

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Προσδιορισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων πράσινου και  
καβουρδισμένου καφέ**

**Determination of the antimutagenic activity of coffee extracts from green  
and roasted coffee beans**

Μήτσιου Δήμητρα

Λάρισα 2016

## **Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Μόσιαλος:** Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## 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 πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη 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.

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

# Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή .....	2
Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>8</b>
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	9
1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	10
1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ).....	10
1.2.3 Υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).....	11
1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS) .....	12
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	13
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση .....	13
1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη” .....	13
1.4.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.....	15
1.4.4 Κυτόχρωμα $P_{450}$ .....	15
1.4.5 Αυτοοξειδωση μορίων .....	15
1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS .....	15
1.6 Βιολογική δράση των ROS .....	16
1.6.1 Θετικές επιδράσεις.....	16
1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις .....	17
1.7 Οξειδωτικό στρες .....	19
1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	21
1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	22
1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά .....	23
1.9 Πολυφαινόλες .....	24
1.9.1 Φυσικές ιδιότητες.....	25
1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών.....	25
1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	27
1.10 Καφές .....	29
1.10.1 Γενικά .....	29
1.10.2 Χημική σύσταση.....	30
<b>2. Σκοπός .....</b>	<b>34</b>
<b>3. Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>35</b>
3.1 Ποικιλίες καφέ .....	35
3.2 Παραγωγή των εκχυλισμάτων από κόκκους καφέ .....	35

3.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων καφέ με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	36
3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα σουπεροξειδίου O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	38
3.4.1 Γενικά .....	38
3.4.2 Υλικά και μεθοδολογία .....	38
3.5 Τεστ του Ames.....	40
3.5.1 Γενικά.....	40
3.5.2 Μηχανισμός δράσης του μεταλλαξιγόνου παράγοντα <i>t-BOOH</i> .....	42
3.5.3 Υλικά και μεθοδολογία .....	43
3.5.4 Τεστ Ames με μεταβολική ενεργοποίηση.....	45
<b>4. Αποτελέσματα .....</b>	<b>47</b>
4.1 Ποσοτικοποίηση TPC των εκχυλισμάτων καφέ με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	47
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα σουπεροξειδίου O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	48
4.3 Τεστ του Ames.....	49
4.3.1 Τεστ Ames χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.....	50
4.3.2 Τεστ Ames με μεταβολική ενεργοποίηση.....	57
<b>5. Συζήτηση.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>65</b>

## Περίληψη

Ο καφές είναι ένα εξαιρετικά δημοφιλές ρόφημα ανά τον κόσμο λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του (γεύση και άρωμα). Το ρόφημα προέρχεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea* και σαν φυτικό προϊόν περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών όπως η καφεΐνη, πολυφαινόλες και άλλα. Οι κόκκοι του φυτού *Coffea* υφίστανται επεξεργασία και καβούρδισμα πριν τη χρήση για την παραγωγή του ροφήματος, γεγονός που είναι πιθανόν να οδηγήσει σε αλλαγή των ιδιοτήτων των βιοδραστικών συστατικών. Επειδή, λοιπόν, ο καφές αποτελεί ένα τόσο διαδεδομένο ρόφημα και καταναλώνεται παντού έχει στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω του και ως αποτέλεσμα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση των ιδιοτήτων του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αλλά εφόσον δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό δράσης, δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθούν στοχευμένες μελέτες. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν εννέα δείγματα καφέ εκ των οποίων τρεις πράσινοι και έξι αντίστοιχοι καβουρδισμένοι. Αρχικά ετοιμάστηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα για το κάθε δείγμα και εν συνεχεία αυτά εφαρμόστηκαν σε πολλαπλά τεστ Ames με χρήση βακτηρίων *Salmonellatyphimurium* TA102 και παρουσία οξειδωτικού παράγοντα με σκοπό να διαπιστωθεί η επίδραση που θα είχαν στην ανάπτυξη των αποικιών των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο καφές -στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν- φάνηκε να παρεμποδίζει τη μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού παράγοντα.

## Abstract

Coffee is a very popular beverage worldwide due to its organoleptic properties (flavour and aroma). It is a brewed drink prepared from coffee beans, which are the seeds of the *Coffea* plant. As a crop, it contains a plethora of bioactive components such as caffeine and polyphenols among others. Coffee beans undergo several processes and roasting, which may affect the properties of its bioactive components. Therefore, because coffee is a widely consumed beverage, several studies have taken place in order to investigate its role in various pathological conditions. There are some encouraging results, but since its molecular mechanisms of action remains obscure, more specific studies are not easy to be conducted. Therefore, in this study nine coffee samples were examined, including 3 green coffee samples and 6 corresponding roasted coffee samples. Initially, polyphenolic extracts for each sample were prepared and then these extracts were screened with the Ames tests using *Salmonella typhimurium* TA102 strains in the presence of an oxidizing agent in order to determine the impact they would have on the mutation rate of the bacterial colonies. According to the results, coffee -in the concentration range tested- appeared to inhibit the mutagenic activity of the oxidizing agent.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ελεύθερες ρίζες

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, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 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).

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; Pani *et al.* 2010; AICR 2007), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010) ή τον άνθρακα.



## 1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

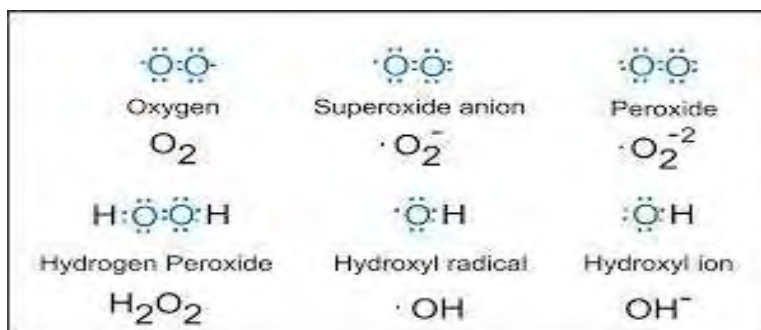
Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου συνήθως περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ωστόσο, δεν αποτελούν όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική 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 (Παπαγαλάνης, 2014).

Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξειδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξείδωση 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 ( $O_2^{\cdot-}$ ), του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^{\cdot}$ ) και του υδροπεροξυλίου ( $HO_2^{\cdot}$ ). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3^{\cdot}$ ), οι θειούχες ρίζες ( $RS^{\cdot}$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ).

**Πίνακας 1:** Δραστικές μορφές οξυγόνου

<b>ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ</b>	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )	Υπεροξείδιο 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 ( $^1O_2$ )



**Εικόνα 1:** Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

### 1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

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

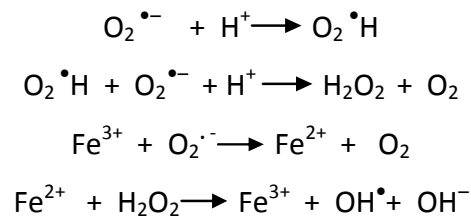
Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου,  $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$ . Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τη οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης 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, Lustgarten, Jang, Richardson, & Van Remmen, 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

### 1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}^{\cdot}$ )

Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα που, ωστόσο, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία των ριζών (Hayyan, Hashim, & AlNashef, 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., 1995; Reiter, Carneiro, & Oh, 1997). 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 ( $O_2^{\bullet-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999).

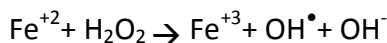


Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου.

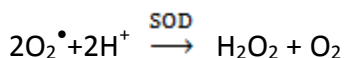
### 1.2.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

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 υπεροξειδίο 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 υπεροξειδίο 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



### 1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (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 μονοξειδίο του αζώτου  $\text{NO}^\bullet$  και το διοξειδίο του αζώτου  $\text{NO}_2^\bullet$  καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ  $\text{HNO}_2$  και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου  $\text{ONOO}^-$ ) (Fang, Yang, & Wu, 2002).

**Πίνακας 2:** Δραστικές μορφές αζώτου

<b>ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ</b>	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ( $\text{NO}^\bullet$ )	Νιτρώδες Οξύ ( $\text{HNO}_2$ )
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ( $\text{NO}_2^\bullet$ )	Κατιόν Νιτροσυλίου ( $\text{NO}^+$ )
	Ανιόν Νιτροσυλίου ( $\text{NO}^-$ )

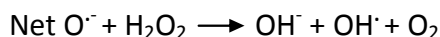
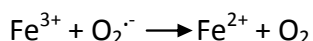
## 1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

### 1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

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  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$  (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και  $FADH_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\bullet-}$  (Chance et al., 1979). Το  $O_2^{\bullet-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\bullet-}$  και στο  $H_2O_2$  δημιουργείται  $OH^{\bullet}$ .

#### 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 ( $O_2^{\bullet-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^-$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  και  $NO_2^{\bullet}$ .

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

### 1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από

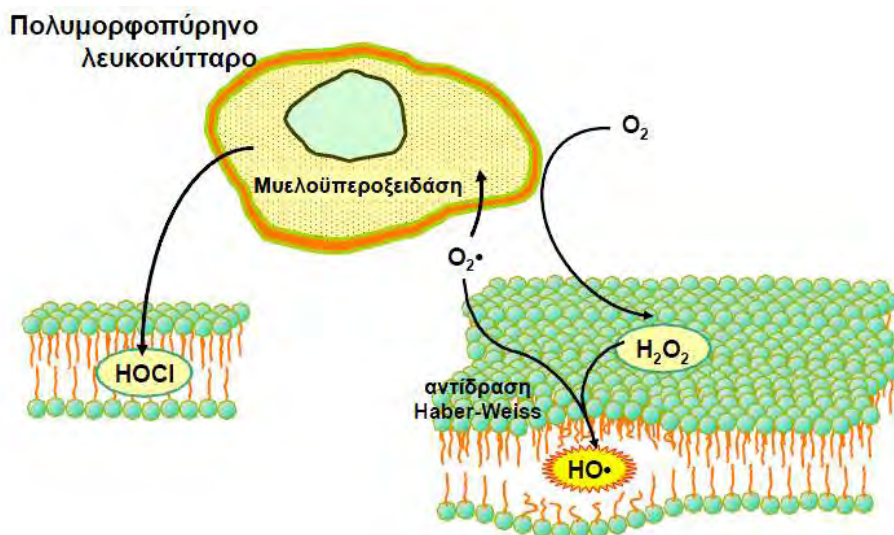
ιούς και βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς.

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. 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. 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

### 1.4.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kurpusamy & Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^{\bullet-}$ .

Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το  $Ca^{2+}$  ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

### 1.4.4 Κυτόχρωμα P<sub>450</sub>

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> (Yu, 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας  $O_2^{\bullet-}$  το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979). 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  $O_2^{\bullet-}$ .

### 1.4.5 Αυτοοξείδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ).

## 1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής 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, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998; Ray et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed, Omaye, Klain, & Korte, 1992; Jones et al., 2000; Obata, Yamanaka, Kinemuchi, & Orelan, 2001).

Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Lapidot, 2001; Lijinsky, 1999).

## 1.6 Βιολογική δράση των ROS

### 1.6.1 Θετικές επιδράσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ROS έχουν και ευεργετικές δράσεις οι οποίες εκδηλώνονται σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδο- 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 απακευλάσες η μεθυλάσες ιστονών. Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

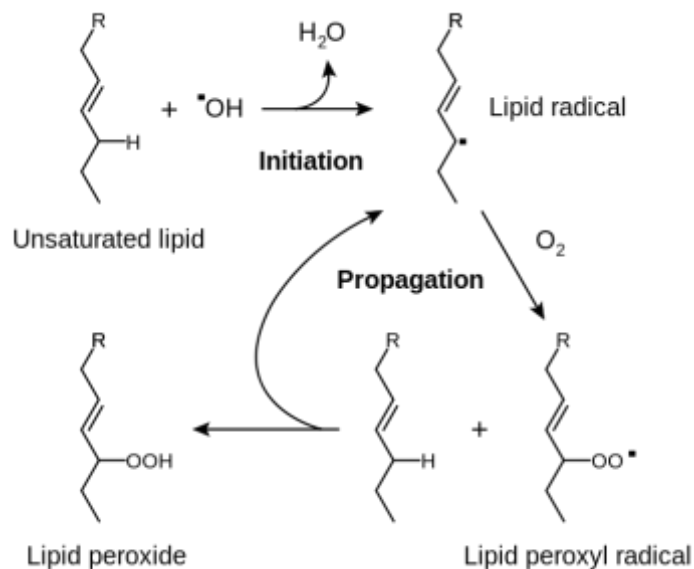
Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.



### 1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

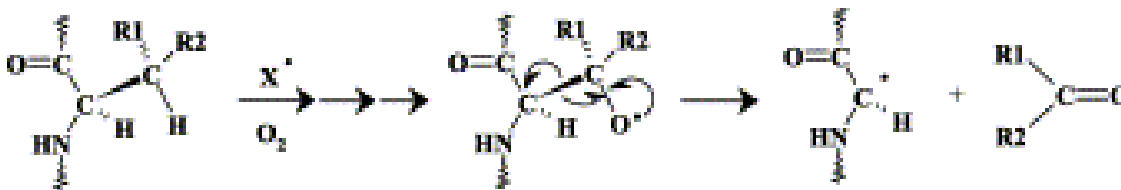
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Μέσω αυτής της αρνητικής δράσης τους έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των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

Λιπίδια → Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει  $ROO^{\bullet}$  κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο.



