



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Αποτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης σε τοπικά κρασιά με
συνδυασμό μοριακών τεχνικών.**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΑΜΑΡΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2018

**Αποτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης σε τοπικά κρασιά με
συνδυασμό μοριακών τεχνικών.**

**Evaluation of antioxidant activity in local wines with a
combination of molecular techniques.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, τα σταφύλια και ο οίνος έχουν κερδίσει το γενικότερο ενδιαφέρον για τις ευεργετικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές δράσεις που τους αποδίδονται, κυρίως λόγω των πολυφαινόλων που περιέχουν. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες του οίνου είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} σε έναν αριθμό ερυθρών και λευκών κρασιών. Ακόμη, προσδιορίστηκε ποσοτικά το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 17 ερυθροί και 14 λευκοί οίνοι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ερυθροί οίνοι ήταν πλουσιότεροι σε συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με τους λευκούς. Ακόμη βρέθηκε ότι οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης έναντι των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 1,6 μl-18,5 μl για τη μέθοδο DPPH και από 1,2 μl-19 μl για τη μέθοδο ABTS) σε σχέση με τους λευκούς οίνους (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 7,7 μl-80 μl για τη μέθοδο DPPH και από 1,25 μl-76 μl για τη μέθοδο ABTS).

Abstract

In recent years, grapes and wine have gained the general interest for their beneficial properties and the biological effects that are attributed to their polyphenol content. One of the most important biological activities that are attributed to wines' polyphenols is their antioxidant action. In the present study, it was examined the ability of a number of red and white wines to neutralize the stable chemical radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}. In addition, their total polyphenolic content was quantified using the Folin-Ciocalteu method. Specifically, 17 red and 14 white wines were studied. The results showed that red wines were richer in total polyphenolic content than white wines. It was also found that red wines have a higher neutralization capacity against DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals (IC₅₀ ranged from 1.6 µl to 18.5 µl for the DPPH method and from 1.2 µl-19 µl for the ABTS method) compared to white wines (IC₅₀ values ranged from 7.7 µl to 80 µl for the DPPH method and from 1.25 µl to 76 µl for the ABTS method).

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια του, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Θάλεια Κερασιώτη για την καθοριστική βοήθεια του και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα οινοποιία του νομού Σερρών που συνέβαλαν αφίλοκερδώς προσφέροντας μου δείγματα οίνων για το πείραμά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
2. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΙΝΟ.....	10
2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	10
2.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	10
2.3 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ.....	11
3. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	12
3.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	12
3.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS).....	13
3.2.1 ΑΝΙΟΝ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ($O_2^{\cdot-}$)	14
3.2.2 ΡΙΖΑ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ (OH^{\cdot}).....	15
3.2.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2)	16
3.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS).....	16
3.4 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS	17
3.4.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.....	17
3.4.2 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ “ΕΚΡΗΞΗ”	17
3.4.3. ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ.....	19
3.4.5 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P_{450}.....	19
3.4.6 ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ	19
3.5 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS	19
3.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS.....	20
3.6.1 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ	20
3.6.2 ΕΠΙΒΛΑΒΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ	20
3.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	22
3.8 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	24
3.8.1. ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	25
1.8.2. ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	27
3.9 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	31
4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
4.1 ΥΛΙΚΑ.....	35
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
4.2.1.ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN- CIOCALTEAU	36

4.2.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH•	36
4.2.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ ABTS•+	38
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
5.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN – CIOCALTEU	40
5.2. ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΡΙΖΩΝ DPPH• ΚΑΙ ABTS•+	41
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο κρασί αποδίδονται από την αρχαιότητα ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, τις οποίες η σύγχρονη επιστημονική έρευνα τεκμηριωμένα αποδίδει στην αντιοξειδωτική δράση ορισμένων συστατικών του. Ως τέτοιες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση έχουν χαρακτηριστεί οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, το ασκορβικό οξύ, ορισμένες λιγνάνες, τα κινναμωμικά οξέα κλπ. Από τις πολλές ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες του οίνου, η ελαττωμένη θνησιμότητα από στεφανιαίες καρδιοπάθειες που παρουσιάζουν όσοι καταναλώνουν λογικές ποσότητες κρασιού είναι ένα επιδημιολογικό εύρημα που έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις και έχει μελετηθεί κατά κόρον. Από την άλλη δεν έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχα ευρήματα όταν το δείγμα του πληθυσμού αναφέρεται σε ανθρώπους που καταναλώνουν άλλα, εκτός από το κρασί, οινοπνευματώδη ποτά. Η διαφοροποίηση αυτή μεταξύ κατανάλωσης κρασιού και άλλων οινοπνευματωδών ποτών, ήταν το έναυσμα στην πραγματοποίηση πολλών ερευνών για να πιστοποιηθεί ποιες από τις ενώσεις που περιέχονται στο κρασί είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Έτσι βρέθηκε ότι από τις 300 οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα κρασιά, υπεύθυνες για την δραστηριότητα αυτή είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν τη σημαντικότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Γενικά, οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκονται κυρίως στο κέλυφος των καρπών των σταφυλιών και προσδίδουν γεύση, άρωμα και χρώμα στο κρασί, ενώ η τελική συγκέντρωσή τους είναι συνάρτηση της ποικιλίας, του τρόπου και των συνθηκών καλλιέργειας, παρασκευής και ωρίμανσης του κρασιού.

Από τα πολυφαινολικά αυτά παράγωγα, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η κερκετίνη, η ρουτίνη και η trans-ρεσβερατρόλη είναι οι πλέον δραστικές αφού απεδείχθη ότι αποτρέπουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDL - Low Density Cholesterol) αποτελεσματικότερα και από την 2- τοκοφερόλη. Η οξείδωση αυτή της χοληστερόλης είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της αθηροσκλήρυνσης και των στεφανιαίων καρδιοπαθειών (Κουράκου., 1998). Εκτεταμένες ιατρικές μελέτες έδειξαν ότι οι φαινόλες αυτές (σε καθαρή μορφή) ή σε εκχυλίσματα κόκκινων κρασιών διευκολύνουν τη φλεβική κυκλοφορία παράγοντας οξείδια του αζώτου στο ενδοθήλιο (Kourakou., 1998).

2. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΙΝΟ

Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία, «Οίνος καλείται το ποτό που προέρχεται αποκλειστικά από ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών ή γλεύκους εν νωπών σταφυλιών». Ο ίδιος ορισμός με κάποιες επιπλέον διευκρινήσεις εγκρίνεται από την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης «Οίνος ή κρασί καλείται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση, ολική ή μερική, νωπών σταφυλιών, σπασμένων ή όχι γλεύκους σταφυλιών» (Kourakou., 1998)

2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Η λέξη "κρασί" αντικατέστησε τη λέξη "οίνος" στους βυζαντινούς χρόνους και η αντικατάσταση αυτή επιταχύνθηκε ίσως από το ότι ο "οίνος" (όπως και ο "άρτος") αποτελούσε πλέον όρο του χριστιανικού λειτουργικού- θρησκευτικού λεξιλογίου, μετατράπηκε δηλαδή σε "λέξη ταμπού". Η λέξη κατάγεται, με μεσολάβηση των τύπων κρασίν <κρασίον, από τη λέξη κράσις =ανάμειξη, που με τη σειρά της είναι παράγωγο του ελληνικού θέματος κρα- (πρβλ. το ρήμα κεράννυμι=αναμειγνύω και το ουσ. κρατήρ=σκεύος ανάμειξης). Η ετυμολογία της λέξης αντανακλά τη συνήθεια των αρχαίων Ελλήνων να πίνουν το κρασί τους ανακατεμένο με νερό.

Το αμπέλι, από το οποίο προέρχεται το κρασί, σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, έχει προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Απολιθωμένα κλήματα ηλικίας 60 εκατομμυρίων ετών αποτελούν την αρχαιότερη επιστημονική απόδειξη της ηλικίας της αμπέλου.

2.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Οι ρώγες του σταφυλιού, που αποτελεί και την πρώτη ύλη του κρασιού, περιέχουν σάκχαρα, οργανικά οξέα και νερό (πάνω από 70%). Η περιεκτικότητα του εξαρτάται κάθε φορά από την ποικιλία, το υπέδαφος, τις κλιματικές συνθήκες, αλλά και από την χρονική στιγμή της ωρίμανσης του σταφυλιού. Μετά τη διαδικασία του τρύγου (συγκομιδής), ακολουθεί η γλευκοποίηση, η διαδικασία δηλαδή κατά την οποία εξάγεται το γλεύκος (ή συνήθως μούστος) από το σταφύλι. Για την έκθλιψη

του μούστου χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συνηθέστερα με χρήση ειδικών μηχανημάτων που λειτουργούν συνθλίβοντας το σταφύλι ανάμεσα σε περιστρεφόμενους κυλίνδρους. Κατά τη γλευκοποίηση, επιβάλλεται η αφαίρεση των κοτσανιών (αποβοστρύχωση) του σταφυλιού, καθώς είναι επιζήμια τόσο για την γεύση του τελικού κρασιού, όσο και για την υγεία του καταναλωτή.

Στη συνέχεια ακολουθεί η τελική διαδικασία της ζύμωσης. Το οινόπνευμα που περιέχει το κρασί παράγεται από τα σάκχαρα του μούστου με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, που επιτελείται από ειδικά ένζυμα, τις ζυμάσες των ζυμομυκήτων. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν αδρανοποιημένοι στο φλοιό των σταφυλιών και καθώς έρχονται σε επαφή με το μούστο, πολλαπλασιάζονται και επιτελούν τη ζύμωση. Εκτός από αιθυλική αλκοόλη παράγεται και διοξείδιο του άνθρακα αλλά και μια σειρά δευτερευόντων προϊόντων και ενώσεων με καθοριστική σημασία πολλές φορές για την ποιότητα του οίνου. Η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί συνήθως 8-25 ημέρες. Είναι σύνηθες, να παρατείνεται ή να διακόπτεται η ζύμωση με τεχνητά μέσα, κυρίως μέσω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά ή υψηλά επίπεδα αντίστοιχα. Ο χρόνος της ζύμωσης είναι καθοριστικός για το κρασί που θα παραχθεί τελικά. Επιπλέον γίνεται συνήθως λόγος για λευκή και ερυθρή οινοποίηση, ανάλογα με το χρώμα του παραγόμενου κρασιού (Tsetouras P. Inotechnia, Athens 2008)

2.3 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ

Τα κρασιά παίρνουν την ονομασία τους είτε από την ποικιλία σταφυλιών τους είτε από τον τόπο παραγωγής τους. Ιστορικά, τα κρασιά από την Αυστραλία, τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και τη Γερμανία ονομάστηκαν αποκλειστικά από την ποικιλία σταφυλιών τους, ενώ κρασιά από τη Γαλλία, την Ισπανία, την Ιταλία ή την Ελλάδα προσδιορίστηκαν κυρίως από το γεωγραφικό τόπο παραγωγής τους.

