχετικά χαμηλή, ενώ σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, όπως το γάλα, το γάλα σε σκόνη και το τηγανητό κοτόπουλο, ήταν σχετικά υψηλή.

1.6 Σχηματισμός Καρβοξυμέθυλο-λυσίνης (CML)

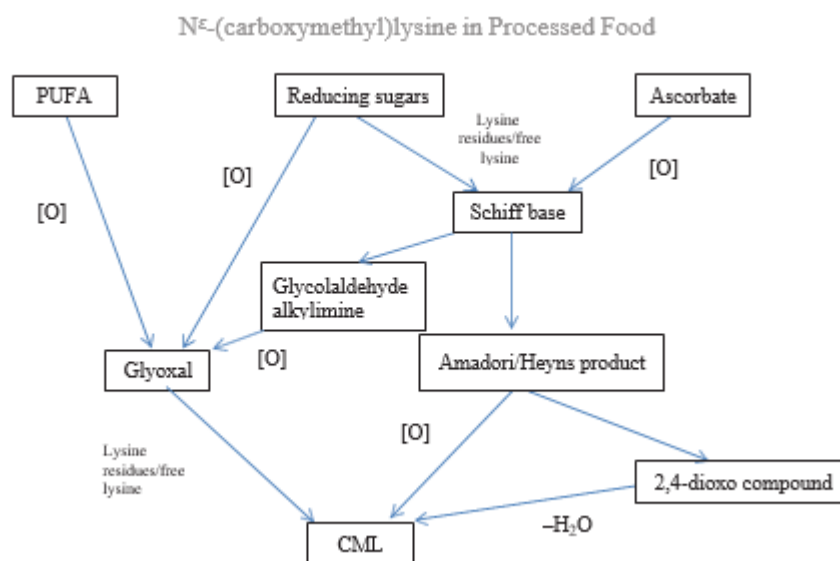
Ανάλογα με τη σύνθεση αλλά με και το μοριακό μέγεθος των πρόδρομων ενώσεων δημιουργούνται διαφορετικές ενώσεις της κατηγορίας των AGEs μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων που περιλαμβάνουν αφυδάτωση, κυκλοποίηση, ενολοποίηση, κατακερματισμό και οξείδωση. Για παράδειγμα, τέτοιες ενώσεις είναι η πυραλίνη, η πεντοσιδίνη, η N^ε-καρβοξυμέθυλο-λυσίνη (CML), η N^ε-καρβοξυαίθυλο-λυσίνη (CEL), τα παράγωγα της μεθυλογλυοξάλης (MG), η γλυοξάλη, η 3-δεοξυγλυκοζόνη (3-DG), καθώς και παράγωγα δισ(λυσιλ)ιμιδαζολίου, όπως το διμερές μεθυλογλυοξάλης-λυσίνης (MOLD) και το διμερές γλυοξάλης-λυσίνης (GOLD). Τα πιο κοινά AGEs στα τρόφιμα και στο ανθρώπινο πλάσμα, είναι

-μεταξύ άλλων- η πεντοσιδίνη, η φουροσίνη και η CML, η οποία θεωρείται η πιο διαδεδομένη (Chen et al 2018), και χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης για τον σχηματισμό AGEs στα τρόφιμα (Nguyen et al., 2014).



Εικόνα 1.7 Χημικές δομές κύριων AGEs (Kutlu et al.,2016)

Η CML είναι σταθερή και συναντάται σε δεσμευμένη μορφή. Για την δημιουργία της απαιτείται η αντίδραση της καρβονυλομάδας των αναγωγικών σακχάρων των προϊόντων οξείδωσής τους ή των προϊόντων υπεροξείδωσης των λιπιδίων με την ε-αμινομάδα υπολειμμάτων λυσίνης πεπτιδίων ή πρωτεϊνών. Σχετικά με τον σχηματισμό της ελεύθερης CML μέχρι στιγμής υπάρχει μικρός αριθμός μελετών. Ο σχηματισμός της CML στα τρόφιμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα (1.8), αποδίδεται μέσα από πέντε διαφορετικά μονοπάτια.



Εικόνα 1.8. Τα μονοπάτια σχηματισμού CML(προσαρμοσμένο σχήμα από Nguyen 2013)

1. Από την οξειδωση των προϊόντων Amadori ή Heyns. Σε αυτήν την περίπτωση, η φρουκτοζυλολυσίνη, η λακτουλοζυλολυσίνη, η ταγατοζυλολυσίνη, είναι προϊόντα Amadori όταν τα αναγωγικά σάκχαρα είναι η γλυκόζη, η λακτόζη και η γαλακτόζη αντίστοιχα. Σε αυτό το μονοπάτι η CML σχηματίζεται μέσω αφυδάτωσης των 2,4-διοξο-ενώσεων που παράγονται από τα προϊόντα Amadori, χωρίς την παρουσία κάποιου οξειδωτικού παράγοντα σε κανένα στάδιο.
2. Μέσω της οξειδωσης της γλυκόζης. Στο μονοπάτι αυτό η γλυοξάλη, αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν σχηματισμού της CML, που αντιδρά γρήγορα με κατάλοιπα λυσίνης, τα οποία βρίσκονται στις πρωτεΐνες και οδηγεί στον σχηματισμό της CML.
3. Μέσα από την οδό Namiki. Στο πλαίσιο των αντιδράσεων της οδού Namiki, το σάκχαρο διαχωρίζεται από την βάση Schiff προς σχηματισμό της γλυκολαλδεϋδης αλκυλιμίνη, η οποία στην πορεία οξειδώνεται σε γλυοξάλη και ακολουθεί ο σχηματισμός της CML όπως στην προηγούμενη περίπτωση. Ο σχηματισμός της CML ευνοείται κυρίως από αλδόζες και όχι τόσο από κετόζες. Η πιο δραστική από τις αλδόζες είναι η γαλακτόζη σε συστήματα λυσίνης-σακχάρου και καζεΐνης-σακχάρου.
4. Από την υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Είναι γνωστό ότι η γλυοξάλη μπορεί να παραχθεί και μέσω της υπεροξειδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, η οποία αντιδρά με κατάλοιπα λυσίνης που βρίσκονται στις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας CML.
5. Μέσω της αντίδρασης με ασκορβικό οξύ. Η CML επίσης, μπορεί να σχηματιστεί μέσω της αντίδρασης ασκορβικού οξέος και λυσίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες (pH και θερμοκρασίας) αλλά και παρουσία αέρα. Η αντίδραση ξεκινά με τον κατακερματισμό του δεϋδροασκορβικού οξέος σε L-θρεόζη.

Μπορεί η CML να αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα AGEs, ωστόσο υπάρχουν κενά σε ό,τι αφορά την CML που παράγεται από την διατροφή. Μάλιστα, είναι ευρέως διαδεδομένο ότι η παραγόμενη στα τρόφιμα CML συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων CML στον ανθρώπινο οργανισμό (Nguyen et al., 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Αναστολή των AGEs

Όπως προαναφέρθηκε υψηλές συγκεντρώσεις AGEs στους ιστούς δύναται να προκαλέσουν πληθώρα διαταραχών αλλά και τις αντίστοιχες επιπλοκές τους όπως για παράδειγμα η νόσος Alzheimer, ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, η νεφρική και η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια (Starowicz et al., 2019).

Για να αντιμετωπιστεί η επιβλαβής τους δράση τόσο στην υγεία, όσο και στην γήρανση έχουν προταθεί: ο περιορισμός τους στη διατροφή, η μεσογειακή διατροφή, η παρεμπόδιση του σχηματισμού τους μέσω της χρήσης αντιοξειδωτικών ενώσεων (πολυφαινόλες) αλλά και η χρήση αναστολέων AGEs (Nowotny et al., 2018). Πρόσφατα το ενδιαφέρον στράφηκε σε παράγοντες που παρουσιάζουν αντι-γλυκαντική δράση. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να διαδραματίσουν βασικό ρόλο τόσο στην πρόληψη όσο και στη βελτίωση των προβλημάτων υγείας που προκαλούνται από τα AGEs. Επί του παρόντος οι γνωστοί αναστολείς μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες : τους συνθετικούς και τους φυσικούς αναστολείς (Velichkova et al., 2021).

Και στις δύο κατηγορίες ανήκουν ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)-, οι οποίες με τη σειρά τους υποβοηθούν στην παθολογική ανάπτυξη πολλών σημαντικών ασθενειών (διαβήτη, καρδιαγγειακές ασθένειες, κ.α.). Οι ενώσεις αυτές δρουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μέσω μηχανισμών δέσμευσης ελεύθερων ριζών ή με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής κατάστασης, αντίστοιχα (Gonzales-Burgos & Gomez-Serranillos., 2012).

2.2 Συνθετικοί αναστολείς

Στους κύριους μηχανισμούς αναστολής AGEs περιλαμβάνονται η αναστολή του σχηματισμού ROS, η αναγωγή των ενεργών καρβονυλικών ενώσεων, η προστασία της δομής της πρωτεΐνης καθώς και η αποδόμηση των AGEs. Η αμινογουανιδίνη, είναι το πρώτο φάρμακο με κλινική θεραπευτική ικανότητα ενάντια

στα AGEs. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον σχηματισμό τους αφού μπορεί να παγιδεύει την καρβονυλική ομάδα των προϊόντων Amadori αλλά και την περαιτέρω αναδιάταξή τους μέσω πυρηνόφιλων αντιδράσεων προσθήκης. Επιπλέον η αμινογουανιδίνη μπορεί να συνδεθεί με ενεργά ενδιάμεσα προϊόντα α-δικαρβονυλίου σχηματίζοντας τριαζίνες οι οποίες εμποδίζουν τον μετασχηματισμό των προϊόντων Amadori σε AGEs. Από την άλλη πλευρά η αμινογουανιδίνη εμφανίζει σημαντικές παρενέργειες που έχουν περιορίσει τις κλινικές της εφαρμογές όπως για παράδειγμα γαστρεντερικά συμπτώματα, γρίπη, λύκο αλλά και την προώθηση της οξειδωσης (C. Luevano-Contreras et al., 2010).

Άλλοι συνθετικοί αναστολείς όπως οι ALT-711, ALT-486, ALT-462 και ALT-TRC4186 έχουν την ικανότητα να αφαιρούν τους υπάρχοντες δεσμούς άνθρακα-άνθρακα μεταξύ καρβονυλικών ομάδων μεταθέτοντας έτσι τα προϊόντα με σταυροδεσμούς. Επιπρόσθετα άλλοι συνθετικοί αναστολείς όπως η μετμορφίνη και οι αναστολείς του ενζύμου της αγγειοτενσίνης μπορούν με τη σειρά τους να αναστείλουν τον σχηματισμό των AGEs (C.G. Schalkwijk et al., 2012; Song et al., 2021). Ωστόσο λόγω ανεπιθύμητων παρενεργειών, οι συνθετικοί αναστολείς δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται μακροπρόθεσμα. Η έρευνα πλέον στρέφεται στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων που μπορούν να αναστείλουν τον σχηματισμό των AGEs εμφανίζοντας υψηλή δραστηριότητα ενώ παράλληλα θα είναι και ασφαλή (Song et al., 2021).

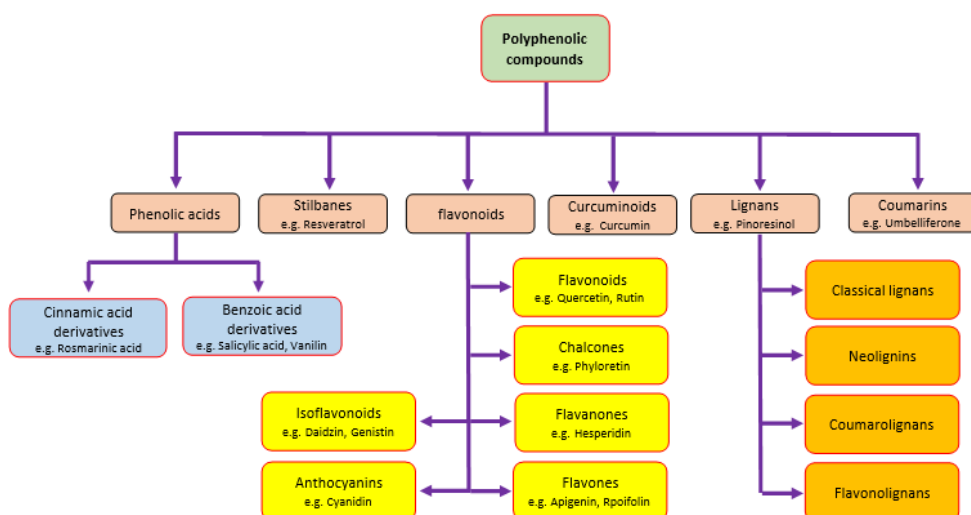
2.3 Φυσικοί αναστολείς

Οι φυσικοί αναστολείς μπορούν να επιδείξουν διάφορους αντιγλυκαιμικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων της βελτίωσης του οξειδωτικού στρες, την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αλλά και διάφορων επιδράσεων στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παρόλα αυτά, η δράση των φυσικών αναστολέων δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά όσο των συνθετικών. Μέχρι στιγμής, έχουν αξιολογηθεί ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα και τα φαινολικά τους συστατικά ως προς τη δράση τους κατά του σχηματισμού των AGEs αλλά και για την αντιοξειδωτική τους δράση. Επιπλέον, έχει γίνει αναφορά σε διάφορα φυτικά προϊόντα σχετικά με την δράση τους στην πρόληψη και την θεραπεία διάφορων παθολογικών ασθενειών στο ανθρώπινο σώμα. Για παράδειγμα διάφορα κλάσματα φυτικών εκχυλισμάτων έχουν δοκιμαστεί σε

μεγάλο βαθμό για την αναστολή του σχηματισμού των AGEs (Velichkova 2021). Οι φυσικοί αναστολείς διακρίνονται σε έξι κατηγορίες με βάση την δομή τους: πολυφαινόλες, τερπενοειδή, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, αλκαλοειδή και πεπτίδια (Song et al., 2021).

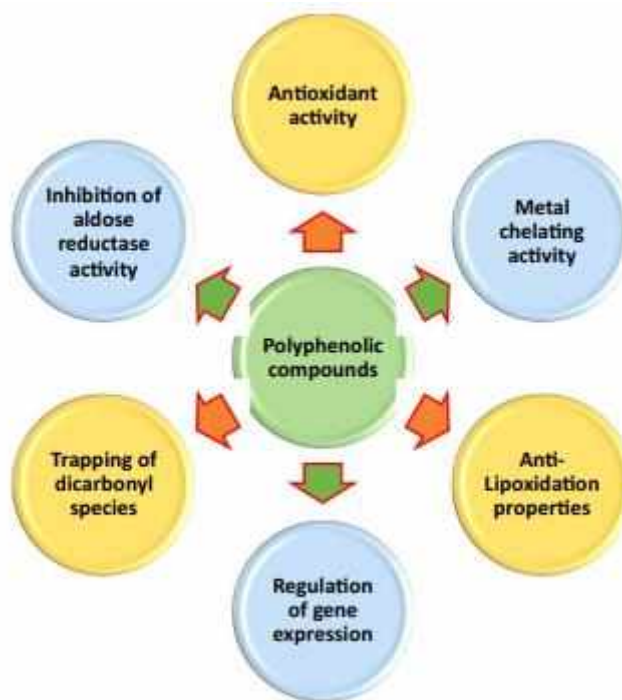
2.3.1 Φαινολικές ενώσεις στην αναστολή των AGEs

Οι φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια, κουρκουμίνη) είναι μια ομάδα ενώσεων η οποία έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό ως προς την αναστολή σχηματισμού των AGEs. Συνήθως απαντώνται σε αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά καθώς και σε άλλες φυτικές πηγές και σε συνδυασμό και με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις διαδραματίζουν υψηλό ανασταλτικό ρόλο (Ulibarri et al., 2015; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015).



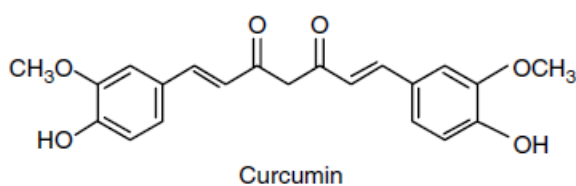
Εικόνα 2.1. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Anwar et al., 2021)

Οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν το σχηματισμό των AGEs με διάφορους μηχανισμούς. Έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν τη γλυκόζη, να ανασχέουν την δράση της αναγωγάσης της αλδόζης, να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και δραστικές καρβονυλικές ενώσεις και να δρουν ως χηλιωτικοί παράγοντες δημιουργώντας σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων κ.α. (Anwar et al., 2021).



Εικόνα 2.2. Μηχανισμοί φαινολικών ενώσεων ως προς το σχηματισμό των AGEs (Anwar et al., 2021)

Για παράδειγμα, η κουρκουμίνη έχει τη ικανότητα να παγιδεύει ενεργές δικαρβονυλικές ενώσεις όπως την MGO (μεθυλογλυοξάλη) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης κουρκουμίνης-MGO στη θέση του άνθρακα 10, μεταξύ ομάδων δικετόνης και έτσι να αναστέλλεται ο σχηματισμός AGEs (Song et al., 2021). Επιπλέον παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο σχηματισμό γλυοξάλης (GO) από πολυφαινόλες η οποία αποδόθηκε στην ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τις υπό μελέτη ενώσεις. Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται τη λυσίνη και την αργινίνη αναστέλλοντας με αυτόν το τρόπο το σχηματισμό των AGEs (Khan et al., 2020). Ορισμένες πολυφαινόλες δεσμεύουν περισσότερο MGO από ότι η αμινογουανιδίνη (Thornalley et al., 2003). Τέλος, η κατεχόλη επίσης έχει ικανότητα συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων (Song et al., 2021).



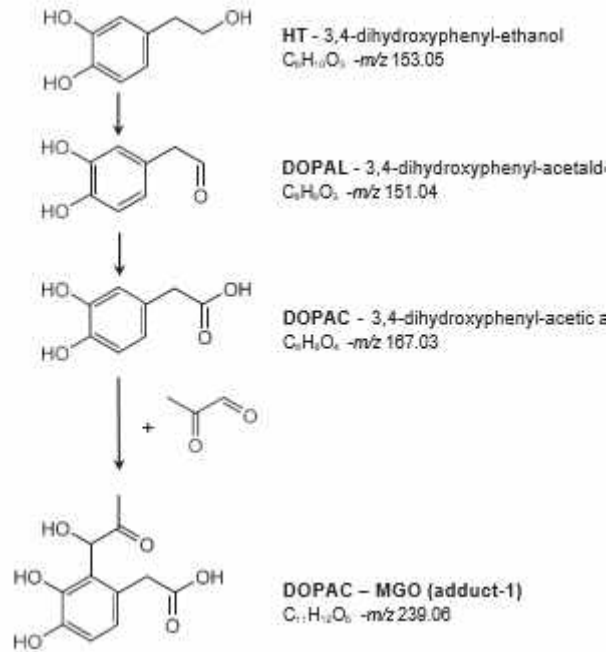
Η υδροξυτυροσόλη (HT, 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο-αιθανόλη)) είναι μια ορθο-διφαινολική ένωση, σεκοϊριδοειδές παράγωγο, η οποία βρίσκεται στη διατροφή μας αλλά και σε φαρμακευτικά σκευάσματα, σε ελεύθερη μορφή ή ως οξικός εστέρας. Αποτελεί επίσης βασικό συστατικό της ελευρωπαίνης που απαντάται στο ελαιόλαδο αλλά και στα απόβλητα ελαιουργείων σε μεγάλες ποσότητες. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η χημική δομή της HT και του οξικού εστέρα της HT (HTA)



Εικόνα 2.4. Χημική δομή της υδροξυτυροσόλης HT(a) και του οξικού εστέρα της υδροξυτυροσόλης HTA(b) (Navarro & Morales, 2016)

Η HT έχει συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριδιακές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές κ.α. δράσεις (Navarro & Morales, 2016).

Οι Navarro and Morales, 2015 σε *in vitro* πειράματα, διαπίστωσαν ότι η υδροξυτυροσόλη (HT, 3,4-dihydroxyphenylethanol) ανταγωνίζεται τις: λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη στη δέσμευση δικαρβονυλικών ενώσεων με αποτέλεσμα την ανάσχεση σχηματισμού φθοριζουσών πρωτεϊνικών παραγώγων. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό (Εικόνα 2.5) η HT οξειδώνεται σε DOPAC το οποίο αντιδρά με την MGO με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Το προϊόν προσθήκης που σχηματίζεται monoDOPAC-monoMGO, είναι πιθανό να βρίσκεται σε μείγμα δύο ταυτομερών μορφών.



Εικόνα 2.5. Προτεινόμενος μηχανισμός δέσμευσης της MGO από την HT (Navarro & Morales 2015)

Επίσης η HT και ο οξικός εστέρας της HT (HTA) παρεμποδίζουν τη δημιουργία των προϊόντων Amadori, δρουν παρεμποδιστικά σε όλα τα στάδια της γλυκίωσης των πρωτεϊνών ανασχώντας το σχηματισμό της CML και της AgrP (argpyrimidine) (Navarro & Morales, 2016). Έτσι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη γλυκίωση δημιουργώντας μονομερή και διμερή προϊόντα προσθήκης. Συμπερασματικά η ικανότητα ανάσχεσης των φυσικών αναστολέων των AGEs συνδέεται με την ικανότητά τους να παγιδεύουν τις δραστικές δικαρβονυλικές ενώσεις όπως τις MGO, GO και 3-DG οδηγώντας στην δημιουργία μονομερών και διμερών προϊόντων προσθήκης (Khan et al., 2020).