**Εικόνα 3:** Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

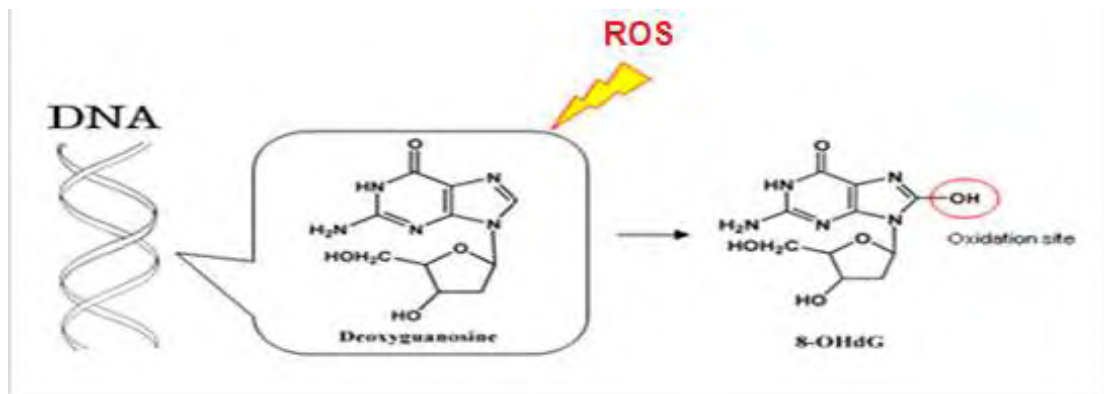
Πρωτεΐνες → Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το  $\text{OH}\cdot$ , το  $\text{RO}\cdot$  και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός 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, Reinheckel, & Davies, 1997; Levine & Stadtman, 2001).



**Εικόνα 4:** Αντίδραση πρωτεϊνικής οξειδωσης

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 ( $\text{OH}^\bullet$ ) 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 αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Helbock, Beckman, & Ames, 1999).

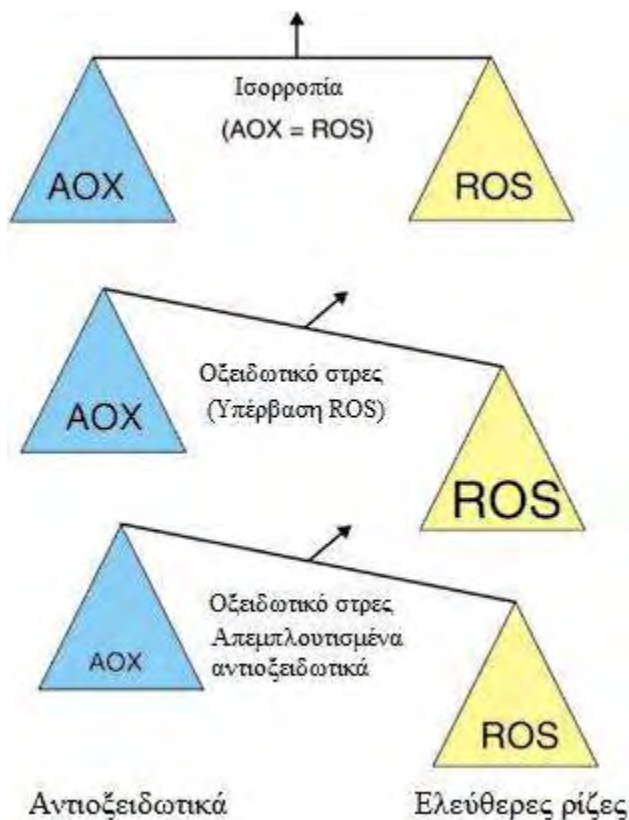


**Εικόνα 5:** Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

### 1.7 Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης 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 μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών αζώτου και οξυγόνου.



**Εικόνα 6:** Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει:

- 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.

- 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. Το περιεχόμενο των κυττάρων περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, όπως CAT ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. 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.

## 1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως **αντιοξειδωτικό**, ορίζεται η ουσία που βοηθάει στη μείωση της σοβαρότητας του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (Dekkers, van Doornen, & Kemper, 1996). 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).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση:

- την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή)
- τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα)
- τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική)

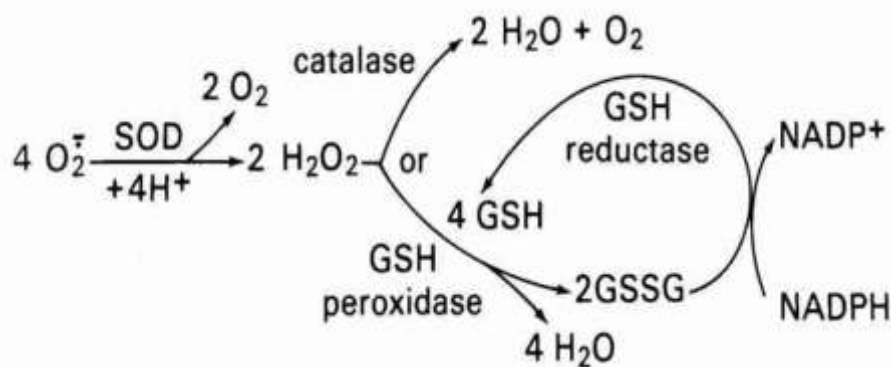
### 1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

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

#### 1.8.1.α Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν άμεση επίδραση. 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 7: Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

### 1.8.1.β Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Οι μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνουν τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη E (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπράγοντες. Η βιταμίνη C και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστο αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, αντιδρά απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

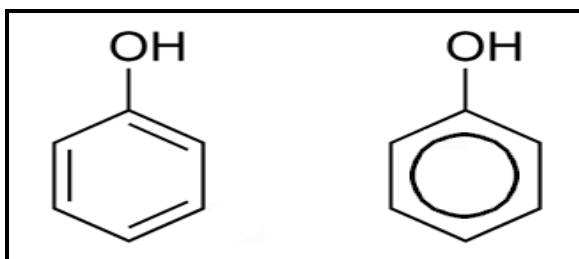
### 1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.

Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10.

## 1.9 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της δίαιτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsaο, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Rouyseguy, 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι  $C_6H_5OH$ , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 8: Δομή φαινολών

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μίγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesì, Vari, Scazzocchio, & Masella, 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

Πιστεύεται ότι η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στα φυτά υποτιμάται, καθώς πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και τα παράγωγά τους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, ξεφεύγοντας από τις μεθόδους και



τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η σύσταση σε πολυφαινόλες για τα περισσότερα φρούτα και αρκετών ποικιλιών σιτηρών δεν είναι ακόμα γνωστή.

### 1.9.1 Φυσικές ιδιότητες

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως βρίσκονται σε υγρή ή σε στερεή μορφή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν. Επίσης, υπάρχουν και λιποδιαλυτές πολυφαινόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

### 1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Paradourouli & Frazier, 2004).

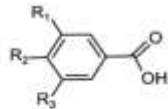
Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach *et al.* 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στου δακτυλίου τους. Ως

εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

- Φλαβονοειδή → Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly *et al.*, 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.
- Μη φλαβονοειδή → Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach *et al.* 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, τη βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007). Τα στυλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στυλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι

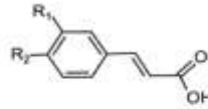
δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά της νόσου του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων.

#### Hydroxybenzoic acids



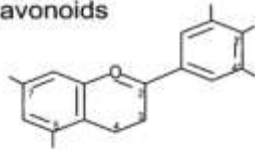
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  : Protocatecholic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Gallic acid

#### Hydroxycinnamic acids

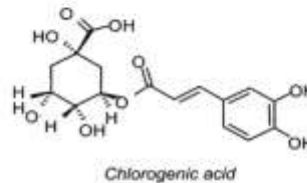


$R_1 = \text{OH}$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Caffeic acid  
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$  : Ferulic acid

#### Flavonoids

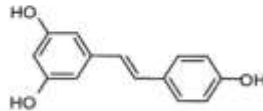


See Figure 2



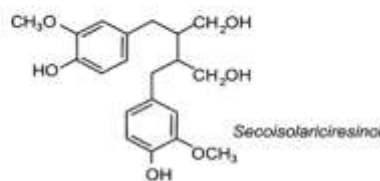
Chlorogenic acid

#### Stilbenes



Resveratrol

#### Lignans



Secoisolariciresinol

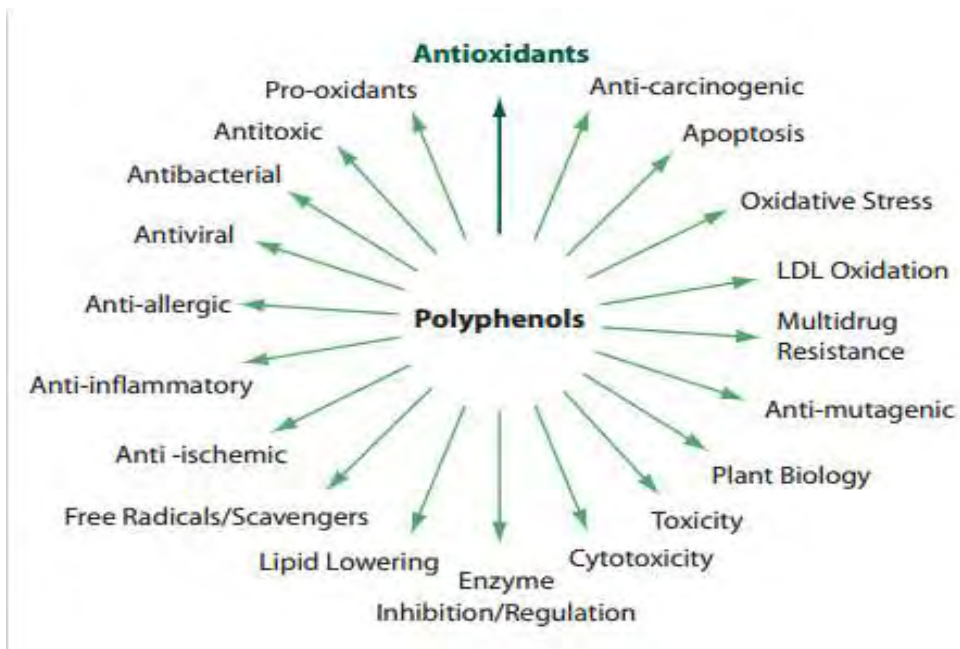
**Εικόνα 9:** Είδη πολυφαινολών

### 1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen et al. 2005).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, δρουν ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος  $Fe^{+2}$ , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές  $OH^{\bullet}$ . Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert et al. 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo et al. 2014; Bouayed et al. 2011). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.



**Εικόνα 10:** Παράγοντες στους οποίους οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική δράση

## 1.10 Καφές

### 1.10.1 Γενικά

Ο καφές αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως. Παρασκευάζεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea*. Αρκετά είδη του γένους *Coffea* παράγουν τα μούρα από τα οποία προέρχονται οι κόκκοι του καφέ. Τα δύο κύρια είδη που καλλιεργούνται εμπορικά είναι ο *Coffea canephora* –γνωστότερο ως *robusta*- και *C. arabica*. Όλα τα φυτά καφέ προέρχονται από την τροπική Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και άλλα νησιά του Ινδικού ωκεανού. Ωστόσο, ο καφές μεταφέρθηκε και σε άλλα μέρη του κόσμου και πλέον καλλιεργείται σε περισσότερες από 70 χώρες. Ο καρπός του φυτού συλλέγεται όταν ωριμάσει, επεξεργάζεται και αποξηρένεται. Μετά την αποξήρανση οι κόκκοι καφέ συνήθως καβουρδίζονται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα αναλόγως με την επιθυμητή τελική γεύση (Maurin et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχει και η επιλογή μη καβουρδίσματος και τότε μιλάμε για τον πράσινο καφέ.

Με την κατανάλωση ροφημάτων καφέ παρατηρείται μία διεγερτική δράση που οφείλεται στο μόριο της καφεΐνης. Επιπρόσθετα, κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η

συνετή κατανάλωση ροφημάτων καφέ μπορεί να είναι ευεργετική σε υγιείς ενήλικες (Liu, Shen, Shi, & Cai, 2016; Nehlig, 2016).

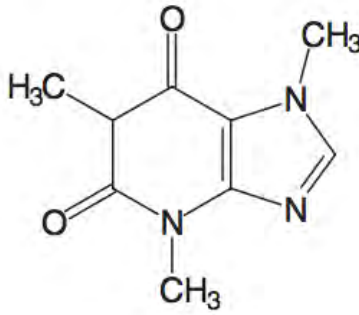
Η πιο αξιόπιστη ιστορική αναφορά τοποθετεί την κατανάλωση ροφημάτων καφέ στα μέσα του 15<sup>ου</sup> αιώνα από μουσουλμάνους Σούφι στην Υεμένη. Εκεί, στην Αραβία, οι κόκκοι του καφέ επεξεργάζονταν και ψήνονταν με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που χρησιμοποιούμε σήμερα για την προετοιμασία ροφημάτων καφέ. Μέχρι τις αρχές του 16<sup>ου</sup> αιώνα ο καφές είχε εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο.

## 1.10.2 Χημική σύσταση

### 1.10.2.α Πράσινος καφές

Ο πράσινος καφές αποτελείται κυρίως από νερό, υδατάνθρακες και ίνες, πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα, οργανικά οξέα, χλωρογενικά οξέα, τριγονελλίνη και καφεΐνη. Από αυτά, τα χλωρογενικά οξέα, η τριγονελλίνη, η καφεΐνη, οι διαλυτές ίνες και τα διτερπένια των λιπιδίων είναι το πιο βιοενεργά και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να παίζουν σημαντικό στη διαμόρφωση της γεύσης του ροφήματος μετά το καβούρδισμα.

