



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**«ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ»**

**ΣΚΕΥΑ ΕΛΕΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2011



**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

**«ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ»**

ΣΚΕΥΑ ΕΛΕΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.

Επιβλέπουσα: Γηρούση Σ.
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας Α.Π.Θ.

Παπαδογιάννης Ιωάννης,
Καθηγητής Αναλυτικής
Χημείας Α.Π.Θ.

Τσιμίδου Μαρία,
Καθηγήτρια Χημείας και
Τεχνολογίας Τροφίμων Α.Π.Θ.

Γηρούση Στέλλα,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Αναλυτικής Χημείας Α.Π.Θ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2009-2010 στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική ανάλυση – Έλεγχος ποιότητας», υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Σ. Γηρούση, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την άριστη συνεργασία.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην καθηγήτρια κ. Μ. Τσιμίδου, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την επιλογή των συγκεκριμένων ενώσεων και τις χρήσιμες συμβουλές της καθώς και στον καθηγητή κ. Ι. Παπαδογιάννη, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής και συντονιστή του διαπανεπιστημιακού διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Χημική ανάλυση – Έλεγχος ποιότητας».

Ευχαριστώ επίσης τις υποψήφιες διδάκτορες κ. Κ. Σέρπη και κ. Ζ. Αναστασιάδου για τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές τους καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την άρτια συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στον εργαστηριακό χώρο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις υποψήφιες διδάκτορες κ. Σ. Καραστογιάννη και κ. Μ. Νότου για την ενθάρρυνση και την υποστήριξη τους ενώ ξεχωριστή βοήθεια κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών μου πρόσφερε ο μεταπτυχιακός φοιτητής κ. Χ. Βιολιντζής, τον οποίον ευχαριστώ από καρδιάς.

Τέλος στην οικογένεια μου και στους γονείς μου, Δημήτρη και Έφη Σκεύα εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για τη συνεχή ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια τόσο των προπτυχιακών αλλά και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θεσσαλονίκη 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦ.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	2
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.2. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	4
1.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	8
1.3.1 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών οξέων	9
1.3.2 Αντιοξειδωτικές- Βιολογικές δράσεις των φαινολικών οξέων	11
1.3.3 Τοξικές δράσεις των φαινολικών οξέων	14
1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	16
ΚΕΦ.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ- ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	18
2.1 ΟΡΙΣΜΟΙ	18
2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	19
2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	21
2.4 ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΟΜΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	25
2.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	29
2.6 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ	30
ΚΕΦ.3 ΧΗΜΕΙΑ FENTON	33
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	33
3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON	33
3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ HABER-WEISS (HABER-WILLSTÄTTER)	35
3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	36
3.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ FENTON ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	38
ΚΕΦ.4 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	39
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	41
4.2.1 DNA-Δομή και ιδιότητες	41
4.2.2 Ηλεκτροδραστικότητα νουκλεϊνικών οξέων	42
4.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	45
4.3.1 Εφαρμογή βιοαισθητήρων στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας	45
4.3.2 Εφαρμογή βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών	49
ΚΕΦ.5 ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	54
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	54
5.2 ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ	55
5.3 ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ	57
5.3.1 Διαφορική παλμική βολταμμετρία	57
5.4 ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ	59
5.4.1 Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία (AdSV)	59
5.4.2 Προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdTSV)	62
ΚΕΦ.6 ΒΟΤΑΝΑ	64
6.1 ΤΣΑΙ	64
6.2 ΔΙΚΤΑΜΟ	64
6.3 ΤΣΑΙ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ	65

6.4 ΛΟΥΙΖΑ	66
Π. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
ΚΕΦ. 7 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	69
7.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	69
7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	69
ΚΕΦ. 8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	71
8.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	71
8.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	71
8.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	71
8.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ	72
ΚΕΦ. 9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	73
9.1 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	73
9.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ	73
9.2.1 Προκατεργασία ηλεκτροδιακής επιφάνειας	73
9.2.2 Ακινητοποίηση του dsDNA στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια	73
9.2.3 Χημική οξείδωση του dsDNA μέσω συστήματος Fenton	74
9.2.4 Αλληλεπίδραση του dsDNA με το σύστημα Fenton μετά την προσθήκη των φαινολικών οξέων	74
9.2.5 Μετάλλαξη σήματος-Μέτρηση	74
ΚΕΦ. 10 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	76
10.1 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΥΚΛΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑΣ	76
10.1.1 Γαλλικό οξύ	77
10.1.2 Καφεϊκό οξύ	80
10.1.3 Trolox	84
10.2 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑΣ	88
10.2.1 Βελτιστοποίηση ταχύτητας σάρωσης	88
10.2.2 Βελτιστοποίηση δυναμικού προσυγκέντρωσης	96
10.2.3 Βελτιστοποίηση χρόνου προσυγκέντρωσης	103
10.2.4 Καμπύλες βαθμονόμησης των φαινολικών οξέων	111
ΚΕΦ. 11 ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	122
11.1 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	122
11.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON	123
11.2.1 Δημιουργία συμπλόκου [Fe(EDTA)] ²⁻	124
11.2.2 Βέλτιστη συγκέντρωση συμπλόκου	126
11.2.3 Βέλτιστη αναλογία συμπλόκου / H ₂ O ₂	127
11.2.4 Χρόνος εμφάνισης για τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA	130
11.3 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	131
11.3.1 Χρόνος αλληλεπίδρασης αντιδραστηρίου Fenton με τα φαινολικά οξέα	131
11.3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης για την προσθήκη των φαινολικών οξέων	136
ΚΕΦ. 12 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ	143

ΚΕΦ. 13 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
ΚΕΦ. 14 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

147
149

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

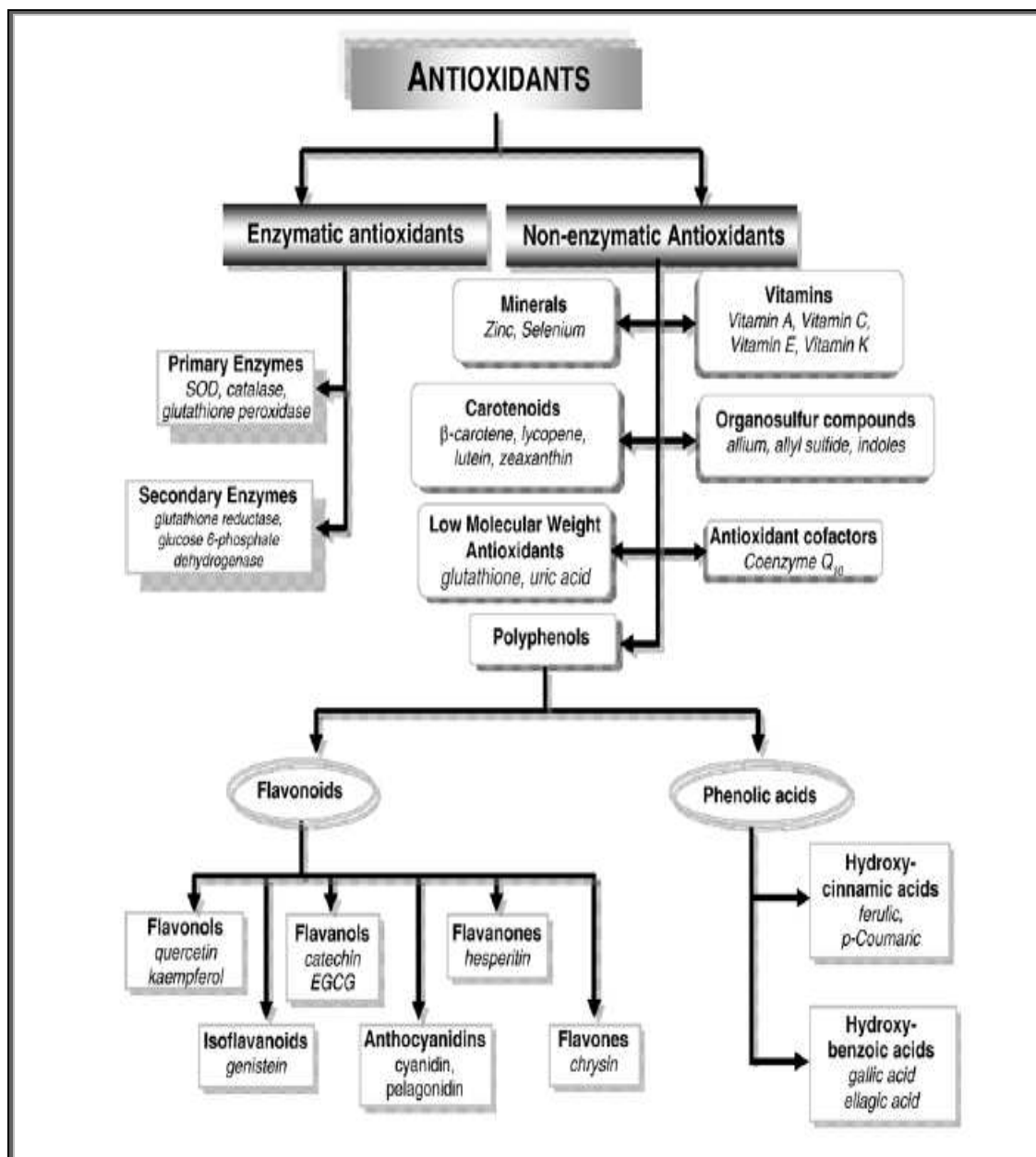
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα αντιοξειδωτικά έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της ευρύτατης χρησιμοποίησής τους στη βιομηχανία τροφίμων και των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν προληπτικούς και σε ορισμένες περιπτώσεις θεραπευτικούς παράγοντες για διάφορες ασθένειες. Διάφοροι παράγοντες όπως η μόλυνση του περιβάλλοντος και ο σύγχρονος χρόνος ζωής έχουν συμβάλλει στη ραγδαία αύξηση της παγκόσμιας αγοράς των αντιοξειδωτικών. Επιπλέον η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε προϊόντα κοσμετολογίας έχει προσθέσει έναν ακόμη παράγοντα έρευνας και ανάπτυξης [1].

Ο Chirpault το 1962 όρισε τα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα ως ουσίες που παρεμποδίζουν ή επιβραδύνουν ικανοποιητικά την οξείδωση εύκολα οξειδώσιμων υποστρωμάτων όπως λίπη [2]. Ο ορισμός που προτάθηκε αργότερα από τους Halliwell και Gutteridge όμως είναι πιο γενικός και περιλαμβάνει όλα τα πιθανά υποστρώματα που μπορούν να υποστούν οξείδωση όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA κ.τ.λ. Αντιοξειδωτικό λοιπόν θεωρείται κάθε ουσία που παρεμποδίζει ή επιβραδύνει την οξείδωση ενός υποστρώματος, όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με αυτή του υποστρώματος [3]. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει ένζυμα ‘δεσμευτές’ ελευθέρων ριζών όπως η υπεροξειδική δισμουτάση και καταλάσες, υδατοδιαλυτούς ‘δεσμευτές’ ελευθέρων ριζών όπως ουρικό οξύ, ακορβικό οξύ και γλουταθειόνη και λιποδιαλυτούς ‘δεσμευτές’ ελευθέρων ριζών όπως τοκοφερόλες και καροτενοειδή. Τα αντιοξειδωτικά δρουν είτε δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες πριν οξειδώσουν κάποιο βιομόριο, είτε τερματίζοντας διαδοχικές αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών είτε προλαμβάνοντας τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [4].

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (σχήμα 1.1). Μπορούμε επίσης να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση. Ορισμένα από αυτά παράγονται ενδογενώς όπως διάφορα ένζυμα, διάφορα αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους και διάφορους συμπαράγοντες ενζύμων (πίνακας 1.1). Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ανήκουν και τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από την τροφή. Τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε διάφορες τάξεις, η μεγαλύτερη των οποίων είναι οι φαινολικές

ενώσεις. Φαινολικά αντιοξειδωτικά συνιστούν τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Επίσης διαιτικά αντιοξειδωτικά αποτελούν οι βιταμίνες, τα καροτενοειδή και τα ιχνοστοιχεία. Ο Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), το λυκοπένιο, η κουερσετίνη, το ελλαγικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η α-τοκοφερόλη και η υδροξυτυροσώλη είναι μερικά από τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται με την τροφή και πολλές φορές αποτελούν βασικά συστατικά συμπληρωμάτων διατροφής.



Σχήμα 1. 1. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών [1]

Αντιοξειδωτικό	Μηχανισμός δράσης
Γλουταθειόνη	Ενδομοριακός αναγωγικός παράγοντας
EGCG	Δημιουργία συμπλόκων με μέταλλα Αναγέννηση α-τοκοφερόλης
Λυκοπένιο	Δέσμευση $^1\text{O}_2$
Ελλαγικό οξύ	Ενεργοποίηση της σύνθεσης της γλουταθειόνης
Συνένζυμο Q ₁₀	Αναστολή της λιπιδικής οξειδωσης Μείωση του μιτοχondριακού οξειδωτικού στρες
Κουερσετίνη	Απενεργοποίηση H ₂ O ₂
Βιταμίνη C	Έμμεση απενεργοποίηση O ₂ ^{•-}
Βιταμίνη E	Άμεση απενεργοποίηση O ₂ ^{•-} Ενεργοποίηση ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση
IBC (indole-3-carbinol)	Αναστολή της δημιουργίας μεταλλάξεων στο DNA Μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών

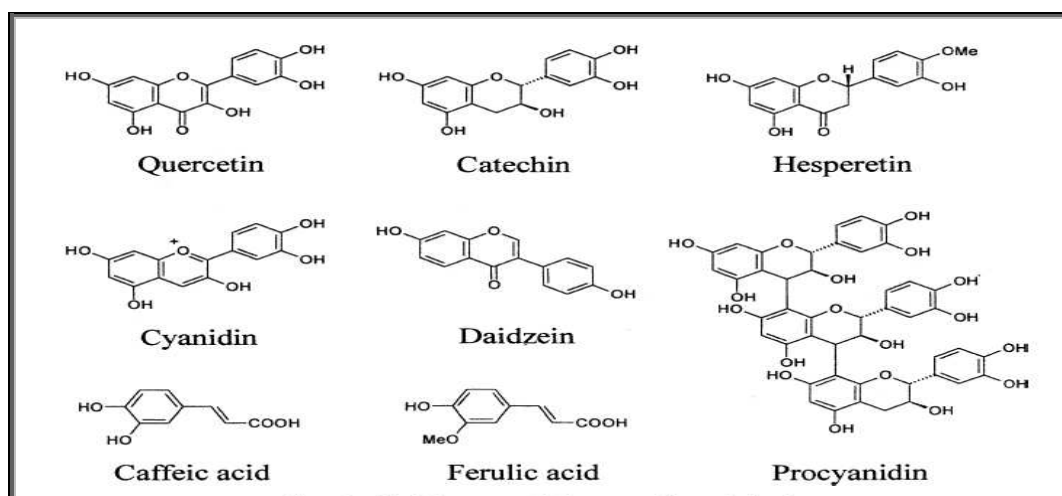
Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικά και οι μηχανισμοί δράσης τους [1]

1.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά ή πολυφαινόλες θεωρούνται η κύρια κατηγορία αντιοξειδωτικών που απαντούν σε τρόφιμα και προσλαμβάνονται με την τροφή. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου με υποκαταστάτες μια ή περισσότερες υδρόξυ ομάδες [5]. Τα απλούστερα μέλη αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα. Την μεγαλύτερη τάξη αποτελούν τα φλαβονοειδή με αντίστοιχη κατηγοριοποίηση σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανονόλες και ανθοκυανίνες. Επιπλέον ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων διακρίνονται σε φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή (C₆-C₃-C₆), στυλβένια (C₆-C₂-C₆) και λιγνάνες (C₆-C₃)₂ (πίνακας 1.2) [6].

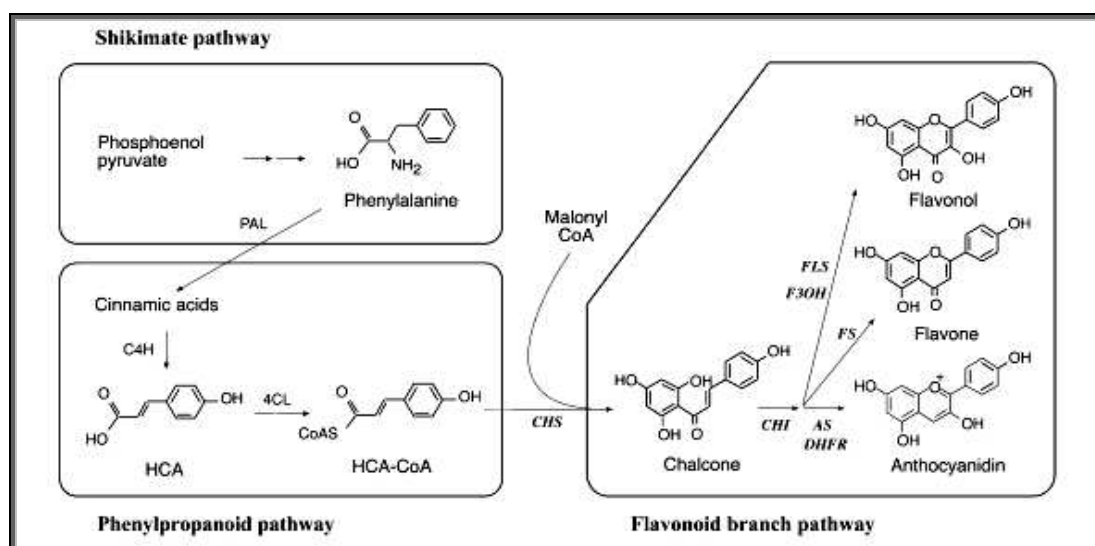
Πίνακας 1. 1. Ταξινόμηση φαινολικών αντιοξειδωτικών κατά Harborne [6]

Δομή	Τάξη φαινολικών αντιοξειδωτικών κατά Harborne
C_6	Απλές φαινόλες
$C_6 - C_1$	Υδροξυβενζοϊκά οξέα
$C_6 - C_2$	Ακετοφαινόνες / Φαινυλοξικά οξέα
$C_6 - C_3$	Υδροξυκινναμωνικά οξέα / Κουμαρίνες / Ισοκουμαρίνες / Χρωμόνες
$C_6 - C_4$	Ναφθοκινόνες
$C_6 - C_1 - C_6$	Ξανθόνες / Βενζοφαινόνες
$C_6 - C_2 - C_6$	Στυλβένια / Ανθρακινόνες
$C_6 - C_3 - C_6$	Φλαβονοειδή (Φλαβανόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες)
$(C_6 - C_3)_2$	Λιγνάνες / Νεολιγνάνες
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Διφλαβάνες / Βιοφλαβονοειδή
$(C_6 - C_3)_n$	Λιγνίνες
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Προανθοκυανιδίνες / Ταννίνες



Σχήμα 1. 2. Δομές κοινών διαιτητικών πολυφαινολών [7]

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτό βασίλειο. Απαντώνται σε όλα τα μέρη των φυτών, ρίζες, φύλλα και καρπούς, ενώ εντοπίζονται κυρίως με τη μορφή εστέρων ή αιθέρων με σάκχαρα ή οργανικά οξέα, παραπροϊόντα του μεταβολισμού των φυτών (σχήμα 1.2). Η βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων λαμβάνει χώρα με δυο τρόπους (σχήμα 1.3), την οδό του σικιμικού και του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος [6]. Αρχικά σχηματίζεται το *trans*-κινναμωνικό οξύ μέσω της οδού του σικιμικού οξέος και της μεταβολικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών. Στη συνέχεια από το *trans*-κινναμωνικό οξύ προκύπτουν οι κουμαρίνες, διάφορα υδροξυκινναμωνικά οξέα, οι χαλκόνες και τα στυλβένια. Τα στυλβένια, μέσω κατάλληλων μετατροπών, δίνουν ορισμένες τάξεις φλαβονοειδών, ενώ οι λιγνίνες και οι λιγνάνες προέρχονται από μεθοξυλιωμένα παράγωγα υδροξυκινναμωνικών οξέων. Εξάιρεση αποτελεί η βιοσύνθεση του γαλλικού οξέος που αποδίδεται σε ενζυμική μετατροπή του 3-διυδροσικιμικού οξέος [8].



Σχήμα 1. 3. Ενδεικτικά στάδια της βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων [9]

Τρόφιμα πλούσια σε φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι διάφορα φρούτα και χυμοί π.χ. μούρα, ρόδια, σταφύλια, μήλα, αχλάδια, εσπεριδοειδή, διάφορα λαχανικά π.χ. μπρόκολο, κουνουπίδι, σκόρδο, ντομάτες, σπανάκι, διάφορα όσπρια π.χ. φασόλια, διάφορα αρτύματα π.χ. ginger, διάφορα ροφήματα π.χ. τσάι, καφές, διάφορα βότανα π.χ. φασκόμηλο, ρίγανη, διάφορα δημητριακά π.χ. βρώμη και μεγάλες ποσότητες σε κόκκινα κρασιά και ελαιόλαδο (πίνακας 1.3) [9-12]. Η ημερήσια πρόσληψη φαινολικών αντιοξειδωτικών κυμαίνεται από 100 mg-2 g, με τον καφέ και το τσάι σαν κύριες πηγές λόγω των διατροφικών συνηθειών του σύγχρονου ανθρώπου [13].

Μελέτες έδειξαν ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν καφέ προσλαμβάνουν ημερησίως περίπου 1 g χλωρογενικών οξέων ενώ αυτοί που δεν τον προτιμούν προσλαμβάνουν αντίστοιχα 25 mg.

Πίνακας 1. 2. Πρόσληψη πολυφαινολών από διάφορα τρόφιμα (mg/100g) κατά USDA [14]

	Φλαβανόνες	Φλαβονόλες	Φλαβανόλες	Προκυανιδίνες	Ανθοκυανιδίνες	Σύνολο
Πορτοκάλι	44	0	0	0	0	44
Κόκκινο κρεμμύδι	0	39	0	0	13	52
Μύρτιλο	0	4	3	325	113	445
Φράουλα	0	2	4	140	nd	146
Μήλο	0	4	9	128	nd	141

1.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα φαινολικά οξέα όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μια μεγάλη υποκατηγορία των φαινολικών αντιοξειδωτικών. Απαντούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Τα φαινολικά οξέα είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα βενζοϊκών και κινναμωνικών οξέων. Στην περίπτωση των βενζοϊκών παραγώγων ο βενζολικός δακτύλιος ενώνεται με καρβοξυλική ομάδα, ενώ στην περίπτωση των κινναμωνικών οξέων με προπενοϊκό οξύ. Και οι δυο αυτές δομές περιλαμβάνουν οξέα με διαφορετικό αριθμό υδροξυλίων [15]. Τα πιο διαδεδομένα υδροξυκινναμωνικά οξέα είναι τα π-κουμαρικό, καφεϊκό και διάφορα φερουλικά οξέα που συναντώνται κυρίως εστεροποιημένα με κινικό, σιμικό, τρυγικό οξύ και διάφορους γλυκοζίτες όπως το χλωρογενικό οξύ (πίνακας 1.4). Όλες οι παραπάνω μορφές διαθέτουν ελεύθερες ομάδες υδροξυλίου [8]. Το καφεϊκό οξύ αποτελεί το 70% των συνολικών υδροξυκινναμωνικών οξέων σε φρούτα ενώ τα φερουλικά οξέα είναι άφθονα στα δημητριακά. Εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας των φρούτων και των λαχανικών σε υδροξυκινναμωνικά οξέα, η συνεισφορά τους στην ολική πρόσληψη φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα βενζοϊκά παράγωγα και διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβόνες και φλαβανόλες [16]. Τα υδροξυκινναμωνικά οξέα αποτελούν πρόδρομες ενώσεις απλούστερων φαινολικών οξέων όπως τα υδροξυβενζοϊκά. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα απαντούν κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών σε πληθώρα φυτών αλλά σε μικρότερη περιεκτικότητα σε σχέση με την προηγούμενη τάξη. Τα πιο γνωστά είναι το π-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλλικό, το πρωτοκατεχικό και το ελλαγικό οξύ. Ξεχωριστή θέση στην παραπάνω κατηγορία κατέχει το γαλλικό οξύ και τα παράγωγα του, τα οποία σε αντίθεση με τα άλλα μέλη της ίδιας κατηγορίας είναι κύρια συστατικά πολλών φυτών και φρούτων όπως τσάι, μούρα, κόκκινο κρασί, κρεμμύδια κ.τ.λ [17-19]. Καθημερινά ο μέσος άνθρωπος προσλαμβάνει 25 mg έως 1 g φαινολικών οξέων [20]. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία υπολόγισε τη μέση ημερήσια πρόσληψη υδροξυκινναμωνικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων σε 211 και 11 mg αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν σημαντικές και καθοριστικές μεταβολές στην πρόσληψη φαινολικών οξέων από 6 ως 987 mg, λόγω των προσωπικών διατροφικών επιλογών και προτιμήσεων του ανθρώπινου πληθυσμού [5, 16]. Κύριες πηγές ελλαγικού οξέος είναι οι καρύδες, οι φράουλες, το ρόδι και ο χυμός του, το κρασί και τα μούρα. Αντίστοιχα φερουλικό οξύ εντοπίζεται σε σόγια, ντομάτες, μπύρα, δημητριακά και κρασί ενώ ροσμαρινικό οξύ σε βότανα

της οικογένειας Lamiaceae και στη ρίγανη. Καφεϊκό οξύ σε μεγάλες ποσότητες βρίσκουμε στο κόκκινο κρασί, στα καρότα, σε δημητριακά, στο λάχανο, στο ακτινίδιο, στη σόγια και στην πατάτα, π-κουμαρικό σε δημητριακά, ελαιόλαδο και σόγια και χλωρογενικά οξέα στον καφέ, στη σόγια και στα καρότα. Το τσάι, η μαύρη σταφίδα, το κόκκινο κρασί και ξηροί καρποί περιέχουν μεγάλες ποσότητες γαλλικού οξέος [5, 16, 21-24].

Πίνακας 1. 4. Δομές φαινολικών οξέων

R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	code	common name
H	H	H	H	a	1	cinnamic acid
-OH	H	H	H	a	2	<i>o</i> -coumaric acid
H	H	-OH	H	a	3	<i>p</i> -coumaric acid
H	-OH	H	H	a	4	<i>m</i> -coumaric acid
H	-OCH ₃	-OH	H	a	5	ferulic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	6	sinapic acid
H	-OH	-OH	H	a	7	caffeic acid
H	H	H	H	b	8	benzoic acid
-OH	H	H	H	b	9	salicylic acid
H	H	-OH	H	b	10	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
H	-OCH ₃	-OH	H	b	11	vanillic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	12	syringic acid
H	-OH	-OH	H	b	13	protocatechuic acid
-OH	H	H	-OH	b	14	gentisic acid
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	gallic acid
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	16	veratric acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	17	syringaldehyde
H	-OCH ₃	-OH	H	c	18	vanillin

1.3.1 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών οξέων

Είναι πλέον αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα ότι τα φαινολικά οξέα έχουν αντιοξειδωτική δράση και κατά συνέπεια δρουν προληπτικά στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών π.χ αθηροσκλήρωση, διαβήτης κ.τ.λ. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι διατροφικές συνήθειες του σύγχρονου ανθρώπου έχουν ως αποτέλεσμα την ικανοποιητική πρόσληψη τόσο πολυφαινολών όσο και φαινολικών οξέων συγκεκριμένα, που θεωρούνται η κύρια μορφή πολυφαινολών που προέρχεται από την διατροφή. Αυτό που πρέπει να διευκρινιστεί όμως είναι η βιοδιαθεσιμότητα, η οποία επιδρά σημαντικά στην κατανόηση της αντιοξειδωτικής δράσης των

φαινολικών οξέων. Τα φαινολικά οξέα λοιπόν εμφανίζουν ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα. Όταν βρίσκονται με την ελεύθερη μορφή τους απορροφώνται κυρίως από το ανώτερο γαστρεντερολογικό σύστημα. Το στομάχι ιδιαίτερα αποτελεί έναν ενεργό τόπο απορρόφησης φαινολικών οξέων όταν το γαλλικό, καφεϊκό, φερουλικό και κουμαρικό οξύ απορροφώνται από αυτό σε ποσοστά από 19 έως 56,1% [16]. Σημαντική όμως μείωση της βιοδιαθεσιμότητας παρατηρείται όταν τα φαινολικά οξέα βρίσκονται με τη μορφή εστέρων. Η απορρόφηση σε αυτή την περίπτωση φτάνει μόλις 0,3-0,4% της αρχικής ποσότητας εξαιτίας της μη ικανοποιητικής υδρόλυσης των εστεροποιημένων μορφών στο έντερο που είναι απαραίτητη για να εισέλθουν τα συστατικά αυτά στον κύκλο του αίματος [25]. Παρόλα αυτά, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των μορίων φθάνει στο παχύ έντερο όπου μεταβολίζεται από τη μικροβιακή χλωρίδα [26]. Εξαιτίας της περιορισμένης περιεκτικότητας των τροφίμων σε υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητά τους είναι περιορισμένες και αφορούν κυρίως το γαλλικό οξύ [17]. Η πλειονότητα αυτών των μελετών συγκλίνει στην ικανοποιητική απορρόφηση του γαλλικού οξέος από τον ανθρώπινο οργανισμό και από ποντίκια [27]. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους, το γαλλικό οξύ ανιχνεύτηκε κυρίως με την μορφή 4-Ο-μεθυλιωμένων και Ο-γλυκορουνιδιωμένων δομών, ανεξάρτητα από την πηγή και την πρόσληψη π.χ. κόκκινο κρασί, τσάι ή καθαρό γαλλικό οξύ [28, 29]. Η συγκέντρωση όλων των μορφών του γαλλικού οξέος που προσδιορίστηκε δυο ώρες μετά την κατανάλωση 200 mL μαύρου τσαγιού, το οποίο περιείχε 50 mg γαλλικού οξέος, ήταν $4,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, ενώ οι μορφές του γαλλικού οξέος που ανιχνεύτηκαν σε δείγμα ούρων αντιστοιχούσαν στο 39,6% της προσληφθείσας αρχικής ποσότητας (πίνακας 1.5). Παρόμοια συμπεριφορά και αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της κατανάλωσης καθαρού γαλλικού οξέος [28]. Ορισμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και για το ελλαγικό οξύ, όπου μετά από κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αυτό όπως φράουλες, μούρα (raspberries) και καρύδες, μόνο ο μεταβολίτης του ελλαγικού οξέος με γλυκουρονικό οξύ urolithine B ανιχνεύτηκε σε δείγμα ούρων [30]. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τα υδροξυκινναμωνικά οξέα επικεντρώνονται στη μελέτη του καφεϊκού, του φερουλικού και του χλωρογενικού οξέος. Όταν η πρόσληψη υδροξυκινναμωνικών οξέων γινόταν με την ελεύθερη μορφή τους, η απορρόφηση από το στομάχι και το λεπτό έντερο ήταν ταχεία και αποτελεσματική. Όταν εθελοντές κατανάλωσαν ντομάτες ή μπύρα, ανιχνεύτηκε

ταχύτατα φερουλικό οξύ στο πλάσμα, ενώ η ποσότητα του φερουλικού οξέος που ανιχνεύθηκε στα ούρα μετά από 8 ώρες αντιστοιχούσε στο 11-30% της αρχικής δόσης [31]. Στην περίπτωση της κατανάλωσης δημητριακών παρατηρήθηκε ταχεία απορρόφηση φερουλικού οξέος από το στομάχι και το λεπτό έντερο [32]. Όταν χορηγήθηκαν 505 mg καφεϊκού οξέος σε εθελοντές, το 11% της δόσης ανιχνεύθηκε στα ούρα. Όταν η πηγή του καφεϊκού οξέος ήταν το κόκκινο κρασί, η ανίχνευση στο πλάσμα έγινε ταχύτατα ενώ η συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος κυμαινόταν από 0,084 έως 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (πίνακας 1.5) [29].

Πίνακας 1. 5. Βιοδιαθεσιμότητα γαλλικού και καφεϊκού οξέος [16, 33]

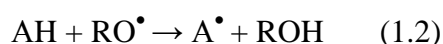
Φαινολικό οξύ	Μορφή	Δόση	T (h)	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Απέκκριση στα ούρα (%)
Καφεϊκό	Καθαρό	125 mg/kg	2	60	40,9
	Καθαρό	110 mg/day	0,5	550	13,7
	Κόκκινο κρασί	55 $\mu\text{g/kg}$	1	0,084	-
	Κόκκινο κρασί	1,8 mg	0,5-1	0,04-0,06	-
Γαλλικό	Καθαρό	50 mg	1,5	4	37,1
	Μαύρο τσάι Assam	50 mg	1,5	4,7	39,6
	Κόκκινο κρασί	4 mg	<1,5	1,57	-
	Κόκκινο κρασί	47 $\mu\text{g/kg}$	2	0,176	-

1.3.2 Αντιοξειδωτικές- Βιολογικές δράσεις των φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα και γενικά οι πολυφαινόλες έχουν κεντρίσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της αποδεδειγμένης αντιοξειδωτικής τους δράσης. Αυτό που καθιστά τα φαινολικά οξέα ισχυρά αντιοξειδωτικά είναι ο φαινολικός δακτύλιος που σταθεροποιείται σημαντικά λόγω συντονισμού. Τα φαινολικά οξέα δρουν με τους ακόλουθους τρόπους:

- ↳ Δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και τα ενεργά είδη οξυγόνου,
- ↳ Δρουν έμμεσα με αναγέννηση ή αύξηση των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών π.χ. α-τοκοφερόλη,
- ↳ Δεσμεύουν διάφορα μεταλλικά ιόντα που συμμετέχουν στην δημιουργία ελευθέρων ριζών (αντίδραση Fenton).

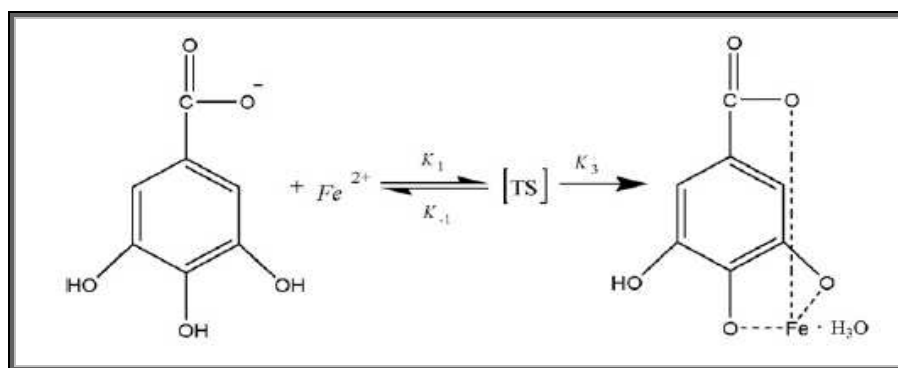
Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιοξειδωτικής τους δράσης αποδίδεται στην απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το υδροξύλιο του φαινολικού δακτυλίου για την απενεργοποίηση των υπερόξυ (ROO^\bullet) ή αλκόξυ (RO^\bullet) ριζών και τη μετατροπή τους σε αδρανή μόρια όπως ROOH και ROH αντίστοιχα (αντιδράσεις 1.1, 1.2).



Οι φαινόξυ ρίζες που παράγονται λόγω της αποβολής του υδρογόνου σταθεροποιούνται λόγω συντονισμού και είναι λιγότερο δραστικές σε σχέση με τις ROO^\bullet και RO^\bullet ρίζες. Επιπλέον οι φαινόξυ ρίζες αντιδρούν με άλλες ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερών προϊόντων [34]. Δεν εμφανίζουν όλα τα φαινολικά οξέα την ίδια αντιοξειδωτική δράση [35]. Η αντιοξειδωτική δράση ενός φαινολικού οξέος εξαρτάται από τη δομή του και τη μορφή τους π.χ. ελεύθερα ή εστεροποιημένα [34]. Η μορφή ουσιαστικά επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα και κατά συνέπεια την αποδοτικότητα του αντιοξειδωτικού, όπως εξηγήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Με τον όρο δομή αναφερόμαστε ουσιαστικά στο βαθμό ευκολίας με τον οποίο αποσπάται ένα υδρογόνο από το υδροξύλιο του δακτυλίου και δεσμεύεται από τις ελεύθερες ρίζες και από την σταθερότητα της σχηματιζόμενης φαινόξυ ρίζας [35].

Έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη υποκαταστατών, υδρόξυ ή άλκυλο ομάδων που προκαλούν αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο φαινολικό υδροξύλιο σε ο-θέση, διευκολύνει την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου εξαιτίας της μείωσης της ενέργειας του δεσμού υδρογόνου-οξυγόνου και κατά συνέπεια αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του φαινολικού οξέος. Επίσης αυτού του είδους η υποκατάσταση αυξάνει την σταθερότητα της φαινόξυ ρίζας. Οι παρατηρήσεις αυτές εξηγούν τη διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση του καφεϊκού και του γαλλικού οξέος. Το γαλλικό οξύ, που θεωρείται μια από τις πιο αποτελεσματικές φαινόλες, διαθέτει τρεις υδρόξυ ομάδες ενώ το καφεϊκό που εμφανίζει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα διαθέτει δυο υδρόξυ ομάδες.

Ένας άλλος τρόπος δράσης όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι η δέσμευση ιόντων μετάλλων από τα φαινολικά οξέα και κατά συνέπεια μείωση των πιθανοτήτων για σχηματισμό ελευθέρων ριζών από ανάλογες αντιδράσεις που συμμετέχουν τα ιόντα αυτά π.χ. αντίδραση Fenton. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η δέσμευση, σύμφωνα με φασματοσκοπικές μελέτες, απεικονίζεται στο σχήμα που ακολουθεί (σχήμα 1.4).

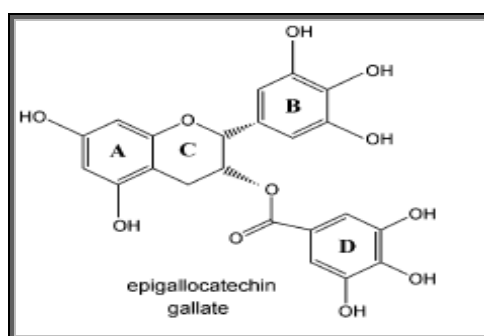


Σχήμα 1. 4. Δέσμευση δισθενούς σιδήρου από το γαλλικό οξύ [36]

Τα φαινολικά οξέα, όπως και τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά, προστατεύουν από ασθένειες που σχετίζονται με τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών βλαβών, όπως γήρανση, οξείδωση LDL και καρδιοπάθειες, διάφορα είδη καρκίνου και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες [37, 38]. Για παράδειγμα, το ροσμαρινικό οξύ έχει αναφερθεί ότι έχει αντιμεταλλαξιογόνο και αντιβακτηριδιακή δράση. Το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ έχουν αντιμεταλλαξιογόνο, αντικαρκινική δράση, ενώ προστατεύουν το DNA από πιθανές βλάβες και απενεργοποιεί τις λιποξυγενάσες [39].

Εκτός της προστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης και της δέσμευσης ελευθέρων ριζών, τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν και άλλες βιολογικές δράσεις. Το καφεϊκό οξύ είναι γνωστό για τον τερμαρισμό της βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων, μορίων που σχετίζονται με ανοσοπαθήσεις όπως το άσθμα και οι αλλεργίες [40]. Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι το γαλλικό οξύ και κάποιοι εστέρες του παρουσιάζουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου [41]. Άλλες μελέτες συνέδεσαν μια σειρά φαινολικών οξέων που βρίσκονται στο κρασί, γαλλικό, καφεϊκό, πρωτοκατεχικό, π-κουμαρικό, σιναπικό και φερουλικό, με την αναστολή της αντιγραφής της AP-1 πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει σε διάφορες διεργασίες όπως η φλεγμονή [42]. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα παράγωγα του καφεϊκού οξέος αναστέλλουν την ανάπτυξη του ιού HIV-1 και για αυτό το λόγο τα

συγκεκριμένα παράγωγα εξετάζονται για πιθανή χορήγησή τους σε αντιϊκή θεραπεία [34]. Σε έρευνες που έγιναν σε ποντίκια, η χορήγηση καφεϊκού και φερουλικού οξέος εμπόδιζε την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης σε διάφορα τεστ αντοχής γλυκόζης που έγιναν ενδοφλέβια, ενώ η επίδραση τόσο του καφεϊκού όσο και του γαλλικού οξέος στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στον άνθρωπο δεν έχει αποσαφηνιστεί [7]. Σχετικά με τις βιολογικές δράσεις του γαλλικού οξέος, οι μελέτες επικεντρώνονται στους διάφορους εστέρες του και όχι στην ελεύθερη μορφή του όπως ο EGCG (σχήμα 1.5).

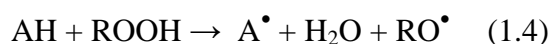
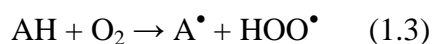


Σχήμα 1.5. EGCG, εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης

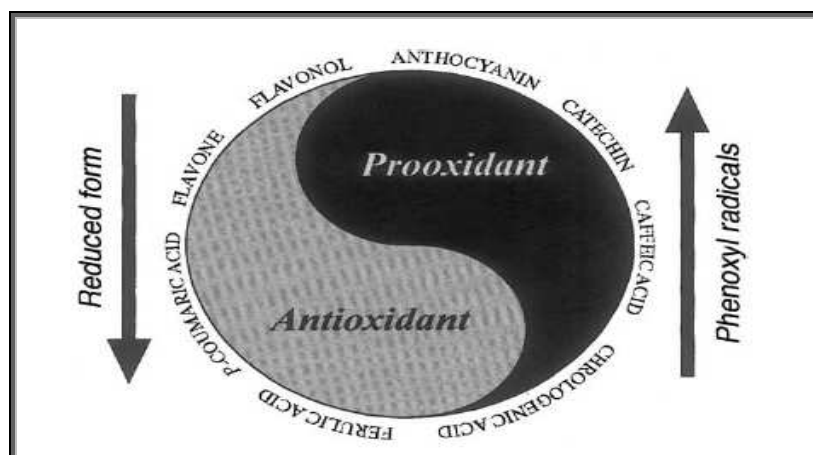
Ο EGCG είναι ο εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πράσινο τσάι. Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι περιορίζει σε σημαντικό ποσοστό τις λοιμώξεις που σχετίζονται με τον ιό του AIDS καθώς και ότι μπλοκάρει τη γλυκοπρωτεΐνη gp120 που επιτρέπει την είσοδο του ιού στα κύτταρα [43, 44]. Επίσης, έρευνες έδειξαν ότι δεσμεύει την πρωτεΐνη Bcl-x1, η οποία εμπλέκεται στην δημιουργία καρκινικών κυττάρων και για αυτόν το λόγο θεωρείται επιβραδυντικός παράγοντας στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου όπως καρκίνος του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας και της ουροδόχου κύστης [45, 46].

1.3.3 Τοξικές δράσεις των φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση, κάτω υπό ορισμένες συνθήκες, είναι πιθανόν να εμφανίζουν και προοξειδωτική δράση (σχήμα 1.6). Όταν η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων είναι πολύ υψηλή και ξεπερνά την κρίσιμη τιμή, τα φαινολικά οξέα οξειδώνουν διάφορα μόρια και παρουσιάζουν προοξειδωτικές ιδιότητες σύμφωνα με τις αντιδράσεις 1.3 και 1.4.:



Επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις υπάρχει πιθανότητα αναγωγής της περίσσειας του Fe^{3+} σε Fe^{2+} ή Cu^{2+} σε Cu^{1+} και ταυτόχρονης δημιουργίας ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton [7]. Ουσιαστικά δρουν έμμεσα παρέχοντας τα ιόντα δισθενούς σιδήρου για την έναρξη της αντίδρασης. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η περίσσεια αυτών των ιόντων δεν συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ιόντα αυτά είναι δεσμευμένα σε ένζυμα και δεν μπορούν να δράσουν ως καταλύτες στις παραπάνω αντιδράσεις [47]. Τέτοια δράση έχει παρατηρηθεί στο γαστρεντερολογικό σύστημα εντόμων, εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης φαινολικών οξέων στο συγκεκριμένο τμήμα [48]. Αντίστοιχες πληροφορίες για τον ανθρώπινο οργανισμό δεν υπάρχουν. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι τέτοιες μελέτες επιβεβαιώνονται στο εργαστήριο αλλά όχι *in vivo* και για αυτό το λόγο δεν μπορούμε να συμπεράνουμε με απόλυτη ασφάλεια [7, 48]. Επιπλέον, λόγω της δομής τους, τα φαινολικά οξέα σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με διάφορα ιόντα όπως $Fe(II)$. Αυτή η ιδιότητα εξηγεί την αδυναμία απορρόφησης του μη αιμικού σιδήρου λόγω της κατανάλωσης τροφών πλούσια σε φαινολικά οξέα όπως τσάι και καφές [49, 50]. Για αυτόν το λόγο σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με πρόσληψη σιδήρου συστήνουν την πόση τσαγιού ή καφέ τουλάχιστον δυο ώρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου. Από την άλλη πλευρά πολύ υποστηρίζουν ότι η δέσμευση της περίσσειας του σιδήρου είναι ευεργετική επειδή υψηλή συγκέντρωση φερριτίνης στο πλάσμα συνδέεται με καρδιολογικές παθήσεις και καρκίνο του παχέως εντέρου [7].



Σχήμα 1. 6. Η διττή συμπεριφορά των φαινολικών αντιοξειδωτικών

1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι πολλές και διαφορετικές. Μεταξύ των κυριότερων συμπεριλαμβάνονται αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες σε οργανικά ή υδατικά διαλύματα καθώς και δοκιμές επιταχυνόμενης οξείδωσης σε μοντέλα λιπαρών υποστρωμάτων.

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Είναι μία φωτομετρική τεχνική που εφαρμόζεται στον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα. Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στην ορατή περιοχή (725nm). Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από το δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος [51, 52, 53, 54, 55].

Μέθοδος Υπερμαγγανικού Καλίου (KMnO_4)

Όπως και η μέθοδος Folin-Ciocalteu έτσι και αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ενώσεις σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ουσιών από το υπερμαγγανικό κάλιο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη από το κυανό στο κίτρινο. Η αλλαγή του χρώματος του δείκτη συμπίπτει με το τέλος της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων [51, 52, 53].

Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH είναι μία μέθοδος εκτίμησης του περιεχομένου σε πολυφαινόλες και βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH^\bullet). Είναι η πιο διαδεδομένη στα πεδία των Επιστημών Τροφίμων και Υγείας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων ριζών DPPH^\bullet , αλλαγή του χρώματος από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο και κατά συνέπεια μειωμένη τιμή απορρόφησης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox [53, 54, 55].

Μέθοδος ORAC

Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) στηρίζεται στην ελάττωση του φθορισμού ορισμένων ουσιών (φυκοερυθρίνες) με την προσθήκη υπερόξυ ριζών, οι οποίες παράγονται κατά τη θερμική αποικοδόμηση του υδατοδιαλυτού αζω-εκκινητή (AAPH) σε ουδέτερο περιβάλλον (37 °C, pH=7). Η δράση αυτή των ριζών αναστέλλεται παρουσία αντιοξειδωτικών [51, 52, 53, 54, 55].

Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) στηρίζεται στην αναγωγή ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου από το αντιοξειδωτικό προς ένα προϊόν με έντονο κυανό χρώμα [51, 52, 53, 54, 55].

Μέθοδος TRAP

Η μέθοδος TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential) βασίζεται στην αντίδραση ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου με μία ουσία, τη λουμινόλη. Το προϊόν της αντίδρασης είναι μία ρίζα λουμινόλης, η οποία παρουσιάζει χημειοφωταύγεια και με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται η συγκέντρωσή της. Παρουσία αντιοξειδωτικών, η χημειοφωταύγεια ελαττώνεται [51, 53, 55].

Μέθοδος ABTS

Η δοκιμή ABTS είναι πρόσφατη τεχνική και εφαρμόζεται κυρίως για εκτίμηση των ολικών φαινολών σε εκχυλίσματα φυτών και τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον έλεγχο του αποχρωματισμού της κατιονικής ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ που παράγεται από την οξείδωση του αντιδραστήριου δις-αμμωνιακό άλας του 2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS). Η οξείδωση επιτυγχάνεται με χημικό ή ενζυμικό τρόπο. Όταν η συγκέντρωση των φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι μεγάλη, ο αποχρωματισμός του διαλύματος είναι εντονότερος. Η ποσότητα του $ABTS^{\bullet+}$ που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox ή γαλλικού οξέος [54, 55].

ΚΕΦ.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ- ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξειδωτικό στρες (Oxidative stress)

Σε φυσιολογικές συνθήκες στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει ισορροπία μεταξύ παραγωγής και εξουδετέρωσης οξειδωτικών ουσιών (redox state). Με τον όρο αυτόν αναφερόμαστε στη διαταραχή αυτής της ισορροπίας ως αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών ή της μείωσης των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών που τις δεσμεύουν σε φυσιολογικές συνθήκες [4]. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει:

- i. Λόγω της ελάττωσης των επιπέδων των αντιοξειδωτικών. Η ελάττωση αυτή οφείλεται σε μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται σε ενζύμα π.χ. υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase), σε τοξίνες που έμμεσα μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού π.χ. μεταβολισμός ξενοβιοτικών παρουσία GSH και σε ανεπάρκεια διατροφικών ιχνοστοιχείων π.χ. Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se.
- ii. Λόγω της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι λόγοι παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι: η έκθεση κυττάρων ή οργανισμών σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου ή σε τοξίνες που χαρακτηρίζονται ως οξειδωτικά είδη όπως NO_2 , paraquat και σε λανθασμένη ενεργοποίηση εκείνων των συστημάτων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ριζών όπως στις περιπτώσεις ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων σε χρόνιες φλεγμονές [56].

Οξειδωτική βλάβη (Oxidative damage)

Οι οξειδωτικές βλάβες προκύπτουν από την απευθείας προσβολή διάφορων βιομορίων από οξειδωτικά είδη κατά το οξειδωτικό στρες.

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες είναι οι ακόλουθες:

- i. **Προσαρμογή** του κυττάρου ή του οργανισμού μέσω ρύθμισης των μηχανισμών άμυνας με αποτέλεσμα είτε την πλήρη ή μερική προστασία από τις οξειδωτικές βλάβες είτε την υπερπροστασία, όπου για παράδειγμα τα κύτταρα είναι ανθεκτικά σε δυσμενέστερες συνθήκες οξειδωτικούς στρες.

- ii. **Βλάβη** του κυττάρου. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται όλες οι βλάβες σε όλους τους πιθανούς κυτταρικούς στόχους, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, λιπίδια, DNA κ.τ.λ.
- iii. **Θάνατος** του κυττάρου. Τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης ή αντικατάστασης των στόχων που έχουν αλλοιωθεί ή καταστραφεί από οξειδωτικό στρες αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις οι οξειδωτικές βλάβες οδηγούν σε θάνατο του κυττάρου (απόπτωση, νέκρωση), ειδικά όταν το στόχο αποτελεί το DNA [56].

2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Μόλις το 1815 ο Gay Lussac αναφέρθηκε στον όρο ελεύθερη ρίζα, απομονώνοντας το CN. Το 1828 οι Dumas και Boullay επέκτειναν την ιδέα και σε οργανικά μόρια ενώ το 1832 οι Liebig και Wöhler ασχολήθηκαν με την βενζόυλο ρίζα. Η ύπαρξη όμως των ελευθέρων ριζών θεμελιώθηκε το 1900 με τον Moses Gomberg να ταυτοποιεί την ύπαρξη της τριφαινυλομέθυλο ρίζας. Για αυτό τον λόγο ο Moses Gomberg θεωρείται πρωτοπόρος και ο πατέρας των ελευθέρων ριζών [57, 58]. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα ενός ατόμου π.χ. O, N. Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια προσδίδουν στις ελεύθερες ρίζες μεγάλη χημική δραστηριότητα και συμβολίζονται με μια τελεία στο επάνω δεξί μέρος του χημικού τύπου (X^\bullet). Είναι ασταθή είδη και μετατρέπονται σε ανιονικές ή κατιονικές ρίζες με πρόσληψη ή αποβολή ηλεκτρονίου στην αντίστοιχη περίπτωση [59].

Επειδή όλες οι ελεύθερες ρίζες παρουσιάζουν παραμαγνητικές ιδιότητες, για τη μελέτη τους λαμβάνονται φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR, Electron Paramagnetic Resonance) ή συντονισμού σπιν (ESR, Electron Spin Resonance) [60]. Τις πιο διαδεδομένες ελεύθερες ρίζες και ουδέτερες ενώσεις αποτελούν τα επονομαζόμενα ενεργά είδη οξυγόνου (HO^\bullet , ROO^\bullet , RO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2), γνωστά και ως ROS (πίνακας 2.1), αζώτου όπως NO_2^\bullet και χλωρίου όπως $HOCl$ [61]. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας.

Η υδροξυλική ρίζα HO^\bullet είναι το κύριο προϊόν της ραδιόλυσης του νερού. Είναι εξαιρετικά ηλεκτρονιόφιλο είδος, γεγονός που εξηγεί την δραστηριότητα και την τοξικότητα της. Προσβάλλει και οξειδώνει σχεδόν την πλειονότητα των βιομορίων που

εκτίθενται σε αυτές. Σε ορισμένες περιπτώσεις δρουν έμμεσα, αφαιρώντας υδρογονοκατιόντα από οργανικές ενώσεις, παράγοντας ποικιλία νέων ριζών. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της παραπάνω δράσης είναι η έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης μέσω απόσπασης υδρογόνου από τα λιπίδια των μεμβρανών και σχηματισμό ριζών R[•]. Επιπλέον συμμετέχει σε αντιδράσεις προσθήκης σε αρωματικές ενώσεις όπως ο σχηματισμός της ρίζας της 8-υδροξυγουανιδίνης υπό την επίδραση στο DNA [62].

Στα βιολογικά συστήματα ο σχηματισμός της ρίζας λαμβάνει χώρα με δυο τρόπους: με την αντίδραση του H₂O₂ με O₂^{•-} (αντίδραση Haber-Weiss) ή ιόντα μετάλλων (αντίδραση Fenton) και με την έκθεση βιομορίων σε ακτινοβολίες ιονισμού. Η επίδραση της ρίζας HO[•] στο DNA εξηγείται λεπτομερώς στο κεφάλαιο που πραγματεύεται την οξειδωση του DNA.

Πίνακας 2. 1. Κύριοι τύποι δραστικών μορφών οξυγόνου

Ρίζες	Συμβολισμός	Μη-ρίζες	Συμβολισμός
Υδροξύλιο	•OH	Υπεροξνιτρώδες ανιόν	ONOO ⁻
Αλκοξυρίζα	RO [•]	Υποχλωριώδες	HOCl
Υδροϋπεροξυ ρίζα	HOO [•]	Οργανικά υδροϋπεροξειδία	ROOH
Μονοξειδίο του αζώτου	NO [•]	Μονοατομικό οξυγόνο	¹ O ₂
Σουπεροξειδίο	O ₂ ^{•-}	Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H ₂ O ₂
Ανθρακικό ανιόν	CO ₃ ^{•-}	Όζον	O ₃

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με δυο τρόπους: με ομολυτική διάσπαση και οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

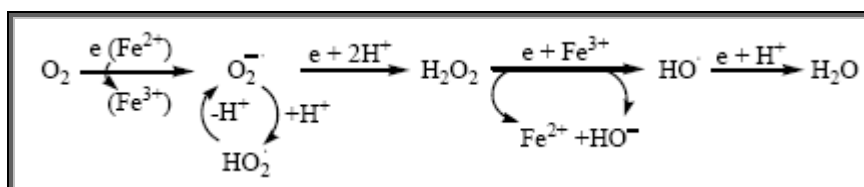
Η ομολυτική διάσπαση περιλαμβάνει τη σχάση ενός ομοιοπολικού δεσμού και διατήρηση ενός ηλεκτρονίου από το κάθε άτομο του δεσμού, με αποτέλεσμα την παραγωγή δυο ελεύθερων ριζών (αντίδραση 2.1).



Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την οξείδωση ή την αναγωγή ενός ατόμου με πρόσληψη ή αποβολή ηλεκτρονίων αντιστοίχα. Στα βιολογικά συστήματα αυτές οι αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα ή μέταλλα.

2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Στον οργανισμό των θηλαστικών περίπου 1% του χρησιμοποιούμενου οξυγόνου ανάγεται μερικώς υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται από το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, από την προσταγλανδική συνθετάση και μονοαμινοξειδάση και με την συμμετοχή μεταβατικών μετάλλων π.χ. σίδηρος, χαλκός. Με τους παραπάνω τρόπους δημιουργούνται δραστικές μορφές οξυγόνου όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2.1 [63].

