



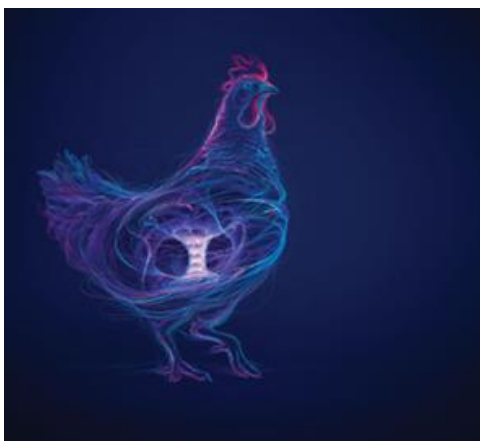
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:

***«Διερεύνηση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ουσιών σε
κοτόπουλα διαφορετικής διατροφής και εκτροφής»***



Παπαδάμη Μαρία

ΧΗΜΙΚΟΣ

Ιωάννινα, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:

***«Διερεύνηση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ουσιών σε
κοτόπουλα διαφορετικής διατροφής και εκτροφής»***

Παπαδάμη Μαρία

ΧΗΜΙΚΟΣ

Εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Χημείας Πεπτιδίων του
Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΣΙΚΑΡΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά την χρονική περίοδο 2020-2022 στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Τσίκαρη Βασιλείου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Τσίκαρη Βασίλειο για την διαρκή καθοδήγηση, την επιμονή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου διπλώματος ειδίκευσης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το μέλος ΕΔΙΠ κ. Μούση Βασίλειο για την καθοδήγηση, την στήριξη και τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ το μέλος ΕΔΙΠ κ. Τέλλη Κωνσταντίνο, για τις συμβουλές, την διαρκή εκπαίδευση και την καθοδήγηση που μου παρείχε.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Τσιούρη Βασίλειο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την συνεργασία και βοήθεια που μου παρείχε.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Τζάκο Ανδρέα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπως και τον συνεργάτη κ. Παρίση Νικόλαο, για την βοήθεια και το ενδιαφέρον που υπέδειξαν.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ Πατσιά Απόστολο, Υπεύθυνο του Μικροβιολογικού - Χημικού Εργαστηρίου της “ΠΙΝΔΟΣ” Α.Π.Σ.Ι., για το ενδιαφέρον που υπέδειξε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Πεπτιδοχημείας, την Διδάκτορα κα Φώτου Ευγενία, την Υποψήφια Διδάκτορα κα Μουλασιώτη Βασιλική και την Μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα Αβραμίδου Ελισάβετ, όπως επίσης και την Υποψήφια Διδάκτορα κα Κυριάκου Δήμητρα, του Ερευνητικού Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας, της ομάδας του Αναπληρωτή Καθηγητή κ.

Μαλανδρίνου Γεράσιμου, για την υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχαν σε διάφορους τομείς, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρέχουν σε κάθε βήμα της ζωής μου, αλλά και όλους τους φίλους μου, για την αδιάκοπη συμπαράσταση και εμπύχωση που παρείχαν σε κάθε στάδιο της πορείας μου.

Η μεταπτυχιακή έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το από το ερευνητικό πρόγραμμα «Π.Ι.Ν.Δ.Ο.Σ.» : “Πρωτοποριακοί Ιχνηλάτες ως Νέοι Δείκτες Ορισμού Συστημάτων «Ελεύθερης Βοσκής»” (κωδικός έργου: 82415). Το έργο υλοποιήθηκε στα πλαίσια του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα Καινοτομία 2014-2020» με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ / ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1. Πουλερικά	9
1.1.1. Συμβατικό Σύστημα Εκτροφής	11
1.1.2. Σύστημα Εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής	12
1.1.2.1. Εμπλουτισμένης διατροφής πουλερικά	14
1.1.3. Σύστημα Βιολογικής Εκτροφής.....	14
1.2. Διατροφή των πουλερικών	15
1.3. Ελεύθερες Ρίζες	21
1.4. Οξειδωτικό Στρες	23
1.5. Αντιοξειδωτικά - Αντιοξειδωτική Δράση	26
1.5.1. Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών.....	26
1.5.1.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	28
α) Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (<i>Superoxide dismutase, SOD</i>)	28
β) Καταλάση (<i>CAT</i>).....	30
γ) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (<i>Glutathione peroxidase, GPx</i>)	30
δ) Αναγωγάση της γλουταθειόνης (<i>GR</i>)	31
ε) Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (<i>GST</i>)	32
στ) Οξυγενάση της αίμης (<i>HO-1</i>).....	32
1.5.1.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	33
α) Καροτενοειδή.....	34
β) Φλαβονοειδή	45
γ) Βιταμίνη Ε	46
δ) Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)	51
ε) Θειόλες ή θειοαλκοόλες ή μερκαπτάνια (<i>R-SH</i>)	53
1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας	55
Ηλεκτροχημικές Τεχνικές Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.....	64
2. ΣΚΟΠΟΣ	74
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	75
Αντιδραστήρια και Όργανα	75
3.1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (<i>Total Antioxidant Capacity, TAC</i>)	77
3.2. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ <i>TBARS</i>	79

3.3.	Προσδιορισμός α-τοκοφερόλης.....	81
3.4.	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-QTOF-MS)	82
3.5.	Προσδιορισμός Ολικών Καροτενοειδών.	85
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89
4.1.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)	89
4.2.	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ TBARS	100
4.3.	Προσδιορισμός α-τοκοφερόλης	111
4.4.	Ανάλυση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-Q-TOF-MS).....	118
4.5.	Προσδιορισμός Ολικών Καροτενοειδών.....	138
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	140
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	142

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τη σύγχρονη βιομηχανία πουλερικών, καθώς έχει κριθεί υπεύθυνο για την υποβάθμιση της υγείας των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, για την μείωση της ευζωίας τους και την ελάττωση της ποιότητας του παραγόμενου κρέατος. Για να υπερνικηθεί αυτό το φαινόμενο, η βιομηχανία συχνά αναπτύσσει διαφορετικά συστήματα εκτροφής κοτόπουλων, με ποικίλα χαρακτηριστικά γονότυπου και διαφορετικές συνθήκες διατροφής και εκτροφής. Σημαντική επίδραση φαίνεται πως έχει η διατροφή των πουλερικών, αφού πέραν της βασικής ζωοτροφής, συχνά προστίθενται αρωματικά φυτά με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ερευνήθηκαν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών σε κοτόπουλα. Η σύγκριση αφορούσε διαφορετικά συστήματα εκτροφής και το είδος διατροφής.

Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση ανά δύο, τριών συστημάτων εκτροφής, συμβατική εκτροφή, εκτροφή ελεύθερης βοσκής και εκτροφή ελεύθερης βοσκής με πρόσθετα αρωματικά φυτά, ως προς την περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά. Μετρήθηκαν σε δείγματα πλάσματος αίματος και μυϊκού ιστού, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) και η βιταμίνη Ε. Επίσης, έγινε ανίχνευση και ταυτοποίηση ενώσεων της ομάδας των καρροτενοειδών και ενώσεων της βιταμίνης Ε σε καθεμία από τις τρεις εκτροφές μέσω υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-Q-TOF-MS). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν μικρή βελτίωση αντιοξειδωτικής κατάστασης, στην ομάδα των κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ πέντε ομάδων διαφορετικής διατροφής πουλερικών, ως προς την συγκέντρωση των ολικών καρροτενοειδών σε πλάσμα αίματος. Οι ομάδες αυτές περιείχαν, υγιή κοτόπουλα με βασική διατροφή, κοτόπουλα μολυσμένα με *Eimeria* spp και τρεις ομάδες κοτόπουλων μολυσμένα με *Eimeria* spp και τρία διαφορετικά προβιοτικά ως πρόσθετο διατροφής αντίστοιχα. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία προβιοτικών δεν ανέστειλε την μείωση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών στα μολυσμένα κοτόπουλα.

ABSTRACT

Oxidative stress can be described as a constant challenge for the modern poultry industry, as it has been found responsible for degrading the health of broiler chickens, reducing their welfare, and reducing the quality of the produced meat. To overcome this phenomenon, the industry often develops different chicken breeding systems, with varying genotype characteristics and different feeding and rearing conditions. Poultry nutrition seems to have a significant effect, since in addition to the basic animal feed, aromatic plants with a strong antioxidant effect are often added.

In this thesis, the levels of antioxidant substances in chickens were investigated. The comparison involved different breeding systems and types of diets.

Specifically, a comparison between three rearing groups, conventional broilers, free-range broilers, and free-range broilers with aromatic plants as additives, was made in terms of their antioxidant content. Total antioxidant capacity (TAC), lipid peroxidation levels (TBARS) and vitamin E were measured in serum and muscle tissue samples. Also, carotenoid group compounds were detected and identified in each of the three rearing groups, by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS). The results indicated a slight improvement in antioxidant status, in the group of free-range chickens, compared to the other groups, but without a statistically significant difference.

Finally, a comparison was made between chickens of five groups, following different diets, regarding the concentration of total carotenoids in blood plasma. These groups contained, healthy chickens with basal diet, chickens infected with *Eimeria* spp and three groups of chickens infected with *Eimeria* spp and three different probiotics as dietary supplement respectively. The results showed that the presence of probiotics did not inhibit the decrease in the concentration of carotenoids of the infected chickens.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMP	Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
ADP	Διφωσφορική Αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
CAT	Καταλάση
DPPH	2,2,-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο
FAD+	Δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης
GPx	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
GSH	Ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης
GST	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GSSG	Οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης
HO-1	Οξυγενάση της αίμης-1 (ισομορφή 1)
HO-2	Οξυγενάση της αίμης-2 (ισομορφή 2)
NADP+	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο
SOD	Υπεροξειδική Δισμουτάση
RNS	Δραστικά είδη αζώτου
ROS	Δραστικά είδη οξυγόνου
R-SH	Θειόλες ή θειοαλκοόλες ή μερκαπτάνια
TAC	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBA	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
TBARS	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
UMP	Μονοφωσφορική Ουρακίλη
UDP	Διφωσφορική Ουρακίλη
UTP	Τριφωσφορική Ουρακίλη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ / ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Πουλερικά

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο κλάδος της πτηνοτροφίας έχει αποτελέσει έναν από τους μεγαλύτερους και σημαντικότερους στον τομέα της ζωικής παραγωγής. Η συνεχής ανάπτυξη και εξέλιξή του, τον καθιστά κύριο για την παγκόσμια αγροτική οικονομία, έχοντας ήδη κατακτήσει ένα σημαντικό ποσοστό της τάξης του 6%, γεγονός που του δίνει το προβάδισμα σε σχέση με τους υπόλοιπους κλάδους της κτηνοτροφίας. Η συμβολή αυτή στην εθνική οικονομία έχει ήδη χτίσει γερά θεμέλια, αφού η πτηνοτροφία έχει ξεκινήσει να λειτουργεί ως αυτόνομος κλάδος εδώ και σχεδόν 70 χρόνια.

Συγκεκριμένα, η ορνιθοτροφία είναι το καλύτερα οργανωμένο και πλήρως εκσυγχρονισμένο τμήμα, συγκριτικά με άλλα τμήματα της πτηνοτροφίας στη χώρα μας. Η περιοχή της Ηπείρου είναι υπεύθυνη για το 64% της συνολικής ελληνικής παραγωγής, σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ, 2016). Το σύστημα παραγωγής της περιοχής έχει χαρακτηριστεί ως μεγάλης κλίμακας, εντατικό και βιομηχανικό, ενώ οι εγκαταστάσεις ως καλά εξοπλισμένες και μηχανοποιημένες, αφού διαθέτουν τόσο ημιαυτόματο, όσο και αυτόματο εξοπλισμό [1].

Λόγω του συνεχούς αναπτυσσόμενου τομέα της πτηνοτροφίας, οι μονάδες εκτροφής διαθέτουν σύγχρονα συστήματα παροχής τροφής και νερού των πτηνών. Ταυτόχρονα, υπάρχει διαρκής έλεγχος επιπέδων υγρασίας και θερμοκρασίας στους θαλάμους εκτροφής. Παράλληλα, πραγματοποιούνται καθημερινά δειγματοληψίες τόσο για βακτηριολογικό έλεγχο των πτηνοτροφείων, για ακριβέστερη “εικόνα” των χώρων και των συνθηκών στέγασης των πτηνών, όσο και για οργανοληπτικό έλεγχο, για την διαρκή μελέτη της ποιότητας του παραγόμενου προς κατανάλωση κρέατος [1].

Όπως έχει οριστεί, για να λειτουργούν οι εγκαταστάσεις των πτηνοτροφείων θα πρέπει να πληρούν ορισμένα πρότυπα. Τα γενικά πρότυπα που πρέπει να ακολουθούν οι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις σύμφωνα με το Π.Δ. 374 (Φ.Ε.Κ.

251/A/22-10-2001) περί της προστασίας των ζώων στα εκτροφεία, σε κάθε κτηνοτροφική εκμετάλλευση, είναι τα εξής:

- Να υπάρχει ελευθερία κινήσεων των ζώων και σε περίπτωση περιορισμού τους, να υπάρχει επαρκής χώρος για τις φυσιολογικές ανάγκες τους και τις ανάγκες συμπεριφοράς τους,
- Τα υλικά και ο εξοπλισμός με τα οποία έρχονται σε επαφή τα ζώα θα πρέπει να μην είναι επιβλαβή γι' αυτά, και
- Να εξασφαλίζονται κατάλληλη θερμοκρασία, υγρασία και φωτισμός.

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία, όπως έχει θεσπιστεί και επιβάλλεται στα κράτη, κάθε πτηνοτροφική μονάδα οφείλει να ακολουθεί ένα πρότυπο ευζωίας για τα πουλερικά, με σκοπό την ορθή μεταχείρισή τους, αλλά και την εξασφάλιση της υγείας τους. Συνοπτικά, τα πρότυπα ευζωίας εφαρμόζονται με σκοπό την αποτροπή της πρόκλησης περιττής οδύνης στα πουλερικά σε τρεις βασικούς τομείς: στην εκτροφή, στη μεταφορά και στη σφαγή. Με την πιστή και υποδειγματική λειτουργία των πτηνοτροφείων, διασφαλίζεται πρωτίστως η ποιότητα όλων των παραγόμενων προϊόντων και εν συνεχεία η υγεία και των καταναλωτών.

Είναι γεγονός πως τις τελευταίες δεκαετίες η αύξηση της παραγωγής και της κατανάλωσης πουλερικών (ιδίως κοτόπουλου) στις αναπτυσσόμενες χώρες έχει επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στο παγκόσμιο εμπόριο όλων των προϊόντων κρέατος. Τα πουλερικά παράγονται από ταχέως αναπτυσσόμενες φυλές με χαμηλή θνησιμότητα, μιας και τα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής μπορούν να εκτραφούν με επιτυχία σε τυπικές συνθήκες στέγασης σε εύκολα διαθέσιμες ειδικές διαμορφωμένες μονάδες τροφής. Επιπλέον, τα πουλερικά έχουν πολύ γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης, υψηλό λόγο μετατροπής τροφοδοσίας και χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας [2], γεγονός που εξασφαλίζει την γρήγορη διάθεση των προϊόντων προς κατανάλωση.

Τα πουλερικά ως προϊόντα, έχουν μεγάλη διατροφική αξία αλλά και χαμηλή εμπορική τιμή, γεγονός που το καθιστά μία από τις καλύτερες τροφές, γι' αυτό και καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες παγκοσμίως. Ως εκ τούτου, οι λόγοι για την αυξανόμενη ζήτηση κρέατος κοτόπουλου αποδίδονται στο υγιές και υψηλό θρεπτικό

προφίλ τους, το χαμηλό κόστος παραγωγής τους, το γρήγορο ρυθμό ανάπτυξής τους και την παραγωγή πολλών μεταποιημένων προϊόντων που προέρχονται από αυτά.

Παρ' όλο που η μαζική παραγωγή των πουλερικών είναι αποτελεσματική ως προς την κάλυψη των διατροφικών αναγκών των καταναλωτών, η παραγωγή διαφορετικών εκτροφών πουλερικών έχει εισαχθεί ως πρωτοποριακή και πιο υγιεινή εναλλακτική. Συγκεκριμένα, τα είδη παραγόμενων πουλερικών, με τα αντίστοιχα συστήματα εκτροφής τα οποία κυριαρχούν στο εμπόριο χωρίζονται σε συμβατικά κοτόπουλα, κοτόπουλα ελεύθερης βοσκής και βιολογικά κοτόπουλα. Επιπλέον, άλλες υποκατηγορίες των παραπάνω αποτελούν τα χωριάτικα, τα ορεινά και τα εμπλουτισμένα, με απαραίτητη προϋπόθεση την πιστοποίηση της προέλευσής τους. Παρ' όλα αυτά, κάθε είδος / σύστημα εκτροφής φέρει διαφορετικά χαρακτηριστικά, εφόσον χρησιμοποιούνται διαφορετικές ράτσες πουλερικών, με άλλες διατροφικές και περιβαλλοντικές ανάγκες εκτροφής.

1.1.1. Συμβατικό Σύστημα Εκτροφής

Πρόκειται για τον πιο σύνηθες τρόπο εκτροφής πουλερικών στη σημερινή εποχή, με την εξέλιξη και βιομηχανοποίηση της ορνιθοτροφίας. Με την μαζικό τρόπο παραγωγής κοτόπουλων, η βιομηχανία κατορθώνει να καλύψει πλήρως τις διατροφικές ανάγκες των καταναλωτών, αλλά και να μειώσει το κόστος των προϊόντων, με σκοπό να κάνει τα πουλερικά πιο προσιτά οικονομικά.

Τα κοτόπουλα συμβατικής εκτροφής περιλαμβάνουν πουλερικά ταχείας ανάπτυξης, τα οποία αναπτύσσονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους εντός κλειστών χώρων (κλειστοί ορνιθώνες). Τα συμβατικά κοτόπουλα λόγω της μεγάλης συσσώρευσής τους στους ορνιθώνες, δηλαδή σε καθορισμένης έκτασης χώρους, χαρακτηρίζονται από μικρή κινητικότητα και δραστηριότητα. Επιπλέον, στα κοτόπουλα συμβατικής μαζικής εκτροφής επιλέγονται ράτσες οι οποίες αναπτύσσονται γρήγορα, ώστε να μειώνεται ο χρόνος σφαγής τους, με αποτέλεσμα την γρηγορότερη διάθεσή τους στην αγορά. Η ποιότητα ζωής των κοτόπουλων ακολουθεί τα πρότυπα ευζωίας που έχουν οριστεί, συνεπώς δεν υφίσταται λόγος ανησυχίας από τους καταναλωτές για την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος, αλλά και για την επίδραση των προϊόντων στην υγεία τους.



Εικόνα 1: Συμβατικός τρόπος εκτροφής κοτόπουλων, εντός κλειστών ορνιθώνων [3].

Η διατροφή των συμβατικών κοτόπουλων είναι καθορισμένης σύστασης σε δημητριακά και άλλα φυτικά προϊόντα, ενώ μπορούν να επιτραπούν και επιπλέον ζωικής προέλευσης τροφές, οι οποίες να περιέχουν μόνο ιχθυάλευρα. Η εκάστοτε πτηνοτροφική μονάδα έχει την δυνατότητα να διαφοροποιήσει τη διατροφή των πτηνών με την προσθήκη επιπλέον τροφών, βιταμινών, ιχνοστοιχείων και μετάλλων, έως ενός επιτρεπόμενου ορίου.

1.1.2. Σύστημα Εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής

Τα κοτόπουλα ελεύθερης βοσκής εισήχθησαν στην βιομηχανία παραγωγής κρέατος των ανεπτυγμένων χωρών, ως αποτέλεσμα της ανησυχίας των καταναλωτών για τις συνθήκες μεταχείρισης των μαζικών και εντατικών συμβατικής εκτροφής πουλερικών. Επιπλέον, ως συνέπεια της μεταχείρισής τους, μεγάλη ανησυχία υπήρχε και ως προς την θρεπτικότητα των συμβατικών κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, αλλά και το κατά πόσο είναι υγιεινά προς κατανάλωση. Γι' αυτόν τον λόγο, η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε κανονισμούς, οι οποίοι αφορούν κυρίως τους χώρους στους οποίους αναπτύσσονται και μεγαλώνουν τα πτηνά, οι οποίοι πρέπει να ακολουθούνται πιστά για να μπορεί ένα κοτόπουλο να χαρακτηριστεί ως ελεύθερης βοσκής. Συγκεκριμένα, ισχύουν τα εξής: α) οι κότες πρέπει να έχουν συνεχή πρόσβαση κατά τη διάρκεια της ημέρας σε υπαίθριο χώρο, β) το έδαφος στο οποίο έχουν πρόσβαση οι κότες πρέπει να καλύπτεται κυρίως από βλάστηση, γ) η μέγιστη εκτροφή δεν πρέπει να υπερβαίνει συγκεκριμένο αριθμό πτηνών ανά στρέμμα (πχ 1 πτηνό/10 m²), και δ) το εσωτερικό του κτιρίου, μέσα στο οποίο θα μεγαλώσουν τα πτηνά κατά τις πρώτες

μέρες της ζωής τους θα πρέπει να συμμορφώνεται με τα ακόλουθα πρότυπα, όσον αφορά τον πληθυσμό των πτηνών, ανά τετραγωνικά μέτρα:

- Αχυρώνας: όπου υπάρχει ελάχιστος χώρος 15cm για κούρνια ανά πουλί και μέγιστη πυκνότητα 25 πτηνών/m² στο κτίριο.
- Βαθιά απορρίμματα: όπου τουλάχιστον το ένα τρίτο της επιφάνειας του δαπέδου καλύπτεται με απορρίμματα όπως άχυρο, ρινίσματα ξύλου, άμμο ή χλοοτάπητα, και ένα αρκετά μεγάλο μέρος του δαπέδου είναι διαθέσιμο στις κότες για τη συλλογή περιττωμάτων των πτηνών. Η πυκνότητα εκτροφής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 7 πτηνά/m² διαθέσιμου χώρου δαπέδου [1].

Όσον αφορά την ανάπτυξη και την ράτσα τους, τα πουλериκά ελεύθερης βοσκής είναι βραδείας ανάπτυξης, τα οποία μεγαλώνουν τις πρώτες ημέρες της ζωής τους σε κλειστού τύπου θαλάμους, όπως ακριβώς και τα συμβατικά. Στη συνέχεια, βόσκουν σε ανοιχτούς χώρους για ένα συγκεκριμένο ελάχιστο χρονικό διάστημα. Χαρακτηριστικό της ράτσας που επιλέγεται γι' αυτού του είδους την εκτροφή είναι ότι τα κόκκαλά τους είναι πιο μεγάλα και χοντρά [4].



Εικόνα 2: Κοτόπουλα ελεύθερης βοσκής.

Η διατροφή των κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής είναι όμοια με αυτή των συμβατικών κοτόπουλων. Περιέχει, δηλαδή, δημητριακά και άλλα φυτικής προέλευσης προϊόντα, με την δυνατότητα πάντα προσθήκης επιπλέον προϊόντων

(μέταλλα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία), σύμφωνα με την εκάστοτε παραγωγικής μονάδας [4].

1.1.2.1. Εμπλουτισμένης διατροφής πουλερικά

Στην κατηγορία των κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής, συμπεριλαμβάνονται και τα εμπλουτισμένης διατροφής πουλερικά. Η σημαντική διαφορά που ξεχωρίζει την συγκεκριμένη κατηγορία πουλερικών από τα απλά ελεύθερης βοσκής, είναι το γεγονός ότι η διατροφή τους πέραν των δημητριακών, περιλαμβάνει επιπλέον βιοενεργά πρόσθετα. Συγκεκριμένα, τα πρόσθετα διατροφής που χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες είναι πλούσια σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που συμβάλλει στην βελτίωση της υγείας των πουλερικών, αλλά και στην αναβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου κρέατος κοτόπουλου.

1.1.3. Σύστημα Βιολογικής Εκτροφής

Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης: 834/2007 και 889/2008, για να χαρακτηριστεί ένα κοτόπουλο βιολογικό, πρέπει να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Στους κανονισμούς αυτούς προστίθενται όλοι οι περιορισμοί και οι όροι που αφορούν στον τρόπο σταυλισμού και εκτροφής, τη διατροφή, καθώς και τις μεθόδους αντιμετώπισης ασθενειών των βιολογικών κοτόπουλων.

Αντίθετα λοιπόν με τις παραπάνω εκτροφές, στην κατηγορία των βιολογικών κοτόπουλων, τα πτηνά μεγαλώνουν υποχρεωτικά σε υπαίθριο χώρο, ενώ ο χώρος που ανήκει σε κάθε πτηνό είναι σαφώς μεγαλύτερος, σε σχέση με τις προηγούμενες κατηγορίες. Ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης στην έκταση του χώρου εκτροφής των πουλερικών, τα ίδια δεν είναι τόσο επιρρεπή σε ασθένειες και μολύνσεις, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η χρήση αντιβιοτικών, μιας και αυτή απαγορεύεται στο συγκεκριμένο είδος εκτροφής κοτόπουλων. Η ράτσα η οποία επιλέγεται είναι βραδείας ανάπτυξης, όπως ακριβώς και τα κοτόπουλα ελεύθερης βοσκής. Όσον αφορά τη διατροφή τους, στη βιολογική εκτροφή περιλαμβάνονται αποκλειστικά πιστοποιημένες βιολογικές ζωοτροφές.

Τα βιολογικά κοτόπουλα, λόγω της αργής ανάπτυξης τους, της βιολογικής διατροφής τους, αλλά και της έλλειψης αντιβιοτικών κατά την εκτροφή τους, προτιμώνται από τους καταναλωτές ως πιο υγιεινή εναλλακτική.



Εικόνα 3: Κοτόπουλα βιολογικής εκτροφής [5].

1.2. Διατροφή των πουλερικών

Ο σημαντικότερος, ίσως, παράγοντας που διαφοροποιεί τις παραπάνω κατηγορίες των εκτροφών, πέραν του περιβάλλοντος στο οποίο μεγαλώνουν και αναπτύσσονται, είναι η διατροφή τους. Η διατροφή των κοτόπουλων είναι και αυτή η οποία μπορεί να μεταβληθεί εύκολα ως προς την σύσταση και να διαμορφωθεί κατάλληλα, ώστε να οριστούν εναλλακτικά συστήματα εκτροφής. Μέσω της διατροφής των κοτόπουλων, η βιομηχανία κρεατοπαραγωγής μπορεί να βελτιώσει την υγεία των ίδιων των πτηνών, αλλά και την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος, ώστε να προσφέρει στους καταναλωτές ποιοτικά καλύτερα προϊόντα.

Οι δίαιτες των πουλερικών κρεατοπαραγωγής πρέπει να διαμορφώνονται κατάλληλα από την βιομηχανία, ώστε να πληρούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ευημερία και την ευζωία των πτηνών. Η διατροφή θα πρέπει να είναι διαμορφωμένη, με τρόπο που να συνδυάζει πρωτίστως, την κάλυψη όλων των αναγκαίων για τα πτηνά θρεπτικών συστατικών, για την σωστή και υγιή ανάπτυξή τους, καθώς και να καλύπτει όχι μόνο τις ημερήσιες, αλλά και τις μακροχρόνιες διατροφικές τους ανάγκες. Η διατροφή περιλαμβάνει μίγματα συγκεκριμένης σύστασης σε δημητριακά, πλούσια σε ενέργεια και ωφέλιμα είδη, με στόχο την

σωστή ανάπτυξη και παραγωγή των πουλερικών. Οι δίαιτες θα πρέπει να περιέχουν βασικά διατροφικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και νερό.

Οι υδατάνθρακες έχουν οριστεί ως η κύρια πηγή ενέργειας για τα πουλερικά και παρέχονται μέσω των δημητριακών. Τα λίπη παρέχουν στα πτηνά επίσης ενέργεια αλλά και μέσω συνδυασμού των κατάλληλων λιπαρών οξέων μπορούν να συμβάλλουν και στην προστασία του οργανισμού. Οι πρωτεΐνες κρίνονται ως απαραίτητο συστατικό μιας ισορροπημένης διατροφής, αφού είναι υπεύθυνες για την σύνθεση και ανάπτυξη του μυϊκού ιστού των κοτόπουλων, των ορμονών και των ενζύμων τους, ενώ παράλληλα συμβάλλουν σημαντικά στην παραγωγή και ανάπτυξη τόσο των φτερών τους αλλά και των αυγών τους. Τέλος, οι βιταμίνες και τα μέταλλα είναι απαραίτητα συστατικά για την σωστή διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ειδικά σε περιπτώσεις που ο οργανισμός δεν μπορεί από μόνος του να τα συνθέσει [6], [7].

Οι ανάγκες των πουλερικών σε θρεπτικά συστατικά ποικίλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες που αφορούν κυρίως την γενετική, αλλά και χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται οι νεοσσοί. Διαφορετικό είδος ή φυλή των πουλιών, φέρει διαφορετικά χαρακτηριστικά, σημαντικά ώστε να υπάρχει πλήρης και ξεκάθαρος διαχωρισμός, όπως το μέγεθος των κοτόπουλων, και ο ρυθμός ανάπτυξης και παραγωγής τους. Συνεπώς, κάθε είδος είναι λογικό να έχει άλλες διατροφικές απαιτήσεις, όχι μόνο σε ποσότητα, αλλά και σε σύσταση. Παράλληλα, θα πρέπει η ζωοτροφή να είναι ποιοτικά καλή με χαμηλή εμπορική τιμή, ώστε να διατηρείται η παραγωγικότητα των πουλερικών υψηλή [6].

Για τα πουλερικά κρεατοπαραγωγής, οι διατροφές έχουν οριστεί σε παγκόσμια κλίμακα να είναι πλήρως φυτικές, με βάση κυρίως το καλαμπόκι, το σιτάρι και τη σόγια. Συγκεκριμένα, το καλαμπόκι έχει αναγνωριστεί ως μία από τις καλύτερες πηγές ενέργειας για τα πουλερικά, γι' αυτό και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά (>60% της συνολικής τροφής) στη ζωοτροφή. Βέβαια, η υψηλή τιμή του καλαμποκιού οδηγεί πολλές φορές τις βιομηχανίες στην εύρεση εναλλακτικών συστημάτων διατροφής, εξίσου υψηλής διατροφικής αξίας, ώστε να μην υποβαθμιστεί μετέπειτα τόσο η ευζωία των πτηνών,

όσο και η ποιότητα του παραγόμενου κρέατος [6]. Τέλος, η ζωοτροφή των πουλερικών πρέπει να είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, τόσο για την βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος των πτηνών, όσο και για την πρόληψη διαφόρων καταστάσεων / βλαβών ή παθήσεων [8].

1.2.1. Πρόσθετα συστατικά διατροφής των πουλερικών

Η βιομηχανία κρεατοπαραγωγής πουλερικών, με σκοπό να ενισχύσει την υγεία και ευζωία των πτηνών, και να βελτιώσει τις διατροφικές συνθήκες ανάπτυξης και παραγωγής τους, έχει συμβάλλει σημαντικά στην έρευνα εναλλακτικών στη διατροφής τους. Έτσι, στις βασικές ζωοτροφές των πουλερικών συνήθως προστίθενται, σε μικρά αλλά ικανά ποσοστά, τροφές πλούσιες σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, κάτι το οποίο μπορεί να συμβάλλει στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματός τους και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην πρόληψη βλαβών του οργανισμού [9].

Τροφές γνωστές για την αφθονία τους σε αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι κυρίως τα αρωματικά φυτά, τα φρούτα, τα λαχανικά, καθώς και τα έλαια και τα παραπροϊόντα των παραπάνω. Από τα αρωματικά φυτά, η ρίγανη, το δεντρολίβανο, η μέντα, το θυμάρι, η λεβάντα και πολλά άλλα, είναι μερικά από τα σημαντικότερα και πιο γνωστά φυτά για την μεγάλη περιεκτικότητά τους σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Το γεγονός πως η Ελλάδα είναι μία χώρα με μεγάλη ανάπτυξη στον πρωτογενή τομέα, σε ποσοστό μεγαλύτερο από τις αντίστοιχες ευρωπαϊκές χώρες, οδηγεί σε εκτεταμένες καλλιέργειες αυτών των φυτών. Αυτό οδήγησε στην εντατική αξιοποίηση των αρωματικών φυτών από τις πτηνοτροφικές επιχειρήσεις με στόχο την βελτίωση της υγείας των πουλερικών τους [8]–[10].

Τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα πρόσθετα διατροφής για τα πουλερικά είναι η ρίγανη, το δεντρολίβανο, το θυμάρι, καθώς και διάφορα παραπροϊόντα οινοποίησης και η πάστα ελιάς. Όλα τα παραπάνω είναι πλούσια σε ενώσεις με μεγάλη αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται κάποια από τα πρόσθετα διατροφής των ζωοτροφών που χρησιμοποιούνται στην Πτηνοτροφία, με τις αντίστοιχες ενώσεις που περιέχονται, τη δράση αυτών, αλλά και την επίδραση που έχουν στην υγεία των

πτηνών (Πίνακας 1), καθώς και η περιεκτικότητα των πρόσθετων σε αντιοξειδωτικά (Πίνακες 2, 3, 4, 5).

1.2.2. Επίδραση της διατροφής στην ποιότητα του κρέατος των πουλερικών

Η ποιότητα κρέατος κοτόπουλου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την τροφή την οποία καταναλώνουν τα πτηνά. Κάθε ένα από τα συστατικά της ζωοτροφής που τους προσφέρονται, συμβάλλει στην υγεία των πουλερικών, έχοντας διαφορετική επίδραση στον οργανισμό τους. Σύμφωνα πάντα με τις ενώσεις τις οποίες περιέχουν οι τροφές, τις ιδιότητές τους και τον τρόπο που αυτές μεταβολίζονται στον οργανισμό, επιδρούν στα πουλερικά συνήθως με την βελτίωση διαφόρων παραγόντων, όπως το οξειδωτικό τους προφίλ.

Πίνακας 1: Πρόσθετα διατροφής, σύσταση, δράση και επίδραση στα πουλερικά [10].

Πρόσθετα διατροφής	Δραστικές ενώσεις	Βιολογική Δράση	Επίδραση στα πουλερικά	Αναφορές
Ρίγανη / Ριγανέλαιο	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση	Βελτίωση λιπιδικού προφίλ	[9], [11]
Πάστα ελιάς	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση	Βελτίωση λιπιδικού προφίλ	
Στέμφυλα (παραπροϊόντα οινοποίησης)	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση	Βελτίωση λιπιδικού προφίλ	
Μέντα	Πολυφαινόλες	Αντισηπτική και τονωτική δράση	Μείωση της ολικής χοληστερόλης του αίματος, των τριγλυκεριδίων και της συγκέντρωσης των λιποπρωτεϊνών	[9], [11]
Δεντρολίβανο	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική και τονωτική δράση	Βελτίωση του βάρους και της αποδοτικότητας	[9], [11]
Θυμάρι	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική και τονωτική δράση		[9], [11]
Τσάι	Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση		
Σκόρδο	Φυτοστερόλες, Φλαβονοειδή,	Αντισηπτική και τονωτική δράση	Βελτίωση πέψης και λιπιδικού προφίλ του αίματος	[10]
Τζίντζερ	Μονοτερπένια, Σισκετερπένια	Αντιμικροβιακή δράση	Αύξηση σωματικού βάρους, βελτίωση πέψης, μείωση λίπους	[10],[12]
Κανέλα	Φαινολικές ενώσεις, πολυφαινόλες, κινναμαλδεΐδη, ευγενόλη	Αντιοξειδωτική δράση	Βελτίωση πέψης, μείωση περιβαλλοντικού στρες	[10], [13], [14]

Πίνακας 2: Είδος αρωματικού φυτού με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική ικανότητα [15].

Είδος αρωματικού φυτού	Επιστημονική ονομασία	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mg ασκορβικού οξέος/g αποξηραμένου δείγματος)
Ρίγανη	Origanum vulgare	0,5 ± 0,1
Θυμάρι	Thymus vulgaris	0,6 ± 0,3
Λεβάντα	Lavandula vera	0,6 ± 0,4
Δεντρολίβανο	Rosmarinus officinalis	0,5 ± 0,1
Φασκόμηλο / Σάλβια	Salvia officinalis	0,4 ± 0,1
Δίκταμο	Origanum dictamnus	0,2 ± 0,2

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα φαινολικών οξέων σε εκχυλίσματα αρωματικών φυτών (mg / 100g ξηρού δείγματος) [15].

Είδος αρωματικού φυτού	Γαλλικό οξύ	Καφεϊκό οξύ	p-κουμαρικό οξύ	Βανιλικό οξύ	Φερουλικό οξύ
Ρίγανη	-	6,4 ± 0,02	-	-	10,4 ± 0,03
Δίκταμο	4,9 ± 0,03	13,5 ± 0,02	13,9 ± 0,04	18,5 ± 0,02	16,9 ± 0,04

Πίνακας 4: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε έλαια αρωματικών φυτών [15].

Είδος αρωματικού φυτού	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος /g ξηρού δείγματος)
Ρίγανη	±0,2
Θυμάρι	18,0 ± 0,9
Δεντρολίβανο	9,2 ± 0,1
Φασκόμηλο / Σάλβια	12,1 ± 0,1

Πίνακας 5: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε εκχυλίσματα αρωματικών φυτών [15].

Είδος αρωματικού φυτού	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος /g ξηρού δείγματος)
Ρίγανη	19,5 ± 0,2
Θυμάρι	8,0 ± 0,1
Λεβάντα	4,9 ± 0,1
Δεντρολίβανο	8,5 ± 0,1
Φασκόμηλο / Σάλβια	15,6 ± 0,1
Δίκταμο	8,2 ± 0,3

Παρ' όλα αυτά, εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού ανάπτυξης και απόδοσης κρέατος, τα κοτόπουλα τείνουν να εμφανίζουν ορισμένες βλάβες, γεγονός που δυσχεραίνει την κρεατοπαραγωγή πουλερικών. Μία εξ αυτών, αποτελεί το οξειδωτικό στρες, το οποίο εμφανίζεται στους οργανισμούς, συνήθως οφειλόμενο σε εξωγενείς παράγοντες. Το οξειδωτικό στρες εξελίσσεται μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα εξαιτίας της μεγάλης συσσώρευσης ελευθέρων ριζών σε έναν οργανισμό [16]–[18].

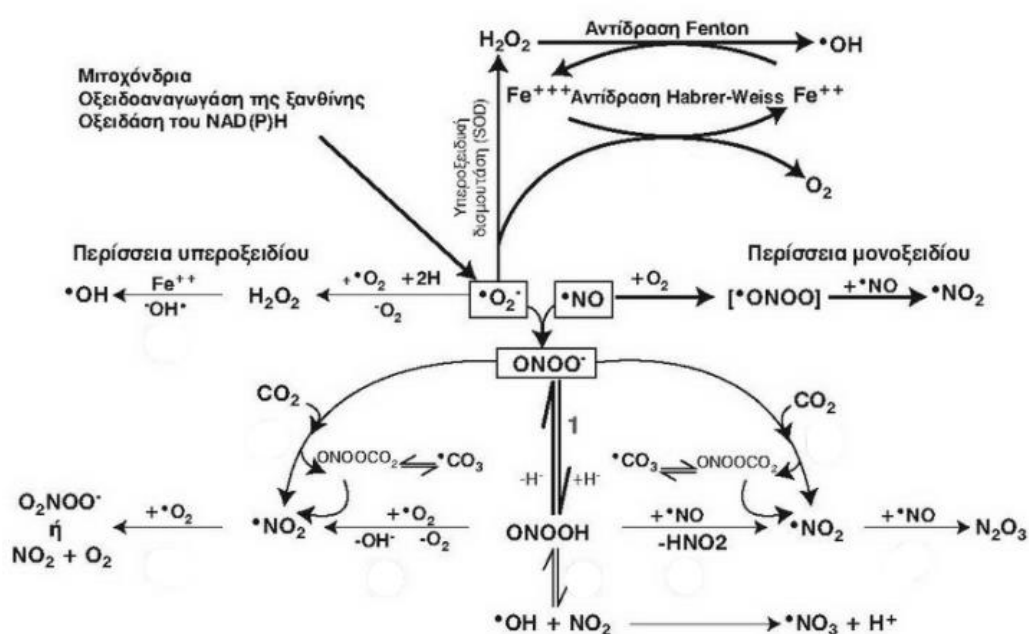
Παρά την βελτίωση των εξωγενών παραγόντων, όπως τις συνθήκες στέγασης, ανάπτυξης και διαβίωσης των πουλερικών, απαιτείται και η βελτίωση των διατροφικών συνθηκών τους. Ο εμπλουτισμός της βασικής τροφής των κοτόπουλων με πρόσθετα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι ικανός να βελτιώσει σημαντικά την υγεία τους, με συνέπεια την παραγωγή κρέατος πλουσιότερο σε θρεπτικά συστατικά και ποιοτικά ανώτερο.

1.3. Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται τα άτομα, μόρια (όπως οξυγόνου ή αζώτου) ή ιόντα, τα οποία διαθέτουν ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές για την αυτόνομη και ανεξάρτητη ύπαρξή τους. Η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου κάνει τα άτομα ασταθή και ιδιαίτερα ενεργά, ενώ ταυτόχρονα, αυξάνει τη δραστηρότητά τους. Επίσης, εξαιτίας της ύπαρξης του ασύζευκτου ηλεκτρονίου, τα άτομα έχουν την τάση να αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, με σκοπό τον εκ νέου σχηματισμό ριζών. Αυτό συμβαίνει λόγω της εγγενούς τάσης όλων των ατόμων να συμπληρώσουν την στιβάδα αυτή, με στόχο την τελική μετάπτωσή τους στη σταθερότερη και με το χαμηλότερο δυνατό ενεργειακό δυναμικό, κατάσταση. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται μία αλυσιδωτή αντίδραση εξουδετέρωσης και παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως λόγου χάριν η ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet-}$), του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), του αλκοξυλίου ($RO^{\bullet}$) και του υδροπεροξυλίου ($HO_2^{\bullet}$). Αντίθετα, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), έχουν ως κεντρικό άτομο το άζωτο

και παραδείγματα αυτών είναι η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}^\bullet$), ρίζα του διοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}_2^\bullet$) και η υπεροξυνιτρική ρίζα ($\text{ONOO}^\bullet$) [19].

Τόσο οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), όσο και οι δραστικές ρίζες αζώτου (RNS) είναι προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Συνεπώς, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν ελεύθερες ρίζες, καθώς έχει πλέον αποδειχθεί ότι δεν έχουν μόνο βλαπτικό ρόλο στη δομή των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Αντίθετα, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς "συμβίωσης" με τις ελεύθερες ρίζες, αφού η παραγωγή τους μέσω του μεταβολισμού είναι αναπόφευκτη (Πίνακας 6). Έτσι, φαίνεται να συμβάλλουν στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, αφού δρουν ως σηματοδοτικά μόρια (Εικόνα 4). Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει τόσο από ενδογενείς πηγές όσο και από εξωγενείς πηγές ή παράγοντες [19]–[21]. Όταν οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου δρουν κατά τρόπο επιβλαβή για έναν οργανισμό, προκαλούν αντίστοιχα οξειδωτικό στρες, εξαιτίας της υπερπαραγωγής τους [21].



Εικόνα 4: Αλληλεπίδραση υπεροξειδίου του οξυγόνου με το μονοξείδιο του αζώτου και παραγωγή ελευθέρων ριζών [22].

Πίνακας 6: Προϊόντα οξυγόνου παραγόμενα κατά τον αερόβιο μεταβολισμό.

Αναγωγή με τέσσερα ηλεκτρόνια του μοριακού οξυγόνου	Αντιδράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -} (+H^+) \rightleftharpoons H_2O$ $O_2^{\bullet -} + e^- \rightarrow (O_2^{\bullet -} + 2H^+) \rightarrow H_2O_2$ $H_2O_2 + e^- \rightarrow \bullet OH + OH^-$ $OH + e^- \rightarrow +H^- \rightarrow H_2O$	$2O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Δισμουτάσιο $H_2O_2 \rightarrow 2\bullet OH$ Ομολυτική κατάτμηση $H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$ Αντίδραση Haber-Weiss
Αντιδράσεις με μέταλλα μετάπτωσης	Αντιδράσεις με ανθρακικές ενώσεις
$Fe^{2+} + H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{3+} \bullet OH + OH^-$ Αντίδραση Fenton $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2^{\bullet -} + 2H^+$ (Αντίδραση Haber-Weiss εξαρτώμενη από το Fe^{2+}) $\bullet OH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + H^+ + O_2^{\bullet -}$ $Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ $Fe^{2+} + \bullet OH \rightarrow Fe^{3+} + OH^-$ $Fe^{2+} + \bullet OH \rightarrow Fe^{3+} + OH^-$	$R-H + \bullet OH \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$ Οργανική ρίζα $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ Υπεροξειδική ρίζα $ROO^{\bullet} + R-H \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$ Οργανικό υπεροξειδίο $ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + OH + Fe^{3+}$ Αλκοξυλική ρίζα

1.4. Οξειδωτικό Στρες

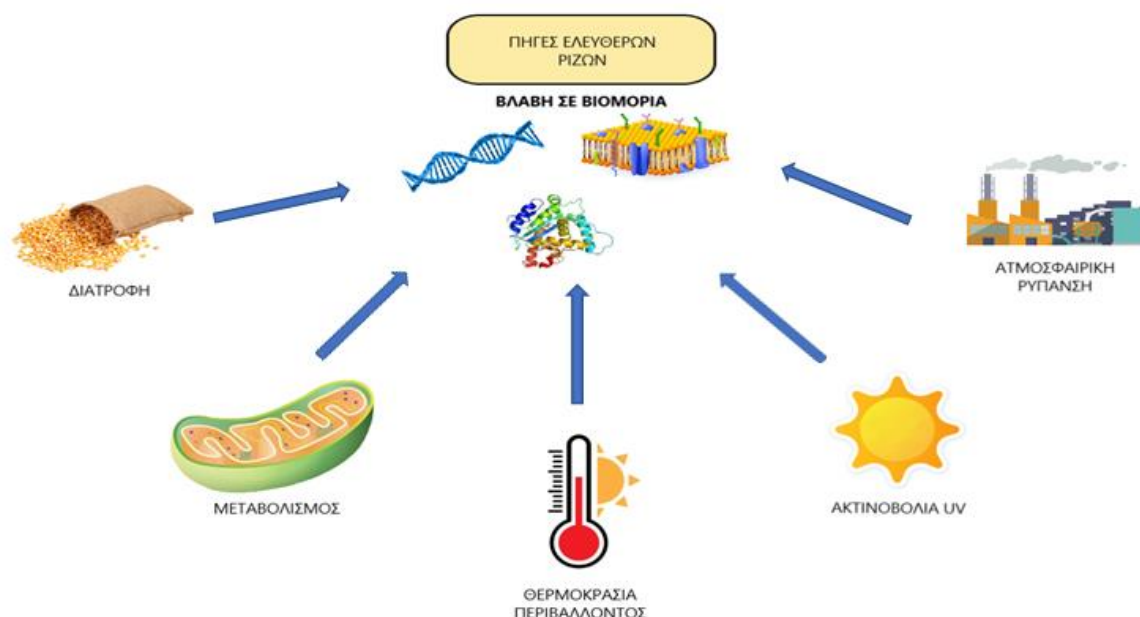
Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν διαταράσσεται η ισορροπία των προοξειδωτικών και των ενδογενών αντιοξειδωτικών σε έναν οργανισμό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών. Πρόκειται για μία κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα, μέσω του μεταβολισμού του οξυγόνου, δημιουργούν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), που είναι δυνητικά επιβλαβή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ρυθμός και το εύρος σχηματισμού οξειδωτικών εξισορροπούνται από τον ρυθμό απομάκρυνσής τους. Ωστόσο, η απώλεια της ισορροπίας αυτής έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του οξειδωτικού στρες. Τα υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε βιολογικά κύτταρα έχουν μεγάλο αντίκτυπο στη λειτουργία τους, αφού αποτελούν απειλή για τα μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένων και των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και τέλος σε ανεπαρκή λειτουργία των τελευταίων, γήρανση ή ακόμα και εμφάνιση ασθένειας [19], [21], [23].