Σημαντικό διακριτικό κάθε κρασιού είναι και το χρώμα του. Τα κρασιά διακρίνονται γενικά σε λευκά, κόκκινα και ροζέ. Είναι λανθασμένη η γενικευμένη άποψη πως το χρώμα του σταφυλιού καθορίζει και το χρώμα του κρασιού. Στην πραγματικότητα οι χρωστικές ουσίες του σταφυλιού περιέχονται στα στερεά μέρη του (στέμφυλα) και επομένως το χρώμα του σταφυλιού παρέχει το χρώμα του κρασιού μόνο αν και τα στερεά του μέρη συμμετέχουν στην διαδικασία της ζύμωσης. Ο μούστος τόσο των κόκκινων όσο και των ανοιχτόχρωμων ποικιλιών διαθέτει το ίδιο ανοιχτό χρώμα. Έτσι, κόκκινο κρασί παράγεται από ποικιλίες κόκκινων (ή μαύρων)

σταφυλιών με την προϋπόθεση ότι τα στερεά τους μέρη συμμετέχουν στη ζύμωση, ενώ λευκά κρασιά μπορούν να παραχθούν από οποιαδήποτε ποικιλία εφόσον τα στερεά μέρη των σταφυλιών διαχωριστούν στη διαδικασία της ζύμωσης. Τα ροζέ κρασιά, παράγονται όπως και τα κόκκινα, με τη διαφορά ότι τα στερεά μέρη των σταφυλιών παραμένουν στη ζύμωση για ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως μικρότερο από μία ημέρα.

Τα κρασιά ταξινομούνται ακόμα με το έτος της συγκομιδής σταφυλιών (τρύγος). Συνήθως παράγονται από σταφύλια της συγκομιδής ενός έτους και χρονολογούνται με βάση το έτος αυτό. Επιπλέον υπάρχουν κάποιες ειδικές κατηγορίες κρασιών όπως είναι ο αφρώδης οίνος, ο οποίος περιέχει και το διοξείδιο του άνθρακα ("ανθρακικό") που παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το διοξείδιο αυτό δεν εισάγεται επιπρόσθετα στο μπουκάλι εμφιάλωσης, όπως γίνεται στα αναψυκτικά καθώς αυτή η μέθοδος απαγορεύεται. Για τον εγκλωβισμό του διοξειδίου στη φιάλη χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, είτε μέσω της εμφιάλωσης του κρασιού πριν ολοκληρωθεί η ζύμωση, είτε μέσω της ολοκλήρωσης της ζύμωσης σε αεροστεγείς δεξαμενές. Εκλεκτότερο παράδειγμα αφρώδους οίνου είναι η γαλλική Σαμπάνια. Τα κρασιά μπορούν να ταξινομηθούν επίσης ως ξηρά, γλυκά ή ημίγλυκα. Η γλυκύτητα των κρασιών μπορεί να μετρηθεί κατά τη διαδικασία της συγκομιδής αν και στην πράξη καθορίζεται από το ποσό της ζάχαρης που παραμένει στο κρασί μετά από τη ζύμωση. Έτσι, το ξηρό κρασί δεν περιέχει υπόλοιπο ζάχαρης. (Johnson H., Robinson J., 2001)

3. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

3.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Με τον όρο ‘‘ελεύθερες ρίζες’’ αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Cheeseman & Slater 1993). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles et al. 2001; Prior & Cao 1999).

Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός (κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό. (Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.* 2004; AICR 2007; Pani *et al.* 2010) ή το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010).

3.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου συνήθως περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ωστόσο, δεν αποτελούν όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Papagalanis 2014).

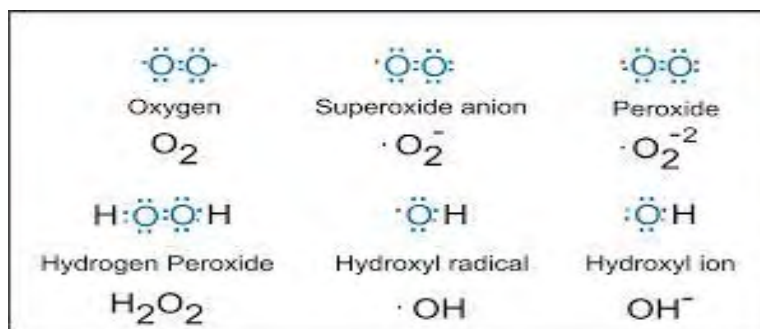
Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπών ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξειδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξειδωση και γι'αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\bullet}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του

οξυγόνου όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υποβρωμιώδες οξύ (HOBr) και το όζον O_3 .

Πίνακας (1): Δραστικές μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ (HOCl)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

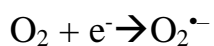


Εικόνα (1): Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

3.2.1 ANION ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Το σουπεροξειδίο αρχικά σχηματίζεται σαν ένα ενδιάμεσο βιοχημικών αντιδράσεων (Halliwell 1995). Αυτό το ανιόν είναι αρνητικά φορτισμένο και είναι σχετικά αδιαπέραστο στη μεμβράνη.

Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου.



Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από την οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς

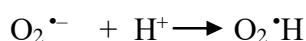
εξουδετέρωσης εισβαλόντων παθογόνων επειδή είναι ιδιαίτερα τοξικό (Halliwell 1995). Παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από τα συμπλέγματα I και II. Παράγεται ακόμα και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller et al. 2007).

3.2.2 ΡΙΖΑ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ (OH[•])

Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα που, ωστόσο, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία των ριζών (Hayyan et al. 2016).

Η ρίζα υδροξυλίου συχνά παράγεται σαν παραπροϊόν της δράσης του ανοσοποιητικού και μπορεί να δράσει ενάντια σε όλα σχεδόν τα είδη μακρομορίων: υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και αμινοξέα (Reiter et al. 1995). Ο χρόνος ημιζωής της ρίζας υδροξυλίου *in vivo* είναι πολύ μικρός και για το λόγο αυτό είναι πολύ επικίνδυνη για τον οργανισμό (Reiter et al. 1997; Reiter et al. 1995). Σε αντίθεση με το ανιόν του σουπεροξειδίου το οποίο μπορεί να εξουδετερωθεί από την υπεροξειδική δισμουτάση, η ρίζα υδροξυλίου δεν μπορεί να αποτοξικοποιηθεί μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι το κύτταρο επιστρατεύει άλλους μηχανισμούς όπως είναι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά για να προστατευτεί από την επιβλαβή δράση του (Reiter et al. 1997).

Προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες,

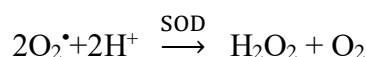
λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου.

3.2.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H₂O₂)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Πρόκειται για ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton.



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου



3.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO[•] και το διοξείδιο του αζώτου NO₂[•] καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO₂ και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO⁻) (Fang et al. 2002).

Πίνακας (2): Δραστικές μορφές αζώτου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO [•])	Νιτρώδες Οξύ (HNO ₂)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO ₂ [•])	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO ⁺)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO ⁻)

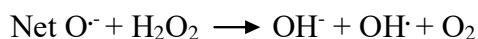
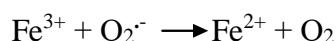
3.4 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS

3.4.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al. 1979b). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al. 1979b). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και NO_2^{\cdot} .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

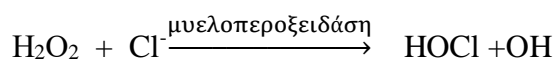
3.4.2 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ “ΕΚΡΗΞΗ”

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN

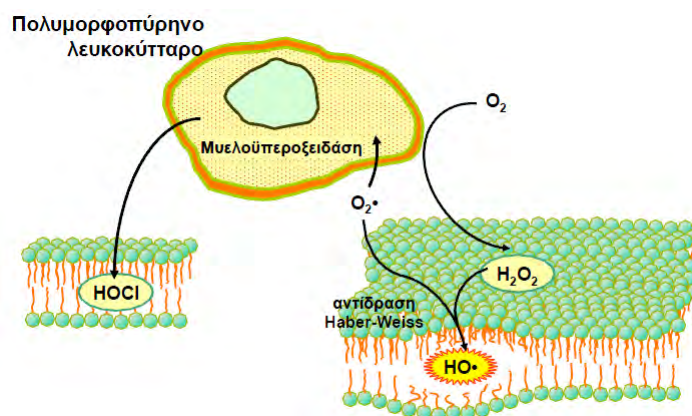
τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (MeydaniandEvans, 1979).

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot -}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $O_2^{\cdot -}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petronietal., 1992). Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$.



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (MeydaniandEvans, 1979; Meydanietal., 1992). Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει $HOCl$ όπως είδαμε.



Εικόνα (2): Παραγωγή ελευθέρων ριζών από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα

3.4.3. ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική υδροξυλίωση υποστρωμάτων πουρινών στο κέντρο μολυβδαινίου και οδηγεί σε μείωση του O_2 στο κέντρο της φλαβίνης με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), είτε ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (BorgesF. Etal., 2002).

3.4.5 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P_{450}

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P_{450} (Yu 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al. 1979a). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\cdot-}$.

3.4.6 ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

3.5 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες. Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al. 1998; Ray et al. 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και την έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια) (Elsayed et al. 1992; Jones et al. 2000; Obata et al. 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (B. Ames 1986; Kanner & Lapidot 2001; Lijinsky 1999).

3.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS

3.6.1 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Μία ποσότητα ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως έκφραση γονιδίων (Jietal., 2006) και μεταγωγή σήματος (Ji, 2007). Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ένδο- όσο και διακυτταρικά. Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες η μεθυλάσες ιστονών. Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Finaudetal., 2006). Ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Reid, 2001; Linnaneetal., 2002).