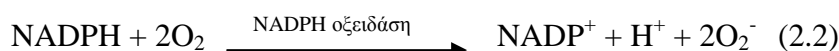


Σχήμα 2. 1. Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στο βιολογικό σύστημα

Οι ελεύθερες ρίζες και άλλα οξειδωτικά είδη (ROS, RNS) δημιουργούνται σε όλα τα αερόβια κύτταρα και συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές και βιοχημικές διεργασίες (σχήμα 2.2). Είναι αποδεδειγμένο ότι η έκθεση σε διάφορες επιβλαβείς συνθήκες όπως ξеноβιοτικά, λοιμοξιογόνοι παράγοντες, επιμολυντές, καπνός τσιγάρου και ακτινοβολίες, οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορίων [64]. Οι κυριότερες πηγές ROS στα κύτταρα είναι η NADPH οξειδάση, η αναπνευστική αλυσίδα, η μυελοπεροξειδάση, η οξειδάση της ξανθίνης, η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, οι λιποοξυγενάσες και τα μεταβατικά μέταλλα [65].

NADPH οξειδάση

Η οξείδωση του νικοτιναμινο-αδενινο-φωσφοδινουκλεοτιδίου αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές ROS στα αγγειακά κύτταρα και στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς. Η αντίδραση που καταλύεται από την NADPH οξειδάση και οδηγεί στο σχηματισμό ριζών σουπεροξειδίου είναι:



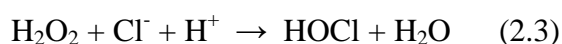
Μετά από ενεργοποίηση, τα κυτταροπλασματικά συστατικά μετατοπίζονται προς την πλασματική μεμβράνη και συνθέτουν την ενεργή NADPH οξειδάση.

Αναπνευστική αλυσίδα

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν μια σημαντική πηγή παραγωγής ROS αφού είναι ο τόπος αναγωγής του O_2 σε O_2^- από διάφορα σύμπλοκα π.χ. NADH δεϋδρογονάση, τα οποία εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το O_2^- δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό αλλά απενεργοποιεί ειδικά ένζυμα και ουσιαστικά προκαλεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων [66].

Μυελοπεροξειδάση

Η μυελοπεροξειδάση (MPO) καταλύει τη μετατροπή των ιόντων Cl^- σε υποχλωριώδες οξύ σύμφωνα με την αντίδραση:



Η MPO εντοπίζεται κυρίως στα λευκά κύτταρα και αποτελεί την μοναδική περίπτωση ενζύμου που καταλύει την παραγωγή $HOCl$. Τα τελευταία χρόνια μελετάται η επίδραση της MPO στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, άρα και η ενοχοποίηση της στην πρόκληση καρδιαγγειακής νόσου [67, 68].

Οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μια σιδηρο-θειο μολυβδαινική φλαβοπρωτεΐνη που απαντά σε δυο μορφές, τη δεϋδρογονάση και την οξειδάση της ξανθίνης. Η οξειδάση συνδέεται με τη δημιουργία O_2^- , ενώ η δεϋδρογονάση με την παραγωγή NADH. Η δεϋδρογονάση μετατρέπεται σε οξειδάση μέσω οξείδωσης των θειϊκών της ομάδων. Η συνεισφορά του ενζύμου στην παραγωγή O_2^- από τα κύτταρα συσχετίζεται με την αγγειακή νόσο και την ισχαιμία [69].

Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)

Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου καταλύει την αντίδραση μετατροπής της L-αργιλίνης σε L-κιτρουλλίνη και NO^- . Διακρίνεται σε ενδοθηλιακή, νευρωνική και επαγόμενη, οι οποίες εντοπίζονται στο ενδοθήλιο, στο νευρικό ιστό και στο ανοσοποιητικό και καρδιαγγειακό σύστημα. Οι ενδοθηλιακές και οι επαγόμενες συνδέονται περισσότερο με την αθηρομάτωση. Το NO^- που παράγεται με την

καταλυτική δράση των συνθασών αντιδρά με το O_2^- που υπάρχει, οπότε σχηματίζεται το δραστικό ONOO-, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με το CO_2 δίνοντας NO_2^- . Το NO_2^- προκαλεί τη νίτρωση των πρωτεϊνών και την υπεροξειδωση των λιπιδίων [70]. Συμπερασματικά οι NO συνθάσες είναι πηγή ROS και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία οξειδωτικού στρες στα αγγεία.

Λιποοξυγενάσες

Οι λιποοξυγενάσες είναι διοξυγενάσες που έχουν στο μόριο τους σίδηρο και καταλύουν την προσθήκη οξυγόνου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με παραγωγή διάφορων βιολογικά ενεργών λιπιδίων όπως προσταγλανδίνες. Οι λιποοξυγενάσες ενοχοποιούνται για τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.

Μεταβατικά μέταλλα

Τα μεταβατικά μέταλλα, όπως ο χαλκός και ο σίδηρος έχουν μελετηθεί σχετικά με τη συμμετοχή τους σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και την καταστροφή βιομορίων, καθώς αποτελούν καταλύτες σε αντιδράσεις οξειδωσης και στον κύκλο Haber- Weiss. Ο ρόλος των μεταβατικών μετάλλων είναι πολύ σημαντικός αφού συμμετέχουν σε πολλές αντιδράσεις- διεργασίες και σε περίσσεια (κυρίως παθολογικές καταστάσεις) προκαλούν πολλών ειδών βλάβες [71].

Ακτινοβολίες

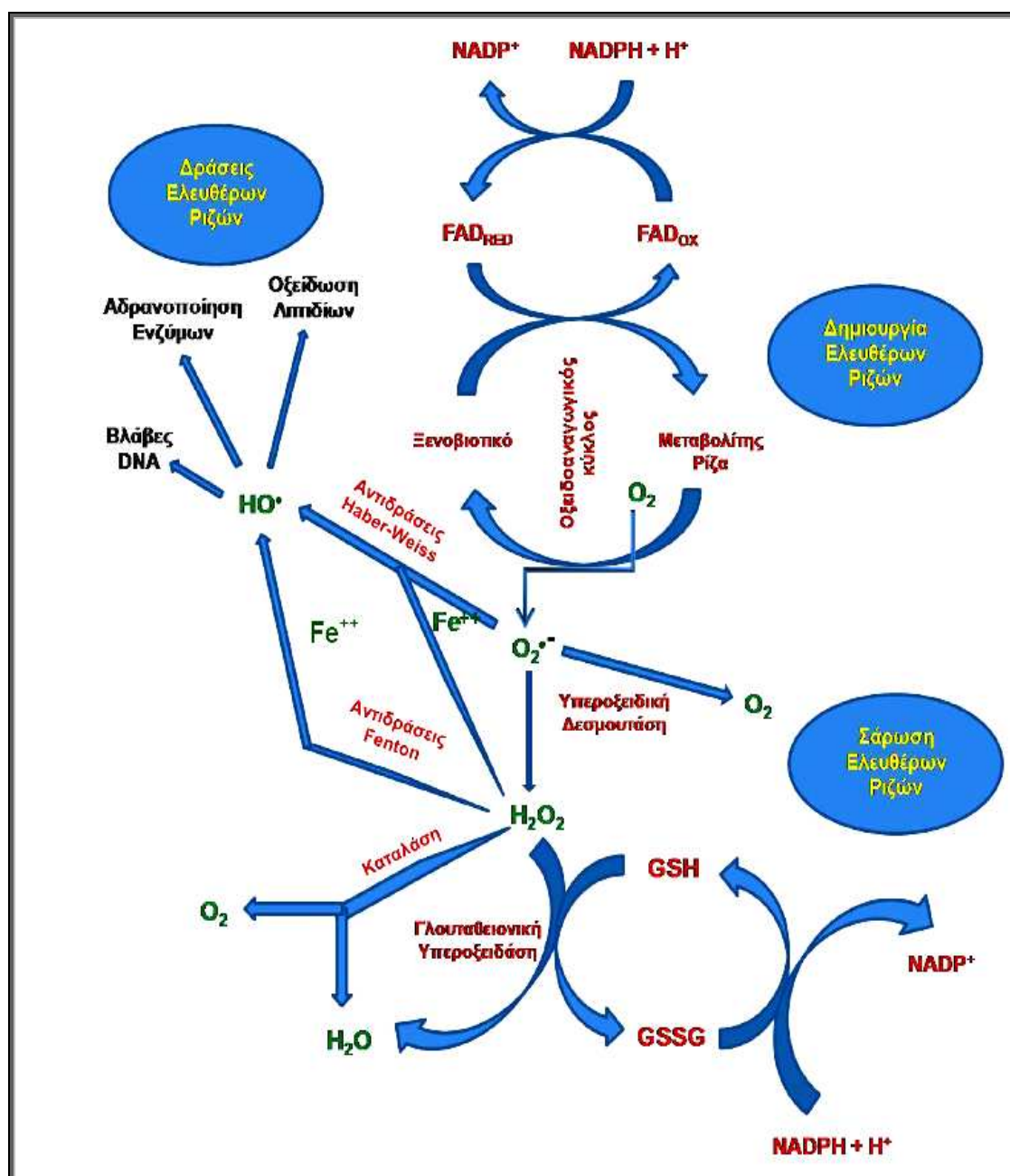
Υπεριώδεις ή ιονίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν είτε φωτολυτική διάσπαση ενώσεων ή βιομορίων προκαλώντας τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, είτε τη διέγερση ατόμων ή μορίων με ταυτόχρονη αποβολή ή πρόσληψη ηλεκτρονίων.

Αντιδράσεις αυτοοξειδωσης

Διάφορα μόρια με σημαντικούς ρόλους στα βιολογικά συστήματα όπως ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη, η ορμόνη αδρεναλίνη και διάφορες φλαβοενώσεις αυτοοξειδώνονται παρουσία O_2 σχηματίζοντας $O_2^{\bullet-}$. Το $O_2^{\bullet-}$ που παράγεται με αυτόν τον τρόπο συμμετέχει στην οξειδωση άλλων ενώσεων σε μια σειρά διαδοχικών αντιδράσεων.

Φάρμακα

Αρκετά φάρμακα, μετά από συνεχή χρήση, προκαλούν παρενέργειες συμπεριλαμβανομένης και της δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αντιβιοτικό με το εμπορικό όνομα αδριαμυκίνη. Το συγκεκριμένο φάρμακο χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις θεραπείας καρκίνου, αλλά είναι αρκετά τοξικό για την καρδιά. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα φάρμακα νταουνορουμπικίνη και αλκακινομυκίνη Α [72].



Σχήμα 2. 2. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας και απενεργοποίησης ελευθέρων ριζών, δράσεις επί διαφόρων δομών του κυττάρου

2.4 ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΟΜΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Θεμελιώδεις κυτταρικές και μοριακές δομές, όπως μεμβράνες, πρωτεΐνες, ένζυμα και νουκλεϊνικά οξέα εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες (πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Βλάβες διαφόρων μοριακών δομών μετά την επίδραση ελευθέρων ριζών

Βιολογικά μόρια	Βλάβες
Λιποειδή	Υπεροξειδωση
Πρωτεΐνες	Μετουσίωση
Ένζυμα	Απενεργοποίηση
Νουκλεϊνικά οξέα	Μεταλλάξεις

Λιπιδική υπεροξειδάση

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες δρουν άμεσα, με ομοιοπολικό δεσμό με λιπίδια βιομεμβρανών και πρωτεΐνες όπου προκαλούν απενεργοποίηση, είτε έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βιομεμβρανών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Αυτή θεωρείται ίσως η πιο χαρακτηριστική οξειδωτική βλάβη λιπιδίων, κυρίως φωσφολιπιδίων, λόγω των ελευθέρων ριζών. Μεταξύ των κύριων προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η μηλονική διαλδεΰδη. Η παραπάνω δικαρβονυλική ένωση, μέσω της αντίδρασης Schiff με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, γεφυρώνει ενδομοριακά πρωτεϊνικά μόρια με καθοριστικές συνέπειες στη δομή και ως συνέπεια στη λειτουργία τους. Επιπλέον κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση παρατηρούνται αλλαγές στην ομοίωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , ενώ αδρανοποιείται η γλουταθειόνη (GSH), ένα από τα βασικότερα αμυντικά συστήματα του οργανισμού [63].

Οξειδωση πρωτεϊνών

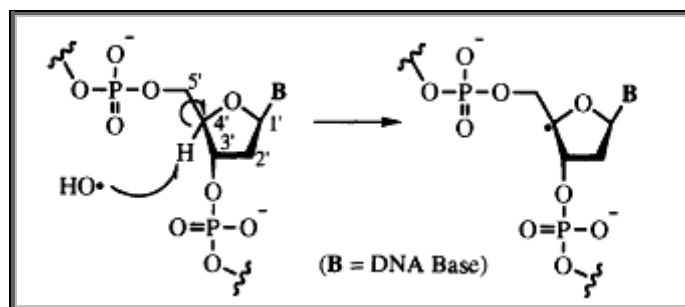
Οι πρωτεΐνες είναι άλλη μια σημαντική κατηγορία κυτταρικών δομών που οξειδώνονται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες

λόγω οξειδωσης προκαλούνται από τη δράση διαφόρων ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Η εμφάνιση οξειδωτικά αλλοιωμένων πρωτεϊνών αυξάνεται με τη γήρανση αφού η συσσώρευση τους εμπλέκεται σε διαδικασίες γήρανσης [73].

Οξείδωση DNA

Το DNA όλων των κυττάρων των θηλαστικών περιέχει τροποποιημένες βάσεις ενδεικτικές της προσβολής του από οξειδωτικά είδη. Οι παραπάνω αλλοιώσεις ανιχνεύονται σε ιχνοποσότητες και απομακρύνονται με την επίδραση επιδιορθωτικών ενζύμων εκτομής. Περίπου 500.000 μόρια 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine αποβάλλονται κάθε μέρα με τα ούρα για το μέσο άνθρωπο [74]. Επιπλέον οι αλλοιώσεις αυτές αυξάνονται με την ηλικία και σχετίζονται με διάφορες ασθένειες [75, 76]. Για παράδειγμα ο σχηματισμός της 8-oxoguanine, του πιο ευρέως προσδιοριζόμενου προϊόντος οξειδωσης του DNA, οδηγεί στη μεταστροφή του ζεύγους των βάσεων από G:C σε T:A. Αυτή η μεταστροφή θεωρείται μια κοινή μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 που εντοπίζεται στο ήπαρ και τους πνεύμονες [77, 78]. Οξείδωση μπορεί να υποστεί το DNA τόσο του πυρήνα όσο και των μιτοχονδρίων. Το DNA των μιτοχονδρίων όμως είναι πιο εύκολος στόχος αφού δεν είναι ικανοποιητικά προστατευμένο από τις ιστόνες (πρωτεΐνες) και διότι τα μιτοχόνδρια είναι ο χώρος στον οποίο λαμβάνουν χώρα οξειδοαναγωγικές διεργασίες και παραγωγή ανηγμένων μορφών οξυγόνου. Οι ρίζες $\cdot\text{OH}$ επιδρούν και οξειδώνουν το DNA με τους παρακάτω τρόπους: με προσθήκη στους π δεσμούς των βάσεων του DNA ($k > 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) και με απόσπαση H^+ από τις δεοξυριβόζες του DNA ($k < 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), η οποία θεωρείται το πρώτο βήμα για την καταστροφή της διπλής έλικας του DNA.

Η απόσπαση του υδρογόνου είναι πιθανόν να συμβεί σε όλα τα άτομα άνθρακα της δεοξυριβόζης, με σχηματισμό ρίζας με κέντρο το άτομο του άνθρακα, η οποία σταθεροποιείται από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του γειτονικού οξυγόνου (σχήμα 2.3). Ορισμένες από αυτές τις ρίζες έχουν ταυτοποιηθεί με ESR σε δείγματα μονο- και ολιγονουκλεοτιδίων. Η απόσπαση από το 4' άτομα άνθρακα θεωρείται η πιο σημαντική αφού πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο ποσοστό βάση μελετών σε γ -irradiated DNA.



Σχήμα 2. 3. Απόσπαση υδρογόνου από τις δεοξυριβόζες του DNA

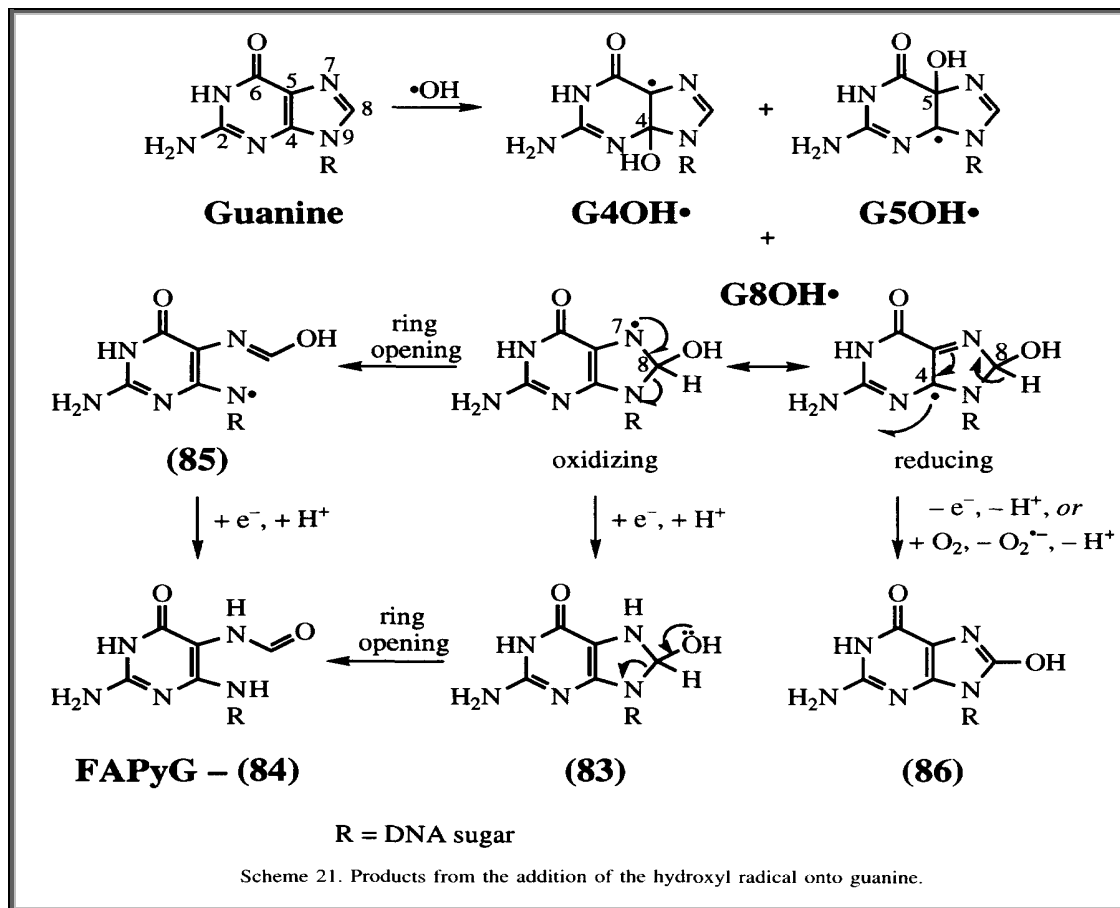
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι ρίζες προσβάλουν και τις βάσεις του DNA. Η γουανίνη είναι η βάση που προσβάλλεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (πίνακας 2.3) και μελετάται από τους περισσότερους ερευνητές.

Πίνακας 2. 3. Προσδιορισμός των προϊόντων οξειδωσης των βάσεων του DNA με GC-MS

Parent Base	Product Formed	Chromatin		Naked DNA	
		N ₂ O	N ₂ O + O ₂	N ₂ O	N ₂ O + O ₂
T	5,6-dihydrothymine (57)	0.26	nil	5.6	nil
	5-hydroxy-5,6-dihydrothymine (54)	0.30	nil	7.7	< 0.1
	thymine glycol (53)	0.094	0.40	10.2	43.4
	5-hydroxymethyluracil (58)	0.064	0.052	n.d.	n.d.
	5-hydroxy-5-methylhydantoin (66)	b	0.42	n.d.	n.d.
C	5-hydroxy-5,6-dihydrocytosine (74)	0.17	nil	2.6	< 0.1
	cytosine glycol (70)	0.95	2.30	10.7	25.6
	5,6-dihydroxycytosine (78)	b	0.33	n.d.	n.d.
	5-hydroxyhydantoin (80)	b	0.22	n.d.	n.d.
A	FAPyA (4,6-diamino-5-formamidopyrimidine) (89)	0.96	1.02	8.7	5.9
	8-hydroxyadenine (88)	0.80	3.50	5.3	15.8
G	FAPyG (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) (84)	1.81	1.81	12.4	3.6
	8-hydroxyguanine (86)	1.35	8.05	16.2	46.7

nil = not detected; b = not detected above levels present in control sample; n.d. = lesion measurement not determined.

Ο O' Neill [79] μελέτησε την επίδραση των ριζών υδροξυλίου στη 2'-deoxyguanosine (dG) παρουσία οξειδωτικών και αναγωγικών παραγόντων. Παρατήρησε την προσθήκη του $\cdot\text{OH}$ στις θέσεις 4,5 και 8 της γουανίνης και δημιουργία των ριζών $\text{G4OH}\cdot$, $\text{G5OH}\cdot$ και $\text{G8OH}\cdot$, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4. Επίδραση των ριζών υδροξυλίου στη γουανίνη

Ο O' Neill παρατήρησε την δημιουργία ριζών με διττή δράση, αναγωγική και οξειδωτική. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτής της συμπεριφοράς είναι η ρίζα $\text{G8OH}\cdot$. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.4, η ρίζα αυτή είναι αναγωγικό μέσο όταν το σχηματιζόμενο κατιόν σταθεροποιείται μέσω των α ατόμων αζώτου, ενώ οξειδωτικό όταν η ρίζα εντοπίζεται στο 7 άτομο αζώτου. Στη συνέχεια αναγωγή της οξειδωτικής μορφής της $\text{G8OH}\cdot$ οδηγεί στο προϊόν (83), το οποίο στη συνέχεια μέσω διάνοιξης του δακτυλίου σχηματίζει το ένα εκ των δυο τελικών προϊόντων οξείδωσης της γουανίνης από $\cdot\text{OH}$, την φορμαμιδοπυριμιδίνη (FADyG, 84). Το ίδιο προϊόν προκύπτει εάν πραγματοποιηθεί διάνοιξη του δακτυλίου της οξειδωτικής μορφής της $\text{G8OH}\cdot$ (85) και στη συνέχεια αναγωγή αυτής. Το προϊόν FADyG απομονώθηκε πριν από 45 χρόνια ενώ μεταγενέστερες μελέτες αποδεικνύουν το σχηματισμό του σε βιομόρια όπως DNA ή χρωματίνη μετά από ακτινοβόληση.

Η οξείδωση όμως της αναγωγικής μορφής της $\text{G8OH}\cdot$ και ταυτόχρονη αποβολή ενός πρωτονίου επαναδημιουργεί τον ιμιδαζολικό δακτύλιο και σχηματίζεται το

δεύτερο τελικό προϊόν οξείδωσης της γουανίνης από $\bullet\text{OH}$, η 8-υδροξυγουανίνη (86). Η 8-υδροξυγουανίνη έχει απομονωθεί από DNA και χρωματίνη σε δείγματα ανθρωπίνων κυττάρων και κυττάρων συκωτιού ποντικών [80]. Πολλές φορές χρησιμοποιείται και η ονομασία 7, 8-διϋδρο-8-οξο-γουανίνη (8-οξο-G) αφού βρίσκεται με τη C-8 καρβονυλική μορφή. Η 8-υδροξυγουανίνη είναι η πιο συχνή αλλοίωση που συμβαίνει στις βάσεις του DNA υπό την επίδραση και έχει αποδειχθεί η ενοχοποίηση της σε μεταλλάξεις [81].

2.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων ενώ επιπλέον συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό τα ROS αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις (αθηροσκλήρωση, έμφραγμα μυοκαρδίου), καρκίνο, εγκεφαλοπάθειες (Parkinson, Alzheimer), νευροεκφυλιστικές ασθένειες, πνευμονοπάθειες, ρευματοειδής αρθρίτιδα, γαστρεντεροπάθειες, νεφροπάθειες, καταρράκτη, γήρανση, διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες (πίνακας 2.4) [82, 83]. Επιπλέον τελευταίες μελέτες υποδεικνύουν συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με την κατάθλιψη και την ανδρική υπογονιμότητα [84, 85].

Πίνακας 2. 4. Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών σε διάφορες ασθένειες

Diseases	Role of free radicals in pathophysiology
Atherosclerosis	Superoxide-mediated endothelial dysfunction, activation of macrophages
Myocardial infarction	ROS driven ischemic reperfusion injury and myocyte necrosis and/or apoptosis
Hypertension	ROS-mediated vascular smooth muscle cell proliferation, oxidant production via NADH/NADPH oxidase and endothelial dysfunction
Diabetes	ROS accelerated formation of advanced glycation end products (AGEs)
Aging	Superoxide-mediated endothelial dysfunction
Cancer	Cell damage and metabolic abnormalities
	ROS-mediated gene mutations (modification of pyridine and purine bases) and post-translational modifications leading disruption of cellular processes
Parkinson's disease	ROS-mediated mitochondrial dysfunction
Alzheimer's disease	Amyloid peptide and advanced glycation end products
	ROS-mediated neurotoxicity to hippocampal cells and the synaptosomal membranes
Huntington's disease	ROS-mediated transcriptional dysregulation and mitochondrial impairment
Autoimmune disorders	ROS-mediated inflammation and tissue destruction
Age-related macular degeneration	Photochemical reactions in the oxygen-rich environment of the outer retina lead to the liberation of cytotoxic (ROS)
Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, inflammation and hyperoxia	ROS-mediated inflammation and endothelial dysfunction

2.6 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ

Η ομοιότητα είναι θεμελιώδης ιδιότητα των κυττάρων όλων των οργανισμών. Αυτή εξηγεί την ικανότητα προσαρμογής των κυττάρων και ανάπτυξης μηχανισμών ενάντια στις επιβλαβείς επιδράσεις που εμφανίζονται λόγω των ελευθέρων ριζών. Η άμυνα του οργανισμού περιλαμβάνει τέσσερις μηχανισμούς-τρόπους δράσης: την παραγωγή ενζύμων που απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες π.χ. δισμουτάση σουπεροξειδίου, ένζυμα που επιδιορθώνουν την οξειδωτική βλάβη στο DNA, ενδογενή και διαιτητικά αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους π.χ. γλουταθειόνη, πολυφαινόλες και μηχανισμούς δέσμευσης ιόντων μεταβατικών μετάλλων π.χ. ceruloplasmin (πίνακας 2.5) [86].

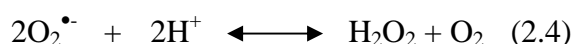
Στα βιολογικά συστήματα ως ενδογενή αντιοξειδωτικά δρουν ποικίλες ενώσεις, μεταξύ των οποίων η γλουταθειόνη, η κυστεΐνη, το ασκορβικό οξύ, το συνένζυμο ουβικινόνη CoQ₁₀, η βιταμίνη A κ.τ.λ. [87]. Όμως σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών λαμβάνονται και με την τροφή. Από αυτή την κατηγορία άλλα αντιοξειδωτικά είναι πιο δραστικά ή απορροφώνται πιο εύκολα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα διαιτητικών αντιοξειδωτικών είναι πολυφαινόλες, τοκοφερόλες, το ασκορβικό οξύ, διάφορα καροτενοειδή, η υδροξυτυροσόλη κ.τ.λ.

Πίνακας 2.5. Δράση ενδογενών παρεμποδιστών οξειδωσης στον οργανισμό [61, 88]

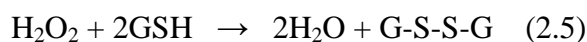
Ενδογενή συστήματα	Δράση
Ενζυμικά συστήματα	
Δισμουτάση σουπεροξειδίου (SOD)	Απενεργοποίηση ριζών σουπεροξειδίου
Καταλάση	Διάσπαση υπεροξειδίου υδρογόνου
Υπεροξειδάση γλουταθειόνης	Αναγωγή υδροϋπεροξειδίων
Πρωτεάσες / Λιπάσες	Απομάκρυνση οξειδωμένων ενώσεων
Γλυκοσιλάσες / Νουκλεάση εκτομής	Αντικατάσταση οξειδωμένων βάσεων
Μη ενζυμικά συστήματα	
NADH / NADPH	Επιδιόρθωση DNA / Απαραίτητα για την ενεργοποίηση της καταλάσης
Γλουταθειόνη	Απαραίτητη για την ενεργοποίηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης
Θειόλες / Ουρικό οξύ / α-τοκοφερόλη	Διακοπή αντιδράσεων ελευθέρων ριζών
Τρανσφερίνη / Φερριτίνη / Μυοσφαιρίνη	Δέσμευση μετάλλων

Ενδοκυτταρικά ένζυμα

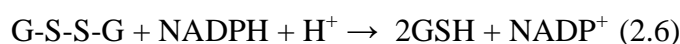
Δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SOD). Ένζυμα που περιέχουν μέταλλα και καταλύουν την ακόλουθη αντίδραση:



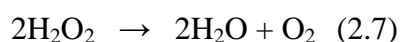
Γλουταθειονική υπεροξειδάση. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες διαθέτουν ένα άτομο σεληνίου στο ενεργό κέντρο και ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου.



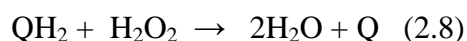
Γλουταθειονική αναγωγάση. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη που προκύπτει από την προηγούμενη αντίδραση ανάγεται από το ένζυμο γλουταθειονική αναγωγάση.



Καταλάσες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα φέρουν τέσσερις πρωτεϊνικές μονάδες και διασπών το υπεροξείδιο του υδρογόνου.



Οξειδάσες. Απομακρύνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου καταλύοντας αντιδράσεις οξείδωσης άλλων υποστρωμάτων.



Μηχανισμοί δέσμευσης ιόντων μεταβατικών μετάλλων

- ↳ Fe, φερριτίνη για αποθήκευση και τρανσφερίνη για μεταφορά του σιδήρου
- ↳ Cu, ceruloplasmin ή caeruloplasmin, πρωτεΐνη που δεσμεύει το χαλκό

Ενδοκυτταρικά- Εξωκυτταρικά αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους

- ↳ Γλουταθειόνη
- ↳ Βιταμίνη E: Προστατεύει μεμβράνες και λιπίδια από υπεροξείδωση
- ↳ Βιταμίνη C: Δεσμευτής ελευθέρων ριζών, συμμετέχει στη μετατροπή της τοκοφερολυόλης σε τοκοφερόλη.
- ↳ Ουρικό οξύ
- ↳ β-καροτένιο
- ↳ Διαιτητικά φλαβονοειδή και πολυφαινόλες

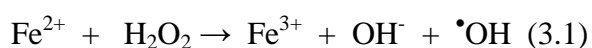
Ένζυμα επιδιόρθωσης

- ↳ Ένζυμα εκτομής και αντικατάστασης κατεστραμμένων βάσεων του DNA π.χ. γλυκοσιλάσες.
- ↳ Ένζυμα που ρυθμίζουν την παραγωγή κατεστραμμένων- οξειδωμένων πρωτεϊνών [61].

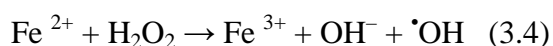
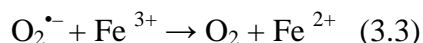
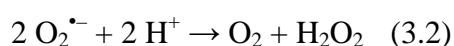
ΚΕΦ.3 ΧΗΜΕΙΑ FENTON

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1894 ο H.J.H. Fenton δημοσίευσε την εργασία με τίτλο 'Oxidation of tartaric acid in presence of iron', όπου απέδειξε ότι ο συνδυασμός Fe(II) και H₂O₂ αποτελεί ένα αποτελεσματικό οξειδωτικό σύστημα για συγκεκριμένα οργανικά οξέα [89]. Το παραπάνω σύστημα ονομάστηκε αντιδραστήριο Fenton, προς τιμήν του ερευνητή, όπως και η αντίδραση 3.1 που περιγράφει τη διαδικασία σύμφωνα με την οποία λαμβάνει χώρα η οξείδωση.



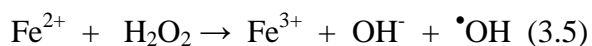
Τα επόμενα χρόνια η χρησιμοποίηση του αντιδραστήριου Fenton επεκτάθηκε και σε άλλα οργανικά μόρια [90]. Από το 1931 ως το 1935, οι Haber, Willstätter και Weiss απέδειξαν τον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου κατά την αντίδραση Fenton, ενώ σε συνεργασία με τον Baxendale και την ερευνητική του ομάδα, κατέληξαν σε μια τροποποιημένη αντίδραση που εξηγεί το ρόλο του O₂^{•-} στη δημιουργία του Fe²⁺. Οι παρακάτω αντιδράσεις, σαν σύνολο, είναι γνωστές ως αντίδραση Haber-Weiss, όπου ο Fe²⁺ δρα καταλυτικά (αντιδράσεις 3.2-3.4) [91-94].



Για τα επόμενα χρόνια μέχρι και σήμερα το ενδιαφέρον σχετικά με την αντίδραση Fenton εστιάζεται στη δημιουργία άλλων ενδιάμεσων οξειδωτικών ριζών όπως oxo-ferryl ή crypto-hydroxyl ρίζες (vide infra), που συνιστούν ισχυρότερα οξειδωτικά είδη σε σχέση με τις ρίζες υδροξυλίου [95].

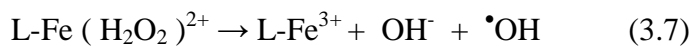
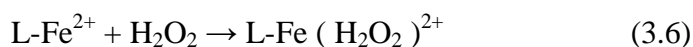
3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON

Η απλουστευμένη μορφή της αντίδρασης Fenton είναι:



Όπου παρατηρείται μεταφορά ενός μόνου ηλεκτρονίου, χωρίς σχηματισμό ή καταστροφή δεσμών, με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών υδροξυλίου (•OH). Ο παραπάνω μηχανισμός χαρακτηρίζεται ως outersphere. Με βάση όμως τα θερμοδυναμικά δεδομένα της αντίδρασης, ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν ευνοείται. Σύγχρονες μελέτες κατέληξαν σε έναν innersphere μηχανισμό, όπου ένα σύμπλοκο Fe²⁺-H₂O₂ σχηματίζεται ως ενδιάμεσο (αντίδραση 3.6). Σε τέτοιου είδους

αντιδράσεις ο σίδηρος βρίσκεται με τη μορφή συμπλόκου με κάποιο υποκαταστάτη όπως EDTA ή κάποιο βιολογικό μόριο [96].



Το ασταθές σύμπλοκο διασπάται δίνοντας πολλά πιθανά προϊόντα όπως ρίζες $\bullet\text{OH}$ (αντίδραση 3.7), είδη Fe(IV) (αντίδραση 3.9), είδη οχοίρον (αντίδραση 3.10) ή δρα απευθείας οξειδώνοντας κατάλληλο υπόστρωμα R (αντίδραση 3.8). Οι ταχύτητες των παραπάνω αντιδράσεων (πίνακας 3.1) σχετίζονται καταρχήν με τον αριθμό των θέσεων συναρμογής του σιδήρου με τον υποκαταστάτη (αντίδραση 3.6) ή από την φύση του υποκαταστάτη και από το pH (αντιδράσεις 3.7, 3.9, 3.10). Στην αντίδραση γ ο σχηματισμός ριζών $\bullet\text{OH}$ περιορίζεται λόγω της οξειδωσης του υποστρώματος R.

Ο προσδιορισμός του είδους των οξειδωτικών προϊόντων της αντίδρασης Fenton είναι εξαιρετικά δύσκολος και εξαρτάται τόσο από το οξειδωτικό μέσο όσο και από τον υποκαταστάτη που συναρμόζεται με το σίδηρο. Για παράδειγμα, όταν επιλέγεται το EDTA ως υποκαταστάτης, είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν οι ρίζες $\bullet\text{OH}$ από τα υπόλοιπα προϊόντα της αντίδρασης. Επίσης όταν χρησιμοποιείται ως υποκαταστάτης το nitrilotriacetate ενοείται ο σχηματισμός των ferryl ειδών [96]. Από όλα τα παραπάνω είναι φανερό ότι η χημεία Fenton είναι ουσιαστικά η χημεία όλων των παραπάνω δραστικών ενδιάμεσων και προϊόντων.

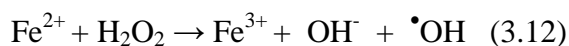
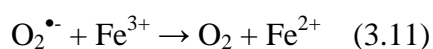
Πίνακας 3.1. Πιθανοί μηχανισμοί της αντίδρασης Fenton [97]

Step	Reactions	Rate Constants
1	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$	$k_1 = 58 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
2	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2\bullet + \text{H}^+$	$k_2 = 0.02 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
3	$\bullet\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$k_3 = 1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
4	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^-$	
5	$\text{RH} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{R}\bullet + \text{H}_2\text{O}$	
6	$\text{R}\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2\bullet$	$k_6 = 2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
7	$\text{HO}_2\bullet + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^-$	$k_7 = 1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
8	$\text{RH} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}\bullet$	
9	$\text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$k_9 = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
10	$\text{Fe}^{2+} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	$k_{10} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
11	$\text{R}\bullet + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RH}$	$k_{11} = 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
12	$\text{R}\bullet + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{R}^+$	$k_{12} = 5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
13	$\bullet\text{OH} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{13} = 5.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
14	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^- \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	
15	$\text{R}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}^+$	

Τα οξειδωτικά είδη που παράγονται είναι ρίζες $\bullet\text{OH}$, Fe^{4+} και $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]^{2+}$, ενδιάμεσα υψηλότερης οξειδωτικής κατάστασης από τον Fe^{3+} . Ο σχηματισμός των *ferryl* ριζών προτάθηκε το 1932 από τους Bray και Gorin [98]. Όλα τα παραπάνω οξειδωτικά είδη που προκύπτουν από την αντίδραση Fenton μπορούν να καταστρέψουν, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, βιομόρια και πρωτεΐνες.

3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ HABER-WEISS (HABER-WILLSTÄTTER)

Η επονομαζόμενη σιδηρο-καταλυόμενη αντίδραση Haber-Weiss ή απλά κύκλος Haber-Weiss (αντιδράσεις 3.11, 3.12) προτάθηκε από τον Weiss και την ερευνητική ομάδα του Baxendale για να εξηγήσει την καταλυτική διάσπαση του H_2O_2 με χρήση της αντίδρασης Fenton (*vide supra*) [94].



Ο κύκλος Haber-Weiss είναι πολύ σημαντικός για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων εφόσον δίνει ένα σαφή μηχανισμό για την καταλυτική δημιουργία $\cdot\text{OH}$ από ιχνοποσότητες σιδήρου in vivo [99] και μια λογική εξήγηση για την πλειονότητα των βλαβών στα κύτταρα λόγω των ελευθέρων ριζών και για την τοξικότητα του σουπεροξειδίου [96]. Οι Haber και Willstätter πίστευαν ότι ένζυμα αντιδρούσαν με διάφορα υποστρώματα μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Βασιζόμενοι στην παραπάνω παραδοχή εξήγησαν τη διάσπαση του H_2O_2 από το ένζυμο καταλάση μέσω αντιδράσεων που συμμετέχουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ενεργοποιούνται από το ένζυμο. Σε πολλές περιπτώσεις έχει μελετηθεί η ικανότητα ενεργοποίησης του κύκλου Haber-Weiss από διάφορα σύμπλοκα του σιδήρου [100, 101].

3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Γενικά τα μεταλλικά ιόντα χρησιμοποιούνται εκτενώς από τον ανθρώπινο οργανισμό τόσο για λειτουργικούς όσο και για δομικούς σκοπούς. Παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως καταλύτες βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά και ενεργοποίηση και μεταφορά διαφόρων μορίων όπως το οξυγόνο. Επιπλέον είναι συμπαράγοντες σε πολλά ενζυμικά συστήματα και έχουν ουσιώδη συμμετοχή στη σύνθεση του DNA [102]. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των μεταλλικών ιόντων είναι ο βαθμός οξειδωσης του μετάλλου, η φύση του υποκαταστάτη, η γεωμετρία και το περιβάλλον του συμπλόκου στο οποίο είναι δεσμευμένο το μέταλλο. Ένα από τα σημαντικότερα μέταλλα είναι ο σίδηρος. Αποτελεί βασικό συστατικό ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, υπεύθυνων για τη μεταφορά του οξυγόνου και για άλλες μεταβολικές διεργασίες. Επιπλέον πρέπει να μεταφέρεται σε όλο το σώμα, να αποθηκεύεται και να είναι διαθέσιμος για τη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών. Η ικανότητα του σιδήρου να μεταβαίνει από την μια οξειδωτική κατάσταση στην άλλη είναι ουσιαστικά η σημαντικότερη ιδιότητα του [64].

Σε ένα μέσο ενήλικά εντοπίζονται με διάφορες μορφές 4,5 g σιδήρου. Οι μορφές με τις οποίες απαντά ο σίδηρος στον οργανισμό είναι ο λειτουργικός, ο αποθηκευτικός και ο μεταφορικός. Ο αποθηκευτικός σίδηρος βρίσκεται με τη μορφή των πρωτεϊνών φερριτίνη και αιμοσφαιρίνη. Η μορφή αυτή παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις και συναντάται κυρίως στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος και στα

μακροφάγα του ενδοθηλιακού συστήματος. Οι πρωτεΐνες φερριτίνη και αιμοσφαιρίνη δεσμεύουν και αποθηκεύουν την περίσσεια του σιδήρου ενώ τον αποδεσμεύουν σε περιπτώσεις όπου απαιτείται αναπλήρωση του λειτουργικού σιδήρου. Η παραπάνω δράση ουσιαστικά αποτελεί αμυντικό μηχανισμό για τη δέσμευση της τοξικής περισσειας του σιδήρου που μπορεί να οδηγήσει σε αιμοχρωμάτωση. Ως μεταφορικός αναφέρεται ο σίδηρος που απαντάται με τη μορφή της πρωτεΐνης τρανσφερρίνης [103]. Περίπου 3 g βρίσκονται με τη μορφή αιμογλοβίνης και 0,4 g ως μυογλοβίνη. Επιπλέον 1 g σιδήρου βρίσκεται υπό τη μορφή φερριτίνης και αιμοσιδερίνης και 3-5 mg αντιστοιχούν σε τρανσφερίνη. Πρέπει να τονιστεί όμως ότι σε όλες τις παραπάνω δεξαμενές ο σίδηρος είναι δεσμευμένος και δεν συμμετέχει στον κύκλο Haber-Weiss [99]. Άρα θα πρέπει ο σίδηρος να αποδεσμευτεί από τις πρωτεΐνες για να συμμετάσχει σε αυτόν. Αυτό πραγματοποιείται με οξειδωτική απενεργοποίηση του ενζύμου ακονιτάση, το οποίο σχετίζεται με την ομοιόσταση του σιδήρου και οδηγεί σε απελευθέρωση του σιδήρου από τις σιδηροθείο πρωτεΐνες [104, 105].

Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο σίδηρος που βρίσκεται με τη μορφή της φερριτίνης. Η συγκεκριμένη μορφή του σιδήρου δεν συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εκτός αν αποδεσμευτεί από την πρωτεΐνη με ταυτόχρονη αναγωγή του μέσω ελευθέρων ριζών όπως $O_2^{\bullet-}$ [106]. Παρόλα αυτά, τόσο οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ όσο και άλλα αναγωγικά που παράγονται μέσα στα κύτταρα, δεν είναι αρκετά δραστικά και στην ουσία η φερριτίνη δρα προστατευτικά και όχι καταστροφικά για τα κύτταρα. Άλλα μέσα όπως ελεύθερα ηλεκτρόνια, paraquat, αδριαμυκίνη, 6-υδροξυντοπαμίνη, θειόλες και αδρεναλίνη είναι πιο αποτελεσματικά στην απελευθέρωση του σιδήρου από την φερριτίνη και με αυτό τον τρόπο δρουν κυτταροτοξικά [107]. Διαφορετική περίπτωση αποτελούν οι πρωτεΐνες της αίμης και διάφορες υπεροξειδάσες, οι οποίες αντιδρούν με το H_2O_2 και απελευθερώνουν το σίδηρο αλλά δεν παράγονται ρίζες $\bullet OH$ [108]. Για παράδειγμα, η μυελοπεροξειδάση και η μετμυογλοβίνη σχηματίζουν με επίδραση H_2O_2 oxo-ferryl είδη που περιέχουν την ομάδα της αίμης. Άλλη περίπτωση αποτελεί ο σίδηρος που βρίσκεται υπό την μορφή συμπλόκου με διάφορους υποκαταστάτες όπως EDTA, ATP, ADP. Σε αυτά τα σύμπλοκα ο σίδηρος χαρακτηρίζεται από σταθερή οξειδωτική κατάσταση και κατά συνέπεια δεν οξειδώνεται εύκολα από κοινά οξειδωτικά μέσα. Οι πιο αποτελεσματικοί συμπλοκοποιητές του σιδήρου είναι η διπυριδίνη και η φαινανθρολίνη.

Συμπερασματικά λοιπόν, η πιθανότητα ενεργοποίησης της αντίδρασης Fenton στον οργανισμό εξαρτάται από τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ που μπορεί να απελευθερώσουν το σίδηρο από το ένζυμο ακοτινάση, από την ύπαρξη πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον ελεύθερο σίδηρο και από την ταυτοποίηση του γονιδίου που θεωρείται υπεύθυνο για την αιμοχρωμάτωση (HFE).

3.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ FENTON ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Η εφαρμογή της Fenton σε βιολογικά συστήματα δεν είναι τόσο απλή, αφού ο σίδηρος μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε συγκεκριμένες θέσεις σε πρωτεΐνες και DNA (site specific damages) [109]. Η ανεπιθύμητη αυτή δράση περιορίζεται με συμπλοκοποίηση του με διάφορους υποκαταστάτες όπως EDTA, ADP κ.τ.λ.. Σε αυτά τα σύμπλοκα, ο σίδηρος παραμένει δεσμευμένος και μόνο με την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών μέσων όπως το H_2O_2 απελευθερώνεται και συμμετέχει στην αντίδραση Fenton [110, 111].

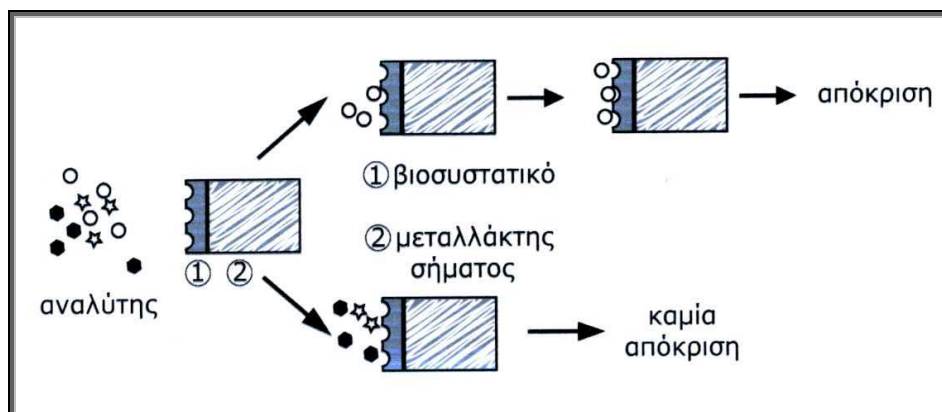
ΚΕΦ.4 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λέξη “sensor” (αισθητήρας) προέρχεται από τη λατινική λέξη *sentire* η οποία σημαίνει “αισθάνομαι”. Ένας αισθητήρας είναι μια διάταξη που αποκρίνεται σε μια φυσική ή χημική διέγερση, όπως θερμότητα, φως, ήχος, πίεση, μαγνητισμός, ή μια συγκεκριμένη κίνηση και μεταδίδει το αποτέλεσμα που προκύπτει με τη μορφή ώσης. Ένας αισθητήρας, συνεπώς, μπορεί να αναγνωρίσει ένα εσωτερικό σήμα (ή ενέργεια) και να το μετατρέψει στο κατάλληλο εξωτερικό σήμα (ή άλλη μορφή ενέργειας) [112].

Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο βιοσυστατικό (DNA, ένζυμο, μικροοργανισμό ή ιστό) και από ένα σύστημα ανίχνευσης (ανιχνευτή ή μεταλλάκτη σήματος). Με βάση τη φυσικοχημική αρχή η οποία διέπει το σύστημα ανίχνευσης, αυτοί διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, θερμικούς και βιοαισθητήρες μάζας.

Πλεονεκτήματα της αναλυτικής τους ικανότητας είναι η εκλεκτικότητα, η υψηλή ευαισθησία, η σταθερότητα και η σχετικά φτηνή οργανολογία που απαιτείται, ενώ το κύριο μειονέκτημά τους εντοπίζεται όταν υπάρχουν στο προς μελέτη δείγμα ηλεκτροδραστικές ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό και υστερούν στη μακροχρόνια σταθερότητα.



Σχήμα 4. 1. Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα

Η εκλεκτική μοριακή αναγνώριση του αναλύτη είναι ο κύριος στόχος των βιοαισθητήρων και μπορεί να γίνει με χρήση ενζύμων, αντισωμάτων, νουκλεϊνικών οξέων, μικροοργανισμών, μικροβίων, κυττάρων καθώς και ιστών. Κατά την αντίδραση αυτών των βιολογικά ενεργών συστατικών με την προσδιοριζόμενη ένωση

πραγματοποιείται μία φυσικοχημική μεταβολή, η οποία πρέπει να μετατραπεί σε χρήσιμο ηλεκτρικό σήμα μέσω του μεταλλάκτη σήματος.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούνται από ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος (πχ. ηλεκτρόδια). Οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες σε αμπερομετρικούς και ποτενσιομετρικούς. Οι αμπερομετρικοί, παρακολουθούν τα φαρανταϊκά ρεύματα τα οποία προκύπτουν λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού συστήματος και ενός ηλεκτροδίου στο οποίο εφαρμόζεται ένα κατάλληλο σταθερό δυναμικό. Οι ποτενσιομετρικοί βασίζονται σε εκλεκτικές σε ιόντα μεμβράνες, οι οποίες όταν βρίσκονται σε επαφή με το διάλυμα της αναλυόμενης ουσίας μεταβάλλουν την πυκνότητα φορτίου στη διεπιφάνεια και η μεταβολή αυτή έχει ως συνέπεια μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης.

Υπάρχουν δύο τύποι βιοαισθητήρων, οι οποίοι εξαρτώνται από τη φύση του στοιχείου αναγνώρισης, οι διατάξεις βιοσυγγένειας που βασίζονται στην εκλεκτική σύνδεση του αναλυτικού στόχου με το ακινητοποιημένο βιολογικό στοιχείο, το οποίο μπορεί να είναι αντίσωμα ή ολιγονουκλεοτίδιο και οι βιοκαταλυτικές διατάξεις, όπου ένα ακινητοποιημένο ένζυμο χρησιμοποιείται για την αναγνώριση ενός συγγενικού υποστρώματος, του αναλυτικού στοιχείου 'στόχου' [113].

Ο πρώτος βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της γλυκόζης από τους Clark και Lyons το 1962. Ενζυμικοί βιοαισθητήρες έχουν αναπτυχθεί κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό υδρογονανθράκων (γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη), πρωτεϊνών (χοληστερόλη και κρεατινίνη), αμινοξέων (γλουταμίνη) και μεταβολιτών (ουρία) τόσο στο αίμα όσο και σε άλλα σωματικά υγρά καθώς και σε ιστούς. Έχει επίσης επιτευχθεί ο προσδιορισμός μεγάλου αριθμού βιομορίων όπως αντισώματα και αντιγόνα με χρήση ανοσοχημικού αισθητήρα (immuno sensor). Πιο πρόσφατα ξεκίνησε και υλοποιήθηκε η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση βλάβης ή καταστροφής στο μόριο του DNA [114] όπως και για την αναγνώριση αλληλουχιών και υβριδίων DNA [115]. Οι βιοαισθητήρες αναπτύσσονται με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για αναλύσεις ρουτίνας, όπως για κλινικές διαγνώσεις, έλεγχο ποιότητας τροφίμων και για περιβαλλοντική ανάλυση. Ο έλεγχος της ρύπανσης του περιβάλλοντος είναι σημαντικός για την προστασία του και η χημική ανάλυση των ρυπαντών αποτελεί σημαντικό ζήτημα. Οι κλασσικές μέθοδοι ελέγχου είναι συνήθως αργές, σύνθετες και απαιτούν ακριβό εξοπλισμό. Οι βιοαισθητήρες αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση.

Πολλοί από αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον ταχύ χαρακτηρισμό φαρμακευτικών ενεργών ουσιών. Τέτοια συστήματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για ουσίες με γνωστή βιοδραστητικότητα ή άγνωστη χημική σύνθεση [116]. Σημαντική πρόκληση στις μέρες μας αποτελεί η εφαρμογή των DNA βιοαισθητήρων για την ανίχνευση μεταλλάξεων ή τον προσδιορισμό κληρονομικών γενετικών ασθενειών.

4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

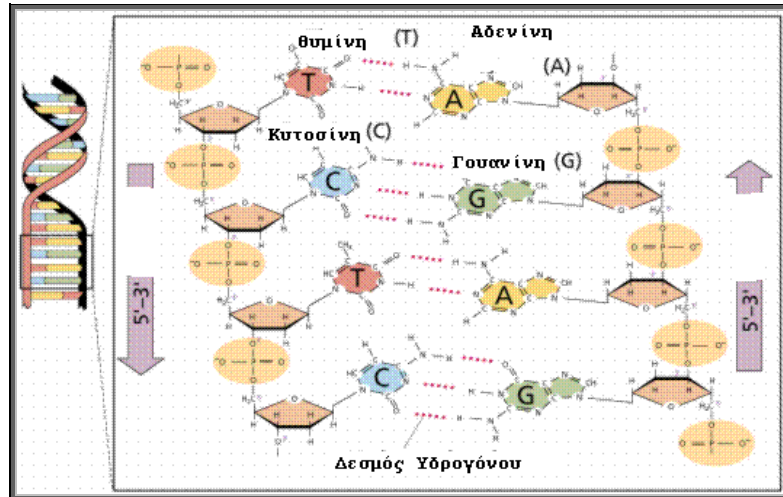
4.2.1 DNA-Δομή και ιδιότητες

Τα νουκλεϊνικά οξέα όπως είναι γνωστό είναι πολύ σημαντικά για τους έμβιους οργανισμούς αφού παρέχουν πληροφορίες τόσο για την συγκρότηση όσο και για την λειτουργία τους. Το 1869 ανακαλύφθηκαν ως χημικές οντότητες από τον Friedrich Miescher ενώ το 1953 αποσαφηνίστηκε ο ακριβής βιολογικός τους ρόλος και η στερεοχημική τους δομή.

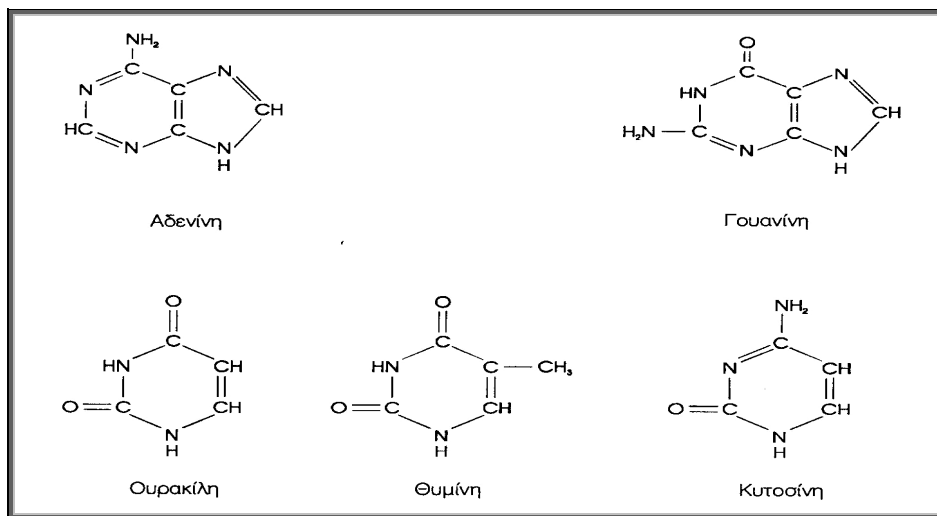
Πιο συγκεκριμένα οι Watson και Crick, βασιζόμενοι κυρίως σε κρυσταλλογραφικές μελέτες που έκαναν οι ίδιοι και ο Wilkins σε ίνες DNA, κατέληξαν σε ένα συγκεκριμένο μοντέλο DNA, το οποίο αποτελείται από μια διπλή έλικα [117]. Η παραδοχή ότι το DNA είναι δίκλωνο έχει ζωτική σημασία αφού με αυτό τον τρόπο έγιναν αντιληπτές οι δυνατότητες του για αντιγραφή και αποθήκευση πληροφοριών. Πιο αναλυτικά, ένα μόριο DNA συνίσταται από δυο κλώνους δηλαδή από δυο μακριές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Το εξωτερικό μέρος του καθενός από τους δυο κλώνους αποτελείται από διαδοχικά μόρια φωσφορικού οξέος και δεοξυριβόζης, ενώ προς το εσωτερικό προεξέχουν οι αζωτούχες βάσεις (τέσσερις) με τέτοιο τρόπο, ώστε απέναντι από κάθε μόριο αδενίνης να βρίσκεται ένα μόριο θυμίνης και απέναντι από κάθε μόριο γουανίνης ένα μόριο κυτοσίνης. Μεταξύ των βάσεων κάθε ζεύγους αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου, δύο στο ζεύγος αδενίνης-θυμίνης ενώ τρεις στο ζεύγος γουανίνης – κυτοσίνης. Οι βάσεις αδενίνης (A) και θυμίνης (T), καθώς και οι βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) είναι συμπληρωματικές. Το ζευγάριωμα ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις επιτρέπει στα ζεύγη των βάσεων να συσχευάζονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας στην πιο ευνοϊκή διάταξη από ενεργειακής απόψεως [118].