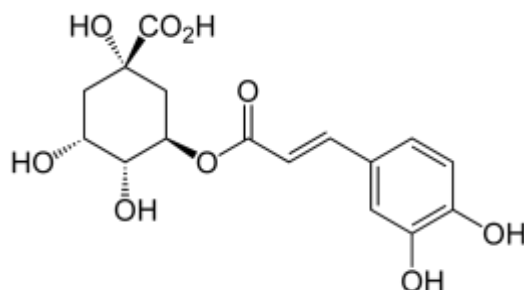
Καφεΐνη: είναι μία μεθυλξανθίνη με πικρή γεύση που, μολαταύτα, συμβάλλει κατά λιγότερο από 10% της πικράδας του ροφήματος καφέ. Αυτό το αλκαλοειδές είναι ανθεκτικό στη θερμότητα και η συγκέντρωσή του στο *C. canephora* είναι περίπου διπλάσια από αυτή στο *C. arabica*. Η καφεΐνη διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα γιατί ανταγωνίζεται με την αδενοσίνη για πρόσδεση στους υποδοχείς της. Παρόλο που η πρόσληψη καφεΐνης έχει συσχετιστεί με υψηλή χοληστερόλη, στεφανιαίες νόσους και καρκίνο, άλλες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ευεργετικές επιδράσεις της στη υγεία όπως μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος (Adriana Farah, de Paulis, Moreira, Trugo, & Martin, 2006). Επιπρόσθετα, κάποιοι μεταβολίτες της καφεΐνης (κυρίως 1-μεθυλξανθίνη και 1-μεθυλουρικό) έχουν παρουσιάσει αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro* (C. Lee, 2000).



**Εικόνα 11:** Δομή μορίου καφεΐνης

Χλωρογενικά οξέα: περιλαμβάνουν μία κύρια κατηγορία φαινολικών ενώσεων, οι οποίες προέρχονται κυρίως από εστεροποίηση *trans*-κινναμωμικών οξέων με κινικό οξύ (Clifford, 2000). Τα χλωρογενικά οξέα συμβάλλουν στη γεύση των ροφημάτων καφέ προσδίδοντας στυφότητα, πικράδα και οξύτητα. Μολαταύτα, εάν είναι παρόντα σε υψηλές ποσότητες στο πράσινο καφέ, ενδέχεται να δημιουργήσει ανεπιθύμητη γεύση, πιθανόν λόγω του σχηματισμού προϊόντων οξειδωσης και αποικοδόμησης κατά το καβούρδισμα (A Farah, Monteiro, Calado, Franca, & Trugo, 2006). Η περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ στο φυτό *C. canephora* είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη από αυτή του *C. arabica*, αν και γενικά αυτή η συγκέντρωση ποικίλλει σημαντικά στα δύο είδη.

Τα τελευταία χρόνια, μια σειρά από επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η κατανάλωση καφέ, ανεξάρτητα από την πρόσληψη καφεΐνης, συνδέεται με οφέλη για την υγεία, όπως χαμηλότερο κίνδυνο διαβήτη τύπου 2 (Agardh et al., 2004; Salazar-Martinez et al., 2004), Parkinson και Alzheimer (Lindsay et al., 2002), και καρκίνο του ήπατος (Larsson & Wolk, 2007). Οι κύριες πηγές δεδομένων που αποδίδουν αυτές τις ευεργετικές ιδιότητες των χλωρογενικών οξέων είναι μελέτες *in vitro* και μελέτες σε ζώα (Herrera-Arellano, Aguilar-Santamaria, Garcia-Hernandez, Nicasio-Torres, & Tortoriello, 2004; Johnston, Clifford, & Morgan, 2003; Pellegrini et al., 2003).

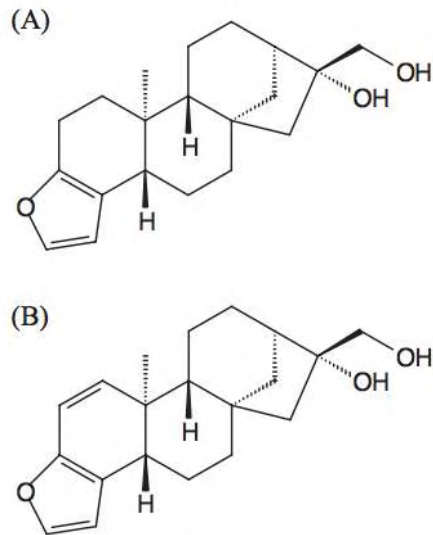


**Εικόνα 12:** Βασική δομή χλωρογενικών οξέων

Καφεστόλη και καφεόλη: είναι πεντακυκλικά διτερπένια με σκελετό καουρενίου. Μεθυλιωμένες μορφές αυτών έχουν βρεθεί σε σπόρους Robusta. Αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις και τα παράγωγά τους, τα οποία είναι κυρίως άλατα ή εστέρες λιπαρών οξέων, αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του λιπιδικού κλάσματος του καφέ (Cavin et al., 2002; Wattenberg, 1983). Η καφεστόλη είναι το πρωτογενές συστατικό του μη σαπωνοποιητικού κλάσματος λιπιδίων καφέ που αντιπροσωπεύει περίπου το 0,2% - 0,6% του βάρους του καφέ. Η καφεόλη είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα, το οξυγόνο, το φως, και τα οξέα και συνεπώς είναι λιγότερο άφθονη. Το *C. arabica* έχει υψηλότερα επίπεδα διτερπενίων σε σχέση με το είδος *C. canephora*.

Τα διτερπένια του καφέ παρουσίασαν αντικαρκινικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες *in vitro* (Cavin et al., 2002; Wattenberg, 1983). Από την άλλη πλευρά, όμως, η υψηλή κατανάλωση αυτών των ενώσεων έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο ανθρώπινο πλάσμα, γεγονός που μπορεί έμμεσα να αυξήσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Olthof, Hollman, Zock, & Katan, 2001). Αυτές οι ενώσεις είναι παρούσες κατά κύριο λόγο στον μη φιλτραρισμένο καφέ, αφού είναι δυσδιάλυτες στο νερό και ως εκ τούτου παγιδεύονται από τα φίλτρα χαρτιού.





**Εικόνα 13:** Δομή μορίων (A) καφεστόλης και (B) καφεόλης

#### 1.10.2.β Καβουρδισμένος καφές

Η σύνθεση των κόκκων αλλάζει δραματικά κατά το καβούρδισμα, ως συνέπεια της πυρόλυσης, της καραμελοποίησης, και των αντιδράσεων Maillard. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του καβουρδισμένου καφέ (1,5% -5%) είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη του πράσινου καφέ, και ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό καβουρδίσματος (Trugo & Macrae, 1984).

Ως προϊόν των αντιδράσεων Maillard παράγονται οι μελανοΐδινες οι οποίες ορίζονται ως πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους και σκούρου χρώματος. Τα πολυμερή αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέ χρώμα του καβουρδισμένου καφέ και σχηματίζουν το 25% περίπου της ξηρής μάζας του (Nicoli, Anese, Manzocco, & Lericci, 1997). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μελανοΐδινες είναι εν μέρει αρμόδιες για τις αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες του καφέ και επομένως μπορούν να θεωρηθούν βιοδραστικές ενώσεις (Daglia, Papetti, Gregotti, Berte, & Gazzani, 2000; Nicoli et al., 1997).

Λόγω της θερμικής τους αστάθειας, τα χλωρογενικά οξέα υφίστανται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, όπως ισομερισμό, επιμερισμό, αποικοδόμηση σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και ενσωμάτωση σε μελανοΐδινες, συμβάλλοντας στο χρώμα και στη γεύση.

Η καφεΐνη δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, αλλά μπορεί να παρατηρηθούν μικρές απώλειες λόγω εξάχνωσης.

Το λιπιδιακό κλάσμα είναι θερμικά σταθερό. Όσον αφορά τα διτερπένια, παρά το γεγονός ότι είναι πιο ευαίσθητα στη θερμότητα, μπορούν ακόμα να βρεθούν στον καβουρδισμένο καφέ (ειδικά σε *C. arabica*) σε αξιοσημείωτες ποσότητες (0,2-0,9g/100g ξηρού βάρους).

## 2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων καφέ καθώς και η διαφορά μεταξύ πράσινων και καβουρδισμένων δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, αξιοποιήσαμε τη δυνατότητα χρήσης του τεστ του Ames για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών. Έτσι, εκχυλίσματα διαφόρων ποικιλιών καφέ εφαρμόστηκαν σε καλλιέργειες βακτηρίων *S. typhimurium* παρουσία ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Ο προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας του καφέ έγινε μετά από σύγκριση του αριθμού των βακτηριακών αποικιών μεταξύ τρυβλίων που περιείχαν τον μεταλλαξιγόνο παράγοντα παρουσία και μη του καφέ. Ακόμα, σε μία προσπάθεια επεξήγησης των αποτελεσμάτων του τεστ Ames, πραγματοποιήθηκαν μέθοδοι προσδιορισμού του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών σουπεροξειδίου σε όλα τα εκχυλίσματα.

### 3. Πειραματικό Μέρος

#### 3.1 Ποικιλίες καφέ

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από 9 δείγματα καφέ: πέντε Brazil, δυο Robusta και δυο ντεκαφεϊνέ. Ο Brazil ήταν *C.arabica*, ο ντεκαφεϊνέ ήταν χαρμάνι διαφόρων *C.arabica*, ενώ ο Robusta ήταν *C.canephora*.

Τα πέντε Brazil είναι τα εξής (τα λεπτά αφορούν χρόνο καβουρδίσματος):

- i. Brazil Green (άψητος)
- ii. Brazil Roasted 1 (7.15min, 215°C)
- iii. Brazil Roasted 2 (6.05min, 215°C)
- iv. Brazil Roasted 3 (5.32min, 215°C)
- v. Brazil Roasted 4 (3.52min, 215°C)

Ενώ τα δύο Robusta:

- i. Robusta Green (άψητος)
- ii. Robusta Roasted (12.30min, 218°C)

Και τα δυο Ντεκαφεϊνέ:

- i. Espresso Swiss Water Decaf Green
- ii. Espresso Swiss Water Decaf Roasted (12min, 208°C)

#### 3.2 Παραγωγή των εκχυλισμάτων από κόκκους καφέ

Για κάθε ποικιλία, 2g κόκκων καφέ (πράσινοι και καβουρδισμένοι) αλέθηκαν χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι με τη βοήθεια υγρού αζώτου, ώσπου οι κόκκοι έγιναν σκόνη. Κατόπιν, διαλύθηκαν σε νερό έως τελικού όγκου 20 ml (10% w/v) και υποβλήθηκαν σε υπερήχους για 20 λεπτά (70% amplitude, κύκλος 0,7 δευτερολέπτων). Κατά τη διάρκεια της κατεργασίας με υπερήχους τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για αποφυγή ανόδου της θερμοκρασίας τους. Έπειτα, κάθε δείγμα αναδεύθηκε για 20 λεπτά υπό μέτρια θέρμανση (35°C). Το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με φυγοκέντρηση (3000rpm, 10 λεπτά, 5°C). Τέλος, κάθε εκχύλισμα

διαχωρίστηκε σε κλάσματα που διατηρήθηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση (Priftis et al., 2015).

### 3.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων καφέ με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

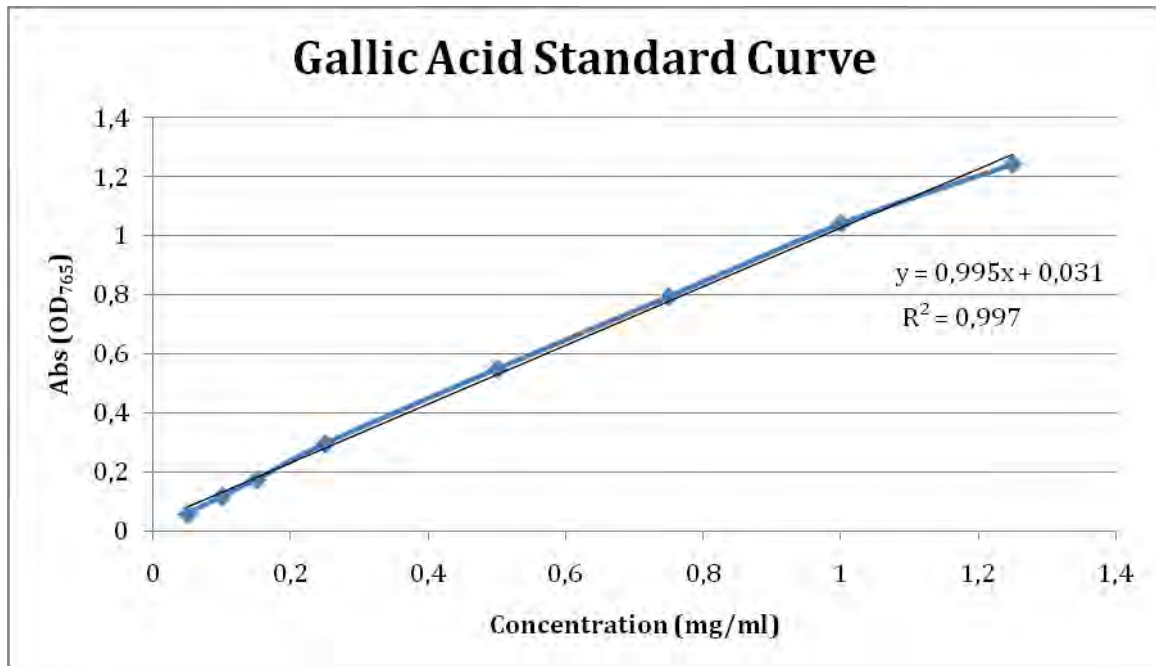
Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων καφέ προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά 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 αντιδραστήριου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Τα μίγματα της αντίδρασης παρασκευάστηκαν σε erpendorf tubes σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Για κάθε κατάσταση είχαμε 3 επαναλήψεις:

	<b>Δείγμα</b>	<b>Negative control</b>	<b>Τυφλό</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1ml	1,1ml	1,02ml
<b>Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu</b>	100μl	-	100μl
<b>Καφές</b>	20μl	20μl	-

Ακολούθως, τα δείγματα επώαστηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστέθηκαν 280μl  $Na_2CO_3$  (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765nm (Priftis et al., 2015).

