

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΩΡΓΑΚΑ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας in vitro καθαρών φυτικών
φαινολικών ουσιών, εκχυλισμάτων και κλασμάτων των ελληνικών ποικιλιών
αμπέλου Ασύρτικο και Μανδηλαριά Σαντορίνης: έλεγχος για πιθανή
συνεργική δράση μεταξύ των φαινολικών ουσιών.*



ΛΑΡΙΣΑ, 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4659/1
Ημερ. Εισ.: 14-10-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΓΕΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087879

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κουρέτα Δημήτριο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία, καθώς και για την προθυμία του να ακούσει τους προβληματισμούς μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωσταρόπουλο Ιάσωνα για την πολύτιμη βοήθειά του, τις επιστημονικές συμβουλές του, την κατανόησή του και την υπομονή που έδειξε σε καθετί που προέκυψε.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον κ. Στάνγκο Δημήτριο για την αμέριστη βοήθειά του και την άψογη συνεργασία μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριές μου για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	6
1.1. Γενικά.....	6
1.2. Φαινολικές ουσίες.....	7
1.2.1. Εισαγωγικά.....	7
1.2.2. Ταξινόμηση φαινολικών ουσιών με βάση τη χημική τους δομή.....	7
1.2.3. Βιοσύνθεση φαινολικών ουσιών.....	13
1.2.4. Μεταβολισμός φαινολικών ουσιών.....	15
1.2.5. Βιολογικές δράσεις φαινολικών ουσιών.....	16
1.2.5.α. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	17
1.2.5.β. Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών.....	23
1.2.5.γ. Προοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών.....	26
1.2.5.δ. Αντικαρκινική δράση φαινολικών ουσιών.....	27
1.2.5.ε. Αντιφλεγμονώδης δράση φαινολικών ουσιών.....	30
1.2.5.στ. Καρδιοπροστατευτική δράση φαινολικών ουσιών.....	30
1.3. Κρασί και φαινολικές ουσίες.....	32
1.4. Φαινολικές ουσίες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	33
1.5. Εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	37
1.6. Σκοπός.....	37
2. Υλικά και μέθοδοι.....	38
2.1. Υλικά.....	38
2.2. Μέθοδοι.....	40
2.2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών.....	40
2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	41
2.2.3. Συνδυασμός δράσης φαινολικών ουσιών.....	41
2.3. Στατιστική Ανάλυση, υπολογισμοί και γραφήματα.....	41
3. Αποτελέσματα.....	43
3.1. Επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης DPPH για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.....	43
3.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος.....	43
3.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων φαινολικών ουσιών με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την οργανική νιτρική ρίζα DPPH.....	43
3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την οργανική νιτρική ρίζα DPPH.....	45
3.5. Συνδυασμός δράσης φαινολικών ουσιών.....	45
4. Συζήτηση.....	73
5. Βιβλιογραφία.....	81

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός μελετών επικεντρώνεται στην επίδραση της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία και το όριο ζωής. Οι φαινολικές ουσίες, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα, έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, καθώς τους έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ικανότητες και προστατευτική δράση απέναντι σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές ασθένειες. Τα σταφύλια έχουν υψηλές συγκεντρώσεις και μεγάλη ποικιλία φαινολών. Έτσι, το κρασί είναι μια πλούσια πηγή φαινολικών ουσιών στην ανθρώπινη διαίτα. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν διττός. Αφενός, επιδιώχθηκε να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ορισμένων καθαρών φυτικών φαινολικών ουσιών, εκχυλισμάτων δύο ποικιλιών αμπέλου *Vitis Vinifera*, του Ασύρτικου Σαντορίνης (λευκά σταφύλια) και της Μανδηλαριάς Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια), καθώς επίσης και τριών κλασμάτων των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης. Ο δεύτερος στόχος ήταν να διευκρινιστεί αν υπάρχουν συνεργικές δράσεις μεταξύ των καθαρών φαινολικών ουσιών, διότι στις φυτικές τροφές και στα παράγωγά τους, ένα από τα οποία είναι και το κρασί, οι ουσίες αυτές παρουσιάζονται ως μείγματα. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών, των κλασμάτων και των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά τους να «προσφέρουν» ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα ηλεκτρόνιο) στην οργανική νιτρική ρίζα DPPH και εκφράστηκε ως IC_{50} . Οι φαινόλες με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν το ελλαγικό οξύ (IC_{50} : 6,932 μ M) και το γαλλικό οξύ (IC_{50} : 7,144 μ M), πιθανώς λόγω της δομής τους. Από τα εκχυλίσματα, πιο ισχυρό βρέθηκε να είναι το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά (IC_{50} =23,548 μ g/ml), ενώ από τα κλάσματα, το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά (IC_{50} =18,326 μ g/ml). Η σύσταση σε διαφορετικές ουσίες, περιεκτικότητα σε φαινόλες, αλλά και ποια φαινόλη κυριαρχεί, φαίνεται να επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητά τους. Η πιθανή συνεργική δράση, μπορεί να αποτελεί εξήγηση της αυξημένης αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρουσιάζουν κάποια εκχυλίσματα σε σχέση με τη μεμονωμένη δράση των φαινολών. Ωστόσο, κανένας συνδυασμός δεν εμφάνισε συνεργική δράση, με ορισμένους να εμφανίζουν ανασταλτική δράση μεταξύ των φαινολικών ουσιών.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AP-1: activated protein-1

AA: ascorbic acid

BHA: butylated hydroxyanisole

CAPE: caffeic phenylester

CBG: cytoplasmic β -glycosidase

CDK: κυκλίνη

CHS: chalcone synthase

COMT: catechol-o-methyltransferase

CYP: ένζυμα του κυτοχρώματος P450

DMSO: dimethylsulfoxide

DPPH: 1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl

EGF: epidermal growth factor

EGCG: epigallocatehin-3-gallate

EtOAc: ethyl acetate

IGF-1: insulin like growth factor-1

GSH-PX: glutathione peroxidase

GSH-RD: glutathione reductase

LPH: lactase phlotridzinehydrolase

LDL: low density lipoprotein

PKC: protein kinase C

PKT: protein tyrosine kinase

ROS: reactive oxygen species

RNS: reactive nitrogen species

RS: resveratrol synthase

SULT: sulfotransferase

SOD: superoxide dismutase

UDPGT: UDP glucuronosyl transferase

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Την τελευταία δεκαετία, οι φαινολικές ουσίες συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον των ερευνητών σε όλο και μεγαλύτερο βαθμό για πολλαπλούς λόγους. Οι κύριοι λόγοι για το ενδιαφέρον αυτό είναι η αναγνώρισή τους ως αντιοξειδωτικά, η μεγάλη αφθονία τους στη φύση και ο πιθανός τους ρόλος στην προστασία από παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, η φλεγμονή και οι καρδιαγγειακές και νευρολογικές ασθένειες (*Manach και συν., 2004, Scalbert και Williamson, 2000*). Αξίζει να αναφερθεί ότι έρευνα επάνω σε βιβλιογραφία αποκάλυψε ότι ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με τα αντιοξειδωτικά και το οξειδωτικό στρες σχεδόν τετραπλασιάστηκε την τελευταία δεκαετία, από 1684 το 1993 σε 6510 το 2003 (*Huang και συν., 2005*).

Υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα σχετικά με τις δομές των φαινολών στη φύση και αυτό τις διαφοροποιεί από τα άλλα αντιοξειδωτικά. Μερικές εκατοντάδες έχουν αναγνωριστεί στα φυτά και πολλές από αυτές στα εδώδιμα φυτά, παρόλα αυτά μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτές έχει βρεθεί στην ανθρώπινη διατροφή (*Scalbert και Williamson, 2000*).

Μελέτες επάνω σε διαιτητικά πρότυπα και καταστάσεις υγείας έδειξαν ότι η παραδοσιακή ελληνική δίαιτα συσχετίζεται με χαμηλά ποσοστά καρδιαγγειακών ασθενειών και καρκίνου. Αυτό που φαίνεται να είναι τόσο σημαντικό όσον αφορά την ελληνική διατροφή είναι το περιεχόμενό της σε βιοπροστατευτικές ουσίες. Η παραδοσιακή ελληνική διατροφή είναι ισορροπημένη σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα και πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως οι πολυφαινόλες, που προέρχονται κυρίως από τα φυτά, τα βότανα, το ελαιόλαδο και το κρασί (*Simopoulos, 2004*).

Επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν τη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού με μειωμένη εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων και τη μέτρια κατανάλωση λευκού κρασιού με μείωση της αθηροσκλήρυνσης και της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο (*Huisman και συν., 2004*). Σε μια πολύ γνωστή μελέτη, ο Renaud και ο de Lorgeril (1992) αναφέρονται στο «Γαλλικό παράδοξο», σύμφωνα με το οποίο, τα επίπεδα θνησιμότητας που προκαλούνται από καρδιαγγειακές παθήσεις, είναι χαμηλότερα στη Γαλλία σχετικά με άλλες βιομηχανοποιημένες χώρες, παρόλο που η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι περίπου ίδια και τα επίπεδα χοληστερόλης είναι γενικώς υψηλότερα. Το παράδοξο αυτό αποδόθηκε στη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού και ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα μη αλκοολικά κλάσματα του κρασιού ως σημαντική πηγή φαινολικών ουσιών, οι οποίες είναι ικανές για την αναστολή των διεργασιών που κρύβονται πίσω από τις καρδιαγγειακές ασθένειες (*Teissedre και συν., 2001*).

1.2. Φαινολικές ουσίες

1.2.1. Εισαγωγικά

Τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα, επειδή παράγονται από βιολογικά συστήματα, περιέχουν διάφορες ενώσεις εκτός από τα «παραδοσιακά» θρεπτικά στοιχεία. Πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν την ικανότητα να τροποποιούν ενζυμικές και χημικές αντιδράσεις, και συνεπώς μπορούν να έχουν επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, θετική ή αρνητική. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές ως φυτοχημικά (phytochemicals) (Beecher, 2003). Οι φαινολικές ουσίες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία φυτοχημικών ενώσεων, στην οποία αποδόθηκε μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία δέκα χρόνια. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φαινολών, της μεγάλης αφθονίας τους στην ανθρώπινη διατροφή και του πιθανού ρόλου τους στην πρόληψη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Manach και συν., 2004).

Υπολογίζεται ότι περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες υπάρχουν στα διάφορα είδη φυτών (Urquiaga και Leighton, 2000). Κύριο χαρακτηριστικό της χημικής τους δομής είναι ότι περιέχουν έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου, καθώς και άλλες δραστικές ομάδες όπως καρβοξυλικές ή μεθοξυλικές (-O-CH₃) ομάδες (Καράταγλης, 1994). Αυτός ο φαινολικός δακτύλιος βρίσκεται είτε στην οξειδωμένη μορφή του (κινόνη) είτε στην ανηγμένη του μορφή (φαινόλη) (Castanas και συν., 2004). Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν μια ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητά τους, αφού μερικές είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, μερικές είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994).

Λειτουργικά, οι φαινόλες εκδηλώνουν διάφορους ρόλους στα φυτά. Μερικές έχουν αμυντικό ρόλο ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία ή σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (Manach και συν., 2004), άλλες έχουν δομική λειτουργία συμμετέχοντας στο σχηματισμό των στηρικτικών ιστών των φυτών, άλλες συμμετέχουν στην προσέλκυση επικονιαστών και τη διασπορά των καρπών, ενώ άλλες δρουν προκαλώντας μείωση της αύξησης των γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών (Καράταγλης, 1994).

1.2.2. Ταξινόμηση φαινολικών ουσιών με βάση τη χημική τους δομή

Οι φαινόλες ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και των δομικών ομάδων που συνδέουν αυτούς τους δακτύλιους μεταξύ τους.

Διακρίνονται σε φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμικά), φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες (Εικόνα 1.1.). Μπορούν να συνδεθούν με ποικίλους υδρογονάνθρακες και οργανικά οξέα, αλλά και να πολυμεριστούν σχηματίζοντας ουσίες υψηλού μοριακού βάρους, τις ταννίνες.

Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά (Πίνακας 1.1.). Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 1.1.). Στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων ανήκουν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Στην κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων ανήκει το *p*-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό, το φερούλικό και τα σιναπικά οξέα. Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι πιο κοινά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (*Manach και συν., 2004*).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα πολυμερίζονται σε υδρολυόμενες ταννίνες (γαλλοταννίνες στο μάνγκο και ελλαγιταννίνες). Οι υδρολυόμενες ταννίνες αποτελούνται από μόρια γαλλικού ή ελλαγικού οξέος στα οποία εστεροποιείται συνήθως ένα σάκχαρο. Τα μόρια του γαλλικού οξέος, στο μόριο της υδρολυόμενης ταννίνης, συνδέονται με ποικίλους τρόπους. Το σάκχαρο είναι συνήθως γλυκόζη χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία κάποιου άλλου σακχάρου. Σε όξινες συνθήκες ή με ενζυμική αποικοδόμηση οι υδρολυόμενες ταννίνες διαχωρίζονται πολύ εύκολα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα. Αυτό συμβαίνει γιατί το χαμηλό pH εξασθενεί τον δεσμό ανάμεσα στο υδρογόνο και το οξυγόνο των συνδεδεμένων φαινολών (*Nepka και συν., 1999*).

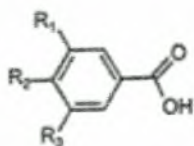
Στυλβένια

Τα στυλβένια και τα γλυκοσιδιά τους αποτελούν τον κύριο όγκο των φαινολικών αντιμυκηπισιακών φυτοαλεξινών και κυρίως συντίθενται μόνο ως απόκριση σε τραυματισμό ή μόλυνση από μικροοργανισμούς. Τα στυλβένια δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στα εδάδιμα φυτά (Πίνακας 1.1.) (Εικόνα 1.1.). Παρόλα αυτά, ένα από αυτά, η ρεσβερατρόλη, έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω των αντικαρκινικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει. Είναι το πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό των πολυμερών που ονομάζονται βινιφερίνες, ενώσεις που αναστέλλουν την μόλυνση από μύκητες (*Soleas και συν., 1997*).

Λιγνάνες

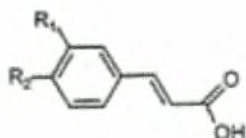
Οι λιγνάνες (secoisolariciresinol) (Εικόνα 1.1.) σχηματίζονται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίων (phenylpropane units). Μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από την εντερική μικροχλωρίδα. Ανήκουν στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων επειδή παρουσιάζουν ιδιότητες αγωνιστών και ανταγωνιστών ως προς τα οιστρογόνα του ανθρώπινου οργανισμού (*Scalbert και Williamson, 2000*).

Υδροξυβενζοϊκά Οξέα



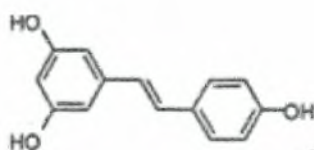
$R_1=R_2=OH, R_3=H$: Πρωτοκατεχοϊκό οξύ
 $R_1=R_2=R_3=OH$: Γαλλικό οξύ

Υδροξυκινναμικά Οξέα



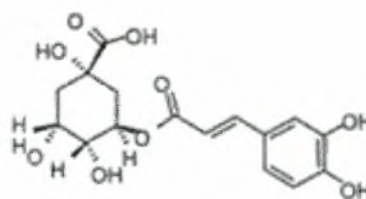
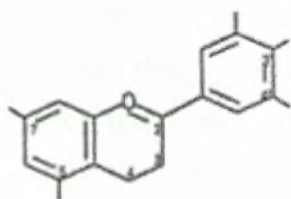
$R_1=OH$: Κουμαρικό οξύ
 $R_1=R_2=OH$: Καφεϊκό οξύ
 $R_1=OCH_3, R_2=OH$: Φερουλικό οξύ

Στιλβένια



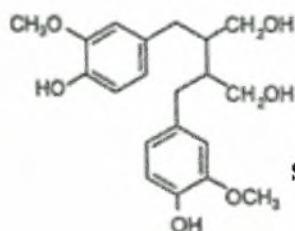
Ρεσβερατρόλη

Φλαβονοειδή



Χλωρογενικό οξύ

Λιγνάνες



Secoisolaricresinol

Εικόνα 1.1. Χημικές δομές των κατηγοριών των φαιολικών ουσιών και των κυριότερων εκπροσώπων τους (Manach και συν., 2004).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα πολυφαινολών η οποία αποτελείται πάνω από 4000 φαιολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης (Πίνακας 1.1.). Η ονομασία τους προέρχεται από το

κίτρινο χρώμα μερικών ενώσεων της ομάδας αυτής (flavus=κίτρινος) (Καράταγλης, 1994). Πιθανώς βρίσκονται στο φυτικό βασίλειο πάνω από ένα δισεκατομμύριο χρόνια. (Scalbert και Williamson, 2000).

Αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτύλιους (Α και Β), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα, η οποία ονομάζεται κεντρικός οξυγονωμένος ετεροδακτύλιος. Η δομή αυτή είναι το αποτέλεσμα της συνένωσης δύο προϊόντων που προέρχονται από δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια στα φυτά. Ο δακτύλιος Α προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος Β προέρχεται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος (Καράταγλης, 1994). Διαιρούνται σε έξι υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετεροδακτυλίου: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) (Εικόνα 1.2.) (Manach και συν., 2004).

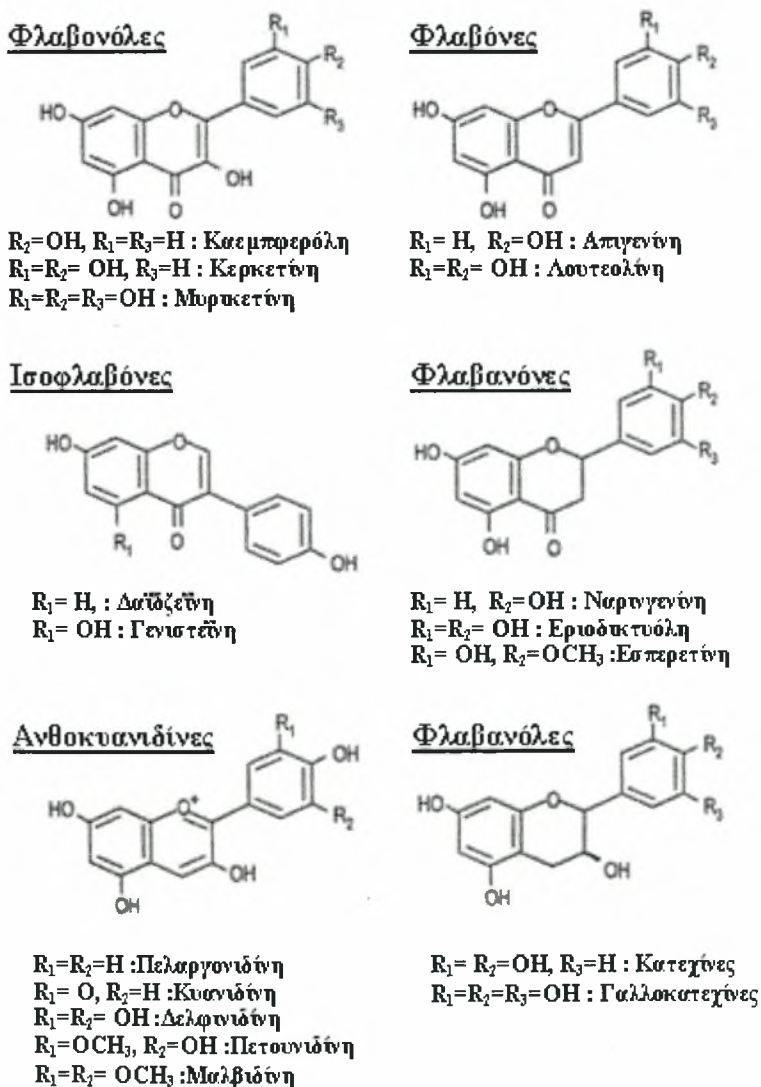
Οι φλαβονόλες (κερκετίνη, καεμπφερόλη) βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένες μορφές (συνδέονται κυρίως με ραμνόζη) και συγκεντρώνονται στην επιδερμίδα και στα φύλλα των φυτών επειδή η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από το φως. Οι φλαβόνες βρίσκονται κυρίως συνδεδεμένες με λουτεολίνη και απιγενίνη (Manach και συν., 2004). Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες δεν περιορίζονται μόνο στα άνθη, αλλά βρίσκονται επίσης στα φύλλα και στους βλαστούς όλων των χλωροφυλλούχων φυτών έτσι ώστε να τα προστατεύουν από την UV-B ακτινοβολία (Καράταγλης, 1994).

Οι ισοφλαβόνες (genistein, daidzein, glycitein) έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα, αν και δεν είναι στεροειδή και έχουν ψευδοορμονικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου της ικανότητας τους να συνδέονται στον οιστρογονικό υποδοχέα, γι' αυτό κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα.

Φλαβανόλες υπάρχουν σε μονομερή μορφή (κατεχίνες) και σε πολυμερισμένη μορφή (προανθοκυανιδίνες). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν είναι γλυκοσυλιωμένες. Κύριοι εκπρόσωποι των κατεχινών είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη. Οι προανθοκυανιδίνες, είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή κατεχινών και προσδίδουν αντισηπτικές ιδιότητες στα φρούτα (Manach και συν., 2004). Παρόλο που οι προανθοκυανιδίνες βρίσκονται κυρίως ως διμερή στα σταφύλια, στο κρασί έχουν τάση να πολυμερίζονται συνθέτοντας μια δεύτερη κατηγορία ταννινών, τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες περιέχουν από τρεις έως πέντε υπομονάδες προανθοκυανιδινών. Τα μόρια των συμπυκνωμένων ταννινών είναι μεγαλύτερα από αυτά των υδατοδιαλυτών ταννινών. Αντίθετα με τις υδατοδιαλυτές ταννίνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες σε όξινες συνθήκες ή παρουσία αποικοδομητικών ενζύμων, διαχωρίζονται σε

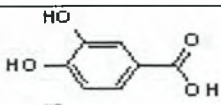
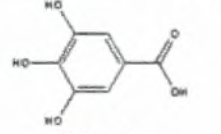
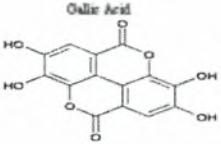
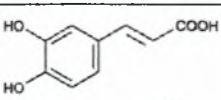
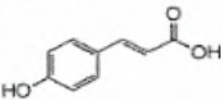
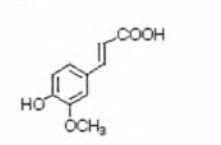
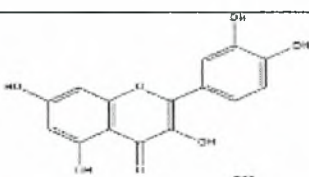
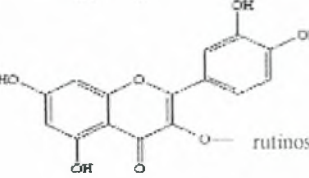
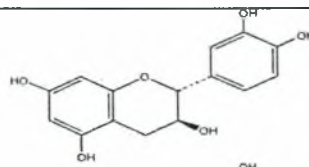
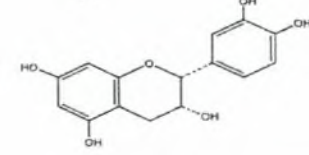
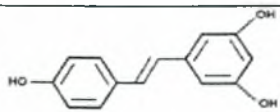
πολύπλοκα μόρια τα οποία είναι αδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα (*Nerka και συν., 1999, Soleas και συν., 1997*).

Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές που είναι διαλυμένες στα χυμοτόπια επιδερμικών ιστών ανθέων και φρούτων. Βοηθούν στην προσέλκυση των ζώων προς τα άνθη και τους καρπούς με τη δημιουργία ορατών και οσφρητικών σημάτων (*Καράταγλης, 1994*). Υπάρχουν σε διαφορετικές χημικές δομές, που χρωματίζονται ή είναι άχρωμες ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Είναι εξαιρετικά ασταθείς όταν δεν βρίσκονται συνδεδεμένες με σάκχαρα. Μέσα στα φυτά είναι ανθεκτικές στο φως, στο pH και σε οξειδωτικές συνθήκες. Η γλυκοσυλίωσή τους στη θέση 3 και η εστεροποίησή τους με διάφορα οργανικά οξέα (citric acids, malic acids) ή φαινολικά οξέα εμποδίζει την αποικοδόμησή τους. Οι γλυκοσυλιωμένες ανθοκυανίνες ονομάζονται ανθοκυανιδίνες με κυριότερη εκπρόσωπό τους την κυανιδίνη. (*Manach και συν., 2004*).



Εικόνα 1.2. Χημικές δομές των υποκατηγοριών των φλαβονοειδών (*C. Manach και συν., 2004*).

Πίνακας 1. Φαινόλες στα τρόφιμα (Manach και συν., 2004, Dong, 2002).

	Χημική δομή	Πηγή	Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλη mg/kg φρέσκου βάρους (ήmg/L στα υγρά)
Υδροξυβενζοϊκά οξέα			
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ		Βατόμουρο Σμέουρο Μαύρη σταφίδα	80-270 60-100 40-130
Γαλλικό οξύ		Φράουλα	20-90
Ελλαγικό οξύ			
Υδροξυκιναμικά οξέα			
Καφεϊκό οξύ		Βακκίνιο Ακτινίδιο Κεράσι	2000-2200 600-1000 180-1150
Κουμαρικό οξύ		Δαμάσκηνο Μελιτζάνα Μήλο	140-1150 600-660 50-600
Φερουλικό οξύ		Αχλάδι Ραδίκι Πατάτα Μηλίτης Καφές	15-600 200-500 100-190 10-500 350-1750
Φλαβονόλες			
Κερκετίνη		Κίτρινο κρεμμύδι Κατσαρό λάχανο Πράσο Ντομάτα Μπρόκολο	350-1200 300-600 30-225 2-15 40-100
Ρουτίνη		Μαύρη σταφίδα Μήλο Μαύρο σταφύλι Κόκκινο κρασί Μαύρο τσάι Πράσινο τσάι	30-70 20-40 15-40 2-30 30-45 20-35
Μονομερείς Φλαβανόλες			
Κατεχίνη		Σοκολάτα Φασόλια Βερίκοκο Κεράσι Σταφύλι	460-610 350-550 100-250 50-220 30-175
Επικατεχίνη		Πράσινο τσάι Μαύρο τσάι Κόκκινο κρασί Βατόμουρα Μήλο	100-800 60-500 80-300 130 20-120
Στιλβένια			
Ρεσβερατρόλη		Κόκκινο κρασί Χυμός σταφυλιού Μούρα Φυστίκι	1,5-3 4-5

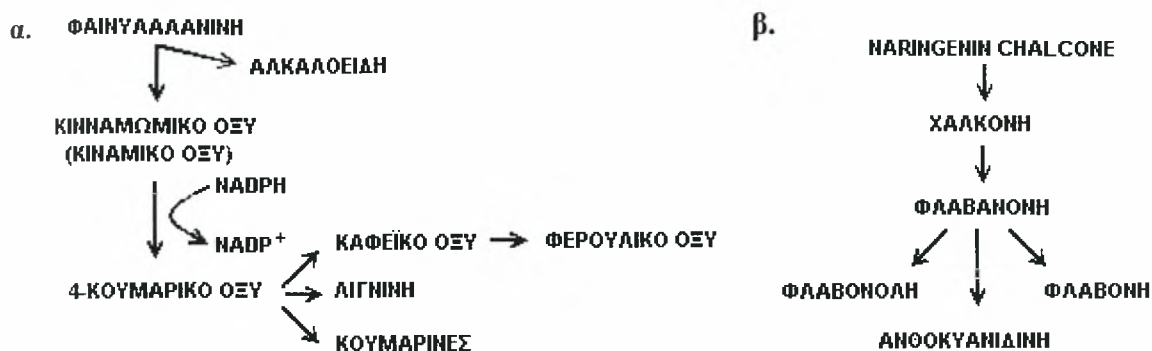
1.2.3. Βιοσύνθεση φαινολικών ουσιών

Οι φυτικές φαινόλες βιοσυντίθενται με αρκετά διαφορετικές πορείες και κατά συνέπεια συνιστούν μια ετερογενή ομάδα από άποψη μεταβολικής διαδικασίας. Για τη βιοσύνθεσή τους δύο κυρίως μονοπάτια συμμετέχουν: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του μαλονικού οξέος.

Η σημασία του μονοπατιού του σικιμικού οξέος δεν οφείλεται μόνο στο σχηματισμό φαινολών, αλλά κυρίως επειδή προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων: της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης (Εικόνα 1.3.). Από ένα προϊόν ενδιάμεσου σταδίου του μονοπατιού, το 5-δεϋδρο-σικιμικό οξύ, είναι δυνατό να σχηματιστούν είτε γαλλικό οξύ, είτε πρωτοκατεχοϊκό οξύ, είτε σικιμικό οξύ. Το τελευταίο οδηγεί στο σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων. Πολλές ομάδες φαινολών προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη, όπως για παράδειγμα το κινναμικό οξύ (κινναμωμικό οξύ), το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Μάλιστα, τα πρώτα τέσσερα οξέα προέρχονται αποκλειστικά από τα παραπάνω αμινοξέα. Το κινναμικό οξύ με υδροξυλίωση μετατρέπεται σε *p*-κουμαρικό οξύ, ενώ η τυροσίνη με απαμίνωση μετατρέπεται απ' ευθείας σε *p*-κουμαρικό οξύ. Με την προσθήκη μιας ακόμη υδροξυλικής ομάδας, το *p*-κουμαρικό οξύ σχηματίζει το καφεϊκό. Η προθήκη μιας μεθυλομάδας στην δεύτερη υδροξυλική ομάδα του καφεϊκού οδηγεί στη σύνθεση του φερουλικού οξέος (Εικόνα 1.4.α.) (Καράταγλης, 1994).



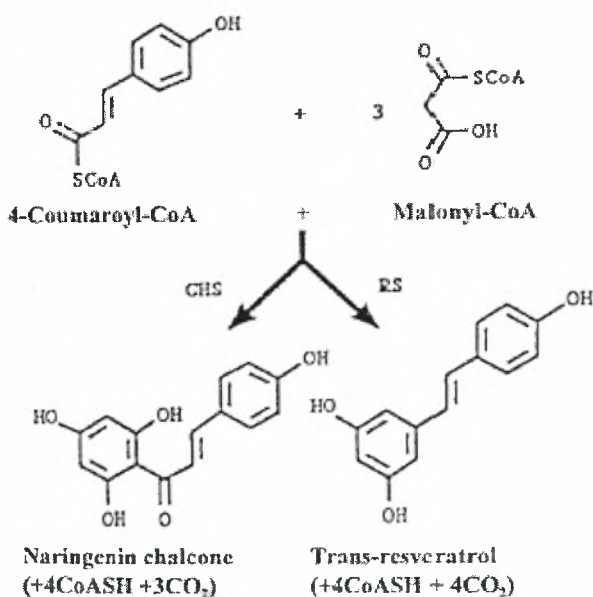
Εικόνα 1.3. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (τροποποιημ. εικόνα, Καράταγλης, 1994).



Εικόνα 1.4. α. Δευτερογενή φαινολικά προϊόντα που προέρχονται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη
β. Βιοσυνθετική πορεία των φλαβονοειδών (τροποποιημ. εικόνα, Καράταγλης, 1994).

Ένα σημαντικό σημείο στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι η συνένωση του μαλόνυλο-CoA που προέρχεται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος και του *p*-κουμαροϋλ-CoA που προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος σχηματίζοντας τη χαλκόνη μέσω της συνθάσης της χαλκόνης (Εικόνα 1.5.) (Καράταγλης, 1994, Soleas και συν., 1997). Αμέσως μετά το σχηματισμό της, η τριμερής αυτή ένωση έχει την τάση να κυκλοποιείται σχηματίζοντας έναν αρωματικό δακτύλιο. Η δεύτερη κυκλοποίηση της χαλκόνης οδηγεί στο σχηματισμό της φλαβανόνης ναρινγενίνης (naringenin) που είναι πρόδρομο μόριο των φλαβονολών, των ανθοκυανινών και των προκυανιδινών (Εικόνα 1.4.β.).

Η κύρια εκπρόσωπος των στυλβενίων, η ρεσβερατρόλη συντίθεται επίσης μέσω της συνένωσης του μαλόνυλο-CoA και του *p*-κουμαροϋλ-CoA, μέσω όμως ενός διαφορετικού ενζύμου, της συνθάσης της ρεσβερατρόλης (Εικόνα 1.5.) (Soleas και συν., 1997).



Εικόνα 1.5. Βιοσύνθεση της Naringenin chalcone και της trans-ρεσβερατρόλης μέσω της συνθάσης της χαλκόνης (CHS) και της συνθάσης της ρεσβερατρόλης (RS), αντίστοιχα (Soleas και συν., 1997).

1.2.4. Μεταβολισμός φαινολικών ουσιών

Η δομική ποικιλότητα των διατροφικών φαινολικών ουσιών κάνει δύσκολη την εκτίμηση του περιεχομένου τους στα τρόφιμα. Ενδεικτικές τιμές της μέσης περιεκτικότητας μερικών τροφίμων και ποτών σε φαινόλες παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1. Το ποσοστό πρόσληψης των πολυφαινολών εξαρτάται κυρίως από τις διατροφικές συνήθειες (*Scalbert και Williamson, 2000*).

Από τη στιγμή που οι φαινολικές ουσίες θα εισέλθουν μέσω της τροφής στον οργανισμό, ακολουθούν την ίδια οδό με τις υπόλοιπες ξενοβιοτικές ουσίες. Το πρωταρχικό σημείο του μεταβολισμού τους καθορίζεται από τη φύση τους και από τις ομάδες με τις οποίες είναι συνδεδεμένες.

Ορισμένες φαινόλες βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή. Η μοίρα των γλυκοσιδίων στο στομάχι δεν είναι ξεκάθαρη. Σύμφωνα με μελέτες, η γαστρική απορρόφηση είναι εφικτή για ορισμένες πολυφαινόλες (κερκετίνη, daidzein), αλλά όχι για τις γλυκοσυλιωμένες τους μορφές. Τα περισσότερα γλυκοσίδια πιθανώς αντιστέκονται στην υδρόλυση από τα οξέα του στομάχου και έτσι φτάνουν ανέπαφα στο έντερο (*Manach και συν., 2004*). Το συνδεδεμένο σάκχαρο εμποδίζει την παθητική διάχυσή τους διαμέσου του τοιχώματος του λεπτού εντέρου. Το πρώτο βήμα για την απορρόφησή τους είναι η απομάκρυνση του υδρόφιλου σακχάρου. Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση αυτή ανήκουν στην κατηγορία των γλυκοσιδασών. Η CBG (κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση) καταλύει την υδρόλυση ενδοκυτταρικά και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του εντέρου και του ήπατος. Η LPH (lactase phloridzine hydrolase) υδρολύει τα υποστρώματά της εξωκυτταρικά και βρίσκεται αποκλειστικά στο λεπτό έντερο (*Scalbert και Williamson, 2000*).

Οι φαινολικές ουσίες που περιέχουν ραμνόζη, υδρολύονται από τις ραμνοσιδάσες της μικροχλωρίδας στο κόλον. Επίσης, φαινόλες που είτε δεν απορροφούνται από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου, είτε έχουν μεταβολιστεί από το ήπαρ και φτάνουν πάλι στο λεπτό έντερο, υπόκεινται σε επιπλέον αποδόμηση σε απλά αρωματικά οξέα με στόχο την απομάκρυνσή τους.

Στο ήπαρ, οι φαινόλες λειτουργούν ως υποστρώματα για τα ένζυμα της φάσης I και II του μεταβολισμού. Οι αντιδράσεις φάσης II περιλαμβάνουν σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, μεθειϊκό οξύ καθώς και μεθυλίωση ή συνδυασμό των προηγούμενων (*Rechner και συν., 2002*). Οι παραπάνω μεταβολές καταλύονται αντίστοιχα από τα ένζυμα UDP γλυκουρονοσυλτρανσφεράσες (UDP glucuronosyl transferase, UDPGT), σουλφοτρανσφεράσες (sulfotransferases, SULT) και κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράσες (catechol-O-methyltransferases, COMT) (*Scalbert και Williamson, 2000*).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν εξαίρεση, δεν υπόκεινται στις αντιδράσεις των φάσεων I και II, και έτσι η κύρια μορφή τους στο αίμα είναι τα ανέπαφα γλυκοσίδιά τους. Η εξήγηση μάλλον

έγκειται στο ότι είναι ασταθείς όταν δεν βρίσκονται συνδεδεμένες με σάκχαρα. Εξ' αιτίας της αστάθειάς τους, δεν είναι ξεκάθαρο αν μένουν ανέπαφες για αρκετή ώρα στους ιστούς, έτσι ώστε να δράσουν ως αντιοξειδωτικά (Prior, 2003). Οι προανθοκυανιδίνες απορροφούνται σε πολύ μικρό βαθμό εξ' αιτίας του μεγάλου μοριακού τους βάρους και μάλλον παρουσιάζουν δραστηριότητα μόνο στην γαστρεντερική κοιλότητα. Τα υδροξυκιναμικά οξέα συνήθως βρίσκονται εστεροποιημένα με σάκχαρα, λιπίδια ή οργανικά οξέα κάνοντας δύσκολη την απορρόφησή τους, διότι τα ανθρώπινα κύτταρα δεν έχουν εστεράσες. Υδρολύονται μόνο από τη μικροχλωρίδα στο κόλον (Manach και συν., 2004). Τα περισσότερα φλαβονοειδή, τα οποία βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή υπόκεινται σε υδρόλυση του σακχάρου με ακόλουθη απορρόφηση και μεταβολισμό της μη γλυκοσυλιωμένης μορφής (Rechner και συν., 2002).

Οι συγκεντρώσεις των ανέπαφων αρχικών φαινολικών μορίων στο πλάσμα είναι συχνά χαμηλές, κυμαίνονται στο εύρος 0,1-10μM (Kroon και συν., 2004, Scalbert και Williamson, 2000). Η αυξημένη αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει το πλάσμα οφείλεται εν μέρει στους μεταβολίτες που προκύπτουν (Scalbert και Williamson, 2000). Οι φαινολικές ουσίες φτάνουν στους ανθρώπινους ιστούς και στα κύτταρά τους μέσω του αίματος, εκτός των κυττάρων της εντερικής κοιλότητας. Επομένως, μελέτες που εστιάζουν στις βιολογικές δράσεις των φαινολών θα πρέπει να στηρίζονται στις αντιοξειδωτικές ικανότητές που παρουσιάζουν στα πλαίσια αυτών των συγκεντρώσεων.

Γενικά, η χημική δομή των φαινολικών ουσιών επηρεάζει το ρυθμό απορρόφησής τους από το έντερο, τον μεταβολισμό τους και τη μορφή με την οποία θα βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η βιοδιαθεσιμότητα τους επηρεάζεται, επίσης, από τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα συστατικά των τροφίμων (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες), που μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφησή τους.

1.2.5. Βιολογικές δράσεις φαινολικών ουσιών

Οι φαινόλες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων ως αποτέλεσμα των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των φαινολών προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες και την λιπιδική υπεροξείδωση, παράγοντες που εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η χρόνια φλεγμονή και ο καρκίνος. Πολλαπλές μελέτες έδειξαν ότι μπορούν να αναστείλουν ή να επάγουν ποικίλα ένζυμα που βρίσκονται στα θηλαστικά, μερικά από τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την αποτοξίνωση, την απόκριση στη φλεγμονή και σε αντιγόνα. Έχουν περιγραφεί επιδράσεις των φαινολικών ουσιών στα στάδια μετατροπής των κυττάρων σε καρκινικά αναστέλλοντας την

αρχική φάση (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression) της καρκινογενετικής διαδικασίας. (Hollman και Katan, 1999). Παρόλα αυτά, κάποιες φαινόλες παρουσιάζουν μεταλλαξιγόνες ιδιότητες, είτε ως καρκινογόνα, είτε ως προαγωγείς της καρκινογενετικής διαδικασίας (Urquiaga και Leighton, 2000).

1.2.5.α. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο ή μια ένωση που περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων της εξωτερικής στιβάδας και συνεπώς διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε κάποιο τροχιακό της (McMurry, 1994). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γενικώς αυξάνει τη δραστηριότητα του ατόμου (ή του μορίου) επειδή το άτομο (ή το μόριο) προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα μόρια έτσι ώστε να δημιουργήσει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων (Mylonas και Kouretas, 1999).

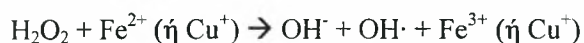
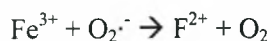
Πολλές φορές χρησιμοποιείται ο γενικός όρος «δραστικές μορφές» (reactive species) που περιλαμβάνει όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και μη-ρίζες (nonradicals) που αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες και/ ή μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ρίζες. Στις «δραστικές μορφές οξυγόνου» ή αλλιώς ROS (Reactive Oxygen Species) περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες των οποίων το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται στο οξυγόνο, όπως οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και υπεροξυλίου (RO_2^{\cdot}), και μη- ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το όζον (O_3). Αντιστοίχως ορίζονται και οι «δραστικές μορφές αζώτου» ή αλλιώς RNS (Reactive Nitrogen Species) στις οποίες περιλαμβάνονται το νιτρικό μονοοξείδιο (NO^{\cdot}) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^{\cdot}) που είναι ρίζες και το υπεροξυνιτρικό ($ONOO^{\cdot}$) που δεν είναι ρίζα. Η δραστηριότητα παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ρίζες (Halliwell, 2001).

Τα πιο σημαντικά στοιχεία όσον αφορά στη βιοχημεία των ROS είναι το O_2 , το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 , τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης και το OH^{\cdot} , εκ των οποίων τα τέσσερα πρώτα παράγουν το τελευταίο μέσω ορισμένων αντιδράσεων. Η **ρίζα σουπεροξειδίου** ($O_2^{\cdot-}$), δεν είναι ιδιαίτερα δραστική - η σημασία της έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι είναι πηγή του H_2O_2 και στο ότι δρα ως αναγωγικό στα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης. Το **υπεροξείδιο του υδρογόνου** (H_2O_2) είναι οξειδωτικός παράγοντας και έχει ιδιαίτερη σημασία διότι είναι πηγή OH^{\cdot} , παρουσία ιόντων των μετάλλων μετάπτωσης. Απουσία αυτών των καταλυτών, το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 απομακρύνονται απ' τον οργανισμό. Η **ρίζα υδροξυλίου** (OH^{\cdot}), είναι εξαιρετικά δραστική και αντιδρά σχεδόν με όλα τα βιομόρια με ταχύτητα διάχυσης. Παρόλο που έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και δεν καταφέρνει να διαχυθεί σε σημαντική απόσταση μέσα σε ένα κύτταρο πριν δράσει, είναι ικανή να προκαλέσει μεγάλη ζημιά μέσα σε μικρή ακτίνα από το σημείο παραγωγής της (Mylonas και Kouretas, 1999).

Τρόποι παραγωγής ριζών στον οργανισμό

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνέχεια μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Μέσα σε ένα κύτταρο, συνήθως παράγονται:

1. κατά τη διάρκεια αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το $\text{OH}\cdot$ παράγεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα από το H_2O_2 και το $\text{O}_2\cdot^-$ σύμφωνα με τις αντιδράσεις Haber-Weiss. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, συνήθως χαλκού ή σιδήρου (αντιδράσεις Fenton):



2. κατά τις αντιδράσεις του κυτοχρώματος P450 και από τη «διαρροή» ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.
3. από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Για παράδειγμα η οξειδάση της ξανθίνης που ενεργοποιείται κατά την ισχαιμία, η συνθάση της προσταγλαδίνης, η λιποοξυγενάση, η αλδεϋδική οξειδάση και η οξειδάση των αμινοξέων παράγουν σημαντικές ποσότητες ρίζας υπεροξειδίου (*Mylonas και Kouretas, 1999*).
4. υπό την επίδραση ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου του νερού που είναι και το κύριο συστατικό των κυττάρων και δημιουργεί $\text{OH}\cdot$ και $\text{H}\cdot$. Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι η ρύπανση της ατμόσφαιρας, το κάπνισμα και η ραδιενέργεια (*Halliwell, 2001*).

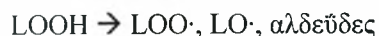
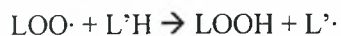
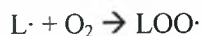
Βιολογική δράση ριζών

Ορισμένες ρίζες που παράγονται απ' τον οργανισμό είναι χρήσιμες *in vivo*. Το $\text{NO}\cdot$ παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων προκαλώντας τη χάλασή τους και ρυθμίζοντας την αρτηριακή πίεση, από τα φαγοκύτταρα κατά τη χρόνια και οξεία φλεγμονή και από άλλους κυτταρικούς τύπους. Το $\text{O}_2\cdot^-$, επίσης, παράγεται από φαγοκύτταρα ως απόκριση σε βακτήρια για την καταπολέμηση τους, αλλά και από άλλα κύτταρα ως χημειοτακτικός παράγοντας (*Halliwell, 2001*).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με βιολογικά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια των μεμβρανών. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες που φέρουν ως προσθετική ομάδα ιόν μετάλλου μετάπτωσης, είναι επιρρεπείς σε αντιδράσεις με H_2O_2 στο ενεργό κέντρο ή κοντά σε αυτό και μετουσιώνονται. Η αντίδραση του $\text{OH}\cdot$ με την γουανίνη στο DNA οδηγεί στο σχηματισμό μιας νέας ρίζας, της 8-υδροξυγουανίνης (*Halliwell, 2001*):



Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι τα πιο επιρρεπή στις ελεύθερες ρίζες βιολογικά μόρια. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια αυτοτροφοδοτούμενη αλυσιδωτή αντίδραση, που ξεκινά όταν μια ελεύθερη ρίζα «επιτεθεί» σε ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ:



Όπου **LH**: ελεύθερο λιπαρό οξύ, **R·**: αρχική ρίζα, **LOO·**: ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου (lipid peroxy radical), **LOOH**: λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο (lipid hydroperoxide), **L'H**: γειτονική αλυσίδα λιπαρού οξέος

Μια και μόνο αρχική αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση εκατοντάδων αλυσίδων λιπαρών οξέων σε λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, τα οποία αλλάζουν τη δομική ακεραιότητα και τις βιοχημικές λειτουργίες των κυτταρικών μεμβρανών (*Mylonas και Kouretas, 1999*).