Κάθε ζεύγος βάσεων έχει παρόμοιο εύρος για να διατηρεί τον σακχαρο-φωσφορικό σκελετό σε ίση απόσταση κατά μήκος του μορίου του DNA, ενώ οι σακχαρο-φωσφορικοί σκελετοί περιτυλίσσονται ο ένας γύρω από τον άλλον για να

σχηματίσουν την διπλή έλικα. Επίσης συμπληρωματικοί είναι και οι κλώνοι του DNA ο ένας προς τον άλλον, όπως και αντιπαράλληλοι δηλαδή η 3'→5' κατεύθυνση των φωσφοδιεστερικών δεσμών είναι αντίθετη στους δύο κλώνους (σχήμα 4.2). Με τον παραπάνω τρόπο αιτιολογείται η χημική πολικότητα του κάθε κλώνου.



Σχήμα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση των δύο κλώνων του DNA



Σχήμα 4.3. Οι βάσεις του DNA

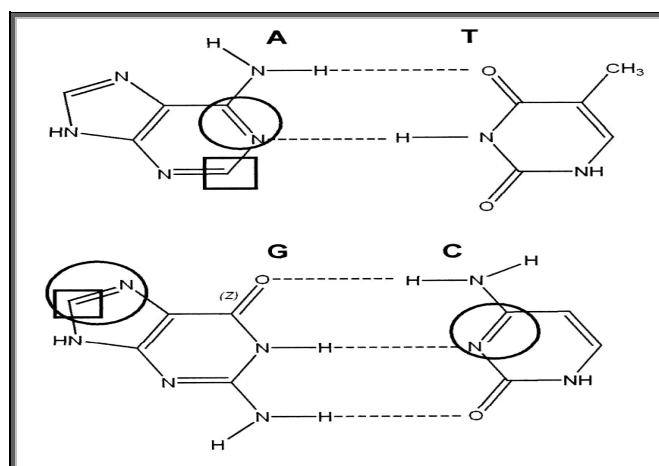
4.2.2 Ηλεκτροδραστικότητα νουκλεϊνικών οξέων

Ο βασικός ρόλος του DNA στα κύτταρα είναι να διατηρεί και να εκφράζει τη γενετική πληροφορία. Η βλάβη που προκαλείται στο DNA των κυττάρων, οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις ορισμένων χημικών και φυσικών ουσιών που εμφανίζονται στο περιβάλλον και που είναι πιθανόν να προκαλέσουν μετάλλαξη και ακολούθως εμφάνιση καρκίνου. Η βλάβη στο DNA προκαλεί διαταραχές στη λειτουργία του κυττάρου και επομένως επιδρά και στην ανθρώπινη υγεία. Οι χημικές μετατροπές στις βάσεις του DNA προκαλούν μετάλλαξη στην αλληλουχία του νουκλεοτιδίου. Τα

σπασίματα στη διπλή έλικα του DNA προκαλούν χρωματική εκτροπή και λάθη κατά τη διαδικασία της μίτωσης. Η συσσώρευση μεταλλάξεων ή άλλου είδους βλάβης στο DNA είναι δυνατό να αποτελέσουν αιτίες τερατογένεσης και καρκινιγένεσης.

Στον όρο ‘βλάβη του DNA’ υπεισέρχεται, το σπάσιμο των κλώνων ως αποτέλεσμα της επίδρασης ελεύθερων ριζών στα μόρια δεοξυριβόζης ή της ενζυματικής υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών στη ραχοκοκκαλιά του DNA. Επίσης η υδρόλυση των N-γλυκοσιδικών δεσμών οδηγεί στην απελευθέρωση βάσεων (πουρίνες περισσότερο από πυριμιδίνες) και στην εμφάνιση τμημάτων χωρίς βάσεις στο DNA. Με τις βάσεις του DNA αντιδρούν και αρκετές απλές χημικές ενώσεις όπως διάφορα ηλεκτρονιόφιλα ή πυρηνόφιλα αλκυλιωτικά μέσα, αλλάζοντας έτσι τις φυσικοχημικές ιδιότητές του. Μερικές χημικές μετατροπές οδηγούν στη διάσπαση τμημάτων βάσεων, στην αποσταθεροποίηση των N-γλυκοσιδικών δεσμών. Ενώσεις με πιο πολύπλοκη δομή αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με το DNA δίνοντας προϊόντα με οπτικές, ηλεκτροχημικές και ανοσιολογικές ιδιότητες.

Στα νουκλεϊνικά οξέα, μόνο οι βάσεις είναι ηλεκτροδραστικές (σχήμα 4.3). Η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) οξειδώνονται σε ηλεκτρόδια γραφίτη, ενώ η αδενίνη (A) και η κυτοσίνη (C) ανάγονται σε ηλεκτρόδια Hg. Στο σχήμα 4.4 φαίνονται οι θέσεις οξείδωσης και αναγωγής των βάσεων σύμφωνα με το μοντέλο Watson-Crick [119].



Σχήμα 4. 4. Θέσεις οξείδωσης και αναγωγής των βάσεων. Οι κύκλοι υποδηλώνουν θέσεις που μπορούν να αναχθούν σε ηλεκτρόδια υδραργύρου και τα τετράγωνα δείχνουν τις θέσεις οξείδωσης στα ηλεκτρόδια γραφίτη

Η ηλεκτροχημική απόκριση εξαρτάται από τη δομή του DNA. Οι οξειδούμενες περιοχές των A και G δεν αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και γι' αυτόν το λόγο οι διαφορές στη βολταμετρική συμπεριφορά του δίκλωνου και του

μονόκλωνου DNA καθορίζονται κυρίως από τις διαφορές στην ευκαμψία των δύο μορφών του DNA. Έτσι, το μονόκλωνο DNA είναι σχετικά ευλύγιστο και κατά την προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου γραφίτη παίρνει θέση προς την επιφάνεια με αποτέλεσμα περισσότερα κατάλοιπα αδερινών και γουανινών να είναι προσβάσιμα και να δίνουν μεγαλύτερα ρεύματα κορυφής σε σύγκριση με το δίκλωνο DNA το οποίο έχει πιο άκαμπτη δομή [120].

Οι θέσεις αναγωγής των A και C αποτελούν τμήμα του συστήματος των δεσμών υδρογόνου, οπότε ένας παράγοντας για την αναγωγή των A και C είναι η πρωτονίωσή τους, η οποία μπορεί να λάβει χώρα στην περιοχή ουδέτερων pH αρκεί το άζωτο στη θέση 1 της αδερίνης ή αυτό στη θέση 3 της κυτοσίνης να μπορούν να δεχθούν το πρωτόνιο.

Οι DNA βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται σε μεθόδους αναγνώρισης νουκλεϊνικού οξέος, αναπτύχθηκαν ταχέως κάνοντας διάφορες απλές, γρήγορες και φθηνές δοκιμές σε γενετικές και λοιμώδεις ασθένειες, καθώς και για την παρακολούθηση της καταστροφής του DNA και τις αλληλεπιδράσεις. Σημαντική πρόκληση στις μέρες μας αποτελεί η εφαρμογή των DNA βιοαισθητήρων για την ανίχνευση μεταλλάξεων ή τον προσδιορισμό κληρονομικών γενετικών ασθενειών [121].

Οι DNA βιοαισθητήρες είναι διατάξεις που μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την αλλαγή της δομής των νουκλεϊνικών οξέων, την αλληλεπίδραση τους με διάφορες ενώσεις και φάρμακα και χρήση τους μπορεί να γίνει για την ανίχνευση φαρμάκων και γενικότερα ενώσεων που παρουσιάζουν αγχιστεία με το DNA. Σε αντίθεση με τα ένζυμα, τα νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να απομονωθούν γρηγορότερα και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά την ακινητοποίηση.

Στους DNA βιοαισθητήρες, τα νουκλεϊνικά οξέα ακινητοποιούνται στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων και καταγράφονται τα παραγόμενα ηλεκτροχημικά σήματα λόγω οξειδωσης ή αναγωγής των βάσεων τους. Η εφαρμογή, λοιπόν, αυτού του είδους βιοαισθητήρων στηρίζεται στην ηλεκτροδραστικότητα των βάσεων, ιδιότητα που πρωτοανακαλύφθηκε το 1960 από τον Emil Palecek.

4.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η μελέτη των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών στους τομείς της βιολογίας, της τεχνολογίας τροφίμων, της φαρμακολογίας και της κοσμετολογίας είναι πολύ σημαντική και για αυτόν το λόγο έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι ελεύθερες ρίζες από τη μια πλευρά θεωρούνται υπεύθυνες για την οξειδωση βιομορίων και την αλλοίωση τροφίμων και καλλυντικών προϊόντων, ενώ τα αντιοξειδωτικά από την άλλη πλευρά δρουν προλαμβάνοντας τις δράσεις των ελευθέρων ριζών. Οι συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων αντιοξειδωτικών είναι η φασματοφωτομετρία, η φθορισμομετρία και χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC, GC) [122, 123] ενώ τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν στραφεί σε νέες τεχνολογίες με εξαιρετικές δυνατότητες.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι εξαιρετικά εργαλεία, κατάλληλα για γρήγορες και φθηνές αναλύσεις, ενώ παρέχουν πληροφορίες όταν άλλες τεχνικές (π.χ. HPLC) αδυνατούν. Η μελέτη των αντιοξειδωτικών πρέπει να δίνει απαντήσεις και πληροφορίες ανάλογα με το δείγμα και τον αντικειμενικό σκοπό της ανάλυσης. Για παράδειγμα, στον ιατρικό-βιολογικό τομέα το ενδιαφέρον εστιάζεται στην εκτίμηση της ικανότητας των διαφόρων αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, ενώ στον τομέα των τροφίμων ενδιαφέρει η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών. Για τους παραπάνω λόγους έχουν αναπτυχθεί δυο κατηγορίες βιοαισθητήρων που να ανταποκρίνονται στις σύγχρονες απαιτήσεις, μελετώντας την αντιοξειδωτική ικανότητα ή την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και την ανίχνευση ή ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών (μονο και πολυφαινόλες), γνωστό και ως ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total phenol content) [124].

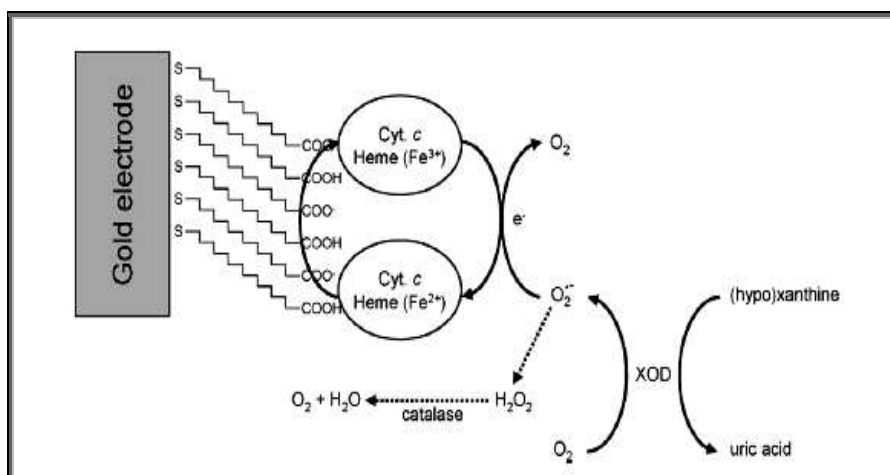
4.3.1 Εφαρμογή βιοαισθητήρων στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Όλοι οι βιοαισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί για αυτόν το σκοπό είναι ηλεκτροχημικοί και χρησιμοποιούν δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) για την οξειδωση του εκάστοτε βιολογικού στόχου. Τα ROS δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, αφού συνιστούν είδη εξαιρετικά ασταθή και για αυτόν το λόγο είναι απαραίτητη η παραγωγή τους *in vitro* με βιοχημικές, χημικές και φυσικοχημικές διεργασίες. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι παραγωγής ROS και οι πιο αντιπροσωπευτικοί είναι η παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton και κατά την φωτοκατάλυση του TiO₂ [125], καθώς και η παραγωγή ριζών υπεροξειδίου με

καταλυτική οξείδωση της ξανθίνης ή υποξανθίνης από το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης [126] και με την προσθήκη NaOH ή KO₂ σε διάλυμα DMSO [127, 128]. Στην πλειονότητα των DNA βιοαισθητήρων χρησιμοποιείται σαν πηγή ελευθέρων ριζών η αντίδραση Fenton ενώ το ένζυμο XOD προτιμάται στις περιπτώσεις των cyt c- και SOD βιοαισθητήρων. Η ακόλουθη κατηγοριοποίηση της συγκεκριμένης ομάδας γίνεται με βάση το βιοσυστατικό που ακινητοποιείται στο ηλεκτρόδιο.

Cyt c- βιοαισθητήρας

Η αρχή λειτουργίας του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα είναι η ανίχνευση του O₂^{•-} μέσω της αντίδρασης αναγωγής του cyt c. Το ακινητοποιημένο ανάγεται από τις ρίζες O₂^{•-} και αμέσως αναγεννάται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με την εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού οξείδωσης (σχήμα 4.5).



Σχήμα 4. 5. Σχηματική παράσταση Cyt c- βιοαισθητήρα

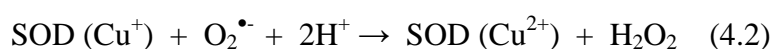
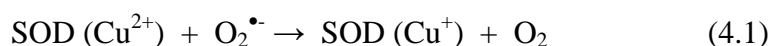
Το ρεύμα που δημιουργείται από τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από τη ρίζα, μέσω του cyt c, στο ηλεκτρόδιο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ρίζας. Πολλές φορές κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη καταλάσης στο σύστημα για την αποφυγή παρεμποδίσεων από το σχηματισμό H₂O₂, όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών, μείωση της συγκέντρωσης τους καθώς και του οξειδωτικού ρεύματος, ποσοτικοποιώντας την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύσουν τις ρίζες που έχουν παραχθεί προηγουμένως. Συνήθως η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ηλεκτροδιακής επιφάνειας και της ανηγμένης πρωτεΐνης είναι πολύ αργή και οι συμβατικές ηλεκτροχημικές τεχνικές αδυνατούν να την ανιχνεύσουν [129].

Ο Tammeveski, ο Manning και οι συνεργάτες τους τροποποίησαν ηλεκτρόδια χρυσού με τη δημιουργία μονοστιβάδων (SAM) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [130, 131]. Επιπλέον για την εξάλειψη των παρεμποδίσεων που προκύπτουν από την αντίδραση όπως H_2O_2 και ουρικό οξύ, το cyt c ακινητοποιήθηκε σε τροποποιημένα με θειόλες μακριάς αλυσίδας (μερκαπτοδεκανοϊκό οξύ) ηλεκτρόδια. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε πολύ συχνά για την ανίχνευση $O_2^{\bullet-}$ και την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας [132, 133, 134]. Η μελέτη των SAM τροποποιημένων ηλεκτροδίων έδειξε ότι η ευαισθησία του βιοαισθητήρα μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με την ποσότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης [135]. Ο Beissenhirtz και οι συνεργάτες του σύγκριναν την αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος και της Biochanin A, μιας φλαβόνης και απέδειξαν ότι το ασκορβικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών, ενώ μελέτησαν και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφόρων καλλυντικών κρεμών [136].

Ο Krylov και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ένα fluidic chip που συνδυάζει την δημιουργία $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 με ένα βιοαισθητήρα δυο ηλεκτροδίων για την ανίχνευση. Με αυτόν τον τρόπο κατάφεραν την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τεχνική flow-injection [137]. Το 2004 ο Beissenhirtz και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν πολυστρωματικές δομές από cyt c και poly(anilinesulfonic acid) (PASA) πάνω σε SAM τροποποιημένα ηλεκτρόδια, αυξάνοντας την ευαισθησία του βιοαισθητήρα [138]. Πολύ σημαντική είναι η εφαρμογή των συγκεκριμένων διατάξεων σε in vivo αναλύσεις όπως ανίχνευση $O_2^{\bullet-}$ κατά την διάρκεια ισχαιμίας [139].

SOD βιοαισθητήρας

Πολλοί υποστηρίζουν ότι οι SOD βιοαισθητήρες είναι μια ικανοποιητική εναλλακτική έναντι στους cyt c- βιοαισθητήρες. Το ένζυμο SOD προστατεύει τα κύτταρα από τα ROS καταλύοντας και τις δυο οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων με ταυτόχρονη παραγωγή O_2 και H_2O_2 (αντιδράσεις 4.1, 4.2).



Η αστάθεια των ριζών $O_2^{\bullet-}$ περιορίζει τον απευθείας προσδιορισμό τους και για αυτόν το λόγο ανιχνεύονται αμπερομετρικά τα προϊόντα O_2 και H_2O_2 . Αρκετοί

ερευνητές επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη βελτιωμένων SOD βιοαισθητήρων για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων συστατικών [140, 141].

Ο Campanella και οι συνεργάτες του επέλεξαν την ακινητοποίηση του ενζύμου SOD μέσα σε gel καρραγενάνης και αμπερομετρικό προσδιορισμό H_2O_2 [142]. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας έχει εφαρμοστεί στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματικών δειγμάτων όπως κρασιά [143], αρωματικά βότανα, ελαιόλαδο, τσάι [144, 145], αρτύματα [146], φάρμακα [147] και στη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας υγίων και μη ιστών νεφρών *in vitro* [138]. Επιπλέον απεδείχθη ότι η παραπάνω διάταξη είναι εξίσου αποτελεσματική και σε οργανικούς διαλύτες, γεγονός εξαιρετικά ενδιαφέρον και χρήσιμο αφού η τεράστια γκάμα των αντιοξειδωτικών περιλαμβάνει δεν περιλαμβάνει μόνο υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά [148].

DNA βιοαισθητήρας

Η μελέτη του DNA είναι πολύ σημαντική διότι αποτελεί τον φορέα των γενετικών πληροφοριών. Αρκετοί DNA βιοαισθητήρες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικίλων συστατικών και πραγματικών δειγμάτων. Σε αυτήν την κατηγορία αναφέρονται δυο είδη βιοαισθητήρων: εκείνοι στους οποίους η ανίχνευση γίνεται έμμεσα με τη μέτρηση του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και εκείνοι στους οποίους χρησιμοποιείται μια ηλεκτροχημική 'ετικέτα' που αλληλεπιδρά με το DNA.

Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στην ακινητοποίηση δίκλωνου DNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με προσρόφηση και μέτρηση του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης με βολταμετρία τετραγωνικού παλμού [111]. Ο Mello και οι συνεργάτες του προκαλούσαν μείωση και αύξηση του σήματος οξείδωσης της γουανίνης με χημική οξείδωση της γουανίνης μέσω της αντίδρασης Fenton και προσθήκη αντιοξειδωτικών στο μίγμα της αντίδρασης αντίστοιχα. Παρατήρησαν ότι με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων αντιοξειδωτικών η οξειδωτική βλάβη είχε αποσβεστεί και το ρεύμα οξείδωσης της γουανίνης έφτανε σχεδόν τα αρχικά επίπεδα [149]. Επιπλέον προσδιόρισαν και σύγκριναν την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων και κατέληξαν στην ακόλουθη σειρά: *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citrates* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*. Η Heilerova και οι συνεργάτες της σύγκριναν

την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων όπως ρίγανη και θυμάρι με χρήση συμβατικών τεχνικών και DNA βιοαισθητήρα [150].

Στη δεύτερη κατηγορία χρησιμοποιείται μια ηλεκτροχημική 'ετικέτα' που αλληλεπιδρά με το DNA για τη ανίχνευση της οξειδωτικής βλάβης. Αυτή η αλληλεπίδραση βασίζεται σε φαινόμενα παρεμβολής και ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το μόριο του DNA [120]. Η ποσότητα του αναγωγικού αντιδραστήριου ετικέτας που βρίσκεται προσκολλημένο στο DNA προσδιορίζεται με την τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας, ενώ μειώνει τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών [151, 152]. Και σε αυτήν την περίπτωση η προσθήκη των αντιοξειδωτικών προκαλεί ανάκτηση του ηλεκτροχημικού σήματος. Ο Buckova και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων πολυσακχαριτών χρησιμοποιώντας το $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ως αναγωγικό αντιδραστήριο [153]. Ο Labuda και οι συνεργάτες του, επιλέγοντας το ίδιο αναγωγικό αντιδραστήριο, υπολόγισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων βοτάνων πλούσια σε φαινολικά αντιοξειδωτικά [154], τις προ-αντιοξειδωτικές δράσεις της α-τοκοφερόλης, του β-καροτενίου και διαφόρων εκχυλισμάτων τσαγιού [155] ενώ όταν μελέτησαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφόρων φλαβόνων και φλαβονόλων κατέληξαν στην ακόλουθη σειρά: κουερσετίνη > ρουτίνη > κατεχίνη [156].

Ο Liu και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μπλε του μεθυλίου σαν παράγοντα παρεμβολής και απέδειξαν ότι το γαλλικό οξύ είναι περίπου 16 φορές πιο αποτελεσματικό σαν αντιοξειδωτικό σε σχέση με τη γλουταθειόνη και αργότερα χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του γαλλικού οξέος, της γλουταθειόνης, του τροlox, του ουρικού οξέος και του ασκορβικού οξέος [157, 158]. Η Ziyatdinova και οι συνεργάτες της ανέπτυξαν έναν εμπεδημετρικό DNA βιοαισθητήρα τροποποιημένο με νανοϋλικά για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της ρουτίνης και διαφόρων εκχυλισμάτων τσαγιού [159].

4.3.2 Εφαρμογή βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών

Βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Στο μονοξείδιο του αζώτου έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές λειτουργίες και ρόλοι όπως ενδοθηλιακός χαλαρωτικός παράγοντας, νευροδιαβιβαστής και

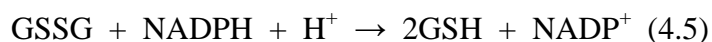
αγγειοδιαστολέας. Επίσης μπορεί να θεωρηθεί τοξίνη κατά την καταστροφή παθογόνων και πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό ριζών (π.χ. ONOO⁻). Ο προσδιορισμός του NO in vitro με μεγάλη ακρίβεια είναι πολύ δύσκολος εξαιτίας της μικρής του συγκέντρωσης, της αστάθειάς του και την αδυναμία παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων. Για αυτό το λόγο οι εφαρμογές είναι περιορισμένες, ενώ χρησιμοποιούνται ένζυμα (π.χ. HRP) και άλλα βιοσυστατικά (π.χ. αιμογλοβίνη).

Βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης

Η αντιοξειδωτική λειτουργία της γλουταθειόνης αποδίδεται στην πυρηνόφιλη κυστεΐνη που βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Απενεργοποιεί απευθείας τις ρίζες O₂^{•-} και OH[•] χάνοντας ένα άτομο υδρογόνου, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζεται η δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG) [160]. Στους βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης επιλέγονται τα ένζυμα αναγωγή της γλουταθειόνης (GSHR) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) (αντιδράσεις 4.3, 4.4).



Μια άλλη εναλλακτική αποτελεί ο σχηματισμός της γλουταθειόνης ως προϊόν μιας σειράς αντιδράσεων όπου η αναγωγή της γλουταθειόνης δρα καταλυτικά. Συγκεκριμένα η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) ανάγεται σε γλουταθειόνη από το ένζυμο παρουσία NADPH ως συμπάραγοντα (αντίδραση 4.5) [161].

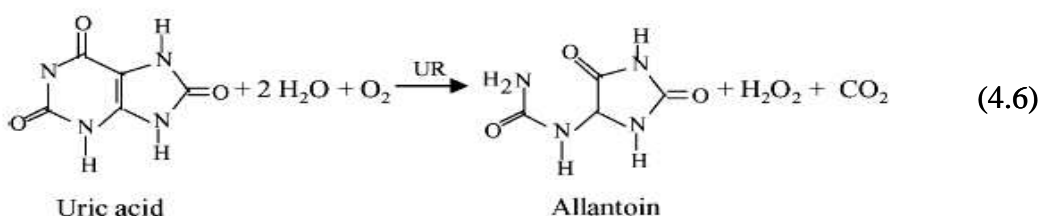


Βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος

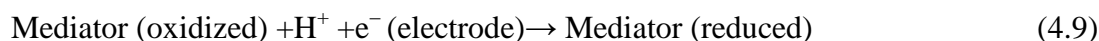
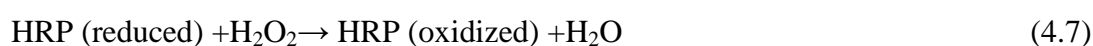
Το ουρικό οξύ (2,6,8-τριϋδροξυπουρίνη) είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον το ουρικό οξύ είναι ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό δρώντας ως αναστολέας σχηματισμού των ριζών O₂^{•-} και OH[•], προϊόντων της καταλυτικής δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης [162]. Η συνεισφορά του ουρικού οξέος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος είναι αρκετά σημαντική [163]. Όταν τα επίπεδα του ουρικού οξέος υπερβαίνουν τις φυσιολογικές τιμές είναι ένδειξη διαφόρων ασθενειών όπως υπερουριχαιμία, βλάβη στους μύες, λευχαιμία, πνευμονία και υπέρταση [164, 165].

Επιπλέον αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στα ούρα αποδίδονται στη δράση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σαν αποτέλεσμα της καταστροφής νουκλεοπρωτεϊνών. Για όλους τους παραπάνω λόγους ο προσδιορισμός του ουρικού οξέος σε βιολογικά υγρά είναι πολύ σημαντικός στη διάγνωση και στη θεραπεία ασθενών που νοσούν από τέτοιου είδους ασθένειες.

Οι βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος διακρίνονται σε δυο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία χρησιμοποιείται το ένζυμο ουρικάση που καταλύει την οξειδωση του ουρικού οξέος με αποτέλεσμα την παραγωγή αλλαντοΐνης, μηχανισμός παρόμοιος με αυτόν που εντοπίζεται στα ζώα. Ουσιαστικά με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται είτε η συνολική κατανάλωση O_2 είτε η ποσότητα του H_2O_2 που παράγεται σύμφωνα με την αντίδραση 4.6.



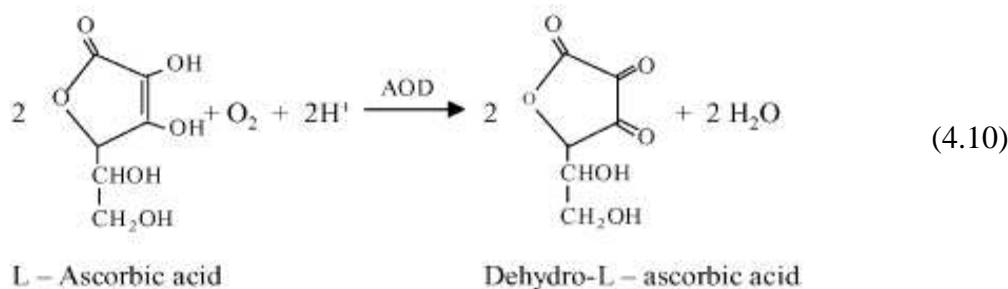
Στη δεύτερη κατηγορία το H_2O_2 που παράγεται κατά την ενζυματική οξειδωση του ουρικού οξέος καταναλώνεται από μια υπεροξειδάση, που συνήθως είναι horseradish υπεροξειδάση (αντιδράσεις 4.7 - 4.9).



Βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό ασκορβικού οξέος

Το L- ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι μια γ-λακτόνη που συντίθεται κυρίως από τα φυτά. Αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής, σαν πρόσθετο στη βιομηχανία τροφίμων όπου βοηθά στη διατήρηση του χρώματος, των αρωμάτων και της γεύσης των τροφίμων ενώ επιμηκύνει την περίοδο ζωής των προϊόντων [166]. Ο προσδιορισμός της βιταμίνης C είναι πολύ σημαντικός τόσο σε βιολογικά όσο και σε δείγματα τροφίμων, εξαιτίας της

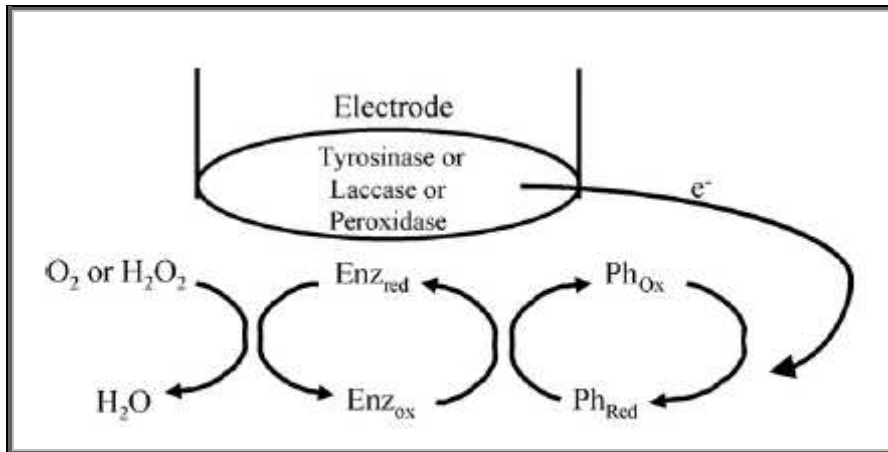
διττής δράσης του ασκορβικού οξέος σαν αντιοξειδωτικό (δεσμευτής ελευθέρων ριζών) και προοξειδωτικό (δότης ηλεκτρονίων) [167]. Ο βιοαισθητήρας του ασκορβικού οξέος βασίζεται στο ένζυμο ασκορβική οξειδάση που καταλύει την οξείδωση του L- ασκορβικού οξέος παρουσία οξυγόνου (αντίδραση 4.10). Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο τύπου Clark ενώ το μέγεθος που προσδιορίζεται είναι η συγκέντρωση του O₂, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος.



Βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό φαινολικών συστατικών (Ένζυμα)

Τα φαινολικά συστατικά είναι αντιοξειδωτικά που λειτουργούν ως παρεμποδιστές οξείδωσης και συναντώνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες του μεταβολισμού των φυτών. Περισσότερες πληροφορίες για τα φαινολικά αντιοξειδωτικά και τις υποκατηγορίες τους δίνονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Ο προσδιορισμός των φαινολικών αντιοξειδωτικών βρίσκει πολλές εφαρμογές σε πραγματικά δείγματα όπως εκχυλίσματα φυτών, βοτάνων και αρτύματα. Οι βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων βασίζονται στην ακινητοποίηση κάποιας οξειδάσης όπως τυροσινάση, λακτάση ή υπεροξειδάση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, με τις φαινόλες να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων [168]. Στις περισσότερες όμως των περιπτώσεων ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου κρίνεται πιο σημαντικός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ξεχωριστά. Η πλειονότητα των εργασιών πάνω σε τέτοιου είδους βιοαισθητήρες μελετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών [169].

Η αρχή λειτουργίας ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων περιγράφεται στο σχήμα 4.6.



Σχήμα 4. 6. Μηχανισμός δράσης ενζυμικών βιοαισθητήρων

Η οξείδωση των ενζύμων λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παρουσία οξειδωτικού υποστρώματος, O₂ για τις οξειδάσες και H₂O₂ για τις υπεροξειδάσες. Στη συνέχεια το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική οξειδωτική του κατάσταση προσλαμβάνοντας ηλεκτρόνιο από κατάλληλο δότη, όπως η ανηγμένη μορφή των φαινολών. Ουσιαστικά το μέγεθος που μετράται είναι το αναγωγικό ρεύμα που αντιστοιχεί στην αναγωγή των φαινολικών ενώσεων. Το ένζυμο τυροσινάση περιορίζεται στον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων με τουλάχιστον μια ελεύθερη ορθο- θέση, ενώ η λακτάση χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φαινολικών με ελεύθερη παρα- και μετα- θέση.

ΚΕΦ.5 ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βολταμετρικές τεχνικές συνιστούν μια ομάδα ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης, στις οποίες η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από διαγράμματα i - E , όπου το i είναι η ένταση του ρεύματος που διαρρέει το ηλεκτρολυτικό στοιχείο και E το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, η βολταμετρία αποτελεί ηλεκτροαναλυτική τεχνική όπου το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετράται ως συνάρτηση του δυναμικού του, το οποίο αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα του διαλύματος να οξειδωθούν ή να αναχθούν επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Ως ηλεκτρόδιο εργασίας ορίζεται το ηλεκτρόδιο πάνω στο οποίο πραγματοποιείται η οξειδοαναγωγική αντίδραση του συστήματος που μελετάται. Το δυναμικό είναι μία ελεγχόμενη παράμετρος, η οποία μπορεί να μεταβληθεί ως προς το χρόνο με διάφορους τρόπους όπως γραμμικά, παλμικά, εναλλασσόμενα. Η ηλεκτροδιακή δράση περιγράφεται από τη γενική αντίδραση 5.1:



Η σχέση μεταξύ του δυναμικού του ηλεκτροδίου και της συγκέντρωσης της οξειδωμένης ή της ανηγμένης μορφής στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου στους 25°C δίνεται από την εξίσωση του Nernst (σχέση 5.1):

$$E = E^{\circ} + (0.059/n)\log(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) \quad (5.1)$$

όπου C_{ox} και C_{red} , οι συγκεντρώσεις της οξειδωμένης και της ανηγμένης μορφής αντίστοιχα και n ο αριθμός ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης.

Το ρεύμα που προκύπτει κατά τη μεταβολή της οξειδωτικής κατάστασης ονομάζεται φαρανταιϊκό και εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

(α) Φαινόμενα μεταφοράς μάζας, ουσιαστικά την ταχύτητα με την οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις μεταφέρονται από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

(β) Φαινόμενα μεταφοράς φορτίου, ουσιαστικά την ταχύτητα με την οποία τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ενώσεις του διαλύματος στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα.

Σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είναι δυνατόν να συμβούν επιφανειακές ή άλλες χημικές αντιδράσεις. Το βραδύτερο στάδιο καθορίζει το μέγεθος του ρεύματος. Για τη διαδικασία που ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας και κατά την οποία οι

ηλεκτροδραστικές ενώσεις είναι δυνατόν να φτάσουν την επιφάνεια του ηλεκτροδίου με διάχυση, το ρεύμα που προκύπτει περιγράφεται από την εξίσωση Cottrell (σχέση 5.2):

$$i = nFA(D/\pi t)^{1/2}C \quad (5.2)$$

όπου i το ρεύμα διάχυσης (ampere) που διαρρέει το σύστημα σε χρόνο t (s) από την έναρξη του πειράματος, n ο αριθμός ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης, F η σταθερά Faraday, A η επιφάνεια (cm^2) του ηλεκτροδίου, D ο συντελεστής διάχυσης (cm^2s^{-1}) και C η συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (mol L^{-1}).

Εκτός από το φαρανταιϊκό ρεύμα δημιουργείται και το ρεύμα υποβάθρου (υπολειμματικό), το οποίο διαρρέει το σύστημα απουσία των ηλεκτροδραστικών ενώσεων που ενδιαφέρουν, είναι σύνθετο και προέρχεται από τη συνεισφορά του ρεύματος φόρτισης της διπλοστοιβάδας, της αντίδρασης οξειδοαναγωγής των προσμίξεων καθώς και του διαλύτη, του ηλεκτρολύτη ή του ηλεκτροδίου (έκλυση υδρογόνου και οξείδωση του υδραργύρου). Το ρεύμα φόρτισης είναι το κύριο συστατικό του υπολειμματικού ρεύματος.

Το διάγραμμα ρεύματος-δυναμικού καλείται βολταμμογράφημα. Από το βολταμμογράφημα, το δυναμικό στο ανερχόμενο τμήμα του κύματος ή της κορυφής αποδίδεται στο E^0 για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος και παρέχει πληροφορίες για ποιοτική αποτίμηση, ενώ το φαρανταιϊκό ρεύμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των ηλεκτροδραστικών ενώσεων και μπορεί να αξιοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται από το σχετικό μέγεθος του φαρανταιϊκού ρεύματος συγκρινόμενο με το υπολειμματικό ρεύμα.

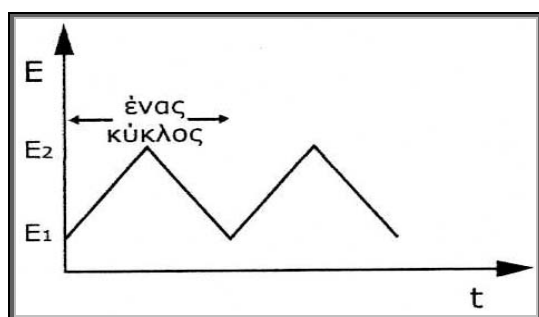
Γενικά οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές, σε σύγκριση με άλλες ενόργανες αναλυτικές τεχνικές, μπορούν να θεωρηθούν ότι υπερτερούν σε χαρακτηριστικά όπως το κατώτερο όριο ανίχνευσης και το χαμηλότερο κόστος. Την τελευταία δεκαετία διατίθενται στο εμπόριο ολοκληρωμένα συστήματα ελεγχόμενα από μικροϋπολογιστή, τα οποία εκτελούν οποιαδήποτε ηλεκτροαναλυτική τεχνική με απλή φόρτωση του αντίστοιχου προγράμματος ελέγχου [170].

5.2 ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

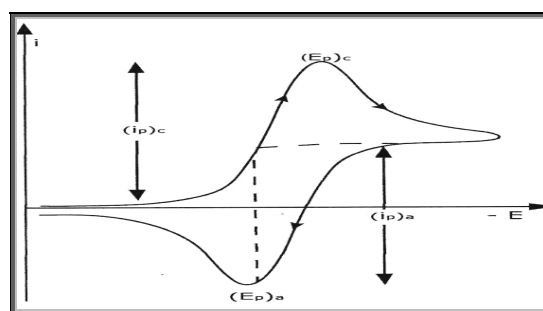
Η κυκλική βολταμμετρία ουσιαστικά συνεισφέρει στην εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών για τις ηλεκτροχημικές δράσεις που πραγματοποιούνται και συνήθως

είναι το πρώτο πείραμα που εκτελείται σε μία ηλεκτροχημική μελέτη, αφού η διαδικασία είναι σχετικά απλή και γρήγορη. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη της αντιστρεψιμότητας των ηλεκτροδιακών δράσεων, της κινητικότητάς τους και ορισμένες φορές για αναλυτικούς σκοπούς. Δίνει πληροφορίες για την οξειδοαναγωγική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών και προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης ενδιάμεσων [171].

Το εφαρμοζόμενο δυναμικό στην κυκλική βολταμετρία είναι ένα τριγωνικό κύμα ως συνάρτηση του χρόνου (σχήμα 5.1). Το δυναμικό σαρώνεται σε καθοδική κατεύθυνση στη διαδικασία αναγωγής και στη συνέχεια αντίστροφα σε ανοδική κατεύθυνση μετά τον τερματισμό του κύματος αναγωγής. Το δυναμικό είναι δυνατόν να σαρώνεται σαν απλός ή πολλαπλός κύκλος και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού μπορεί να φτάσει και τα 100Vs^{-1} . Στη διάρκεια της αναγωγής το δυναμικό σαρώνεται καθοδικά και μετά αντίστροφα κατά την ανοδική κατεύθυνση, προς θετικότερα δυναμικά.



Σχήμα 5.1. Κυματομορφή του δυναμικού στην κυκλική βολταμετρία



Σχήμα 5.2. Αντιστρεπτό κυκλικό βολταμμογράφημα

Ένα τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για ένα αντιστρεπτό σύστημα φαίνεται στο σχήμα 5.2. Σε ένα τέτοιο βολταμμογράφημα οι μετρούμενες παράμετροι είναι ο λόγος i_{pa}/i_{pc} και η διαφορά $E_{pa}-E_{pc}$, όπου i_{pa} , i_{pc} οι μέγιστες τιμές ρεύματος και E_{pa} , E_{pc} οι αντίστοιχες τιμές δυναμικού στην ανοδική και καθοδική κατεύθυνση, αντίστοιχα [172].

Σε ένα απλό αντιστρεπτό σύστημα ο λόγος των ρευμάτων i_{pa}/i_{pc} είναι ίσος με τη μονάδα και η διαφορά μεταξύ των δυναμικών E_{pa} και E_{pc} είναι $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ mV. Η ένταση του ρεύματος κορυφής στους 25°C δίνεται από την εξίσωση 5.3:

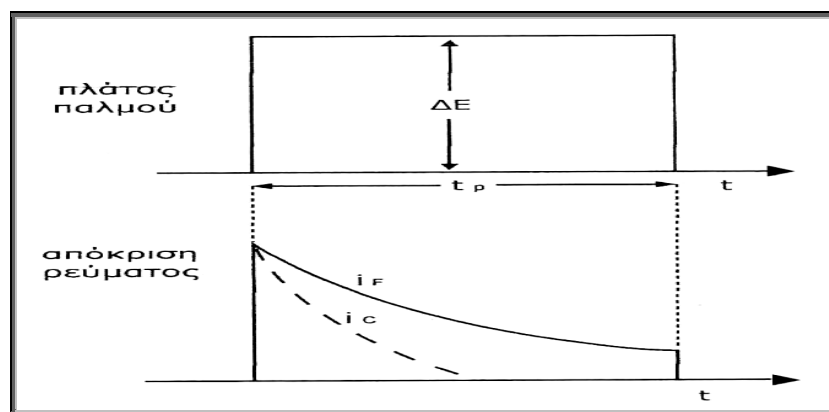
$$i_p = 2.67 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (5.3)$$

όπου i_p το ρεύμα κορυφής (Ampere), n ο αριθμός ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου (cm^2), D ο συντελεστής διάχυσης (cm^2s^{-1}), C η συγκέντρωση (mol L^{-1}) και v η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (Vs^{-1}).

5.3 ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

Η συγκεκριμένη μέθοδος προκαλεί όχι μόνο σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος αλλά και βελτίωση της ευαισθησίας των προσδιορισμών, αφού το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης τεχνικής είναι αρκετά χαμηλότερο από το αντίστοιχο της κλασσικής πολαρογραφίας. Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή παλμού σε σταθερό ή αυξανόμενο δυναμικό πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και διακρίνεται σε κανονική και διαφορική παλμική. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταιϊκό βραδύτερα. Εξετάζοντας το ρεύμα στα τελευταία χιλιοστοδευτερόλεπτα της διάρκειας του παλμού, το ρεύμα είναι σχεδόν φαρανταιϊκό. Η ευαισθησία αυξάνεται 5 έως 7 φορές συγκρινόμενη με αυτή της κλασσικής πολαρογραφίας [171].

Οι παλμικές τεχνικές μπορούν να εφαρμοσθούν στο σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου ή στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου καθώς και σε στερεά ηλεκτρόδια [173].

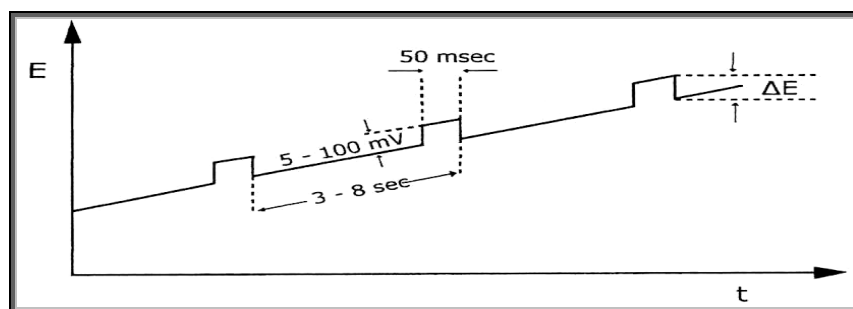


Σχήμα 5. 3. Αρχή των παλμικών τεχνικών

5.3.1 Διαφορική παλμική βολταμμετρία

Στη συγκεκριμένη τεχνική οι παλμοί είναι σταθερού πλάτους και υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό (σχήμα 5.4). Οι παλμοί εφαρμόζονται τη χρονική στιγμή αμέσως πριν το τέλος του χρόνου ζωής της σταγόνας του σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου [174]. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: ακριβώς

πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού. Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρείται αυτόματα από το μέγεθος του δεύτερου και αυτή η διαφορά του ρεύματος παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.



Σχήμα 5. 4. Συμπεριφορά δυναμικού-χρόνου στην διαφορική παλμική βολταμετρία

Η τιμή του ρεύματος κορυφής για μια αντιστρεπτή, ελεγχόμενη από διάχυση ηλεκτροδιακή δράση δίνεται από την εξίσωση 5.4:

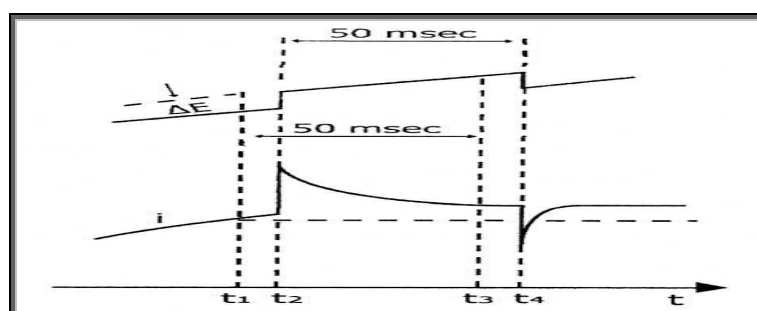
$$i_p = nFAC(D/t_p)^{1/2}(\sigma-1)/(\sigma+1) \quad (5.4)$$

όπου t_p = το εύρος του παλμού, $\sigma = \exp(nF\Delta E/2RT)$ και ΔE = το πλάτος του παλμού

Το ρεύμα της κορυφής είναι ευθέως ανάλογο με τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης, ενώ το δυναμικό στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση, καθώς συνδέεται με το δυναμικό μισού κύματος με τη σχέση 5.5:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (5.5)$$

Τυπικά, η διαφορική παλμική τεχνική είναι πιο ευαίσθητη από την κανονική παλμική κατά μία τάξη μεγέθους και το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι 10^{-7} - 10^{-8} mol L^{-1} , ενώ στην κανονική παλμική είναι 10^{-6} - 10^{-7} mol L^{-1} και στην κλασσική συνεχούς ρεύματος περίπου 10^{-4} - 10^{-5} mol L^{-1} .



Σχήμα 5. 5. Η απόκριση ρεύματος-χρόνου στη διαφορική παλμική βολταμετρία t_1 , t_3 : χρόνοι μέτρησης του ρεύματος, t_2 : χρόνος εφαρμογής του παλμού και t_4 : χρόνος παύσης του παλμού

5.4 ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

Η αναδιαλυτική βολταμμετρία (stripping voltammetry) είναι μια ηλεκτροαναλυτική τεχνική κατά την οποία η ηλεκτροχημικά δραστική ουσία (analyte) σε ένα υγρό δείγμα αρχικά προσυγκεντρώνεται σε ένα ηλεκτρόδιο με ηλεκτροανάλυση. Στη συνέχεια η ουσία αυτή επαναδιαλύεται ηλεκτροχημικά (stripped) από το ηλεκτρόδιο και το ρεύμα που παράγεται χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ηλεκτροχημικά δραστικής ουσίας στο δείγμα. Το στάδιο της προσυγκέντρωσης καθιστά την επαναδιαλυτική βολταμμετρία μια από τις αναλυτικές τεχνικές με εξαιρετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD). Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε λόγω της ανάγκης ηλεκτροχημικού προσδιορισμού με περιβαλλοντικό, κλινικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον σε ιχνοποσότητες [170].

Χρησιμοποιείται εκτεταμένα για αναλύσεις ιχνοσυστατικών, όπου έχουν επιτευχθεί όρια ανίχνευσης έως και 10^{-9} mol L⁻¹ καθώς και για την ανάλυση χημικών μορφών στοιχείων (speciation). Μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα πολλά στοιχεία, αφού τα κύματα αναδιαλύσεως εμφανίζονται σε χαρακτηριστικά δυναμικά, σε μεγαλύτερη ταχύτητα και με μικρότερο κόστος σε σχέση με άλλες τεχνικές [175].

5.4.1 Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία (AdSV)

Η προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία αναπτύχθηκε λόγω της δυνατότητας εκμετάλλευσης της αυθόρμητης τάσης των αντιδρώντων να προσροφώνται, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των βολταμμετρικών προσδιορισμών. Αρχικά το φαινόμενο της προσρόφησης θεωρούνταν ανεπιθύμητο ενώ στην συνέχεια η αύξηση του ρεύματος λόγω προσρόφησης προσέφερε πολλά αναλυτικά πλεονεκτήματα κατά την διάρκεια πολωρογραφικών μελετών πολλών οργανικών και ανόργανων μορίων ή ιόντων.

Η διαφορά της συγκεκριμένης μεθόδου από την ανοδική και την καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία έγκειται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης. Το σύμπλοκο μετάλλου-(κυρίως ιόντα μεταβατικών στοιχείων)-συμπλεκτικού (ligand) προσυγκεντρώνεται στη διαφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου-διαλύματος [176]. Η παρουσία ηλεκτροενεργών συστατικών στην επιφάνεια του σταγονικού ηλεκτροδίου είναι υπεύθυνη για την αύξηση της ευαισθησίας κατά 5 έως 10 φορές. Η χρήση όμως του συγκεκριμένου ηλεκτροδίου, δεν επιτρέπει την πλήρη εκμετάλλευση της ευαισθησίας με τη διαφασική συσσώρευση, γι' αυτόν το λόγο προτιμήθηκαν στατικά

ηλεκτρόδια. Έτσι η προσυγκέντρωση βασίζεται αποκλειστικά στη διφασική συσσώρευση και δεν επηρεάζεται από καμιά φαρανταϊκή δράση. Η προσροφητική βολταμμετρία εκτός από την αυξανόμενη σπουδαιότητα της σαν αναλυτική τεχνική, χρησιμεύει και για τη διευκρίνιση των διφασικών και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των τασενεργών ουσιών.

Ο ηλεκτροχημικός όρος προσρόφηση σημαίνει συγκράτηση/προσκόληση των μορίων ή των ιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι ιδιότητες της διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου και διαλύματος διαφέρουν απ' αυτές του διαλύματος ή του ηλεκτροδίου ξεχωριστά. Η τάση της διεπιφάνειας να έλκει και να συγκρατεί τα αντιδρώντα είναι μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητές της.

Η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας είναι μια διαδικασία αντικατάστασης, κατά την οποία τα μόρια του διαλύτη αντικαθίστανται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από τα μόρια ή ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Η τελευταία δεν αντικαθιστά πάντα εξ'ολοκλήρου τα μόρια του διαλύτη αφού το μέγεθος της προσρόφησης εξαρτάται από το μοριακό βάρος καθώς και από τη διαλυτότητα του αντιδρώντος σε δεδομένο διαλύτη, αφού μικρότερη διαλυτότητα οδηγεί σε ισχυρότερη προσρόφηση. Προσρόφηση επίσης προκαλείται και από άλλου είδους δυνάμεις, όπως ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ ιόντος και φορτισμένου ηλεκτροδίου, δυνάμεις διπόλου-πεδίου, δράση μεταξύ της ηλεκτροδιακής διπλοστιβάδας και των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών αντιδρώντων, καθώς και χημειορρόφηση συγκεκριμένων ομάδων στις επιφάνειες των μεταλλικών ηλεκτροδίων.

Το ρεύμα είναι ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης της προσροφημένης ουσίας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αυτή με τη σειρά της ανάλογη της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας. Η κατανόηση αυτής της σχέσης είναι δυνατή από την ισόθερμη προσρόφησης. Οι ισόθερμες είναι σχέσεις ισορροπίας μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στην επιφάνεια που έχει προσροφηθεί και της συγκεντρώσεώς της στο διάλυμα. Η πιο γνωστή είναι η ισόθερμη του Langmuir (σχέση 5.6):

$$\Gamma = \Gamma_m[BC/(1+BC)] \quad (5.6)$$

όπου Γ είναι η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας, Γ_m η επιφανειακή συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα, C η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, B ο συντελεστής προσροφήσεως (ο οποίος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της προσροφημένης ουσίας και της επιφάνειας, που με τον τρόπο αυτό σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια προσρόφησης).

Η ισόθερμη του Langmuir μπορεί να γραφεί και ως εξής (σχέση 5.7):

$$BC = \theta / (1 - \theta) \quad (5.7)$$

Όπου $\theta = \Gamma / \Gamma_m$ είναι η κλασσική επιφανειακή κάλυψη.

Όταν $1 \gg BC$ η εξίσωση παίρνει τη μορφή 5.8: $\Gamma = \Gamma_m BC$ (5.8)

Για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας στην επιφάνεια, η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα. Η ισόθερμη του Langmuir ανταποκρίνεται σε φυσικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η μέγιστη κάλυψη επιφάνειας αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα, εκτίμηση η οποία σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εφαρμόσιμη. Σε τέτοιες περιπτώσεις εφαρμόζεται η ισόθερμη του Frumkin (σχέση 5.9):

$$BC = [\theta / (\theta - 1)] \exp(-2g\theta) \quad (5.9)$$

όπου g είναι η παράμετρος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων των προσροφημένων ουσιών (και είναι θετική όταν η αλληλεπίδραση οφείλεται σε έλξη και αρνητική όταν οφείλεται σε άπωση) όταν το g είναι ίσο με μηδέν τότε έχουμε την ισόθερμη του Langmuir.

Κατά την προσρόφηση των ουσιών στη διφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου εργασίας/διαλύματος, ο σχηματισμός της προσροφημένης στιβάδας ελέγχεται από την ταχύτητα διάχυσης των ουσιών από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου καθώς και από την ταχύτητα της προσρόφησης τους από την επιφάνεια του διαλύματος, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η δεύτερη διαδικασία είναι σχετικά γρήγορη κι έτσι η όλη διαδικασία ελέγχεται από τη διάχυση των ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Ο Kano και οι συνεργάτες του [176] έδωσαν μια εξίσωση για το ρεύμα i_p κορυφής της αναγωγής της αδριαμυσίνης (adriamycin) στο ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου (HMDE), υποθέτοντας ότι ισχύει προσρόφηση η οποία ελέγχεται από τη διάχυση και το ρεύμα κορυφής είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ένωσης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, Γ (σχέση 5.10):

$$i_p = kA\Gamma = kAC [(D/r)t_{acc} + 2(D/\pi)^{1/2} t_{acc}^{1/2}] \quad (5.10)$$

όπου k η σταθερά αναλογίας, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, C η συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα, r η ακτίνα της σταγόνας του υδραργύρου και t_{acc} ο χρόνος προσρόφησης.

Για μεγάλες τιμές C και/ή t_{acc} , η τιμή του i_p πλησιάζει την οριακή τιμή i_p^{max} για την οποία συμπεραίνεται ότι ισχύει (σχέση 5.11):

$$i_p^{\max} = kA\Gamma_m \quad (5.11)$$

όπου Γ_m είναι η συγκέντρωση σε πλήρη κάλυψη στην κατάσταση κορεσμού της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

$$\text{Ο Koryta έδειξε ότι } \Gamma_m = 7.36 \cdot 10^{-4} \text{CD}^{1/2} t_m^{1/2} \quad (5.12)$$

όπου t_m ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για την πλήρη κάλυψη επιφάνειας σε mol cm^{-2} και C η συγκέντρωση του διαλύματος σε mol cm^{-3} .

Έχει βρεθεί πειραματικά ότι το ρεύμα κορυφής αυξάνει γραμμικά με την τετραγωνική ρίζα του t_{acc} . Συμπερασματικά η τεχνική της προσροφητικής βολταμμετρίας πρέπει να εφαρμόζεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπου το ρεύμα κορυφής αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του μελετούμενου μορίου. Όταν αυτή η εξάρτηση παρεκκλίνει από τη γραμμικότητα (ιδιαίτερα όταν το i_p πλησιάζει την οριακή τιμή), οι πειραματικές συνθήκες πρέπει να τροποποιηθούν με τους ακόλουθους τρόπους: αραίωση του διαλύματος και ελάττωση του χρόνου προσρόφησης ή διακοπή της ανάδευσης κατά τη διάρκεια της απόθεσης.