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1 και 1.25 mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση  $y = 0,9954x + 0,0311$  με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman  $r = 0,9979$  με  $p < 0,01$ . Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 14: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

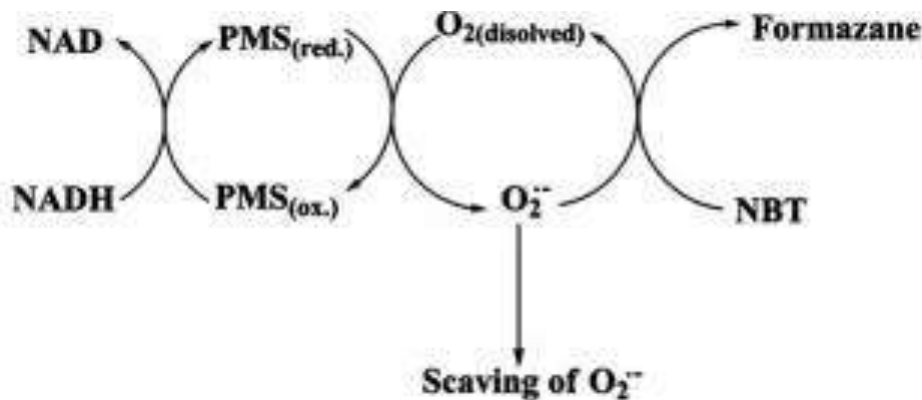
### 3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$

#### 3.4.1 Γενικά

Η ρίζα  $O_2^{\bullet-}$  έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών.

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας  $O_2^{\bullet-}$  πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al. (2004).

Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το  $O_2^{\bullet-}$  μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το  $NBT^{2+}$  με αποτέλεσμα να σχηματίζεται προϊόν με μπλε χρώμα (φορμαζάνη) το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν τη μετατροπή του κίτρινου NBT στη μπλε φορμαζάνη.



**Εικόνα 15:** Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα  $O_2^{\bullet-}$  μέσω του συστήματος PMS-NADH

#### 3.4.2 Υλικά και μεθοδολογία

Τα μίγματα προς φωτομέτρηση παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

	<b>Τυφλό</b>	<b>Control</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Καφές</b>	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	50 µl	-	-	-	-	-
<b>Tris-HCl (16mM, pH 8.0)</b>	800 µl	625 µl	625 µl	625 µl	625 µl	625 µl	625 µl
<b>NBT (300µM)</b>	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
<b>NADH (468µM)</b>	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
<b>PMS (60µM)</b>	-	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml

Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60µM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν καφέ αποτελούσαν το μάρτυρα.

Επίσης, ελέγχθηκε αν τα εκχυλίσματα καφέ απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Για το σκοπό αυτό τα μίγματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Κάθε δείγμα εξεταστηκε εις διπλούν.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Καφές</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	-	-
<b>Tris-HCl (16mM, pH 8.0)</b>	750 µl	750 µl	750 µl	750 µl	750 µl
<b>NBT (300µM)</b>	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
<b>NADH (60µM)</b>	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup> υπολογίζεται από τον τύπο:

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

όπου A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

όπου Αδ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

### 3.5 Τεστ του Ames

#### 3.5.1 Γενικά

Το τεστ του Ames, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του, είναι μία μέθοδος μικρής διάρκειας (short-term), αξιόπιστη και ευαίσθητη που έχει ως σκοπό την ανίχνευση χημικών ουσιών που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι εξαρτώμενα από το αμινοξύ ιστιδίνη, δηλαδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Όταν τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης τότε είναι πιθανό να συμβούν επαναμεταλλάξεις, δηλαδή νέες μεταλλάξεις στα ήδη μεταλλαγμένα γονίδια της ιστιδίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί επαναμεταλλάξεις μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Για το λόγο αυτό η μέθοδος ανήκει στη κατηγορία των τεστ αντιστροφής (reversion tests). Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Όταν μία μεταλλαξιγόνο ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό θα προκαλέσει αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τις καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί η συγκεκριμένη ουσία.

Υπάρχουν διάφορα στελέχη *S. typhimurium*, καθένα από τα οποία είναι ευαίσθητο στην πρόκληση μεταλλάξεων από διαφορετικές κατηγορίες χημικών ουσιών. Στη συγκεκριμένα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102 το οποίο είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστιδίνης που υπάρχει σε αυτό το στέλεχος είναι η *hisG428*, η οποία είναι μία μετάλλαξη λήξης (TAA) και μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (μεταπτώσεις ή μεταστροφές). Η



μετάλλαξη *hisG428* βρίσκεται στο πλασμίδιο pAQ1 που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 με σκοπό να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις ανάστροφων μεταλλάξεων. Επίσης το πλασμίδιο pAQ1 προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Το στέλεχος TA102, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη *S. typhimurium*, φέρει χαρακτηριστικά που το καθιστούν πιο ευαίσθητο στη δράση χημικών μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης, περιέχει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις μέσω ενίσχυσης του επιδιορθωτικού μηχανισμού βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway). Το πλασμίδιο αυτό προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευσή του.

Για να θεωρηθεί μια χημική ένωση ότι είναι μεταλλαξιγόνος σύμφωνα με το τεστ του Ames θα πρέπει να πληρούνται δύο βασικά κριτήρια:

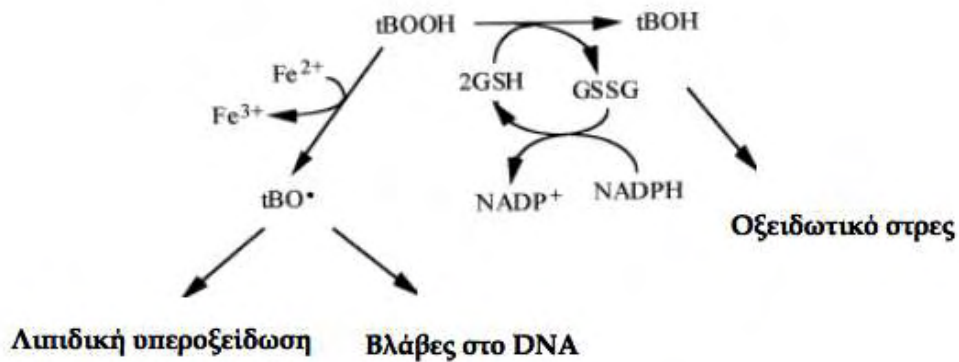
- 1) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να είναι τουλάχιστον διπλάσιος σε κάποια από τις συγκεντρώσεις της, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μάρτυρες (δηλαδή αυτές στις οποίες προστίθενται μόνο βακτήρια).
- 2) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης.

Επίσης, το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Για το σκοπό αυτό, σε κάποιες καλλιέργειες προστίθεται μία μεταλλαξιγόνος ουσία ενώ σε άλλες καλλιέργειες προστίθεται η μεταλλαξιγόνος ουσία μαζί με την πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο ουσία. Μείωση του αριθμού των επαναμεταλλαγμάτων στις

δεύτερες καλλιέργειες σε σύγκριση με τις πρώτες είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης της ουσίας.

### 3.5.2 Μηχανισμός δράσης του μεταλλαξιγόνου παράγοντα *t-BOOH*

Ο οξειδωτικός παράγοντας *tert*-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (*t-BOOH*) είναι ένα οργανικό υδροπεροξειδίο. Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών στα κύτταρα (Alia, Ramos, Mateos, Bravo, & Goya, 2005; Sies & Summer, 1975). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του *t-BOOH* που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Έχει παρατηρηθεί ότι ο οξειδωτικός παράγοντας *t-BOOH* οξειδώνει την GSH, μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Lima, Fernandes-Ferreira, & Pereira-Wilson, 2006; Martin et al., 2001; Sies & Summer, 1975). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα τα  $Fe^{2+}$  οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών *tBO•* (Hix, Kadiiska, Mason, & Augusto, 2000; Martin et al., 2001). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες *tBO•* (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του *t-BOOH* με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξειδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Latour, Demoulin, & Buc-Calderon, 1995; Martin et al., 2001).



**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του *t-BOOH*

### 3.5.3 Υλικά και μεθοδολογία

#### Διάλυμα VBSalt

dH <sub>2</sub> O (ml)	MgSO <sub>4</sub> (gr)	Κιτρικό οξύ (gr)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (gr)	Sodium ammonium phosphate (gr)
100	1	10	50	17,5

#### Διάλυμα γλυκόζης 10%

dH <sub>2</sub> O (ml)	Γλυκόζη (gr)
200	20

#### Διάλυμα Glucose minimal agar

dH <sub>2</sub> O (ml)	Agar (gr)	VB salt διάλυμα (ml)	Διάλυμα γλυκόζης 10% (ml)
186	3	4	10

#### Διάλυμα top agar

dH <sub>2</sub> O (ml)	Agar (gr)	Χλωριούχο νάτριο (gr)	Διάλυμα ιστιδίνης 0.5mM (ml)
40	0.24	0.24	4

#### Διάλυμα ιστιδίνης 0.5mM

dH <sub>2</sub> O (ml)	Ιστιδίνη (mg)
100	9,6

#### Θρεπτικό υλικό (Nutrient broth)

dH <sub>2</sub> O (ml)	Nutrient broth (gr)
300	2,4

- Εναιωρήσαμε τα βακτήρια της *Salmonella* σε Nutrient broth (1 δισκίο σε 100ml) και επώασαμε overnight στους 37°C. Την επόμενη μέρα φωτομετρήσαμε στα 600 nm μέχρι η απορρόφηση να γίνει 1-2. Το εναιώρημα διαχωρίστηκε σε κλάσματα (frozen stock cultures) τα οποία περιέχουν 0,5ml γλυκερόλης και 0,5ml καλλιέργειας. Τα κλάσματα αυτά τα φυλάξαμε στους -80°C για μελλοντική χρήση.
- Προσθέσαμε τα στελέχη της *Salmonella* από τα frozen stock cultures στο θρεπτικό υλικό. Σε θρεπτικό υλικό όγκου 30ml προσθέσαμε 700μl καλλιέργειας. Αφήσαμε την καλλιέργεια στους 37°C. Στη συνέχεια φωτομετρήσαμε στα 540nm μέχρι οπτική απορρόφηση να γίνει 0.1-0.2 ( $1-2 \times 10^9$  CFU/ml).
- Τα μίγματα προετοιμάστηκαν σε σωλήνες falcon. Ο αριθμός των σωλήνων ήταν ίσος με τον αριθμό των καλλιεργειών και διατηρούνταν στους 43°-48°C σε υδατόλουτρο. Για κάθε κατάσταση είχαμε 3 επαναλήψεις. Σε κάθε σωλήνα προσθέσαμε top agar, καφέ, t-BOOH, dH<sub>2</sub>O και βακτηριακή καλλιέργεια σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Top Agar	Καφές	t-BOOH	dH <sub>2</sub> O	Overnight Culture
<b>Control</b>	2ml	-	-	100μl	100μl
<b>Μόνο t-BOOH</b>	2ml	-	50μl	50μl	100μl
<b>C 1</b>	2ml	50μl	50μl	-	100μl
<b>C 2</b>	2ml	50μl	50μl	-	100μl
<b>C 3</b>	2ml	50μl	50μl	-	100μl
<b>C 4</b>	2ml	50μl	50μl	-	100μl
<b>C 5</b>	2ml	50μl	50μl	-	100μl
<b>Μόνο Καφές 1</b>	2ml	50μl	-	50μl	100μl
<b>Μόνο Καφές 2</b>	2ml	50μl	-	50μl	100μl

- Ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας t-BOOH ήταν αραιωμένος κατά 1/500 το οποίο αντιστοιχεί σε 20,64 mmol σε κάθε τρυβλίο.
- Ο καφές υπήρχε σε πέντε διαδοχικές συγκεντρώσεις: 20 μg/τρυβλίο, 50 μg/τρυβλίο, 100 μg/τρυβλίο, 200 μg/τρυβλίο, 300 μg/τρυβλίο.

- Μετά από ελαφριά ανάδευση το περιεχόμενο των σωλήνων επιστρώθηκε στα τρυβλία με το GM agar (25ml). Τα τρυβλία περιστράφηκαν ώστε το top agar να απλωθεί σε όλη την επιφάνεια.
- Αφού το top agar έπηξε (2-3 λεπτά) τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στους 37°C για 48 ώρες.
- Μετά την επώαση έγινε η καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε κάθε τρυβλίο.
- Τέλος, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση των τρυβλίων για τον έλεγχο πιθανής κυτταροτοξικής επίδρασης των εκχυλισμάτων.

#### 3.5.4 Τεστ Ames με μεταβολική ενεργοποίηση

Όλες οι ξενοβιοτικές ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό υφίστανται μεταβολισμό. Ο κύριος μεταβολισμός συμβαίνει στο ήπαρ από τα ένζυμα μεταβολισμού φάσης I και φάσης II. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών μπορεί να οδηγήσει είτε σε παραγωγή αδρανών προϊόντων που αποβάλλονται εύκολα από τον οργανισμό (απενεργοποίηση), είτε σε πολύ δραστικές ουσίες (ενεργοποίηση) οι οποίες πιθανόν να εμφανίζουν και τοξικότητα.

Τα βακτήρια δε διαθέτουν τέτοια ένζυμα καταβολισμού όπως τα θηλαστικά. Για αυτό το λόγο, εκτός των βασικών πειραμάτων Ames πραγματοποιήθηκαν και επιπλέον πειράματα με τη χρήση του μίγματος S9. Πρόκειται για το υπερκείμενο τμήμα που παραλαμβάνεται από τη φυγοκέντρηση ήπατος αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν επαγωγείς του κυτοχρώματος P450. Το μίγμα αυτό περιέχει τόσο το κυτοσόλιο όσο και τα μικροσωμάτια των ηπατικών κυττάρων. Τα μικροσώματα του S9 περιέχουν το κυτόχρωμα P450 (μεταβολισμός φάσης I) καθώς και άλλα ένζυμα. Το κυτοσολικό τμήμα του μίγματος περιλαμβάνει μεγάλη ποσότητα μεταφορασών (μεταβολισμός φάσης II) (Paolini, Sapigni, Hrelia, Grilli, & Cantelli-Forti, 1988). Έτσι, καταφέραμε να προσομοιάσουμε τις συνθήκες μεταβολισμού του καφέ μετά από κατανάλωση από τον άνθρωπο για να εντοπίσουμε πιθανή ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των βιοδραστικών συστατικών.