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στους ζωντανούς οργανισμούς, τα επίπεδα των «δραστικών μορφών» ελέγχονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αντιοξειδωτικών μηχανισμών, οι οποίοι μειώνουν, αλλά δεν μηδενίζουν, τον κίνδυνο της οξείδωσης των βιομορίων. **Αντιοξειδωτικό** είναι κάθε ουσία, η οποία όταν υπάρχει σε μικρές συγκεντρώσεις, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις ενός υποστρώματος που μπορεί να οξειδωθεί, καθυστερεί ή εμποδίζει σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (*Halliwel, 2001*). Επίσης, αναφέρεται ότι ως αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί μια ουσία που είτε έχει την ικανότητα να δίνει ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου σε μια ρίζα υπεροξυλίου (peroxyl radical) ή αλκοξυλίου (alkoxyl radical) για να σταματήσει την λιπιδική υπεροξειδωση, είτε μπορεί να σχηματίσει χηλική ένωση με ένα προ-οξειδωτικό μέταλλο μετάπτωσης (*Aruoma, 2003*).

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** αναφέρεται στην κατάσταση κατά την οποία υπάρχει σοβαρή ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, υπέρ των πρώτων.

Μέσα στο κύτταρο, υπάρχουν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, ενζυμικοί και μη ενζυμικοί με στόχο να το προστατεύσουν από τις επιβλαβείς επιπτώσεις που μπορούν να προκαλέσουν οι ελεύθερες ρίζες ή να επιδιορθώσουν τις πιθανές βλάβες. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες (Εικόνα 1.7.):

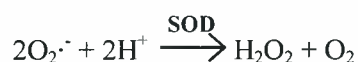
- α) ενζυμικά αντιοξειδωτικά
- β) μικρού μοριακού βάρους διαλυτά αντιοξειδωτικά
- γ) ουσίες που δεσμεύουν τα μέταλλα μετάπτωσης
- δ) αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής.

Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα ένζυμα που περιλαμβάνονται στην κατηγορία αυτή βρίσκονται σε συγκεκριμένα οργανίδια και υποκυτταρικά διαμερίσματα για να ρυθμίζουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών στα σημεία αυτά. Τα ένζυμα αυτά αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

A) Σουπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD)

Υπάρχουν τρεις τύποι σουπεροξειδικής δισμουτάσης, η SOD που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (Cu-Zn SOD) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, η SOD που περιέχει μαγγάνιο (Mn SOD) είναι μιτοχονδριακή, ενώ έχει ανακαλυφθεί και μια εξωκυτταρική SOD. Καταλύουν την μετατροπή του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



B) Καταλάση

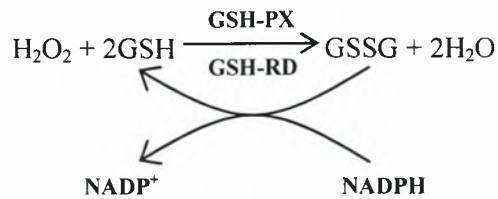
Ένα άλλο ένζυμο, η καταλάση, είναι μια αιμοπρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στα υπεροξυσωμάτια. Συντελεί στην απομάκρυνσή του H_2O_2 από τους περισσότερους ιστούς και καταλύει τη μετατροπή του σε νερό:



Γ) Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (glutathione peroxidases, GSH-PX)

Πολύ σημαντικά ένζυμα απομάκρυνσης του H_2O_2 από τα ανθρώπινα κύτταρα είναι και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης. Είναι μια ομάδα κυτταροπλασματικών, μιτοχονδριακών και εξωκυτταρικών ενζύμων, απαιτούν σελήνιο για τη δράση τους και μετατρέπουν λιπιδικά υπεροξειδία και H_2O_2 σε νερό και αλκοόλες μετατρέποντας το ανηγμένο τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH) στην οξειδωμένη του μορφή (GSSG). Για την αναγωγή της GSSG είναι

υπεύθυνο το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GSH-RD), ένζυμο που περιέχει FAD. Η αντίδραση είναι η εξής:



Διαλυτά αντιοξειδωτικά

Η γλουταθειόνη (GSH) μπορεί να καταστρέψει ποικίλα οξειδωτικά (π.χ. HOCl και ONOO⁻) είτε διαλυμένη στην ελεύθερη μορφή της, είτε ως υπόστρωμα των GSH-PX ενζύμων. Στα διαλυτά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνεται και το ουρικό οξύ, η αλβουμίνη και διάφορες αιμοπρωτεΐνες (π.χ. απτογλοβίνη και αιμοπηξίνη) (Mylonas και Kouretas, 1999, Halliwell, 2001, Aruoma, 2003).

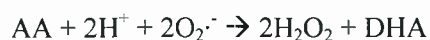
Δεσμευτές των μετάλλων μετάπτωσης

Τα μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και το σελήνιο, θεωρούνται επίσης ρίζες, καθώς περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και μπορούν να αντιδράσουν με το H₂O₂ παράγοντας O₂⁻ κατά την αντίδραση Fenton. Είναι, επίσης, συμπαραγοντες ορισμένων ενζυμικών και μη πρωτεϊνών [SOD (Cu/Fe), κυτοχρωμική οξειδάση (Cu), κυτοχρώματα (Se), φεριτίνη (Fe)]. Οι πρωτεΐνες αυτές, κάτω από ορισμένες συνθήκες, λειτουργούν έτσι ώστε να περιορίζουν τις οξειδωτικές διεργασίες, δεσμεύοντας τα μέταλλα αυτά (Mylonas και Kouretas, 1999, Aruoma, 2003).

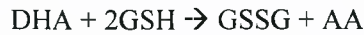
Διατροφικά αντιοξειδωτικά

Τα διατροφικά αντιοξειδωτικά παράγονται αποκλειστικά από τα φυτά. Χωρίζονται σε υδατοδιαλυτά (βιταμίνη C) και σε λιποδιαλυτά (βιταμίνη A, βιταμίνη E, β-καροτένιο). Οι φυτικές φαινόλες είναι μια ετερογενής ομάδα διατροφικών αντιοξειδωτικών (Castanas et al., 2004).

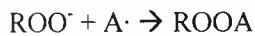
Η βιταμίνη C, γνωστή και ως ασκορβικό οξύ (ascorbic acid, AA), εκτός του ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, έχει και άλλες σημαντικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (συνένζυμο της υδροξυλάσης της προλίνης και της β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης). Ως αντιοξειδωτικό, αντιδρά με ελεύθερες ρίζες και παράγει τον μεταβολίτη δεϋδροασκορβικό οξύ (dehydroascorbic acid, DHA):



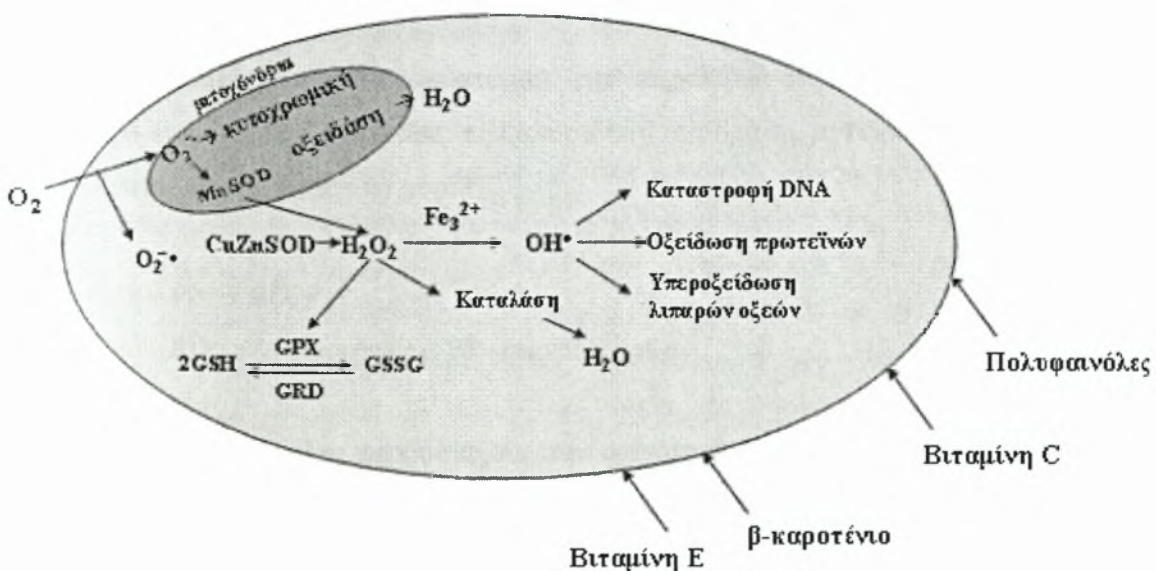
Το ασκορβικό οξύ αναγεννάται από τη γλουταθειόνη σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγάση του δεϋδροασκορβικού:



Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη, AH), προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Ως ισχυρά λιποδιαλυτή ουσία, συγκεντρώνεται στην διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών και στις λιποπρωτεΐνες. Μετατρέπεται σε μια λιγότερο ισχυρή ρίζα (A·), διακόπτοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση (Mylonas και Kouretas, 1999, *Aruoma*, 2003):



Η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα είναι δυνατόν να προστατεύει ένα σύστημα, αλλά να αποτυγχάνει να προστατεύσει ή και να προκαλεί βλάβη σε ένα άλλο. Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντική καθώς, μερικά αντιοξειδωτικά που αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση, μπορεί να μην προστατεύουν άλλους στόχους των ελευθέρων ριζών, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA και μερικές φορές μπορούν ακόμη και να βοηθούν στην καταστροφή τους. Παράδειγμα αποτελεί το Butylated hydroxyanisole (BHA), το οποίο ενώ θεωρείται ισχυρός αναστολέας της λιπιδικής υπεροξειδωσης, σύμφωνα με μελέτες, αποδείχτηκε ότι σε υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του στομάχου στα ποντίκια και η διαδικασία αυτή είναι πιθανόν να περιλαμβάνει οξειδωτική βλάβη στο DNA (Aruoma, 2003).



Εικόνα 1.7. Συνέπειες του οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου (τροποποιημ. εικόνα από Mylonas και Kouretas, 1999).

1.2.5.β. Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών

Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολών

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολών, μπορούν να προβλεφθούν, αν ληφθούν υπ' όψιν οι χημικές ιδιότητες τους ως δότες υδρογόνων του φαινολικού δακτυλίου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Για τον χαρακτηρισμό μιας φαινόλης ως αντιοξειδωτικό, πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις:

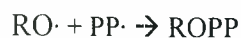
- α) βρισκόμενη σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχετικά με το υπόστρωμα που πρόκειται να οξειδωθεί, να μπορεί να καθυστερήσει, να αναβάλει ή και να προστατεύσει από την αυτοοξείδωση ή την μεσολαβούμενη από ρίζες οξείδωση
- β) το προκύπτον προϊόν της αντίδρασης θα πρέπει να είναι σταθερό (*Rice-Evans και συν., 1996*).

Εκτιμάται ότι οι περισσότερες βιολογικές δράσεις των φαινολικών ουσιών προκύπτουν εξ' αιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Η κύρια και βασική τους αντιοξειδωτική ικανότητα είναι η εξουδετέρωση ενδογενώς παραγόμενων ριζών και άλλων δραστικών μορφών ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$) (*Azam και συν., 2004*). Σημαντικός όγκος εργασιών αναφέρεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε *in vitro* πειράματα στο αρχικό (initiation) στάδιο, εξουδετερώνοντας το $O_2^{\cdot-}$ και το OH^{\cdot} , αλλά και «σπάζοντας» την αλυσιδωτή αντίδραση προσφέροντας άτομα υδρογόνου στην ρίζα υπεροξυλίου:



Όπου **RO[·]**: ρίζα υπεροξυλίου, **PPH**: πολυφαινόλη, **PP[·]**: φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που προκύπτει απ' την παραπάνω αντίδραση είναι σχετικά σταθερή. Επίσης δρα έτσι ώστε να τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση, αντιδρώντας με άλλες ρίζες και σχηματίζοντας ένα μη δραστικό μόριο:



Όπου **RO[·]**: ρίζα υπεροξυλίου, **PP[·]**: φαινολική ρίζα

Ορισμένες φαινόλες παρουσιάζουν την ικανότητα να επάγουν ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανφεράση της γλουταθειόνης, διευκολύνοντας την απέκκριση οξειδωτικών ουσιών, ή να επάγουν ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση, όπως η καταλάση και η αναγωγάση της γλουταθειόνης. Επίσης είναι πιθανό, να αναστέλλουν ένζυμα που εξαρτώνται από το κυτόχρωμα P450 (CYP) ή ένζυμα, όπως η κυκλοοξυγενάση, η λιποοξυγενάση, η

οξειδάση της ξανθίνης, τα οποία έχουν οξειδωτική δράση επειδή παράγουν ROS (*Rice-Evans και συν., 2001, Cook και Samman, 1996, Ferguson και συν., 2001*).

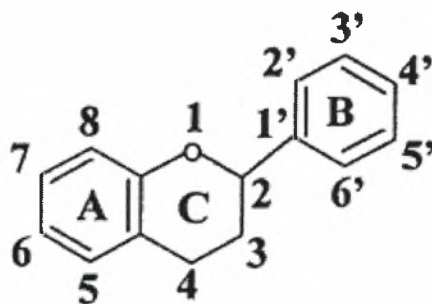
Η ικανότητα ορισμένων φαινολών να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα, είναι σημαντική, καθώς ο χαλκός και ο σίδηρος συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, η οποία είναι μια σημαντική πηγή ριζών οξυγόνου (*Cook και Samman, 1996, Rice-Evans και συν., 2001, Mylonas και Kouretas, 1999*).

Δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ουσιών

Η ικανότητα των φαινολών να προσφέρουν ηλεκτρόνια εξαρτάται από τη χημική του δομή. Συνοπτικά, τα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα τους είναι τα εξής:

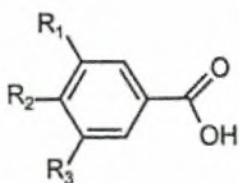
1. Η *όρθο*-υποκατάσταση του δακτυλίου B των φλαβονοειδών από υδροξυλομάδες, ιδιαίτερα στις θέσεις 3' και 5', καθώς και στις θέσεις 5 και 7 του A δακτυλίου, συνεισφέρει στη μετατόπιση του ηλεκτρονίου κατά τη δέσμευση με ρίζες (*Cook και Samman, 1996, Burda και Oleszek, 2001, Rice-Evans και συν., 2001, Sroka και Cisowski, 2003*). Η αντικατάσταση μιας υδροξυλομάδας από μια μεθυλομάδα μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα (*Cao και συν., 1996, Cook και Samman, 1996*), όπως παρατηρείται από την σύγκριση του καφεϊκού με το σιναπικό οξύ (*Soleas και συν., 1997*).
2. Ο 2, 3 διπλός δεσμός σε συνδυασμό με έναν καρβονυλικό δεσμό στη θέση 4 είναι υπεύθυνος για την μετατόπιση του ηλεκτρονίου από τον δακτύλιο B (*Burda και Oleszek, 2001, Rice-Evans και συν., 2001, Cook και Samman, 1996*). Η υδρογόνωση του δεσμού αυτού μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα (*Cook και Samman, 1996*).
3. Οι 3- και 5-υδροξυλικές ομάδες απαιτούνται για την αντιοξειδωτική δράση (*Burda και Oleszek, 2001, Rice-Evans και συν., 2001*). Τα φλαβονοειδή που έχουν 3- και 5-υδροξυλικές ομάδες και καρβονυλική ομάδα στη θέση 4, όπως η ρουτίνη και η κερκετίνη, μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου (*Cook και Samman, 1996*).
4. Ο βαθμός της υδροξυλίωσης είναι ανάλογος με την αντιοξειδωτική ικανότητα (*Burda και Oleszek, 2001, Rice-Evans και συν., 2001, Soleas και συν., 1997, Fukumoto και Mazza, 2001, Cook και Samman, 1996*), για παράδειγμα η καεμφερόλη, η κερκετίνη και η μυρικετίνη έχουν τέσσερις, πέντε και έξι υδροξυλομάδες αντίστοιχα και παρουσιάζουν αυξανόμενη δραστηριότητα (*Cao και συν., 1996*).
5. Η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την αντιοξειδωτική τους δράση (*Rice-Evans και συν., 2001*). Παρόλα αυτά, πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι τα γλυκοσίδια των φλαβονοειδών, όπως η κερκετίνη, υφίστανται υδρόλυση μέσα στον οργανισμό (*Cook και Samman, 1996*).

6. Η καρβονυλική ομάδα στη θέση 4 του δακτυλίου C αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η κατεχίνη στερείται C-4 καρβονυλίου και έχει χαμηλότερη ικανότητα δέσμευσης OH· σε σχέση με την κερκετίνη που έχει μια C-4 καρβονυλομάδα (Cook και Samman, 1996).
7. Ο πολυμερισμός των φλαβονοειδών αυξάνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Οι διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες είναι πιο αποτελεσματικές από μονομερή φλαβονοειδή στη δέσμευση ριζών σουπεροξειδίου και όσο αυξάνεται ο πολυμερισμός τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύουν διάφορες ελεύθερες ρίζες (Heim και συν., 2002).
8. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλομάδων που εστεροποιούνται (Rice-Evans και συν., 2001). Το λιγότερο δυο υδροξυλομάδες απαιτούνται για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης στα φαινολικά οξέα (Fukumoto και Mazza, 2001).
9. Η εισαγωγή σε θέση *όρθο* ή *πάρα* μιας υδροξυλικής ομάδας σε ένα μονοφαινολικό οξύ αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση. Έτσι το *p*-κουμαρικό οξύ είναι λιγότερο δραστικό από ότι το καφεϊκό (*όρθο*) ή το πρωτοκατεχοϊκό (*πάρα*) (Rice-Evans και συν., 2001).
10. Οι μεθοξυλικές ομάδες μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων (Fukumoto και Mazza, 2001), για παράδειγμα το σιναπικό οξύ είναι πιο δραστικό από ότι το φερουλικό και το φερουλικό είναι πιο δραστικό από ότι το *p*-κουμαρικό οξύ (Rice-Evans και συν., 2001).
11. Η παρουσία ομάδων $-CH=CH-COOH$ στα κινναμικά οξέα τα καθιστά περισσότερο δραστικά από ότι τα βενζοϊκά οξέα (Fukumoto και Mazza, 2001, Rice-Evans και συν., 2001).

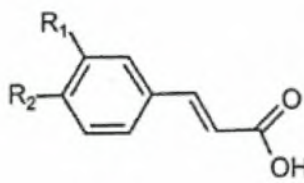


Εικόνα 1.8. Γενική δομή των φλαβονοειδών (Cook και Samman, 1996).

ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΑ ΟΞΕΑ



ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ



Εικόνα 1.9. Δομή φαινολικών οξέων (Manach και συν., 2004).

1.2.5.γ. Προοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών

Παράλληλα με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα που παρουσιάζουν, οι φαινολικές ουσίες μπορούν να συμπεριφερθούν και ως προοξειδωτικά. Η προ-οξειδωτική τους δραστηριότητα είναι πιθανόν να συνεισφέρει σε ορισμένες θεραπευτικές ιδιότητες που αποδίδονται σε αυτές και να συσχετίζεται με την αντικαρκινική τους δράση (*Azam και συν., 2003*).

Οι φαινολικές ρίζες που σχηματίζονται μέσω οξειδωτικών διαδικασιών έχουν συσχετιστεί με την άμυνα των φυτών ενάντια σε παθογόνα. Επίσης έχει παρατηρηθεί αύξηση των πολυφαινολών ως απόκριση σε τραυματισμό και οξείδωση τους κατά την καταστροφή φυτικών ιστών (*Sakihama και συν., 2002*).

Η προοξειδωτική δραστηριότητα των φαινολών βασίζεται στην ικανότητα τους να ανάγουν τα μέταλλα σχηματίζοντας με αυτά χηλικές ενώσεις και να ανάγουν το O₂. Η αντίδραση με το O₂ εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική ισχύ και τον χρόνο ημιζωής της φαινολικής ρίζας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής της φαινολικής ρίζας τόσο πιθανότερο είναι η ρίζα να αλληλεπιδράσει με το O₂ και με άλλα μόρια και να οδηγήσει στον σχηματισμό νέων ελευθέρων ριζών. Ο χρόνος ημιζωής των φαινολικών ριζών παρατείνεται από τη σύνδεσή τους με μέταλλα. Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, η έκθεση σε μέταλλα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών στους φυτικούς οργανισμούς. Είναι πιθανόν, η συσσώρευση μετάλλων να συμπληρώνει την κυτταροτοξική δραστηριότητα των φαινολών ενάντια σε παθογόνα (*Sakihama και συν., 2002*). Τα φλαβονοειδή μπορούν να αυτοοξειδωθούν σε υδατικά μέσα και να σχηματίσουν πολύ δραστικές ρίζες παρουσία Cu²⁺ (*Bhosle και συν., 2005*). Η προοξειδωτική τους δραστηριότητα παρουσία Cu²⁺ μεγαλώνει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή τους (*Cao, και συν., 1996*).

Φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη και η καεμπερόλη, προκαλούν βλάβη στο DNA και λιπιδική υπεροξειδωση παρουσία μετάλλων μετάπτωσης (*Cao και συν., 1996, Ferguson, 2001*). Έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ φαινολών με χαλκό συνδεδεμένο με DNA μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση βάσεων, σε σπασίματα στις αλυσίδες του DNA και σε σχηματισμό συμπλεγμάτων DNA (DNA adducts) (*Sakihama και συν., 2002*). Έτσι, τα φλαβονοειδή έχουν δύο αντίθετες δράσεις παρουσία Cu²⁺, H₂O₂ και O₂, αφενός την απορρόφηση των ριζών υδροξυλίου και των άλλων ελευθέρων ριζών που παράγονται από την αντίδραση μεταξύ Cu²⁺, H₂O₂ και O₂ και αφετέρου την παραγωγή δραστικών ομάδων μέσω της αντίδρασης μεταξύ Cu²⁺ φλαβονοειδών και O₂ (*Cao και συν., 1996*). Η ισορροπία ανάμεσα στην αντιοξειδωτική και στην προοξειδωτική δραστηριότητα που παρουσιάζουν εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους αλλά και από τη συγκέντρωση και την πηγή των ελευθέρων ριζών (*Galati και O' Brien, 2004*). Η

προοξειδωτική δραστηριότητα που προκαλείται από την αυτοοξειδωση τους μπορεί να μην είναι σημαντική *in vivo* όταν ο Cu^{2+} δεσμεύεται σε μεγάλο βαθμό (Chan, 1999). Ο φαινολικός δακτύλιος που περιέχουν τα φλαβονοειδή μπορεί να δράσει και ως υπόστρωμα των υπεροξειδασών και των μεταλλοενζύμων παράγοντας φαινολικές ρίζες (Bhosle και συν., 2005). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι, παρουσία μονοξειδίου του αζώτου (NO), μερικά φλαβονοειδή είναι πιθανόν να δρουν ως προοξειδωτικά (Ferguson, 2001).