Οι εφαρμογές της προσροφητικής βολταμμετρίας στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων [177], βαρέων μετάλλων και ανιόντων την καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική. Τα πλεονεκτήματά της είναι η υψηλή ευαισθησία, η οποία επιτυγχάνεται με το στάδιο της προσυγκέντρωσης, ο μικρός σχετικά απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης αφού δεν κρίνεται απαραίτητη κάποια προηγούμενη διαδικασία απομόνωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού (π.χ. με εκχύλιση), καθώς και η δυνατότητα αυτοματοποίησής της.

5.4.2 Προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdTSV)

Η βολταμμετρία αλλαγής μέσου χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη αποφυγή παρεμποδίσεων του διαλύματος. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παρακολούθηση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μόνο πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στην περίπτωση ανάπτυξης των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι απαραίτητη η αλλαγή μέσου καθώς επιβάλλεται η διαμόρφωση βιομορίων πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια χωρίς την ύπαρξη συστατικών που παρεμποδίζουν.

Έχει αποδειχθεί ότι με την προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου μπορεί να γίνει ανίχνευση βλάβης του DNA η οποία προκαλείται από ενζυματική λύση, ιονική ακτινοβολία ή από αλληλεπίδραση με χημικές ουσίες. Το DNA αλληλεπιδρά με την ουσία που προκαλεί τη βλάβη τόσο όταν βρίσκεται σε διάλυμα, όσο και όταν

ακινητοποιείται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στην περίπτωση αυτή όπου το DNA ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αναπτύσσεται βιοαισθητήρας (ο οποίος μπορεί να ενσωματωθεί και σε σύστημα συνεχούς ροής) που είναι ικανός να ανιχνεύσει βλάβη στο DNA δίνοντας το κατάλληλο σήμα. Η σχάση στο DNA που προκαλεί το ένζυμο DNάση (και κατ'επέκταση οποιαδήποτε άλλη ουσία χρησιμοποιηθεί) μπορεί να ανιχνευτεί και με ηλεκτροφόρηση με πηκτή αγαρόζης, που όμως είναι πολύ χρονοβόρα.

Σε μερικές περιπτώσεις οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν βλάβη στο DNA που δεν είναι ανιχνεύσιμη με την ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Για παράδειγμα, βλάβη στο DNA με απαμίνωση που προκαλεί το νιτρώδες νάτριο σε pH 4,5 δε γίνεται αντιληπτή με πηκτή αγαρόζης επειδή δεν προκαλείται καμιά αλλαγή στην κινητικότητα του DNA πάνω στην πηκτή. Η απαμίνωση όμως γίνεται αντιληπτή με προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου [178].

ΚΕΦ.6 ΒΟΤΑΝΑ

6.1 ΤΣΑΙ

Όλα τα είδη του τσαγιού προέρχονται από ένα μόνο φυτό, το *Camelia sinensis*, αλλά οι ποικιλίες του ξεπερνούν τις 3000. Οι τρεις βασικές κατηγορίες είναι το oolong, το πράσινο και το μαύρο τσάι. Όλα τα παραπάνω είδη περιέχουν καφεΐνη σε ποσοστό 1-5% και σε ποσοστό 4-16,5% άλλα συστατικά όπως φλαβονοειδή, αμινοξέα, στερόλες, βιταμίνη C και φαινολικά οξέα [179, 180]. Σε μικρές ποσότητες ανιχνεύονται επίσης διάφορα αλκαλοειδή. Η διαφορά τους έγκειται στο διαφορετικό βαθμό κατεργασίας που επηρεάζει και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα, το πράσινο τσάι (σχήμα 6.1) δεν υφίσταται καμία επεξεργασία μετά τη συγκομιδή του εκτός της αποξήρανσης. Περιέχει πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τις άλλες δυο κατηγορίες. Αντίθετα το μαύρο τσάι (σχήμα 6.2) οξειδώνεται πλήρως και η πιο έντονη γεύση του οφείλεται σε συστατικά που έχουν σχηματιστεί κατά την επεξεργασία όπως θειοφλαβίνες, EGCG, τερπενοειδή και άλλα σε σύνολο πάνω από 300.



Σχήμα 6. 1. Πράσινο τσάι

Σχήμα 6. 2. Μαύρο τσάι

6.2 ΔΙΚΤΑΜΟ

Το δίκταμο (σχήμα 6.3) είναι χαμηλός ημιξυλώδης θάμνος και ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae ενώ η επιστημονική του ονομασία είναι *origanum dictamnus*. Οι βλαστοί του φτάνουν σε μέχρι και 40 εκατοστά ύψος. Τα φύλλα του είναι λευκοπράσινα, ενώ τα άνθη του ρόδινα. Συναντάται και με τις ονομασίες δίταμο, αρτεμίδιον, έρωντας, στομαχόχορτο ή μαλλιαρόχορτο. Βότανο με πολλαπλές ευεργετικές ιδιότητες που κατά την μινωική εποχή ήταν εμπορικό προϊόν της Κρήτης.

Θεωρείται ότι έχει αντιφλεγμονώδεις, αντισηπτικές και σπασμολυτικές ιδιότητες [179, 180].



Σχήμα 6. 3. Δίκταμο

6.3 ΤΣΑΙ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ

Βότανο ιδιαίτερο αγαπητό από τους Έλληνες γνωστό και με τις ονομασίες μαλοτήρας, σιδερίτης και καλοκοιμηθιά. Η επιστημονική του ονομασία είναι *sideritis syriaca* και ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Στη Βενετοκρατούμενη Κρήτη το θεωρούσαν φάρμακο ενάντια σε κρυολογήματα και παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος. Είναι πολυετής πόα, ύψους 50 εκατοστών με απλό όρθιο βλαστό που καλύπτεται από πυκνό άσπρο χνούδι (σχήμα 6.4). Θεωρείται καταπραϊντικό για το πεπτικό και το αναπνευστικό σύστημα. Έχει αποχρεπτικές, εφιδρωτικές και σπασμολυτικές ιδιότητες ενώ χρησιμοποιείται κατά της διάρροιας και της δυσπεψίας [179]. Περιέχει φλαβονοειδή αλλά καθόλου καφεΐνη όπως το κλασσικό τσάι και δεν θα πρέπει να συγχέονται [180].



Σχήμα 6. 4. Τσάι του βουνού

6.4 ΛΟΥΙΖΑ

Η επιστημονική ονομασία του βοτάνου είναι *Aloysia triphylla* (*Lippia citriodora*) – Αλοϋσία η τρίφυλλος (Λιππία η κίτροσμος) [181]. Την συναντούμε και με το όνομα λεμονόχορτο, λόγω της χαρακτηριστικής μυρωδιάς της. Είναι φυτό φυλλοβόλο και πολυετές. Φτάνει σε ύψος το 1-1,5 μέτρο (σχήμα 6.5). Τα φύλλα συνθλιβόμενα αναδίδουν έντονο άρωμα λεμονιού. Η λουίζα κατάγεται από την Χιλή. Στη χώρα μας υπάρχει και μία ποικιλία η Κομβανθής που φύεται σε παραθαλάσσιες περιοχές και ελώδεις εκτάσεις της Αττικής, Πελοποννήσου, Σύρου και Κρήτης. Περιέχει πολυφαινόλες, αιθέρια έλαια και ταννίνες [180]. Έχει ήπια ηρεμιστική, καταπραϋντική, αντιπυρετική και σπασμολυτική δράση, ιδιαίτερα για το πεπτικό σύστημα. Τη χρησιμοποιούμε σε εμπύρετα κρυολογήματα και δυσπεψία. Βοηθά επίσης σε διάρροιες και αιμορραγίες. Στην αρωματοθεραπεία χρησιμοποιείται για νευρικά και πεπτικά προβλήματα, για την ακμή, καλόγερους και κίστες. Συνίσταται σε περιπτώσεις νεφρολιθιάσεων λόγω της διουρητικής της δράσης [181].



Σχήμα 6. 5. Λουίζα

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το ενδιαφέρον τόσο της ανθρωπότητας όσο και της επιστημονικής κοινότητας έχουν κερδίσει τα τελευταία χρόνια τα αντιοξειδωτικά. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια κατηγορία των φαινολικών αντιοξειδωτικών που βρίσκονται σε αρκετά φρούτα και λαχανικά. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν αναφέρεται συγκριτική μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των τριών φαινολικών οξέων γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και trolox με χρήση dsDNA βιοαισθητήρα καθώς και πλήρη μελέτη τους με χρήση βολταμμετρικών τεχνικών όπως κυκλική και διαφορική βολταμμετρία.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν στο πρώτο μέρος η μελέτη της ηλεκτροχημικής και αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς τριών αντιπροσωπευτικών φαινολικών οξέων, γαλλικό, καφεϊκό οξύ και trolox. Μελετήθηκε το ηλεκτροχημικό προφίλ των τριών φαινολικών οξέων με χρήση κυκλικής βολταμμετρίας ενώ προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό τους με διαφορική παλμική βολταμμετρία, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, κατά την ανοδική και καθοδική σάρωση του δυναμικού και υπολογίστηκαν η επαναληψιμότητα και η γραμμικότητα της μεθόδου. Στο δεύτερο μέρος οι στόχοι περιελάμβαναν την ανάπτυξη dsDNA βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεθανολικών διαλυμάτων των προαναφερθέντων αντιοξειδωτικών και τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων της αντίδρασης Fenton για τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA, όπως η βέλτιστη αναλογία ιόντων Fe^{2+} και EDTA για τη δημιουργία συμπλόκου, η βέλτιστη συγκέντρωση του συμπλόκου, η βέλτιστη αναλογία συμπλόκου $Fe(EDTA)]^{2-}/H_2O_2$, ο βέλτιστος χρόνος εμφάνισης του ηλεκτροδίου στο σύστημα Fenton και ο βέλτιστος χρόνος αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα ή τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων.

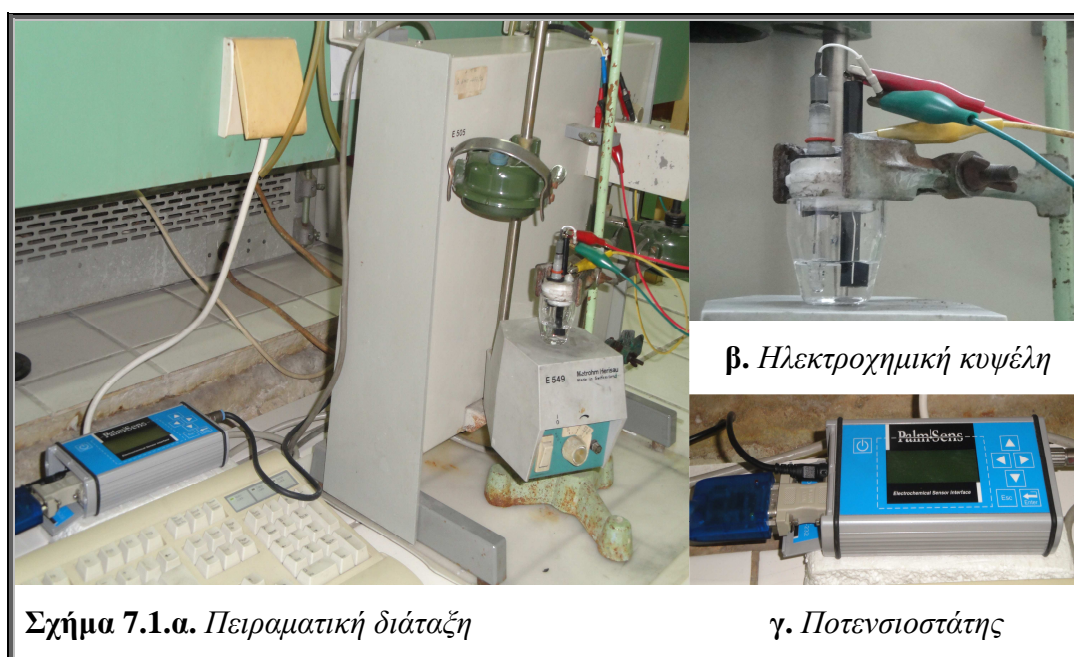
Ο τελικός στόχος υλοποιήθηκε με την εφαρμογή των βελτιστοποιημένων dsDNA βιοαισθητήρων στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδατικών εκχυλισμάτων των βοτάνων, μαύρο και πράσινο τσάι, δίκταμο, λουίζα και τσάι του βουνού.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ.7 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

7.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- ▶ Οι βολταμμετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ποτενσιοστάτη / γαλβανιοστάτη PalmSens και με το αντίστοιχο λογισμικό για ηλεκτρονικό υπολογιστή (IVIUM Technologies, The Netherlands, www.ivium.nl).
- ▶ Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (carbon paste, CPE) εσωτερικής διαμέτρου 3mm (Metrohm, Switzerland), ως ηλεκτρόδιο εργασίας.
- ▶ Ηλεκτρόδιο Ag/AgCl με κορεσμένο διάλυμα KCl 3 mol L⁻¹ (Metrohm, Switzerland), ως ηλεκτρόδιο αναφοράς.
- ▶ Ηλεκτρόδιο από σύρμα λευκοχρύσου (Metrohm, Switzerland), ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο.
- ▶ Μαγνητικός αναδευτήρας (Metrohm, Switzerland).
- ▶ Πεχάμετρο Consort C830 (Belgium, www.consort.be).
- ▶ Vortex (Velp Scientifica, Italy, www.velp.com)



7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ▶ Mineral oil (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, www.sigma-aldrich.com) και σκόνη γραφίτη (Fluka, Buchs, Germany) για την παρασκευή της πάστας

άνθρακα.

- ▶ Δίκλωνο DNA (dsDNA) από θύμο αδένος βοοειδούς (calf thymus DNA, Catalog No.D-1501, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- ▶ Τα φαινολικά οξέα καφεϊκό οξύ (caffeic acid $\geq 98\%$), γαλλικό οξύ (gallic acid, $\geq 98\%$) και trolox $\geq 97\%$ αγοράστηκαν από την εταιρία Aldrich (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, www.sigma-aldrich.com).
- ▶ Επταένυδρος θειικός σίδηρος ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \geq 99\%$) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, www.sigma-aldrich.com).
- ▶ Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 , 30wt% in H_2O , αναλυτικής καθαρότητας) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, www.sigma-aldrich.com).
- ▶ Αιθυλενο-διαμυνο-τετραοξικό οξύ (EDTA, 99,4-100,06%, powder) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, www.sigma-aldrich.com).
- ▶ Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων των φαινολικών οξέων ήταν μεθανόλη (MeOH , αναλυτικής καθαρότητας) της εταιρίας ChemLab.
- ▶ Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων ήταν διπλά απιονισμένο από κατάλληλη διάταξη στο χώρο του εργαστηρίου.
- ▶ Για την παρασκευή διάφορων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας:
 - ✓ Χλωριούχο νάτριο (NaCl , Merck, Darmstadt, Germany)
 - ✓ Καυστικό νάτριο (NaOH , ChemLab)
 - ✓ Υδροχλωρικό οξύ (HCl , Sigma-Aldrich, Seize, Germany)
 - ✓ Νιτρικό οξύ (HNO_3 , Sigma-Aldrich, Seize, Germany)
 - ✓ Οξικό οξύ (CH_3COOH , ChemLab)
 - ✓ Τρι-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο (Tris, Merck, Darmstadt, Germany)
 - ✓ Χλωριούχο κάλιο (KCl , Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- ▶ Ρυθμιστικά διαλύματα με pH (25°C) = 4,01, 7,01, 10,01 για ρύθμιση του πεχαμέτρου.
- ▶ Τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν (Πράσινο και μαύρο τσάι, δίκταμο, λουΐζα και τσάι του βουνού), αγοράστηκαν από την τοπική αγορά σε αποξηραμένη μορφή.

ΚΕΦ. 8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

8.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Η πάστα άνθρακα παρασκευαζόταν καθημερινά πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, αρχικά με ανάμιξη σκόνης γραφίτη και mineral oil σε αναλογία 75:25 w/v και έπειτα ομογενοποίηση του μίγματος δια χειρός μέσα σε κάψα. Στη συνέχεια η πάστα άνθρακα πακτωνόταν μέσα στο ηλεκτρόδιο εργασίας που ήταν κατασκευασμένο από Teflon, με ειδική επιμέλεια καθώς τυχόν κενά επηρεάζουν τόσο την ακρίβεια, όσο και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Εν τέλει η επιθυμητή ηλεκτροδιακή επιφάνεια προέκυπτε έπειτα από επιμελή λείανση της πάνω σε ειδικό χαρτί.

8.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Ο φέρον ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων της ηλεκτροχημικής μελέτης (κυκλική και διαφορική βολταμετρία) ήταν ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,8$, ενώ κατά την ανάπτυξη του dsDNA βιοαισθητήρα και τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βοτάνων ως φέρον ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ με προσθήκη NaCl τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,6$.

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης dsDNA (1 g L^{-1}), ήταν διάλυμα tris-HCl $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ με προσθήκη EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Το pH του διαλύματος προσέγγιζε την τιμή 7,5 και ρυθμιζόταν με διαδοχικές προσθήκες HCl . Όλα τα παραπάνω διαλύματα, εκτός αυτό του dsDNA που ήταν απαραίτητη η διατήρηση του σε θερμοκρασίες κατάψυξης από $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ έως $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες από $+2 \text{ }^\circ\text{C}$ έως $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ για μια εβδομάδα.

8.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Σε όλα τα διαλύματα των φαινολικών οξέων που μελετήθηκαν (γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και trolox), χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας. Τα stock διαλύματα και των τριών φαινολικών οξέων συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ φυλάσσονταν στη συντήρηση σε θερμοκρασίες από $+2 \text{ }^\circ\text{C}$ έως $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ και προστατεύονταν από το φως.

8.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ

Τα υδατικά εκχυλίσματα αντιπροσωπευτικών βοτάνων της ελληνικής αγοράς προέκυψαν έπειτα από εκχύλιση στερεού-υγρού αποξηραμένων φύλλων ή και τμημάτων των βοτάνων με δις απιονισμένο ύδωρ 100 °C για 15 min. Στη συνέχεια τα υδατικά εκχυλίσματα παρέμεναν εκτός ψυγείου ώστε η θερμοκρασία τους να προσεγγίσει τους 25° C. Όλα τα υδατικά εκχυλίσματα που προέκυψαν αποθηκεύτηκαν ως διαλύματα παρακαταθήκης, προστατεύονταν καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων από το φως και ήταν περιεκτικότητας 25%w/v. Πρέπει να τονιστεί ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος οργανικός διαλύτης όπως μεθανόλη, εξαιτίας της τοξικής επίδρασης των οργανικών διαλυτών στο dsDNA.

ΚΕΦ. 9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9.1 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Τόσο κατά την χρήση κυκλικής όσο και διαφορικής παλμικής βολταμετρίας, για την ηλεκτροχημική μελέτη των φαινολικών οξέων, ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Αρχικά λάμβανε χώρα σάρωση του διαλύματος του φέροντα ηλεκτρολύτη από 0 έως +1,5 V, για τον έλεγχο τυχόν παρεμποδίσεων στο ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ στη συνέχεια λάμβανε χώρα η μέτρηση δηλαδή η σάρωση του διαλύματος φέροντα ηλεκτρολύτη με προσθήκη συγκεκριμένου όγκου διαλύματος φαινολικών οξέων από 0 έως +1,5 V. Στις περιπτώσεις όπου μελετήθηκαν οι συνθήκες προσυγκέντρωσης, το στάδιο της προσυγκέντρωσης προηγούνταν αυτό της μέτρησης, με ταυτόχρονη εφαρμογή ανάδευσης.

9.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

9.2.1. Προκατεργασία ηλεκτροδιακής επιφάνειας

Αρχικά εφαρμόζεται δυναμικό +1,7 V για 1 min χωρίς ανάδευση στο ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ με NaCl τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,6$. Στο συγκεκριμένο στάδιο επιτυγχάνεται η παραγωγή θετικά φορτισμένης ηλεκτροδιακής επιφάνειας, ώστε να δεχθεί στη συνέχεια το μεγαλομόριο του dsDNA και να απομακρυνθούν τα οργανικά στρώματα. Έπειτα το παρόν διάλυμα σαρώνεται από 0 έως +1,5 V για έλεγχο παρεμποδίσεων.

9.2.2 Ακίνητοποίηση του dsDNA στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια

Στο στάδιο αυτό το dsDNA συγκέντρωσης μάζας 140 mg L^{-1} ακινητοποιείται στην ενεργοποιημένη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με εφαρμογή σταθερού δυναμικού στα +0,5 V για σταθερό χρονικό διάστημα 5 λεπτών υπό ανάδευση σε κυψελίδα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ με NaCl τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,6$.

Για τη διασφάλιση πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας κατά την ακινητοποίηση του βιομορίου, πραγματοποιήθηκε μελέτη ακινητοποίησης διαφορετικών συγκεντρώσεων μάζας dsDNA.

9.2.3 Χημική οξείδωση του dsDNA μέσω συστήματος Fenton

Στο συγκεκριμένο στάδιο λαμβάνει χώρα χημική οξείδωση του dsDNA μέσω συστήματος Fenton, συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ και H_2O_2 σε μοριακή αναλογία 1/800. Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας με dsDNA παραμένει εμβαπτισμένο στο παραπάνω οξειδωτικό σύστημα για 300 s χωρίς ανάδευση ή εφαρμογή δυναμικού. Ο συγκεκριμένος χρόνος επιλέχθηκε έπειτα από διαδικασία βελτιστοποίησης που εξηγείται λεπτομερώς στα παρακάτω κεφάλαια. Οι ελεύθερες ρίζες $\text{OH}\cdot$ που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton προσβάλλουν και οξειδώνουν τις βάσεις του dsDNA μέσω διάχυσης, ενώ ως συνέπεια μειώνουν το ποσοστό των βάσεων που θα οξειδωθούν ηλεκτροχημικά στο τελικό στάδιο της μέτρησης. Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μελετήθηκαν η γουανίνη και η αδενίνη.

9.2.4 Αλληλεπίδραση του dsDNA με το σύστημα Fenton μετά την προσθήκη των φαινολικών οξέων

Στο συγκεκριμένο στάδιο λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση του συστήματος Fenton, της ίδιας αναλογίας όπως και στο προηγούμενο στάδιο, με τα φαινολικά οξέα έπειτα από προσθήκη για χρονικό διάστημα 600 s πριν την εμβάπτιση του τροποποιημένου ηλεκτρόδιου εργασίας με dsDNA. Ο χρόνος που παραμένει το ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο στο παραπάνω διάλυμα είναι 300 s. Τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα που αναφέρθησαν, προέκυψαν από διαδικασίες βελτιστοποίησης που αναφέρονται λεπτομερώς στα επόμενα κεφάλαια. Ουσιαστικά στο συγκεκριμένο στάδιο η προσθήκη των φαινολικών οξέων-αντιοξειδωτικών περιορίζει το ποσοστό της γουανίνης και αδενίνης που οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες και σαν αποτέλεσμα προστατεύεται το μόριο του dsDNA από τη χημική οξείδωση. Πρέπει να τονιστεί ότι κατά την προσθήκη των φαινολικών οξέων το προηγούμενο στάδιο της χημικής οξείδωσης του dsDNA παρουσία **μόνο** συστήματος Fenton παρακάμπτεται. Όταν μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των βοτάνων, στο συγκεκριμένο στάδιο τα φαινολικά οξέα αντικατέστησαν τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων.

9.2.5 Μετάλλαξη σήματος-Μέτρηση

Η μετάλλαξη σήματος πραγματοποιείται μεταφέροντας το τροποποιημένο

ηλεκτρόδιο, αφού έχουν υλοποιηθεί τα προηγούμενα στάδια (9.2.3 ή 9.2.4) σε κυψελίδα με τον φέροντα ηλεκτρολύτη, εφαρμόζοντας προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου με σάρωση δυναμικού από +0,1 V έως +1,5 V και ταχύτητα σάρωσης $0,025 \text{ V s}^{-1}$. Ακόλουθα προκύπτει βολταμμογράφημα με μια ισχυρή κορυφή στα 1,024 V και άλλη μια ασθενέστερη στα 1,294 V, που οφείλονται στην οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης αντίστοιχα. Επιπλέον παρατηρείται μια επιπλέον κορυφή στα 0,264 V, η οποία πιθανότατα αποδίδεται στα ιόντα Fe^{2+} που προκύπτουν από την αντίδραση Fenton.

ΚΕΦ. 10 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

10.1 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

Η μελέτη των φαινολικών οξέων με κυκλική βολταμμετρία είναι το πρώτο αλλά πολύ σημαντικό στάδιο για την κατανόηση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς τους καθώς λαμβάνονται πληροφορίες τόσο για την ηλεκτροδραστικότητα των ενώσεων, όσο και για το προϊόν ή τα προϊόντα της ηλεκτροδιακής δράσης. Το κυκλικό βολταμμογράφημα επιπλέον λαμβάνεται σε μικρό χρονικό διάστημα και αποτελεί το ηλεκτροχημικό φάσμα των ενώσεων. Συμπληρωματικά μελετάται η αντιστρεπτότητα ή μη των δράσεων που λαμβάνουν χώρα καθώς και η φύση των ρευμάτων στις αντίστοιχες κορυφές. Ακολουθούν τα κριτήρια για το χαρακτηρισμό μιας δράσης ως αντιστρεπτή, ημιαντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή (πίνακας 10.1).

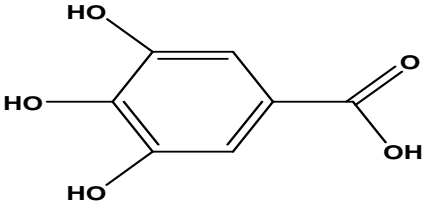
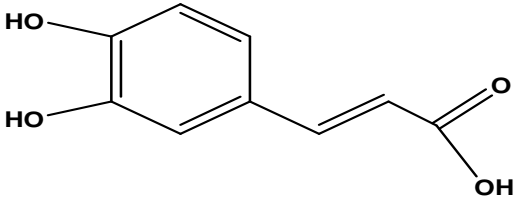
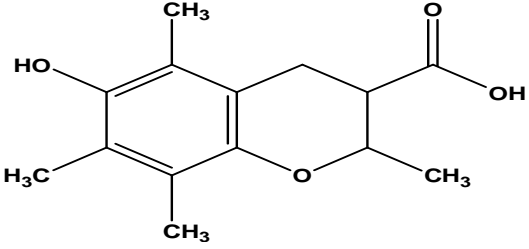
Πίνακας 10. 1. Κριτήρια χαρακτηρισμού δράσεων

Αντιστρεπτές δράσεις	Ημιαντιστρεπτές δράσεις	Μη αντιστρεπτές δράσεις
Το i_p είναι ανάλογο του $u^{1/2}$	Το i_p αυξάνεται με το $u^{1/2}$ όχι όμως γραμμικά	i_p ανάλογο του $u^{1/2}$
Το E_p ανεξάρτητο του u	$i_p^A/i_p^C = 1$ και $a_C = a_A = 0,5$	Το E_p^C μετατοπίζεται κατά $-30/a_c n_a$ mV για κάθε δεκαπλάσια αύξηση του u
$i_p^A/i_p^C = 1$		
$\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 56,5/n$ mV	$\Delta E_p > 56,5/n$ mV και αυξάνει με αύξηση του u	$ E_p - E_{p/2} = 48/a_c n_a$ mV
$ E_p - E_{p/2} = 56,5/n$ mV	Το E_p^C μετατοπίζεται προς αρνητικότερες τιμές με την αύξηση του u	

Γενικά σε αυτό το μέρος της πειραματικής διαδικασίας επελέγησαν μεγάλες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών της τάξης 10^{-4} mol L⁻¹, για να αποφευχθούν πιθανά λάθη εξαιτίας της περιορισμένης ευαισθησίας της συγκεκριμένης αναλυτικής τεχνικής. Ως φέρον ηλεκτρολύτης για την λήψη των κυκλικών βολταμμογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH-CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹. Οι υπόλοιπες συνθήκες μέτρησης όπως ταχύτητα σάρωσης, αριθμός κύκλων κ.τ.λ.

αναφέρονται ξεχωριστά στις επόμενες παραγράφους καθώς ήταν διαφορετικές για κάθε φαινολικό οξύ και προέκυψαν έπειτα από διαδικασία βελτιστοποίησης. Όλα τα αριθμητικά αποτελέσματα αναφέρονται σε αριθμό μετρήσεων $n=3$. Οι εμπειρικές, οι συστηματικές ονομασίες και οι συντακτικοί τύποι των φαινολικών οξέων που μελετήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 10.2).

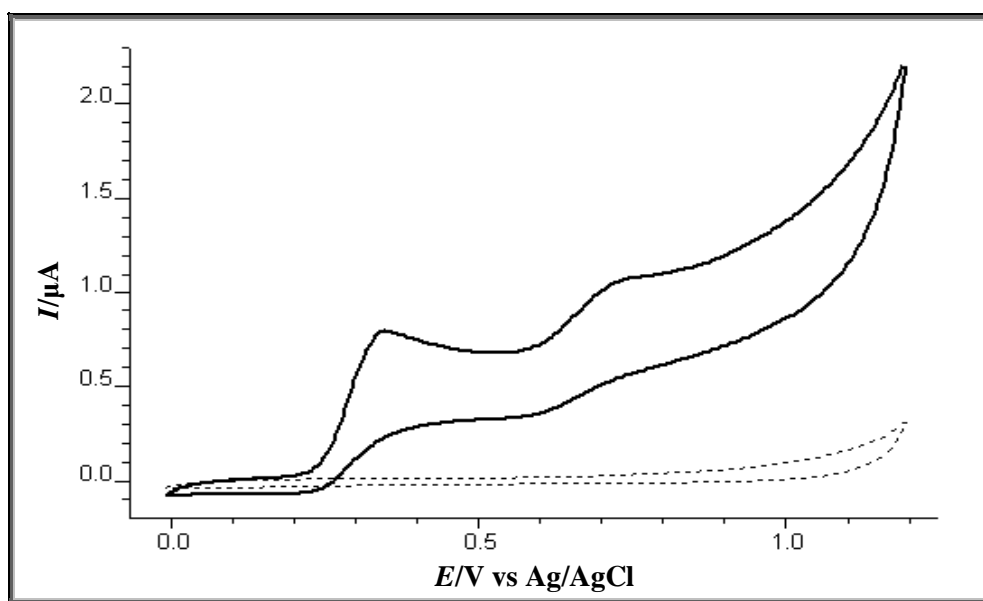
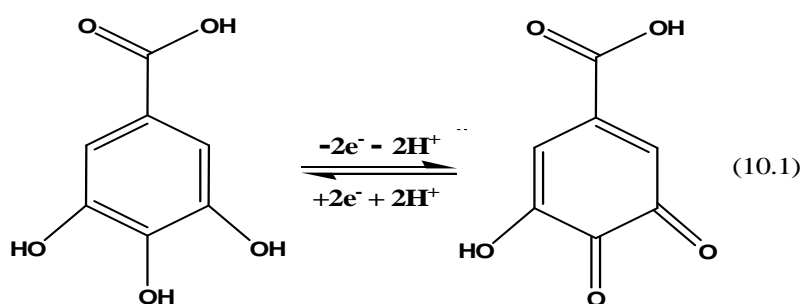
Πίνακας 10. 2. Ονομασίες και δομές των φαινολικών οξέων που μελετήθηκαν.

Γαλλικό οξύ Galic acid	3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	
Καφεϊκό οξύ Caffeic acid	3,4-Dihydroxy-cinnamic acid	
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid	

10.1.1 Γαλλικό οξύ

Για τη μελέτη του γαλλικού οξέος με κυκλική βολταμμετρία έπειτα από βελτιστοποίηση επελέγησαν οι παρακάτω συνθήκες: $E_{vtx1} = 0 \text{ V}$, $E_{vtx2} = 1,2 \text{ V}$, $E_{step} = 0,005 \text{ V}$, $N_{scans} = 5$. Με τις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και η διαδικασία χαρακτηρισμού των δράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την σάρωση των διαλυμάτων του γαλλικού οξέος τόσο ανοδικά όσο και καθοδικά. Για την ίδια διαδικασία εξετάστηκαν διάφορες ταχύτητες σάρωσης όπως 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 και $0,1 \text{ V s}^{-1}$ για συγκέντρωση ποσότητας $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό κυκλικό βολταμμογράφημα του γαλλικού οξέος για συγκέντρωση ποσότητας $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ και ταχύτητα σάρωσης $0,025 \text{ V s}^{-1}$ (σχήμα 10.1). Από το κυκλικό βολταμμογράφημα του σχήματος 10.1 παρατηρούμε δυο κορυφές οξειδωσης στα 0,324 και 0,689 V και δυο κορυφές αναγωγής στα 0,614 και

0,199 V αντίστοιχα. Η πρώτη κορυφή οξειδωσης στα 0,324 V και η δεύτερη κορυφή αναγωγής στα 0,199 V αποδίδονται στα δυο από τα τρία φαινολικά υδροξύλια, όπου λαμβάνει χώρα αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική δράση μεταφοράς δυο ηλεκτρονίων και πρωτονίων αντίστοιχα (αντίδραση 10.1). Η δεύτερη κορυφή οξειδωσης στα 0,689 V και η πρώτη κορυφή αναγωγής στα 0,614 V πιθανότατα αποδίδεται στην παρουσία του υδροξυλίου της καρβουλομάδας όπου λαμβάνει χώρα οξειδοαναγωγική δράση μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου και πρωτονίου αντίστοιχα και εμφανίζεται μόνο σε συγκεντρώσεις ποσότητας μεγαλύτερες της τιμής $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

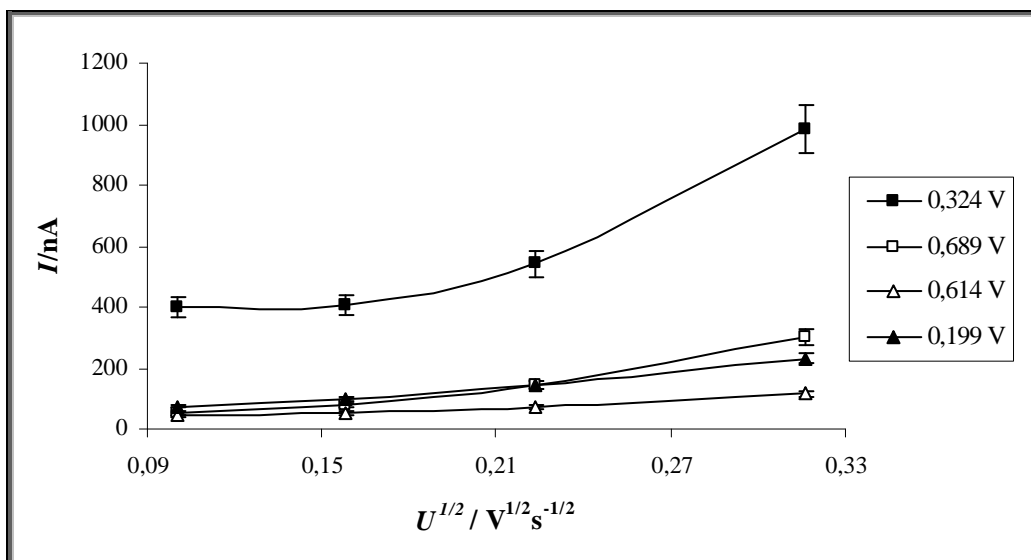


Σχήμα 10. 1. Κυκλικό βολταμογράφημα διαλύματος γαλλικού οξέος (- - - ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $c_{ga}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)

Τόσο η δράση στα 0,320 V, όσο και η δράση στα 0,690 V χαρακτηρίστηκαν ως ημιαντιστρεπτές σύμφωνα με τα κριτήρια ημιαντιστρεπτότητας που παρουσιάστηκαν στον πίνακα 10.1.

Αναλυτικότερα:

i) Το i_p αυξάνεται με το $u^{1/2}$ όχι όμως γραμμικά, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 10.2 που ακολουθεί.



Σχήμα 10. 2. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής διαλύματος γαλλικού οξέος των δράσεων στα 0,320 V και 0,690 V σε σχέση με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. (1^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

ii) Το πηλίκο i_p^A/i_p^C είναι περίπου ίσο με τη μονάδα και για τις δυο δράσεις στα 0,320 και 0,690 V αντίστοιχα (πίνακας 10.3).

Πίνακας 10. 3. Μεταβολή του λόγου i_p^A/i_p^C σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού. (2^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

	0,320 V	0,690 V
Ταχύτητα σάρωσης (V s ⁻¹)	i_p^A/i_p^C	i_p^A/i_p^C
0,01	1,3	1,1
0,025	1,3	1,2
0,05	1,3	1,2
0,1	1,4	1,2

iii) Το ΔE_p είναι μεγαλύτερο του 56,5/n mV και αυξάνει με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού και για τις δυο δράσεις (πίνακας 10.4).

Πίνακας 10. 4. Μεταβολή του ΔE_p σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού.
(3^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

	<i>0,320 V</i>	<i>0,690 V</i>
Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	ΔE_p	ΔE_p
0,01	115	75,0
0,025	120	102,5
0,05	122,5	109,5
0,1	124	118,0

iv) Η δράση στα 0,690 V πληρεί και αυτήν την προϋπόθεση για να χαρακτηριστεί με βεβαιότητα ημιαντιστρεπτή, δηλαδή το E_p^C όντως μετατοπίζεται προς αρνητικότερες τιμές με την αύξηση της ταχύτητας σάρωσης. Αντίθετα η δράση στα 0,320 V δεν πληρεί αυτήν την προϋπόθεση, αλλά τις υπόλοιπες τρεις και για αυτό το λόγο χαρακτηρίστηκε και αυτή ημιαντιστρεπτή (πίνακας 10.5).

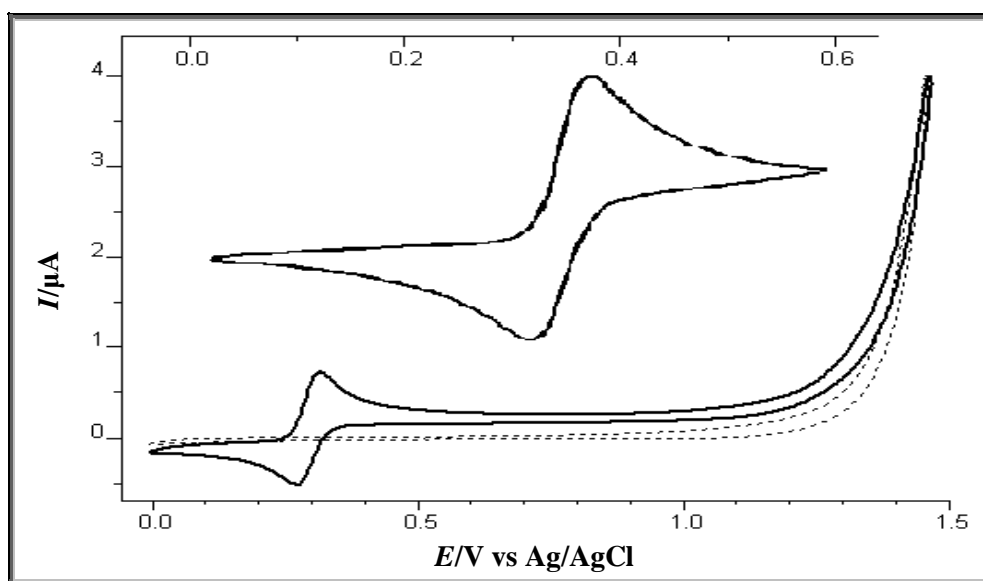
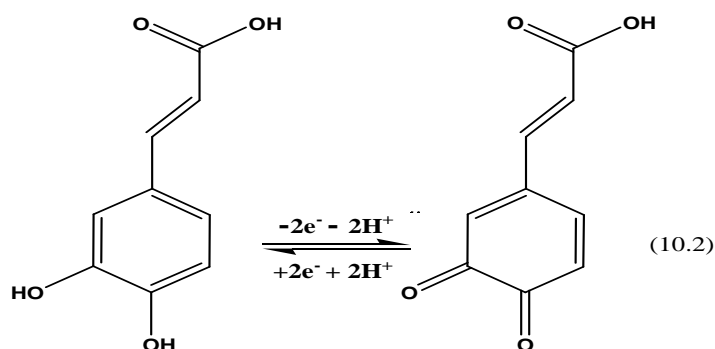
Πίνακας 10. 5. Μετατόπιση του E_p^C με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης.
(4^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

	<i>0,199 V</i>	<i>0,614 V</i>
Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p^C	E_p^C
0,01	199	614
0,025	211,5	604
0,05	214,5	602
0,1	215	595

10.1.2 Καφεϊκό οξύ

Για τη μελέτη του καφεϊκού οξέος με κυκλική βολταμμετρία έπειτα από βελτιστοποίηση επελέγησαν οι παρακάτω συνθήκες: $E_{vtx1} = -0,1 V$, $E_{vtx2} = 0,6 V$, $E_{step} = 0,005 V$, $N_{scans} = 5$. Με τις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και η διαδικασία χαρακτηρισμού των δράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την σάρωση των

διαλυμάτων του καφεϊκού οξέος τόσο ανοδικά όσο και καθοδικά. Για την ίδια διαδικασία εξετάστηκαν διάφορες ταχύτητες σάρωσης όπως 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 και 0,1 V s⁻¹ για συγκέντρωση ποσότητας 7,93*10⁻⁵ mol L⁻¹. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό κυκλικό βολταμμογράφημα του καφεϊκού οξέος για συγκέντρωση ποσότητας 7,93*10⁻⁵ mol L⁻¹ και ταχύτητα σάρωσης 0,050 V s⁻¹ (σχήμα 10.3). Από το κυκλικό βολταμμογράφημα του σχήματος 10.3 παρατηρούμε μια κορυφή οξείδωσης στα 0,324 V και μια κορυφή αναγωγής στα 0,259 V, οι οποίες αποδίδονται στα δυο φαινορικά υδροξύλια όπου πραγματοποιείται μεταφορά δυο ηλεκτρονίων και δυο πρωτονίων αντίστοιχα.

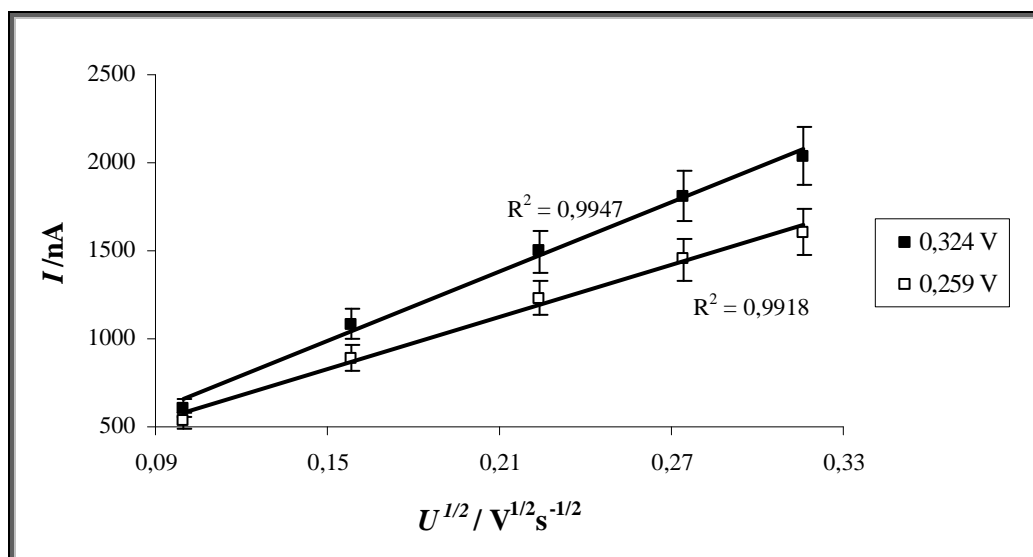


Σχήμα 10. 3 Κυκλικό βολταμμογράφημα διαλύματος καφεϊκού οξέος (--- ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH- CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος c_{ca}=7,93*10⁻⁵ mol L⁻¹).

Η δράση στα 0,324 V χαρακτηρίστηκε ως αντιστρεπτή σύμφωνα με τα κριτήρια αντιστρεπτότητας που παρουσιάστηκαν στον πίνακα 10.1.

Αναλυτικότερα:

i) Το i_p είναι ανάλογο του u^{1/2}, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 10.4 που ακολουθεί.



Σχήμα 10. 4. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής του καφεϊκού οξέος στα 0,324 V και 0,259 V σε σχέση με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. (1^ο κριτήριο αντιστρεπτότητας)

ii) Το E_p είναι ανεξάρτητο της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού (πίνακας 10.6).

Πίνακας 10. 6. Μεταβολή του σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (2^ο κριτήριο αντιστρεπτότητας).

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p^A	E_p^C
0,01	0,324	0,259
0,025	0,323	0,258
0,05	0,324	0,260
0,075	0,324	0,259
0,1	0,325	0,259

iii) Το πηλίκο i_p^A/i_p^C προσεγγίζει τη μονάδα με μικρή απόκλιση (πίνακας 10.7).

Πίνακας 10. 7. Μεταβολή του λόγου i_p^A/i_p^C σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού. (3^ο κριτήριο αντιστρεπτότητας).

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	i_p^A/i_p^C
0,01	1,1
0,025	1,2
0,05	1,2
0,075	1,2
0,1	1,3

iv) Το ΔE_p ισούται με 56,5/n mV με μικρή απόκλιση για n=2 για τη δράση στα 0,324 V (πίνακας 10.8).

Πίνακας 10. 8. Μεταβολή του ΔE_p σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού. (4^ο κριτήριο αντιστρεπτότητας)

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p^A (V)	E_p^C (V)	ΔE_p (mV)
0,01	0,324	0,259	65
0,025	0,323	0,258	65
0,05	0,324	0,260	64
0,075	0,323	0,259	64
0,1	0,325	0,259	66

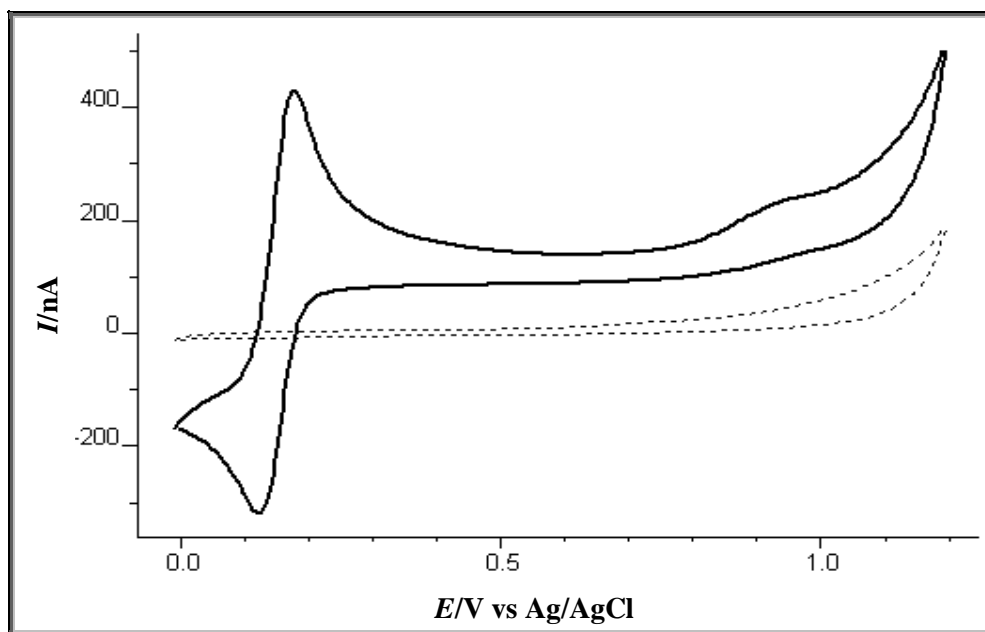
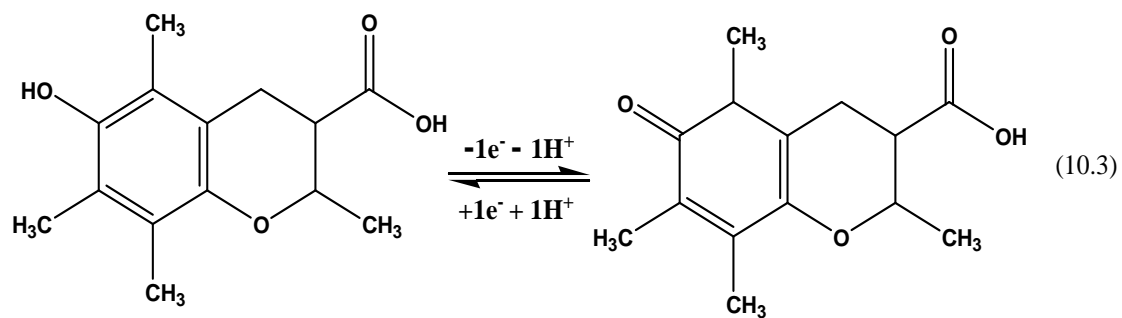
ν) Η απόλυτη τιμή της διαφοράς $E_p - E_{p/2}$ ισούται με $56,5/n$ mV για $n=1$ (πίνακας 10.9).

Πίνακας 10. 9. Μεταβολή της διαφοράς $E_p - E_{p/2}$ σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (5° κριτήριο αντιστρεπτότητας).

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p (V)	$E_{p/2}$ (V)	$ E_p - E_{p/2} $ (mV)
0,01	0,324	0,270	54
0,025	0,323	0,268	55
0,05	0,324	0,270	54
0,075	0,323	0,267	56
0,1	0,325	0,269	56

10.1.3 Trolox

Για τη μελέτη του trolox με κυκλική βολταμμετρία έπειτα από βελτιστοποίηση επελέγησαν οι παρακάτω συνθήκες: $E_{vtx1} = 0$ V, $E_{vtx2} = 1,2$ V, $E_{step} = 0,005$ V, $N_{scans} = 5$. Με τις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και η διαδικασία χαρακτηρισμού των δράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την σάρωση των διαλυμάτων του γαλλικού οξέος τόσο ανοδικά όσο και καθοδικά. Για την ίδια διαδικασία εξετάστηκαν διάφορες ταχύτητες σάρωσης όπως 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 και 0,1 $V s^{-1}$ για συγκέντρωση ποσότητας $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό κυκλικό βολταμμογράφημα του trolox για συγκέντρωση ποσότητας $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ και ταχύτητα σάρωσης $0,050 \text{ V s}^{-1}$ (σχήμα 10.5). Από το κυκλικό βολταμμογράφημα του σχήματος 10.5 παρατηρούμε δυο κορυφές οξειδωσης στα 0,174 και 0,929 V και μια κορυφή αναγωγής στα 0,124 V αντίστοιχα. Η πρώτη κορυφή οξειδωσης στα 0,174 V και η μοναδική κορυφή αναγωγής στα 0,124 V περιγράφουν μια οξειδοαναγωγική δράση όπου λαμβάνει χώρα μεταφορά ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου αντίστοιχα και αποδίδεται στο μοναδικό φαινολικό υδροξύλιο (αντίδραση 10.3). Η δεύτερη κορυφή οξειδωσης στα 0,929 V αποδίδεται πιθανότατα στην οξείδωση του υδροξυλίου της καρβοξυλομάδας.

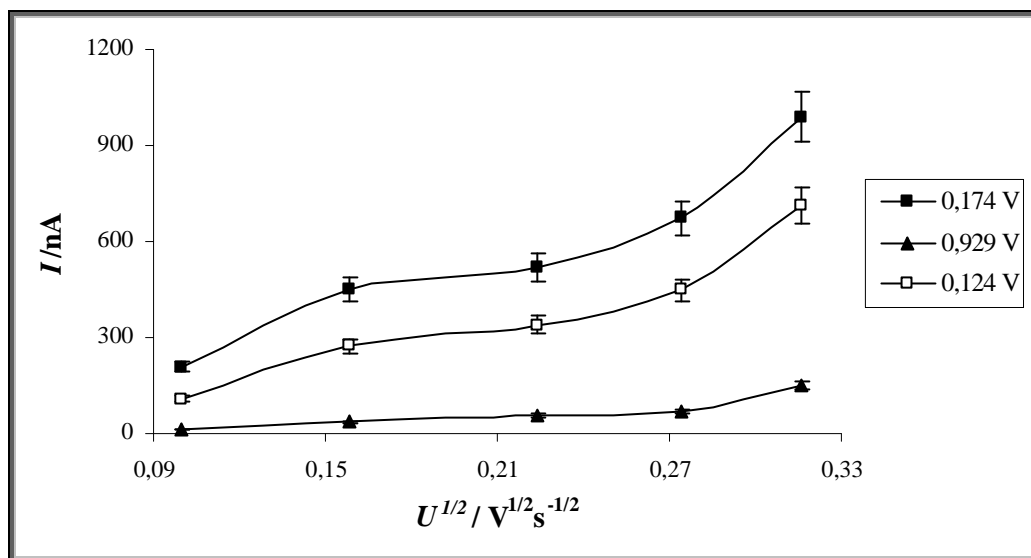


Σχήμα 10. 5. Κυκλικό βολταμογράφημα διαλύματος trolox (- - - ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $c_T=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Η δράση στα $0,170 \text{ V}$ θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ημιαντιστρεπτή σύμφωνα με τα κριτήρια ημιαντιστρεπτότητας που παρουσιάστηκαν στον πίνακα 10.1, αν και πληρεί με βεβαιότητα τα δυο από τα τέσσερα κριτήρια.

Αναλυτικότερα:

i) Το i_p αυξάνεται με το $u^{1/2}$ όχι όμως γραμμικά, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 10.6 που ακολουθεί.



Σχήμα 10. 6. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής του trolox στα 0,174, 0,929 και 0,124 V αντίστοιχα σε σχέση με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. (1^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

ii) Το πηλίκιο i_p^A/i_p^C είναι διάφορο της μονάδας για τη δράση στα 0,174 V επειδή πιθανότατα δεν ισχύει η ισότητα $a_C = a_A = 0,5$ (πίνακας 10.10).

Πίνακας 10. 10. Μεταβολή του λόγου i_p^A/i_p^C σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού. (2^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	i_p^A/i_p^C
0,01	1,7
0,025	1,6
0,05	1,5
0,075	1,5
0,1	1,4

iii) Το ΔE_p είναι μεγαλύτερο του $56,5/n$ mV και αυξάνει με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού (πίνακας 10.11).

Πίνακας 10. 11. Μεταβολή του ΔE_p σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού.
(3^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p^A (V)	E_p^C (V)	ΔE_p (mV)
0,01	176,5	124,0	52,5
0,025	179	126,5	52,5
0,05	184	124,0	60,0
0,075	184	124,0	60,0
0,1	179	124,0	60,0

iv) Η δράση στα 0,174 V δεν πληρεί αυτήν την προϋπόθεση αφού το E_p^C δεν μετατοπίζεται προς αρνητικότερες τιμές με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης αλλά παραμένει σταθερό (πίνακας 10.12).

Πίνακας 10. 12. Μετατόπιση του E_p^C με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης.
(4^ο κριτήριο ημιαντιστρεπτότητας)

Ταχύτητα σάρωσης ($V s^{-1}$)	E_p^C (V)
0,01	124,0
0,025	126,5
0,05	124,0
0,075	124,0
0,1	124,0

10.2 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

Το δεύτερο στάδιο που ουσιαστικά ολοκληρώνει την ηλεκτροχημική μελέτη και μας δίνει μια πιο σαφή εικόνα για τα φαινορικά οξέα περιλαμβάνει τη χρήση διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Η συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική είναι πιο ευαίσθητη σε σχέση με την κυκλική βολταμμετρία και μας επιτρέπει την χρησιμοποίηση χαμηλότερων συγκεντρώσεων ποσότητας και την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τις κορυφές οξείδωσης και αναγωγής ξεχωριστά. Ως φέρον ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, όπως και στην κυκλική βολταμμετρία. Οι συνθήκες που επελέγησαν για την χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης που αναλύονται στη συνέχεια, προέκυψαν από διαδικασίες βελτιστοποίησης για διάφορες παραμέτρους όπως ρυθμός σάρωσης, χρόνος και δυναμικό προσυγκέντρωσης για κάθε φαινολικό οξύ ξεχωριστά και για τις δυο σαρώσεις, ανοδική και καθοδική. Όλα τα παραπάνω περιγράφονται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους. Όλα τα αριθμητικά αποτελέσματα αναφέρονται σε αριθμό μετρήσεων $n=3$.