Το μίγμα περιέχει επίσης και τους απαραίτητους συμπράγοντες για τη λειτουργία των ενζύμων:

- KCl, 256 mM
- MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 6mM
- 6-φωσφορική-γλυκόζη, 4mM
- NADPH, 3mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 77mM

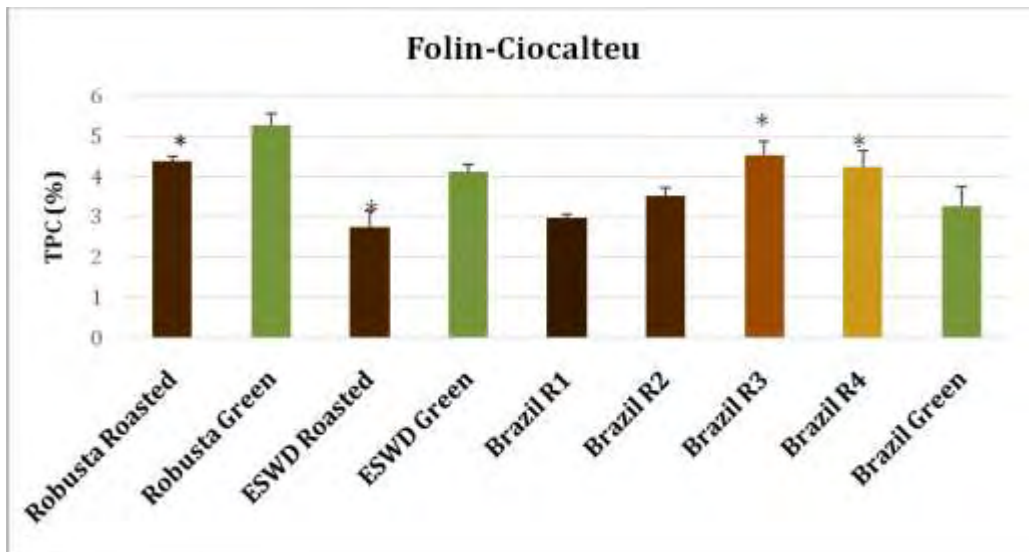
Τα μίγματα προετοιμάστηκαν σε σωλήνες falcon σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

	Top Agar	Καφές	t-BOOH	dH <sub>2</sub> O	Μίγμα S9	Overnight Culture
<b>Control</b>	2ml	-	-	100μl	500μl	100μl
<b>Μόνο t-BOOH</b>	2ml	-	50μl	50μl	500μl	100μl
<b>C1</b>	2ml	50μl	50μl	-	500μl	100μl
<b>C 2</b>	2ml	50μl	50μl	-	500μl	100μl
<b>C 3</b>	2ml	50μl	50μl	-	500μl	100μl
<b>C 4</b>	2ml	50μl	50μl	-	500μl	100μl
<b>C 5</b>	2ml	50μl	50μl	-	500μl	100μl
<b>Μόνο Καφές 1</b>	2ml	50μl	-	50μl	500μl	100μl
<b>Μόνο Καφές 2</b>	2ml	50μl	-	50μl	500μl	100μl

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Ποσοτικοποίηση TPC των εκχυλισμάτων καφέ με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (σε ποσοστό %) φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 1:** Εκατοστιαία ποσοστά TPC των εκχυλισμάτων καφέ. \* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το πράσινο εκχύλισμα.

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε mg/g σκόνης καφέ φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

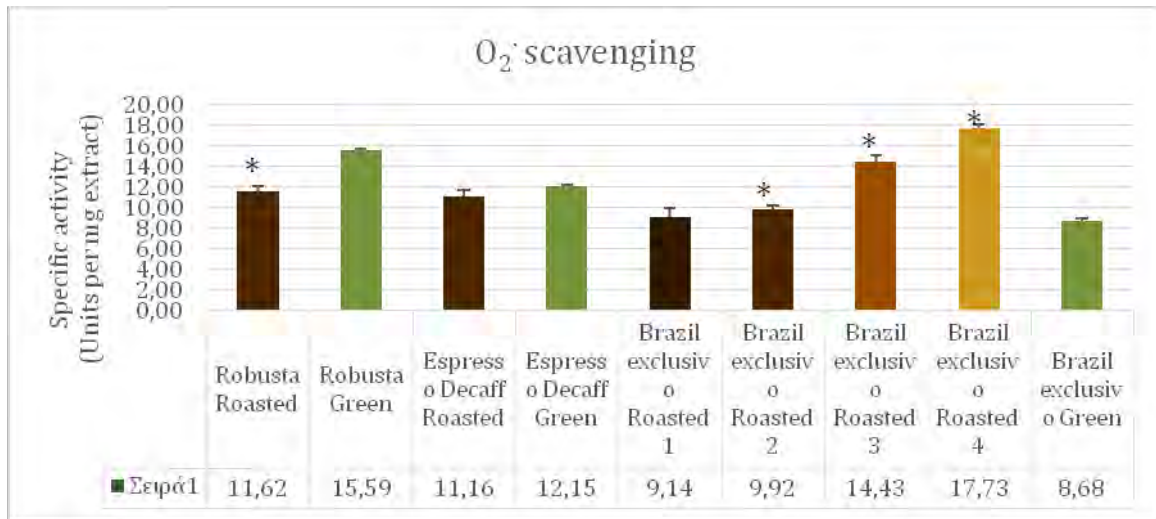
**Πίνακας 3:** TPC (mg/g σκόνης καφέ) των εκχυλισμάτων καφέ

Καφές	TPC (mg/g extract)
Robusta Roasted	43,99 ± 0,16
Robusta Green	52,71 ± 0,32
ESWD Roasted	27,42 ± 0,40
ESWD Green	41,40 ± 0,15
Brazil R1	29,61 ± 0,12
Brazil R2	35,26 ± 0,24
Brazil R3	45,28 ± 0,35
Brazil R4	42,55 ± 0,42
Brazil Green	32,58 ± 0,51

Παρατηρήθηκε πτώση του πολυφαινολικού περιεχομένου λόγω του καβουρδίσματος τόσο στον Robusta και στον Ντεκαφεϊνέ. Στον Brazil χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα καβουρδισμένα δείγματα και πάλι παρατηρήθηκε πτώση με το καβούρδισμα αν και στον συγκεκριμένο καφέ το άψητο δείγμα είχε χαμηλότερα επίπεδα TPC σε σχέση με τα λιγότερο καβουρδισμένα.

#### 4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα σουπεροξειδίου O<sub>2</sub><sup>-</sup>

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



**Διάγραμμα 2:** Ικανότητα αναστολής ριζών σουπεροξειδίου. \* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το πράσινο εκχύλισμα.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα φαίνεται η ειδική ενεργότητα (specific activity) του κάθε εκχυλίσματος. Αυτή η μονάδα έχει προκύψει έπειτα από τον υπολογισμό της τιμής IC50 (δηλαδή της ποσότητας πολυφαινολών του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% των μορίων σουπεροξειδίου) και θεωρείται ένα Unit. Δεδομένου ότι σε κάθε mg σκόνης καφέ υπάρχει συγκεκριμένη ποσότητα πολυφαινολών (υπολογισμένη με βάση τη μέθοδο Folin-Ciocalteu) μπορεί με μία απλή διαίρεση (ποσότητα των πολυφαινολών εκχυλίσματος που απαιτούνται για να φτάσουμε σε IC50/ ποσότητα των πολυφαινολών που περιέχονται σε 1 mg σκόνης



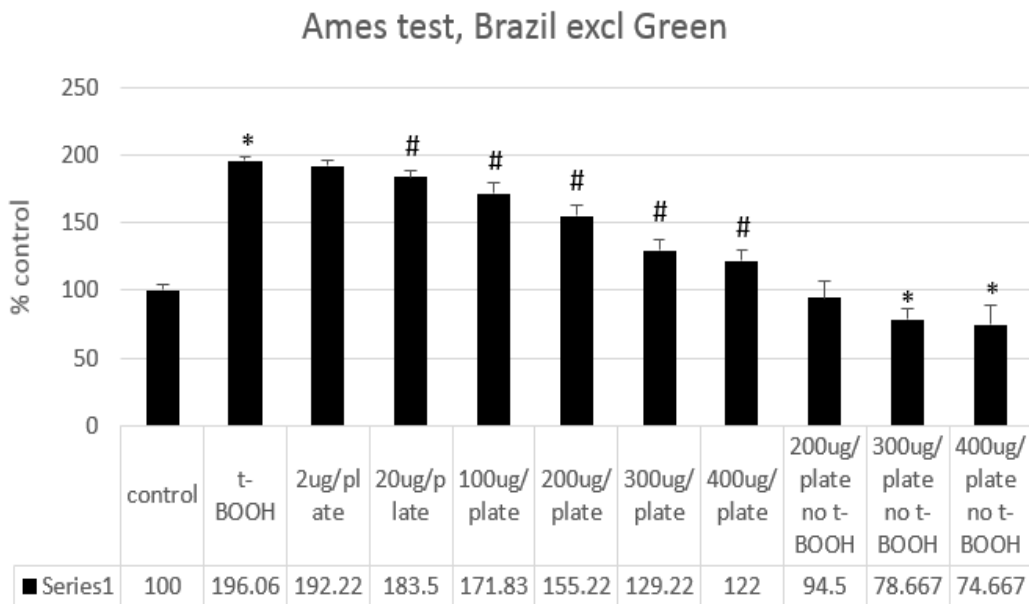
καφέ) να υπολογιστεί η ποσότητα Units ανά mg σκόνης καφέ. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η τιμή, δηλαδή όσο πιο πολλά Units περιέχονται σε ένα mg, τόσο δραστικότερο θα είναι το εκχύλισμα, αφού θα απαιτείται μικρότερη ποσότητα καφέ για τη εξουδετέρωση του 50% των μορίων σουπεροξειδίου.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική πτώση της ικανότητας εξουδετέρωσης ρίζας σουπεροξειδίου λόγω καβουρδίσματος στον Robusta. Στον Ντεκαφεϊνέ δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή. Τέλος, στον Brazil παρατηρείται σημαντική αύξηση στο λιγότερο καβουρδισμένο δείγμα (Roasted 4) η οποία όμως μειώνεται αναλογικά με το καβούρδισμα και φτάνει στα ίδια επίπεδα με τον πράσινο καφέ.

### 4.3 Τεστ του Ames

Τα αποτελέσματα καταμέτρησης αποικιών παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό παρατηρούμενων αποικιών των control τρυβλίων. Εκτός των control απεικονίζονται κατά σειρά τα τρυβλία που περιέχουν μόνο τον οξειδωτικό παράγοντα (*t*-BOOH), αυτά που περιέχουν τις διάφορες συγκεντρώσεις καφέ σε συνδυασμό με το *t*-BOOH και τέλος τα τρυβλία που περιέχουν μόνο καφέ. Αξίζει να σημειωθεί πως σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξική επίδραση των εκχυλισμάτων έπειτα από μικροσκοπική εξέταση των τρυβλίων.

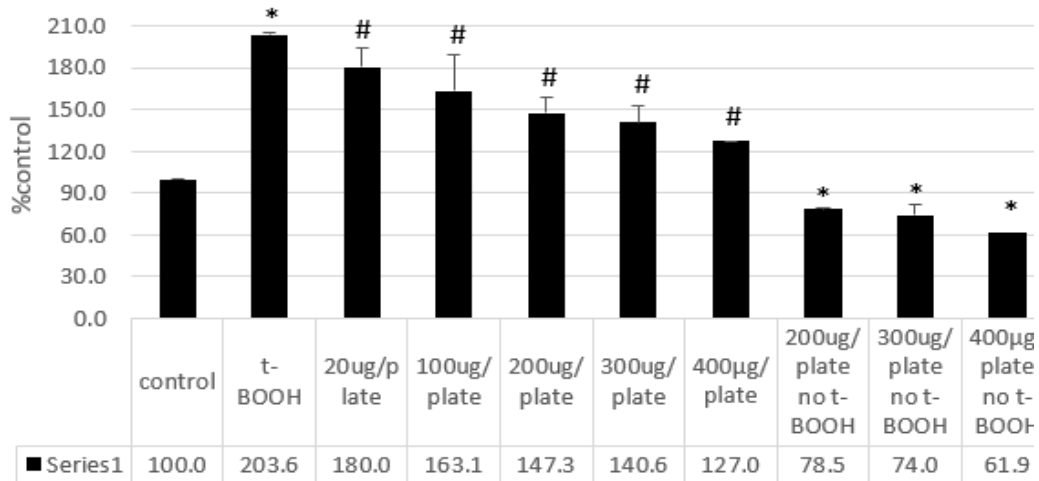
### 4.3.1 Τεστ Ames χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση



**Διάγραμμα 3:** Τεστ Ames για Brazil Green. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

Με βάση τα αποτελέσματα ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH από τη συγκέντρωση των 20μg/plate και πάνω. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις.