1.2.5.δ. Αντικαρκινική δράση φαινολικών ουσιών

Η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή εξεργασία, η οποία προκαλείται κυρίως από καρκινογόνα που οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου. Το πρώτο στάδιο (initiation) της καρκινογενετικής εξεργασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε έναν προγενήτορα (stem cell), δίνοντάς του την ικανότητα της συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal). Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο (προαγωγή ή promotion) της καρκινογενετικής εξεργασίας είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικώς μεταλλαγμένων κυττάρων (initiated cells), μέσω επίδρασης παραγόντων που προάγουν τη μίτωση (προαγωγείς). Στο τρίτο στάδιο (πρόοδος ή progression), το μεταλλαγμένο κύτταρο που εξαρτάται από τον προαγωγέα, γίνεται ανεξάρτητο, καρκινικό κύτταρο (Κουρέτας, 2003). Εκτενής έρευνα τα τελευταία χρόνια εστιάζει στο γεγονός ότι η συστηματική κατανάλωση ορισμένων φρούτων και λαχανικών, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων καρκίνων (Dorai και Aggarwal, 2004). Επίσης, *in vivo* πειράματα έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν την καρκινογένεση και στα τρία στάδιά της (initiation, promotion, progression) (Ren και συν., 2003).

Συχνά, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι ανεπαρκείς και η καταστροφή από τις ROS συσχετίζεται με την καρκινογένεση. Οι ROS μπορούν να βλάψουν το DNA, καθώς και να επέμβουν στην κυτταρική διαίρεση οδηγώντας σε μεταλλάξεις. Αν αυτές συμβούν σε κρίσιμα γονίδια, όπως τα ογκογονίδια, ή τα ογκοκατασταλτικά, μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο στο δεύτερο ή στο τρίτο στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας. Επίσης, οι ROS μπορούν να επηρεάσουν την διακυτταρική επικοινωνία και την κυτταρική ανάπτυξη. Η κυτταρική ζημιά που προκαλείται από τις ROS, μπορεί να επάγει τη μίτωση, αυξάνοντας τον κίνδυνο για μεταλλάξεις (Nijveldt και συν., 2001). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών συνεισφέρει στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, μειώνοντας την έκθεση των κυττάρων σε αυτές. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι κυρίως η προοξειδωτική παρά η αντιοξειδωτική τους δράση συνεισφέρει στις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και την ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση (Kamra και συν., 2004).

Ιδιότητες των φαινολών, όπως η παραγωγή ROS οι οποίες μεσολαβούν στην κατακερμάτιση του DNA που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου, η πρόσδεση και ο σχηματισμός ρωγμών στο DNA είναι παρόμοιες με ιδιότητες γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων. Επίσης, οι προοξειδωτικές φαινολικές ρίζες, προκαλούν τοξικότητα στα μιτοχόνδρια, αλλάζοντας το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (*Galati και O' Brien, 2004*). Όταν αλλάζει η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθερώνονται αποπτωτικοί παράγοντες, όπως το κυτόχρωμα *c*, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση (*Goldstein και συν., 2000*). Η απόπτωση είναι ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που εξασφαλίζει ότι κύτταρα με γενετικές βλάβες δεν θα επιβιώσουν για να πολλαπλασιαστούν, προστατεύοντας από την επιπλέον γενετική αστάθεια (*Ferguson, 2001*).

Πέρα όμως από τον ρόλο τους ως αντιοξειδωτικά ή προοξειδωτικά, πιθανόν να έχουν και ρυθμιστική δράση μέσα στα κύτταρα επηρεάζοντας ένζυμα και ρυθμιστικά μονοπάτια (Εικόνα 1.10.). Η βάση για αυτή τη θεωρία είναι ότι τα φλαβονοειδή και οι μεταβολίτες τους βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις συγκριτικά με άλλα αντιοξειδωτικά, για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ, αλλά οι συγκεντρώσεις αυτές μπορεί να είναι αρκετά υψηλές έτσι ώστε επηρεάζουν τη λειτουργία ενός ενζύμου ή ενός υποδοχέα, επιδρώντας στη λειτουργία του κυττάρου (*Williams και συν., 2004*).

Σε μελέτες *in vivo* και *in vitro* έχει αποδειχτεί ότι ορισμένα φλαβονοειδή ρυθμίζουν τον μεταβολισμό και τη διάθεση διάφορων ξеноβιοτικών ουσιών, ορισμένες από τις οποίες είναι καρκινογόνες (*Ren και συν., 2003*). Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα φλαβονοειδή ασκούν *in vivo* την χημειοπροστατευτική τους δράση είναι η αναστολή των ενζύμων της φάσης I του μεταβολισμού, όπως για παράδειγμα τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP), τα οποία ενεργοποιούν μεταβολικά ορισμένα προκαρκινογόνα (*Galati και O' Brien, 2004*). Η γαλαγγίνη (*galangin*) έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλει το CYP1A1, προλαμβάνοντας τον μεταβολισμό και την ενεργοποίηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (*Hodek και συν., 2002*). Αναφέρεται ότι τα φλαβονοειδή είναι πιθανοί αναστολείς του συμπλέγματος των ενζύμων της αρωματάσης που συνθέτουν οιστραδιόλη, η οποία βιοσυντίθεται από τα ανδρογόνα. Τα οιστρογόνα συσχετίζονται με καρκίνους στα θηλαστικά (*Ren και συν., 2003*).

Ένας άλλος μηχανισμός που πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών είναι η επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η UDP γλυκουρονυλτρανσφεράση, μέσω των οποίων τα καρκινογόνα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται ευκολότερα απ' τον οργανισμό (*Ren και συν., 2003*).

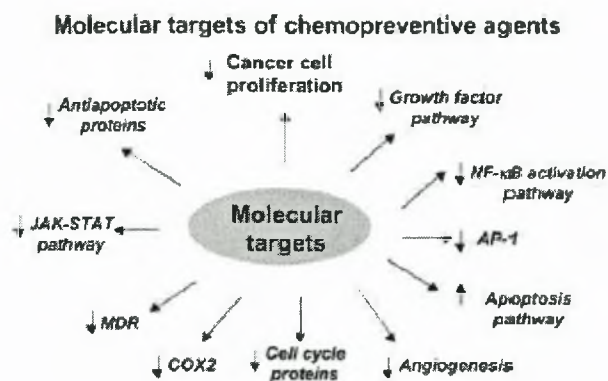
Σημείο κλειδί στην καρκινογενετική διαδικασία είναι ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, όπου τα φλαβονοειδή δρουν ως αναστολείς. Τα κυτταρικά σήματα για τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό παράγονται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο υποδοχέας του EGF (epidermal growth factor) και ο υποδοχέας του IGF-1 (insulin-like growth factor-1), οι οποίοι αποτελούν τους βασικούς υποδοχείς που οδηγούν στην καρκινογένεση σε πολλούς καρκίνους. Τα φλαβονοειδή έχουν βρεθεί να δρουν ως αναστολείς πολλών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του EGFR (epidermal growth factor receptor). Ένας ακόμη μοριακός στόχος των πολυφαινόλων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, στη φλεγμονή, στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη. Η AP-1 (Activated protein-1), είναι άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και αποτελείται από τις πρωτεΐνες JUN και FOS. Οι κατεχίνες, το καφεϊκό οξύ, η ρεσβερατρόλη είναι γνωστοί αναστολείς της διαδικασίας ενεργοποίησης του NF-κB και της AP-1.

Επίσης, τα φλαβονοειδή αναστέλλουν ένζυμα που παίρνουν μέρος στη μεταγωγή σημάτων ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως η πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης (PTK) και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (*Weber και συν., 1997*), αλλά και ένζυμα που αλληλεπιδρούν με το DNA, όπως οι τοποϊσομεράσες. Οι τοποϊσομεράσες (τοποϊσομεράση I/II) είναι ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA, παρόλα αυτά μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία μεταλλάξεων μέσω ορισμένων ενώσεων που ονομάζονται “topoI/II poisons”. Ένας μηχανισμός της αντιμεταλλαξιόνου δράσης ορισμένων πολυφαινόλων είναι η αναστολή των τοποϊσομεράσεων (*Stagos και συν., 2005*) και των “topoI/II poisons” (*Ferguson, 2001*).

Ορισμένες μεταβολές στις λειτουργίες του κυττάρου είναι πολύ κρίσιμες και εμφανίζονται πιθανώς σε όλες τις μορφές καρκίνου. Αφορούν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ιδιαίτερα στα ρυθμιστικά σημεία ελέγχου (control checkpoints). Ορισμένες πολυφαινόλες επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο, σταματώντας τον στα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M, πιθανώς δρώντας ως αναστολείς των κυκλίνων CDK1 και CDK2 (*Casagrande και συν., 2001*).

Τέλος, η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης στον καρκίνο οδηγεί στην τροφοδότηση των καρκινικών κυττάρων που ευνοεί την ανάπτυξή τους. Η αγγειογένεση φυσιολογικά είναι αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, που ρυθμίζεται από αγγειογενετικούς και αγγειοστατικούς παράγοντες. Ενώ πολλοί αναστολείς της αγγειογένεσης βρίσκονται υπο κλινικές δοκιμές, είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι πολλές χημειοπροστατευτικές φυτοχημικές ουσίες, όπως η κουρκουμίνη (curcumin), η ρεσβερατρόλη και η κατεχίνη, είναι ικανές να αναστείλουν τα μονοπάτια ενεργοποίησης της αγγειογένεσης (*Fotsis και συν., 1997*).



Εικόνα 1.10. Μοριακοί στόχοι χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Dorai και Aggarwal, 2004).

1.2.5.ε. Αντιφλεγμονώδης δράση φαινολικών ουσιών

Τη χρόνια φλεγμονή συνοδεύει η υπερπαραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα μακροφάγα, διαδικασία που απαιτεί την ενεργοποίηση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου. Ορισμένες πολυφαινόλες αναστέλλουν την δράση του ενζύμου αυτού και προστατεύουν το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες, δρώντας ως αντιφλεγμονώδεις ουσίες (Ferguson, 2001).

Η κυκλοοξυγενάση και η λιποξυγενάση παίζουν σημαντικό ρόλο ως μεσολαβητές της φλεγμονής. Εμπλέκονται στην απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος, το οποίο αποτελεί το σημείο εκκίνησης για την απόκριση στη φλεγμονή. Τα ουδετερόφιλα που περιέχουν λιποξυγενάση παράγουν χημειοτακτικούς παράγοντες από το αραχιδονικό οξύ. Προκαλούν επίσης την απελευθέρωση κυτοκινών. Έχει αποδειχτεί ότι φαινολικές ενώσεις αναστέλλουν τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται η κυκλοοξυγενάση και η 5-λιποξυγενάση με επακόλουθη μείωση της απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος (Layghton και συν., 1991).

Επίσης, άλλη μια αντιφλεγμονώδης δράση των φλαβονοειδών περιλαμβάνει την αναστολή της βιοσύνθεσης των εικοσανοειδών. Τα εικοσανοειδή, όπως οι προσταγλαδίνες, εμπλέκονται σε ποικίλες ανοσολογικές αποκρίσεις και είναι τα τελικά προϊόντα των μονοπατιών της λιποξυγενάσης και της κυκλοοξυγενάσης (Damas και συν., 1985). Τέλος, τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων, δράση που μειώνει άμεσα την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (Nijveldt και συν., 2001).

1.2.5.στ. Καρδιοπροστατευτική δράση φαινολικών ουσιών

Τα αυξημένα επίπεδα LDL (low density lipoprotein) στο πλάσμα συσχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση, η οποία είναι η κύρια αιτία πολλών καρδιαγγειακών ασθενειών. Η αθηροσκλήρυνση είναι μια φλεγμονώδης ασθένεια. Η διαδικασία ξεκινά από τη συσσώρευση

οξειδωμένης LDL στην εσωτερική στιβάδα των τοιχωμάτων των αρτηριών και επακόλουθη πρόσληψή τους από τα μακροφάγα. Η LDL μπορεί να οξειδωθεί από ελεύθερες ρίζες ή από οξειδωτικά ένζυμα και η συσσώρευσή της προσελκύει μονοκύτταρα στην περιοχή αυτή. Τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, φτάνουν στην εσωτερική στιβάδα και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία εγκολπώνουν την LDL σχηματίζοντας τα αφρώδη κύτταρα, χαρακτηριστικά συστατικά των αρχικών αθηροσκληρωτικών θρόμβων. Τα αφρώδη κύτταρα υφίστανται απόπτωση απελευθερώνοντας ελεύθερες ρίζες, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην περαιτέρω οξείδωση των LDL. Κατά την πρόοδο της διαδικασίας αυτής, συσσωρεύονται λεία μυϊκά κύτταρα, κολλαγόνο και αιμοπετάλια, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαμέτρου των αγγείων και ως εκ τούτου μείωση της ροής του αίματος (*Rasmussen και συν., 2005*).

Πολλαπλές μελέτες έχουν ως επίκεντρο την κατανάλωση φλαβονοειδών και την προστασία απ' τις καρδιαγγειακές ασθένειες. Τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση της LDL με διάφορους τρόπους. Εξ' αιτίας των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων εξουδετερώνουν τις σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες ή προστατεύουν την βιταμίνη E από την οξείδωση, καθυστερώντας την λιπιδική υπεροξείδωση (*Rasmussen και συν., 2005, Lamuela-Raventos και συν., 1999*). Τα φλαβονοειδή που δεν περιέχουν σάκχαρα στο μόριό τους, όπως οι κατεχίνες, είναι λιπόφιλα μόρια, λιγότερο όμως απ' ότι η βιταμίνη E. Αναφέρεται ότι οι κατεχίνες μπορεί να είναι τοποθετημένες κοντά στη επιφάνεια μεμβρανών εξουδετερώνοντας υδρόφιλες ρίζες που προκύπτουν από το κυτταρόπλασμα και εμποδίζοντας την κατανάλωση της βιταμίνης E, ενώ η τελευταία κυρίως δρα μέσα στις μεμβράνες (*Nijveldt και συν., 2001*). Εναλλακτικά, μπορούν να αναγεννήσουν την βιταμίνη E δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου στην ρίζα της βιταμίνης E.

Η συσσώρευση αιμοπεταλίων συνεισφέρει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης και στο σχηματισμό θρόμβων με επακόλουθη στένωση αρτηριών. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο και παράγουν λιπιδικά υπεροξείδια, ελεύθερες ρίζες και μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως θρομβοξάνη A₂ και σεροτονίνη. Επίσης, το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται κατά τη φλεγμονή προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (*Hertog και συν., 1995*). Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, επίσης, εμφανίζουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (*Ruf και συν., 1999*).

1.3. Κρασί και φαινολικές ουσίες

Το ενδιαφέρον γύρω από το κρασί και τις φαινόλες που αυτό περιέχει αυξήθηκε μετά την δημοσίευση πολλών μελετών που συσχετίζουν την μέτρια κατανάλωση κρασιού με την μειωμένη εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (*Huisman και συν., 2004, Renaud και de Lorgeril, 1992*). Η ιστορία όμως του κρασιού πιστεύεται ότι ξεκινά χιλιάδες χρόνια πριν. Οι ιστορικοί πιστεύουν ότι υπάρχει πιθανότητα, οι πρωτόγονοι πληθυσμοί της Ευρασιατικής ηπείρου, να έπιναν ποτά που προέρχονταν από ζύμωση χαλασμένων φρούτων πολύ πριν καλλιεργηθούν τα πρώτα σταφύλια γύρω στα 7,000 χρόνια πριν. Τα απολιθώματα που έχουν βρεθεί στην περιοχή γύρω από την Κασπία θάλασσα είναι τα επιστημονικά στοιχεία που αποδεικνύουν την ύπαρξη τους από τότε. Οι αρχαιολόγοι έχουν βρει δοχεία κρασιού 6000-7000 χρόνων, υποθέτοντας ότι τα πρώτα κρασιά παρασκευάστηκαν στην Μέση ανατολή από σταφύλια, σύκα και χουρμάδες. Η τέχνη της καλλιέργειας σταφυλιού εξαπλώθηκε με τους μεταναστευτικούς λαούς, ιδιαίτερα με τους Εβραίους (στη Βίβλο αναφέρεται ότι ο Νώε καλλιεργούσε σταφύλια και έφτιαχνε κρασί). Κατά τον αποικισμό της Βορείου Αμερικής οι Ευρωπαίοι άποικοι βρήκαν χωράφια με άγρια σταφύλια, όπως και οι Βίκινγκς όταν έφτασαν στον Ανατολικό Καναδά. Παρόλα αυτά, τα πρώτα κρασιά που έγιναν από τα τοπικά αμερικάνικα είδη (*Vitis labrusca*), ήταν κατώτερα από αυτά που παράγονταν από τα Ευρωπαϊκά σταφύλια (*Vitis vinifera*) (*Derrida, 2003*).

Έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί πάνω από πεντακόσιες ενώσεις στο κρασί, από τις οποίες εκατόν εξήντα είναι εστέρες. Οι πλειοψηφία αυτών των ενώσεων βρίσκεται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10^{-1} και 10^{-6} mg/L. Η γεύση του κρασιού επηρεάζεται κυρίως από λίγα συστατικά, τα οποία βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100mg/L. Στα συστατικά αυτά συμπεριλαμβάνεται το νερό, η αιθανόλη, τα οργανικά οξέα, ορισμένα σάκχαρα και γλυκερόλη. Οι ταννίνες υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στο κόκκινο κρασί και σπανίως στο λευκό. Οι φαινόλες, οι λακτόνες, τα τερπένια και οι υδρογονάνθρακες βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις, αλλά είναι σημαντικές ενώσεις που συμβάλλουν στην ποιότητα και τη χαρακτηριστική γεύση και οσμή ενός κρασιού (*Soleas και συν., 1997*).

Το κόκκινο κρασί και ο χυμός σταφυλιών περιέχει πάνω από 500mg/L φλαβονοειδών, ενώ η μύρα και το λευκό κρασί περιέχουν λιγότερο από 60mg/L (*van de Wiel και συν., 2001*). Τα φαινολικά συστατικά του κόκκινου κρασιού προέρχονται από τη φλούδα, τον καρπό και τον μίσχο των σταφυλιών, τα οποία είναι πλούσιες πηγές φλαβονολών και παραμένουν μαζί με τον χυμό των σταφυλιών κατά την πρώτη ζύμωση του κρασιού. Σε αντίθεση με τα κόκκινα κρασιά, τα λευκά παράγονται μόνο από τον χυμό των σταφυλιών, χωρίς να υπάρχει καμιά επαφή με την φλούδα. Αυτός πιστεύεται ότι είναι ο κύριος λόγος για τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε

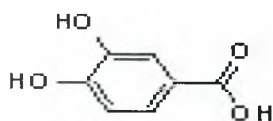
φαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα του λευκού κρασιού σε σχέση με το κόκκινο κρασί (Furman et al., 2001). Ωστόσο η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του κρασιού δεν επηρεάζεται μόνο από την περιεκτικότητα των πολυφαινόλων, αλλά και από το έτος παραγωγής, την ποικιλία των σταφυλιών, την διαδικασία παραγωγής κρασιού και τις συνθήκες ωρίμανσης (Davalos και συν., 2004). Επίσης, πλούσια σε αντιοξειδωτικά κλάσματα μπορούν να εκχυλιστούν από τα στέμφυλα (ξερά υπολείμματα των σταφυλιών) χρησιμοποιώντας διαλύτες, όπως οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και νερό. Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα, χρησιμοποιώντας μεθανόλη επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόδοση φαινολικών συστατικών (Murthy και συν., 2002).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κρασιού οφείλεται κυρίως στα μη αλκοολικά συστατικά και κυρίως στις πολυφαινόλες (van de Wiel και συν., 2001). Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κρασιού είναι μεγαλύτερη από την αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες του μεμονωμένες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του μπορεί να φέρνει στην επιφάνεια δράσεις που δεν έχουν απαραίτητα τα συστατικά του ξεχωριστά (Tedesco και συν., 2000).

Εκτός από τις καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές τους δράσεις, οι φαινολικές ουσίες του κρασιού μπορούν να προκαλέσουν μεταλλαξιογένεση (Partineli και συν., 1996) ή κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα *S. Typhimurium* (Aiub και συν., 2004).

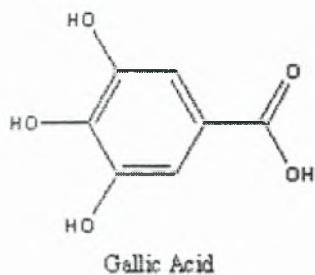
1.4. Φαινολικές ουσίες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Πρωτοκατεχοϊκό οξύ



Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, (3,4-dihydroxybenzoic acid) είναι ένα βενζοϊκό παράγωγο που βρίσκεται σε φρούτα, φυτά, λαχανικά, στο μαύρο ρύζι, στο λευκό κρασί και στο τσάι. Οι μελέτες γύρω από την βιολογική του δράση είναι αντιφατικές. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες μειώνοντας την μεταλλαξιογένεση και την καρκινογένεση, ρυθμίζοντας τη δράση των ενζύμων της φάσης I και της φάσης II (Kuzniak και συν., 2005) και μειώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Suzuki και συν., 2003). Σύμφωνα με άλλες όμως μελέτες, ενίσχυε την χημικά επαγόμενη καρκινογένεση του δέρματος, προκαλεί ζημιά στα χρωμοσώματα των ωαρίων κινέζικων χάμστερ και δεν προστατεύει από την χημικά επαγόμενη καρκινογένεση των πνευμόνων (Babich και συν., 1996).

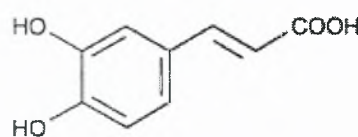
Γαλλικό οξύ



Το γαλλικό οξύ (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) βρίσκεται σε αφθονία στο τσάι και ιδιαίτερα στα φύλλα του σε ελεύθερη μορφή ή δεσμευμένο σε ταννίνες. Έχει ανιμυκητισιακές και αντιϊικές ιδιότητες. Είναι ιδιαίτερα ισχυρό αντιοξειδωτικό, σε μεγαλύτερο βαθμό από το trolox προστατεύοντας τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες.

Εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Sohi και συν., 2003) και στα προμυελωτικά HL-60RG κύτταρα στη λευχαιμία (Inoue και συν., 1994). Οι ιδιότητές του πιθανώς βασίζονται στην κυτταροτοξικότητα απέναντι στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τα υγιή (Shahrzad και συν., 2001).

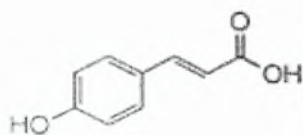
Καφεϊκό οξύ



Το καφεϊκό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της λιγνίνης και στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Έχει αντιοξειδωτικές

ιδιότητες, αλλά εμφανίζει και κυτταροτοξικότητα (Lim και συν., 2003). Ο καφεϊκός φαινυλεστέρας (caffeic phenethyl ester, CAPE), ο οποίος βρίσκεται στην πρόπολη, και άλλοι εστέρες του καφεϊκού οξέος, παρουσιάζουν αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Wang και συν., 2005).

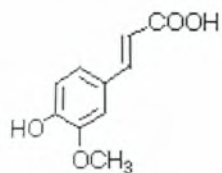
Κουμαρικό οξύ



Το *p*-κουμαρικό οξύ (4-hydroxycinnamic acid) υπάρχει στα μήλα, στα αχλάδια, στα φασόλια, στις ντομάτες και στο τσάι. Έχει αντιοξειδωτικές ικανότητες, ιδιαίτερα σημαντικές για την προστασία

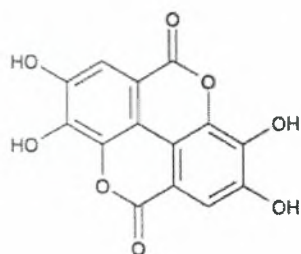
της LDL από την οξείδωση, όπου το *p*-κουμαρικό οξύ τερματίζει την αλυσίδα των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Zang και συν., 2000).

Φερουλικό οξύ



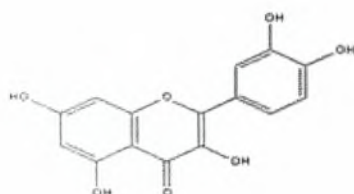
Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο υδροξυκιναμικό οξύ. Μία από τις κύριες πηγές φερουλικού οξέος είναι το πίτουρο του σιταριού (5mg/g) (Scalbert και Williamson, 2000). Τα διμερή του φερουλικού οξέος είναι σημαντικά δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνδέονται μέσω εστερικών δεσμών με τις ημικυτταρίνες (Mathew και Abraham, 2005). Απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες σταματώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (Graf, 1992).

Ελλαγικό οξύ



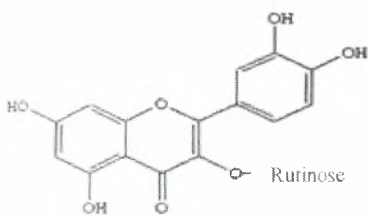
Το ελλαγικό οξύ βρίσκεται στα σμέουρα, στις φράουλες και στα καρύδια και παράγεται κυρίως από την υδρόλυση των ελλαγιταννίνων. Είναι γνωστό ότι αναστέλει ορισμένους τύπους καρκίνου που προκαλούνται από καρκινογόνες ενώσεις. Έχει βρεθεί ότι αναστέλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση. Πιθανώς να εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της ενεργοποίησης αναστολέων των CDKs (Narayanan και συν., 1999). Έχει επίσης παρουσιάσει προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στη νεοπλασία που προκαλείται από το benzo[a]pyrene στα ποντίκια (Bhosle και συν., 2005).

Κερκετίνη



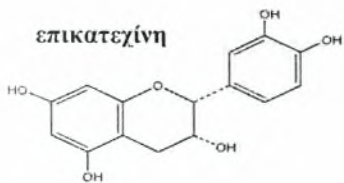
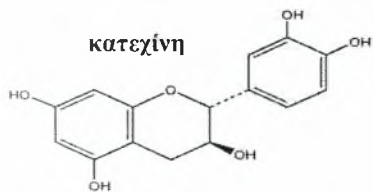
Η κερκετίνη είναι ένα από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή. Τρόφιμα πλούσια σε κερκετίνη, όπως τα κρεμμύδια και το κόκκινο κρασί, έχει αποδειχτεί από μελέτες σε ανθρώπους ότι καθυστερούν την οξείδωση της LDL μετά τη χορήγησή τους (Lamuela-Raventos και συν., 1999). Παρόλο που η δράση της πιστεύεται ότι οφείλεται στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι παρουσιάζει και προοξειδωτική δράση, δρώντας κυτταροτοξικά. Μπορεί να δράσει τόσο ως αντιοξειδωτικό, όσο και ως προοξειδωτικό ανάλογα με τη συγκέντρωσή της και την συγκέντρωση και την πηγή των ελευθέρων ριζών σε θυμοκύτταρα ποντικίου (Lee και συν., 2003). Η κερκετίνη έχει αντικαρκινικές ιδιότητες επάγοντας την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα (Fillipe και συν., 2004).

Ρουτίνη



Η ρουτίνη είναι ένα γλυκοσυλιωμένο φλαβονοειδές, παράγωγο της κερκετίνης. Βρίσκεται σε πολλά φυτά, στο μαύρο τσάι και τα μήλα. Έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες (νιτροσυλίωση), η ρουτίνη, όπως και η κερκετίνη, δρα προοξειδωτικά. Παρόλα αυτά, ρουτίνη εμφανίζει μικρότερη μεταλλαξιογόνο δράση σε σχέση με την κερκετίνη (*Undeger και συν., 2004*).

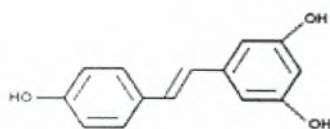
Κατεχίνη και Επικατεχίνη



Η κατεχίνη και η επικατεχίνη βρίσκονται κυρίως στο κόκκινο κρασί και στο πράσινο τσάι. Το πράσινο τσάι περιέχει κατεχίνες, επικατεχίνες και παράγωγά τους, ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιαγγειογενετική δραστηριότητα και μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε πολλές μορφές καρκίνου. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση ορισμένων παραγώγων τους, όπως η epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (*Huh και συν., 2004*). Η

επικατεχίνη προστατεύει τη ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων όχι μόνο δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και εμποδίζοντας την παραγωγή NO από την NO συνθάση (*Steffen και συν., 2005*). Η κατεχίνη εμφανίζει κυτταροπροστατευτική δράση από τις ελεύθερες ρίζες στα κύτταρα της μικρογλοίας (*Huang και συν., 2005*).

Ρεσβερατρόλη



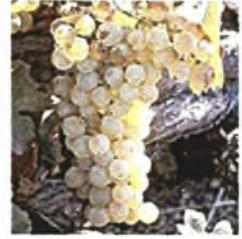
Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στα σταφύλια, στο κρασί, στα φυστίκια και σε πολλά φυτά. Έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών εξ' αιτίας των αντικαρκινικών και καρδιοπροστατευτικών της ιδιοτήτων. Πιστεύεται ότι οι βιολογικές της δράσεις οφείλονται στις

αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, παρόλα αυτά έχει αναφερθεί και προοξειδωτική δράση, ιδιαίτερα παρουσία ιόντων χαλκού (*Ahmad και συν., 2005*). Η αντικαρκινική της δράση πιθανώς να οφείλεται στη δράση της ως ανασταλτικός παράγοντας του πρώτου σταδίου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι καταστέλλει με εξειδίκευση την μεταγραφική ενεργοποίηση ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (*Bhat και Pezzuto, 2005*).

1.5. Εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Ασύρτικο Σαντορίνης (λευκά σταφύλια)

Η ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης βρίσκεται στις Κυκλάδες, κυρίως στη Σαντορίνη και στην Πάρο. Τα σταφύλια χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο οξύτητας και παράλληλα υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Το κρασί που παράγεται είναι ξηρό και έχει τη δυνατότητα να διατηρεί την οξύτητά του καθώς ωριμάζει. Οι ιδιότητες του επηρεάζονται από το ηφαιστειακό έδαφος της Σαντορίνης.



Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια)

Κατατάσσεται ανάμεσα στις ποικιλίες της Μεσογείου με το πλουσιότερο χρώμα. Η Μανδηλαριά αρχικά καλλιεργήθηκε στα νησιά των Κυκλάδων, στη Ρόδο και στην Κρήτη. Είναι πιθανόν μια από τις πιο παλιές ποικιλίες στην Ελλάδα, ενώ πιστεύεται ότι οι ρίζες της βρίσκονται στην αρχαιότητα. Το κρασί που προκύπτει από την ποικιλία αυτή, είναι ξινό στη γεύση, έχει μικρή έως μέτρια περιεκτικότητα σε αλκοόλ, πλούσιο χρώμα και πληθώρα ταννίνων.



1.6. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν διττός. Αφενός, επιδιώχθηκε να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ορισμένων καθαρών φυτικών φαινολικών ουσιών, εκχυλισμάτων δύο ποικιλιών αμπέλου *Vitis Vinifera*, του Ασύρτικου Σαντορίνης (λευκά σταφύλια) και της Μανδηλαριάς Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια), καθώς επίσης και τριών κλασμάτων των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης. Ο δεύτερος στόχος ήταν να διευκρινιστεί αν υπάρχουν συνεργικές δράσεις μεταξύ των καθαρών φαινολών, διότι στις φυτικές τροφές και στα παράγωγά τους, ένα από τα οποία είναι και το κρασί, οι ουσίες αυτές παρουσιάζονται ως μείγματα. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολών, των κλασμάτων και των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά τους να «προσφέρουν» ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα ηλεκτρόνιο) στην οργανική νιτρική ρίζα DPPH και εκφράστηκε ως IC₅₀. Η πιθανή συνεργική δράση, μπορεί να αποτελεί εξήγηση της αυξημένης αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρουσιάζει το κρασί σε σχέση με τη μεμονωμένη δράση των φαινολικών ουσιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

Αντιδραστήρια: Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι φαινολικές ουσίες: πρωτοκατεχοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ, κερκετίνη, επικατεχίνη, κατεχίνη, ρεσβερατρόλη και ρουτίνη, οι οποίες αγοράστηκαν από την Sigma Chemicals Co. (Η.Π.Α.). Από την ίδια εταιρεία αγοράστηκε η σταθερή ελεύθερη ρίζα 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Από τους διαλύτες, η απόλυτη αιθανόλη αγοράστηκε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Germany), ενώ το dimethylsulfoxide (DMSO) από την Fluka (Switzerland).

Εκχυλίσματα: Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν απομονώθηκαν από δύο ποικιλίες αμπέλου, από την ποικιλία **Ασσύρτικο Σαντορίνης** (άσπρα σταφύλια) και την **Μανδηλαριά Σαντορίνης** (κόκκινα σταφύλια). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου και μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κλάσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης :

- Μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα
- Μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα
- Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) από υδατικό εκχύλισμα

Η απομόνωση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων καθώς και ο καθορισμός της σύστασής τους (Πίνακας 2.1, Πίνακας 2.2, Πίνακας 2.3, Πίνακας 2.4) πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 2.1. Σύσταση Υδατικού Εκχυλίσματος της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης.

	M.B.	mg/g	μmol/g
Γαλλικό οξύ	170,10	0,48	2,82
Κατεχίνη	290,30	4,09	14,09
Επικατεχίνη	290,27	2,10	7,23
trans-ρεσβερατρόλη	228,20	0,02	0,09
Κερκετίνη	338,26	0,03	0,09
Βινιφερίνη	439,00	0,06	0,14
Σύνολο		6,78	24,46

Πίνακας 2.2. Σύσταση Μεθανολικού Εκχυλίσματος της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης.

	M.B.	mg/g	μmol/g
Γαλλικό οξύ	170,10	1,45	8,52
Κατεχίνη	290,30	1,56	5,37
Επικατεχίνη	290,27	0,63	2,17
trans-ρεσβερατρόλη	228,20	0,19	0,83
p-κουμαρικό	164,20	0,02	0,10
Φερουλικό	194,20	0,01	0,07
Σύνολο		3,86	17,07

Πίνακας 2.3. Σύσταση Υδατικού Εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης.

	M.B.	mg/g	μmol/g
Γαλλικό οξύ	170,10	1,57	9,23
Κατεχίνη	290,30	0,35	1,21
Επικατεχίνη	290,27	0,32	1,10
trans-ρεσβερατρόλη	228,20	0,04	0,18
Κερκετίνη	338,26	0,13	0,38
Βινιφερίνη	439,00	0,25	0,57
Σύνολο		2,66	12,67

Πίνακας 2.4. Σύσταση Μεθανολικού Εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης.

	M.B.	mg/g	μmol/g
Γαλλικό οξύ	170,10	16,24	95,47
Κατεχίνη	290,30	5,83	20,08
Επικατεχίνη	290,27	4,64	15,99
trans-ρεσβερατρόλη	228,20	0,77	3,37
p-κουμαρικό	164,20	0,55	3,35
Φερουλικό	194,20	0,17	0,88
Συριγγικό	198,20	0,90	4,54
Κερκετίνη	338,26	0,30	0,89
Ρουτίνη	664,60	2,25	3,39
Σύνολο		31,65	147,95

2.2. Μέθοδοι

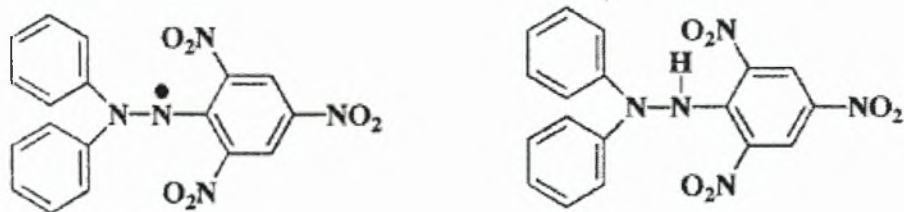
2.2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών

Αρχή της μεθόδου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά τους να «προσφέρουν» ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα ηλεκτρόνιο) στο DPPH. Το DPPH είναι μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές νιτρικές ρίζες και έχει μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm στο ορατό φάσμα (Huang et al., 2005). Όταν το DPPH βρίσκεται σε ένα διάλυμα με τη μορφή ρίζας (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) το διάλυμα έχει χρώμα ερυθρωπό, ενώ όταν ανάγεται (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) το διάλυμα μεταχρωματίζεται κίτρινο (Εικόνα 2.1). Ο βαθμός μεταβολής του χρώματος που μετράται ως μείωση της απορρόφησης του DPPH καθορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα της εκάστοτε πολυφαινόλης.

Πειραματικό πρωτόκολλο. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην εργασία των Andreadou et al. (1997). Σε κυψελίδες του 1 ml προστίθεντο μεταβλητή ποσότητα φαινόλης και στη συνέχεια αιθανόλη ως τα 950 μ l. Κατόπιν προστέθηκαν 50 μ l 2 mM φρέσκου αιθανολικού διαλύματος DPPH (τελική συγκέντρωση: 100 μ M). Το μίγμα αναδεύτηκε και ακολούθησε επώαση για 20 min σε σκοτάδι επειδή το DPPH είναι φωτοευαίσθητο. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 517 nm. Οι τελικές συγκεντρώσεις των φαινολών κυμαίνονταν μεταξύ 0,5-50 μ M. Οι φαινόλες ήταν διαλυμένες σε απόλυτη αιθανόλη με εξαίρεση την κερκετίνη και το ελλαγικό οξύ που ήταν διαλυμένες σε DMSO.

Σε κάθε σειρά μετρήσεων συμπεριλαμβανόταν ένα δείγμα ελέγχου και ένα θετικό δείγμα. Το δείγμα ελέγχου περιείχε μόνο DPPH χωρίς την προσθήκη φαινολών, ενώ το θετικό δείγμα περιείχε 50 μ M ασκορβικού οξέος αντί για φαινόλη.

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και κάθε πείραμα έγινε τουλάχιστον τρεις φορές. Οι τυπικές αποκλίσεις για τις τιμές απορρόφησης συνήθως ήταν μικρότερες από $\pm 10\%$.



1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl DPPH 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazine DPPH+H

Εικόνα 2.3 Χημική δομή του DPPH (Abe και συν., 2000).

2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ουσιών προσδιορίστηκε ως IC₅₀, όπου η IC₅₀ καθορίζεται ως η συγκέντρωση της φαινόλης που προκαλεί μείωση κατά 50% της απορρόφησης του δείγματος σε σχέση με την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου.

Προσδιορισμός του IC₅₀. Το ποσοστό (%) της δραστηριότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (% αναστολή) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Αναστολή (\%)} = [(A_0 - A_8) / A_0] \times 100$$

όπου A₀ είναι η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου και A₈ είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm.

Η % αναστολή προσδιορίστηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών. Η συγκέντρωση της φαινόλης (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH ή αλλιώς 50% μείωση στην απορρόφηση του control, καθορίστηκε ως IC₅₀.

2.2.3. Συνδυασμός δράσης φαινολικών ουσιών

Αφού προσδιορίστηκε η επί τοις εκατό (%) αναστολή κάθε φαινόλης, ήταν δυνατό να επιλεγθούν οι συγκεντρώσεις που προκαλούσαν 20% αναστολή, δηλαδή η συγκέντρωση της φαινόλης (μM) που προκαλεί 20% μείωση στην αρχική απορρόφηση του δείγματος ελέγχου. Έπειτα, υπολογίστηκε η ακριβής % αναστολή που προκαλούσε κάθε συγκέντρωση. Το δείγμα του οποίου θα εκτιμούνταν η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν διάλυμα που περιείχε συνδυασμό δύο πολυφαινολών, η καθεμία απ' τις οποίες βρισκόταν σε συγκέντρωση που προκαλούσε περίπου 20% αναστολή. Υπολογίζεται η πειραματική % αναστολή (του διαλύματος με τον συνδυασμό) και η θεωρητική % αναστολή (άθροισμα % αναστολών των δυο φαινολών). Σε όλες τις περιπτώσεις, η αναστολή εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος για να εφαρμοστεί η στατιστική ανάλυση. Η αντιστοίχιση αυτή γινόταν χάρη στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς του ασκορβικού οξέος ως προς την αντιοξειδωτική του ικανότητα έναντι του DPPH.

2.3. Στατιστική Ανάλυση, υπολογισμοί και γραφήματα

Σκοπός της στατιστικής ανάλυσης είναι η αξιολόγηση της αξιοπιστίας των μετρήσεων. Υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων, ενώ η αξιολόγηση των μετρήσεων κατά το συνδυασμό των φαινολών βασίστηκε στη δοκιμασία Student ή t-test.

Η δοκιμασία *Student* ή *t-test* χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί αν είναι στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των μετρήσεων κατά το συνδυασμό της δράσης των φαινολών και των αναμενόμενων (θεωρητικών τιμών).

Για τη στατιστική ανάλυση, τους υπολογισμούς και τα γραφήματα που πραγματοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, συγκεκριμένα το InStat για να υπολογιστούν οι μέσες τιμές, το Kinet για τον υπολογισμό των IC₅₀, το Origin 5.0 για τον σχεδιασμό των γραφικών παραστάσεων και το Microsoft Excel.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης DPPH για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Η συγκέντρωση DPPH που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα επιλέχθηκε βάσει μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Δείγματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M) φωτομετρήθηκαν και η καμπύλη σχεδιάστηκε αντιστοιχώντας την εκάστοτε απορρόφηση (A) έναντι της συγκέντρωσης DPPH (μ M DPPH) (σχήμα 3.1). Η συγκέντρωση DPPH που επιλέχθηκε ήταν 100 μ M διότι ανήκει στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης και δίνει ικανοποιητικώς υψηλή συγκέντρωση.

3.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος.

Αντίστοιχα, βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του ασκορβικού οξέος. αντιστοιχώντας την επί τοις εκατό αναστολή που προκαλούσε η κάθε συγκέντρωση έναντι της συγκέντρωσης αυτής (μ M ασκορβικού οξέος) (σχήμα 3.2). Η καμπύλη αυτή σχεδιάστηκε διότι, χρησιμοποιώντας την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του ασκορβικού ανάγουμε την εκάστοτε επί τοις εκατό αναστολή κάθε φαινόλης σε συγκέντρωση ασκορβικού, έτσι ώστε να υπάρχει αντιστοιχία με έναν θετικό μάρτυρα.

3.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων φαινολών με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την οργανική νιτρική ρίζα DPPH.

Οι φαινολικές ουσίες που εξετάστηκαν ήταν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το φερούλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το ελλαγικό οξύ, η κερκετίνη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η ρεσβερατρόλη και η ρουτίνη. Για κάθε φαινόλη εκτιμήθηκε το ποσοστό (%) της δραστηριότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (% αναστολή) για των εξής συγκεντρώσεων: 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 30 μ M, 50 μ M. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο πρώτων συγκεντρώσεων είναι σημαντική καθώς το εύρος στο οποίο κυμαίνονται οι συγκεντρώσεις των φαινολών στο αίμα, και συνεπώς φτάνουν στα ανθρώπινα κύτταρα, είναι μεταξύ 0,1 και 1 μ M.

Οι τιμές της % αναστολής που παρουσίασε το πρωτοκατεχοϊκό οξύ σε όλες τις συγκεντρώσεις, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1. (Σχήμα 3.3.). Στα 0,5 μ M η αναστολή είναι 0,294% και στο 1 μ M είναι 0,226%. Η τιμή IC₅₀ ισούται με 26,281 μ M.

Οι τιμές της % αναστολής που παρουσίασε το γαλλικό οξύ σε όλες τις συγκεντρώσεις, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.2. (Σχήμα 3.4.). Στα 0,5μM η αναστολή είναι 3,025% και στο 1μM είναι 8,027%. Η τιμή IC₅₀ ισούται με 7,144μM.

Το φερουλικό οξύ παρουσίασε επαγωγική δράση στα 0,5μM και στο 1μM ίση με 1,969% και 0,378% αντίστοιχα. Η ανασταλτική του δράση ξεκινά μετά τα 2μM και οι τιμές φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.3. (Σχήμα 3.5.). Η τιμή IC₅₀ είναι υψηλή και ως αντιπροσωπευτική τιμή παρουσιάζεται η % αναστολή στα 50μM, η οποία είναι ίση με 23,765μM.

Το καφεϊκό οξύ παρουσίασε επαγωγική δράση στα 0,5μM που ισούται με 0,922%. Σε συγκέντρωση 1μM η ανασταλτική του ικανότητα είναι 0,980%, ενώ οι υπόλοιπες τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. (Σχήμα 3.6.). Το IC₅₀ είναι ίσο με 10,901μM.

Σε συγκέντρωση 0,5μM η ρουτίνη παρουσίασε επαγωγική δράση 2,551%. Στο 1μM η % αναστολή ισούται με 2,668. Αναλυτικά οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. (Σχήμα 3.7.). Η τιμή IC₅₀ για τη ρουτίνη είναι 11,873μM.

Οι τιμές της % αναστολής που παρουσίασε η επικατεχίνη σε όλες τις συγκεντρώσεις, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.6. (Σχήμα 3.8.). Στα 0,5μM η αναστολή είναι 1,429% και στο 1μM 3,227%. Το IC₅₀ ισούται με 10,522μM.