2.3.2 Οι τερπενοειδείς ενώσεις στην αναστολή των AGEs

Τα τερπενοειδή είναι μια ομάδα φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνει ποικίλες ενώσεις οι οποίες διαφέρουν τόσο στην δομή όσο και στην λειτουργία τους. Έχει αποδειχθεί ότι μερικά από αυτά μπορούν να μειώσουν τον σχηματισμό των AGEs. Για παράδειγμα τα πεντακυκλικά τριτερπενοειδή (φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες), τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα σε διάφορα φυτά όπως η βρώμη και το πράσινο τσάι έχουν πολλές βιολογικές δράσεις συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντιυπεργλυκαιμικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων. Μερικές από

τις πιο μελετημένες ενώσεις ως και σήμερα είναι το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ (Song et al., 2021). Τα φυσικά αυτά απαντώντα τριτερπενοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και χρόνια ως αντιβακτηριδιακά και αντιφλεγμονώδη ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αντικαρκινικές ιδιότητες τους (Wu et al., 2021).

Άλλη μια κατηγορία τερπενοειδών, τα ιριδοειδή στα οποία περιλαμβάνονται και τα μονοτερπένια είναι ευρέως διαδεδομένα στα φαρμακευτικά φυτά. Ένα παράδειγμα της κατηγορίας αυτής είναι το Aucubin το οποίο έχει διάφορες βιολογικές δραστηριότητες (αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπει τον σχηματισμό των AGEs ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται και για την θεραπεία χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με τα AGEs. Τρέχουσες μελέτες που έχουν λάβει χώρα έχουν δείξει ότι ενώ τα τερπενοειδή έχουν εξαιρετικά αντιγλυκαντικά αποτελέσματα αλλά δεν έχουν πραγματοποιηθεί επαρκείς μελέτες όσον αφορά τα αντιγλυκαιμικά τους αποτελέσματα. Ως εκ τούτου τα τερπενοειδή χρήζουν μελλοντικής μελέτης (Song et al., 2021)

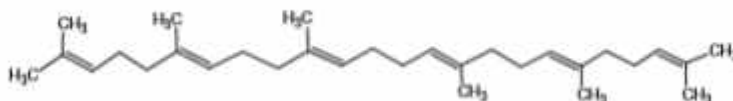
Τέλος, όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, ο προστατευτικός ρόλος των τερπενίων στην οξείδωση εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους στο μέσο διότι φαίνεται να εμφανίζουν προ οξειδωτική συμπεριφορά σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ σε χαμηλές δρουν ως αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των τερπενοειδών υδρογονανθράκων έχει προταθεί ότι είναι κυρίως το αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ αλυσίδων που φέρουν υδροϋπεροξειδικές ρίζες ($\text{HOO}\cdot$) με λινελαϋλικές ρίζες υπεροξυλίου $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8]$. Η αντίδραση προκαλεί τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης οξείδωσης και αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό στην αναστολή του οξειδωτικού στρες και τον επακόλουθο σχηματισμό AGEs (Graßmann et al., 2005).

Το σκουαλένιο (Sq) είναι ένα λιπόφιλο βιομόριο που ανήκει στη χημική κατηγορία των τριτερπενίων. Σχηματίζεται από έξι μονάδες ισοπρενίου, επομένως, είναι μια ισοπρενοειδής ένωση 30 ατόμων άνθρακα με έξι διπλούς δεσμούς ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$). Πιο συγκεκριμένα το Sq είναι άοσμο και άχρωμο υγρό. (Micera et al., 2020). Η πιο γνωστή πηγή σκουαλενίου είναι το έλαιο από συκώτι καρχαρία. Στα φυτικά έλαια, το Sq είναι ευρέως διαδεδομένο. Περιέχεται στα φυστίκια, στην κολοκύθα και στο ελαιόλαδο. Το τριτερπένιο αυτό έχει επίσης βρεθεί ότι έχει

προστατευτική δράση έναντι αρκετών καρκινογόνων παραγόντων (Amarowicz et al., 2009).

Το 90% του κλάσματος υδρογονανθράκων στο ελαιόλαδο αποτελείται από σκουαλενίου (Tsimidou, 2010). Η υψηλή ποσότητα σκουαλενίου που βρίσκεται στο ελαιόλαδο, το καθιστά καλή πηγή ανθρώπινης κατανάλωσης και σε συνδυασμό με φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο, ενισχύεται η αντιοξειδωτική δράση του τελευταίου. Τα επίπεδα σκουαλενίου στο παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνονται από 200 έως 7500 mg kg⁻¹ και μπορούν να φτάσουν στο ανώτερο επίπεδο των 12000 mg kg⁻¹ (Tsimidou, 2010)

Επιπλέον το S_q αποτελεί πρόδρομη ένωση της χοληστερόλης στα ζωικά κύτταρα και πρόδρομη ένωση των φυτοστερολών στα φυτικά κύτταρα. Ως ενδιάμεσο προϊόν στη βιοσύνθεση στερολών, το S_q διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες τονίζουν τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις του S_q, πιθανώς λόγω των μοριακών του ιδιοτήτων που συνδέονται άμεσα με τη δράση του έναντι των ελεύθερων ριζών. (Micera et al., 2020)



Εικόνα 2.5. Χημική δομή σκουαλενίου (Amarowicz 2009)

2.3.3 Βιταμίνες ως αναστολείς των AGEs

Οι βιταμίνες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου σώματος αλλά έχουν και ένα ρόλο κλειδί στο μεταβολισμό. Μερικές από τις βιταμίνες που εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), E (α-τοκοφερόλη) και η πυριδοξαμίνη (Rahbar et al., 2003; Song et al., 2021).

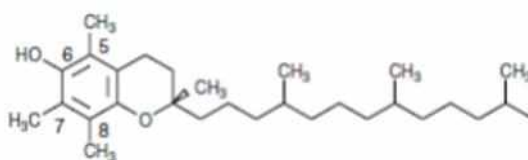
Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη η οποία βρίσκεται σε πληθώρα φρούτων και λαχανικών. Λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης προστατεύει το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και μειώνει τις οξειδωτικές βλάβες. Επίσης, μπορεί

εύκολα να σχηματίσει σύμπλοκα με πρωτεΐνες και έτσι μπορεί να δεσμεύει ανταγωνιστικά πρωτεΐνες με σκοπό να διασφαλίσει την προστασία της φυσιολογικής τους δομής. Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανταγωνίζεται τη γλυκόζη ως προς τη δέσμευση με τις πρωτεΐνες, οδηγώντας έτσι στην μείωση της παραγωγής AGEs *in vitro*. Τέλος, μπορεί επίσης να αναστέλλει το μονοπάτι της σορβιτόλης μειώνοντας την παραγωγή φρουκτόζης, ενός εξαιρετικά ενεργού σακχάρου στη γλυκίωση, σε διαβητικούς ασθενείς (Mazumder et al., 2019; Song et al., 2021).

Η πυριδοξαμίνη ανήκει στην οικογένεια των βιταμινών Β6 με πολλαπλές δράσης συμπεριλαμβανομένων της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών αλλά και της συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων. Σήμερα, χρησιμοποιείται ευρέως ως αναστολέας της γλυκίωσης. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι έχει πολύ καλή δράση και είναι πολύ πιο ασφαλής σε σύγκριση με την αμινογουανιδίνη που αναφέρθηκε στην αρχή του Κεφαλαίου 2 (Chen et al., 2012; Voziyan et al., 2005; Song et al., 2021).

Η βιταμίνη Ε είναι και αυτή με τη σειρά της μια λιποδιαλυτή ένωση με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που συναντάται κυρίως σε φρούτα, λαχανικά αλλά και ξηρούς καρπούς. Στο σύμπλεγμα των βιταμινών Ε περιλαμβάνονται οκτώ ομόλογες ενώσεις (παρόμοιας δομής και βιολογικής δράσης), οι οποίες χαρακτηρίζονται από αναγωγική δράση. Από τα οκτώ ενώσεις, η α-τοκοφερόλη (α-toc) είναι η περισσότερο άφθονη, διαδεδομένη αλλά και η πιο δραστική μορφή στη φύση (Song et al., 2021; Rizvi et al., 2014; Liu et al., 2015).

Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα των τοκοφερολών ανήκουν οι τέσσερις χημικές δομές της α-,β-,γ- και δ-τοκοφερόλης. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι ο υδροξυλιωμένος δακτύλιος (δακτύλιος χρωμανόλης) με μια αλυσίδα φυτόλης. Η διαφορά στη δομή των τεσσάρων τοκοφερολών εντοπίζεται στο μοτίβο της μεθυλίωσης του δακτυλίου της χρωμανόλης (Brandy 2013).



Εικόνα 2.6 Χημική δομή α-τοκοφερόλης (Brandy 2013)

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη Ε παρουσιάζει υψηλή ανασταλτική δράση. Η ουσία αυτή έχει την δυνατότητα να αντιστέκεται στην

υπεροξειδωση των λιπιδίων, να αποτρέπει την γλυκίωση της αιμοσφαιρίνης αλλά και να αναστέλλει τον σχηματισμό των AGEs *in vitro* (Song et al., 2021). Τέλος, ένας συνδυασμός μεταξύ βιταμίνης C και E παρουσιάζει πολύ υψηλότερη ανασταλτική δράση έναντι της γλυκίωσης αλλά και της συσσώρευσης AGEs από ότι η κάθε ουσία ξεχωριστά (Song et al., 2021).

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρεις ενώσεις που αναφέρθηκαν αναλυτικά παραπάνω (α-τοκοφερόλη, το σκουαλένιο και η υδροξυτυροσόλη) ως προς τον ρόλο τους στην γλυκίωση της λυσίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Μέθοδοι ανάλυσης AGEs

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση των AGEs μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, στις ενόργανες μεθόδους ανάλυσης και στις αναλύσεις ανοσοπροσδιορισμού.

Οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης περιλαμβάνουν την αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδυαζόμενη με διάφορους ανιχνευτές όπως για παράδειγμα τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD), τον ανιχνευτή φθορισμού (FLD) αλλά και την φασματομετρία μάζας (MS) και την διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS). Η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανοσοπροσδιορισμού είναι η ELISA κατά την οποία χρησιμοποιείται ένζυμο ομοιοπολικά συνδεδεμένο με αντιγόνο ή αντίσωμα (Wei et al., 2018).

3.1.1 Φθορισμός

Η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, είτε υπό μορφή θερμότητας είτε με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Τόσο ο φθορισμός όσο και ο φωσφορισμός αποτελούν δύο τύπους της φωτοφωταύγειας που διαφοροποιούνται σε σχέση με τη φύση των βασικών και διεγερμένων καταστάσεων.

Ειδικότερα, η φωτοφωταύγεια χαρακτηρίζεται από μια διαδικασία διέγερσης των ηλεκτρονίων λόγω των μαγνητικών τους ιδιοτήτων. Τα διαμαγνητικά άτομα, δηλαδή τα άτομα που έχουν μόνο συζευγμένα ηλεκτρόνια και βρίσκονται σε απλή κατάσταση, εφόσον τοποθετηθούν σε μαγνητικό πεδίο, δεν υπάρχει κανένας διαχωρισμός ενεργειακών σταθμών και επιπλέον, το συνολικό spin είναι μηδέν. Από την άλλη πλευρά, τα παραμαγνητικά άτομα, δηλαδή τα άτομα που περιέχουν ασύζευκτα ή μονήρη ηλεκτρόνια, εμφανίζουν μαγνητικό πεδίο.

Ο φθορισμός προκύπτει από την απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, σε ένα φαινόμενο κατά το οποίο το ηλεκτρόνιο διεγείρεται αφού απορροφηθεί η ακτινοβολία, χωρίς να αλλάξει το spin, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια βραχεία διεγερμένη κατάσταση (Skoog et al., 2007). Σε αντίθεση, όσον αφορά τον φωσφορισμό, η διεγερμένη κατάσταση των ηλεκτρονίων ακολουθείται από αλλαγή του spin και παρουσιάζει αυξημένη διάρκεια, σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

3.1.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό

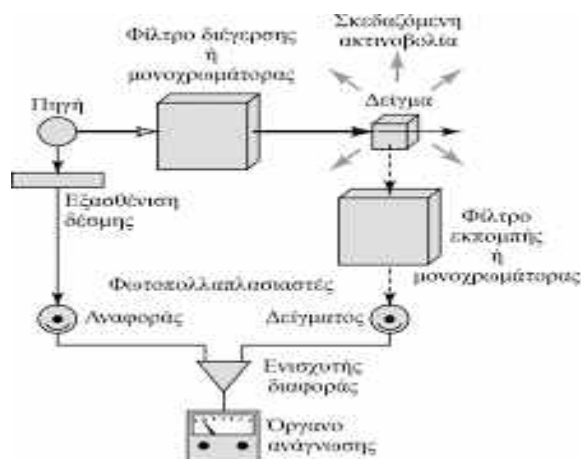
Προκειμένου ένα μόριο να απορροφά ακτινοβολία UV ή Vis, προϋποτίθεται η μελέτη της δομής του. Δομές που ευθύνονται για τον φωσφορισμό ή φθορισμό, είναι οι χημικές ενώσεις, κατά τις οποίες ηλεκτρόνια με χαμηλή ενέργεια μεταπίπτουν σε π^* . Οι ενώσεις με αρωματικούς δακτυλίους χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερης έντασης φθορισμό σε σχέση με τις αλειφατικές ενώσεις. Στην περίπτωση των ετεροκυκλικών ενώσεων δεν παρατηρείται φθορισμός.

Επιπλέον, η ποσοτική σχέση μεταξύ εντάσεως φθορισμού ή φωσφορισμού και συγκεντρώσεως επηρεάζεται από έναν άλλον παράγοντα, ο οποίος προκύπτει από τον νόμο του Beer και ονομάζεται συντελεστής κβαντικής απόδοσης. Ο συντελεστής αυτός ορίζεται ως η αναλογία του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων. Συνεπώς, η τιμή φθορισμού του μορίου είναι υψηλή όταν πλησιάζει την τιμή 1, ενώ αντίθετα μια χαμηλή τιμή φθορισμού προκύπτει από ένα μόριο με πολύ χαμηλό συντελεστή κβαντικής απόδοσης. Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει το φθορισμό είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι σε πολύ αραιά διαλύματα η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας. Τέλος, υπάρχουν ζώνες διέγερσης και εκπομπής για τις διαφορετικές φθορίζουσες ενώσεις.

3.1.1.2 Φθορισμόμετρα

Τα φασματοφωτόμετρα όπως και τα όργανα μέτρησης φθορισμού ή φωσφορισμού έχουν αρκετά κοινά σημεία. Συνήθως αποτελούνται από μια πηγή

φωτός, μια λυχνία υδραργύρου που εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με εύρος μηκών κύματος μεταξύ 250 – 780nm. Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται, ανιχνεύεται και γίνεται ψηφιακή καταγραφή. Η κύρια διαφορά σε σχέση με τα φασματοφωτόμετρα είναι τα φίλτρα επιλογής μήκους κύματος διέγερσης κι εκπομπής.



Εικόνα 3.1. Αρχή λειτουργίας φθορισμομέτρου

3.1.1.3 Προσδιορισμός των AGEs στα τρόφιμα μέσω φθορισμομετρίας

Κατά τη μέτρηση των AGEs χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία φθορισμού, το υπεριώδες και το μπλε-ιώδες φως που εκπέμπεται από λάμπα υδραργύρου υψηλής τάσης ή λάμπα ξένου ακτινοβολείται στο δείγμα μέσω φίλτρων, προκαλώντας τις φθορίζουσες ενώσεις στα δείγματα να εκπέμπουν φθορισμό. Αφού ανακλαστεί ο φθορισμός, οδηγείται στον φωτοανιχνευτή και στη συνέχεια εμφανίζεται σε ψηφιακή μορφή.

Στη φασματοσκοπία φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης για την κατηγορία των AGEs είναι γενικά μεταξύ 300nm και 420nm και το μήκος κύματος εκπομπής είναι μεταξύ 350nm και 600 nm. Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι σχετικά εύκολη στη λειτουργία, έχει υψηλή ευαισθησία, αλλά χαρακτηρίζεται από έλλειψη εξειδίκευσης με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται μια ομάδα ενώσεων που ανήκουν στα AGEs, παρά ένας συγκεκριμένος εκπρόσωπος (Wei et al., 2018b).

3.2 Φασματομετρία ορατού-υπεριώδους (UV/Vis)

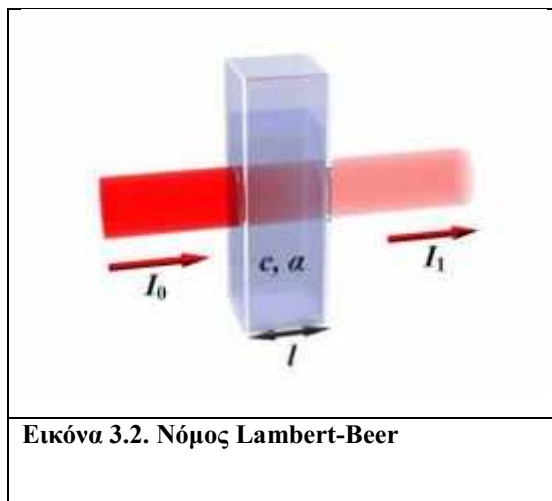
Η φασματομετρία Uv-Vis αποτελεί μια τεχνική για τη μέτρηση της συγκέντρωσης χημικών ενώσεων και η οποία βασίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Η φασματομετρία είναι μια μέθοδος ανάλυσης που εφαρμόζεται εύκολα και γρήγορα, έχοντας μεγάλη ευαισθησία και χαμηλό κόστος. Κατά την διαδικασία όταν το φως προσπίπτει σε ένα διάλυμα μιας ουσίας γίνεται επιλεκτική απορρόφηση. Αυτό σημαίνει ότι απορροφούνται αποκλειστικά ακτινοβολίες, στις οποίες τα φωτόνια παρουσιάζουν ίση ενέργεια με την ενέργεια που απαιτείται έτσι ώστε η ουσία να μεταβεί σε στάθμη υψηλότερης ενέργειας.

3.2.1 Απορρόφηση – Νόμος Lambert-Beer

Για τη φασματοσκοπία ορατού και υπεριώδους το δείγμα-διάλυμα τοποθετείται, συνήθως, σε διάφανες κυψελίδες (cuvettes) με επίπεδες επιφάνειες κατασκευασμένες από υλικό προσαρμοσμένο στις παραμέτρους της μέτρησης (χαλαζίας και γυαλί για την υπεριώδη και την ορατή περιοχή, αντίστοιχα). Το μήκος (l) της κυψελίδας αποτελεί το μήκος της διαδρομής που διανύει η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο εξεταζόμενο δείγμα-διάλυμα.

Η ανάλυση μιας ουσίας με τη χρήση φασματοφωτομετρίας απαιτεί απορρόφηση του φωτός και η απορρόφηση αυτή να διαφοροποιείται από εκείνη που οφείλεται σε άλλες ουσίες του δείγματος. Επειδή οι περισσότερες ουσίες απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία, οι μετρήσεις σε αυτή τη φασματική περιοχή δεν ευνοούν πάντα και γι' αυτό η ανάλυση περιορίζεται στην ορατή περιοχή του φάσματος. Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν άλλες ουσίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η απορρόφηση στο υπεριώδες. Επομένως, με τη χρήση λάμπας δευτερίου ή βολφραμίου για τις περιοχές υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας, αντίστοιχα εκπέμπεται μονοχρωματική ακτινοβολία έντασης (I_0) η οποία διέρχεται μέσα από διάλυμα που περιέχει ουσία, συγκέντρωσης (c), που απορροφά (Εικόνα 3.2). Η ένταση της ακτινοβολίας ελαττώνεται σταδιακά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω της απορρόφησής της από την ουσία. Τέλος η μείωση της έντασης εξαρτάται από τη

συγκέντρωση της ουσίας και από την απόσταση που διανύει η ακτινοβολία μέσα στο διάλυμα.



Ο νόμος **Lambert-Beer** εκφράζεται μέσα από τη μαθηματική γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης όπως φαίνεται παρακάτω:

$$I = I_0 \cdot e^{-alc} \xleftrightarrow{\varepsilon = a \cdot M_r} I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon lc} \quad (1)$$

ή ισοδύναμα

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\varepsilon lc \quad (2)$$

όπου ο λόγος $T = I/I_0$ (διαπερατότητα) καθορίζει το ποσοστό διέλευσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (I_0) από το διάλυμα και λαμβάνει τιμές από 0 έως 1. Συνήθως όμως, χρησιμοποιείται ο δεκαδικός λογάριθμος του I/I_0 μέσω του οποίου ορίζεται η **απορρόφηση A**:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

όπου I , η ισχύς της ακτινοβολίας, I_0 , η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, a , απορροφητικότητα όταν η συγκέντρωση, c , του διαλύματος εκφράζεται σε g/L ε , ο μοριακή απορροφητικότητα με διαστάσεις [$L/mol \cdot cm$] και M_r , η μοριακή μάζα της ουσίας).