10.2.1 Βελτιστοποίηση ταχύτητας σάρωσης

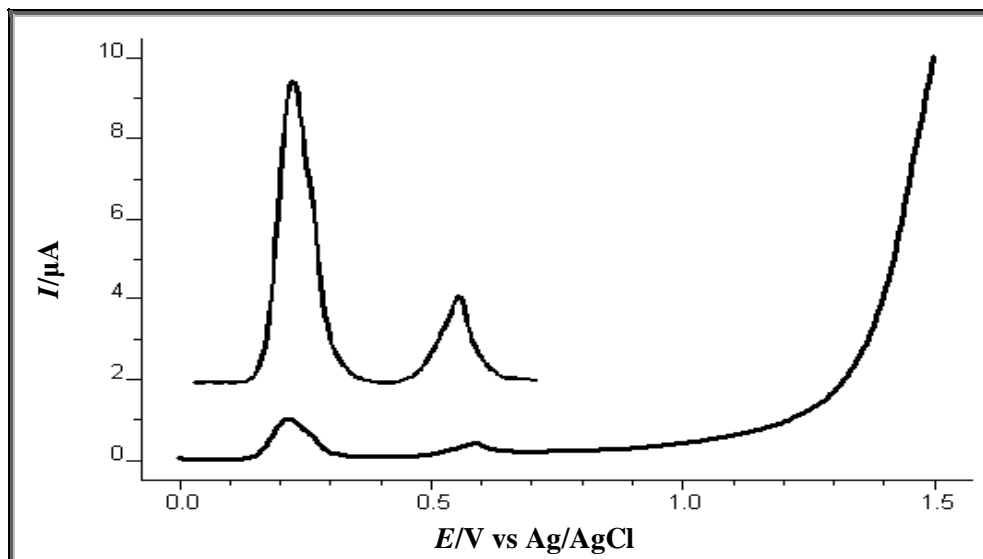
Η βελτιστοποίηση της ταχύτητας σάρωσης (scan rate ή sr) πραγματοποιήθηκε πρώτη καθώς είναι βασική για την εκτέλεση των υπόλοιπων πειραμάτων. Σε κάθε μια από τις επόμενες τρεις παραγράφους περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία και παρατίθενται τα αποτελέσματα τόσο για τις κορυφές οξείδωσης, όσο και για τις κορυφές αναγωγής. Για κάθε φαινολικό οξύ επιλέχθηκε να μελετηθεί διαφορετική συγκέντρωση ποσότητας εξαιτίας της διαφορετικής ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς που εμφάνιζαν, κυρίως λόγω του διαφορετικού αριθμού φαινολικών υδροξυλίων, γεγονός που επηρέαζε και τα ποσοτικά αποτελέσματα. Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν $0,005, 0,01, 0,025, 0,05$ και $0,075 \text{ V s}^{-1}$. Σε όλη την πειραματική διαδικασία η σάρωση του δυναμικού γινόταν ανοδικά είτε καθοδικά για παράθυρο δυναμικού 0 ως $1,5 \text{ V}$.

10.2.1.1 Γαλλικό οξύ

Οξείδωση

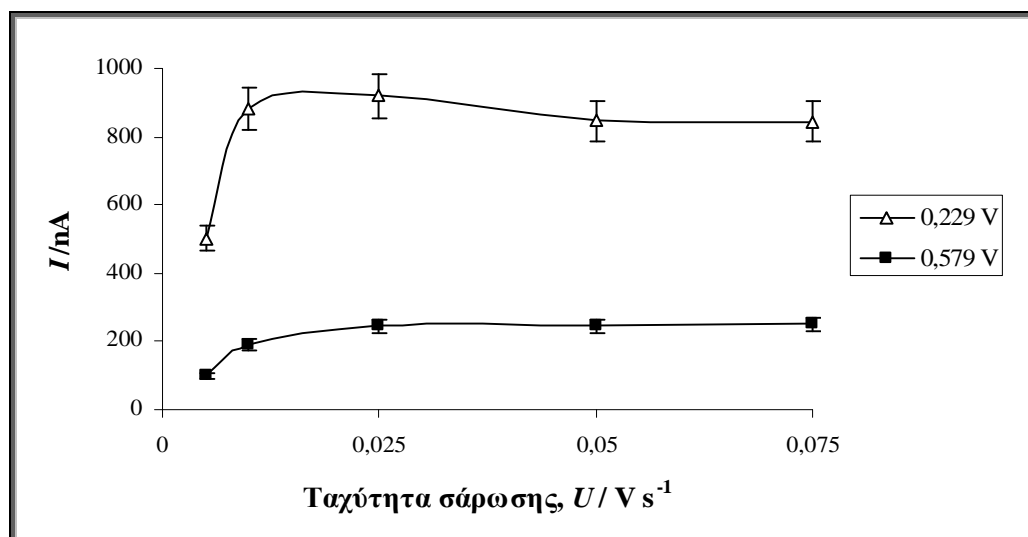
Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση δυο κορυφών οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση στο

δυναμικό εμφάνισης των κορυφών σε σχέση με τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν με κυκλική βολταμετρία. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν δυο κορυφές οξείδωσης, στα 0,229 V και 0,579 V αντί για 0,324V και 0,689 V αντίστοιχα. Στο σχήμα 10.7 φαίνονται καθαρά οι δυο κορυφές οξείδωσης.



Σχήμα 10. 7. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=7,93*10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate= $0,025 \text{ V s}^{-1}$).

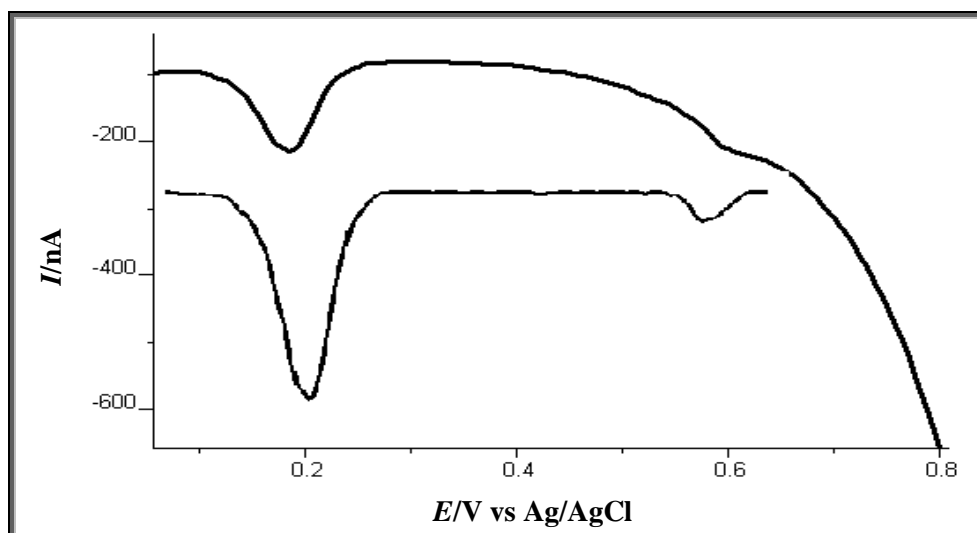
Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και $0,075 \text{ V s}^{-1}$. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στο σχήμα 10.8 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή $0,025 \text{ V s}^{-1}$.



Σχήμα 10. 8. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=7,93*10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

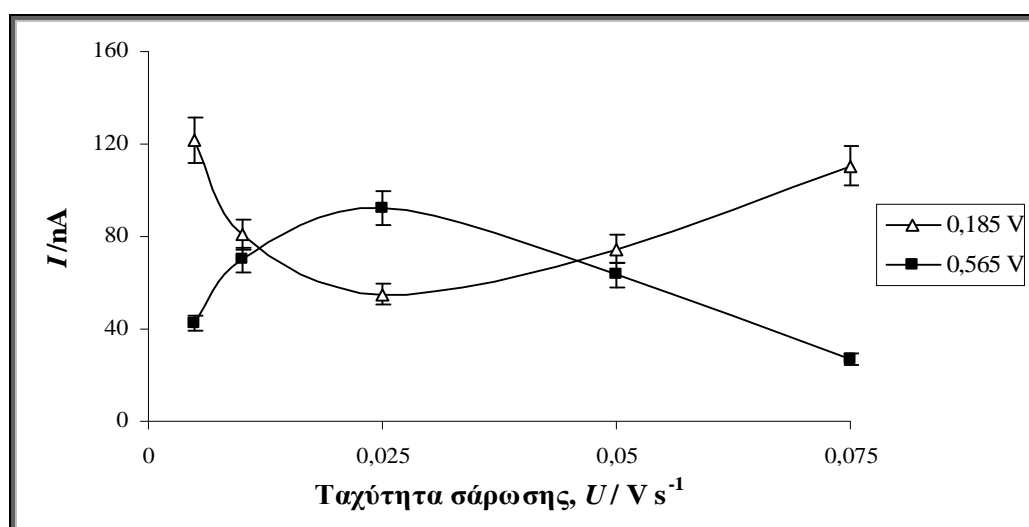
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος ήταν ίση με $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση δυο κορυφών αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση πάλι στο δυναμικό εμφάνισης των κορυφών. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν δυο κορυφές αναγωγής, στα 0,185 V και 0,565 V αντί για 0,199 V και 0,614 V αντίστοιχα. Στο σχήμα 10.9 φαίνονται καθαρά οι δυο κορυφές αναγωγής.



Σχήμα 10. 9. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$).

Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και $0,075 \text{ V s}^{-1}$. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στο σχήμα 10.10 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή $0,010 \text{ V s}^{-1}$.

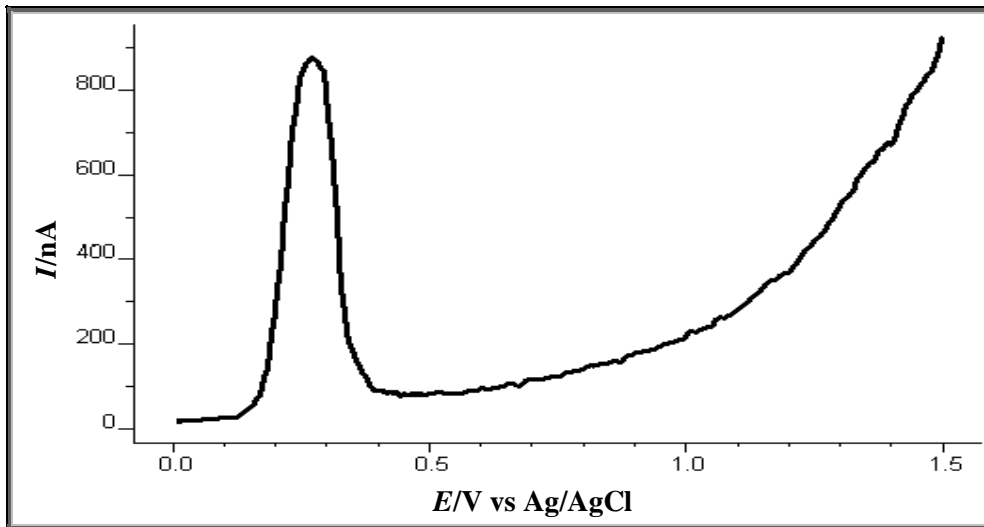


Σχήμα 10. 8. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

10.2.1.2 Καφεϊκό οξύ

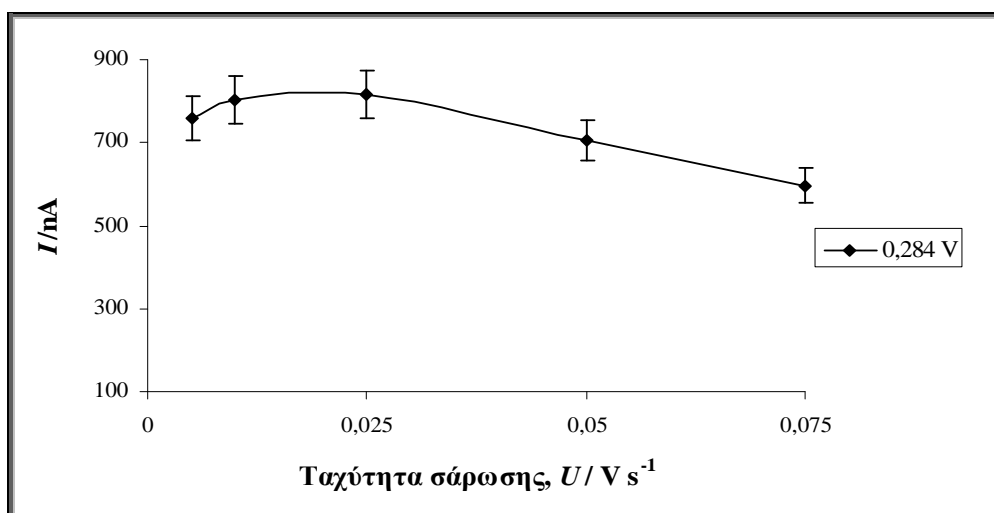
Οξείδωση

Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογράφημα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση μιας κορυφής οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση στο δυναμικό εμφάνισης της κορυφής. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκε μια κορυφή οξείδωσης στα 0,284 V αντί για 0,324 V. Στο σχήμα 10.11 φαίνεται καθαρά η κορυφή οξείδωσης.



Σχήμα 10. 11. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate= $0,025 \text{ V s}^{-1}$).

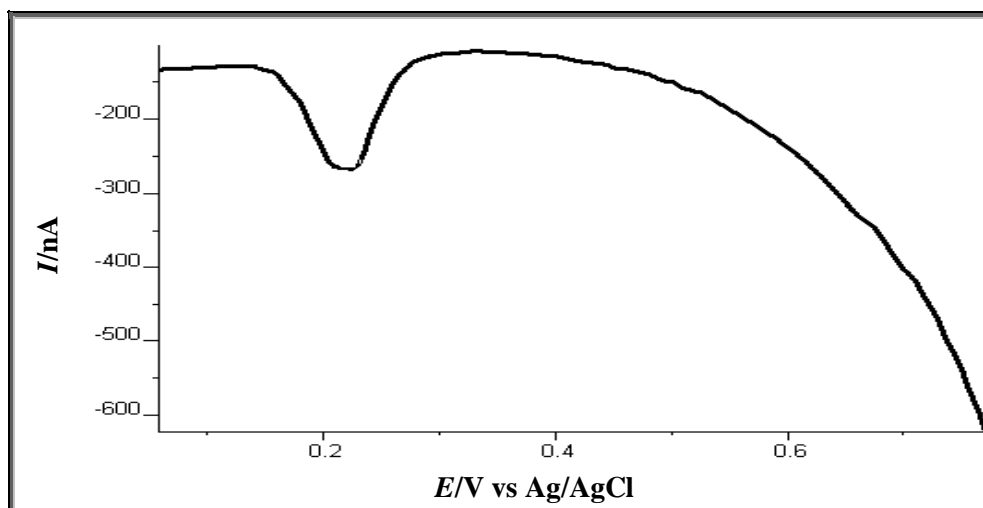
Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και $0,075 \text{ V s}^{-1}$. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στο σχήμα 10.12 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή $0,025 \text{ V s}^{-1}$.



Σχήμα 10. 12. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

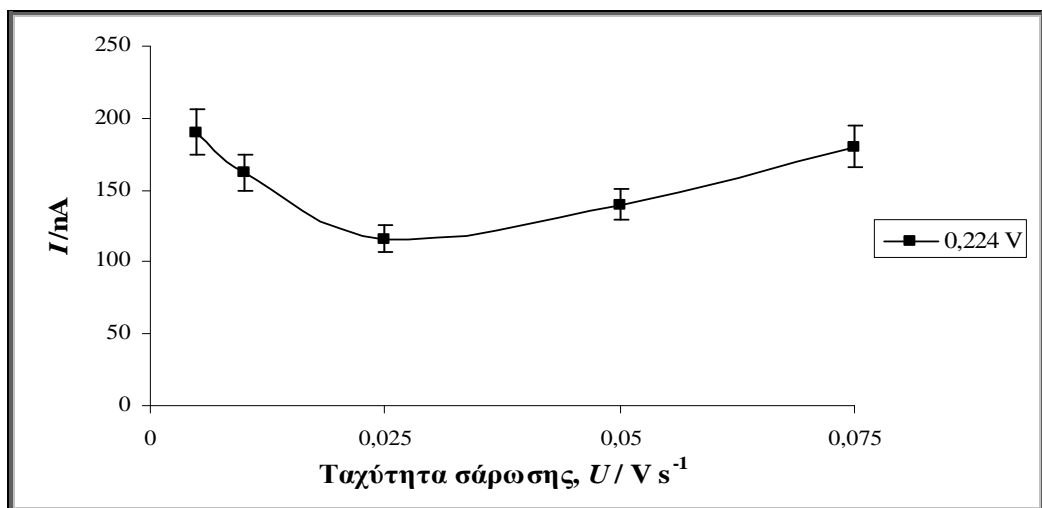
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμογράφημα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση μιας κορυφής αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση πάλι στο δυναμικό εμφάνισης στα 0,224 V αντί για 0,259 V. Στο σχήμα 10.13 φαίνεται καθαρά η κορυφή αναγωγής.



Σχήμα 10. 13. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,010 V s^{-1}).

Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και 0,075 V s^{-1} . Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στο σχήμα 10.14 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 0,010 V s^{-1} .

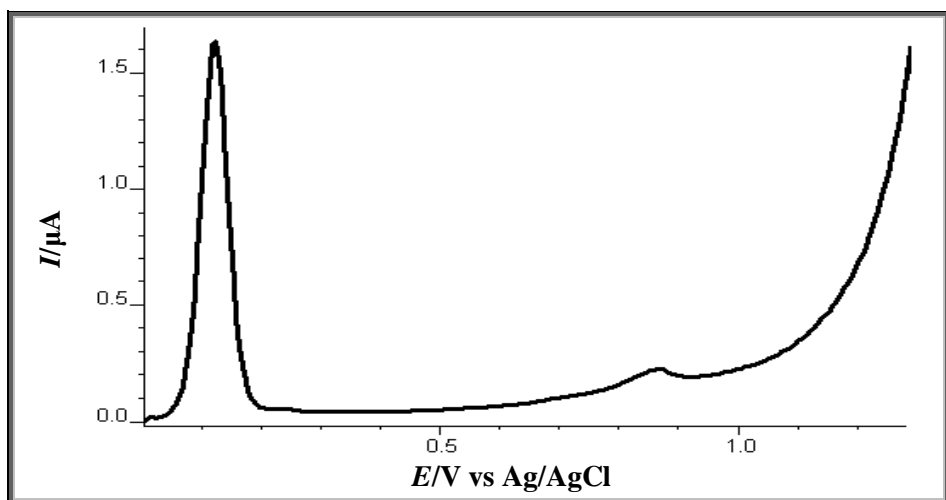


Σχήμα 10. 14. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

10.2.1.3 Trolox

Οξείδωση

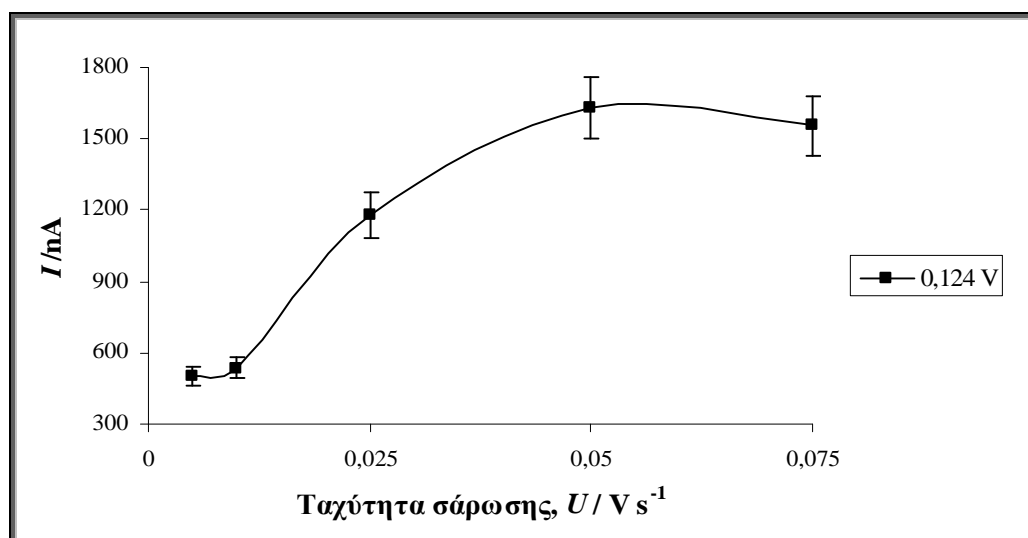
Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση δυο κορυφών οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση στο δυναμικό εμφάνισης των κορυφών. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν δυο κορυφές οξείδωσης, στα 0,124 V και 0,829 V αντί για 0,174V και 0,929 V αντίστοιχα. Στο σχήμα 10.15 φαίνονται καθαρά οι δυο κορυφές οξείδωσης.



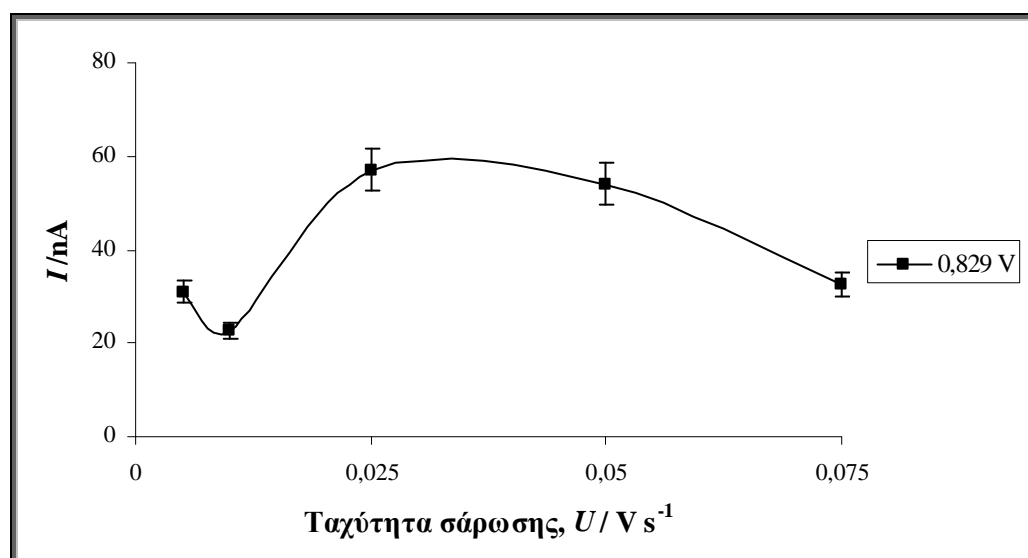
Σχήμα 10. 15. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate= $0,05 \text{ V s}^{-1}$).

Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και 0,075 V s^{-1} . Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στα

σχήματα 10.16 και 10.17, ενώ ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή $0,05 \text{ V s}^{-1}$ και για τις δυο κορυφές.



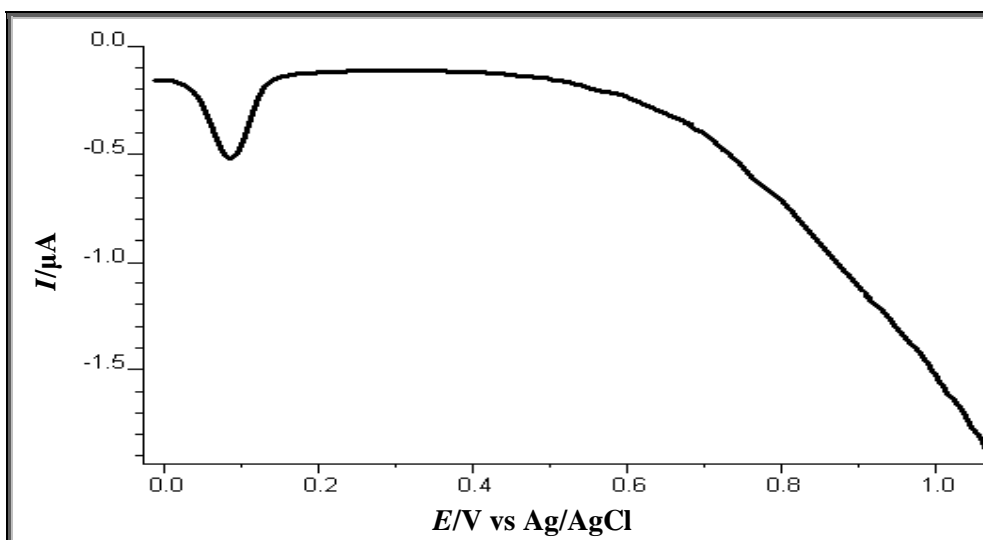
Σχήμα 10. 16. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα $0,124 \text{ V}$ σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος trolox ($c_{tr}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).



Σχήμα 10. 17. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα $0,829 \text{ V}$ σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος trolox ($c_{tr}=7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

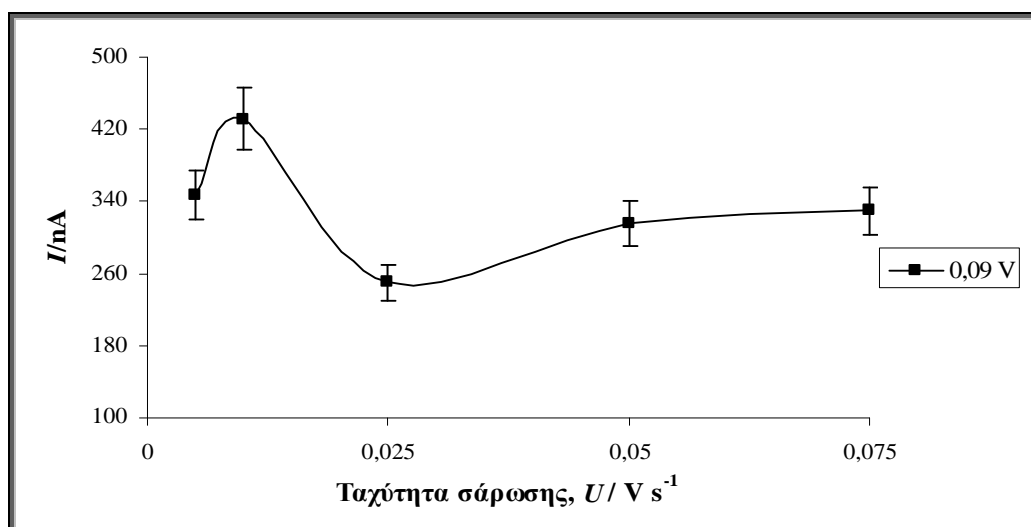
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση μιας κορυφής αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση αλλά με διαφοροποίηση πάλι στο δυναμικό εμφάνισης της κορυφής. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκε μια κορυφή αναγωγής στα $0,09 \text{ V}$ αντί για $0,124 \text{ V}$. Στο σχήμα 10.18 φαίνονται καθαρά η μοναδική κορυφή αναγωγής.



Σχήμα 10. 18. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος trolox ($c_{ir}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$).

Οι τιμές της ταχύτητας σάρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 και $0,075 \text{ V s}^{-1}$. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού παρουσιάζεται στο σχήμα 10.19 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή $0,010 \text{ V s}^{-1}$.



Σχήμα 10. 19. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού διαλύματος trolox ($c_{ir}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

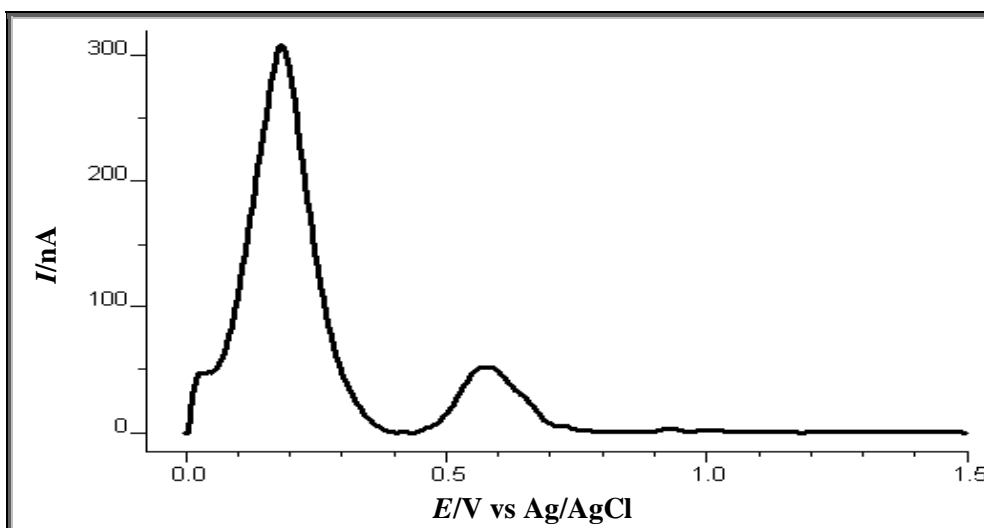
10.2.2 Βελτιστοποίηση δυναμικού προσυγκέντρωσης

Η μελέτη του δυναμικού προσυγκέντρωσης ($E_{\text{deposition}}$ ή E_{dep}) ήταν το επόμενο στάδιο βελτιστοποίησης που πραγματοποιήθηκε. Σε κάθε μια από τις επόμενες τρεις παραγράφους περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία και παρατίθενται τα αποτελέσματα τόσο για τις κορυφές οξείδωσης, όσο και για τις κορυφές αναγωγής. Για κάθε φαινολικό οξύ επιλέχθηκε να μελετηθεί διαφορετική συγκέντρωση ποσότητας εξαιτίας της διαφορετικής ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς που εμφάνιζαν, κυρίως λόγω του διαφορετικού αριθμού φαινολικών υδροξυλίων και της δομής τους γενικότερα, γεγονός που επηρέαζε και τα ποσοτικά αποτελέσματα. Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 V. Στο συγκεκριμένο στάδιο η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν αυτή που επελέγη από την προηγούμενη μελέτη (Κεφ.10.2.1) για κάθε φαινολικό οξύ, ενώ ως χρόνος προσυγκέντρωσης ορίστηκαν τα 60 s και ως παράθυρο δυναμικού από 0 ως 1,5 V για όλα τα αντιοξειδωτικά. Κατά τη διάρκεια της προσυγκέντρωσης, το διάλυμα βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση.

10.2.2.1 Γαλλικό οξύ

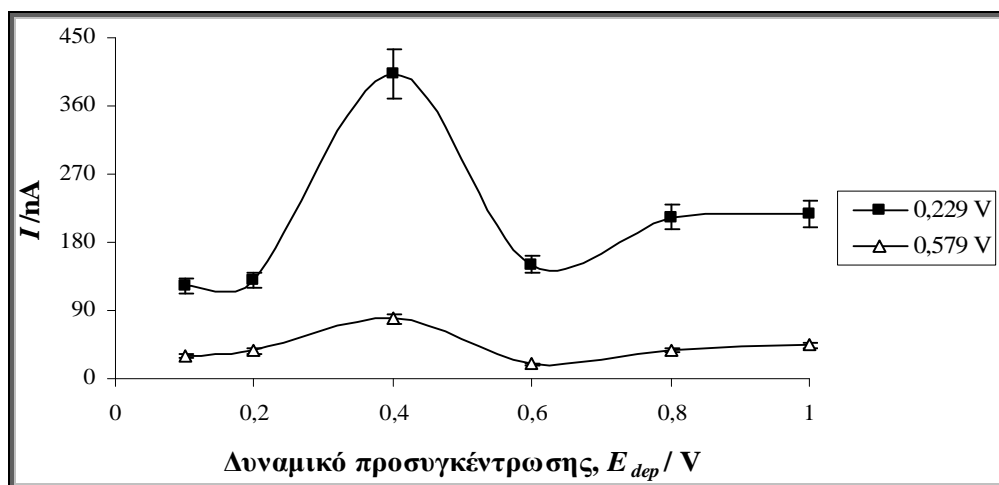
Οξείδωση

Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ίση με $0,025 \text{ V s}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν ξανά την εμφάνιση δυο κορυφών οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση στα 0,229 και 0,579 V. Στο σχήμα 10.20 φαίνονται οι δυο κορυφές οξείδωσης σε βολταμμογράφημα όπου έχει πραγματοποιηθεί διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα 10. 20. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,025 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=0,4 \text{ V}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

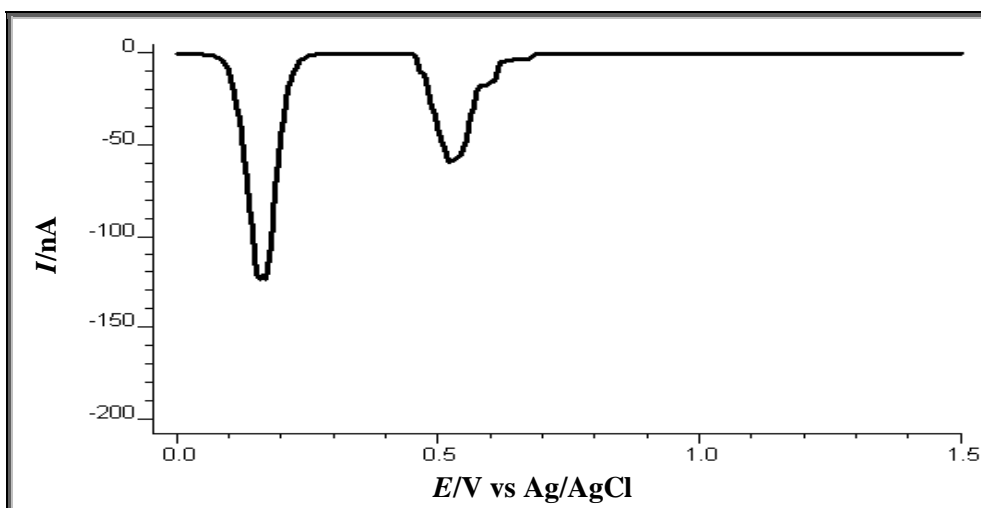
Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1V. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξειδωσης σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.21 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 0,4 V και για τις δυο κορυφές.



Σχήμα 10. 21. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξειδωσης σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,025 \text{ V s}^{-1}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

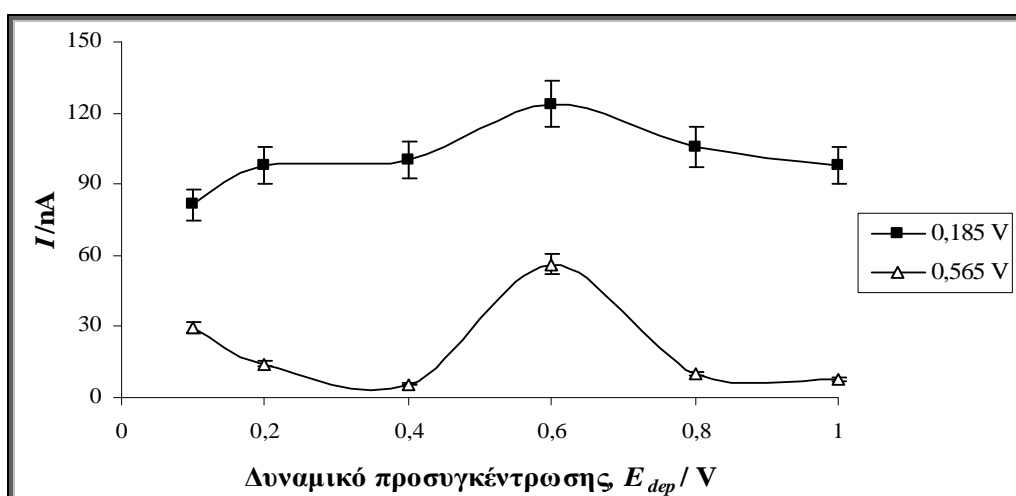
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος ήταν ίση με $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ η ταχύτητα σάρωσης ίση με $0,01 \text{ V s}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν ξανά την εμφάνιση δυο κορυφών αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση στα 0,185 V και 0,565 V. Στο σχήμα 10.22 φαίνονται καθαρά οι δυο κορυφές αναγωγής, σε βολταμμογράφημα όπου έχει πραγματοποιηθεί διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα 10. 22. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,2*10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=0,6 \text{ V}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που εξετάστηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές που εξετάστηκαν και κατά την οξείδωση. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.23 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 0,6 V.



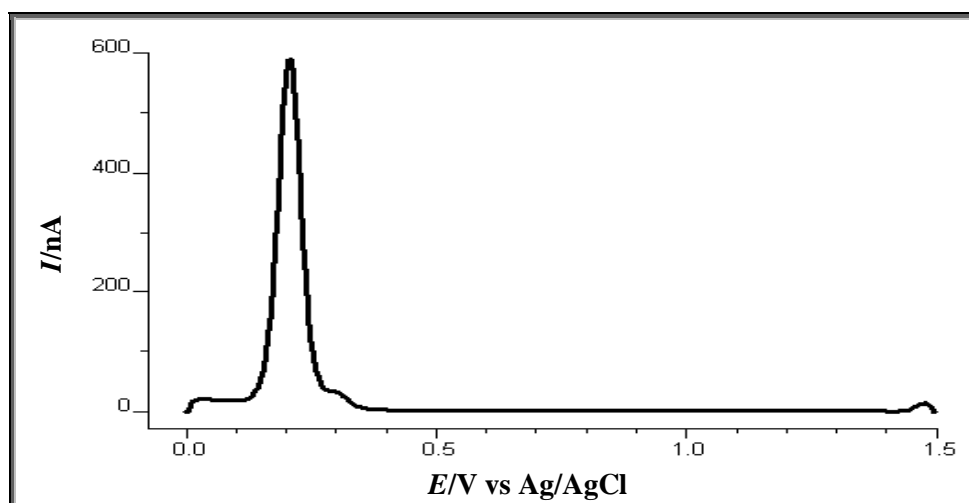
Σχήμα 10. 23. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,2*10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

10.2.2.2 Καφεϊκό οξύ

Οξείδωση

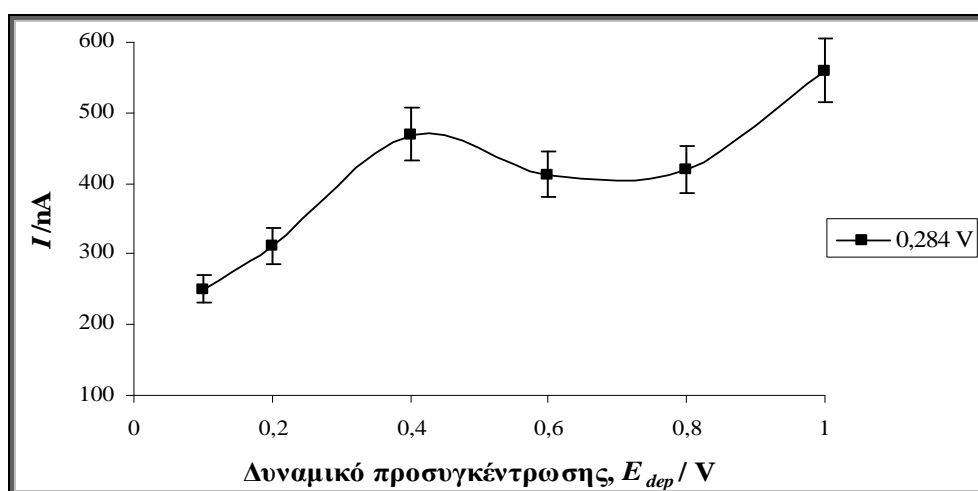
Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμογράφημα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν και σε αυτήν την περίπτωση την εμφάνιση μιας κορυφής οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση στα 0,204 V. Στο σχήμα 10.24 φαίνεται καθαρά το βολταμογράφημα που έχει ληφθεί με

διόρθωση βασικής γραμμής καθώς και η κορυφή οξείδωσης.



Σχήμα 10. 24. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,025 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=1 \text{ V}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 V. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.25 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 1 V.

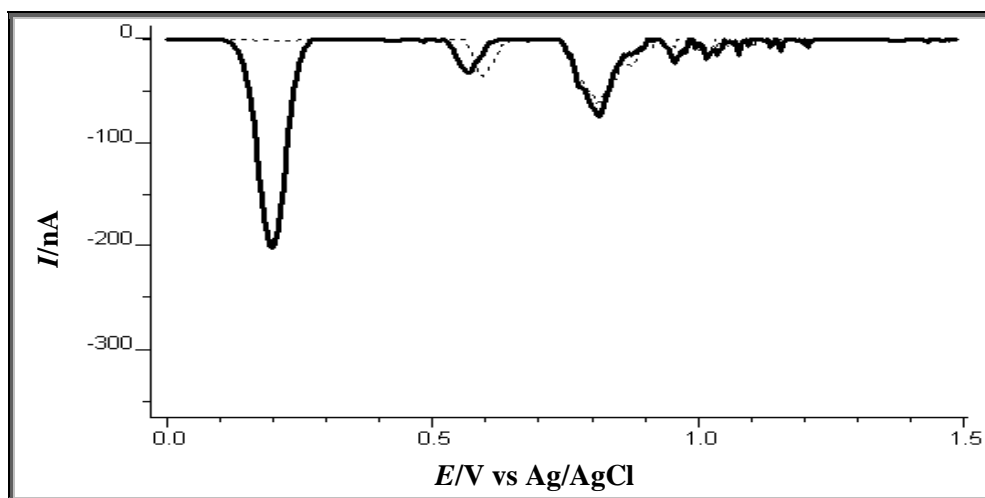


Σχήμα 10. 25. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,025 \text{ V s}^{-1}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

Αναγωγή

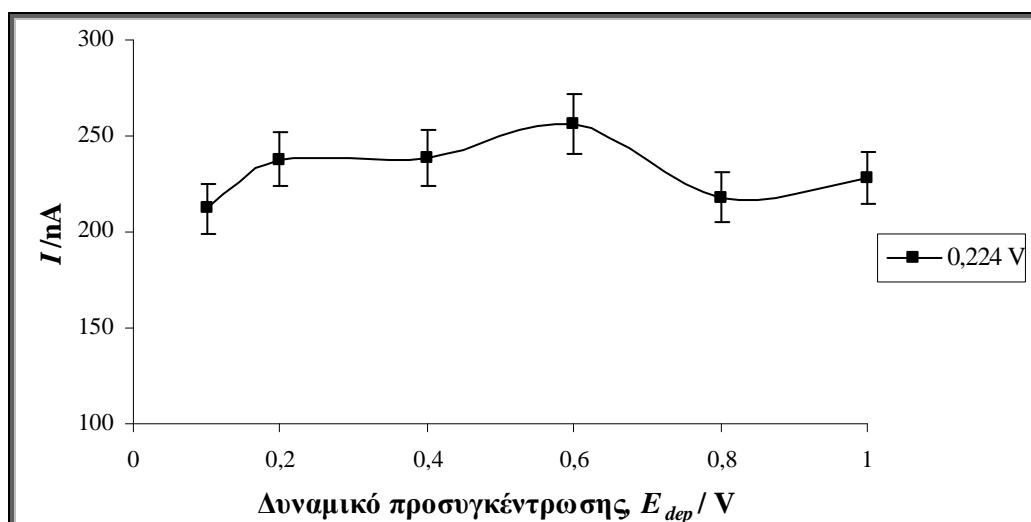
Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Στα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαιώθηκε μιας κορυφής αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση στα 0,184 V. Στο σχήμα 10.26 φαίνεται καθαρά η κορυφή αναγωγής στα 0,184 V, ενώ εμφανίζονται και δυο άλλες κορυφές στα 0,580 και 0,814 V που αποδίδονται όμως στο ρυθμιστικό διάλυμα

$\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ που χρησιμοποιείται ως φέρων ηλεκτρολύτης, όπως έχει τονιστεί σε προηγούμενο κεφάλαιο.



Σχήμα 10. 26. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα καθοδικής σύρσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$, $E_{\text{dep}}=0,6 \text{ V}$, $t_{\text{dep}}=60 \text{ s}$, - - - ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, - διάλυμα καφεϊκού οξέος $c_{\text{ca}}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 V. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.27 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 0,6 V.



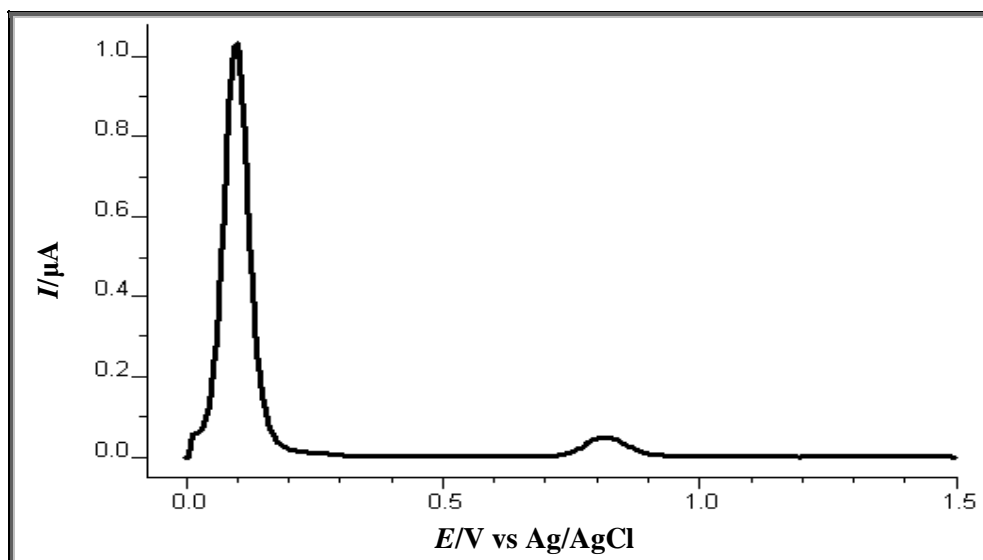
Σχήμα 10. 27. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{\text{ca}}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$, $t_{\text{dep}}=60$).

10.2.2.3 Trolox

Οξείδωση

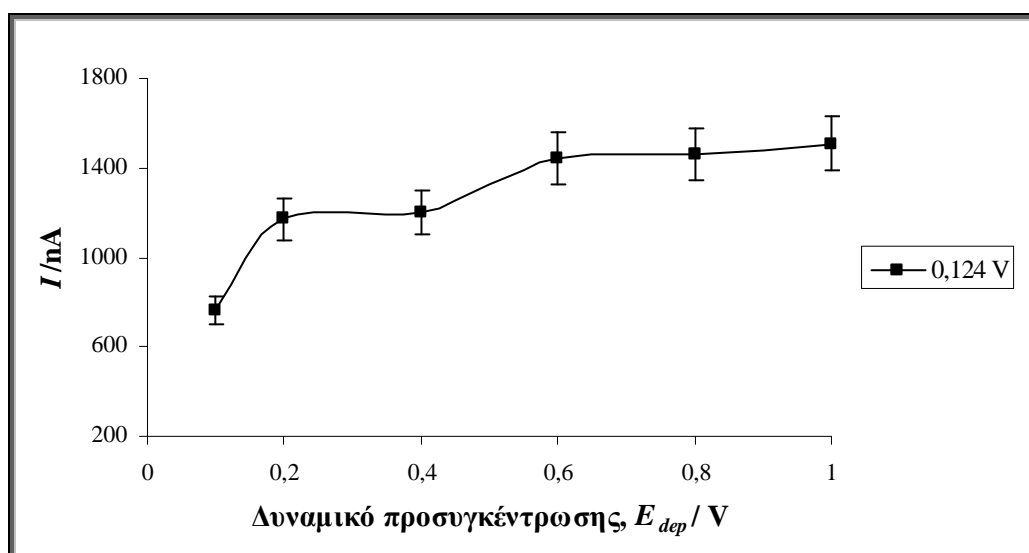
Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $1,99 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Τα διαφορικά βολταμογραφήματα που καταγράφηκαν, επιβεβαίωσαν και σε αυτήν την

περίπτωση την εμφάνιση δυο κορυφών οξείδωσης κατά την ανοδική σάρωση στα 0,124 V και 0,829 V. Στο σχήμα 10.28 διακρίνονται οι δυο κορυφές οξείδωσης, ενώ προηγήθηκε διόρθωση βασικής γραμμής.

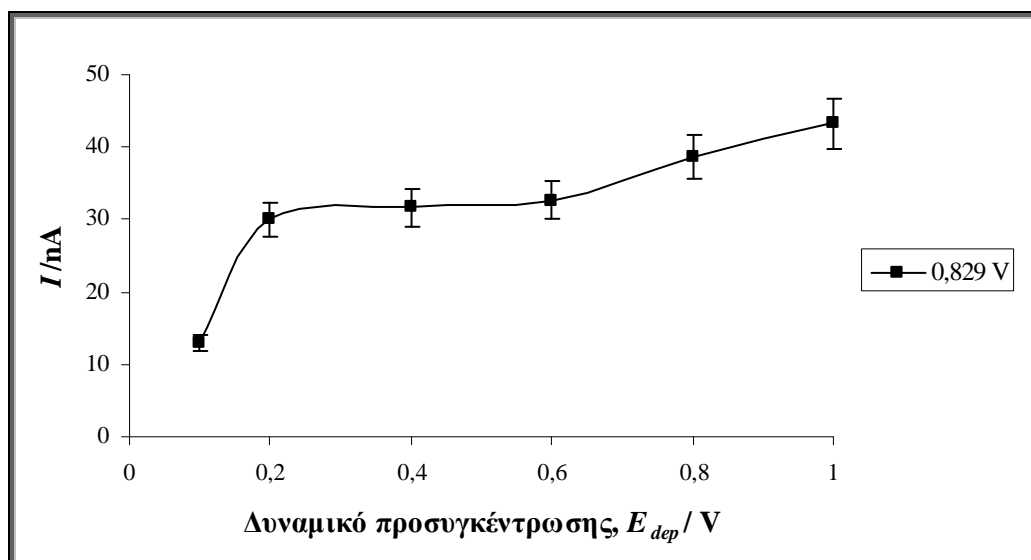


Σχήμα 10. 28. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=1,99 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,05 V s^{-1} , $E_{dep}=1\text{V}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 V. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.29 και 10.30 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 1 V και για τις δυο κορυφές.



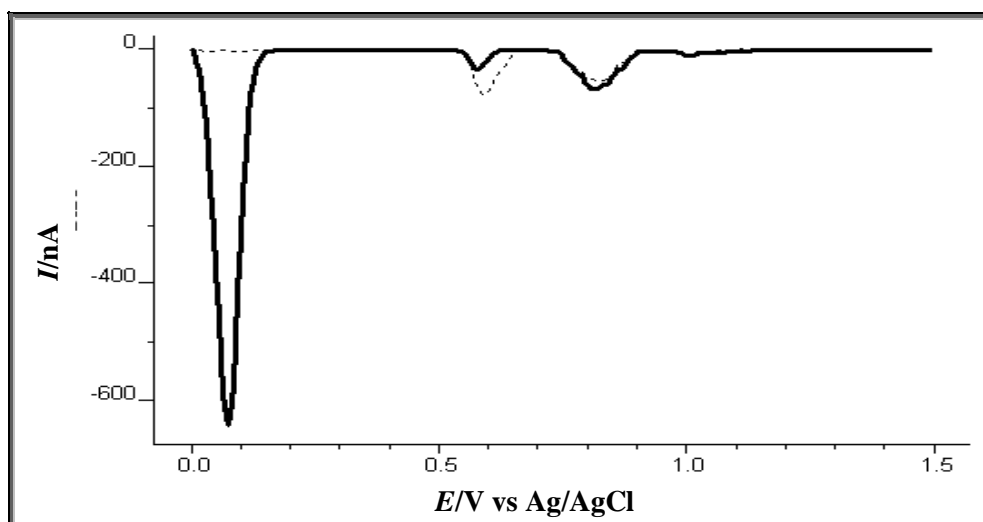
Σχήμα 10. 29. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα 0,124 V σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=1,99 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,05 V s^{-1} , $t_{dep}=60 \text{ s}$).



Σχήμα 10. 30. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα 0,829 V σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=1,99*10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate= $0,05 \text{ V s}^{-1}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$).

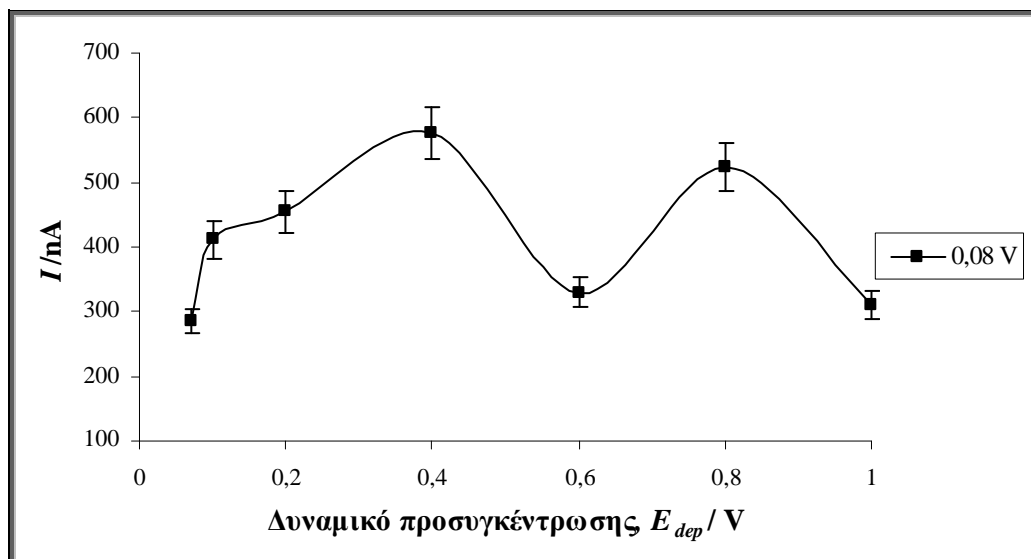
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Στα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, εντοπίστηκε μόνο μια κορυφή αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση στα 0,08 V, όπως και στις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Στο σχήμα 10.31 φαίνεται καθαρά η μοναδική κορυφή αναγωγής που αποδίδεται στο trolox, ενώ παρατηρούνται και άλλες δυο μικρές κορυφές αναγωγής που αποδίδονται στο ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol L^{-1} , όπως στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος.



Σχήμα 10. 31. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος trolox (scan rate= $0,010 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=0,4 \text{ V}$, $t_{dep}=60 \text{ s}$, - - - ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol L^{-1} , — διάλυμα trolox $c_{tr}=7,93*10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 V. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.32 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 0,4 V.



Σχήμα 10. 32. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,010 V s^{-1} , $t_{dep}=60 \text{ s}$).

10.2.3 Βελτιστοποίηση χρόνου προσυγκέντρωσης

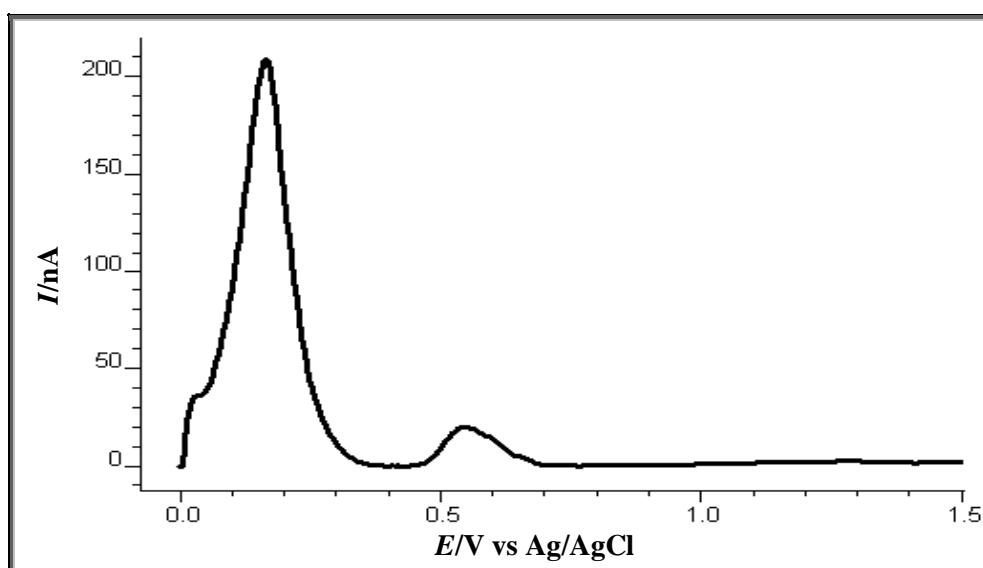
Η μελέτη του χρόνου προσυγκέντρωσης ($t_{deposition}$ ή t_{dep}) ολοκληρώνει την διαδικασία βελτιστοποίησης. Σε κάθε μια από τις επόμενες τρεις παραγράφους περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία και παρατίθενται τα αποτελέσματα τόσο για τις κορυφές οξειδωσης, όσο και για τις κορυφές αναγωγής. Για κάθε φαινολικό οξύ επιλέχθηκε να μελετηθεί και σε αυτήν την περίπτωση, διαφορετική συγκέντρωση ποσότητας. Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Στο συγκεκριμένο στάδιο η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού καθώς και το δυναμικό προσυγκέντρωσης ήταν αυτά που προέκυψαν από προηγούμενες μελέτες για κάθε φαινολικό οξύ ξεχωριστά. Κατά τη διάρκεια της προσυγκέντρωσης, το διάλυμα βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση.