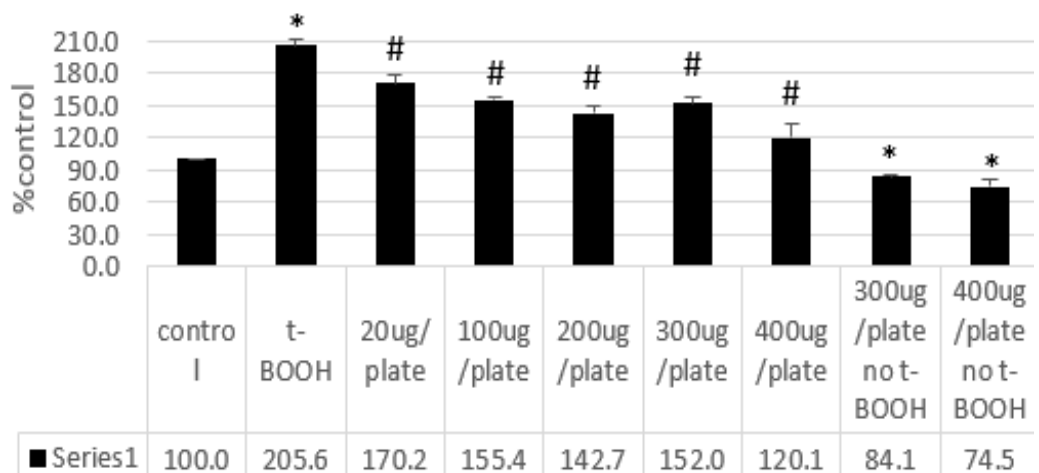
### Ames test, Brazil excl R1



**Διάγραμμα 4:** Τεστ Ames γιαBrazil Roasted 1. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

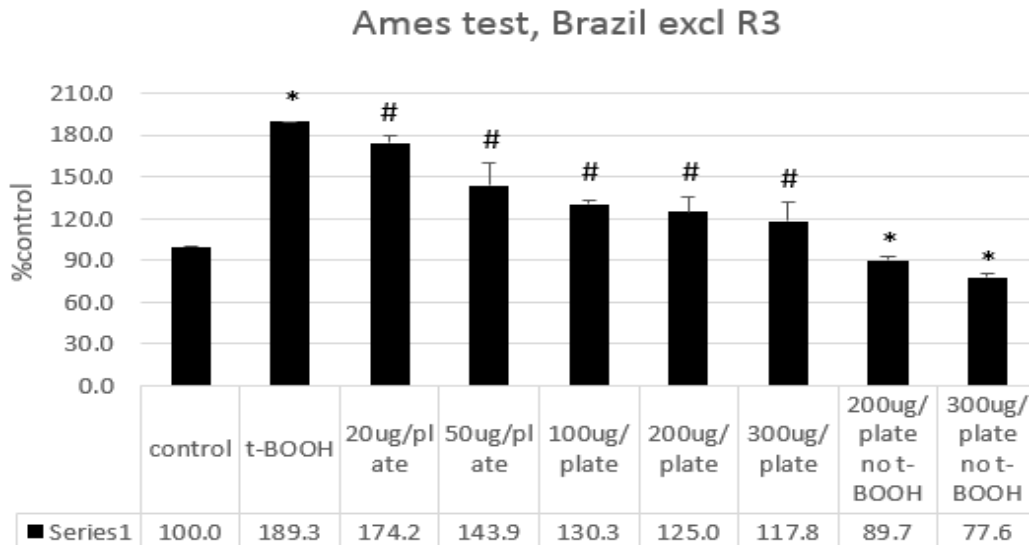
Επομένως, ο οξειδωτικός παράγοντας αύξησε στο διπλάσιο σχεδόν τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH. Όταν στις καλλιέργειες εφαρμόστηκε καφές απουσία οξειδωτικού παράγοντα οι παρατηρούμενες αποικίες μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το control.

### Ames test, Brazil excl R2



**Διάγραμμα 5:** Τεστ Ames γιαBrazil Roasted 2. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

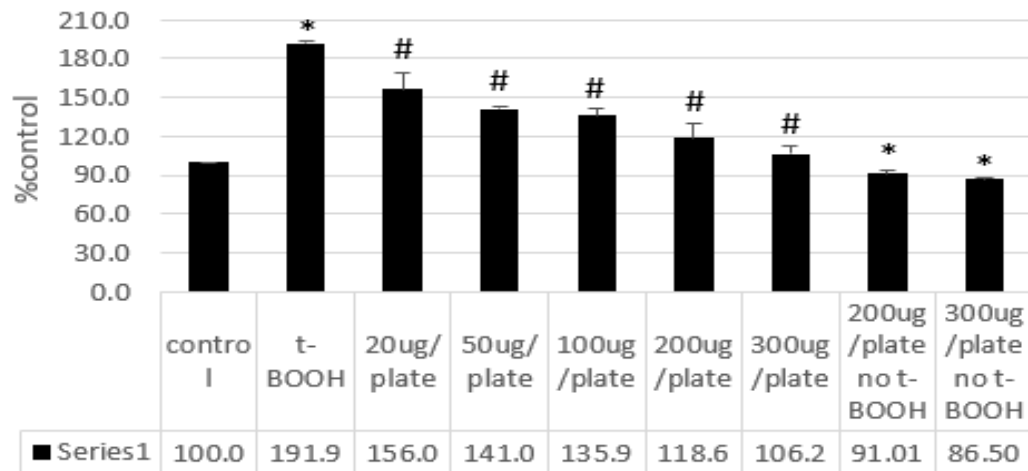
Σε αυτή την περίπτωση και πάλι ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) και ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το *t*-BOOH. Στα τρυβλία με καφέ απουσία του οξειδωτικού παράγοντα οι παρατηρούμενες αποικίες μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το control.



**Διάγραμμα 6:** Τεστ Ames για Brazil Roasted 3. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το *t*-BOOH.

Ο *t*-BOOH διπλασίασε στατιστικώς σημαντικά τις αποικίες ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το *t*-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.

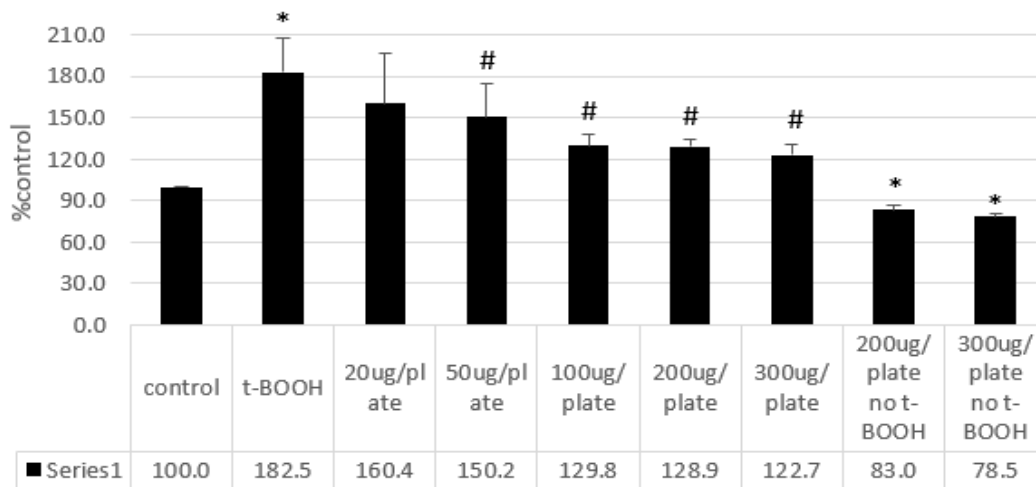
### Ames test, Brazil excl R4



**Διάγραμμα 7:** Τεστ Ames για Brazil Roasted 4. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

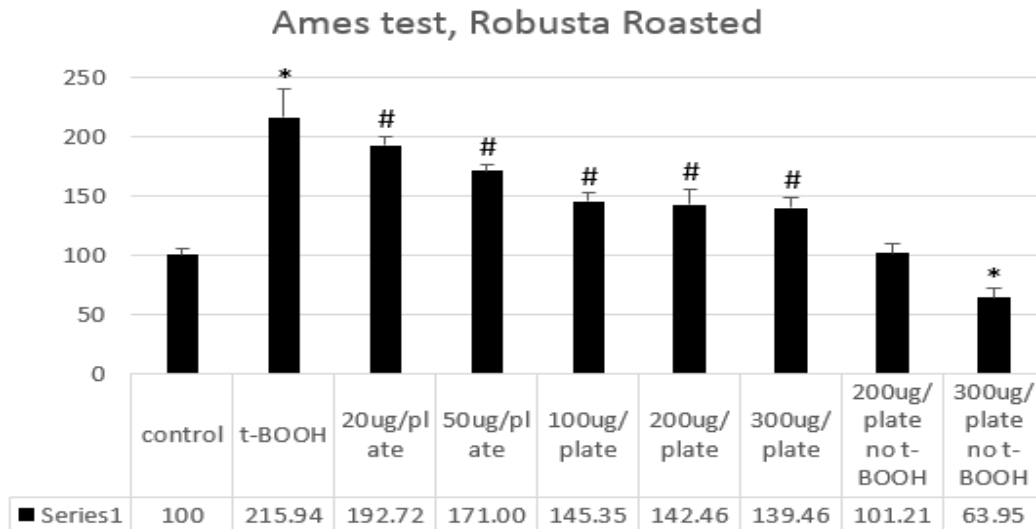
Στα τρυβλία που εφαρμόστηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας οι παρατηρούμενες αποικίες αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά σχεδόν στο διπλάσιο σε σχέση με το control. Στη συνέχεια ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.

### Ames test, Robusta Green



**Διάγραμμα 8:** Τεστ Ames για Robusta Green. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

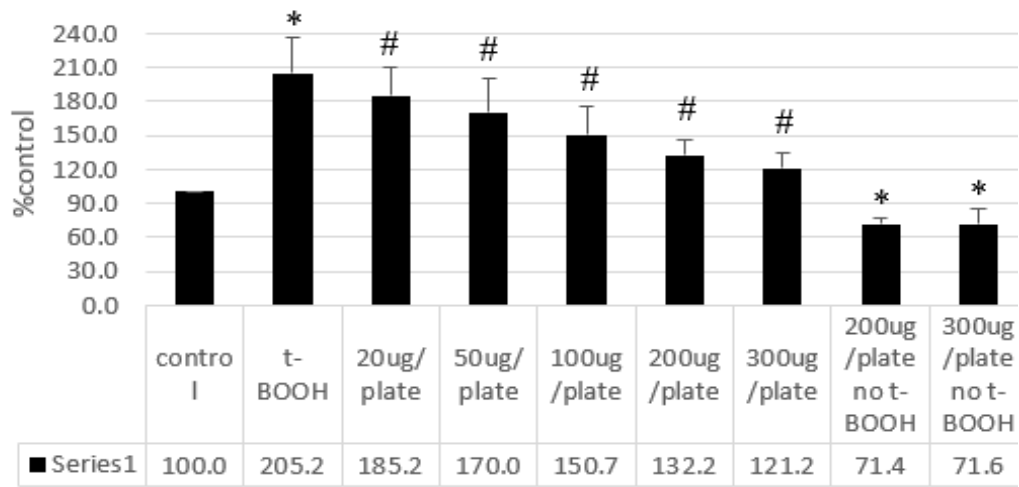
Ο t-BOOH σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH από τη συγκέντρωση των 50μg/plate και πάνω. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.



Διάγραμμα 9: Τεστ Ames για Robusta Roasted. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

Στα τρυβλία με οξειδωτικό παράγοντα μόνο, οι παρατηρούμενες αποικίες σχεδόν διπλασιάστηκαν σε σχέση με το control (στατιστικώς σημαντικά). Στα τρυβλία μόνο με καφέ οι παρατηρούμενες αποικίες μειώθηκαν σε σχέση με το t-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του.

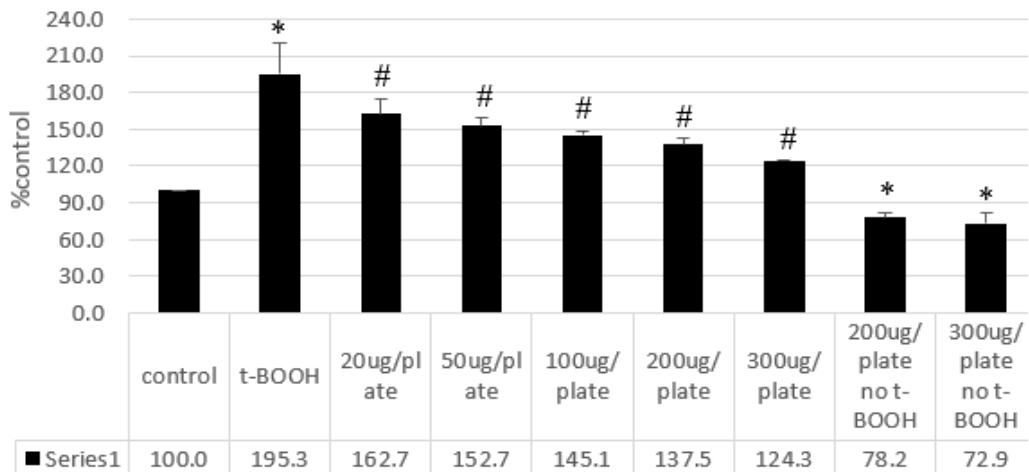
### Ames test, ESWD Green



**Διάγραμμα 10:** Τεστ Ames για Ντεκαφεΐνέ Green. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

Με βάση τα αποτελέσματα ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH. Ο καφές απουσία t-BOOH μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.