Με βάση λοιπόν τον νόμο Lambert-Beer προκύπτει ότι η απορρόφηση εξαρτάται γραμμικά από την συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα. Συνεπώς μέσω αυτής της εξίσωσης μπορεί εύκολα να μετρηθεί η συγκέντρωση μιας ουσίας εφόσον είναι γνωστή η τιμή της απορρόφησης.

3.2.2 Αποκλίσεις Νόμου Lambert-Beer

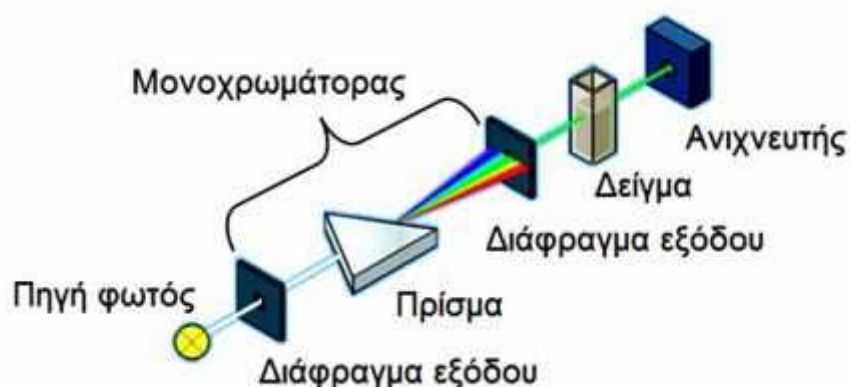
Μία πολύ σημαντική παράμετρος, που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις εφαρμογές της φασματομετρίας είναι η συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση της ακτινοβολίας. Η συγκέντρωση της ουσίας θα πρέπει να έχει χαμηλή τιμή διότι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερη απορροφητικότητα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Άλλες παράμετροι που δύναται να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την εφαρμογή του νόμου **Lambert-Beer** είναι αυτές που αφορούν στα όργανα μέτρησης και είναι οι διακυμάνσεις στην τάση του ρεύματος και κατ' επέκταση στην ένταση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας, ο τύπος της ακτινοβολίας αλλά και το μήκος της κυψελίδας. Το μήκος των κυψελίδων μπορεί να αποτελέσει μια επιφέρει απόκλιση από το νόμο αλλά μπορεί εύκολα να αποφευχθεί διαλέγοντας ίδιου μεγέθους κυψελίδες. Τέλος, ο νόμος μπορεί να βρει εφαρμογή μόνο στην επιλογή μονοχρωματικής πηγής ακτινοβολίας. Επιλέγοντας μια πολυχρωματική ακτινοβολία ο νόμος Lambert-Beer μπορεί να επηρεαστεί καθώς οι μοριακές απορροφητικότητες κάθε μήκους κύματος παρουσιάζουν διαφορές και η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης της ουσίας και απορρόφησης δεν χαρακτηρίζεται πλέον από γραμμικότητα.

3.2.3 Φασματοφωτόμετρα

Η μέτρηση της απορρόφησης του φωτός αλλά και η καταγραφή ενός φάσματος απορρόφησης πραγματοποιείται μέσω ειδικών οργάνων των φασματοφωτόμετρων. Τα τελευταία διακρίνονται σε φασματοφωτόμετρα ορατού, υπεριώδους, ορατού-υπεριώδους, υπέρυθρου αλλά και σε φασματοφωτόμετρα απλής ή διπλής δέσμησης, άμεσης ανάγνωσης ή μηδενισμού. Αποτελούνται από τον μονοχρωμάτορα (πηγή φωτός), την κυψελίδα με το δείγμα, τον ανιχνευτή

ακτινοβολίας αλλά και το σύστημα μέτρησης στο οποίο περιλαμβάνεται ο ενισχυτής και το όργανο ανάγνωσης.



Εικόνα 3.3 .Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου UV-Vis.

Η διαφοροποίηση της πηγής γίνεται ανάλογα με το επιθυμητό μήκος κύματος. Ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis περιέχει δύο πηγές, μια λυχνία εκκενώσεως δευτερίου για το υπεριώδες φάσμα (190-400 nm) και μία λυχνία βολφραμίου για το ορατό φάσμα (400-800 nm).

Η ακτινοβολία διέρχεται από την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα. Για την περιοχή του υπεριώδους επιλέγονται κυψελίδες από χαλαζία ενώ στην περιοχή του ορατού γυάλινες ή πλαστικές καθώς το υλικό κατασκευής της κυψελίδας εξαρτάται από το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Όσον αφορά τις κυψελίδες του τυφλού δείγματος αυτές θα πρέπει να έχουν τις ίδιες διαστάσεις με αυτές του δείγματος έτσι ώστε να γίνεται η εφαρμογή του νόμου.

Τέλος, η ακτινοβολία οδηγείται στον ανιχνευτή που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ένας απλός φωτοπολλαπλασιαστής, όπου όσα φωτόνια προσπίπτουν μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα. Μέσα από ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα το σήμα αυτό ενισχύεται και στη συνέχεια γίνεται η καταγραφή του σε μία οθόνη.

3.2.4 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με φασματοφωτομετρία UV-Vis

Τα τρόφιμα είναι συστήματα με μεγάλη πολυπλοκότητα καθώς αποτελούνται από πολλά διαφορετικά συστατικά με διαφορετικές ιδιότητες γεγονός που δημιουργεί δυσκολίες στις μετρήσεις τους. Για το λόγο αυτό συχνά για τη μελέτη της αντίδρασης Maillard χρησιμοποιούνται μοντέλα-συστήματα που αποτελούνται από ελεύθερα αμινοξέα που περιέχουν ελεύθερες αμινομάδες αλλά και αναγωγικά σάκχαρα όπως η γλυκόζη.

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον προσδιορισμό διαφορετικών προϊόντων σε διαφορετικά στάδια της αντίδρασης αλλά και με μήκος κύματος εξαρτώμενο από τις λειτουργικές ομάδες των προϊόντων σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Για την μελέτη της αντίδρασης γίνεται επιλογή τριών μηκών κύματος δηλαδή όσα και τα κύρια στάδια της αντίδρασης. Σε μήκος κύματος 280 nm απορροφούν τα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης όπως για παράδειγμα οι βάσεις Schiff και τα προϊόντα Amadori. Ακολούθως, στα 360 nm μετρούνται τα προϊόντα του ενδιάμεσου σταδίου (φουράνιο, δικαρβονύλια καθώς και τα προϊόντα που προέρχονται από την οξείδωση, αφυδάτωση και τον κατακερματισμό των αρχικών προϊόντων) . Τελικά, στα 420 nm μετρούνται τα τελικά προϊόντα της μη ενζυματικής αμαύρωσης όπως για παράδειγμα οι πτητικές ενώσεις και τα έγχρωμα πολυμερή.

Ο χρόνος θέρμανσης συνδυαζόμενος με το σήμα έντασης της απορρόφησης έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας καμπύλης που μπορεί να περιγράψει την εξέλιξη της αντίδρασης Maillard. Στα μειονεκτήματα της χρήσης της φασματοφωτομετρίας UV-Vis περιλαμβάνεται το γεγονός ότι κάποιες ενώσεις με παρόμοια δομή μπορεί να απορροφούν ακτινοβολία στο ίδιο μήκος κύματος (**Skoog et al., 2007**).

3.3 Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού των AGEs

3.3.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης η οποία έχει σχεδιαστεί με σκοπό τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων. Επιπρόσθετα μπορεί να γίνει χρήση της και για τον προσδιορισμό των AGEs αφού προηγουμένως γίνει παραγωγοποίηση των ενώσεων ή και άλλων πτητικών ενδιάμεσων ουσιών της αντίδρασης Maillard όπως για παράδειγμα οι πυραζίνες επιτυγχάνοντας ακόμη υψηλότερη απόδοση όταν γίνει σύνδεση με φασματόμετρο μάζας (GC/MS) (Milkovska et al., 2015). Η χαμηλή θερμική σταθερότητα και η ανεπαρκής πτητικότητα των AGEs καθιστά απαραίτητη την παραγωγοποίηση των πολικών λειτουργικών τους ομάδων πριν από την ανάλυση με GC-MS. Η παραγωγοποίηση συνήθως επιτυγχάνεται με τριμεθυλοσιλυλίωση (trimethylsilylation). Το αντιδραστήριο MSTFA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide) είναι περισσότερο αποτελεσματικό σε σύγκριση με άλλα αντιδραστήρια (*N*-Trimethylsilylimidazole (TMSI), *N*-methyl-*N*-trimethylsilylacetamide (MSA), *N*-trimethylsilyldiethylamine (TMSDEA), *N*-trimethylsilyldimethylamine (TMSDMA), δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα για ένα ευρύτερο φάσμα ενώσεων ενώ επιπλέον παράγει λιγότερα παραπροϊόντα, ιδιαίτερα στην περίπτωση που προηγείται επεξεργασία με αλκοξαμίνη για την πρόληψη σχηματισμού κυκλικών ανωμερών.

3.3.2 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η HPLC είναι μια άλλη χρωματογραφική τεχνική στην οποία το υγρό χρησιμοποιείται ως κινητική φάση και ένας μεμονωμένος ή μικτός διαλύτης με διαφορετικές πολικότητες αντλείται μέσω μιας στήλης με στατική φάση μέσω ενός συστήματος υψηλής πίεσης. Στην στήλη πραγματοποιείται διαχωρισμός αλλά και ανίχνευση των αναλυτών (Wei et al., 2018).

Η χρήση υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD Diode Array Detector) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση AGEs τα οποία έχουν την ικανότητα να απορροφούν στο υπεριώδες (UV). Ανιχνευτής φθορισμού (FLD) σε συγκεκριμένα μήκη κύματος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση ευαίσθητων στον φθορισμό AGEs, όπως η πεντοσιδίνη. Ωστόσο, για AGEs που δεν έχουν χρωμοφόρα

είτε φθορίζοντα τμήματα στο μόριο τους, όπως η CML, είναι απαραίτητη μια κατάλληλη μέθοδος παραγωγοποίησης πριν την ανάλυση με HPLC-FLD (και ακολούθως διαχωρισμός σε στήλη αντίστροφης φάσης).

3.3.3 Ανοσοχημικός προσδιορισμός

Αποτελεί μια τεχνική που βρίσκει χρήση στον προσδιορισμό των AGEs και βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνων-αντισωμάτων (Wei et al., 2018). Ο παραπάνω προσδιορισμός στα τρόφιμα μπορεί να γίνει μέσα από την αλληλεπίδραση των μονοκλωνικών αντισωμάτων της CML όπως διαπιστώθηκε μέσω μιας σειράς μελετών. Αν και η τεχνική αυτή έχει ένα μεγάλο πλεονέκτημα, δηλαδή να είναι εκλεκτική σε μεγάλο βαθμό είναι αρκετά κοστοβόρα με αποτέλεσμα την μη συχνή επιλογή της. (Goldberg et al., 2014). Όταν εφαρμόζεται σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος έχει παρατηρηθεί ότι τα αποτελέσματα είναι υπερεκτιμημένα ενώ σε αμυλούχα τρόφιμα υποεκτιμημένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της επίδρασης της α -τοκοφερόλης, της υδροξυτυροσόλης και του σκουαλενίου στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Για την μελέτη της αντίδρασης παρασκευάστηκε ισομοριακό μίγμα (1:1) γλυκόζης : λυσίνης (0,1M) στο οποίο προστέθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις α -τοκοφερόλης: (15,5 μ M, 29 μ M και 58 μ M), σκουαλενίου (40,6 μ M, 1622,6 μ M και 2677,4 μ M) και υδροξυτυροσόλης (32,4 μ M, 116,7 μ M, και 233,5 μ M). Τα συστήματα θερμάνθηκαν στους 100⁰ C για συνολικά 240 λεπτά. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με μη εκλεκτικές μεθόδους όπως η μέτρηση της έντασης της απορρόφησης στα 280nm, 360nm και 420nm και της έντασης του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min.

Πειραματικό μέρος

4.1 Το σύστημα της αντίδρασης

Στο μείγμα της αντίδρασης η συγκέντρωση των υπό εξέταση ενώσεων (α -τοκοφερόλης, σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης) υπολογίστηκε με βάση την περιεκτικότητά τους στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Πιο συγκεκριμένα το μείγμα της αντίδρασης σχεδιάστηκε έτσι ώστε η αναλογία γλυκόζης : λυσίνης : ελαιόλαδου (μέσο μοριακό βάρος τριακυλογλυκερόλης 885,48 gr/mol) να είναι 1:1:1, με την συγκέντρωση των αντιδρώντων να είναι 0,1 M (**Han et al., 2013**). Με βάση την μέση σύσταση του ελαιόλαδου σε σκουαλένιο, α -τοκοφερόλη και υδροξυτυροσόλη επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρεις συγκεντρώσεις για κάθε μία από τις τρεις ενώσεις.

Η συγκέντρωση του σκουαλενίου στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 200 mg/kg έως 7.000 mg/kg (**Mikrou et al., 2020**), αλλά στη βιβλιογραφία για ελληνικά ελαιόλαδα καταγράφονται και πολύ μεγαλύτερες ποσότητες. Για αυτό τον λόγο εκτός από τις δύο προηγούμενες συγκεντρώσεις εξετάστηκε και ποσότητα σκουαλενίου που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 11.000 mg/kg.

Η συγκέντρωση της α -τοκοφερόλης κυμαίνεται από 80 mg/kg έως 150 mg/kg. Ομοίως με το σκουαλένιο, στη βιβλιογραφία αναφέρονται και ελαιόλαδα που περιέχουν σχεδόν διπλάσια ποσότητα (**Boskou et al., 2015**) και γι' αυτό το λόγο εξετάστηκε και συγκέντρωση α -τοκοφερόλης ίση με 300mg/Kg.

Η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 50 έως 200 mg/kg (**Romero and Brenes, 2012**). Για το σκοπό του πειράματος επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση ποσότητας διπλάσια από την μέγιστη που απαντάται στο ελαιόλαδο (400mg/Kg).

4.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- PBS, phosphate buffer 0,1M, Bectron, Dickinson and Company
- d-Glucose anhydrous, Acros Organics (MW = 180,1 g/ mol)
- L-Lysine monohydrochloride, Acros Organics (MW=182,65 g/mol)
- Tween 80, Serva Electrophoresis GmbH
- α -Tocopherol, 97%, Fluka Biochemika, Sigma Aldrich, Mr= 430,71g/mol
- Squalen, MERCK-Schuchart, Mr= 410,72g/mol
- Hydroxytyrosol, 98%,SigmaAldrich, Mr= 154,16g/mol

Υλικά:

- Ογκομετρικές φιάλες (25, 50, 100, 500, 1000 mL)
- Γυάλινα σιφώνια (10 mL)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (25, 100 mL)
- Ποτήρια ζέσεως (50, 100, 250 mL)
- Πιπέτες Pasteur
- Falcons
- Μηχανικό σιφώνιο (1000 μ L, Brand, Germany)
- Αναλυτικός ζυγός AE20 (METTLER TOLEDO, Ohio, USA)
- Θερμαντική εστία (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Κυκλοαναμίκτης (VELP Scientifica, Usmate, Italy)

- Θερμοαναδευτήρας HCM100-Pro (Sinosource, China)
- Φυγόκεντρος K-80 (Hellenic Labware, Greece)

Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (JASCO, V-530, Tokyo, Japan)
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis με μικροπλάκες (Epoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)
- Φθορισμόμετρο 2030 VICTOR X2 (Perkin-Elmer, UK)

4.3 Παρασκευή διαλυμάτων

1) Διάλυμα Phosphate Buffer Salin PBS (0,1M)

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 9,23g PBS (σύμφωνα με τις οδηγίες της συσκευασίας) προστίθεται απιονισμένο νερό και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Το pH του τελικού διαλύματος είναι 7,2.

2) Διάλυμα D-γλυκόζης 0,1 M

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται **9,008g** προστίθεται διάλυμα PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των **500mL**, και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

3) Διάλυμα L-λυσίνης 0,1 M

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται **9,1325g** προστίθεται διάλυμα PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των **500mL** και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

4) Διάλυμα εργασίας α-τοκοφερόλης

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται **0,05 g** α-τοκοφερόλης, **0,2 g** TWEEN και μικρή ποσότητα PBS (λιγότερο από 50mL). Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε Ultra Turex για περίπου 1min μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός (overnight στο ψυγείο). Στην συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη **50 mL** και συμπληρώνεται με PBS ως την χαραγή.

Το διάλυμα που προκύπτει έχει τελική συγκέντρωση α -τοκοφερόλης 1 g/L (**2,32mM**) και TWEEN 0,4%.

5) Διάλυμα εργασίας σκουαλενίου

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται **0,5 g** σκουαλενίου, **0,2 g** TWEEN και μικρή ποσότητα PBS (λιγότερο από 50mL). Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε Ultra Turex για περίπου 1min μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός (overnight στο ψυγείο). Στην συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη **50 mL** και συμπληρώνεται με PBS ως την χαραγή. Το διάλυμα που προκύπτει έχει τελική συγκέντρωση σκουαλενίου 10 g/L (**24,34mM**) και TWEEN 0,4%.

6) Διάλυμα εργασίας υδροξυτυροσόλης

Σε αναλυτικό ζυγό τοποθετείται ογκομετρική φιάλη των **5 mL** και ζυγίζονται **0.01 g** υδροξυτυροσόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή. Το τελικό διάλυμα έχει συγκέντρωση 2 g/L (**12,97mM**)

7) Διάλυμα ελέγχου

Για τον έλεγχο της συμπεριφοράς των τριών υπό εξέταση ενώσεων 3mL δ/μα γλυκόζης (0,1M) και 3mL διαλύματος λυσίνης (0,1M) θερμάνθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες και ανασύρονταν στα αντίστοιχα χρονικά σημεία από τη συσκευή θέρμανσης. Για τον έλεγχο της δράσης του σκουαλενίου και της α -τοκοφερόλης προστέθηκε επιπλέον ποσότητα TWEEN όπως περιγράφεται στα (4) και (5).

4.4 Προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης

Σε γυάλινα φιαλίδια με κωνικό πυθμένα και πόμα σιλικόνης με στρογγυλή φλάντζα τοποθετούνται **3mL του διαλύματος (2)** και **3 mL του διαλύματος (3)** που αποτελούν **το μίγμα της αντίδρασης**. Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της συγκέντρωσης της εκάστοτε ένωσης, από τα διαλύματα εργασίας (4), (5) και (6) προστέθηκαν οι όγκοι V (μ L) όπως φαίνονται στη 2η στήλη του **Πίνακα 3.1** ώστε τελικά να προκύπτουν οι συγκεντρώσεις a, b, και c όπως φαίνονται στη 3η στήλη του ίδιου Πίνακα.

Πίνακας 3.1 : Συγκέντρωση βιοδραστικών ενώσεων στο μίγμα της αντίδρασης

Χημική ένωση		V(μL) βιοδραστικών ενώσεων δτος εργασίας	C (μM) στο μίγμα της αντίδρασης
α-τοκοφερόλη	a	40	15,4
	b	75	29,0
	c	150	58,0
Σκουαλένιο			
Σκουαλένιο	a	10	40,6
	b	400	1622,6
	c	660	2677,4
Υδροξυτυροσόλη			
Υδροξυτυροσόλη	a	15	32,4
	b	54	116,7
	c	108	233,5

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα αναδεύεται και τοποθετείται σε Thermo Shaker LLG, Unithermix 1 Pro (700 rpm), όπου θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 100°C για 4 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται σε 5 χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min, αποσύροντας 1 σωλήνα (για κάθε χρονικό σημείο). Κάθε φορά που σταματά η ανάδευση για την απόσυρση κάποιου σωλήνα ανοίγονται όλα τα καπάκια για να ανανεωθεί ο αέρας (Lima et al., 2010).

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου (controls) αποτελούμενα από τα μίγματα αντίδρασης 1:1 χωρίς την προσθήκη βιοδραστικών ενώσεων. Η πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

4.4.1 Παρακολούθηση της αντίδρασης

Η παρακολούθηση της αντίδρασης MR έγινε μέσω μη εξειδικευμένων δεικτών όπως είναι ο σχηματισμός φθορίζουσών ουσιών και η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης του μείγματος της αντίδρασης. Στα πρώτα στάδια της αντίδρασης MR τα ανάγοντα σάκχαρα αντιδρούν με τα αμινοξέα οδηγώντας στο σχηματισμό άχρωμων προϊόντων τα οποία δεν απορροφούν στην περιοχή του ορατού φάσματος και η παρακολούθηση του σχηματισμού τους γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm, ενώ τα προϊόντα στο ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης απορροφούν στα 360nm. Στα τελευταία στάδια της αντίδρασης παράγονται υψηλού μοριακού βάρους μελανοΐδινες, που διαθέτουν χρωμοφόρα τμήματα τα οποία απορροφούν στα 420nm (browning intensity).