10.2.3.1 Γαλλικό οξύ

Οξείδωση

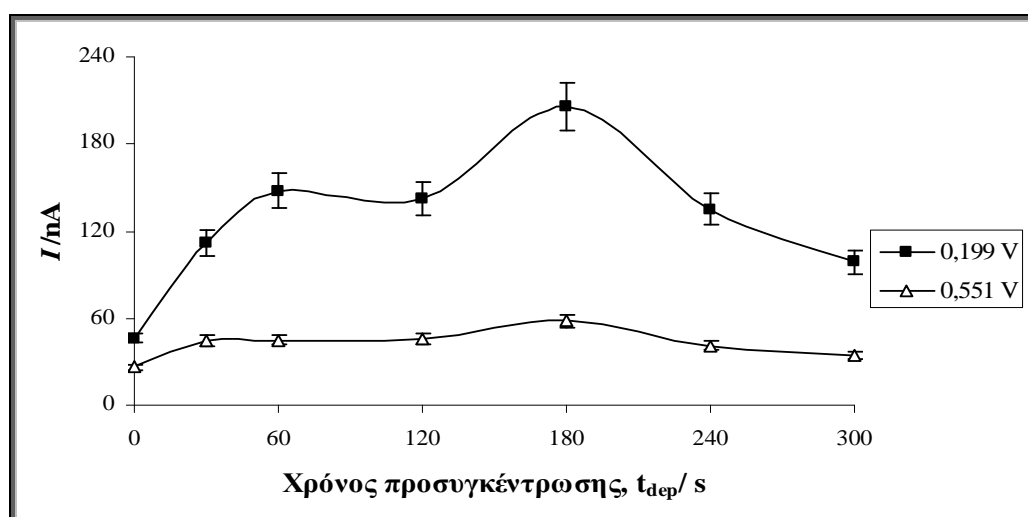
Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν ίση με $9,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ίση με

0,025 V s⁻¹ και το δυναμικό προσυγκέντρωσης ίσο με 0,4 V. Στο σχήμα 10.33 φαίνονται οι δυο κορυφές οξείδωσης σε βολταμμογράφημα όπου έχει πραγματοποιηθεί διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα 10. 33. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,025 V s⁻¹, $E_{dep}=0,4 \text{ V}$, $t_{dep}=180 \text{ s}$).

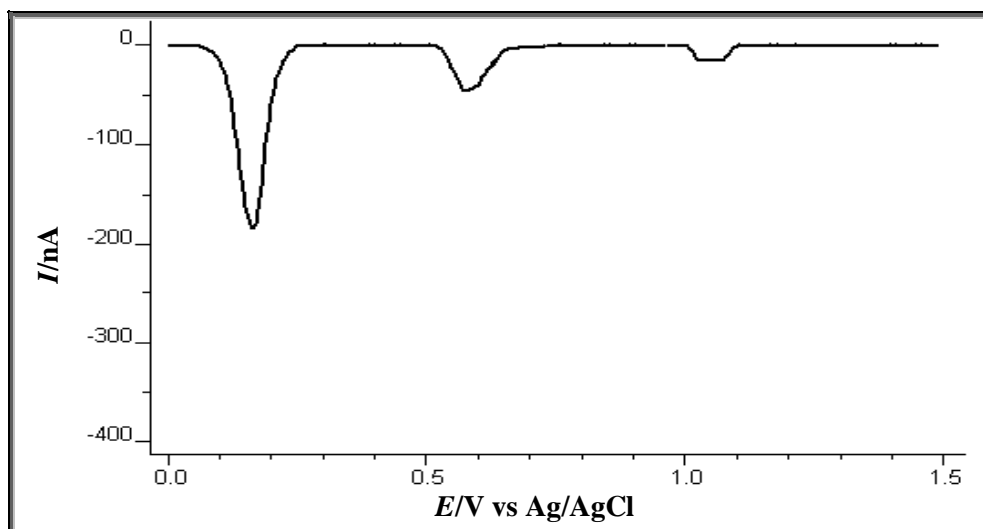
Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.34 και ως βέλτιστη επελέγη η τιμή 180 s και για τις δυο κορυφές.



Σχήμα 10. 34. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,025 V s⁻¹, $E_{dep}=0,4 \text{ V}$).

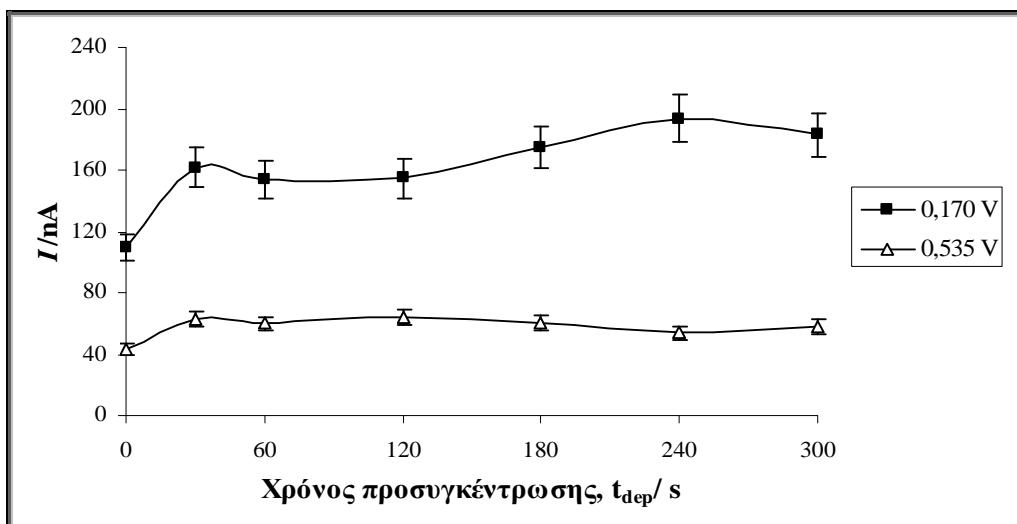
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του γαλλικού οξέος ήταν ίση με $1,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ η ταχύτητα σάρωσης ίση με $0,01 \text{ V s}^{-1}$. Στο σχήμα 10.35 φαίνονται καθαρά οι δυο κορυφές αναγωγής στα $0,170 \text{ V}$ και $0,545 \text{ V}$, σε βολταμμογράφημα όπου έχει πραγματοποιηθεί διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα 10. 35. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{scan rate}=0,010 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=0,6 \text{ V}$, $t_{dep}=240 \text{ s}$).

Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που εξετάστηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές που εξετάστηκαν και κατά την οξειδωση, 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.36 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 240 s, λαμβάνοντας υπόψη μόνο την μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής στα $0,170 \text{ V}$, εφόσον δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή στην ένταση του ρεύματος της κορυφής στα $0,545 \text{ V}$ σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης.

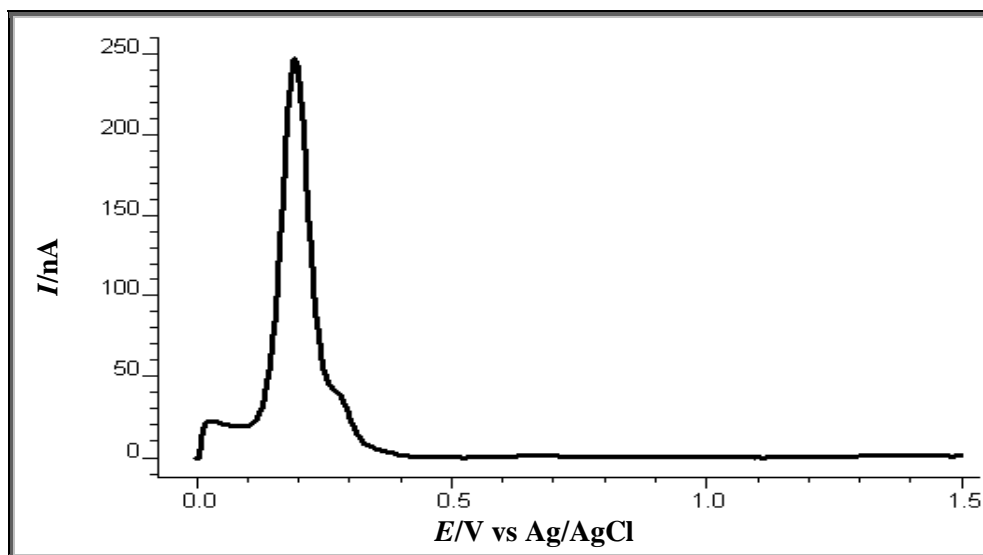


Σχήμα 10. 36. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής στα 0,170 και 0,535 V σε σχέση με το δυναμικό προσυγκέντρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος ($c_{ga}=1,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,010 V s^{-1} , $E_{dep}=0,6 \text{ V}$).

10.2.3.2 Καφεϊκό οξύ

Οξείδωση

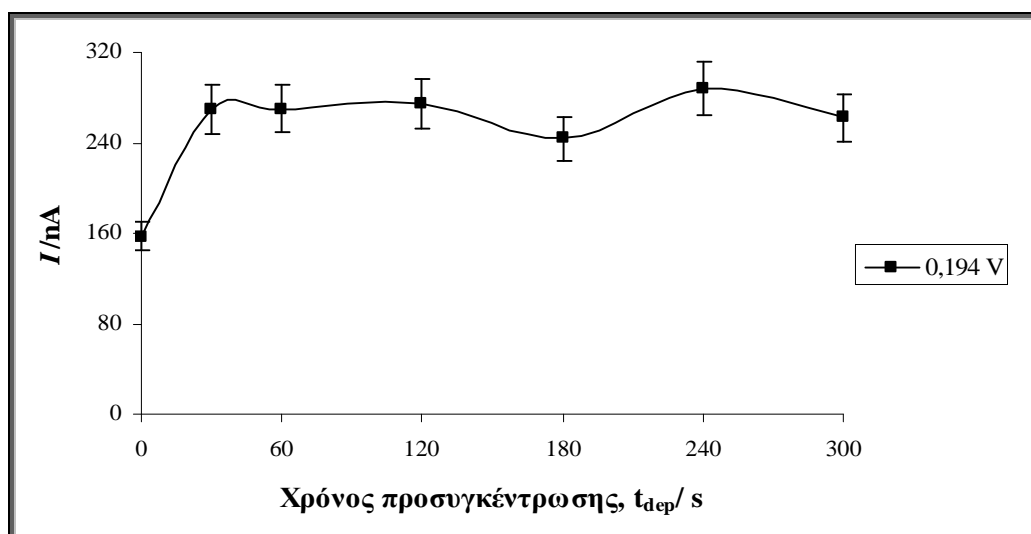
Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Στο σχήμα 10.37 φαίνεται καθαρά το βολταμμογράφημα που έχει ληφθεί με διόρθωση βασικής γραμμής καθώς και η κορυφή οξείδωσης.



Σχήμα 10. 37. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,025 V s^{-1} , $E_{dep}=1 \text{ V}$, $t_{dep}=240 \text{ s}$).

Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.38 και ως

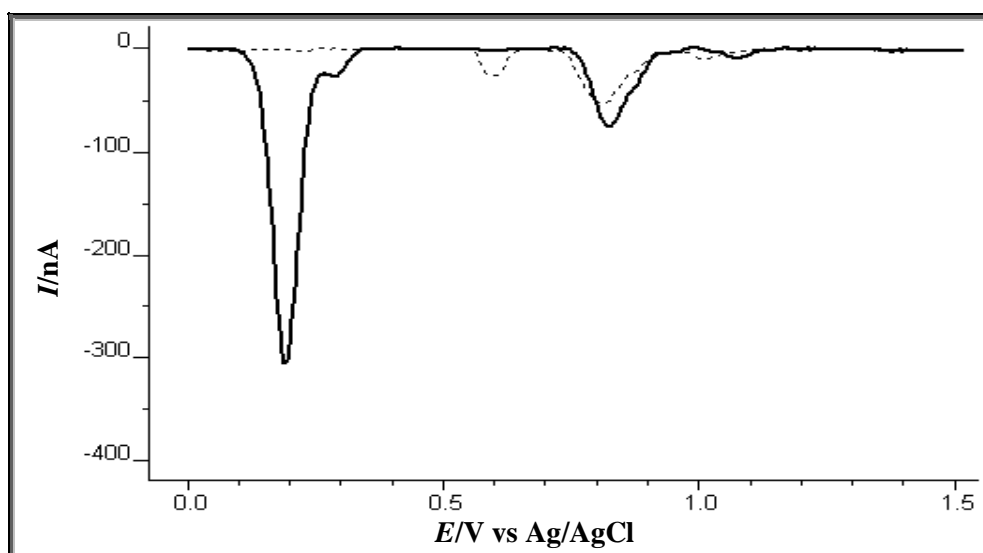
βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 240 s.



Σχήμα 10. 38. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=3,98*10^{-6} mol L^{-1}$, $scan\ rate=0,025 V s^{-1}$, $E_{dep}=1 V$).

Αναγωγή

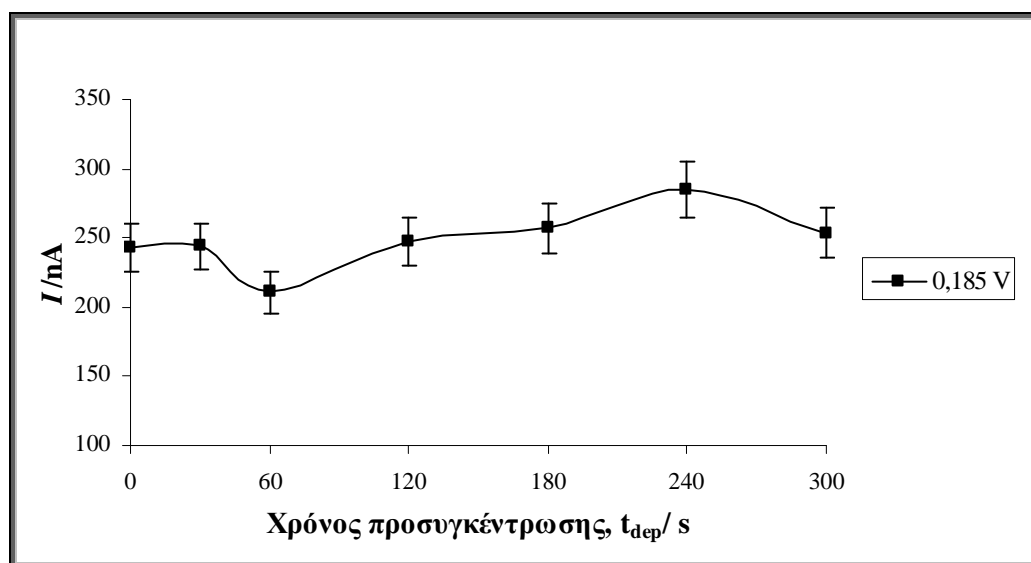
Η συγκέντρωση ποσότητας του καφεϊκού οξέος ήταν ίση με $7,93*10^{-6} mol L^{-1}$. Στο σχήμα 10.39 φαίνεται η κορυφή αναγωγής στα 0,185 V σε βολταμογράφημα όπου έχει πραγματοποιηθεί διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα 10. 39. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($scan\ rate=0,010 V s^{-1}$, $E_{dep}=0,6 V$, $t_{dep}=240 s$, - - - ρυθμιστικό διάλυμα $CH_3COOH- CH_3COONa$ $0,1 mol L^{-1}$, - διάλυμα καφεϊκού οξέος $c_{ca}=7,93*10^{-6} mol L^{-1}$)

Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της μοναδικής κορυφής

αναγωγής σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.40 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 240 s.

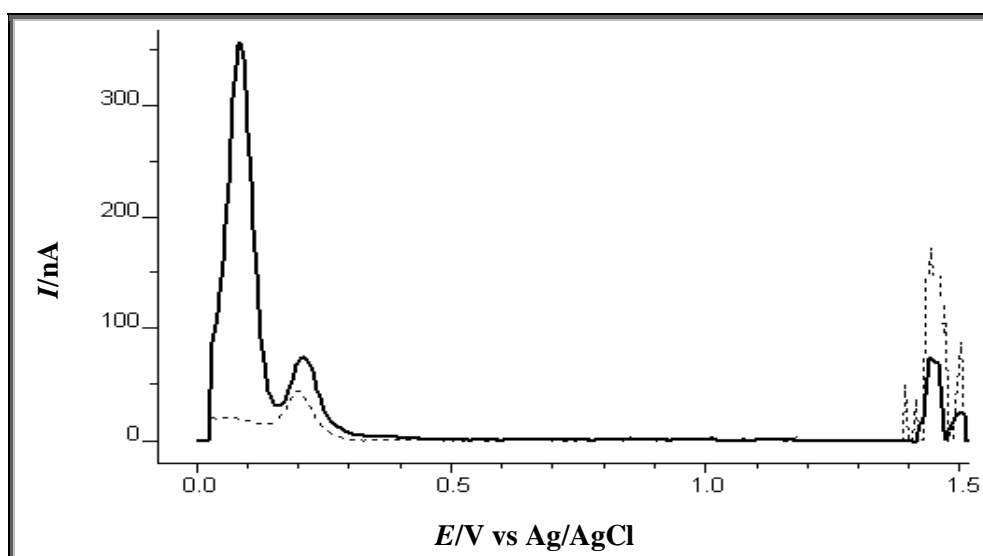


Σχήμα 10. 40. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης διαλύματος καφεϊκού οξέος ($c_{ca}=7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate= $0,010 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=0,6 \text{ V}$).

10.2.3.3 Trolox

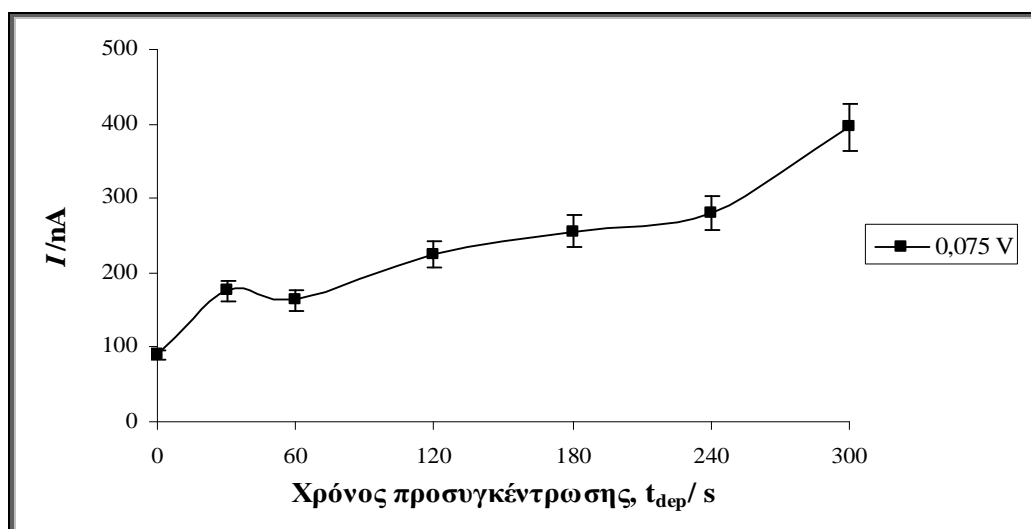
Οξείδωση

Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Στο σχήμα 10.41 διακρίνεται μόνο η μια κορυφή οξείδωσης στα 0,075 V, μετά από διόρθωση βασικής γραμμής. Η δεύτερη κορυφή στα 0,829 V δεν εμφανίζεται εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσης ποσότητας του φαινολικού οξέος trolox.



Σχήμα 10. 41. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα ανοδικής σάρωσης διαλύματος trolox (scan rate= $0,05 \text{ V s}^{-1}$, $E_{dep}=1 \text{ V}$, $t_{dep}=300 \text{ s}$, - - - ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $c_{tr}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

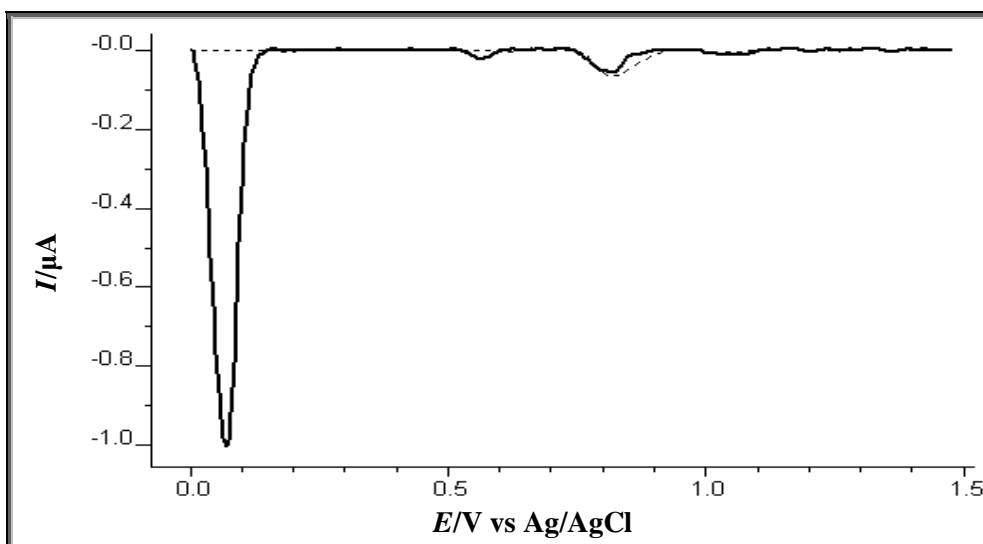
Οι τιμές του χρόνου προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της μιας κορυφής οξείδωσης που εμφανίζεται στη συγκεκριμένη συγκέντρωση ποσότητας trolox σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.42 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 300 s.



Σχήμα 10. 42. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα 0,075 V σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης διαλύματος trolox ($c_{tr}=3,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate=0,05 V s⁻¹, $E_{dep}=1 \text{ V}$).

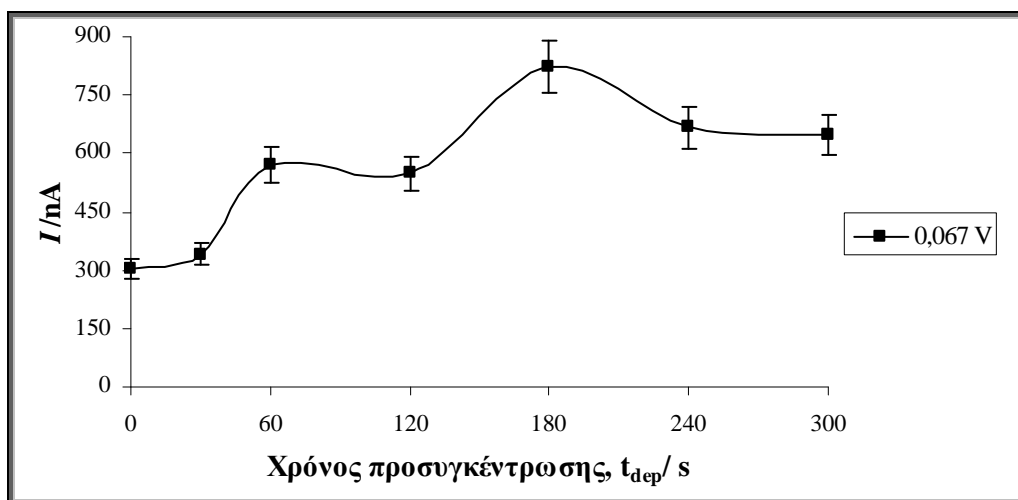
Αναγωγή

Η συγκέντρωση ποσότητας του trolox ήταν ίση με $7,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Στα διαφορικά βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν, εντοπίστηκε μόνο μια κορυφή αναγωγής κατά την καθοδική σάρωση στα 0,067 V, όπως και στις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Στο σχήμα 10.43 φαίνεται καθαρά η μοναδική κορυφή αναγωγής που αποδίδεται στο trolox, ενώ παρατηρούνται και άλλες δυο μικρές κορυφές αναγωγής που αποδίδονται στο ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol L⁻¹.



Σχήμα 10. 43. Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα καθοδικής σάρωσης διαλύματος trolox (scan rate=0,010 V s⁻¹, E_{dep}=1 V, t_{dep}=180 s, - - - ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH-CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹, - διάλυμα trolox c_{tr}=7,93*10⁻⁶ mol L⁻¹)

Οι τιμές του δυναμικού προσυγκέντρωσης που μελετήθηκαν ήταν τα 0, 30, 60, 120, 180, 240 και 300 s. Η μεταβολή της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 10.44 και ως βέλτιστη θεωρήθηκε η τιμή 180 s.



Σχήμα 10. 44. Διάγραμμα μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής σε σχέση με το χρόνο προσυγκέντρωσης διαλύματος trolox (c_{tr}=7,93*10⁻⁶ mol L⁻¹, scan rate=0,010 V s⁻¹, E_{dep}=1 V).

10.2.4 Καμπύλες βαθμονόμησης των φαινολικών οξέων

Η χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε και για τα τρία φαινολικά οξέα αφότου μελετήθηκαν οι παράμετροι ταχύτητα σάρωσης, δυναμικό και χρόνος προσυγκέντρωσης και επελέγησαν οι βέλτιστες τιμές τους. Όλες οι τιμές των εντάσεων του ρεύματος που παρατίθενται είναι ο μέσος όρος για $n=3$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης. Επιπλέον μελετήθηκε και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων με τις ίδιες βέλτιστες συνθήκες, υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για κάθε φαινολικό οξύ οι συνθήκες μέτρησης που επελέγησαν ήταν διαφορετικές και για αυτό το λόγο αναφέρονται ξεχωριστά σε κάθε υποκεφάλαιο.

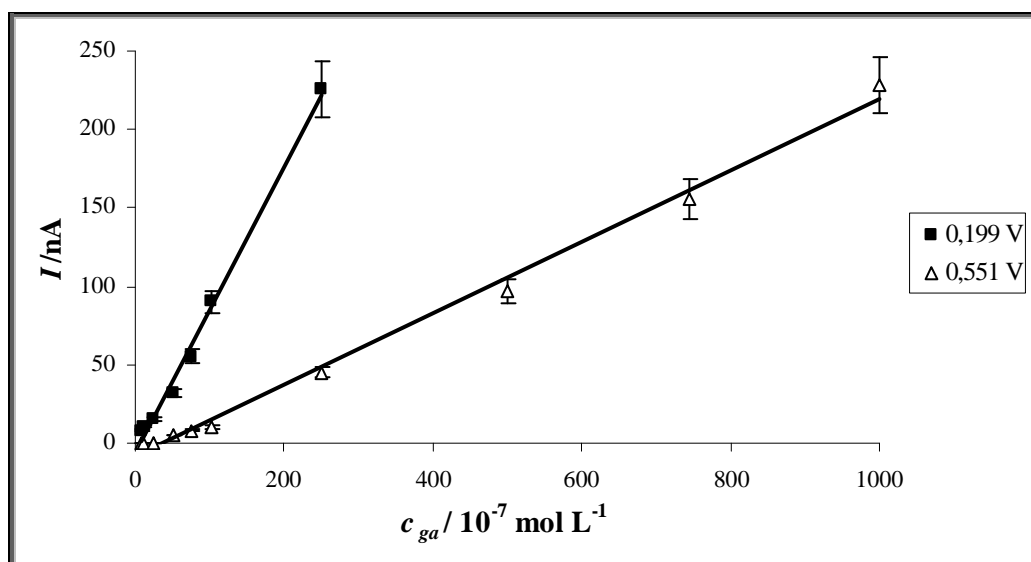
10.2.4.1 Γαλλικό οξύ

Οξειδωση

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης ανοδικής σάρωσης δυναμικού του γαλλικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

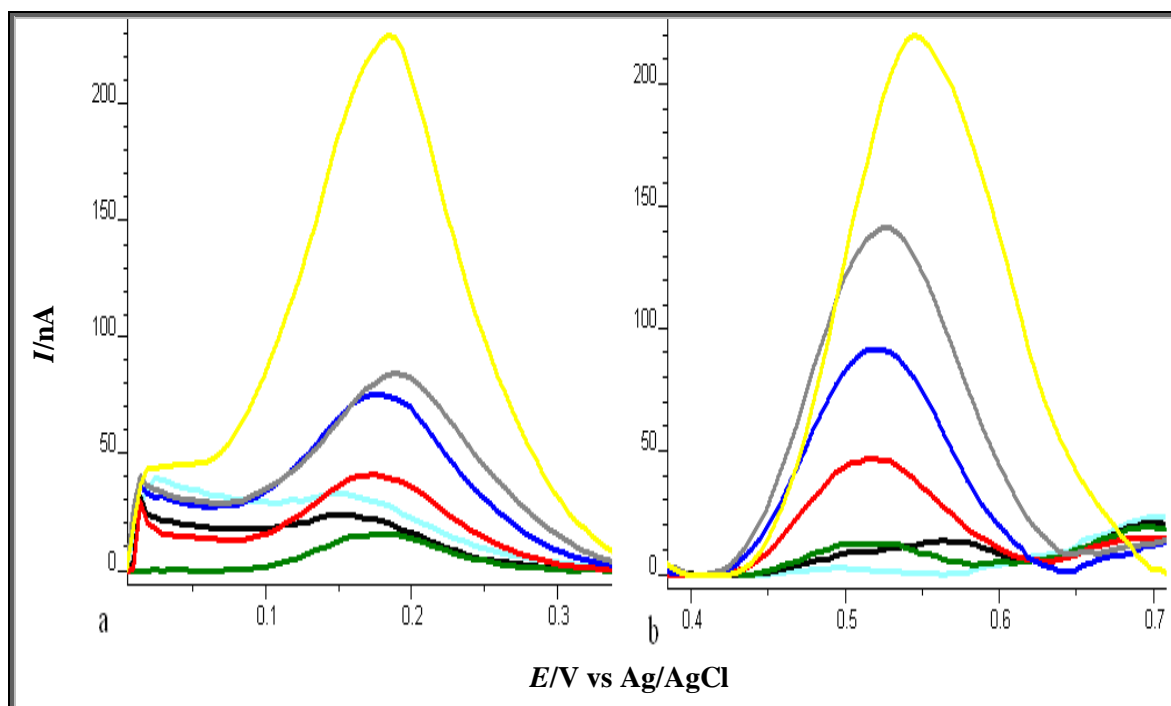
Πίνακας 30.1. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης γαλλικού οξέος ανοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{begin} = 0 \text{ V}$	$t_{pulse} = 0,05 \text{ s}$
$E_{end} = 1,4 \text{ V}$	$scan \text{ rate} = 0,05 \text{ V s}^{-1}$
$E_{step} = 0,005 \text{ V}$	$E_{dep} = 0,4 \text{ V}$
$E_{pulse} = 0,025 \text{ V}$	$t_{dep} = 180 \text{ s}$



Σχήμα 10. 45. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης στα 0,199 V και στα 0,551 V σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του γαλλικού οξέος με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.45) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,199 V κυμαίνεται από $7,5 \cdot 10^{-7}$ έως $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,551 V κυμαίνεται από $5 \cdot 10^{-6}$ έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,199 V και στα 0,551 V είναι $I_{0,199 \text{ V}} = 0,9152 (\pm 0,0344) c_{ga} - 5,319 (\pm 3,705)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,993 και $I_{0,551 \text{ V}} = 0,2324 (\pm 0,0066) c_{ga} - 11,75 (\pm 3,43)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,996 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού και για τις δυο κορυφές είναι τα ακόλουθα: $\text{LOD}_{0,199 \text{ V}} = 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,199 \text{ V}} = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOD}_{0,551 \text{ V}} = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,551 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,199 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 7,9% για τα ακόλουθα επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, $7,5 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$ και $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,551 V βρέθηκε ίση με 7,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας, $5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$ και $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 10.46. DPV βολταμογραφήματα.

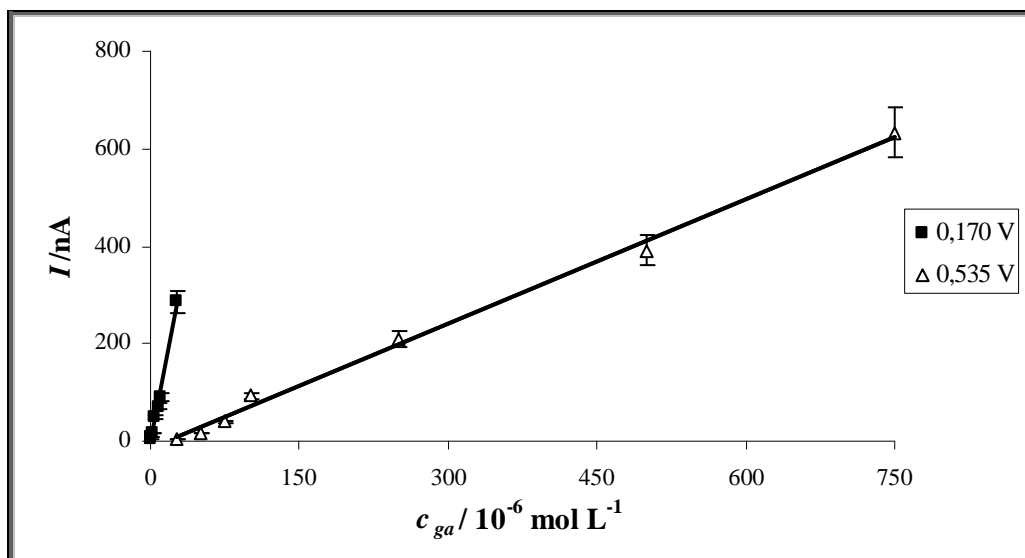
- a. Κορυφή οξειδωσης στα 0,199 V, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.
- b. Κορυφή οξειδωσης στα 0,551 V, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Αναγωγή

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης καθοδικής σάρωσης δυναμικού του γαλλικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

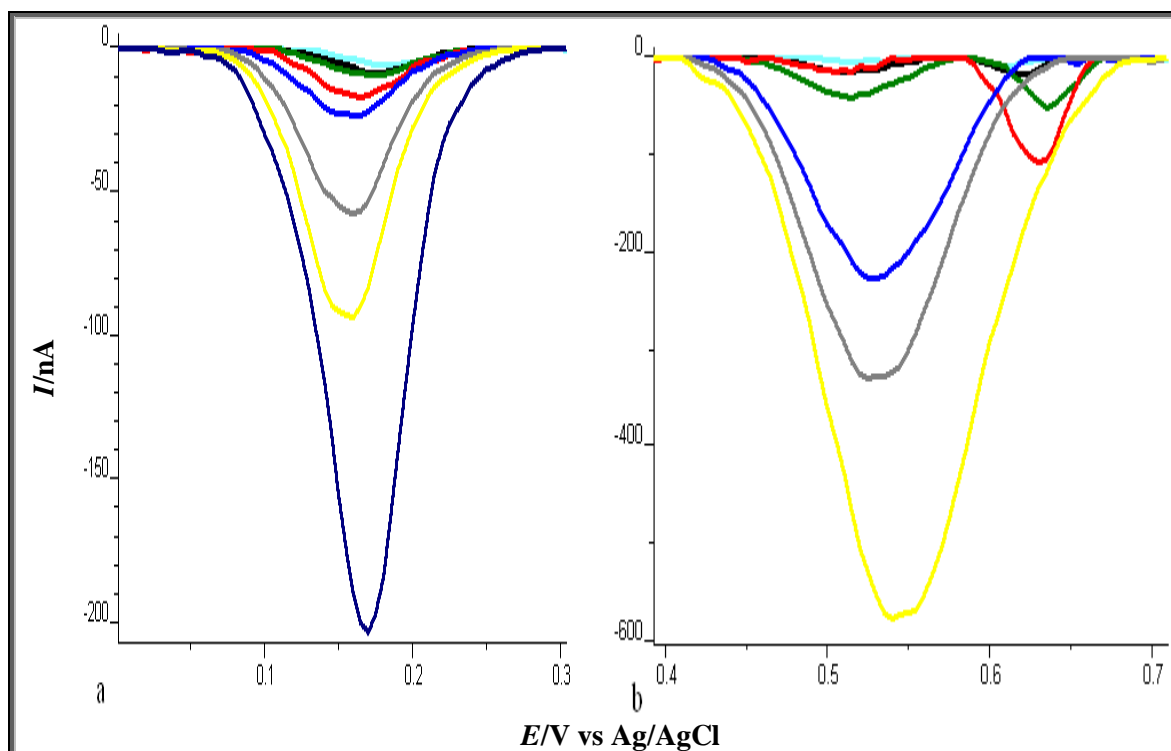
Πίνακας 10.2. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης γαλλικού οξέος καθοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	$\text{scan rate} = 0,01 \text{ V s}^{-1}$
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$E_{\text{dep}} = 0,6 \text{ V}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 240 \text{ s}$



Σχήμα 10. 47. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών αναγωγής στα 0,170 V και στα 0,535 V σε σχέση με την αύξηση της συγκεντρώσεως ποσότητας του γαλλικού οξέος με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.47) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την καθοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,170 V κυμαίνεται από $5 \cdot 10^{-7}$ έως $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,535 V κυμαίνεται από $2,5 \cdot 10^{-5}$ έως $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,170 V και στα 0,535 V είναι $I_{0,170 \text{ V}} = 11,107 (\pm 0,375) c_{ga} - 6,3675 (\pm 3,8521)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,993 και $I_{0,535 \text{ V}} = 0,853 (\pm 0,024) c_{ga} - 15,074 (\pm 8,588)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,996 αντίστοιχα. Τα όρια αντίχενωσης και ποσοτικού προσδιορισμού και για τις δυο κορυφές είναι τα ακόλουθα: $LOD_{0,170 \text{ V}} = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $LOQ_{0,170 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $LOD_{0,535 \text{ V}} = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $LOQ_{0,535 \text{ V}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεως ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,170 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 6,8% για τα επίπεδα συγκεντρώσεως ποσότητας, $5 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$ και $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,535 V βρέθηκε ίση με 6,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας, $2,5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} και $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 10.48. DPV βολταμογραφήματα.

- a.** Κορυφή αναγωγής στα 0,170 V, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.
- b.** Κορυφή αναγωγής στα 0,535 V, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα γαλλικού οξέος $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

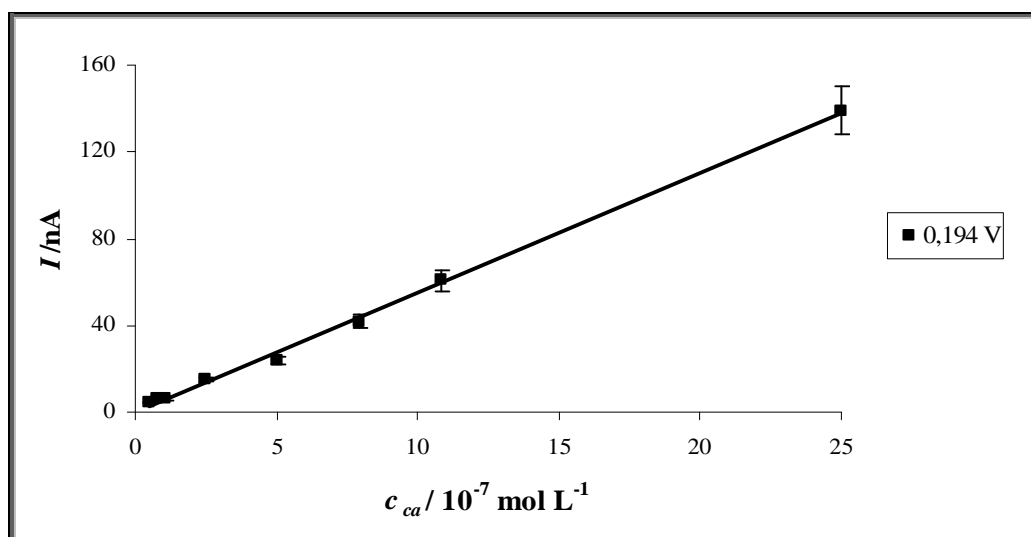
10.2.4.2 Καφεϊκό οξύ

Οξειδωση

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης ανοδικής σάρωσης δυναμικού του καφεϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

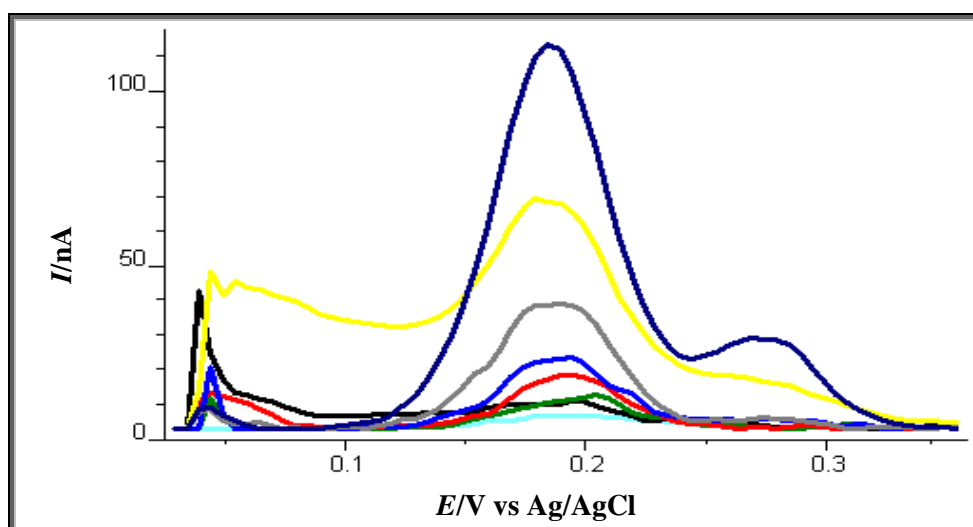
Πίνακας 10.3. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος ανοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	$\text{scan rate} = 0,05 \text{ V s}^{-1}$
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$E_{\text{dep}} = 1 \text{ V}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 240 \text{ s}$



Σχήμα 10. 49. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης στα 0,194 V σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του καφεϊκού οξέος με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.49) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,194 V κυμαίνεται από $5 \cdot 10^{-8}$ έως $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, ενώ η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων είναι $I_{0,194 \text{ V}} = 5,5245 (\pm 0,0968) c_{ca} - 0,1245 (\pm 0,9907)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,998. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: LOD_{0,194 V} = $1,5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ και LOQ_{0,194 V} = $5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹. Υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) ίση με 7,3% για n=6 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-7}$ και $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.



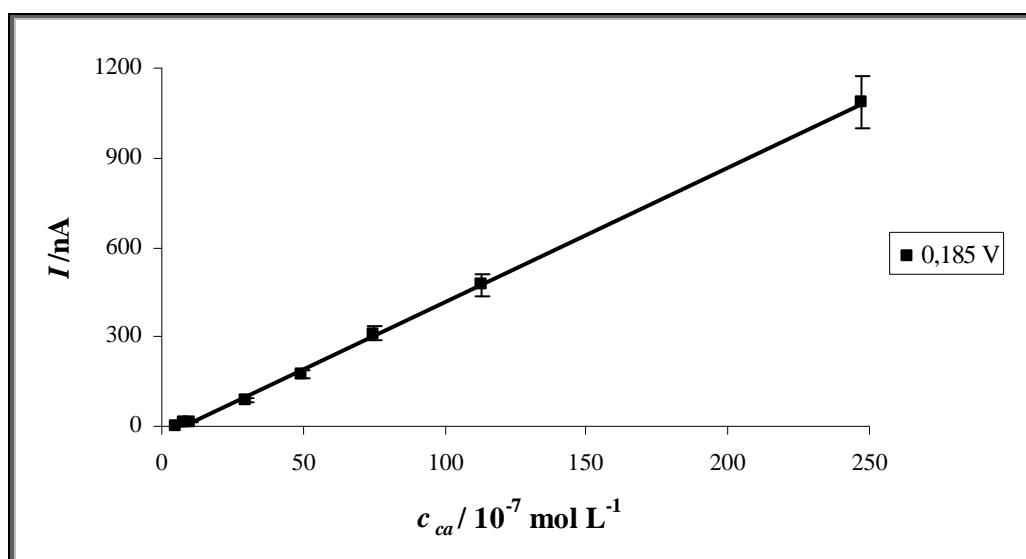
Σχήμα 10.50. DPV βολταμμογραφήματα: Κορυφή οξείδωσης στα 0,194 V, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος 10^{-7} mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $7,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος 10^{-6} mol L⁻¹, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Αναγωγή

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης καθοδικής σάρωσης δυναμικού του καφεϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

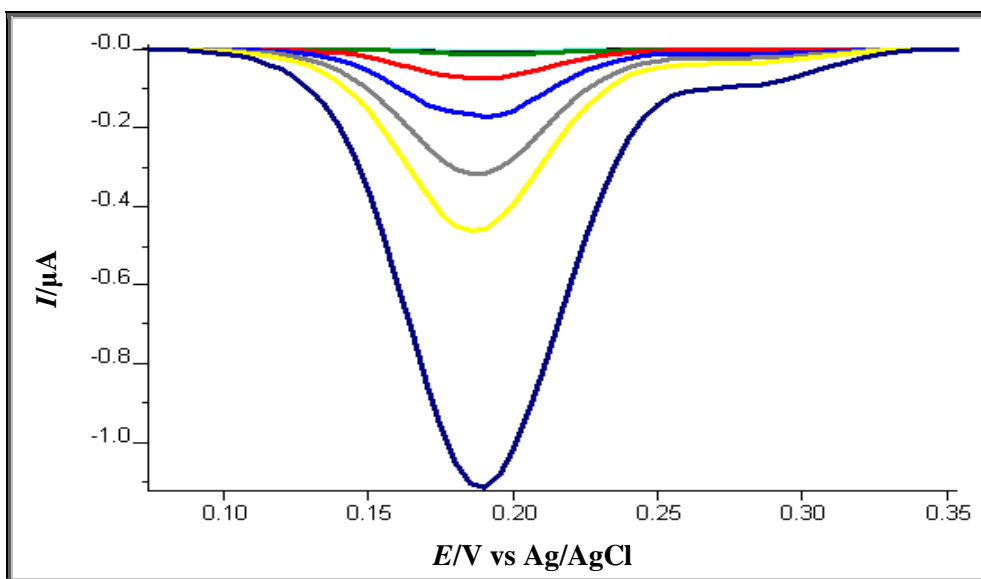
Πίνακας 10.4. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος καθοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	scan rate = 0,01 V/s
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$E_{\text{dep}} = 0,6 \text{ V}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 240 \text{ s}$



Σχήμα 10. 51. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής στα 0,185 V σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του καφεϊκού οξέος με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.51) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την καθοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,185 V κυμαίνεται από $5 \cdot 10^{-7}$ έως $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων είναι $I_{0,185 \text{ V}} = 4,512 (\pm 0,051) c_{ca} - 32,708 (\pm 5,191)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,999. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $\text{LOD}_{0,185 \text{ V}} = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{LOQ}_{0,185 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) ίση με 6,3% για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, $7,5 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$ και $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 10.52. DPV βολταμογραφήματα: Κορυφή αναγωγής στα 0,185 V, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα καφεϊκού οξέος $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

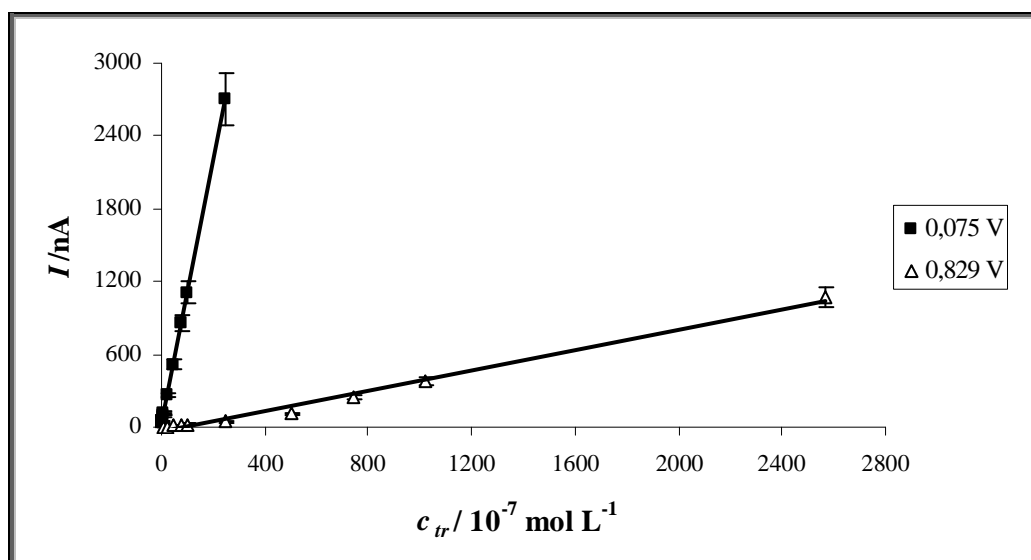
10.2.4.3 Trolox

Οξειδωση

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης ανοδικής σάρωσης δυναμικού του trolox χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

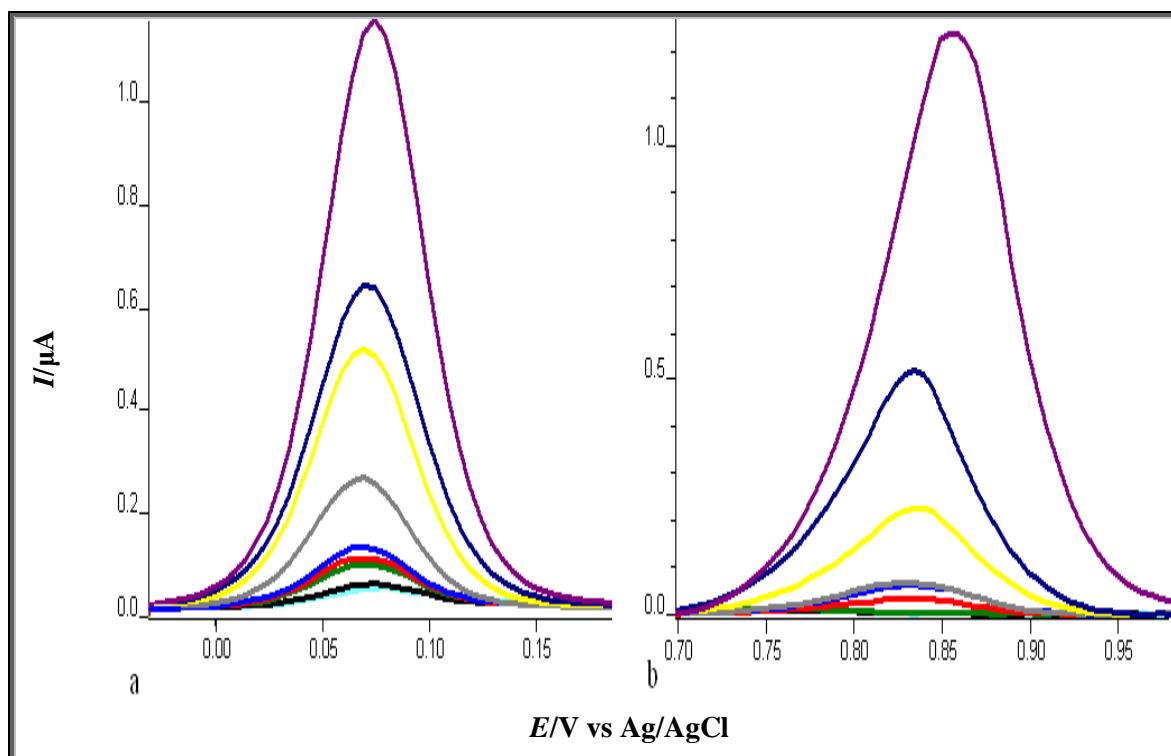
Πίνακας 10.5. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης του trolox ανοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορετικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	scan rate = 0,05 V/s
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$E_{\text{dep}} = 1 \text{ V}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 180 \text{ s}$



Σχήμα 10. 53. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος και των δυο κορυφών οξείδωσης στα 0,075 V και στα 0,829 V σε σχέση με την αύξηση της συγκεντρώσεως ποσότητας του trolox με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.53) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,075 V κυμαίνεται από 10^{-7} έως $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,829 V κυμαίνεται από 10^{-6} έως $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,075 V και στα 0,829 V είναι $I_{0,075 \text{ V}} = 10,789 (\pm 0,095) c_{tr} - 16,571 (\pm 8,592)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,999 και $I_{0,829 \text{ V}} = 0,4177 (\pm 0,0143) c_{tr} - 32,412 (\pm 13,225)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,991 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $\text{LOD}_{0,075 \text{ V}} = 2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,075 \text{ V}} = 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{LOD}_{0,829 \text{ V}} = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,829 \text{ V}} = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,075 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 7,1% για τα επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, 10^{-7} , $2,5 \cdot 10^{-6}$ και $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 0,829 V βρέθηκε ίση με 6,9% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας, $2,5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$ και $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 10.54. DPV βολταμογραφήματα.

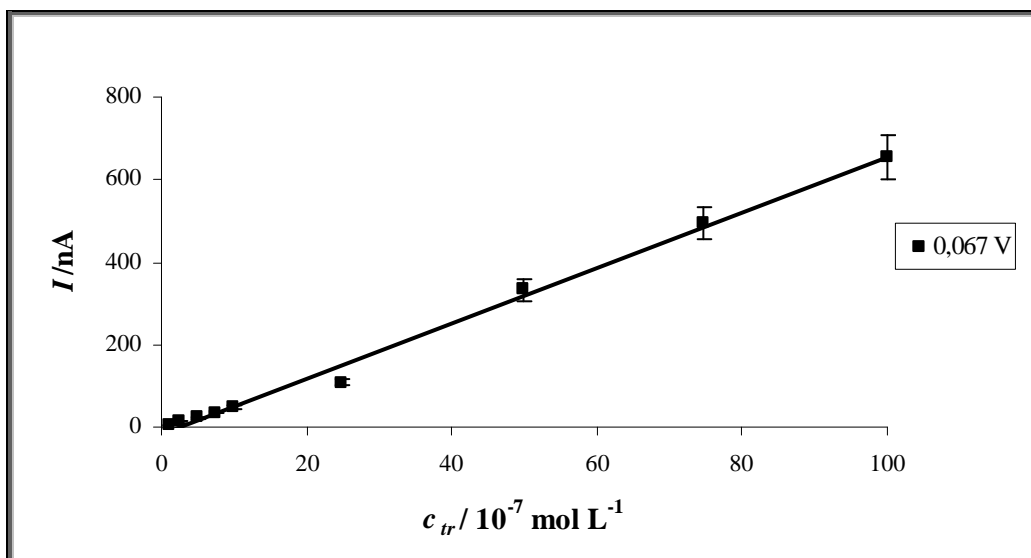
- a.** Κορυφή οξείδωσης στα 0,075 V, — διάλυμα trolox $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.
- b.** Κορυφή οξείδωσης στα 0,829 V, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Αναγωγή

Για τη χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης καθοδικής σάρωσης δυναμικού διαλύματος trolox χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές των ακόλουθων παραμέτρων.

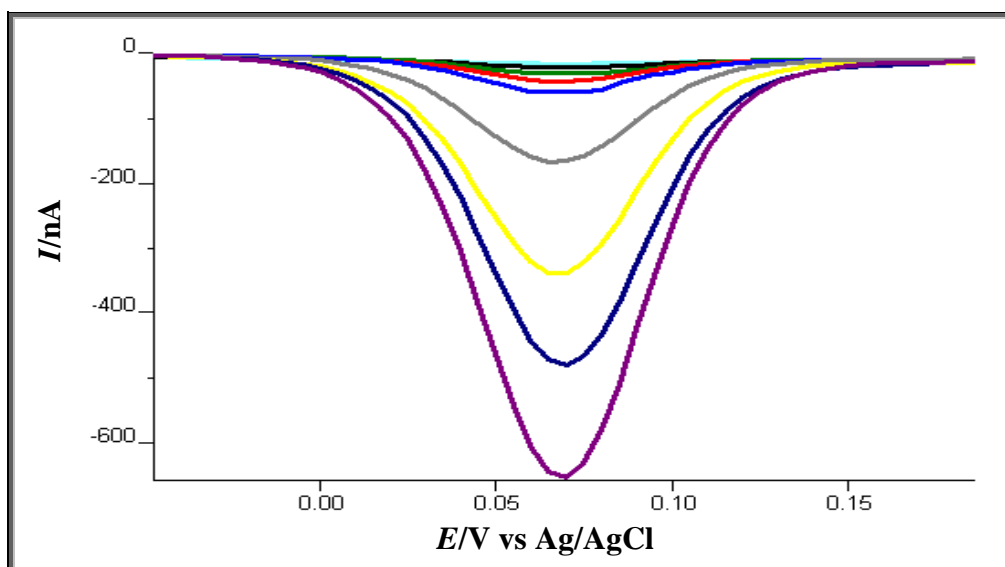
Πίνακας 10.6. Συνθήκες καμπύλης βαθμονόμησης trolox καθοδικής σάρωσης δυναμικού με χρήση διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	scan rate = 0,01 V/s
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$E_{\text{dep}} = 0,4 \text{ V}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 180 \text{ s}$



Σχήμα 10. 55. Γραμμική περιοχή της μεταβολής της έντασης του ρεύματος της κορυφής αναγωγής στα 0,067V σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του trolox με DPV.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 10.55) της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την καθοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,067 V κυμαίνεται από 10^{-7} έως 10^{-5} mol L⁻¹. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων είναι $I_{0,067\text{ V}} = 6,7063 (\pm 0,1856) c_{tr} - 14,437 (\pm 8,4936)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,995. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $LOD_{0,067\text{ V}} = 5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ και $LOQ_{0,067\text{ V}} = 10^{-7}$ mol L⁻¹. Υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) ίση με 8,2% για n=6 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, 10^{-7} , 10^{-6} και 10^{-5} mol L⁻¹.

