



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.3.4.3: Διερεύνηση και τεκμηρίωση του τρόπου δράσης των φυσικών προϊόντων που προέρχονται από φυτικές πηγές, από την αξιοποίηση μεταβολικά τροποποιημένων μικροβιακών βιοεργοστασίων.

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.3.4.3**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ3**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΕΛΜΕΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Πιπεράκης Νικόλαος, Βερβερίδης Φίλιππος, Τραντάς Εμμανουήλ]**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **[Έκθεση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15 - Δεκεμβρίου – 2025]**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: TAEDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη του Έργου	3
Σύνοψη της ΕΕ3	3
Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π3.4.3	3
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	4
2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	5
2.1 Υλικά και μεθοδοι	5
2.2 αποτελέσματα και συζήτηση.....	6
2.2.1. Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών pH.....	6
2.2.2. Προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης buffer	13
2.2.3. Επίδραση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων HT	15
2.2.4. Επίδραση του CuSO₄ στη αντίδραση	16
2.2.5. Εναλλακτικά μόρια (analogs) της HT	18
3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	21
4 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	23
5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	24

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ3

Οι δραστηριότητες της ΕΕ3 περιλαμβάνουν τις βιοδοκιμές αποτελεσματικότητας και τη βελτίωση και ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων και προϊόντων. Κύριες δράσεις της ΕΕ3 περιλαμβάνουν ανάπτυξη και αξιολόγηση καινοτόμων βιοφυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως

- βιοδραστικά μορία ανάπτυξης αντοχής στα φυτά (πεπτίδια, μεταβολίτες),
- φυτοπροστατευτικά φυσικής προέλευσης (εκχυλίσματα, μικροβιακοί μεταβολίτες, «green»),
- νέας γενιάς ελκυστικά και απωθητικά (παγίδες, παρεμπόδιση σύζευξης),
- ανθεκτικές ποικιλίες (και αλληλεπιδράσεις με το οικοσύστημα και τα ωφέλιμα).

Για τα πιο αποτελεσματικά καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά, θα μελετηθούν και οι επιπτώσεις τους σε οργανισμούς μη στόχους (φυσικοί εχθροί, επικονιαστές, υδρόβιοι οργανισμοί, κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών).

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π3.4.3

Το Π3.4.3 αποτελεί συνέχεια της δραστηριότητας του προηγούμενου ΕΚΔ -έργου με το ακρωνύμιο «INNOVA-PROTECT», όπου ο Καθηγητής Φίλιππος Βερβερίδης μαζί με τον Αναπλ. Καθηγητή Εμμανουήλ Τραντά του Τμήματος Γεωπονίας, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών και ως ερευνητές του Ινστιτούτου Αγροδιατροφής & Επιστημών Ζωής (ΙΝΑΖΩ), στο Πανεπιστημιακό Κέντρο Έρευνας & Καινοτομίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου (ΠΑΚΕΚ-ΕΛΜΕΠΑ), δημιούργησαν προδιαγραφές για φυτοπροστατευτικό σκεύασμα και με δυνατότητα αποτελεσματικότητας βιοδιεγέρτη με το όνομα "BIOMORE". Κατόπιν, προχώρησαν σε υποβολή φακέλου πνευματικής κατοχύρωσης του "BIOMORE", αρχικά στο Ευρωπαϊκό Γραφείο Πατεντών (European Patent Office, EPO-Patent pending, EP4374696A1, 2022, Appl. Patent No.: 22386086.7 – 1110), που κατόπιν το Νοέμβριο 2023, επεκτάθηκε σε επίπεδο πατέντας με δυνατότητα παγκόσμιας εμβέλειας WIPO-Patent pending (WO/2024/110666, 2023).

Το "BIOMORE" αφορά φυσικό προϊόν το οποίο προέρχεται από την ελιά, με το μοριακό τρόπο δράσης του να στηρίζεται στο διφαινολικό του δακτύλιο και άλλους συμπαραγόντες. Τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα αξιολογούν

διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της κατά κύριο λόγο εμφανιζόμενης δραστικής ένωσης (H_2O_2 , υπό διερεύνηση και άλλα), όπως η σύνθεση του δ/τος, το pH και η παρουσία πρόσθετων καταλυτών (μεταλλικός συμπάραγοντας υπό μελέτη βελτιστοποίησης) και παράλληλα διερευνώνται οι μηχανισμοί δράσης τους του φυτοπροστατευτικού σκευάσματος "BIOMORE".

Η βασική βιοφαινόλη του σκευάσματος: υδροξυτυροσόλη (HT) είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που προέρχεται από την ελευρωπαΐνη και έχει αντιμικροβιακή δράση. Η αστάθεια αυτού του μορίου σε αλκαλικό pH, παρουσία οξυγόνου (O_2) και μετάλλων μετάπτωσης όπως ο χαλκός (Cu^+) και ο σίδηρος (Fe^+), συνδέεται με την πιθανή παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Οι συστηματικές μελέτες που διερευνούν την εξάρτηση της αποσύνθεσης της HT από το pH, την επίδραση της σύνθεσης του ρυθμιστικού διαλύματος και την παρουσία μεταλλικών ιόντων για τη διαρκή παραγωγή H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου είναι περιορισμένες. Σκοπός της έρευνας είναι ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών pH και ρυθμιστικού διαλύματος για τη διαρκή παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Διεξήχθησαν διάφορες δοκιμές σε εύρος pH 3,15-12,35 παρουσία διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Διαπιστώσαμε ότι το ρυθμιστικό σύστημα K_2HPO_4/KH_2PO_4 έδωσε το βέλτιστο αποτέλεσμα για τη σταδιακή αποικοδόμηση της HT και τη διατήρηση υψηλών επιπέδων H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου σε pH 8,2. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος συνέβαλαν στη διατήρηση υψηλότερων επιπέδων H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις HT, ο σχηματισμός H_2O_2 δεν αυξήθηκε αναλογικά και ο θειικός χαλκός αύξησε αρχικά την παραγωγή, αλλά δεν διατήρησε υψηλά επίπεδα μετά από λίγες ημέρες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η υδροξυτυροσόλη (HT) είναι ένας φυτικός μεταβολίτης που προέρχεται από την ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαΐνης και εντοπίζεται σε πολλά παράγωγα της ελιάς (Romeo et al., 2021). Αποτελεί ένα από τις πιο αντιπροσωπευτικές βιοφαινόλες (Blekas et al., 2002) και έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της διατροφικής και λειτουργικής της αξίας (Granados-Principal et al., 2010). Πλήθος μελετών έχει αναδείξει τις βιολογικές της ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, νευροπροστατευτική, αντιμικροβιακή και αντιική δράση (Karkonić Markonić et al., 2019; Khan & Murphy, 2021; Rai & Kosalec, 2022; Robles-Almazan et al., 2018; Zorić & Kosalec, 2022).

Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ιδιαίτερα σε αλκαλικό pH, η HT υφίσταται οξειδωτική αποδόμηση με παράλληλη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Akagawa et al., 2003; Kitsati et al., 2016; Long et al., 2010; Odiatou et al., 2013). Η αποπρωτονίωση της φαινολικής ομάδας οδηγεί σε σχηματισμό φαινοξειδίου, το οποίο αντιδρά με το οξυγόνο και μέσω ηλεκτρονικών μεταφορών παράγει ριζικά ενδιάμεσα και τελικά H_2O_2 (Akagawa et al., 2003; Odiatou et al., 2013). Επιπλέον, ιόντα μετάλλων όπως Cu^+ και Fe^+ καταλύουν redox αντιδράσεις που αυξάνουν την παραγωγή H_2O_2 (Iwasaki et al., 2011; Sakihama et al., 2002). Πρόσθετες μελέτες έχουν δείξει παραγωγή H_2O_2 από φαινολικές ενώσεις σε καλλιεργητικά υλικά (Long et al., 2010) και αλληλεπίδραση της HT με το όξινο ανθρακικό άλας (Odiatou et al., 2013).

Το H_2O_2 αποτελεί σημαντικό αντιδραστικό ενδιάμεσο του οξυγόνου (Bopitiya et al.,

2021) και λειτουργεί τόσο ως μόριο σηματοδότησης (Veal & Day, 2011; Veal et al., 2007) όσο και ως παράγοντας οξειδωτικού στρες που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες (Demidchik, 2017; Kreslavski et al., 2012). Μέσω της αντίδρασης Fenton σχηματίζονται ρίζες υδροξυλίου, ισχυρά οξειδωτικά που προκαλούν βλάβες σε DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια (Halliwell & Gutteridge, 1992; Juven & Pierson, 1996; Willson, 1978).

Η ελεγχόμενη παραγωγή H_2O_2 αξιοποιείται και για αντιμικροβιακούς σκοπούς, όπως από γαλακτικά βακτήρια που αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων (Kang et al., 2005). Η ευρεία αντιμικροβιακή δράση του H_2O_2 περιορίζεται από τη χαμηλή του σταθερότητα και τη γρήγορη αδρανοποίηση από την καταλάση (Dogan-Guner et al., 2019; Juven & Pierson, 1996). Ωστόσο, ο μικροεγκλεισμός του σε υδρογέλες πυριτίου έχει επιδείξει αυξημένη σταθερότητα και παρατεταμένη αντιμικροβιακή δράση (Dogan-Guner et al., 2019).

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1. Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά:

Η υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol, ACS reagent, $\geq 98\%$), τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, το ρυθμιστικό διάλυμα CAPS, το ρυθμιστικό διάλυμα MOPS, τα ρυθμιστικά διαλύματα Trizma base και Trizma HCl, το ρυθμιστικό διάλυμα Tricine, η πορτοκαλί ξυλενόλη (xylenol orange) και το $CuSO_4$ προμηθεύτηκαν από την Sigma Aldrich Chemical (Σίδνεϊ, Αυστραλία). Τα ρυθμιστικά διαλύματα ανθρακικού προμηθεύτηκαν από την Riedel-de Haën. Το υπερχλωρικό οξύ, 70% (Certified ACS), προμηθεύτηκε από την Fisher Chemical. Ο θειικός σίδηρος αμμωνίου (Ammonium ferrous sulfate, ACS reagent, 99%) προμηθεύτηκε από την Thermo Scientific Chemicals. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (30% w/w) προμηθεύτηκε από την Carlo Erba. Η υδροξυτυροσόλη διαλύθηκε σε μεθανόλη και τα stock διαλύματα διατηρήθηκαν στους $-4^\circ C$ έως τη χρήση.

Μεθοδολογία Προσδιορισμού H_2O_2 και Υδροξυτυροσόλης (HT)

Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FOX PCA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gay και Gebicki (2002). Η τεχνική διαφοροποιείται από την κλασική FOX λόγω χρήσης υπερχλωρικού οξέος ($HClO_4$) αντί θειικού οξέος, προσφέροντας μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων (Gay & Gebicki, 2002). Σε κάθε αντίδραση, 50 μL δείγματος αναμειγνύονταν σε τριπλέτα με 950 μL FOX PCA αντιδραστηρίου και επώαζονταν για 30 λεπτά. Για δείγματα υψηλής συγκέντρωσης, χρησιμοποιούνταν μικρότερα όγκοι, ώστε να διατηρηθούν οι τελικές συγκεντρώσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 560 nm με φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1700. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης H_2O_2 χρησιμοποιήθηκαν εξωτερικές καμπύλες αναφοράς, προσαρμοσμένες σε κάθε buffer και pH.

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της HT πραγματοποιήθηκε με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UHPLC) σε συνδυασμό με τριπλό τετραπολικό φασματομετρητή μάζας (MS/MS, QTRAP 4500, SCIEX). Χρησιμοποιήθηκε αντίστροφη φάση C18 (50 × 2 mm, 4 μm, Synergi Fusion-RP, Phenomenex) σε διάρκεια 8 λεπτών και θερμοκρασία 40 °C. Η κινητή φάση ήταν μίγμα νερού (Α) και μεθανόλης (Β), με ροή 0,6 mL/min. Η HT είχε αναμενόμενο χρόνο κατακράτησης 1,22 min. Η ιοντοποίηση έγινε με electrospray (ESI) σε αρνητικό ιόν και οι συνθήκες MS/MS (MRM transitions) καθορίστηκαν με έγχυση προτύπων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλη επτά σημείων (5–500 μg/mL, $r^2 > 0,99$) και ακρίβεια 94–99% (SCIEX OS software, 2023).

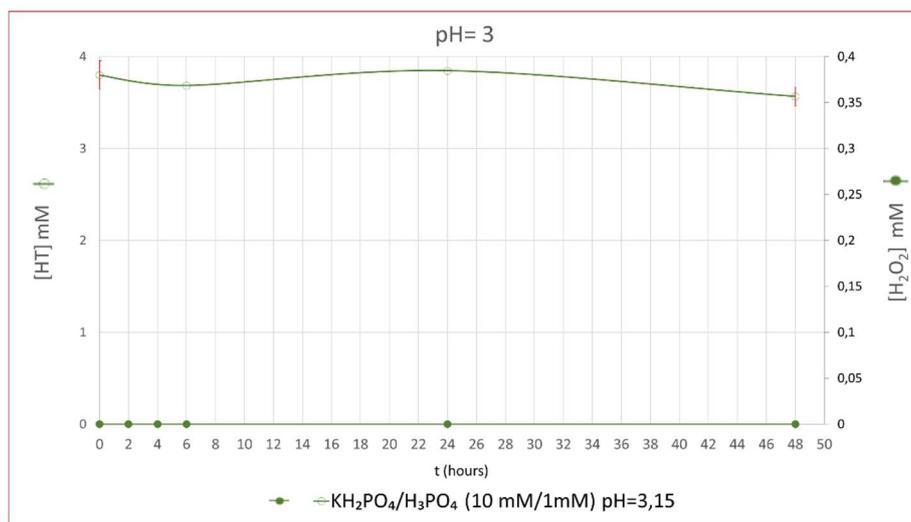
Πίνακας Π3.4.3.1: Οι μεταβάσεις MRM που παρακολουθήθηκαν (μάζες Q1 και Q3) στο MS/MS module (QTRAP 4500, SCIEX) καθώς και οι συνθήκες της μεθόδου απόκτησης δεδομένων (χρόνος παραμονής/dwell time, δυναμικό αποσυσσώματωσης/declustering potential, DP, δυναμικό εισόδου/entrance potential, EP, ενέργεια σύγκρουσης/collision energy, CE, δυναμικό εξόδου κυτταρικής σύγκρουσης/collision cell exit potential, CXP).

Analyte	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	Dwell time (msec)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Hydroxytyrosol (quantitation)	153.00	123.00	50.0	- 25.00	- 10.00	- 22.00	-9.00
Hydroxytyrosol (qualification)	153.00	95.00	50.0	- 25.00	- 10.00	- 26.00	-9.00

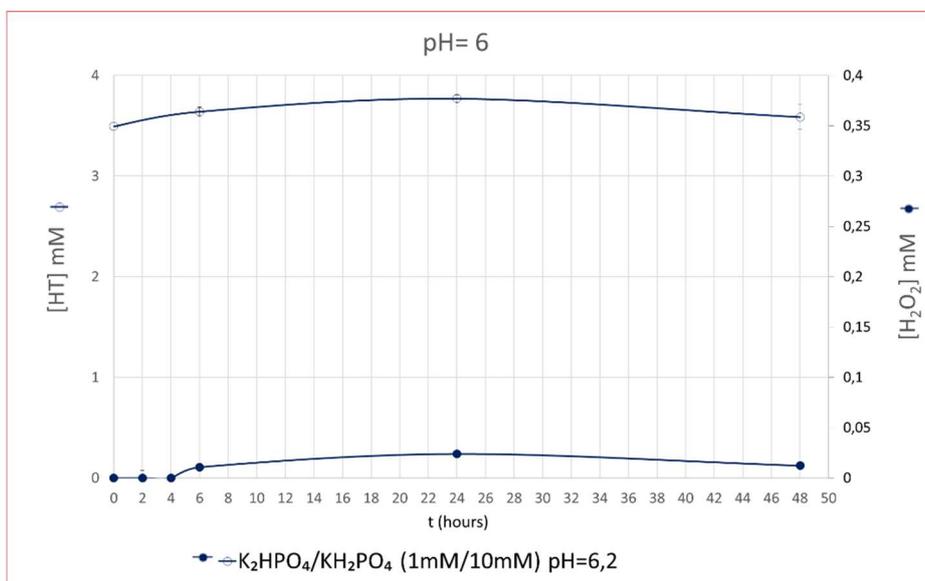
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

2.2.1. Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών pH

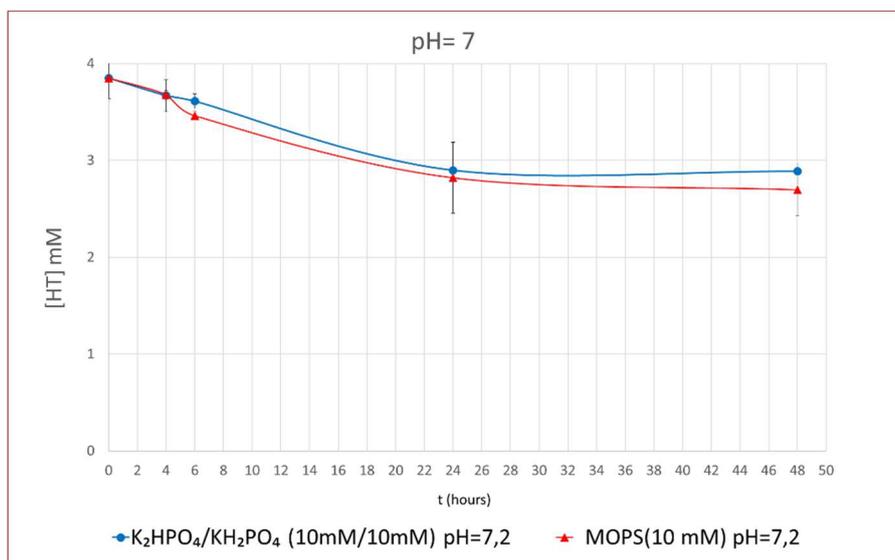
Πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δοκιμές διάσπασης της υδροξυτυροσόλης (HT) σε εύρος pH 3,15–12,35 παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων: H₃PO₄/KH₂PO₄ (pKa 2,15), K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pKa 7,2), MOPS (pKa 7,2), Trizma HCl (pKa 8,1), Trizma base (pKa 8,1), Tricine (pKa 8,1), CAPS (pKa 10,4), K₃PO₄/KH₂PO₄ (pKa 12,35). Κάθε buffer παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 10 mM και ρυθμίστηκε στο pH κοντά στο pKa του για εξασφάλιση σταθερής ρυθμιστικής ικανότητας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Οι αρχικές συγκεντρώσεις της HT ήταν 500–600 μg/mL (3,24–3,89 mM, με βάση το μοριακό βάρος 154,16 g/mol). Οι ακριβείς αρχικές συγκεντρώσεις της HT παρέχονται στον Πίνακα Π3.4.3.3.



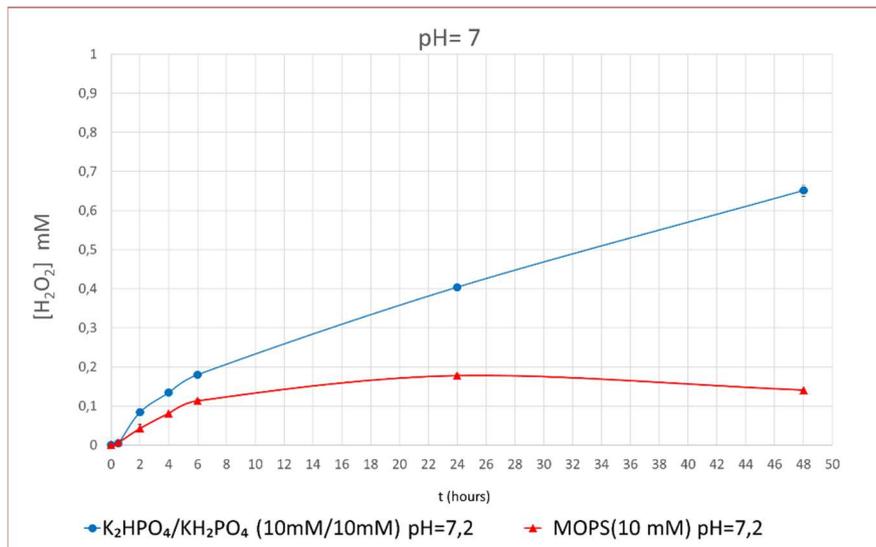
Εικόνα Π3.4.3.1. Η διάσπαση της HT στην πάροδο του χρόνου (ανοικτοί κύκλοι) και παραγωγή H₂O₂ (κλειστοί κύκλοι) σε ρυθμιστικό διάλυμα KH₂PO₄/H₃PO₄ (10 mM/1 mM), pH=3.



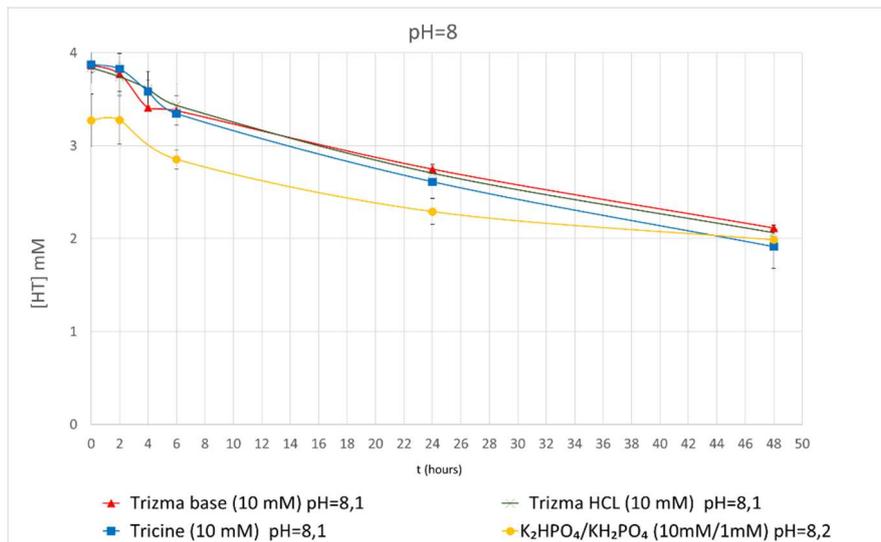
Εικόνα Π3.4.3.2. Η διάσπαση της HT στην πάροδο του χρόνου (ανοικτοί κύκλοι) και παραγωγή H₂O₂ (κλειστοί κύκλοι) σε ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄ (1 mM/10 mM), pH=6.



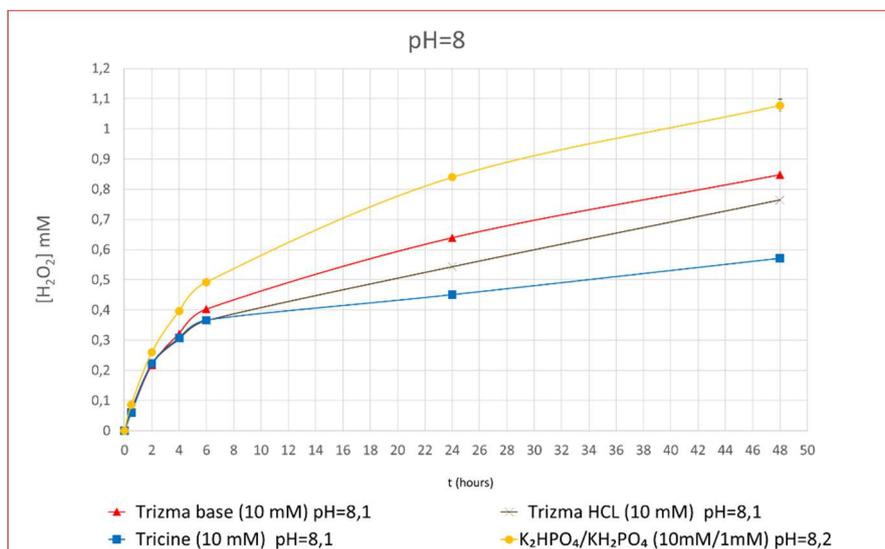
Εικόνα Π3.4.3.3. Η διάσπαση της HT στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄ (10 mM/10 mM) (κύκλοι) και MOPS (10 mM) (τρίγωνα) σε pH=7.



Εικόνα Π3.4.3.4. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄ (10 mM/10 mM) (κύκλοι) και MOPS (10 mM) (τριγωνα) σε pH=7.

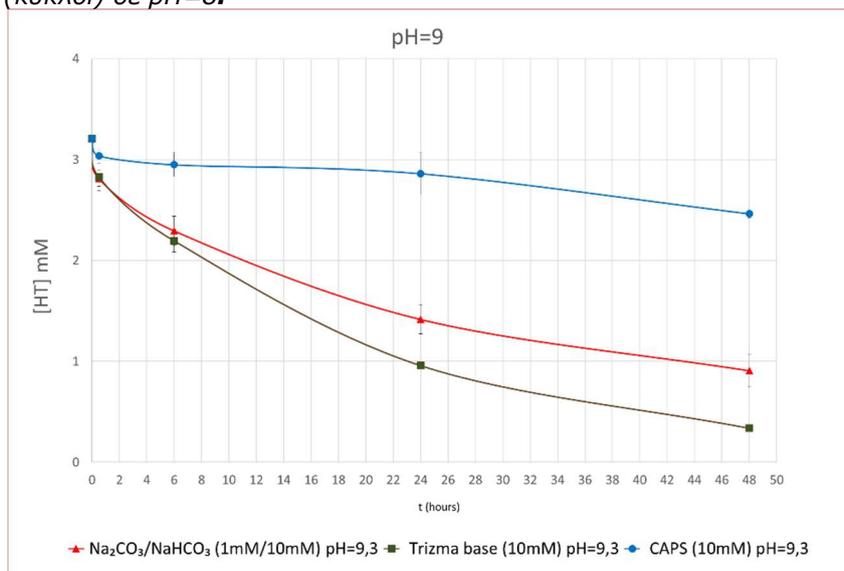


Εικόνα Π3.4.3.5. Η διάσπαση της HT στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Trizma base (10 mM) (τριγωνα), Trizma HCl (10 mM) (σταυροί), Tricine (10 mM) (τετράγωνα) και K₂HPO₄/KH₂PO₄ (10 mM/10 mM) (κύκλοι) σε pH=8

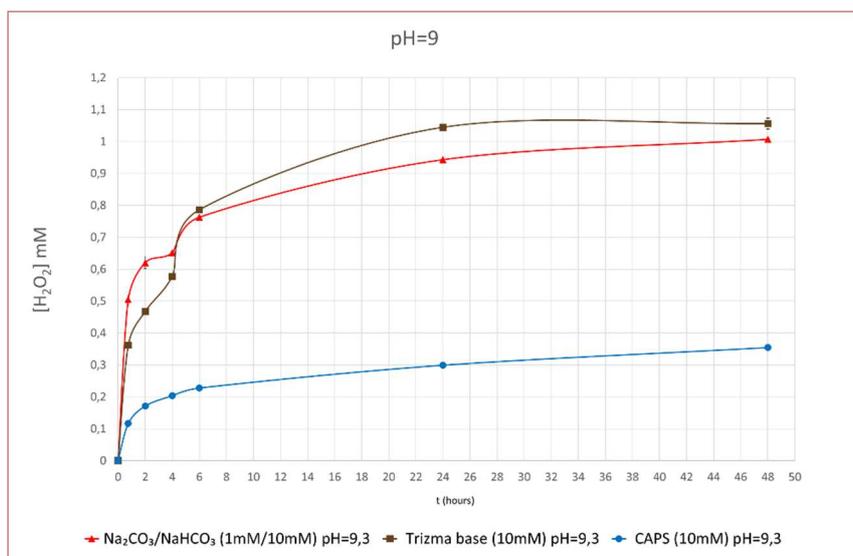


Εικόνα Π3.4.3.6. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Trizma base (10 mM) (τριγωνα), Trizma HCl (10 mM) (σταυροί), Tricine (10 mM) (τετράγωνα) και K₂HPO₄/KH₂PO₄

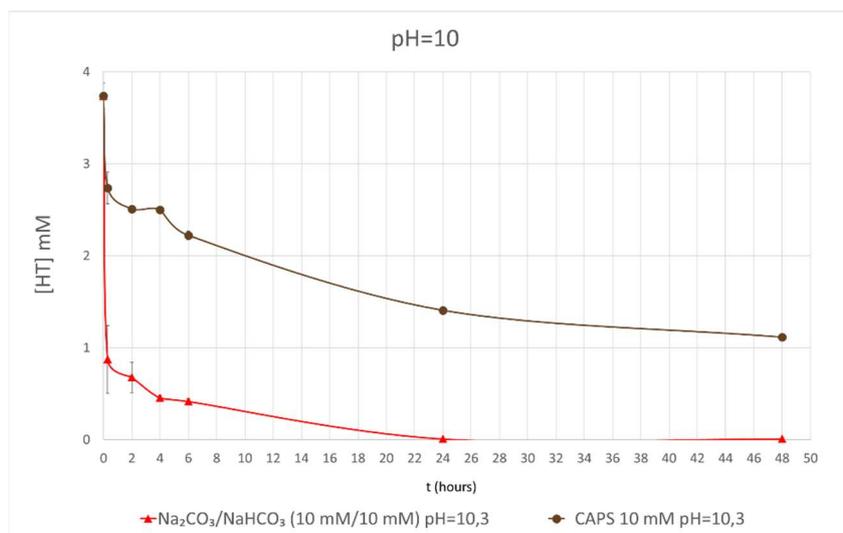
(10 mM/10 mM) (κύκλοι) σε pH=8.



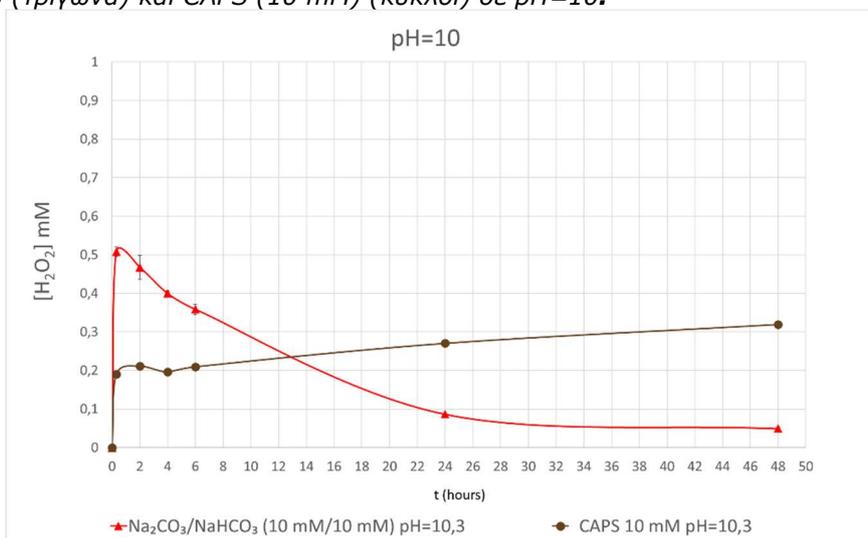
Εικόνα Π3.4.3.7. Η διάσπαση της ΗΤ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Na₂CO₃/NaHCO₃ (1 mM/10 mM) (τρίγωνα), Trizma base (10 mM) (τετράγωνα) και CAPS (10 mM) (κύκλοι) σε pH=9.



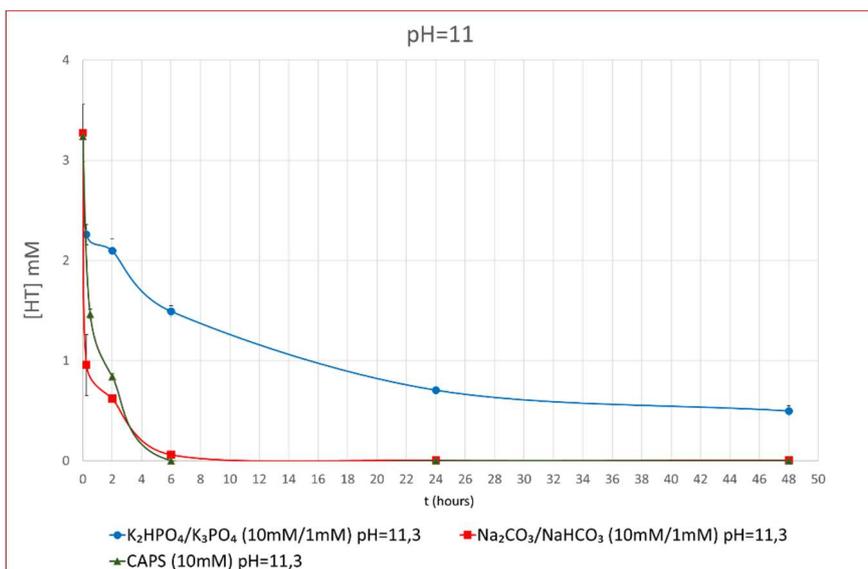
Εικόνα Π3.4.3.8. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Na₂CO₃/NaHCO₃ (1 mM/10 mM) (τρίγωνα), Trizma base (10 mM) (τετράγωνα) και CAPS (10 mM) (κύκλοι) σε pH=9.



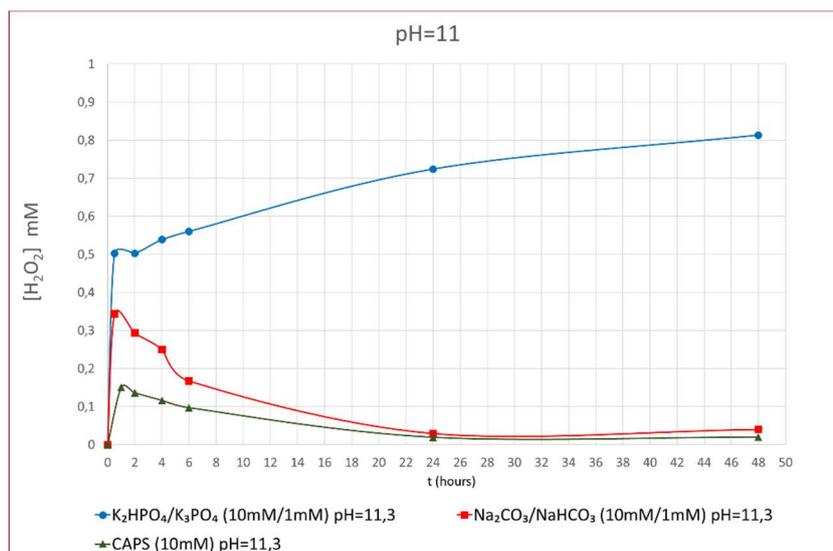
Εικόνα Π3.4.3.9. Η διάσπαση της ΗΤ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Na₂CO₃/NaHCO₃ (10 mM/10 mM) (τρίγωνα) και CAPS (10 mM) (κύκλοι) σε pH=10.



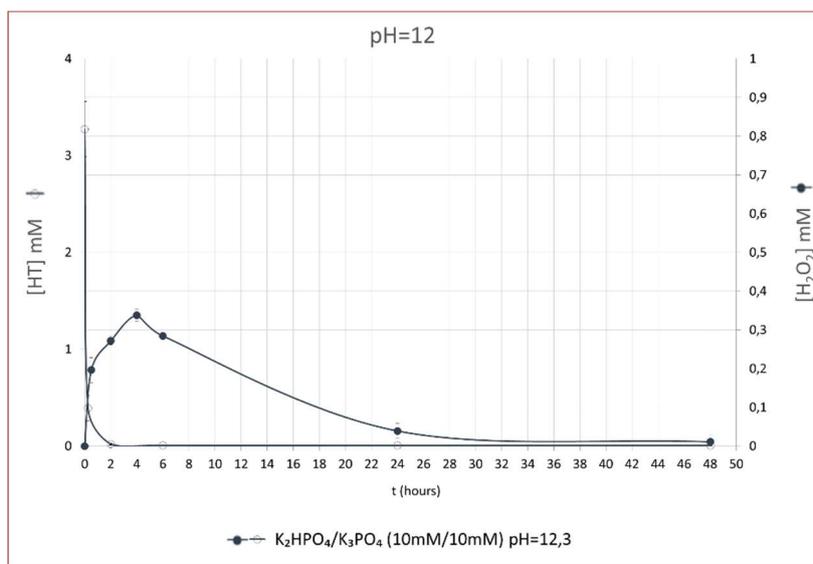
Εικόνα Π3.4.3.10. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα Na₂CO₃/NaHCO₃ (10 mM/10 mM) (τρίγωνα) και CAPS (10 mM) (κύκλοι) σε pH=10.



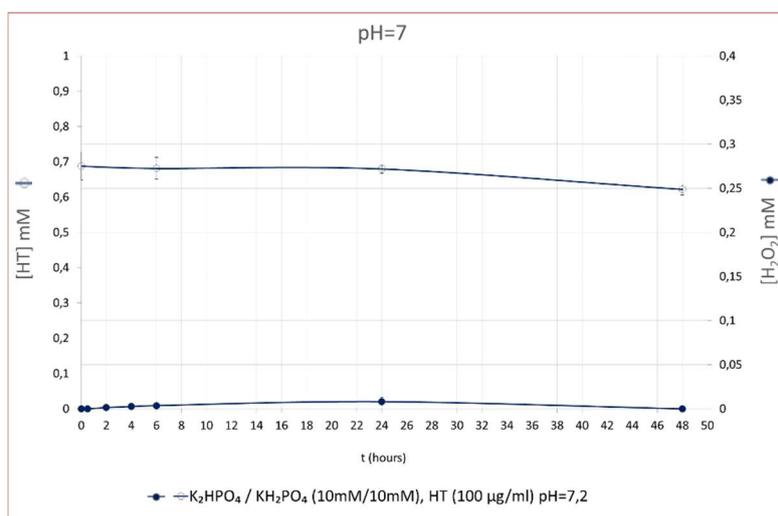
Εικόνα Π3.4.3.11. Η διάσπαση της ΗΤ στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα K₂HPO₄/K₃PO₄ (10 mM/1 mM) (κύκλοι), Na₂CO₃/NaHCO₃ (10 mM/1 mM) (τετράγωνα) και CAPS (10 mM) (τρίγωνα) σε pH=11.



Εικόνα Π3.4.3.12. Η παραγωγή H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα K_2HPO_4/K_3PO_4 (10 mM/1 mM) (κύκλοι), $Na_2CO_3/NaHCO_3$ (10 mM/1 mM) (τετράγωνα) και CAPS (10 mM) (τρίγωνα) σε pH=11.

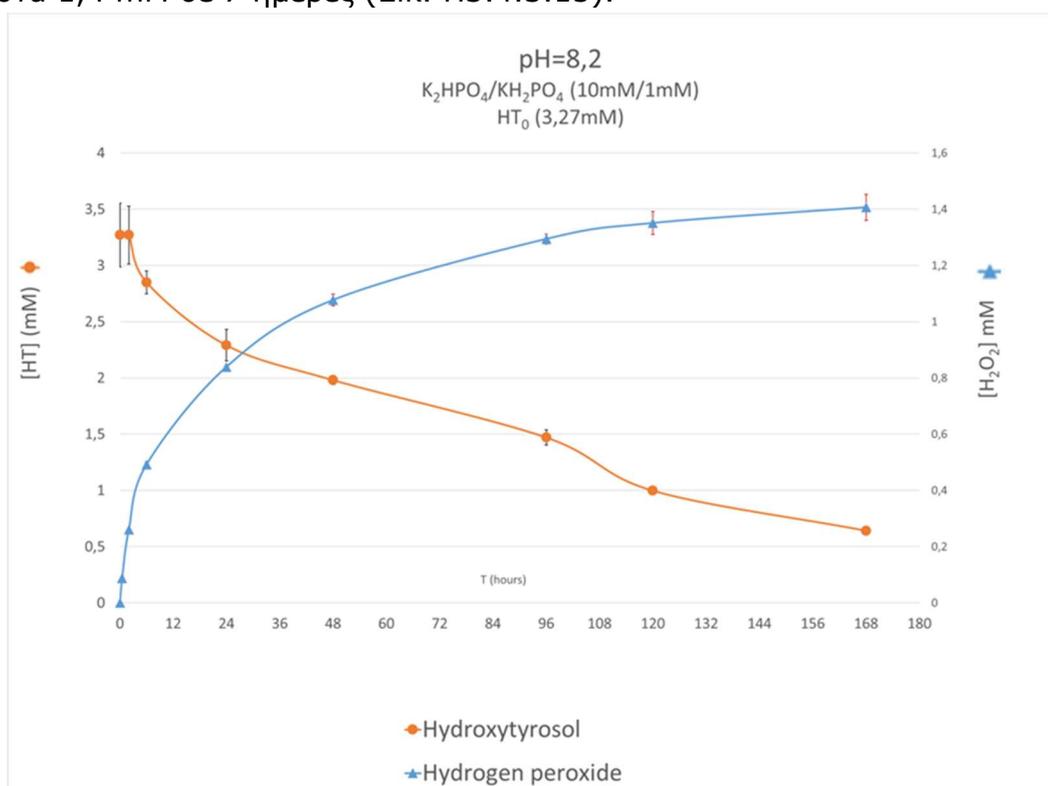


Εικόνα Π3.4.3.13. Η διάσπαση της HT (ανοικτοί κύκλοι) και η παραγωγή H_2O_2 (κλειστοί κύκλοι) σε ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4/K_3PO_4 (10 mM/10 mM) σε pH=12.



Εικόνα Π3.4.3.14. Η διάσπαση της HT στην πάροδο του χρόνου (ανοικτοί κύκλοι) και η παραγωγή H_2O_2 (κλειστοί κύκλοι) σε pH=7 με αρχική συγκέντρωση $HT_0 = 100 \mu\text{g/mL}$.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντίδραση ξεκινά σε $\text{pH} \geq 7,2$ (Εικ. Π3.4.3.3, Π3.4.3.4) και εξελίσσεται μόνο σε συγκεντρώσεις $[\text{HT}] > 0,7 \text{ mM}$ (Εικ. Π3.4.3.14). Σε $\text{pH} 7$, το buffer φωσφορικού καλίου έδειξε υψηλότερη παραγωγή H_2O_2 από το MOPS, παρά την παρόμοια πορεία διάσπασης HT (Εικ. Π3.4.3.3, Π3.4.3.4). Σε $\text{pH} 8$, το buffer φωσφορικού καλίου έδειξε υψηλότερη παραγωγή H_2O_2 από Trizma base, Trizma HCl και Tricine, αν και το ποσοστό HT που καταναλώθηκε στις 24 ώρες ήταν ελαφρώς μικρότερο (Εικ. Π3.4.3.5, Π3.4.3.6). Σε $\text{pH} 9$, το CAPS παρουσίασε μικρότερη παραγωγή H_2O_2 από το ανθρακικό νάτριο και Trizma base, σύμφωνα με τα χαμηλότερα επίπεδα διάσπασης HT (Εικ. Π3.4.3.7, Π3.4.3.8). Σε αλκαλικά $\text{pH} > 10$, η διάσπαση HT ήταν ταχύτερη αλλά η παραγωγή H_2O_2 μικρότερη από τις προηγούμενες εφαρμογές. Στο $\text{pH} 10$ με ανθρακικό νάτριο παρατηρήθηκε γρήγορη διάσπαση HT σε 20 λεπτά, αλλά η παραγωγή H_2O_2 παρέμεινε χαμηλή και σχεδόν μηδενική στις 24 ώρες (Εικ. Π3.4.3.9, Π3.4.3.10). Στο ίδιο pH , το CAPS έδειξε σχετικά μικρή αλλά υψηλότερη παραγωγή H_2O_2 από το ανθρακικό νάτριο που συμβαδίζει με τα χαμηλότερα επίπεδα διάσπασης HT. Στο $\text{pH} 11$, η διάσπαση HT ήταν έντονη τόσο στο ανθρακικό buffer όσο και στο CAPS, αλλά τα επίπεδα H_2O_2 μηδενίστηκαν στις 24 ώρες (Εικ. Π3.4.3.11, Π3.4.3.12). Στο ίδιο pH , το buffer φωσφορικού καλίου παρουσίασε σταδιακή αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , χαμηλότερη όμως από $\text{pH} 8,2$. Στο $\text{pH} 12$, η διάσπαση HT με το buffer φωσφορικού καλίου ήταν σχεδόν πλήρης στις 2 ώρες, ενώ η παραγωγή H_2O_2 παρέμεινε χαμηλή και μηδενίστηκε στις 24 ώρες (Εικ. Π3.4.3.13). Συμπερασματικά, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου στο $\text{pH} 8,2$ προσέφερε βέλτιστο αποτέλεσμα για σταδιακή διάσπαση HT και διατήρηση υψηλών επιπέδων H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου. Μετά από 48 ώρες καταναλώθηκε μόνο το 40% της αρχικής HT, ενώ τα επίπεδα H_2O_2 συνέχισαν να αυξάνονται (Εικ. Π3.4.3.5, Π3.4.3.6). Η μέγιστη συγκέντρωση H_2O_2 έφτασε στα 1,4 mM σε 7 ημέρες (Εικ. Π3.4.3.15).



Εικόνα Π3.4.3.15. Τα επίπεδα $[\text{HT}]$ (mM) (κύκλοι) και $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mM) (τρίγωνα) κατά τη διάρκεια σταδιακής αντίδρασης σε $\text{pH}=8,2$ με αρχική $[\text{HT}]_0 = 3,2 \text{ mM}$

Πίνακας Π3.4.3.2. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις H_2O_2 (mM) στην πάροδο του χρόνου πραγματοποίησης της αντίδρασης στα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα

Buffer	pKa	pH	[H_2O_2] (mM)				Trend of the curve at 48 h	Αντίστοιχη Εικόνα
			2 h	6 h	24 h	48 h		
H_3PO_4/KH_2PO_4	2,15	3,15	0,00	0,00	0,00	0,00	-	Π3.4.3.1.
K_2HPO_4/KH_2PO_4	7,20	6,20	0,00	0,01	0,02	0,01	Flattening curve	Π3.4.3.2.
MOPS	7,20	7,20	0,04	0,11	0,18	0,14	Flattening curve	Π3.4.3.4.
KH_2PO_4/KH_2PO_4	7,20	7,20	0,08	0,18	0,40	0,65	Ascending curve	Π3.4.3.4.
Trizma base	8,06	8,10	0,22	0,40	0,64	0,85	Ascending curve	Π3.4.3.6.
Trizma HCL	8,10	8,10	0,22	0,36	0,54	0,76	Ascending curve	Π3.4.3.6.
Tricine	8,15	8,10	0,22	0,37	0,45	0,57	Ascending curve	Π3.4.3.6.
K_2HPO_4/KH_2PO_4	7,20	8,20	0,26	0,49	0,84	1,07	Optimal Ascending curve	Π3.4.3.6.
Trizma base	8,06	9,30	0,47	0,79	1,04	1,05	Flattening curve	Π3.4.3.8.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	9,30	0,62	0,76	0,94	1,00	Flattening curve	Π3.4.3.8.
CAPS	10,30	9,30	0,17	0,23	0,30	0,35	Flattening curve	Π3.4.3.8.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	10,30	0,47	0,36	0,09	0,05	Descending curve	Π3.4.3.10.
CAPS	10,30	10,30	0,21	0,21	0,27	0,32	Flattening curve	Π3.4.3.10.
KH_2PO_4/K_3PO_4	12,35	11,30	0,50	0,56	0,72	0,81	Ascending curve	Π3.4.3.12.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	11,30	0,29	0,17	0,03	0,04	Descending curve	Π3.4.3.12.
CAPS	10,30	11,30	0,14	0,10	0,02	0,02	Descending curve	Π3.4.3.12.
KH_2PO_4/K_3PO_4	12,35	12,30	0,27	0,28	0,04	0,01	Descending curve	Π3.4.3.13.

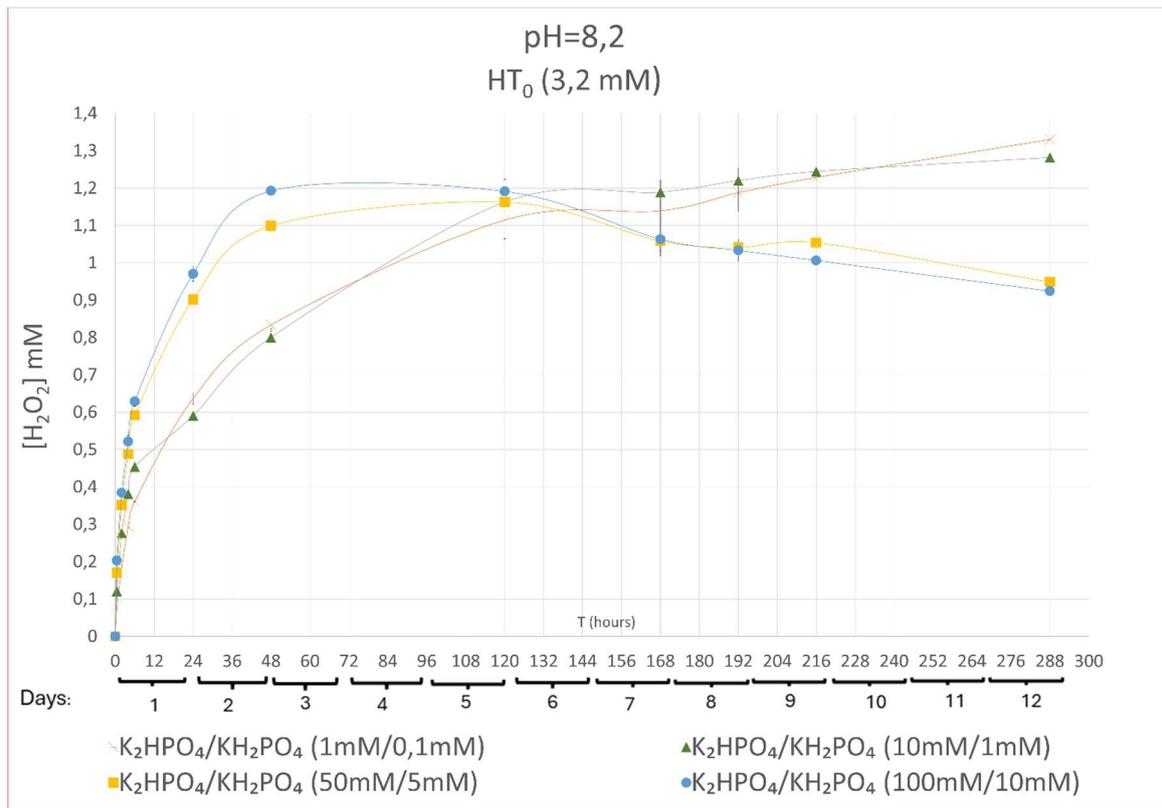
Πίνακας Π3.4.3.3. Οι ακριβείς συγκέντρωση HT (mM) στην πάροδο του χρόνου πραγματοποίησης της αντίδρασης στα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα

Buffer	pKa	pH	[HT] (mM)				Trend of the curve at 48 h	Εικόνα
			Initial	6 h	24 h	48 h		
H_3PO_4/KH_2PO_4	2,15	3,15	3,79	3,69	3,85	3,57	-	Π3.4.3.1.
K_2HPO_4/KH_2PO_4	7,20	6,20	3,49	3,64	3,77	3,59	Descending curve	Π3.4.3.2.
MOPS	7,20	7,20	3,85	3,46	2,82	2,69	Descending curve	Π3.4.3.3.
KH_2PO_4/KH_2PO_4	7,20	7,20	3,85	3,61	2,89	2,88	Descending curve	Π3.4.3.3.
Trizma base	8,06	8,10	3,86	3,38	2,74	2,11	Descending curve	Π3.4.3.5.
Trizma HCL	8,10	8,10	3,83	3,43	2,70	2,06	Descending curve	Π3.4.3.5.
Tricine	8,15	8,10	3,87	3,35	2,61	1,91	Descending curve	Π3.4.3.5.
K_2HPO_4/KH_2PO_4	7,20	8,20	3,27	2,86	2,29	1,98	Descending curve/ Better preserved HT	Π3.4.3.5.
Trizma base	8,06	9,30	3,20	2,19	0,95	0,34	Descending curve	Π3.4.3.7.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	9,30	3,20	2,29	1,41	0,90	Descending curve	Π3.4.3.7.
CAPS	10,30	9,30	3,20	2,95	2,86	2,46	Descending curve	Π3.4.3.7.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	10,30	3,74	0,42	0,01	0,01	Descending curve	Π3.4.3.9.
CAPS	10,30	10,30	3,74	2,22	1,40	1,11	Descending curve	Π3.4.3.9.
KH_2PO_4/K_3PO_4	12,35	11,30	3,27	1,49	0,70	0,49	Descending curve	Π3.4.3.11.
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,30	11,30	3,27	0,06	0,00	0,01	Descending curve	Π3.4.3.11.
CAPS	10,30	11,30	3,24	0,05	0,00	0,00	Descending curve	Π3.4.3.11.
KH_2PO_4/K_3PO_4	12,35	12,30	3,27	0,01	0,01	0,01	Descending curve	Π3.4.3.12.

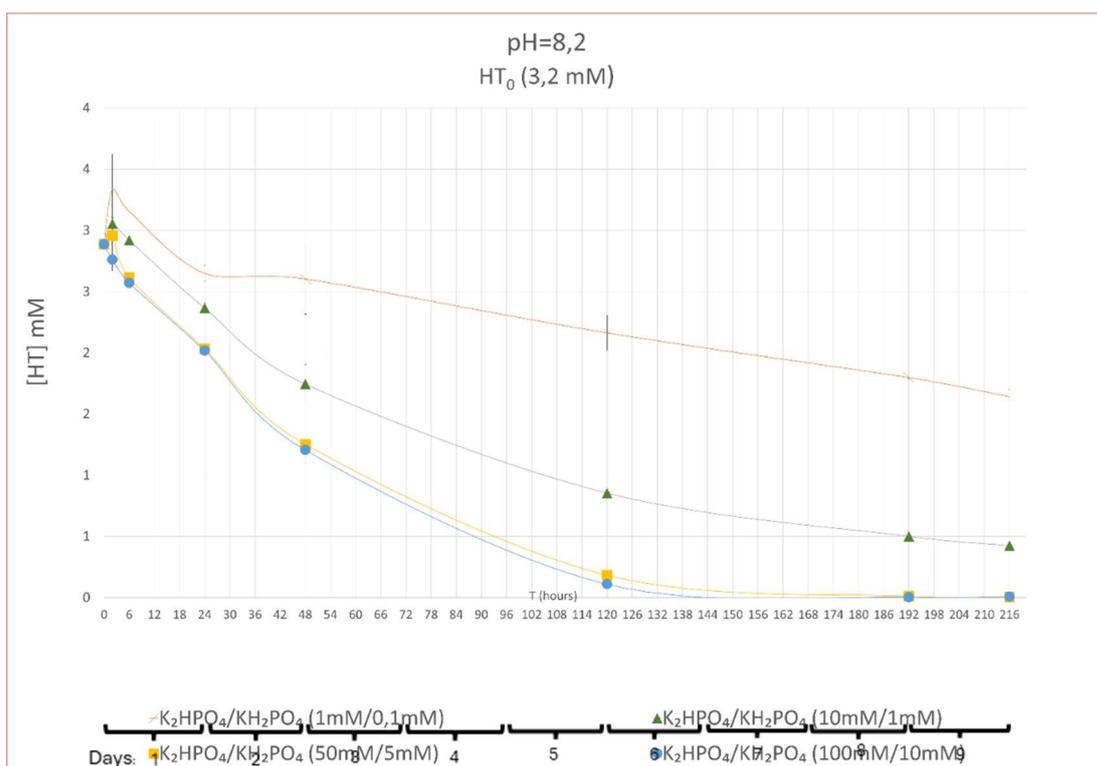
2.2.2. Προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης buffer

Στο επόμενο πείραμα, δοκιμάστηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις K_2HPO_4/KH_2PO_4 στο pH 8,2: 1/0,1 mM, 10/1 mM, 50/5 mM και 100/10 mM. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (50/5 και 100/10 mM) προκάλεσαν ταχύτερη διάσπαση HT και υψηλότερα επίπεδα

H₂O₂ έως 120 ώρες. Μετά το διάστημα αυτό παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση, συμβαδίζοντας με την πλήρη κατανάλωση της HT. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις (1/0,1 και 10/1 mM) οδήγησαν σε βραδύτερη διάσπαση της HT και παραγωγή H₂O₂, αλλά τα επίπεδα συνέχισαν να αυξάνονται μετά τις 120 ώρες λόγω διαθεσιμότητας της HT.



Εικόνα Π3.4.3.16. Χρονική εξέλιξη της παραγωγής H₂O₂ (mM) σε pH=8,2 με αρχική συγκέντρωση HT₀ = 3,2 mM, ως συνάρτηση διαφορετικών συγκεντρώσεων του ρυθμιστικού διαλύματος K₂HPO₄/KH₂PO₄:

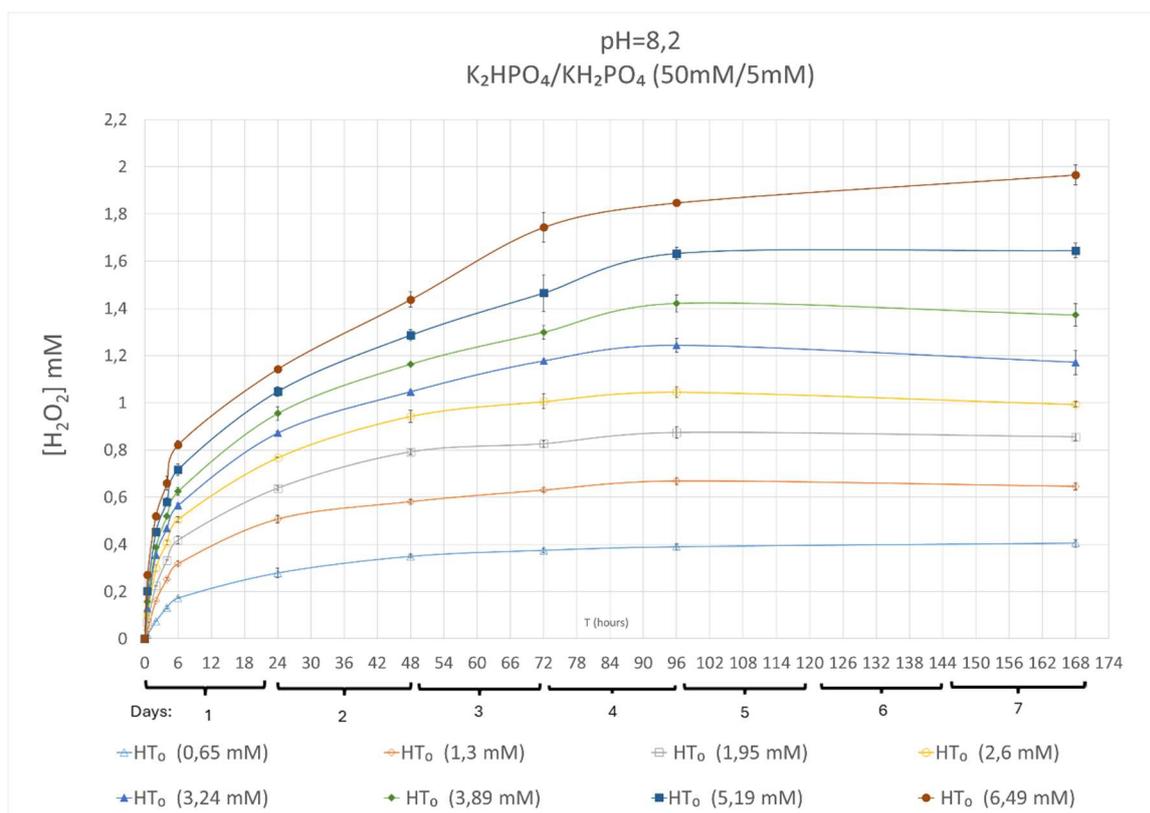


(1 mM / 0,1 mM) (σταυροί), (10 mM / 1 mM) (τρίγωνα), (50 mM / 5 mM) (τετράγωνα), (100 mM / 10 mM) (κύκλοι).

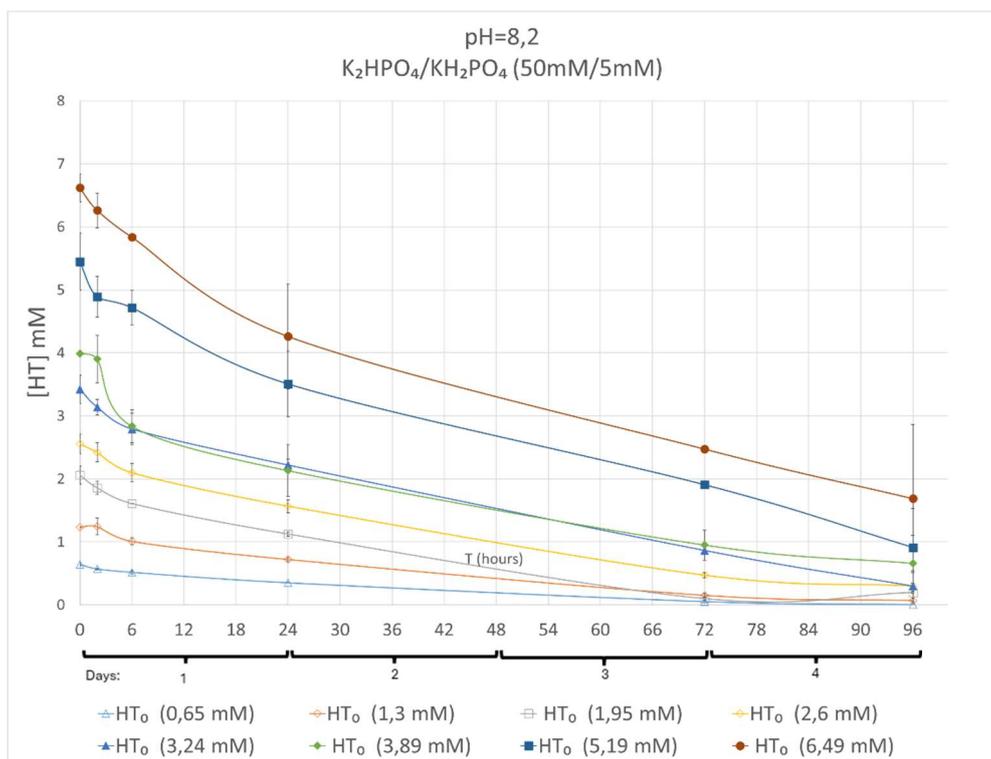
Εικόνα Π3.4.3.17. Χρονική εξέλιξη της αποδόμησης της HT (mM) σε pH=8,2 με αρχική συγκέντρωση $HT_0 = 3,2 \text{ mM}$, ως συνάρτηση διαφορετικών συγκεντρώσεων του ρυθμιστικού διαλύματος K_2HPO_4/KH_2PO_4 : (1 mM / 0,1 mM) (σταυροί), (10 mM / 1 mM) (τρίγωνα), (50 mM / 5 mM) (τετράγωνα), (100 mM / 10 mM) (κύκλοι).

2.2.3. Επίδραση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων HT

Στο επόμενο πείραμα, δοκιμάστηκαν οκτώ αρχικές συγκεντρώσεις HT (0,65-6,49 mM) σε buffer φωσφορικού καλίου με pH 8,2. Η παραγωγή H_2O_2 αυξανόταν με την αύξηση της [HT]. Για $[HT] < 2,6 \text{ mM}$, η $[H_2O_2]$ παρέμενε $< 1 \text{ mM}$. Σε $[HT] \geq 2,6 \text{ mM}$ η αντίδραση έγινε σημαντικά πιο παραγωγική, ενώ σε $[HT] = 6,49 \text{ mM}$ η $[H_2O_2]$ έφτασε $\sim 2 \text{ mM}$ και συνέχισε να αυξάνεται έως 7 ημέρες (Εικ. Π3.4.3.18- Π3.4.3.19). Η παραγωγή H_2O_2 δεν αυξανόταν αναλογικά σε πολύ υψηλές [HT], υποδεικνύοντας κορεσμό του οξειδωτικού μηχανισμού.



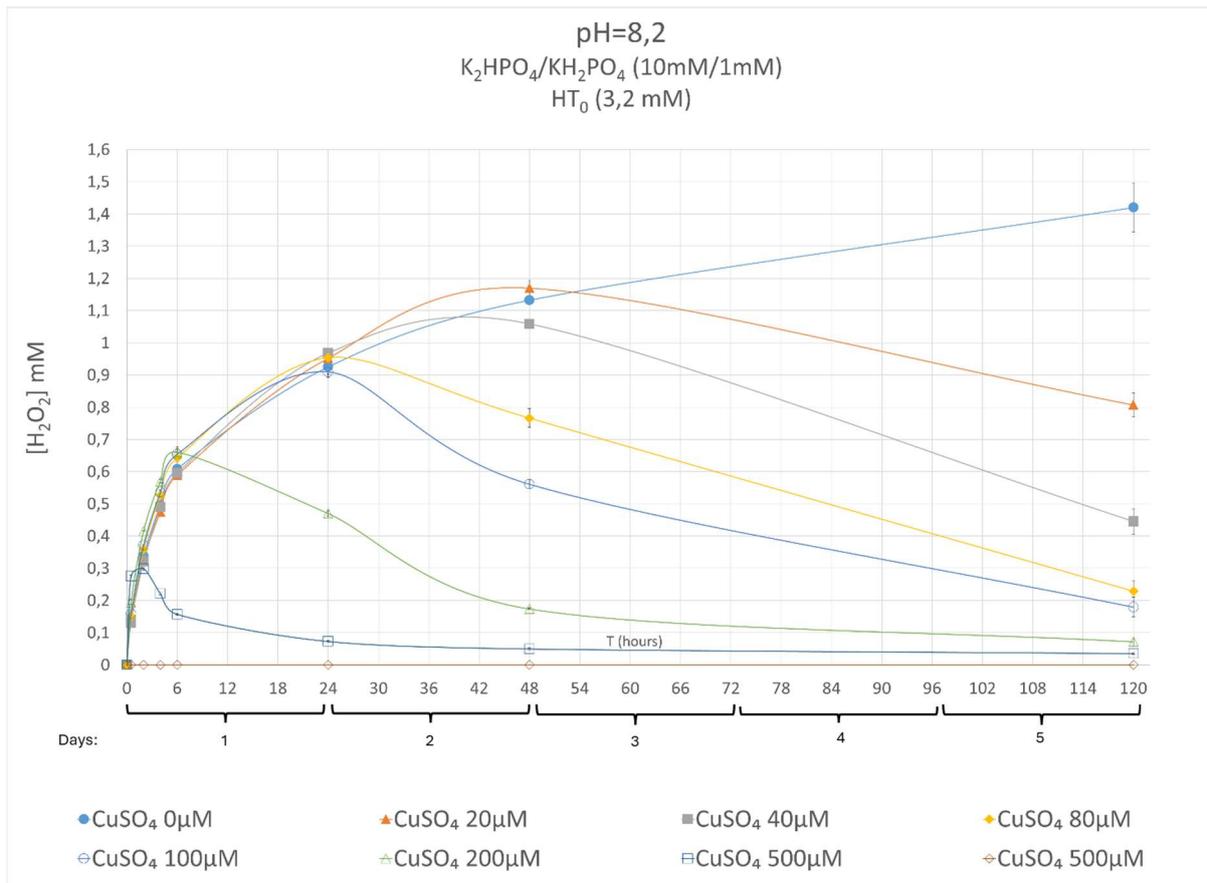
Εικόνα Π3.4.3.18. Χρονική εξέλιξη της παραγωγής H_2O_2 (mM) σε pH 8,2 (ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 50 mM/5 mM) ως συνάρτηση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων [HT]₀: 0,65 mM (κενά τρίγωνα), 1,3 mM (κενοί ρόμβοι), 1,95 mM (κενά τετράγωνα), 2,6 mM (κενοί κύκλοι), 3,24 mM (γεμάτα τρίγωνα), 3,89 mM (γεμάτοι ρόμβοι), 5,19 mM (γεμάτα τετράγωνα), 6,49 mM (γεμάτοι κύκλοι)



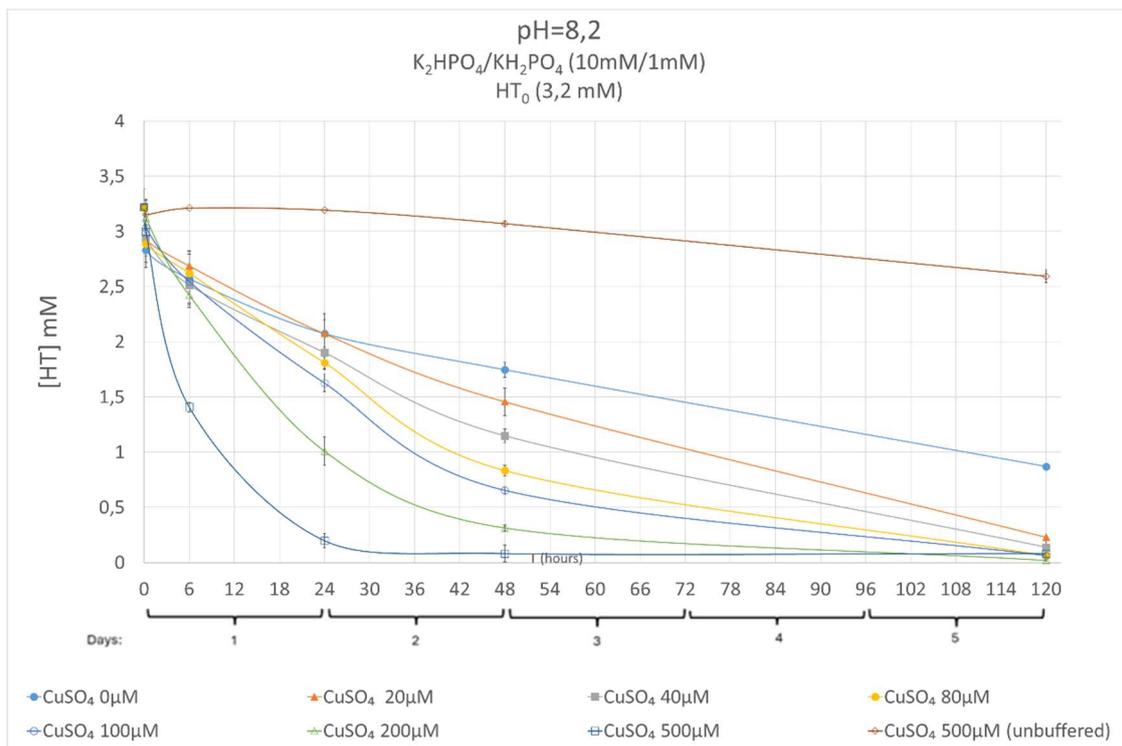
Εικόνα Π3.4.3.19. Χρονική εξέλιξη της αποδόμησης τη HT (mM) σε pH 8,2 (ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50 mM/5 mM) ως συνάρτηση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων [HT]₀: 0,65 mM (κενά τρίγωνα), 1,3 mM (κενοί ρόμβοι), 1,95 mM (κενά τετράγωνα), 2,6 mM (κενοί κύκλοι), 3,24 mM (γεμάτα τρίγωνα), 3,89 mM (γεμάτοι ρόμβοι), 5,19 mM (γεμάτα τετράγωνα), 6,49 mM (γεμάτοι κύκλοι)

2.2.4. Επίδραση του CuSO₄ στη αντίδραση

Στο επόμενο πείραμα δοκιμάστηκαν έξι συγκεντρώσεις CuSO₄ (20, 40, 80, 100, 200, 500 μM) σε pH 8,2, καθώς και μία εφαρμογή CuSO₄ 500 μM χωρίς buffer. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το Cu²⁺ επιταχύνει την αντίδραση στις πρώτες ώρες, αλλά μετά τις 48 ώρες μειώνει τη [H₂O₂], ακόμα και με σημαντική ποσότητα διαθέσιμης HT. Στην εφαρμογή CuSO₄ 500 μM με φωσφορικό buffer, η [H₂O₂] άρχισε να μειώνεται σε 2 ώρες ενώ η HT δεν είχε καταναλωθεί πλήρως (Εικ. Π3.4.3.21). Χωρίς buffer, το CuSO₄ προκάλεσε μικρή διάσπαση της HT χωρίς παραγωγή H₂O₂ (Εικ. Π3.4.3.20).



Εικόνα Π3.4.3.20. Χρονική εξέλιξη της παραγωγής H₂O₂ (mM) σε διαφορετικές εφαρμογές με ή χωρίς CuSO₄, με αρχική συγκέντρωση HT₀ = 3,2 mM. Το CuSO₄ προστέθηκε σε pH 8,2 (ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 mM/1 mM), σε συγκεντρώσεις 20 μM (γεμάτα τρίγωνα), 40 μM (γεμάτα τετράγωνα), 80 μM (γεμάτοι ρόμβοι), 100 μM (κενοί κύκλοι), 200 μM (κενά τρίγωνα), 500 μM (κενά τετράγωνα) και 0 μM (γεμάτοι κύκλοι). Με κενό ρόμβο συμβολίζεται η εφαρμογή χωρίς buffer με 500 μM CuSO₄)

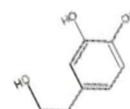


Εικόνα Π3.4.3.21. Χρονική εξέλιξη της αποδόμησης της HT (mM) σε διαφορετικές εφαρμογές με ή χωρίς CuSO_4 , με αρχική συγκέντρωση $\text{HT}_0 = 3,2 \text{ mM}$. Το CuSO_4 προστέθηκε σε pH 8,2 (ρυθμιστικό διάλυμα $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 mM/1 mM), σε συγκεντρώσεις 20 μM (γεμάτα τρίγωνα), 40 μM (γεμάτα τετράγωνα), 80 μM (γεμάτοι ρόμβοι), 100 μM (κενοί κύκλοι), 200 μM (κενά τρίγωνα), 500 μM (κενά τετράγωνα) και 0 μM (γεμάτοι κύκλοι). Με κενό ρόμβο συμβολίζεται η εφαρμογή χωρίς buffer με 500 μM CuSO_4

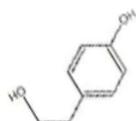
2.2.5. Εναλλακτικά μόρια (analogs) της HT

Στο επόμενο πείραμα που ακολούθησε, δοκιμάστηκαν εναλλακτικά φαινολικά μόρια ως δραστική ουσία της αντίδρασης.

Ειδικότερα, εξετάστηκαν τα παρακάτω δομικά ανάλογα μόρια της HT:

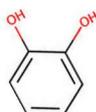


- Tyrosol → ίδια δομή χωρίς το 2ο -OH



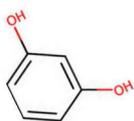
δεν αντέδρασε

- Catechol → βασική κατάχλομή (διυδροξυ-βενζόλιο)



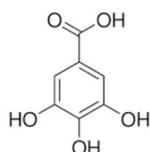
αντέδρασε

- Resorcinol → διυδροξυ-βενζόλιο σε meta θέση



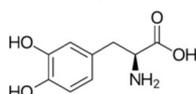
αντέδρασε ελάχιστα μόνο σε carbonate buffer

- Gallic acid → τριυδροξυ-βενζοϊκό οξύ



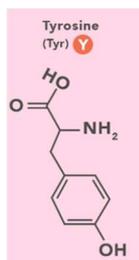
αντέδρασε

- L-DOPA → φαινόλη με δύο -OH (όπως κατεχόλη) και πλευρική αμινοξική-αλυσίδα α-άνθρακα. Η L-DOPA είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ.



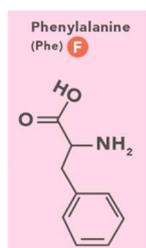
αντέδρασε

- Tyrosine → φαινόλη με αμινοξική πλευρά



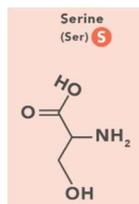
δεν αντέδρασε

- L-Phenylalanine → ίδιος σκελετός με Tyrosine αλλά χωρίς -OH



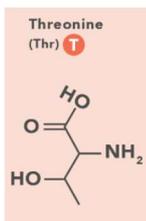
δεν αντέδρασε

- L-Serine → αμινοξύ με -OH αλλά μη φαινολικό



δεν αντέδρασε

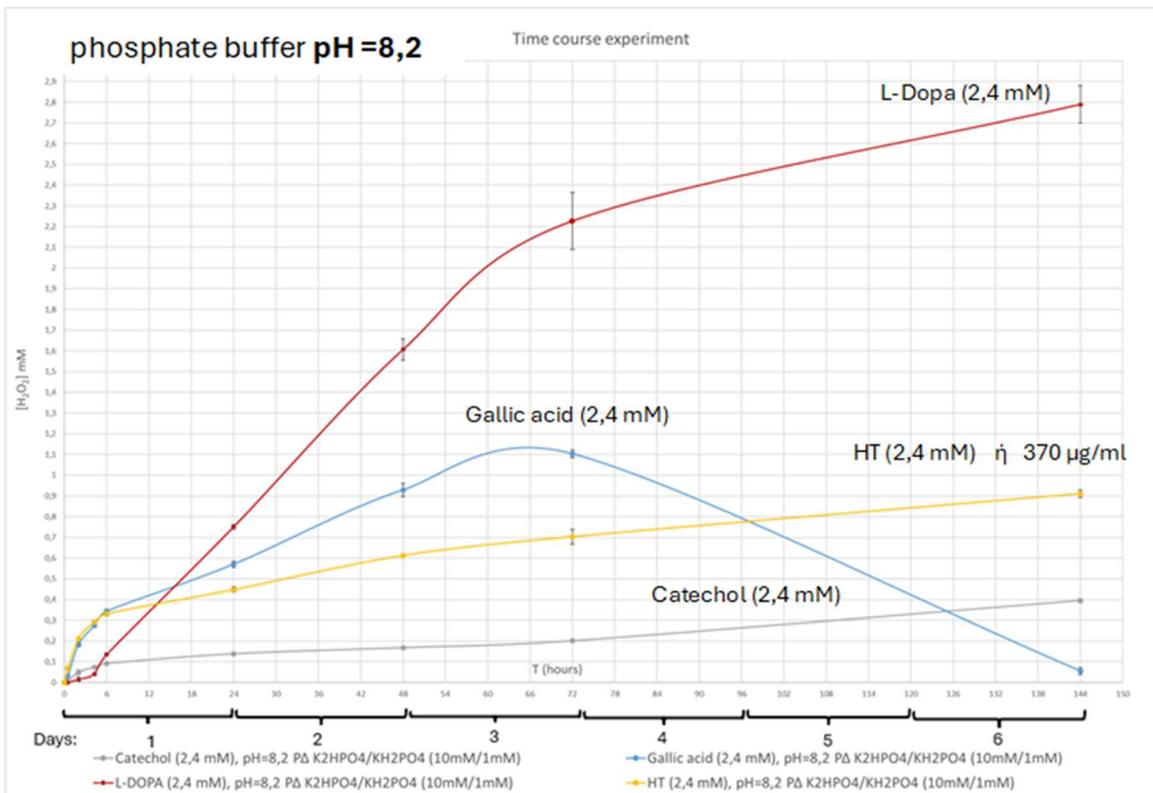
- Threonine → αμινοξύ μη φαινολικό



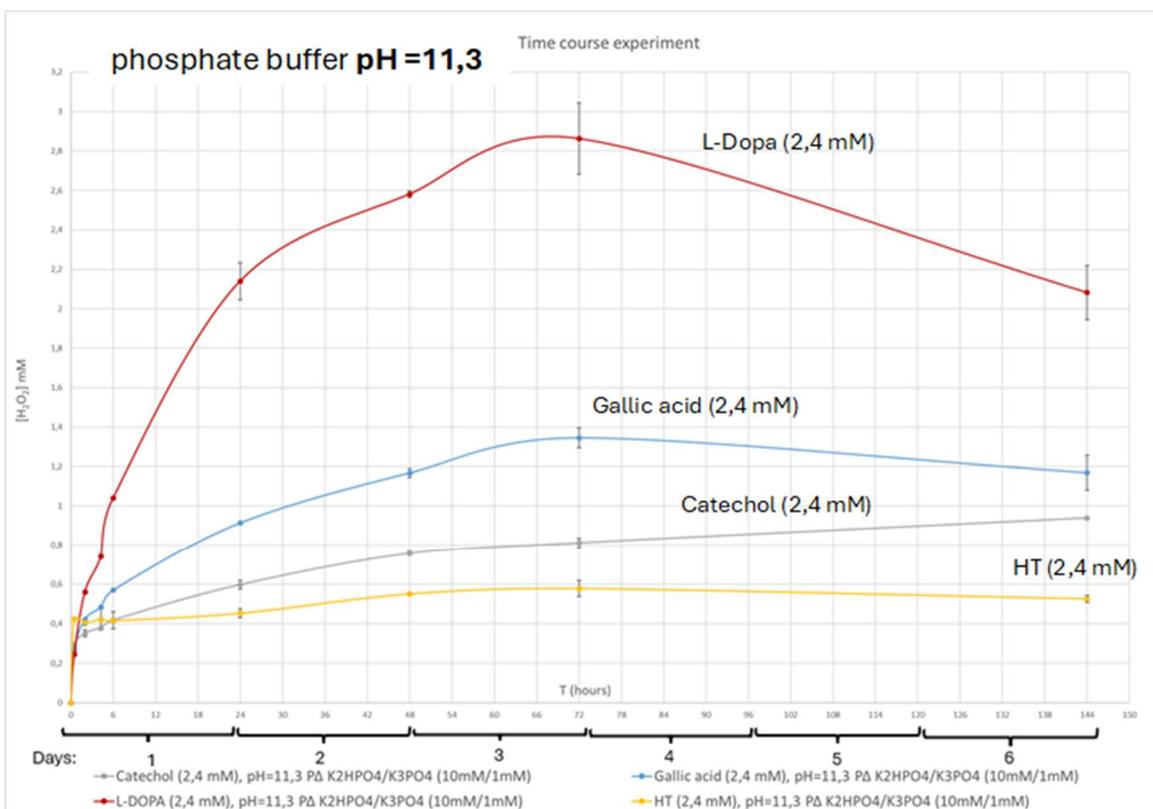
δεν αντέδρασε

Οι ενώσεις που αντέδρασαν έχουν τα εξής κοινά χαρακτηριστικά:

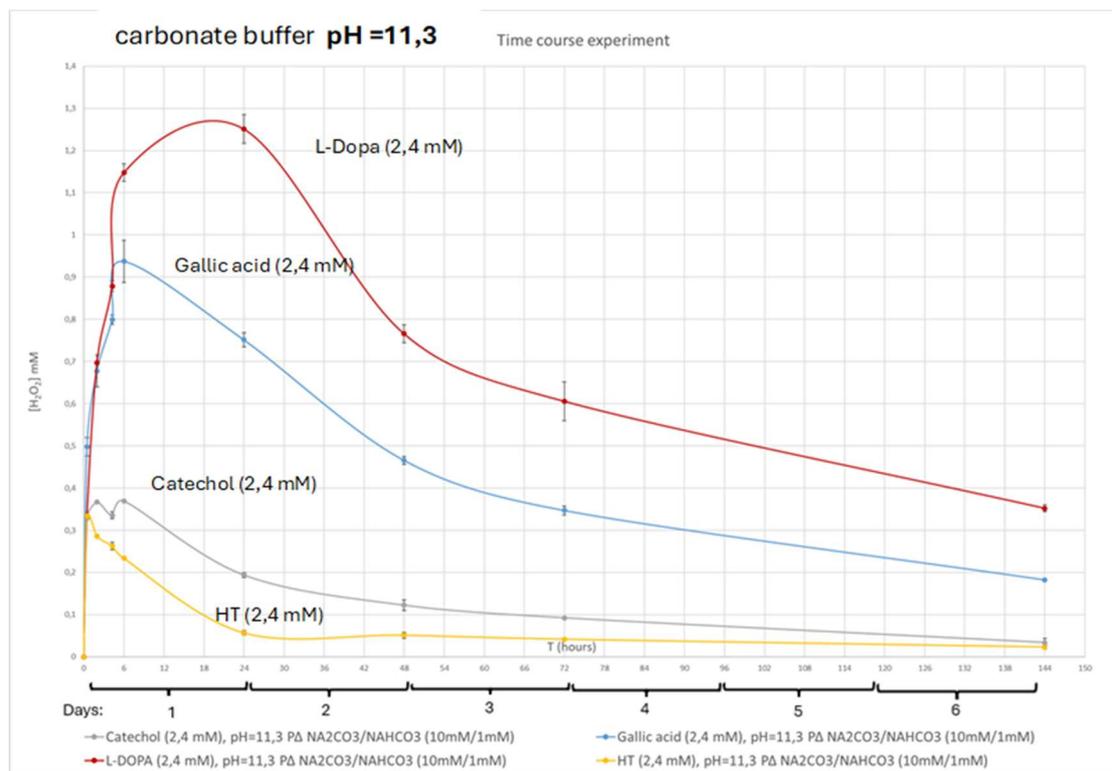
- **Ορθο-διυδροξυφαινυλικό μοτίβο** (όπως η κατεχόλη) το οποίο οξειδώνεται εύκολα σε ορθο-κινόνη μέσω σταθερού ενδιάμεσου ριζικού.
- Μπορούν να σταθεροποιούν ριζικά μέσω συντονισμού και να παρέχουν **πολλαπλές ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες**. Οι ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες (-OH, -NH₂) αυξάνουν την πυκνότητα ηλεκτρονίων στον δακτύλιο, ευνοώντας οξείδωση.



Εικόνα Π3.4.3.22. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου στα εναλλακτικά μόρια σε phosphate buffer pH 8,2. Όλες οι ενώσεις κατασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 2,4mM.



Εικόνα Π3.4.3.23. Η παραγωγή H₂O₂ στην πάροδο του χρόνου στα εναλλακτικά μόρια σε phosphate buffer pH 11,3. Όλες οι ενώσεις κατασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 2,4mM.



Εικόνα Π3.4.3.24. Η παραγωγή H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου στα εναλλακτικά μόρια σε carbonate buffer pH 11,3. Όλες οι ενώσεις κατασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 2,4mM.

3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματά δείχνουν ότι το ρυθμιστικό σύστημα μονοβασικού/διβασικού φωσφορικού καλίου, σε pH 8,2, παρείχε το βέλτιστο αποτέλεσμα για μια σταδιακή αποδόμηση της HT και τη διατήρηση υψηλών συγκεντρώσεων $[H_2O_2]$ στην πάροδο του χρόνου. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται και από τη μελέτη των Akagawa, Shigemitsu & Suyama (2003), όπου οι ερευνητές έδειξαν ότι το βέλτιστο pH για την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις αλλά και από δείγματα πλούσια σε πολυφαινόλες βρίσκεται στην περιοχή pH από 7 έως 9. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η καθαρή παραγωγή H_2O_2 δεν αυξανόταν περαιτέρω πάνω από pH 9 και το απέδωσαν στο γεγονός ότι οι ίδιες οι φαινολικές ενώσεις (ή οι οξειδωμένες μορφές τους) γίνονται πιο αποτελεσματικές στη δέσμευση των δραστικών μορφών οξυγόνου που παράγουν σε υψηλότερα επίπεδα pH. Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα επιτάχυνε σημαντικά την παραγωγή, πιθανόν επειδή το pH του ήταν βέλτιστο και επειδή περιείχε ιχνοποσότητες μεταλλικών ιόντων που δρουν ως καταλύτες στην αυτοοξείδωση των πολυφαινολών (Akagawa, Shigemitsu & Suyama, 2003).

Εκτός από τη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών για την παραγωγή H_2O_2 από φαινολικές ενώσεις, τα φωσφορικά μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως σταθεροποιητές του υπεροξειδίου του υδρογόνου και προτιμώνται έναντι των ανθρακικών όταν επιδιώκεται σταθερότητα (Rastinfard, Dalisson & Barralet, 2022). Τα ιόντα όξινου ανθρακικού (HCO_3^-) έχουν μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα διυδρογονοφωσφορικά ιόντα (Nicoll & Smith, 1955; Rastinfard, Dalisson & Barralet, 2022; Waite, Bonner & Autenrieth, 1999; Zhu, Noël & Shoesmith, 2020), γεγονός που εξηγεί γιατί παρατηρήσαμε μείωση στη συγκέντρωση του υπεροξειδίου στα ανθρακικά ρυθμιστικά διαλύματα στα πειράματα της Ενότητας 1. Οι ερευνητές (Watts et al., 1999) παρείχαν μια λεπτομερή εξήγηση σχετικά με τον ρόλο

ενός σταθεροποιητή που περιέχει μονοβασικό φωσφορικό νάτριο και αμμώνιο στα επίπεδα H_2O_2 για κάθε pH. Σύμφωνα με αυτούς, το φωσφορικό αναστέλλει τη διάσπαση του υπεροξειδίου μειώνοντας τη συγκέντρωση των διαλυμένων μετάλλων είτε μέσω αντιδράσεων καθίζησης είτε μέσω σχηματισμού σταθερών συμπλόκων μετάλλων (Hinchee, Downey & Aggarwal, 1991). Μόλις ο σίδηρος συμπλοκοποιηθεί, θεωρείται μη δραστικός ως προς το H_2O_2 . Επιπλέον, το φωσφορικό δρα ως δεσμευτής ριζών επειδή «σβήνει» τις ρίζες υδροξυλίου και τερματίζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις αποδόμησης (Aggarwal et al., 1991). Ωστόσο, το φωσφορικό δεν αναστέλλει τη βιολογική αποδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ένζυμο καταλάση (Scandalios, 1992).

Στα πειράματά μας (Ενότητα 1), παρατηρήσαμε ότι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου σε σύγκριση με τα buffer Trizma base, Trizma HCl και Tricine, παρόλο που το ποσοστό της HT που καταναλώθηκε στις 24 ώρες ήταν ελαφρώς μικρότερο από τις άλλες τρεις εφαρμογές (Εικόνα Π3.4.3.6). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα δεν καταλύει περαιτέρω την αυτοοξειδωση της πολυφαινόλης, αλλά διατηρεί υψηλά τα επίπεδα του H_2O_2 λειτουργώντας ως σταθεροποιητής.

Όσον αφορά την επίδραση των ιχνομετάλλων στην αντίδραση, οι Iwasaki et al. (2011) έδειξαν ότι οι ορθο-διυδροξυλικές ομάδες των πολυφαινολών μπορούν να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα με Cu^{2+} , τα οποία επάγουν τη δημιουργία H_2O_2 και την προοξειδωτική δραστηριότητα. Η προσθήκη ειδικού χηλικού παράγοντα για Cu^+ και καταλάσης (καταναλωτή H_2O_2) μείωσε τη δημιουργία $\cdot OH$, επιβεβαιώνοντας ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη μείωση του Cu^{2+} σε Cu^+ από τη φαινολική ένωση, ακολουθούμενη από αντίδραση Fenton, όπου ο Cu^+ αντιδρά με H_2O_2 για να παραγάγει ρίζες $\cdot OH$. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται αναλυτικά από τους Sakihama et al. (2002), οι οποίοι αναφέρουν ότι η οξειδωση κατεχόλης από Cu^{2+} δημιουργεί ένα ριζικό μόριο ημικινόνης. Το ριζικό αυτό μόριο αντιδρά με οξυγόνο σχηματίζοντας υπεροξειδική ρίζα ($\cdot O_2^-$). Η υπεροξειδική ρίζα οξειδώνει περαιτέρω τη φαινολική ένωση, αναγεννώντας την ημικινόνη και παράγοντας H_2O_2 , το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε ιδιαίτερα δραστική ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$) μέσω αντίδρασης τύπου Fenton. Επιπλέον, οι Moran et al. (1997) έδειξαν ότι φαινολικές ενώσεις — ειδικά εκείνες με κατεχόλες ή πυρογαλλολικές ομάδες — μπορούν να αναγάγουν Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Δεδομένου ότι ο Fe^{2+} είναι πιο δραστικός από τον Fe^{3+} στην κατάλυση διάσπασης υπεροξειδίων προς ελεύθερες ρίζες, οι μεταλλο-αναγωγικές ιδιότητες των πολυφαινολών μπορούν να ενισχύσουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις (Paiva-Martins & Gordon, 2005). Επιπλέον μελέτες έχουν παρατηρήσει έντονη αποσταθεροποίηση του H_2O_2 παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως του χαλκού και άλλων οξειδίων. Για παράδειγμα, οι Yazici & Deveci (2010) έδειξαν ότι σε συγκέντρωση θειικού χαλκού 40 mg/L περίπου 76% του αρχικού H_2O_2 αποδομήθηκε μέσα σε 3 ώρες. Σύμφωνα με τους Watts et al. (1999), μεταλλικά ορυκτά όπως η γκαϊίτης μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις τύπου Fenton, παράγοντας ρίζες υδροξυλίου και διασπώντας ταχύτατα το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνεπώς, η αρχική υψηλότερη συγκέντρωση του H_2O_2 που παρατηρήσαμε στην εφαρμογή $CuSO_4$ (Ενότητα 4) μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικοί παράγοντες των μεταλλικών ιόντων, παράγοντας H_2O_2 . Στη συνέχεια, τα μεταλλικά ιόντα χαμηλότερου σθένους μπορούν να αντιδράσουν με το υπεροξειδίο, γεγονός που πιθανώς εξηγεί τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του H_2O_2 στην πάροδο του χρόνου. Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι η υδροξυτυροσόλη υποβάλλεται σε μικρή αποδόμηση παρουσία χαλκού χωρίς buffer, χωρίς παραγωγή H_2O_2 (Εικ. Π3.4.3.20 & Π3.4.3.21), κάτι που μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη εναλλακτικών οδών αποδόμησης.

Σχετικά με τα εναλλακτικά μόρια που δοκιμάστηκαν αντί της HT, από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα μόρια Gallic acid και L-Dopa αντιδρούν πιο έντονα από την HT σε όλες τις τιμές pH που δοκιμάστηκαν (Εικ. Π3.4.3.22, Εικ. Π3.4.3.23,

Εικ. Π3.4.3.24). Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στις περισσότερες ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες ($-OH$, $-NH_2$) που έχουν τα μόρια. Μάλιστα, η L-DOPA μπορεί να ανακυκλώνεται χημικά (μέσω redox κύκλου), παράγοντας πολλαπλά μόρια H_2O_2 ανά μόριο αρχικού υποστρώματος και έχει ιδανικό pK_a για αποπρωτονίωση στο βιολογικό pH ($\sim 7.4-8$), κάτι που αυξάνει τη συγκέντρωση του φαινοξυ-ανιόντος και πιθανόν διευκολύνει την αντίδραση.

Το γεγονός ότι παρατηρήσαμε αποδόμηση H_2O_2 σε αλκαλικά διαλύματα (pH = 12) (Ενότητα 1), απουσία HCO_3^-/CO_3^{2-} , είναι σύμφωνο με τους Littauer & Tsai (1979) και αποδίδεται στον σχηματισμό ιόντων υπεροξυλίου (HO_2^-) σε αλκαλικές συνθήκες, με ή χωρίς την παρουσία καταλυτών μετάλλων (Zhu, Noël & Shoesmith, 2020). Η καταλυτική επίδραση των HCO_3^-/CO_3^{2-} που παρατηρήσαμε αποδίδεται στον σχηματισμό υπερανθρακικών ιόντων όταν το H_2O_2 συνυπάρχει με ανθρακικά (Flanagan et al., 1986; Zhu, Noël & Shoesmith, 2020). Γενικά, το γεγονός ότι παρατηρήσαμε χαμηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 σε υψηλά επίπεδα pH (Ενότητα 1) οφείλεται στο ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι πιο σταθερό σε χαμηλότερα, πιο όξινα επίπεδα pH (Eul, Moeller & Steiner, 2000; Watts et al., 1999). Το βέλτιστο pH για τη διατήρηση υψηλών και σταθερών επιπέδων υπεροξειδίου είναι ένα όξινο pH περίπου 5 (Rastinfard, Dalisson & Barralet, 2022). Χρησιμοποιώντας σταθεροποιητές όπως το φυτικό άλας (phytate), ο χρόνος ημιζωής του H_2O_2 μπορεί να αυξηθεί έως και 50 φορές (Watts et al., 2007).

4 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη μας είναι η πρώτη που αναλύει συνολικά πολλούς παράγοντες (pH, συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, αρχική συγκέντρωση φαινόλης, παρουσία μεταλλικών ιόντων) οι οποίοι μπορούν να συμβάλουν στη σταδιακή αποδόμηση της HT και στη διατήρηση της συγκέντρωσης του $[H_2O_2]$ στην πάροδο του χρόνου. Για την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος, προτείνουμε τη χρήση φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος σε pH 8,2, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1–10 mM). Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις HT οδήγησαν σε μη ανάλογη παραγωγή, γεγονός που υποδηλώνει κορεσμό του οξειδωτικού μηχανισμού υπό αυτές τις συνθήκες. Η παρουσία μεταλλικών ιόντων θα πρέπει να αποφεύγεται, ώστε να διατηρείται η σταθερότητα του H_2O_2 . Λαμβάνοντας υπόψη όλους αυτούς τους παράγοντες, μπορεί να αναπτυχθεί ένα σύστημα σταδιακής και συνεχούς παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο θα υπερνικά τους αμυντικούς μηχανισμούς των παθογόνων και θα προσφέρει νέες προοπτικές για αντιμικροβιακές εφαρμογές.

5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Aggarwal, P. K., Means, J. L., Downey, D. C., & Hinchee, R. E. (1991). Use of hydrogen peroxide as an oxygen source for in situ biodegradation: Part II. Laboratory studies. *Journal of Hazardous Materials*, 27(3), 301-314. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3894\(91\)80056-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3894(91)80056-T)
- Akagawa, M., Shigemitsu, T., & Suyama, K. (2003). Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(12), 2632-2640. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2632>
- Akter, S., Khan, M. S., Smith, E. N., & Flashman, E. (2021). Measuring ROS and redox markers in plant cells. *RSC Chem Biol*, 2(5), 1384-1401. <https://doi.org/10.1039/d1cb00071c>
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., & Boskou, D. G. (2002). Biophenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3688-3692. <https://doi.org/10.1021/jf0115138>
- Bopitiya, D., Christensen, D., Martin, M., Zhang, J., & Bennett, L. E. (2021). Production of hydrogen peroxide in formulated beverages is associated with the presence of ascorbic acid combined with selected redox-active functional ingredients. *Food Chem*, 338, 127947. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127947>
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xyleneol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal Biochem*, 377(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.029>
- Demidchik, V. (2017). Reactive oxygen species and their role in plant oxidative stress. *CABI*, 64-96. <https://doi.org/10.1079/9781780647296.0064>
- Dogan-Guner, E. M., Mohamed, H., Orbey, N., & Goodyear, N. (2019). Stabilization and controlled release of micro-encapsulated hydrogen peroxide for wound treatment applications. *J Appl Microbiol*, 126(3), 965-972. <https://doi.org/10.1111/jam.14177>
- Eul, W., Moeller, A., & Steiner, N. (2000). Hydrogen Peroxide. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471238961.0825041808051919.a01.pub2>
- Flanagan, J., Jones, D. P., Griffith, W. P., Skapski, A. C., & West, A. P. (1986). On the existence of peroxocarbonates in aqueous solution [Article]. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 1, 20-21. <https://doi.org/10.1039/C39860000020>

- Gay, C. A., & Gebicki, J. M. (2002). Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric-Xylenol Orange Peroxide Assay. *Analytical Biochemistry*, 304(1), 42-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.2001.5566>
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 68(4), 191-206. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*, 307(1), 108-112. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80911-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80911-Y)
- Hincee, R. E., Downey, D. C., & Aggarwal, P. K. (1991). Use of hydrogen peroxide as an oxygen source for in situ biodegradation: Part I. Field studies. *Journal of Hazardous Materials*, 27(3), 287-299. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3894\(91\)80055-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3894(91)80055-S)
- Iwasaki, Y., Hirasawa, T., Maruyama, Y., Ishii, Y., Ito, R., Saito, K., Umemura, T., Nishikawa, A., & Nakazawa, H. (2011). Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1320-1327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.024>
- Juven, B. J., & Pierson, M. D. (1996). Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation (†). *J Food Prot*, 59(11), 1233-1241. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-59.11.1233>
- Kang, D. K., Oh, H. K., Ham, J. S., Kim, J. G., Yoon, C. H., Ahn, Y. T., & Kim, H. U. (2005). Identification and Characterization of Hydrogen Peroxide-generating *Lactobacillus fermentum* CS12-1. *Asian-Australas J Anim Sci*, 18(1), 90-95. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.90>
- Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24102001>
- Khan, M. F., & Murphy, C. D. (2021). 3-Hydroxytyrosol regulates biofilm growth in *Cunninghamella elegans*. *Fungal Biol*, 125(3), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.10.011>
- Kitsati, N., Mantzaris, M. D., & Galaris, D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biology*, 10, 233-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.006>
- Kreslavski, V., Los, D., Allakhverdiev, S., & Kuznetsov, V. V. (2012). Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 141-154.
- Li, D., Wang, M., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., & Cao, W. (2017). A modified FOX-1 method for Micro-determination of hydrogen peroxide in honey samples. *Food*

Chemistry, 237, 225-231.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.065>

- Littauer, E., & Tsai, K. (1979). Catalytic decomposition of hydrogen peroxide in alkaline solution. *Journal of The Electrochemical Society*, 126(11), 1924.
- Long, L. H., Hoi, A., & Halliwell, B. (2010). Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 162-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.012>
- Mattila, H., Khorobrykh, S., Havurinne, V., & Tyystjärvi, E. (2015). Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 152, 176-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.001>
- Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J., & Becana, M. (1997). Complexes of Iron with Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 861-870. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00426-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00426-1)
- Mueller, U., Sauer, T., Weigel, I., Pichner, R., & Pischetsrieder, M. (2011). Identification of H₂O₂ as a major antimicrobial component in coffee. *Food Funct*, 2(5), 265-272. <https://doi.org/10.1039/c0fo00180e>
- Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, 49(2), 474-478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)
- Nicoll, W., & Smith, A. (1955). Stability of dilute alkaline solutions of hydrogen peroxide. *Industrial & Engineering Chemistry*, 47(12), 2548-2554.
- Obied, H. K. (2013). Biography of biophenols: past, present and future. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(6), 230-241.
- Odiatou, E. M., Skaltsounis, A. L., & Constantinou, A. I. (2013). Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Cancer Letters*, 330(1), 113-121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.035>
- Paiva-Martins, F., & Gordon, M. H. (2005). Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2704-2709. <https://doi.org/10.1021/jf0481094>
- Rai, M., & Kosalec, I. (2022). Promising antimicrobials from natural products (Vol. 2022). Springer.
- Rastinfard, A., Dalisson, B., & Barralet, J. (2022). Aqueous decomposition behavior of solid peroxides: Effect of pH and buffer composition on oxygen and hydrogen peroxide formation. *Acta Biomaterialia*, 145, 390-402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.04.004>

- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, M. (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int*, 105, 654-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>
- Romeo, F. V., Granuzzo, G., Foti, P., Ballistreri, G., Caggia, C., & Rapisarda, P. (2021). Microbial Application to Improve Olive Mill Wastewater Phenolic Extracts. *Molecules*, 26(7), 1944. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/1944>
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8)
- Scandalios, J. G. (1992). *Molecular biology of free radical scavenging systems / edited by John G. Scandalios*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharova, E., Smolikova, G., & Medvedev, S. (2024). Determining Hydrogen Peroxide Content in Plant Tissue Extracts. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70. <https://doi.org/10.1134/S1021443724603744>
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.15488>
- Veal, E., & Day, A. (2011). Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal*, 15(1), 147-151. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3968>
- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*, 26(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
- Waite, A., Bonner, J., & Autenrieth, R. (1999). Kinetics and Stoichiometry of Oxygen Release from Solid Peroxides. *Environmental Engineering Science - ENVIRON ENG SCI*, 16, 187-199. <https://doi.org/10.1089/ees.1999.16.187>
- Watts, R. J., Finn, D. D., Cutler, L. M., Schmidt, J. T., & Teel, A. L. (2007). Enhanced stability of hydrogen peroxide in the presence of subsurface solids. *J Contam Hydrol*, 91(3-4), 312-326. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.11.004>
- Watts, R. J., Foget, M. K., Kong, S.-H., & Teel, A. L. (1999). Hydrogen peroxide decomposition in model subsurface systems. *Journal of Hazardous Materials*, 69(2), 229-243. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(99\)00114-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3894(99)00114-4)
- Willson, R. L. (1978). Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? *Ciba Found Symp*(65), 19-42. <https://doi.org/10.1002/9780470715413.ch3>
- Winterbourn, C. C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2), 730-738. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.004>
- Yazıcı, E., & Deveci, H. (2010). Factors Affecting Decomposition of Hydrogen

Peroxide. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1530.0648>

- Zhu, Z., Noël, J. J., & Shoemith, D. W. (2020). Hydrogen peroxide decomposition on simulated nuclear fuel bicarbonate/carbonate solutions. *Electrochimica Acta*, 340, 135980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135980>
- Zorić, N., & Kosalec, I. (2022). The Antimicrobial Activities of Oleuropein and Hydroxytyrosol. In M. Rai & I. Kosalec (Eds.), *Promising Antimicrobials from Natural Products* (pp. 75-89). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83504-0_5