4.4.2 Μέτρηση Απορρόφησης

Η μέτρηση της απορρόφησης στα 360nm και 420nm πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο με μικροπλάκες Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA). Για την μέτρηση τοποθετήθηκαν 200μL από κάθε πειραματικό σημείο και από τα δείγματα ελέγχου σε μικροπλάκα 96 θέσεων (εις διπλούν). Η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης JASCO V-530 UV-Vis (Jasco, Tokyo), όπου τα δείγματα και τα controls τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία 1cm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχέση

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{\text{Abs}_{280_360_420_control} - \text{Abs}_{280_360_420_sample}}{\text{Abs}_{280_360_420_control}} \right) \times 100$$

όπου, $\text{Abs}_{280-360-420_control}$ και $\text{Abs}_{280-360-420_sample}$ η απορρόφηση των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων σε καθένα από τα 3 μήκη κύματος για κάθε χρονικό σημείο της αντίδρασης.

4.4.3 Μέτρηση Φθορισμού

Η μέτρηση του αυθόρμητου φθορισμού των AGEs πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο με φίλτρα σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 370 και 420nm, αντίστοιχα (excitation/emission 370/430nm). Για τον σκοπό αυτό τοποθετήθηκαν 200μL από κάθε πειραματικό σημείο και από τα δείγματα ελέγχου σε μικροπλάκα 96 θέσεων (εις διπλούν). Ο φθορισμός των AGEs εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) σε αναγνώστη πλάκας Victor 801 (Perkin-Elmer, Singapore Pte Ltd). Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχέση (2)

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{\text{Fluo}_{control} - \text{Fluo}_{sample}}{\text{Fluo}_{control}} \right) \times 100$$

Όπου $Fluo_{control}$ ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης 1:1 στο κάθε χρονικό σημείο θέρμανσης χωρίς την προσθήκη βιοδραστικών ενώσεων, και $Fluo_{sample}$ ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης με την προσθήκη των βιοδραστικών ενώσεων.

4.5 Στατιστική ανάλυση

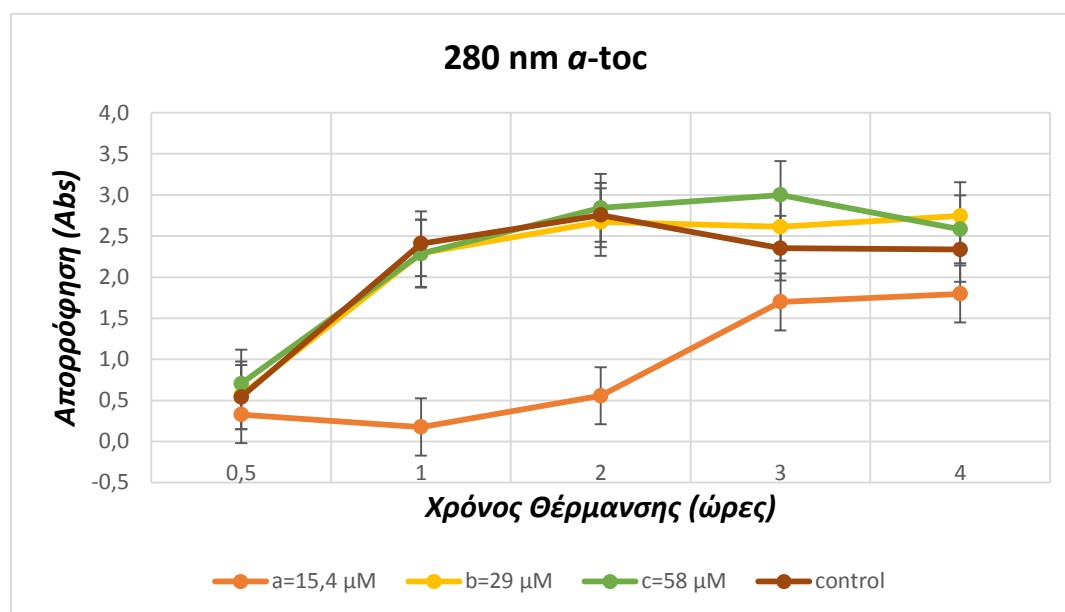
Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού προγράμματος Statgraphics Centurion XVII. Τα αποτελέσματα εξετάστηκαν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο διάστημα αυτό η κρίσιμη τιμή P-value κάτω από την οποία τα δείγματα προς εξέταση διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους είναι 0.05. Όσον αφορά τον προσδιορισμό των στατιστικών διαφορών πραγματοποιήθηκε έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων (multiple sample comparison). Οι μέσες τιμές των ανασχέσεων συγκρίθηκαν με την μέθοδο LSD (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) αλλά και με την ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis

Για το σχολιασμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ηθογράμματα τα οποία αποτελούν μία τεχνική διερευνητικής ανάλυσης των δεδομένων από την οποία αντλούνται πληροφορίες ενώ δεν είναι μια διαδικασία εξαγωγής οριστικών συμπερασμάτων. Σε μία συμμετρική κατανομή, η διάμεσος εμφανίζεται στο μέσο του ηθογράμματος και οι μύστακες έχουν το ίδιο μήκος. Στις κατανομές που εμφανίζουν θετική ασυμμετρία η διάμεσος απομακρύνεται από την επάνω βάση του ορθογωνίου και μετακινείται προς τα κάτω. Προφανώς όσο πιο έντονη γίνεται η θετική ασυμμετρία τόσο περισσότερο μετακινείται η διάμεσος προς τα κάτω. Επιπλέον, ο πάνω μύστακας είναι μεγαλύτερος από τον κάτω. Καθώς αυξάνεται η θετική ασυμμετρία, ο πάνω μύστακας γίνεται ολοένα μεγαλύτερος. Αντίστροφα, στην αρνητική ασυμμετρία η διάμεσος μετακινείται προς την επάνω βάση του ηθογράμματος και μεγαλώνει το μήκος του κάτω μύστακα. Η **διάμεσος (median)** της κατανομής του δείγματος είναι ένας αριθμός για τον οποίο ισχύει ότι το πολύ 50% των παρατηρήσεων είναι μικρότερες από αυτόν και επίσης το πολύ 50% των τιμών των παρατηρήσεων είναι μεγαλύτερες από αυτόν ενώ παράλληλα εκφράζει την *κεντρική θέση* της κατανομής του δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

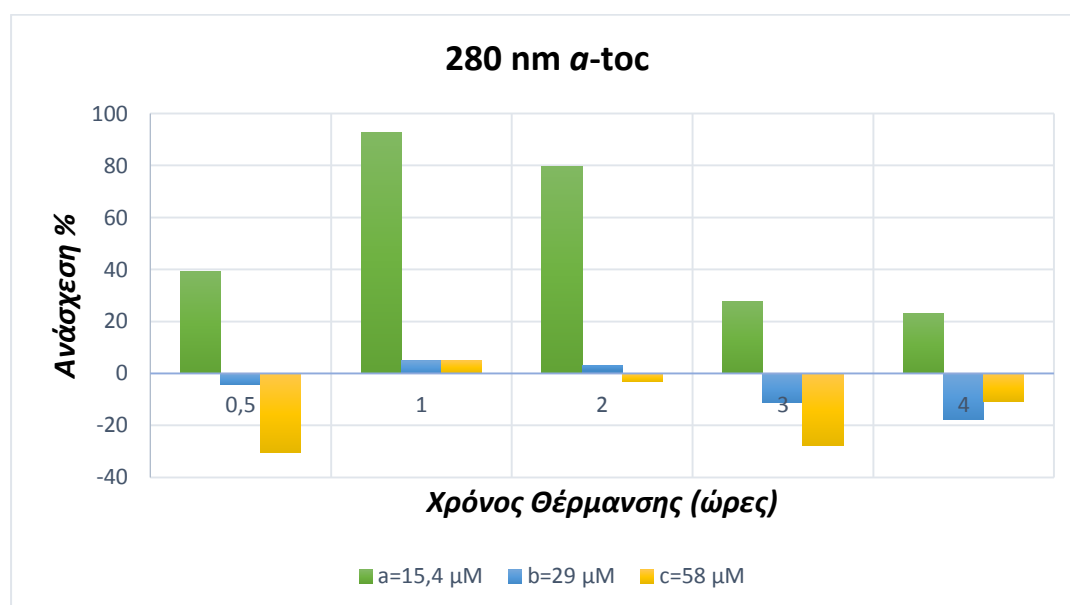
5.1 Επίδραση στην εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR (Μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm)

Στο Διάγραμμα 5.1 παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 280nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε *a-toc* σε συγκεντρώσεις a: 15,4μM, b: 29 μM και c: 58 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



Διάγραμμα 5.1: Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων *a-toc*

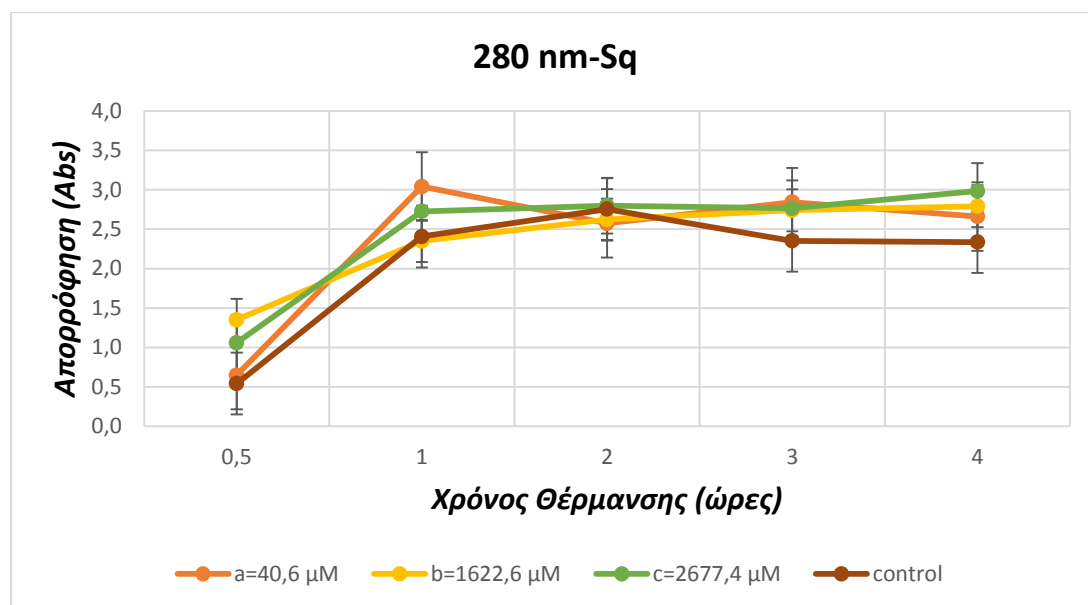
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.2** η συγκέντρωση $a=15,4\mu\text{M}$ της $\alpha\text{-toc}$ προκαλεί ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR. Στην 1^η ώρα θέρμανση τους 100°C η ανάσχεση έφτασε στο 92,6% και μειώθηκε σταδιακά στα επόμενα χρονικά σημεία φτάνοντας τη μικρότερη τιμή μετά από 4 ώρες θέρμανσης (23%). Όταν η $\alpha\text{-toc}$ προστέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούσαν σε $b=29\mu\text{M}$ και $c=58\mu\text{M}$, δεν παρατηρήθηκε ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR, αντίθετα σημειώθηκε προώθηση που γίνεται περισσότερο εμφανής κατά τη χρήση της c συγκέντρωσης στην μισή ώρα (-30,2%) και στις 3 ώρες (-27,5%) αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.2: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων $\alpha\text{-toc}$ στην ανάσχεση των αρχικών προϊόντων της MR (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 100°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

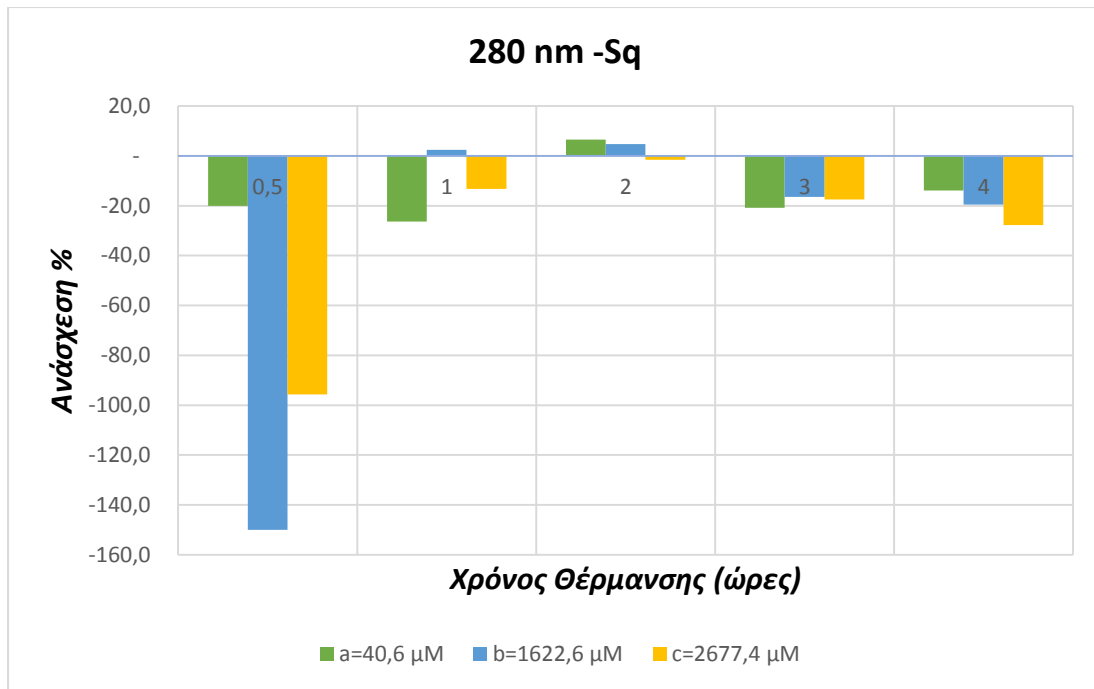
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR μεταξύ των συγκεντρώσεων a με τις b και c ($P\text{-Value}=0,0006 < 0,05$).

Στο **Διάγραμμα 5.3** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 280nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε Sq σε συγκεντρώσεις a: 40,6 μM, b: 1622,6 μM και c: 2677,4 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.3: Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq

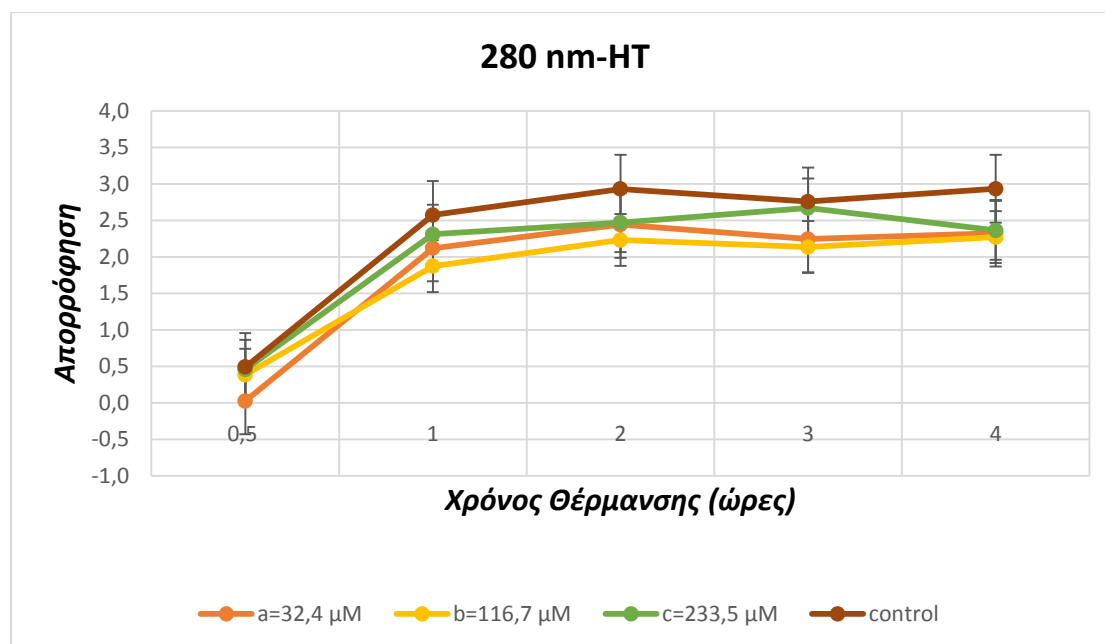
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.4** δεν παρατηρήθηκε ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR, από την προσθήκη των τριών συγκεντρώσεων του Sq (a=40,6 μM, b=1622,3 μM, c=2677,4 μM). Σε κάθε περίπτωση η προώθηση των αρχικών προϊόντων είναι μεγάλη μέχρι την 1^η ώρα θέρμανσης. Οι μεγαλύτερες τιμές προώθησης σημειώθηκαν κατά τη χρήση των συγκεντρώσεων c στην μισή ώρα (-95,7%) και στις 4 ώρες (-27,8%) αλλά και της b συγκέντρωσης στην μισή ώρα (-150%) και στις 4 ώρες (-19,5%) αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.4 : Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Sg στην ανάσχεση των αρχικών προϊόντων της MR (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M)

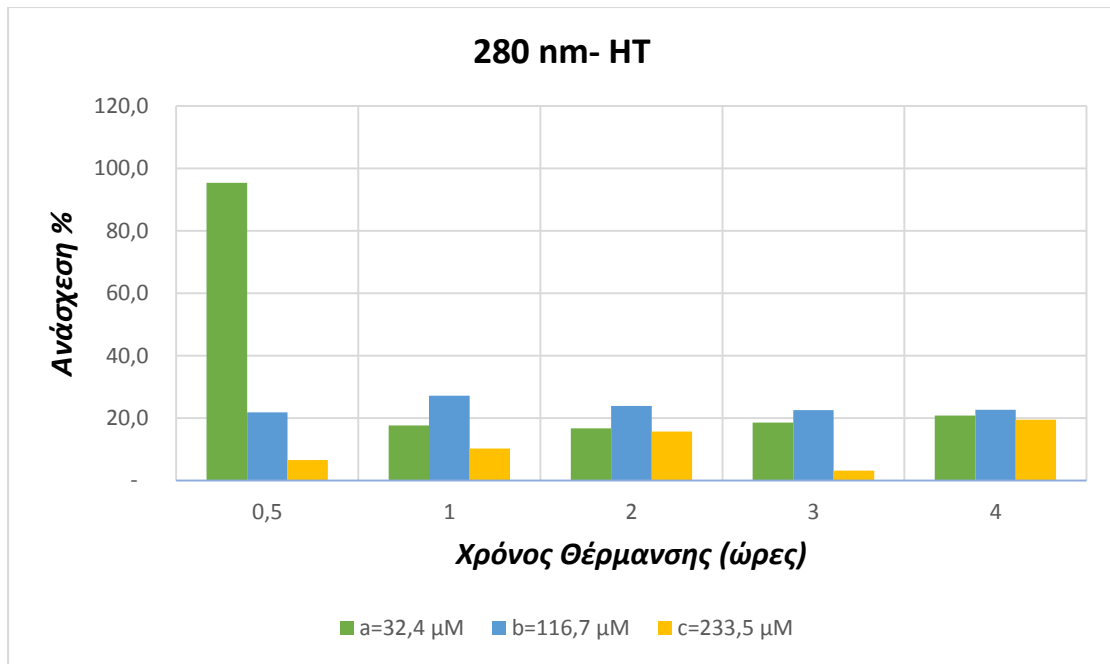
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση του σχηματισμού προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (P-Value=0,73 >0,05).

Στο **Διάγραμμα 5.5** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 280nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε HT σε συγκεντρώσεις a: 32,4 μ M, b: 116,7 μ M και c: 233,5 μ M και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



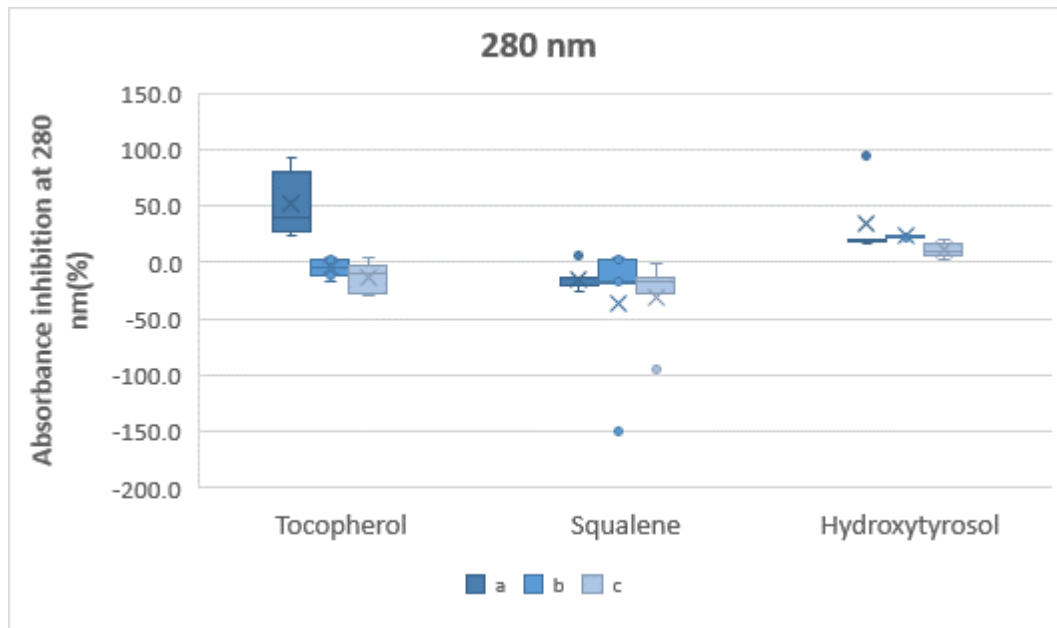
Διάγραμμα 5.5: Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων HT

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.6** και οι τρεις συγκεντρώσεις a=32,4 μ M, b=116,7 μ M και c=233,5 μ M της HT προκαλούν ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR. Στην μισή ώρα θέρμανσης στους 100° C η ανάσχεση με τη χρήση της συγκέντρωσης a=32,4 μ M έφτασε στο 95,4% και μειώθηκε σταδιακά στα επόμενα χρονικά σημεία φτάνοντας τη μικρότερη τιμή μετά από 2 ώρες θέρμανσης 17,6%. Όταν η HT προστέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούσαν σε b=116,7 μ M και c=233,5 μ M, παρατηρήθηκε ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR, που γίνεται περισσότερο εμφανής στις 2 ώρες (23,9%) για την συγκέντρωση b και στις 4 ώρες (19,4%) για την συγκέντρωση c αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.6: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων HT ζ στην ανάσχεση των αρχικών προϊόντων της MR (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (P-Value=0,24>0,05) από την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων HT.