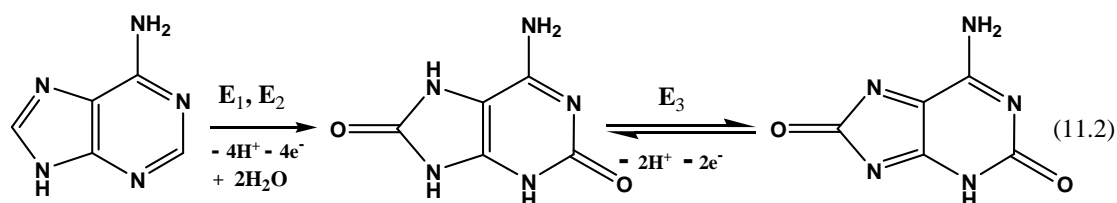
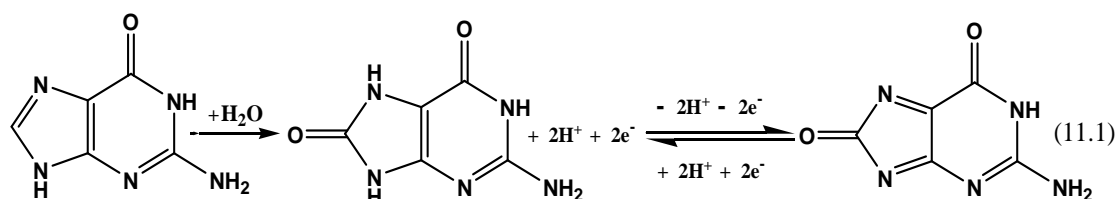


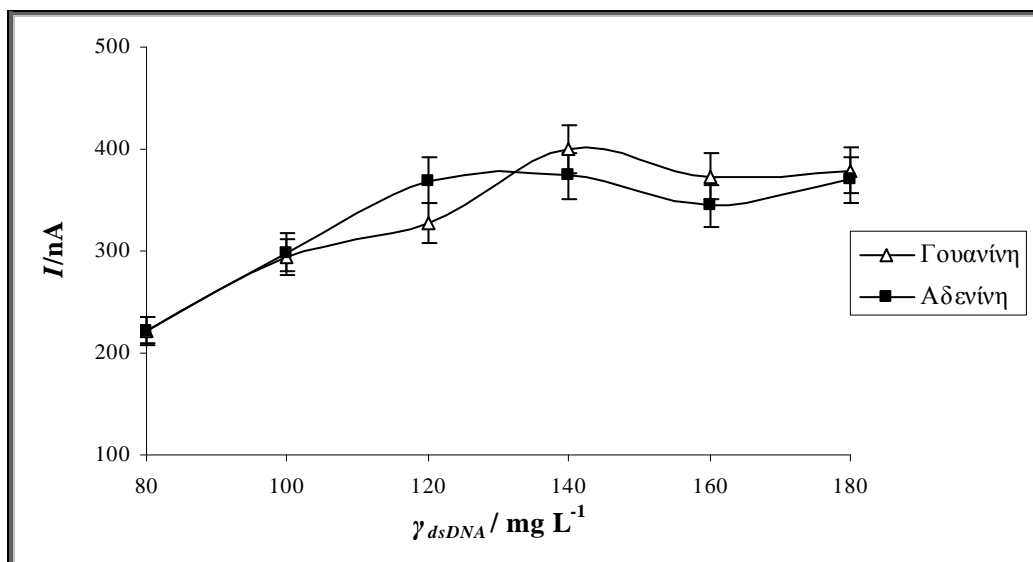
Σχήμα 10. 56. DPV βολταμογραφήματα: Κορυφή αναγωγής στα 0,067 V, — διάλυμα trolox 10^{-7} mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox 10^{-6} mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, — διάλυμα trolox 10^{-5} mol L⁻¹.

ΚΕΦ. 11 ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

11.1 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ

Για τη μελέτη της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα παρακαταθήκης dsDNA από θύμο αδένα βοοειδούς συγκέντρωσης μάζας 1 g L^{-1} και διάλυμα tris-HCl $10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ με EDTA $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, ως διαλύτης. Με εφαρμογή δυναμικού $+0,5\text{ V}$ για 300 s και ταυτόχρονη ανάδευση του διαλύματος, λάμβανε χώρα προσρόφηση μέσω ηλεκτροστατικής δέσμευσης διαδοχικών συγκεντρώσεων μάζας του αρνητικά φορτισμένου βιομορίου του dsDNA στη θετικά φορτισμένη ηλεκτροδιακή επιφάνεια [171]. Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο ξεπλενόταν και μεταφέρονταν σε κυψελίδα με ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,2\text{ mol L}^{-1}$ με NaCl $0,02\text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,6$, όπου λάμβανε χώρα η ηλεκτροχημική οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης για ανοδική σάρωση δυναμικού από 0 έως $1,4\text{ V}$ και ταχύτητα σάρωσης ίση με $0,025\text{ V s}^{-1}$. Με αυτόν τον τρόπο επιλέχθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση μάζας διαλύματος dsDNA για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας. Το κριτήριο για αυτήν την επιλογή ήταν η μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης (αντίδραση 11.1) και της αδενίνης (αντίδραση 11.2) στα $1,024\text{ V}$ και $1,294\text{ V}$ αντίστοιχα με αύξηση της συγκέντρωσης μάζας του dsDNA [182-3]. Ως βέλτιστη θεωρήθηκε η συγκέντρωση μάζας 140 mg L^{-1} dsDNA, όπου η ένταση του ρεύματος λαμβάνει μέγιστη τιμή και έπειτα σταθεροποιείται (σχήμα 11.1).



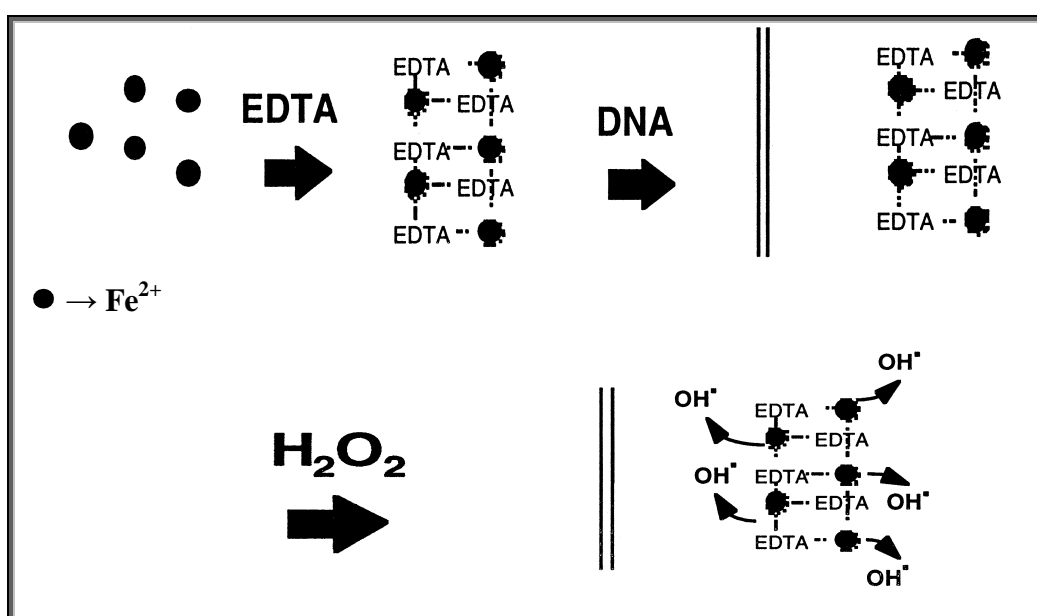


Σχήμα 11. 1. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης μάζας του dsDNA.

11.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON

Το σύστημα Fenton επιλέχθηκε ως ένα αποτελεσματικό μέσο για τη χημική οξείδωση του βιομορίου του dsDNA. Το παραπάνω σύστημα αποτελείται από ιόντα Fe^{2+} , EDTA και H_2O_2 . Η χημική οξείδωση του ακινητοποιημένου dsDNA στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια επιτυγχάνεται καταρχήν εμβαπτίζοντας το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο σε κυψελίδα που περιέχει σύμπλοκα ιόντα $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$, ενώ ουσιαστικά η αντίδραση Fenton ξεκινά με την προσθήκη H_2O_2 σε συγκεκριμένους όγκους χωρίς ανάδευση. Οι $\cdot\text{OH}$ που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης προσεγγίζουν το βιομόριο και το οξειδώνουν μέσω διάχυσης. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα για το οποίο το ηλεκτρόδιο παρέμενε εμβαπτισμένο στο σύστημα Fenton και που προέκυψε έπειτα από διαδικασία βελτιστοποίησης, το ηλεκτρόδιο ξεπλενόταν και μεταφερόταν σε κυψελίδα που περιείχε μόνο ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ με NaCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ και $\text{pH}=4,6$ και λάμβανε χώρα η μέτρηση. Με την παραπάνω μεθοδολογία επιτυγχάνεται έμμεσος προσδιορισμός του αριθμού των βάσεων που οξειδώνονται χημικά. Ουσιαστικά η χημική οξείδωση του dsDNA, συγκεκριμένα της γουανίνης και της αδενίνης που μελετώνται, περιορίζει τον αριθμό των μορίων των παραπάνω βάσεων που οξειδώνονται ηλεκτροχημικά με εφαρμογή δυναμικού στο τελευταίο στάδιο της μετάλλαξης σήματος. Ως αποτέλεσμα το οξειδωτικό σήμα που λαμβάνεται μειώνεται σημαντικά. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι

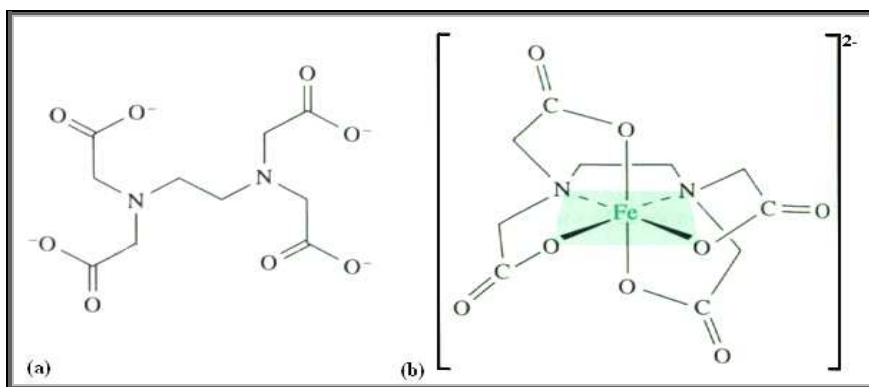
παρόλο που το EDTA δεν αποτελεί βιολογικό συμπλοκοποιητικό παράγοντα, χρησιμοποιήθηκε τόσο για λόγους διαλυτότητας, αλλά κυρίως για τη δέσμευση, μέσω ισχυρής συμπλοκοποίησης, των ιόντων Fe^{2+} (σχήμα 11.2). Στην περίπτωση όπου τα ιόντα παρέμεναν ελεύθερα, θα δεσμευόταν από τις βάσεις του dsDNA σε συγκεκριμένες θέσεις και ως συνέπεια η χημική οξείδωση θα πραγματοποιούνταν μόνο σε αυτές τις θέσεις και όχι μέσω διάχυσης των ριζών υδροξυλίου σε όλο το μόριο του dsDNA που παρήχθησαν από την αντίδραση Fenton. Το παραπάνω φαινόμενο που αποκαλείται 'site-specific damage' είναι ανεπιθύμητο γιατί επηρεάζει τόσο την ακρίβεια όσο και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων (Κεφ. 3.5).



Σχήμα 11. 2. Σχηματική αναπαράσταση συμπλοκοποίησης των ιόντων Fe^{2+} και χημικής οξείδωσης του dsDNA από ρίζες OH^\bullet [110].

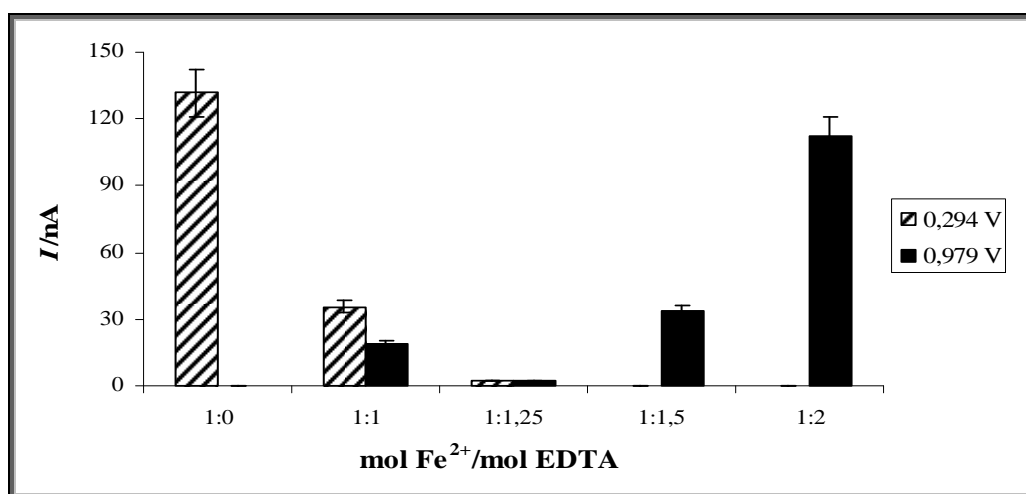
11.2.1 Δημιουργία συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-}$

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται σαφώς ότι το EDTA σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα Fe^{2+} και Fe^{3+} σε μοριακή αναλογία 1:1 (σχήμα 11.3) [184].



Σχήμα 11. 3. (a) Ανιόν EDTA, (b) Σύμπλοκο [Fe(EDTA)]²⁻

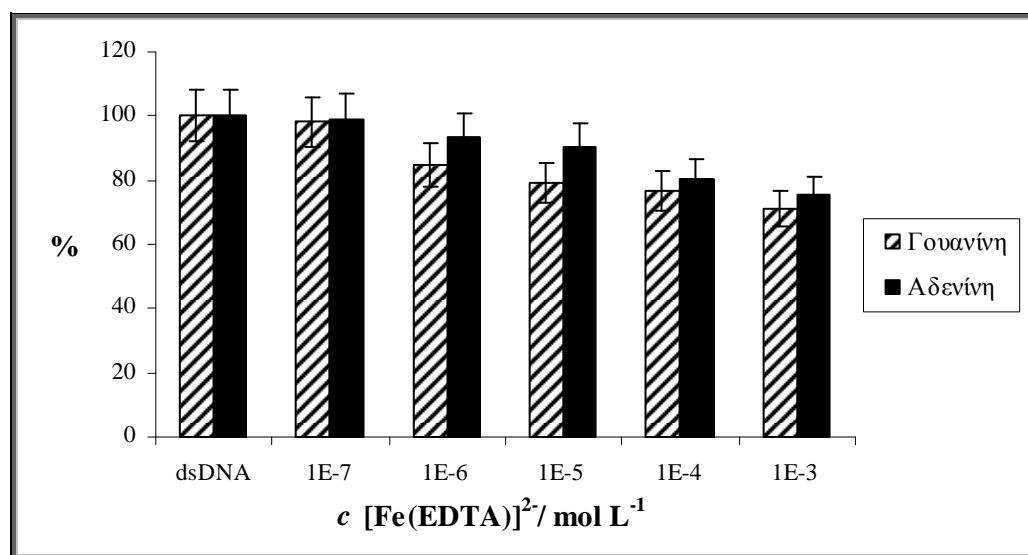
Για τη διασφάλιση όμως της πλήρους συμπλοκοποίησης του σιδήρου πραγματοποιήθηκε επιλογή της βέλτιστης αναλογίας με διαδοχικές προσθήκες EDTA σε σταθερό όγκο διαλύματος Fe²⁺. Η επιλογή βασίστηκε στη μείωση του οξειδωτικού σήματος που λαμβάνεται για την κορυφή στα 0,294 V που αντιστοιχεί στην ηλεκτροχημική οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή. Για μοριακή αναλογία 1:1,25 επιτυγχάνεται σχεδόν ποσοτική συμπλοκοποίηση και δέσμευση του Fe²⁺ από το EDTA. Επιπλέον διαπιστώνεται ότι σε μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες όπως 1:1,5 και 1:2 μηδενίζεται η ένταση του οξειδωτικού ρεύματος που αντιστοιχεί στην ηλεκτροχημική οξείδωση του Fe²⁺, αλλά αυξάνεται η ένταση του οξειδωτικού ρεύματος που αντιστοιχεί στην ηλεκτροχημική οξείδωση του μορίου του EDTA (σχήμα 11.4). Το φαινόμενο αυτό επηρεάζει σημαντικά την ακρίβεια των αποτελεσμάτων διότι η συγκεκριμένη κορυφή στα 0,979 V αλληλεπικαλύπτεται με την κορυφή στα 1,024 V που αντιστοιχεί στην ηλεκτροχημική οξείδωση της γουανίνης.



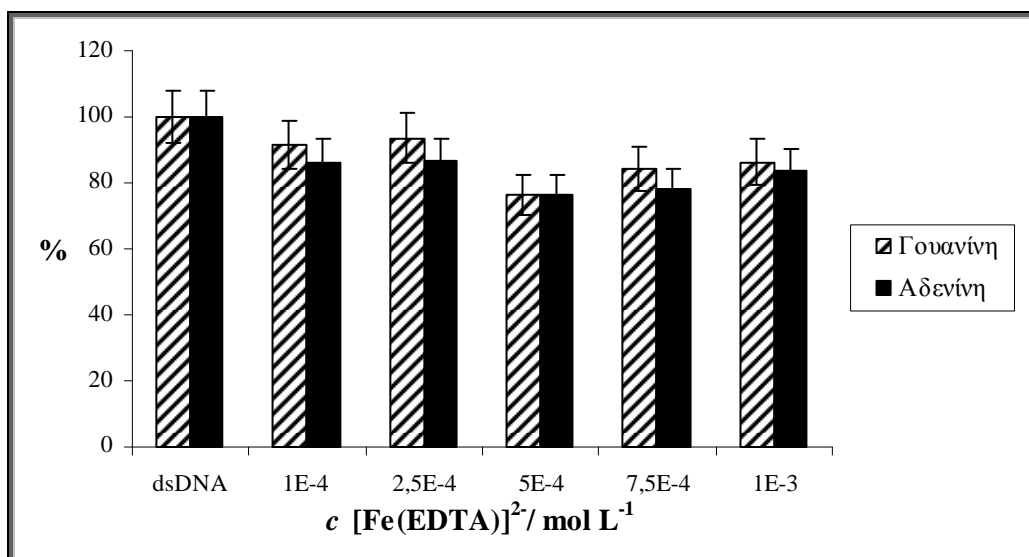
Σχήμα 11. 4. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης του Fe²⁺ και του EDTA για διαδοχικές μοριακές αναλογίες.

11.2.2 Βέλτιστη συγκέντρωση συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο επιλέγεται η βέλτιστη συγκέντρωση του συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ που προκαλεί τη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και αδενίνης για σταθερή μοριακή αναλογία $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2 = 1:40$ και χρόνο εμφάπτισης του ηλεκτροδίου στο σύστημα Fenton 300 s. Τόσο η μοριακή αναλογία $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2$, όσο και ο χρόνος αλληλεπίδρασης επελέγησαν από μελέτη της βιβλιογραφίας για τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων [149]. Στη συνέχεια μελετώνται και επιλέγονται οι βέλτιστες τιμές αυτών. Στο σχήμα 11.5 παρουσιάζεται το ποσοστό κατά το οποίο μειώνεται το οξειδωτικό ρεύμα των βάσεων για αυξανόμενες συγκεντρώσεις ποσότητας συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$. Όταν το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος των βάσεων που οξειδώνονται ηλεκτροχημικά μειώνεται, συμπεραίνεται ότι το αντίστοιχο ποσοστό των βάσεων που οξειδώνεται χημικά μέσω του συστήματος Fenton αυξάνεται. Με βάση αυτό το κριτήριο, επιλέχθηκε η τιμή $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, όπου παρατηρείται το μικρότερο ποσοστό ηλεκτροχημικής οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης $\sim 70\%$. Για την παραπάνω επιλογή μελετήθηκαν συγκεντρώσεις ποσότητας συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ από 10^{-7} έως $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (σχήματα 11.5, 11.6).



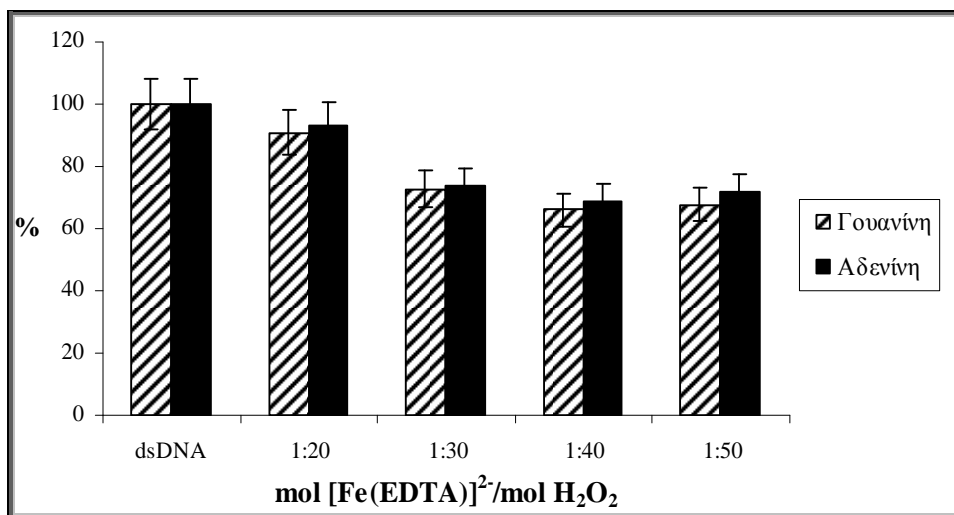
Σχήμα 11. 5. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ από 10^{-7} έως $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{mol}[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{molH}_2\text{O}_2=1:40$, $t_{im}=300 \text{ s}$).



Σχήμα 11. 6. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-}$ από 10^{-4} έως $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{mol}[Fe(EDTA)]^{2-} / \text{molH}_2\text{O}_2=1:40$, $t_{im}=300 \text{ s}$).

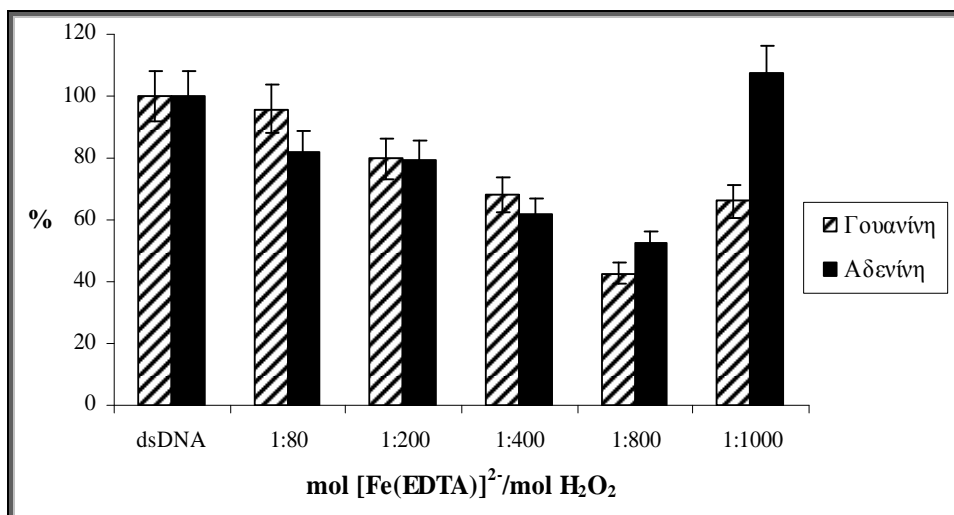
11.2.3 Βέλτιστη μοριακή αναλογία συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-} / H_2O_2$

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο μελετάται και επιλέγεται η μοριακή αναλογία συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-} / H_2O_2$ που προκαλεί την μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και αδενίνης, πρακτική ίδια με αυτή που εξηγήθηκε λεπτομερώς στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφ. 11.2.2). Η συγκέντρωση του συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-}$, $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, προέκυψε από προηγούμενη διαδικασία βελτιστοποίησης, ενώ ως χρόνος εμβάπτισης του ηλεκτροδίου στο σύστημα Fenton επελέγησαν τα 300 s όπως και στο κεφάλαιο 11.2.2. Επιλέχθηκε λοιπόν η μοριακή αναλογία συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-} / H_2O_2 = 1:800$, όπου παρατηρείται το μικρότερο ποσοστό ηλεκτροχημικής οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης 45%. Για την παραπάνω επιλογή μελετήθηκαν μοριακές αναλογίες συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-} / H_2O_2$ από 1:20 έως 1:1000 (σχήματα 11.7, 11.8).



Σχήμα 11. 7. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση της μοριακής αναλογίας συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2+}/H_2O_2$ από 1:20 έως 1:50

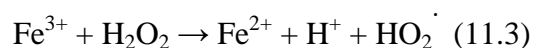
($c [Fe(EDTA)]^{2+} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $t_{im} = 300 \text{ s}$).

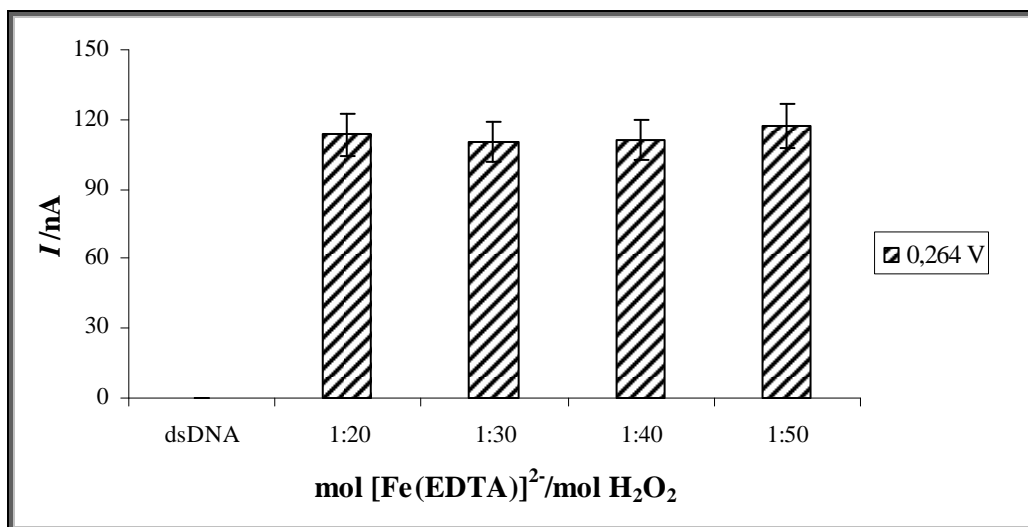


Σχήμα 11. 8. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση της μοριακής αναλογίας συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2+}/H_2O_2$ από 1:80 έως 1:1000

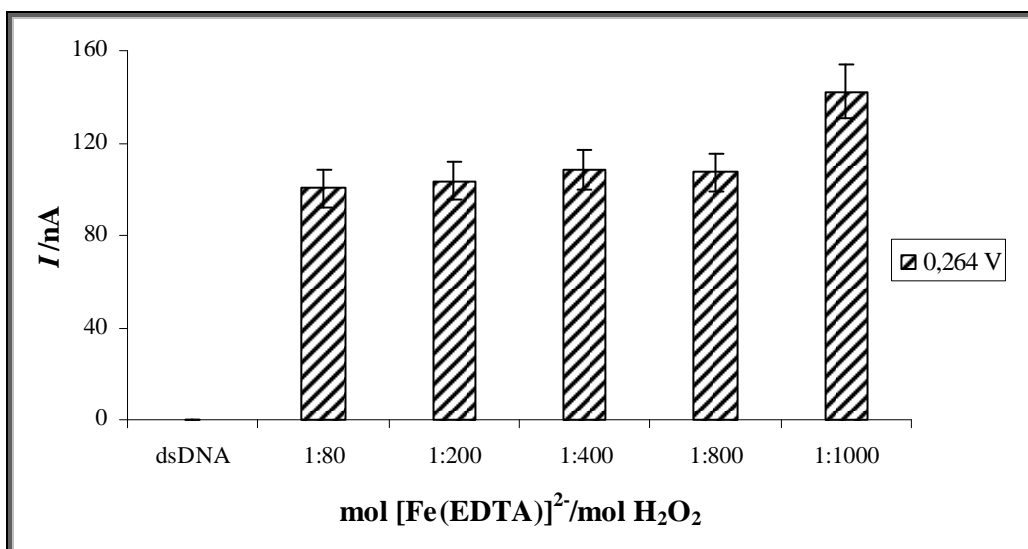
($c [Fe(EDTA)]^{2+} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $t_{im} = 300 \text{ s}$).

Κατά την εκτέλεση των συγκεκριμένων πειραματικών μετρήσεων μελετήθηκε και η μεταβολή του οξειδωτικού ρεύματος μιας κορυφής στα 0,264 V σε σχέση με τη μοριακή αναλογία συμπλόκου / H₂O₂ (σχήματα 11.9, 11.10), η οποία πιθανότατα οφείλεται στην ηλεκτροχημική οξείδωση ιόντων Fe²⁺ που αναγεννιούνται από το σύστημα Fenton λόγω της μεγάλης περίσσειας του H₂O₂, σύμφωνα με την αντίδραση 11.3 [185]. Το οξειδωτικό ρεύμα που αντιστοιχεί στο παραπάνω φαινόμενο μεγιστοποιείται για μέγιστη αναλογία 1:1000.





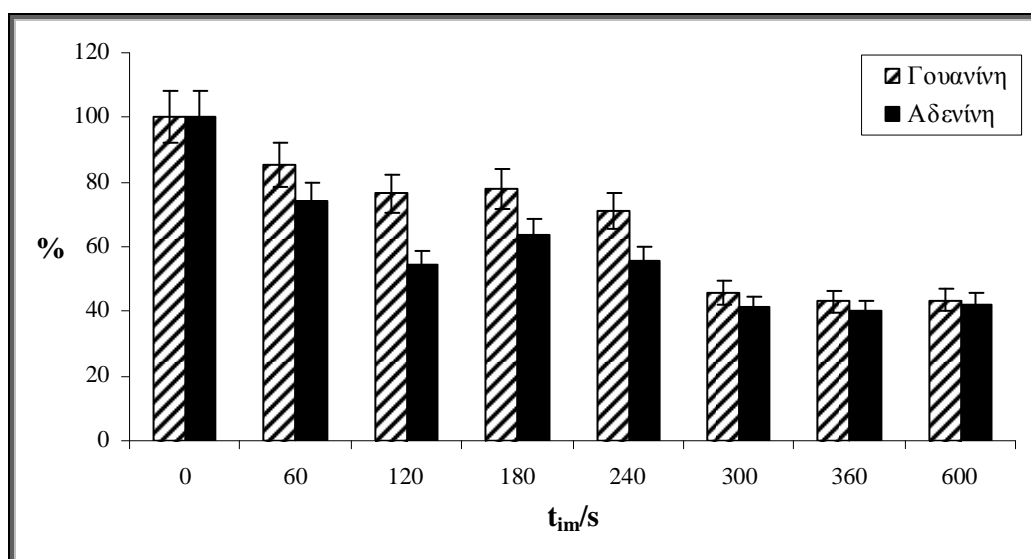
Σχήμα 11. 9. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της κορυφής στα 0,264 V με αύξηση της μοριακής αναλογίας συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-}/H_2O_2$ από 1:20 έως 1:50 ($c [Fe(EDTA)]^{2-}=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $t_{im}=300 \text{ s}$).



Σχήμα 11. 10. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της κορυφής στα 0,264 V με αύξηση της μοριακής αναλογίας συμπλόκου $[Fe(EDTA)]^{2-}/H_2O_2$ από 1:80 έως 1:1000 ($c [Fe(EDTA)]^{2-}=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $t_{im}=300 \text{ s}$).

11.2.4 Χρόνος εμβάπτισης για τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA

Η μελέτη του χρόνου εμβάπτισης του ηλεκτροδίου ($t_{\text{immersion}}$ ή t_{im}) για την επίτευξη μέγιστης χημικής οξείδωσης του dsDNA ολοκληρώνει την διαδικασία βελτιστοποίησης της αντίδρασης Fenton. Όπως παρατηρείται στο σχήμα 11.11, για χρόνο 300 s επιτυγχάνεται η μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA και ως αποτέλεσμα αυτή η τιμή θεωρήθηκε βέλτιστη, ενώ στη συνέχεια το οξειδωτικό σήμα σταθεροποιείται μέχρι τα 600 s.



Σχήμα 11. 11. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση του χρόνου εμβάπτισης του ηλεκτροδίου

($c [Fe(EDTA)]^{2-} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{mol } [Fe(EDTA)]^{2-} / \text{mol } H_2O_2 = 1:800$, $\gamma_{dsDNA} = 140 \text{ mg L}^{-1}$).

11.3 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των βιοαισθητήρων των φαινολικών οξέων περιλαμβάνει τη μελέτη και επιλογή του βέλτιστου χρόνου αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα. Στη συνέχεια κατασκευάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης των βιοαισθητήρων και ακολουθεί η μελέτη της επαναληψιμότητας των μετρήσεων. Οι πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια συνοψίζονται στον πίνακα 11.1 και έχουν εφαρμοστεί στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών οξέων.

Πίνακας 11. 1. Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης βιοαισθητήρων φαινολικών οξέων.

Φέρων ηλεκτρολύτης:	
$\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,2 mol L ⁻¹	$\gamma_{\text{dsDNA}} = 140 \text{ mg L}^{-1}$
+ NaCl 0,02 mol L ⁻¹ (pH = 4,6)	$E_{\text{dep}} = 0,5 \text{ V}$
$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	$t_{\text{dep}} = 300 \text{ s}$
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	Αντίδραση Fenton:
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$c [\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	mol [Fe(EDTA)] ²⁻ /
$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$	mol H ₂ O ₂ = 1:800
scan rate = 0,025 V s ⁻¹	$t_{\text{im}} = 300 \text{ s}$

11.3.1 Χρόνος αλληλεπίδρασης συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα

Η μελέτη του χρόνου αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα είναι η τελευταία παράμετρος που βελτιστοποιείται πριν την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης των βιοαισθητήρων των τριών φαινολικών οξέων. Οι χρόνοι αλληλεπίδρασης που μελετώνται είναι κοινοί και για τα τρία φαινολικά οξέα, των οποίων η τελική συγκέντρωση ποσότητας στο σύστημα Fenton είναι 10⁻⁴ mol L⁻¹. Οι τιμές που επελέγησαν για τη μελέτη είναι τα 0, 60, 180, 300 και 600 s. Για χρόνο $t_{\text{inter}}=0$, το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας με dsDNA εμβαπτίζεται σε κυψελίδα που περιέχει το αντιδραστήριο Fenton ταυτόχρονα με την προσθήκη συγκεκριμένου όγκου διαλύματος φαινολικού οξέος. Το ηλεκτρόδιο εργασίας παραμένει εμβαπτισμένο για χρονικό διάστημα $t_{\text{im}}=300 \text{ s}$, το οποίο προέκυψε από τη διαδικασία βελτιστοποίησης για τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA από το σύστημα

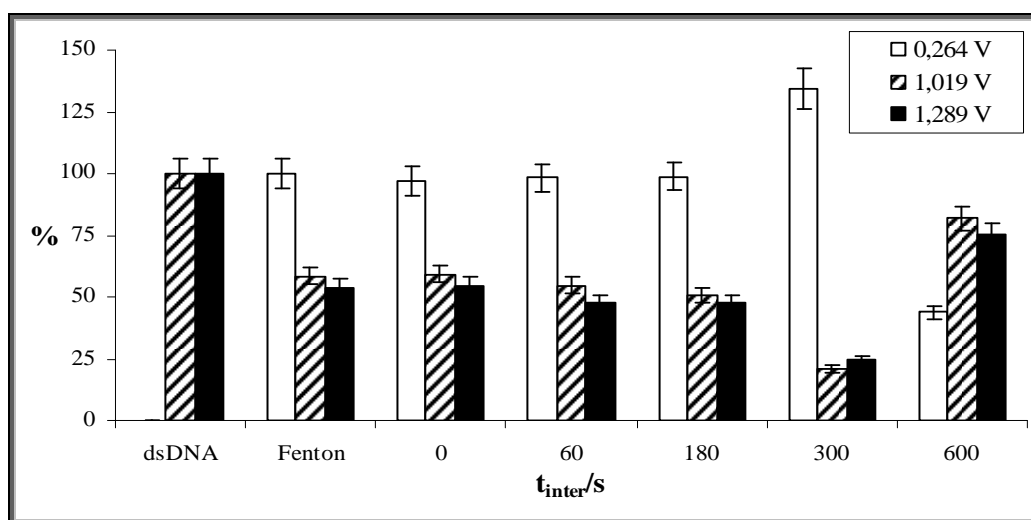
Fenton. Δεν απομένει δηλαδή χρόνος στο φαινολικό οξύ να αλληλεπιδράσει με το αντιδραστήριο Fenton που προϋπάρχει στην κυψελίδα. Για $t_{inter}=60, 180, 300$ και 600 s, το φαινολικό οξύ αλληλεπιδρά με το αντιδραστήριο Fenton για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα και αμέσως μετά το πέρας αυτού εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο εργασίας για χρονικό διάστημα $t_{im}=300$ s, όπως και στη προηγούμενη περίπτωση. Οι υπόλοιπες συνθήκες παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 11.1.

11.3.1.1 Γαλλικό οξύ

Στο σχήμα 11.12 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της έντασης του οξειδωτικού ρεύματος των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V που αντιστοιχούν στην ηλεκτροχημική οξείδωση των ιόντων Fe^{2+} , της γουανίνης και της αδενίνης σε σχέση με το χρόνο αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με διάλυμα γαλλικού οξέος. Ως 100% για τη γουανίνη και την αδενίνη θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού διαλύματος dsDNA συγκέντρωσης μάζας 140 mg L^{-1} , ενώ για την κορυφή στα 0,264 V ως 100% θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση μετά την αλληλεπίδραση του dsDNA με το σύστημα Fenton. Αυτό γίνεται για να διαπιστωθεί το ποσοστό ανάκτησης του οξειδωτικού σήματος όλων των κορυφών σε σχέση με τα αρχικά ποσοστά και κατά συνέπεια η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε φαινολικού οξέος-αντιοξειδωτικού.

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι για $t_{inter}=0, 60$ και 180 s δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή στο ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος και των τριών κορυφών σε σχέση με το οξειδωτικό ρεύμα που αντιπροσωπεύει τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA. Για $t_{inter}=300$ s, που συμπίπτει με $t_{im}=300$ s, δηλαδή με το χρονικό διάστημα για το οποίο παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια λαμβάνει χώρα μέγιστη οξείδωση του dsDNA, αυξάνεται κατά 35% το οξειδωτικό ρεύμα της κορυφής στα 0,264 V, ενώ μειώνεται στο 20% το οξειδωτικό ρεύμα των κορυφών στα 1,019 και 1,289 V, σε σχέση με την αρχική τιμή (100%), που αντιστοιχούν στις κορυφές οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης, αρκετά μικρότερο του 60%, ποσοστό που αντιστοιχεί στη χημική οξείδωση του dsDNA από το οξειδωτικό σύστημα Fenton. Για $t_{inter}=600$ s, μειώνεται κατά 57% το οξειδωτικό ρεύμα της κορυφής στα 0,264 V, ενώ αυξάνεται το οξειδωτικό ρεύμα των κορυφών στα 1,019 και 1,289 V στο 80%, που αντιστοιχούν στις κορυφές οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη γαλλικού

οξέος τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ για χρόνο αλληλεπίδρασης 600 s προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού σήματος κατά 25% από το ποσοστό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης. Η τιμή λοιπόν $t_{\text{inter}}=600 \text{ s}$ επιλέγεται ως βέλτιστη καθώς παρατηρείται μέγιστη ανάκτηση του οξειδωτικού σήματος της γουανίνης και της αδενίνης σε σχέση με αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης.



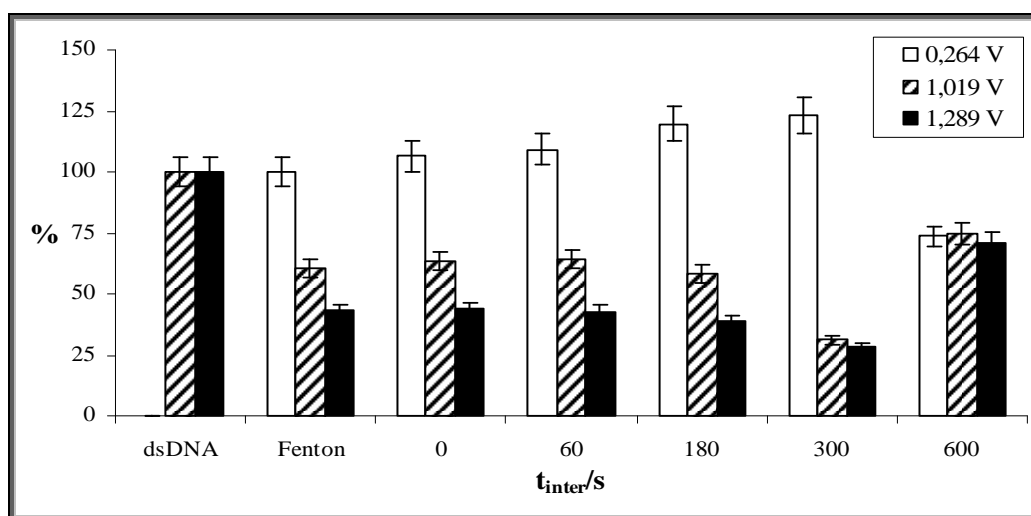
Σχήμα 11. 12. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με διάλυμα γαλλικού οξέος ($c [\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{mol} [\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-} / \text{mol H}_2\text{O}_2 = 1:800$, $\gamma_{\text{dsDNA}} = 140 \text{ mg L}^{-1}$, $c_{\text{ga}} = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

11.3.1.2 Καφεϊκό οξύ

Στο σχήμα 11.13 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της έντασης του οξειδωτικού ρεύματος των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V που αντιστοιχούν στην ηλεκτροχημική οξείδωση των ιόντων Fe^{2+} , της γουανίνης και της αδενίνης, σε σχέση με το χρόνο αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με διάλυμα καφεϊκού οξέος. Ως 100% για τη γουανίνη και την αδενίνη θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού διαλύματος dsDNA συγκέντρωσης μάζας 140 mg L^{-1} , ενώ για την κορυφή στα 0,264 V ως 100% θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση μετά την αλληλεπίδραση του dsDNA με το σύστημα Fenton, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του γαλλικού οξέος. Είναι εμφανές από το σχήμα 11.13, ότι για $t_{\text{inter}}=0, 60$ και 180 s δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή στο ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της γουανίνης και αδενίνης σε σχέση με το οξειδωτικό ρεύμα που αντιπροσωπεύει τη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA, συμπεριφορά παρόμοια με

αυτή του γαλλικού οξέος. Το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής στα 0,264 V αυξάνεται σταδιακά για τα χρονικά διαστήματα 0, 60, 180 και 300 s. Για $t_{inter}=300$ s, που συμπίπτει με $t_{im}=300$ s, μειώνεται στο 30% το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος των κορυφών στα 1,109 και 1,289 V που αντιστοιχούν στις κορυφές οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης, αρκετά μικρότερο από το 60%, ποσοστό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA από το οξειδωτικό σύστημα Fenton. Για $t_{inter}=600$ s, μειώνεται στο 73% το οξειδωτικό ρεύμα της κορυφής στα 0,264 V, ενώ αυξάνεται το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος των κορυφών στα 1,109 και 1,289 V στο 74,6% και 71,2 %.

Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη καφεϊκού οξέος τελικής συγκέντρωσης ποσότητας 10^{-4} mol L⁻¹ για χρόνο αλληλεπίδρασης 600 s προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού σήματος κατά 20% από το ποσοστό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης. Η τιμή $t_{inter}=600$ s επιλέγεται ως βέλτιστη καθώς παρατηρείται μέγιστη ανάκτηση του οξειδωτικού σήματος της γουανίνης και της αδενίνης σε σχέση με αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του γαλλικού οξέος.

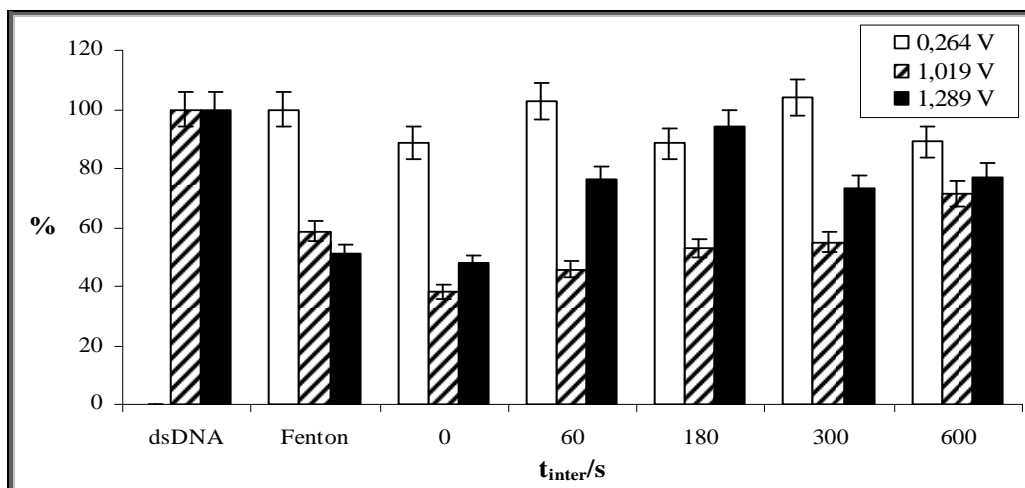


Σχήμα 11. 13. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με διάλυμα καφεϊκού οξέος ($c [Fe(EDTA)]^{2-}=5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, mol $[Fe(EDTA)]^{2-}/$ mol $H_2O_2= 1:800$, $\gamma_{dsDNA}=140$ mg L⁻¹, $c_{ca}=10^{-4}$ mol L⁻¹).

11.3.1.3 Trolox

Στο σχήμα 11.14 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της έντασης του οξειδωτικού ρεύματος των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V που αντιστοιχούν στην ηλεκτροχημική οξείδωση των ιόντων Fe^{2+} , της γουανίνης και της αδενίνης, σε σχέση με τον χρόνο αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με το trolox. Ως 100% για τη γουανίνη και την αδενίνη θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού διαλύματος dsDNA συγκέντρωσης μάζας 140 mg L^{-1} , ενώ για την κορυφή στα 0,264 V ως 100% θεωρείται το οξειδωτικό ρεύμα που λαμβάνεται κατά την ανοδική σάρωση μετά την αλληλεπίδραση του dsDNA με το σύστημα Fenton, όπως ακριβώς και στην περίπτωση των δυο φαινολικών οξέων που μελετήθηκαν προηγουμένως. Από τη μελέτη του σχήματος 11.14, δεν εξάγεται ασφαλές συμπέρασμα για τη μεταβολή στο ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής στα 0,264 V. Το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής στα 1,019 V, που αντιστοιχεί στη γουανίνη, αυξάνεται σταδιακά για τα χρονικά διαστήματα 0, 60, 180 και 300 s, ενώ λαμβάνει τη μέγιστη τιμή του, 73%, για $t_{\text{inter}}=600 \text{ s}$. Παρατηρείται όμως μείωση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος για $t_{\text{inter}}=0$ και 60 s στην τιμή 40%, σε σχέση με το 60%, ποσοστό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση του dsDNA από το οξειδωτικό σύστημα Fenton, γεγονός που διαφοροποιεί το trolox από το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής στα 1,284 V, που αντιστοιχεί στην αδενίνη, αυξομειώνεται για τα χρονικά διαστήματα 0, 60, 180, 300 και 600 s και για αυτό το λόγο δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη μεταβολή του ηλεκτροχημικού σήματος. Για $t_{\text{inter}}=600 \text{ s}$, όπου το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής που αντιστοιχεί στη γουανίνη λαμβάνει τη μέγιστη τιμή του, το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της κορυφής που αντιστοιχεί στην αδενίνη προσεγγίζει το 77%, που αντιστοιχεί στη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή.

Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη trolox τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ για χρόνο αλληλεπίδρασης 600 s προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού σήματος κατά 13% σε σχέση με το ποσοστό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωση της γουανίνης. Η τιμή $t_{\text{inter}}=600 \text{ s}$ επιλέγεται ως βέλτιστη καθώς παρατηρείται μέγιστη ανάκτηση του οξειδωτικού σήματος της γουανίνης σε σχέση με αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη χημική οξείδωσή της.

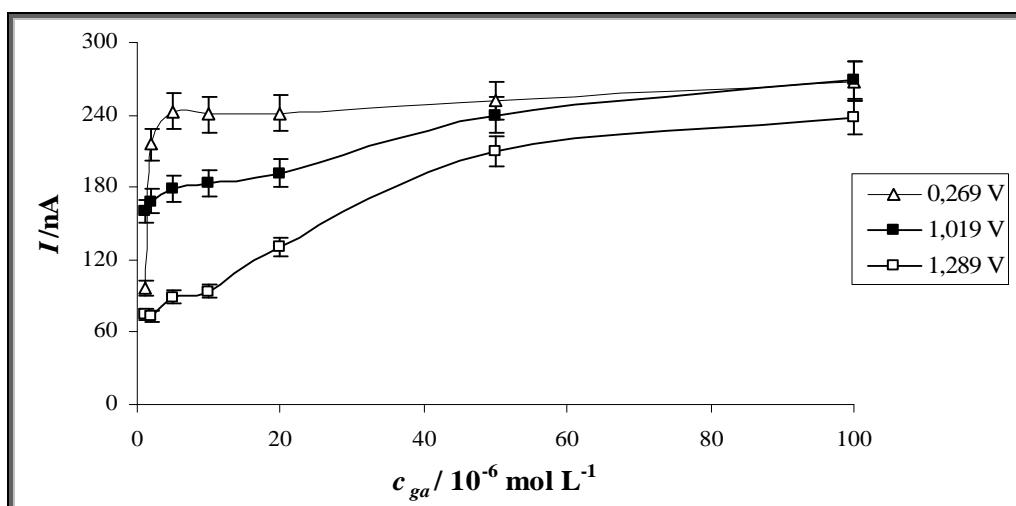


Σχήμα 11. 14. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος οξείδωσης των κορυφών στα 0,264, 1,019 και 1,289 V σε ποσοστιαία κλίμακα με αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με διάλυμα trolox ($c [Fe(EDTA)]^{2-} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{mol } [Fe(EDTA)]^{2-} / \text{mol } H_2O_2 = 1:800$, $\gamma_{dsDNA} = 140 \text{ mg L}^{-1}$, $c_{tr} = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

11.3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης των βιοαισθητήρων των φαινολικών οξέων

Η χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης ανοδικής σάρωσης δυναμικού των βιοαισθητήρων πραγματοποιήθηκε και για τα τρία φαινολικά οξέα αφότου μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν την αντίδραση Fenton (πίνακας 11.1) και ο χρόνος αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα που αποδείχθηκε κοινός, τα 600 s. Όλες οι τιμές των εντάσεων του ρεύματος που παρατίθενται ή τα ποσοστά αυτών είναι ο μέσος όρος για $n=3$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης. Επιπλέον μελετήθηκε και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων με τις ίδιες βέλτιστες συνθήκες, υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας.

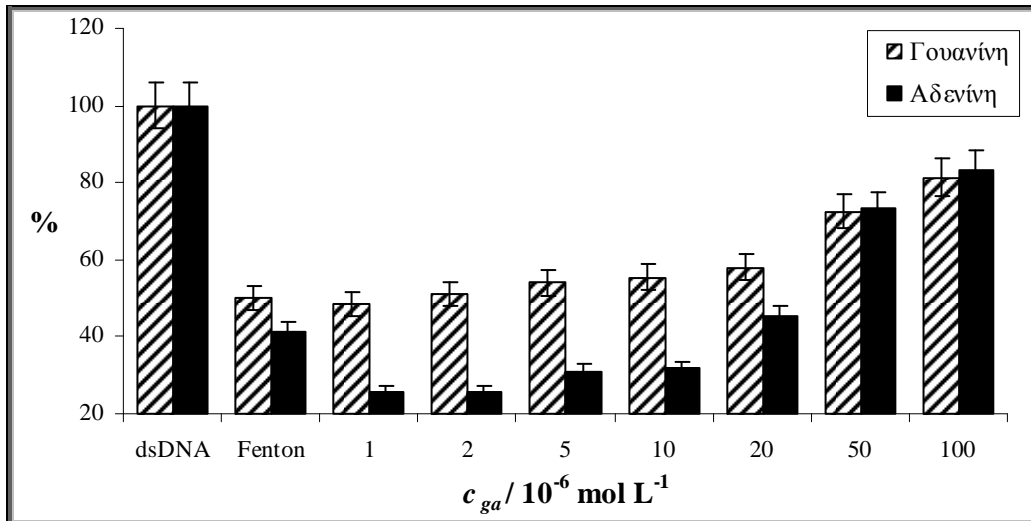
11.3.2.1 Γαλλικό οξύ



Σχήμα 11. 15. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των τριών κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την αύξηση της συγκεντρώσεως ποσότητας του γαλλικού οξέος με dsDNA βιοαισθητήρα.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 11.15) της καμπύλης βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα του γαλλικού οξέος κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,269 V κυμαίνεται από 10^{-5} έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, για την κορυφή στα 1,019 V που αντιστοιχεί στην κορυφή οξείδωσης της γουανίνης κυμαίνεται από $2 \cdot 10^{-6}$ έως $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ και για την κορυφή στα 1,289 V, που αντιστοιχεί στην κορυφή οξείδωσης της αδενίνης, κυμαίνεται από 10^{-6} έως $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,269 V, 1,019 V και 1,289 V είναι $I_{0,269 \text{ V}} = 0,3151 (\pm 0,0157) c_{ga} - 236,07 (\pm 0,89)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,995, $I_{1,019 \text{ V}} = 1,4238 (\pm 0,0891) c_{ga} - 167,53 (\pm 2,19)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,995 και $I_{1,289 \text{ V}} = 2,7984 (\pm 0,0925) c_{ga} - 70,633 (\pm 2,078)$ με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,996 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $\text{LOD}_{0,269 \text{ V}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,269 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOD}_{1,019 \text{ V}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{1,019 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOD}_{1,289 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{1,289 \text{ V}} = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

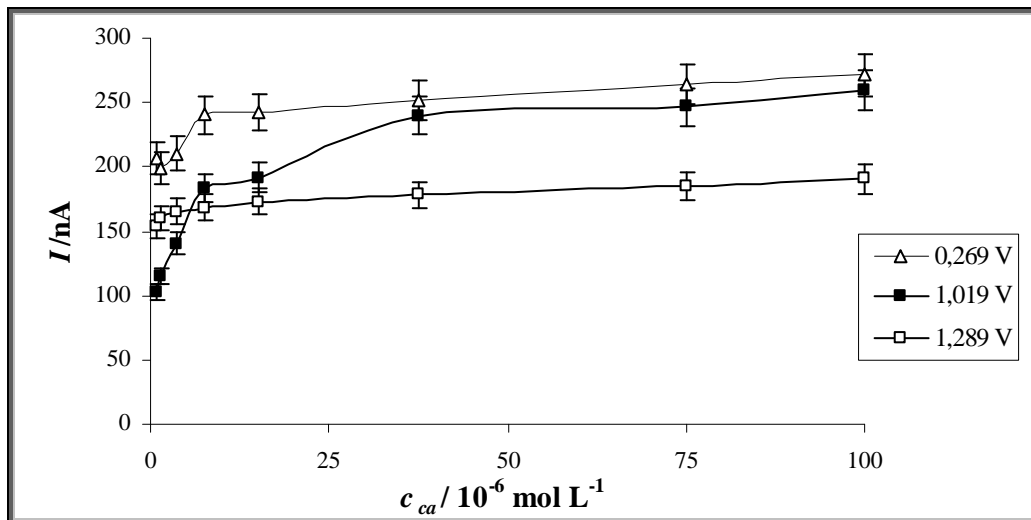
Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,269 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 8,9% για τα επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ και $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, για την κορυφή στα 1,019 V βρέθηκε ίση με 9,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας $2 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} και $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 1,289 V βρέθηκε ίση με 10,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας 10^{-6} , 10^{-5} και $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 11. 16. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του γαλλικού οξέος με dsDNA βιοαισθητήρα.