Το *p*-κουμαρικό οξύ εμφάνισε εντελώς διαφορετική δράση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισε μικρή και σχεδόν σταθερή επαγωγική δράση. Οι τιμές φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.7. (Σχήμα 3.9.).

Η κατεχίνη σε συγκέντρωση 0,5μM προκαλεί 0,969% επαγωγή ενώ σε συγκέντρωση 1μM προκαλεί 2,922% αναστολή. Οι υπόλοιπες τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8. (Σχήμα 3.10.). και η τιμή IC₅₀ είναι ίση με 15,437μM.

Οι τιμές της % αναστολής που παρουσίασε το ελλαγικό οξύ σε όλες τις συγκεντρώσεις, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.9. (Σχήμα 3.11.). Στα 0,5μM η αναστολή είναι 6,383 % και στο 1μM 12,522 %. Το IC₅₀ ισούται με 6,932μM.

Η ρεσβερατρόλη προκαλεί επαγωγή στα 0,5μM ίση με 2,026% και στο 1μM 1,162%. Η ανασταλτική της δράση ξεκινά μετά τα 4μM και οι τιμές φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.10. (Σχήμα 3.12.). Η τιμή IC₅₀ είναι υψηλή και ως αντιπροσωπευτική τιμή παρουσιάζεται η % αναστολή στα 50μM, η οποία είναι ίση με 25,37μM.

Οι τιμές της % αναστολής που παρουσίασε η κερκετίνη σε όλες τις συγκεντρώσεις, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.11. (Σχήμα 3.13.). Στα 0,5μM η αναστολή είναι 0,068% και στο 1μM 5,023%. Το IC₅₀ ισούται με 12,399μM.

Οι τιμές IC₅₀ των πολυφαινολών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο ραβδόγραμμα του σχήματος 3.14. Οι τιμές IC₅₀ του φερουλικού οξέος και της ρεσβερατρόλης είναι υψηλές και ως

αντιπροσωπευτικές τιμές ορίζονται οι % αναστολές στα 50μM. Το ραβδόγραμμα του σχήματος 3.15. απεικονίζει την % αναστολή στα 50μM των δύο αυτών πολυφαινολών.

3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την οργανική νιτρική ρίζα DPPH

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ήταν το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου Σαντορίνης και το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς Σαντορίνης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν το μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς, το μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς και το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς. Όπως και για τις πολυφαινόλες εκτιμήθηκε το ποσοστό (%) της δραστηριότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (% αναστολή). Για την ποικιλία Ασσύρτικο εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 5μg/ml, 10μg/ml, 30μg/ml, 60μg/ml, 120μg/ml, 240μg/ml και 480μg/ml, ενώ για την ποικιλία Μανδηλαριά οι συγκεντρώσεις 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml, 24μg/ml, 48μg/ml, 96μg/ml και 192μg/ml.

Στην παρούσα μελέτη, το εκχύλισμα που βρέθηκε ότι έχει την χαμηλότερη τιμή IC₅₀, είναι το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (IC₅₀=23,548μg/ml) (Πίνακας 3.15., Σχήμα 3.19.). Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (IC₅₀=31,686μg/ml) (Πίνακας 3.14., Σχήμα 3.18.), το μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικου (IC₅₀=35,442μg/ml) (Πίνακας 3.13., Σχήμα 3.17.) και τέλος το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου (IC₅₀=52,403μg/ml) (Πίνακας 3.12., Σχήμα 3.16.). Από τα κλάσματα που μελετήθηκαν, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασε το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (IC₅₀=18,326μg/ml) (Πίνακας 3.18., Σχήμα 3.22 .), ακολουθούμενο από το μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (IC₅₀=44,535μg/ml) (Πίνακας 3.17., Σχήμα 3.21.), και τέλος από το μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (IC₅₀=83,014μg/ml) (Πίνακας 3.16., Σχήμα 3.20.).

Οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων των ποικιλιών Ασσύρτικο και Μανδηλαριά παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3.19. και τα IC₅₀ των κλασμάτων των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3.20.

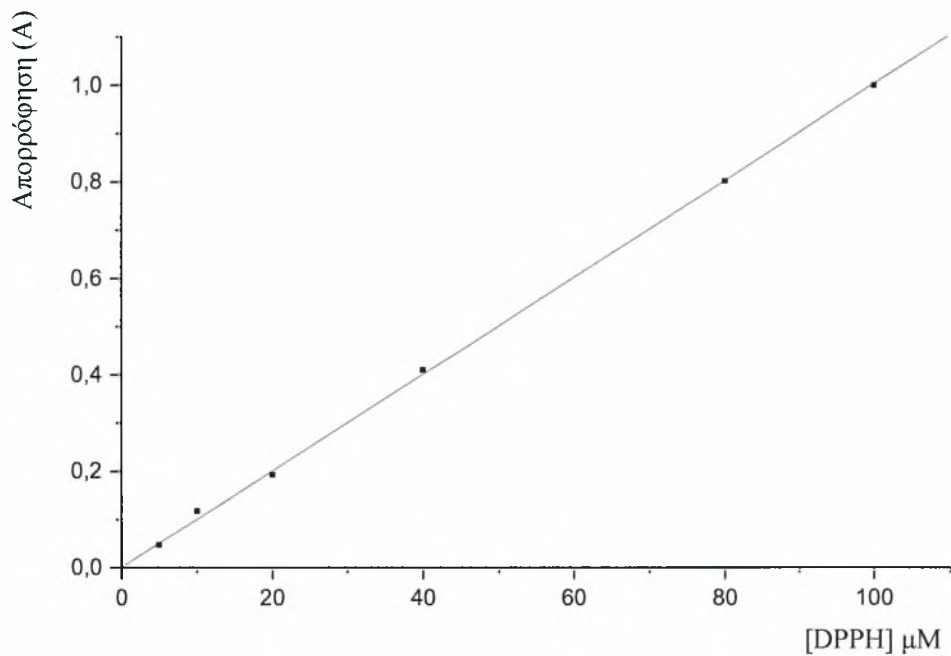
3.5. Συνδυασμός δράσης φαινολικών ουσιών

Για κάθε φαινόλη επιλέχθηκε η συγκέντρωση που προκαλούσε 20% αναστολή, δηλαδή 20% μείωση στην απορρόφηση του δείγματος ελέγχου. Αφού μετρήθηκε η ακριβής % αναστολή

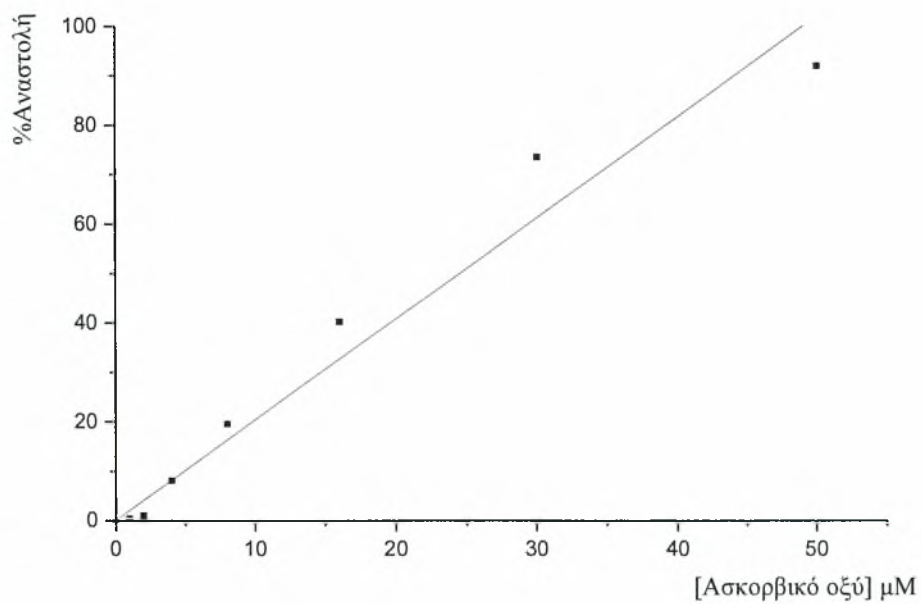
κάθε φαινόλης, υπολογίστηκαν οι θεωρητικές % αναστολές και εκτιμήθηκαν οι % πειραματικές αναστολές κάθε δυνατού συνδυασμού.

Κανένας συνδυασμός δεν οδήγησε σε αύξηση της ανασταλτικής δράσης και κατ' επέκταση δεν παρουσιάστηκε συνεργιστική δράση μεταξύ των φαινολικών ουσιών, κρίνοντας από το γεγονός ότι όλες οι θεωρητικές τιμές ήταν μεγαλύτερες από τις πειραματικές. Ορισμένες πειραματικές αναστολές εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με τις αναμενόμενες θεωρητικές, δηλαδή η δράση της μιας φαινόλης αναιρούσε εν μέρει τη δράση της δεύτερης. Οι τιμές παρατίθενται στον Πίνακα 3.21. Εξ' αιτίας του όγκου των αποτελεσμάτων, μόνο οι συνδυασμοί με τη μεγαλύτερη μείωση παριστάνονται γραφικά και είναι οι εξής:

1. Επικατεχίνη με ρεσβερατρόλη (Σχήμα 3.24.)
2. Επικατεχίνη με φερουλικό οξύ (Σχήμα 3.25.)
3. Επικατεχίνη με *p*-κουμαρικό οξύ (Σχήμα 3.26.)
4. Ελλαγικό οξύ με φερουλικό οξύ (Σχήμα 3.27.)
5. Ελλαγικό οξύ με ρεσβερατρόλη (Σχήμα 3.28.)
6. Ελλαγικό οξύ με κερκετίνη (Σχήμα 3.29.)
7. Φερουλικό οξύ με κατεχίνη (Σχήμα 3.30.)
8. Ρεσβερατρόλη με κερκετίνη (Σχήμα 3.31.).



Σχήμα 3.1. Πρότυπη καμπύλη DPPH.



Σχήμα 3.2. Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος.

Πίνακας 3.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή **
0,5	0,294±1,139	-
1	0,226±1,251	-
2	4,260±0,247	-
4	9,207±0,191	-
8	24,949±0,767	-
16	41,652±3,532	-
30	51,223±3,388	-
50	69,049±7,642	-

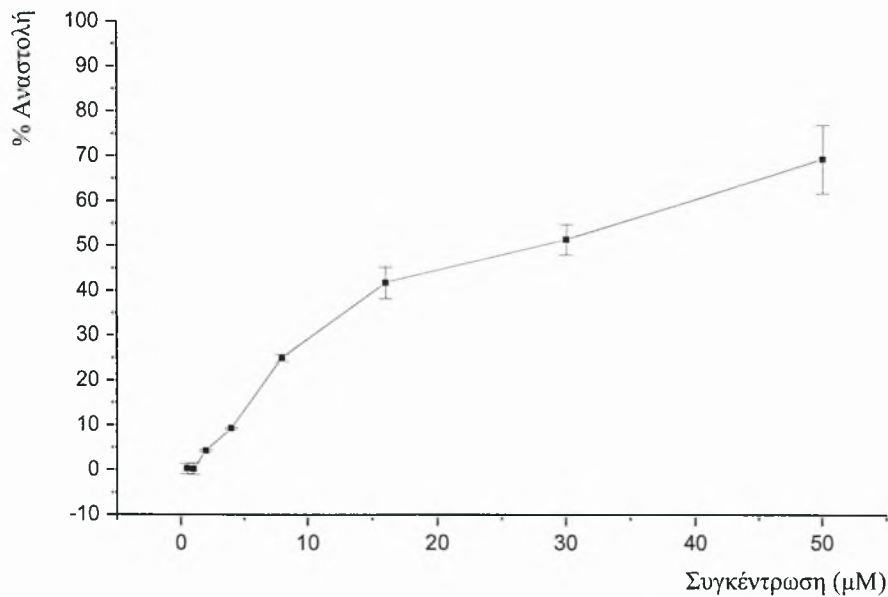
IC₅₀¹

26,281±3,689 μM

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.3. Πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα του γαλλικού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	3,025±1,095	-
1	8,027±0,992	-
2	12,905±0,845	-
4	25,329±0,199	-
8	47,046±1,396	-
16	81,983±3,143	-
30	96,457±0,427	-
50	96,609±0,486	-

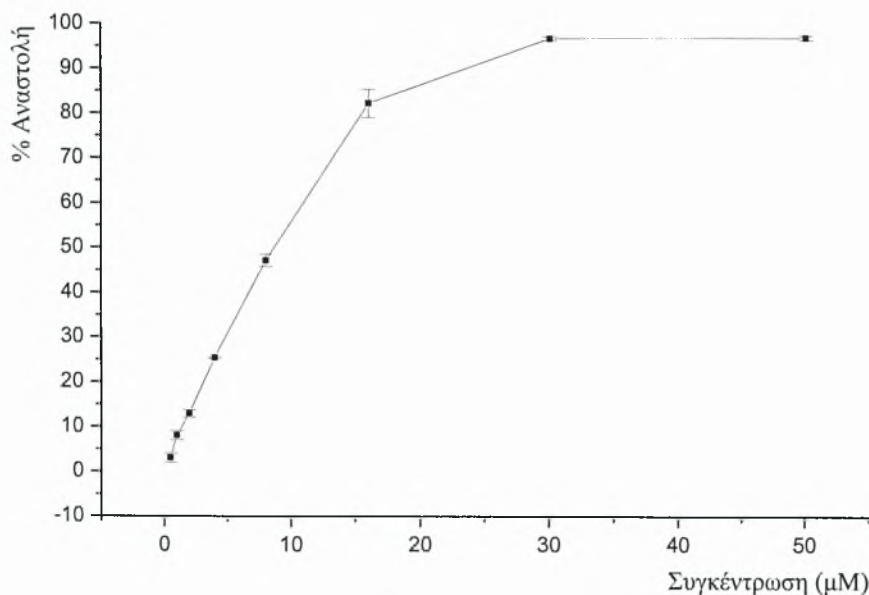
IC_{50}^1

$7,114 \pm 0,227 \mu M$

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.

** % Επαγωγή: $-(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.4. Γαλλικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα του φερουλικού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	-	1,969±0,897
1	-	0,378±1,646
2	0,492±2,431	-
4	1,235±2,078	-
8	7,941±2,292	-
16	15,583±2,295	-
30	16,531±3,958	-
50	23,765±8,950	-

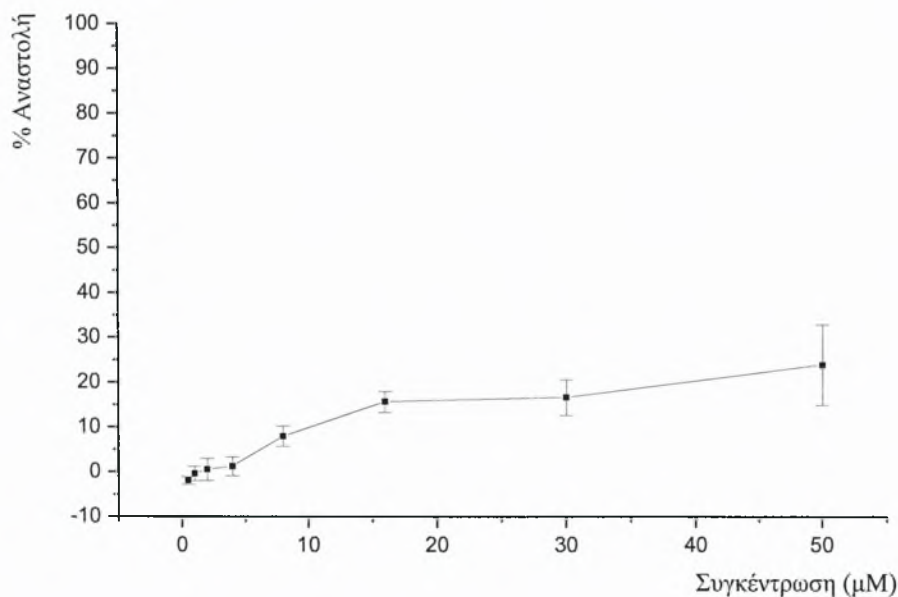
% Αναστολή στα 50μM

23,765±8,950

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή±SEM.



Σχήμα 3.5. Φερουλικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

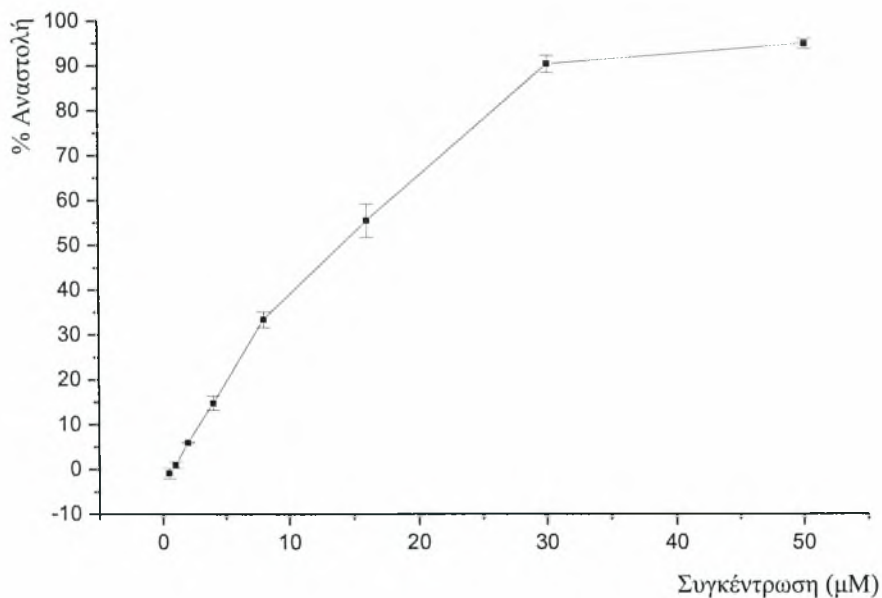
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή*
0,5	-	0,922±1,188
1	0,980±0,746	-
2	5,926±0,182	-
4	14,732±1,602	-
8	33,298±1,762	-
16	66,361±3,758	-
30	90,221±1,944	-
50	94,526±1,091	-

IC₅₀¹ 10,901±0,854 μM

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.6. Καφεϊκό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα της ρουτίνης με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

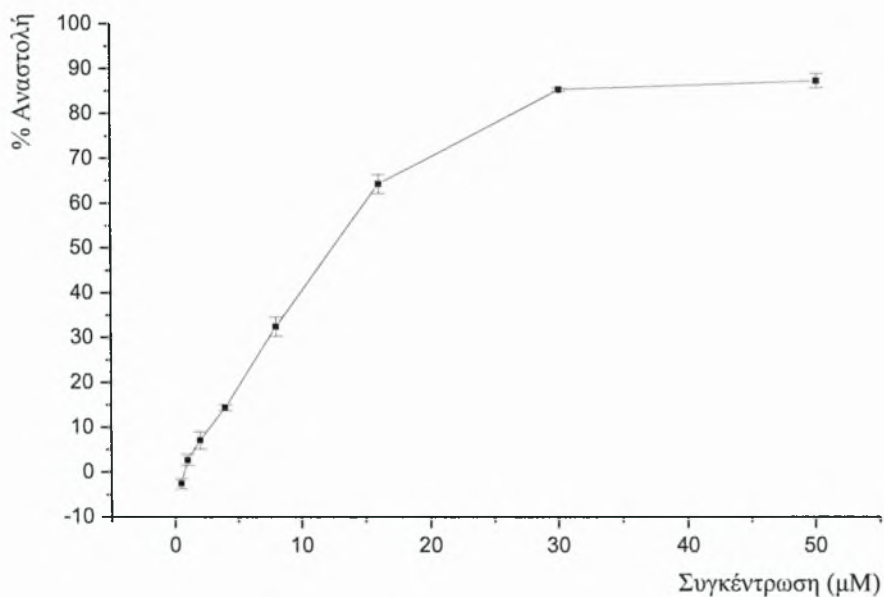
Συγκέντρωση (μΜ)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	-	2,551±1,099
1	2,668±1,208	-
2	7,060±1,952	-
4	14,374±0,711	-
8	32,391±2,158	-
16	64,113±2,069	-
30	85,045±0,355	-
50	87,500±0,355	-

IC₅₀¹ 11,873±0,024 μΜ

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μΜ) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.7. Ρουτίνη. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα της επικατεχίνης με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	1,429±0,089	-
1	3,227±0,278	-
2	9,665±0,148	-
4	19,373±0,331	-
8	34,264±0,082	-
16	61,47±3,409	-
30	92,129±2,643	-
50	93,914±0,456	-

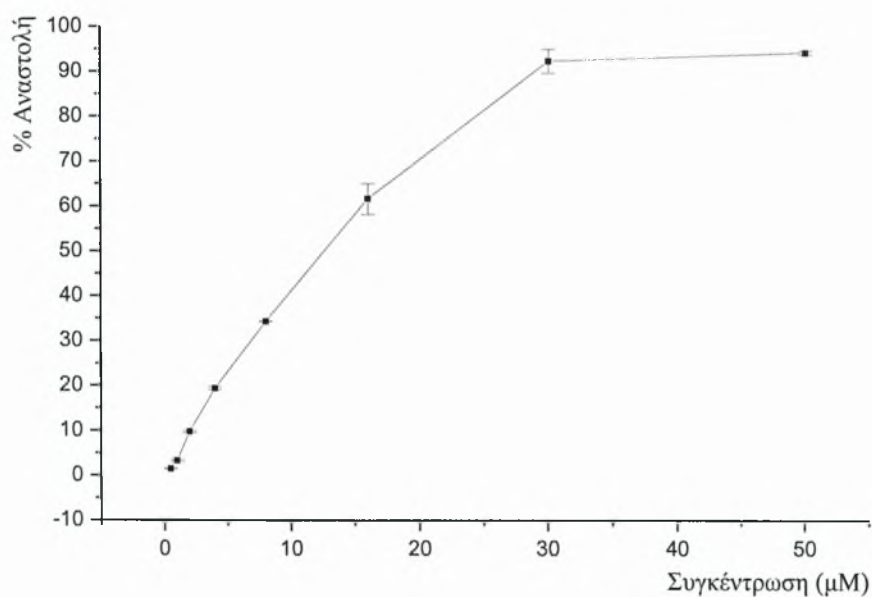
IC₅₀¹

10,522±0,533 μM

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.8. Επικατεχίνη Οι γραμμές σφάλματος στον άξονα Y υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.7. Αντιοξειδωτική ικανότητα του *p*-κουμαρικού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