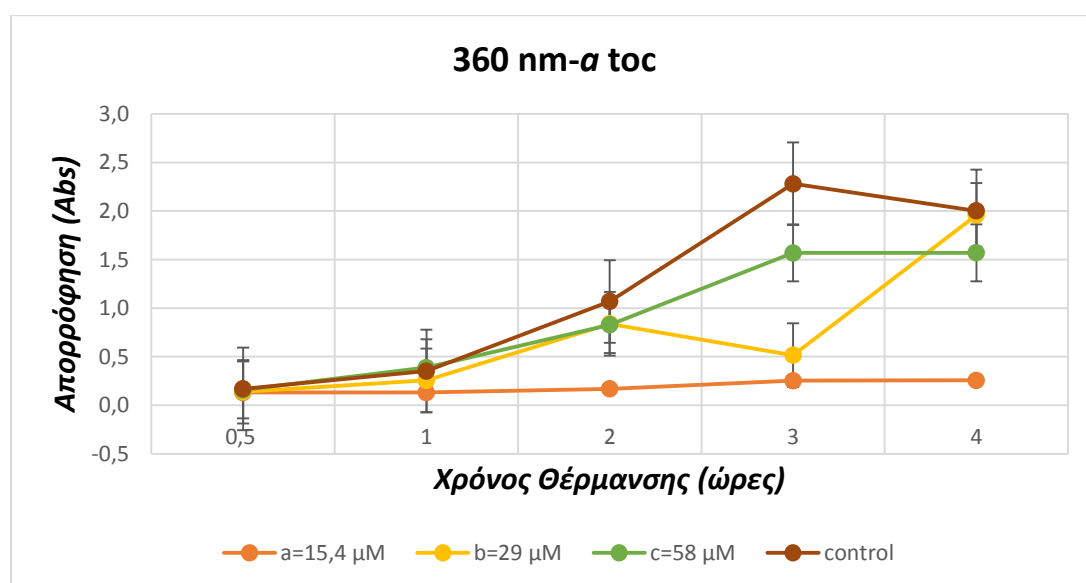
Διάγραμμα 5.7: Θηκόγραμμα που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (280 nm) στο σύστημα 1:1, στους 100° C, από την παρουσία βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαισίου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα(°,×) εκτός θηκογράμματος υποδηλώνουν ακραίες τιμές

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR στο σύστημα 1:1 στους 100° C. Πιο συγκεκριμένα το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης, του σκουαλενίου και των συγκεντρώσεων b και c της *a-toc* είναι μικρό γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών κατά το διάστημα των 4 h θέρμανσης στους 100° C, ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται μόνο στην περίπτωση της συγκέντρωσης a της *a-toc*. Όσο αφορά τις τιμές ανάσχεσης της τελευταίας περίπτωσης, παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία, καθώς το 50% των παρατηρήσεων είναι συμπιεσμένες σε ένα διάστημα από 23,1% (minimum) έως 39,1% (median) ενώ το υπόλοιπο 50% «απλώνεται» από 39,1% έως 92,6% (maximum), τιμή ανάσχεσης που σημειώθηκε μετά από 1 ώρα θέρμανσης στους 100°C. Συνολικά παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη επίδραση στην **ανάσχεση σχηματισμού των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR έχει η a συγκέντρωση της a-toc**. Μικρότερη επίδραση φαίνεται να

έχουν οι συγκεντρώσεις a,b,c της HT ενώ και οι τρεις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην περίπτωση του Sq προωθούν την αντίδραση.

5.2 Επίδραση στην εξέλιξη του ενδιάμεσου σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 360 nm)

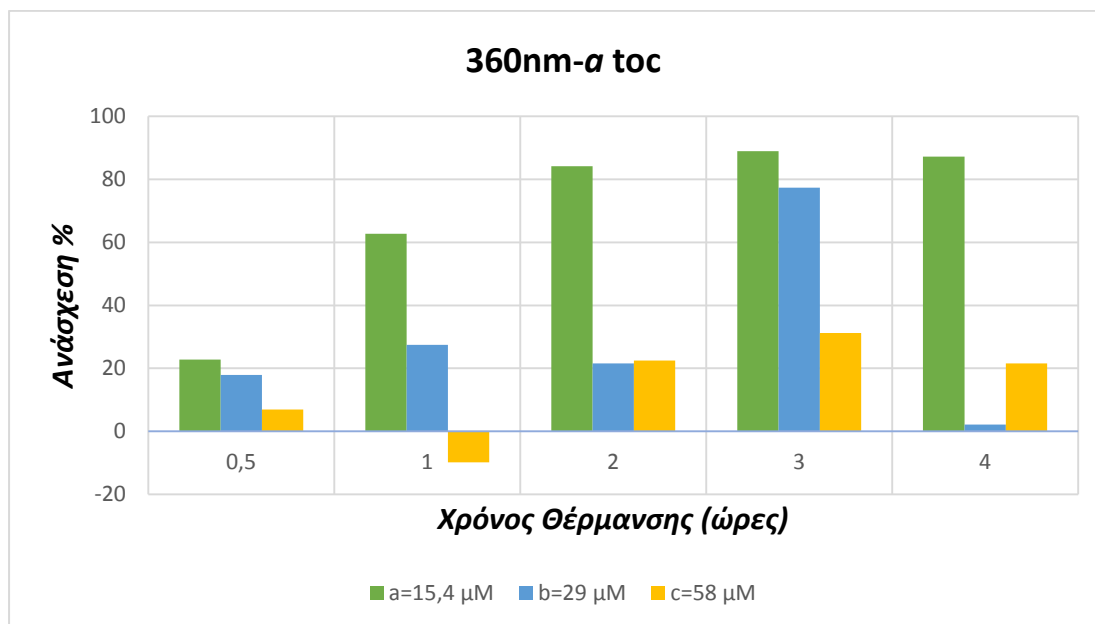
Στο Διάγραμμα 5.8 παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 360nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε *a-toc* σε συγκεντρώσεις a: 15,4μM, b: 29 μM και c: 58 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



Διάγραμμα 5.8: Η απορρόφηση (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων *a-toc*

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 5.9 η συγκέντρωση a=15,4μM της *a-toc* οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάσχεση τον σχηματισμό των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της αντίδρασης MR σε σύγκριση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Στην μισή ώρα θέρμανσης τους 100° C η ανάσχεση έφτασε στο 22,8% και αυξήθηκε σταδιακά στα επόμενα χρονικά σημεία φτάνοντας τη μεγαλύτερη τιμή μετά από 3 ώρες θέρμανσης 88,9%. Όταν η *a-toc* προστέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούσαν σε b=29μM και c=58μM, παρατηρήθηκε επίσης ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της αντίδρασης,

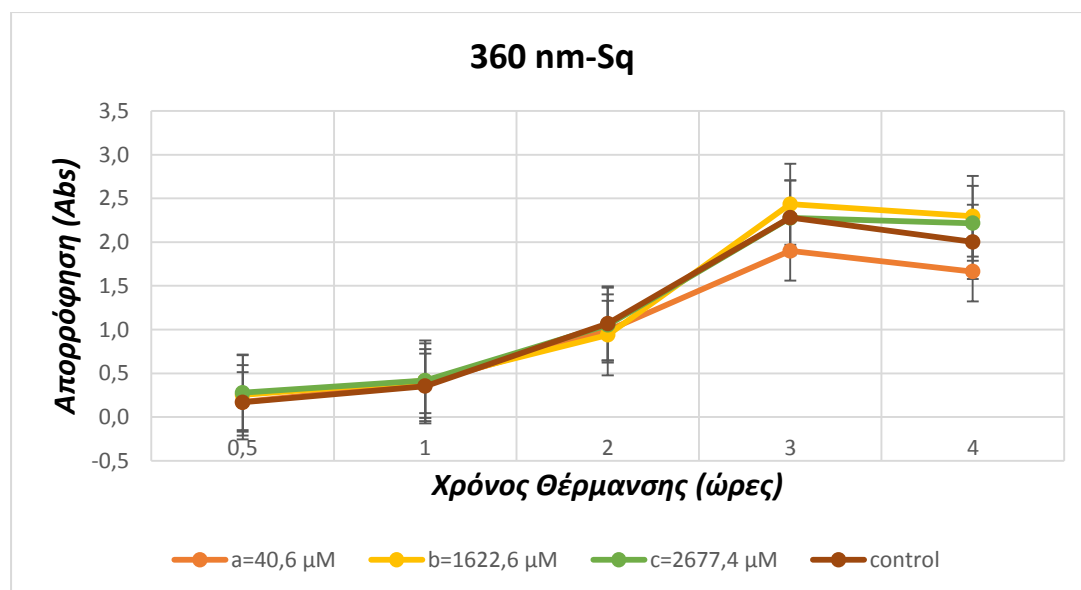
που γίνεται περισσότερο εμφανής κατά τη χρήση της b συγκέντρωσης στις 3 ώρες (77,4%).



Διάγραμμα 5.9: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *a-toc* στην ανάσχεση σχηματισμού των ενδιάμεσων προϊόντων της MR (360 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

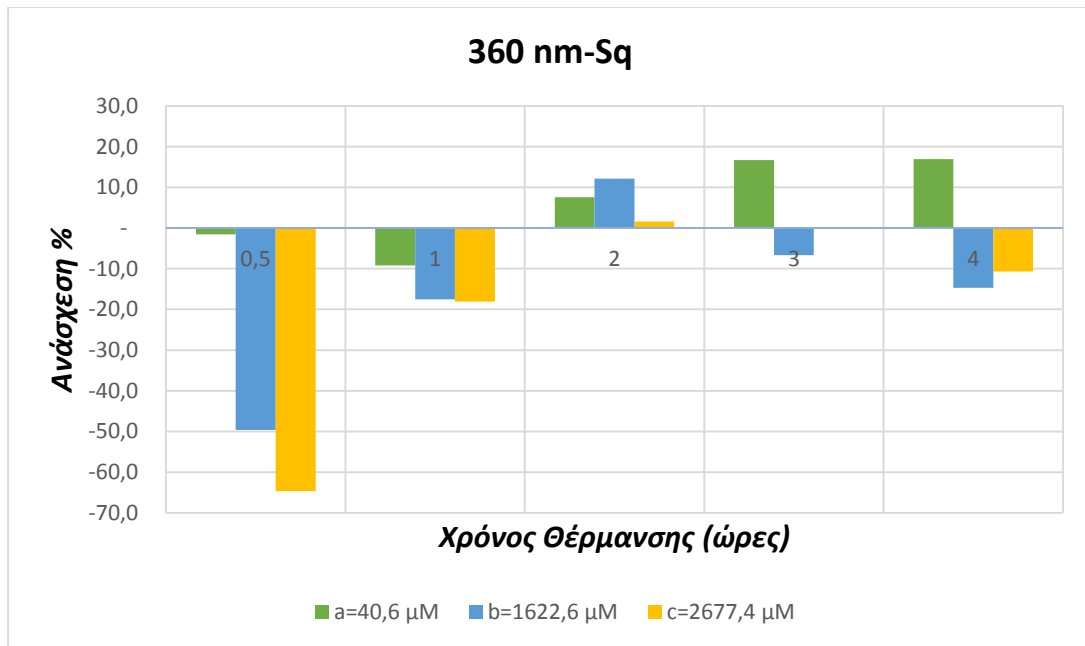
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR μεταξύ των συγκεντρώσεων a με τις b και c (P-Value=0,01<0,05).

Στο **Διάγραμμα 5.10** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 360nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε Sq σε συγκεντρώσεις a:40,6μM, b: 1622,6 μM και c: 2677,4 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



Διάγραμμα 5.10: Εξέλιξη της απορρόφησης (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.11** και οι τρεις συγκεντρώσεις Sq που εξετάστηκαν προωθούν την αντίδραση μέχρι περίπου τις 2 πρώτες ώρες θέρμανσης. Η συγκέντρωση a=40,6 μM του Sq προκαλεί χαμηλή ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της αντίδρασης MR από την 2^η ώρα της θέρμανσης στους 100° C φτάνοντας τη μεγαλύτερη τιμή μετά από 4 ώρες θέρμανσης 16,9%.

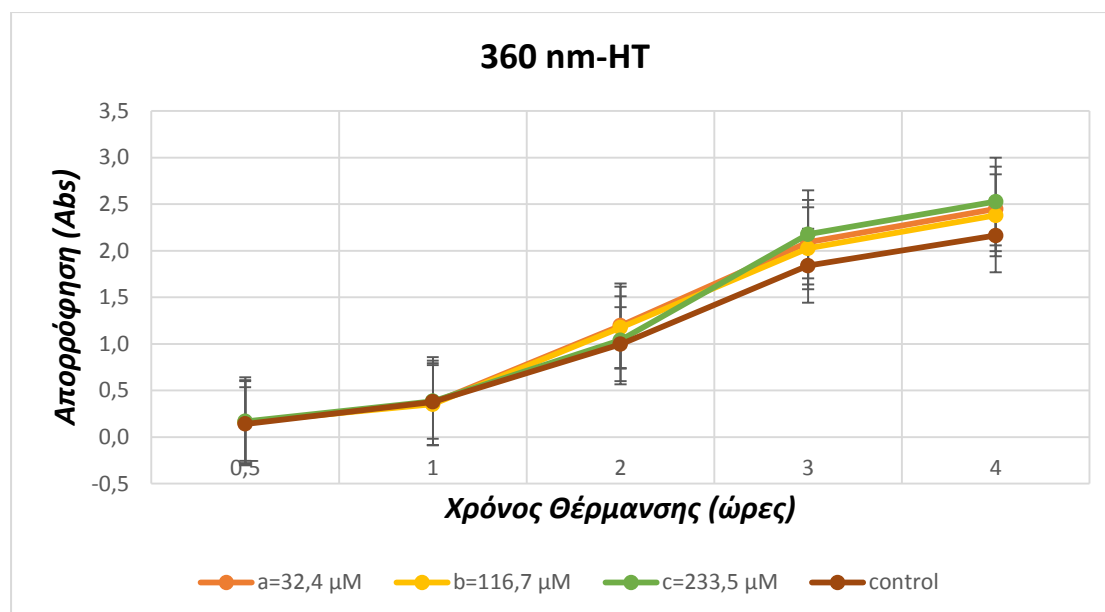


Διάγραμμα 5.11: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq στην ανάσχεση των ενδιάμεσων προϊόντων της MR (360 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M)

Όταν το Sq προστέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούσαν σε b=1622,6 μM και c=2677,4 μM, παρατηρήθηκε προώθηση που γίνεται περισσότερο εμφανής κατά τη χρήση της c συγκέντρωσης στην 1/2 ώρα (-64,6%) αλλά και κατά την χρήση της b συγκέντρωσης στο ίδιο χρονικό σημείο (-49,6%) αντίστοιχα.

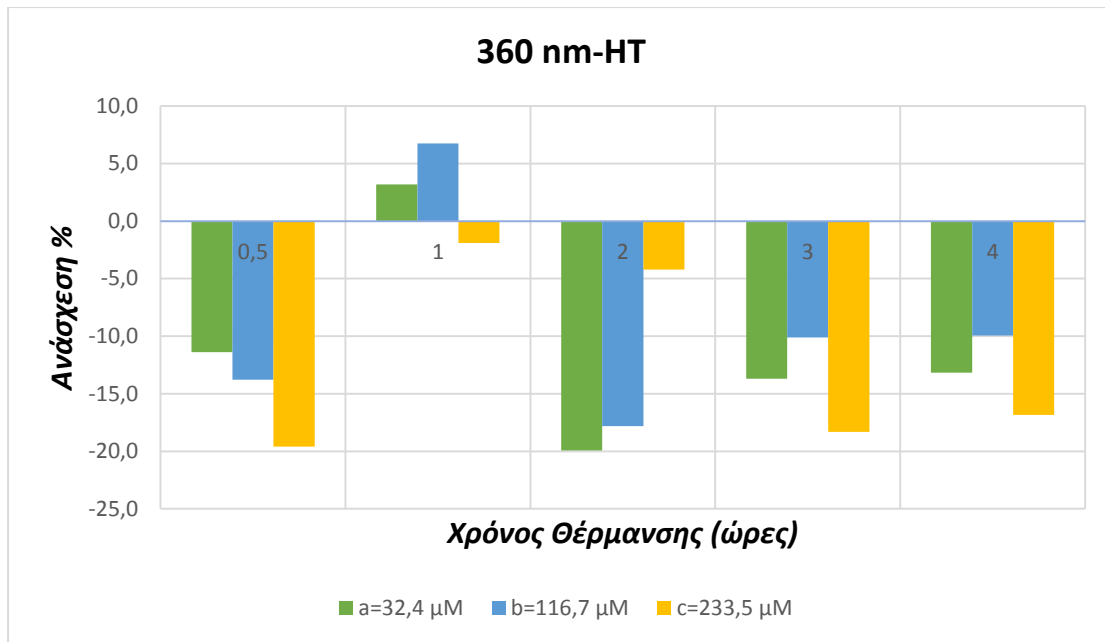
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (P-Value=0,19>0,05) μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων του Sq που εξετάστηκαν.

Στο **Διάγραμμα 5.12** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 360nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε HT σε συγκεντρώσεις a: 32,4 μ M, b: 116,7 μ M και c: 233,5 μ M και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.12: Η απορρόφηση (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 100°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων HT

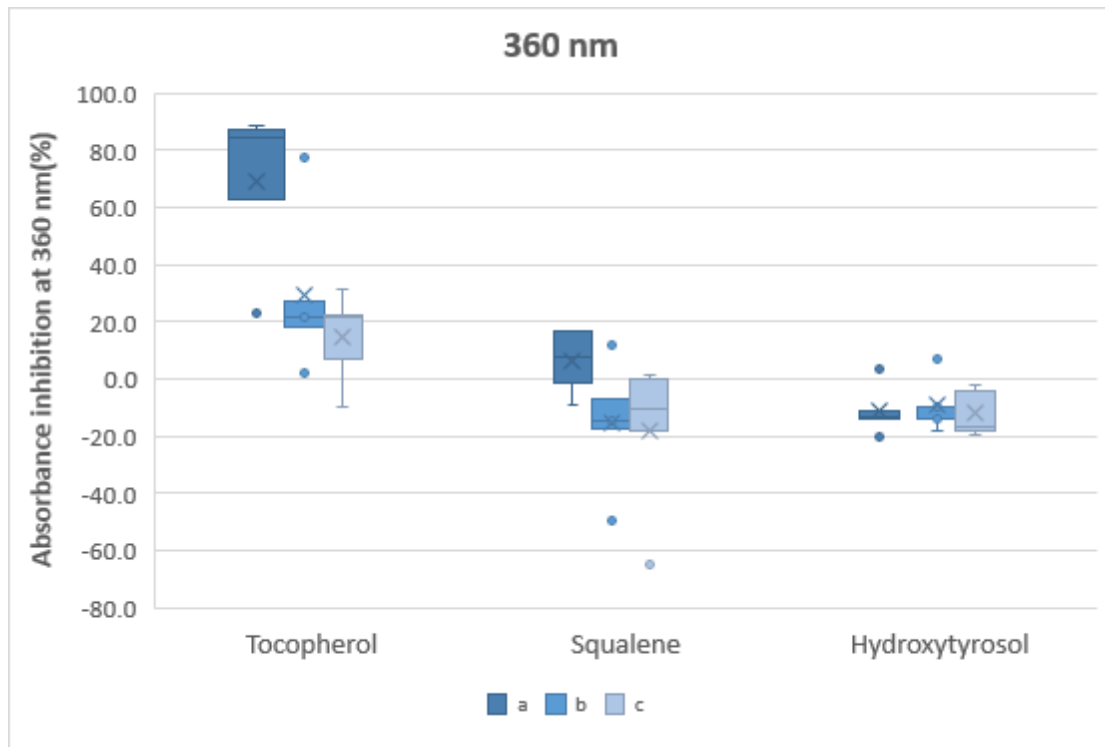
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.13** και οι τρεις συγκεντρώσεις HT που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε προώθηση των αντιδράσεων του ενδιάμεσου σταδίου της MR. Μικρή ανάσχεση ίση με 3,2% και 6,8% σημειώθηκε στην 1^η ώρα θέρμανσης από τη χρήση των συγκεντρώσεων a και b. Οι ίδιες συγκεντρώσεις την 2^η ώρα θέρμανσης οδήγησαν σε προώθηση της τάξης -19,9% και -17,8% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.13 : Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων HT στην ανάσχεση των ενδιάμεσων προϊόντων της MR (360 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M)

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (P-Value=0,85>0,05) μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων HT που εξετάστηκαν.