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), την αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnaneetal., 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτότητας των μυϊκών ινών ενώ αύξηση των επιπέδων τους επιτείνει την ένταση της συστολής των μυϊκών ινών (Reid, 2001). Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

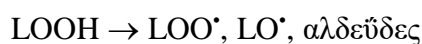
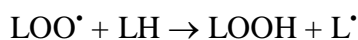
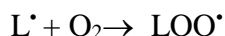
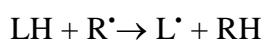
3.6.2 ΕΠΙΒΛΑΒΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Μέσω αυτής της αρνητικής δράσης τους έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson, Alzheimer), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

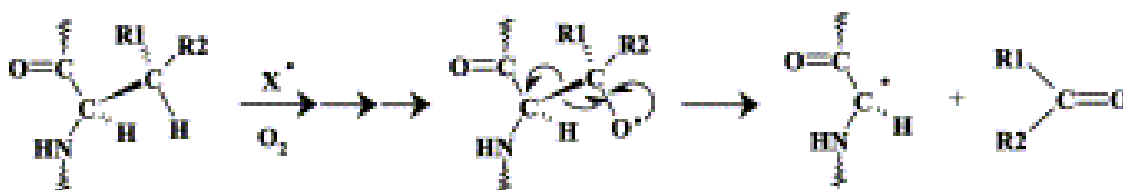
Λιπίδια→ Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες οδηγώντας στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Alessio, 1993; Mylonas&Kouretas, 1999). Μία ελεύθερη ρίζα (R^{*}) δηλαδή, μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH) και στον

σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών. Οι αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό μιας ρίζας με κεντρικό μόριο τον άνθρακα (L^\bullet ή C^\bullet) η οποία στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο O_2 οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ρίζας περοξυλίου (LOO^\bullet ή γενικά ROO^\bullet).

Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνονται παρακάτω:



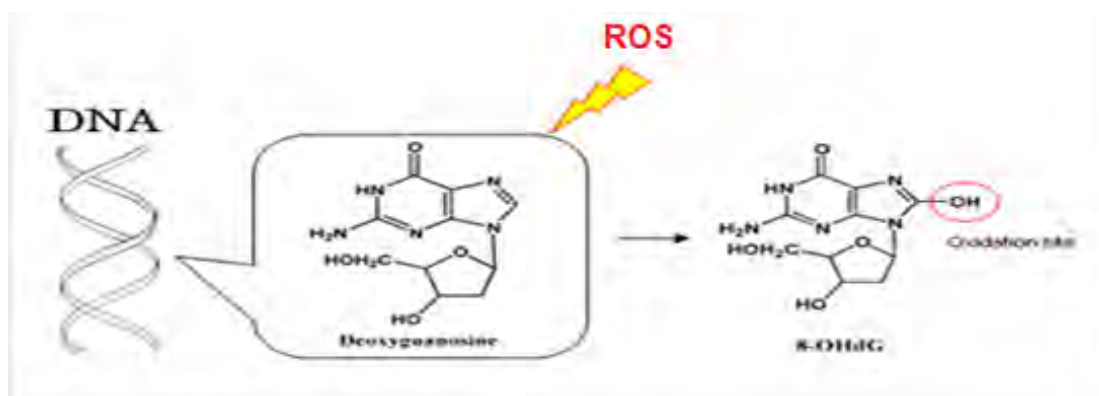
Πρωτεΐνες → Οι πρωτεΐνες είναι στόχος της δράσης των ελευθέρων ριζών όταν αυτές έχουν υψηλή συγκέντρωση. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH^\bullet , το RO^\bullet και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davies 1987; Grune et al. 1997; Levine & Stadtman 2001).



Εικόνα (3): Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης

DNA → Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν

επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδείνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδείνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Dizdaroglu et al. 2002; Helbock et al. 1999; B. N. Ames 1986).



Εικόνα (4): Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

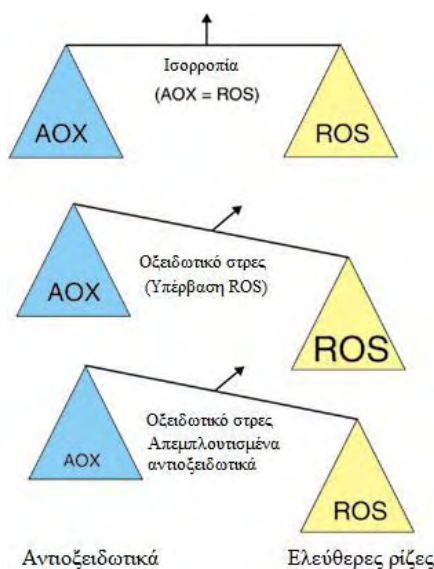
3.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της εξουδετέρωσης ROS και RNS. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της ποσότητας ROS, RNS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του **οξειδωτικού στρες** (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS/RNS). Αυτό συμβαίνει είτε από έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε σε παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.



Εικόνα (5): Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει:

- ο Βλάβη στους ιστούς. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του.

- ο Κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη

νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενο του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται σε θάνατο από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο “μηχανισμός αυτοκτονίας” του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Halliwell&Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001).

3.8 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις ικανές είτε να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν τις διεργασίες οξείδωσης που συμβαίνουν υπό την επίδραση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου ή των δραστικών ειδών οξυγόνου ή αζώτου. Η αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky 2002).

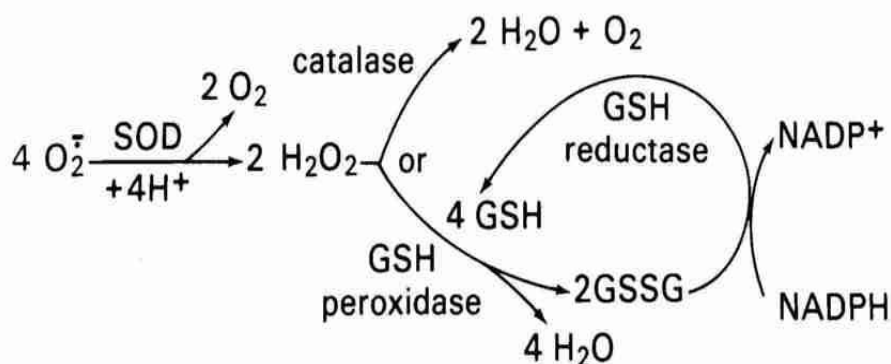
Τα αντιοξειδωτικά εμπλέκονται στο μηχανισμό άμυνας του οργανισμού έναντι των παθολογιών που συνδέονται με την επίθεση των ελευθέρων ριζών. Για να προστατεύσουν τα κύτταρα και τα οργανικά συστήματα του σώματος έναντι των ελεύθερων ριζών, ο οργανισμός έχει εξελίξει ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας. Πρόκειται για μια ποικιλία συστατικών, τόσο ενδογενούς (από τον οργανισμό) όσο και εξωγενούς (κυρίως μέσω της διατροφής) προέλευσης, που λειτουργούν για να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Marketal., 1998). Το ενδογενές σύστημα περιλαμβάνει ενζυμικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες, ενώ αυτά που λαμβάνονται με τη διατροφή είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους (Alessio&Hagerman, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελεύθερων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια
- Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

3.8.1. ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

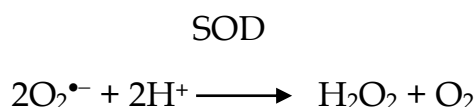
Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξеноβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα (6): Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ (SOD)

Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Υπάρχει σε τρεις μορφές, την κυτταροπλασματική που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), τη μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό της κέντρο (MnSOD) και την εξωκυτταρική. Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου $O_2^{\bullet-}$ από τα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65%-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997).

Η κυτταροπλασματική μορφή της SOD (Cu/ZnSOD), είναι ένα ομοδιμερές 32 kD, και αποτελεί περίπου το 70% των μορφών της SOD. Είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων (Crapo et al., 1992). Η μιτοχονδριακή Mn-SOD είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες μεταξύ τους υπομονάδες 96 kD, που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα (Whittaker, 2000). Η εξωκυττάρια-SOD (Cu/ZnSOD) είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ στον εξωκυττάριο χώρο. Πρόκειται για μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kD, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και αποτελεί το 0,5-17% των μορφών της SOD. Ο ρόλος της συγκεκριμένης μορφής SOD είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής της στους ιστούς (Oury et al., 1996).

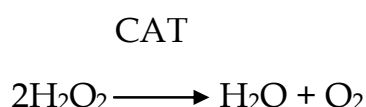
Η SOD θεωρείται ότι είναι από τα ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiel et al., 1994).

ΚΑΤΑΛΑΣΗ (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, τα οποία είναι

κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών οδηγώντας στην παραγωγή H_2O_2 (Antunesetal., 2002) αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Chanceetal., 1986; Mastersetal., 1986). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 (Halliwell&Gutteridge, 1998).

Η CAT καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



Το H_2O_2 που παράγεται από τη δράση της SOD διασπάται από την CAT κι έτσι αναστέλλει τόσο τις βλαβερές επιδράσεις του ίδιου στα βιομόρια όσο και τις επιδράσεις του OH^\bullet , στο οποίο μπορεί να μετατραπεί.

1.8.2. ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη Ε είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από πολλές ισομορφές, γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή (Fuchs et al., 2003). Η βιταμίνη Ε είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό λόγω της αφθονίας της στα κύτταρα και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και λόγω της ικανότητάς της να αντιδρά απευθείας με τις ROS (Evans, 2000). Αλληλεπιδρά με πολυάριθμα αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, GSH, β-καροτένιο ή λιποϊκό οξύ, τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τη βιταμίνη Ε από την οξειδωμένη της μορφή (Coombes et al., 2001). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον, ιδιαίτερα τις ρίζες υπεροξυλίου που προέρχονται από την οξείδωση της

χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) (Vasankari et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά αλλά είναι αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). Η βιταμίνη C είναι πιο άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Στα εξωκυττάρια υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{LOO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$) (Bigard, 2001). Η βιταμίνη C έχει επίσης την ικανότητα να παγιδεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή οξειδωτική δράση.

Β-καροτένιο και βιταμίνη A (ρετινόλη)

Η βιταμίνη A είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS (ιδιαίτερα το $^1\text{O}_2$ και λιπιδικές ρίζες) και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Powers & Lennon, 2000; Ozhogina & Kasaikina, 1995). Αν και λιγότερο σημαντική από τη βιταμίνη E, η βιταμίνη A και το β-καροτένιο ενεργούν από κοινού με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E με σκοπό να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις ROS (Livrea et al., 1995).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό (Willcox et al., 2002; Wedworth & Lynch, 1995). *In vitro* μελέτες έχουν τονίσει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλουν προ-οξειδωτικά ένζυμα ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με προ-οξειδωτικά ιόντα όπως Fe^{2+} , Fe^{3+} ή Cu^{2+} . Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης άμεση δράση παγίδευσης κάποιων ROS με άμεση δωρεά ατόμου υδρογόνου.

Γλουταθειόνη (GSH)

Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση (Meister & Anderson, 1983). Η GSH ανάγει τα οργανικά υπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την GP_x, εξουδετερώνει την OH[•] και το ¹O₂ και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξειδωση (Niki et al., 1985).