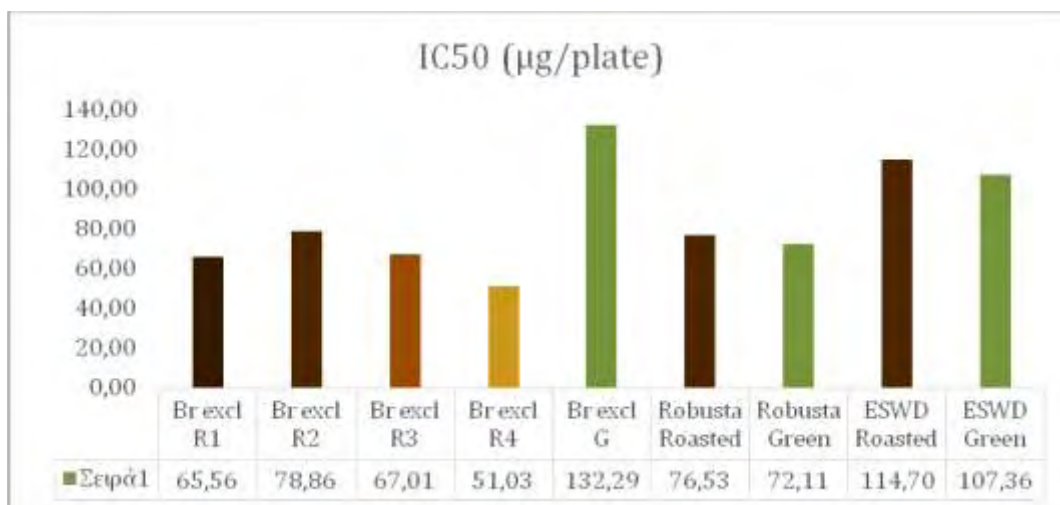
### Ames test, ESWD Roasted



**Διάγραμμα 11:** Τεστ Ames για Ντεκαφεΐνέ Roasted. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

Με βάση τα αποτελέσματα ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το *t*-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.

Από τα παραπάνω διαγράμματα προέκυψαν καμπύλες αναστολής μεταλλαξιγένεσης από τον καφέ από τις οποίες προέκυψαν τιμές IC50 (σε µg καφέ/plate) για κάθε εκχύλισμα ξεχωριστά. Το σύνολο των τιμών φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:

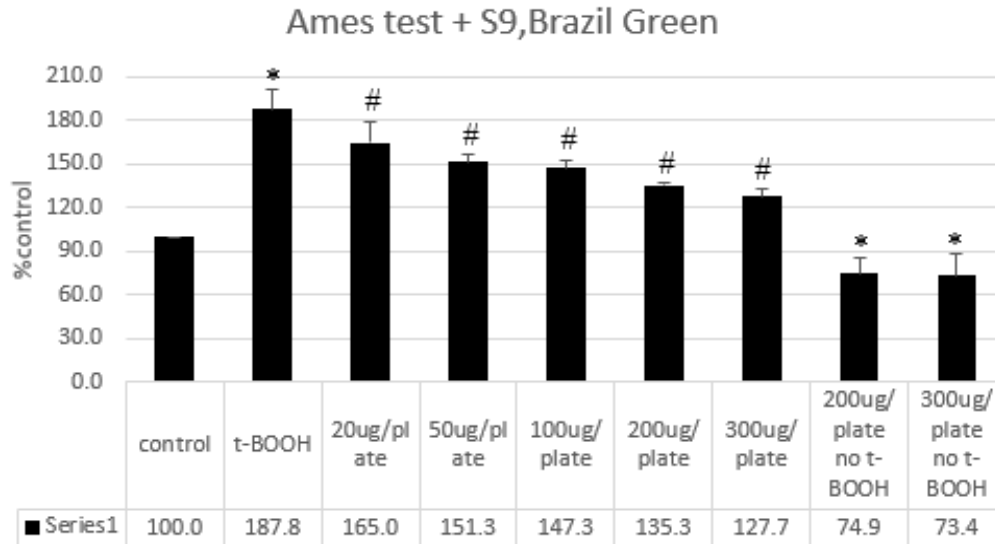


**Διάγραμμα 12:** Τιμές IC50 για το τεστ Ames

Όπως φαίνεται, το καβούρδισμα προκάλεσε αύξηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης στον Brazil ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε Robusta και Ντεκαφεϊνέ.

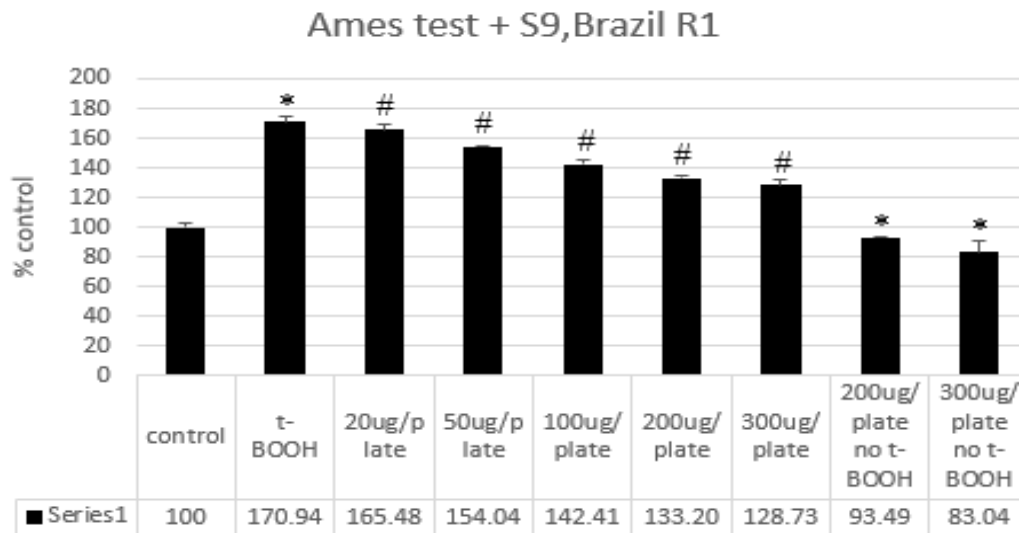


#### 4.3.2 Τεστ Ames με μεταβολική ενεργοποίηση



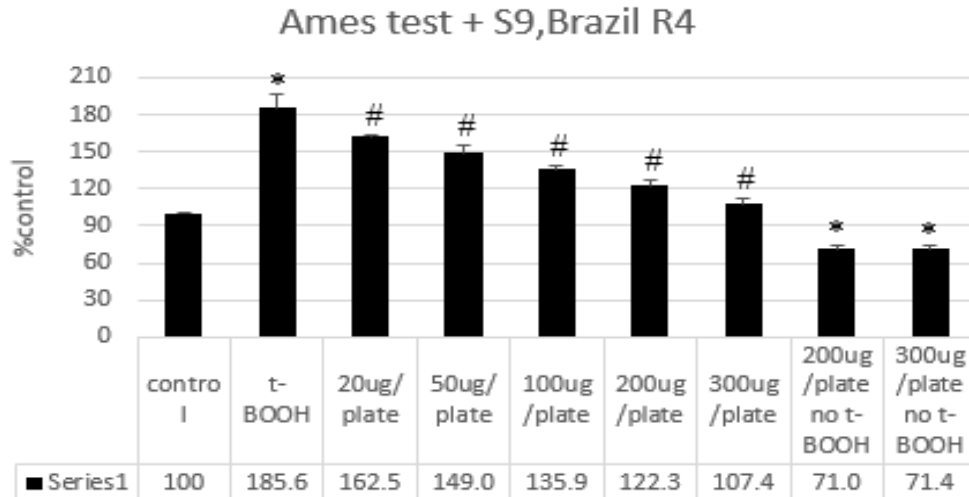
**Διάγραμμα 12:** Τεστ Ames με S9 για Brazil Green. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ στη συνέχεια ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το t-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.



**Διάγραμμα 13:** Τεστ Ames με S9 για Brazil Roasted 1. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το t-BOOH.

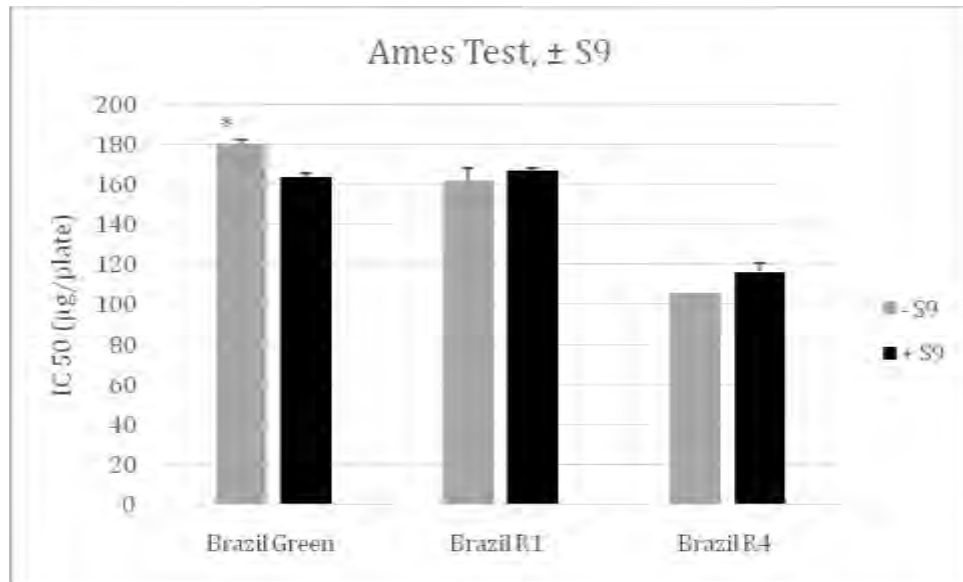
Με βάση τα αποτελέσματα ο οξειδωτικός παράγοντας σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το *t*-BOOH. Ακόμα, ο καφές απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.



**Διάγραμμα 14:** Τεστ Ames με S9 για Brazil Roasted 4. \* Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το control. # Στατιστικώς σημαντικό σε σύγκριση με το *t*-BOOH.

Με βάση το διάγραμμα 14, ο παράγοντας *t*-BOOH σχεδόν διπλασίασε τις αποικίες (στατιστικώς σημαντικά) ενώ εν συνεχεία ο καφές μείωσε τις αποικίες σε σχέση με το *t*-BOOH. Στα τρυβλία που υπήρχε απουσία του οξειδωτικού παράγοντα ο καφές μείωσε στατιστικώς σημαντικά τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με το control.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 16, η παρουσία των μεταβολικών ενζύμων οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο στο δείγμα πράσινου καφέ, όπου και αύξησε την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του καφέ. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην δραστικότητα των δύο καβουρδισμένων δειγμάτων που μελετήθηκαν.



**Διάγραμμα 16:** Σύγκριση αποτελεσμάτων τεστ Ames απουσία και παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης

## 5. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δραστικότητα του καφέ. Ο καφές είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του. Ως φυτικά προϊόντα, οι κόκκοι καφέ είναι πλούσιοι σε βιοδραστικά συστατικά, μεταξύ των οποίων η καφεΐνη, κάποια διτερπένια και πολυφαινολικά μόρια με κυριότερα τα χλωρογενικά οξέα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του καφέ είναι η επεξεργασία που υφίστανται οι κόκκοι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του ροφήματος. Αναλυτικότερα, οι κόκκοι καβουρδίζονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πολλές φορές υπερβαίνουν τους 200°C) και για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα αναλόγως του επιθυμητού τύπου ροφήματος. Με την ανάπτυξη τόσο υψηλών θερμοκρασιών πραγματοποιούνται διεργασίες εντός του κόκκου που αλλάζουν τη φυσικοχημική του σύσταση, με σημαντικότερες τις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης τύπου Maillard. Αυτές οι αντιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται μελανοΐδινες. Τα μόρια αυτά πιθανώς εμφανίζουν βιοδραστικότητα, προσδίδοντας στον καβουρδισμένο κόκκο διαφορετικές ιδιότητες από τον πράσινο. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για το ρόφημα του καφέ κι ενώ κάποιες έδειξαν ευεργετικά για την υγεία αποτελέσματα, σε άλλες αυτά δεν ήταν εμφανή (You et al., 2011). Οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν είτε απευθείας χορήγηση του ροφήματος σε ανθρώπους είτε *in vitro* πειράματα που μελετούσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα για το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τόσο καβουρδισμένοι όσο και πράσινοι κόκκοι ως προς την επίδραση στην μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH, με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του καφέ. Αρχικά, παρήχθησαν τα εκχυλίσματα καφέ. Συνολικά εξετάστηκαν εννέα δείγματα καφέ που προέρχονται από τα είδη Arabica και Robusta. Από αυτά τα δείγματα, τρία προέρχονταν από πράσινους κόκκους και τα υπόλοιπα έξι

από τους αντίστοιχους καβουρδισμένους καθώς σε μια ποικιλία εξετάστηκαν τέσσερα διαφορετικά καβουρδίσματα.