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (P <0.05) μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR στο σύστημα 1:1 στους 100° C (**Διάγραμμα 5.14**).



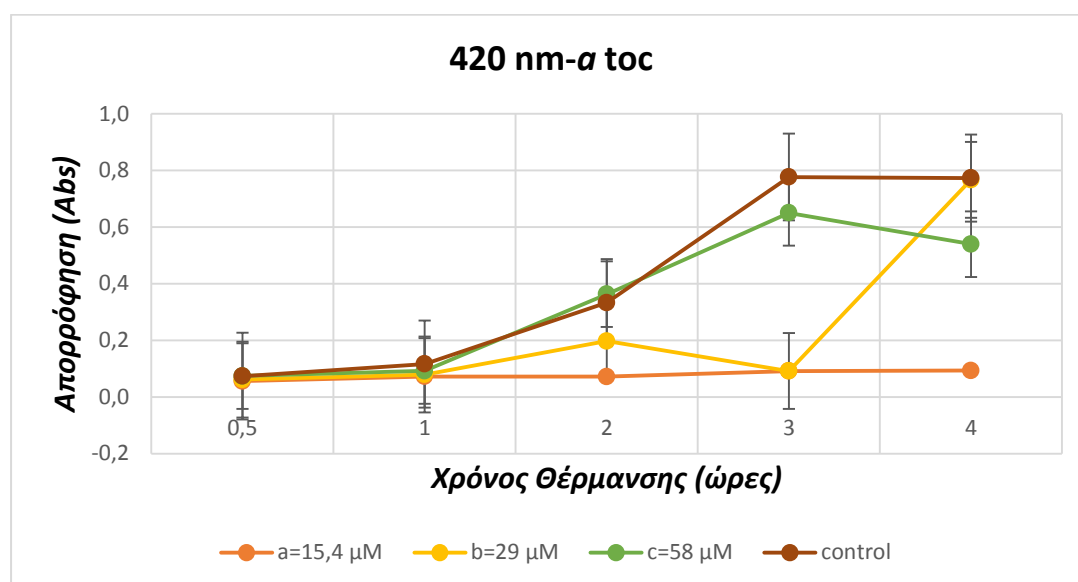
Διάγραμμα 5.14: Θηκόγραμμα που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (360 nm) στο σύστημα 1:1, στους 100° C, από την παρουσία βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαισίου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα, ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα(°,×) εκτός θηκογράμματος υποδηλώνουν ακραίες τιμές.

Πιο συγκεκριμένα το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της HT, του Sq και των συγκεντρώσεων b και c της a-toc είναι μικρό γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών κατά το διάστημα των 4 h θέρμανσης στους 100° C, ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στην περίπτωση της συγκέντρωσης a της a-toc. Όσο αφορά τις τιμές ανάσχεσης της τελευταίας περίπτωσης, παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία, καθώς το 50% των παρατηρήσεων βρίσκονται σε ένα διάστημα από 22,8% (minimum) έως 84,2% (median) ενώ το υπόλοιπο 50% είναι συμπιεσμένο από 84,2% έως 88,9% (maximum), τιμή ανάσχεσης που σημειώθηκε μετά από 3 ώρες θέρμανσης στους 100°C. Συνολικά παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη επίδραση στην ανάσχεση σχηματισμού των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της αντίδρασης MR έχει η a συγκέντρωση της a-toc. Μικρή επίδραση φαίνεται να έχουν οι συγκεντρώσεις b,c της a-toc αλλά και η συγκέντρωση a του Sq. Τέλος,

και οι τρεις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην περίπτωση της HT αλλά και η b,c συγκεντρώσεις του Sq προωθούν την αντίδραση.

5.3 Επίδραση στην εξέλιξη του τελικού σταδίου της MR (Μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm)

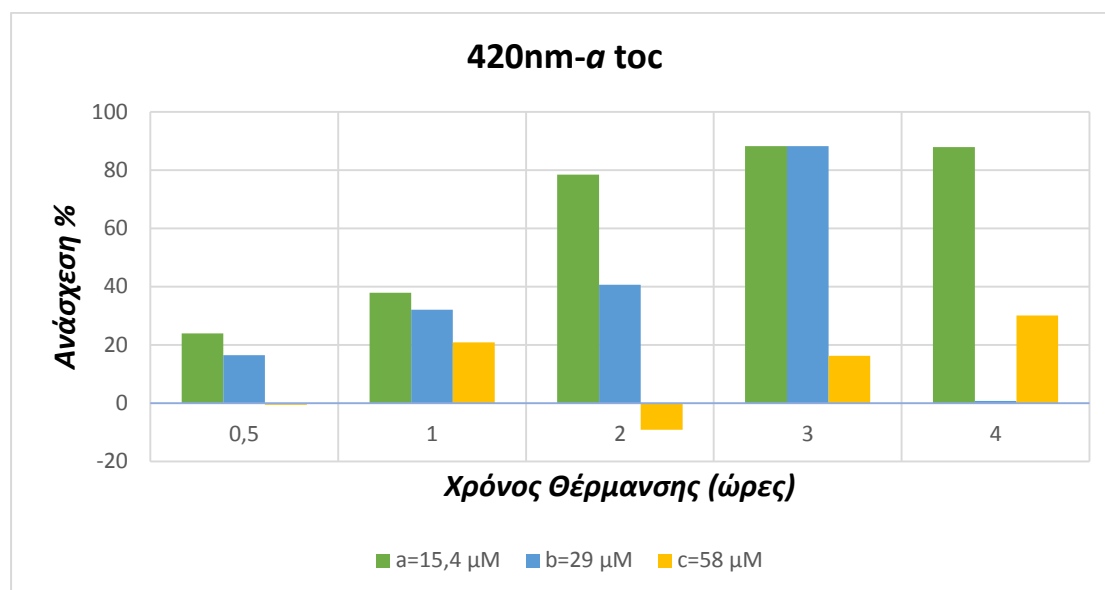
Στον **Διάγραμμα 5.15** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 420nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε *a*-toc σε συγκεντρώσεις a: 15,4μM, b: 29 μM και c: 58 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.15: Η απορρόφηση (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων *a*-toc

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.16** η συγκέντρωση a=15,4μM και η συγκέντρωση b=29μM της *a*-toc προκαλούν ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του τελικού σταδίου της αντίδρασης MR. Στην μισή ώρα θέρμανσης τους 100° C η ανάσχεση έφτασε στο 24% και 16,5% αντίστοιχα και αυξήθηκε σταδιακά στα επόμενα χρονικά σημεία φτάνοντας τη μεγαλύτερη τιμή μετά από 3 ώρες θέρμανσης 88,2% και για τις 2 συγκεντρώσεις. Όταν η *a*-toc προστέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, που αντιστοιχούσε σε c=58μM, παρατηρήθηκε επίσης

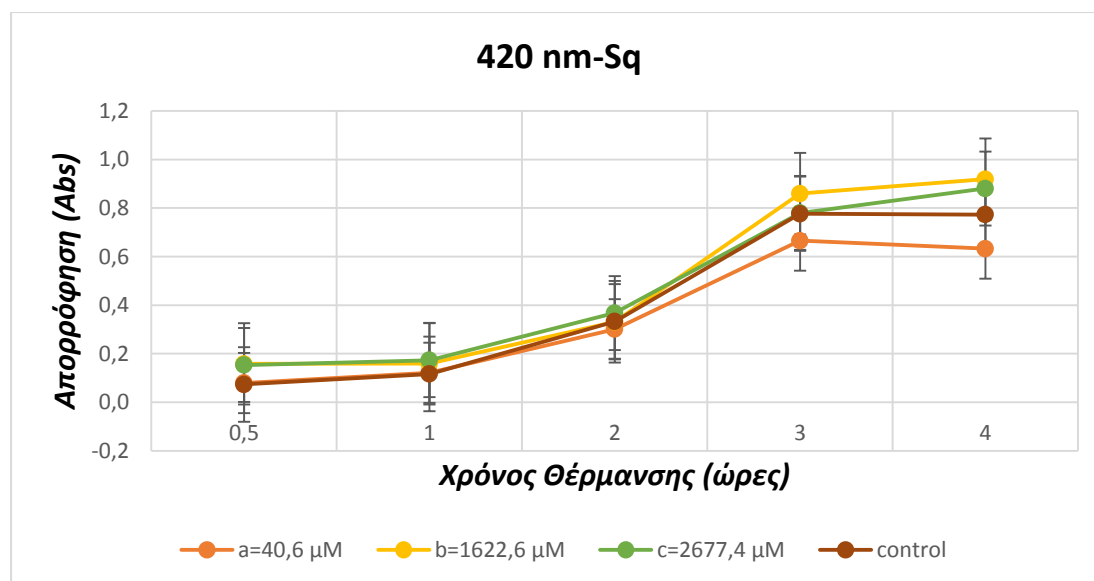
ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του τελικού σταδίου της αντίδρασης MR, που γίνεται περισσότερο εμφανής στις 4 ώρες θέρμανσης (30,2%) .



Διάγραμμα 5.16: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *a*-toc στην ανάσχεση των τελικών προϊόντων της MR (420 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

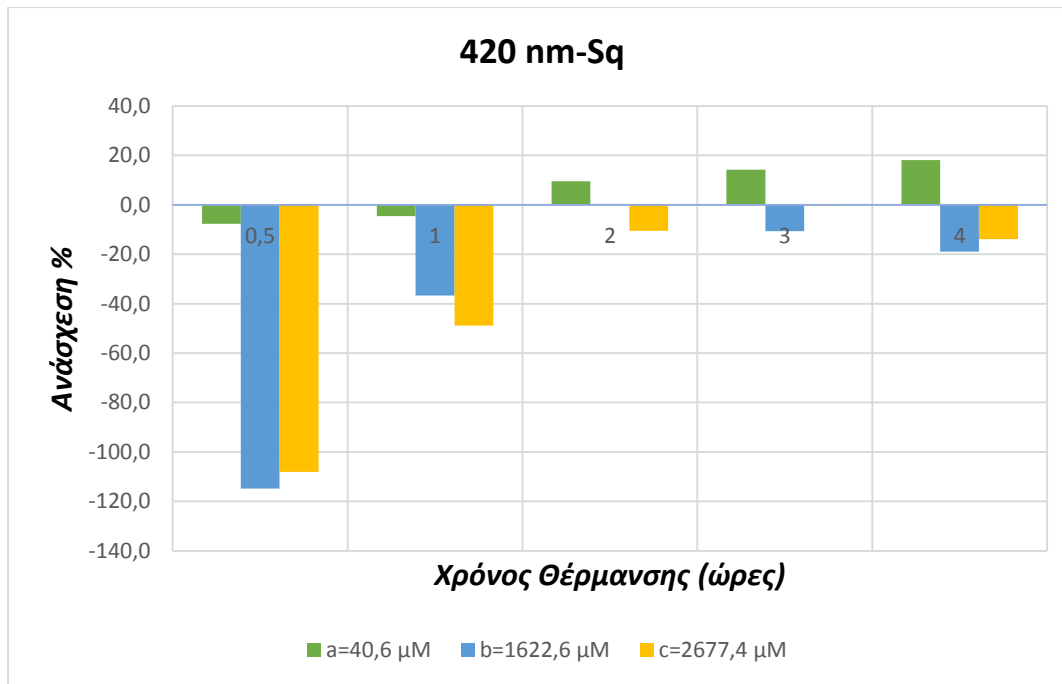
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του τελικού σταδίου της MR μόνο μεταξύ των συγκεντρώσεων a και c (P-Value= 0,03(<0,05)).

Στο **Διάγραμμα 5.17** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 420nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε Sq σε συγκεντρώσεις a: 40,6μM, b: 1622,6 μM και c: 2677,4 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.17: Εξέλιξη της απορρόφησης (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.18** η συγκέντρωση a=40,6 μM του Sq προκαλεί χαμηλή ανάσχεση στον σχηματισμό των προϊόντων του τελικού σταδίου της αντίδρασης MR από την 2^η ώρα της θέρμανσης στους 100° C φτάνοντας τη μεγαλύτερη τιμή μετά από 4 ώρες θέρμανσης 18,2%.

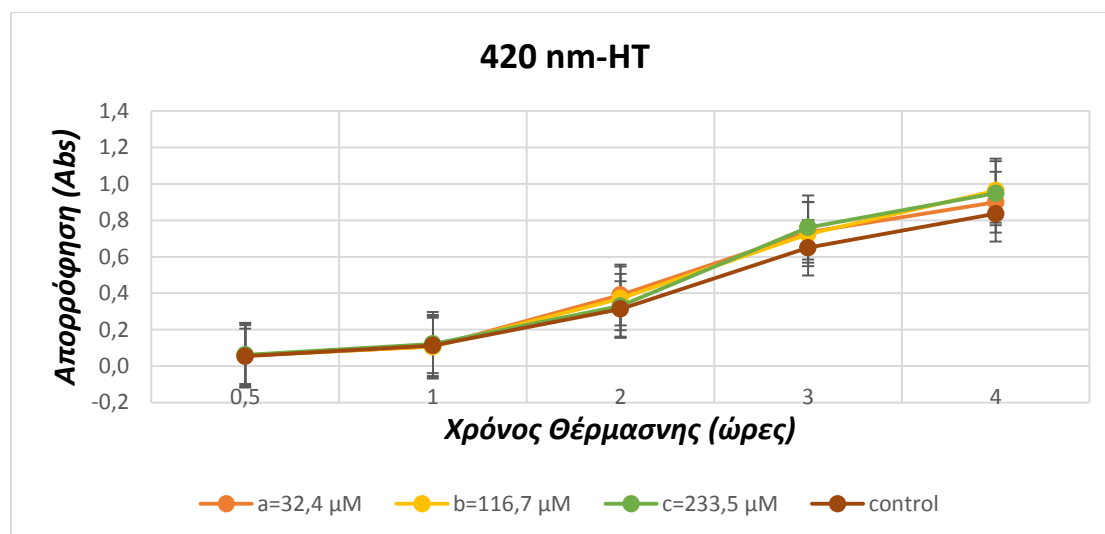


Διάγραμμα 5.18: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Sg στην ανάσχεση των τελικών προϊόντων της MR (420 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

Όταν το Sg προστέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούσαν σε b=1622,6 μM και c=2677,4 μM, παρατηρήθηκε προώθηση που γίνεται περισσότερο εμφανής κατά τη χρήση των b και c συγκεντρώσεων στην μισή ώρα θέρμανσης (-108% και -114,8% αντίστοιχα).

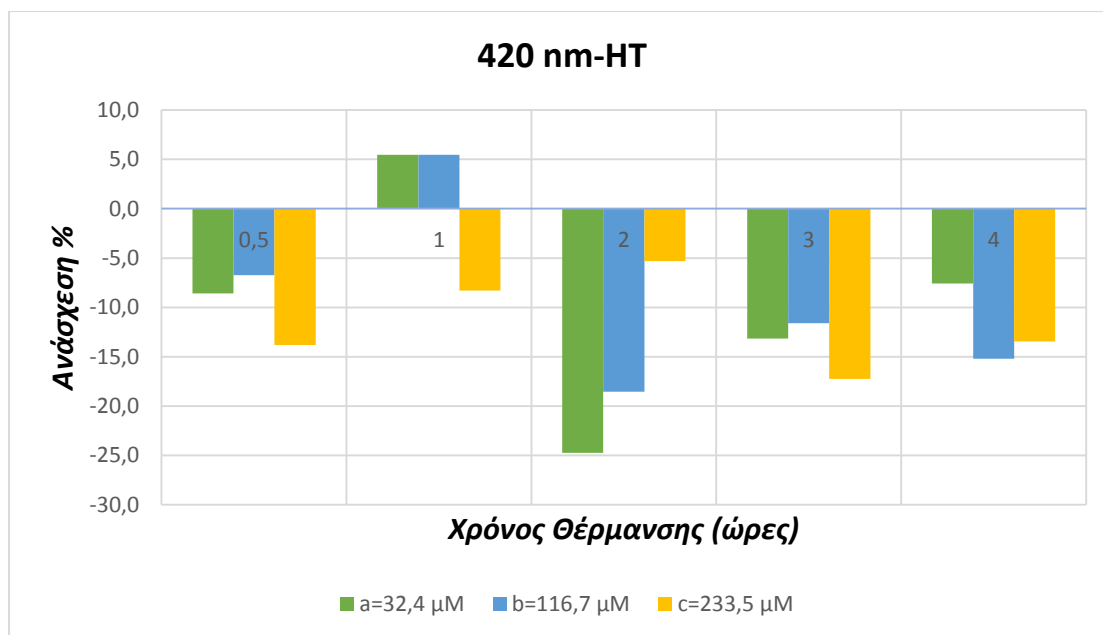
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (P-Value=0,16>0,05).

Στο **Διάγραμμα 5.19** παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης στα 420nm όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε HT σε συγκεντρώσεις a: 32,4 μM, b: 116,7 μM και c: 233,5 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.19: Εξέλιξη της απορρόφησης (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0.1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων HT

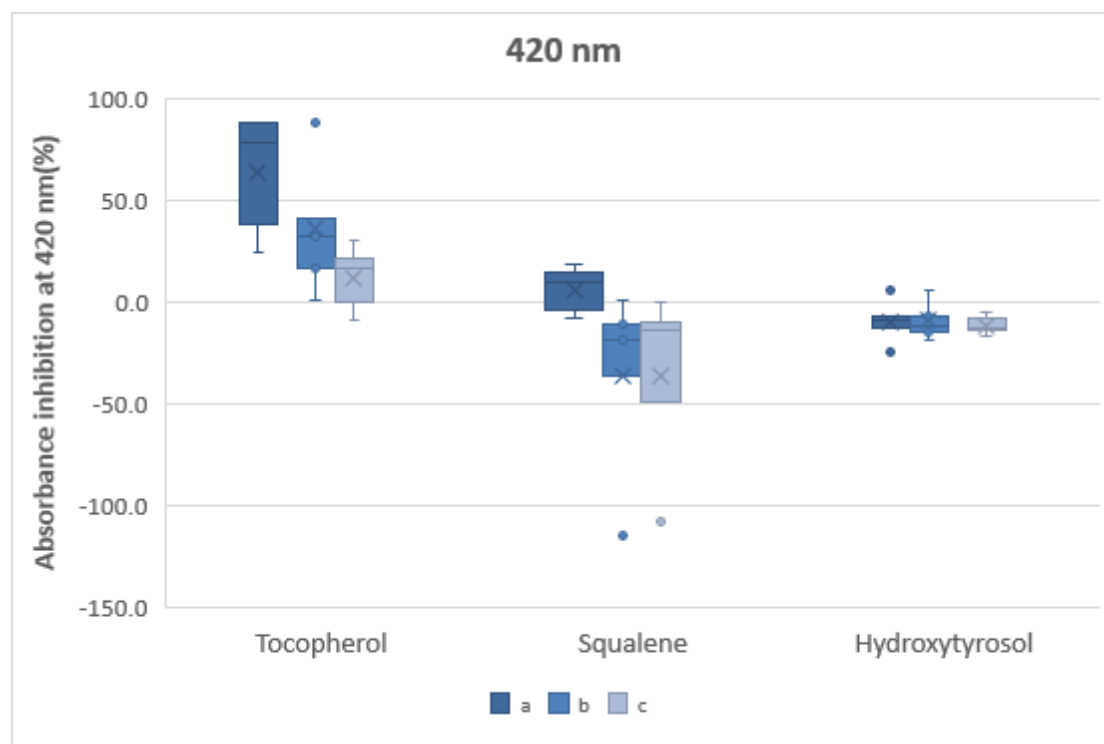
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.20** και οι τρεις συγκεντρώσεις HT που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε προώθηση των αντιδράσεων του τελικού σταδίου της MR. Η επίδραση στην ανάσχεση των προϊόντων του τελικού σταδίου είναι όμοια με αυτήν που είχαν οι τρεις συγκεντρώσεις και στα προϊόντα του ενδιάμεσου σταδίου. Μικρή ανάσχεση ίση με 5,5% σημειώθηκε στην 1^η ώρα θέρμανσης από τη χρήση των συγκεντρώσεων a και b. Οι ίδιες συγκεντρώσεις την 2^η ώρα θέρμανσης οδήγησαν σε προώθηση της τάξης -24,7 και -18,6% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.20 : Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων HT στην ανάσχεση των τελικών προϊόντων της MR (420 nm) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (P-Value=0,90>0,05)

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του τελικού σταδίου της MR στο σύστημα 1:1 στους 100°C (Διάγραμμα 5.21).