Η GSH εκτός από αντιοξειδωτική δράση επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες:

1. Η GSH συζεύγνυται με το NO για να σχηματίσει S-νιτροζογλουταθειόνη, το οποίο διασπάται από το σύστημα θειορεδοξίνης για να απελευθερώσει GSH και NO (Fang et al., 2002).
2. Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την αφυδρογονάση της φορμαλδεΰδης, η οποία μετατρέπει την φορμαλδεΰδη και την GSH σε S-φόρμυλο-γλουταθειόνη (Townsend et al., 2003). Η απομάκρυνση της φορμαλδεΰδης (ένα καρκινογόνο) είναι φυσιολογικής σημασίας επειδή παράγεται από το μεταβολισμό της μεθειονίνης, της χολίνης, της μεθανόλης, της σαρκοσίνης και των ξενοβιοτικών ουσιών.
3. Η GSH είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της προσταγλανδίνης H₂ σε προσταγλανδίνες D₂ και E₂ από την ισομεράση του ενδοϋπεροξειδίου (Lu, 2000).
4. Η GSH συμμετέχει στο σύστημα της γλυοξυλάσης, η οποία μετατρέπει την μεθυλογλυοξυλάση σε D-γαλακτικό, ένα μονοπάτι δραστικό σε μικροοργανισμούς.

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Aw, 2003). Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών.

Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.

Συνένζυμο Q₁₀

Το συνένζυμο Q₁₀ (CoQ₁₀) είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002; Maulic et al., 2000). Το CoQ₁₀ είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Witt et al., 1992; Crane, 2001). Το CoQ₁₀ έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους (Svensson et al., 2002; Grootveld & Halliwell, 1987; Hellsten et al., 1997). Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες (Hellsten et al., 1998). Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο ¹O₂, το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO⁻ ή το όζον (O₃) (Ames et al., 1981; Wayner et al., 1987; Hooper et al., 1998,2000; Kean et al., 2000). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι (>50%) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al., 1987). Έτσι, το ουρικό οξύ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον Fe³⁺ να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση (Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1991).

Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της πρωτεΐνης της αίμης. Η οξυγενάση της αίμης διασπά τον δακτύλιο της αίμης προς σχηματισμό χολοπρασίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από τη ρεδουκτάση της χολοπρασίνης σε χολερυθρίνη (Stocker, 2004). Αν και τόσο η χολερυθρίνη όσο και η χολοπρασίνη είναι αναγωγικά είδη, η χολερυθρίνη θεωρείται το καλύτερο φυσιολογικό

αντιοξειδωτικό (Baranano et al., 2002). Πράγματι, η χολερυθρίνη κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικά επίπεδα του H_2O_2 (Baranano et al., 2002; Stocker et al., 1987).

3.9 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Τα συστατικά του οίνου είναι δυνατόν να διακριθούν σε οργανικά συστατικά και ανόργανα συστατικά.

Στα οργανικά συστατικά του συγκαταλέγονται τα φαινολικά συστατικά, τα οποία αποτελούν και τις αντιοξειδωτικές του ουσίες. Οι ουσίες αυτές επηρεάζουν το χρώμα των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων χαρακτηριστικών τους (στυφάδα, τραχύτητα), προσφέρουν στους οίνους αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες (π.χ. κολλάρισμα). Προέρχονται από το φλοιό και τα κουκούτσια των σταφυλιών και τους βλαστούς του κλήματος.

Το σύνολο του φαινολικού περιεχομένου αποτελείται από το άθροισμα των ανθοκυανινών, των φλαβονολών, των παραγώγων του υδροξυκιναμικού οξέος και μονομερών της γλαβαν - 3 - όλης. Το σύνολο των φαινολικών οξέων, ελεύθερων ή με μορφή ενώσεων, φτάνει τα 100 — 150 mg/L στους ερυθρούς οίνους, ενώ στους λευκούς περιορίζεται στα 10 – 15mg/L.(Soufleros E., 1997)

ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Τα φαινολικά είναι σημαντικά για τον οίνο, γιατί έχουν αντιβιοτικές και αντισηπτικές ιδιότητες (βενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ) και χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση τροφίμων. Ενδέχεται τα οξέα αυτά να παίζουν κάποιο ρόλο στη μικροβιολογική κατάσταση του οίνου, έναντι κυρίως των βακτηρίων. (Soufleros E., 1997)

Μερικά από τα φαινολικά, κυρίως εκείνα που έχουν 2 φαινολικά -OH σε θέση ορθό-(καφεϊκό και γαλλικό), έχουν την ιδιότητα να οξειδώνονται εύκολα και να οδηγούν σε θέση κινόνης. Οι κινόνες έχουν φαιά απόχρωση και θεωρείται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην οξειδωτική μετατροπή του χρώματος των λευκών γλευκών και οίνων σε καστανό. Κατά τη διάρκεια της γήρανσης τα φαινολικά οξέα υδρολύονται και περνούν σε ελεύθερη μορφή.

Τα βενζοϊκά οξέα δε βρίσκονται ελεύθερα στο σταφύλι, αλλά με μορφή σύνθετων χημικών ενώσεων άγνωστης μέχρι τώρα δομής. Ωστόσο στις ενώσεις αυτές φαίνεται να συμμετέχουν και ανθοκυάνες. Μερική αποδόμηση των ανθοκυανών με αλκοολική σαπωνοποίηση συντελεί στην εμφάνιση ελευθέρων βενζοϊκών οξέων. Έπειτα, τα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος δεν περιέχονται ελεύθερα στα σταφύλια και στους οίνους, αλλά με μορφή ενώσεων με τις ανθοκυάνες και με το τρυγικό οξύ, με το οποίο δίνουν τα παράγωγα, π- κουμαριλοτρυγικό, καφειλοτρυγικό και φαιρουλοτρυγικό. Η τυροσόλη, η φαινυλοαιθανόλη και η τρυπταφόλη συμμετέχουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου.

Τέλος τα ερυθρά κρασιά περιέχουν φαινόλες σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα λευκά κρασιά. Εξάιρεση αποτελούν το γεντισικό και το φερουλικό οξύ. (Soufleros E., 1997)

Έχει διαπιστωθεί ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει σημαντική προστατευτική επίδραση, λόγω των πολυφαινόλων ,στο καρδιαγγειακό σύστημα. Έχει παρατηρηθεί μείωση των ασθενειών σχεδόν στο 20 - 30%. Εργαστηριακές δοκιμές έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη έχει σημαντικές αντιπηκτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις .(Wu M, 2001)

Η ρεσβερατρόλη (RVT) παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει οξυγονούχες ρίζες και οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος. Με βάση αυτή την ιδιότητα έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες για την RVT και παράγωγά της με περισσότερα υδροξύλια.(Murcia A.,2001, Ovesna Z., 2006) Από την άποψη αυτή η RVT διαθέτει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες . (Wu M, 2001)

Η πολυπλοκότητα της σύνθεσης στο κόκκινο κρασί δεν επιτρέπει τη διάκριση της κατηγορίας των ενώσεων που καθορίζουν την αντιοξειδωτική κατάσταση της ηλικίας στους ερυθρούς οίνους, αλλά οι αναλύσεις HPLC προβλέπουν την συνολική σύνθεση των οίνων και έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις μείζονες πολυφαινόλες, και διαπιστώθηκε ότι είναι μάλλον απίθανο ότι οι επιμέρους πολυφαινόλες μπορεί να είναι σε θέση να επηρεάσουν άμεσα την αντιοξειδωτική συμπεριφορά των οίνων.(Biti M. and Mistiridou E.2010,Amous A.,2001)

ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ

Στις φλαβονοειδείς φαινόλες περιλαμβάνονται οι φλαβονόλες που έχουν ανοιχτό κίτρινο χρώμα και αφθονούν στα κουκούτσια, οι φλαβονόλες-3 (κατεχίνες), που υπάρχουν κυρίως στη φλούδα και στα κουκούτσια και οι φλαβονοδιόλες 3,4 (λευκοανθοκυάνες ή προκυανιδίνες), που υπάρχουν στη φλούδα και κυρίως στα κουκούτσια. Επειδή οι φλαβονοειδείς φαινόλες βρίσκονται στο εσωτερικό του φλοιού και στα κουκούτσια, ενώ σε κανονικές συνθήκες δεν υπάρχουν στους λευκούς οίνους.

ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ

Οι ανθοκυάνες είναι ερυθρές χρωστικές του σταφυλιού, οι οποίες εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις, βρίσκονται μόνο στο φλοιό των ρογών. Από χημική άποψη είναι παράγωγα του φαινυλο - 2 βενζοπυριλίου, το μόριο του οποίου παρουσιάζει κάποια ιδιαιτερότητα. Η ιδιαιτερότητά του είναι ότι περιέχει σε μορφή θετικού ιόντος έναν οξυγονούχο ετεροκυκλικό δακτύλιο, το πυρόλιο, που επιτρέπει το σχηματισμό αλάτων με τα ανιόντα. Από το μόριο του φαινυλο -2 βενζοπυριλίου προκύπτουν οι διάφορες ανθοκυανίδες του σταφυλιού.

Η μαλβιδίνη είναι η σημαντικότερη από άποψη ποσότητας χρωστικής των ερυθρών σταφυλιών και γι αυτό ονομάζεται και οινιδίνη. Αντίθετα, η πελαργονιδίνη δεν περιέχεται καθόλου σε αυτά.

Οι χρωστικές που συναντιούνται στη φύση δεν είναι ανθοκυανιδίνες, αλλά ενώσεις αυτών με ένα ή δυο μόρια κάποιου σακχάρου και ονομάζονται ανθοκυανίνες (ή ανθοκυάνες). Στις ανθοκυάνες των σταφυλιών το σάκχαρο που συμμετέχει στο σχηματισμό του μορίου τους είναι η γλυκόζη. Έτσι, ανάλογα με τη θέση στην οποία προσκολλάται η γλυκόζη στο μόριο της ανθοκυανιδίνης σχηματίζονται οι μονογλυκοζίτες και οι διγλυκοζίτες. (Soufleros E., 1997).

TANNINES

Οι ταννίνες είναι προϊόντα πολύ μερισμού των απλών φαινολών. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται μεταξύ 500 και 3000. Αν τα μόρια των ταννινών είναι πολύ μικρά δεν υπάρχουν αρκετές ενεργές θέσεις και έτσι οι ενώσεις που σχηματίζονται με τις πρωτεΐνες είναι ασταθείς. Αλλά και στην περίπτωση που τα μόρια των ταννινών

είναι υπερβολικά μεγάλα, τότε αυτά δεν μπορούν να πλησιάσουν αρκετά τις πρωτεΐνες και παρεμποδίζεται έτσι ο σχηματισμός ενώσεων. Επίσης η ιδιαίτερη στυφή γεύση ορισμένων οίνων οφείλεται στην παρουσία ορισμένων τανινών (μοριακό βάρος: 500 - 3000). Οι "επιθετικές" αυτές ταννίνες έχουν την ιδιότητα να ενώνονται με τις πρωτεΐνες και να εξαφανίζονται, ενώ οι "μη επιθετικές" δεν ενώνονται με τις πρωτεΐνες και παραμένουν στον οίνο.

Ανάλογα με τη δομή των μορίων τους, οι ταννίνες διακρίνονται στις υδρολυμένες και στις συμπυκνωμένες. Οι υδρολυμένες ταννίνες αποτελούνται από ένα γλυκοσίδιο πάνω στο οποίο προσκολλούνται διάφορες φαινολικές ενώσεις, όπως το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ. Επιπλέον, οι υδρολυμένες ταννίνες δεν περιέχονται στα σταφύλια αλλά είναι δυνατόν να βρεθούν σε οίνους, γιατί αποτελούν τις κύριες εμπορικές ταννίνες, που χρησιμοποιούνται στις διάφορες κατεργασίες αυτών.

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι οι φυσικές ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων και προέρχονται από τον πολυμερισμό της φλαβονόλης - 3 (κατεχίνη) και κυρίως της φλαβονοδιόλης - 3,4 (λευκοκιανιδίνη). Οι τελευταίες δεν είναι ταννίνες, αλλά μόρια που θα συμπυκνωθούν για να δώσουν ταννίνες. Οι συνηθισμένες φυσικές ταννίνες του σταφυλιού απαρτίζονται από τις φλαβονάλες, οι οποίες είναι ολιγομερή, που περιλαμβάνουν 2 μέχρι 10 ή 12 στοιχειώδη μόρια. (Παπαγεωργίου Ε., 2005)

Η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις κατεχίνες και στις λευκοκυανιδίνες οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρώτες μετά από θέρμανση στους 1000 °0 και σε όξινο περιβάλλον, μετατρέπονται κατά 100% σε φλοιοβένιο (προϊόν με καστανόμαυρο χρώμα), και οι δεύτερες μετατρέπονται κατά 80% σε φλοιοβένιο και κατά 20% σε κυανιδίνη, η οποία είναι μια ανθοκυάνη ερυθρού χρώματος. Στην τελευταία αντίδραση στηρίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των ταννινών.

Οι ταννίνες των σταφυλιών βρίσκονται στα στερεά μέρη τους και παραλαμβάνονται είτε με εκχύλιση είτε με συμπίεση. Από την ποσότητα των ταννινών που περιέχεται στο σταφύλι ένα ελάχιστο ποσοστό μεταφέρεται στον οίνο. Το ποσοστό αυτό από μετά από τις μειώσεις που παθαίνει από τα διάφορα φαινόμενα στους ερυθρούς οίνους κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 4 g / ί, ενώ στους λευκούς οίνους μεταξύ 40 και 200 mgfL·.

Οι ταννίνες χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική τους δράση με την οποία προστατεύονται οι ερυθροί οίνοι από τις επιδράσεις του οξυγόνου. Επίσης διακρίνονται για τις ενώσεις που σχηματίζουν με το Εε, λόγω των 2 OH που βρίσκονται στη θέση ορθό- του πλάγιου δακτυλίου (κατεχολική θέση). Οι ενώσεις

αυτές συμμετέχουν στο σιδηρικό θόλωμα των οίνων και στο οξειδωτικό μαύρισμα διαφόρων φρουτοχυμών που είναι ανεπιθύμητο. (Soufleros E., 1997)

Από την ποικιλία των σταφυλιών, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος της οινοποίησης εξαρτάται και η ανομοιογένεια της υφής των ταννινών. Οι ερυθροί οίνοι δεν αντέχουν στην παλαίωση. Η ύπαρξη μικρών μόνο μορίων οφείλεται στο σύντομο χρόνο εκχύλισης, που γι' αυτόν τον τύπο οίνων αποβλέπει περισσότερο στην παραλαβή χρώματος δηλαδή ανθοκυανών.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΥΛΙΚΑ

Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζίλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ [(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid), ABTS], το διάλυμα H₂O₂ (30% w/v) και το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Οίνοι

ΚΟΚΚΙΝΟΙ ΟΙΝΟΙ	ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ
ΒΛΑΔΙΚΑΣ MERLOT (ΕΡΥΘΡΟ)	ΒΛΑΔΙΚΑΣ Chardonnay
ΒΛΑΔΙΚΑΣ SYRAH (ΡΟΖΕ)	ΒΛΑΔΙΚΑΣ Sauvignon Blanc
ΒΛΑΔΙΚΑΣ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (ΡΟΖΕ-ΞΗΡΟ)	ΒΛΑΔΙΚΑΣ ΜΟΣΧΑΤΟ
ΒΛΑΔΙΚΑΣ ΡΟΖΕ ΙΜΗΓΛΥΚΟ	KERKINITIS Μαλαγουζιά
Διογένης Μοσχάτο - Ξινόμαυρο	Καραλή Ευήλιος (Λευκό)
KERKINITIS MERLOT	ΚΡΕΤΣΗ ΝΗΔΥΜΟΣ (Chardonnay)
Καραλή Ευήλιος (Merlot - Cabernet Sauvignon)	ΚΥΑΘΟΣ ΑΓΚΑΘΙΑ (Μοσχάτο - Ροδίτης)
ΚΡΕΤΣΗ ΘΑΛΕΡΟΣ	ΚΥΑΘΟΣ ΒΟΡΕΙΑ ΓΗ Μαλαγουζιά - Ασύρτικο
ΚΥΑΘΟΣ Βόρεια Γη Cinsaut	Μελίδου Chardonnay
ΚΥΑΘΟΣ Βόρεια Γη Cinsaut - Caberbet Sauvignon	Μελίδου Μαλαγουζιά
Μελίδου Cabernet S	ΜΠΙΣΚΑΣ Μαλαγουζιά
ΜΠΙΣΚΑΣ MERLOT	ΝΕΡΑΝΤΖΗ ΚΤΗΜΑ 16'
ΝΕΡΑΝΤΖΗ CIRINON RED 16'	ΝΕΡΑΝΤΖΗ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ 16'
ΝΕΡΑΝΤΖΗ SYRAH 16'	Τ'ΑΠΟΣΤΟΛΗ Chardonnay
Τ'ΑΠΟΣΤΟΛΗ SYRAH	
Τ'ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΔΑΚΡΥ ΧΑΡΑΣ	
Τ'ΑΠΟΣΤΟΛΗ Εριφύλη	

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN- CIOCALTEAU

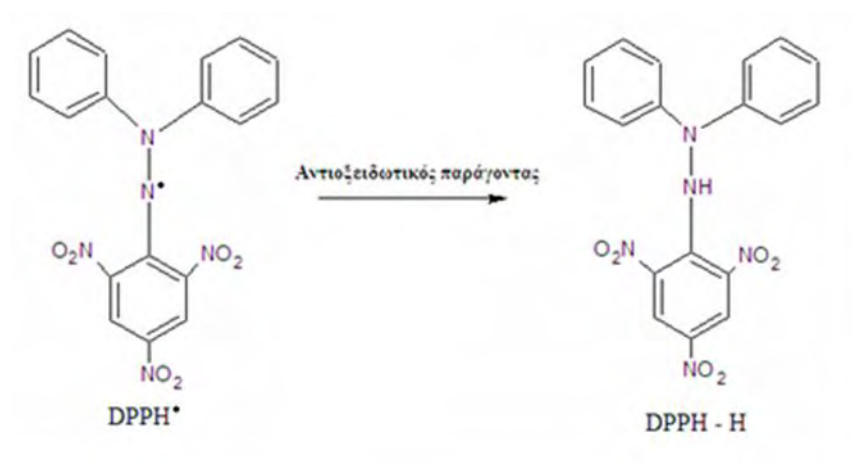
Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με τη χρήση της οποίας προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) (Vermeris & Nicholson, 2006). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 2 mL όπου αρχικά προστίθεται 1 mL H_2O , 100 μ L αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 20 μ L από το δείγμα και ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 3 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 280 μ L Na_2CO_3 (25%) και 600 μ L H_2O . Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 1 h. Μετά το πέρας της επώασης ακολούθησε φωτομέτρηση στα 765 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν το κρασί απορροφούσε στις εξεταζόμενες ποσότητες. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

4.2.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH•

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH• πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί

μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.



Εικόνα (7): Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μ M ρίζας DPPH• και το δείγμα κρασιού σε διαφορετικές αυξανόμενες ποσότητες. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH• (100 μ M) μαζί με την μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Επίσης, ελέγχθηκε αν το κρασί απορροφούσε στις εξεταζόμενες

ποσότητες στα 517 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_d) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

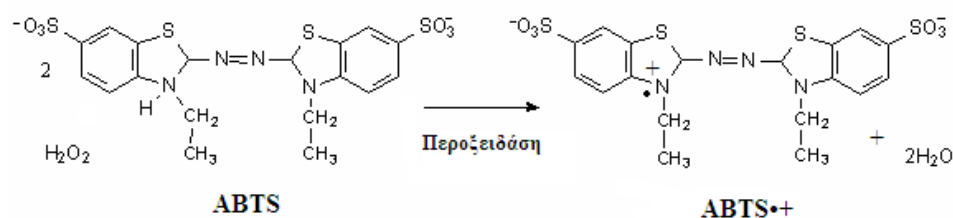
A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

4.2.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ ABTS•+

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+ (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS•+ είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH•, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH•, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS•+ πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS•+ και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS•+ για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS•+ από την στιγμή που σχηματίζεται είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS•+ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂.



Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαιζολίνη)-6-σουλφονικού (ABTS•+) μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL H₂O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H₂O₂ (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκε το κρασί. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H₂O με 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ αποτελούσε το τυφλό. Επίσης, ελέγχθηκε αν το κρασί απορροφούσε στις εξεταζόμενες ποσότητες στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_\delta) / A_o \times 100$$

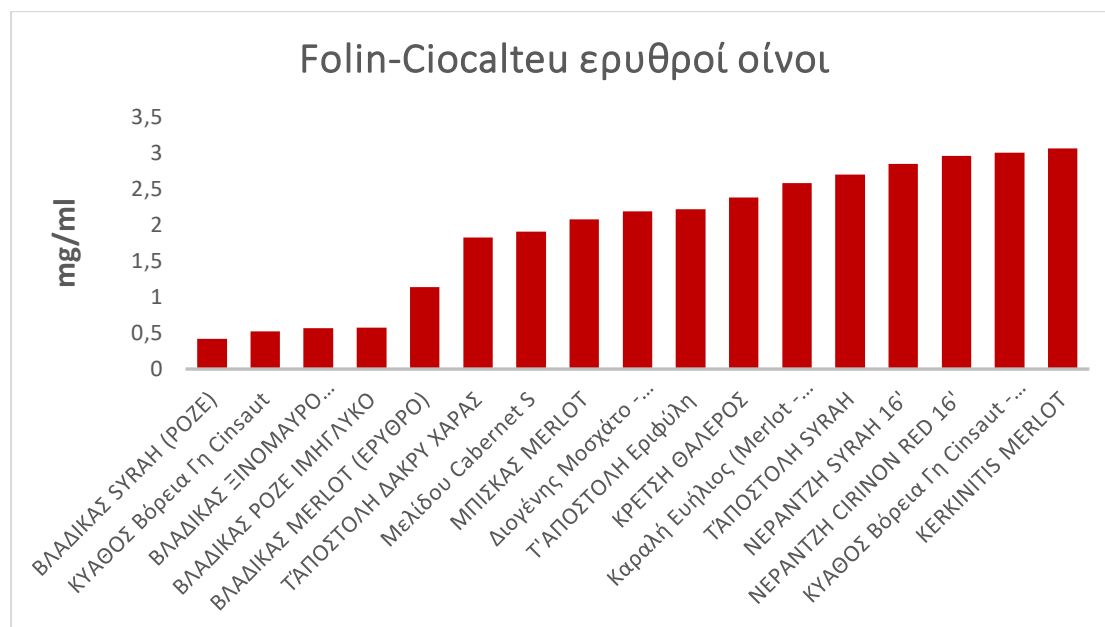
A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A_δ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

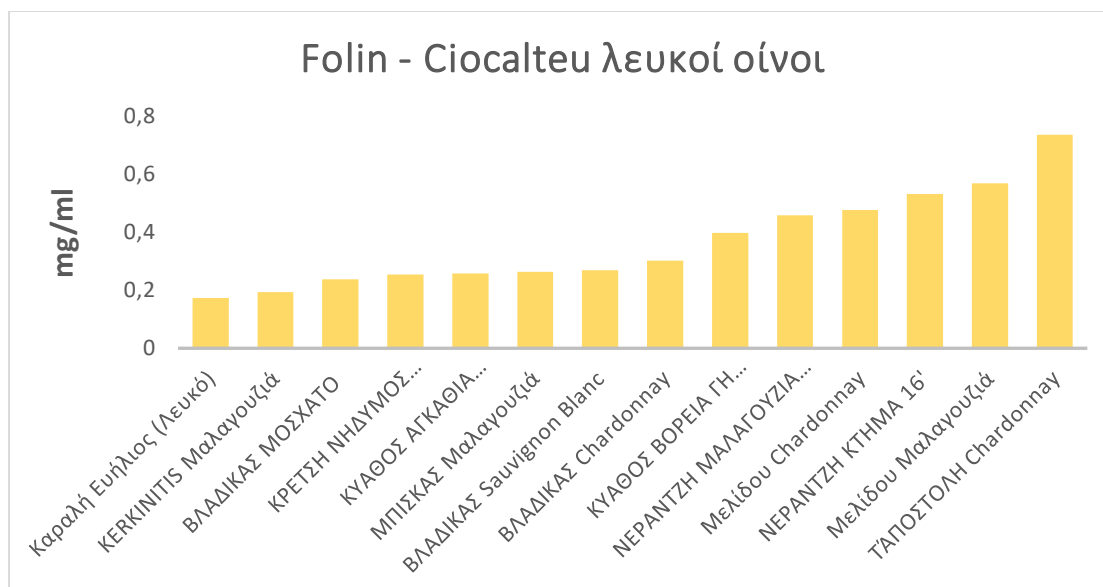
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN – CIOCALTEU

Με αυτή την μέθοδο έγινε προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου στους οίνους. Βρέθηκε ότι οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο από τους λευκούς οίνους. Στους παρακάτω πίνακες βλέπουμε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των ερυθρών και των λευκών οίνων. Για τους ερυθρούς είναι κατά αυξανόμενη συγκέντρωση με το πιο ασθενές στα **0,42 mg/ml** ενώ το πιο ισχυρό δείγμα στα **3,06 mg/ml**. Για τους λευκούς οίνους είναι κατά αυξανόμενη συγκέντρωση με το πιο ασθενές στα **0,17 mg/ml** ενώ το πιο ισχυρό δείγμα στα **0,74 mg/ml**.



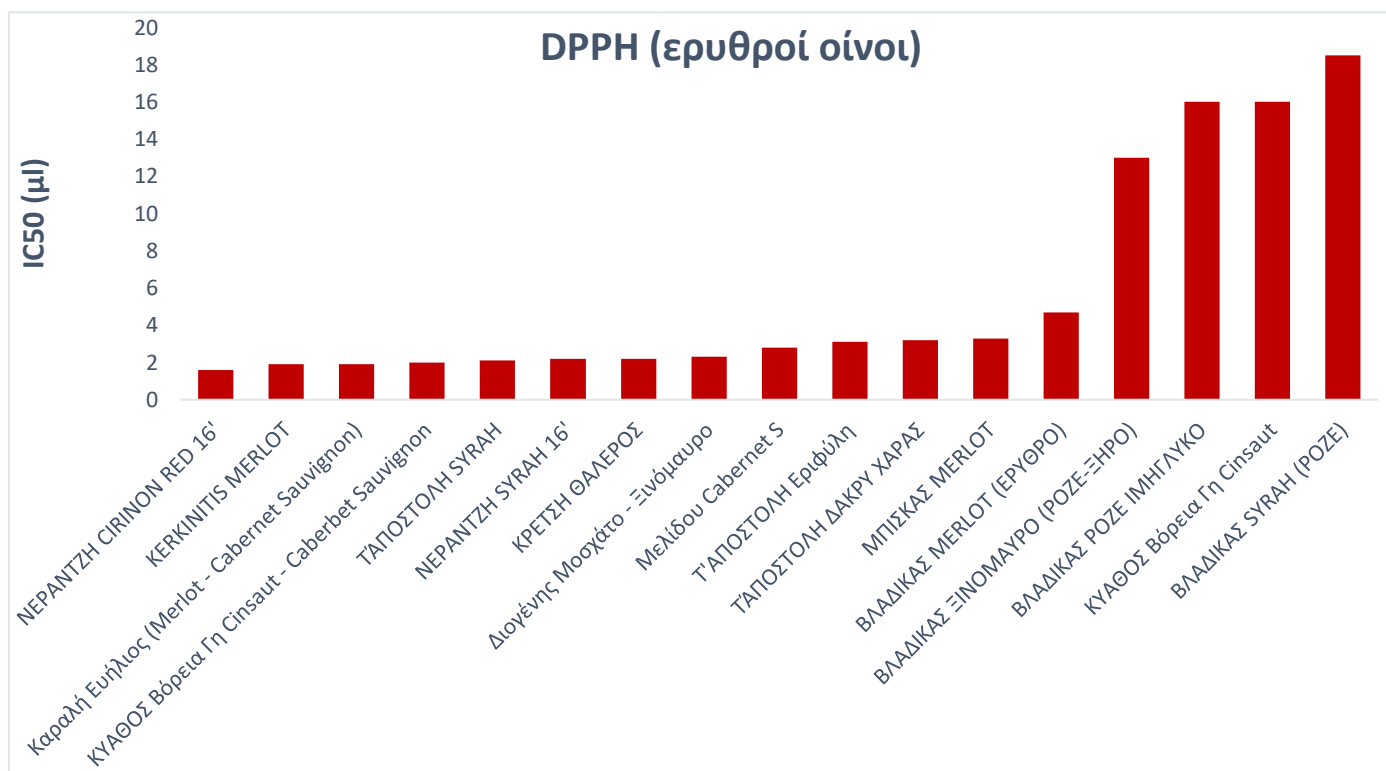
Γράφημα (1): Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο για τους ερυθρούς οίνους.



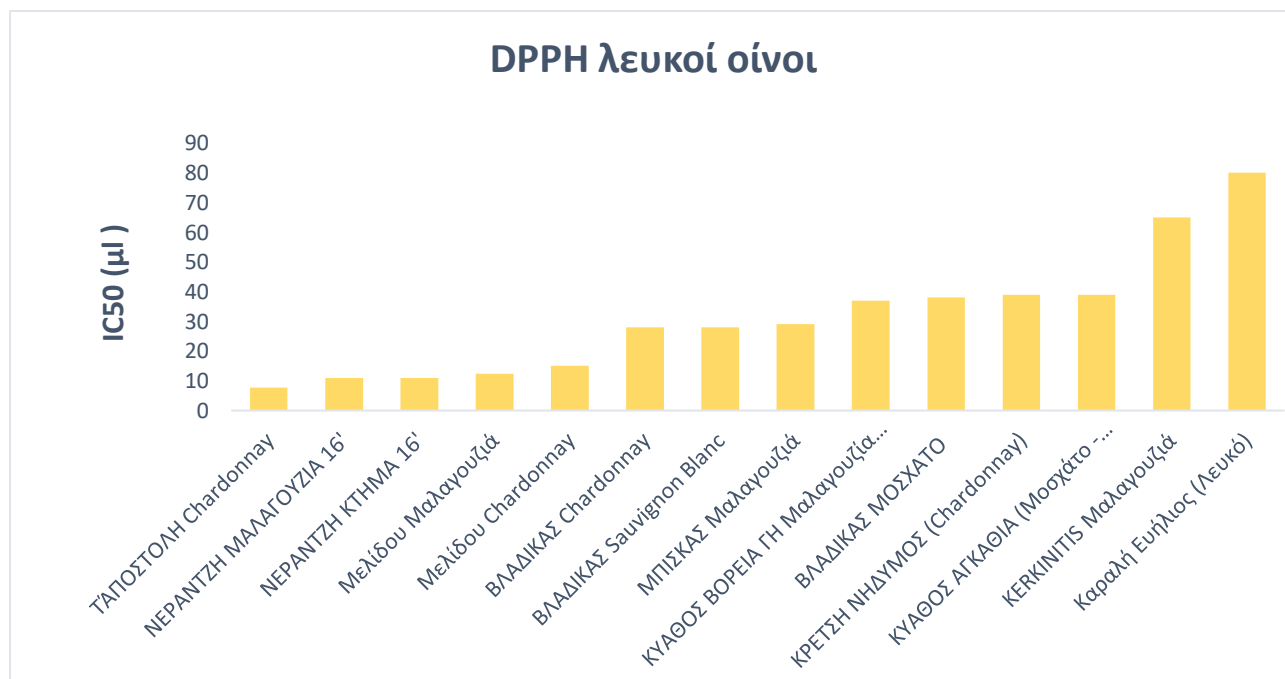
Γράφημα (2): Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο για τους λευκούς οίνους.