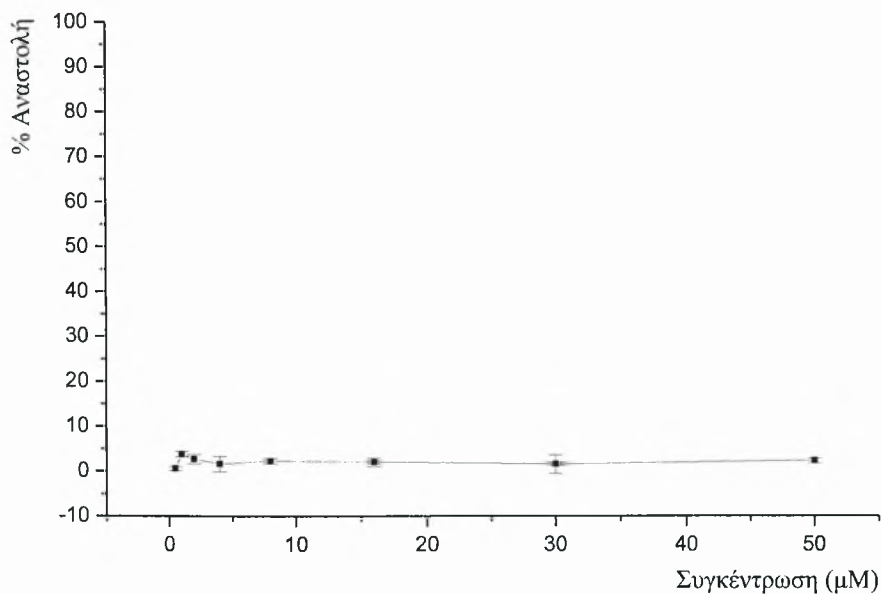
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	-	0,592±0,477
1	-	3,786±0,577
2	-	2,675±1,068
4	-	1,611±1,719
8	-	2,237±0,633
16	-	1,960±0,927
30	-	1,458±2,101
50	-	2,251±0,529

IC₅₀¹ (μM) -

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.9. *p*-κουμαρικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.8. Αντιοξειδωτική ικανότητα της κατεχίνης με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

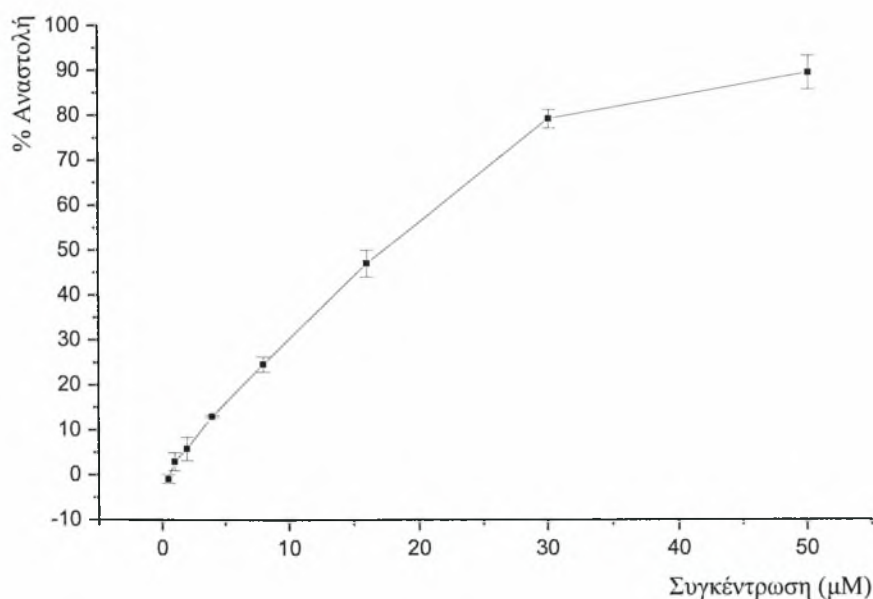
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	-	0,969±0,969
1	2,922±2,050	-
2	5,78±2,582	-
4	12,973±0,205	-
8	24,541±1,674	-
16	46,968±2,976	-
30	79,082±2,047	-
50	89,385±3,735	-

IC₅₀¹ 15,437±0,705 μM

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.10. Κατεχίνη. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.9. Αντιοξειδωτική ικανότητα του ελλαγιικού οξέος με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

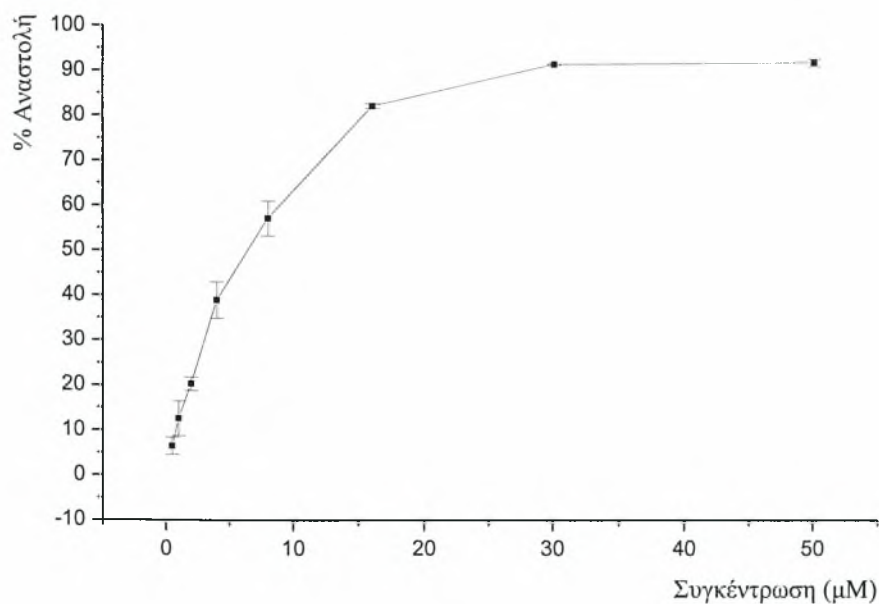
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	6,383±1,937	-
1	12,522±3,869	-
2	20,219±1,490	-
4	38,845±4,024	-
8	56,965±3,889	-
16	81,975±0,501	-
30	91,256±0,113	-
50	91,781±0,848	-

IC₅₀¹ 6,932±0,816 μM

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.11. Ελλαγιικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.10. Αντιοξειδωτική ικανότητα της ρεσβερατρόλης με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

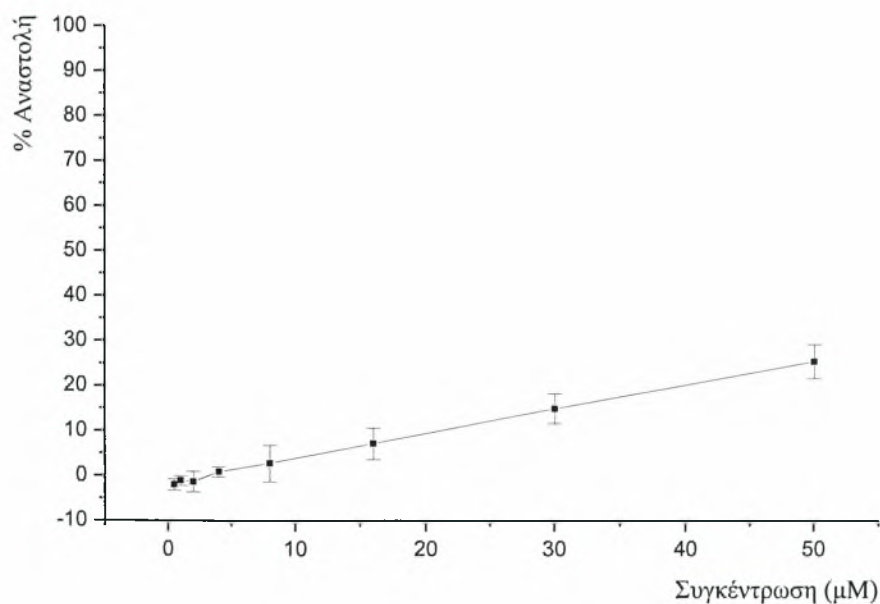
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	-	2,026±1,267
1	-	1,162±1,086
2	-	1,391±2,304
4	0,828±1,149	-
8	2,701±4,066	-
16	7,092±3,478	-
30	14,870±3,304	-
50	25,365±3,760	-

% Αναστολή στα 50μM **25,365±3,760**

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή±SEM.

** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή±SEM.



Σχήμα 3.12. Ρεσβερατρόλη. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.11. Αντιοξειδωτική ικανότητα της κερκετίνης με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

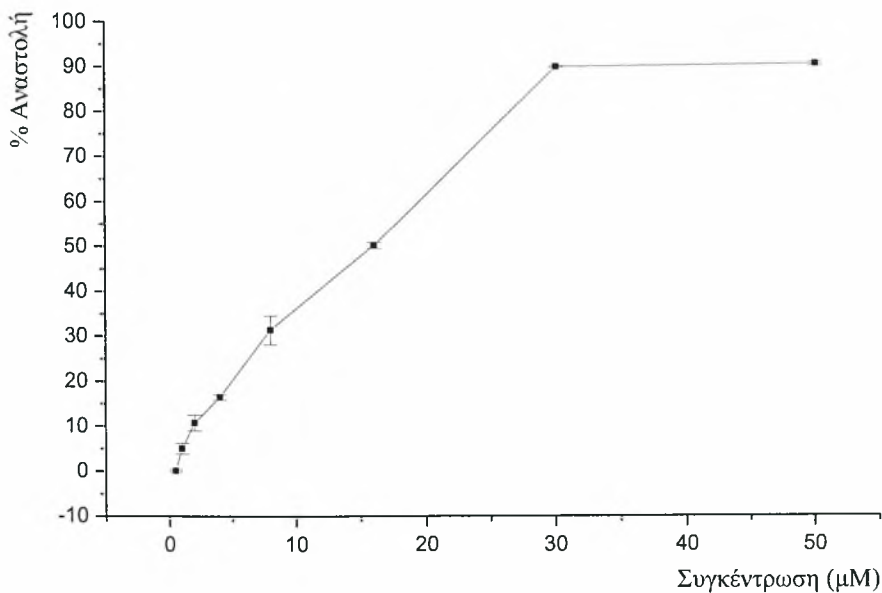
Συγκέντρωση (μM)	% Αναστολή *	% Επαγωγή**
0,5	0,068±0,306	-
1	5,023±1,208	-
2	10,682±1,779	-
4	16,349±0,583	-
8	31,288±3,211	-
16	50,057±0,658	-
30	89,735±0,170	-
50	90,434±0,344	-

IC₅₀¹ 12,399±0,966 μM

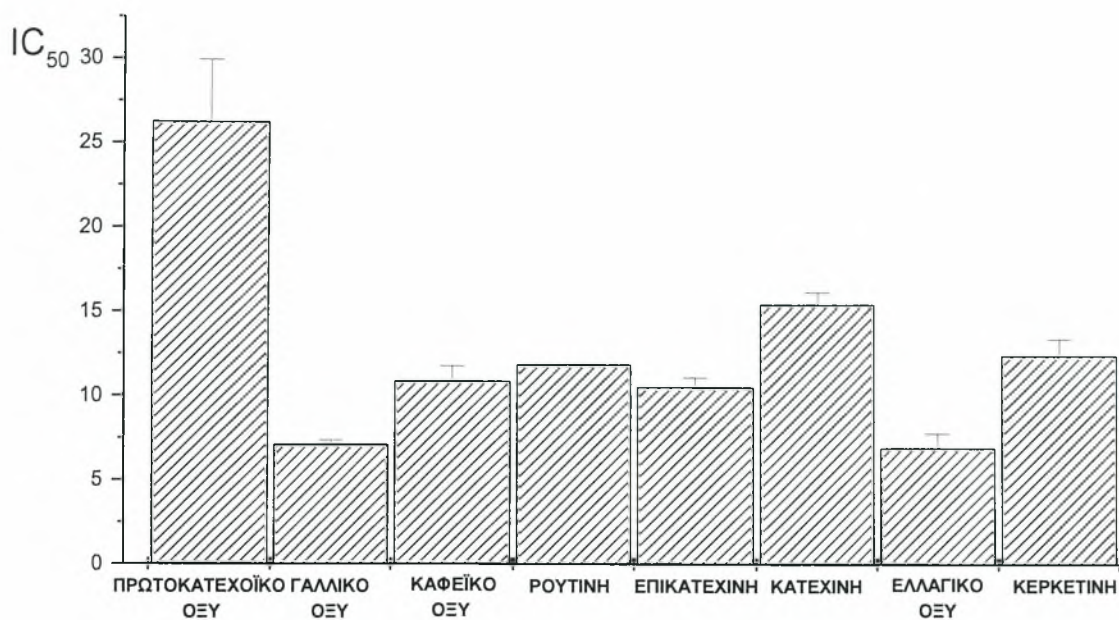
¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

* % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.

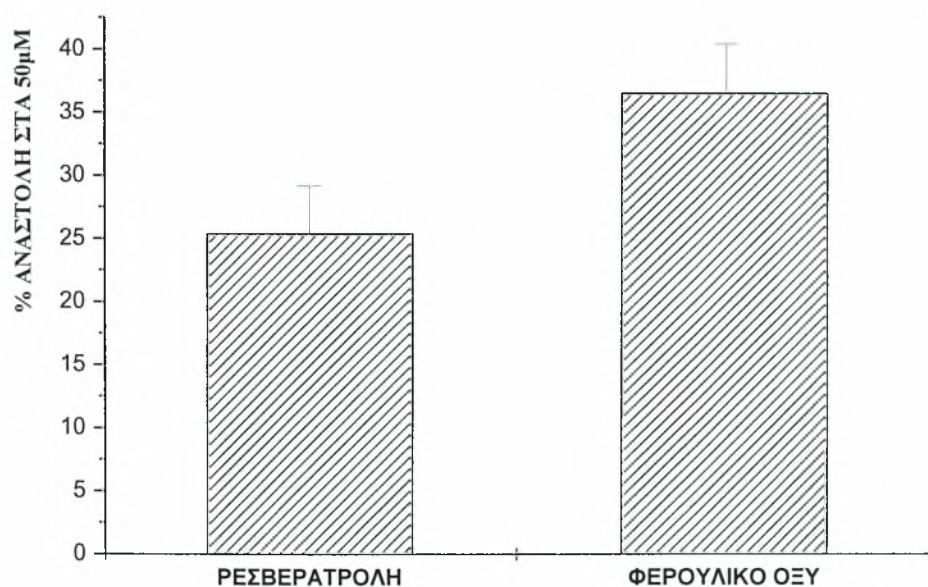
** % Επαγωγή: $-(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Επαγωγή ±SEM.



Σχήμα 3.13. Κερκετίνη. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).



Σχήμα 3.14. Τιμές IC₅₀ των φαινολικών ουσιών που εξετάστηκαν. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).



Σχήμα 3.15. Η % αναστολή στα 50μM που παρουσιάζουν το φερούλικό οξύ και η ρεσβερατρόλη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

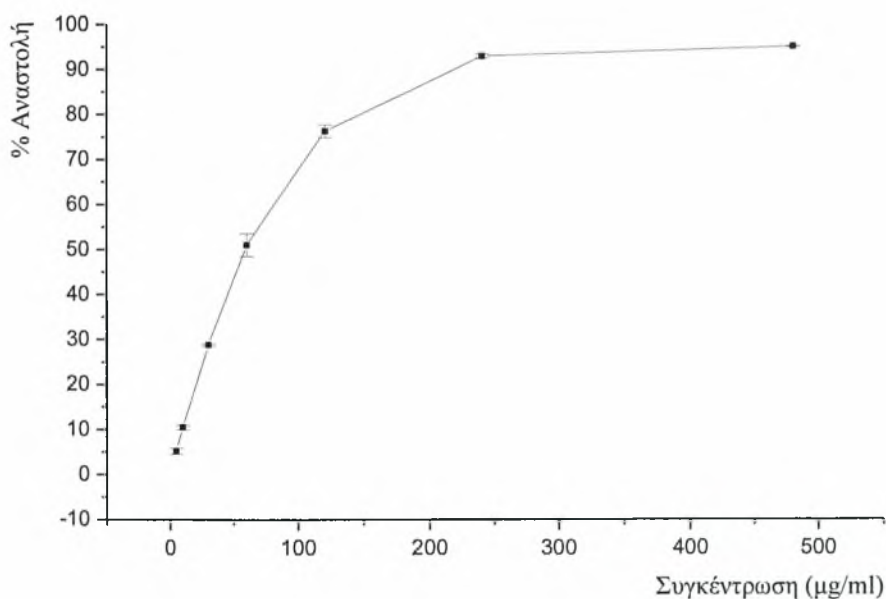
Πίνακας 3.12. Αντιοξειδωτική ικανότητα του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Ασσύρτικο με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μg/mL)	% Αναστολή *
5	5,168±0,659
10	10,457±0,543
30	28,744±0,168
60	50,888±2,493
120	76,150±1,382
240	92,934±0,427
480	95,193±0,100

IC_{50}^1 **52,403±7,373 μg/mL**

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.16. Υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας Ασσύρτικο. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.13. Αντιοξειδωτική ικανότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Ασσύρτικο με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

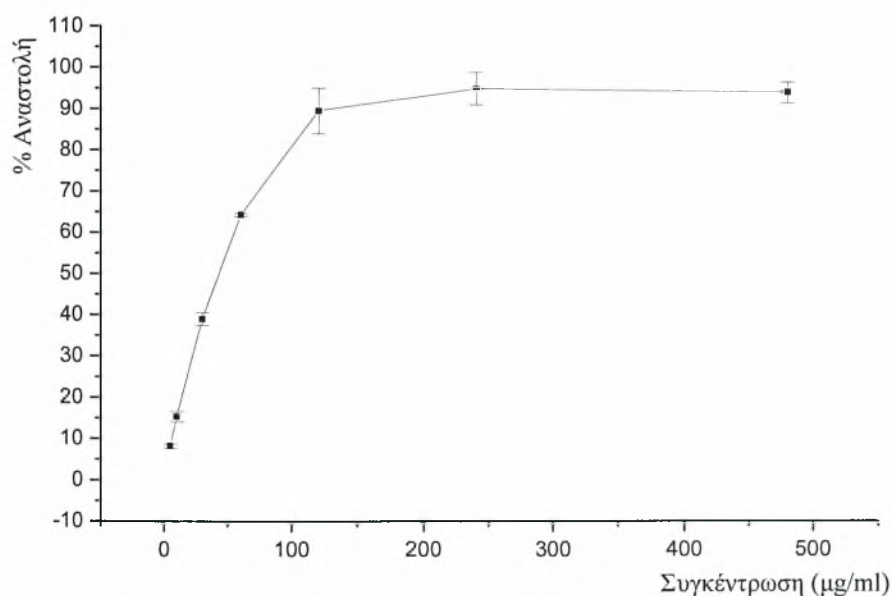
Συγκέντρωση (μg/mL)	Αναστολή %*
5	8,149±0,525
10	15,272±1,203
30	38,880±1,576
60	64,075±0,425
120	89,269±5,522
240	94,743±3,927
480	94,997±2,520

IC_{50}^1

35,442±5,266 μg/mL

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.17. Μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Ασσύρτικο. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.14. Αντιοξειδωτική ικανότητα του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

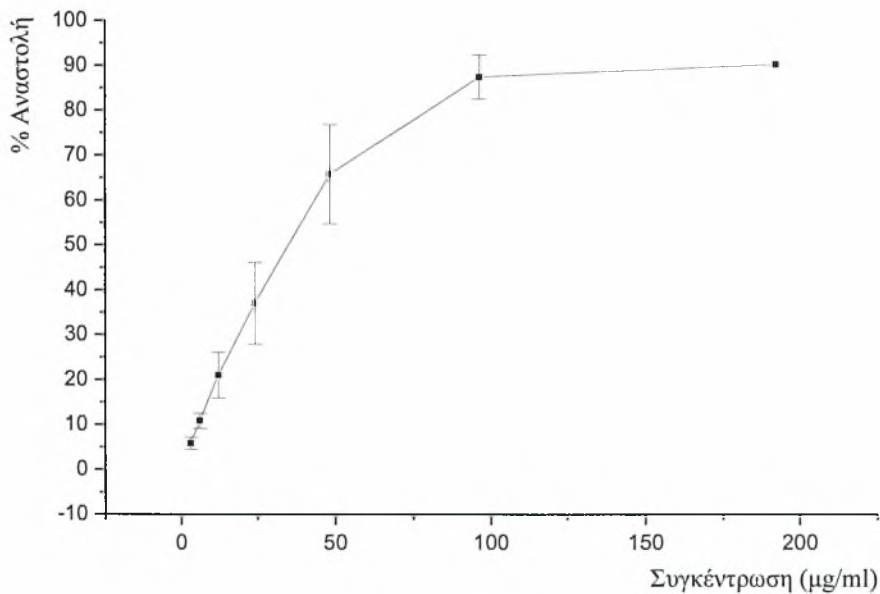
Συγκέντρωση (μg/mL)	% Αναστολή *
3	5,787±1,323
6	10,843±1,730
12	20,939±5,099
24	36,967±9,100
48	65,678±10,997
96	87,265±4,903
192	90,155±0,570

IC₅₀¹

31,686±4,369 μg/mL

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}/A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.