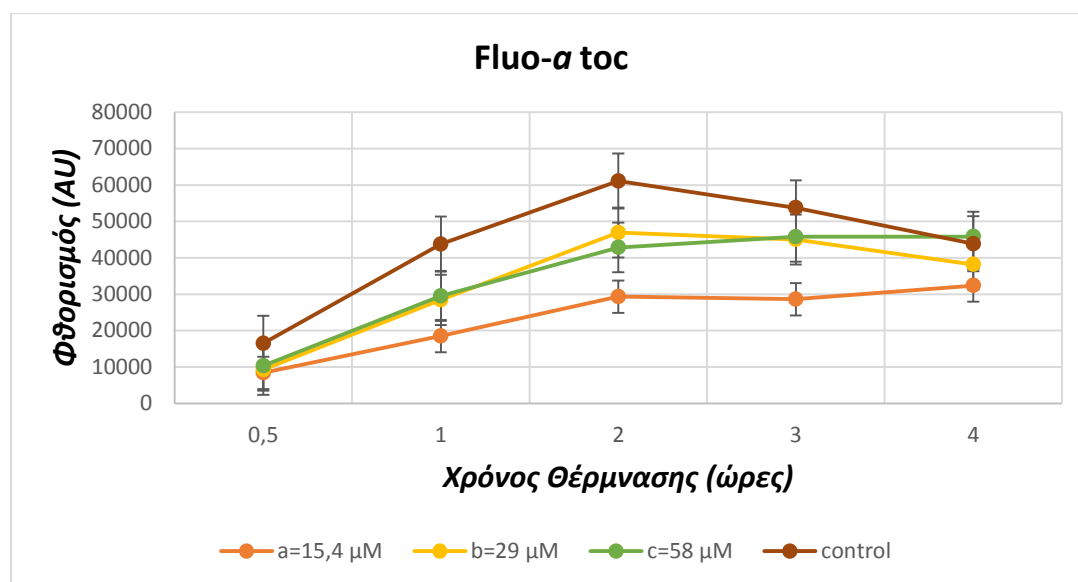
Διάγραμμα 5.21: Θηκόγραμμα που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (420 nm) στο σύστημα 1:1, στους 100°C , από την παρουσία βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαισίου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα, ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα(°,×) εκτός θηκογράμματος υποδηλώνουν ακραίες τιμές.

Πιο συγκεκριμένα το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης, είναι μικρό γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών κατά το διάστημα των 4 h θέρμανσης στους 100°C , ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στην περίπτωση της συγκέντρωσης a της *a*-toc. Όσο αφορά τις τιμές ανάσχεσης της τελευταίας περίπτωσης, παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία, καθώς το 50% των παρατηρήσεων είναι απλωμένες σε ένα διάστημα από 24,% (minimum) έως 78,5% (median) ενώ το υπόλοιπο 50% είναι συμπιεσμένο από 78,5% έως 88,2% (maximum), τιμή ανάσχεσης που σημειώθηκε μετά από 3 ώρες θέρμανσης στους 100°C . Συνολικά παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη επίδραση στην

ανάσχεση σχηματισμού των προϊόντων του τελικού σταδίου της αντίδρασης MR έχει η a συγκέντρωση της a-toc ακολουθούμενη από τις συγκεντρώσεις b και c. Ανάσχεση επιπλέον σημειώθηκε και από τη συγκέντρωση a του Sq. Τέλος, και οι τρεις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην περίπτωση της HT αλλά και η b,c συγκεντρώσεις του Sq προωθούν την αντίδραση.

5.4 Επίδραση στον σχηματισμό φθοριζουσών προϊόντων

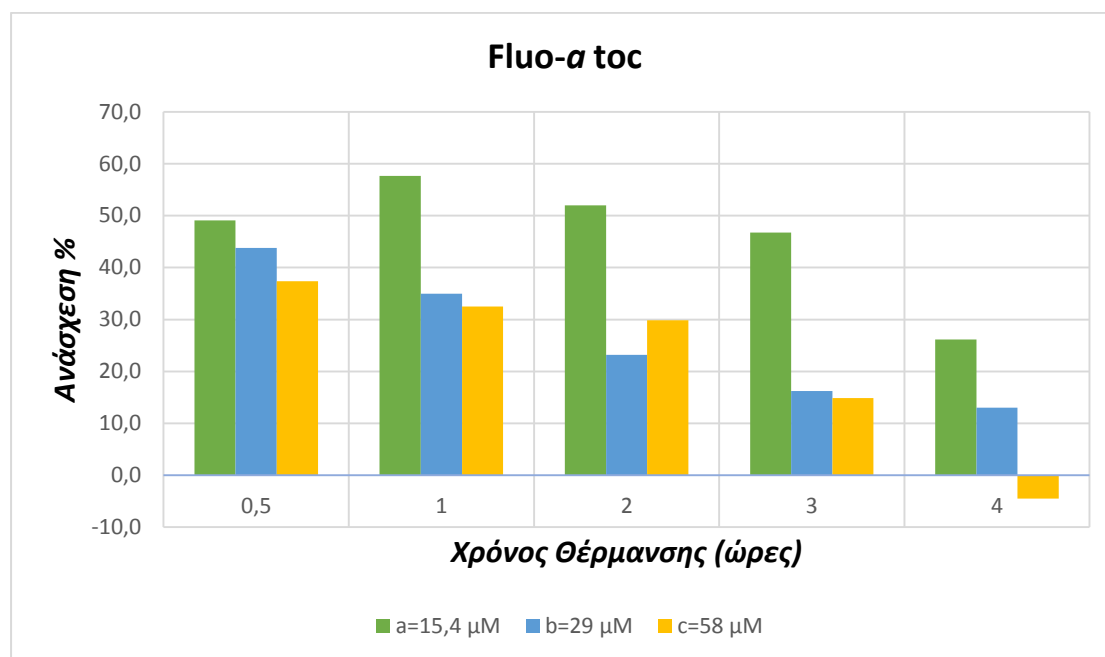
Στο **Διάγραμμα 5.22** παρουσιάζονται οι τιμές του φθορισμού όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε a-toc σε συγκεντρώσεις a: 15,4μM, b: 29 μM και c: 58 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C.



Διάγραμμα 5.22: Εξέλιξη του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 100°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων a-toc

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.23** και οι τρεις συγκεντρώσεις a-toc προκαλούν ανάσχεση στον σχηματισμό φθοριζουσών ουσιών. Στην μισή ώρα θέρμανσης τους 100°C η ανάσχεση έφτασε στο 49,1%, 43,8% και 37,4% για τις συγκεντρώσεις a, b και c αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη τιμή της ανάσχεσης παρατηρήθηκε μετά από 1 ώρα θέρμανσης 57,7% για την συγκέντρωση a. Μετά την

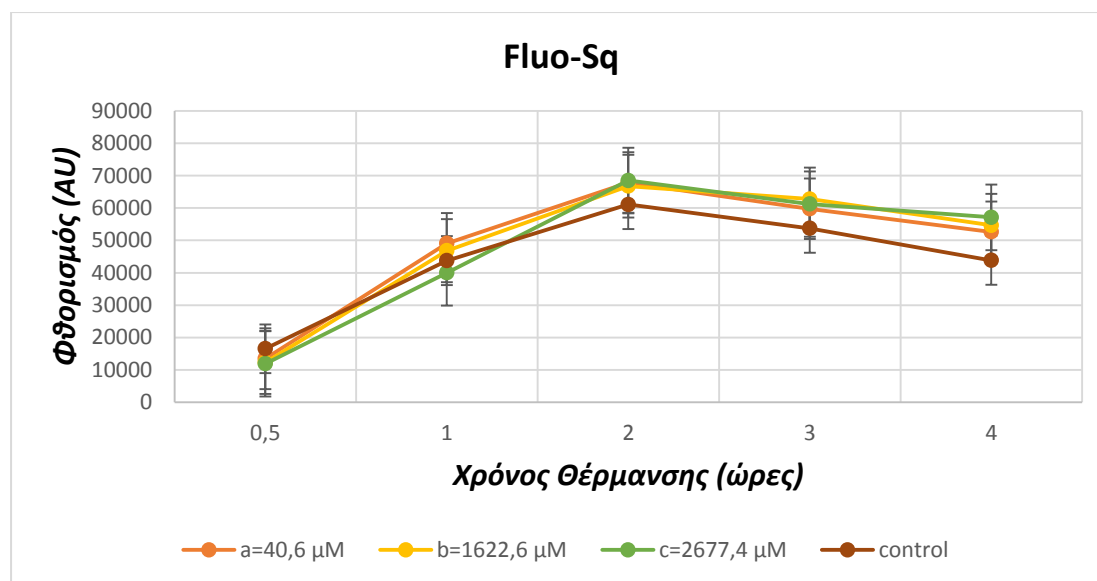
1^η ώρα θέρμανσης η ανάσχεση μειώνεται σταδιακά και για τις 3 συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 5.23: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *a-toc* στην ανάσχεση των φθορίζουσών ουσιών κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

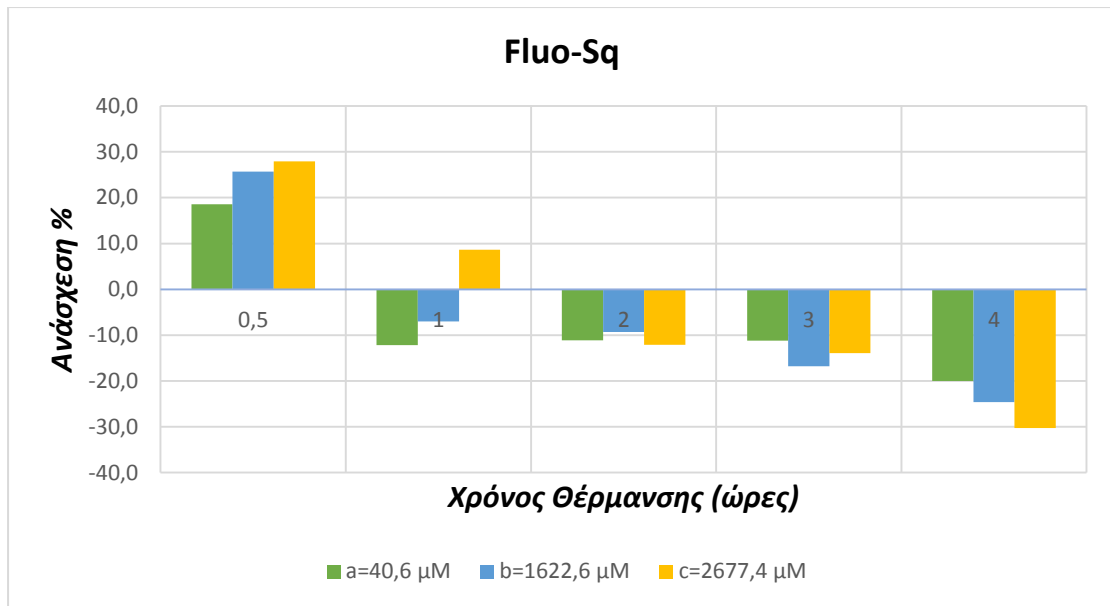
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας φθορίζουσών προϊόντων μεταξύ των συγκεντρώσεων a με τις b και c, P-Value= 0,04(<0,05).

Στο **Διάγραμμα 5.24** παρουσιάζονται οι τιμές του φθορισμού όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 1 M προστέθηκε Sq σε συγκεντρώσεις a: 40,6 μM , b: 1622,6 μM και c: 2677,4 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



Διάγραμμα 5.24: Εξέλιξη του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq

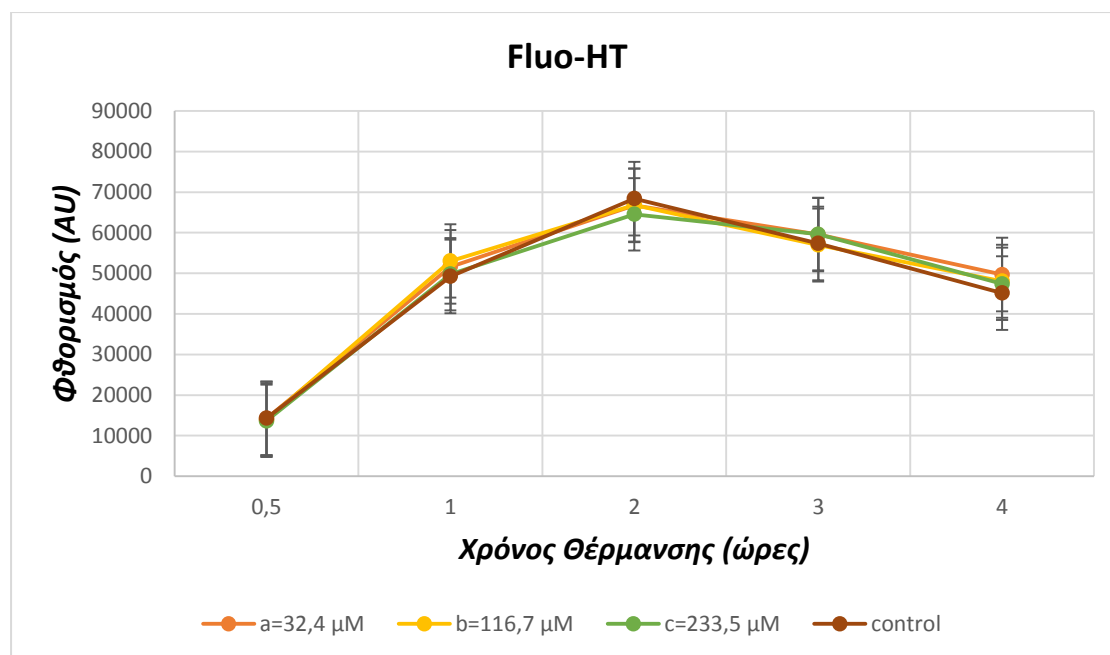
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.25** όλες οι συγκεντρώσεις του Sq a=40,6 μM , b=1622,6 μM και c=2677,4 μM προκαλούν ανάσχεση στον σχηματισμό των φθοριζουσών ουσιών στην μισή ώρα της θέρμανσης στους 100° C με πιο αποτελεσματική την χρήση της συγκέντρωσης c όπου η ανάσχεση έφτασε το (27,9%). Από την 1^η ώρα και έως το τέλος της θέρμανσης και οι τρεις συγκεντρώσεις του Sq που εξετάστηκαν προωθούν το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων (μέγιστη τιμή από τη c συγκέντρωση μετά από 4 ώρες θέρμανσης, -30,3%).



Διάγραμμα 5.25: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Sq στην ανάσχεση των φθοριζουσών ουσιών κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M)

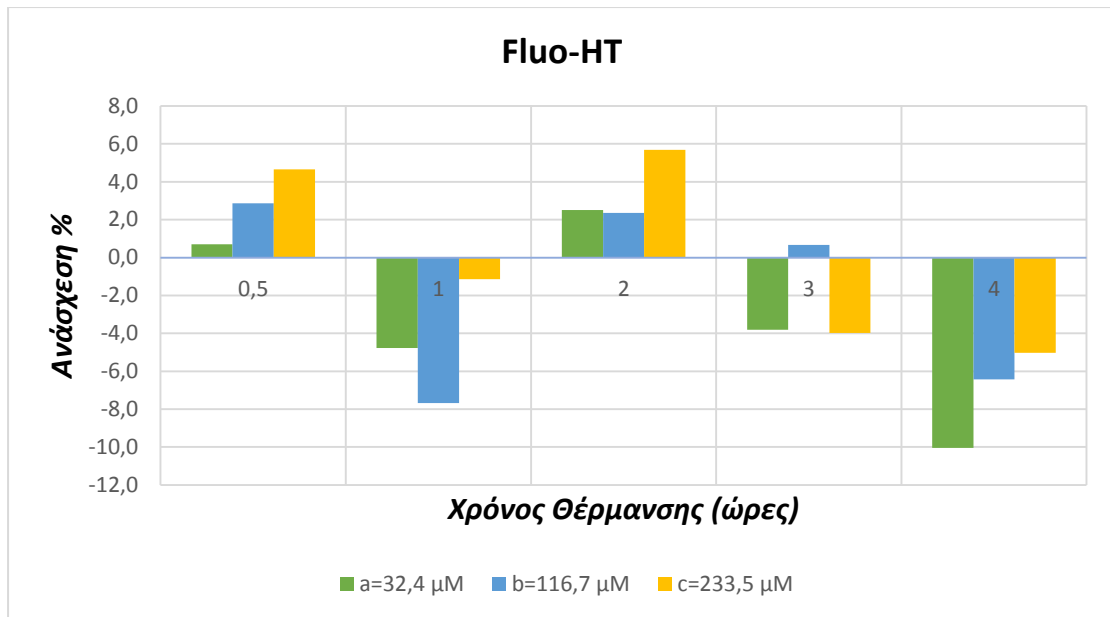
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (P-Value=0,9>0,05).

Στο **Διάγραμμα 5.26** παρουσιάζονται οι τιμές του φθορισμού όταν στο σύστημα γλυκόζης: λυσίνης 0,1 M προστέθηκε HT σε συγκεντρώσεις a: 32,4 μM , b: 116,7 μM και c: 233,5 μM και το σύστημα θερμάνθηκε στους 100°C .



Διάγραμμα 5.26: Εξέλιξη του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων HT

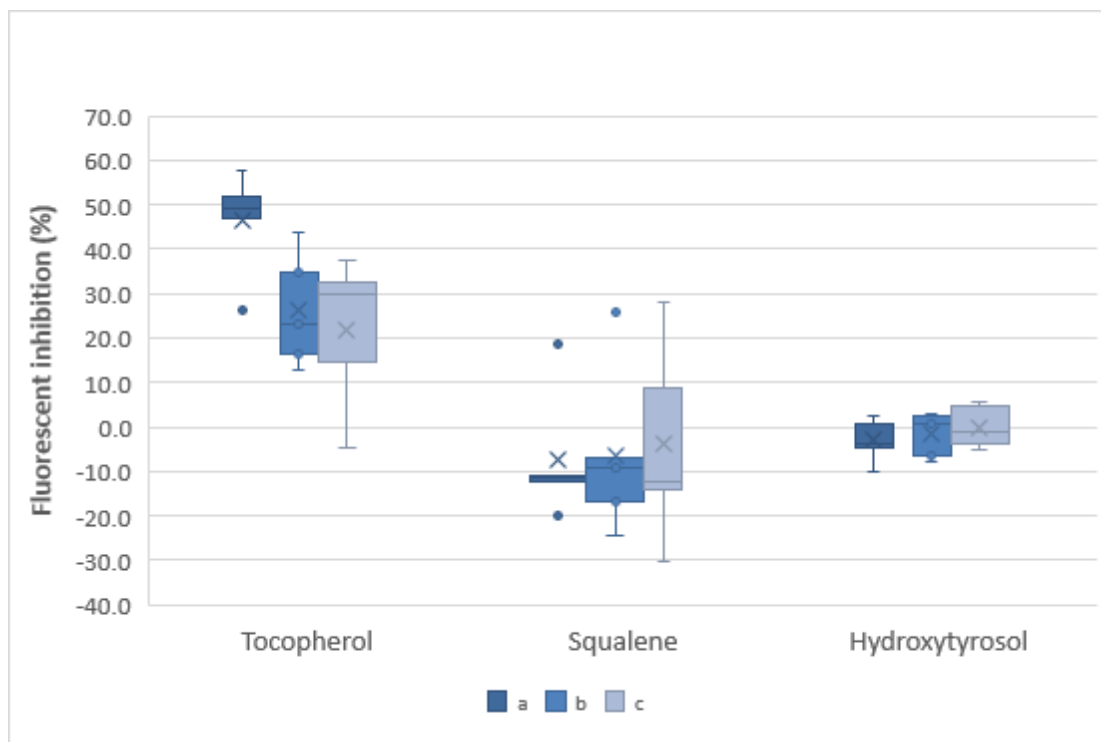
Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 5.27** η συγκέντρωση c της HT (c=233,5 μM) προκαλεί χαμηλή ανάσχεση στον σχηματισμό των φθοριζουσών ουσιών ως την 2η ώρα της θέρμανσης στους 100° C (5,7%). Κατά την 3^η και 4^η ώρα προώθηση που γίνεται περισσότερο εμφανής κατά τη χρήση της a συγκέντρωσης μετά από 4 ώρες θέρμανσης (-10,1%). Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι τρεις συγκεντρώσεις της HT για τις 2 πρώτες ώρες θέρμανσης επηρέασαν με ένα ακριβώς αντίστροφο μοτίβο τον σχηματισμό των φθοριζουσών ενώσεων με αυτόν των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων της MR (βλέπε Διαγράμματα 5.13 & 5.20).



Διάγραμμα 5.27 : Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων HT στην ανάσχεση των φθορίζουσών προϊόντων κατά τη θέρμανση στους 100° C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M).

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας φθορίζουσών ουσιών (P-Value=0,61>0,05)

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας φθοριζουσών ενώσεων στο σύστημα 1:1 στους 100°C (Διάγραμμα 5.28).



Διάγραμμα 5.28: Θηκόγραμμα που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας φθοριζουσών ενώσεων στο σύστημα 1:1, στους 100°C , από την παρουσία βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαισίου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα, ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα(°,×) εκτός θηκογράμματος υποδηλώνουν ακραίες τιμές .