5.2. ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΡΙΖΩΝ DPPH[•] ΚΑΙ ABTS^{•+}

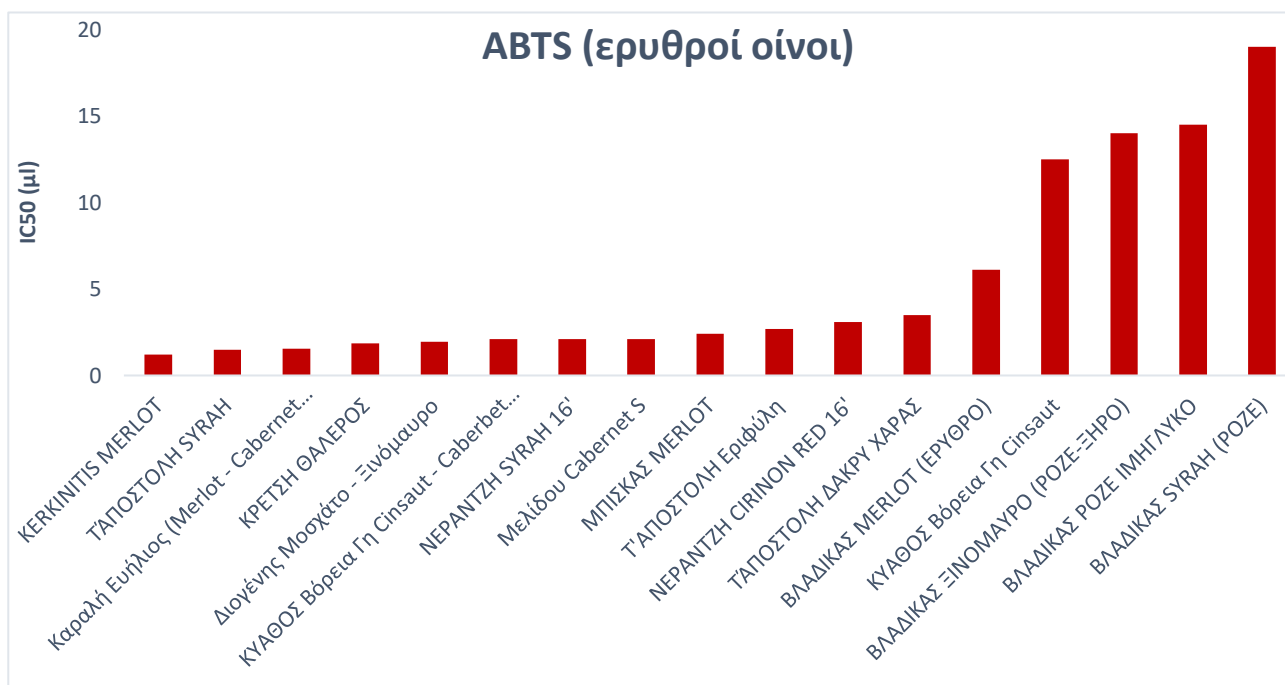
Τόσο οι ερυθροί όσο και οι λευκοί εξουδετέρωσαν τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}. Για κάθε κρασί προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀, η συγκέντρωση του κρασιού που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για το εκάστοτε κρασί. Βρέθηκε ότι οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης έναντι των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 1,6 μ l-18,5 μ l για τη μέθοδο DPPH και από 1,2 μ l-19 μ l για τη μέθοδο ABTS) σε σχέση με τους λευκούς οίνους (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 7,7 μ l-80 μ l για τη μέθοδο DPPH και από 1,25 μ l-76 μ l για τη μέθοδο ABTS).



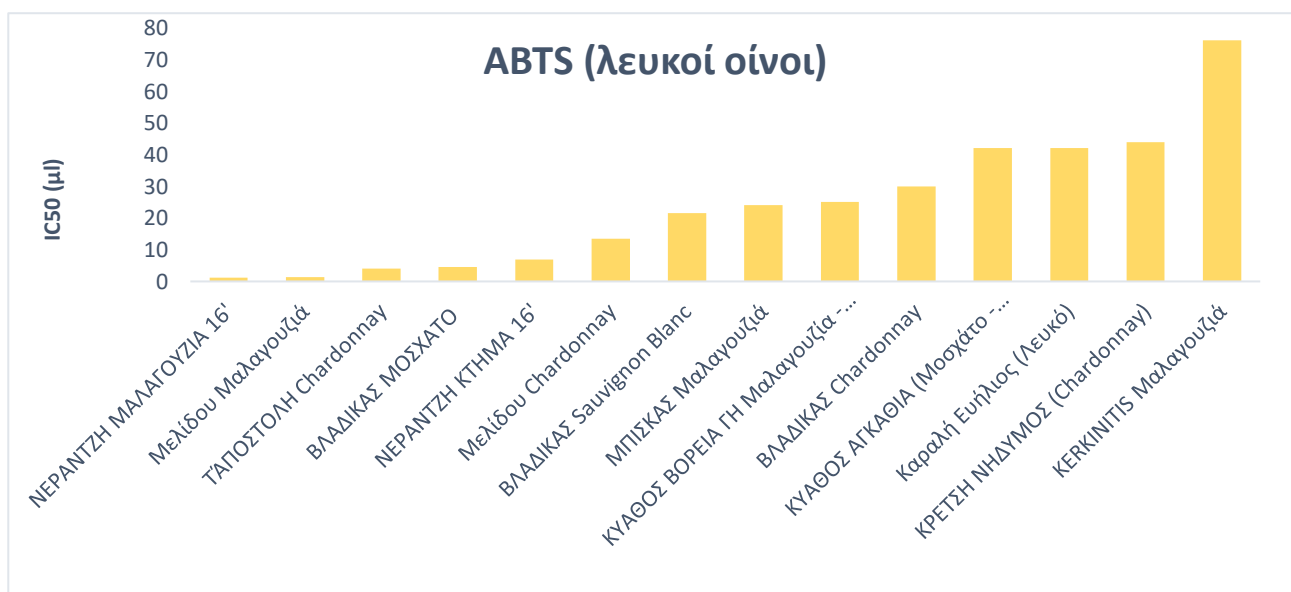
Γράφημα (3): Οι τιμές IC₅₀ (μl) για τους ερυθρούς οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH').



Γράφημα (4): Οι τιμές IC₅₀ (μl) για τους λευκούς οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH').



Γράφημα (5): Οι τιμές IC₅₀ (μl) για τους ερυθρούς οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS[•])



Γράφημα (6): Οι τιμές IC₅₀ (μl) για τους λευκούς οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS^{•+}).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία (Renaud & De Lorgeril 1992; Klatsky & Armstrong 1993; Trichopoulou & Lagiou 1997; Hoffmeister et al. 1999; Renaud et al. 1999; Rimm et al. 1999). Η κατανάλωση κρασιού μειώνει την οξείδωση της LDL η οποία είναι σημαντική για την πρόληψη της αρτηριοσκλήρωσης. Επίσης, η μέτρια κατανάλωση κρασιού αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Cooper et al. 2004). Ακόμη, έχει ευνοϊκή επίδραση στην μείωση της εμφάνισης καρκίνου και των χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, η ανάπτυξη των οποίων σχετίζεται με την παρουσία ελευθέρων ριζών (Scalbert et al. 2005). Οι ωφέλιμες επιδράσεις του κρασιού οφείλονται στις βιολογικά δραστικές ενώσεις, που είναι παρούσες κυρίως στο κόκκινο κρασί. Διαφορετικά είδη κρασιού έχουν διαφορετικές ποσότητες αντιοξειδωτικών και συνεπώς διαφορετικά οφέλη για την υγεία. Η σύσταση του κρασιού, συμπεριλαμβανομένου της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την καλλιέργεια, το έδαφος, το κλίμα, τη διαδικασία οινοποίησης και τις συνθήκες ωρίμανσης και αποθήκευσης.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα 17 ερυθρών και 14 λευκών κρασιών *in vitro*. Για την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι που βασίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH• και ABTS•⁺. Επίσης έγινε προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin–Ciocalteu.

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των κόκκινων κρασιών κυμαινόταν από 0,42 mg/ml έως 3,06 mg/ml και αυτό των λευκών κρασιών κυμαινόταν από 0,17 mg/ml έως 0,74 mg/ml. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των κόκκινων κρασιών ήταν 2,5 έως 4 φορές υψηλότερο από αυτό των λευκών κρασιών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα και με την βιβλιογραφία όπου επιβεβαιώνεται ότι τα λευκά κρασιά έχουν χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από τα κόκκινα (Šrakovská et al., 2012). Η διαφορά στην ποσότητα των πολυφαινολών μεταξύ κόκκινων και λευκών κρασιών οφείλεται στη διαδικασία παρασκευής τους. Για την παρασκευή κόκκινου κρασιού, τα σταφύλια υφίστανται διάσπαση των στερεών τμημάτων τους με σκοπό την μεταφορά των πολυφαινολών στο κρασί. Στη συνέχεια απαιτείται ένα στάδιο ζύμωσης για να

εξασφαλίζει τη μεταφορά των πολυφαινολών στο κόκκινο κρασί. Το λευκό κρασί δεν υποβάλλεται στη διαδικασία της διάσπασης των στερεών μερών αλλά αντι αυτού πραγματοποιείται μια απλή μηχανική συμπίεση των λευκών ή κόκκινων σταφυλιών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μη εισαγωγή των στερεών μερών στο στάδιο της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων πολυφαινολών στο κρασί και έτσι να περιορίζεται το τελικό πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι τόσο τα κόκκινα όσο και τα λευκά εμφανίζουν ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH• και ABTS•⁺. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι στη μέθοδο DPPH• για τα κόκκινα κρασιά οι τιμές IC₅₀ κυμαινόταν από 1,6 μl έως 18,5 μl ενώ στα λευκά από 7,7 μl έως 80 μl. Στη μέθοδο ABTS•⁺, οι τιμές IC₅₀ κυμαινόταν για τα κόκκινα κρασιά από 1,2 μl έως 19 μl ενώ στα λευκά από 1,25 μl έως 76 μl. Η ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στις ρίζες DPPH• και ABTS•⁺ οφείλεται στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Οι κόκκινοι οίνοι εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH• και ABTS•⁺ κάτι που πιθανώς οφείλεται στο πλουσιότερο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Σε μελέτες της βιβλιογραφίας έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα κόκκινα κρασιά εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• και ABTS•⁺ (Stratil et al., 2008; Šrakonská et al., 2012). Η χημική δομή των πολυφαινολών τους δίνει τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Ο τύπος της ένωσης, ο βαθμός μεθοξυλίωσης και ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων είναι μερικές από τις παραμέτρους που καθορίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα δομικά χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με την αντιοξειδωτική δράση είναι: 1) ένα μόριο κατεχόλης στον B-δακτύλιο, 2) η παρουσία ομάδων υδροξυλίου στη 3' και 5' θέση και 3) ο 2,3 διπλός δεσμός σε σύζευξη με μια καρβονυλική ομάδα στον C δακτύλιο (Bourne & Rice-Evans, 1998). Μπορούν να δρουν είτε απευθείας ως "εξουδετερωτές" των ελευθέρων ριζών ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου είτε να έχουν προσθετικό αποτέλεσμα στην ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίζουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κρασιών λόγω της αυτονόητης δυσκολίας διαχωρισμού και μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά αλλά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των κρασιών διαφέρει ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS. Οι διαφορές που παρατηρούνται

οφείλονται στη διαφορετική φύση και χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολικών που περιέχονται σε αυτά.