Το σχήμα 11.16 παρατίθεται για την ευκολότερη κατανόηση των μεταβολών των ποσοστών με την προσθήκη γαλλικού οξέος και την εξαγωγή συμπερασμάτων για την συμπεριφορά των κορυφών οξείδωσης **μόνο** της γουανίνης και της αδενίνης.

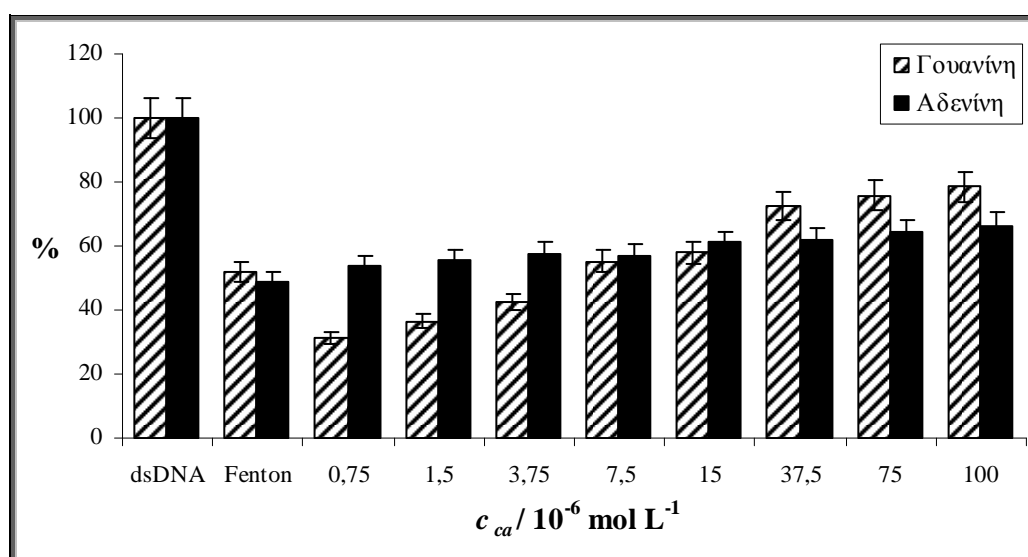
11.3.2.2 Καφεϊκό οξύ



Σχήμα 11. 17. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των τριών κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του καφεϊκού οξέος με dsDNA βιοαισθητήρα.

Η γραμμική περιοχή (σχήμα 11.17) της καμπύλης βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα του καφεϊκού οξέος κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,269 V κυμαίνεται από $7,5 \cdot 10^{-6}$ έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, για

την κορυφή στα 1,019 V που αντιστοιχεί στην κορυφή οξειδωσης της γουανίνης κυμαίνεται από $7,5 \cdot 10^{-7}$ έως $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ και για την κορυφή στα 1,289 V, που αντιστοιχεί στην κορυφή οξειδωσης της αδενίνης, κυμαίνεται από $7,5 \cdot 10^{-6}$ έως 10^{-4} mol L⁻¹. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,269 V, 1,019 V και 1,289 V είναι $I_{0,269 \text{ V}} = 0,3423 (\pm 0,0093) c_{ca} - 237,83 (\pm 0,55)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,998, $I_{1,019 \text{ V}} = 11,663 (\pm 0,373) c_{ca} - 95,906 (\pm 1,593)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,998 και $I_{1,289 \text{ V}} = 0,2235 (\pm 0,0925) c_{ca} - 70,633 (\pm 2,078)$ με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,991 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $LOD_{0,269 \text{ V}} = 3,75 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $LOQ_{0,269 \text{ V}} = 7,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $LOD_{1,019 \text{ V}} = 7,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, $LOQ_{1,019 \text{ V}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $LOD_{1,289 \text{ V}} = 7,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, $LOQ_{1,289 \text{ V}} = 3,75 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για n=6 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,269 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 9,6% για τα επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} και 10^{-4} mol L⁻¹, για την κορυφή στα 1,019 V βρέθηκε ίση με 9,8% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας $7,5 \cdot 10^{-7}$, $3,75 \cdot 10^{-6}$ και $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, ενώ για την κορυφή στα 1,289 V βρέθηκε ίση με 10,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας $7,5 \cdot 10^{-6}$, $3,75 \cdot 10^{-5}$ και 10^{-4} mol L⁻¹.

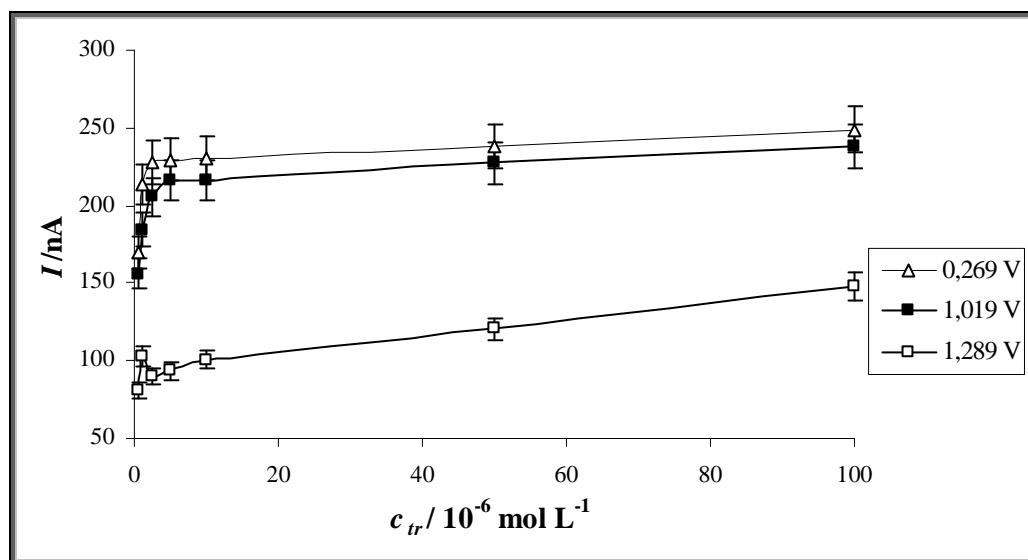


Σχήμα 11. 18. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξειδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του καφεϊκού οξέος με dsDNA βιοαισθητήρα.

Το σχήμα 11.18 παρατίθεται για την ευκολότερη εξαγωγή συμπερασμάτων για τη μεταβολή των κορυφών οξειδωσης **μόνο** της γουανίνης και της αδενίνης με την

προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων καφεϊκού οξέος.

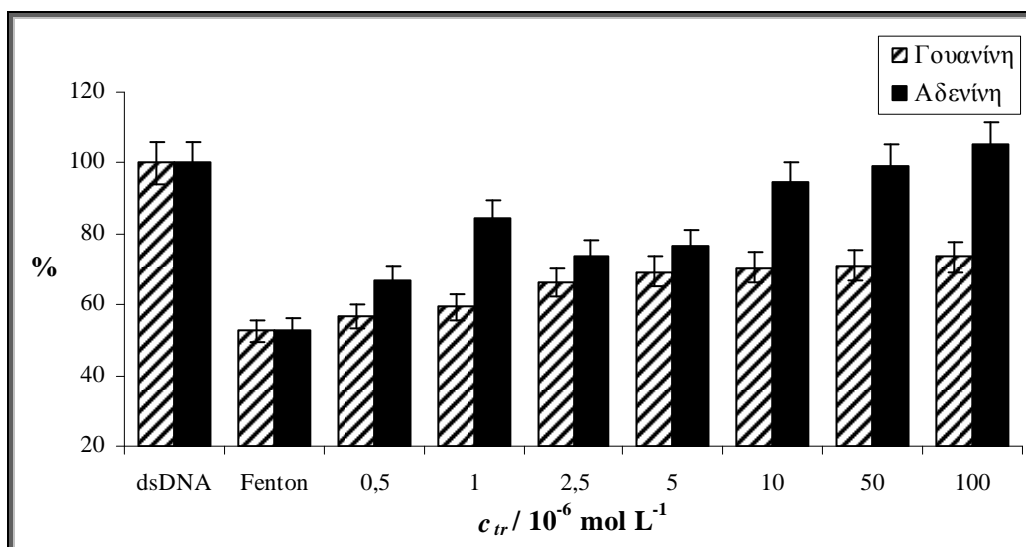
11.3.3.3 Trolox



Σχήμα 11. 19. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος και των τριών κορυφών οξείδωσης σε σχέση με την αύξηση της συγκεντρώσεως ποσότητας του trolox με dsDNA βιοαισθητήρα.

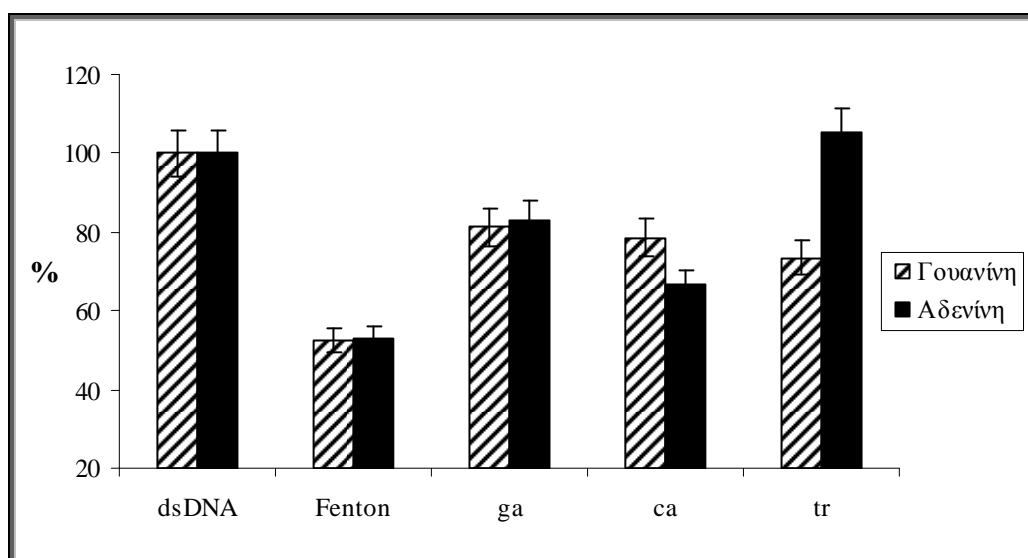
Η γραμμική περιοχή (σχήμα 11.19) της καμπύλης βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα του trolox κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού για την κορυφή που εμφανίζεται στα 0,269 V κυμαίνεται από $2,5 \cdot 10^{-6}$ έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, για την κορυφή στα 1,019 V, που αντιστοιχεί στην κορυφή οξείδωσης της γουανίνης, κυμαίνεται από $5 \cdot 10^{-6}$ έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ και για την κορυφή στα 1,289 V, που αντιστοιχεί στην κορυφή οξείδωσης της αδενίνης, κυμαίνεται από $2,5 \cdot 10^{-6}$ έως $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Οι εξισώσεις των ευθειών ελαχίστων τετραγώνων για τις κορυφές στα 0,269 V, 1,019 V και 1,289 V είναι $I_{0,269 \text{ V}} = 0,2068 (\pm 0,0063) c_{tr} - 228,04 (\pm 0,32)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,997, $I_{1,019 \text{ V}} = 0,2431 (\pm 0,0084) c_{tr} - 214,45 (\pm 0,47)$, με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,997 και $I_{1,289 \text{ V}} = 0,569 (\pm 0,033) c_{tr} - 91,25 (\pm 1,66)$ με συντελεστή συσχέτισης ίσο με 0,991 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα: $\text{LOD}_{0,269 \text{ V}} = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{0,269 \text{ V}} = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOD}_{1,019 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{1,019 \text{ V}} = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOD}_{1,289 \text{ V}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{LOQ}_{1,289 \text{ V}} = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (s_r) για $n=6$ επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας. Για την κορυφή στα 0,269 V η σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε ίση με 10,6% για τα επίπεδα συγκεντρώσεων ποσότητας, $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$ και $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, για την κορυφή στα 1,019 V βρέθηκε

ίση με 9,2% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$ και $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ενώ για την κορυφή στα 1,289 V βρέθηκε ίση με 8,5% για τις συγκεντρώσεις ποσότητας $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$ και $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Σχήμα 11. 20. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης ποσότητας του trolox με dsDNA βιοαισθητήρα.

Το σχήμα 11.20 παρατίθεται για την ευκολότερη εξαγωγή συμπερασμάτων για τη μεταβολή των κορυφών οξείδωσης **μόνο** της γουανίνης και της αδενίνης με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων του φαινολικού οξέος trolox.



Σχήμα 11. 21. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με την προσθήκη φαινολικών οξέων τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ με dsDNA βιοαισθητήρα.

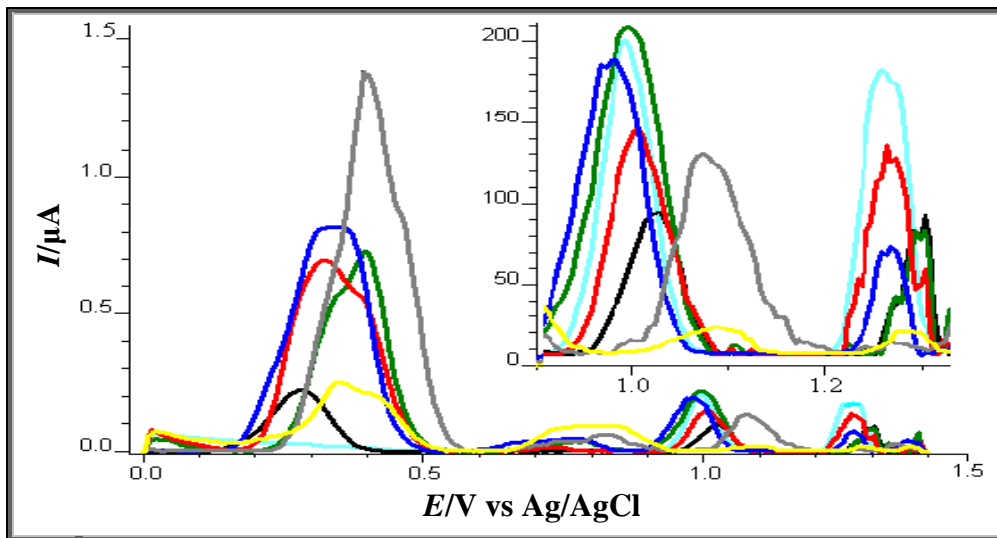
Στο σχήμα 11.21 παρατίθεται η μεταβολή του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης με την προσθήκη γαλλικού, καφεϊκού οξέος και τροlox τελικής συγκέντρωσης ποσότητας στο σύστημα 10^{-4} mol L⁻¹. Επιπλέον είναι εμφανής η διαφοροποίηση του οξειδωτικού ρεύματος με προσθήκη του κάθε φαινολικού οξέος ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, προσθήκη γαλλικού οξέος, καφεϊκού οξέος και τροlox τελικής συγκέντρωσης ποσότητας 10^{-4} mol L⁻¹ προκαλεί αύξηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος σε 81%, 78% και 73% αντίστοιχα. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι ο αριθμός των φαινολικών υδροξυλίων επηρεάζει την αύξηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος της γουανίνης και της αδενίνης και κατά συνέπεια την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων. Για παράδειγμα, το γαλλικό οξύ που περιέχει στο μόριο του τρία φαινολικά υδροξύλια προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος σε σχέση με το καφεϊκό οξύ που περιέχει δυο φαινολικά υδροξύλια, ενώ το καφεϊκό οξύ αντίστοιχα προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με το τροlox, του οποίου η δομή περιλαμβάνει ένα μόνο φαινολικό υδροξύλιο. Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα που παρατίθενται στη βιβλιογραφία με χρήση διαφόρων τεχνικών και μεθόδων για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας φαινολικών οξέων [186-9].

ΚΕΦ. 12 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ dsDNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

Τα υδατικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 8.4 (Παρασκευή εκχυλισμάτων βοτάνων). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των βοτάνων είναι πανομοιότυπη με αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 9.2 (Ανάπτυξη dsDNA βιοαισθητήρα), με τη διαφορά ότι αντί των φαινολικών οξέων προστίθενται συγκεκριμένοι όγκοι εκχυλισμάτων βοτάνων, όπως αναφέρεται χαρακτηριστικά και στο υποκεφάλαιο 9.2.4. Το αρχικό εκχύλισμα (παρακαταθήκης) που παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ήταν περιεκτικότητας 25% w/v, ενώ η περιεκτικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των οποίων η αντιοξειδωτική ικανότητα εν τέλει μελετήθηκε ήταν 2,5% w/v, έπειτα από αραίωση τους με το σύστημα Fenton. Οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες παρουσιάζονται στον πίνακα 11.2. Όλες οι τιμές των εντάσεων του ρεύματος που παρατίθενται ή τα ποσοστά αυτών είναι ο μέσος όρος για n=3 επαναλήψεις της ίδιας μέτρησης.

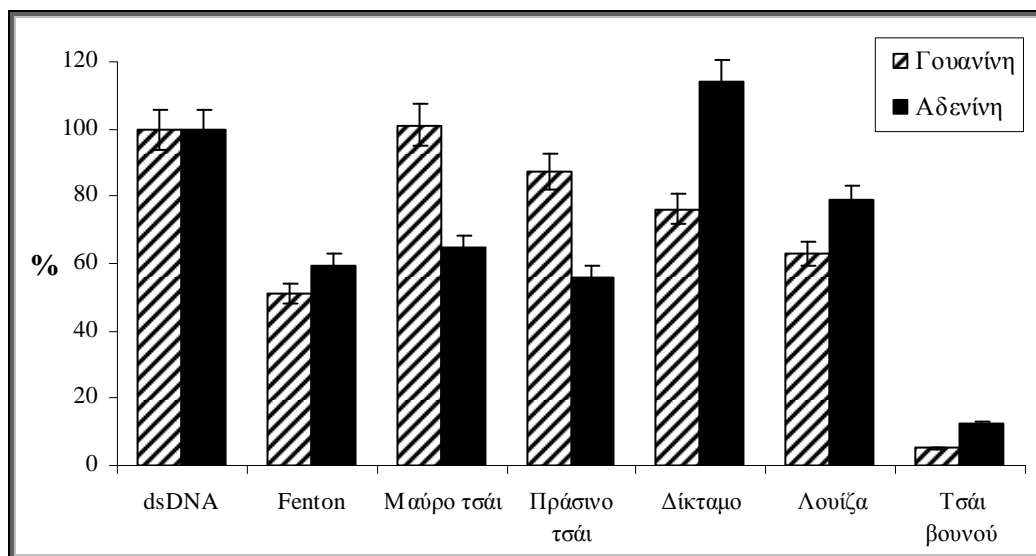
Πίνακας 11. 2. Πειραματικές συνθήκες μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων με dsDNA βιοαισθητήρα.

Φέρων ηλεκτρολύτης:	$\gamma_{\text{dsDNA}} = 140 \text{ mg L}^{-1}$
$\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$	$E_{\text{dep}} = 0,5 \text{ V}$
+ NaCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,6)	$t_{\text{dep}} = 300 \text{ s}$
$E_{\text{begin}} = 0 \text{ V}$	Αντίδραση Fenton:
$E_{\text{end}} = 1,4 \text{ V}$	$c [\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
$E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$	$\text{mol} [\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-} /$
$E_{\text{pulse}} = 0,025 \text{ V}$	$\text{mol H}_2\text{O}_2 = 1:800$
$t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$	$t_{\text{im}} = 300 \text{ s}$
$\text{scan rate} = 0,025 \text{ V s}^{-1}$	$t_{\text{inter}} = 600 \text{ s}$
	Υδατικά εκχυλίσματα βοτάνων
	περιεκτικότητας 25% w/v



Σχήμα 11. 22. DPV βολταμμογραφήματα dsDNA βιοαισθητήρων υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων περιεκτικότητας 2,5% w/v: — διάλυμα dsDNA 140 mg L⁻¹, — σύστημα Fenton, — μαύρο τσάι, — δίκταμο, — πράσινο τσάι, — λουίζα, — τσάι του βουνού.

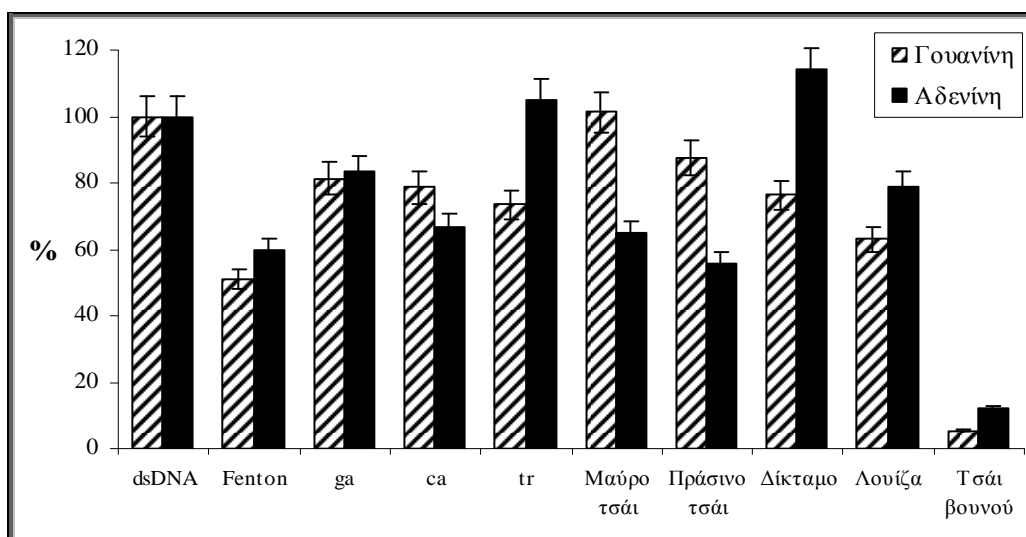
Στο σχήμα 11.22 παρατίθενται τα βολταμμογραφήματα που καταγράφηκαν με χρήση dsDNA βιοαισθητήρα για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βοτάνων όπως μαύρο τσάι, δίκταμο, πράσινο τσάι, λουίζα και τσάι του βουνού. Όπως παρατηρείται, εμφανίζονται κυρίως τρεις κορυφές στα 0,290 V, 1,019 V και 1,284 V, οι οποίες αποδίδονται στην ηλεκτροχημική οξείδωση των ιόντων Fe²⁺, της γουανίνης και της αδενίνης αντίστοιχα όπως ακριβώς συνέβη και στην περίπτωση των φαινολικών οξέων. Επιπλέον εμφανίζεται και μια τέταρτη κορυφή στα 0,780 V που αποδίδεται στο ηλεκτροχημικό προφίλ των βοτάνων.



Σχήμα 11. 23. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με χρήση dsDNA βιοαισθητήρων υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων περιεκτικότητας 2,5% w/v.

Στο σχήμα 11.23 παρατίθεται η μεταβολή του ρεύματος των κορυφών οξειδωσης της γουανίνης και της αδενίνης με την προσθήκη υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων, τα οποία είναι τελικής περιεκτικότητας 2,5% w/v στο σύστημα. Είναι εμφανής η διαφοροποίηση του οξειδωτικού ρεύματος για την προσθήκη εκχυλίσματος διαφορετικού βοτάνου. Συγκεκριμένα, τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων ίδιας περιεκτικότητας που μελετήθηκαν κατατάσσονται με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση την ανάκτηση που επιφέρει η προσθήκη τους στο ποσοστό του ρεύματος οξειδωσης της γουανίνης: τσάι του βουνού < λουΐζα < δίκταμο < πράσινο τσάι < μαύρο τσάι. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι το υδατικό εκχύλισμα μαύρου τσαγιού 2,5% w/v επαναφέρει πλήρως το ποσοστό του οξειδωτικού ρεύματος της γουανίνης.

Κατά συνέπεια, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι προστατεύει πλήρως το βιομόριο του dsDNA με συγκέντρωση μάζας $\gamma_{\text{dsDNA}} = 140 \text{ mg L}^{-1}$ από τη χημική οξείδωση που λαμβάνει χώρα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες υλοποίησης της αντίδρασης Fenton (πίνακας 11.2). Επιπλέον για το υδατικό εκχύλισμα του τσαγιού του βουνού δεν παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος σε σχέση με αυτό που λαμβάνεται με τη χημική οξείδωση από το σύστημα Fenton και κατά συνέπεια δεν θεωρείται ότι παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων πράσινο τσάι, δίκταμο και λουΐζα περιεκτικότητας 2,5% w/v προκαλούν αύξηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος σε σχέση με αυτό που λαμβάνεται με τη χημική οξείδωση από το σύστημα Fenton αλλά όχι σε τέτοια βαθμό όπως το μαύρο τσάι. Εμφανίζουν δηλαδή ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση την κατάταξη που αναφέρεται προηγουμένως.



Σχήμα 11. 24. Μεταβολή της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης σε ποσοστιαία κλίμακα με χρήση dsDNA βιοαισθητήρων φαινολικών οξέων $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ και υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων περιεκτικότητας 2,5% w/v.

Το σχήμα 11.24 παρατίθεται για σύγκριση της μεταβολής του ποσοστού του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης με την προσθήκη τόσο διαλυμάτων φαινολικών οξέων-αντιοξειδωτικών τελικής συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ όσο και υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων περιεκτικότητας 2,5% w/v. Είναι εμφανές ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων μαύρο και πράσινο τσάι περιεκτικότητας 2,5% w/v προκαλούν μεγαλύτερη ανάκτηση του ποσοστού του οξειδωτικού ρεύματος της γουανίνης σε σχέση με μεθανολικά διαλύματα γαλλικού, καφεϊκού οξέος και trolox συγκέντρωσης ποσότητας $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Αντίθετα τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων λουίζα και τσάι του βουνού περιεκτικότητας 2,5% w/v κρίνονται λιγότερο αποτελεσματικά στην προστασία των βάσεων, γουανίνη και αδενίνη, από τη χημική οξείδωση που προκαλείται μέσω της δημιουργίας ριζών $\cdot\text{OH}$ από την αντίδραση Fenton. Συγκεκριμένα, τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων ίδιας περιεκτικότητας που μελετήθηκαν και τα διαλύματα των φαινολικών οξέων κατατάσσονται με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής ικανότητας: τσάι του βουνού 2,5% w/v < λουίζα 2,5% w/v < trolox $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ < δίκταμο 2,5% w/v < καφεϊκό οξύ $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ < γαλλικό οξύ $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ < πράσινο τσάι 2,5% w/v < μαύρο τσάι 2,5% w/v.

ΚΕΦ. 13 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκαν λεπτομερώς τόσο η ηλεκτροχημική αλλά και η αντιοξειδωτική συμπεριφορά τριών αντιπροσωπευτικών φαινολικών οξέων, γαλλικό, καφεϊκό οξύ και trolox. Με χρήση κυκλικής βολταμμετρίας αποσαφηνίστηκε το είδος των δράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ανοδική και καθοδική σάρωση του δυναμικού. Κατά τη σάρωση διαλύματος γαλλικού οξέος λαμβάνουν χώρα δυο ημιαντιστρεπτές δράσεις, στα 0,320 V και 0,690 V, στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος λαμβάνει χώρα μια αντιστρεπτή δράση στα 0,324 V και του trolox μια ημιαντιστρεπτή δράση στα 0,170 V. Οι παραπάνω δράσεις αποδίδονται στη μεταφορά δυο ηλεκτρονίων και πρωτονίων αντίστοιχα για το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, ενώ στην περίπτωση του trolox η μεταφορά περιλαμβάνει μόνο ένα ηλεκτρόνιο και πρωτόνιο αντίστοιχα.

Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό τους με διαφορική παλμική βολταμμετρία, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, κατά την ανοδική και καθοδική σάρωση του δυναμικού. Κατά την ηλεκτροχημική μελέτη διαλύματος γαλλικού οξέος παρατηρήθηκαν δυο κορυφές οξειδωσης στα 0,199 και 0,551 V και δυο κορυφές αναγωγής στα 0,170 και 0,535 V. Αντίστοιχα παρατηρήθηκαν μια κορυφή οξειδωσης και μια αναγωγής στα 0,194 V και 0,185 V για το καφεϊκό οξύ και δυο κορυφές οξειδωσης στα 0,075 και 0,829 V και μια κορυφή αναγωγής στα 0,067 V για το trolox. Εν τέλει η χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φαινολικών οξέων κρίθηκε επιτυχής, με ικανοποιητική γραμμικότητα και επαναληψιμότητα.

Επιπλέον μελετήθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης Fenton για τη μέγιστη χημική οξειδωση του dsDNA, όπως η τιμή 1:1,25 ως βέλτιστη αναλογία ιόντων Fe^{2+} και EDTA για τη δημιουργία συμπλόκου, $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ η βέλτιστη συγκέντρωση του συμπλόκου, 1:800 η βέλτιστη αναλογία συμπλόκου $\text{Fe(EDTA)]}^{2-} / \text{H}_2\text{O}_2$, $t_{\text{im}} = 300 \text{ s}$ ο βέλτιστος χρόνος εμβάπτισης του ηλεκτροδίου στο σύστημα Fenton και $t_{\text{inter}} = 600 \text{ s}$ ο βέλτιστος χρόνος αλληλεπίδρασης του συστήματος Fenton με τα φαινολικά οξέα ή τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν dsDNA βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεθανολικών διαλυμάτων γαλλικού, καφεϊκού οξέος και trolox και απεδείχθη η ακόλουθη σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής ικανότητας: trolox < καφεϊκό οξύ < γαλλικό οξύ. Οι παραπάνω βιοαισθητήρες εφαρμόστηκαν και

στον προσδιορισμό και της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδατικών εκχυλισμάτων των βοτάνων, μαύρο και πράσινο τσάι, δίκταμο, λουίζα και τσάι του βουνού και προέκυψε η ακόλουθη κατάταξη: τσάι του βουνού < λουίζα < δίκταμο < πράσινο τσάι < μαύρο τσάι.

Συνοψίζοντας η παραπάνω ερευνητική εργασία προτείνει ένα προκαταρκτικό *in vitro* test για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φαινολικών οξέων ή κατ' επέκταση αντιοξειδωτικών διαφόρων κατηγοριών και υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων με σαφή πλεονεκτήματα το μειωμένο χρόνο ανάλυσης, το χαμηλό κόστος, την κατανάλωση μικρών όγκων οργανικών διαλυτών, το μειωμένο χρόνο προκατεργασίας των δειγμάτων και τη προσομοίωση του με τον τρόπο δράσης των αντιοξειδωτικών στον ανθρώπινο οργανισμό. Το επόμενο βήμα έγκειται στη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας συγκεκριμένων υποομάδων αντιοξειδωτικών όπως φαινολικών αντιοξειδωτικών ή φαινολικών οξέων στα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων, όπου με διαδοχικές εκχυλίσεις στερεάς φάσης (SPE) απομονώνονται συγκεκριμένες υποομάδες και μελετώνται μεμονωμένα με χρήση του προτεινόμενου dsDNA βιοαισθητήρα.

ΚΕΦ. 14 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Venkat Ratnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., and Ravi Kumar, M.N.V., *J. Control. Release*, 2006, **113**, 189–207
- [2] Becker, E.M., Nissen, L.R., and L.H., Skibsted, *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, **219**, 561–571
- [3] Halliwell, B., *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **49**, 1341-1348
- [4] Azzi, A., Davies, K.J.A., and Kelly, F., *FEBS Lett.*, 2004, **558**, 3–6
- [5] Manach, C., Scalbert, A., Morand, A., Rémésy, A., and Jimenez, L., *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727- 747
- [6] Escarpa, A., and Gonzalez, M.C., *Critical Rev. Anal. Chem.*, 2001, **31**, 57 — 139
- [7] Harborne, J.B., In *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, Dey, P.M., Harborne, J.B., London, 1989, 1-27
- [8] Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., and Yamasaki, H., *Toxicology*, 2002, **177**, 67–80
- [9] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G., *Trends Plant science*, 1997, **2**, 152-159
- [10] Roginsky, V., De Beer, D., Harbertson, J.F., Kilmartin, P.A., Barsukova, T., and Adams, D.O., *J. Sci. Food Agric.*, 2006, **86**, 834–840
- [11] Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H., *Food Chem. Toxic.*, 2000, **38**, 647-659
- [12] Clifford, M.N., *Planta Med.*, 2004, **70**, 1103–1114
- [13] Williamson, G., and Holst, B., *Brit. J. Nutr.*, 2008, **99**, S55–S58
- [14] Clifford, M.N., *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1033–1043
- [15] Lafay, S., and Gil-Izquierdo, A., *Phytochem. Rev.*, 2008, **7**, 301–311
- [16] Tomas-Barberan F.A., and Clifford M.N., *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1024–1032
- [17] Torronen R., Hakkinen S., Karenlampi S., and Mykkanen H., *Cancer Lett.*, 1997, **114**, 191–192
- [18] Herrmann, K., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, **28**, 315-347
- [19] Clifford, M.N., *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 362-372
- [20] Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., and Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5294-5299
- [21] King, A., and Young, G., *Am. Diet Assoc.*, 1999, **99**, 213-218
- [22] Shahidi, F., and Wanasundara, P.K.J.P.D., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992, **32**, 67-103
- [23] Mattila, P., and Hellström, J., *J. Food Compos. Anal.*, 2007, **20**, 152-160
- [24] Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigne, C., and Remesy, C., *J. Nutr.*, 2002, **132**, 1962–1968
- [25] Gonthier, M.P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souque, J.M., Poutanen, K., and Aura, A.M., *Biomed. Pharmacother.*, 2006, **60**, 536–540
- [26] Konishi, Y., Zhao, Z., and Shimizu, M., *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7539–7543
- [27] Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., and Bitsch, I., *J. Nutr.*, 2001, **131**, 1207–1213
- [28] Cartron, E., Fouret, G., Carbonneau, M.A., Lauret, C., Michel, F., Monnier, L., Descomps, B., and Leger, C.L., *Free Radic. Res.*, 2003, **37**, 1021–1035
- [29] Cerda, B., Tomas-Barberan, F.A., and Espin, J.C., *J. Agric. Food Chem.*, 2005b, **53**, 227–235

- [30] Bourne, L.C., and Rice-Evans, C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **253**, 222–227
- [31] Kern, S.M., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A., and Garcia-Conesa, M.T., *Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6050–6055
- [32] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Rémésy, C., *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **81**, 30S– 42S
- [33] Robbins, R.G., *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2866-2887
- [34] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G., *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, **20**, 933-956
- [35] Lu, L., Li, Y., and Lu, X., *Spectrochim. Acta*, 2009, **74**, 829–834
- [36] Paganga, G., Miller, N., and Rice-Evans, C.A., *Free Radical Res.*, 1999, **30**, 153-162
- [37] Powles, J.W., and Ness, A.R., *Int. J. Epidemiol.*, 1996, **26**, 1-13
- [38] Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N., and Mathe, G., *Biomed. Pharmacother.*, 2002, **56**, 200-207
- [39] Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S.I., Lao, A.N., Fujimoto, and Y., Tatsuno, T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **792**, 92-97
- [40] Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., and Katan, M., *Hum. Nutr. Metabol.*, 2001, **131**, 66-71
- [41] Maggi-Capeyron, M.F., Ceballos, P., Cristol, J.P., Delbosc, S., Le Doucen, C., Pons, M., Leger, C.L., and Descomps, B., *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5646-5652
- [42] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., and Remesy, C., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2005, **45**, 287–306
- [43] Williamson, M.P., McCormick, T.G., Nance, C.L., and William T.S., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, **118**, 1369-74
- [44] Hamza, A, and Zhan, C.G., *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 2910-2917
- [45] Hsieh, T.C., and Wu, J.M., *Anticancer Res.*, 2009, **29**, 4025-4032
- [46] Brian, J.P, Coyle, C.H., Morrisroe, S.N., Chancellor, M.B., and Yoshimura, N., *Biomedical Res.*, 2009, **30**, 207-215
- [47] Niki, E., and Noguchi, N., *Life*, 2000, **50**, 323–329
- [48] Halliwell, B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, **476**, 107-112
- [49] Brune, M., Rossander, L., and Hallberg, L., *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1989, **43**, 547–558
- [50] Petti, S., Scully, C., *J.Dent.*, 2009, **37**, 413-423
- [51] Knasmuller, S., Nersesyan, A., Misik, M., Gerner, C., Mikulits, W., Ehrlich, V., Hoelzl, C., Szakmary, A., and Wagner K., *Br. J. Nutr.*, 2008, **99**, ES3–ES52
- [52] Somogyi, A., Rosta, A., Pusztai, P., Tulassay, Z., and Nagy, G., *Physiol. Meas.*, 2007, **28**, R41–R55
- [53] Karadag, A., Ozelik, B., and Saner, S., *Food Anal. Methods*, 2009, **2**, 41–60
- [54] Chanda, S. and Dave, R., *Af. J. Microb. Res.*, 2009, **3**, 981-996
- [55] Kohen, R., and Nyska, A., *Toxicol. Pathol.*, 2002, **30**, 620-650
- [56] Halliwell, B., and Whiteman, M., *Br. J. Pharmacol.*, 2004, **142**, 231–255
- [57] Gomberg, M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, **22**, 757
- [58] Gomberg, M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1914, **36**, 6, 1144–1170
- [59] Perkins, J.M., *Radical chemistry*, Ellis Horwood, UK, 1994, 21-28
- [60] Cammac., R., In: *The biochemistry of plants* , Academic Press, New York , 1987, 13, 229-257
- [61] Evans, P., and Halliwell, B., *Brit. J. Nutr.*, 2001, **85**, S67-S74
- [62] Kasai, H., *Mutat.Res.*, 1997, **387**, 147-163

- [63] Halliwell, B, and Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine, ed. 3, Oxford University Press, Oxford, 1999
- [64] Prousek, J., Pure Appl.Chem., 2007, **79**, 2325-2338
- [65] Stocker, R., and Keane, J.F., Oxidative stress and atherosclerosis. In: Molecular mechanisms of atherosclerosis. Loscalzo, J., Taylor and Francis publications, UK, 66-71
- [66] Cadenas, E., and Davies, K.J., Free Radic.Biol.Med., 2000, **29**, 222-230
- [67] Daugherty, A., Dunn, J.,L., Rateri, D., L. and Heinecke J.,W., J. Clin.Invest., 1994, **94**, 437-444
- [68] Zhang, R., Brennan, M.L., Fu, X., Aviles, R.J.,Pearce, G.L., Penn, M.S., Topol, E.J., Sprecher, D.L. and Hazen S.L., J.Am.Med.Assoc., 2001, **286**, 2136-2142
- [69] Ohara, Y., Peterson, T.E. and Harrison, D.J., J.Clin.Invest., 1993, **91**, 2546-2551
- [70] Byun, J., Mueller, D.M., Fabjan, J.S. and Heinecke, J.W., FEBS Lett., 1999, **455**, 243-243
- [71] Haber, F., and Weiss, J., Proc. Roy. Soc. Lond., 1934, **33**, 332-351
- [72] Urso, M.L., Clarkson, P.M., Toxicol., 2003, **189**, 41-54
- [73] Topic, B., Tani, E., Tsiakitzis, K., Kourounakis, P.N., Dere, E., Häcker, R.U., Mattern, K., Mattern, C.M., and Huston, J.P., Neurobiol. Ag., 2002, **23**, 135-143
- [74] Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., and Ames, B.N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 9697-9708
- [75] Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., and Ames, B.N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, **87**, 4533-4537
- [76] Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagan, T.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, **90**, 7915-7922
- [77] Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A., J. Biol. Chem., 1992, **267**, 166-172
- [78] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C., Science, 1991, **253**, 49-53
- [79] O'Neill, P., Radiat. Res., 1983, **96**, 198-210
- [80] Dizdaroglu, M., Biochemistry, 1985, **24**, 4476-4481
- [81] Breen, A.P., and Murphy, J.A., Free Rad.Biol.Med., 1995, **18**, 1033-1077
- [82] Langseth, L., Antioxidants and their effect on health. In, Essentials of functional foods. Schmidl, M.K., Labuza, T.P., Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, Ch. 14, 303-304
- [83] Ou, D.,and Jacob, B.R., J. Agric. Food Chem., 2003, **51**, 3273-3279
- [84] Angelopoulou, R., and Kyriazoglou, M., Arch. Hell. Med., 2005, **22**, 433-446
- [85] Bilicia, M., Efe, H., Koroglu, A., Uydu, A.H., Bekaroglu, M., and Deger, O., Jour. Affect. Dis., 2001, **64**, 43-51
- [86] Hellman, N.E., and Gitlin, J.D., Annu.Rev.Nutr., 2002, **22**, 439-458
- [87] Halliwell, B., Free Radic.Res.Comm., 1990, **9**, 1-32
- [88] Sies, H., Eur. J. Biochem., 1993, **215**, 213-219
- [89] Fenton, H.J.H., J.Chem.Soc., **65**, 899, 1894
- [90] Wieland, H., and Franke, W., Justus Liebigs Ann. Chem., 457, **1**, 1927
- [91] Haber, F., and Willstätter, R., Ber. Deutsch. Chem. Ges., 1931, **64**, 2844
- [92] Haber, F., and Weiss, J., Naturwissenschaften, 1932, **20**, 948
- [93] Haber, F., and Weiss, J., Proc. Roy. Soc. Lond., 1934, **33**, A147
- [94] Weiss, J., Naturwissenschaften, 1935, **23**, 64
- [95] Koppenol, W. H., Redox Rep., 2001, **6**, 229
- [96] Winterbourn, C.C., Toxicol.Lett., 1995, **82/83**, 969-974

- [97] Hao, O.J., Hyunook, K., and Pen-Chi, C., *Crit. Rev. Envir. Sc. Tech.*, 1999, **30**, 449- 505,
- [98] Bray, W.C., and Gorin, M.H., *J.Am.Chem.Soc.*, 1932, **54**, 2124
- [99] Burkitt, M.J., *Prog.React.Kinet.Mech.*, 2003, **28**, 75-103
- [100] Grof, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., and Eaton, J.W., *J.Biol.Chem*, 1984, **259**, 3620-3624
- [101] Egan, T.J., Barthakur, S.R., and Aisen, P., *J.Inorg.Biochem.*, 1992, **48**, 241-249
- [102] Lombard, M., Chua, E., and O'Toole, P., *Gut*, 1997, **40**, 435-439
- [103] Cornelius, A., and Gregor, G.M., *J.Nutr.*, 2001, **131**, 649S-668S
- [104] Gardner, P.R., and Fridovich, I., *J.Biol.Chem.*, 1992, **267**, 8757-8772
- [105] Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., and Kennedy, M.C., *J.Biol.Chem.*, 2000, **275**, 14064-14073
- [106] Reif, D.W., *Free Radic.Biol.Med.*, 1992, **12**, 417-427
- [107] Boyer, R.F., Clark, H.M., and La Roche, A.P., *J.Inorg.Biochem.*, 1988, **32**, 171-181
- [108] Mao, G.D., Thomas, P.D., and Podznansty, M.J., *Free Radic.Biol.Med.*, 1994, **16**, 493-500
- [109] Chevion, M., *Free Radic.Biol.Med.*, 1988, **5**, 27-37
- [110] Lloyd, D.R. and Phillips, D.H., *Mut.Res.*, 1999, **424**, 23-36
- [111] Moriwaki, H., Osborne, M.R. and Phillips, D.H., *Toxicol. In Vitro*, 2008, **22**, 36-44
- [112] Healey B.G., Matson R.S., and Walt D.R., *Anal. Biochem.*, 1997, **251**, 270-279
- [113] Wang J., *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 757-762
- [114] Keusgen M., *Naturwissenschaften*, 2002, **89**, 433-444
- [115] Mascini M., Palchetti I. and Marrazza, G. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **369**, 15-22
- [116] Paleček E., Fojta M., Tomschik M. and Wang J., *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 621-628
- [117] Γεωργάτσος Ι.Γ., *Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Δ' έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη*, 1993
- [118] Streyer J., *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 1997
- [119] Gherghi I.C., Girousi S.T., Voulgaropoulos A.N. and Tzimou-Tsitouridou, R., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2004, **84**, 865-874
- [120] F.Jelen, M.Fojta, and E. Palecek, *J.Electroanal. Chem.*, 1997, **42**, 749-56
- [121] Girousi S., *Sci. Pap. Univ. Pardubice Ser. A*, 2002, **8**, 5-17
- [122] Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K., *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4290-4302
- [123] Roginsky, V., and Lissi, E.A., *Food Chem.*, 2005, **92**, 235-254
- [124] Prieto-Simon, B., Cortina, M., Campas, M., and Calas-Blanchard, C., *Sens.Act.B*, 2008, **129**, 459-466
- [125] Nagaveni, K., Hegde, M.S., Ravishankar, N., Subbanna, G.N., and Madras, G., *Langmuir*, 2004, **20**, 2900-2907
- [126] Fridovich, I., *Science*, 1978, **201**, 875-880
- [127] Hyland, K., and Auclair, C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **102**, 531-537
- [128] Lvovich, V., and Scheeline, A., *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 454-462
- [129] Krylov, A.V., Pfeil, W., and Lisdat, F., *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **569**, 225-231
- [130] Tammeveski, K., Tenno, T.T., Mashirin, A.A., Hillhouse, E.W., Manning, P., and McNeil, C.J., *Free Rad. Biol. Med.*, 1998, **25**, 973-978

- [131] Manning, P., McNeil, C.J., Cooper, and J.M., Hillhouse, E.W., *Free Rad. Biol. Med.*, 1998, **24**, 1304–1309
- [132] Lisdat, F., Ge, B., Ehrentreich-Forster, E., Reszka, R., and Scheller, F.W., *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1359–1365
- [133] Gobi, K.V., and Mizutani, F., *Anal. Sci.*, 2001, **17**, 11–15
- [134] Gobi, K.V., and Mizutani, J. *Electroanal. Chem.*, 2000, **484**, 172–181
- [135] Ge, B., Lisdat, F., *Anal. Chim. Acta*, 2002, **454**, 53–64
- [136] Beissenhirtz, M., Scheller, F., and Lisdat, F., *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1425–1435
- [137] Krylov, A.V., Adamzig, H., Walter, A.D., Lochel, B., Kurth, E., Pulz, O., Szeponik, J., Wegerich, F., and Lisdat, F., *Sens. Actuators B*, 2006, **119**, 118–126
- [138] Beissenhirtz, M., Scheller, F., and Lisdat, F., *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 4665–4671
- [139] Scheller, W., Jin, W., Ehrentreich-Forster, E., Ge, B., Lisdat, F., Buttemeier, R., Wollenberger, U., and Scheller, F.W., *Electroanalysis*, 1999, **11**, 703–706
- [140] Campanella, L., Martini, E., and Tomassetti, M., *Talanta*, 2005, **66**, 902–911
- [141] Campanella, L., Bonanni, A., Bellantoni, D., and Tomassetti, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **35**, 303–320
- [142] Campanella, L., Favero, G., Persi, L., and Tomassetti, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **23**, 69–76
- [143] Campanella, L., Bonanni, A., Finotti, E., and Tomassetti, M., *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **19**, 641–651
- [144] Campanella, L., Favero, G., Persi, L., and Tomassetti, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **24**, 1055–1064
- [145] Campanella, L., Bonanni, A., Favero, G., and Tomassetti, M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 1011–1019
- [146] Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E., and Tomassetti, M., *Food Chem.*, 2007, **102**, 751–758
- [147] Campanella, L., Bonanni, A., Bellantoni, D., Favero, G., and Tomassetti, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **36**, 91–99
- [148] Campanella, L., De Luca, S., Favero, G., Persi, L., and Tomassetti, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **369**, 594–600
- [149] Mello, L.D., Hernandez, S., Marrazza, G., Mascini, M., Kubota, L.T., *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1374–1382
- [150] Heilerova, L., Buckova, M., Tarapcik, P., Silhar, S. and Labuda, J., *Czech J. Food Sci.*, 2003, **21**, 78–84
- [151] Labuda, J., Buckova, M., Vanickova, M., Mattusch, J., and Wennrich, R., *Electroanalysis*, 1999, **11**, 101–107
- [152] Korbut, O., Buckova, M., Tarapcik, P., Labuda, J., and Grundler, P., *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **506**, 143–148
- [153] Buckova, M., Labuda, J., Sandula, J., Krizkovai, L., Stepanek, I., and Durackova, Z., *Talanta*, 2002, **56**, 939–945
- [154] Labuda, J., Buckova, M., Heilerova, L., Caniova-Ziakova, A., Brandsteterovai, E., Mattusch, J., and Wennrich, R., *Sensors*, 2002, **2**, 1–10
- [155] Ferancova, A., Heilerova, L., Korgova, E., Silhar, S., Stepanek, I., and Labuda, J., *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, **219**, 416–420
- [156] Labuda, J., Buckova, M., Heilerova, L., Silhar, S., and Stepanek, I., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 168–173

- [157] Liu, J., Roussel, C., Lagger, G., Tacchini, P., and Girault, H.H., *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7687–7694
- [158] Liu, J., Su, B., Lagger, G., Tacchini, P., and Girault, H.H., *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 6879–6884
- [159] Ziyatdinova, G., Galandova, J., and Labuda J., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2008, **3**, 223-235
- [160] Droge, W., and Breitzkreutz, R., *Proc. Nutr. Soc.*, 2000, **59**, 595
- [161] Rahman, I., Yang, S.R., and Biswas, S.K., *Antioxid. Redox Signal.*, 2006, **8**, 681
- [162] Kandar, R., Zakova, P., and Muzakova, P., *Clin. Chim. Acta*, 2006, **365**, 249
- [163] Wayner, D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C., and Locke, S.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **924**, 408
- [164] Masseur, D., Rott, K., Liu-Bryan, R., and Agudelo, C., *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 4117
- [165] Schachter, M., *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 4139
- [166] Davey, M.W., Van Montagu, M., Inze, D., San Martin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., and Fletcher, J., *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 825
- [167] Carr, A., and Frei, B., *FASEB J.*, 1999, **13**, 1007–1024
- [168] Bernhardt, P.V., *Austr. J. Chem.*, 2006, **59**, 233
- [169] Blasco, A.J., Rogerio, M.C., Gonzalez, M.C., and Escarpa, A., *Anal. Chim. Acta*, 2005, **539**, 237
- [170] Στράτης Ι., Θεμελής Δ., Ζαχαριάδης Γ., Οικονόμου Α., Ανθεμίδης Α., *Ενόργανη Χημική Ανάλυση ΙΙ, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη*, 2004
- [171] Γηρούση Σ., *Μελέτη και ανάπτυξη μεθόδων βολταμετρικού προσδιορισμού βιοστοιχείων (χαλκός-μολυβδαίνιο), Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη*, 1996
- [172] Κοκκινίδης Γ., *Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη*, 1992
- [173] Wang J., *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, VCH Publishers Inc., New York, 1988
- [174] Vanýsek P. in: *Chemical Analysis: Modern Techniques in Electroanalysis*, Vol. 139, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996
- [175] Brainina K.Z., *Talanta*, 1971, **18**, 513
- [176] Kano K., Konse T., Nishimura N., and Kubota T., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1984, **57**, 2383
- [177] Ghergi I., Girousi S., Voulgaropoulos A., and Tzimou-Tsitouridou R., *Analytica Chimica Acta*, 2004, **505**, 135
- [178] Sze S.M., “Semiconductor sensors”, John Wiley & Sons Inc., 1994, NY, 1-15
- [179] www.herb.gr, Τελευταία επίσκεψη: 09/11/2010
- [180] Bremness, L., *The complete book of herbs*, New York, Viking Studio Books, 1988
- [181] Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D., and Lamaison, J.L., *Fitoterapia*, 1999, **70**, 44-49
- [182] Brabec, V., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1981, **8**, 437–449
- [183] Goncalves, L.M., Batchelor-McAuley, C., Barros, A.A., and Compton, R.G., *J. Phys. Chem.*, 2010, **114**, 14213–14219
- [184] Βουλγαρόπουλος, Α., Στράτης Ι., Ζαχαριάδης Γ., *Εισαγωγή στην ποσοτική χημική ανάλυση, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη*, 1999
- [185] Casado, J., Fornaguera, J., and Galan, M.I., *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 1843-1847

- [186]Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C., LWT-Food Sci. Tech., 1995, **28**, 25-30
- [187]Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., and Lee, C.Y., J. Agric. Food Chem., 2002, **50**, 3713-3717
- [188]Ορδούδη, Σ., Φαινολικά οξέα ως φυσικοί παρεμποδιστές οξείδωσης- Αξιολόγηση δραστηριότητας, προοπτική αξιοποίησης σε λειτουργικά τρόφιμα, Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη 2007
- [189]Νενάδης, Ν., Βιοφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα, Σχέση δομής-δραστηριότητας, Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη 2004

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗ dsDNA ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ»

ΣΚΕΥΑ ΕΛΕΝΗ

Την τελευταία δεκαετία, η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί εντατικά να αποσαφηνίσει τη συσχέτιση μεταξύ ROS, οξειδωτικών βλαβών στο DNA, ποικίλων δυσλειτουργιών και ασθενειών και αντιοξειδωτικών. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι εξαιρετικά εργαλεία, κατάλληλα για γρήγορες και φθηνές αναλύσεις *in vitro* για τον προσδιορισμό ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και ειδικά οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) προκαλούν σημαντικές βλάβες στο DNA είτε με προσθήκη στους π δεσμούς των βάσεων του DNA ή με απόσπαση H^+ από τις δεοξυριβόζες του DNA, η οποία θεωρείται το πρώτο βήμα για την καταστροφή της διπλής έλικας. Οι παραπάνω αλλοιώσεις σχετίζονται με τη διαδικασία της γήρανσης, διάφορα είδη καρκίνου, τη νόσο Alzheimer και καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι ρίζες αυτές στους διάφορους οργανισμούς παράγονται λόγω της οξείδωσης μεταλλικών ιόντων όπως Fe^{2+} από H_2O_2 μέσω της αντίδρασης Fenton, η οποία αποτελεί σημαντικό μέσο για οξειδωτικές βλάβες *in vivo*. Αντιοξειδωτικά όπως τα φαινολικά οξέα καθώς και εκχυλίσματα βοτάνων που θεωρούνται πλούσιες πηγές αντιοξειδωτικών, δρουν σαν απενεργοποιητές ελευθέρων ριζών και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες στο DNA.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η ηλεκτροχημική συμπεριφορά τριών αντιπροσωπευτικών φαινολικών οξέων, του γαλλικού και καφεϊκού οξέος και trolox με κυκλική βολταμμετρία. Ερευνήθηκαν και επιλέγησαν οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορισμού τους με διαφορική παλμική βολταμμετρία όπως ρυθμός σάρωσης, δυναμικό και χρόνος προσυγκέντρωσης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μελέτες σχετικά με την επίδραση τους στις οξειδωτικές βλάβες του dsDNA μέσω προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας αλλαγής μέσου. Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο dsDNA πάστας άνθρακα, βοηθητικό ηλεκτρόδιο σύρματος λευκοχρύσου και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, ενώ σαν ισχυρό οξειδωτικό μέσο επιλέχθηκε το σύστημα Fenton, μέσω FeSO_4 και H_2O_2 . Όλα τα

συμπεράσματα βασίζονται στο οξειδωτικό ρεύμα της γουανίνης και αδενίνης πριν και μετά την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων αντιοξειδωτικών. Ο παραπάνω βιοαισθητήρας εφαρμόστηκε σαν προκαταρκτικό αντιοξειδωτικό test εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων της ελληνικής αγοράς.

ABSTRACT

«ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PHENOLIC TYPE COMPOUNDS AND STUDY OF THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES USING A dsDNA ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR»

SKEVA ELENI

The last decade, the scientific community has been trying intensively to understand and explain the connection between ROS, DNA oxidative damage, various disorders and diseases and antioxidants. Electrochemical DNA biosensors are promising tools for fast, inexpensive and simple in vitro analysis for the determination of free radicals and antioxidants. Reactive Oxygen Species (ROS) and especially hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), are known to damage DNA by oxidation of the bases, which results in their destruction, release or attack of the deoxyribose moieties by strand breaking. These lesions are related to the aging process, cancer, Alzheimer's disease and atherosclerosis. In living systems, hydroxyl radicals are generated from the metal (ferrous or cupric ions) ion-dependent breakdown of hydrogen peroxide by Fenton's reaction, which is an important mediator of oxidative damage in vivo. Antioxidants such as phenolic acids and plant extracts containing high amounts of them, act as free radical terminators and reduce the effect of the oxidative damage on dsDNA.

In the present work, we studied the electrochemical behaviour of three representative phenolic acids, caffeic acid, gallic acid and trolox using cyclic voltammetry. We investigated the determination of the above antioxidants and the optimized conditions (scan rate, deposition potential and time) using differential pulse voltammetry. Moreover, we performed in vitro studies upon their effect on the oxidative damage on dsDNA, using adsorptive transfer stripping voltammetry. We used a dsDNA modified carbon paste electrode, a Pt wire counter electrode, a Ag/AgCl reference electrode and Fenton's mixture, by FeSO_4 and H_2O_2 , as a strong oxidative system. Our conclusions were based on the oxidative signal of guanine and adenine bases before and after the addition of certain amounts of the antioxidants. This biosensor has been applied as a screening antioxidant test in order to estimate the antioxidant capacity of aqueous herb extracts from the local market.

«Το έργο συγχρηματοδοτείται στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς πόρους»
«The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources»



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης