رقم التسلسل:

رقم الترتيب:

جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية الرياضيات وعلوم المادة

قسم الكيميـــــــــاء

مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر أكاديمي

تخصص: كيمياء مطبقة

من إعداد: بن علي إيمان وعتبه لبنى

الموضوع:

دراسة الفعالية البيولوجية لبعض مركبات الأزو أمينيه

نوقشت في يوم: 2016/05/28

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

- علاوي مسعودة	أستاذ محاضر (ب)	رئيســـا
- رحيم أم الخير	أستاذ محاضر (ب)	مناقشـا
- عطية سالم	أستاذ مساعـــد (أ)	مؤطـرا

شكر وعرفان

قال الله تعالى: " لئن شكرتم لأزيدنكم"

نحمد الله و نشكره على نعمه التي لا تعد ولا تحصى وعلى توفيقه لنا وبفضله وصلنا إلى انجاز هذا العمل المتواضع الذي يعد نقطة بداية لأعمال اخرى.

كما نتوجه بالشكر الخالص للأستاذ الفاضل: عطية سالم المشرف على تأطيرنا الذي قدم لنا كل المساعدة كما لا ننسى ان نتوجه بالشكر إلى الطالبة: لطيفة كريبع ونتمنى لها التوفيق في التحضير لشهادة الدكتوراه على الوقوف معنا وتوجيهاتها لنا.

لا ننسى أن نشكر الأستاذ المحترم رئيس قسم الكيمياء: ذوادي علي على مد يد العون و مساعدته لنا والشكر الخالص لعمال المخبر كذلك.

و نوجه الشكر لكل طلبة الكيمياء و خاصة دفعة ماستر كيمياء مطبقة **2016**.

كما لا ننسى جميع من ساعدنا سوى من قريب او بعيد.

وكذلك لا ننسى ان نتقدم بالشكر للمؤسسة العمومية الإستشفائية محمد بوضياف بورقلة على السماح لنا بالعمل بمخبر المؤسسة.

قائمة الرموز

A:	الإمتصاصية الضوئية
ADN :	الحمض النووي
AEAC :	الفعالية المضادة للكسدة
CMI:	هو التركيز الأقل للمضاد الحيوي القادر على مواجهة البكتيريات والتثبيط الكامل لها
DMSO :	ثنائي مثيل سلفور أكسيد
DPPH° :	جذر ثلاثي فينيل بكريل هايدرازيل
FRAP:	اختبار إرجاع الحديد الثلاثي
GSH :	الجلوتاثيون المختزل
HDL :	دراسة علاج تصلب الشرايين
I% :	النسبة المئوية لتثبيط
I C_{50}:	تركيز المركبات للقضاء على 50% من الجذور الحرة
MH:	الوسط الجيلوزي (الوسط المغذي)
MTP_3 :	جذور ثلاثي فينيل مثيل
SOD :	انزيم فوق أكسيد الديسميوتاز
UV-visible:	الأشعة المرئية و فوق البنفسجية
Vc:	حمض الاسكوربيك

فهرس المحتويـات

المحتوى	الصفحة
الاهداء	I
شكر وعرفان	II
الرموز	III
فهرس المحتويات	IV
قائمة المنحنيات	X
قائمة الجدول.....	X
قائمة الاشكال	XI
مقدمـــــــة	1
الجانب النظري: مفاهيم عامة	
I – الأمينات	3
I-1- تعريف الأمينات	3
I-2- تصنيف الأمينات	3
I-3- تحضير الأمينات	3
II- مركبات الآزو	5
II-1- تعريفها	5

II-2- تركيبها 5

III- الجذور الحرة و مضادات الأكسدة 6

III- 1- مقدمة 6

III- 2 - الجذور الحرة 7

III- 2- 1- تعريف الجذور الحرة 7

III-2-2- مصدرها 7

III-2- 3- أنواع الجذور الحرة 8

III-2 - 4- تفاعلات الجذور الحرة 9

III-2 - 5- أضرار الجذور الحرة 10

III-2- 6- الأكسدة التلقائية 11

III-3- مضادات الأكسدة 12

III-3-1- تعريفها 12

III-3-2- تصنيف مضادات الأكسدة 13

III-3-3 - الآثار الضارة من المواد المضادة للأكسدة 19

IV - عموميات حول البكتيريا 22

IV- 1- لمحة تاريخية عن البكتيريا 22

IV- 2- تعريف البكتريا 23

IV- 3- تركيب الخلية البكتيرية..... 23

IV- 4- خصائص البكتيريا 25

IV- 5 - تصنيف البكتيريا 26

IV- 6- مقاومة البكتيريا 29

IV- 7- المضادات الحيوية 30

IV- 7-1- لمحة تاريخية 30

IV- 7 -2- تعريف المضادات الحيوية 30

IV- 7-3- تصنيف المضادات الحيوية 31

IV- 7- 7- تحضير سلالات البكتريا 31

IV- 7- 8- تحضير وسط الزرع 31

IV- 7- 9- تحضير المعلق البكتيري 31

IV- 7- 10- الزرع والحضن 32

IV- 8- الأنواع البكتيرية المستعملة في الدراسة 32

الجانب العملي: الدراسة البيولوجية

I- الدراسة البيولوجية 36

II- طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة 36

II-1- التحليل الطيفي بالأشعة المرئية و فوق البنفسجية 36

II-2- المواد الكيميائية المستعملة 38

II-3- اختبار الـ DPPH 39

II -3-1- طريقة العمل 40

II -3-2 – النتائج و مناقشة 41

II-4- اختبار الحديد الثلاثي (FRAP) 42

II-4 - 1 - طريقة العمل 43

II -4-2 – النتائج و مناقشة 44

II-5 - اختبار المولبيدات 44

II-5 - 1 - طريقة العمل 45

II -5-2 – النتائج و مناقشة 45

III – دراسة الفعالية ضد ميكروبية..... 46

III – 1- طريقة العمل..... 46

III – 2 - النتائج ومناقشتها 48

III – 2 – 1- نتائج الاختبار 48

III – 2 – 2- تفسير النتائج 49

الخـــــاتمة 50

المراجـــع

قائمة المنحنيات

المنحنى	الصفحة
الجانب العملي : الدراسة البيولوجية	
المنحنى (II – 1) : منحنى قياسي لحمض الأسكوربيك في إختبار DPPH	45
المنحنى (II - 2) : المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك في إختبار موليبدات الفوسفات	49

قائمة الجداول

الجدول	الصفحة
الجانب العملي : الدراسة البيولوجية	
جدول(III - 1): جدول يوضح نتائج التثبيط	**49**

قائمة الأشكال

الشكل **الصفحة**

الجانب النظري : مفاهيم عامة

الشكل (III-1) : مبادئ مضادات الأكسدة الإنزيمية 15

الشكل (IV- 1) : بنية الخلية 26

الشكل (IV-2): بكتيريا العنقودية staphlococcus eureus..... 33

الشكل(IV-3): بكتيريا اشريشيا كولي Escherichia coli 34

الشكل (IV- 4): بكتريا زائفة زنجارية Pseudomonas aeruginosa 35

الجانب العملي : الدراسة البيولوجية

الشكل(II-1): جهاز الأشعة المرئية و فوق بنفسجية 38

الشكل(II-2): أعمدة بيانية توضح قيمة DPPH لكل مركب 41

الشكل(II -3): أعمدة بيانية توضح قيمة FRAP لكل مركب 44

الشكل (II – 4): امتصاصية المركبات في اختبار المولييدات 46

الشكل(III – 1) : زرع البكتريا 47

الشكل(III – 2) : وضع الاقراص 48

الشكل(III – 3) : نتائج الاختبار 48

المقدمة

مقدمـــــة

إن المساهمة في دراسة الأمينات المشتقة من قواعد شيف قد سمح لنا بجمع معلومات إضافية في علم الكيمياء، فالتعامل معها أدى إلى التعرف بشكل أفضل على الخواص المختلفة لهذه المركبات.

فمنذ عشرات السنين عرفت كيمياء مركبات السندات التي تحتوي على بنيتها على مجموعة "أمين" أو أكثر إلى جانب المجموعات "الفينولية"، وهو الأمر الذي يميز هذه المركبات في خواصها عن باقي المركبات الأخرى، هذا التناسق يمكننا من الحصول على مجموعة جد مهمة من المركبات العضوية، حيث تبدي هذه المركبات أنواع متعددة، تحتوي على محطات تناسق متغيرة.

الاهتمام المتزايد في كيمياء السندات يرجع إلى تنوع تطبيقاتها فهي تستعمل في مجال معالجة المياه وذلك راجع إلى قدرتها الكبيرة لتكوين معقدات مع العناصر الانتقالية، كما تستعمل في مجال الطب (كمضادات للبكتيريا أو مضادات للسرطان) لمعالجة عدة أمراض.[1]

هذا العمل الذي نحن بصدد مناقشته يهدف إلى دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية البيولوجية للمركبات المحضرة التالية:

4,4'- ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل ميثان ذو الصيغة المجملة ($C_{39}H_{28}O_2N_6$)،

4,4'- ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثان ذو الصيغة المجملة ($C_{40}H_{28}O_2N_6$)،

4,4'– ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثر ذو الصيغة المجملة ($C_{38}H_{28}O_3N_6$).

يشتمل عملنا هذا جانبين اساسين هما:

الجانب النظري: وهو عبارة عن مفاهيم عامة حول الأمينات، الأزو، الجذور الحرة، مضادات الأكسدة والبكتيريا.

الجانب العملي: وهو عبارة عن الدراسة التطبيقية والنتائج المتحصل عليها في المخبر لدراسة الفعالية المضادة للأكسدة وذلك باستعمال الاختبارات الكيميائية التالية:DPPH، FRAP والموليبدات. ودراسة الفعالية ضد ميكروبية لأنواع البكتيريا: *Eschaerichia coli , Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus eureus*

الجانب النظري
مفاهيم عامة

I- الأمينات:

I-1- تعريف الأمينات:

الأمينات هي عبارة عن مشتقات الأمونيا تستبدل فيها ذرة هيدروجين أو أكثر بمجموعة ألكيليه (أمينات أليفاتية) أو مجموعة أريلية (أمينات أروماتية), هي مركبات عضوية قاعدية لاحتوائها على ذرة النتروجين والتي تحمل زوجا من الالكترونات الحرة (غير مشاركة), تأخذ الأمينات عموما الصيغ العامة التالية R_3N, R_2NH و RNH_2 حيث R عبارة عن مجموعة ألكيليه أو أريلية. تعتبر الأمينات ومشتقاتها ذات أهمية كبيرة في الأنظمة الحيوية اذ تدخل تلك المجموعات الأمينية في تركيب الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات وتدخل في تركيب الجزيئات المسؤولة عن الخصائص الوراثية للكائنات الحية, كما تدخل في تركيب عدد كبير من العقاقير الطبية (الأدوية) إلا أن الأمينات الأروماتية تعتبر مركبات سامة اذ يمكن ان تمتص عن طريق الجلد مؤدية إلى عواقب وخيمة.

I-2 - تصنيف الأمينات :

تصنف الأمينات إلى ثلاثة انواع وهي كالتالي:

- **أمينات أولية:** هي امينات ترتبط فيها ذرة النتروجين بذرة كربون واحدة فقط مثال : انيلين.
- **أمينات ثانوية:**هي امينات ترتبط فيها ذرة النتروجين بذرتي كربون مثال: N- مثيل انيلين.
- **أمينات ثالثية**: هي امينات ترتبط فيها ذرة النتروجين بثلاث ذرات كربون مثال : البيريدين.

I- 3- تحضير الأمينات:

هناك ثلاث طرق لتحضير الأمينات وهي:

I-3-1- التحضير بواسطة تفاعلات الاستبدال النيكلوفيلي:

نذكر على سبيل المثال تفاعل الهاليدات العضوية مع الأمونيا أو الأمين الأولي كما هو موضح في المعادلتين (I-1) و (I-2).

$$H_3N + R\text{-}X \longrightarrow RN^+H_3X^- \xrightarrow{OH^-} RNH_2 + H_2O + X^- \quad (1\text{-}I)$$

$$CH_3\,CH_2N\,H_2 \xrightarrow[OH]{CH_3\text{-}Cl} CH_3\,CH_2N\,HCH_3 \quad (2\text{-}I)$$

I-3-2- التحضير بواسطة الاختزال:

I-3-2-1- إختزال مركبات النيترو الأليفاتية والأروماتية:

يتم تحضير الأمينات أيضا باختزال مركبات النيترو الأليفاتية والأروماتية باستخدام العامل المختزل $LiAlH_4$ في وسط إيثر أو استخدام الهيدروجين بوجود محفز مثال على ذلك كما موضح في المعادلة-3) I).

$$CH_3NO_2 \xrightarrow{H_2 / Pt} CH_3\,NH_2 \quad (3\text{-}I)$$

I-3-2-2-إختزال المركبات النيتريلية الأروماتية والأليفاتية:

تختزل مركبات النيتريل بواسطة الهيدروجين وبوجود عامل مساعد كالنيكل ويمكن إختزاله كذلك بواسطة $LiAlH_4$ في الإيثر بواسطة الصوديوم مع الإيثانول حيث ينطلق الهيدروجين الفعال وهدرجة مجموعة النيتريل مثال على ذلك كما هو موضح في المعادلة (I-4).

$$CH_3CH_2C{\equiv}N \xrightarrow{H_2/Pd \text{ or } LiAlH_4/Ether} CH_3CH_2CH_2NH_2 \quad (4\text{-}I)$$

I-3-3-بواسطة تكسير أو خسف هوفمان :

تتحول الأميدات إلى أمينات وذلك بنزع مجموعة الكربونيل عن طريق معاملة الأميدات بعامل مؤكسد مثل NaOBr الذي ينتج عادة من تفاعل البروم مع هيدروكسيد الصوديوم كما يتضح من خلال التفاعل الموضح في المعادلة (I-7) :

$$CH_3(CH_2)_4CONH_2 + Br_2 \xrightarrow{4NaOH/H2O} CH_3(CH_2)_4NH_2 \quad (7\text{-}I)$$

وجميع الطرق السابقة تعتبر طرق تحضير مخبريه, أما في الصناعة فإن الأمينات الأليفاتية الأولية فيتم تصنيعها بعدة طرق أهمها :

- تفاعل هاليدات الألكيل مع الأمونيا .
- اختزال مركبات نيتروألكان Nitroalcanes.
- تفاعل الكحول مع الأمونيا تحت الضغط والكوبالت كمحفز أما أمين الفينيل فيتم تحضيره بواسطة إختزال نتروبنزن بواسطة الحديد Fe وحمض الهيدروكلوريك HCl أو الهيدروجين H_2 مع عامل مساعد في الطور الغازي.[2]

II- مركبات الآزو:

II-1- تعريفها:

مركبات الآزو هي مركبات تحتوي على المجموعة الوظيفية R-N=N-R' حيث R و R' من الممكن أن تكون مجموعة ألكيل أو أريل, المجموعة الوظيفية N=N تسمى مجموعة الآزو بالرغم من أن مجوعة الأم HN=NH تسمى دي إيميد. الإسم مشتق من ازوت التي تعني بالفرنسي نيتروجين Nitrogene. اكتشفت أول مرة من طرف العالم Griess سنة 1858.

II-2- تركيبها:

أصباغ الآزو هي العائلة الأكثر استخدما في الصناعات ويتم إنتاجها في تفاعلين تفاعل التكثيف (Condensation) وتفاعل دييز (diazotation) .

II-2-1- تفاعل دييز: هو تحول الأمينات الأولية مع حمض النيتروز إلى مركبات diazoique غير مستقر يطلق عليه إسم ديازو diazo والتي تتأثر في وجود الضوء والحرارة وفق المعادلة الكيميائية التالية:

$$R\text{-}NH_2 + 2HCl + NaNO_2 \longrightarrow R\text{-}N{=}N\text{-}Cl + 2H_2O + NaCl \quad (1\text{-}II)$$

II-2-2- تفاعل تكثيف : هو تفاعل مركب diazoique مع فينيل أو أمين وفق التفاعل التالي :

$$R\text{-}N{=}N\text{-}Cl + H\text{-}R'\text{-}OH \longrightarrow R\text{-}N{=}N\text{-}R'\text{-}OH + HCl \qquad (2\text{-}II)$$

وهكذا يمكننا الحصول على آزو مستقر. [3]

III- الجذور الحرة و مضادات الأكسدة:

III- 1- مقدمة:

لعدة سنوات وجود الجذور الحرة في الأنظمة الحيوية والبيولوجية مرفوض و في الآونة الأخيرة وبسبب تقنيات الفحص المحسنة تغيرت وجهة النظر إلى حد ما وقد وجدت الجذور الحرة مكانا في المسببات المرضية.[4] يتم إنتاجها من خلال عدد من الوظائف الداخلية للجسم, كذلك عند تعرض الجسم لبعض المواد البيئية السامة. [5] ولتقليل منها أو كبحها اكتشفت مواد تعرف بمضادات الأكسدة. أول ملاحظة سجلت على مانعي الأكسدة جاءت من قبل Berthollet سنة 1727 وبعدها من قبل Davy ونظريتهم وصفتها ب "**المحفز المخرب**" والمشاركة الأولى أثبتت من أكسجين الغلاف الجوي على الأحماض الذهنية. [6] من الأمثلة البسيطة على عملية الأكسدة ما يحدث عند قطع تفاحة و تركها معرضة للهواء فإنها تتحول إلى اللون البني, كما أن صدأ الحديد وتشقق المطاط وتلف الأغذية أمثلة شائعة لهذه العملية الطبيعية. الأكسدة في جسم الإنسان, كل خلية من خلايا الجسم تحتاج إلى أكسجين ويتفاعل هذا الأكسجين مع جزيئات الطعام المهضوم بحيث ينتج ثاني أكسيد الكربون والماء والطاقة, تتكون الجذور الحرة داخل الأنسجة الحية كنواتج كيميائية ثانوية عمليات التمثيل الغذائي أو الأيض أو الإستقلاب التي تحدث بصورة مستمرة في الجسم. تعمل الجذور الحرة على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضرارا بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة.[7]

ظلت آلية تأكسد الدسم غير معروفة حتى شرحت من قبل العالم E-Duclaux (1840-1904م) الذي أعتبر أن الأكسجين الجوي هو العامل الرئيسي المسبب لتأكسد الأحماض الدسمة الحرة, الدهون, الزيوت و الأطعمة التي تحتوي على الليبيدات يحدث لها عملية تخريب جراء تعرضها إلى درجة الحرارة أو إلى تخزين طويل المدى. هذا التخريب ناتج عن تفاعلات الأكسدة وتفكك لنواتج الأكسدة مما يؤدي إلى إنخفاض في القيمة الغذائية وجودتها الحسية. التأخير في عمليات الأكسدة مهم جدا في تصنيع المنتجات الغذائية وهي في الواقع مهمة جدا بالنسبة لجميع المشاركين في السلسلة الغذائية بأكملها من المصنع إلى المستهلك.[8]

توجد طريقة للحماية من الأكسدة هو استخدام كمية محددة من مواد مضافة, التي تمنع الأكسدة. تسمى

بشكل صحيح مثبطات للأكسدة ولكن في الوقت الحاضر تسمى المواد المضادة للأكسدة. هذه المثبطات تمثل فئة من المواد التي تختلف على نطاق واسع في التركيب الكيميائي ولها آليات تفاعلات مختلفة.[9]

III- 2 - الجذور الحرة:

III- 2- 1- تعريف الجذور الحرة:

الجذور الحرة هي أصناف كيميائيةذريةٌ أو جزيئية متعادلة أو مشحونة بشحنة سالبة أو موجبة، تمتلك إلكترون حر في مدار التكافؤ وهو السبب في شدة فاعلية هذه الجزيئات وفي الواقع تتكون من مجموعة من الشظايا الجزئيةٌ غيرقادرة على وجود مستقبل، تتفاعل مع الجزيئات في معظم المناطق المجاورة لها وهذا يشٌمل بروتينات، كربوهيدرات، دهون وADN وتتكون هذه الأصناف خاصة بالتفاعلات التسلسليةٌ والتفاعلات المتعاقبة وبعض التفاعلات الأخرى مثل البلمرة.[10]

III-2-2- مصدرها:

في الواقع الحياة الخلوية عبارة عن مصدر مستمر لإنتاج مختلف أنواع الجذور الحرة, حيث تكون المركبات الخلوية الأساسية مستهدفة باستمرار من طرف هذه الجذور الحرة, منها المرتبطة بعوامل داخلية ومنها خارجية المنشأ.

III-2-2-1- المصدر الداخلي للجذور الحرة:

إن نشاط وحركية انتقال الإلكترونات يعتبر من أساسيات توليد الطاقة في التفاعلات الحيوية كالفسفرة التأكسدية على مستوى الميتوكوندري عن طريق إختزال الأكسيجين الجزيئي خلال التنفس الخلوي, وتشكيل الـ ATP على مستوى الميتوكوندري, حيث يمكن أن يؤدي التسرب في الإلكترونات خلال تفاعلات نقلها إلى أكسدة الأكسجين الجزيئي.

III-2-2-2- المصدر الخارجي للجذور الحرة :

يمكن أن تنتج الجذور الحرة النشطة عند التعرض لمختلف العوامل البيئية الفيزيائية والكيميائية منها: الإشعاعات فوق البنفسجية وتحت الحمراء, الحرارة, الموجات فوق الصوتية وبعض المعادن مثل الحديد والتدخين...[11,12]

III-2-3- أنواع الجذور الحرة :

III-2-3-1- الجذور الحرة النشطة :

من المعروف أن أنواع الأوكسجين النشطة هي المادة المؤكسدة الرئيسية والهادمة للخلايا والأنسجة النباتية تحت ظروف الإجهاد وهذه الأنواع الأوكسجينية هي:

1. جذر أنيون سوبيرا أكسيد $O_2^{\cdot}$ Super oxide radicals
2. جذر هيدروكسيلي $OH^{\cdot}$ Hydroxy radicals
3. أنيون السوبيرا اكسيد $O_2^{\cdot}$ Singlet oxygen radical
4. بروكسيل الهيدروجين $ROO^{\cdot}$ Peroxyl radicals
5. جذر الكوكسيل $RO^{\cdot}$ Alkoxyl radicals
6. جذر بيروكسيل $H_2O_2^{\cdot}$ Peroxyl radicals
7. جذر اوكسيد النيتريك $NO^{\cdot}$ Oxide nitric radical
8. بيروكسينيتريت $ONOO^{\cdot-}$ Peroxinitrite
9. الابوكلوريت $OCl^{\cdot-}$ Hypochlorite

هذه المواد الأوكسيجينية نشطة وخاصة O_2 و OH مواد مؤكسدة قوية جدا وتقوم سريعا بمهاجمة الجزيئات البيولوجية مثل جزيئات ADN مما يؤدي إلى خلل شديد في عمليات الميتابوليزم (Métabolisme) واختلال وظيفي لا يمكن إصلاحه أو تعويضه مما يؤدي إلى هدم الأنسجة النباتية والحيوانية. [13, 14]

III-2-3-2- الجذور الحرة المستقرة:

هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو الساعات أو حتى بالأيام مثل جذر ثلاثي فينيل مثيل (MTP_3) وجذر ثلاثي فينيل بكريل هايدرازيل (DPPH) وجذر ثنائي فينيل وأكسيد النتريك (PH_2NO) ومشتقاته. نستطيع القول أن معظم الجذور الأروماتية التي تشمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها تكون مستقرة في أغلب الأحيان, فكلما زاد ثبات الجذر الحر قلت فعاليته من الناحية الديناميكية الحرارية فإن قلة فعاليته تعود إلى أنه يحتاج طاقة تنشيط عالية نسبيا أثناء التفاعل. إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة مهمة جدا لصحة وحياة الكائن الحي ومع ذلك فالجذور الحرة ليست مجرد مواد ضارة فحسب, لكنها قد تكون في بعض الأحيان بمثابة السلاح الذي يستخدمه الجسم للدفاع عن نفسه.[15]

III- 2 - 4- تفاعلات الجذور الحرة:

تدخل الجذور الحرة في تفاعلات جد سريعة وذات طاقات تنشيط قريبة من الصفر لشدة فعاليتها.

III-2- 4-1- تفاعلات التبادل الإلكتروني:

يتم في هذا التفاعل انتقال إلكتروني من المادة المستقرة المتواجدة بالمحيط إلى الجذر الحر وبذلك يتكون أيون سالب مشتق من الجذر الحر وجذر حر جديد مشتق من الأيون السالب كما هو موضح في المعادلة (1-III). [16]

$$OH^{\cdot} + Cl^{-} \longrightarrow OH^{-} + Cl^{\cdot} \qquad (1\text{-III})$$

III-2-4-2- تفاعلات تفكك الجذور الحرة:

تتفكك الجذور الحرة بصور مختلفة حسب طبيعة الجذر الحر مخلفة بذلك جذورا أبسط ومثال ذلك تفكك الأسيل بواسطة فقدان جزيئه أول أكسيد الكربون كما هو موضح في المعادلة (III-2).

$$RC^{\cdot} = O \longrightarrow R^{\cdot} + CO \qquad (2\text{-III})$$

III-2 - 5- أضرار الجذور الحرة:

يمكن إجمال أضرار الجذور الحرة إلى ثلاثة أنواع كما يلي:

1. الضرر الواقع على حامض النووي ADN والذي يؤدي إلى طفرات تؤدي إلى موت الخلايا أو تسرطنها أو حدوث أمراض المناعة الذاتية.
2. الضرر الواقع على البروتينات والذي يؤدي إلى فقد طبيعة هذه البروتينات ومن ثم وظيفتها أو تحول طبيعتها إلى أشكال جديدة تؤدي إلى أمراض المناعة الذاتية.
3. الضرر الواقع على الدهون أو الأكسدة الفوقية للدهون وهي أخطر هذه الأضرار ويشتمل على زيادة سيولة الجدران الخلوية وتطفر الحامض النووي وما يتبعه من موت الخلايا أو أمراض المناعة الذاتية أو السرطان. [17, 18]
4. تثبيط السلسلة التنفسية للميتوكندري.
5. تثبيط العديد من الإنزيمات إنزيم الصوديوم- البوتاسيوم- أتيباز على جدران الخلايا.
6. زيادة نشاط الأنزيمات المصاحب لتوتر الأكسدة.[19]

III-2- 6- الأكسدة التلقائية:

يتفاعل الأكسجين والعديد من المركبات العضوية (RH) لإنتاج هيدروبيروكسيد ومركبات أكسجينية.

في معظم الحالات هذه الأكسدة عبارة عن تفاعلات سلسليه تمر بثلاث مراحل, أولا مرحلة بداية السلسلة, ثانيا مرحلة انتشار السلسلة وثالثا مرحلة النهاية.[20]

أولا- مرحلة البدء:

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} \qquad (3\text{-III})$$

تكون الجذور الحرة قد تحدث من قبل التفكك الحراري المباشر (الحراري) عن طريق التحلل هيدروبيروكسيد, من خلال التحفيز وعند التعرض للضوء (التحلل الضوئي).

ثانيا- مرحلة الانتشار:

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot} \qquad (4\text{-III})$$

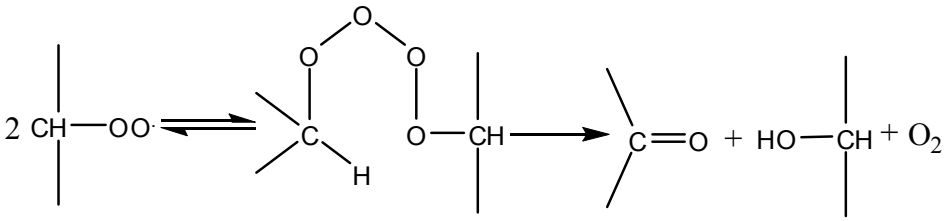
$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad (5\text{-III})$$

قابلية المركبات العضوية للأكسدة التلقائية على سهولة منحها هيدروجين عن طريق التفاعل (5-III).

ثالثا - مرحلة قطع السلسلة:

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow \text{nonradical products} \qquad (6\text{-III})$$

اقترح Russell أن تفاعل جذرين من هيدروبيروكسيد في درجة الغرفة يعطي وسيط تترا أكسيد لإنتاج كينون وكحول وأكسجين. [21]



(7-III)

يمكن أن يكون الأكسجين من التفاعل السابق نشيط في الحالة الأحادية.[22]

III-3- مضادات الأكسدة :

III-3-1- تعريفها:

تعرف مضادات الأكسدة بأنها تلك المواد التي لها القدرة على تثبيط المواد المؤكسدة، فهي تعمل منع تكوين أو على منع تأثير أصناف الأكسجين والنتروجين الفعّال الناشئين داخل الجسم ويؤديان إلى أضرار في الجزيئات الحيوية للخلية، يتم ذلك بإضافة كم هائل من الالكترونات إلى داخل الأوعية الدموية مما يحقق التوازن لذرات الأكسجين التي تحمل عناصر حرة والأهم أنه يعيد الخلية منزوعة الإلكترون إلى توازنها وطبيعتها. ومن بين الشروط التي يجب أن تتوفر في مضادات الأكسدة المناسبة للجسم هي أن تتفاعل مع نواتج الأيض الأكسجين التفاعلية التي هي مواد بيولوجية سامة, تعديل الجذر الحر دون أن تتحول بنفسها إلى جذر حر وفصل الجذر الحر المرتص على مستقبلات خاصة معينة عن هذا المستقبل وألا تكون سامة ومؤذية للجسم وقابلة للإنطراح من الجسم وغير قابلة للتخزين, يجب أن يكون نصف عمر مضادات الأكسدة كبير بما فيه الكفاية للتفاعل مع المؤكسد. إلا أنه في الحقيقة فإن مواد قليلة تحقق هذه الشروط المجتمعة.[23, 24]

III-2-3- تصنيف مضادات الأكسدة:

يوجد العديد من التصنيفات التي يمكن أن تتدرج ضمنها مضادات التأكسد, فقد صنفت حسب مصدر إنتاجها داخلية أي ذاتية أو خارجية, آلية عملها وطبيعتها (إنزيمية, غير أنزيمية).