Συμπερασματικά καταλήγουμε στο γεγονός ότι οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους λευκούς και έχουν μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο. Από διατροφικής απόψεως επομένως θα ήταν προτιμότερη η κατανάλωση ερυθρών οίνων, όσο αναφορά την αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς και ελαχίστων περιπτώσεων λευκών που παρουσίασαν πολύ καλή συμπεριφορά στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών χωρίς να έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινόλες. Τέλος πρέπει να τονίσουμε ότι ο οίνος δεν παύει να είναι ένα αλκοολούχο ποτό οπότε πρέπει πάντα να υπάρχει μέτρο στην κατανάλωσή του.

Βιβλιογραφία

- Abreu, R.V. et al., 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), pp.659–664.
- Agardh, E.E. et al., 2004. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *Journal of internal medicine*, 255(6), pp.645–652.
- Akash, M.S.H., Rehman, K. & Chen, S., 2014. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*, 30(7–8), pp.755–763. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713005480>.
- Ames, B., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, pp.3–32.
- Ames, B.N., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, pp.3–32.
- Amous A., Makris D. and Kefalas P. Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(12), 5740–5741.
- Bakouria Bros. Stories of the jungle <http://dionysos.e-e-e.gr/wine/index.html>
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Biti M. and Mistiridou E. Experiments on Quantification of Derivatives of Wine α -Dicarbonyl Compounds, Work in the Chemistry III course, Chief Assistant Professor: Chrysanthopoulos Athanasios, Patras 2010, http://www.slideshare.net/gue_sl3bab_59/doc-3083534.
- Bøhn, S.K., Blomhoff, R. & Paur, I., 2014. Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms. *Molecular nutrition & food research*, 58(5), pp.915–30.
- Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T., 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128(1), pp.14–21.
- Bourne, L. and Rice-Evans, C. (1998), "Bioavailability of ferulic acid ", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 253, pp. 222–227.
- Brezová, V., Šlebodová, A. & Staško, A., 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114(3), pp.859–868. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608012454> [Accessed January 10, 2015].
- Bulkley, G.B., 1987. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, pp.66–73.
- Carden, D.L. & Granger, D.N., 2000. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*, 190(3), pp.255–266.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Lifesciences*, 65(4), pp.337–353.
- Cavin, C. et al., 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(8), pp.1155–1163.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979a. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979b. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Cheeseman, K.H. & Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), pp.481–493.
- Clifford M.N. and Willson K.C. Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverages. *London, Croom Hel*. 1985.

- Cooper K.A., Chopra M., Thurnham D.I. (2004): Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Review*, 17: 111–129.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- Davies, K., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp.9895–9901.
- Day, R.O. et al., 2016. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(23), pp.2167–2180.
- Dirks-Naylor, A.J., 2015. The benefits of coffee on skeletal muscle. *Life Sciences*, 143, pp.182–186. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320515300680>.
- Dizdaroğlu, M. et al., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine*, 32(11), pp.1102–1115.
- Dourtoglou V., Makris D., Dounas F., Zonas C., Trans -Resveratrol Concentration in Wines Produced in Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, Academic Press, 1999, 12 (3): 227- 233.
- Elsayed, N.M. et al., 1992. Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), pp.153–165.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp.872–879. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>.
- Farah, A. et al., 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), pp.374–381.
- Farah, A. et al., 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), pp.373–380.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, L.S., 2008. 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *Journal of Nutrition*, (September), pp.2309–2315.
- Frost-Meyer, N.J. & Logomarsino, J. V., 2012. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(4), pp.819–830. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461200093X> [Accessed January 10, 2015].
- Gawlik-Dziki, U. et al., 2014. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee—mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Research International*, 61, pp.48–55. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691400307X> [Accessed January 10, 2015].
- Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K.J., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), pp.526–534.
- Halliwell, B., 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium*, 61, pp.73–101.
- Harborne, J., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
- Hayyan, M., Hashim, M.A. & AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), pp.3029–3085.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology*, 300, pp.156–166.
- Herrera-Arellano, A. et al., 2004. Clinical trial of Cecropia obtusifolia and Marrubium vulgare leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 11(7–8), pp.561–566.
- Hoffmeister H., Schelp F.P., Mensink G.B.M., Dietz E., Bohning D. (1999): The relationship

- between alcohol consumption, health indicators and mortality in the German population. *International Journal of Epidemiology*, 28: 1066–1072.
- Honda, S. et al., 2014. Identification of crypto- and neochlorogenic lactones as potent xanthine oxidase inhibitors in roasted coffee beans. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 78(12), pp.2110–2116.
- Houston, M. et al., 1999. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium: Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), pp.4985–4994.
- Johnson H., Robinson J. The World Atlas of Wine. Mitchell Beazley, 2001, pp: 44–45.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N. & Morgan, L.M., 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American journal of clinical nutrition*, 78(4), pp.728–733.
- Jones, D.P. et al., 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free radical biology & medicine*, 28(4), pp.625–635.
- Kanner, J. & Lapidot, T., 2001. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free radical biology & medicine*, 31(11), pp.1388–1395.
- Keles, M.S. et al., 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 28(2), pp.141–143.
- Khallouki, F. et al., 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *The official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), pp.67–75.
- Klatsky A.L., Armstrong M.A. (1993): Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality: do red wine drinkers fare best? *American Journal of Cardiology*, 71: 467–469.
- Kourakou-Dragona S., Inology Issues, Trohalia Publications, Athens 1998.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- Larsson, S.C. & Wolk, A., 2007. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 132(5), pp.1740–1745.
- Lattanzio, V. et al., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.
- Lee, C., 2000. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 295(1–2), pp.141–154.
- Levine, R. & Stadtman, E., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), pp.1495–1502.
- Lijinsky, W., 1999. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation research*, 443(1–2), pp.129–138.
- Lindsay, J. et al., 2002. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American journal of epidemiology*, 156(5), pp.445–453.
- Magalhães, C.S. De et al., 2016. The Coffee Protective Effect on Catalase System in the Preneoplastic Induced Rat Liver. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Manach, C. et al., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.230S–242S.
- Manach, C. et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.

- Maurin, O. et al., 2007. Towards a Phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Annals of Botany*, 100(7), pp.1565–1583.
- Mitchell H.W. Cultivation and Harvesting of the Arabica Coffee Tree. Coffee: Agronomy. Ed. R.J. Clarke. New York: Elsevier Applied Science. 1988
- Monente, C. et al., 2015. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, 12, pp.365–374.
- Moreira, A.S.P. et al., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), pp.903–915. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C2FO30048F>.
- Muller, F. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine*, 43(4), pp.477–503.
- Murcia A, Martinez-Tome M. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additive, *J Food Prot*, 64, 2001: 379–384.
- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo (Athens, Greece)*, 13(3), pp.295–309.
- Naito, Y. et al., 1998. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive diseases and sciences*, 43(9 Suppl), p.30S–34S.
- Natella, F. et al., 2007. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 86(3), pp.604–609.
- Obata, T. et al., 2001. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain research*, 906(1–2), pp.170–175.
- Olthof, M. et al., 2001. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 73(3), pp.532–538.
- Ovesna Z et al. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines, *Oncol Rep*, 16, 2006 : 617- 624.
- Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P., 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews*, 29(2), pp.351–378.
- Papagalanis, N., 2014. Oxidative stress and endogenous antioxidant system I. Active oxygen radicals. , 26 (3), pp. 151-194.
- Papageorgiou E. Biochemistry of free radicals, antioxidants and lipid peroxidase, University Studio Press, Thessaloniki 2005: 114-126.
- Pellegrini, N. et al., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*, 133(9), pp.2812–2819.
- Pérez-Hernández, L.M. et al., 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), pp.430–435.
- Perrone, D., Farah, A. & Donangelo, C., 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), pp.4265–4275.
- Perrone, D., Farah, A. & Donangelo, C.M., 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(17), pp.4265–4275.
- Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp.55–74.
- Prior, R.L. & Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology & medicine*, 27(11–12), pp.1173–1181.
- Qiuyun Zhang, Weiwei Chen, Jianhua Zhao, Wanpeng X, (2016) Functional constituents and

- antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes
- Quideau, S. et al., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Ray, R.S. et al., 2001. Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug and chemical toxicology*, 24(2), pp.191–200.
- Reiter, R.J. et al., 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18(1), pp.1–11.
- Reiter, R.J., Carneiro, R.C. & Oh, C.S., 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 29(8), pp.363–372.
- Renaud S., De Lorgeril M. (1992): Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339: 1523–1526.
- Renaud S.C., Gueguen R., Siest G., Salomon R. (1999): Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. *Archives of Internal Medicine*, 159: 1865–1870.
- Rimm E.B., Williams P., Fosher K., Criqui M., Stampfer M.J. (1999): Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *British Medical Journal*, 319: 1523–1528.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Rodrigues, N.P., Salva, T.D.J.G. & Bragagnolo, N., 2015. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the in Vitro Capacity To Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(19), pp.4815–4826.
- Salazar-Martinez, E. et al., 2004. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 140(1), pp.1–8.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 1–20.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 5(3), pp.237–245.
- Soufleros E. *Inology - Science and Know-how*, 2nd Edition, Thessaloniki 1997.
- Špakovská E., Marcinčák S., Bača M., Potravinarstvo P. T. (2012): Polyphenolic content and antioxidative activity of wines from the sobrance wine region. vol. 6, 2012, no. 3, p. 32–35.
- Steinbacher, P. & Eckl, P., 2015. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules*, 5(2), pp.356–377.
- Stratil P., Klejdus B., Kubáň V. (2007): Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71: 1741–1751.
- Tidball, J.G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R345–53.
- Tidball, J.G. & Villalta, S.A., 2010. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(5), pp.R1173–87.
- Trichopoulou A., Lagiou P. (1997): Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutrition Review*, 55: 383–389.
- Trugo, L.C. & Macrae, R., 1984. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15(3), pp.219–227.
- Tsakiris Argyris, *Inology*, Athens 1998, Psichalou Publishing
- Tsetouras P. *Oenotechnia - The science of wine in practice*, 2nd Edition, Stamoulis, Athens 2008.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40.
- Vitaglione, P., Fogliano, V. & Pellegrini, N., 2012. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food & Function*, 3(9), p.916.
- Wattenberg, L., 1983. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer research*, 43(5 Suppl), p.2448s–2453s.
- Wu M et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in

red wine, *Int. J. Mol. Med*, 8, 2001 : 3-17.
Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), pp.139–162.