Το επόμενο βήμα ήταν ο υπολογισμός του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων, καθώς οι πολυφαινόλες είναι από τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν τα φυτικά προϊόντα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το TPC μειώθηκε σημαντικά στους καβουρδισμένους κόκκους τόσο στην ποικιλία Robusta όσο και στον Ντεκαφεϊνέ. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε και στον Brazil, ωστόσο σε αυτή την περίπτωση το πράσινο δείγμα είχε χαμηλότερο ποσοστό πολυφαινολών σε σχέση με το ελαφρύτερα καβουρδισμένο δείγμα (Brazil Roasted 4). Η παρατηρούμενη μείωση του TPC ήταν αναμενόμενη με βάση τη βιβλιογραφία καθώς μόρια όπως τα χλωρογενικά οξέα είναι ευαίσθητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας όπως η μεγάλη αύξηση κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος (Perrone, Donangelo, Donangelo, & Farah, 2010). Το χαμηλότερο TPC στους πράσινους κόκκους του Brazil πιθανότατα οφείλεται σε ατελή εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών τους λόγω δυσκολίας στην κονιορτοποίηση των πράσινων κόκκων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου εξουδετέρωσης ριζών σουπεροξειδίου. Με βάση τα αποτελέσματα στον Brazil παρατηρήθηκε διπλασιασμός της δραστηρότητας στο δείγμα Roasted 4 συγκριτικά με τον Brazil Green. Ωστόσο, στα επόμενα χρονικά καβουρδίσματα η δραστηρότητα μειώθηκε φτάνοντας στον Roasted 1 όπου ήταν ίδια με τον πράσινο. Όσον αφορά τα δύο άλλα δείγματα, στο Robusta το καβουρδισμένο εκχύλισμα είχε μικρότερη δραστηρότητα σε σχέση με το αντίστοιχο πράσινο ενώ στον Ντεκαφεϊνέ δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων. Το μοτίβο αυτό που παρατηρήθηκε πιθανώς να οφείλεται στη συγκέντρωση πολυφαινολών στο κάθε εκχύλισμα αφού, τα πιο δραστικά εκχύλισμα είχαν και μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών ενώ τα λιγότερο δραστικά βρέθηκε να έχουν λιγότερες πολυφαινόλες. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα *in vitro* πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά τον Brazil. Αντίθετα,

παρατηρήθηκε διαφορά στα άλλα δύο δείγματα καθώς στις μεθόδους DPPH και ABTS και τα δύο εκχυλίσματα του Robusta είχαν παρόμοια δράση ενώ στον Ντεκαφεϊνέ το πράσινο εκχύλισμα εμφάνιζε ισχυρότερη δραστηριότητα (Priftis et al., 2015). Τα δείγματα καφέ που εξετάστηκαν φάνηκε να έχουν ισχυρή δράση για την εξουδετέρωση ριζών σουπεροξειδίου οι οποίες είναι από τα σημαντικότερα είδη ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται φυσιολογικά εντός του οργανισμού.

Επόμενο βήμα ήταν η πραγματοποίηση του τεστ του Ames για τον έλεγχο της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας *t*-BOOH και η βακτηριακή σειρά TA102 η οποία είναι ευαίσθητη σε οξειδωτικές βλάβες. Βάσει των αποτελεσμάτων όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στο εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις ο οξειδωτικός παράγοντας οδήγησε σε διπλασιασμό των παρατηρούμενων επαναμεταλλάξεων ενώ τα εκχυλίσματα οδήγησαν σε μείωση του αριθμού αποικιών με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, και πάλι παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων. Αναλυτικότερα, για τον Brazil Green το IC50 ήταν στα 132μg/plate ενώ στον Roasted 4 έπεσε στα 51μg/plate. Εν συνεχεία στον Roasted 3 ανέβηκε στα 67μg/plate, στον Roasted 2 στα 79μg/plate ενώ ο Roasted 1 είχε IC50 στα 66μg/plate. Άρα, η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα αυτού του είδους καφέ φαίνεται να αυξάνεται στα ψημένα εκχυλίσματα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στις αντιδράσεις Maillard που οδηγούν στο σχηματισμό μελανοϊδινών στις οποίες συχνά ενσωματώνονται και μόρια χλωρογενικού οξέος. Αυτά τα παραγόμενα πολυμερή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, θεωρούνται βιοδραστικά μόρια (Daglia et al., 2000) και ίσως να είναι υπεύθυνα για την παρεμπόδιση των επαναμεταλλάξεων από τον *t*-BOOH. Στον Robusta το πράσινο εκχύλισμα είχε IC50 στα 72μg/plate ενώ το καβουρδισμένο στα 76μg/plate. Όπως και στο σουπεροξειδίο το ελαφρύ καβούρδισμα (Roasted 4) οδήγησε σε κατακόρυφη αύξηση της δραστηριότητας του καφέ ενώ όσο αυξάνεται ο χρόνος καβουρδίσματος τόσο αυτή μειώνεται. Μολαταύτα, στο δείγμα Roasted 1 παρατηρήθηκε μία διαφοροποίηση με άλλα *in vitro* πειράματα καθώς η δραστηριότητα αυξήθηκε σε σχέση με το δείγμα Roasted 2. Αυτή η διαφοροποίηση

παρατηρήθηκε και σε παράλληλο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε κυτταροκαλλιέργειες και αυτό πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων και το πως αυτά αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα σε σχέση με την απευθείας εξουδετέρωση ριζών *in vitro*. Στα άλλα δύο εκχυλίσματα που εξετάστηκαν δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των πράσινων και των αντίστοιχων καβουρδισμένων. Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση που παρατηρήθηκε πιθανώς οφείλεται σε μόρια που μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται εξαιτίας του *t*-BOOH όπως είναι διάφορες πολυφαινόλες και μελανοΐδίνες. Επίσης, τα διτερπένια καφεστόλη και καφεόλη που αναφέρθηκαν και στην εισαγωγή έχουν εμφανίσει αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες (K. J. Lee & Jeong, 2007).

Στο τελευταίο πειραματικό βήμα, πραγματοποιήθηκε τεστ του Ames με παράλληλη μεταβολική ενεργοποίηση. Αυτό έγινε με τη βοήθεια του μίγματος S9 που περιέχει πληθώρα μεταβολικών ενζύμων. Η διαφορά με το απλό τεστ του Ames ήταν η επώαση των εκχυλισμάτων με το μίγμα S9 προτού προστεθούν στο τρυβλίο. Κατά αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται μεταβολισμός των συστατικών του εκχυλίσματος αλλάζοντας πιθανώς τη δραστηριότητά τους. Στο συγκεκριμένο σκέλος του πειράματος εξετάστηκαν μόνο τα δείγματα Brazil Green, Roasted 1 και Roasted 4, για να μπορεί να φανεί η διαφορά μεταξύ πράσινου, ελαφρώς καβουρδισμένου και αρκετά καβουρδισμένου καφέ. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δεν έδειξαν μεγάλες διαφορές σε σχέση με το απλό τεστ Ames αφού τόσο ο Roasted 1 όσο και ο Roasted 4 εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα δραστηριότητας είτε υπέστησαν μεταβολική ενεργοποίηση είτε όχι. Μόνο στο πράσινο εκχύλισμα παρατηρήθηκε διαφορά καθώς το δείγμα που είχε υποστεί μεταβολική ενεργοποίηση εμφάνισε ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε σχέση με το δείγμα χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση αλλά και πάλι όχι σε μεγάλο βαθμό (9,28%).

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι ο καφές παρουσιάζει ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση εφόσον μπορεί να αναστείλει κατά το ήμισυ τις αποικίες που αναπτύσσονται λόγω δράσης του *t*-BOOH σε συγκεντρώσεις από 51-132μg/plate. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία

καθώς σε τρεις μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν με χρήση των στελεχών TA98, TA100 και TA102 του *S. typhimurium* ο καφές εμφάνισε μεταλλαξιγόνο δράση (Aeschbacher, Chappuis, & Würzner, 1980; Blair & Shibamoto, 1984; Friederich, Hann, Albertini, Schlatter, & Wurgler, 1985). Μια σημαντική όμως διαφορά της παρούσης μελέτης με τις εργασίες που αναφέρθηκαν είναι η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου καφέ καθώς στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν μέχρι και 300μg/plate ενώ στα άλλα πειράματα έγινε χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων έως και 50mg/plate. Η μεταλλαξιγόνος επίδραση του καφέ σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις πιθανώς να οφείλεται σε μόρια όπως η μεθυλγλυοξάλη η οποία δεν εκδηλώνει δράση στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.

Εν κατακλείδι, τα εκχυλίσματα καφέ που εξετάστηκαν εμφάνισαν τόσο αντιοξειδωτική όσο και αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Τα αποτελέσματα αυτά προσδίδουν νέες, ενδιαφέρουσες και ευεργετικές για τον οργανισμό ιδιότητες σε αυτό το τόσο δημοφιλές ρόφημα. Βέβαια, είναι απαραίτητο να λάβουν χώρα περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα και να καθοριστούν οι καλύτερες ποικιλίες και οι βέλτιστες δόσεις που θα πρέπει να καταναλώνονται για να εκδηλώνονται τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς και να ξεκαθαριστεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης.



## 6. Βιβλιογραφία

- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483–525. <http://doi.org/10.1080/10408360701612942>
- Aeschbacher, H. U., Chappuis, C., & Würzner, H. P. (1980). Mutagenicity testing of coffee: A study of problems encountered with the Ames Salmonella test system. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(6), 605–613. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0015-6264\(80\)80008-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0015-6264(80)80008-3)
- Agardh, E. E., Carlsson, S., Ahlbom, A., Efendic, S., Grill, V., Hammar, N., ... Ostenson, C.-G. (2004). Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *Journal of Internal Medicine*, 255(6), 645–652. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01331.x>
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., & Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(2), 119–128. <http://doi.org/10.1002/jbt.20061>
- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- 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), 1–23. <http://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>
- Blair, C. A., & Shibamoto, T. (1984). Ames mutagenicity tests of overheated brewed coffee. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 22(12), 971–975.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- 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), 14–21. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W. W., & Schilter, B. (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), 1155–1163.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033–1043. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T)
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <http://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F., & Gazzani, G. (2000). In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1449–1454.
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895–9901.
- Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 21(3), 213–238.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115.

- Downey, J. M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annual Review of Physiology*, 52, 487–504. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.002415>
- Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J., & Korte, D. W. J. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), 153–165.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), 872–879.
- Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 374–381. <http://doi.org/10.1021/jf0518305>
- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), 373–380. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- Friederich, U., Hann, D., Albertini, S., Schlatter, C., & Wurgler, F. E. (1985). Mutagenicity studies on coffee. The influence of different factors on the mutagenic activity in the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutation Research*, 156(1-2), 39–52.
- 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), 526–534.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*, 61, 73–101.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, 2, 950–988.
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <http://doi.org/10.1021/jf061478a>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and

- Chemical Implications. *Chemical Reviews*, *116*(5), 3029–3085.  
<http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- 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*, 156–166.
- Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernandez, B., Nicasio-Torres, P., & Tortoriello, J. (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), 561–566.  
<http://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.01.006>
- Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., & Augusto, O. (2000). In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(10), 1056–1064.
- 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), 728–733.
- Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J., Lynn, M. J., & Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*, *28*(4), 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), 1388–1395.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (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), 141–143.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., ... Owen, R. (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. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), 67–75. <http://doi.org/10.1097/01.cej.0000051106.40692.d3>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9880–9884.
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 132(5), 1740–1745. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.044>
- Latour, I., Demoulin, J. B., & Buc-Calderon, P. (1995). Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 373(3), 299–302. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01065-M](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)01065-M)
- 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), 141–154.
- Lee, K. J., & Jeong, H. G. (2007). Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. *Toxicology Letters*, 173(2), 80–87. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.008>
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502.
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research*, 443(1-2), 129–138.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79(21), 2056–2068. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.042>

- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., & McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*, *156*(5), 445–453.
- Liu, J., Shen, B., Shi, M., & Cai, J. (2016). Higher Caffeinated Coffee Intake Is Associated with Reduced Malignant Melanoma Risk: A Meta-Analysis Study. *PloS One*, *11*(1), e0147056. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147056>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727–747.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004b). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bio availability studies. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(1 Suppl), 230S–242S.
- Martin, C., Martinez, R., Navarro, R., Ruiz-Sanz, J. I., Lacort, M., & Ruiz-Larrea, M. B. (2001). tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochemical Pharmacology*, *62*(6), 705–712.
- Maurin, O., Davis, A. P., Chester, M., Mvungi, E. F., Jaufeerally-Fakim, Y., & Fay, M. F. (2007). Towards a Phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Annals of Botany*, *100*(7), 1565–1583. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm257>
- Mennen, L., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(1 Suppl), 326S–329S.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, *43*(4), 477–

503. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034>

- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295–309.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(9 Suppl), 30S–34S.
- Nehlig, A. (2016). Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients? *Practical Neurology*, 16(2), 89–95. <http://doi.org/10.1136/practneurol-2015-001162>
- Nicoli, M. C., Anese, M., Manzocco, L., & Lerici, C. R. (1997). Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 292–297. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0181>
- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., & Orelund, L. (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), 170–175.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L., & Katan, M. B. (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), 532–538.
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Paolini, M., Sapigni, E., Hrelia, P., Grilli, S., & Cantelli-Forti, G. (1988). Isolation of S9 fractions from mouse and rat with increased enzyme activities after repeated administration of cytochrome P-450 and P-448 inducers. *Mutagenesis*, 3(3), 239–243.
- Papadopoulou, A., & Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein–polyphenol

- interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3–4), 186–190.  
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.017>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (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), 2812–2819.
- Perrone, D., Donangelo, R., Donangelo, C. M., & Farah, A. (2010). Modeling weight loss and chlorogenic acids content in coffee during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12238–12243. <http://doi.org/10.1021/jf102110u>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.  
<http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11-12), 1173–1181.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621.  
<http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Ray, R. S., Mehrotra, S., Shankar, U., Babu, G. S., Joshi, P. C., & Hans, R. K. (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug and Chemical Toxicology*, 24(2), 191–200.  
<http://doi.org/10.1081/DCT-100102610>
- 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 Metabolisme*, 29(8), 363–372.



<http://doi.org/10.1055/s-2007-979057>

- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, *18*(1), 1–11.
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, *15*(4), 304–317.
- Salazar-Martinez, E., Willett, W. C., Ascherio, A., Manson, J. E., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2004). Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, *140*(1), 1–8.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, *45*(4), 287–306. <http://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, *5*(3), 237–245.
- Sies, H., & Summer, K. H. (1975). Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *57*(2), 503–512.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, *30*(2), 91–113.
- 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), 219–227. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90006-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(84)90006-2)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interactions*, *160*(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Wattenberg, L. W. (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Research*, *43*(5 Suppl), 2448s–2453s.

- You, D.-C., Kim, Y.-S., Ha, A.-W., Lee, Y.-N., Kim, S.-M., Kim, C.-H., ... Lee, J.-M. (2011). Possible Health Effects of Caffeinated Coffee Consumption on Alzheimer's Disease and Cardiovascular Disease. *Toxicological Research*, 27(1), 7–10. <http://doi.org/10.5487/TR.2011.27.1.007>
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162.
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.