Πιο συγκεκριμένα το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης, της a συγκέντρωσης της *a-toc* και των συγκεντρώσεων a και b του σκουαλενίου είναι μικρό γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών κατά το διάστημα των 4 h θέρμανσης στους 100°C , ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στην περίπτωση της συγκέντρωσης b,c της *a-toc* και της συγκέντρωσης c του Sq. Όσο αφορά τις τιμές ανάσχεσης της τελευταίας περίπτωσης, παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία, καθώς το 50% των παρατηρήσεων είναι συμπιεσμένες σε ένα διάστημα από -30,3% (minimum) έως -12,1% (median) ενώ το υπόλοιπο 50% «απλώνεται» από -12,1% έως 27,9% (maximum), τιμή ανάσχεσης που σημειώθηκε

μετά από μισή ώρα θέρμανσης στους 100°C. Συνολικά παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη επίδραση στην ανάσχεση σχηματισμού φθοριζουσών ενώσεων έχει η **a** συγκέντρωση της *a-toc* ενώ μικρότερη επίδραση φαίνεται να έχουν οι συγκεντρώσεις **b** και **c** της ίδιας ένωσης. Τέλος, και οι τρεις συγκεντρώσεις της HT που εξετάστηκαν προωθούν το φθορισμό του συστήματος. Μεγαλύτερη επίδραση στο φθορισμό παρατηρήθηκε και από τις τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις του Sq.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Συζήτηση

Η αντίδραση Maillard είναι σίγουρα η πιο κοινή αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του τρόπου δράσης βιοδραστικών συστατικών που απαντώνται στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και πιο συγκεκριμένα των: *α*-τοκοφερόλης, σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Οι παράμετροι που επηρεάζουν το ρυθμό της αντίδρασης είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των αντιδρώντων, το pH, η ενεργότητα του νερού καθώς και η παρουσία ενώσεων που δρουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μέσω μηχανισμών δέσμευσης ελεύθερων ριζών ή με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής κατάστασης (Brady, 2013; Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos, 2012; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015b). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού, ενδιάμεσου, τελικού σταδίου της MR αλλά και του σχηματισμού φθοριζουσών ενώσεων σε σύστημα γλυκόζης: λυσίνης (1:1) το οποίο θερμάνθηκε στους 100° C, παρουσία των παραπάνω βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με τη χρήση μη εκλεκτικών μεθόδων όπως είναι η μέτρηση της έντασης της απορρόφησης στα 280, 360 και 420nm και της έντασης του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min. Η θερμοκρασία των 100° C επιλέχθηκε ως μια ήπια θερμική επεξεργασία που υφίστανται τα τρόφιμα κατά το βρασμό.

α-τοκοφερόλη

Η προσθήκη *a-toc* στο υπό εξέταση σύστημα γλυκόζης-λυσίνης 1:1 παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα την εξέλιξη της αντίδρασης συγκριτικά με την προσθήκη σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης. Και οι τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις της *a-toc* οδήγησαν σε ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου και του τελικού σταδίου της MR, ενώ μόνο η μικρότερη ($a=15,4\mu\text{M}$) ανάσχεσε αποτελεσματικά το σχηματισμό των αρχικών προϊόντων. Αξιοσημείωτο είναι ότι η μικρότερη συγκέντρωση είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επίδραση

στην ανάλυση τόσο στα αρχικά όσο και στα ενδιάμεσα στάδια της αντίδρασης. Όσο αφορά στην ανάλυση της δημιουργίας φθοριζουσών προϊόντων, μιας ιδιότητας που σχετίζεται με τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs) η *a-toc* φάνηκε και πάλι περισσότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις άλλες δύο υπό εξέταση ενώσεις, με την μικρότερη συγκέντρωση να παρεμποδίζει στατιστικά σημαντικά το σχηματισμό αυτών των προϊόντων σε σχέση με τις μεγαλύτερες. Η συμπεριφορά αυτή επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η *a-toc* αντιδρά με τις δραστικές ομάδες της αντίδρασης (αμινομάδα, καρβονυλομάδα) παρεμποδίζοντας την καρβονυλοαμινο συμπύκνωση και την μετάθεση Amadori ενώ είναι δραστική και στα μετέπειτα στάδια κατά τις αντιδράσεις αφυδάτωσης και κατακερματισμού των σακχάρων καθώς και στις αντιδράσεις αποικοδόμησης των αμινοξέων αλλά και κατά το στάδιο του πολυμερισμού.

Μελέτες για τη δράση της *a-toc* στη γλυκίωση έχουν διεξαχθεί κυρίως σε βιολογικά δείγματα (**Jain and Palmer 1997**). Τα συμπεράσματα των μελετών είναι ότι η βιταμίνη E έχει ανασταλτική επίδραση στη γήρανση και τη γλυκίωση. Κυρίως η δράση της συνδέεται με την παρεμπόδιση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, την αποτροπή της γλυκίωσης της αιμοσφαιρίνης και την αναστολή του σχηματισμού AGEs *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα η δράση εστιάζει στην ανάλυση του σχηματισμού της μηλονικής διαλδεϋδης (προϊόν βιοχημικής υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων). Επιπρόσθετα αναφέρεται ότι ο συνδυασμός βιταμίνης C και βιταμίνης E έχει μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση στη γλυκίωση και τη συσσώρευση AGEs από ότι ο κάθε παράγοντας μόνος του. Τέλος, μια ακόμη έρευνα έδειξε ότι η *a-toc* είναι ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας ο οποίος περιορίζει τον σχηματισμό των AGEs αλλά και άλλων παρόμοιων προϊόντων *in vivo*. Από τα αποτελέσματά της βρέθηκε ότι ο σχηματισμός των AGEs αλλά και άλλων παρόμοιων προϊόντων στην υπεργλυκαιμία μπορεί να ανασταλεί μερικώς με την χορήγηση της *a-toc* μειώνοντας τα επίπεδα υπεροξειδωσής των λιπιδίων ή του οξειδωτικού stress (**Y. Aoki et al., 1992**). Η *a-toc* αναστέλλει τον σχηματισμό των προϊόντων της αντίδρασης MR αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης της στα στάδια της αντίδρασης.

Σκουαλένιο

Η προσθήκη Sq στο υπό εξέταση σύστημα γλυκόζης-λυσίνης 1:1 έδρασε προωθητικά στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Ανάσχεση στη δημιουργία των προϊόντων του ενδιάμεσου και του τελικού σταδίου της αντίδρασης, μετά την 2^η ώρα της θέρμανσης, σημειώθηκε από την μικρότερη συγκέντρωση σκουαλενίου που εξετάστηκε ($a=40,6\mu\text{M}$). Στον ίδιο χρονικό διάστημα οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μικρή επίδραση στην εξέλιξη της αντίδρασης. Παρόλα αυτά σε κανένα στάδιο της αντίδρασης δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δράση των τριών συγκεντρώσεων του σκουαλενίου που εξετάστηκαν. Αξιοσημείωτο είναι ότι η παρουσία αυτού του τριτερπενικού υδρογονάνθρακα (και για τις τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις a, b και c) προωθεί το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων, γεγονός που δεν μπορεί να εξηγηθεί από τη δομή του καθώς δεν περιέχει αρωματικές ομάδες και η αλειφατική δομή του δεν είναι παρουσιάζει υψηλή συζυγία. Η συμπεριφορά του στο φθορισμό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Λίγα είναι γνωστά για το ρόλο των υδρογονανθράκων στην γλυκίωση των πρωτεϊνών. Από τη βιβλιογραφία περισσότερο δραστικά στην ανάσχεση των AGEs είναι τα τερπένια με πενταμελής ή εξαμελής δακτυλίους στη δομή τους (**Song et al., 2021; Vlassopoulos et al., 2022**). Επιπλέον στη μελέτη του **Amarowicz, 2009**, επισημαίνεται η σταθερότητα του μορίου αυτού σε θερμικές επεξεργασίες όπως αυτές του τηγανίσματος ενώ κατά το ψήσιμο παρουσιάζει μέγιστη απώλεια μόλις 12% (20 λεπτά στους 150°C). Συνεπώς το Sq χαρακτηρίζεται από θερμική σταθερότητα και δεν αναμένεται η θερμική επεξεργασία των 100°C που εξετάστηκε να επιφέρει αλλαγές στη δομή του. Όταν υποβλήθηκε σε επιταχυνόμενη οξείδωση (σε συσκευή Rancimat) στους 100° C, παρουσίασε αμελητέα αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στην ικανότητα να δρα ως δότης ηλεκτρονίου από τις μεθυλο-ομάδες του (**Micera et al., 2020**).

Υδροξυτυροσόλη

Η προσθήκη της υδροξυτυροσόλης (HT) κατά τη θέρμανση στους 100°C του συστήματος γλυκόζης-λυσίνης 1:1 ανάσχεσε το σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR και μάλιστα η δράση αυτή δεν φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Στα επόμενα στάδια της αντίδρασης έδρασε

προωθητικά με χαρακτηριστικό τη μικρή μεταβλητότητα των τιμών της προώθησης σε σχέση με το χρόνο θέρμανσης και τη συγκέντρωση. Όσο αφορά την επίδραση στο σχηματισμό φθοριζουσών προϊόντων μικρές τιμές ανάσχεσης σημειώθηκαν από την χρήση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ($c=233,5\mu\text{M}$). Η δράση της τελευταίας δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις.

Η HT έχει μελετηθεί περισσότερο συγκριτικά με την α -τοκοφερόλη και το σκουαλένιο ως προς την αντιγλυκαιμική της δράση και την ανάσχεση των AGEs. Σε *in vitro* πειράματα που διεξήχθησαν υπό φυσιολογικές συνθήκες στους 37°C για 14 ημέρες, διαπιστώθηκε η ικανότητά της να ανταγωνίζεται τις: λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη στη δέσμευση δικαρβονυλικών ενώσεων (γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη) με αποτέλεσμα την ανάσχεση σχηματισμού των προϊόντων προχωρημένης γλυκίωσης (Navarro et al., 2015; Navarro et al., 2016). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαίωσαν ότι αυτή η ανασταλτική δράση μπορεί να παραμείνει και στις έντονες θερμικές επεξεργασίες που υφίστανται τα τρόφιμα. Η θερμική επεξεργασία των 100°C , η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, επιτάχυνε τις αντιδράσεις γλυκίωσης και απέτρεψε τη δράση της HT στην ανάσχεση των AGEs. Επιπλέον στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η HT παρουσιάζει ανασταλτική δράση στο σχηματισμό φρουκτοζαμίνης με αποτέλεσμα να είναι δραστική και στα αρχικά της αντίδρασης MR (Khan et al., 2020). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν αυτήν την δράση. Παρόλα αυτά, ενώ τα αποτελέσματα από τα *in vitro* πειράματα είναι πολλά υποσχόμενα όσον αφορά την υδροξυτυροσόλη στις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού, πρέπει να γίνουν στο μέλλον περισσότερα βήματα προς τη μελέτη της δράσης στα τρόφιμα.

6.2 Συμπεράσματα

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής είναι η μελέτη της επίδρασης των ενώσεων α -τοκοφερόλης, σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης στη γλυκίωση της λυσίνης και στο σχηματισμό των AGEs. Επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι συγκεκριμένες ενώσεις καθώς αποτελούν σημαντικά βιοδραστικά συστατικά του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, της σημαντικότερης πηγής λιπαρών υλών για τη χώρα μας και βάση της μεσογειακής διατροφής.

Η μελέτη κατέληξε στα εξής:

Η προσθήκη α -τοκοφερόλης (a-toc) παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα την εξέλιξη της αντίδρασης συγκριτικά με την προσθήκη σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης.

Η προσθήκη σκουαλενίου (Sq) έδρασε προωθητικά στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Η παρουσία αυτού του τριτερπενικού υδρογονάνθρακα προωθεί το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων, γεγονός που δεν μπορεί να εξηγηθεί από τη δομή του. Η συμπεριφορά του στο φθορισμό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η προσθήκη της υδροξυτυροσόλης (HT) ανάσχεσε το σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης MR και μάλιστα η δράση αυτή δεν φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η θερμική επεξεργασία των 100°C, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, επιτάχυνε τις αντιδράσεις γλυκίωσης και απέτρεψε τη δράση της HT στα επόμενα στάδια της αντίδρασης και στο σχηματισμό φθοριζουσών προϊόντων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amarowicz, R., (2009). Squalene: A natural antioxidant? *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 411-412. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900102>

Anwar, S., Khan, S., Almatroudi, A., Khan, A. A., Alsahli, M. A., Almatroudi, S. A., & Rahmani, A.H. (2021). A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 787-805.

Aoki Y., Yanagisawa Y., Yazaki K., Oguchi H. , Kiyosawa K., and Furuta S. (1992). Protective effect of vitamin E supplementation on increased thermal stability of collagen in diabetic rats *Diabetology* 35:913-916

BeMiller, J.N. & Huber, K. C. (2008). Carbohydrates in Fennema's Food Chemistry, pp. 83-100.

Boskou, D., (2015). Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents, in: *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. Elsevier, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50007-0>

Brady, J.W., (2013). *Introductory food chemistry*. Comstock Pub. Associates, Ithaca.

Chen Jie-Hua, Lin Xu, Bu Cuihong and Zhang Xuguang (2018). Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies. *Nutrition & Metabolism* 15:72

Chen J.L.T. , Francis J., (2012) Pyridoxamine, advanced glycation inhibition, and diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (1) 6–8.

Fang, H., Wang, L., Zhang, S., Liu, H., Li, J. (2014) Advanced glycation end products (AGEs) formation in high-protein foods processing model system *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 14 (2), pp. 28-34.

Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B. S., Uribarri, J., & Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(8), 1287-1291

Gonzalez-Burgos, E., Gomez-Serranillos, M.P., (2012). Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry* 19, 5319–5341. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>

Graßmann, J., (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 505–535. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72015-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X)

Han, L., Li, L., Li, B., Zhao, D., Li, Y., Xu, Z., Liu, G., (2013). Glyoxal derived from triglyceride participating in diet-derived Nε-carboxymethyllysine formation. *Food Res. Int.* 51, 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.051>

Hemmler, Daniel, Roullier-Gall, Chloe; Marshall, James W., Rychlik, Michael, Taylor, Andrew J., Schmitt-Kopplin, Philippe (2017). Evolution of Complex Maillard Chemical Reactions, Resolved in Time. *Scientific Reports*, 7(1), 3227

- Hodge, J.E (1953). Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928-943
- Jain S.K., Palmer M., (1997) The effect of oxygen radicals' metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (4) 593–596.
- Khan, M., Liu, H., Wang, J., Sun, B., (2020). Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. *Food Res. Int.* 130, 108933
- Kouka, P. et al., (2017). Assessment of the antioxidant activity of olive oil, total polyphenolic fraction, and Hydroxytyrosol from a Greek Olea European variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), pp. 703-712
- Kutlu, T., (2016). Dietary gliotoxins and infant formulas. *Türk Pediatri Arş.* 51, 179-185
- Lima, M., Assar, S.H., Ames, J.M., (2010). Formation of N^ε-(Carboxymethyl)lysine and Loss of Lysine in Casein Glucose–Fatty Acid Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1954–1958. <https://doi.org/10.1021/jf903562c>
- Lin, J. A., Wu, C. H. & Yen, G. C., (2018). Perspective of Advanced Glycation End Products on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Issue 66, pp. 2065-2070
- Liu P., Feng Y., Wang Y., Zhou Y., Zhao L., (2015) Protective effect of vitamin E against acute kidney injury, *Bio-Med. Mater. Eng.* 26 (Suppl 1) S2133–S2144.
- Luevano-Contreras C. , Chapman-Novakofski K. , (2010). Dietary advanced glycation end products and aging, *Nutrients* 2 (12) 1247–1265
- Martins, S. I., Jongen, W. M., & Van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in food science & technology*, 11(9-10), 364-373
- Mazumder M.A.R., Hongsprabhas P., Thottiam R., (2019). In vitro and in vivo inhibition of Maillard reaction products using amino acids, modified proteins, vitamins, and genistein: a review, *J. Food Biochem.* 43 (12) 13089.
- Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Berteza, C.M., Levi, R., Gallo, M.P., Querio, G., (2020). Squalene: More than a Step toward Sterols. *Antioxidants* 9, 688. <https://doi.org/10.3390/antiox9080688>
- Mikrou, T., Pantelidou, E., Parasyri, N., Papaioannou, A., Kapsokefalou, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., (2020). Varietal and Geographical Discrimination of Greek
- Milkovska-Stamenova, S., Schmidt, R., Frolov, A., & Birkemeyer, C. (2015). GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(25), 5911-5919
- Navarro, M., Morales, F.J., (2015). Mechanism of reactive carbonyl species trapping by Hydroxytyrosol under simulated physiological conditions. *Food Chem.* 175, 92-99.
- Navarro, Marta, Morales, Francisco J. (2016). In vitro investigation on the antiglycative and carbonyl trapping activities of Hydroxytyrosol. *European Food Research and Technology*, 242(7), 1101-1110

- Nie, S., Huang, J., Hu, J., Zhang, Y., Wang, S., Li, C., ... & Xie, M. (2013). Effect of pH, temperature, and heating time on the formation of furan in sugar-glycine model systems. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 87-92
- Nguyen, H.T., van der Fels-Klerx, H.J., van Boekel, M.A.J.S., (2014). N-(carboxymethyl)lysine: A Review on Analytical Methods, Formation, and Occurrence in Processed Food, and Health Impact. *Food Rev. Int.* 30, 36-52
- Nowotny, K., Schröter, D., Schreiner, M., Grune, T., (2018). Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Res. Rev.* 47, 55-66
- Qais, Faizan Abul (2019). New Look to Phytomedicine II Understanding Biochemical and Molecular Mechanism of Complications of Glycation and its Management by Herbal Medicine., (), 331-366
- Rahbar S., Figarola J.L., (2003). Novel inhibitors of advanced glycation end products, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (1) 63–79.
- Rizvi S., Raza S.T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S. , Mahdi F., (2014). The role of vitamin e in human health and some diseases, *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 14 (2) e157–e165.
- Romero, C., Brenes, M., (2012). Analysis of Total Contents of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Olive Oils 9017–9022.
- Rufián-Henares, J.A. (2016). Encyclopedia of Food and Health II Maillard Reaction., (),593-600.
- Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G., (2015a). Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecules* 20, 3309–3334. <https://doi.org/10.3390/molecules20023309>
- Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G., (2015b). Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecules* 20, 3309–3334. <https://doi.org/10.3390/molecules20023309>
- Schalkwijk C.G., Miyata T., (2012). Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics, *Amino Acids* 42 (4) 1193–1204.
- Skoog, D.A., Holler, J. & Crouch, S.R, (2007). An Introduction to Ultraviolet-Visible Molecular Absorption Spectrometry. In: *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont, USA: Thomson Brooks/Cole, pp. 336-366
- Skoog, D.A., Holler, J. & Crouch, S.R, (2007). An Introduction to Ultraviolet-Visible Molecular Absorption Spectrometry. In: *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont, USA: Thomson Brooks/Cole, pp. 367-398
- Song, Q., Liu, J., Dong, L., Wang, X., & Zhang, X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111750
- Starowich, Malgorzata, Zielinski, Henryk (2019). Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by High Antioxidant-Levelled Spices Commonly Used in European Cuisine. *Antioxidants*, 8(4), 100-
- Thornalley, P.J., (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 31–40.

- Troise, A.D., (2019). Maillard Reaction and Food Safety, in: Pasquale Ferranti, Elliot M. Berry, Jock R. Anderson (Ed.), *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Elsevier, pp. 364–369.
- Tsimidou, M. Z., (2010). Squalene and Tocopherols in Olive Oil. In: V. Preedy & R. Watson, eds. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. s.l.:Academic Press, pp. 561-567.
- Uribarri, J., del Castillo, M. D., de la Maza, M. P., Filip, R., Gugliurri, A., Luevano-Contreras, C., ... & Garay-Sevilla, M. E. (2015). Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Advances in nutrition*, 6(4), 461-473
- Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., ... & Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916
- Velichkova, S., Foubert, K., & Pieters, L. (2021). Natural Products as a Source of Inspiration for Novel Inhibitors of Advanced Glycation End Products (AGEs) Formation. *Planta Medica*, 87(10/11), 780-801
- Vinson J.A., Howard, T.B., (1996). Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients, *J. Nutr. Biochem.* 7 (12) 659–663.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., Aldini, G., (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* 47, 3–27.
- Vlassopoulos Antonis, Mikrou Theano, Papantoni Artemis, Papadopoulos Georgios, Kapsokefalou Maria, Mallouchos Athanasios and Gardeli Chrysavgi (2022). The Effect of Terpenoid Compounds on the Formation of Advanced Glycation End products (AGEs) in Model Systems. Laboratory of Food Chemistry and Analysis, Department of Food Science and Human Nutrition
- Voziyan P.A., Hudson B.G., (2005). Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (15) 1671–1681.
- Wang, Y., Liu, H., Zhang, D., Liu, J., Wang, J., Wang, S., Sun, B., (2019). Baijiu Vinsase Extract Scavenges Glyoxal and Inhibits the Formation of Nε-Carboxymethyl lysine in Dairy Food. *Molecules* 24, 1526.
- Wei, Q., Liu, T., Sun, D.-W., 2018a. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 82, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.020>
- Wu, Chi-Hao, Huang, Shang-Ming; Lin, Jer-An, Yen, Gow-Chin (2011). Inhibition of advanced glycation end products formation by foodstuffs. *Food & Function*, 2(5), 224
- Zhu, Y., Lan, f., Wei, J., Chong, B., Chen, P., Huynh, L., ... & Liu, Y. (2011). Influence of dietary advanced glycation end products on wound healing in nondiabetic mice. *Journal of food science*, 76(1), T5-T10