Εικόνα 5: Αλλοίωση κυττάρων κατά την προσβολή τους από ελεύθερες ρίζες [24].

Στην βιομηχανία πουλερικών το οξειδωτικό στρες είναι ίσως ο σημαντικότερος παράγοντας απειλής για την υγεία των πτηνών. Σε ένα μεγάλο μέρος της ζωής τους, τα πουλερικά βιώνουν καταστάσεις οξειδωτικού στρες, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της ευζωίας τους. Η μεγάλη παραγωγή ελεύθερων ριζών στον οργανισμό των πουλερικών, εξαιτίας του οξειδωτικού στρες, καθίσταται ικανή για εμφάνιση διαφόρων διαταραχών ή ακόμα και ασθενειών, όπως διάφορες μυοπάθειες. Συνεπώς, το οξειδωτικό στρες είναι ικανό να θέσει σε μεγάλο κίνδυνο την κατάσταση της υγείας τους και να βλάψει σημαντικά την απόδοση ανάπτυξής τους, αλλά και την ποιότητα του κρέατος των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής. [25].

Διάφοροι λόγοι που μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες στα πουλερικά είναι κυρίως διατροφικοί, περιβαλλοντικοί (όπως ατμοσφαιρική ρύπανση, ραδιενέργεια, υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος) και η συσσώρευση τοξινών στον οργανισμό τους (Εικόνα 6) [25].



Εικόνα 6: Πηγές ελευθέρων ριζών και παραγωγής οξειδωτικού στρες στα πουλερικά.

1.4.1. Δείκτες Οξειδωτικού στρες

Για την εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης στα βιομόρια, δηλαδή την υπεροξείδωση των λιπιδίων, την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών, αλλά και του DNA, γίνεται προσδιορισμός συγκεκριμένων προϊόντων τα οποία παράγονται σε αυτές τις περιπτώσεις. Επίσης, μετράται και ο βαθμός προστασίας των αντιοξειδωτικών. Ως δείκτης οξειδωτικού στρες ορίζεται ένα βιολογικό μόριο του οποίου η χημική δομή έχει τροποποιηθεί από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Ο προσδιορισμός των δεικτών αυτών μπορεί να συμβάλλει, τόσο στην πρόληψη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων σε έναν οργανισμό, όσο και στην εκτίμηση του σταδίου της οξειδωτικής βλάβης που αυτός φέρει [26].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ζωοτροφή που προσφέρεται από τη βιομηχανία στα πουλερικά, τόσο ως προς την σύσταση, αλλά και την περιεκτικότητα σε ενώσεις, μπορεί να συμβάλλει στην μείωση του οξειδωτικού στρες, με την προσθήκη πρόσθετων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Όπως αναφέρθηκε ήδη, καταστάσεις έντονου στρες στα πτηνά, οδηγούν σε υποβάθμιση της ευζωίας τους, αλλά και της ποιότητας του παραγόμενου κρέατος. Πρόσθετα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι ικανά να συμβάλλουν στη μείωση σε σημαντικό βαθμό των ελευθέρων

ριζών και τέλος του οξειδωτικού στρες στα πουλερικά. Η αλλαγή στη σύσταση της διατροφής των κοτόπουλων αποτελεί μία εύκολη και οικονομική λύση για την μείωση του οξειδωτικού στρες.

1.5. Αντιοξειδωτικά - Αντιοξειδωτική Δράση

Αντιοξειδωτικά ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών μέσα σε έναν οργανισμό και συνεπώς για τη μείωση της λιπιδικής οξείδωσης. Τα αντιοξειδωτικά παρεμβάλλονται στην αλυσιδωτή αντίδραση κατά την οποία μία ελεύθερη ρίζα δεσμεύει ένα ηλεκτρόνιο από γειτονικό άτομο, δημιουργώντας μία νέα. Με την παρεμβολή αυτή, τα αντιοξειδωτικά δίνουν το ηλεκτρόνιο που υπολείπεται της ρίζας, αδρανοποιώντας την, χωρίς να σχηματίσουν εκ νέου κάποια άλλη. Έτσι, έχουν διπλό ρόλο, την παρεμπόδιση της περαιτέρω δημιουργίας ελευθέρων ριζών σε έναν οργανισμό, αλλά και την αναστολή της καταστροφικής δράσης των ίδιων των ριζών.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια ισορροπία σε κάθε οργανισμό, μεταξύ των δραστηριοτήτων που περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες και των ενδοκυτταρικών επιπέδων των αντιοξειδωτικών. Η διατήρηση αυτής της ισορροπίας κρίνεται απαραίτητη για την διατήρηση της υγείας των οργανισμών, αλλά και μετέπειτα την επιβίωσή τους.

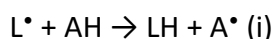
1.5.1. Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών

Σύμφωνα με τον μηχανισμό λειτουργίας τους, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

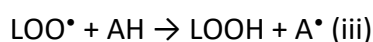
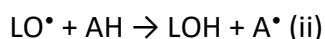
- 1) τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά, ή αλλιώς οξειδωτικά διάσπασης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης και
- 2) τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά, ή αλλιώς προληπτικά αντιοξειδωτικά.

Τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά δρουν στην διαδικασία αναστολής του αρχικού σταδίου εκκίνησης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης. Ο ρόλος τους είναι η δέσμευση των αλκυλο-ριζών που έχουν ήδη παραχθεί από την αντίδραση που έχει λάβει χώρα μεταξύ

του υποστρώματος, σε συνδυασμό με κάποια δραστική μορφή οξυγόνου, όπως φαίνεται και στην αντίδραση (i).



Διαφορετικά, μπορούν να δεσμεύσουν τις αλκοξυ-ρίζες ή τις αλκυλοπεροξυλο-ρίζες κατά το στάδιο διάδοσης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (ii) και (iii) αντίστοιχα:



Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στην καθυστέρηση του ρυθμού οξείδωσης, όπως λόγου χάριν με την αναστολή έναρξης μιας αντίδρασης παραγωγής ελεύθερων ριζών.

Ταυτόχρονα, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν σε φυσικά, τα οποία περιέχονται στα τρόφιμα, και σε συνθετικά, τα οποία παράγονται εργαστηριακά. Στην πρώτη κατηγορία, τα φυσικά αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στη διατήρηση της υγείας ενός οργανισμού αλλά ταυτόχρονα και στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Στα πουλερικά, οι αντιοξειδωτικές ουσίες, μέσω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών, είναι ικανές να βελτιώσουν σε σημαντικό βαθμό την κατάσταση της υγείας τους.

Ένα αντιοξειδωτικό, για να θεωρηθεί ωφέλιμο για έναν οργανισμό, είναι η ιδιότητά του να απορροφάται το ίδιο από τον οργανισμό, όπως επίσης και η βιοδιαθεσιμότητά του. Όταν δεν είναι δυνατή η απορρόφησή του, ο εκάστοτε οργανισμός δεν είναι σε θέση να λάβει καμία από τις ευεργετικές ιδιότητές του. Σημαντικό ρόλο, επίσης, έχει ο τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών, όταν αυτός είναι συνεργατικός ή ανταγωνιστικός. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να δρουν συνδυαστικά, προστατεύοντας έτσι το ένα το άλλο από φαινόμενα αυτοοξείδωσης.

Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενδογενή (κυτταρικές λειτουργίες) και σε εξωγενή (π.χ. λήψη από την τροφή). Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν γενικά στους: (α) ενζυμικούς και (β) μη-ενζυμικούς. Στην κατηγορία των ενζυμικών αντιοξειδωτικών

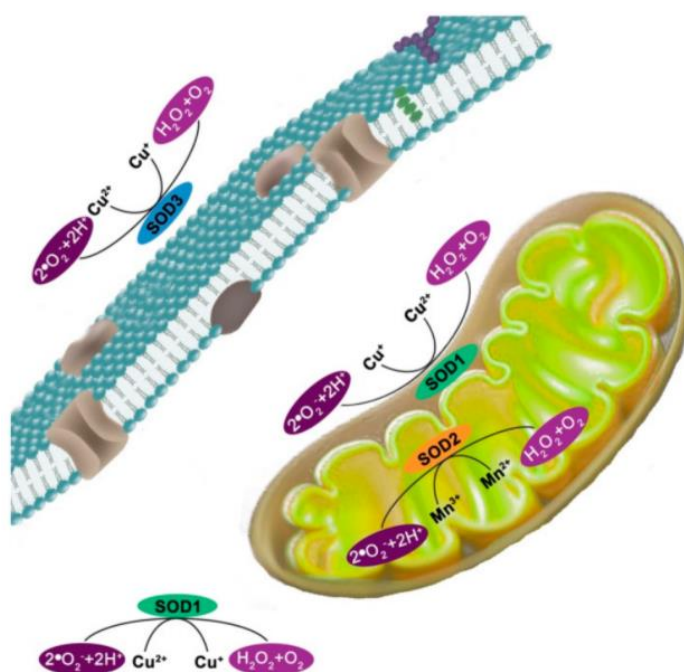
ανήκουν η δισμουτάση του υπεροξυλίου, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η καταλάση, η θειορεδοξίνη και η γλουταρεδοξίνη η οποία είναι επίσης γνωστή και ως θειολοτρανσφεράση. Αντίθετα, στα μη ενζυμικά ανήκουν οι βιταμίνες, τα μέταλλα, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή κ.λπ.

1.5.1.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Οι ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (ενδογενή αντιοξειδωτικά) μετατρέπουν δύο εξαιρετικά τοξικές ρίζες, την ρίζα υπεροξειδίου του υδρογόνου ($O_2^{\bullet -}$) και την ρίζα υπεροξειδίου ανιόντος, σε αδρανείς ενώσεις, όπως σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και νερό αντίστοιχα. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν τα παρακάτω:

α) Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Superoxide dismutase, SOD)

Πρόκειται για μεταλλοένζυμα με οργάνωση δομικής υπομονάδας. Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) εμφανίζεται με δύο διαφορετικές μορφές, ανάλογα το σημείο στο οποίο εντοπίζονται. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Cu, Zn-SOD ή SOD1), στη μιτοχονδριακή μήτρα και στην εσωτερική μεμβράνη (Mn-SOD ή SOD2), και εξωκυτταρικό διαμέρισμα (Cu, Zn-SOD ή SOD3), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Διαφορετικές μορφές SOD και εντοπισμός τους [27].

Ο κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση των διεργασιών οξείδωσης στα βιολογικά κύτταρα. Τα ένζυμα αυτά περισυλλέγουν τις ρίζες του σουπεροξειδίου, καταλύοντας τη μετατροπή δύο ελευθέρων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μοριακό οξυγόνο O_2 [27], [28]:



Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση αυτο-οξειδοαναγωγής ή αλλιώς αντίδραση διπλής μετατροπής με παρόμοιο μηχανισμό. Η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου ανάγεται από το σουπεροξείδιο για την παραγωγή οξυγόνου. Έπειτα, η ανηγμένη μορφή του ενζύμου, που μόλις έχει σχηματιστεί, αντιδρά με ένα δεύτερο ανιόν σουπεροξειδίου, με τελικό προϊόν το υπεροξείδιο. Το τελευταίο προσλαμβάνει δύο πρωτόνια κατά την πορεία της αντίδρασης, ώστε να προκύψει το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες είναι παρούσες στα κύτταρα σε ικανά επίπεδα ώστε να προκαλέσουν αδρανοποίηση του υπεροξυλίου, με ταυτόχρονη αναστολή του σχηματισμού συμπλόκων οξυγόνου με μέταλλα μετάπτωσης, την απελευθέρωση ελεύθερου σιδήρου και την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton.

Το H_2O_2 είναι ένας ουσιαστικός αισθητήρας στον οξειδοαναγωγικό μεταβολισμό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή του είναι χαμηλή και μεσολαβεί στην απόκριση στρες και εμπλέκεται σε φυσιολογικές διεργασίες του μεταβολισμού. Όταν όμως, η συγκέντρωσή του αυξηθεί σημαντικά, προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση και οδηγεί σε κυτταρική βλάβη. Σύμφωνα λοιπόν με το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα που εμπλέκεται στην παραγωγή και απομάκρυνση του H_2O_2 , ανάλογα με τα εμπλεκόμενα ένζυμα, ο ρόλος του είναι ταυτόχρονα φυσιολογικός και παθολογικός. Έτσι λοιπόν, η δραστηριότητα SOD μπορεί να έχει και αντίθετη σημασία. Το SOD μπορεί να δράσει και ως προ-οξειδωτικό, καθώς το H_2O_2 μπορεί να υπερσυσσωρευτεί, οδηγώντας σε υπερπαραγωγή ROS και τελικά στην τοξικότητα των κυττάρων [27].

Οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου εμπλέκονται επίσης με μικρό βαθμό, στην αποτοξίνωση από τον οξειδωτικό και τον νιτρωτικό παράγοντα υπεροξυνιτρικό

(ONOO). Το ίδιο σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου και της ρίζας του μοριακού οξυγόνου. Το ONOO⁻ είναι υπεύθυνο για την δημιουργία περαιτέρω ελεύθερων ριζών κατά την αντίδρασή του με το διοξείδιο του άνθρακα. Η συμβολή της SOD είναι ότι παρεμποδίζει την παραπάνω αντίδραση. Συμπερασματικά, η μειωμένη δραστηριότητα του SOD μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση οξειδωτικού στρες αλλά και σε εμφάνιση ασθενειών [27].

β) Καταλάση (CAT)

Το ένζυμο καταλάση περιέχει πορφυρίνη και είναι μία αιμοπρωτεΐνη. Ρόλος της είναι η περισυλλογή του υπεροξειδίου του υδρογόνου που έχει παραχθεί από την δισμουτάση του σουπεροξειδίου και η μετέπειτα αποσύνθεσή του δημιουργώντας οξυγόνο και νερό [27]:



Και τα δύο ένζυμα που επεξηγήθηκαν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά, διότι η ταχύτητα δράσης τους είναι παρόμοια με την ταχύτητα διάχυσης.

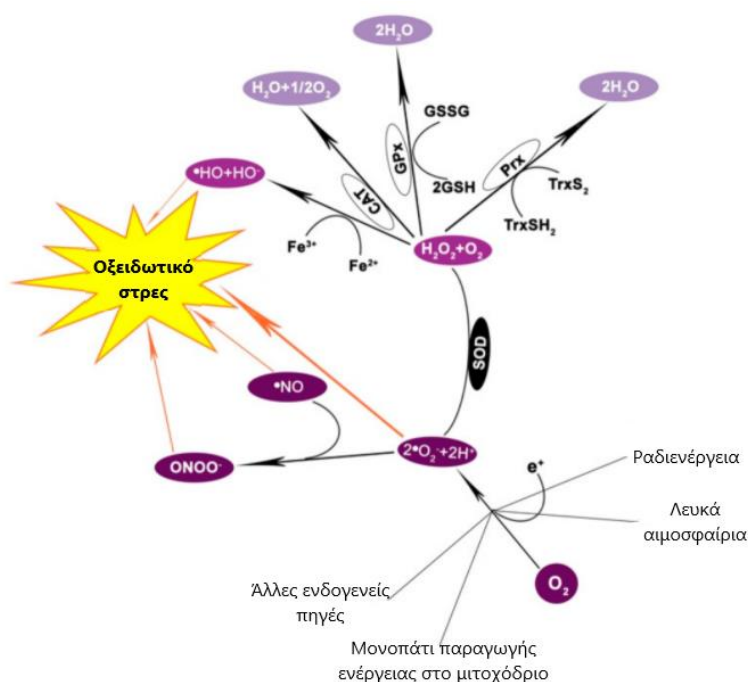
Η καταλάση δεν είναι το μόνο ένζυμο, ικανό να αποικοδομήσει το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τον ίδιο ρόλο έχουν και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης. Παρ' όλα αυτά, όταν το υπεροξείδιο διαχυθεί διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης η καταλάση μπορεί να προσφέρει προστασία στο κύτταρο.

γ) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο το οποίο περιέχει σελήνιο και καταλύει τις αντιδράσεις αναγωγής των υδροϋπεροξειδίων σε αλκοόλες. Επίσης, οι GSH-Pxs χρησιμοποιούν το H₂O₂ ως υπόστρωμα, για να πετύχουν ταυτόχρονη μείωση του H₂O₂ όσο και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων, με απλή αναγωγή του H₂O₂ σε νερό, μέσω της συνοξείδωσης της GSH [27].



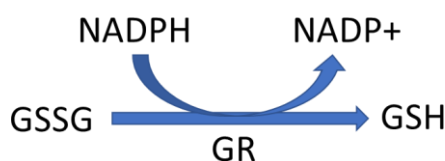
Σε ένα γενικό πλαίσιο, με τους ήδη προαναφερθέντες αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ισχύει ότι, όταν η δραστηριότητα της SOD αυξάνεται, τα ενισχυμένα επίπεδα H_2O_2 πυροδοτούν την ανοδική ρύθμιση του CAT ή/και του GPx, με μια τελική αντιοξειδωτική ισορροπία ως αντισταθμιστική, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 8.



Εικόνα 8: Γενική απεικόνιση των ενζύμων SOD, CAT, GPx στις αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών[27] .

δ) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης επιτυγχάνεται με την διατήρηση της υψηλής αναλογίας ανηγμένης (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό συμβαίνει μέσω της αντίδρασης αναγωγής της GSSG, με την παράλληλη οξείδωση του NADPH (ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο) σε $NADP^+$ (φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο). Ταυτόχρονα, το NADPH ανάγει το FAD (δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης) σε $FADH_2$, το οποίο χρησιμοποιείται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ως συνένζυμο.



Η δραστικότητα της αναγωγής της γλουταθειόνης μπορεί να αυξηθεί με δύο τρόπους, ή με την αύξηση των επιπέδων δραστικότητα της GR, ή με την αύξηση των επιπέδων NADPH.

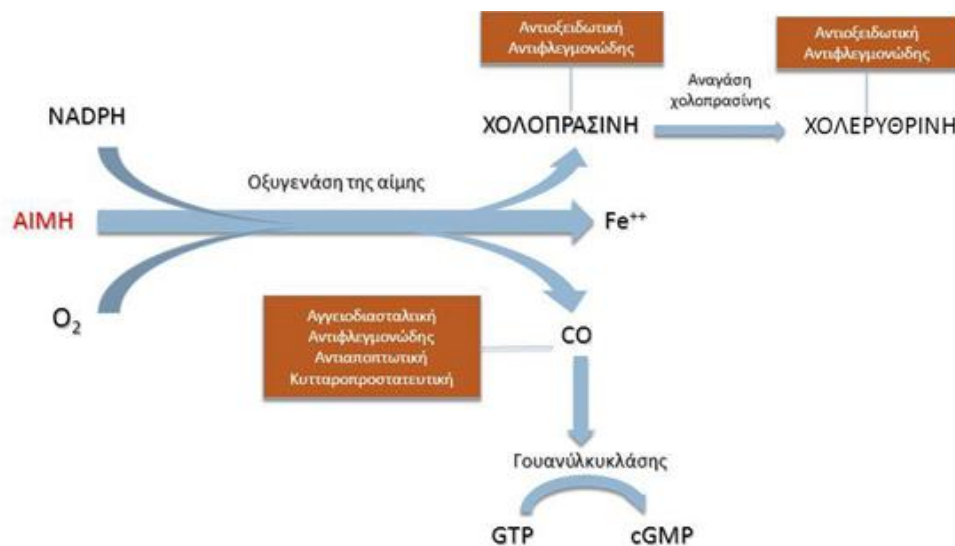
Γενικά, η οξειδωμένη γλουταθειόνη συσσωρεύεται μέσα στα κύτταρα και η αναλογία GSH/GSSG είναι ένα καλό μέτρο του οξειδωτικού στρες ενός οργανισμού. Πολύ υψηλή συγκέντρωση GSSG μπορεί να βλάψει πολλά ένζυμα [29].

ε) Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι μία υπερ-οικογένεια ενζύμων που υπάρχει τόσο στους προκαρυωτικούς, όσο και στους ευκαριωτικούς οργανισμούς ως μεταβολικά ισοένζυμα διαφορετικής εκλεκτικότητας. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης προς ξενοβιοτικά υποστρώματα, με τελικό στόχο την αποτοξίνωση των κυττάρων από ενδογενείς ή εξωγενείς τοξικές ενώσεις. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στην σουλφυδρυλική ομάδα της γλουταθειόνης και ενός ηλεκτρονιόφιλου κέντρου του ξενοβιοτικού υποστρώματος. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δημιουργία περισσότερο υδατοδιαλυτών συμπλόκων με μειωμένη τοξικότητα, τα οποία θα μπορούν να αποβληθούν με φυσικό τρόπο από τον οργανισμό. Ωστόσο, οι ρόλοι τους δε περιορίζονται μόνο στην αποτοξίνωση, αλλά και σε άλλες λειτουργίες, όπως η μεταφορά και αποθήκευση διάφορων υδρόφοβων μορίων.

στ) Οξυγενάση της αίμης (HO-1)

Η κύρια λειτουργία της οξυγενάσης της αίμης είναι να καταλύει το πρώτο βήμα για την αποδόμηση της αίμης, δηλαδή συμβάλλει στη ρύθμιση και στον μεταβολισμό της αίμης. Η αίμη καταβολίζεται μέσω της οξυγενάσης μέσω της αποδέσμευσης του σιδήρου, οδηγώντας στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και χολοπρασίνης, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 9. Παράλληλα με τη λειτουργία αυτή της οξυγενάσης της αίμης, έχει δειχθεί ότι μπορεί να συμμετέχει και στην προστασία των κυττάρων, έναντι του οξειδωτικού στρες. Η οξυγενάση υπάρχει σε δύο ισομορφές, την HO-1 (οξυγενάση της αίμης-1 (ισομορφή 1)) και την HO-2 (οξυγενάση της αίμης-2 (ισομορφή 2)). Και οι δύο ισομορφές παρουσιάζουν τόσο αντιοξειδωτική, όσο και αντιφλεγμονώδη δράση.



Εικόνα 9: Μεταβολισμός της αίμης με τη καταλυτική δράση της οξυγενάσης της αίμης.

1.5.1.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών κατατάσσονται οι ενώσεις βάσει της διαλυτότητάς τους σε υδατικά ή λιπόφιλα διαλύματα. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε υδατικό περιβάλλον σε έναν οργανισμό. Για να μπορέσουν τα αντιοξειδωτικά να τις δεσμεύσουν, με σκοπό να τις απενεργοποιήσουν και να σταματήσουν ή να προλάβουν την έναρξη μίας αλυσιδωτής οξειδωτικής αντίδρασης, θα πρέπει τα ίδια ως επί το πλείστον να έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, τα οποία δεσμεύουν κυρίως τις λιποδιαλυτές ρίζες, οι οποίες εντοπίζονται εντός των μεμβρανών αλλά και των λιποπρωτεϊνών. Εξάιρεση των παραπάνω αποτελεί η α-τοκοφερόλη, γνωστή και ως βιταμίνη Ε, η οποία παρόλο που εντοπίζεται στην επιφάνεια των μεμβρανών, είναι ικανή να δεσμεύσει και υδατοδιαλυτές ρίζες. Αυτή η ικανότητα που εμφανίζει η α-τοκοφερόλη, θεωρείται υψίστης σημασίας, αφού τα λιπίδια οξειδώνονται μέσω ενός αλυσιδωτού μηχανισμού ελευθέρων ριζών, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνονται και να επιδεινώνονται οι βλάβες που οφείλονται σε αυτόν, αν δεν πραγματοποιηθεί αναστολή κάποιου από τα στάδια του μηχανισμού. Συμπερασματικά, ένας οργανισμός έχει ανάγκη τόσο τα υδρόφιλα, όσο και τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά για να λειτουργήσει χωρίς να εμφανίσει οξειδωτικές βλάβες.

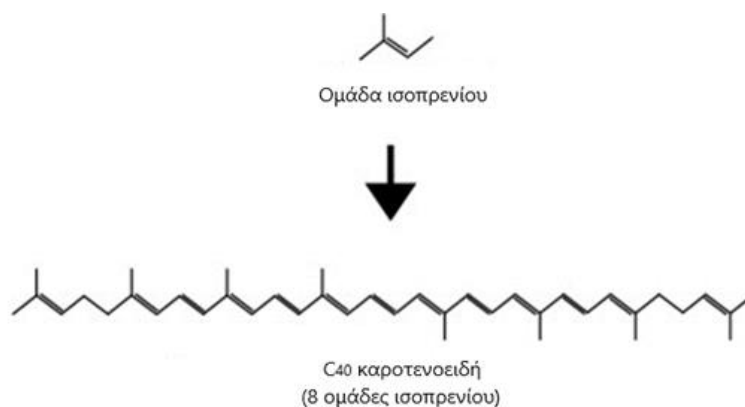
Πολλοί οργανισμοί, όπως και τα πουλερικά δεν μπορούν να συνθέσουν ορισμένα από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Τα ίδια εμφανίζονται συχνά σε φυτικούς οργανισμούς. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής ακόμα και σε καθημερινή βάση, μιας και τα πουλερικά είναι οργανισμοί οι οποίοι εμφανίζουν συχνά οξειδωτικό στρες σε κάποιο στάδιο της ζωής τους. Με αυτόν τον τρόπο, θα επιτευχθεί πρωτίστως η πρόληψη οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς, αλλά και η μείωσή του, σε περίπτωση ήδη εμφάνισής του, ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής τους.

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ανήκουν κυρίως τα καροτενοειδή, βιταμίνες, όπως η βιταμίνη C και E, οι θειόλες, τα φλαβονοειδή και άλλα.

α) Καροτενοειδή

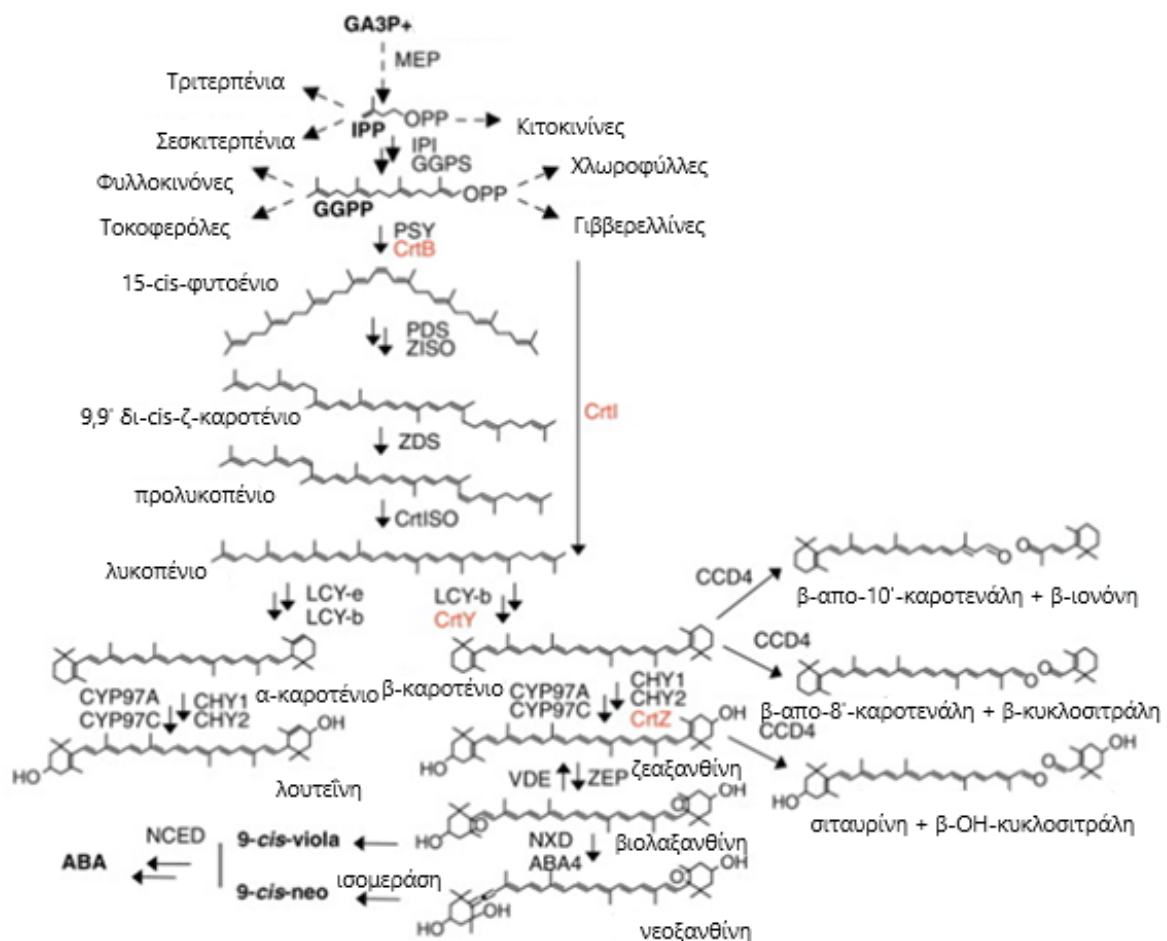
Τα καροτενοειδή αποτελούν την πλέον διαδεδομένη ομάδα χρωστικών των ζώντων οργανισμών στη φύση. Πρόκειται για αντιοξειδωτικά τα οποία βρίσκονται σε όλα τα είδη φυτών, τόσο σε φωτοσυνθετικούς όσο και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς, στα βακτήρια, αλλά και στους μύκητες. Επίσης, τα καροτενοειδή εντοπίζονται και στα ζώα, τα οποία όμως δεν έχουν την δυνατότητα *de novo* βιοσύνθεσής τους, με αποτέλεσμα να τα παραλαμβάνουν από τα φυτά μέσω της τροφής τους [30].

Τα καροτενοειδή αποτελούν παράγωγα πολυακόρεστων υδρογονανθράκων, τα οποία φέρουν στο μόριό τους οκτώ ομάδες ισοπρενίου, δηλαδή συνολικά 40 άτομα άνθρακα (Εικόνα 10). Μία άλλη ονομασία που χρησιμοποιείται είναι τα τετρατερπένια [31]–[33].



Εικόνα 10: Δομή καροτενοειδών [34].

Τα περισσότερα καροτενοειδή που βρίσκονται στους φυτικούς οργανισμούς φέρουν 40 άτομα άνθρακα στον σκελετό τους και συντίθενται από δύο μόρια διφωσφορικού γερανυλογερανυλίου (GGPP), ενός ενδιάμεσου παραγώγου με 20 άτομα άνθρακα. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται το φυτοένιο, το οποίο αποτελεί και πρόδρομη ένωση όλων των καροτενοειδών που απαντώνται στα φυτά. Ο μεγάλος αριθμός των δομών που φέρουν τα καροτενοειδή προκύπτει από διαδοχικές δομικές αλλαγές, όπως λόγου χάριν η κυκλοποίηση στο ένα ή και στα δύο άκρα του μορίου, υδροξυλίωση ή εισαγωγή οξυγονούχων ομάδων στο μόριο, με τελικό προϊόν, ενώσεις που φέρουν χρωμοφόρες ομάδες, χαρακτηριστικές της ομάδας των καροτενοειδών [31], [32], [35]. Παραδείγματα των διαδοχικών αυτών αλλαγών και των προϊόντων παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: De novo βιοσύνθεση των καροτενοειδών στα φυτά [36].

Τα καροτενοειδή με λιγότερα από 40 άτομα άνθρακα ονομάζονται αποκαροτενοειδή. Αντίθετα, αυτά που έχουν μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα (45-50 άτομα άνθρακα) ονομάζονται ομοκαροτενοειδή και συναντώνται μόνο σε μερικά είδη βακτηρίων. Τα καροτενοειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

α) σύμφωνα με την χημική τους δομή, σε καροτένια (αποκλειστικά πολυακόρεστοι υδρογονάνθρακες), και σε ξανθοφύλλες (οξυγονούχα παράγωγά με υποκατεστημένες υδροξυ- ή οξο- ή εποξυ- ομάδες), και

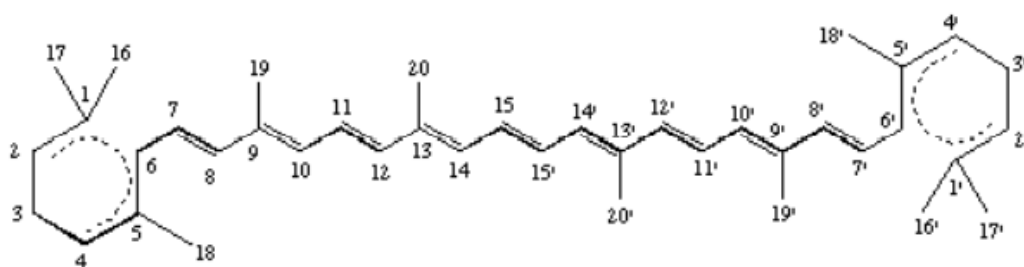
β) σύμφωνα με την λειτουργικότητά τους, σε πρωτογενή και δευτερογενή καροτενοειδή.

Παραδείγματα των κατηγοριών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Ταξινόμηση καροτενοειδών [37].

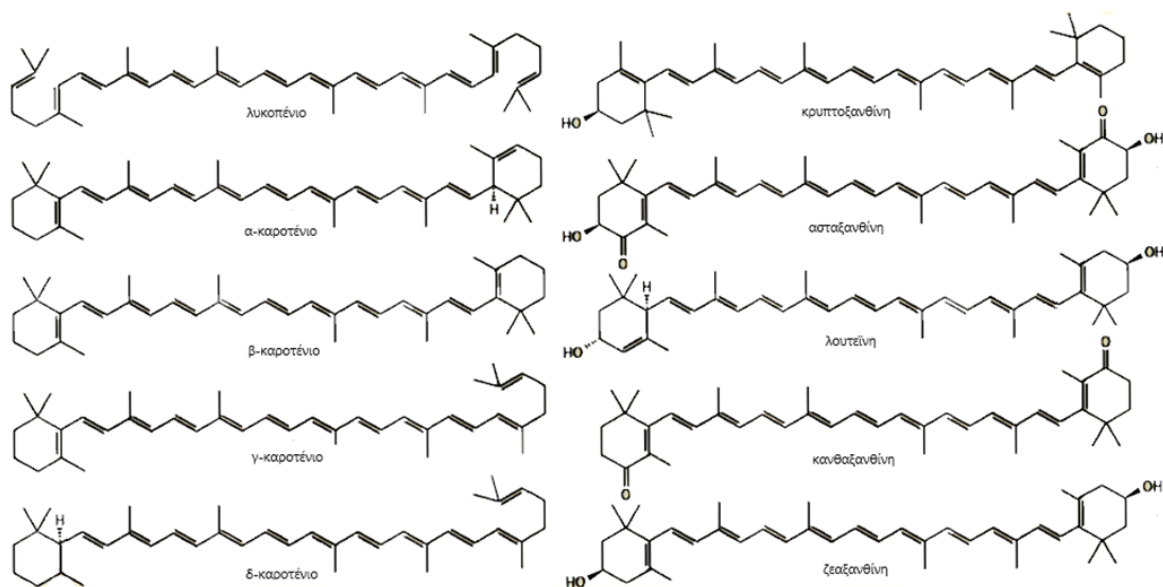
Κριτήριο Ταξινόμησης	Υποομάδες και χαρακτηριστικά	Παραδείγματα
Χημική δομή	Καροτένια Καροτενοειδή αποτελούμενα από C και H	α-καροτένιο, β-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη
	Ξανθοφύλλες Καροτενοειδή αποτελούμενα από C, H και O	Λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, βιολαξανθίνη, νεοξανθίνη, φουκοξανθίνη
	Πρωτογενή Καροτενοειδή απαιτούμενα για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης	β-καροτένιο, βιολαξανθίνη, νεοξανθίνη, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, ανθεραξανθίνη
Λειτουργικότητα	Δευτερογενή Η παρουσία τους δεν συνδέεται άμεσα με την επιβίωση των φυτών	Καροτενοειδή που εντοπίζονται σε φρούτα και άνθη: α-καροτένιο, καψανθίνη, λυκοπένιο, μπιξίνη, ασταξανθίνη, κανθαξανθίνη

Οι ονομασίες των καροτενοειδών συχνά προέρχονται από το είδος του οποίου έγινε η απομόνωσή τους. Παρ' όλα αυτά, όλες οι ονομασίες βασίζονται στη κύρια ονομασία «καροτένιο» που αφορά τη δομή και συγκεκριμένα την αρίθμηση της δομής στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 12). Η πλειοψηφία των καροτενοειδών που εντοπίζονται στη φύση βρίσκονται σε all-trans (ή all-E) διαμόρφωση, ενώ λίγα είναι αυτά που έχουν Z- ή cis διαμόρφωση [31].



Εικόνα 12: Γενική δομή καροτενοειδών [38].

Στην Εικόνα 13 απεικονίζεται η χημική δομή διαφόρων παραδειγμάτων των καροτενοειδών.



Εικόνα 13: Τυπικά καροτενοειδή: Καροτένια (αριστερά) και ξανθοφύλλες (δεξιά) [39].

Φυσικές ιδιότητες των καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλες ενώσεις, οι οποίες είναι αδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα. Εξάιρεση αποτελούν τα καροτενοειδή που στο μόριό τους φέρουν πολικές λειτουργικές ομάδες. Ταυτόχρονα, η παρουσία εκτεταμένου συζυγιακού συστήματος (μέσω διπλών δεσμών) στον ανθρακικό σκελετό των μορίων, είναι υπεύθυνη για το κυριότερο χαρακτηριστικό τους, την απορρόφηση φωτός. Όταν η χρωμοφόρος ομάδα φέρει περισσότερους από επτά διπλούς δεσμούς, έχει την δυνατότητα απορρόφησης

στο φάσμα ορατού. Στα συγκεκριμένα μόρια, παρατηρούνται αποχρώσεις από κίτρινο έως κόκκινο [32].

Η δομή των καροτενοειδών είναι υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά τους, όπως η ευαισθησία τους στην αυτο-οξείδωση. Γενικά, τα περισσότερα καροτενοειδή στη φύση απαντώνται ως trans-ισομερή. Ωστόσο, υπάρχει πληθώρα παραγόντων που μπορούν να επηρεάζουν την ισομερίωσή τους. Αυτοί, είναι κυρίως η θέρμανση, το φως και οι ποικίλες διαφοροποιήσεις που φέρουν στη δομή τους. Η εκάστοτε ισομερής διαμόρφωση μίας καροτενοειδούς ένωσης, είναι ικανή να προσδιορίσει το σχήμα του μορίου και κατά συνέπεια να επηρεάσει ιδιότητες, όπως τη διαλυτότητα και την ικανότητα απορρόφησής του. Συγκεκριμένα, οι trans διαμορφώσεις των καροτενοειδών ενώσεων, συγκριτικά με τις cis διαμορφώσεις, είναι περισσότερο άκαμπτες και έχουν μεγαλύτερη τάση κρυστάλλωσης ή συσσωμάτωσης. Αυτός είναι άλλωστε και ο λόγος για τον οποίο οι cis διαμορφώσεις μπορούν να απορροφηθούν και να μεταφερθούν με μεγαλύτερη ευκολία στους ζωικούς οργανισμούς. Όλες οι παραπάνω ιδιότητες σχετίζονται με τη δομική σταθερότητα των μορίων των καροτενοειδών [32].

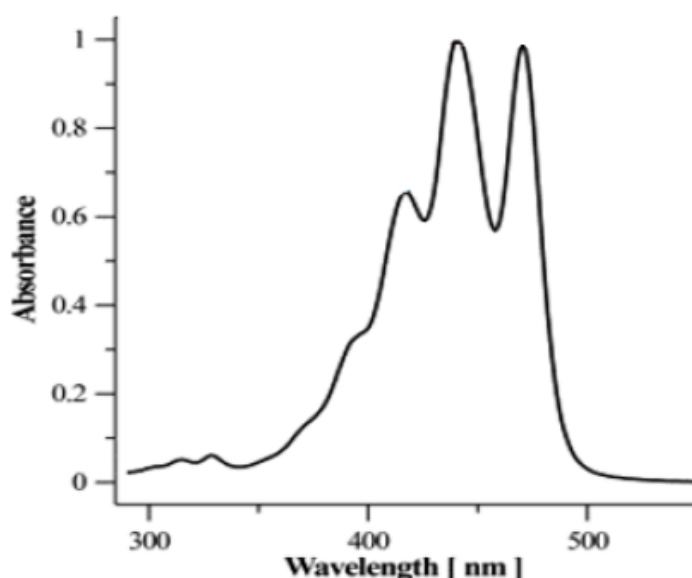
Στους φυτικούς οργανισμούς, τα καροτενοειδή εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία. Συγκεκριμένα, στα άνθη εντοπίζονται στους χρωμοπλάστες, ενώ στα πράσινα μέρη συναντώνται στη μεμβράνη των χλωροπλαστών ως μέρος της φωτοσυνθετικής συσκευής [40]–[43]. Στα φυτά εντοπίζονται συνήθως το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, από την κατηγορία των καροτένιων, ενώ από την κατηγορία των ξανθοφυλλών, η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και η βιολαξανθίνη [33], [40].

Φασματοσκοπικές ιδιότητες των καροτενοειδών

Το χαρακτηριστικό που είναι υπεύθυνο για το φάσμα ορατού των καροτενοειδών, είναι το συζυγιακό σύστημα των καροτενοειδών ενώσεων, δηλαδή ο αριθμός των συζυγών διπλών δεσμών που διαθέτουν. Ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών διαφοροποιείται η τιμή της μέγιστης απορρόφησης ($\lambda_{\max}$). Στα φάσματα ορατού - υπεριώδους των καροτενοειδών παρατηρείται βαθυχρωμία, όπου όσο διευρύνεται το συζυγιακό σύστημα της χρωμοφόρου ομάδας, τόσο αυξημένη θα βρεθεί και η τιμή του $\lambda_{\max}$. Επίσης, τα μέγιστα απορρόφησης μπορούν να επηρεαστούν

και από τον διαλύτη, αφού μπορεί να υπάρχουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους [32]. Στην Εικόνα 14 παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό φάσμα ορατού-υπεριώδους φωτός καροτενοειδών.

Άλλες φασματοσκοπικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα καροτενοειδή είναι η απορρόφηση ενέργειας στην υπέρυθρη (IR) περιοχή και ο φθορισμός. Πιο συγκεκριμένα, ο φθορισμός παρατηρείται σπάνια, αφού ορισμένα μόνο καροτενοειδή έχει την δυνατότητα να φθορίσουν όταν διεγείρονται σε κατάλληλα μήκη κύματος. Αντίστοιχα, η φασματοσκοπία IR εφαρμόζεται μόνο για την ταυτοποίηση των λειτουργικών ομάδων των καροτενίων, όπως αυτή του υδροξυλίου, του καρβονυλίου και του αλλενίου [32].



Εικόνα 14: Γενικό φάσμα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους φωτός καροτενοειδών [44].

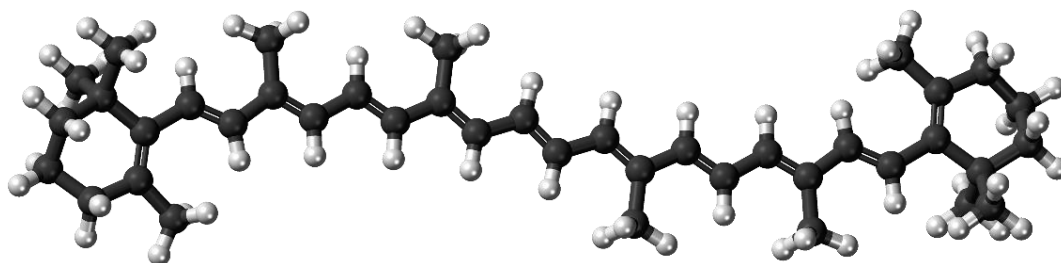
Οι χαρακτηριστικές ενώσεις των καροτενοειδών

- **Β-καροτένιο**

Το β-καροτένιο (Εικόνα 15) την πιο χαρακτηριστική ένωση της κατηγορίας των καροτενοειδών. Πρόκειται για ένα λιπόφιλο μόριο, φυτικής προέλευσης, το οποίο χάρη στις χρωστικές που περιέχει είναι υπεύθυνο για το πορτοκαλί χρώμα που έχουν διάφορα φρούτα και λαχανικά, όπως τα καρότα ενώ σε σημαντικές συγκεντρώσεις ανευρίσκεται στο μπρόκολο, στα νεκταρίνια, στην παπάγια, στα βερίκοκα και στα γκρέιπφρουτ.

Το β-καροτένιο διαθέτει ιδιότητες προβιταμίνης Α, η οποία αποτελεί την πρόδρομη ένωση της βιταμίνης Α. Ως λιποδιαλυτή ουσία, απορροφάται από το λεπτό έντερο μαζί με άλλα λιπίδια, όπου και διασπάται στη συνέχεια στο βλεννογόνο του εντέρου στο τελικό προϊόν, την ρετινάλη, γνωστή και ως βιταμίνη Α. Το β-καροτένιο αποθηκεύεται στον οργανισμό στο λιπώδη ιστό και σε μικρότερο ποσοστό και στο ήπαρ.

Το συνθετικό β-καροτένιο είναι στερεό με έντονο σκούρο πορτοκαλί χρώμα όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 16. Πρόκειται για μία φωτοευαίσθητη ουσία, η οποία οξειδώνεται παρουσία οξυγόνου, χάνοντας έτσι το έντονο σκούρο χρώμα της.



Εικόνα 15: Μοριακή δομή του β-καροτενίου [45].



Εικόνα 16: Στερεή μορφή του β-καροτενίου [46].

Απορρόφηση από τον οργανισμό

Η ύπαρξη της βιταμίνης Α απαιτείται για την επιβίωση όλων των σπονδυλωτών ζώων. Το β-καροτένιο αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές πηγές της βιταμίνης Α. Παρ' όλα αυτά, η απορρόφηση του β-καροτενίου από τον δωδεκαδάκτυλο και εν συνεχεία από το λεπτό έντερο, ο μετασχηματισμός σε βιταμίνη Α, η μεταφορά, η συσσώρευση και ο μεταβολισμός ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του οργανισμού το οποίο εξετάζουμε [47].

Δεδομένου ότι τα πουλερικά εκτίθενται σε συνθήκες στρες ως ένα ποσοστό κατά τη διάρκεια της ζωής τους, είναι εξαιρετικά σημαντικό το ανοσοποιητικό τους σύστημα να παραμένει ισχυρό. Συνεπώς, μία από τις καταλληλότερες πηγές για τον οργανισμό αποτελεί το β-καροτένιο, το οποίο έχει αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Έρευνες έχουν δείξει ότι το β-καροτένιο έχει την ικανότητα ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος των πουλερικών, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικά την βιωσιμότητά τους. Επιπλέον, αποτελεί την βασική πηγή βιταμίνης Α, η οποία είναι απαραίτητη για την υγιή ανάπτυξη των οστών, του δέρματος και του βλεννογόνου, αλλά ειδικότερα και στην όραση σε έναν ζωικό οργανισμό [47].

Το β-καροτένιο αποτρέπει την οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη ιδιότητες. Επιπλέον, το β-καροτένιο και ευρύτερα όλη η κατηγορία των καροτενοειδών έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα και στο χρώμα του δέρματος, του αυγού και του κρέατος [47].

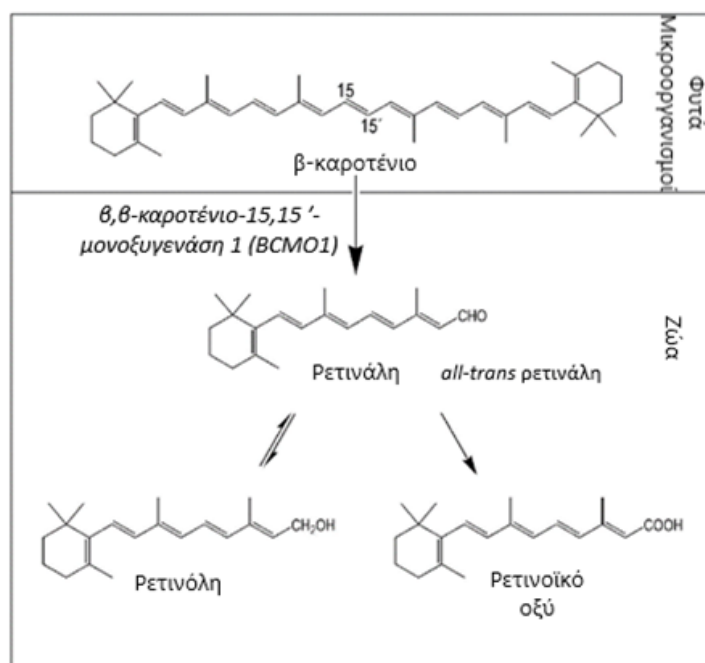
Επειδή όπως αναφέρθηκε ήδη, τα καροτενοειδή δεν μπορούν να συντεθούν σε έναν ζωικό οργανισμό, είναι επιτακτική ανάγκη να προσλαμβάνονται από την τροφή σε καθημερινή βάση. Γι' αυτόν τον λόγο, τα καροτενοειδή χορηγούνται ως τροφή στα πουλερικά, μέσω φυσικών προϊόντων. Η περιεκτικότητά τους στα φυσικά αυτά προϊόντα κυμαίνεται περίπου από 60 έως 90% για την trans μορφή και 10 έως 30% για την cis μορφή. Η trans μορφή είναι πιο αποτελεσματική χρωστική ουσία λόγω του έντονου χρώματος και της μεγαλύτερης σταθερότητάς της, έναντι της cis. Τα πουλερικά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν μέρος της trans μορφής του β-καροτενίου σε cis μορφή και αυτός ο μετασχηματισμός έχει βρεθεί ότι λαμβάνει χώρα στον κρόκο του αυγού.

Βιοχημική πορεία β-καροτενίου

Η μετατροπή του β-καροτενίου σε βιταμίνη Α λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στα βλεννογόνα κύτταρα του λεπτού εντέρου, αλλά και στο ήπαρ, στο οποίο αποτελεί το κύριο όργανο του μεταβολισμού. Έχει παρατηρηθεί ότι το ήπαρ είναι η κύρια θέση συσσώρευσης β-καροτενίου στον οργανισμό όταν δίαιτες συμπληρωμένες με αυτό το καροτενοειδές χορηγούνται σε διάφορα είδη, όπως τα κοτόπουλα. Το ήπαρ είναι

επίσης ο κύριος τόπος αποθήκευσης της βιταμίνης Α στο ζώο. Συγκεκριμένη ομάδα κυττάρων (τα αστρικά κύτταρα) του ήπατος αποτελούν την κύρια κυτταρική θέση αποθήκευσης βιταμίνης Α στο ήπαρ, που περιέχει το 80-90% της συνολικής ηπατικής ρετινόλης. Η ηπατική ρετινόλη είναι παρούσα με τη μορφή ρετινυλεστέρων, οι οποίοι και υδρολύονται στη συνέχεια για να την απελευθερώσουν στην κυκλοφορία του αίματος. Συνοπτικά, μετά την κατανάλωση τροφών που περιέχουν καροτενοειδή, τα καροτενοειδή απελευθερώνονται και ενσωματώνονται σε μικτά μικκύλια που αποτελούνται από λιπίδια και άλλα χολικά συστατικά.

Η εντερική απορρόφηση των καροτενοειδών συμβαίνει μέσω παθητικής διάχυσης ή μέσω διευκολυνόμενης μεταφοράς μέσω ειδικού υποδοχέα. Στα πουλερικά όπως και στους ανθρώπους, ένα μέρος του απορροφηθέντος β-καροτενίου διασπάται οξειδωτικά από το ένζυμο β,β-καροτένιο-15,15'-μονοξυγενάση 1 (BCMO1) σε δύο μόρια all-trans-ρετινάλης (atRAL), τα οποία μπορούν είτε να οξειδωθούν περαιτέρω μη αναστρέψιμα σε all-trans-ρετινοϊκό οξύ (atRA) ή να μετασχηματιστούν αναστρέψιμα σε all-trans-ρετινόλη (Εικόνα 17) [31].



Εικόνα 17: Μεταβολικό μονοπάτι μετατροπής του β-καροτενίου σε ρετινόλη στα ζώα (μόνο τα all-trans παρουσιάζονται) [32].

Δεδομένου ότι το μόριο του β-καροτενίου έχει τη δομή του προϊόντος διμερισμού της ρετινάλης, όταν αυτό διασπαστεί, θα δώσει δύο μόρια ρετινάλης.

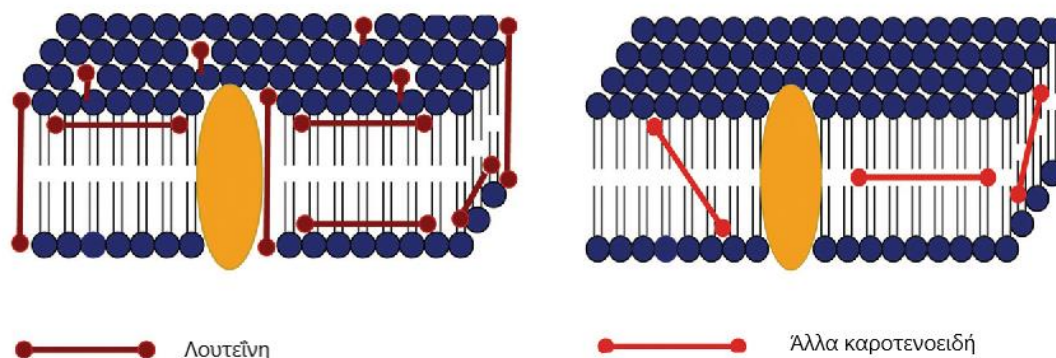
Ωστόσο, η βιολογική δραστικότητα του β-καροτενίου είναι περίπου η μισή από αυτή των μορίων ρετινάλης. Η μετατροπή του β-καροτενίου σε ρετινάλη είναι μία διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει μέρες. Ωστόσο, μπορεί να επισπευσθεί και να υπάρχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα παρουσία λιπαρού περιβάλλοντος. Επιπλέον, όταν η απορρόφηση του β-καροτενίου δεν γίνεται στο λεπτό έντερο, μπορεί να γίνει απευθείας μεταφορά στο αίμα με τη μορφή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικής χοληστερόλης.

- **Λουτεΐνη**

Η λουτεΐνη αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της κατηγορίας των ξανθοφυλλών, όπως και η ισομερής της μορφή, η ζεαξανθίνη. Οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα καροτενοειδή, τα οποία περιέχονται κυρίως στα πράσινα φρούτα, σε λαχανικά και άνθη. Η λουτεΐνη είναι μια κύρια διατροφική ξανθοφύλλη και χρησιμεύει ως αντιοξειδωτικό στους ιστούς. Στη διατροφή των πουλερικών βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο καλαμπόκι και σε προϊόντα αυτού. Όσον αφορά τον μεταβολισμό και τη δράση της, όπως και γενικά τα καροτενοειδή, η λουτεΐνη στοχεύει στην απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους αντίδρασης τα λευκοκύτταρα δημιουργούν αντιδραστικά είδη οξυγόνου για να σκοτώσουν παθογόνα. Τα δραστικά είδη οξυγόνου, εκτός από τη θανάτωση παθογόνων, στοχεύουν και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στις βιολογικές μεμβράνες του ξενιστή. Τα αντιοξειδωτικά, τα οποία στοχεύουν στα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, αποκαθιστούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών και ταυτόχρονα προστατεύουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των καροτενοειδών και των λιπαρών οξέων είναι σημαντική καθώς τόσο τα καροτενοειδή όσο και τα λιπαρά οξέα είναι αναπόσπαστα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης [48], [49].

Λόγω των μοριακών τους διαστάσεων και της παρουσίας των υδροξυλομάδων στα άκρα αυτών των μορίων, η λουτεΐνη, όπως και η ζεαξανθίνη έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν με τη δομή των μεμβρανών, έτσι ώστε να είναι σε θέση να γεφυρώνουν τη δομή της μεμβράνης από την εσωτερική επιφάνειά της, στην εξωτερική επιφάνεια. Επιπλέον, λόγω του διπλού δεσμού στη δομή της λουτεΐνης, το μόριο

μπορεί να προσανατολιστεί παράλληλα με την επιφάνεια της μεμβράνης, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 18. Τέτοιοι προσανατολισμοί στις μεμβράνες μπορεί να βοηθήσουν στην παροχή σημαντικής αντιοξειδωτικής προστασίας στις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς και στις ενδοκυτταρικές και μεσοκυτταρικές λιπιδικές διπλοστιβάδες και η περιεκτικότητα σε λιπίδια αυτών των δομών αυξάνεται σημαντικά [50].



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση προσανατολισμού της λουτεΐνης στην λιπιδική διπλοστιβάδα, σε σύγκριση με άλλα καροτενοειδή [50].

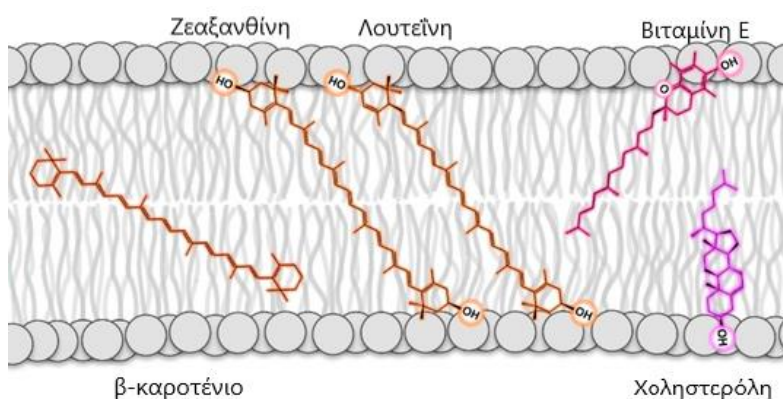
Στους ζωικούς οργανισμούς, με την πρόσληψη της λουτεΐνης μέσω της διατροφής, η ίδια απορροφάται εν μέρει και εναποτίθεται στον λιπώδη ιστό, στο πλάσμα και στην ωχρά κηλίδα.

Αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών

Από τις ενώσεις των καροτενοειδών, αυτές που εντοπίζονται στο πλάσμα είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη, η λουτεΐνη, η κανθαξανθίνη και η β-κρυπτοξανθίνη.

Τα καροτενοειδή έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες με το να προκαλούν μείωση των ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κυτταρική οξειδωτική βλάβη. Η παρουσία των ακόρεστων λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες αποτελούν στόχο για τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Μία τέτοια αντίδραση μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω αλυσιδωτές αντιδράσεις, ξεκινώντας από υπεροξείδωση των λιπιδίων με τελικό αποτέλεσμα την λειτουργική βλάβη των ίδιων των μεμβρανών, των νουκλεϊκών οξέων και των ενζύμων.

Τα καροτενοειδή δρουν ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες $O_2^{\bullet-}$ και $OH^{\bullet}$ ή ως δευτερογενή αντιοξειδωτικά μέσω του φαινομένου αποδιέγερσης του οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης (1O_2). Εξαιτίας της θέσης στην οποία βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 19) προσφέρουν και σημαντική προστασία έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων.



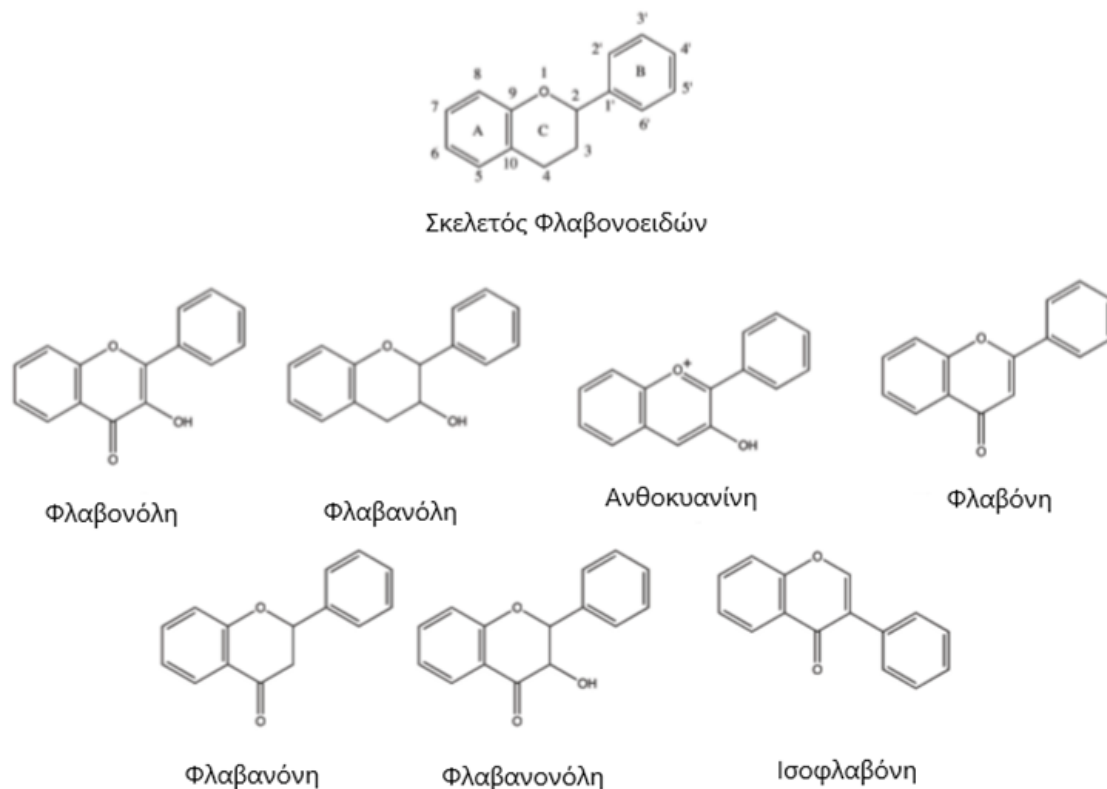
Εικόνα 19: Θέση διαφόρων καροτενοειδών και αντιοξειδωτικών στην κυτταρική μεμβράνη [51].

β) Φλαβονοειδή

Η δομή των φλαβονοειδών αποτελείται από ένα σκελετό με 15 άτομα άνθρακα, ο οποίος διαθέτει δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο (C). Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 20, τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 7 κύριες κατηγορίες: στις φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες. Συχνότερα απαντώνται σε πολυμερή μορφή σε σύνδεση με σάκχαρα που οδηγούν σε γλυκοζυλιωμένα παράγωγα. Τα περισσότερα φλαβονοειδή φαίνεται να παρουσιάζουν ένα πρότυπο υδροξυλίωσης, ή ένα μοτίβο γλυκοζυλίωσης στα φυτικά κύτταρα που σχετίζεται με την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους. Παρ' όλα αυτά, διάφορες ομάδες, όπως το μεθύλιο ή το ισοπεντυλένιο, αυξάνουν τον λιπόφιλο χαρακτήρα των ενώσεων [52]–[55]

Διάφοροι φυτικοί οργανισμοί είναι πλούσιοι σε φλαβονοειδή και παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση κυρίως λόγω δομής. Ο υποκατεστημένος με υδροξύλια αρωματικός δακτύλιος που φέρουν, μπορεί να προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο ή το πρωτόνιο του υδροξυλίου στις ελεύθερες ρίζες, αδρανοποιώντας τες. Αυτή η δυνατότητα των φλαβονοειδών ενώσεων έχει σκοπό την αποδυνάμωση του δεσμού μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου της υδροξυλικής τους ομάδας λόγω της

χημικής φύσης του αρωματικού δακτυλίου. Έτσι καθίσταται δυνατή η μεταφορά είτε ενός πρωτονίου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) είτε ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) [56].



Εικόνα 20: Κατηγορίες Φλαβονοειδών [57].

γ) Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E απαρτίζεται από ένα σύνολο 8 φυσικών λιποδιαλυτών ενώσεων, 4 τοκοφερολών (αΤ, βΤ, γΤ, δΤ) και 4 τοκοτριενολών (αΤΕ, βΤΕ, γΤΕ, δΤΕ) που εμφανίζονται σε μεγάλη αφθονία σε φυτά και κυρίως στα έλαια αυτών. Η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλη των ζωικών και φυτικών λιπών (ελαίων) επηρεάζεται από τις ζωοτροφές.

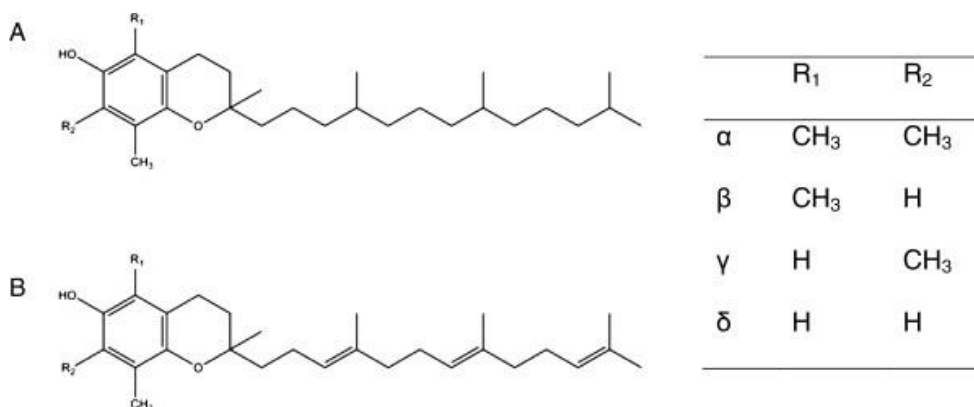
- Για την άλφα(α)-τοκοφερόλη, καθεμία από τις τρεις θέσεις "R" έχει συνδεδεμένη ομάδα μεθυλίου (CH₃).
- Για βήτα(β)-τοκοφερόλη: R₁ = μεθυλ- ομάδα, R₂ = H, R₃ = μεθυλ- ομάδα.
- Για γάμμα(γ)-τοκοφερόλη: R₁ = H, R₂ = μεθυλ- ομάδα, R₃ = μεθυλ- ομάδα.

- Για δέλτα (δ)-τοκοφερόλη: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = \text{μεθυλ- ομάδα}$.

Οι τοκοτριενόλες παρουσιάζονται με αντίστοιχες διαμορφώσεις, με μόνη εξαίρεση την υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα, η οποία φέρει τρεις διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ($C=C$). Αντίθετα με τις τοκοφερόλες που έχουν μια κορεσμένη πλευρική αλυσίδα.

- Για την άλφα(α)-τοκοτριενόλη, καθεμία από τις τρεις θέσεις "R" έχει συνδεδεμένη ομάδα μεθυλίου (CH_3).
- Για βήτα(β)- τοκοτριενόλη: $R_1 = \text{μεθυλ- ομάδα}$, $R_2 = H$, $R_3 = \text{μεθυλ- ομάδα}$.
- Για γάμμα(γ)- τοκοτριενόλη: $R_1 = H$, $R_2 = \text{μεθυλ- ομάδα}$, $R_3 = \text{μεθυλ- ομάδα}$.
- Για δέλτα (δ)- τοκοτριενόλη: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = \text{μεθυλ- ομάδα}$.

Στις εικόνες 21 και 22 παρουσιάζονται η χημική δομή των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών, με τις αντίστοιχες χαρακτηριστικές ομάδες, καθώς και η στερεοχημεία αυτών.



Εικόνα 21: Γενική χημική δομή των τοκοφερολών (A) και των τοκοτριενολών (B).

Η δομή τους έχει την χαρακτηριστική ομάδα της χρωμανόλης και την πλευρική αλειφατική αλυσίδα. Η ονομασία των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών (α -, β -, γ - ή δ -) καθορίζεται από τους μεθυλικούς υποκαταστάτες που βρίσκονται πάνω στον αρωματικό δακτύλιο. Η διαφορά μεταξύ των ενώσεων, έγκειται στην ύπαρξη μιας υδρόφοβης «ουράς», η οποία και προσδίδει την ιδιότητα σε κάθε είδους μόριο της ομάδας της βιταμίνης E να προσκολλάται σε μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες.

Όπως και οι άνθρωποι, έτσι και τα ζώα, δεν δύνανται να συνθέσουν βιταμίνη E, συνεπώς μοναδική πηγή αποτελεί η πρόσληψη μέσω της διατροφής. Οι πηγές της βιταμίνης E είναι αποκλειστικά φυτικές, αφού οι φυτικοί οργανισμοί είναι οι μόνοι που

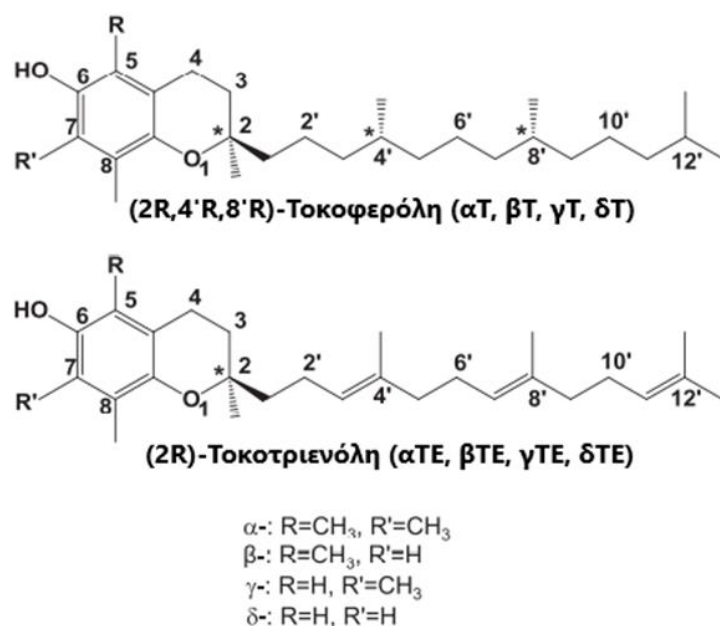
έχουν τη δυνατότητα παραγωγής της. Η γ-τοκοφερόλη αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή βιταμίνης Ε. Η μορφή αυτή αποτελεί το 70% της βιταμίνης Ε που προσλαμβάνεται σε έναν οργανισμό. Παρά τη μεγάλη πρόσληψη της γ-τοκοφερόλης, η μορφή της βιταμίνης Ε η οποία εντοπίζεται στο πλάσμα και στους μύες τόσο των ζώων, όσο και των ανθρώπων, είναι η α-τοκοφερόλη [57].

Οι τροφές που αποτελούν κύρια πηγή της βιταμίνης Ε είναι οι ξηροί καρποί και συγκεκριμένα οι ηλιόσποροι, τα καρύδια, τα φουντούκια, τα αμύγδαλα και τα φιστίκια. Επιπλέον, τα έλαια που εκχυλίζονται από τα παραπάνω προϊόντα είναι πλούσια σε βιταμίνης Ε. Επιπρόσθετες πηγές της βιταμίνης Ε αποτελούν τροφές όπως το μωρουνέλαιο, το καλαμποκέλαιο, το ελαιόλαδο, το σογιέλαιο, ενώ παράλληλα η βιταμίνη αυτή περιέχεται σε επαρκείς ποσότητες και στα δημητριακά, γενικά στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, στα αυγά, στο βούτυρο, και σε άλλα [57].

Ρόλος της βιταμίνης Ε

Η βιταμίνη Ε χαρακτηρίζεται συχνά ως ο πιο σημαντικός αναστολέας της οξείδωσης των λιπιδίων *in vivo*. Ο κύριος ρόλος της α-τοκοφερόλης είναι να δρα ως λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που απαιτείται για τη διατήρηση των μεμβρανών. Χάρη στον λιπόφιλο χαρακτήρα της, η βιταμίνη Ε θεωρείται το αντιοξειδωτικό το οποίο προστατεύει κατά κύριο λόγο τις κυτταρικές μεμβράνες. Αντιδρά γρήγορα με τις ρίζες υπεροξειδίου και διατηρεί τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, δεσμεύει τις ρίζες υδροξυλίου χωρίς όμως να συμμετέχει σε περαιτέρω αλυσιδωτές αντιδράσεις. Οι ημερήσιες ανάγκες σε βιταμίνη Ε συχνά συνδέονται με την πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τη δίαιτα.

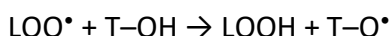
Η έλλειψη βιταμίνης Ε σε έναν οργανισμό προκαλεί παρεμπόδιση απορρόφησης των λιπαρών καθώς και αιμορραγικές διαταραχές. Ακόμα, η παρατεταμένη έλλειψη βιταμίνης Ε είναι υπεύθυνη για σοβαρότερες νόσους.



Εικόνα 22: Γενική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών.

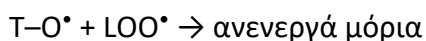
Αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης Ε

Η βιταμίνη Ε, χάρη στο λιπόφιλο χαρακτήρα της, αποτελεί το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό των κυτταρικών και των ενδοκυτταρικών μεμβρανών, καθώς και του πλάσματος. Έχει την ικανότητα να προστατεύει τα φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών από υπεροξείδωση. Η οξείδωση των λιπιδίων, αποτελεί αλυσιδωτή διαδικασία, αφού όταν ένα λιπίδιο οξειδωθεί, παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οξειδώνουν με τη σειρά τους διπλανά μόρια. Ρόλος της βιταμίνης Ε είναι να σταματήσει αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των λιπιδικών υπεροξειδώσεων. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται εκκαθάριση των ριζών υπεροξυλίου των λιπιδίων (LOO[•]) κατά την λιπιδική υπεροξείδωση. Η βιταμίνη Ε χάρη στην ταχύτερη αντίδρασή της με τις ελεύθερες ρίζες, συγκριτικά με τα λιπίδια, σταματά αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Επομένως, αντί να γίνεται οξείδωση και καταστροφή των λιπιδίων, πραγματοποιείται οξείδωση της ίδιας της βιταμίνης Ε, σχηματίζοντας μία α-τοκοφερο-ρίζα (TO[•]) και τέλος, ανάγοντας τις ρίζες υπεροξυλίου (LOO[•]) σε λιπιδικά υδροϋπεροξείδια (LOOH):

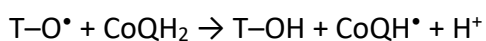


Έπειτα από την οξείδωση της βιταμίνης Ε, η μερικώς σταθερή και αδρανής χημικά α-τοκοφερο-ρίζα παίρνει μέρος σε κάποιες αντιδράσεις:

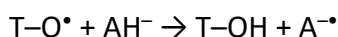
α) ενώνεται με άλλες ρίζες $\text{LOO}^\bullet$ και να σχηματίζει ανενεργά μόρια,



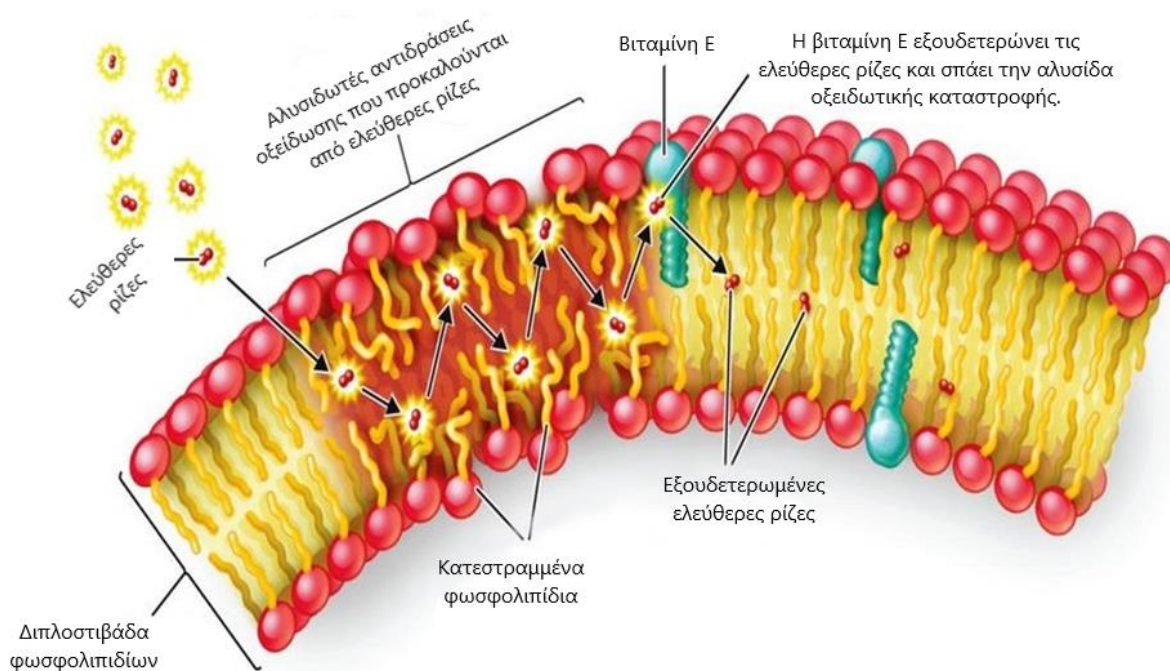
β) ανάγεται ξανά σε τοκοφερόλη από το συνένζυμο Q,



γ) ανάγεται ξανά σε τοκοφερόλη από την βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ).



Όπως φαίνεται και στην τελευταία αντίδραση (γ), η α-τοκοφερόλη λειτουργεί συνεργιστικά με το ασκορβικό οξύ. Αυτή η διαδικασία «ανακύκλωσης» της βιταμίνης E, καθιστά το ασκορβικό οξύ ως υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. Αντίθετα με την βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Αυτό το γεγονός πιθανώς να κρίνεται ως πρόβλημα, μιας και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαφορετική φάση. Παρ' όλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι στις μεμβράνες η θέση της βιταμίνης E είναι τέτοια, ώστε η φαινολική υδροξυλική ομάδα της να βρίσκεται μεταξύ της ίδιας της μεμβράνης και της υδατικής φάσης. Αυτή η εικόνα παρατηρείται με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Η δράση της βιταμίνης E στην κυτταρική μεμβράνη [58].

Τέλος, η α-τοκοφερόλη έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται σε βιολογικές μεμβράνες, όπου και σταθεροποιεί τη δομή των λιποπρωτεϊνών. Το μόριο της προσδένεται στη διπλοστιβάδα των φωσφολιπιδίων μέσω της πλευρικής αλυσίδας, έτσι ώστε η πολική κεφαλή της, που έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, να βρίσκεται κοντά στη διασύνδεση μεταξύ λιπιδίων και νερού όπου προστατεύει το ενδοθήλιο.

δ) Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

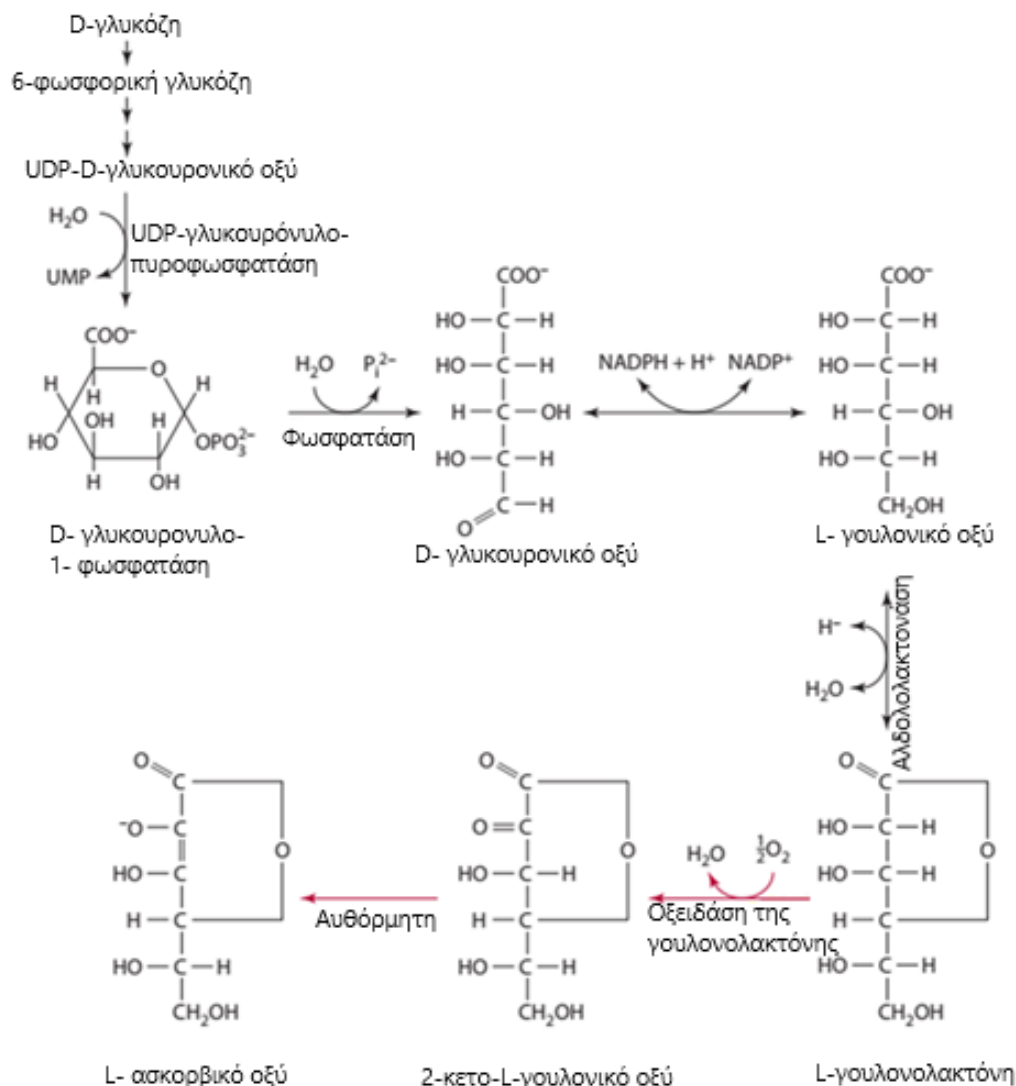
Η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ είναι ένα φυσικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό με ισχυρή αναγωγική δράση, αφού ο κύριος βιοχημικός της ρόλος είναι να δωρίζει ηλεκτρόνια σε διάφορες ενζυμικές και μη ενζυματικές αντιδράσεις. Η βιταμίνη C είναι ένας ισχυρός μειωτικός και αντιοξειδωτικός παράγοντας αλλά και αναγεννητής άλλων αντιοξειδωτικών, που δρα στην καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων, στις αντιδράσεις αποτοξίνωσης και στο σχηματισμό κολλαγόνου στον ινώδη ιστό, στους χόνδρους, τα δόντια, τα οστά, τον συνδετικό ιστό, το δέρμα και τα τριχοειδή αγγεία. Επιπλέον, συμβάλλει και στην επούλωση τραυματισμών.

Η βιταμίνη C κρίνεται ως ένα από τα σημαντικότερα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, καθώς είναι ικανή να προστατεύσει τις βιομεμβράνες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων αφαιρώντας τις ρίζες υπεροξυλίου στο υδατικό στάδιο πριν την εκκίνηση της διαδικασίας της οξείδωσης. Μπορεί επίσης να δράσει συνεργιστικά, ώστε να αναπληρώσει τη μειωμένη βιταμίνη E σε έναν οργανισμό. Επειδή η ίδια η βιταμίνη C δεν μπορεί να εξαλείψει με άμεσο τρόπο τις λιπόφιλες ρίζες που σχηματίζονται στις βιολογικές μεμβράνες, συμβάλλει στη μείωση του αριθμού των ριζών του τοκοφεροξυλίου, οι οποίες που προσκολλώνται στη μεμβράνη κατά τη μετάβαση της λιπόφιλης στην υδατική φάση. Έτσι λοιπόν, φαίνεται ότι η βιταμίνη C με τον συνεργιστικό της ρόλο, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E και επίσης συμβάλλει και στην αύξηση της διαθεσιμότητας της βιταμίνης E στον οργανισμό [59]–[61].

Η βιταμίνη C εντοπίζεται κυρίως στα εσπεριδοειδή και άλλα φρούτα αλλά και στα λαχανικά και δεν μπορεί να παραχθεί ή να αποθηκευτεί από όλους τους οργανισμούς, γι' αυτό και ορισμένοι, όπως οι άνθρωποι, πρέπει να την λαμβάνουν μέσω της διατροφής τους.

Τα περισσότερα ζώα και φυτά είναι σε θέση να συνθέσουν βιταμίνη C μέσω μιας ακολουθίας βημάτων που καθοδηγούνται από ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν τους μονοσακχαρίτες σε βιταμίνη C. Στα ζώα, η πρώτη ύλη είναι η γλυκόζη. Σε ορισμένα είδη που συνθέτουν ασκορβικό οξύ στο ήπαρ (συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών και των πτηνών), η γλυκόζη εξάγεται από το γλυκογόνο. Η σύνθεση του ασκορβικού οξέος είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τη γλυκογονόλυση.

Πιο συγκεκριμένα, στα πουλερικά, όπως και σε διάφορα σπονδυλωτά ζώα, η βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού του UDP-γλυκουρονικού οξέος. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 24), το UDP-γλυκουρονικό οξύ σχηματίζεται από την UDP-γλυκόζη μέσω διαδοχικών οξειδώσεων, καταλυόμενες από το κατάλληλο ένζυμο (UDP-γλυκοζυλο-6-αφυδρογονάση). Η UDP-γλυκοζυλο-6-αφυδρογονάση χρησιμοποιεί τον συμπαράγοντα NAD⁺ ως δέκτη ηλεκτρονίων. Η τρανσφεράση UDP-γλυκουρονική πυροφωσφορυλάση αφαιρεί ένα UMP και η γλυκουρονοκινάση, με τον συμπαράγοντα ADP, αφαιρεί το τελικό φωσφορικό που οδηγεί σε D-γλυκουρονικό οξύ. Η ομάδα αλδεΐδης αυτής της ένωσης ανάγεται σε πρωτοταγή αλκοόλη με τη βοήθεια ενζύμου (γλυκουρονική αναγωγή) και τον συμπαράγοντα NADPH, δίνοντας L-γουλονικό οξύ. Αυτό ακολουθείται από σχηματισμό λακτόνης μεταξύ του καρβονυλίου στο C1 και της ομάδας υδροξυλίου στο C4. Στη συνέχεια, η L-γλουνολολακτόνη αντιδρά με το οξυγόνο, που καταλύεται από το ένζυμο L-gulonolactone oxidase και τον συμπαράγοντα FAD⁺. Αυτή η αντίδραση παράγει 2-κετο-γουλονολακτόνη, η οποία υφίσταται αυθόρμητα ενολίωση για να σχηματίσει ασκορβικό οξύ σαν τελικό προϊόν.



Εικόνα 24: Συνθετική πορεία του ασκορβικού οξέος .

ε) Θειόλες ή θειοαλκοόλες ή μερκαπτάνια (R-SH)

Σε αυτήν την κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ανήκουν οι θειόλες, οι οποίες κατέχουν πολλαπλές αντιοξειδωτικές δράσεις στο εσωτερικό των κυττάρων. Δρουν ως υπόστρωμα σε διάφορες αντιοξειδωτικές αντιδράσεις, συμβάλλουν στην επαναδημιουργία άλλων αντιοξειδωτικών ενώσεων και μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων.

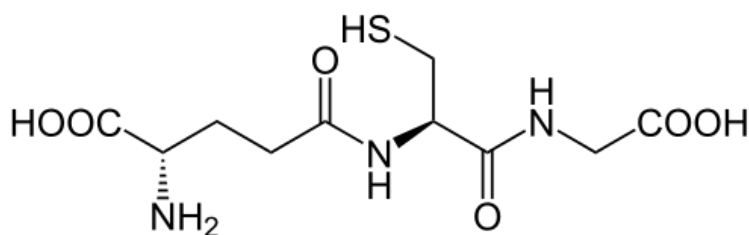
Στην συγκεκριμένη κατηγορία ανήκει και η γλουταθειόνη (GSH) (Εικόνα 25). Η γλουταθειόνη είναι η κυρίαρχη θειόλη μικρού μοριακού βάρους στα ζωικά κύτταρα. Το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής γλουταθειόνης GSH (85–90%) εντοπίζεται στο

κυτταρόπλασμα, με το υπόλοιπο σε πολλά οργανίδια (συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, της πυρηνικής μήτρας και των υπεροξεισωμάτων), ενώ οι εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις της GSH είναι σχετικά χαμηλές [62].

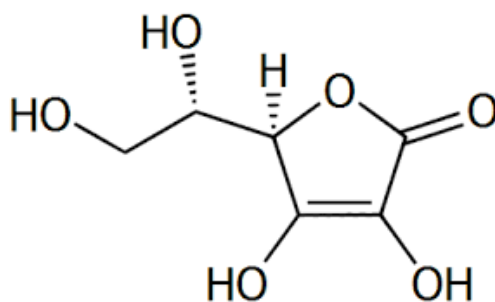
Αποτελεί ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά για έναν οργανισμό που δρα σε ενδομοριακό επίπεδο και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ίδια συμβάλλει στον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών, όπως η έκφραση γονιδίων, η σύνθεση DNA και πρωτεϊνών, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των κυττάρων, αλλά και η μεταγωγή σήματος. Η έλλειψη γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες σε κάθε οργανισμό αλλά και στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών [62], [63].

Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο γ-γλουταμυλο-κυστεϊνυλο-γλυκίνη, που συντίθεται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη σε μια σειρά από δύο ενδοκυτταρικές, εξαρτώμενες από το ATP αντιδράσεις. Λαμβάνει μέρος σε πλήθος αντιοξειδωτικών λειτουργιών, όπως το να δρα ως υπόστρωμα στην αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξειδίων από την υπεροξειδάση. Επιπλέον, δεσμεύει τις δραστικές μορφές του οξυγόνου, όπως το οξυγόνο απλής κατάστασης, και έχει την δυνατότητα να δρα συνδυαστικά και με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως για παράδειγμα με το διυδροασκορβικό οξύ (Εικόνα 26), το οποίο ανάγεται σε ασκορβικό οξύ [63], [64].

Η γλουταθειόνη είναι σημαντική στο πλαίσιο της κυτταρικής υγείας και είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στο οξειδωτικό και νιτροζωτικό στρες καθώς και στην αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών μέσω του συστήματος γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης. Έχει αποδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά σημαντικό για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του σώματος και απαραίτητο για τη διατήρηση της υγείας των κυττάρων [62], [63].



Εικόνα 25: Μοριακή δομή της γλουταθειόνης.



Εικόνα 26: Μοριακή δομή του διυδροασκορβικού οξέος [65].

1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής κατάστασης στα πουλερικά, οι οποίες εξελίσσονται διαρκώς, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτη πρόοδο. Σκοπός των μεθόδων αυτών είναι η μέτρηση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, έναντι του σχηματισμού συγκεκριμένων ειδών προϊόντων οξείδωσης. Βασίζονται ως επί το πλείστον, στη μέτρηση της οξείδωσης των λιπιδίων. Για την αξιολόγηση, λοιπόν, της αντιοξειδωτικής δράσης με ειδικές μεθόδους, έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες τεχνικές, με εξαιρετικά ευαίσθητες αυτοματοποιημένες τεχνολογίες ανίχνευσης και διαφορετικά υποστρώματα [23], [66]. Η δυσκολία η οποία έγκειται, είναι ότι σε αντίθεση με τα τρόφιμα και τα θρεπτικά συστατικά, τα βιολογικά δείγματα είναι πολύ πιο ευαίσθητα και πολύπλοκα, αφού περιέχουν όχι μόνο διατροφικά αντιοξειδωτικά αλλά και διάφορους τύπους ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων, διαιτητικών αντιοξειδωτικών, ακόμη και οξειδωτικών προϊόντων [66].

Κάθε μέθοδος προκειμένου να βρει ευρέως εφαρμογή, οφείλει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

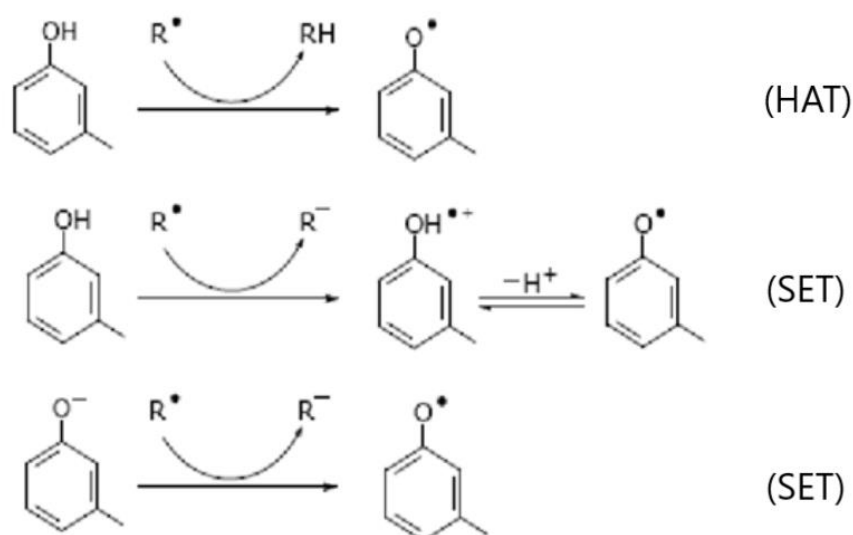
- Να είναι απλή, γρήγορη και σχετικά οικονομική.
- Να έχει καθορισμένο τελικό σημείο και χημικό μηχανισμό.
- Να έχει καλή αναπαραγωγικότητα εντός και μεταξύ ημερών.
- Τα όργανα να είναι άμεσα διαθέσιμα.
- Να χρησιμοποιεί μια βιολογικά σχετική πηγή ριζών.

- Να μπορεί να προσαρμοστεί κατάλληλα, ανάλογα τον λιπόφιλο ή υδρόφιλο χαρακτήρα των προς προσδιορισμό αντιοξειδωτικών, με τη χρήση διαφορετικών πηγών ριζών.
- Να μπορεί να προσαρμοστεί κατάλληλα σε ανάλυση «υψηλής απόδοσης» για αναλύσεις ρουτίνας ποιοτικού ελέγχου.

Τέλος, τα χαρακτηριστικά απόδοσης που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την τυποποίηση μιας δοκιμασίας περιλαμβάνουν: (α) αναλυτικό εύρος, (β) ανάκτηση, (γ) επαναληψιμότητα, (δ) αναπαραγωγιμότητα, και (ε) αναγνώριση παρεμβαλλόμενων ουσιών [67].

Δεδομένου ότι τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών είναι καθοριστικά για την κατάσταση της υγείας των πουλερικών, κρίνεται απαραίτητη η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε βιολογικά υγρά και όχι μόνο. Γι' αυτόν τον λόγο, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας για βιολογικά δείγματα [66].

Οι μέθοδοι οι οποίες έχουν αναπτυχθεί μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο μπορούν να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες. Οι δύο κύριοι μηχανισμοί είναι μέσω: (α) μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT - Hydrogen Atom Transfer), και (β) μεταφοράς απλού ηλεκτρονίου (SET - Single Electron Transfer). Το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο, ανεξαρτήτως μηχανισμού, αλλά τα χαρακτηριστικά τα οποία διαφέρουν είναι η κινητική και η πιθανότητα παρενεργειών. Οι μέθοδοι που βασίζονται στο HAT μετρούν την κλασική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες με τη δωρεά υδρογόνου. Αντίθετα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε SET ανιχνεύουν την ικανότητα ενός δυνητικού αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο για να απενεργοποιήσει οποιαδήποτε ένωση, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων, των καρβονυλίων και των ριζών [67]. Παραδείγματα των μηχανισμών δράσης των αναλύσεων μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και μεταφοράς απλού ηλεκτρονίου (SET), παρουσιάζονται στην εικόνα 27.



Εικόνα 27: Μηχανισμός δράσης των αναλύσεων μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και μεταφοράς απλού ηλεκτρονίου (SET) [68].

Οι μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζονται στην κινητική του ανταγωνισμού. Οι αντιδράσεις που ακολουθούν τον μηχανισμό HAT είναι ανεξάρτητες από τον διαλύτη και το pH και είναι συνήθως αρκετά γρήγορες, αφού η διαδικασία μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε δευτερόλεπτα έως λεπτά. Βέβαια, η παρουσία αναγωγικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων, αποτελούν τροχοπέδη για τις αναλύσεις με μηχανισμό HAT και μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Απεναντίας, οι αντιδράσεις που ακολουθούν τον μηχανισμό SET είναι συνήθως αργές και μπορεί να απαιτήσουν μεγάλο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθούν. Επομένως, σε αυτές τις αντιδράσεις οι υπολογισμοί της αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν βασίζονται στην κινητική, αλλά στην ποσοστιαία μείωση του προϊόντος [67].

Συνοπτικά οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Κατηγοριοποίηση Φασματομετρικών Μεθόδων Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Κατάστασης και μηχανισμός δράσης αυτών [23].

Τεχνική	Μέθοδος Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Κατάστασης	Μηχανισμός Δράσης
Φασματομετρία	ORAC	HAT
	HORAC	HAT
	TRAP	HAT
	CUPRAC	SET
	FRAP	SET
	ABTS (TEAC)	SET
	DPPH	SET

Οι μέθοδοι που ακολουθούν τον μηχανισμό αναλύσεων HAT βασίζονται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να αφαιρεί τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ακόλουθες αναλύσεις:

➤ ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) - HORAC (Hydroxyl Radical Absorption Capacity)

Η ανάλυση ORAC μετρά την ικανότητα διάσπασης της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών από αντιοξειδωτικά, μέσω της παρακολούθησης της αναστολής της οξείδωσης της ρίζας υπεροξυλίου. Οι ρίζες υπεροξυλίου χαρακτηρίζονται ως ελεύθερες ρίζες που κυριαρχούν στην οξείδωση των λιπιδίων στα βιολογικά συστήματα, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Σύμφωνα με την ORAC, η ρίζα υπεροξυλίου που εκπέμπεται αντιδρά με ένα δείγμα φθορισμού, οδηγώντας το σύστημα σε απώλεια φθορισμού.

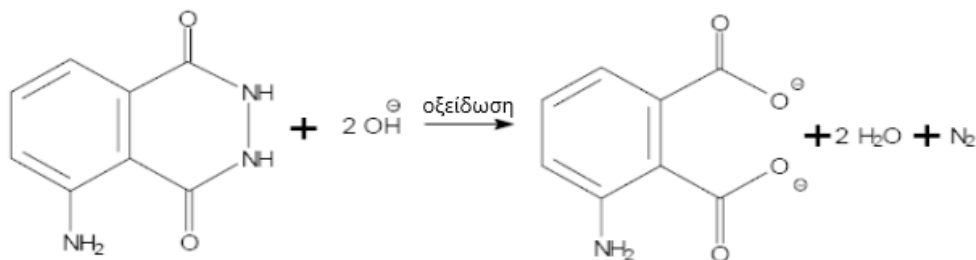
Γενικά, και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην οξείδωση ενός φθορίζοντα ανιχνευτή, όπως η φλουορεσκεΐνη, από τις ελεύθερες ρίζες, για να οδηγήσει σε αλλαγή της έντασης του φθορισμού. Η παρουσία αντιοξειδωτικών έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες στη φθορίζουσα ένωση. Αυτή η αναστολή παρατηρείται ως διατήρηση του σήματος φθορισμού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της

προστασίας υπολογίζεται βάσει μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, συνήθως από υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E (τρολόξη) .

Ο προσδιορισμός ORAC χρησιμοποιεί έναν εκκινητή ελευθέρων ριζών για την παραγωγή ριζών υπεροξυλίου, ενώ ο προσδιορισμός HORAC χρησιμοποιεί έναν εκκινητή ρίζας υδροξυλίου και αντιδραστήριο fenton για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου.

➤ TRAP (Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter):

Για την παρακολούθηση διαφόρων αντιδράσεων που περιλαμβάνουν ρίζα υπεροξυλίου, αξιοποιείται η τεχνική με χημειοφωταύγεια ενισχυμένη με λουμινόλη (CL). Η λουμινόλη (5-αμινο-2,3-διυδρο-1,4-φθαλαζινεδιόνη), παρουσία ελευθέρων ριζών υφίσταται οξείδωση, η οποία συνοδεύεται από την αύξηση απορρόφησης στα 425nm (Εικόνα 28). Το σήμα CL καθοδηγείται από την παραγωγή ριζών που προέρχονται από λουμινόλη, που προέρχονται από τη θερμική αποσύνθεση του μορίου AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Η τιμή TRAP προσδιορίζεται από τη διάρκεια της χρονικής περιόδου κατά την οποία το δείγμα έσβησε το σήμα χημειοφωταύγειας, λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών [23].



Εικόνα 28: Αντίδραση οξείδωσης λουμινόλης.

Μειονέκτημα της παραπάνω ανάλυσης είναι το γεγονός δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί in vivo, διότι η λουμινόλη είναι αδιάλυτη στο νερό, ευαίσθητη στο φως και στην παρουσία μεταλλικών κατιόντων.

➤ TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity):

Η ανάλυση TOSC βασίζεται στην αναστολή του σχηματισμού αιθυλενίου, παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων που ανταγωνίζονται το KMBA (α -keto- γ -bethiolbutiric acid) για ROS.

Οι μέθοδοι που ακολουθούν τον μηχανισμό αναλύσεων SET βασίζονται στη μεταφορά ενός μόνο ηλεκτρονίου και ανιχνεύουν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο προκειμένου να μειώσει τα μεταλλικά ιόντα, τις ομάδες καρβονυλίου και τις ελεύθερες ρίζες σε ένα βιολογικό δείγμα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, η σχετική αντιδραστικότητα βασίζεται κυρίως στο δυναμικό αποπρωτονίωσης και ιονισμού της δραστικής λειτουργικής ομάδας. Συνεπώς, οι αντιδράσεις SET εξαρτώνται από το pH.

Οι φασματοσκοπικές αναλύσεις SET μετρούν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να μειώνει ένα οξειδωτικό, το οποίο αλλάζει χρώμα όταν ελαττωθεί. Ο βαθμός αλλαγής χρώματος συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Με την ίδια μέθοδο λειτουργούν επίσης και οι ηλεκτροχημικές αναλύσεις.

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι ακόλουθες αναλύσεις:

➤ Μέθοδος Folin–Ciocalteu (Total Phenolic Content by Folin–Ciocalteu)

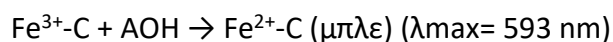
Η μέθοδος Folin χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινόλων που βρίσκονται στα δείγματα. Αρχικά, οι φαινόλες οι οποίες εξάγονται, διαλύονται στο νερό, και στη συνέχεια οξειδώνονται σε αλκαλικό διάλυμα με την προσθήκη του αντιδραστήριου Folin. Αυτό αποτελείται από φωσφοβολφραμικά και φωσφομολυβδενικά ετεροπολυμερή οξέα, όπου με την παρουσία ανθρακικού νατρίου σχηματίζεται ένα σύμπλοκο χρώματος μπλε. Το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση, η οποία εξαρτάται από την ποιοτική και την ποσοτική σύσταση των φαινολικών μειγμάτων, καθώς και από το pH των διαλυμάτων το οποίο μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου. Αφού το pH ρυθμιστεί περίπου στο 10, πραγματοποιείται αποσύνδεση του φαινολικού υδρογόνου και σχηματίζεται το φαινολικό ιόν, που με τη σειρά του ανάγει το αντιδραστήριο Folin. Τέλος, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων στο εκάστοτε

δείγμα, και προσδιορίζεται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 765 nm. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με το γαλλικό οξύ ως πρότυπη ουσία.

Η μέθοδος αυτή μειονεκτεί στο γεγονός ότι εκτός των φαινολικών ενώσεων, προσδιορίζονται και άλλες ενώσεις, ικανές να ανάγουν το αντιδραστήριο Folin-C. Τέτοιες ενώσεις είναι διάφορα ανάγοντα σάκχαρα, αμινοξέα και το ασκορβικό οξύ, που οδηγούν στην εμφάνιση θετικού σφάλματος. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό διαφόρων υδρόφιλων και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών ενώσεων.

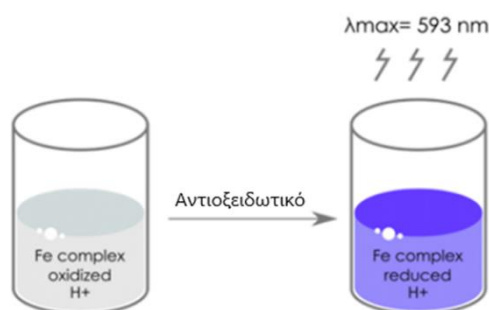
➤ FRAP (Αντιοξειδωτική Ισχύς Μείωσης του Σιδήρου)

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου ιόντος σιδήρου-TPTZ από τα αντιοξειδωτικά. Η δέσμευση του Fe^{2+} στον συνδέτη δημιουργεί ένα πολύ έντονο μπλε χρώμα. Σε όξινες συνθήκες το αρχικό σύμπλοκο σιδήρου ανάγεται στη σιδηρούχα μορφή (Fe^{2+}), αναπτύσσεται έντονο μπλε χρώμα (παρουσία αντιοξειδωτικού), όπως φαίνεται στην Εικόνα 29.



Η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί για να ελεγχθεί η μειωμένη ποσότητα σιδήρου και μπορεί να συσχετιστεί με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών. Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιούνται Trolox ή ασκορβικό οξύ.

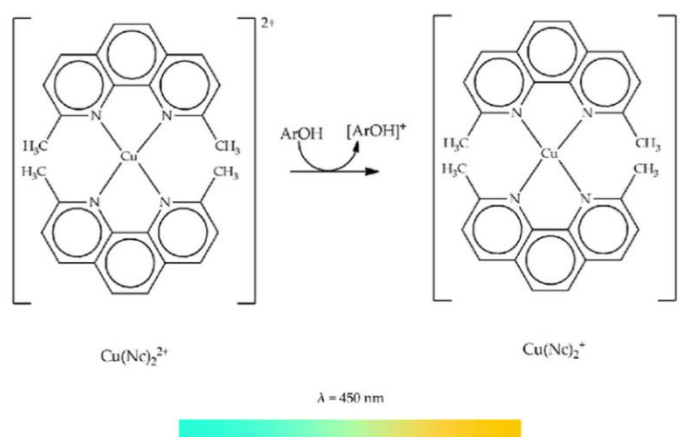
Αυτή η αντίδραση είναι μη ειδική και οποιαδήποτε ημι-αντίδραση που έχει λιγότερο θετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής, υπό συνθήκες αντίδρασης, από την ημιαντίδραση συμπλόκου $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ θα οδηγήσει στη μείωση του συμπλόκου Fe^{3+} .



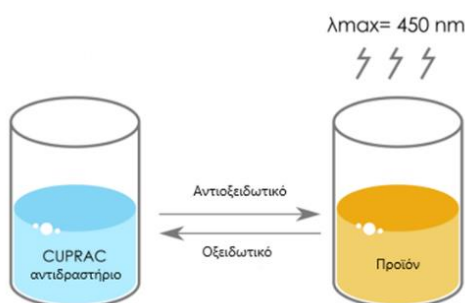
Εικόνα 29: Χρωματισμός διαλύματος με τη δέσμευση του Fe^{2+} στον συνδέτη, λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών ενώσεων [69].

➤ CUPRAC

Τα αντιοξειδωτικά αναμειγνύονται με CuSO_4 και νεοκουπροΐνη. Στην ανάλυση, ο Cu(II) ανάγεται σε Cu(I) μέσω της δράσης μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα αντιοξειδωτικά, προκαλώντας αλλαγή του χρώματος του διαλύματος (Εικόνες 30 και 31). Η απορρόφηση μετράται στα 450nm.



Εικόνα 30: Αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) μέσω της δράσης μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα αντιοξειδωτικά [70].

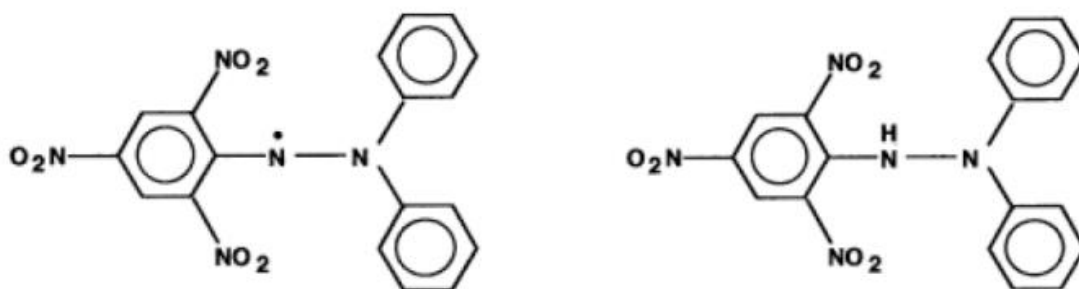


Εικόνα 31: Αποχρωματισμός διαλύματος κατά την αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) [71].

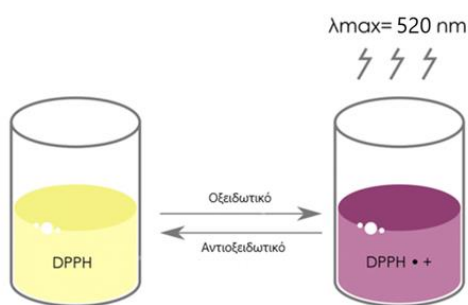
➤ DPPH

Η μέθοδος DPPH (2,2,-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζυλιο) (Εικόνα 32) προσδιορίζει την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH· (Εικόνα 32). Η μέθοδος αυτή θεωρείται από τις πρότυπες και πιο εύκολες χρωματομετρικές μεθόδους, καθώς εφαρμόζεται ευρέως για την αξιολόγηση αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η DPPH (2,2- διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζυλική ρίζα) είναι μία σχετικά σταθερή ρίζα σε μορφή μεθανολικού διαλύματος. Η οξειδωμένη μορφή της στο διάλυμα παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 520nm. Όταν η οξειδωμένη μορφή της DPPH έρθει σε επαφή με ενώσεις δότες ηλεκτρονίων (αντιοξειδωτική ένωση), πραγματοποιείται

αντίδραση κατά την οποία η ίδια ανάγεται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η απορρόφηση του διαλύματος να μειώνεται με ταυτόχρονη εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματος (Εικόνα 33). Η ελάττωση της απορρόφησης προσδιορίζεται φασματοσκοπικά.



Εικόνα 32: Η ρίζα του DPPH στην οξειδωμένη μορφή της (αριστερά) και στην ανηγμένη (δεξιά).



Εικόνα 33: Αποχρωματισμός του διαλύματος / μείωση του πορφυρού χρώματος, λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών [72].

Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η σχετική απλότητά της και το γεγονός ότι η ρίζα είναι σταθερή στο μεθανολικό διάλυμα, γι' αυτό και προσφέρεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης. Επιπλέον, η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, ευκολία στην εκτέλεση των πειραμάτων, επαναληψιμότητα, φέρει την δυνατότητα εφαρμογής σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς και δυνατότητες αυτοματισμού [23].

➤ ABTS (TEAC)

Η μέθοδος TEAC χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ένωσης, δηλαδή την ποσότητα των ελεύθερων ριζών που είναι ικανή να δεσμεύσει. Η ρίζα κατιόντος ABTS (ABTS•+) προσδιορίζεται

ποσοτικά με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Απορροφά στα 743nm και σχηματίζεται από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το άτομο αζώτου του ABTS, παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας αντιοξειδωτικού προκαλώντας αποχρωματισμό του διαλύματος.

Ηλεκτροχημικές Τεχνικές Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι ηλεκτροχημικά ενεργές, αφού έχουν την δυνατότητα να δρουν ως αναγωγικά σώματα. Αυτή η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της ένωσης και τον μετέπειτα προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας που φέρει η ένωση. Συνεπώς, μία ηλεκτροχημική ανάλυση μπορεί να προσφέρει πλήθος πληροφοριών για μία τέτοια ένωση. Γενικά, προτιμάται η χρήση ηλεκτροχημικών μεθόδων, χάρη στα πλεονεκτήματά τους, όπως η υψηλή ευαισθησία, η μεγάλη ταχύτητα εφαρμογής και το σχετικά χαμηλό κόστος τους. Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων με ηλεκτροχημικές μεθόδους μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η μέτρηση της ηλεκτροχημικής οξείδωσης στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων, ενώ ο δεύτερος η ηλεκτροχημική μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης που προκύπτουν από την βιοκαταλυτική μετατροπή με την χρήση κάποιου ενζύμου οξειδάσης ή υπεροξειδάσης, που βρίσκονται ακινητοποιημένα στα ηλεκτρόδια.

➤ Κυκλική Βολταμμετρία (CV)

Πρόκειται για μία μέθοδο ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας χαμηλού μοριακού βάρους του πλάσματος του αίματος, των ομογενοποιημένων ιστών και των φυτικών εκχυλισμάτων. Η κυκλική βολταμμετρία εκτιμά την αναγωγική δύναμη των ενώσεων, δηλαδή την ικανότητά τους να προκαλούν αναγωγή και να χάνουν ηλεκτρόνια. Επίσης, μετράται η συνολική συγκέντρωση των αναγωγικών σωμάτων στο δείγμα, χωρίς την επιμέρους μέτρηση συγκεκριμένων ενώσεων.

➤ Αμπερομετρία

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μέτρηση της έντασης του ρεύματος που ρέει μεταξύ ενός ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς, σε μια σταθερή τιμή δυναμικού. Το ρεύμα παράγεται από την οξείδωση/αναγωγή ενός ηλεκτροενεργού αναλύτη. Η μέθοδος αξιολογεί την αντιοξειδωτική δράση ορισμένων καθαρών υδρόφιλων αντιοξειδωτικών.

Μετράται η ένταση του ρεύματος που παράγεται από την οξείδωση/αναγωγή μιας ηλεκτρενεργής αναλυόμενης ουσίας.

➤ Μέθοδος HPLC (Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως)

Η μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως-HPLC είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία στην αναλυτική χημεία και τη βιοχημεία και έχει ως σκοπό να διαχωρίσει τις ουσίες ενός μίγματος βάση των ιδιοτήτων τους (υδρόφιλες-υδρόφοβες) με τη χρήση μιας κινητής φάσης και μια στατικής φάσης. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος, ασταθείς ή ιοντισμένες, που δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία. Επίσης μέσω της μεθόδου HPLC επιτυγχάνονται μεγάλες αποδόσεις συνήθως με χαμηλές ταχύτητες ροής για την επίτευξη μεγαλύτερου χρόνου παραμονής στη χρωματογραφική στήλη για καλύτερο διαχωρισμό ενώ παράλληλα χρήση σωματιδίων μικρού μεγέθους για πληρωτικό υλικό. Η έκλουση διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους κατηγορίες, την ισοκρατική και την βαθμωτή. Κύριο χαρακτηριστικό της ισοκρατικής έκλουσης είναι η σταθερή σύσταση της κινητής φάσης, ενώ παράλληλα ο χρόνος κατακράτησης του υπό ανάλυση δείγματος καθορίζεται από το τι δείγμα εξετάζεται και τη σύσταση της κάθε φάσης ξεχωριστά. Έτσι, στη περίπτωση δείγματος με αρκετά συστατικά ο διαχωρισμός είναι δύσκολος ενώ συγχρόνως τα συστατικά συγκρατούνται ισχυρά από τη σταθερή φάση της στήλης με αποτέλεσμα να εκλούνται με αργό ρυθμό. Στην άλλη κατηγορία, αυτή της βαθμωτής έκλουσης, επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός λόγω της μεταβαλλόμενης κινητής φάσης. Αυτό βοηθάει τις ουσίες που πρακτικά δυσκολεύονται να εξέλθουν της χρωματογραφικής στήλης, καθώς οι μεν με μικρό χρόνο παραμονής βγαίνουν σχετικά εύκολα ενώ αντίθετα οι άλλες υποβοηθούνται από την αύξηση της ισχύος [73]–[75].

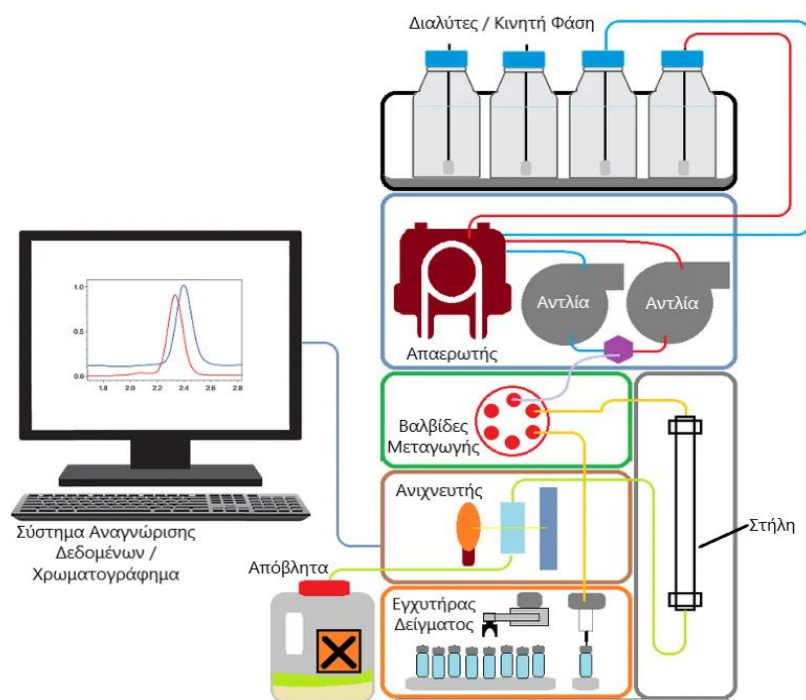
Τα επιμέρους τμήματα της συσκευής HPLC είναι τα παρακάτω:

- Εισαγωγέας (εισαγωγή δείγματος χειροκίνητα με ένεση)
- Απαγωγέας (απομάκρυνση φυσαλίδων)
- Στήλη
- Κινητή φάση
- Ανιχνευτές

Επίσης πέραν των επιμέρους τμημάτων των συσκευών HPLC, οι χρωματογραφικές στήλες διαθέτουν και μια σειρά τεχνικών χαρακτηριστικών για είναι αποδοτικές. Συνήθως είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα ενώ για καλύτερο διαχωρισμό προτιμάται το πληρωτικό υλικό να αποτελείται από σωματίδια μικρής διαμέτρου και η χρωματογραφική στήλη να έχει σχετικά μεγάλο μήκος. Επίσης η πολικότητα των μορίων και ο συντελεστής προσρόφησης τους είναι καθοριστικός για τον χρόνο κατακράτησης τους. Οι στήλες ακόμα χωρίζονται σε στήλες κανονικής φάσης όπου σε αυτές πρώτα διαχωρίζονται τα μη πολικά μόρια, και στις στήλες ανεστραμμένης φάσης όπου πρώτα εκλύονται τα πολικά μόρια και έπειτα τα μη πολικά. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα διαλυτών, οι οποίοι επιλέγονται αναλόγως την πολικότητα και την εκλεκτικότητα τους. Για την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού η πολικότητα της στατικής φάσης θα πρέπει να είναι διαφορετική από αυτή της κινητής φάσης [75]. Τέλος οι ανιχνευτές διαχωρίζονται σε έξι κατηγορίες οι οποίες είναι :

1. Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
2. Ανιχνευτές υπεριώδους- ορατού
3. Ανιχνευτές φθορισμού
4. Ανιχνευτές φασματογράφου μάζας
5. Ανιχνευτές σειράς φωτοδιοδίων
6. Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές.

Στην Εικόνα 34 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).



Εικόνα 34: Σχηματική Απεικόνιση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) [75].

➤ Μέθοδος LC-MS (Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας)

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry / MS) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες και ταχύτερα αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές που διαθέτει η σύγχρονη επιστημονική κοινότητα. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε επιστήμες όπως η χημεία, η βιολογία, αλλά και στις βιοϊατρικές επιστήμες, παρέχοντας ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα. Ειδικότερα, με την φασματομετρία μάζας υπάρχει δυνατότητα διευκρίνησης της μοριακής δομής μεγάλης ποικιλίας αναλυτών, παρέχεται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ιδιαίτερα σύνθετων δειγμάτων, ενώ ταυτόχρονα προσδιορίζεται πλήθος φυσικοχημικών ιδιοτήτων της ύλης. Τα χαρακτηριστικά τα οποία ξεχωρίζουν την φασματομετρία μάζας από άλλες τεχνικές ανάλυσης είναι η υψηλή ευαισθησία και η εκλεκτικότητα. Αυτά βελτιώνονται και εξελίσσονται διαρκώς με την εισαγωγή καινοτόμου οργανολογίας.

Στο φάσμα μάζας απεικονίζεται η σχετική αφθονία των παραγόμενων ιόντων συναρτήσει του λόγου μάζα προς φορτίο (m/z). Συγκεκριμένα, η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν με τη μεγαλύτερη αφθονία ονομάζεται βασική κορυφή, και το ιόν αυτής, μοριακό ιόν. Η κορυφή του μοριακού ιόντος ορίζεται αυθαίρετα με σχετική

αφθονία 100 %. Αντίθετα, οι υπόλοιπες κορυφές αντιστοιχούν σε τιμές σχετικής αφθονίας εκατοστιαίας αναλογίας ως προς τη βασική κορυφή. Έτσι, στη φασματομετρία μάζας λαμβάνονται πληροφορίες βάσει της τιμής του λόγου m/z των προκύπτων ιόντων, και της αφθονίας αυτών, οδηγώντας στη λήψη ποιοτικών και ποσοτικών αποτελεσμάτων.

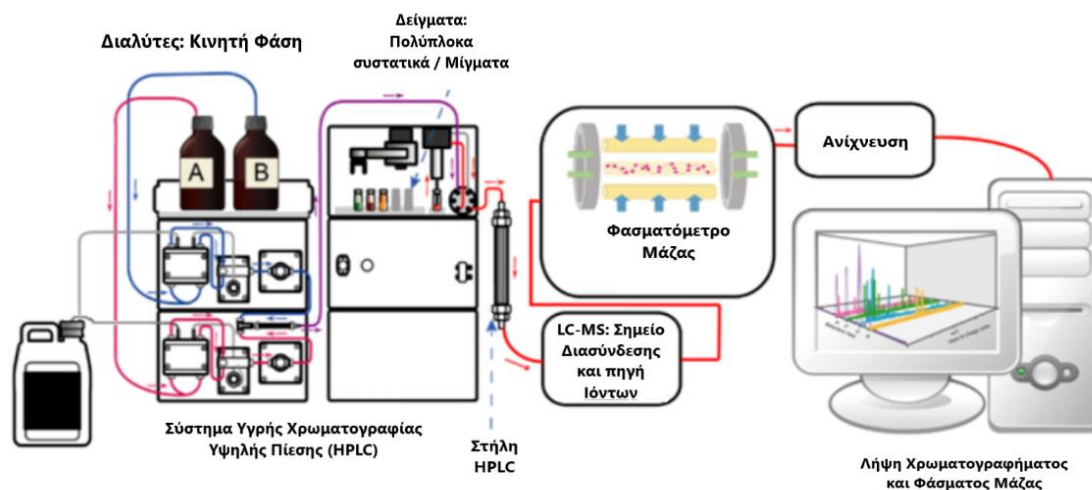
Με την σύζευξη διαφόρων αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού με φασματομετρία μάζας προκύπτει μία τεχνική που έχει στόχο την αύξηση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας. Συγκεκριμένα, με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος όταν αυτός εφαρμόζεται πριν από τη φασματομετρική ανάλυση, παρέχονται αξιόπιστα δεδομένα για τους προσδιοριζόμενους αναλύτες, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται και ταυτοποίηση αυτών. Οι συζευγμένες τεχνικές χαρακτηρίζονται εξίσου από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα και λαμβάνουν χώρα όταν τα προς ανάλυση μίγματα είναι εξαιρετικά πολύπλοκα.

Μία από τις σημαντικότερες και εξαιρετικά εκλεκτική, είναι η συνδυασμένη τεχνική μεταξύ MS και HPLC, κοινώς γνωστή ως LC-MS. Ο συνδυασμός των δύο αναλυτικών μεθόδων συμβάλλει στη μείωση των πειραματικών σφαλμάτων και ταυτόχρονα στην βελτίωση της ακρίβειας. Η εφαρμογή του LC-MS είναι πολύ χρήσιμη σε καταστάσεις που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ενώσεων, όπως βιολογικά δείγματα.

Η τεχνική LC-MS περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των μιγμάτων σύμφωνα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, στη συνέχεια τον εντοπισμό των συστατικών σε κάθε κορυφή και την ανίχνευση με βάση το φάσμα μάζας τους. Οι ρυθμοί ροής που χρησιμοποιούνται στο LC-MS θα πρέπει να είναι μικρότεροι από εκείνους που χρησιμοποιούνται για την HPLC. Αυτό γίνεται για να εξασφαλιστεί πλήρης ιονισμός και να διατηρηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης του MS. Επομένως, η στήλη που χρησιμοποιείται στο LC-MS είναι πολύ μικρότερη, για να υποστηρίξει τους μικρότερους ρυθμούς ροής διαλύτη και τους μικρότερους όγκους δειγμάτων. Το γεγονός αυτό κάνει τις αντλίες σύριγγας πολύ βολικές για το LC-MS επειδή είναι πολύ ακριβείς και μπορούν να προσφέρουν πολύ χαμηλούς ρυθμούς ροής. Επιπλέον, είναι δυνατή η χρήση

αντλιών σύριγγας για έγχυση δείγματος στο σύστημα, καθώς μπορούν να παρέχουν πολύ ακριβή δοσολογία δείγματος [76], [77].

Στην Εικόνα 35 απεικονίζεται η οργανολογία του συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένο με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS).



Εικόνα 35: Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας συστήματος LC-MS [78].

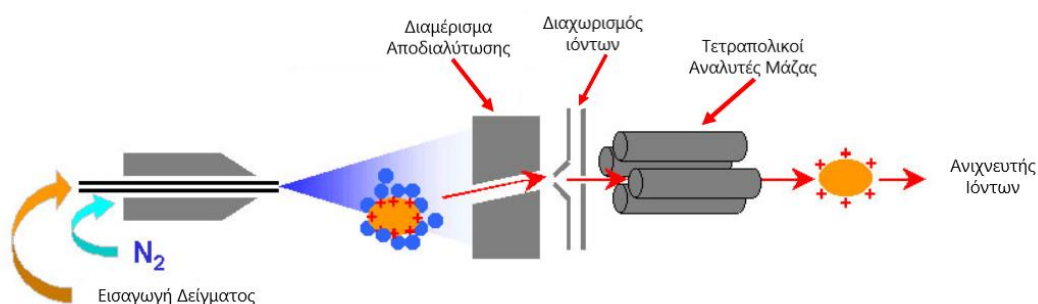
Με την εισαγωγή καινοτόμου οργανολογίας στο ήδη υπάρχον συζευγμένο σύστημα, επιτυγχάνεται η αύξηση της ακρίβειας, της εκλεκτικότητας, αλλά και της ευαισθησίας. Ανάλογα με το σύστημα χρωματογραφικής εισαγωγής, τις τεχνικές ιονισμού, αλλά και τους διαφορετικούς αναλυτές μάζας, σε σχέση πάντα με τις ιδιότητες και την λειτουργία αυτών, διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό το τελικό αποτέλεσμα που θα ληφθεί.

Πιο συγκεκριμένα, με τις τεχνικές ιονισμού επιτυγχάνεται η παραγωγή αέριων ιόντων, τα οποία προέρχονται από το εκάστοτε υπό ανάλυση δείγμα (Τεχνική Ιονισμού Αέριας Φάσης), ή ακόμα και η απευθείας ανάλυση υγρού ή στερεού δείγματος (Τεχνική Ιονισμού Εκρόφησης). Σύμφωνα με τον εκάστοτε αναλύτη, διαφοροποιείται και η τεχνική ιονισμού που θα χρησιμοποιηθεί, παράμετρος που καθορίζει την μορφή του τελικού φάσματος μάζας που λαμβάνεται. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται οι τεχνικές ιονισμού με τον παράγοντα ιονισμού, καθώς και ο τύπος της τεχνικής στον οποίο υπάγονται.

Πίνακας 9: Διάφορες Τεχνικές Ιονισμού.

Τύπος Τεχνικής	Όνομα Τεχνικής	Ακρωνύμιο	Παράγοντας Ιονισμού
Αέριας Φάσης	Χημικός Ιονισμός	CI	Αντιδραστήρια / Ιόντα Αέριας Φάσης
	Ιονισμός Πεδίου	FI	Ηλεκτρόδιο Υψηλού Κενού
	Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων	EI	Ηλεκτρονική Δέσμη
Εκρόφησης	Ιονισμός Πεδίου με εκρόφηση	FD	Ηλεκτρόδιο Υψηλού Κενού
	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό	ESI	Ισχυρό Ηλεκτρικό Πεδίο
	Ιονισμός με Θερμοψεκασμό		Υψηλή Θερμοκρασία
	Ιονισμός Εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από τη μήτρα	MALDI	Ακτίνα λέιζερ
	Ιονισμός βομβαρδισμού με ταχέως κινούμενα άτομα	FAB	Ατομική Δέσμη
	Εκρόφηση Πλάσματος		Θραύσματα σχάσης ^{252}Cf

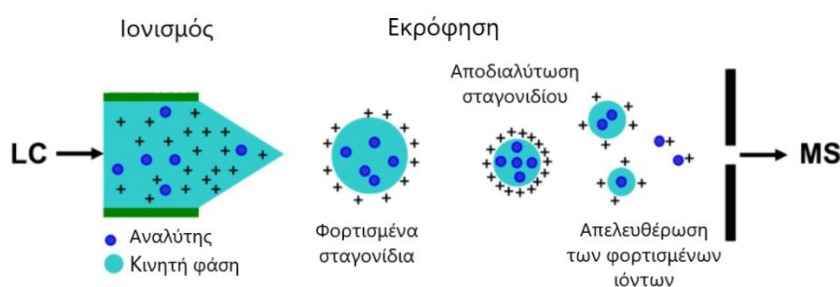
Το σύστημα ιονισμού ESI-MS θεωρείται μία από τις καλύτερες και πιο ήπιες μεθόδους ιονισμού που χρησιμοποιείται για τα βιομόρια και γενικά τα μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους.



Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος ESI-MS [79].

Σύμφωνα με την συγκεκριμένη τεχνική και όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 36, το δείγμα εξερχόμενο από το LC ως διάλυμα, εισέρχεται με χαμηλή ροή σε έναν τριχοειδή σωλήνα, όπου και υφίσταται την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου στο άκρο αυτού. Με αυτόν τον τρόπο, το διαλυμένο δείγμα μετατρέπεται σε νεφέλωμα. Τα φορτισμένα σωματίδια που εξέρχονται του τριχοειδούς σωλήνα, είναι ίδιας πολικότητας με αυτήν που επικρατεί στο άκρο αυτού. Στη συνέχεια, τα σταγονίδια

εισέρχονται σε μία περιοχή «αποδιαλύτωσης», στην οποία ο διαλύτης εξατμίζεται, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η πυκνότητα του φορτίου, αφού μειώνεται η επιφάνειά των σωματιδίων. Συνεπώς, μεγαλύτερη πυκνότητα φορτίου κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια. Η αύξηση αυτή της πυκνότητας του φορτίου στα σωματίδια, συμβάλλει στην διάσπαση του σωματιδίου λόγω απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται στην επιφάνειά του. Αποτέλεσμα της διάσπασης αυτής, είναι η απελευθέρωση των φορτισμένων ιόντων, με τελικό προορισμό τον αναλυτή μάζας [76], [80]. Στην εικόνα 37 παρουσιάζεται η διαδικασία εξαγωγής ιόντων στο σύστημα ESI-MS, όπως περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 37: Διαδικασία εξαγωγής ιόντων στο σύστημα ESI-MS [81].

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού σε σχέση με άλλες τεχνικές ιονισμού, πλεονεκτεί στο γεγονός ότι δεν παράγει ιόντα από το δείγμα, αντίθετα εξάγει τα ήδη υπάρχοντα.

Ο διαχωρισμός των ιόντων που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τον λόγο m/z , αποτελεί την βασική λειτουργία ενός αναλυτή μάζας. Οι αναλυτές μάζας μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες, βασιζόμενοι στον τρόπο λειτουργίας τους:

- Οι συνεχείς αναλυτές μάζας, όπως ο τετραπολικός αναλυτής μάζας και ο αναλυτής μάζας μαγνητικού τομέα,
- Οι παλμικοί αναλυτές μάζας, όπως ο αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης, και
- Οι αναλυτές μάζας παγίδας ιόντων, όπως η Τετραπολική παγίδα ιόντων, η Γραμμική παγίδα ιόντων, ο αναλυτής Κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντος με μετασχηματισμό Fourier και το Orbitrap.

Στον Πίνακα 10 αναγράφονται οι τύποι αναλυτών μάζας, καθώς και η αρχή διαχωρισμού αυτών.

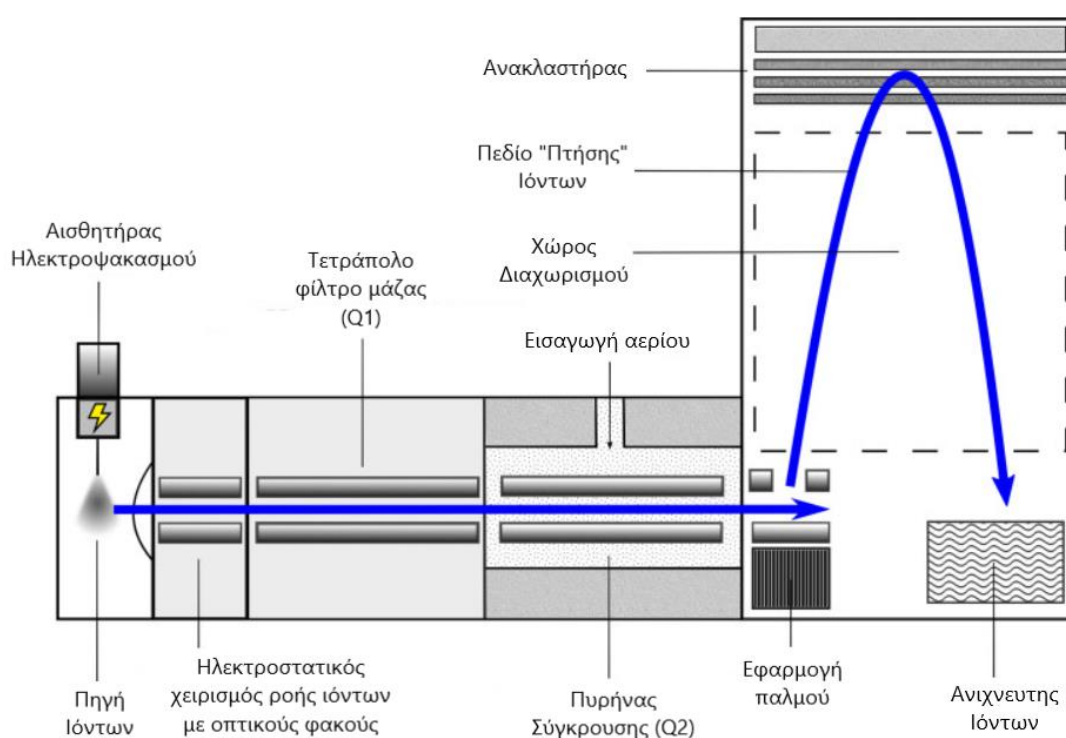
Πίνακας 10: Διάφοροι Αναλυτές Μάζας.

Τύπος Αναλυτή Μάζας	Ακρωνύμιο	Αρχή Διαχωρισμού
Μαγνητικού Τομέα	B	Ορμή
Τετραπόλου	Q	Σταθερότητα Τροχιάς
Γραμμικής Παγίδας Ιόντων	LIT	Σταθερότητα Τροχιάς
Τετραπολικής Παγίδας Ιόντων	QIT	Σταθερότητα Τροχιάς
Χρόνου Πτήσης	TOF	Χρόνος Πτήσης
Κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντος με μετασχηματισμό Fourier	FTICR	Συχνότητα Κυκλοτρονιακού Συντονισμού
Ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Orbitrap)	FT-OT	Συχνότητα Συντονισμού

Συγκεκριμένα, το Q-TOF-MS είναι ένα «υβριδικό» όργανο που συνδυάζει τεχνολογίες τετραπόλων με αναλυτή μάζας χρόνου πτήσης. Τα όργανα Q-TOF-MS μοιάζουν πολύ με αυτά ενός φασματογράφου μάζας τριπλού τετραπόλου, αν και το τρίτο τετράπολο έχει αντικατασταθεί από έναν σωλήνα χρόνου πτήσης. Το πρώτο τετράπολο (Q1) είναι ικανό να λειτουργεί ως φίλτρο μάζας για την επιλογή συγκεκριμένων ιόντων με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) ή μόνο σε λειτουργία ραδιοσυχνότητας (RF) όπου όλα τα ιόντα μεταδίδονται μέσω του τετραπόλου. Το δεύτερο τετράπολο (Q2) δρα ως πυρήνας σύγκρουσης όπου τα ιόντα βομβαρδίζονται από ουδέτερα μόρια αερίου όπως άζωτο ή αργό, με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό των ιόντων με μια διαδικασία γνωστή ως διάσπαση επαγόμενης από σύγκρουση (CID). Το Q2 μπορεί επίσης να δράσει σε λειτουργία μόνο RF χωρίς μετέπειτα κατακερματισμό των ιόντων. Αφού φύγουν από τον τετράπολο, τα ιόντα επιταχύνονται εκ νέου στην περιοχή διαμορφωτή ιόντων του αναλυτή χρόνου πτήσης, όπου εφαρμόζεται παλμός από ένα ηλεκτρικό πεδίο και επιταχύνονται ορθογώνια προς την αρχική τους διεύθυνση. Όλα τα ιόντα που έχουν αποκτήσει την ίδια κινητική ενέργεια εισέρχονται στο πεδίο «πτήσης», όπου πρόκειται για μια περιοχή μετατόπισης χωρίς πεδίο, μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα διαχωρισμός των ιόντων, σύμφωνα με την μάζα τους. Τα ιόντα που παρουσιάζουν ελαφρύτερη μάζα έχουν μικρότερο χρόνο πτήσης, συνεπώς φτάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή ιόντων. Αντίθετα, τα βαρύτερα ιόντα χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να διασχίσουν τη διαδρομή πτήσης, με αποτέλεσμα να οδηγούνται αργότερα στον ανιχνευτή. Οι σύγχρονοι αναλυτές χρόνου πτήσης χρησιμοποιούν επίσης μια συσκευή ανακλαστήρα, στο ένα

άκρο του πεδίου διαχωρισμού των ιόντων, που χρησιμεύει για τη διόρθωση της διασποράς κινητικής ενέργειας και της χωρικής διασποράς ιόντων που παρουσιάζουν τα ίδια m/z , αλλά έχουν μεταβαλλόμενες ταχύτητες. Αυτή η διόρθωση ανακλαστήρα επιτρέπει σε ιόντα του ίδιου m/z να φτάσουν στον ανιχνευτή την ίδια στιγμή. Επίσης, η συσκευή ανακλαστήρα αυξάνει το μήκος της διαδρομής πτήσης των ιόντων, γεγονός που βελτιώνει την ανάλυση μάζας [82]–[85].

Στην Εικόνα 38 απεικονίζεται η σχηματική αναπαράσταση οργάνολογίας Q-TOF-MS, καθώς και η πορεία του δείγματος με μπλε βέλος.



Εικόνα 38: Σχηματική αναπαράσταση οργάνολογίας Q-TOF-MS [82].

Ο αυξημένος ρυθμός ανίχνευσης με το LC-Q-TOF-MS οφείλεται στην αυξημένη ευαισθησία των οργάνων και στην ικανότητα ανίχνευσης πρόσθετων μη πτητικών, θερμικά ασταθών και εξαιρετικά πολικών ενώσεων που δεν επιδέχονται ανάλυση με την βοήθεια άλλων τεχνικών, όπως λόγω χάριν GC-MS [82].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες που προκαλείται σε έναν οργανισμό και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων και των ιστών. Η προστασία από τις ελεύθερες ρίζες γίνεται με την παρουσία των αντιοξειδωτικών, δηλαδή δραστικών ενώσεων που μπορούν να ληφθούν από τη διατροφή. Η μελέτη της αντιοξειδωτικής κατάστασης των πουλερικών είναι πολύ σημαντική για την εκτίμηση της υγείας τους, αλλά και την ποιότητα του κρέατος, μετρώντας διάφορους αντιοξειδωτικούς δείκτες στο πλάσμα και τους ιστούς των πτηνών.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η σύγκριση διαφορετικών συστημάτων εκτροφής πουλερικών, για την εύρεση του καλύτερου αντιοξειδωτικού προφίλ. Οι μετρήσεις που έγιναν πραγματοποιήθηκαν σε βιολογικά δείγματα, τα οποία ήταν πλάσμα αίματος και εκχύλισμα μυϊκού ιστού των πουλερικών της εκάστοτε εκτροφής. Τα συστήματα εκτροφής που αναλύθηκαν ήταν τα εξής, συμβατική εκτροφή, εκτροφή ελεύθερης βοσκής και εκτροφή ελεύθερης βοσκής με πρόσθετα αρωματικά φυτά. Σε αυτά τα δείγματα προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) με την μέτρηση της % δραστικότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών, ο βαθμός υπεροξειδωσης των λιπιδίων με την μέτρηση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η περιεκτικότητα σε Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) με φθορισμομετρική μέθοδο, καθώς και τα καροτενοειδή και ενώσεις της βιταμίνης E μέσω LC-Q-TOF-MS.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των ολικών καροτενοειδών στο πλάσμα κοτόπουλων πέντε διαφορετικών ομάδων: υγιή κοτόπουλα με βασική διατροφή, κοτόπουλα μολυσμένα με *Eimeria* spp και τρεις ομάδες κοτόπουλων μολυσμένα με *Eimeria* spp και τρία διαφορετικά προβιοτικά ως πρόσθετο διατροφής.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι αναλύσεις που γίνονται με τη βοήθεια βιοδεικτών βοηθούν στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για την εξαγωγή ενός αντιοξειδωτικού προφίλ, σύμφωνα με την διατροφή των πουλερικών, και εν συνεχεία συμβάλλουν στην βελτίωση του τρόπου εκτροφής των πτηνών. Η λήψη των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αντιδραστήρια και Όργανα

- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC):

DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πυκρυλυδραζόλη), Sigma Aldrich, Γερμανία

Μεθανόλη

Φωσφορικό νάτριο, 96%, Sigma Aldrich, USA

Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15 ml

Vortex

Φασματοφωτόμετρο, Jasco V-730

Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K

Κυψελίδες 1 ml

- Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ TBARS:

Τριχλωροξικό οξύ (TCA), >=99,5%, Fisher Chemical, Βέλγιο

2-Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), >=98%, Sigma Aldrich, Ηνωμένο Βασίλειο

Μηλονική διαλδεΐδη (MDA),

Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15 ml

Vortex

Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K

Φασματοφωτόμετρο, Jasco V-730

Κυψελίδες 1 ml

- Προσδιορισμός α-τοκοφερόλης

α-τοκοφερόλη, >= 95,5%, Sigma Aldrich, Γερμανία

Διηθημένη αιθανόλη

Εξάνιο, 95%, Fisher Chemical, Ηνωμένο Βασίλειο

Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15ml

Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K

Vortex

Κυψελίδες 1cm

Φθορισμόμετρο, Jasco FR-8300

- Μέθοδος Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)

Αιθανόλη absolute 99,5%

Εξάνιο, 95%, Fisher Chemical, Ηνωμένο Βασίλειο

Ακετονιτρίλιο

Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K

Φασματόμετρο μάζας Xevo G2-X2 Q-ToF (Waters, Manchester, UK) συνδεδεμένο στο σύστημα ACQUITY UPLC iClass Plus (Waters, Milford, MA, ΗΠΑ)

- Προσδιορισμός Ολικών Καροτενοειδών

β-καροτένιο 99%, Alfa Aesar, Γερμανία

Ακετόνη

Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15ml

Vortex

Φυγόκεντρος, Hermle Z 326 K

Κυψελίδα 1cm

Φασματοφωτόμετρο, Jasco V-730

Δείγματα - Επεξεργασία Δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό των α-τοκοφερόλη, TBARS και TAC, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από την εταιρεία «ΠΙΝΔΟΣ» Α.Π.Σ.Ι. και ήταν:

- Πλάσμα αίματος κοτόπουλων.
- Εκχύλισμα Μυϊκού Ιστού κοτόπουλων: Σε erpendorf ζυγίζονται 100mg μυϊκού ιστού σε αναλυτικό ζυγό, 5 δεκαδικών. Προστίθενται 400μl διαλύματος 50 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH=7,5 (Buffer). Πραγματοποιείται ομογενοποίηση με τη χρήση του Polytron System PT 1200 E (KINEMATICA AG), και της κεφαλής Polytron Biotrona PT-DA 03/2EC-E050, PT 1300D, Dispersing Aggregate 3mm

coupling type C (KINEMATICA AG). Έπειτα, φυγοκεντρείται κάθε δείγμα στα 10.000 rpm, για 15 min στους 20 °C. Συλλέγεται σε νέο errendorf το υπερκείμενο διάλυμα (εκχύλισμα μυϊκού ιστού) από το κάθε δείγμα και αποθηκεύεται στους -80 °C.

Για τον προσδιορισμό των ολικών καροτενοειδών και για την ανάλυση με LC-MS, τα δείγματα ήταν πλάσμα αίματος κοτόπουλων.

3.1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων αντιοξειδωτικών συστατικών σε βιολογικά δείγματα, πολλές είναι οι μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί. Ωστόσο, η χρήση μίας μόνο τιμής που μπορεί να χαρακτηρίσει το αντιοξειδωτικό δυναμικό συνολικά, αποτελεί πλεονέκτημα. Έτσι, χρησιμοποιείται ο όρος της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC), για την εκτίμηση της οποίας έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι. Οι περισσότερες από τις μεθόδους αυτές μετράνε την αναστολή μιας σταθερής τεχνητά σχηματιζόμενης ελεύθερης ρίζας. Η μέθοδος DPPH αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκτίμηση της TAC.

Αρχή μεθόδου TAC

Η μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (δηλαδή η δέσμευση ελεύθερων ριζών) πραγματοποιείται με τη μέτρηση της απορρόφησης και βασίζεται στη μέτρηση του ανηγμένου DPPH στα 520 nm. Το DPPH• είναι μία από τις σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου και όταν δέχεται ένα υδρογόνο από κάποιο αντιοξειδωτικό, το DPPH• ανάγεται σε DPPH-H και ως συνέπεια αυτού η απορρόφηση μειώνεται (Εικόνα 39). Το χρώμα μετατρέπεται από μωβ σε κίτρινο. Αυτή η αντίδραση είναι στοιχειομετρική σε σχέση με τον αριθμό των ατόμων υδρογόνου που απορροφήθηκαν. Επομένως, το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί ακολουθώντας τη μείωση της απορρόφησης UV στα 520 nm. Ο βαθμός αποχρωματισμού υποδεικνύει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να δώσουν ένα υδρογόνο [86].



Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

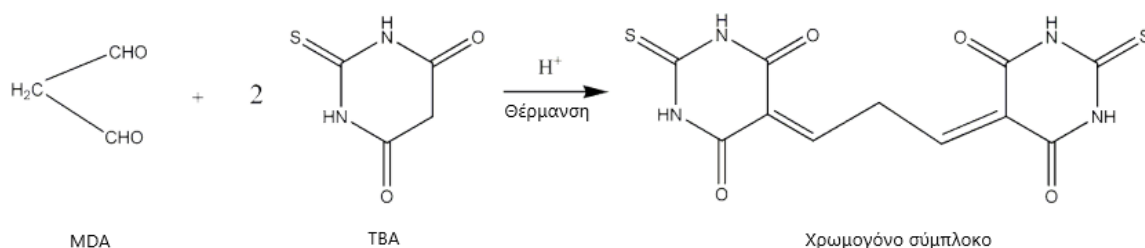
Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, πραγματοποιείται με τον υπολογισμό της % Δραστικότητας Δέσμευσης Ελευθέρων Ριζών (Radical Scavenging Activity) από τον τύπο:

$$\frac{\text{Absorbance}_{\text{Control}} - \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αντιπροσωπεύει τα mmol του DPPH• που ανάγονται σε DPPH:H, από τα υπάρχοντα αντιοξειδωτικά του δείγματος.

3.2. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ TBARS

Πρόκειται για μία φασματοσκοπική ανάλυση, η οποία ανιχνεύει χρωμογόνα σύμπλοκα που παράγονται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων, που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Αντίδραση μηλονικής διαλδεΐδης με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA).

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Έτσι, κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων, παράγονται ενώσεις ικανές να αντιδράσουν με θειοβαρβιτουρικό οξύ. Η παρουσία προϊόντων υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων δημιουργεί χρωμογόνα σύμπλοκα με το TBA, τα οποία προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά μέσω της απορρόφησης στα 532nm. Όσο ασθενέστερη είναι η απορρόφηση, τόσο λιγότερη είναι η δημιουργία προϊόντων υπεροξείδωσης, συνεπώς τόσο καλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα.

Αρχή της μεθόδου TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)

Οι δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) σχηματίζονται ως παραπροϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με τον προσδιορισμό TBARS χρησιμοποιώντας θειοβαρβιτουρικό οξύ ως αντιδραστήριο. Η μέθοδος TBARS μετρά την μηλονική διαλδεΰδη (MDA) που υπάρχει στο δείγμα, καθώς αυτή αποτελεί προϊόν της διάσπασης των ασταθών αυτών μορίων, δηλαδή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων από τις υδρολυτικές συνθήκες της αντίδρασης. Οι καρβονυλικές ενώσεις αντιδρούν και συμπλέκονται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ δίνοντας έγχρωμα σύμπλοκα προϊόντα, τα οποία προσδιορίζονται φωτομετρικά στα 532 nm.

Διαλύματα εργασίας

Δ/μα 10% TCA: 10 g TCA διαλύονται σε 100 ml d H₂O (Διατηρείται στους 4 °C).

Δ/μα 0,67% TBA: 0,7539 g TBA διαλύονται σε ~ 80 ml d H₂O υπό θέρμανση. Το δ/μα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με προσθήκη d H₂O. Το TBA είναι ευαίσθητο στον αέρα γι' αυτό και μετά από κάθε χρήση και πριν την αποθήκευσή του αφαιρείται όλος ο αέρας από το μπουκάλι με ρεύμα N₂. Το δ/μα διατηρείται στους 4 °C.

Δ/μα 6 mM MDA: Ένα μέρος του πυκνού MDA αραιώνεται 1000 φορές με την προσθήκη d H₂O, δίνοντας δ/μα 6 mM. (Διατηρείται στους 4 °C).

Πρότυπο δ/μα 200 μM MDA: 30 μl δ/τος 6 mM MDA προστίθενται σε 870 μl d H₂O δίνοντας δ/μα 200 μM MDA. Το δ/μα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική Πορεία

Προετοιμασία Προτύπων

Σε 6 πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0, 5, 10, 15, 20 και 25 μl δ/τος 200 μM MDA. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 μl με d H₂O.

Κατεργασία Δειγμάτων και Προτύπων δ/των

Σε κάθε σωλήνα που περιέχει δείγμα ή πρότυπο δ/μα MDA, προστίθεται 1 ml δ/τος 10% TCA και 1 ml δ/τος 0,67% TBA. Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά με Vortex,

σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται σε υδρόλουτρο 90 °C για 30 min και αφήνονται μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Φωτομέτρηση Δειγμάτων και Προτύπων

Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 3100 rpm (1500 x g) για 15 min, για καταβύθιση των πρωτεϊνών που προκαλούν θόλωμα. Αφαιρείται προσεκτικά από το υπερκείμενο μία ποσότητα, η οποία μεταφέρεται στην κυψελίδα. Η απορρόφηση μετράται στα 532 nm.

Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων, σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη και από την εξίσωσή της και τις απορροφήσεις των δειγμάτων, υπολογίζονται τα nmol των ισοδύναμων MDA / ml πλάσματος.

3.3. Προσδιορισμός α-τοκοφερόλης

Αρχή Μεθόδου

Η ολική τοκοφερόλη προσδιορίζεται με τη μέτρηση του φθορισμού της εκχυλισμένης α-τοκοφερόλης σε εξάνιο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής. Μετράται ο φθορισμός στα 330nm [87].

Διαλύματα εργασίας

Τυφλό: d H₂O

Πρότυπο διάλυμα βιταμίνης E, 2000 µg/ml: 500 mg α-τοκοφερόλης διαλύονται σε 100 ml διηθημένης αιθανόλης και έπειτα σε 250 ml.

Διάλυμα εργασίας βιταμίνης E, 20 µg/ml: 10 µl πρότυπου διαλύματος βιταμίνης E διαλύονται σε 1 ml διηθημένης αιθανόλης.

Πειραματική Πορεία

Σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15 ml (με πώμα), προστίθενται τα ακόλουθα:

Τυφλό: Σε 1,2 ml d H₂O, προστίθενται 2 ml διηθημένης αιθανόλης υπό ανάδευση.

Πρότυπο: Σε 0,2 ml διαλύματος εργασίας, προστίθενται 1,2 ml d H₂O και αναμιγνύονται για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθενται υπό ανάδευση 1,8 ml διηθημένης αιθανόλης.

Άγνωστο: Σε πλάσμα αίματος 0,2 ml, προστίθεται 1 ml d H₂O και αναμιγνύεται για 30 δευτερόλεπτα. Κατόπιν προστίθενται 2 ml διηθημένης αιθανόλης υπό ανάδευση.

Στη συνέχεια, οι σωλήνες αναδεύονται για 30 δευτερόλεπτα, προστίθενται 5 ml εξανίου και ανακινούνται καλά για 5 λεπτά με το χέρι και Vortex. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 2000 rpm. Η στιβάδα εξανίου, από κάθε σωλήνα, μεταφέρεται σε κυψελίδα φθορισμού. Η απορρόφηση μετράται στα 330 nm.

Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός της ποσότητας της α-τοκοφερόλης γίνεται με την εξίσωση:

$$\frac{\mu\text{g ελεύθερης βιταμίνης E}}{\text{ml}} = \frac{F_x - F_b}{F_s - F_b} \times 20$$

όπου F_x = απορρόφηση άγνωστου, F_s = πρότυπη απορρόφηση, F_b = απορρόφηση τυφλού.

3.4. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-QTOF-MS)

Για την συγκεκριμένη μέτρηση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Καθηγητή κύριου Τζάκου Ανδρέα. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον κ. Παρίση Νικόλαο.

Πραγματοποιήθηκε σάρωση μέσω του συστήματος υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-QTOF-MS) για την ανίχνευση ενώσεων της κατηγορίας των καρτενοειδών και συστατικών ενώσεων της βιταμίνης E σε δείγμα πλάσματος κοτόπουλου. Συγκεκριμένα, έγινε ανίχνευση σε ένα δείγμα από κάθε εκτροφή (Συμβατική Εκτροφή, Εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής και Εκτροφή Ελεύθερης

Βοσκής με προσθήκη Αρωματικών Φυτών), και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ανιχνεύσιμων ενώσεων, καθώς και σχετική ποσοτική σύγκριση.

Πειραματική πορεία

Καταβύθιση πρωτεϊνών: Σε erpendorf βάζουμε 100μL πλάσματος και προστίθενται 100μL καθαρή αιθανόλη και στη συνέχεια 200μL παγωμένο εξάνιο. Γίνεται ανάδευση στο Vortex και έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 0°C, στα 500rcf για 5min. Συλλέγεται η στοιβάδα του εξανίου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Η στοιβάδα του εξανίου συλλέγεται ξανά και προστίθενται μαζί με την πρώτη.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη (εξάνιο) υπό κενό, και το στερεό που απομένει επαναδιαλυτοποιείται σε μίγμα ACN/MeOH (70/30 v/v).

Συνθήκες Χρωματογραφίας

Για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου, δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες, τάσεις, καθώς και χρόνοι έκλουσης και αναλογία διαλυτών.

Το φασματόμετρο μάζας Xevo G2-X2 Q-ToF (Waters, Manchester, UK) συνδέθηκε στο σύστημα ACQUITY UPLC iClass Plus (Waters, Milford, MA, ΗΠΑ) μέσω διεπαφής ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI).

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο ACQUITY iClass Plus UPLC με ρυθμισμένο αυτόματο δειγματολήπτη στους 6 °C, χρησιμοποιώντας στήλη Acquity T3-HSS C18 (100 mm × 2,1 mm i.d., 1,8 μm μέγεθος σωματιδίων) (Waters, Milford, MA, ΗΠΑ). Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 25°C.

Η κινητή φάση που αποτελείται από νερό με 0,1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης Α) και ακετονιτρίλιο με 0,1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης Β) διοχετεύτηκε με ρυθμό ροής 0,4 mL min⁻¹. Δοκιμάστηκαν διάφορα προγράμματα έκλουσης χρωματογραφικής βαθμίδωσης για να ληφθεί το βέλτιστο:

Πίνακας 11: Βέλτιστο πρόγραμμα έκλουσης χρωματογραφικής βαθμίδωσης.

Χρόνος Έκλουσης	Κινητή Φάση
0,00-20,00 min	60% έως 100% B
20,00-25,00 min	100% B
25,00–25,01 min	60% B
25,01–30,00 min	60% B για εξισορρόπηση της στήλης

Ο όγκος της ένεσης ήταν 2 μL .

Το φασματόμετρο μάζας Xevo G2 Q-TOF χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+) για λήψη δεδομένων χρησιμοποιώντας UPLC/MS^E, το οποίο επιτρέπει τη λήψη δεδομένων ιόντων προδρόμου και προϊόντος σε μία έγχυση. Μετά από δοκιμή διαφορετικών συνθηκών πηγής, αυτές για τη μέγιστη ένταση των πρόδρομων ιόντων ήταν οι εξής:

Πίνακας 12: Συνθήκες πηγής με τη μέγιστη ένταση των πρόδρομων ιόντων.

Συνθήκες Πηγής	
Δυναμικό στο τριχοειδές	1,2 kV
Δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς	40 V
Θερμοκρασία πηγής	120 °C
Θερμοκρασία αποδιαλύτωσης	550 °C
Ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς	20 L h ⁻¹
Ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N ₂)	1000 L h ⁻¹

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας LockSpray, το οποίο εξασφάλιζε ακρίβεια και αναπαραγωγικότητα. Η λευκίνη-εγκεφαλίνη (5 ng mL⁻¹) χρησιμοποιήθηκε ως μάζα κλειδώματος που παράγει ένα ιόν αναφοράς σε θετική λειτουργία σε $m/z = 556,2766$ και εισήχθη με ψεκασμό κλειδώματος στα 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ για ακριβή απόκτηση μάζας σε διάστημα 60 δευτερολέπτων για 0,250 δευτερόλεπτα.

Η απόκτηση δεδομένων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το MS^E, το οποίο έχει δύο ξεχωριστές λειτουργίες σάρωσης που προγραμματίζονται με ανεξάρτητες ενέργειες σύγκρουσης.

Πίνακας 13: Λειτουργίες σάρωσης του MS^E.

Ενέργεια σύγκρουσης	Εύρος μάζας σάρωσης	Χρόνος σάρωσης	Ενέργεια σύγκρουσης
Χαμηλή ενέργεια (Λειτουργία 1)	50–1.200	0,2 sec	4 eV
Υψηλή ενέργεια (Λειτουργία 2)	50–1.200	0,2 sec	20–60 eV

Η απόκτηση δεδομένων με αυτόν τον τρόπο προέβλεπε τη συλλογή πληροφοριών για άθικτα πρόδρομα ιόντα καθώς και ιόντα θραυσμάτων.

3.5. Προσδιορισμός Ολικών Καροτενοειδών.

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά καροτενοειδή προσδιορίζονται με την μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος ακετόνης στα 454nm, αφού χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, το β-καροτένιο. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών καροτενοειδών σε βιολογικά δείγματα. Βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης στο UV-Vis και προσδιορίζονται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μέσω της απορρόφησης στα 454nm. Όσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών [88].

Δείγματα

Τα δείγματα στα οποία έγινε μέτρηση ήταν συνολικά 100, χωρισμένα σε πέντε ομάδες των 20 δειγμάτων η καθεμία. Τα κοτόπουλα ήταν κρεατοπαραγωγής Ross 308® και σε όλες τις ομάδες κατανάλωσαν ένα εμπορικό σιτηρέσιο τριών φάσεων (εκκίνησης 1-14^η ημέρα, καλλιέργειας 14-21^η ημέρα και λήξης 21-35^η ημέρα). Δεν χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά, αυξητικοί παράγοντες ή αντικοκκιδιακά φάρμακα, ενώ η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 35 ημέρες.

Οι ομάδες θεραπείας που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν οι εξής:

- T1, όπου έχει οριστεί ως αρνητικό control,
- T2, η οποία έχει μολυνθεί με *Eimeria* spp.,
- T3, η οποία έχει μολυνθεί με *Eimeria* spp και φέρει συμπλήρωμα διατροφής του δοκιμασμένου προβιοτικού Α,
- T4, η οποία έχει μολυνθεί με *Eimeria* spp και φέρει συμπλήρωμα διατροφής του δοκιμασμένου προβιοτικού Β,
- T5, η οποία έχει μολυνθεί με *Eimeria* spp και φέρει συμπλήρωμα διατροφής του δοκιμασμένου προβιοτικού C.

Συγκεντρωτικά παρουσιάζονται οι ομάδες εκτροφών στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Πειραματικός σχεδιασμός της αξιολόγησης των επιδράσεων των διατροφικών συμπληρωμάτων προϊόντων στις παραμέτρους απόδοσης και υγείας του εντέρου κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής που προκλήθηκαν πειραματικά από το *Eimeria* spp.

Ομάδες	Δείγματα	Συμπλήρωμα Διατροφής	Μόλυνση με <i>Eimeria</i> spp
T1	1-20	-	-
T2	41-60	-	+
T3	81-100	+	+
T4	121-140	+	+
T5	161-180	+	+

Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων

Για την εύρεση κατάλληλου διαλύτη για το β-καροτένιο με σκοπό την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγιναν οι παρακάτω δοκιμές (Πίνακας 15):

Πίνακας 15: Δοκιμές διαλυτότητας για το β-καροτένιο σε διαφορετικούς διαλύτες.

Ποσότητα β-καροτενίου	Διαλύτης και ποσότητα	Διαλυτοποίηση
1mg	1ml εξάνιο	×
1mg	1,67ml εξάνιο	×
1mg	1ml μεθανόλη	×
1mg	μίγμα 1ml εξάνιο και 1ml μεθανόλη	×
1mg	μίγμα 2ml εξάνιο και 1ml μεθανόλη	×
1mg	μίγμα 3ml εξάνιο και 1ml μεθανόλη	✓
6mg	1ml DCM (διχλωρομεθάνιο), με υπερήχους*	✓
0,4mg	13,33ml αιθανόλη, με υπερήχους	×
1mg	5ml ακετόνης	✓

*Με την προσθήκη DCM (διχλωρομεθάνιο) στα δείγματα πλάσματος (0,2ml πλάσματος) σχηματίστηκαν μικκύλια στην επιφάνεια του διαλύτη, καθιστώντας μη δυνατή την μέτρηση της απορρόφησης.

Συνεπώς, για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα β-καροτενίου σε ακετόνη με συγκέντρωση $C=0,2 \text{ mg/ml}$.

Παρασκευάζουμε πυκνό διάλυμα β-καροτενίου σε ακετόνη τελικής συγκέντρωσης $C=0,2 \text{ mg/ml}$, ζυγίζοντας 1mg β-καροτενίου και διαλύοντάς το σε 5ml καθαρής ακετόνης. Τοποθετείται πώμα, γίνεται ανάδευση στο Vortex και καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο.

Για τα πρότυπα : Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 10ml παρασκευάζουμε πρότυπα διαλύματα με διαδοχικές αραιώσεις, χρησιμοποιώντας αρχικά το παραπάνω πυκνό πρότυπο διάλυμα που παρασκευάσαμε. Οι ποσότητες οι οποίες χρησιμοποιούνται εμφανίζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16):

Πίνακας 16: Παρασκευαστικός κατάλογος πρότυπων διαλυμάτων β-καροτενίου.

Τελική συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος	Όγκος διαλύματος που λαμβάνεται για διαδοχική αραίωση	Όγκος ακετόνης	Τελικός όγκος αρχικού παρασκευασθέντος διαλύματος
2 $\mu\text{g/ml}$	0,091875 ml από το 0,2 mg/ml	9,0956 ml	$V_{\text{τελικός}} = 9,1875 \text{ ml}$
1,5 $\mu\text{g/ml}$	6,18 ml από το 2 $\mu\text{g/ml}$	2,0625 ml	$V_{\text{τελικός}} = 8,25 \text{ ml}$
1 $\mu\text{g/ml}$	2,25 ml από το 1,5 $\mu\text{g/ml}$	2,0625 ml	$V_{\text{τελικός}} = 7,875 \text{ ml}$
0,75 $\mu\text{g/ml}$	4,875 ml από το 1 $\mu\text{g/ml}$	1,625 ml	$V_{\text{τελικός}} = 6,5 \text{ ml}$
0,5 $\mu\text{g/ml}$	3,5 ml από το 0,75 $\mu\text{g/ml}$	1,75 ml	$V_{\text{τελικός}} = 5,25 \text{ ml}$
0,25 $\mu\text{g/ml}$	2,25 ml από το 0,5 $\mu\text{g/ml}$	2,25 ml	$V_{\text{τελικός}} = 4,5 \text{ ml}$
0,125 $\mu\text{g/ml}$	1,5 ml από το 0,25 $\mu\text{g/ml}$	1,5 ml	$V_{\text{τελικός}} = 3 \text{ ml}$
0 $\mu\text{g/ml}$	-	3 ml	$V_{\text{τελικός}} = 3 \text{ ml}$

Ο τελικός όγκος κάθε πρότυπου διαλύματος, μετά τις διαδοχικές αραιώσεις, είναι 3 ml. Ανακινούμε σε Vortex κάθε πρότυπο διάλυμα, πριν την αφαίρεση οποιασδήποτε ποσότητας για παρασκευή αραιότερου διαλύματος.

Πειραματική Πορεία

Σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml βάζουμε 300 μ l δείγματος πλάσματος αίματος πουλερικών και προσθέτουμε 2,7 ml καθαρής ακετόνης. Τοποθετούμε πώμα και καλύπτουμε τον σωλήνα με αλουμινόχαρτο (το β -καροτένιο είναι φωτοευαίσθητο). Έπειτα ανακινούμε στο Vortex και φυγοκεντρούμε στα 1500 rcf, στους 20°C, για 10 min.

Λαμβάνουμε ποσότητα από τα πρότυπα διαλύματα και τοποθετούμε στην κυψελίδα, πάντα από το αραιότερο προς το πυκνότερο και μετράμε την απορρόφηση στα 454 nm. Ακολούθως, πραγματοποιούμε την ίδια διαδικασία και για τα δείγματα, λαμβάνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και το τοποθετούμε στην κυψελίδα, μετρώντας την απορρόφηση του στα 454 nm.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων οι συγκρίσεις έγιναν ανά δύο, μεταξύ τριών ομάδων: α) συμβατικών κοτόπουλων και κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής και β) κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής και κοτόπουλων ελεύθερης βοσκής με πρόσθετα αρωματικά φυτά για τον προσδιορισμό α-τοκοφερόλης, ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και ενώσεων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσος όρος, ενώ η τυπική απόκλιση (SD), το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) και η στατιστική σημαντικότητα (τιμή p) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την κανονικότητα και υπολογίστηκαν με το ανεξάρτητο t -test, χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM® SPSS® Statistics 26. Για τον προσδιορισμό των ολικών καροτενοειδών στα δείγματα, έγινε σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών πέντε ομάδων εκτροφής. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσος όρος, ενώ η τυπική απόκλιση (SD), το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) και η στατιστική σημαντικότητα (τιμή p) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την κανονικότητα και υπολογίστηκαν με την ανάλυση διασποράς μίας κατεύθυνσης (One-way Anova), χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM® SPSS® Statistics 26.

4.1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Μετά την επεξεργασία των τιμών των δειγμάτων, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των ομάδων εκτροφής (Συμβατικά Κοτόπουλα, Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής -EB- και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής με Πρόσθετα Αρωματικά Φυτά -EBA-), σε δύο διαφορετικές ομάδες δειγμάτων (μυϊκό ιστό και πλάσμα αίματος), για το προσδιορισμό της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας. Τα στοιχεία που λήφθηκαν ήταν τα εξής:

Εκτροφή Χειμώνα

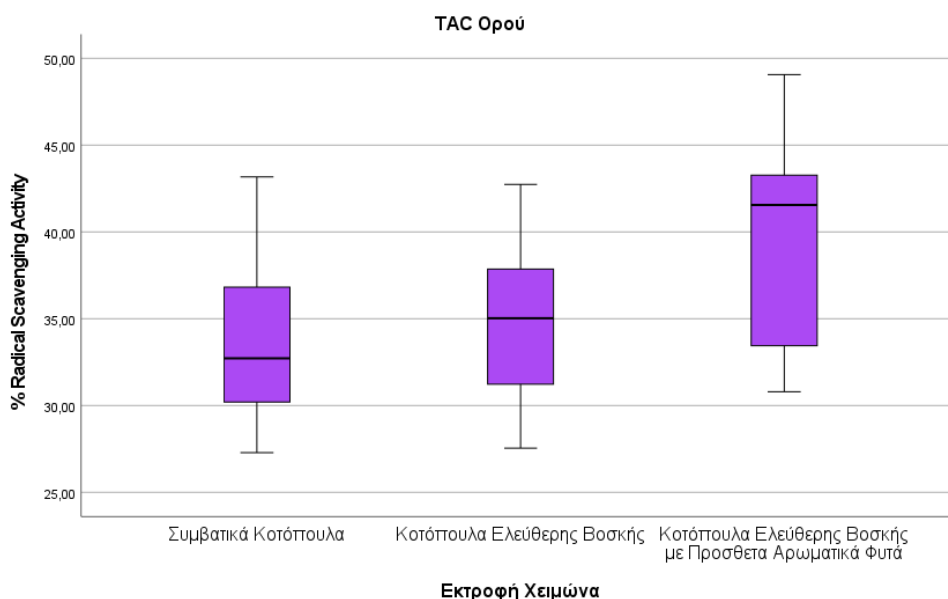
Πλάσμα TAC

Πίνακας 17: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	33,88	1,22	32,72	4,71	>0,05
	EB	34,70	1,23	35,03	4,76	

Πίνακας 18: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος EB και EBA για την εποχή του Χειμώνα.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	34,70	1,23	35,03	4,76	0,029
	EBA	40,03	1,60	41,56	5,99	



Διάγραμμα 1: Σύγκριση TAC σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Χειμώνα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Χειμώνα, σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των Κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής (EB), δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Αντίθετα, ανάμεσα στις ομάδες των EB και EBA υπάρχει διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,029$).

Εκτροφή Χειμώνα

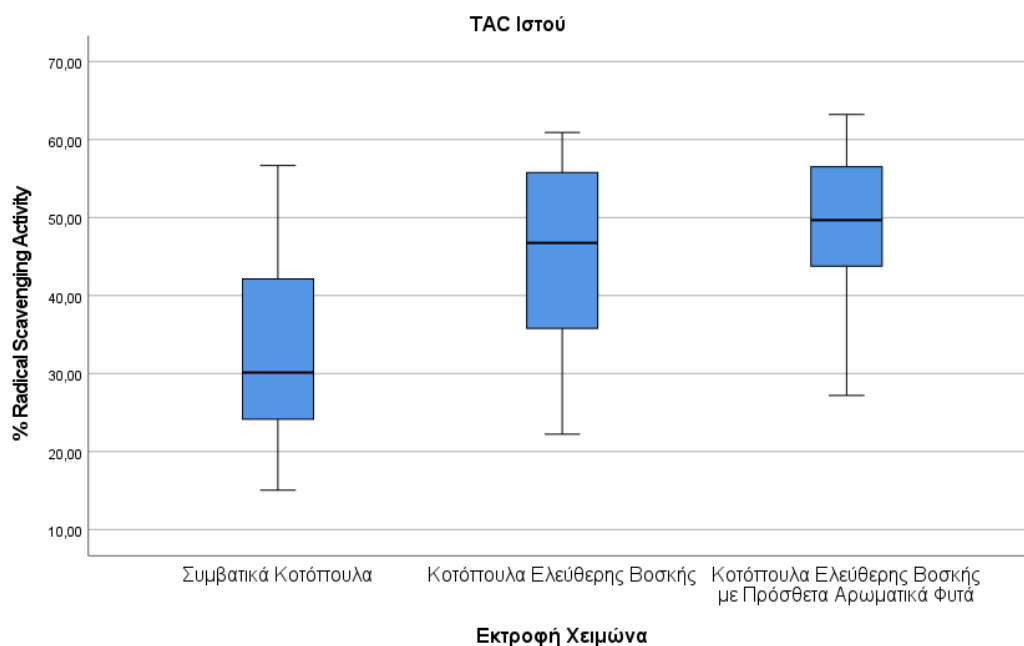
Ιστός TAC

Πίνακας 19: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	32,42	2,76	30,14	12,33	0,003
	EB	45,60	2,68	46,76	11,98	

Πίνακας 20: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	45,60	2,68	46,76	11,98	>0,05
	EBA	48,56	2,41	49,67	10,78	



Διάγραμμα 2: Σύγκριση TAC σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Χειμώνα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Χειμώνα, σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των EB, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,003$). Αντίθετα, ανάμεσα στις ομάδες των EB και EBA δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Εκτροφή Άνοιξη

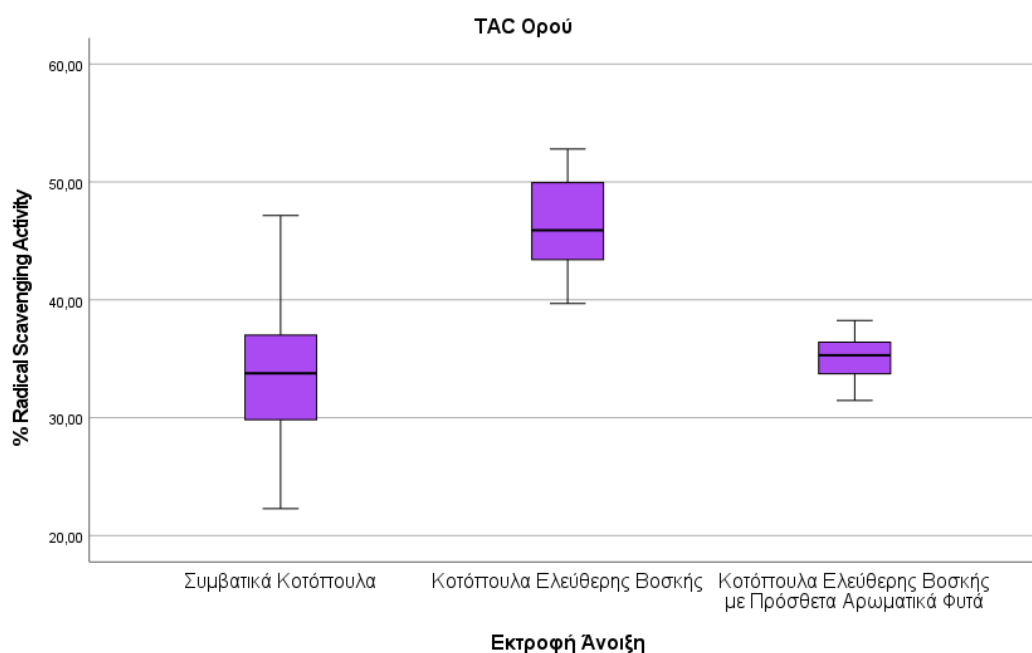
Πλάσμα TAC

Πίνακας 21: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	34,05	1,71	33,78	6,39	<0,001
	EB	46,41	1,13	45,90	4,39	

Πίνακας 22: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	46,41	1,13	45,90	4,39	<0,001
	EBA	35,29	0,52	35,31	1,94	



Διάγραμμα 3: Σύγκριση TAC σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή της Άνοιξης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή της Άνοιξης σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), όπως το ίδιο παρατηρείται και συγκρίνοντας τις ομάδες EB και EBA ($p < 0,001$).

Εκτροφή Άνοιξη

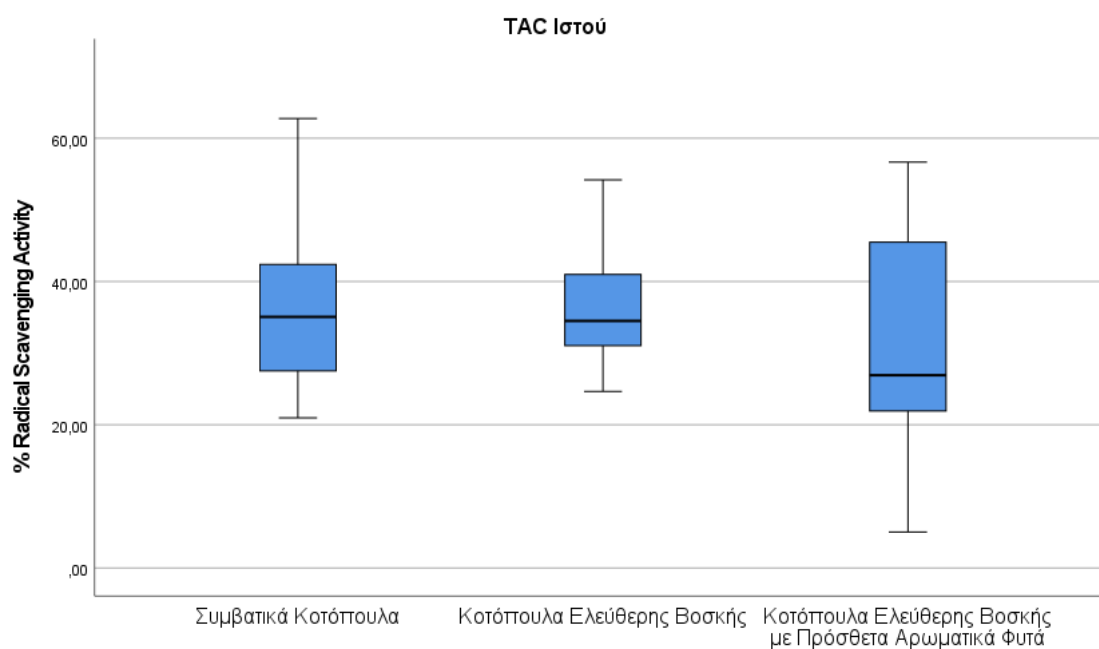
Ιστός TAC

Πίνακας 23: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	35,59	2,37	35,07	10,60	>0,05
	EB	36,35	1,66	34,50	7,24	

Πίνακας 24: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	36,35	1,66	34,50	7,24	>0,05
	EBA	32,37	3,38	26,92	15,11	



Διάγραμμα 4: Σύγκριση TAC σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή της Άνοιξης.

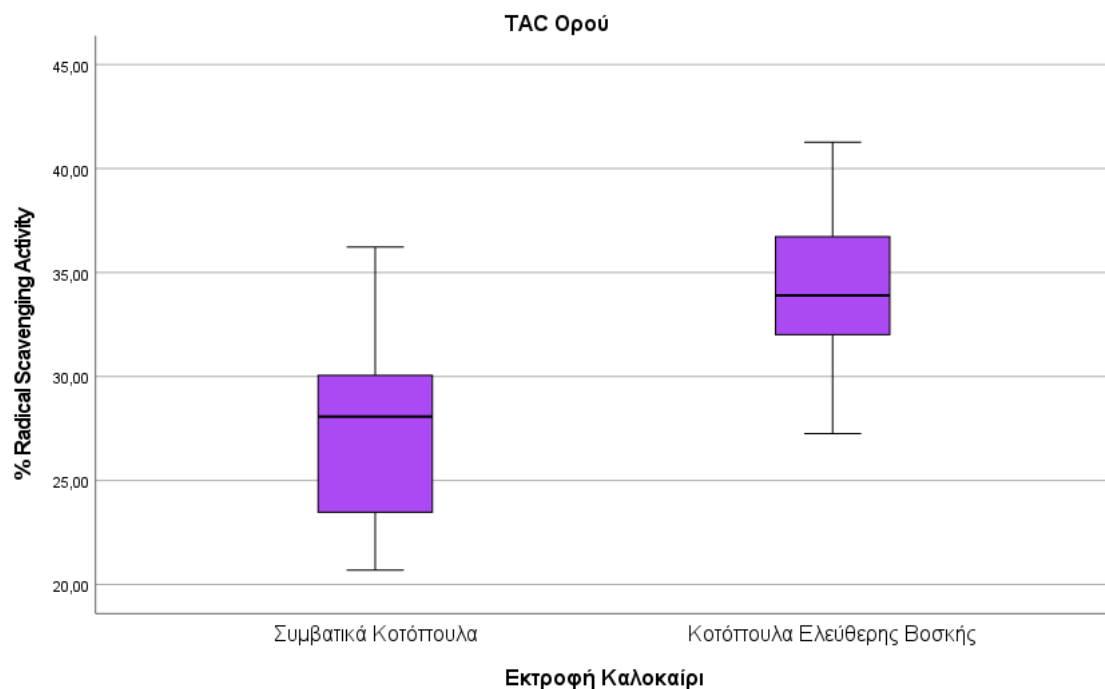
Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή της Άνοιξης σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των EB, αλλά και στις ομάδες EB και EBA δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Εκτροφή Καλοκαίρι

Πλάσμα TAC

Πίνακας 25: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και ΕΒ κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	27,85	1,43	28,08	5,55	0,005
	ΕΒ	33,50	1,19	33,90	4,59	



Διάγραμμα 5: Σύγκριση TAC σε δείγματα πλάσματος αίματος των δύο εκτροφών για την εποχή του Καλοκαιριού.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, για την εκτροφή του Καλοκαιριού σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και ΕΒ, παρατηρείται διαφορά, στατιστικά σημαντική ($p=0,005$).

Εκτροφή Καλοκαίρι

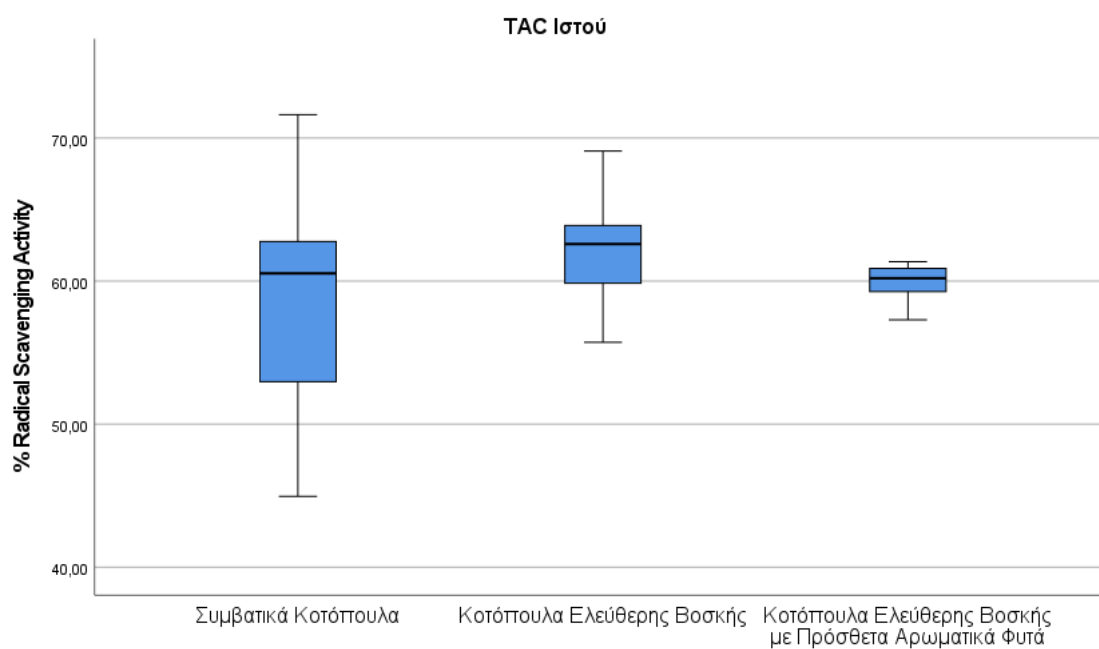
Ιστός TAC

Πίνακας 26: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	58,33	1,61	60,54	7,18	0,030
	EB	62,62	0,92	62,6	4,12	

Πίνακας 27: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	62,62	0,92	62,6	4,12	>0,05
	EBA	60,19	0,50	60,21	2,25	



Εκτροφή Καλοκαίρι

Διάγραμμα 6: Σύγκριση TAC σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Καλοκαιριού.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Καλοκαιριού, σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, παρατηρείται διαφορά, στατιστικά σημαντική ($p=0,030$). Αντίθετα, για τις ομάδες EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Εκτροφή Φθινόπωρο

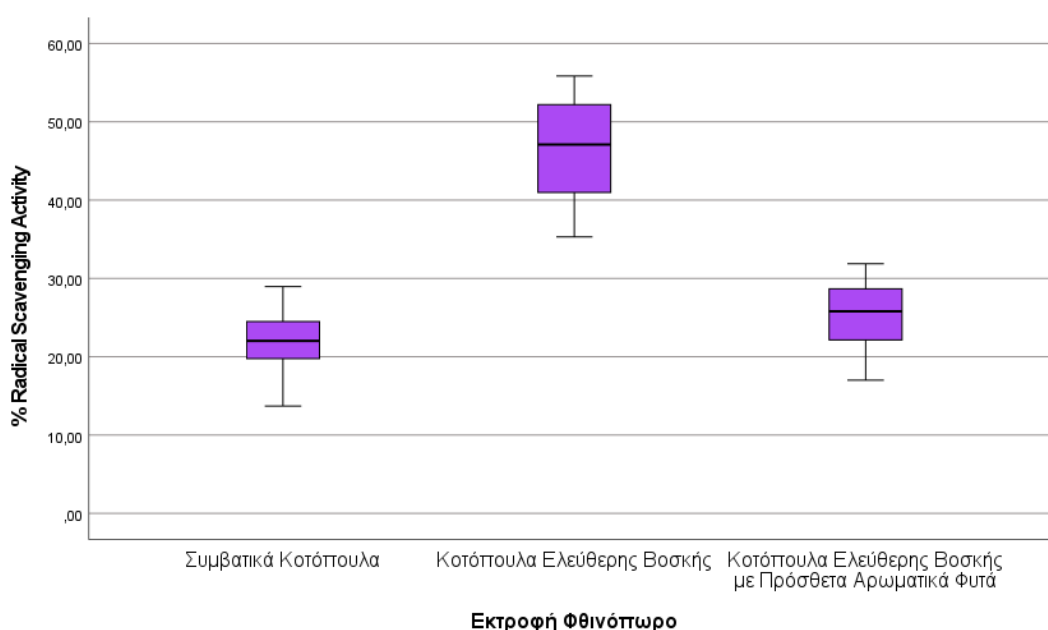
Πλάσμα TAC

Πίνακας 28: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	21,21	1,34	22,04	5,36	<0,001
	EB	46,37	1,67	47,11	6,24	

Πίνακας 29: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	46,37	1,67	47,11	6,24	<0,001
	EBA	25,17	1,11	25,81	4,45	



Διάγραμμα 7: Σύγκριση TAC σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Φθινοπώρου σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), όπως το ίδιο παρατηρείται και συγκρίνοντας τις ομάδες EB και EBA ($p < 0,001$).

Εκτροφή Φθινόπωρο

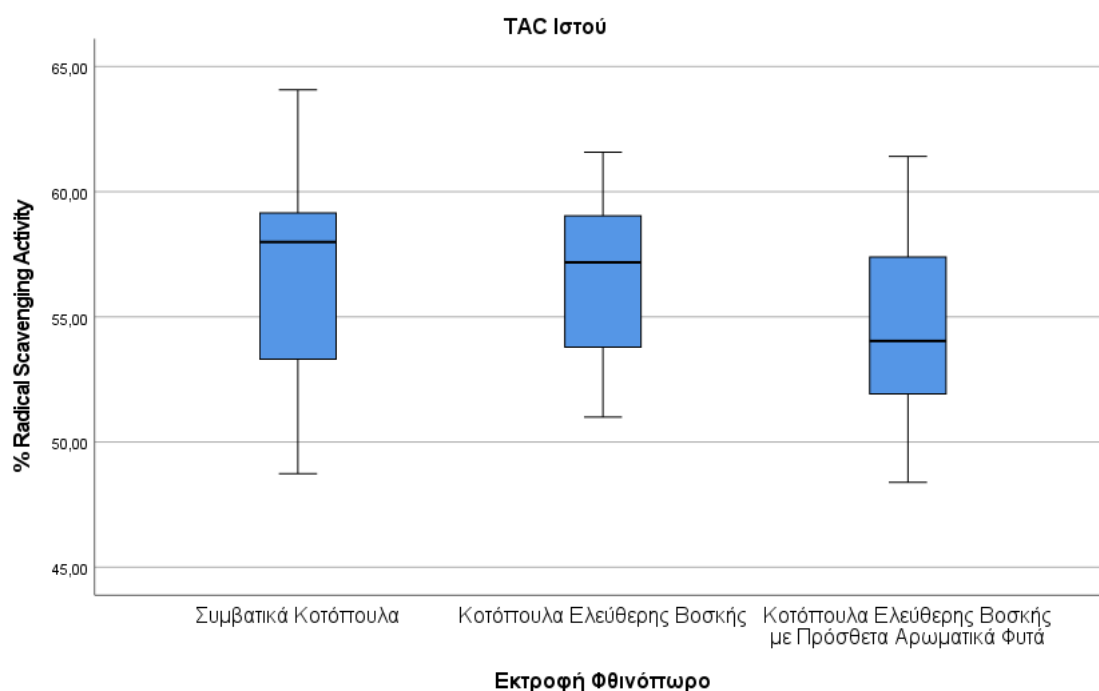
Ιστός TAC

Πίνακας 30: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	56,59	0,94	57,99	4,21	>0,05
	EB	56,67	0,71	57,18	3,17	

Πίνακας 31: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	56,67	0,71	57,18	3,17	>0,05
	EBA	54,69	0,82	54,04	3,68	



Διάγραμμα 8: Σύγκριση TAC σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Φθινοπώρου, σε δείγματα ιστού, τόσο ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, όσο και στις ομάδες EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Σύνολο Εκτροφών

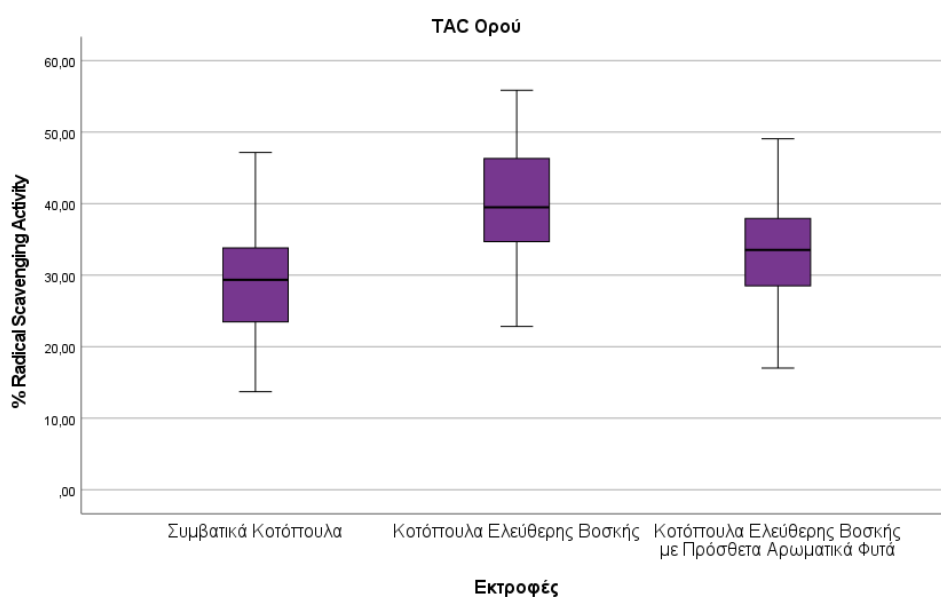
Πλάσμα TAC

Πίνακας 32: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	29,03	0,98	29,37	7,60	<0,001
	EB	40,14	1,03	39,49	7,91	

Πίνακας 33: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	40,14	1,03	39,49	7,91	<0,001
	EBA	33,12	1,16	33,54	7,71	



Διάγραμμα 9: Σύγκριση TAC σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για το σύνολο των εποχών.

Συνολικά για τις όλες τις εκτροφές, σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα και στις δύο ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, αλλά και των EB και EBA, παρατηρείται διαφορά, στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$). Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει την διαφορά στην Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα του πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις εκτροφές και συγκεκριμένα παρουσιάζεται αυξημένη στην ομάδα των EB, σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες Κοτόπουλων.

Σύνολο Εκτροφών

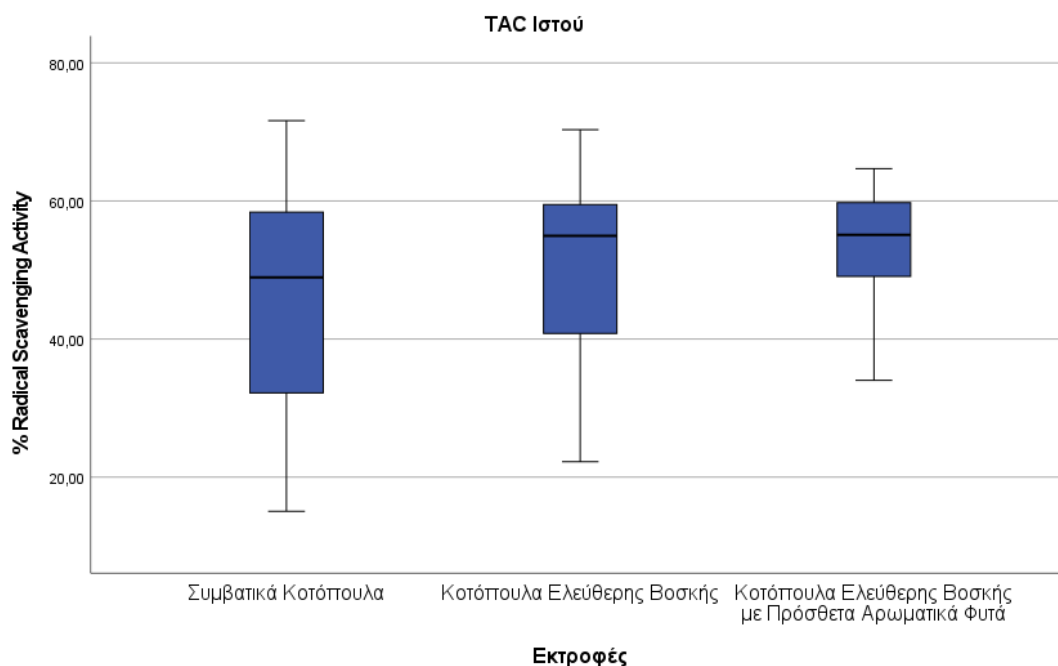
Ιστός TAC

Πίνακας 34: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	45,73	1,66	48,95	14,87	>0,05
	EB	50,49	1,41	54,95	12,49	

Πίνακας 35: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων.

TAC		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	50,49	1,41	54,95	12,49	>0,05
	EBA	51,43	1,31	55,09	11,28	



Διάγραμμα 10: Σύγκριση TAC σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για το σύνολο των εποχών.

Συνολικά για τις όλες τις εκτροφές, σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων σε δείγματα ιστού, ανάμεσα και στις δύο ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, αλλά και των EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Συνεπώς, δεν εμφανίζεται σε κάποια ομάδα, στα δείγματα ιστού, καλύτερη Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα.

Συγκεντρωτικά, για τις μετρήσεις της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας στα δείγματα πλάσματος αίματος, παρατηρήθηκε αυξημένη μέση τιμή στα Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής, ενώ σχετικά χαμηλότερη στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των Κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής με Πρόσθετα Αρωματικά Φυτά. Αυτό υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο σύστημα εκτροφής μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος [89], [90]. Επιπλέον, φανερώνεται και η καλύτερη ικανότητα των κοτόπουλων αυτής της ομάδας να μεταβολίζουν ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με τα άλλα δύο συστήματα εκτροφών. Αντίθετα, σύμφωνα με τα δεδομένα που λήφθηκαν από την ίδια μέτρηση σε δείγματα ιστού, παρουσιάστηκε ελαφρώς αυξημένη η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα ΕΒ συγκριτικά με τα συμβατικά, και αντίστοιχα αυξημένη στα ΕΒΑ, σε σχέση με τα ΕΒ. Η διαφορά αυτή στην πρώτη περίπτωση πιθανώς οφείλεται στον διαφορετικό γονότυπο των κοτόπουλων, όπως και στο διαφορετικό σύστημα εκτροφής (αυξημένη κινητικότητα κοτόπουλων ΕΒ). Στην δεύτερη περίπτωση πιθανώς να ευθύνεται η προσθήκη αρωματικών φυτών στη διατροφή των κοτόπουλων, γεγονός που αποδίδεται στην αυξημένη περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων που είναι ικανές να μειώσουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό. Παρ' όλα αυτά, δεν φάνηκε να υπερισχύει κάποιο από τα τρία συστήματα εκτροφής, αφού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσά τους.

4.2. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ TBARS

Μετά την επεξεργασία των τιμών των δειγμάτων, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των τριών ομάδων διαφορετικής εκτροφής (Συμβατικά Κοτόπουλα, Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής -ΕΒ- και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής με Πρόσθετα Αρωματικά Φυτά -ΕΒΑ-), σε δύο διαφορετικές ομάδες δειγμάτων (μυϊκό ιστό και πλάσμα αίματος), για το προσδιορισμό των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ TBARS. Τα στοιχεία που λήφθηκαν ήταν τα εξής:

Εκτροφή Χειμώνα

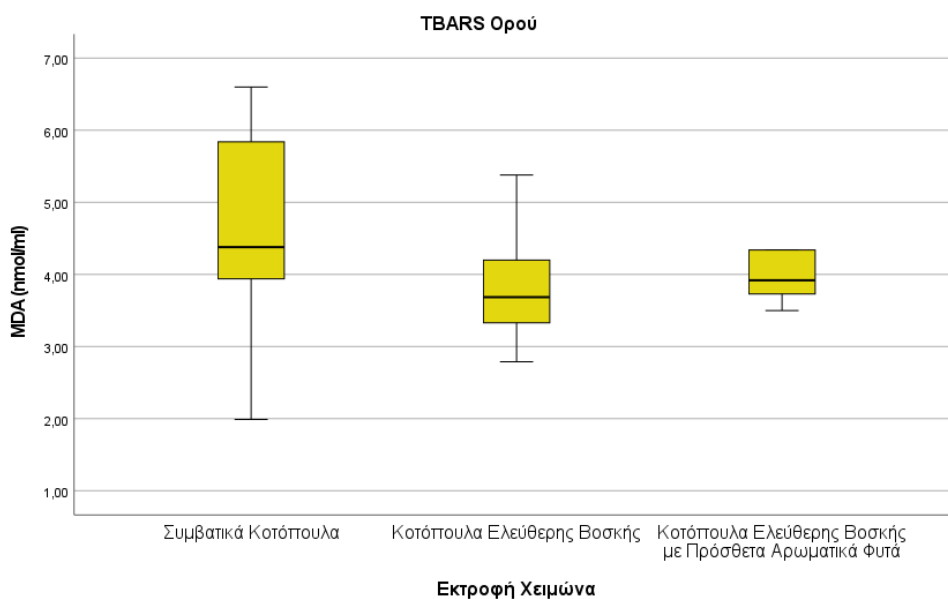
Πλάσμα TBARS

Πίνακας 36: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	4,62	0,37	4,38	1,45	>0,05
	EB	3,84	0,19	3,69	0,71	

Πίνακας 37: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	3,84	0,19	3,69	0,71	>0,05
	EBA	4,35	0,26	3,92	0,92	



Διάγραμμα 11: Σύγκριση TBARS σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Χειμώνα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Χειμώνα, σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των Κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής (EB), δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Το ίδιο παρατηρείται και για τις ομάδες των EB και EBA, όπου επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Εκτροφή Χειμώνα

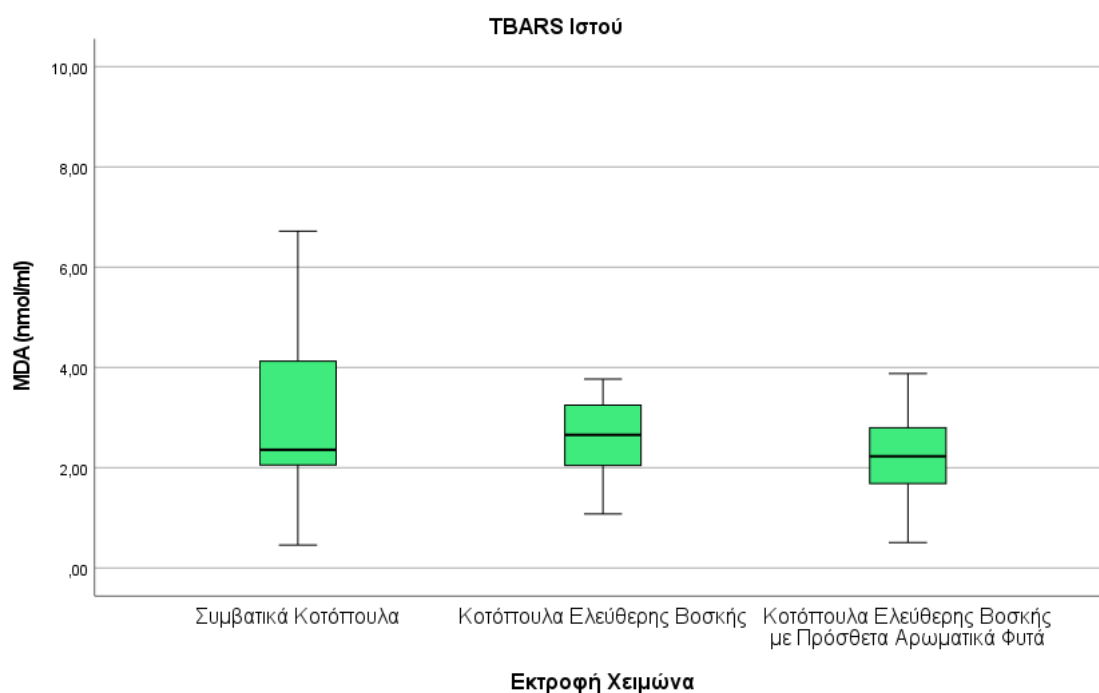
Ιστός TBARS

Πίνακας 38: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	3,31	0,47	2,36	2,09	>0,05
	EB	2,57	0,18	2,66	0,80	

Πίνακας 39: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	2,57	0,18	2,66	0,80	>0,05
	EBA	2,24	1,89	2,23	0,82	



Διάγραμμα 12: Σύγκριση TBARS σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Χειμώνα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Χειμώνα, σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των EB, όπως επίσης και ανάμεσα στις ομάδες των EB και EBA δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Εκτροφή Άνοιξη

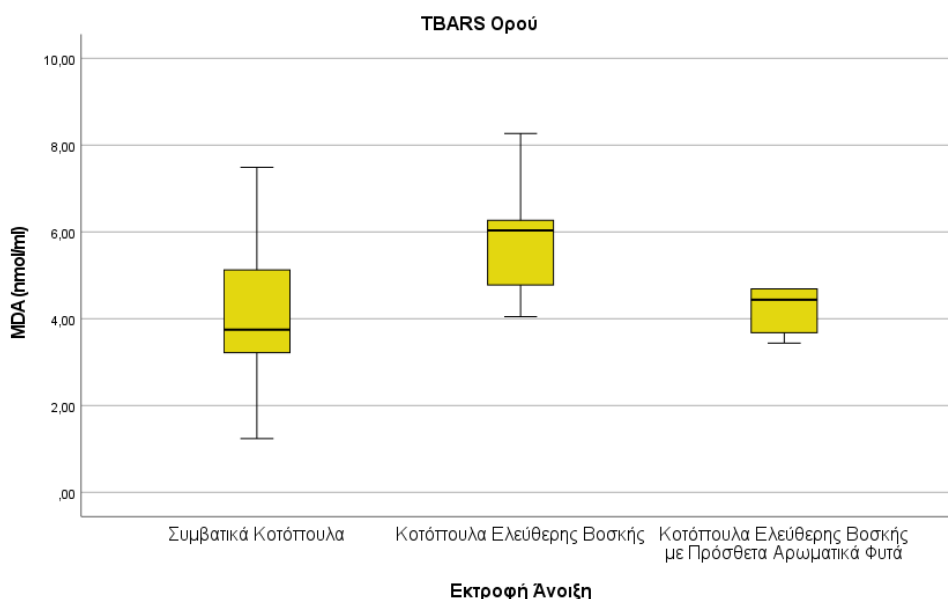
Πλάσμα TBARS

Πίνακας 40: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	4,09	0,44	3,75	1,70	0,007
	EB	5,95	0,36	6,06	1,34	

Πίνακας 41: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	5,95	0,36	6,06	1,34	0,046
	EBA	4,50	0,37	4,44	1,40	



Διάγραμμα 13: Σύγκριση TBARS σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή της Άνοιξης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή της Άνοιξης σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, παρατηρείται διαφορά ($p=0,007$) στατιστικά σημαντική. Το ίδιο παρατηρείται και συγκρίνοντας τις ομάδες EB και EBA, όπου επίσης υπάρχει διαφορά, στατιστικά σημαντική ($p=0,046$).

Εκτροφή Άνοιξη

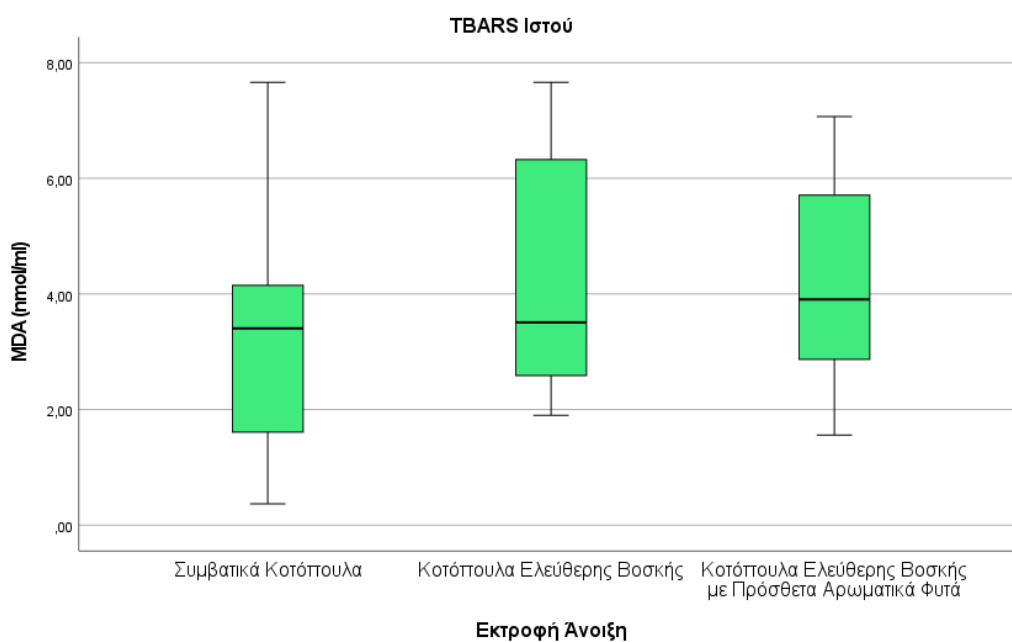
Ιστός TBARS

Πίνακας 42: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	3,14	0,39	3,41	1,73	>0,05
	EB	4,15	0,46	3,51	1,99	

Πίνακας 43: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	4,15	0,46	3,51	1,99	>0,05
	EBA	4,16	0,38	3,91	1,69	



Διάγραμμα 14: Σύγκριση TBARS σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή της Άνοιξης.

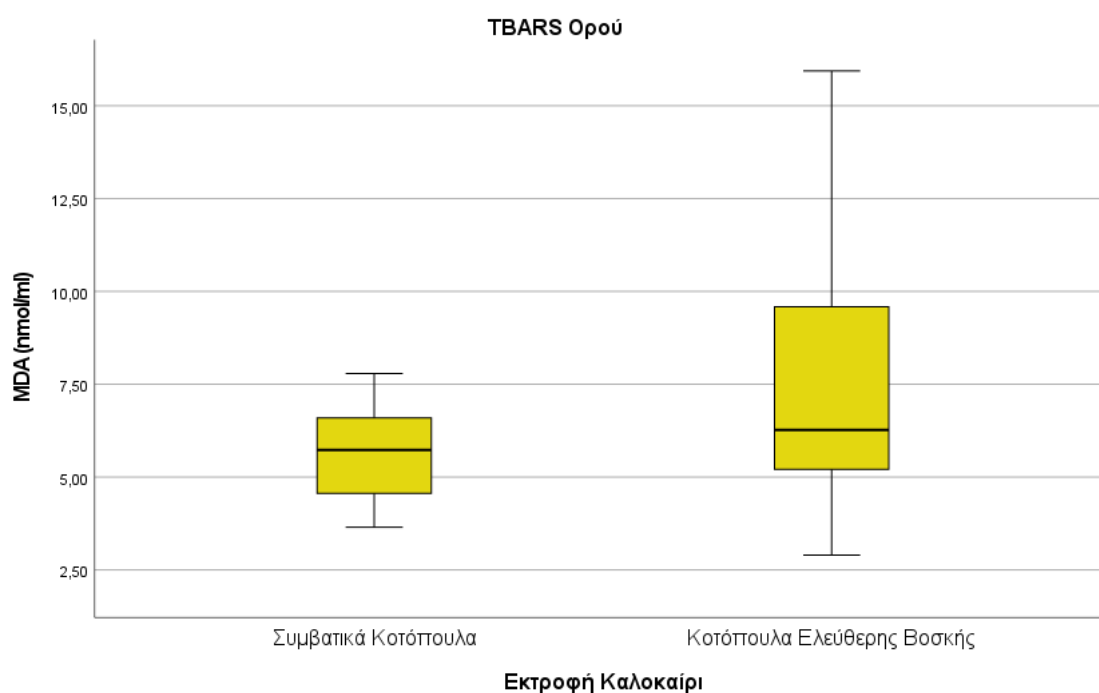
Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή της Άνοιξης σε δείγματα ιστού, ανάμεσα και στις δύο ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και των EB, αλλά και στις ομάδες EB και EBA δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Εκτροφή Καλοκαίρι

Πλάσμα TBARS

Πίνακας 44: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και ΕΒ κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	6,06	0,58	5,73	2,24	>0,05
	ΕΒ	7,20	0,91	6,27	3,40	



Διάγραμμα 15: Σύγκριση TBARS σε δείγματα πλάσματος αίματος των δύο εκτροφών για την εποχή του Καλοκαιριού.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, για την εκτροφή του Καλοκαιριού σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και ΕΒ, παρατηρείται διαφορά, στατιστικά μη σημαντική ($p > 0,05$).

Εκτροφή Καλοκαίρι

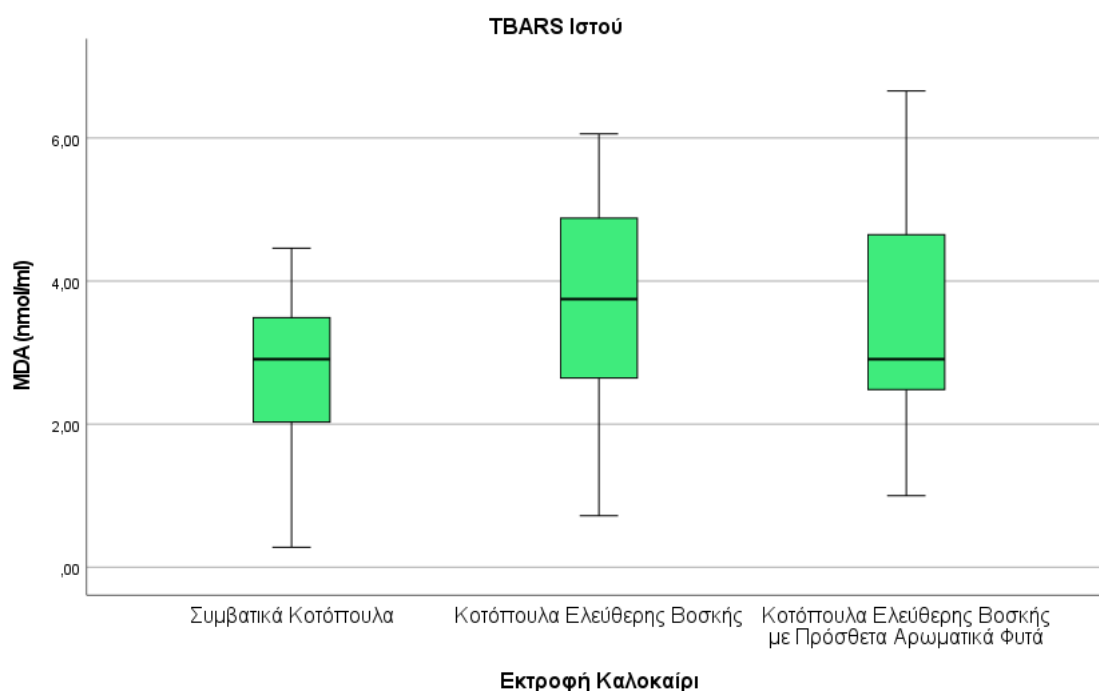
Ιστός TBARS

Πίνακας 45: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	2,71	0,27	2,91	1,13	>0,05
	EB	3,63	0,36	3,75	1,57	

Πίνακας 46: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	3,63	0,36	3,75	1,57	>0,05
	EBA	3,50	0,36	2,91	1,57	



Διάγραμμα 16: Σύγκριση TBARS σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Καλοκαιριού.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Καλοκαιριού, σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, παρατηρείται στατιστικά μη σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Ομοίως, για τις ομάδες EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Εκτροφή Φθινόπωρο

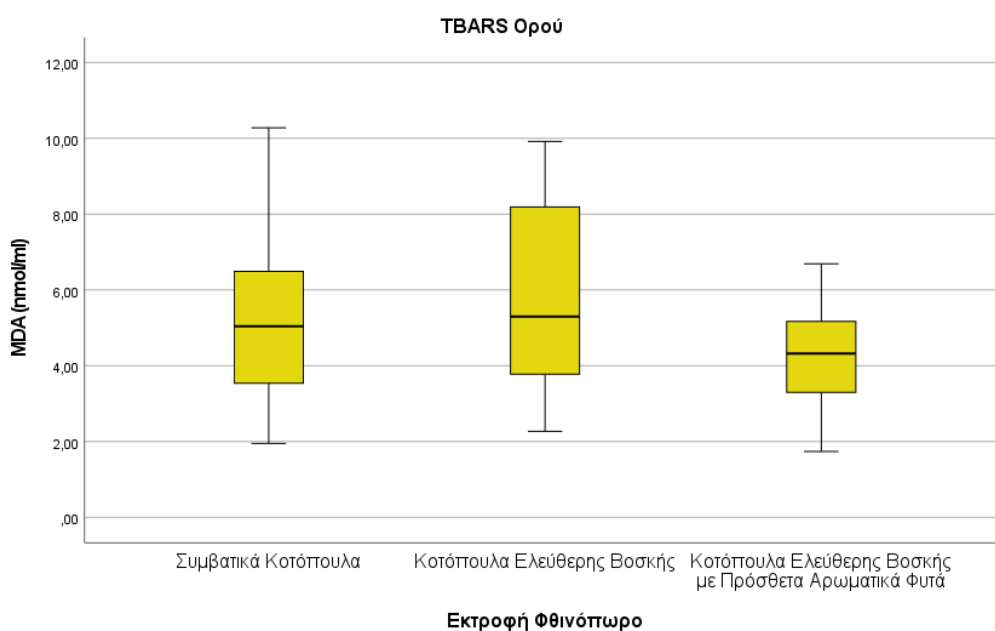
Πλάσμα TBARS

Πίνακας 47: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	5,20	0,53	5,04	2,14	>0,05
	EB	5,74	0,85	5,30	2,68	

Πίνακας 48: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	5,74	0,85	5,30	2,68	>0,05
	EBA	4,15	0,36	4,33	1,36	



Διάγραμμα 17: Σύγκριση TBARS σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Φθινοπώρου σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$), όπως το ίδιο παρατηρείται και συγκρίνοντας τις ομάδες EB και EBA ($p>0,05$).

Εκτροφή Φθινόπωρο

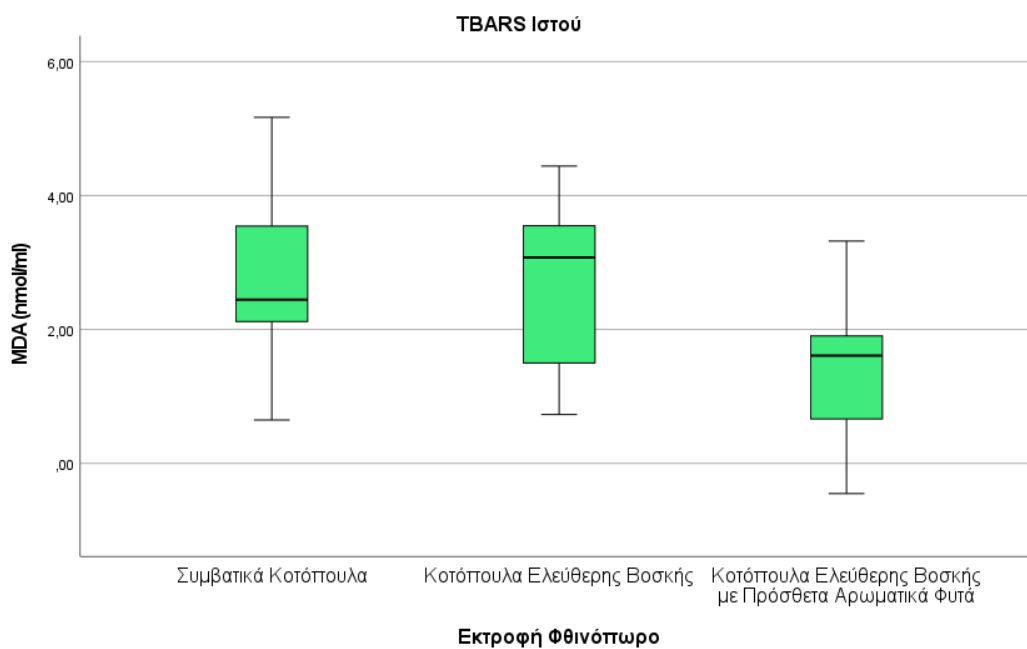
Ιστός TBARS

Πίνακας 49: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	2,77	0,28	2,45	1,26	>0,05
	EB	2,64	0,27	3,08	1,18	

Πίνακας 50: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	2,64	0,27	3,08	1,18	0,002
	EBA	1,43	0,23	1,61	1,05	



Διάγραμμα 18: Σύγκριση TBARS σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για την εποχή του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Φθινοπώρου, σε δείγματα ιστού, ανάμεσα στις ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ, για τις ομάδες EB και EBA, παρατηρείται διαφορά, σημαντική στατιστικά ($p=0,002$).

Σύνολο Εκτροφών

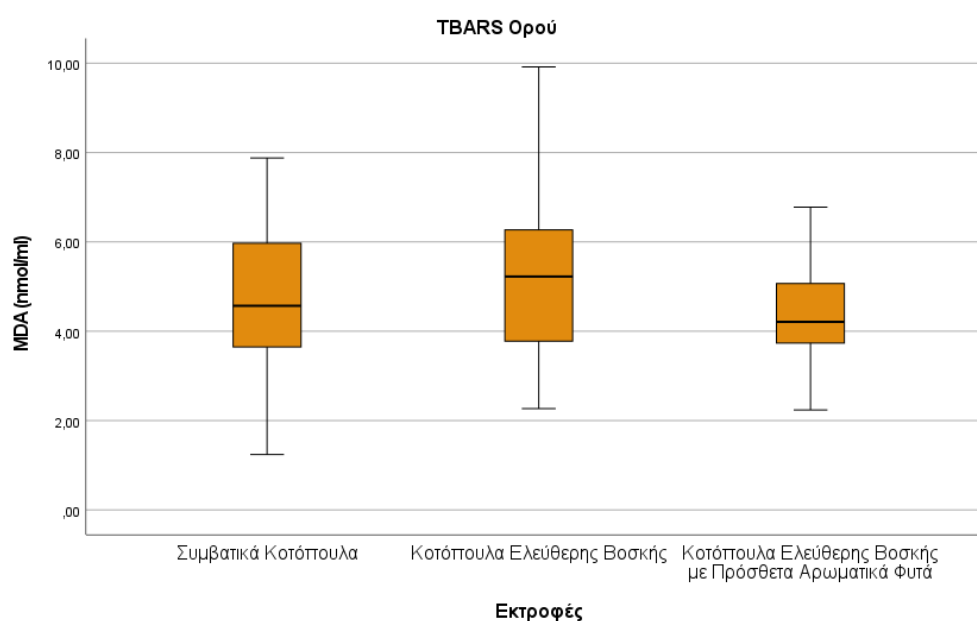
Πλάσμα TBARS

Πίνακας 51: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	4,71	0,21	4,57	1,57	>0,05
	EB	5,38	0,28	5,23	1,98	

Πίνακας 52: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των TBARS σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	5,38	0,28	5,23	1,98	>0,05
	EBA	4,47	0,18	4,21	1,10	



Διάγραμμα 19: Σύγκριση TBARS σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για το σύνολο των εποχών.

Συνολικά για τις όλες τις εκτροφές, σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα και στις δύο ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, αλλά και των EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Αυτό το αποτέλεσμα, μπορεί να ερμηνευτεί ως ότι δεν διαφοροποιείται η τιμή των TBARS ανάλογα με το διαφορετικό σύστημα εκτροφής κοτόπουλων.

Σύνολο Εκτροφών

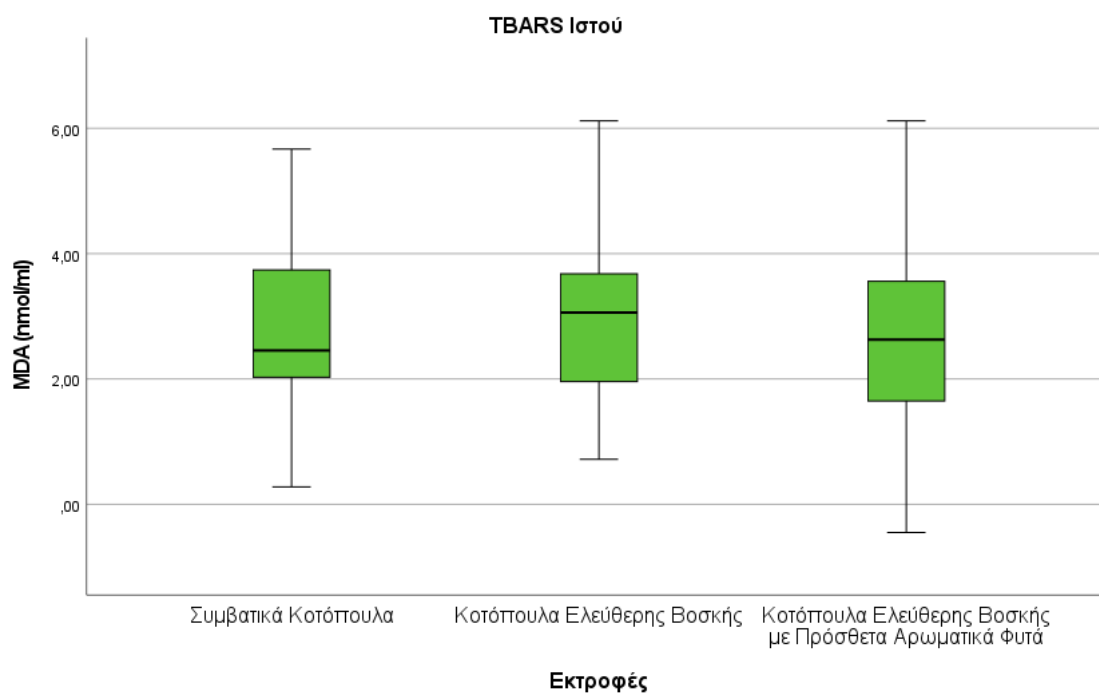
Ιστός TBARS

Πίνακας 53: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό Συμβατικών και EB κοτόπουλων.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	2,75	0,14	2,46	1,23	>0,05
	EB	2,98	0,15	3,06	1,26	

Πίνακας 54: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της TAC σε μυϊκό ιστό EB και EBA κοτόπουλων.

TBARS		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	2,98	0,15	3,06	1,26	>0,05
	EBA	2,76	0,18	2,63	1,56	



Διάγραμμα 20: Σύγκριση TBARS σε δείγματα ιστού των τριών εκτροφών για το σύνολο των εποχών.

Συνολικά για τις όλες τις εκτροφές, σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων σε δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα και στις δύο ομάδες των Συμβατικών Κοτόπουλων και EB, αλλά και των EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Ομοίως με τα δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων, και στον ιστό παρατηρείται σταθερότητα των TBARS.

Συνολικά, μειωμένη τιμή TBARS, παρουσίασαν τα δείγματα συμβατικών και EBA, σε σχέση με τα EB, τόσο στα δείγματα πλάσματος, όσο και ιστού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη κινητικότητα των κοτόπουλων της εκτροφής EB και ταυτόχρονα στις λιγότερο ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες [89]. Η εκτροφή EBA πιθανώς υποβοηθάται σε σχέση με την EB, χάρη στα πρόσθετα αρωματικά φυτά που μπορεί να ευθύνονται για την μειωμένη τιμή TBARS. Πράγματι, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που περιέχονται στα αρωματικά φυτά θα μπορούσαν να καταστείλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων λόγω των ιδιοτήτων δέσμευσης των ROS. Επιπλέον, η συμπλήρωση της διατροφής των κοτόπουλων με πρόσθετα, έδειξε μείωση των επιπέδων TBARS στον ιστό. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει και την συνεργιστική δράση της α-τοκοφερόλης για την σταθεροποίηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων [90]. Ομοίως, η συμπερίληψη πρόσθετων αρωματικών φυτών στη διατροφή των κοτόπουλων της εκτροφής EBA, παρουσίασε μείωση των επιπέδων TBARS στο πλάσμα αίματος [90]. Παρ' όλα αυτά, η διαφορά η οποία παρουσιάζεται δεν είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι, η μέτρηση των TBARS, δηλαδή ο προσδιορισμός του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων, σε δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων στις τρεις διαφορετικές ομάδες εκτροφών δεν υπέδειξε κάποια ως σημαντικά καλύτερη, αφού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (μείωση επιπέδων TBARS) ανάμεσα σε κάποια από αυτές. Το ίδιο ισχύει και για την μέτρηση σε δείγματα μυϊκού ιστού κοτόπουλων των τριών εκτροφών. Συνεπώς συμπεραίνεται ότι η τιμή των TBARS δεν επηρεάζεται αξιοσημείωτα από το διαφορετικό σύστημα εκτροφής κοτόπουλων.

4.3. Προσδιορισμός α-τοκοφερόλης

Μετά την επεξεργασία των τιμών των δειγμάτων, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των τριών ομάδων διαφορετικής εκτροφής (Συμβατικά Κοτόπουλα, Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής -EB- και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής με Πρόσθετα Αρωματικά Φυτά -EBA-), σε δείγματα πλάσματος αίματος, για τον προσδιορισμό της Βιταμίνης E. Τα στοιχεία που λήφθηκαν ήταν τα εξής:

Εκτροφή Χειμώνα

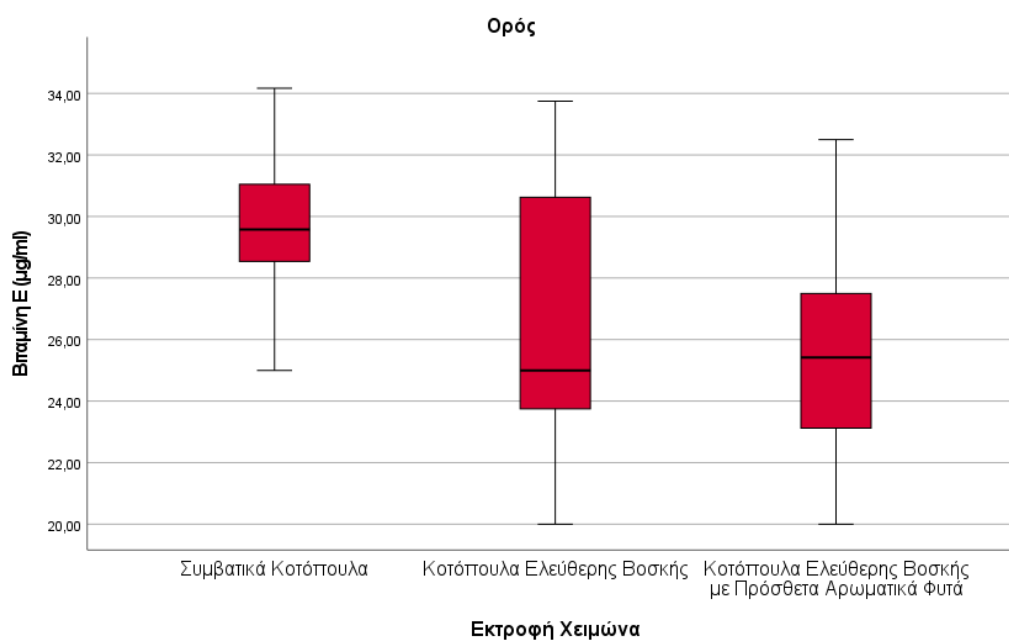
Πλάσμα α-τοκοφερόλη

Πίνακας 55: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και ΕΒ κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	29,58	0,70	29,58	2,72	>0,05
	ΕΒ	26,92	1,15	25,00	4,47	

Πίνακας 56: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος ΕΒ και ΕΒΑ κοτόπουλων για την εποχή του Χειμώνα.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	ΕΒ	26,92	1,15	25,00	4,47	>0,05
	ΕΒΑ	25,58	0,89	25,42	3,43	



Διάγραμμα 21: Σύγκριση α-τοκοφερόλης σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Χειμώνα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Χειμώνα, στα δείγματα πλάσματος αίματος, και οι δύο ομάδες σύγκρισης, Συμβατικά Κοτόπουλα και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής (ΕΒ), αλλά και μεταξύ των ΕΒ και ΕΒΑ, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Εκτροφή Άνοιξη

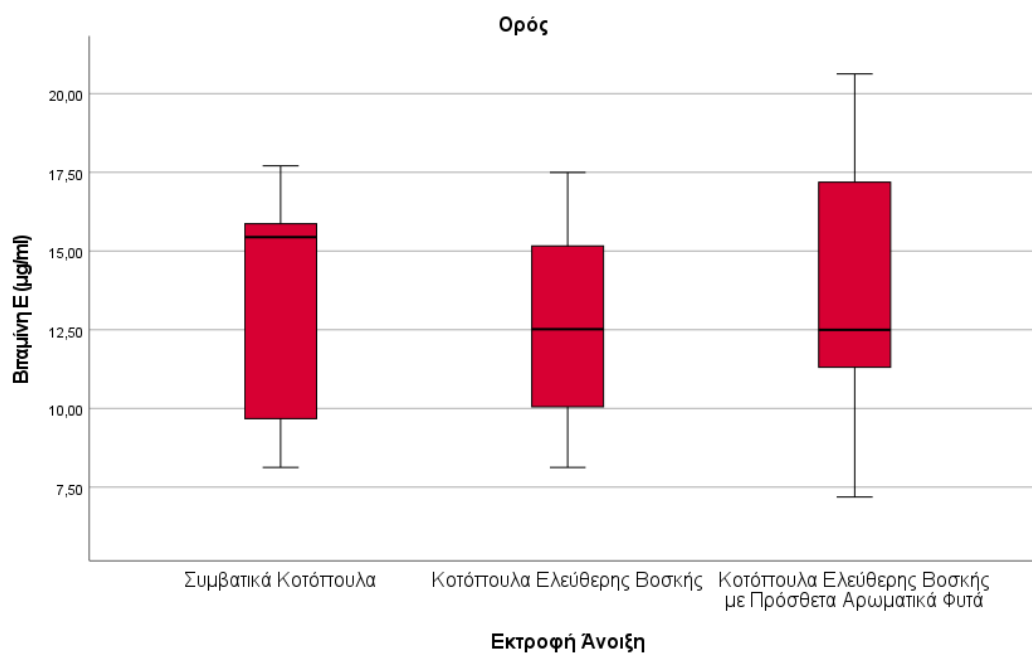
Πλάσμα α-τοκοφερόλη

Πίνακας 57: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	13,95	0,89	15,45	3,34	>0,05
	EB	12,63	0,78	12,52	3,01	

Πίνακας 58: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή της Άνοιξης.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	12,63	0,78	12,52	3,01	>0,05
	EBA	13,81	1,00	12,50	3,88	



Διάγραμμα 22: Σύγκριση α-τοκοφερόλης σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή της Άνοιξης.

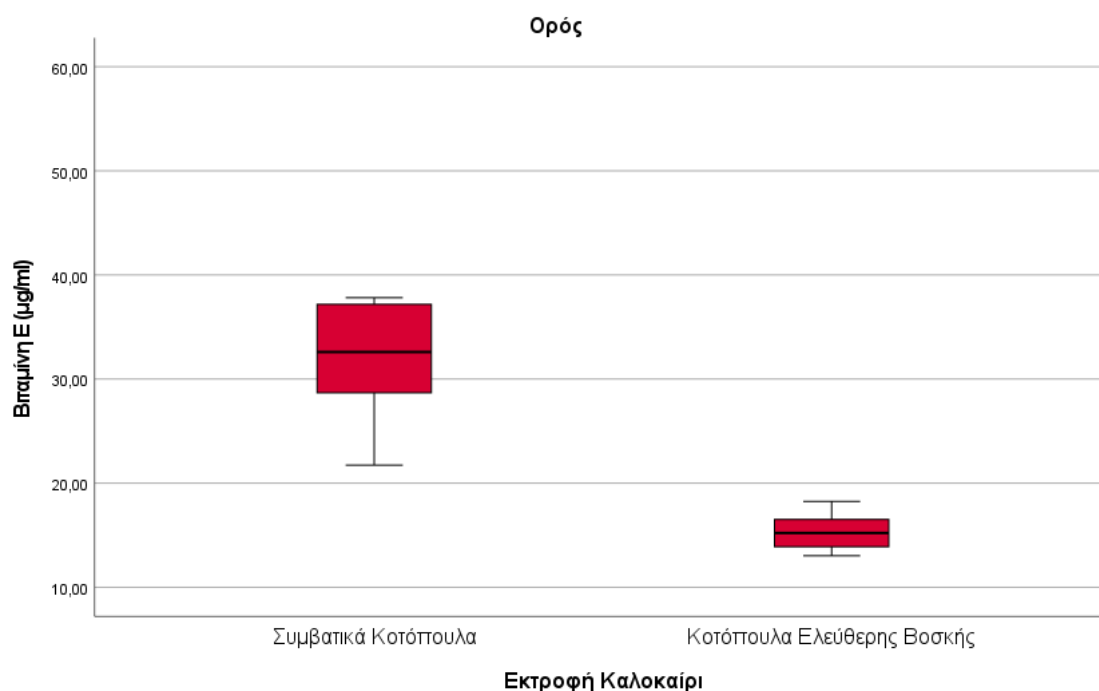
Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή της Άνοιξης, στα δείγματα πλάσματος αίματος, και οι δύο ομάδες σύγκρισης, Συμβατικά Κοτόπουλα και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής (EB), αλλά και μεταξύ των EB και EBA, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Εκτροφή Καλοκαίρι

Πλάσμα α-τοκοφερόλη

Πίνακας 59: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και ΕΒ κοτόπουλων για την εποχή του Καλοκαιριού.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	33,70	3,11	32,61	8,78	<0,001
	ΕΒ	15,36	0,56	15,22	1,67	



Διάγραμμα 23: Σύγκριση α-τοκοφερόλης σε δείγματα πλάσματος αίματος των δύο εκτροφών για την εποχή του Καλοκαιριού.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Καλοκαιριού, στα δείγματα πλάσματος αίματος, των Συμβατικών Κοτόπουλων και των ΕΒ, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$).

Εκτροφή Φθινόπωρο

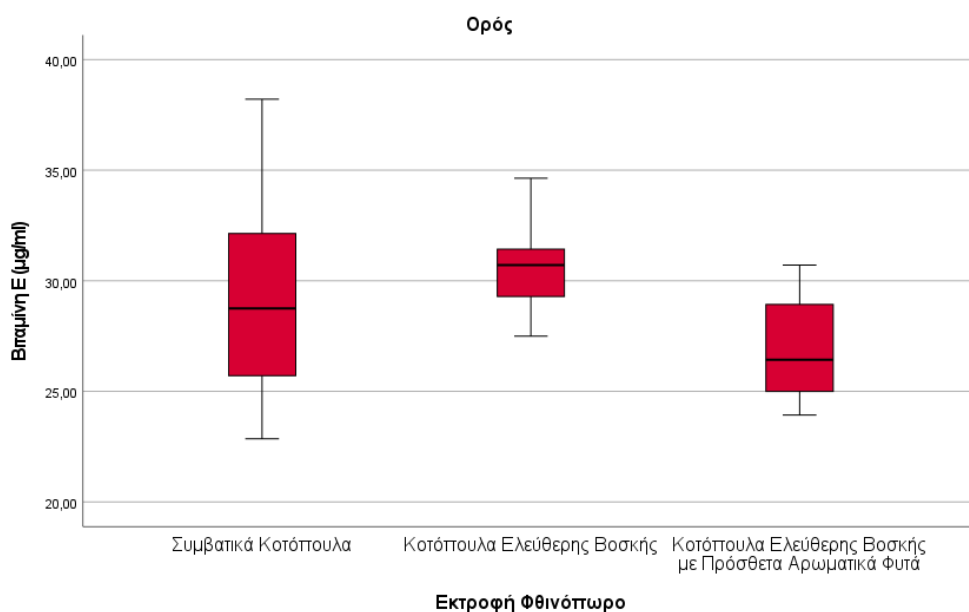
Πλάσμα α-τοκοφερόλη

Πίνακας 60: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	29,17	1,07	28,75	4,28	>0,05
	EB	30,51	0,72	30,71	2,69	

Πίνακας 61: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων για την εποχή του Φθινοπώρου.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	30,51	0,72	30,71	2,69	<0,001
	EBA	27,12	0,62	26,43	2,39	



Διάγραμμα 24: Σύγκριση α-τοκοφερόλης σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για την εποχή του Φθινοπώρου.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, για την εκτροφή του Φθινοπώρου, στα δείγματα πλάσματος αίματος, ανάμεσα στα Συμβατικά Κοτόπουλα και Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής (EB), δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Αντίθετα, μεταξύ των ομάδων EB και EBA παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,001$).

Σύνολο Εκτροφών

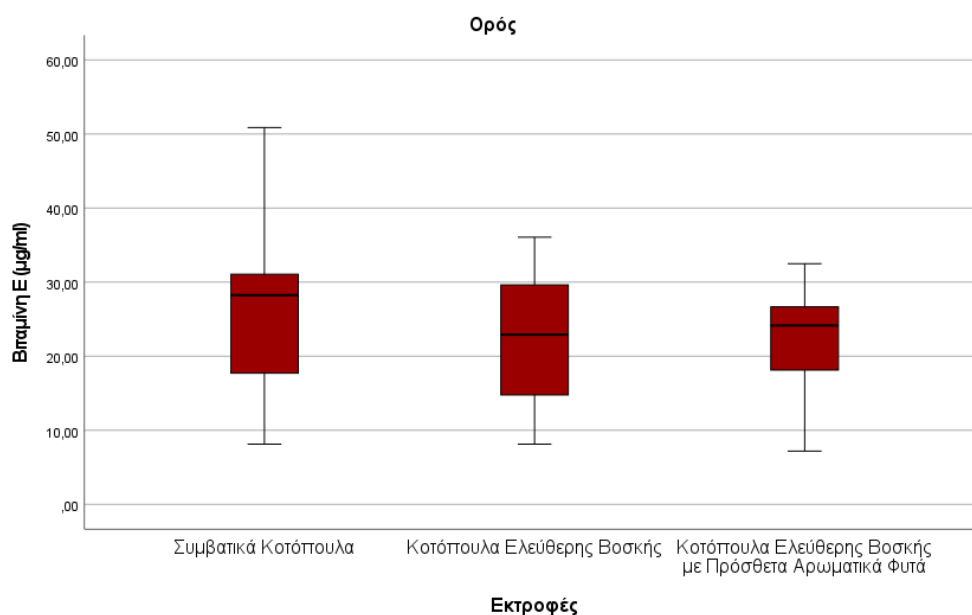
Πλάσμα α-τοκοφερόλη

Πίνακας 62: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος Συμβατικών και EB κοτόπουλων.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	Συμβατικά	25,95	1,19	28,26	8,69	>0,05
	EB	21,86	1,14	22,92	8,33	

Πίνακας 63: Στατιστική ανάλυση και σύγκριση της α-τοκοφερόλης σε πλάσμα αίματος EB και EBA κοτόπουλων.

α-τοκοφερόλη		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)	P value
	EB	21,86	1,14	22,92	8,33	>0,05
	EBA	22,17	1,02	24,15	6,82	



Διάγραμμα 25: Σύγκριση α-τοκοφερόλης σε δείγματα πλάσματος αίματος των τριών εκτροφών για το σύνολο των εποχών.

Ως προς το σύνολο των εκτροφών όλων των εποχών, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$), σε καμία από τις δύο ομάδες σύγκρισης, Συμβατικών Κοτόπουλων με EB, και EB με EBA, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή της ποσότητας της α-τοκοφερόλης στον οργανισμό των κοτόπουλων, ανεξαρτήτου εποχής, διατροφής και γενικής εκτροφής.

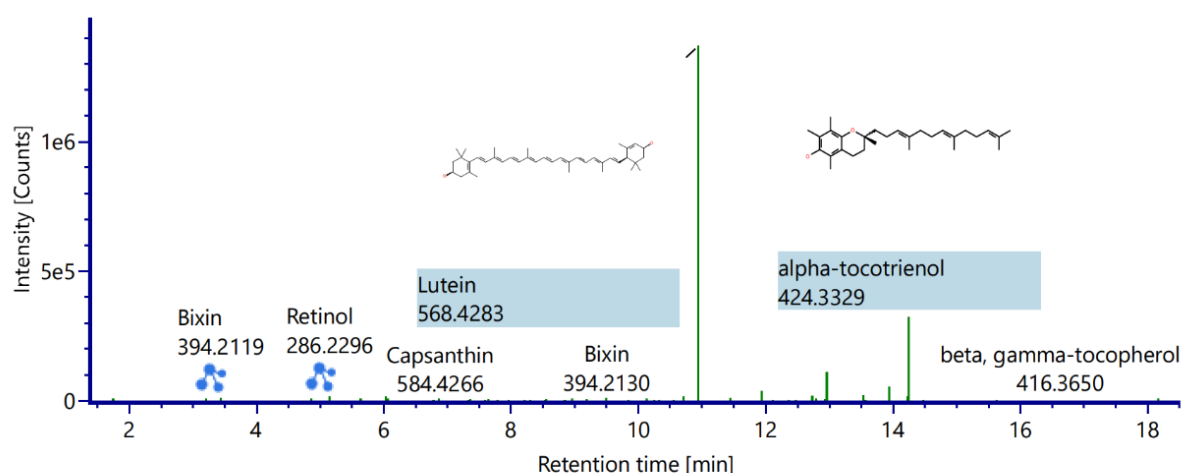
Ο προσδιορισμός της α-τοκοφερόλης (Βιταμίνη Ε) σε δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων έδειξε ότι υπήρξε μείωση της βιταμίνης Ε στην εκτροφή ΕΒ, συγκριτικά με τις άλλες δύο εκτροφές. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω του μεταβολισμού της α-τοκοφερόλης, χάρη στην αυξημένη κινητικότητα των ομάδων ΕΒ και ΕΒΑ, σε σχέση με την συμβατική εκτροφή. Επιπλέον, η προσθήκη αρωματικών φυτών στη διατροφή των κοτόπουλων έδειξε μία αύξηση της α-τοκοφερόλης στα δείγματα της εκτροφής ΕΒΑ σε σχέση με την ΕΒ. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι η εκτροφή κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά, σε σχέση με τα Ελεύθερης Βοσκής, έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ένωση με αντιοξειδωτική δράση [91]. Παρ' όλα αυτά, η διαφορά που παρουσιάζεται στην τιμή της βιταμίνης Ε είναι αρκετά μικρή, αφού δεν έδειξε να διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό ανάμεσα στα τρία διαφορετικά συστήματα εκτροφών. Συνεπώς, δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά η Βιταμίνη Ε από το εκάστοτε σύστημα εκτροφής.

4.4. Ανάλυση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-Q-TOF-MS)

Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν για κάθε ένα από τα τρία δείγματα (Συμβατικής εκτροφής -S1-, τροφής Ελεύθερης βοσκής -EB1- και εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα αρωματικά φυτά -EBA1-, Εικόνες 41,42,43 αντίστοιχα).

Συμβατική Εκτροφή (Συμβατικά)

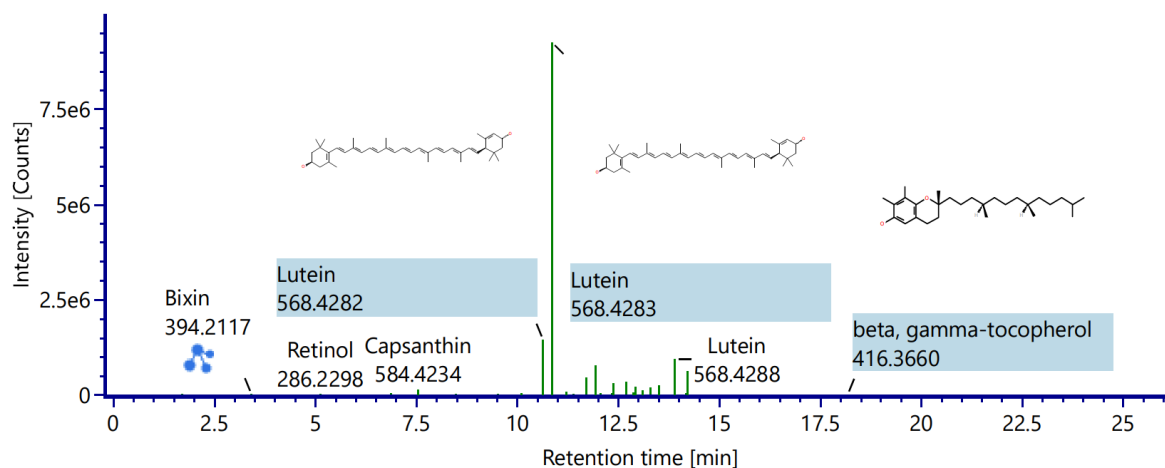
Item name: S1 - high temp 550



Εικόνα 41: Χρωματογράφημα του δείγματος Συμβατικής εκτροφής.

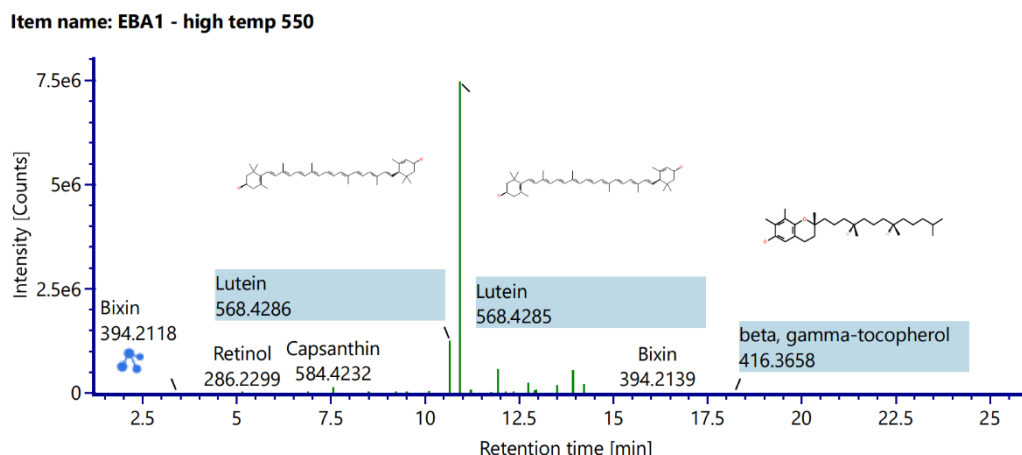
Εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής (EB)

Item name: EB1 - high temp 550



Εικόνα 42: Χρωματογράφημα του δείγματος εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής.

Εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με προσθήκη Αρωματικών Φυτών (EBA)



Εικόνα 43: Χρωματογράφημα του δείγματος εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά.

Σύμφωνα με την ανάλυση (σάρωση) μέσω LC-MS, ανιχνεύτηκαν, σε κάθε ένα από τα δείγματα (Συμβατική Εκτροφή, εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής και εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά), ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των καροτενοειδών και της βιταμίνης Ε. Όπως φαίνεται και στα παραπάνω χρωματογραφήματα (Εικόνα 41, 42, 43), οι ενώσεις που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία αναγράφονται στα γραφήματα πάνω από τις αντίστοιχες κορυφές τους και παρουσιάζονται και οι χημικοί τύποι αυτών. Οι ενώσεις που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία και ταυτοποιήθηκαν μέσω του MS ήταν οι εξής: λουτεΐνη (καροτενοειδές) και α-τοκοτριενόλη (συστατικό της βιταμίνης Ε). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ανιχνεύσιμων ενώσεων στα τρία δείγματα, καθώς και σχετική ποσοτική σύγκριση, βάσει της αφθονίας τους στο συνολικό χρωματογράφημα.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 64) παρουσιάζονται οι ενώσεις που ανιχνεύτηκαν μέσω του LC-Q-TOF-MS στα δείγματα πλάσματος κοτόπουλου των τριών διαφορετικών εκτροφών, καθώς και τα μοριακά βάρη αυτών. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε μέσω μίας βιβλιοθήκης δεδομένων, με ενώσεις της κατηγορίας των καροτενοειδών και της βιταμίνης Ε. Επίσης, στον πίνακα παρουσιάζονται: Α) το συνολικό εμβαδόν των κορυφών της εκάστοτε ένωσης, και Β) το ποσοστό εμβαδού της εκάστοτε ένωσης, διαιρεμένο με το συνολικό εμβαδόν του χρωματογραφήματος.

Πίνακας 64: Ανιχνεύσιμες ενώσεις, συγκριτικά στα τρία δείγματα πλάσματος.

Ονομασία Ένωσης		Μοριακό Βάρος (Da)	Άθροισμα εμβαδού κορυφών ένωσης	Ποσοστό εμβαδού ένωσης / συνολικό εμβαδόν κορυφών	Άθροισμα εμβαδού κορυφών ένωσης	Ποσοστό εμβαδού ένωσης / συνολικό εμβαδόν κορυφών	Άθροισμα εμβαδού κορυφών ένωσης	Ποσοστό εμβαδού ένωσης / συνολικό εμβαδόν κορυφών
			EB		EBA		Συμβατικά	
Λουτεΐνη	-e	568,42803	13.196.515	76,03%	9.863.895	77,45%	1.475.835	63,65%
α-τοκοτριενόλη	-e	424,33413	636.471	3,67%	216.750	1,70%	323.461	13,95%
Ζεαξανθίνη	-e	568,42803	446.078	2,57%	-	-	-	-
β, γ- τοκοτριενόλη	+H	410,31848	230.586	1,33%	82.144	0,64%	111.092	4,79%
Καψανθίνη	-e	584,42295	651.120	3,75%	594.828	4,67%	80.578	3,48%
Ανθεραξανθίνη	+H	584,42295	84.039	0,48%	108.883	0,85%	1.234	0,05%
Κανθαξανθίνη	+H	564,39673	49.578	0,29%	54.150	0,43%	3.054	0,13%
Ρετινόλη	+H	286,22967	59.361	0,34%	55.927	0,44%	53.416	2,30%
δ- τοκοτριενόλη	+H	396,30283	19.778	0,11%	5.877	0,05%	8.928	0,39%
Μπιξίνη	+H	394,21441	88.772	0,51%	60.291	0,47%	80.907	3,49%
Αδονιξανθίνη	+H	582,40730	47.469	0,27%	57.136	0,45%	4.853	0,21%
Φουκοξανθίνη		658,42334	5.336	0,03%	2.091	0,02%	6.682	0,29%
β, γ-τοκοφερόλη	-e	416,36543	3.908	0,02%	3.468	0,03%	8.346	0,36%
δ- τοκοφερόλη	+H	402,34978	4.019	0,02%	-	-	6.653	0,29%
Χοληκαλσιφερόλη	+H	384,33922	21.330	0,12%	1.854	0,01%	8.295	0,36%
Εργοκαλσιφερόλη		396,33922	1.837	0,01%	-	-	-	-
α- τοκοφερόλη	+H	564,39673	1.667	0,01%	5.234	0,04%	10.857	0,47%
Ασταξανθίνη	+H	596,38656	-	-	1.586	0,01%	-	-
Φυτοένιο	-e	544,50080	-	-	1.205	0,01%	-	-
Νεοξανθίνη	+H	600,41786	-	-	-	-	1.815	0,08%
Συνολικό εμβαδόν			17.358.107		12.735.847		2.318.680	

Από τις ενώσεις που ξεχωρίζουν, συγκρίνοντας τα εμβαδά τους σε σχέση με το συνολικό εμβαδόν του χρωματογραφήματος, πρωτίστως παρατηρείται η λουτεΐνη, η οποία παρατηρείται σε ποσοστό 63,65% στη Συμβατική εκτροφή, ενώ στα EB και EBA, παρατηρείται σε ποσοστό 76,03% και 77,45% αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η λουτεΐνη αποτελεί το κύριο συστατικό του καλαμποκιού. Συνεπώς, αυτή η διαφορά πιθανώς οφείλεται στο γεγονός πως η διατροφή των κοτόπουλων EB και EBA περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό καλαμποκιού, από τη διατροφή των Συμβατικών κοτόπουλων. Αυτό το δεδομένο θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αυξημένη απόδοση στα δείγματα. Αντίθετα, η α-τοκοτριενόλη, η οποία περιέχεται σε μεγάλο ποσοστό στο σιτάρι, και σε μικρότερο σε δημητριακά όπως το καλαμπόκι, η βρώμη αλλά και σπόρους όπως το ρύζι, εμφανίζεται στα δείγματα σε ποσοστό 13,95% στη Συμβατική εκτροφή, ενώ στις EB και EBA εμφανίζεται σε ποσοστό 3,67% και 1,70% αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά αναμένεται, καθώς η διατροφή των κοτόπουλων συμβατικής εκτροφής φέρει μεγαλύτερο ποσοστό σε σιτάρι, σε αντίθεση με τις άλλες δύο εκτροφές. Συνεπώς, η διαφορά μεταξύ των συμβατικών κοτόπουλων και των ομάδων EB και EBA, πιθανώς να οφείλεται και πάλι στην διαφορετική διατροφή των ομάδων των κοτόπουλων [92].

Διαφορά, επίσης, παρατηρείται και στις ενώσεις ρετινόλη και μπιξίνη, όπου το ποσοστό στα Συμβατικά κοτόπουλα εμφανίζεται μεγαλύτερο από τις άλλες δύο κατηγορίες.

Επιπλέον, όπως φαίνεται και στον πίνακα των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν (Πίνακας 64), οι περισσότερες από τις ενώσεις έχουν εμβαδόν μικρότερο του ενός τις εκατό σε σχέση με το εμβαδόν του συνολικού χρωματογραφήματος. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η ποσότητά τους στα δείγματα πλάσματος είναι σχεδόν αμελητέα.

Ορισμένες από τις ενώσεις παρατηρείται ότι δεν εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα. Στα δείγματα στα οποία εντοπίζονται, παρατηρείται ότι το εμβαδόν τους είναι κάτω του 0,3%, με μοναδική εξαίρεση την ζεαξανθίνη, η οποία βρίσκεται με ποσοστό 2,57% στο συνολικό χρωματογράφημα του δείγματος EB, ενώ απουσιάζει από τα υπόλοιπα δείγματα.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μέσω της ανάλυσης, μπορεί να οφείλονται είτε στον μεταβολισμό των ενώσεων από τα κοτόπουλα, είτε σε εξωτερικούς παράγοντες. Παράδειγμα μπορεί να αποτελεί το πειραματικό πρωτόκολλο που

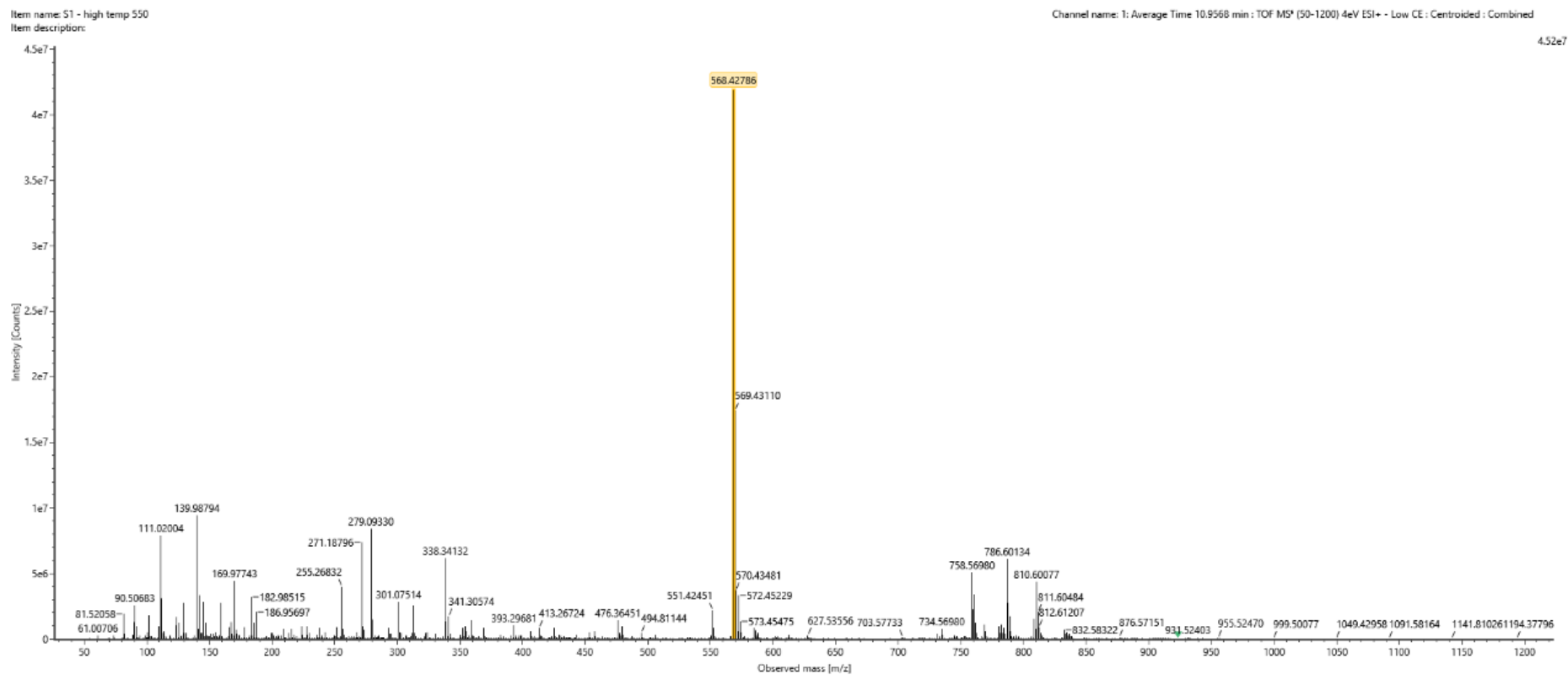
ακολουθήθηκε, με τα στάδια της επεξεργασίας των δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους στο μηχάνημα (π.χ. καταβύθιση πρωτεϊνών), καθώς και σημαντικός παράγοντας κρίνεται και η ίδια η χρωματογραφία. Οι συνθήκες έκλουσης, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και η θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την μέτρηση, είναι παράγοντες που επηρεάζουν την χρωματογραφία. Λόγου χάριν, η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να αποβεί καταστροφική για ορισμένες από τις ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των καροτενοειδών [93]. Συγκεντρωτικά, μεγαλύτερο ποσοστό σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει η εκτροφή των κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής, όπως υπολογίστηκε από το συνολικό εμβαδόν του χρωματογραφήματος. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ομάδα των Ελεύθερης Βοσκής παρουσιάζει καλύτερη εικόνα αντιοξειδωτικού προφίλ.

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν λήφθηκαν τα αντίστοιχα φάσματα μάζας. Η ταυτοποίηση έγινε για τις ενώσεις λουτεΐνη και α -τοκοτριενόλη σε δείγματα από καθεμία από τις τρεις ομάδες εκτροφών (συμβατική εκτροφή, εκτροφή ελεύθερης βοσκής και εκτροφή ελεύθερης βοσκής με πρόσθετα αρωματικά φυτά). Τα παρακάτω φάσματα μάζας που παρουσιάζονται, αντιστοιχούν και στις δύο λειτουργίες σάρωσης. Η λειτουργία 1: χαμηλής ενέργειας 4 eV παρουσιάζει ολόκληρες τις ενώσεις, ενώ η λειτουργία 2: υψηλής ενέργειας 20-60 eV παρουσιάζει τα θραύσματα των ενώσεων.

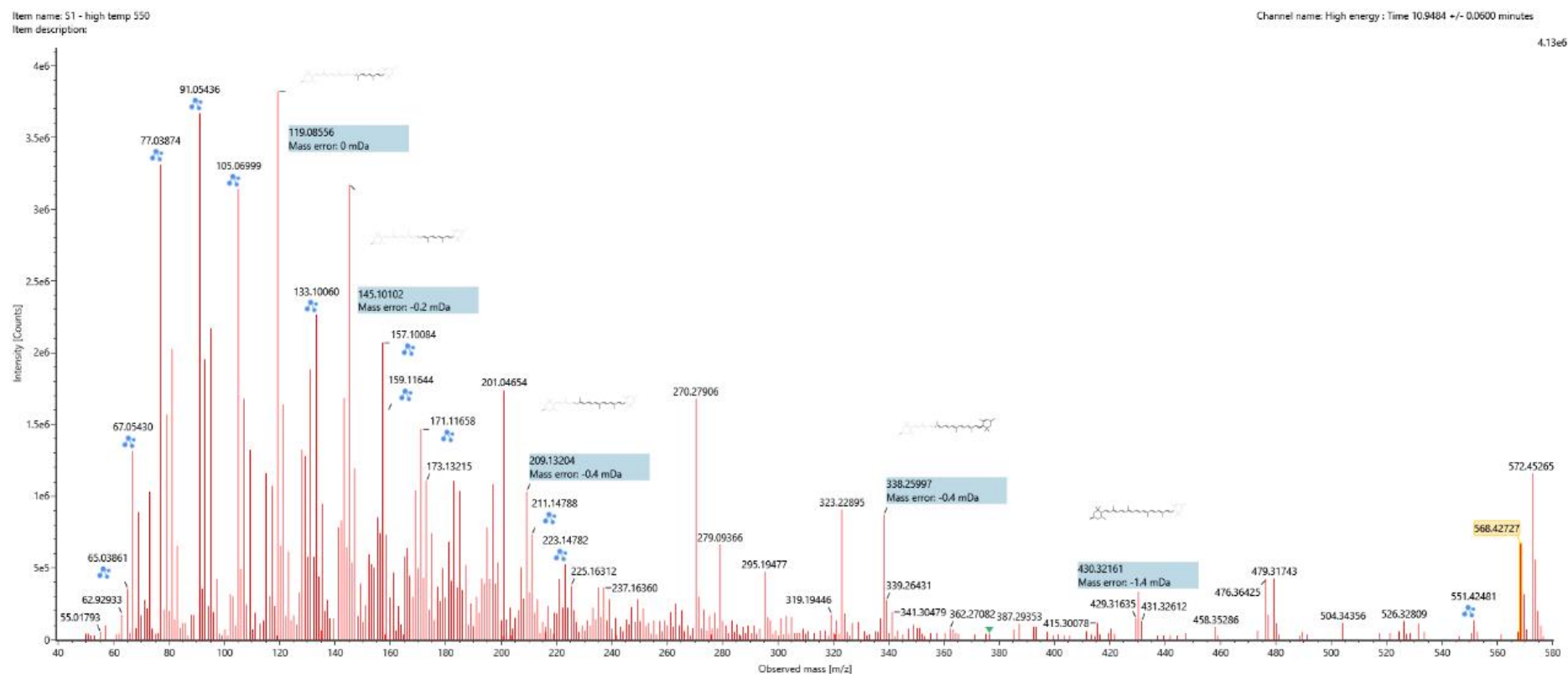
Συμβατική Εκτροφή

Λουτεΐνη (S1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:



Εικόνα 44: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής, RT = 10,9568min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).



Εικόνα 45: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής, RT = 10,9484min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

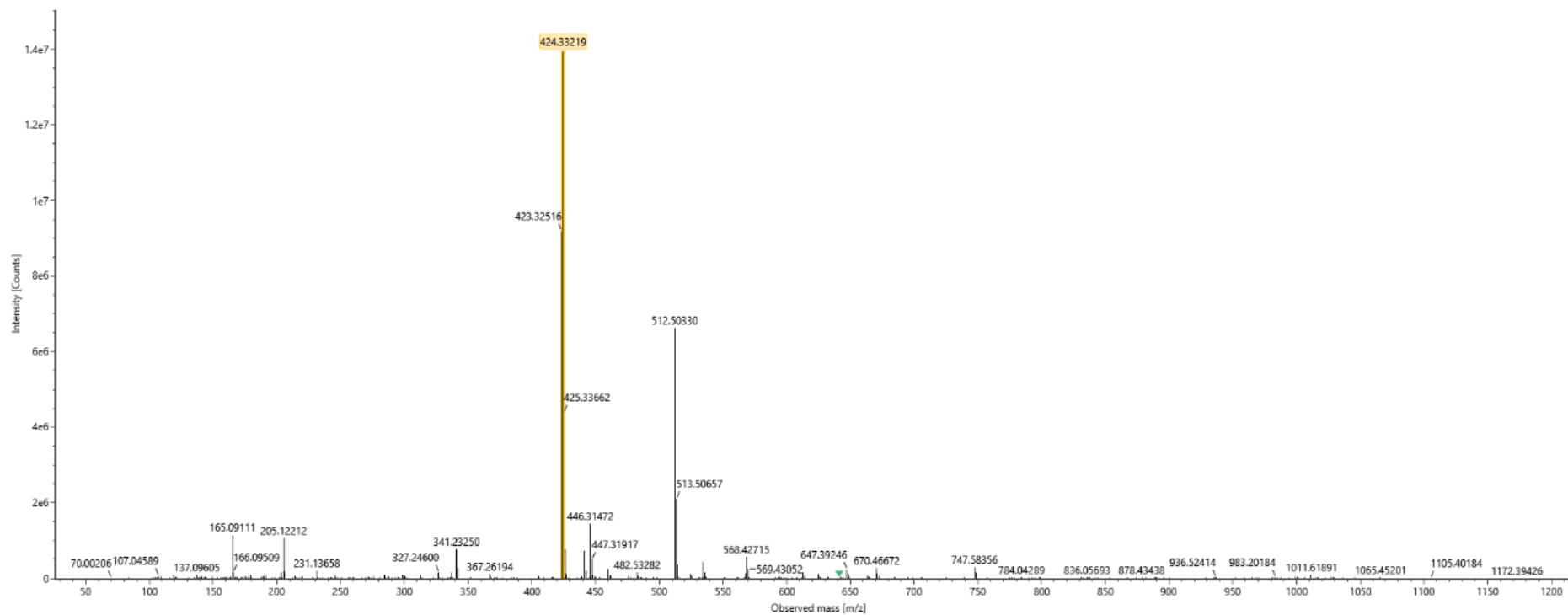
α-τοκοτριενόλη (S1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:

Item name: S1 - high temp 550
Item description:

Channel name: 1: Average Time 14.2527 min : TOF MS* (50-1200) 4eV ESI+ - Low CE : Centroided : Combined

1.5e7

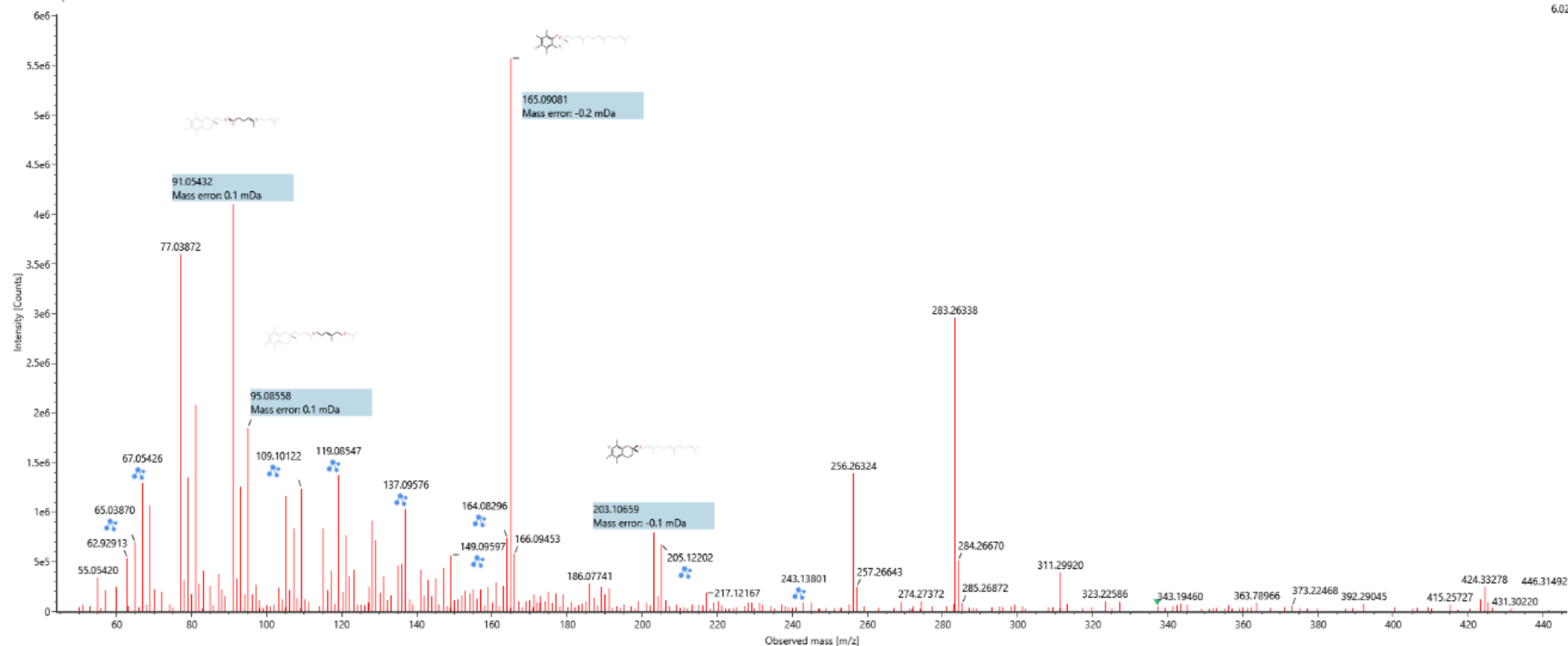


Εικόνα 46: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής, RT = 14,2527min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Item name: S1 - high temp 550
Item description:

Channel name: High energy : Time 14.2599 +/- 0.0600 minutes

6.02e6



Εικόνα 47: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής, RT = 14,2599min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής (EB)

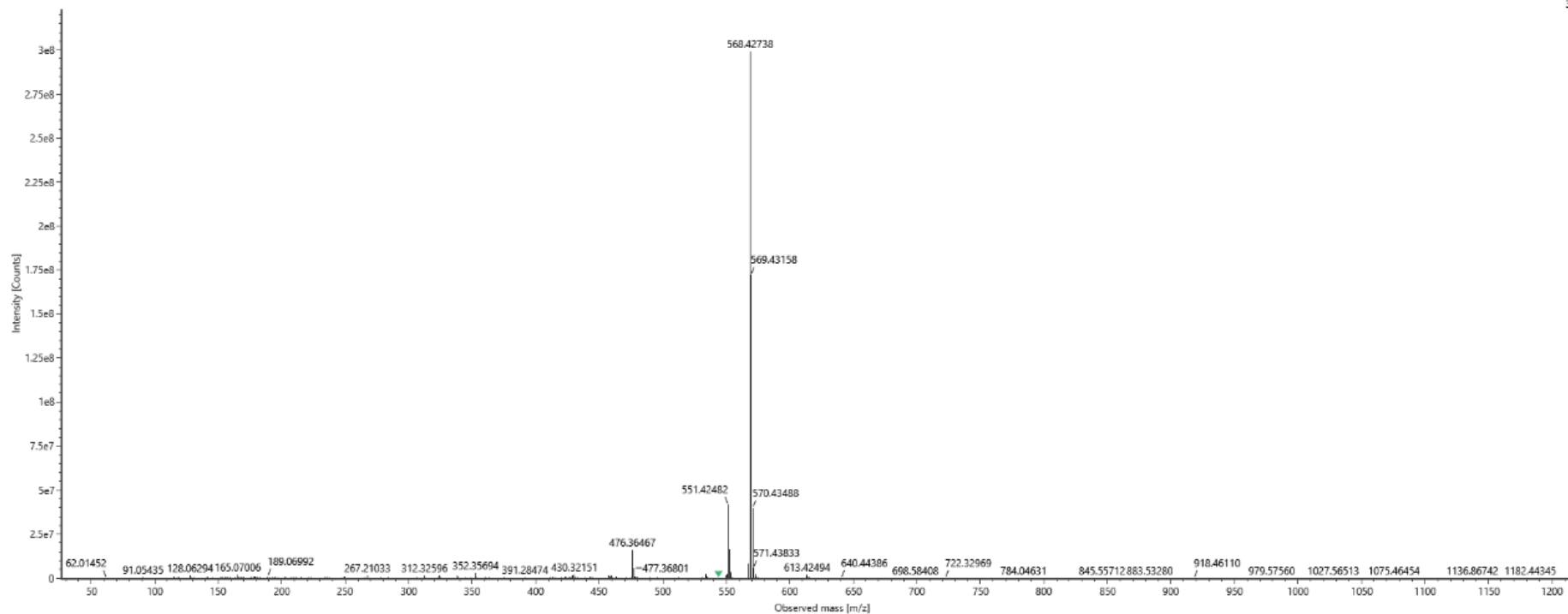
Λουτεΐνη (EB1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:

Item name: EB1 - high temp 550
Item description:

Channel name: 1: Average Time 10.9404 min : TOF MS* (50-1200) 4eV ESI+ - Low CE : Centroided : Combined

3.23e8

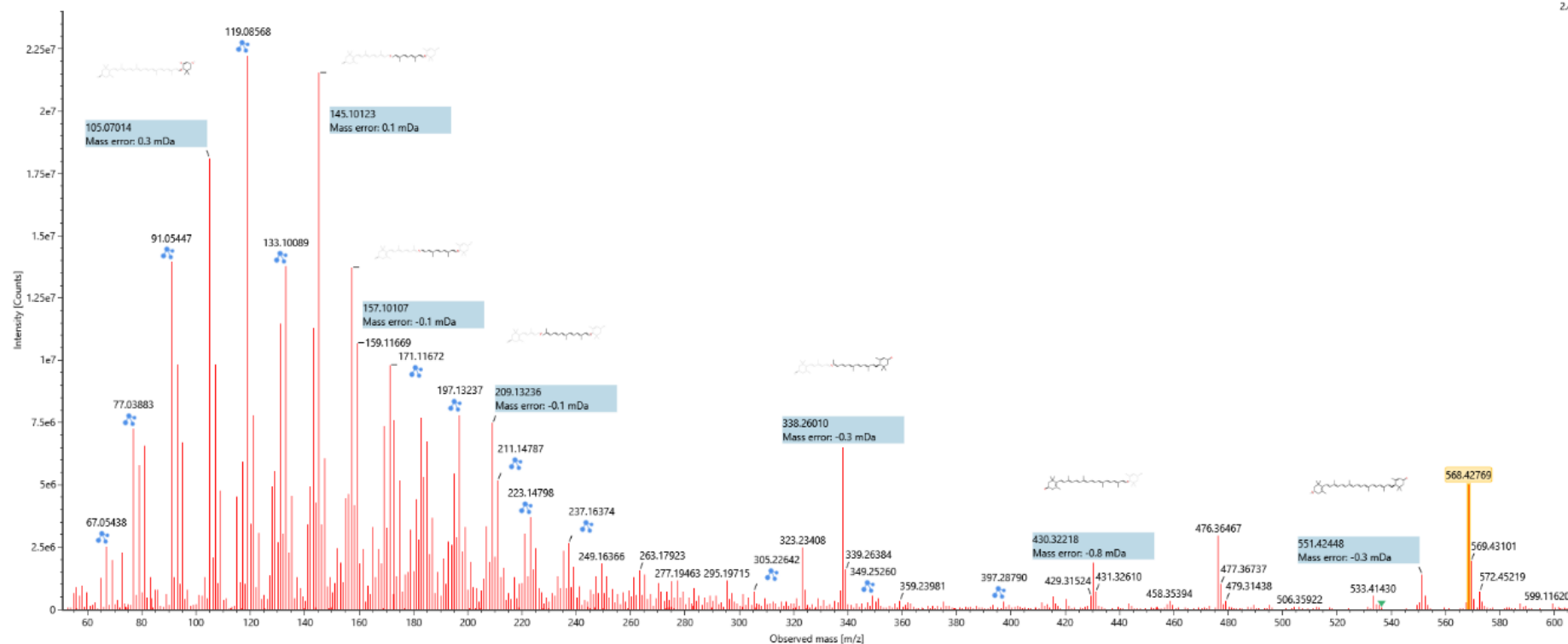


Εικόνα 48: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής, RT = 10,9404min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Item name: EB1 - high temp 550
Item description:

Channel name: High energy : Time 10.8817 +/- 0.1791 minutes

2.4e7



Εικόνα 49: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής, RT = 10,8817min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

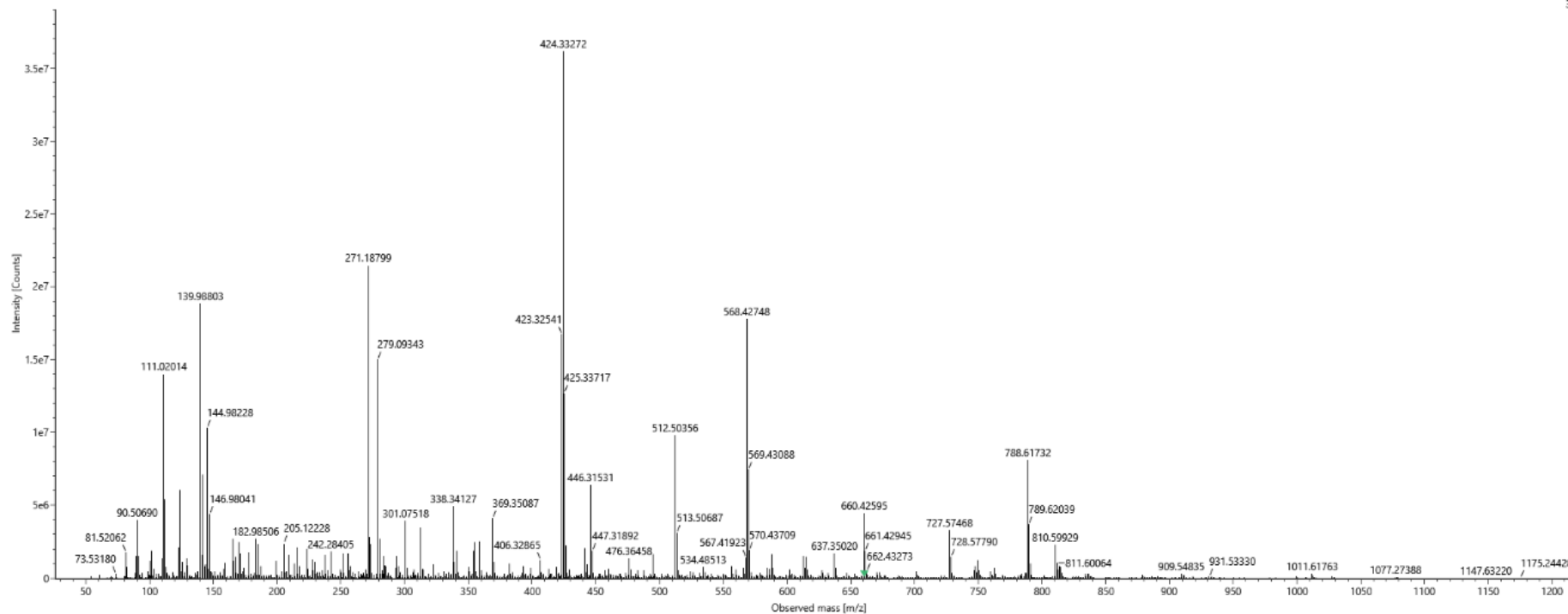
α-τοκοτριενόλη (EB1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:

Item name: EB1 - high temp 550
Item description:

Channel name: 1: Average Time 14.2220 min : TOF MS¹ (50-1200) 4eV ESI⁺ - Low CE : Centroided : Combined

3.91e7

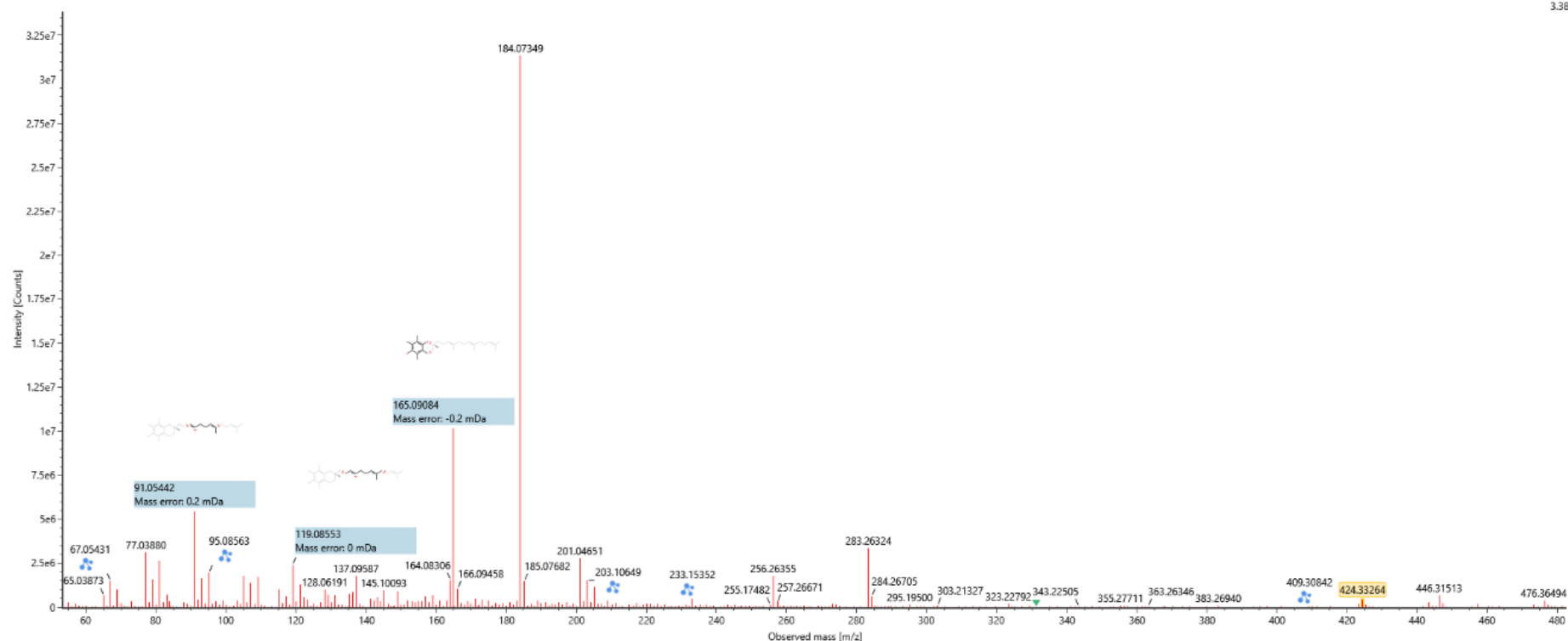


Εικόνα 50: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής, RT = 14,2220min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Item name: EB1 - high temp 550
Item description:

Channel name: High energy : Time 14.2201 +/- 0.0597 minutes

3.38e7



Εικόνα 51: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής, RT = 14,2201min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά (EBA)

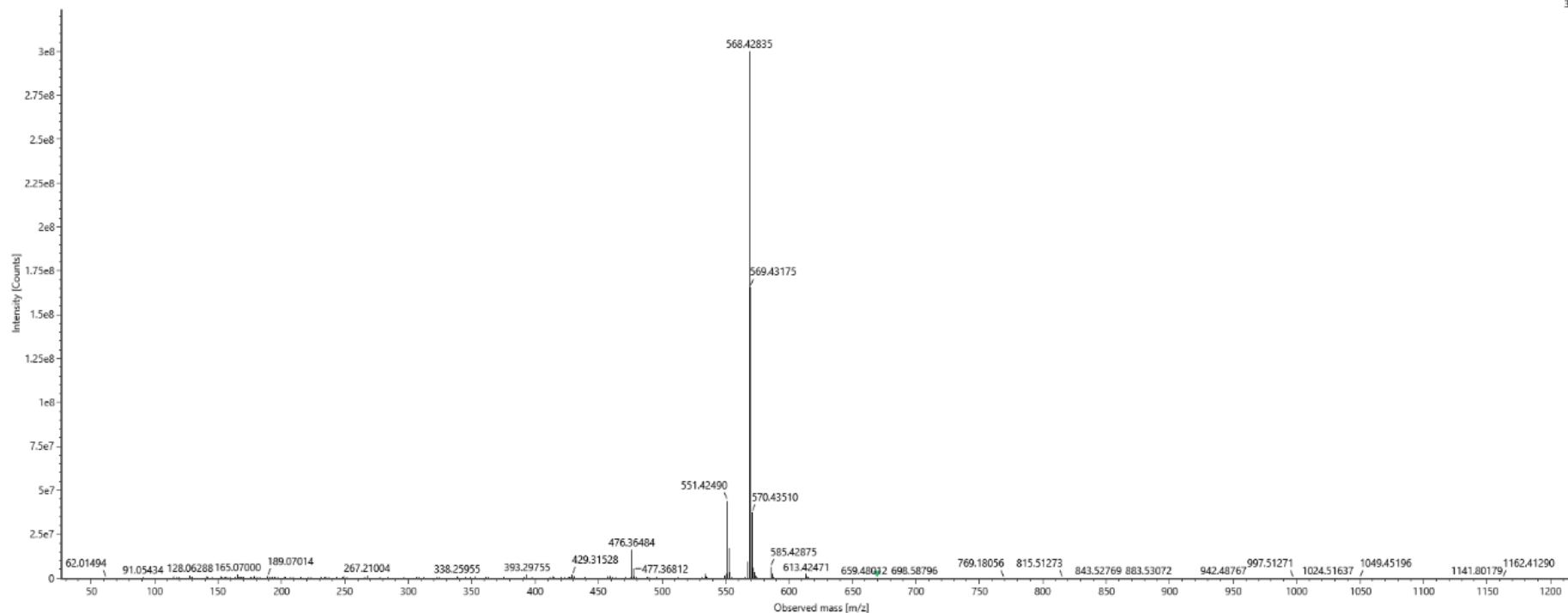
Λουτεΐνη (EBA1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:

Item name: EBA1 - high temp 550
Item description:

Channel name: 1: Average Time 10.9501 min : TOF MS⁺ (50-1200) 4eV ESI+ - Low CE : Centroided : Combined

3.24e8

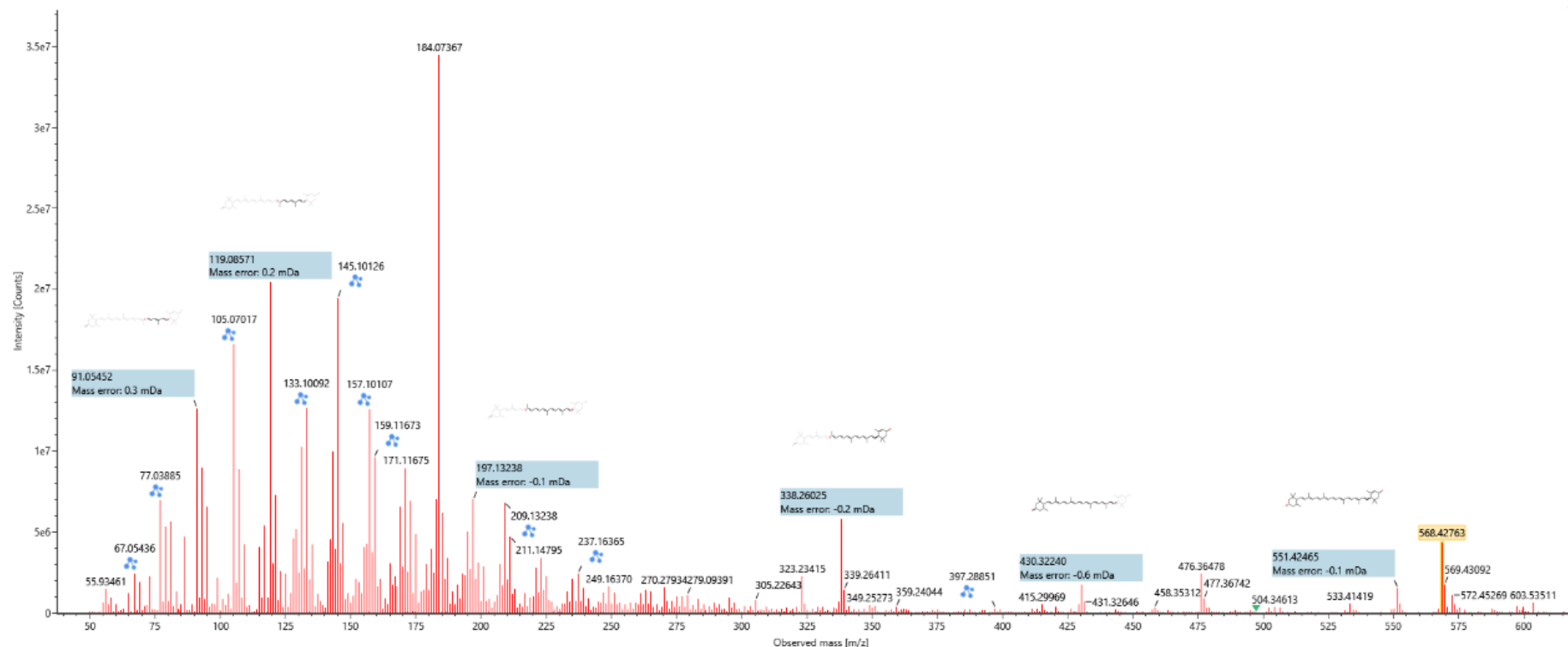


Εικόνα 52: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά RT = 10,9501min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Item name: EBA1 - high temp 550
Item description:

Channel name: High energy : Time 10.9002 +/- 0.1803 minutes

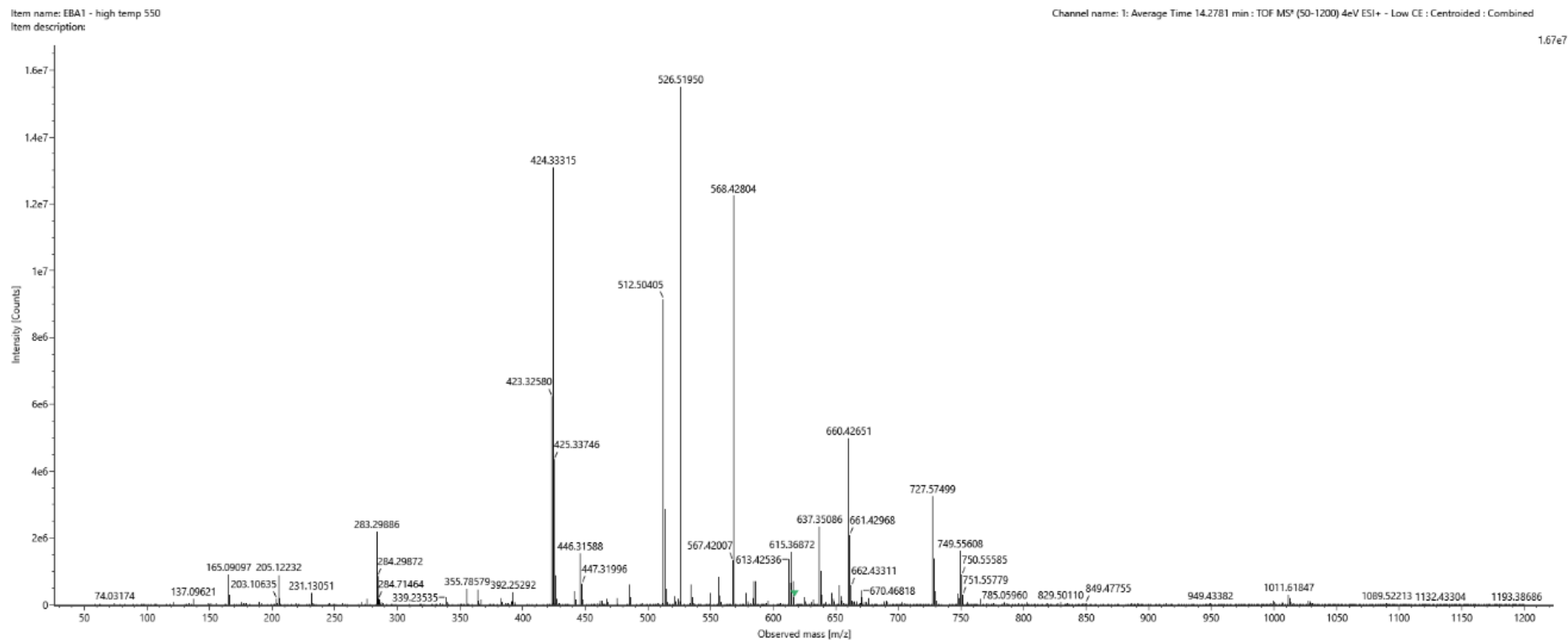
3.73e7



Εικόνα 53: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά, RT = 10,9002min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

α-τοκοτριενόλη (EBA1)

Precursor - Positive Mode [M-e]⁺:

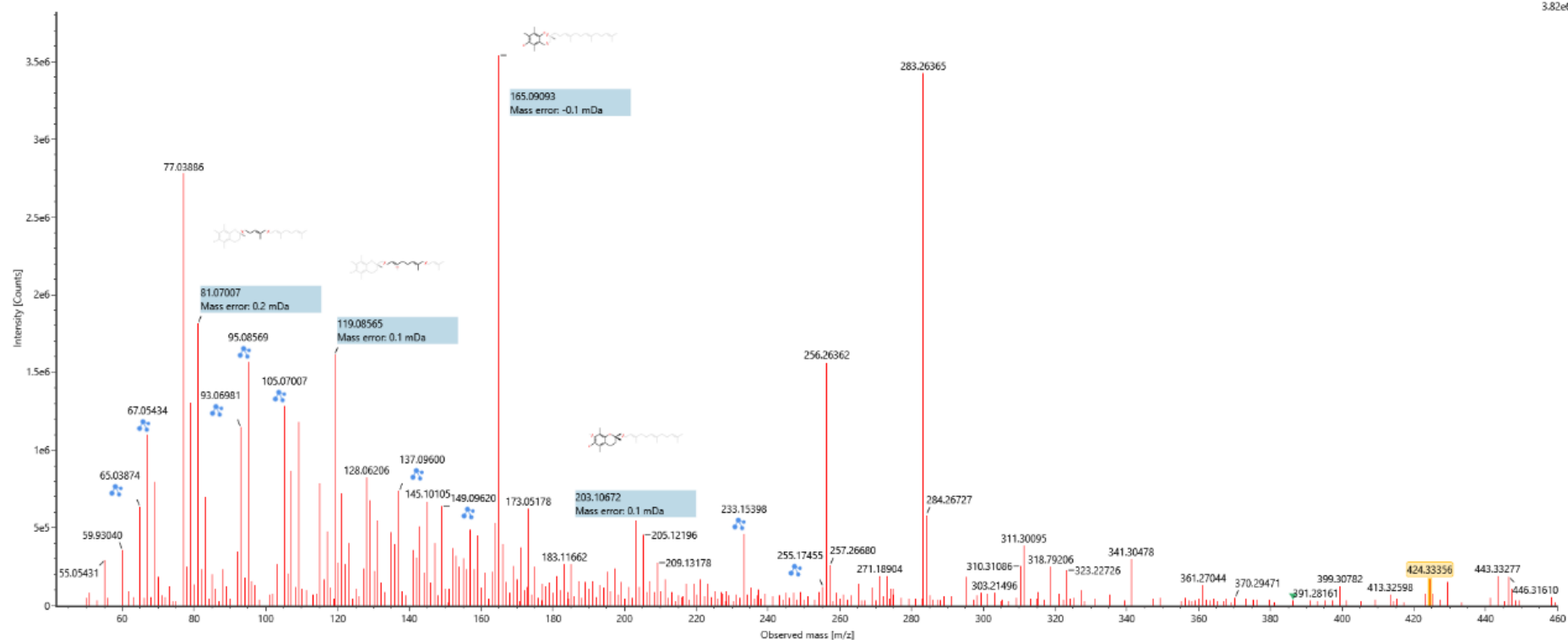


Εικόνα 54: Φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά, RT = 14,2781min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Item name: EBA1 - high temp 550
Item description:

Channel name: High energy : Time 14.2423 +/- 0.0601 minutes

3.82e6



Εικόνα 55: Φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά Φυτά, RT = 14,2423min (Συνθήκες πηγής: δυναμικό στο τριχοειδές, 1,2 kV; δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς, 40 V; θερμοκρασία πηγής, 120 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου στην άκρη του τριχοειδούς 20 L h⁻¹ ; ταχύτητα ροής αερίου αποδιαλύτωσης (N₂) 1000 L h⁻¹).

Σχολιασμός Φασμάτων – Ταυτοποίηση Κορυφών

Στην Εικόνα 44 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής και σε χρόνο έκλουσης $RT = 10,9568$ min. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η λουτεΐνη, με θεωρητικό μοριακό βάρος ένωσης 568,42828 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 568,42786 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται τρεις κορυφές για την λουτεΐνη, η κορυφή του $[M+H]^+$ σε $m/z = 569,43110$, η κορυφή του M^{*+} σε $m/z = 568,42786$ και του ιόντος σε $m/z = 551,42451$, που αντιστοιχεί στην απώλεια ενός μορίου νερού ($[M+H-H_2O]^+$).

Στην Εικόνα 45 παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) Συμβατικής εκτροφής σε χρόνο έκλουσης $RT = 10,9484$ min. Το φάσμα δίνει επιπλέον πληροφορίες για την ένωση της λουτεΐνης από τα θραύσματα της ένωσης που παρουσιάζονται. Χαρακτηριστικά, τα θραύσματα που ταυτοποιούνται απεικονίζονται πάνω από τις αντίστοιχες κορυφές. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 430,32161$, σε $m/z = 338,25997$, σε $m/z = 209,13204$, σε $m/z = 145,10102$ και σε $m/z = 119,08556$.

Στην Εικόνα 46 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα Συμβατικής εκτροφής σε χρόνο έκλουσης $RT = 14,2527$ min. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η α-τοκοτριενόλη, με θεωρητικό μοριακό βάρος ένωσης 424,33432 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 424,33219 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές για την α-τοκοτριενόλη. Η κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ εμφανίζεται σε $m/z = 425,33662$ και του M^{*+} σε $m/z = 424,33219$.

Στην Εικόνα 47 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) Συμβατικής εκτροφής σε χρόνο έκλουσης $RT = 14,2599$ min με τα θραύσματα της ένωσης της α-τοκοτριενόλης. Τα θραύσματα που ταυτοποιήθηκαν απεικονίζονται πάνω στο φάσμα. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 203,10659$, σε $m/z = 165,09081$, σε $m/z = 95,08558$ και σε $m/z = 91,05432$.

Στην Εικόνα 48 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής και σε χρόνο έκλουσης $RT = 10,9404$ min. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η λουτεΐνη, με θεωρητικό μοριακό βάρος

ένωσης 568,42828 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 568,42738 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται τρεις κορυφές για την λουτεΐνη, η κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ σε $m/z = 569,43158$, η κορυφή του M^{*+} σε $m/z = 568,42738$ και του ιόντος σε $m/z = 551,42481$, που αντιστοιχεί στην απώλεια ενός μορίου νερού ($[M+H-H_2O]^+$).

Στην Εικόνα 49 παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής σε χρόνο έκλουσης $RT = 10,8817\text{min}$. Το φάσμα δίνει επιπλέον πληροφορίες για την ένωση της λουτεΐνης από τα θραύσματα της ένωσης που παρουσιάζονται. Τα θραύσματα που ταυτοποιήθηκαν απεικονίζονται πάνω από τις αντίστοιχες κορυφές. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 430,32218$, σε $m/z = 338,26010$, σε $m/z = 209,13236$, σε $m/z = 145,10123$ και σε $m/z = 105,07014$.

Στην Εικόνα 50 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής σε χρόνο έκλουσης $RT = 14,2220\text{ min}$. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η α -τοκοτριενόλη, με θεωρητικό μοριακό βάρος ένωσης 424,33432 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 424,33272 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές για την α -τοκοτριενόλη. Η κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ εμφανίζεται σε $m/z = 425,33717$ και του M^{*+} σε $m/z = 424,33272$.

Στην Εικόνα 51 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής σε χρόνο έκλουσης $RT = 14,2201\text{ min}$ με τα θραύσματα της ένωσης της α -τοκοτριενόλης. Τα θραύσματα που ταυτοποιήθηκαν απεικονίζονται πάνω στο φάσμα. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 165,09084$, σε $m/z = 119,08553$ και σε $m/z = 91,05442$.

Στην Εικόνα 52 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά και σε χρόνο έκλουσης $RT = 10,9501\text{ min}$. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η λουτεΐνη, με θεωρητικό μοριακό βάρος ένωσης 568,42828 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 568,42835 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται τρεις κορυφές για την λουτεΐνη, η κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ σε $m/z = 569,43175$, η κορυφή του M^{*+} σε $m/z = 568,42835$ και του ιόντος σε $m/z = 551,42490$, που αντιστοιχεί στην απώλεια ενός μορίου νερού ($[M+H-H_2O]^+$).

Στην Εικόνα 53 παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά σε χρόνο έκλουσης RT = 10,9002 min. Το φάσμα δίνει επιπλέον πληροφορίες για την ένωση της λουτεΐνης από τα θραύσματα της ένωσης που παρουσιάζονται. Πάνω από τις αντίστοιχες κορυφές απεικονίζονται τα θραύσματα που ταυτοποιήθηκαν. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 430,32240$, σε $m/z = 338,26025$, σε $m/z = 197,13238$, σε $m/z = 119,08571$ και σε $m/z = 91,05452$.

Στην Εικόνα 54 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS χαμηλής ενέργειας (4 eV) στο δείγμα εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά σε χρόνο έκλουσης RT = 14,2781 min. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση ταυτοποιήθηκε ως η α -τοκοτριενόλη, με θεωρητικό μοριακό βάρος ένωσης 424,33432 Da και ευρισκόμενο μοριακό βάρος ένωσης 424,33315 Da. Στο φάσμα εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές για την α -τοκοτριενόλη. Η κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ εμφανίζεται σε $m/z = 425,33746$ και του M^{*+} σε $m/z = 424,33315$.

Στην Εικόνα 55 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας ESI-MS υψηλής ενέργειας (20–60 eV) εκτροφής Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά σε χρόνο έκλουσης RT = 14,2423 min. Παρουσιάζονται τα θραύσματα της ένωσης της α -τοκοτριενόλης και αυτά που ταυτοποιήθηκαν απεικονίζονται πάνω στο φάσμα. Τα κυριότερα θραύσματα εμφανίζονται σε $m/z = 203,10672$, σε $m/z = 165,09093$, σε $m/z = 119,08565$ και σε $m/z = 81,07007$.

4.5. Προσδιορισμός Ολικών Καροτενοειδών

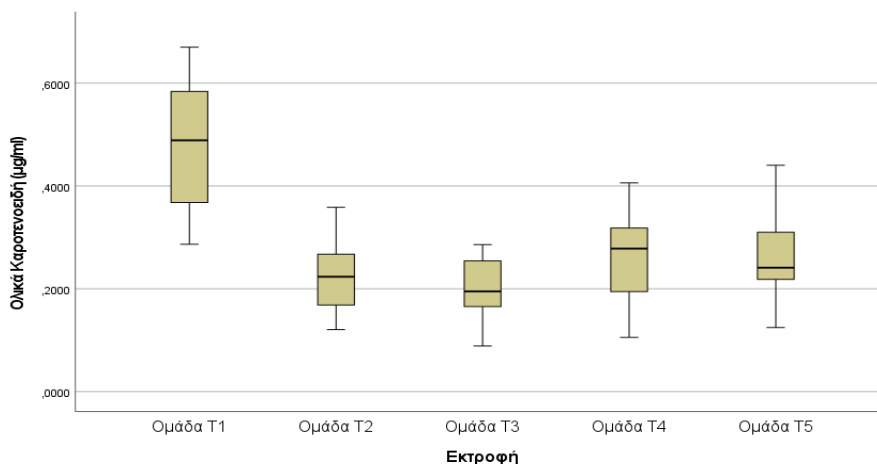
Μετά την επεξεργασία των τιμών των δειγμάτων, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των πέντε διαφορετικών ομάδων εκτροφής (Ομάδες T1, T2, T3, T4 και T5) των πουλερικών σε δείγματα πλάσματος αίματος, για τον προσδιορισμό των Ολικών Καροτενοειδών. Τα στοιχεία που εξήχθησαν παρουσιάζονται στους πίνακες 18 και 19.

Πίνακας 65: Αποτελέσματα Στατιστικής Ανάλυσης σε Ολικά Καροτενοειδή (μg/ml) σε δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων.

Ολικά Καροτενοειδή		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα (SEM)	Διάμεσος	Τυπική Απόκλιση (SD)
	T1	0,48	0,04	0,49	0,12
	T2	0,23	0,02	0,22	0,09
	T3	0,21	0,02	0,20	0,07
	T4	0,26	0,02	0,28	0,09
	T5	0,26	0,02	0,24	0,07

Πίνακας 66: Σύγκριση της τιμής p ανάμεσα στις πέντε ομάδες T1, T2, T3, T4 και T5, ύστερα από την στατιστική ανάλυση σε Ολικά Καροτενοειδή (μg/ml) σε δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων.

P value	T1	T2	T3	T4	T5
T1		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
T2	<0,001		>0,05	>0,05	>0,05
T3	<0,001	>0,05		>0,05	>0,05
T4	<0,001	>0,05	>0,05		>0,05
T5	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	



Διάγραμμα 26: Σύγκριση ολικών καροτενοειδών σε δείγματα πλάσματος αίματος των πέντε ομάδων.

Σύμφωνα με τους παραπάνω πίνακες, η ομάδα T1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά, συγκρινόμενη με καθεμία από τις υπόλοιπες ομάδες εκτροφής ($p < 0,001$). Αντίθετα με αυτήν, καμία άλλη ομάδα δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες ($p > 0,05$).

Ο προσδιορισμός των Ολικών Καροτενοειδών σε δείγματα πλάσματος αίματος κοτόπουλων, συγκρίνοντας πέντε διαφορετικές ομάδες εκτροφών, έδειξε ότι η ομάδα T1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη ομάδα ($p < 0.001$). Αυτό το γεγονός την διαφοροποιεί, αφού η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών παρουσιάζεται μεγαλύτερη και σχεδόν διπλάσια, από κάθε άλλη ομάδα. Αντίθετα, όλες οι υπόλοιπες προς εξέταση ομάδες βρέθηκε πως παρουσιάζουν παρόμοιας κύμανσης τιμή συγκέντρωσης ολικών καροτενοειδών, χωρίς καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0.05$). Σύμφωνα με τα δεδομένα που έχουν ληφθεί σχετικά με την προέλευση των δειγμάτων των ομάδων, διαπιστώνεται πως η ομάδα T1 υπήρξε το αρνητικό control, συνεπώς προέρχεται από υγιή πτηνά, αλλά και κανένα πρόσθετο στη διατροφή των κοτόπουλων. Η ομάδα T2 που φέρει την μόλυνση, αλλά κανένα πρόσθετο διατροφής δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά με τις υπόλοιπες ομάδες, εκτός της T1. Η ομάδα T3, η οποία φέρει την μόλυνση και επιπλέον ως πρόσθετο διατροφής το Προβιοτικό A, παρουσίασε μειωμένη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών σε σχέση με την ομάδα T1. Ειδικότερα, βρέθηκε να έχει μέσο όρο συγκέντρωσης λιγότερο από το υποδιπλάσιο της ομάδας T1. Συμπεραίνεται ότι το προβιοτικό A δεν φαίνεται να προφυλάσσει από την μόλυνση με το βακτήριο. Οι ομάδες T4 και T5, οι οποίες φέρουν την μόλυνση και επιπλέον ως πρόσθετο διατροφής το Προβιοτικό B και Προβιοτικό C αντίστοιχα, βρέθηκε πως έχουν μειωμένη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών σε σχέση με την ομάδα T1. Παρ' όλα αυτά, η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών των T4 και T5 βρέθηκε μεγαλύτερη όμως από το υποδιπλάσιο της T1. Συμπεραίνεται πως τα προβιοτικά B και C προφυλάσσουν ελάχιστα από τις συνέπειες της μόλυνσης με το βακτήριο. Συνεπώς, μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών σε πλάσμα αίματος φέρει η ομάδα του αρνητικού control (T1). Διαπιστώνεται πως υπάρχει μείωση αντιοξειδωτικών και συγκεκριμένα καροτενοειδών στις ομάδες που εφαρμόζεται μόλυνση των κοτόπουλων με *Eimeria* spp ή ακόμα και ο συνδυασμός της μόλυνσης με *Eimeria* spp με κάποιο προβιοτικό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή μετρήθηκαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και η α-τοκοφερόλη, ανάμεσα σε τρεις διαφορετικές εκτροφές κοτόπουλων (Συμβατική εκτροφή, εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής και εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα Αρωματικά φυτά). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν για την αποτίμηση του οξειδωτικού προφίλ, το οποίο αντικατοπτρίζει ποιοτικά και ποσοτικά την κατάσταση της υγείας των πτηνών. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-QTOF-MS), για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ενώσεων της κατηγορίας των καροτενοειδών και της βιταμίνης Ε. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε πλάσμα αίματος κοτόπουλων τριών διαφορετικών εκτροφών (Συμβατική εκτροφή, εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής και εκτροφή Ελεύθερης Βοσκής με πρόσθετα εκχυλίσματα Αρωματικών φυτών), για ποσοτική και ποιοτική σύγκριση. Τέλος, μετρήθηκε η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών σε πλάσμα αίματος κοτόπουλων, ανάμεσα σε πέντε διαφορετικές εκτροφές.

Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για την αποτίμηση του οξειδωτικού προφίλ στις τρεις ομάδες εκτροφών έδειξαν ότι μόνο τα Κοτόπουλα Ελεύθερης Βοσκής φέρουν καλύτερα αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μοναδική διαφοροποίηση της ομάδας αυτής συγκριτικά με τις υπόλοιπες στην μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα πλάσματος αίματος. Αντίθετα, όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις έδειξαν ότι δεν διαφοροποιείται κάποια εκτροφή, τόσο σε δείγματα ιστού, όσο και πλάσματος. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί η εκτροφή κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής ως καλύτερη, σύμφωνα με το οξειδωτικό προφίλ.

Η ανάλυση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (LC-Q-TOF-MS) έδειξε διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων εκτροφής. Συγκεντρωτικά, σύμφωνα δηλαδή με το συνολικό εμβαδόν των χρωματογραφημάτων, μεγαλύτερο ποσοστό σε ορισμένες ενώσεις της κατηγορίας των καροτενοειδών και της βιταμίνης Ε βρίσκονται στην εκτροφή των Κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ομάδα των κοτόπουλων Ελεύθερης Βοσκής παρουσιάζει

μεγαλύτερη περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων. Τα γενικά συμπεράσματα σχετικά με την μελέτη των καρτενοειδών και ενώσεων της βιταμίνης E σε βιολογικά δείγματα με την τεχνική αυτή αποτελούν απλά μία πρώτη εικόνα. Για την εύρεση της μεθόδου θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες και ευρεία διερεύνηση τόσο της επεξεργασίας των δειγμάτων, όσο και των συνθηκών - παραμέτρων με τις οποίες πραγματοποιείται η μέτρηση.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των Ολικών Καρτενοειδών στις πέντε διαφορετικές ομάδες εκτροφών, παρουσίασε διαφοροποίηση σε μία μόνο εκτροφή. Συμπεραίνεται πως μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών καρτενοειδών σε πλάσμα αίματος φέρει η ομάδα του αρνητικού control (T1), η οποία περιλαμβάνει υγιή κοτόπουλα. Συνεπώς, διαπιστώνεται πως υπάρχει μείωση αντιοξειδωτικών και συγκεκριμένα καρτενοειδών στις ομάδες κοτόπουλων που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Eimeria* spp. Η παρουσία κάποιου προβιοτικού δεν υπέδειξε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα κοτόπουλα που έφεραν μόνο την μόλυνση με το βακτήριο *Eimeria* spp.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. Hatzizisis, V. Dotas, K. Zagorakis, D. Gourdouvelis, and D. Dotas, "Technical Efficiency Measurement in Broiler Chicken Production System: A Case Study in Epirus, Greece," 2019.
- [2] S. G. Velleman, "Annual Review of Animal Biosciences Recent Developments in Breast Muscle Myopathies Associated with Growth in Poultry," 2018, doi: 10.1146/annurev-animal-020518.
- [3] "Investigation reveals 'free range' chickens come in flocks of 36,000 birds | Totally Vegan Buzz." <https://www.totallyveganbuzz.com/news/investigation-reveals-free-range-chickens-come-in-flocks-of-36000-birds/> (accessed Dec. 04, 2022).
- [4] P. C. G. and Y. J. R. Z. H. Miao, "Free-range Poultry Production - A Review," *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, vol. 18, pp. 113–132, 2005.
- [5] "Free Ranging and Training Chickens." <https://www.chickenkeepingsecrets.com/keeping-chickens/free-ranging-and-training-chickens/> (accessed Dec. 04, 2022).
- [6] T. Morais *et al.*, "Seaweed potential in the animal feed: A review," *Journal of Marine Science and Engineering*, vol. 8, no. 8. MDPI AG, Aug. 01, 2020. doi: 10.3390/JMSE8080559.
- [7] A. Kannan, B. Prakash, S. S. Paul, M. V. L. N. Raju, S. v. Rama Rao, and M. Shanmugam, "Effect of dietary supplementation of zinc proteinate on performance, egg quality, blood biochemical parameters, and egg zinc content in White Leghorn layers," *Trop Anim Health Prod*, vol. 54, no. 3, Jun. 2022, doi: 10.1007/s11250-022-03162-2.
- [8] M. Kikusato, "Phytobiotics to improve health and production of broiler chickens: Functions beyond the antioxidant activity," *Anim Biosci*, vol. 34, no. 3, pp. 345–353, Mar. 2021, doi: 10.5713/ab.20.0842.
- [9] M. H. Haque *et al.*, "Sustainable Antibiotic-Free Broiler Meat Production: Current Trends, Challenges, and Possibilities in a Developing Country Perspective,"

- Biology* 2020, Vol. 9, Page 411, vol. 9, no. 11, p. 411, Nov. 2020, doi: 10.3390/BIOLOGY9110411.
- [10] M. Krauze, "Phytobiotics, a Natural Growth Promoter for Poultry," Aug. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.99030.
- [11] H. Makala, "Impact of Selected Feed Additives in Broiler Nutrition on Breeding and the Meat Quality Features," Aug. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.99099.
- [12] M. E. Abd El-Hack *et al.*, "Ginger and Its Derivatives as Promising Alternatives to Antibiotics in Poultry Feed," *Animals (Basel)*, vol. 10, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/ANI10030452.
- [13] M. E. Abd El-Hack *et al.*, "Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oil as a Potential Alternative to Antibiotics in Poultry," *Antibiotics (Basel)*, vol. 9, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9050210.
- [14] M. Krauze, M. Cendrowska-Pinkosz, P. Matusevičius, A. Stępniewska, P. Jurczak, and K. Ognik, "The Effect of Administration of a Phytobiotic Containing Cinnamon Oil and Citric Acid on the Metabolism, Immunity, and Growth Performance of Broiler Chickens," *Animals (Basel)*, vol. 11, no. 2, pp. 1–19, Feb. 2021, doi: 10.3390/ANI11020399.
- [15] C. Proestos, K. Lytoudi, O. K. Mavromelanidou, P. Zoumpoulakis, and V. J. Sinanoglou, "Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils," *Antioxidants*, vol. 2, no. 1, pp. 11–22, Mar. 2013, doi: 10.3390/antiox2010011.
- [16] S. G. Velleman, "Recent Developments in Breast Muscle Myopathies Associated with Growth in Poultry," <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115311>, vol. 7, pp. 289–308, Feb. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-ANIMAL-020518-115311.
- [17] T. Kato, T. S. Seixas, L. F. Dias, F. A. G. Coró, and M. R. Pedrão, "Biochemical and technological view of broiler chicken meat with pectoral," *Ciencia Rural*, vol. 50, no. 11, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1590/0103-8478CR20190991.

- [18] X. Pan, L. Zhang, T. Xing, J. Li, and F. Gao, "The impaired redox status and activated nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element pathway in wooden breast myopathy in broiler chickens," *Anim Biosci*, vol. 34, no. 4, p. 652, Apr. 2021, doi: 10.5713/AJAS.19.0953.
- [19] F. M. da Silva, A. Marques, and A. Chaveiro, "Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction," *Open Vet Sci J*, vol. 4, no. 1, pp. 127–133, Jun. 2014, doi: 10.2174/1874318801004010127.
- [20] J. Karlsson, "Introduction to Nutraology and Radical Formation. In: Antioxidants and Exercise," *Illinois: Human Kinetics Press*, pp. 1–143, 1997.
- [21] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001.
- [22] N. Παπαγαλάνης and N. Papagalanis, "Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα III. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών - Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. III. Reactive species toxicity.," *Ελληνική Νεφρολογία - Hellenic Nephrology*, vol. 27, no. 1, Apr. 2015, Accessed: Dec. 04, 2022. [Online]. Available: https://www.ene.gr/eneojs_new/index.php/en/article/view/277/282
- [23] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review," *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3380, vol. 22, no. 7, p. 3380, Mar. 2021, doi: 10.3390/IJMS22073380.
- [24] "Oxidative Stress: Definition, Causes, And Treatment | Hello100." <https://hello100.com/oxidative-stress/> (accessed Dec. 04, 2022).
- [25] T. Xing, X. Chen, J. Li, L. Zhang, and F. Gao, "Dietary taurine attenuates hydrogen peroxide-impaired growth performance and meat quality of broilers via modulating redox status and cell death signaling," *J Anim Sci*, vol. 99, no. 5, May 2021, doi: 10.1093/JAS/SKAB089.

- [26] A. Cherubini, C. Ruggiero, M. C. Polidori, and P. Mecocci, "Potential markers of oxidative stress in stroke," *Free Radic Biol Med*, vol. 39, no. 7, pp. 841–852, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.06.025.
- [27] A. C. Rosa, D. Corsi, N. Cavi, N. Bruni, and F. Dosio, "Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses," *Molecules*, vol. 26, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26071844.
- [28] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review," *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3380, vol. 22, no. 7, p. 3380, Mar. 2021, doi: 10.3390/IJMS22073380.
- [29] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001.
- [30] B. C. L. Weedon, "Occurrence," *Carotenoids*, O. Isler (Ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, vol. 23, pp. 29–59, 1971, doi: 10.1007/978-3-0348-5831-1_2.
- [31] A. Eroglu and E. H. Harrison, "Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A," *J Lipid Res*, vol. 54, no. 7, p. 1719, Jul. 2013, doi: 10.1194/JLR.R039537.
- [32] J. von Lintig and K. Vogt, "Filling the Gap in Vitamin A Research: MOLECULAR IDENTIFICATION OF AN ENZYME CLEAVING β -CAROTENE TO RETINAL," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 16, pp. 11915–11920, Apr. 2000, doi: 10.1074/JBC.275.16.11915.
- [33] T. Maoka, "Carotenoids as natural functional pigments," *J Nat Med*, vol. 74, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2020, doi: 10.1007/S11418-019-01364-X/FIGURES/15.
- [34] T. W. Goodwin, "The Biochemistry of the Carotenoids," *The Biochemistry of the Carotenoids*, 1980, doi: 10.1007/978-94-009-5860-9.

- [35] A. J. Meléndez-Martínez *et al.*, “A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 62, no. 8, pp. 1999–2049, 2022, doi: 10.1080/10408398.2020.1867959.
- [36] G. Giuliano, “Plant carotenoids: Genomics meets multi-gene engineering,” *Curr Opin Plant Biol*, vol. 19, pp. 111–117, 2014, doi: 10.1016/J.PBI.2014.05.006.
- [37] F. Delgado-Vargas, A. R. Jiménez, O. Paredes-López, and F. J. Francis, “Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 40, no. 3, pp. 173–289, 2000, doi: 10.1080/10408690091189257.
- [38] “carotenoid nomenclature.” <https://iupac.qmul.ac.uk/carot/car1t7.html> (accessed Dec. 04, 2022).
- [39] “Η χημική ένωση του μήνα: Λυκοπένιο.” http://195.134.76.37/chemicals/chem_lycopene.htm (accessed Dec. 07, 2022).
- [40] E. Młodzieńska, “Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors,” *Acta Biol Crac Ser Bot*, vol. 51, no. 1, pp. 7–16, 2009.
- [41] K. Davies, *Plant pigments and their manipulation*, vol. Carotenoids. Blackwell, 2004. Accessed: Oct. 16, 2022. [Online]. Available: <https://www.wiley.com/en-us/Annual+Plant+Reviews%2C+Volume+14%2C+Plant+Pigments+and+their+Manipulation-p-9781405150064>
- [42] R. Miller, S. J. Owens, and B. Rørslett, “Plants and colour: Flowers and pollination,” *OptLT*, vol. 43, no. 2, pp. 282–294, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.OPTLASTEC.2008.12.018.
- [43] E. Grotewold, “The genetics and biochemistry of floral pigments,” *Annu Rev Plant Biol*, vol. 57, pp. 761–780, 2006, doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.57.032905.105248.

- [44] W. I. Gruszecki and K. Strzałka, "Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1740, no. 2, pp. 108–115, May 2005, doi: 10.1016/J.BBADIS.2004.11.015.
- [45] "File:Beta-Carotene-3D-balls.png - Wikimedia Commons." <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-Carotene-3D-balls.png> (accessed Dec. 04, 2022).
- [46] "Beta Carotene Powder at Rs 3250/kg | Phytochemical Powder in Indore | ID: 9853882091." <https://www.indiamart.com/proddetail/beta-carotene-powder-9853882091.html> (accessed Dec. 04, 2022).
- [47] Süleyman ÇALIŞLAR, "The Important of Beta Carotene on Poultry Nutrition," *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, vol. 33, no. No 3, pp. 256–263, 2019, Accessed: Oct. 03, 2022. [Online]. Available: <https://9lib.net/document/8ydxpw6z-the-important-of-beta-carotene-on-poultry-nutrition.html>
- [48] R. K. Selvaraj, R. Shanmugasundaram, and K. C. Klasing, "Effects of dietary lutein and PUFA on PPAR and RXR isomer expression in chickens during an inflammatory response," *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, vol. 157, no. 3, pp. 198–203, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.CBPA.2010.06.172.
- [49] J. K. Tyczkowski and P. B. Hamilton, "Metabolism of Lutein Diester During Aflatoxicosis in Young Chickens," *Poult Sci*, vol. 66, no. 12, pp. 2011–2016, Dec. 1987, doi: 10.3382/PS.0662011.
- [50] R. L. Roberts, "Lutein, Zeaxanthin, and Skin Health," <http://dx.doi.org/10.1177/1559827613477827>, vol. 7, no. 3, pp. 182–185, Feb. 2013, doi: 10.1177/1559827613477827.
- [51] B. Demmig-Adams, M. López-Pozo, J. J. Stewart, and W. W. Adams, "Zeaxanthin and Lutein: Photoprotectors, Anti-Inflammatories, and Brain Food," *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3607, vol. 25, no. 16, p. 3607, Aug. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25163607.

- [52] Μακρή Σωτηρία, “Αποτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Βιολειτουργικών Ζωοτροφών Εμπλουτισμένων με Υποπροϊόντα Οινοποιείου και Ελαιοτριβείου σε Κοτόπουλα και Πρόβατα Κρεοπαραγωγής,” Λάρισα, 2019.
- [53] M. Nardoia *et al.*, “Effect of polyphenols dietary grape by-products on chicken patties,” *European Food Research and Technology*, vol. 244, no. 2, pp. 367–377, Feb. 2018, doi: 10.1007/s00217-017-2962-7.
- [54] P. Săvescu and P. Săvescu, “Natural Compounds with Antioxidant Activity-Used in the Design of Functional Foods,” *Functional Foods - Phytochemicals and Health Promoting Potential*, Apr. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.97364.
- [55] K. B. Martinez, J. D. Mackert, and M. K. McIntosh, “Polyphenols and Intestinal Health,” *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, pp. 191–210, Feb. 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-805376-8.00018-6.
- [56] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, “Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review,” *J Funct Foods*, vol. 18, pp. 820–897, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.JFF.2015.06.018.
- [57] P. Săvescu, “Natural Compounds with Antioxidant Activity-Used in the Design of Functional Foods,” *Functional Foods - Phytochemicals and Health Promoting Potential*, Nov. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.97364.
- [58] “The 5 Benefits of Vitamin E (& Where to Get It).” <https://carnivorearelius.com/vitamin-e/> (accessed Dec. 04, 2022).
- [59] G. Wheeler, T. Ishikawa, V. Pornsaksit, and N. Smirnoff, “Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes,” *Elife*, vol. 4, no. 4, Mar. 2015, doi: 10.7554/ELIFE.06369.
- [60] M. A. Hashem, S. S. Abd El Hamied, E. M. A. Ahmed, S. A. Amer, and A. M. Hassan, “Alleviating Effects of Vitamins C and E Supplementation on Oxidative Stress, Hematobiochemical, and Histopathological Alterations Caused by Copper Toxicity in Broiler Chickens,” *Animals (Basel)*, vol. 11, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/ANI11061739.

- [61] A. Saiz del Barrio *et al.*, "Effect of mineral and vitamin C mix on growth performance and blood corticosterone concentrations in heat-stressed broilers," *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 29, no. 1, pp. 23–33, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.JAPR.2019.11.001.
- [62] K. Bolek, "Mitigation strategies to ameliorate acute and chronic heat stress utilizing supplemental methionine or embryonic thermal conditioning in chickens," 2013, doi: 10.31274/ETD-180810-3429.
- [63] L. Moine, M. Rivoira, G. D. de Barboza, A. Pérez, and N. T. de Talamoni, "Glutathione depleting drugs, antioxidants and intestinal calcium absorption," *World J Gastroenterol*, vol. 24, no. 44, pp. 4979–4988, Nov. 2018, doi: 10.3748/WJG.V24.I44.4979.
- [64] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, "Glutathione metabolism and its implications for health," *J Nutr*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492, 2004, doi: 10.1093/JN/134.3.489.
- [65] "Vitamin C skeletal formula and molecular structure. Ascorbic acid, also known as ascorbate, a vitamin found in various foods Stock Photo - Alamy." <https://www.alamy.com/vitamin-c-skeletal-formula-and-molecular-structure-ascorbic-acid-also-known-as-ascorbate-a-vitamin-found-in-various-foods-image352682652.html> (accessed Dec. 07, 2022).
- [66] S. G. Lee *et al.*, "Validation of Analytical Methods for Plasma Total Antioxidant Capacity by Comparing with Urinary 8-Isoprostane Level," *J Microbiol Biotechnol*, vol. 27, no. 2, pp. 388–394, Feb. 2017, doi: 10.4014/JMB.1604.04053.
- [67] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements," *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 2005, doi: 10.1021/JF0502698/ASSET/IMAGES/LARGE/JF0502698F00008.JPEG.
- [68] H. S. Mohapatra, A. Chatterjee, and P. Kumar, "Characterization of Fibrous Assembly from Lime Peel Extract," *International Journal of Pharmacology*,

Phytochemistry and Ethnomedicine, vol. 1, pp. 27–36, Dec. 2015, doi: 10.18052/WWW.SCIPRESS.COM/IJPPE.1.27.

- [69] “fast FRAP Antioxidant Capacity Assay Kit.” <https://www.cosmobiousa.com/products/fast-frap-antioxidant-capacity-assay-kit> (accessed Dec. 06, 2022).
- [70] N. B. Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin, and M. F. Mahomoodally, “The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 8, pp. 1–39, Aug. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9080709.
- [71] “CUPRAC ASSAY KIT KF01005 250 TESTS 96 well plate”, Accessed: Dec. 06, 2022. [Online]. Available: www.libios.fr
- [72] “DPPH ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAY KIT KF01007 100/200/400 TESTS 96 well plate”.
- [73] A. M. Pisoschi and G. P. Negulescu, “Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, vol. 01, no. 01, 2012, doi: 10.4172/2161-1009.1000106.
- [74] P. Săvescu, “Natural Compounds with Antioxidant Activity-Used in the Design of Functional Foods,” *Functional Foods - Phytochemicals and Health Promoting Potential*, Nov. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.97364.
- [75] “HPLC Complete Guide: All About History, Definition, Principle, Types, Instrumentation, And Applications | Tech-publish.” <https://tech-publish.com/hplc-guide-history-definition-principle-types-instrumentation/> (accessed Oct. 18, 2022).
- [76] R. Verplaetse and J. Tytgat, “Liquid chromatography tandem mass spectrometry in forensic toxicology: what about matrix effects?,” 2011.
- [77] “LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS | Technology Networks.” <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238> (accessed Oct. 20, 2022).

- [78] "Introduction of LC, HPLC, UPLC, MS and LC-MS and Flow Control Techniques-Part II." <https://www.auroraprosci.com/Introduction-of-LC-HPLC-UPLC-MS-and-LC-MS-and-Flow-Control-Techniques-Part-II> (accessed Dec. 04, 2022).
- [79] "Principal Research Interests." <https://www.umass.edu/karbon13/research.htm> (accessed Dec. 06, 2022).
- [80] J. v. Iribarne and B. A. Thomson, "On the evaporation of small ions from charged droplets," *J Chem Phys*, vol. 64, no. 6, p. 2287, Aug. 2008, doi: 10.1063/1.432536.
- [81] "(PDF) LC-MS/MS in forensic toxicology: what about matrix effects?" https://www.researchgate.net/publication/263205281_LC-MSMS_in_forensic_toxicology_what_about_matrix_effects (accessed Dec. 04, 2022).
- [82] D. R. Allen and B. C. McWhinney, "Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications.," *Clin Biochem Rev*, vol. 40, no. 3, pp. 135–146, Aug. 2019, doi: 10.33176/AACB-19-00023.
- [83] I. v. Chernushevich, A. v. Loboda, and B. A. Thomson, "An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 36, no. 8, pp. 849–865, Aug. 2001, doi: 10.1002/JMS.207.
- [84] Gross JH, *Mass Spectrometry A Textbook*, 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2017.
- [85] G. M. H. Thomas W. Burgoyne, "An introduction to ion optics for the mass spectrograph," *Mass Spectrom Rev*, vol. 15, no. 4, pp. 241–259, 1996, Accessed: Oct. 17, 2022. [Online]. Available: [https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1996\)15:4%3C241::AID-MAS2%3E3.0.CO;2-I](https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2787(1996)15:4%3C241::AID-MAS2%3E3.0.CO;2-I)
- [86] K. Sirivibulkovit, S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, "Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis," *Anal Sci*, vol. 34, no. 7, pp. 795–800, 2018, doi: 10.2116/ANALSCI.18P014.
- [87] E. Fotou *et al.*, "Influence of dietary olive paste flour on the performance and oxidative stress in chickens raised in field conditions," *Journal of the Hellenic*

Veterinary Medical Society, vol. 72, no. 3, pp. 3239–3248, Oct. 2021, doi: 10.12681/jhvms.28520.

- [88] P. C. Allen, “Physiological responses of chicken gut tissue to coccidial infection: comparative effects of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on mucosal mass, carotenoid content, and brush border enzyme activity.,” *Poult Sci*, vol. 66, no. 8, pp. 1306–1315, 1987, doi: 10.3382/ps.0661306.
- [89] A. Dal Bosco, S. Mattioli, A. Cartoni Mancinelli, E. Cotozzolo, and C. Castellini, “Extensive rearing systems in poultry production: The right chicken for the right farming system. A review of twenty years of scientific research in Perugia University, Italy,” *Animals*, vol. 11, no. 5, p. 1281, May 2021, doi: 10.3390/ANI11051281/S1.
- [90] A. Mavrommatis *et al.*, “Antioxidant Status of Broiler Chickens Fed Diets Supplemented with Vinification By-Products: A Valorization Approach,” *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 1250*, vol. 10, no. 8, p. 1250, Aug. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10081250.
- [91] C. Romero *et al.*, “Feeding Broiler Chickens with Grape Seed and Skin Meals to Enhance α - and γ -Tocopherol Content and Meat Oxidative Stability,” *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 699*, vol. 10, no. 5, p. 699, Apr. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10050699.
- [92] D. E. Breithaupt, P. Weller, and M. A. Grashorn, “Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis,” *Poult Sci*, vol. 82, no. 3, pp. 395–401, Mar. 2003, doi: 10.1093/PS/82.3.395.
- [93] I. Gheonea *et al.*, “Investigations on thermostability of carotenoids from tomato peels in oils using a kinetic approach,” *J Food Process Preserv*, vol. 44, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1111/jfpp.14303.