III-2-3-1- حسب مصدرها:

تصنف مضادات الأكسدة حسب مصدرها إلى أربع مجموعات وهي على التوالي:

III-2-3-1-1- المضادات الذاتية للأكسدة:

توجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي على صورة إنزيمات أو مرافقات إنزيمية أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت, ينتج الإنسان أربعة إنزيمات وهي كالآتي:

- **فوق أكسيد الديسميوتاز Superoxiden Dismutase:**

ويرمز له اختصارا ب (SOD) ويعتبر هذا الإنزيم أحد أهم الإنزيمات الفاعلة كمضادة للأكسدة، فهو يقوم بإزالة جذور فوق الأكسجين وذلك بتسريع معدل إزالته بحوالي أربع مرات بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم, النحاس والزنك، موجود في كل الأنسجة الهوائية مثل الميتوكوندريا.[25, 26]

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (8\text{-III})$$

- **الكاتالاز Catalase:**

يوجد في الأجسام البيروكسية في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدم ونخاع العظام والأغشية المخاطية والكلى والكبد, كما أن هذه الأجسام غنية بإنزيم آخر هو الاكسيداز. فبينما يعمل الاكسيداز على تكوين H_2O_2, يقوم الكاتالاز بتكسيره وتحويله إلى ماء وأكسجيني حسب التفاعل التالي:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O_2 \qquad (9\text{-III})$$

إن الماء والأكسجين الناتجين ثابتين ومستقرين ولا ضرر منها. تحمي إنزيمات Hydroperoxidases الموجودة أيضا في الأجسام البيروكسية الجسم ضد الأكاسيد الضارة, لأن تراكم الأكاسيد يؤدي إلى تكون جذور حرة تؤثر على الأغشية الخلوية وتسبب السرطان وأمراض الشرايين. يوجد البيروكسيداز في الحليب, خلايا الدم البيضاء والصفائح الدموية. إن التفاعل المحفز بواسطة البيروكسيداز معقد ويتم على عدة خطوات يمكن إيجازها فيما يلي:

لإنزيم الكاتالاز نشاط البيروكسيداز فهو يمكن أن يستخدم جزيئات H_2O_2 كركيزة مانحة للإلكترون وجزيئات H_2O_2 أخرى كمؤكسد أو مستقبل للإلكترون.[28 ,27]

- **جلوتاثيون بيروكسيداز Glutathione peroxidase**:

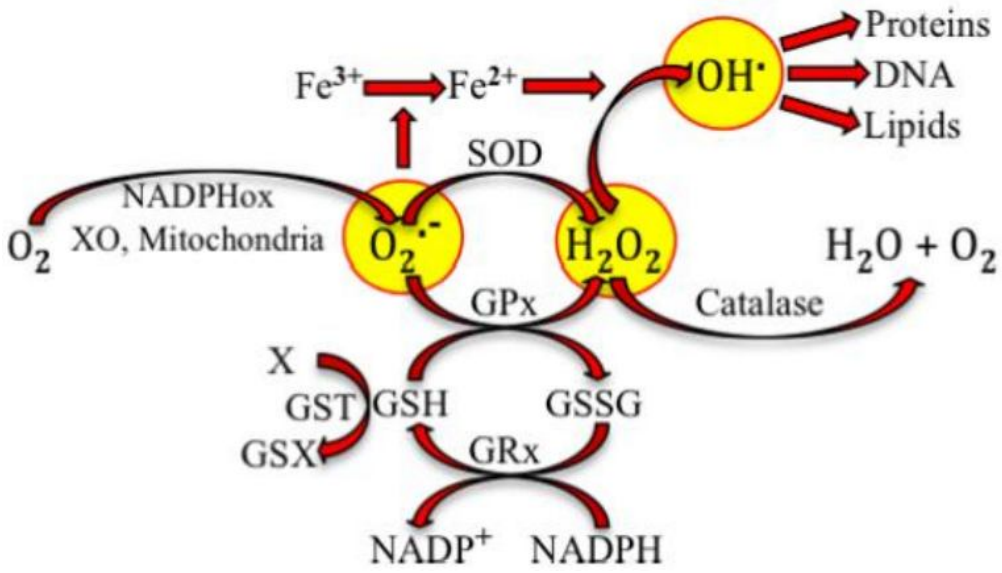
يوجد هذا الإنزيم في خلايا الدم وأنسجة الخلايا الأخرى. يقوم هدا الإنزيم بتحفيز تكسير H_2O_2 هيدروبيروكسيدات اللبيدات بواسطة الجلوتاثيون المختزل (GSH) وH_2O_2 ليعطي الجلوتاثيون المؤكسد (2GS) والماء كما هو موضح في المعادلة التالية:

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GSHPx} GSSG + 2H_2O \qquad (10\text{-III})$$

يقوم الجلوتاثيون بيروكسيداز بحماية دهون الأغشية الحيوية والهيموغلوبين ضد الأكسدة بواسطة Peroxides التي يمكن أن يستخدمها كركائز أخرى. [29]

بالإضافة إلى هذه الإنزيمات هناك هورمون الميلاتونين (Melatonin) الذي تفرزه الغدة الصنوبرية (Pineal gla) ويقوم هذا الهرمون الموجب الشحنة بمعادلة الشوارد الحرة ذات الشحنة السالبة ويزيل الأفعال الضارة لها, لسوء الحظ فإن هذه الغدة تضمحل في سن الأربعين.

وكذلك الثيول فهي مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل مثل الجلوتاثيون (Glutatione) وحمض ألفا– ليبوليك (LA) α-lipoic acid, أسيتيل سيستيين (NAC) N-acetylcysteine وحمض اليوريك, NADH و NADPH ومرفق إنزيم يوبيكوينون ((10) Ubiquinone). [30]



الشكل (III-1): مبادئ مضادات الأكسدة الإنزيمية

III-2-1-2-3- مضادات الأكسدة الغذائية:

هي عبارة عن مركبات يكون مصدرها نباتي منها الخضروات, الفواكه, الحبوب, النباتات الطبية, الأعشاب الطبية والأعشاب العطرية. ويمكن أن تحتوي هذه النبتات على المركبات الفينولية مثل الأحماض الفينولية, الفلافونيدات, الأنتوسيانيدات, التانينات, الكومارينات, الكاروتينويدات, الليبوكين, الفيتامينات ومعادن, أثبت عدة دراسات أن الفاعلية المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية راجع إلى خاصية الأكسدة والإرجاع والتي يمكن أن تلعب دورا هاما في امتصاص وتعديل الجذور الحرة وتمنع الأكسجين الأحادي, الثلاثي وتفكك البروكسيدات أو مصدر حيواني منها اللحوم الحمراء, لحوم الدواجن, الأسماك,

البيض وتحتوي على الفيتامينات (A,E,C), الأحماض الدهنية 3– أوميغا ومعادن نادرة مثلا السيلينيوم, المنغنيز, مغنيسيوم والزنك.[31, 32]

III-3-2-1-3- مضادات الأكسدة الصناعية:

تستخدم المضادات الأكسدة الصناعية كثيرا في صناعة المواد الغذائية, مثل بوتيل هيدروكسي الأنيسول (Butylated hydroxyanisole (BHA)), بيوتل هيدروكسي طولوين (Butylated Hydroxytoluene(BHT)), بيروبيل غالاتي (Propyl gallate (PG)) وثالثي بوتيل الهيدروكينون (tert butyl hydroquinone(TBHQ)), لأنها فعّالة وأقل تكلفة من مضادات الأكسدة الطبيعية. تستخدم BHA وBHT للحفاظ على الدهون والزيوت في مستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية. ومن أجل الحفاظ على النكهة, اللون والقيمة الغذائية. ومع ذلك مازالت تحتاج إلى دراسة من الناحية سلامة استعمالها مثل المواد المضادة للأكسدة الطبيعية كالمستخرجة من الغذاء.[33]

III-3-2-1-4- مزائج مضادات الأكسدة :

تدخل في تركيب هذه المزائج مركبات تعتبر من مضادات الأكسدة ضعيفة الفاعلية وتظهر خصائصها إلا في وجود غيرها من مضادات الأكسدة مثل الليستينات (Léchtines(phosphatidylcholine)), حمض الستيريك, حمض الطرطريك, الأحماض الأمنية وبعض الفلافونيدات. ويمكن تفسير خصائصها من خلال تفاعل التمخلب مع المعادن كالحديد والنحاس, التي لها أثر مضاد الأكسدة عند تراكيز منخفضة. ويكون لبعض النواتج تأثير على تفكيك الهيدروبيروكسيد. وأخرى بتوليد مضادات الأكسدة مثل التكوفيرولات ومشتقات حمض الأسكروبيك من خلال أشكالهم المؤكسدة. [34]

تستخدم مزائج من مضادات الأكسدة في الزيوت والدسم لتأمين منتجات أفضل. فمثلا يستخدم مزيج من TBHQ مع BHT أو BHA وبإضافة حمض السيتريك لزيادة مدة التخزين لزيوت والدسم.

أهم الفوائد المميزة لاستخدام مزيج من المواد المضادة الأكسدة:

- مزج مضادات الأكسدة مع بعضها البعض يؤمن فعالية أعلى وفوائد أفضل من استعمال كل مضاد على حدى.
- يؤمن حدود وضوابط أفضل لتطبيقات مضادات الأكسدة.
- يؤمن امتزاج أفضل بين طور مضاد التأكسد والطور الدسم.

III-3-2-2- حسب آليات تفاعلات مضادات الأكسدة:

يمكن تصنيف المضادات الأكسدة حسب آليات التفاعل إلى قسمين مهمين الأولية والثانوية.

III-3-2-2-1- مضادات الأكسدة الأولية:

هي المركبات التي تتفاعل مع الجذور الليبيدية ($L^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$) لإنتاج مركبات أكثر استقرار ($LH^{\bullet}$, $LOH^{\bullet}$, LOOH) وهذا راجع إلى أنها مركبات مانحة بروتونات نشطة ومشتق الجذر مضاد الأكسدة ($A^{\bullet}$) يحول إلى ناتج مستقر. مثل حمض الأسكوربيك ومشتقاته وتكوفيرول, BHA, BHT, THBP وTHBQ.[35,36]

III-3-2-2-2- مضادات الأكسدة الثانوية (وقائية):

وفق Gordan فإن المركبات المضادة للأكسدة الثانوية هي المركبات التي تؤخر أكسدة الدهون في تفاعلات مختلفة :

- امتصاص الأشعة فوق البنفسجية.
- التمخلب مع المعادن.
- إخماد الأكسجين الأحادي.
- تفكك الهيدروبيركسيد. [37]

III-3-2-2-3- آلية عمل مضادات الأكسدة :

تعمل مضادات الأكسدة الأولية على إعاقة وقطع تفاعلات انتشار السلسلة وبالتالي تبطئ عملية الأكسدة تعود لتتسارع عند نفاذه. وتعد متعددات الفينول من أهم مضادات الأكسدة خاصة تلك التي تحمل زمرتي هيدروكسيل أو زمرة هيدروكسيل ومستبدل في المواقع أورتو أو بارا وهي فعالة بالتراكيز المنخفضة وبالدسم الحيوانية أكثر من الدسم النباتية.

تتميز جذور المواد الدسمة بفاعلية عالية وتدخل بسرعة في التفاعلات انتشار السلسلة من خلال سحب الهيدروجين أو بتفاعل مع الأكسجين في حالته ثلاثي السبين.

$$RH + R'^{\bullet} \longleftrightarrow R^{\bullet} + R'H \qquad (11\text{-III})$$

$$R'^{\bullet} + 3O_2 \longleftrightarrow R'OO^{\bullet} \qquad (12\text{-III})$$

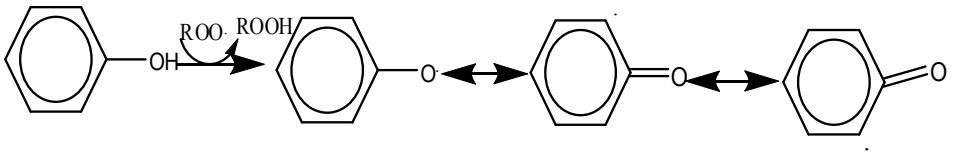
$$ROOH \longleftrightarrow R'OO^{\bullet} + H^{+} \qquad (13\text{-III})$$

$$ROOH \longleftrightarrow RO^{\bullet} + OH^{-} \qquad (14\text{-III})$$

$$2ROOH \longleftrightarrow RO^{\bullet} + ROO^{\bullet} + H_2O \qquad (15\text{-III})$$

$$R'OO + RH \longleftrightarrow R'OOH + R^{\bullet} \qquad (16\text{-III})$$

يحدث التأكسد بسرعة عالية وبطاقة تنشيط منخفضة جدا ولذلك يكون تركيز جذور الألكيل بيروكسي $ROO^{\bullet}$ أعلى بكثير من جذور الألكيل $R^{\cdot}$. ذلك في جميع المنظومات الغذائية الحاوية على الأكسجين. تقوم المركبات الفينولية بدور المستقبلات للجذور الحرة المتشكلة في مرحلة البدء وذلك من خلال التنازل عن $H^{\bullet}$ ليشكل جذر الفينوكسيل المستقر بسبب صيغه الطنينية كما هو موضح في المعادلة (17-III) [38, 39]



(17-III)

تسلك آلية التأكسد آلية جذرية, تتفاعل مضادات الأكسدة الفينولية مع الهيدروبيروكسيدات وفق التفاعل التالي:

$$ROOH \longleftrightarrow ROO + H^+ \quad (18\text{-III})$$

$$ROOH \longleftrightarrow RO^{\cdot} + OH^- \quad (19\text{-III})$$

$$2ROOH \longleftrightarrow RO^{\cdot} + ROO^{\cdot} + H_2O \quad (20\text{-III})$$

$$R^{\cdot} + O_2 \longleftrightarrow ROO^{\cdot} \quad (21\text{-III})$$

$$ROO^{\cdot} + RH \longleftrightarrow ROOH + R^{\cdot} \quad (22\text{-III})$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} + 2H^+ \longleftrightarrow 2ROOH + O_2 \quad (23\text{-III})$$

$$RO^{\cdot} + R^{\cdot} \longleftrightarrow ROR \quad (24\text{-III})$$

ويجب الأخذ بعين الاعتبار إمكانية تشكل الجذور الحرة بالتفاعلات المحفزة ضوئيا أو إنزيميا أو بوجود معادن, كما تزيد الرطوبة, الحرارة ,الضوء وزيادة عدم الإشباع سرعة التأكسد.[40]

أخيرا تجدر الإشارة إلى أن اختيار طريقة إضافة مضادات الأكسدة لمنظومة الأطعمة لتأمين التمازج الكامل مع طور الليبيدات أمر بغاية الأهمية ويلعب نوع الطعام، ظروف التحضير والمعدات المستخدمة دورا أساسيا في اختيار الطريقة ويمكن أن تتم الإضافة بشكل مباشر ومركز للدسم، الزيوت أو كمذيب للطعام ,أو بشكل مستحلب.[7]

III- 3-3- الآثار الضارة من المواد المضادة للأكسدة:

تعد مضادات الأكسدة الصناعية أقل خطورة مقارنة مع منتجات تأكسد المواد الدسمة دون إضافة مضادات الأكسدة, لكن لها تأثير جانبي على صحة الإنسان عند استعمالها.

نلخص بعض الدراسات المنشورة التي تظهر الآثار الضارة من المكملات المضادة للأكسدة في البشر.

أجريت دراسة في أستراليا, حيث تلقى 69 شخص مصاب بارتفاع ضغط الدم مع ضغط الانقباضي الإسعافية أكبر من 125 mm Hg علاج بفيتامين C (500 mg) و بوليفينول مستخرج من بذور العنب

(1000mg) في اليوم لمدة ستة أسابيع. في نهاية العلاج زاد الضغط الانقباضي والانبساطي فكانت هناك تغييرات في البطانة المتعلقة بتوسع الأوعية أو بالجهد التأكسدي للمؤشرات الحيوية.[41]

دراسة علاج تصلب الشرايين (HDL) لمئة وستون شخص مصاب حيث الرجال أقل من سبعين سنة والنساء أقل من ستين سنة, عندهم انخفاض في مستوى الـ HDL وثلاثي الجليسيريد أقل من (400mg/dl) تم تعين المرضى إلى واحد من 4 مجموعات: Simvastatin + niacin مع أو بدون فيتامين E (800IU), فيتامين C (1000mg), بتا كاروتين (25mg) و سيلنيوم (100µg) وهذه الجرعات تأخذ في اليوم. والمتابعة بعد 3 سنوات أظهرت أن العلاج المضاد للأكسدة قلل من ارتفاع HDL التي تنتجها Simvastatin + niacin.[42, 43]

في إطار الفحص التجريبي لسرطان البروستات, الرئة, القولون, المستقيم والمبيض. كانت دراسة استطلاعية في الولايات المتحدة تشمل 25400 امرأة تتراوح أعمارهن من 55 إلى 77 سنة أي بعد سن اليأس, اللواتي تمت متابعتهن لمدة 10 سنوات. وأظهرت النتائج أن خطر الإصابة بسرطان الثدي زادت بنسبة كبيرة (20%) لدى النساء اللواتي لديهن حامض الفوليك اكبر من أو يساوي 400µg في اليوم. في حين لم يرتبط تناول حمض الفوليك الغذائية مع زيادة الخطر.[44]

جرت دراسة ابتدائية لفعالية كل من بتا كاروتين والروتينال في الولايات المتحدة الأمريكية, شارك 18314 من النساء والرجال, هذا بتلقي جرعات من بتا كاروتين (30mg) وفيتامين A (25000IU) أو علاج وهمي.

تم إيقاف الدراسة بعد عامين وهذا بسبب ارتباط العلاج مع وجود نسبة اكبر من (28%) من سرطان الرئة وما يزيد عن (17%) من الوفيات من العلاج الوهمي.[42, 45] استعمال ألفا توكوفيرول وبيتا كاروتين في دراسة الوقاية من السرطان (ATBC). شملت الدراسة 29133 رجل مدخن تتراوح أعمارهم ما بين 50 إلى 69 سنة , حيث يأخذون 50mg من ألفا تكوفيرول و30mg من بتا كاروتين في اليوم أو علاج وهمي,

فكانت النتائج أن هناك نسبة وفيات قدرت أكبر من8% للرجال الذين تناولون المكملات المضادة للأكسدة من الرجال الذين تلقوا العلاج الوهمي.[42, 46, 47]

قام Bjelakovic et al بدراسة المكملات المضادة للأكسدة للوقاية من سرطان الجهاز الهضمي على 131727 مريض. وجدوا مضادات الأكسدة تزيد بشكل كبير من العدد الإجمالي للوفيات ولم يمنع سرطان الجهاز الهضمي.[48]

قام Myung et al بتحليل31 بحث من أصل3327, بحيث شملت 22 تجربة مع 161045 مريض (88610 مريض تعامل مع المواد المضادة للأكسدة) وخلص الباحثون إلى أن المواد المضادة للأكسدة ليست لها أي تأثيرات وقائية على السرطان. ومع ذلك عندما تم تقيم مجموعة فرعية من أربع تجارب وجدوا أن المرضى الذين يتلقون مضادات الأكسدة كانت زيادة ملحوظة في نسبة سرطان المثانة.[49]

تنوعت نتائج الأبحاث حول إثبات الأثر السمي لحمض الأسكوربيك ومشتقاته, حيث تشير دراسة أن أخذ 12.5mg/Kg من فيتامين C و10mg/Kg من N-acetylcystein يؤدي إلى زيادة في الجهد التأكسدي التي تنتجها التمارين الحادة بالنسبة للأشخاص الأصحاء.

يعزى هذا إلى تحول فيتامين C إلى جذر الأسكوربيل بفعل الأصناف النشطة الناتجة أثناء ممارسة الرياضة.[50] وفي الآونة الأخيرة قام كل من Combes و Peternelj بتقييم 23 دراسة, التي تشير إلى الآثار السلبية لمضادات الأكسدة التكميلية على الآثار المفيدة التي تنتجها الممارسة المزمنة للرياضة, وجدوا أن مضادات الأكسدة لها دخل في توسع الأوعية وزيادة إشارات الأنسولين التي تنتجها ممارسة الرياضة. [51]

مؤخرا زاد الإقبال على استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية بالرغم من أنها لم تدرس جيدا كما درست مضادات الأكسدة الصناعية (و بشكل خاص BHT, BHA, THBQ) وذلك بسبب التساؤلات العديدة

حول الأضرار التي تسببها, لذلك يفضل استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية بقليل من الحذر ويجب مراعاة عدة نقاط أخرى بالإضافة لتسميته. وتأثيره في الصحة :

- ✓ كمية مضادات الأكسدة الطبيعية المضافة تتوقف على منشأها وطريقة استخلاصها,
- ✓ عدم تأثيرها في الرائحة والطعم,
- ✓ كلفة اقتصادية منخفضة,
- ✓ عدم تفاعلها بشكل غير مرغوب مع المواد الغذائية الموجودة في المنتج .[7]

IV - عموميات حول البكتيريا:

IV- 1- لمحة تاريخية عن البكتيريا:

إن كلمة ميكروب (microorganisme) تستعمل لوصف الكائنات الدقيقة التي لا يمكن ملاحظة بنيتها إلا بواسطة المجهر، التي تشمل الفيروسات، البكتيريا، الفطريات وبعض الطحالب، نسمي المجال الذي يدرس هذه الكائنات بالميكروبيولوجيا، الذي تطور بتطور وسائل البحث والدراسة انطلاقا من القرن 17، عندما تعرف العالم Antoine van Leewenhoek (1632-1723) عام 1668 بواسطة مجهره البسيط على بعض الفطريات والبكتيريا، في سنة 1859 تمكن الكيميائي الفرنسي Pasteur من التعرف على هذه الكائنات والتأكيد على ماهيتها، حيث اكتشف البكتيريا الهوائية و اللاهوائية من خلال تجاربه على التخمر واكتشف أيضا طعومها وارتبط اسمها بعملية البسترة لقتل الكائنات الحية المجهرية المتواجدة في السوائل وقد أثبت أيضا أن البكتيريا كائن حي والكائن الحي لا يتولد إلا من كائن حي آخر. أما العالم الألماني روبرت كوخ Robert Koch (جائزة نوبل في الطب والفيزيولوجيا 1905) فقد أسهم في إكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض حيث ارتبط اسم البكتيريا بكثير من الأمراض التي تسببها، لكن الاكتشافات الحديثة والتقدم السريع الذي حدث في العلوم التطبيقية أظهرت أن

البكتيريا تلعب دورا هاما في كثير من الصناعات الغذائية والدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية وكذلك معالجة المياه العتمة والمعالجة الحيوية لمخلفات المزارع ولها استخدامات في إنتاج الطاقة وغاز الميثان.[52]

IV- 2- تعريف البكتيريا:

هي كائنات دقيقة مجهرية وحيدة الخلية خالية من البلاستيدات الخضراء واسعة الإنتشار منها حوالي 2000 نوعا، تتواجد بكثرة في الطبيعة على سطح الكرة الأرضية أو داخلها تسمى Anaerobie وأخرى تتواجد في الهواء تسمى Aerobie، فبعضها يعيش بوجود الهواء والآخر بعدم وجوده وتتواجد أيضا في المياه المالحة، العذبة، الينابيع الحارة والبحار وبالتالي فهي تتحمل درجات مختلفة من الملوحة والحرارة كما يمكن أن تتواجد في الأطعمة، السوائل، على سطح الجلد، الأنسجة النباتية، الأمعاء عند الإنسان والحيوان وفي العقد الجذرية بالنسبة للنبات. [53]

IV- 3- تركيب الخلية البكتيرية:

تتركب الخلية البكتيرية من أجزاء أساسية وأخرى إضافية :

- الأجزاء أساسية

- **الجدار الخلوي:** جدار سميك يتألف من طبقتين في البكتيريا موجبة الغرام وثلاث طبقات في البكتيريا سالبة الغرام ويتكون من مواد سكرية ودهون وظيفته الحماية، الدعامة و إعطاء البكتيريا الشكل المميز لها وهو الذي يحدد نوعية صبغة البكتيريا وكذلك يوجد به السم الداخلي للبكتيريا Endo Toxin.

- **الغشاء البلازمي:** غشاء رقيق جدا مكون من الدهون و البروتينات، يتألف من بلايين الثنيات Mesosomes، وظيفته المشاركة في عملية انقسام البكتريا وهو مركز إنزيمات التنفس ويحدد نوعية وكمية المواد التي تنفذ من البكتيريا والتي تعرف بالنفاذية الإختيارية.
- **الستيوبلازم:** كتلة بروتينية هلامية تحتوي على غذاء مدخر وتدور فيها المواد الغذائية والفضلات لإخراجها وكذلك توجد بها حبيبات من مادة ARN تعرف بالريبوزومات، وظيفتها تكوين البروتينات سواء كانت تركيبية أو وظيفية مثل الإنزيمات والهرمونات، كذلك يوجد بها حبيبات مكونة من ADN تحمل صفات جينية معينة وتعرف بالبلازميدات.
- **النواة:** نواة البكتيريا بسيطة تتكون من كروموزوم واحد ملتف حول نفسه يوجد في مركز الخلية وليست محاطة بغشاء نووي ولا توجد بها نويات أو سائل نووي، وظيفتها السيطرة على جميع عمليات الخلية وصفاتها بما تحتويه من جينات وكذلك بدء عملية التكاثر.

- أربعة أجزاء إضافية: قد يوجد أحدها في بعض الخلايا أولا توجد فهي ليست ضرورية لحياة البكتيريا.

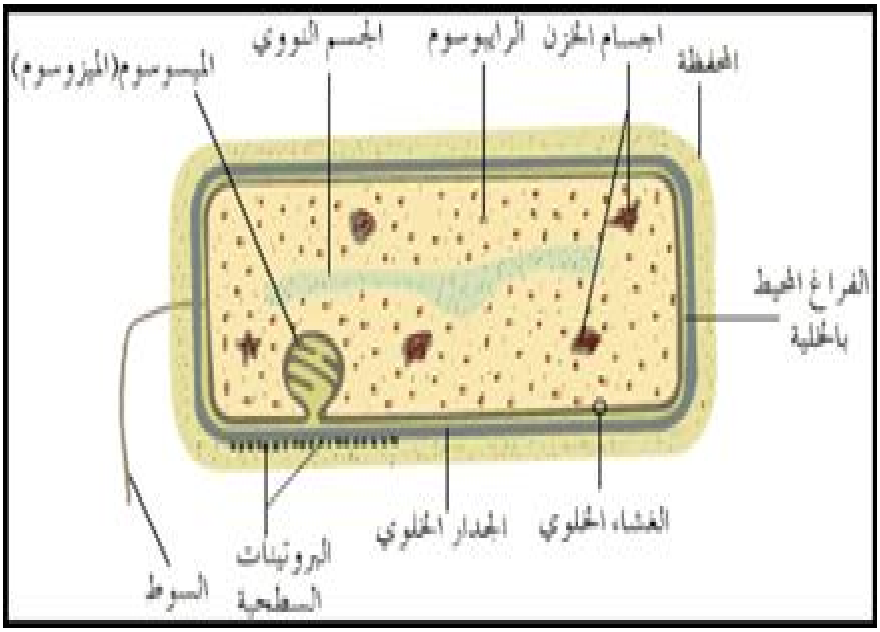
- **الهدبيات:** زوائد دقيقة جدا تسمى Pilli، وظيفتها التثبيت على سطح الخلايا العائلة وبعضها يعرف بالهدبيات الجنسية التي تلتصق ببعضها لإندماج النوايا من خلية لأخرى وهي مسؤولة عن ضراوة البكتيريا (مثل بكتيريا السيلان).
- **الأسواط Flagella :** زوائد طويلة جداً حول البكتيريا في توزيع مميز لكل نوع فقد تخرج من طرف واحد من الخلية أو كلا الطرفين أو من جميع سطح البكتيريا وهي المسؤولة عن حركة البكتيريا (العصيات المعوية E.Coli) .
- **الحافظة Capsule:** طبقة هلامية سميكة تحيط بالبكتيريا وتمنع التصاقها بالخلايا البلعمية (Phagocyte) لذلك فهي من عوامل الضرورية لبعض الأنواع وتوجد في الثنيات الرئوية والجمرة الخبيثة .

- **البذور Spores** : عندما تسوء الظروف البيئية (الجفاف ، نذرة الغذاء و PH) تكوّن بعض أنواع البكتيريا جدار سميك يحيط النواة وقليل من الستيوبلازم ويعرف هذا التركيب بالبذرة التي تظل حية لمدة طويلة إلى أن تتحسن الظروف فيتشقق جدار البذرة وتخرج منه النواة وتستعيد شكل البكتيريا. مثل الجمرة على عكس البكتيريا الخبيثة وكلوستريديا الغرغرينا الغازية وهذه البذور البكتيريا تقاوم حتى درجة ^0C 121 على عكس البكتيريا الخضرية التي لا تقاوم حتى درجة ^0C 100 [53].

IV- 4- خصائص البكتيريا:

- البكتيريا كائنات دقيقة مجهرية بدائية النوى.
- تتميز البكتيريا ببساطة التركيب إذ تتركب من جدار وغشاء خلويين يحيطان بالسيتوبلازم الذي يحوي على واحد أو أكثر من جزيئات DNA على شكل دوائر صغيرة تسمى البلازميدات وتتكاثر بصورة مستقلة عن الكروموزوم والرايبوزمات وبعض الأجسام التخزينية.
- البكتيريا كائنات دقيقة الحجم يتراوح حجمها بين 0.3 – 2 ميكرون.
- تحتوي خلية البكتيريا على غلاف, قاس, متماسك, متمم للبكتيريا وهو المسؤول عن حماية شكل الخلية من الاضطرابات الناتجة عن تأثير الضغط الخارجي كالأجسام الغريبة.

  وهناك أنواع أخرى تحتوي على حافظة خارجية حول الغلاف تدعى Capsule.
- درجة الحرارة المناسبة لنمو البكتيريا تتراوح بين 37°C– 45 بحيث يمكنها التكاثر خلال مدة وجيزة إلى أعداد كبيرة.[54]



الشكل (IV-1): بنية الخلية

IV - 5 - تصنيف البكتيريا:

صنف العلماء البكتيريا على عدة معايير:

IV- 5-1- من حيث توزيع أسواطها :

فيمكن تقسيمها إلى:

- بكتيريا وحيدة السوط.
- بكتيريا ذات أسواط عديدة متجمعة عند طرف واحد.
- بكتيريا ذات أسواط عديدة موزعة على كل الخلية.

IV- 5 -2- من حيث الشكل:

- البكتيريا العصوية (Bacilli): التي تأخذ خلاياها شكل العصويات الصغيرة تحت المجهر.
- البكتيريا الكروية (Cocci): التي تأخذ خلاياها شكل الكريات الصغيرة .
- البكتيريا الحلزونية (Spiral): التي تأخذ الشكل الحلزوني .
- البكتيريا الواوية (Vibrio): التي تأخذ شكل الواو أو الضمة العربية .

IV- 5-3- من حيث الوسط الذي تعيش فيه:

فيمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع:

- بكتيريا هوائية (Aerobic): وهي بكتيريا التي تعيش فقط في وجود الهواء الجوي وهي تعتبر المصدر الأساسي لتسمم المواد الغذائية.
- بكتيريا لا هوائية (Anaerobic): وهي البكتيريا التي تعيش فقط ،في غياب الهواء الجوي.
- بكتيريا لا هوائية إختيارية (Facultative Anaerobic): وهي البكتيريا التي يمكنها العيش والنمو في ظل وجود الهواء الجوي أو عدمه.

IV- 5-4- من حيث التغذية :

فيمكن تقسيمها إلى نوعين:

- بكتيريا ذاتية التغذية: هي البكتيريا التي تستهلك الكربون للنمو.
- بكتيريا عضوية التغذية: هي البكتيريا التي تحصل على الكربون من تحليل المواد النيئة كالسكر.

IV- 5-5- من حيث طريقة التلوين (غرام) :

يوضح الاختلاف في تركيب جدار الخلية بالتلوين، حسب تقنية غرام (Gram) نسبة للعالم J.Gram المكتشفة سنة 1884 واستنبط نوعين من خلال هذه الطريقة:

- بكتيريا غرام موجب (gram positive): عند تلوينها تمتص اللون وتظهر أرجوانية.
- بكتيريا غرام سالبة (Gram négative): تحرر صبغ وتظهر حمراء.

ويظهر جدار خلية البكتيريا موجب (Gram positive) أسمك من جدار خلية البكتريا غرام سالب (Gram positive).

IV- 5-6- من حيث الأثر على الإنسان:

يمكن تقسيمها إلى نوعين:

- بكتيريا نافعة: وهي التي تقدم خدمات جليلة للإنسان، الحيوان والبيئة.

فهناك نوع من البكتيريا يعيش في أمعاء الإنسان ،يساعده على هضم الطعام ويفرز بعض المواد المفيدة للجسم، مثل : الفيتامينات ويعمل على تدمير البكتيريا الضارة.

وهناك نوع آخر من البكتيريا يعيش في التربة و يلعب دورا هاما في غذاء النبات ،إذ يقوم بتثبيت النيتروجين الموجود في الهواء الجوي ،ليكون بمثابة عنصر أولي ،يستطيع من خلاله النبات أن يكون البروتين ،كما تقوم بكتيريا التربة بتحليل أجسام الكائنات الحية بعد موتها وكذا المواد العضوية المعقدة وتحويلها إلى صور بسيطة تستفيد منها التربة، النبات والحيوان. لا يقتصر الأمر على ذلك فحسب، بل إن هناك صناعات كاملة تقوم على استخدام بعض أنواع البكتيريا النافعة ،فصناعة بعض منتجات الألبان وبعض الأدوية ما هي إلا ناتج عمل البكتيريا النافعة. وحديثا تمكن العلماء من استخدام البكتيريا في معالجة مياه الصرف الصحي ،حماية للبيئة من التلوث ويطلق على كل هذه الأنواع البكتيرية اسم البكتيريا النافعة (Bénéficial bactérie) .

ويطلق على هذا النوع من البكتيريا اسم البكتيريا الممرضة (pathogenic bactérie)

- بكتيريا الانتهازية: هناك أنواع من البكتيريا تعيش في جسم الإنسان من دون أن تسبب له أي أضرار صحية إلا أنها تؤدي إلى انخفاض مناعة جسم الإنسان لأي سبب من الأسباب، تهاجم الجسم، متحولة إلى بكتيريا ضارة تسبب العديد من الأمراض وذلك على نحو ما هو شائع في الإصابة بالتهاب الحلق أو التهاب اللوزتين ويطلق على هذه البكتيريا ،اسم البكتيريا الانتهازية (Opportunistic bacteria) .

- البكتيريا الضارة: توجد بكتيريا ضارة تهاجم الإنسان، فتسبب له أمراض ومشاكل صحية عديدة وذلك على نحو ما يحدث في أمراض : السل، الكوليرا، التيفوئيد، السعال الديكي الزهري والسيلان.[55, 56, 57]

IV- 6- مقاومة البكتيريا:

يعيش عدد كبير من البكتيريا على الجلد ،داخل الفم ،الأمعاء والممرات الهوائية. وتخلو بقية أنسجة الجسم عادة من البكتيريا ،يمنع الجلد والأغشية التي تبطن الجهازين التنفسي والهضمي. تمنع البكتيريا الضارة من الدخول إلى بقية أجزاء الجسم. لقد دل التشريح أن لكل جهاز من أجهزة الجسم خلقه الله وسائل مناعة وهي إما تمنع دخول الميكروبات وإما تكاثرها فمثلا:

الجلد له دور بالغ الأهمية فهو حاجز حماية أولي لكل أعضاء الجسم الداخلية وكما أنه يفرز العرق لقتل الميكروبات أو منعها من التكاثر.

الأنف به شعيرات ومواد مخاطية لاصطياد الميكروبات.

إن للردود الفعلية المنعكسة مثل الكحة والعطس دور في طرد الميكروبات إلى الخارج عبر القصبة الهوائية والمبطنة بغشاء مخاطي يحتوي ملاير الهدبيات التي تتحرك لدفع المواد والأجسام الغريبة إلى الخارج.

الفم وما يحتويه من لعاب وإنزيمات يعمل على قتل البكتيريا أو طردها كما يحدث عند البصق.

المعدة إذ تحتوي هذه الأخيرة على عصارة هاضمة حامضة لا تسمح بنمو البكتيريا.

الأمعاء تحتوي عصارة هاضمة قلوية تقتل البكتيريا.

العين تعمل رموش العين على درء الأجسام الغريبة ولها دفاع آخر يتمثل في الدموع والتي تغسل العين باستمرار بما تحتويه من مواد كيميائية تمنع تكاثر الميكروبات.

وعندما تدخل البكتيريا الضارة الجسم ،تطُوقها كريات الدم البيضاء وتهاجمها ،كميلُ كون الدم

أجساماً مضادة وهي مواد تقتل أو تُضعف البكتيريا.[58]

غير أنه ما يجلب الانتباه أن البكتيريا تبدي مقاومة للأجسام المضادة ومقاومة البكتيريا نوعان:

IV- 6- 1- المقاومة الطبيعية:

تكون بوجود مقاومة تبديها البكتيريا بشكل طبيعي لأي مضاد حيوي ومن أمثلة ذلك احتواء الجدار الخلوي (coli bacaille) على غشاء غير نفوذ للبنسيلين .

IV- 6- 2- المقاومة المكتسبة:

هنا يجدر الإشارة إلى أن الاستعمال المفرط لمضادات البكتيريا يعزز من مقاومتها للمضادات، إذ تتأقلم مع الظروف الجديدة.

IV- 7- المضادات الحيوية:

IV- 7-1- لمحة تاريخية :

لا يمكن القول بأي حال من الأحوال أن المضادات الحيوية وليدة اليوم بل موجودة بوجود البكتيريا غير أن مفهومها الحالي تدرج منذ عرف الصينيون الفوائد العلاجية للغلاف العفني المحيط بفول الصويا مرورا بعصر الفراعنة إلى العصر الحديث أين أصبحت محط الاهتمام عندما استعملت النباتات كعلاج كثير من الأمراض والعدوى. [58]

IV- 7 -2- تعريف المضادات الحيوية:

لاحظ العالم Vullemin عام 1889 المضادات الحيوية بينما كان يعمل على المزارع الجرثومية المعرضة للهواء ويفحصها من وقت لآخر تلوث لهذه المزارع وتشكل مستعمرات جرثومية شفافة مما يعني أن البكتيريا قتلت بمادة أخرى، أي أن هناك تنافس بين الميكروبات من أجل البقاء والعيش بحيث يمنع كل ميكروب نمو الميكروبات الأخرى وبالتالي يتغذى على أكبر قدر ممكن من الغذاء الموجود في وسط المحيط، من هنا انطلق اسم Antibiotics (المضادات الحيوية). [59]

تلت بعدها تحديد مفهوم المضادات الحيوية وتسميتها بهذا الاسم من طرف العالم وكسمان Wksman سنة 1945. فالمضادات الحيوية إذن هي عبارة عن مواد كيماوية عضوية تتكون نتيجة للتفاعلات الأيضية لبعض الأحياء الدقيقة ،أول مضاد حيوي هو البنسيلين.

تُستعمل المضادات الحيوية حالياً لعلاج الكثير من الأمراض الميكروبي وبالرغم من الحقيقة المعروفة من أن بعض هذه المواد قد أمكن تصنيعها تجارياً على نطاق واسع إلا أن غالبيتها لا زالت تحضر تجارياً بالاستعانة بالكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاجها.

IV- 7-3- تصنيف المضادات الحيوية:

يمكننا أن نصنف المضادات الحيوية وفق خصائصها: الأصل، الطبيعة الكيميائية، طريقة عملها، مجال عملها، مكونتها الكيميائية ومقاومة البكتيريا لها.

IV- 7-4- تحضير سلالات البكتريا:

العينات البكتيرية زرعت في أوساط Bouillons nutritifs وحفظت عند الدرجة $37\ ^0C$ لمدة 18h قبل استعمالها في دراسة الفعالية البيولوجية وذلك من اجل الوصول إلى الطور اللوغاريتمي للعينات البكتيرية.

IV- 7- 5- تحضير وسط الزرع:

نسكب كميات محددة من وسط Muller hinton بمقدار 20 ml لكل قارورة ثم يترك حتى يتصلب ويتجفف في الفرن لمدة 20 min لإزالة الرطوبة المتبقية.

IV- 7- 6- تحضير المعلق البكتيري:

نأخذ كل مرة جذمة أي عينة من إحدى الأنواع للبكتيريا ونضعها في أنبوب اختبار يحتوي كمية من الماء الفيزيولوجيml 10, ثم نرج جيدا نسكب كمية معينة من المعلق الميكروبي في علبة بتري التي

تحتوي الوسط الزراعي و تترك لمدة وجيزة ثم تفرغ العلبة المعلق وتجفف داخل الفرن عند $37\ ^0C$ لمدة 10 min.

IV- 7- 7- الزرع والحضن:

نقوم بأخذ 1 ml من وسط bouillon nutritine المزروعة به البكتيريا بواسطة ماصة ونضعها في طبق بيتري المحتوية على MH نقوم برج الطبق رجا خفيفا حتى تشمل البكتيريا كل السطح والباقي نتخلص منه ثم نترك الطبق 15 min وعند درجة حرارة $37\ ^0C$ ليتجمد الوسط. [61]

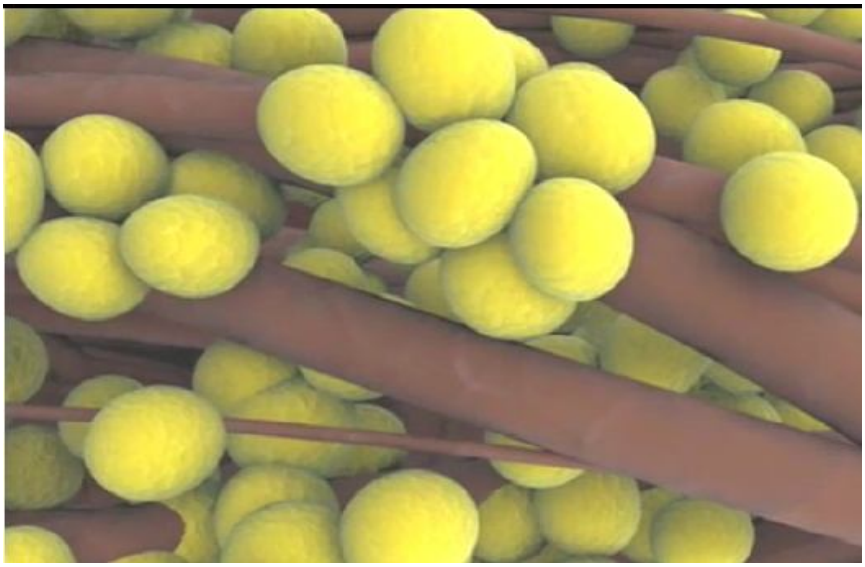
IV- 8- الأنواع البكتيرية المستعملة في الدراسة:

IV- 8-1- بكتيريا *Staphylococcus eureus (25923)* :

المكورات العنقودية الذهبية هي نوع من البكتيريا إيجابية الغرام تنتمي إلى جنس المكورات العنقودية سميت بذلك لأنها تبدو وكأنها قذيفة، ترتبط في مجموعات على شكل عنقود العنب قطرها حوالي1 µm، غير متحركة، لا هوائية اختياريا، تنمو بالتنفس الهوائي أو بالتخمر إذ تخمر العديد من الكاربوهيدرات يبطئ منتجة حمض اللاكتيك (Acid lactic) تم اكتشاف المكورات من طرف باستور وكوخ عام 1877-1878.

على الرغم من أن كثيرا ما وجدت في البشر إلا أنها تعد من البكتيريا المسببة للأمراض للإنسان. إذ يمكن أن تسبب التهابات الجلد أو التهاب الأذن الوسطى، كما يمكن أن تؤدي إلى تسمم الدم. وهي أيضا مسؤولة عن عدوى المستشفيات، التسمم الغذائي ومقاومته للمضادات الحيوية في بعض الأحيان تعد مشكلة كبيرة لعلاج المرضى.

دلت الإحصائيات أن من1 إلى5 ٪ من حالات العدوى في العالم ،تصل العدوى المكتسبة في المستشفيات إلى 30 ٪.[64 - 62]



الشكل (IV-2): بكتيريا *Staphlococcus eureus*

IV- 8-2- بكتيريا *Eschaerichia coli (25922)*:

هي بكتيريا عصوية (على شكل قضيب)، سالبة الجرام القولونية اختيارية الهواء، تندرج ضمن عائلة الأمعائيات، ذات أبعاد من 1 إلى 3µm ،توجد عادة في أمعاء الثدييات بما في ذلك البشر معظمها ليس مسببا للأمراض تلعب دورا هاماً في الأمعاء.[65]

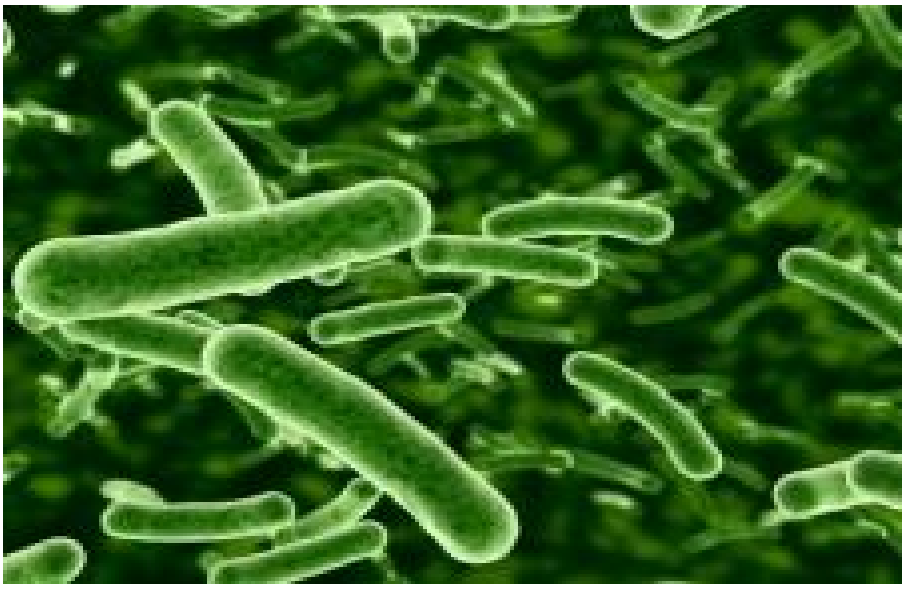
لكن بعض السلالات أكثر ضراوة فيما تسببه الالتهابات المعوية، التهابات الأعضاء التناسلية أو البولية وكذا الإسهال الحاد القاتل. تتكاثر بسرعة كبيرة للغاية عند درجة حرارة الجسم $37\ ^0C$ ،تشكل سلاسل وتتحرك بواسطة الأسواط. دلت الدراسات أنه يمكن للإشيريشيا اختراق الخلايا البطانية المكونة للحاجز الدموي الدماغي في الأطفال حديثي الولادة عبر الأوعية الدموية الدقيقة (BMECS) مسببة التهاب السحايا الذي يعتبر السبب الرئيس في المرض والوفاة .[66]

الشكل(IV- 3): بكتيريا Escherichia coli

IV- 8- 3- بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (27853) :

الزائفة الزنجارية هي بكتيريا سالبة الغرام منتشرة بكثرة، يمكن أن تسبب أمراض عند الحيوانات، بما فيها البشر. وإنها تعتبر ايجابية السترات، تحوي إنزيم الكاتالاز (Catalase) وكانت نتيجة اختبار الأوكسيداز لها ايجابي. تتواجد هذه البكتيريا في التربة، المياه، النباتات، الجلد ومعظم البيئات سواء الطبيعية أو التي هي من صنع الإنسان وتتواجد في جميع أنحاء العالم. تزدهر هذه البكتيريا في الأجواء الطبيعية، بل أيضا في الأجواء قليلة الأكسجين ومن ثم توسعت لتشمل العديد من البيئات الطبيعية والاصطناعية. في البيئة الحيوانية تتغذى على مجموعة واسعة من المواد العضوية وأيضا لديها إمكانيات متعددة، فعند إصابتها للكائن الحي تدمر أنسجته وتصيب الكائنات التي تعاني من نقص في المناعة. أعراض أمراضها هي التهاب المعمم وتعفن الدم. إذا كان انتشارها يحدث في أجهزة الجسم الحيوية، مثل الرئتين أو المسالك البولية أو الكليتين، يمكن أن تكون قاتلة. نظراً لأنها تتغذى على السطوح الرطبة، من الممكن أن تتواجد هذه البكتيريا في المعدات الطبية، مثل أنبوب القسطرة ولذلك فهي أيضا من الاخماج المشفوية وهي من

مسببات طفح الحمام الحار الجلدي وهي أيضا قادرة على تحليل المواد الهيدروكربونية وقد استخدمت لتكسير القطران والنفط عند حدوث تسرب في النفط. [67]



الشكل (IV- 4) : بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

الجانب العملي
الدراسة البيولوجية

I- الدراسة البيولوجية:

تمت الدراسة البيولوجية للمركبات المحضرة سالفا من طرف S. atia ومساعديه. [70] وهي: 4, 4'- ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل ميثان ذو الصيغة المجملة ($C_{39}H_{28}O_2N_6$) ونرمز له احتصارا بـ (A)، 4, 4'- ثنائي [(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثان ذو الصيغة المجملة ($C_{40}H_{28}O_2N_6$) ونرمز له بـ (B)، 4,4'- ثنائي [(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثر ذو الصيغة المجملة ($C_{38}H_{28}N_6O_3$) ونرمز له بـ (C). وذلك بدراسة النشاط المضاد للأكسدة والفعالية المضادة لمجموعة من الأنواع البكتيرية من اجل تثمين هذه المركبات.

II- طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

وهي قياس قدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة وتقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق تناولنا في بحثنا ثلاث طرق التي تعتمد على مبدأ التلوين في طول موجي معين وهي:

- اختبار إرجاع الحديد الثلاثي(FRAP)
- اختبار موليبدات الفوسفات
- اختبار DPPH

حيث اعتمدنا في دراستنا على جهاز الأشعة المرئية وفوق البنفسجية.

II-1- التحليل الطيفي بالأشعة المرئية وفوق البنفسجية "UV-Vis ":

هي طريقة تحليل نوعية وكمية في آن واحد، حيث أنه يؤدي امتصاص الجزيئات للأشعة الكهرومغناطيسية في المنطقة فوق البنفسجية والمرئية من الطيف إلى انتقال واحد أو أكثر من الإلكترونات الموجودة في مدارات ذات طاقة منخفضة إلى مدارات ذات طاقة أعلى وبما أن هذا النوع من

التحليل يشتمل على إثارة إلكترونية فيطلق عليه أحيانا التحليل الطيفي الإلكتروني يمكن توضيحه في الشكل (1-II).

أما العلاقة التي تربط بين الطاقة الممتصة في عملية الانتقال الإلكتروني والتردد (υ) أو الطول الموجي λ للأشعة تعطي كما يلي:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\upsilon = hc \setminus \lambda \qquad [1\text{-II}]$$

حيث:

E1: طاقة المدر الذي يوجد فيه الالكترون والجزيئ في الحالة العادية

E2: طاقة المدر الذي ينتقل اليه الكترون نتيجة الاثارة

ΔE : الفرق في طاقة

h: ثابت بلانك ، C: سرعة الأشعة، υ: التردد

أما كميا فتعتمد هذه الطريقة على قانون بيرلامبير الذي يعطى بالعلاقة التالية:

$$A = \varepsilon LC \qquad [2\text{-II}]$$

حيث:

A: الامتصاص، ε: معامل الامتصاص المولي، L: طول الخلية، C: تركيز الوسط.

I_0 و I : كثافة الشعاع قبل وبعد مروره عبر المحلول على الترتيب.[68]

الشكل(II-1): جهاز الأشعة المرئية و فوق بنفسجية

II-2- المواد الكيميائية المستعملة:

II-2-1- المتفاعلات:

موليبدات الأمونيوم $(NH_4)_2MoO_4$، حمض الكبريتيك H_2SO_4، فوسفات الصوديوم Na_3PO_4،

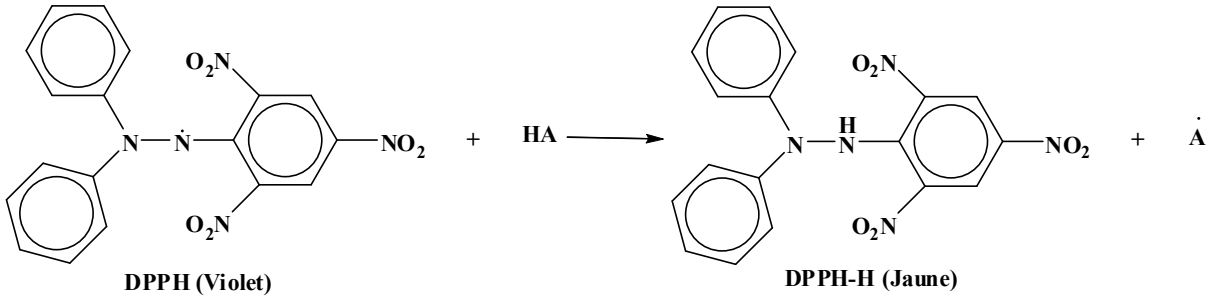
حمض الأسكوربيك Vc، 2، 2'- ثنائي فينيل-1- بيكريل هيدرزيل DPPH، أسيتات الصوديوم CH_3COONa، حمض الخل المجمد CH_3COOH، 2، 4، 6- ثلاثي بيريدين ثلاثي ازين فيريك TPTZ، ثلاثي كلوريد الحديد المائية $FeCl_3$-$6H_2O$.

II-2-2- المذيبات:

ماء مقطر H_2O، ايثانول C_2H_5OH، ثنائي مثيل سلفو أكسيد DMSO، حمض كلور الماء HCl .

II-3- اختبار الـ DPPH:

هو اختبار مضاد للجذور الحرة ولقد سبق تعريفه من طرف العالم بولواز سنة 1958 ويعتمد على نسبة اختزال جذر DPPH في وجود مركب لتقدير فعالية هذا المركب كمضاد للأكسدة ولمتابعة الاختبار نستعمل جهاز UV-Vis. DPPH ثنائي فينيل بكريل هيدرازيل (diphenyl picryl hydrazyl) هي مادة صلبة لونها بنفسجي مسود، يشتق هذا الجذر الحر من جزيئه DPPH-H وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر كما هو موضح في الشكل (II-2)



شكل(II-2) معادلة التثبيط باستعمال جذر DPPH

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذور الحرة حيث يترك 30 min مباشرة مع المركبات المضادة للجذور, مع العلم أن الجذرDPPH مستقر نسبيا يتفاعل مع جزئية مضادة للجذور ليتحول إلى DPPH-H مع فقدان الامتصاصية بطول الموجة الأعظمية $\lambda = 517$ nm.

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول للقضاء على 50% من الجذور الحرة, النتيجة نعبر عليها ب: IC_{50} وهي معرفة بتركيز المحلول المعبر عنه بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو بـ (µM) للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لمسح 50% من جذور DPPH وتحسب انطلاقا من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي % بدلالة تركيز المحلول ,كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية مضادات الجذرية كبيرة. [69]

هذا الاختبار مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها سريع، سهل وغير مكلف كما استخدم هذا الجذر بصورة شائعة كمادة كاسحة للجذور، يتحد جذر على الفور مع جميع أنواع الجذور الحرة مكونا نواتج أخف لونا بكثير من لون الجذر.

في اختبار DPPH نلاحظ تغيرات مختلفة لمضادات الأكسدة تبعا لطبيعتها، من بينها حركية التفاعل وفقا للزمن اللازم للوصول إلى نتيجة وقدرة مضاد الجذور تحسب انطلاقا من نسبة DPPH المتبقية في نهاية الوقت المحدد للتفاعل.

II - 3-1- طريقة العمل :

- نقوم بتحضير محلول DPPH بتركيز 250 µM المحضر في الإيثانول وذلك بإذابة 0.0295g في 150 ml من الايثانول علما أن الكتلة المولية الجزئية لـ DPPH هي: $M_{DPPH} = 394$ g/mol
- نحضر محاليل بتراكيز (50 -500 µM) من حمض الأسكوربيك بإذابته في ثنائي مثيل سلفو كسيد
- نأخذ 1 ml من المحاليل المخففة ونضيف 3 ml من محلول DPPH لكل تركيز.
- نضع المحاليل في مكان مظلم لمدة 30 min عند درجة حرارة الغرفة، ثم نقيس الامتصاصية.
- نقوم برسم منحنيات تغيير نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز حيث تحسب نسبة التثبيط وفق العلاقة التالية: $I = (A_0-A_i)/ A_0 \times 100$

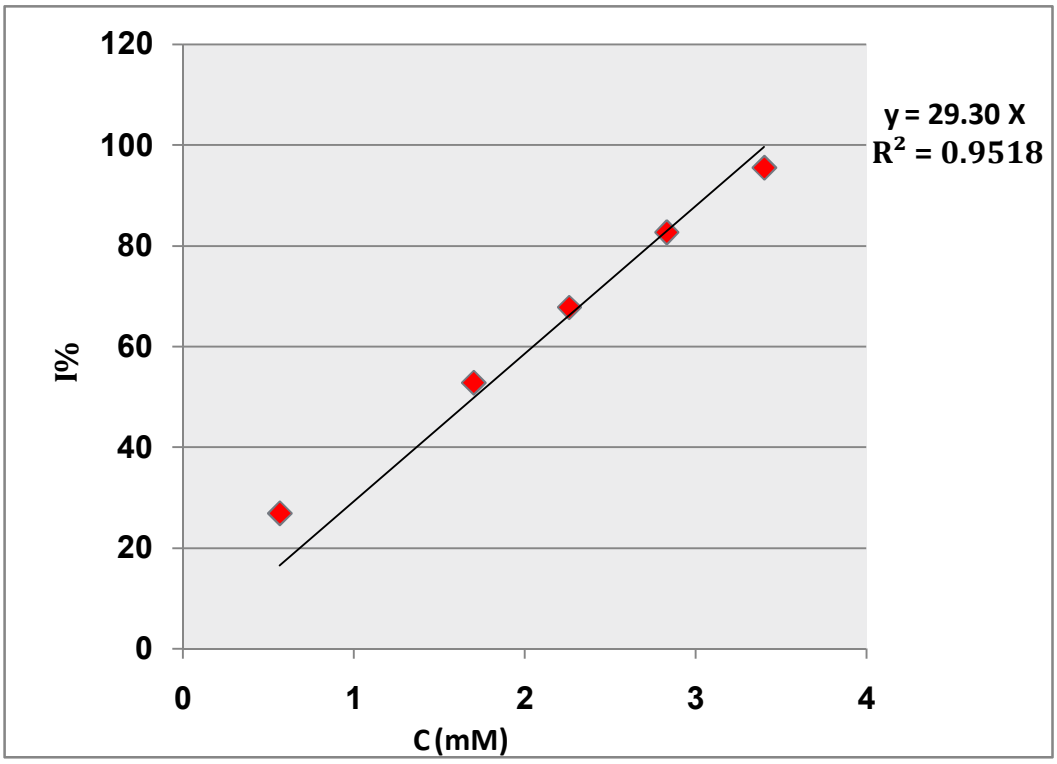
A_0: امتصاصية DPPH عند (517 nm)

A_i:امتصاصية DPPH في وجود المركب بعد 30 min عند (517 nm)

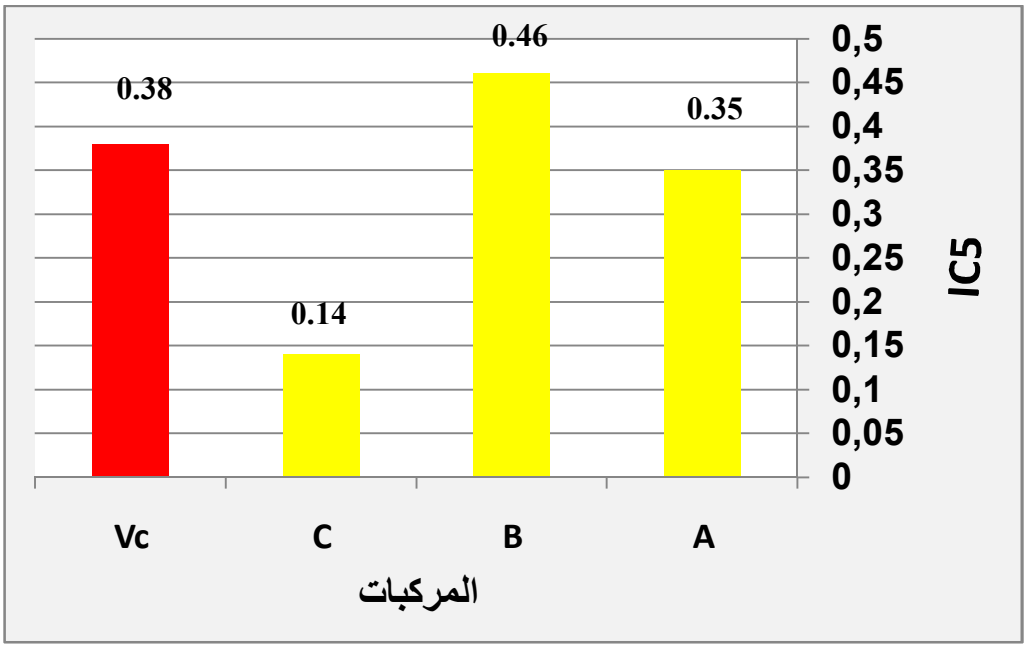
I%: نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة.

ونقوم بنفس العمل السابق بالنسبة جميع المركبات المدروسة (A, B, C).[70].

II -2-3 – النتائج و المناقشة



المنحنى (II – 1): منحنى قياسي لحمض الأسكوربيك في إختبار DPPH



شكل(II-2): أعمدة بيانية توضح قيمةIC50 لكل مركب

II - 3-3- مناقشة النتائج:

من خلال الرسم البياني الموضح في الشكل (II-3) واعتمادا على أنه كل ما نقصت قيمة الIC_{50} كلما زادت الفعالية المضادة للأكسدة. يمكن القول أن جميع المركبات تملك فعالية مضادة للأكسدة جيدة مقارنة بالمركب المرجعي المستعمل حيث نجد أن الفعالية المضادة للأكسدة للمركب A أكبر بـ 5 مرات وفعالية المركب B أكبر بـ 3 مرات بينما فعالية المركب C أكبر ب 12 مرة من فعالية حمض الأسكوربيك.

II-4- اختبار الحديد الثلاثي (FRAP):

تم تحديد اختبار القدرة الارجاعية لأول مرة سنة 1986 من طرفOyaizu . [71]

يعتبر اختبار إرجاعية ايونات الحديديك مباشرا وسريعا وهو يستعمل أساسا لقياس مدى قدرة مضادات الأكسدة غير الإنزيمية ويستعمل هذا الاختبار لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات المدروسة في وسط متعادل يعتمد على الإرجاع والذي يعطي في وجود الحديد الثلاثي لون أزرق فاتح، يمكن قياس الامتصاصية بجهازUV-Vis عند طول موجة 594 nm.

طريقة التحليل بـ FRAP هي تجربة سريعة ومباشرة نوظفها لقياس مضادات الأكسدة لا إنزيمية داخل السائل البيولوجي الحيوي (البلازمة البشرية) ونحن استعملنا هذا الاختبار لدراسة ومتابعة مضادات الأكسدة في مركباتنا فنلاحظ التغير بزيادة الامتصاصية الضوئية في مجال زمني منظم من1 إلى 4min وبصورة أدق هذا الاختبار يسمح لنا بمتابعة حركية التفاعل وكذلك متابعة كثافة الضوء الممتص بدلالة الزمن ومن ثم حساب ثابت معدل سرعة التفاعل كما هو موضح في الشكل(II-3)

$$Fe^{+3} + TPTZ \longrightarrow Fe^{+2} + TPTTZ \qquad (3\text{-II})$$

II-4 - 1 - طريقة العمل:

للحصول على خليط FRAP نحضر ثلاث محاليل في أوساط مائية كالتالي:

- نحضر 0,3 M من أسيتات الصوديوم عند PH = 3.6 بحيث نزن 0.62 g من أسيتات الصوديوم (CH_3COONa) مع 3.2 ml من حمض الخل المجمد (CH_3COOH) يكمل المحلول إلى 200 ml بالماء المقطر.
- نحضر 0.01 M من (TPTZ) في0.04M من HCl أي نزن 0.078 g من (TPTZ) في 25 ml من HCl.
- نحضر0.02M من ثلاثي كلوريد الحديد المائية ($FeCL_3$-$6H_2O$) أي نزن0.135 g في 25 ml من الماء المقطر.

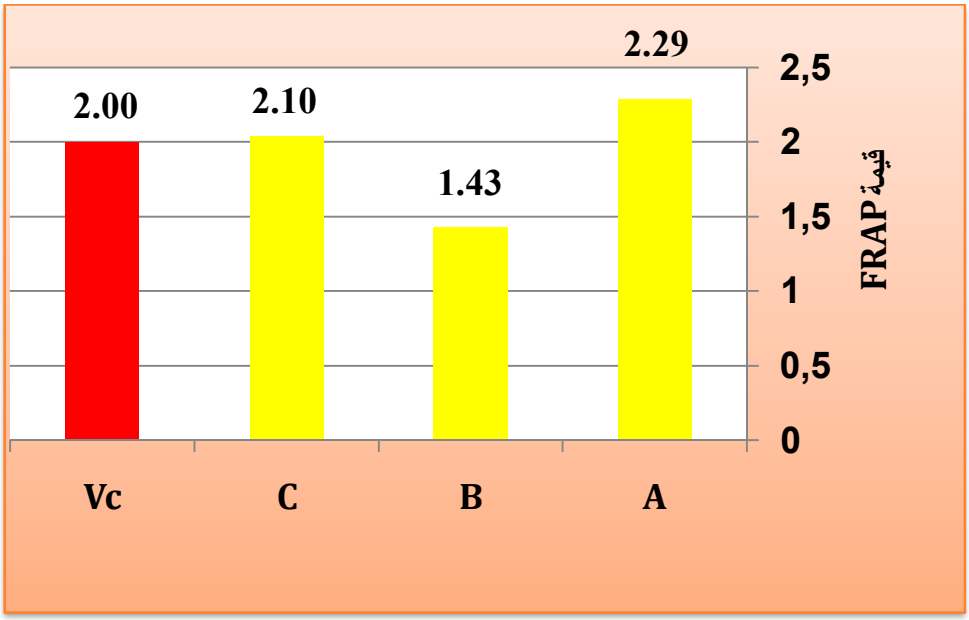
نخلط المحاليل الثلاثة بتكافؤ10:1:1 ونسميه خليط FRAP.

نقوم بعملية إذابة المركبات كما استعملناه في الاختبار السابق والتراكيز السابقة،نأخذ 3ml من محلول FRAP ونضيف له 100µL من كل محلول ويترك مدة 4min في درجة حرارة 37ºC، نقيس الامتصاصية لهذا التفاعل قبل إضافة المحلول أي محلول الـ FRAP وحده وبعد إضافة المحلول .

نقوم بحساب قيمة (FRAP) وفق العلاقة التالية:[72]

$$\text{FRAP } (\mu M) = [(0 - 4\text{min}''A_{593}\text{ nm of test sample})/(0 - 4\text{min}''A_{593}\text{ nm of standard})] \times \text{FRAP value of standard i.e. } 2$$

II - 4-2– النتائج و المناقشة :



الشكل(II -3): أعمدة بيانية توضح قيمة FRAP لكل مركب

مناقشة النتائج:

يتضح لنا من النتائج اختبار FRAP الموضحة في الشكل(II– 3) إن المركبين A و C لهما قيمة اكبر من قيمة المضاد الاكسدة للمركب المرجعي (حمض الاسكوربيك Vc) على غير المركب B الذي له قيمة المضاد الاكسدة اقل من المركب المرجعي .

II-5 - اختبار المولوبيدات :

غالبا ما يعتبر هذا الاختبار في بعض الدراسات طريقة لحساب إجمالي القدرة المضادة للأكسدة وهو اختبار سريع ومنخفض التكلفة وسهل التكرار, يسمح بقياس القدرة المضادة للأكسدة للمركبات المراد دراستها. في وجود عامل اختزال وهذا بإرجاع حمض فسفومولبيديك (Acide phosphomolybdic) إلى فوسفومولبيدات (phosphomolybdate) ذو اللون الأزرق حسب التفاعل التالي:

$$Mo^{+6} \longrightarrow Mo^{+5} \qquad (4 - II)$$

وطيف الأشعة المرئية و فوق البنفسجية في هذا المركب لديه الحد الأقصى مميزة في 695 nm.

واستخدمت هذه الطريقة بنجاح لتحديد النشاط المضادة للأكسدة. في هذه الدراسة استعملنا حمض الأسكوربيك (Vitamine C) كأساس مرجعي في آسر الجذور الحرة. [73]

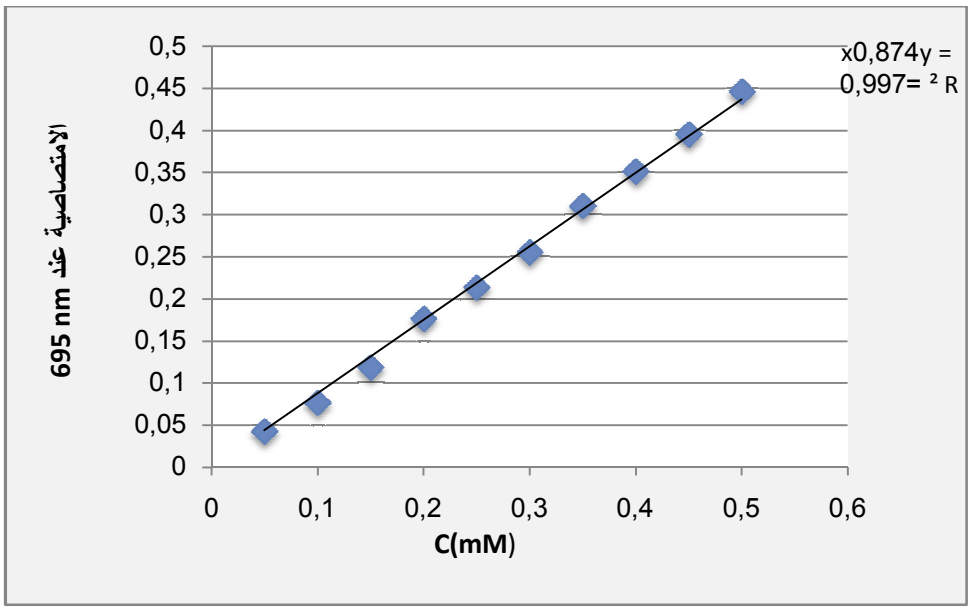
II - 5 - 1 - طريقة العمل :

محلول موليبدات الفوسفات يحضر كمايلي :

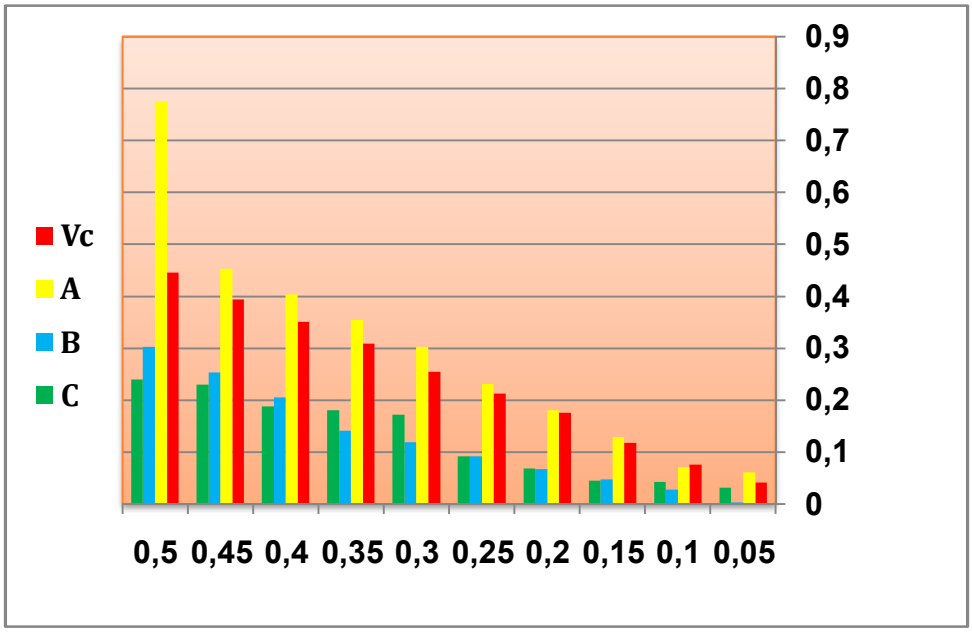
0.6 M من حمض الكبريتيك H_2SO_4، 29 mM من فوسفات الصوديوم Na_3Po_4 ، 4 mM من موليبدات الامونيوم $(NH_4)_2\,MoO_4$.

نأخذ 0.3ml من حمض الاسكوربيك بحيث يتراوح تركيزه ما بين 500µM و50µM ونضيف له 3 ml من محلول موليبدات الفوسفات ثم نضع المزيج في حمام مائي حرارته95^0C لمدة ساعة ونصف وبعدها نترك الأنابيب تبرد تدريجيا ونقيس الامتصاصية عند طول موجة 695 nm. وبنفس الطريقة نعامل جميع المركبات الأخرى المراد دراستها ومن ثم نرسم المنحنى القياسي. [74]

II -5-3- النتائج و مناقشتها:



المنحنى (II - 2) : المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك في إختبار موليبدات الفوسفات



الشكل (II – 4): امتصاصية المركبات بدلالة التركيز في اختبار المولييدات

مناقشة النتائج:

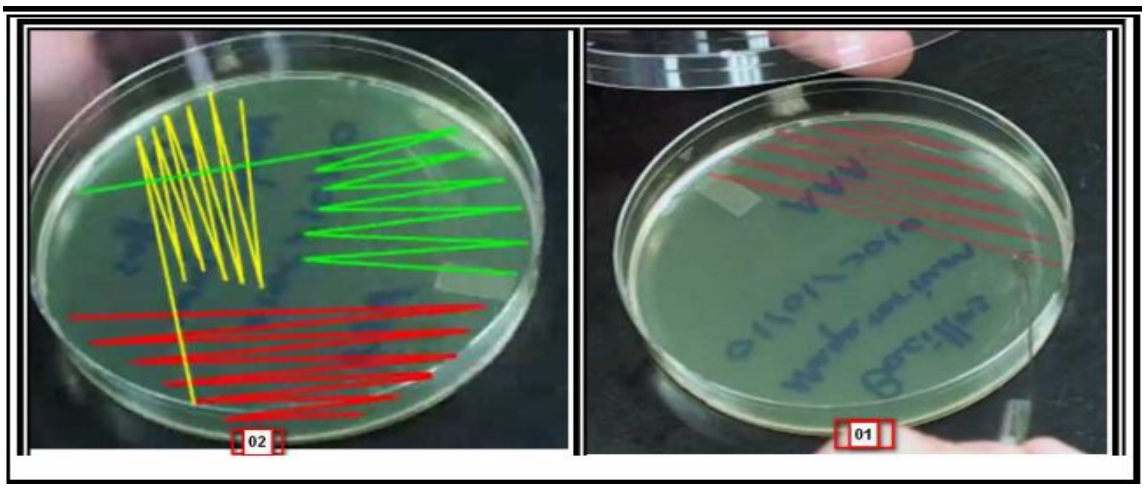
نلاحظ من خلال الشكل (II – 4) انه كلما زاد التركيز زادت الامتصاصية ومنه تبين لنا إن المركب A أقوى أما بالنسبة للمركبين المتبقين ومن المركب المرجعي بينما تبين لنا بالنسبة للمركبين B و C نجد انه في حالة التراكيز الصغيرة يكون المركب C لديه اكبر امتصاصية من المركب B أما في حالة التراكيز الكبيرة يكون المركب B اكبر من المركب C ومنه في كل الحالات يبقى المركب A له فعالية مضادة للأكسدة أفضل.

III – دراسة الفعالية ضد ميكروبية :

متابعة لدراستنا لهذه المركبات أردنا معرفة الخصائص البيولوجية التي يمكن أن تحملها هذه المركبات حيث قمنا بدراسة تأثير هذه المركبات على ثلاث سلالات من البكتريا هي: (staph, pseudo, E.Coli).

III – 1- طريقة العمل :

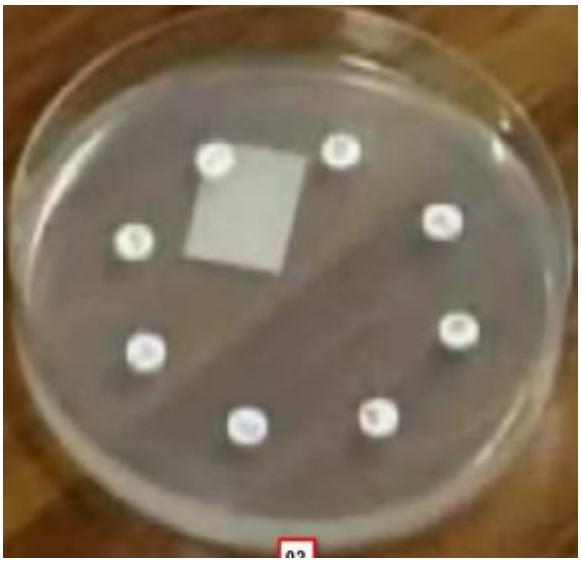
- نقوم أولا بزرع البكتريا بحيث تتم دوما في وجود لهب موقد البنزن لتفادي انتشار البكتريا في الجو وقبل ذلك نكون قد قمنا بتسخين وسط GN (gélose nutritive) في حمام مائي ثم نقوم بصبه في علب بيتري و من ثم تزرع البكتيريا على الوسط كما هو موضح في الشكل (III – 1) :



شكل(III – 1): زرع البكتريا

- تحضير الوسط الزراعي يتم بإذابة الوسط الجيلوزي Muller Hilton (M. H الوسط المغذي) ، سكبنا بكميات محددة في علب بتري في كل علبة حوالي 20ml، ثم وزعت على كامل العلبة بشكل متجانس، وبعدها تركت لي تجفف لمدة 20min.
- وبالنسبة للأقراص قمنا بقص أوراق الترشيح رقم 3 على شكل أقراص ذات أقطار 6mm ثم وضعناها داخل الفرن في درجة حرارة 120°c لمدة 30min لتعقيم .
- ويتم كذلك تحضير المعلق الميكروبي بأخذ جذمة من البكتيريا، قد غمست في أنبوب اختبار يحوي 10ml من الماء الفيزيولوجي ثم سكبنها في علب بتري المحضرة مسبقا بعد تصلب الوسط الجيلوزي أدخلنا العلب للتجفيف لمدة 15min في درجة 37°c .

- في الأخير تتم عملية الحضن بعدما تم سكب كمية معينة من البكتيريا على وسط الزرع يتم في هذه الخطوة استعمال أقراص من ورق ترشيح التي تم تعقيمها سابقا وذلك يتبلل الأقراص بالمركب المعني بالدراسة، ثم يثبت القرص فوق الوسط لتدخل علبة بيتري مقلوبة داخل الحاضنة وتحضن مقلوبة لمدة 24h وبدرجة 37 ºc كما هو موضح في الشكل(III – 2): .

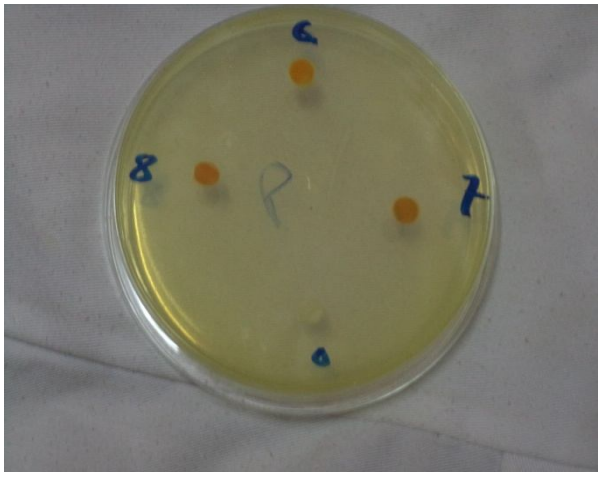


شكل(III – 2): وضع الأقراص

III – 2 - النتائج ومناقشتها:

III – 2 – 1- نتائج الاختبار:

كما هو موضح في الشكل (III – 3) والجدول (III -1)::



شكل(III – 3): نتائج الاختبار

في هذه الحالة تم استعمال عدة تراكيز من اجل معرفة التركيز المثبط للمركبات المحضرة على انواع البكتريا المستعملة ونتائج كانت سلبية في كل تركيز كالأتي:

جدول(III - 1): جدول يوضح نتائج التثبيط

Pseudomonas aeruginosa	*Eschaerichia coli*	*Staphylococcus eureus*	
-	-	-	**مركب A**
-	-	-	**مركب B**
-	-	-	**مركب C**

III – 2 – 2- تفسير النتائج :

من خلال النتائج المتحصل عليها في الشكل (III-3) و الجدول (III-1) نستنتج أن جميع المركبات ليس لها فعالية مثبطة لهذه الأنواع من البكتيريا التي قمنا باختبارها ومنه نستنتج أن هذه الأنواع من البكتيريا مقاوم لهذه المركبات .

الخاتمة

خاتمة:

في هذا العمل تركز اهتمامنا على دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية البيولوجية للمركبات الازو امينية في إطار تثمينها. في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة اختبرنا المركبات بثلاث طرق هي: اختبار DPPH, اختبار FRAP واختبار الموليبدات.

وفيما يخص DPPH تبين لنا أن المركبات المدروسة C, A لها فعالية أحسن من فعالية حمض الاسكوربيك أما المركب B أقل. أما بالنسبة لاختبار FRAP فان المركبات A وC كانت لهم فعالية اكبر من حمض الاسكوربيك على خلاف المركب B الذي كانت فعاليته اقل من فعالية حمض الاسكوربيك وفي اختبار الموليبدات كذلك تبين أن المركب A له قدرة امتصاص اكبر من قدرة حمض الاسكوربيك ومنه فان جميع المركبات ذات فعالية جيدة نوع ماء حسب نتائج الدراسة.

أما بالنسبة لدارسة البيولوجية أردنا معرفة ما مدى فعالية هذه المركبات مع البكتيريا وقمنا باختبارها مع ثلاث أنواع من البكتيريا: *Eschaerichia coli, Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus eureus*

وتبين لنا أن جميع مركباتنا لا يمكنها أن تؤدي أي نشاط اتجاه هذه النوعيات من البكتيريا.

وعليه يمكن القول بان جميع المركبات يمكن أن تلعب دورا في القدرة التثبيطية كمضادات للأكسدة.

في حين انه ليست لها نشاط مضاد لأنواع البكتيريا المدروسة ويمكن أن تكون لها فعالية مع انواع اخرى نأمل أن تكون في دراسات مستقبلية .

قائمة المراجع

المراجع باللغة العربية:

[2] وليد محمد السعيطي– وائل غالب محمد، كتاب اساسيات الكيمياء العضوية، الجمهورية الليبية الشعبية الاشتراكية العظمى، 2008.

[7] غيابة زينب، دراسة تحليلية للبيدات وفينولات ومكونات أخرى لبعض أصناف نخيل التمر المحلية، مذكرة دكتوراه، جامعة ورقلة (2015)، ص99.

[11] بن عشورة صبرينة البتول، الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية، مذكرة ماجستير في الهندسة الكيميائية، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2007).

[13] د/محب طه صقر، استاذ فسيولوجيا النبات، منشور بعنوان فسيولوجيا الاجهاد، Stress physiology كلية الزراعة، جامعة المنصورة.

[14] بوبلوطة حورية، النشاط المضاد للتاكسد وامكانية وقاية المستخلص الميثانولي لنبتي الـ Matricia pubescens و Centaurea Incana على السمية الكبدية، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة 2009.

[15] العابد ابراهيم، دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا والمضادة للاكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران Tragnum nudatum، مذكرة ماجستير جامعة ورقلة (2000).

[16]علي عبد الحسن سعيد، كيمياء الجذور الحرة، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة الأولى (2001).

[17]هيكل م.س.وعمر. عبد الرزاق عمر(1993) . النباتات الطبية والعطرية، كيمياؤها،إنتاجها، فوائدها، الطبعة الثانية، للنشر منشأة المعارف بالإسكندرية (مصر)،(1993)، ص134.

[18] أبو عبد الله محمد بن أحمد الذهبي، الطب النبوي، الطبعة الثالثة، دار أحياء العلوم بيروت،(1410هـ-1990)

[19] عنبر محمود بأحمد حسانين، نباتات الطبية والعطرية، قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة سوهاج، ص28.

[22] مسعي محمد احمد، دراسة فيتوكيميائية للبيدات وفينولات نوى خمسة انواع من التمر المجني من منطقة ورقلة، مذكرة ماجستير ورقلة (2013).

[53] بابا عربي الياس، تحضير بعض أملاح الفوسفونيوم ودراسة فعاليتها البيولوجية على بعض أنواع البكتيريا عند مزجها مع البنيسلينV، مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة، 2009، ص23.

[54]مجلة العلوم .تحديات المقاومة البكتيرية .المجلد 15 العدد 10 أكتوبر / تشرين الأول (1999)

[59]حوة ابراهيم، دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة. مذكرة ماجستير،جامعة ورقلة،(2013)،ص29

[60] محمد الأزهر القادري ،تصنيع بعض الامبسيلين ودراسة فعاليتها البيولوجية على بعض انواع البكتريا , ماجستير جامعة قاصدي مرباح 2008 ,ص31.

[61] د. عادل نوفل. جامعة دمشق. كتاب الكيمياء الصيدلانية (القسم النظري).1980-1981

ص251-264.

[63] م. نائر عبد الباري و م.م. ياسر عادل جبار، عزل وتشخيص جرثومة Staphylococcus من الأشخاص المصابين بأمراض معوية وتنفسية في محافظة المثنى وفحص المقاومة الميكروبية تجاه المضادات الحياتية، مجلة أوروك للأبحاث العلمية المجلد(4) العدد(1) كانون الثاني 2011

[67] سنيقرة موسى، تصنيع بعض مشتقات الأوكساسيلين ودراسة فعاليتها البيولوجية على بعض أنواع البكتيريا، مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة 2008 ،ص 38

[69] الدكتور أحمد الصفار "الطرق الآلية في التحليل الكيميائي" ديوان المطبوعات الجامعية 91/11.

[70] بوقوادة مصطفى ، 2008، مذكرة ماجستير،جامعة قاصدي مرباح ورقلة

المراجع باللغة اللاتينية:

[1] D. West,E. Librta Et S.B.Padhye Coord.Chem. Rev, 123(1993) 49.

[3] Zidani leila ; etude de la deggradation dee quatre colorants azoiques par photocatalyse-comparaison avec d'autres procedes d'oxydation avances (PoAs), magister, université de Batna 2008.

[4] H. Tang, A.Wang, Steven, O. Salley, K.Y. Simon Ng, The effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Biodiesel, J Am Oil Chem Soc 85, (2008),pp.373-382.

[5] N.Moudi,rLes polyphnols de la prolis de algerienne, Mémoire de Magister, Unversité de M'sila, (2004).

[6] R.Christov and V.Bankova,J.Chromatogr, 623,1 85,(1992).

[8] Hammond, G.E., Pamela, White, J., (2011): A Brief History of Lipid Oxidation. J Am Oil Chem Soc. 88:891-897.

[9] Pockorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., (2001): Antioxidants in food First.

[10]F.Hu,H.R.Hepburn,Y.Li,M.Chen,S.E.Radloff,S.Daya.J Ethnopharmacol,100(3), 276-83,(2005).

[12]M.ASOO brattee al, phenolic as potential and Molecular therapentic of MUTAGENESSIS, 579(1), 2005,PP.200-13.

[20]Sen ck, packer L.antioxidant and redox regulation of gene transcription faseb J 10 (7) pp709-720 (1996).

[21]Khader H,Falah M.Aziz, the effect of sustanon (testosterone derivatives) taken by athletes on the testis rat, Jordan Journal of Biological Sciencesn5(2) pp 113-119 (2012).

[23] Frankerl, E.N., Lipid Oxidation. Pray. Lipid Res. VOL 19. PP. 1-22. Pergamon Press Ltd 1980. Printed in Great Britain.

[24] Russell, G. A., (1957): Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, J. Am. Chem. Soc, 79: 3871-3877.

[25] Howard, J.A., and Ingold, K. U., (1968): The self-reaction of sec-butyl-peroxyl radicals: confirmation of the Russell mechanism. J. Am. Chem. Soc, 90: 1056-1058.

[26] Ursini, F., Tubaro, F., Rong, J., and Sevanian, A., (1999): Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. Nutrition Reviews, 57: 241-249.

[27] Opara, E. C., and Rockway, S. W., (2006): Antioxidants and Micronutrients. Dis Mon, 52:151-163.

[28] Oliboni, L. S., Dani, C., Funchal, C., Henriques, J. A., and Salvador, M., (2011): Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (Vitis labrusca var. Bordo) on Wistar rat tissues. An.Braz. Acad.Sci, 83: 1403-1411.

[29] B. Halliwell, J. Gutteridge (Eds.), Free Radicals In Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, 1999, pp. 105-245.

[30] Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O., (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organization Journal, 5: 9-19.

[31] Wang, W., Ballatori, N., (1998): Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological function. Pharmacol Rev, 50: 335-356.

[32] Larson, R. A., (1988): The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27: 969-978.

[33] Chahardehi, A. M., Ibrahim, D., and Sulaiman, S. F., (2009): Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in Urticaceae family. J. Applied Bio. Sci 2:01-05.

[34] Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., et Wul, M. J., (2003): Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn). J. food Drug Anal, 11(1) :60-66.

[35] Kim, D.K., et Lee, C. Y., (2004) : Comprehensive Study on vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship . Critical Reviews in Food Science and Nutrition,44 : 253- 273.

[36] Butnarin, M., and Grozea, I., (2012): Antioxidant (Antiradical) Compounds. J Bioequiv Availab, 4:107-109.

[37] Devasagayam, T. P. A, Tilak, J. C., Boloor, K.K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., (2004): Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. JAPI, 52:794-804.

[38] Gordon, M. H., (1990): The mechanism of antioxidant in vitro. "Food antioxidants".: Ed. HUDSON B.J.F. pp: 1-18.

[39] Nawar, W. F., (1996): Lipids.In: Fennema O, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p 225-320.

[40] Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992): Phenolic antioxidants.

[41] Decker, E. A., (2002): Antioxidant Mechanisms. In: Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology.(ed) Akoh, C.C., Min, D.B., .Marcel Dekker, Inc. New York, Basel. pp 535-560.

[42] Brewer, M. S., (2011) : Natural Antioxidants : Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Appliction. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 10:221-247.

[43] Ward, N. C., Hodgson, J. M., Croft, K. D.: Bruke, V.; Beilin, L.J., Puddey, I. B., (2005): The combination of vitamin c and grape-seed polyohenols increases blood pressure: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. Hypertens, 23: 427-434.

[44] Hasnain, B. I.: Mooradian, A. D., (2004): Recent trials of antioxidant therapy: What should we be telling our patients? Cleve. Clin. J. Med, 71:327-334.

[45] Cheung, M. C., Zhao, X. Q.: Chait, A., Albers, J. J. ; Brown, B. G., (2011): Antioxidant supplements block the response of hdl to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low hdl. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 21: 1320-1326.

[46] Kim, Y. I., (2006) : Does a high folate intake increase the risk of breast cancer ? Nutr. Rev, 64: 468-475.

[47] Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D.,Bames, J., Cullen, M. R., Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L. J. r, Valanis, B., Williams, J. H. J.r.; Barnhart S, Cherniack, M. G., Brodkin, C. A., Hammar, S., (1996): Risk factors for lung cancer and for intervention effects in caret, the beta-carotene and retinol efficacy trial. J. Natl. Cancer Inst, 88:1550-1559.

[48] Albanes, D., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., virtamo, J.,Edwards, B. K., Rautalahti, M., Hartman, A. M., Palmgren, J., Freedman, L.S., Haapakoski, J.: et al. (1996): Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. J. Natl. Cancer Inst, 88: 1560-1570.

[49] The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. (1994): The effect of vitamin e and beta carotene on the incidence of lung cancer prevention study group. N. Engl. J. Med, 330:1029-1035.

[50] Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. (2004): Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. Lancet, 364: 1219-1228.

[51] Myung, S. K., Kim, Y., ju, W., Choi, H. J., Bea, W. K., (2010): Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: Meta-analysis of randomized controlled trials. Ann. Oncol, 21:166-179.

[52] Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., Leeuwenburgh, C., (2001): Supplementation with vitamin c and n-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. Free Radic. Biol. Med, 31: 745-753.

[55]- Pr.Emile de Lavergne,Jean-Claude Burdin (**1973**):Les Bactéries.3émeéd.,Paris .
P 11-14.

[56] Courvalin .P.(**1992**). Interpretative reading of antimicrobial susceptibility testes.ASM News . **58:368-375** .
[57] Jorgensen . J.H., Ferraro .M. J**.(1998).** Antimicrobial susceptibility testing :general principles and contemporary practices. Clin. Infect. Dis **. 26: 973-980 .**
[58] Gherraf N, Tamma N.2011,The synthesis of (5-hydroxy-5-(1-methoxypropan-2-yl)-4-methylfuran-2(5h)-one, 5(1-methoxypropan-2-yl)-4-methylfuran-2(5h)-one and biological avtivity.J Fundam Appel Sci.3(2), 194-199
[62] Methicillin Resistan Staphylococcus aureus, Last Updated: January 2011p1.25

[64] The Food Safety File: Staphylococcus aureus Edition 2008.

[65] Silvia Michanie, Escherichia coli O157:H7 La bacteria que disparó el HACCP en laind ustria de la carne, Énfasis Alimentos Año IX, Nº3 Julio-Agosto, 2003.
[66] Ana Carolina de Mello Santos, Ana Carolina Matos Zidko, A virulência de scherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro, M u n d O d a S a ú d e, São Paulo: 2009;33(4):392-400.
[68] Salem Atia,Tahar Douadi, Ali Douadi, Touhami Lanez and Mousa Al-Noaimi.(2015). synthesis, spectroscopie studies of new azo ligands Schiff base and amines derived of 5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde.7(4):692-696.

[71] Oyaizu, M., (1986): Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44:307-315

[72] Nabasree, D., Bratati, D., (2007): Antioxidant activity of some leafy vegetables of India:A comparative study. *Food Chemistry*, 101(2), 471-474.

[73] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., (1999): Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal. Biochem, 269: 337-341.

ملخص:

في هذا العمل قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة بثلاث طرق (DPPH, FRAP, PM) و كذا الفعالية المضادة للبكتيريا على ثلاثة أنواع مختلفة من البكتيريا: Eschaerichia coli, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus eureus للمركبات التالية:

4 ,4'- ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل ميثان (A)،

4,4'- ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثان (B) ،

4,4'– ثنائي[(4- أزوفنيل سالسيلدين) أمينو] ثنائي فنيل إيثر (C) .

بالنسبة للفعالية المضادة للأكسدة كانت النتائج ايجابية ومضاهية للمركب المرجعي (فيتامين C) بل أفضل منه في بعض الأحيان، أما بالنسبة للفعالية المضادة للبكتيريا كانت النتائج كلها سلبية.

الكلمات المفتاحية: مركبات ازو أمينية، الفعالية المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا

Résumé:

Dans ce travail nous avons étudie l'activité anti-oxydante par trois méthodes (DPPH, FRAP, PM) et aussi l'activité antibactérienne sur trois différents types des bactéries (Eschaerichia coli, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus eureus), pour les composés suivants:

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl methane (A),

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl ethane (B),

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl ether (C).

Les résultats de l'activité anti-oxydante sont positifs et mieux dans certains cas que la référence (Vitamine C). Quant à l'activité antibactérienne, tous les résultats sont négatifs.

Mots-clés : Composés azo aminés, Activité anti-oxydante, Activité antibactérienne.

Abstract :

In this work we have studied the antioxidant activity by three methods (DPPH, FRAP, PM) and also the antibacterial activity of three different types of bacteria (Eschaerichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus) for the following compounds:

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl methane (A),

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl ethane (B),

Bis [5-phenylazo-2-hydroxybenzaldehyde]-4, 4′-diaminophenyl ether (C).

The results of antioxidant activity are positive and even in some cases better than the reference compound (Vitamin C). As for the biological activity, all results are negative.

Keywords: Amino azo compounds, Anti-oxidant activity, Antibacterial activity.