Σχήμα 3.18. Υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

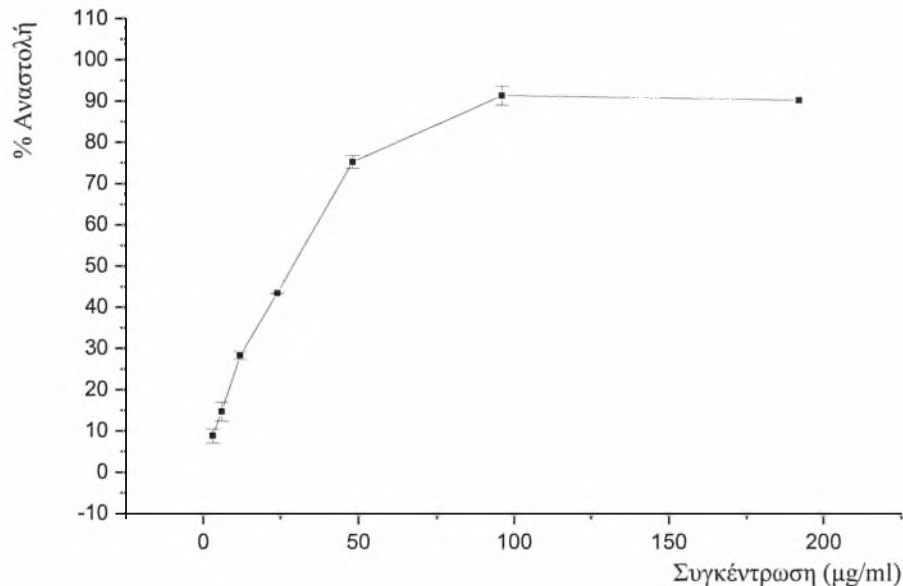
Πίνακας 3.15. Αντιοξειδωτική ικανότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (µg/mL)	% Αναστολή *
3	8,845±1,692
6	14,680±2,304
12	28,274±0,902
24	43,376±0,032
48	75,233±1,526
96	91,341±2,305
192	90,286±0,793

IC_{50}^1 **23,538±3,107 µg/mL**

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (µM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.19. Μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

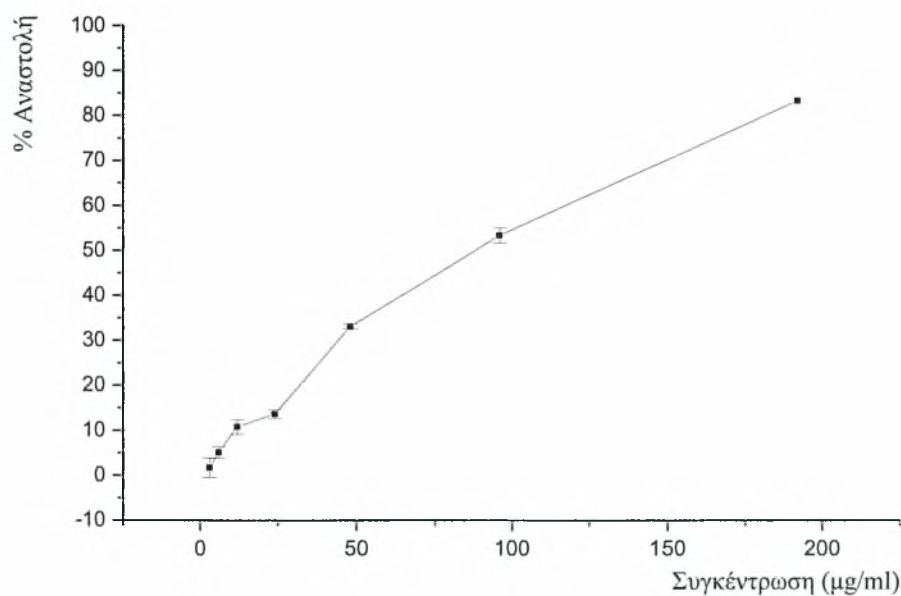
Πίνακας 3.16. Αντιοξειδωτική ικανότητα του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

Συγκέντρωση (μg/mL)	% Αναστολή *
3	1,683±2,207
6	5,050±1,276
12	10,726±1,658
24	13,564±0,977
48	33,102±0,529
96	53,366±1,725
192	83,465±3,537

IC_{50}^1 **83,014±11,631 μg/mL**

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{control} - A_{δείγματος} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.20. Μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.17. Αντιοξειδωτική ικανότητα του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος της 35,442 ποικιλίας Μανδηλαριά με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

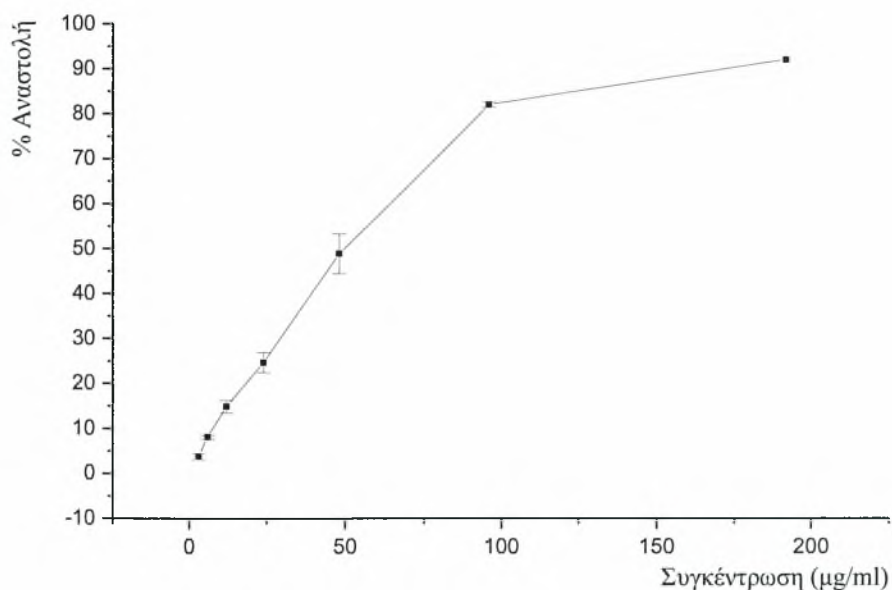
Συγκέντρωση (μg/mL)	% Αναστολή *
3	3,719±0,627
6	8,031±0,439
12	14,870±1,404
24	24,619±2,221
48	48,843±4,425
96	82,049±0,565
192	92,212±2,140

IC_{50}^1

44,535±7,846 μg/mL

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC_{50} . Οι τιμές εκφράζονται ως $IC_{50} \pm SEM$ (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{control} - A_{\text{δείγματος}} / A_{control}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή $\pm SEM$.



Σχήμα 3.21. Μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.18. Αντιοξειδωτική ικανότητα του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH.

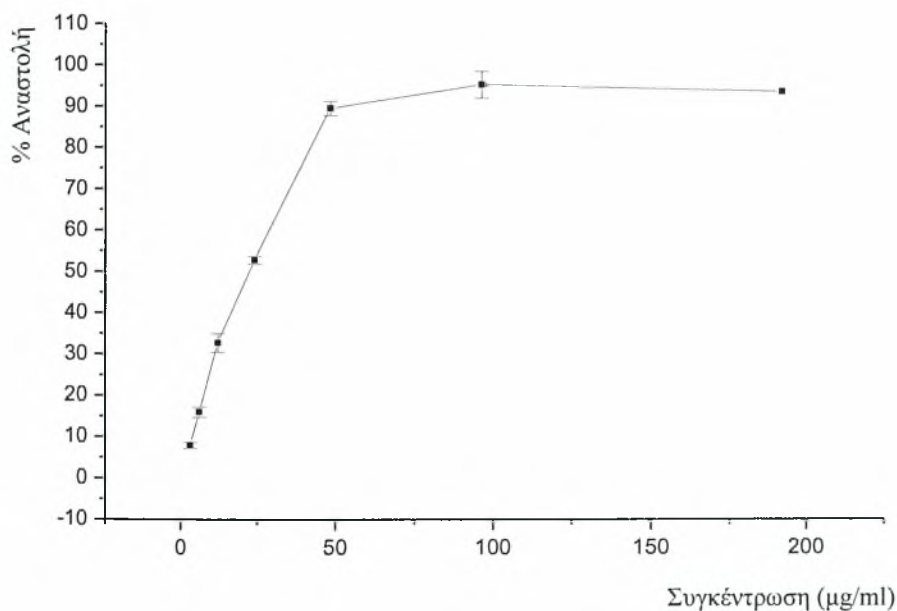
Συγκέντρωση (μg/mL)	% Αναστολή *
3	7,838±0,726
6	15,923±1,215
12	32,548±2,288
24	52,583±0,955
48	89,350±1,732
96	95,149±3,250
192	93,779±0,814

IC₅₀¹

18,326±3,536 μg/mL

¹Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

*Οι τιμές εκφράζουν την % αναστολή στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. % Αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}/A_{\text{control}}) * 100$. Οι τιμές εκφράζονται ως % Αναστολή ±SEM.



Σχήμα 3.22. Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας Μανδηλαριά. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.19. Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων των ποικιλιών Ασσύρτικο και Μανδηλαριά.

Εκχύλισμα	IC ₅₀ ¹ (μg/mL)
Υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικο	52,403±7,373
Μεθυλικό εκχύλισμα Ασσύρτικο	55,442±5,266
Υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριά	31,686±4,369
Μεθυλικό εκχύλισμα Μανδηλαριά	23,548±3,107

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

Πίνακας 3.20. Τιμές IC₅₀ των κλασμάτων των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά.

Κλάσμα Εκχυλίσματος	IC ₅₀ ¹ (μg/mL)
Μεθυλικό κλάσμα μεθυλικού εκχυλίσματος Μανδηλαριά	83,014±11,631
Μεθυλικό κλάσμα υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριά	44,535±7,486
Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα εκχυλίσματος Μανδηλαριά	18,326±3,536

¹ Η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH, καθορίζεται ως IC₅₀. Οι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (standard error of means).

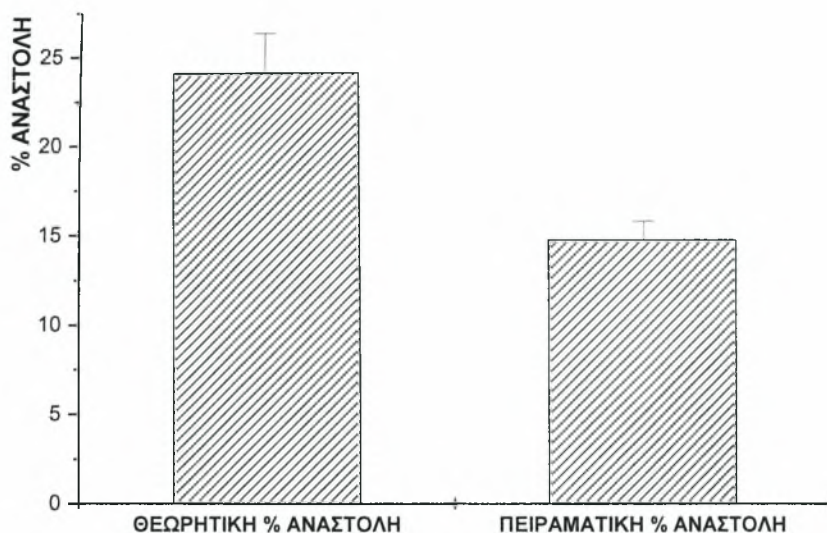
Πίνακας 3.21. Πειραματικές αναστολές που εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με τις αναμενόμενες θεωρητικές.

Συνδυασμός	Θεωρητική % αναστολή συνδυασμού*	Πειραματική % αναστολή του συνδυασμού**
Γαλλικό οξύ-Φερουλικό οξύ	21,665±0,465	17,100±0,320
Γαλλικό οξύ-Ελλαγικό οξύ	24,160±0,370	21,070±0,250
Γαλλικό οξύ-Κερκετίνη	24,930±0,561	20,883±0,595
Γαλλικό οξύ-Ρεσβερατρόλη	23,430±0,390	18,000±0,700
Γαλλικό οξύ-Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	23,445±0,065	18,135±0,665
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ-Φερουλικό οξύ	20,995±0,805	16,810±0,050
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ-Ρουτίνη	20,860±0,050	16,755±0,005
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ-Ρεσβερατρόλη	20,843±1,232	16,239±0,630
Επικατεχίνη-Ελλαγικό οξύ	22,765±0,225	15,535±0,345
Επικατεχίνη-Κερκετίνη	23,265±1,105	15,1200±0,930
Επικατεχίνη-Ρεσβερατρόλη	24,066±2,186	14,773±1,013
Επικατεχίνη-Φερουλικό οξύ	19,273±0,641	11,863±2,155
Επικατεχίνη- <i>p</i> -κουμαρικό	20,500±1,040	5,525±0,225
Καφεϊκό οξύ-Ρεσβερατρόλη	23,550±2,079	16,526±0,508
Ρουτίνη-Κατεχίνη	21,563±1,202	17,603±0,441
Ρουτίνη-Ελλαγικό οξύ	20,570±0,375	16,350±0,907
Ελλαγικό οξύ-Φερουλικό οξύ	20,340±0,270	13,535±0,045
Ελλαγικό οξύ-Ρεσβερατρόλη	22,800±0,475	13,813±1,071
Ελλαγικό οξύ-Κερκετίνη	25,230±0,650	17,360±1,350
Φερουλικό οξύ-Κατεχίνη	21,060±1,700	14,090±1,273
Ρεσβερατρόλη-Κερκετίνη	23,815±0,015	14,965±0,875

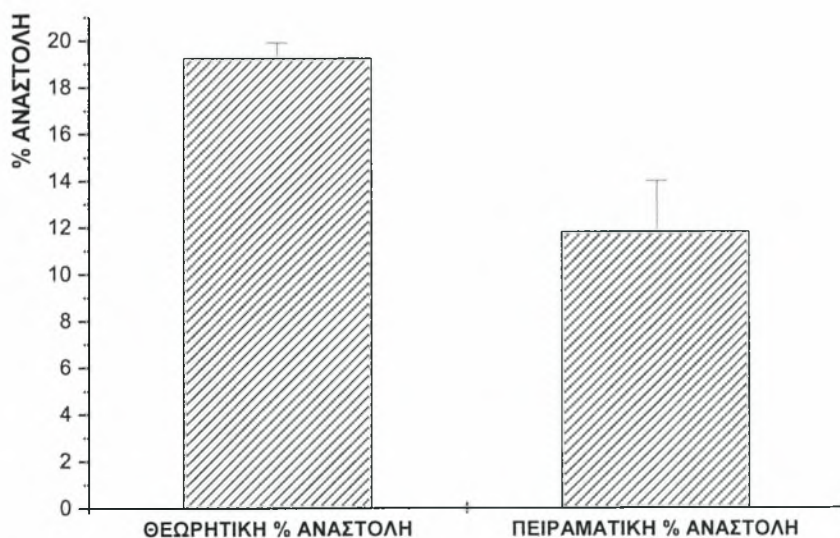
* Θεωρητική % αναστολή συνδυασμού: % αναστολή πρώτης πολυφαινόλης + % αναστολή δεύτερης πολυφαινόλης.

** Πειραματική % αναστολή του συνδυασμού: % αναστολή του μίγματος πολυφαινολών.

% αναστολή: $(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{control}}) * 100$ Οι τιμές εκφράζονται ως % αναστολή \pm SEM.



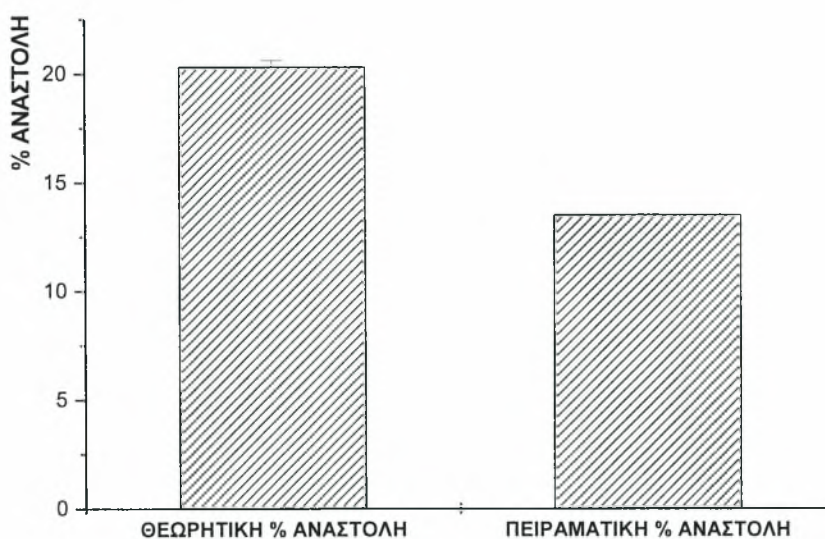
Σχήμα 3.24. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού της επικατεχίνης με τη ρεσβερατρόλη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



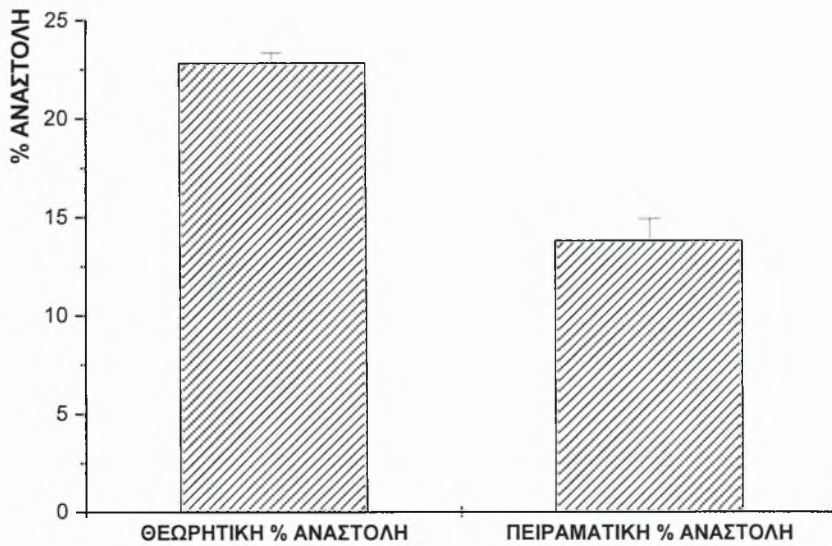
Σχήμα 3.25. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού της επικατεχίνης με το φερουλικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



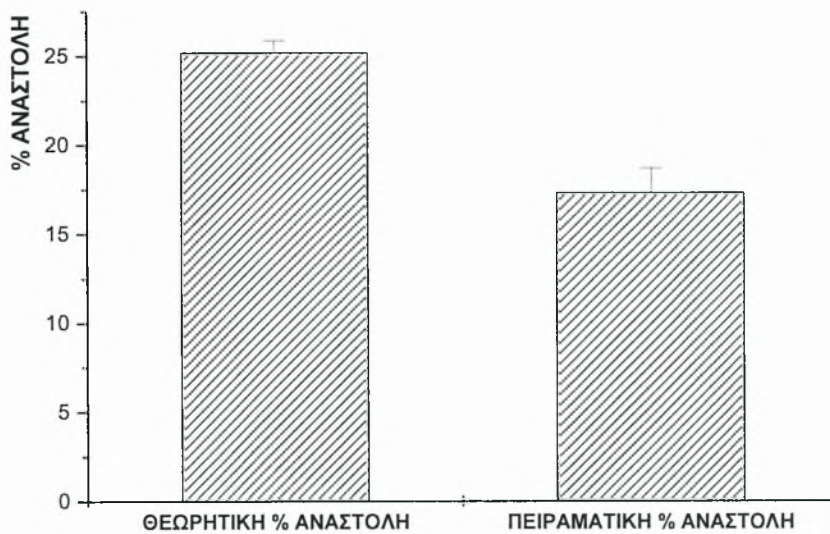
Σχήμα 3.26. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού της επικατεχίνης με το *p*-κουμαρικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



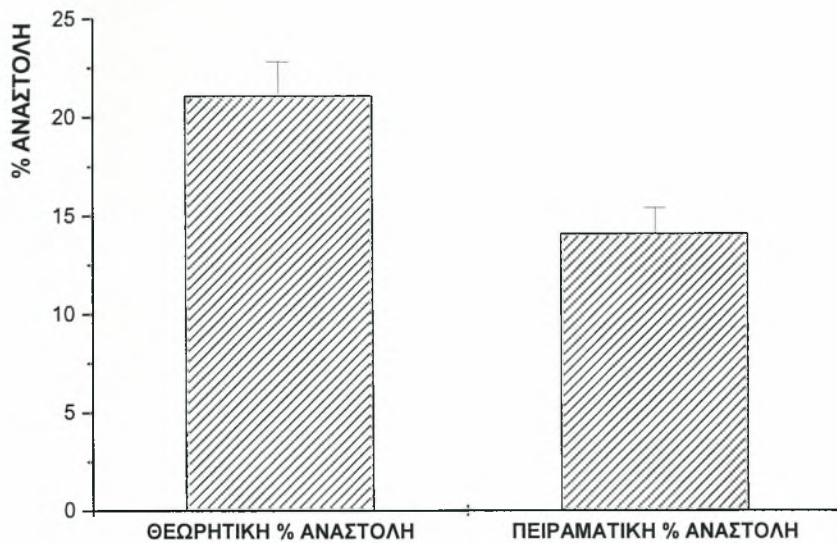
Σχήμα 3.27. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού του ελλαγικού οξέος με το φερουλικό οξύ. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



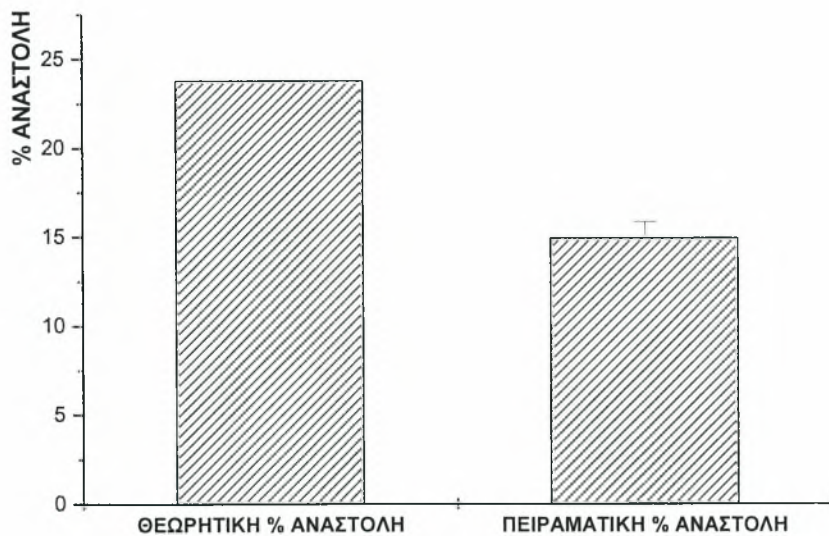
Σχήμα 3.28. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού του ελλάγικού οξέος με τη ρεσβερατρόλη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



Σχήμα 3.29. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού του ελλάγικού οξέος με την κερκετίνη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



Σχήμα 3.30. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού του φερουλικού οξέος με την κατεχίνη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).



Σχήμα 3.31. Θεωρητική % αναστολή και πειραματική % αναστολή του συνδυασμού της ρεσβερατρόλης με την κερκετίνη. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τιμή SEM (standard error mean).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών έχει ασχοληθεί με την επίδραση διαιτητικών προτύπων στην ανθρώπινη υγεία και στο όριο ζωής (Simopoulos, 2004). Συγκεκριμένα, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει συνδεθεί με την πρόληψη διάφορων παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, η φλεγμονή και οι καρδιαγγειακές και νευρολογικές ασθένειες (Sun και συν., 2002). Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να είναι οι κυριότερες διατροφικές, βιοπροστατευτικές ουσίες που περιέχονται στα φυτά και συγκεντρώνουν το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (Manach και συν., 2004). Ωστόσο, η προστατευτική τους δράση, για παράδειγμα στον καρκίνο, μπορεί να οφείλεται και στις προοξειδωτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν μερικές από αυτές, εξουδετερώνοντας τα καρκινικά κύτταρα (Sakihama και συν., 2002). Τα σταφύλια και το κρασί είναι μια πλούσια πηγή ποικίλων φαινολικών ουσιών (Soleas και συν., 1997) και παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό (Renaud και de Lorgeril, 1992). Στο πρώτο τμήμα της παρούσας μελέτης επιδιώχθηκε να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ορισμένων καθαρών φυτικών φαινολικών ουσιών, αλλά και η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις που αυτές βρίσκονται στο αίμα. Επίσης, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων δύο ποικιλιών αμπέλου *Vitis Vinifera*, του Ασύρτικου Σαντορίνης (λευκά σταφύλια) και της Μανδηλαριάς Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια), καθώς επίσης και τριών κλασμάτων των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης. Στο δεύτερο τμήμα, ο στόχος ήταν να διευκρινιστεί αν υπάρχουν συνεργικές δράσεις μεταξύ των καθαρών φαινολών, διότι στις φυτικές τροφές και τα παράγωγά τους, ένα από τα οποία είναι το κρασί, οι ουσίες αυτές παρουσιάζονται ως μείγματα.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολών, των κλασμάτων και των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά τους να «προσφέρουν» ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα ηλεκτρόνιο) στην οργανική νιτρική ρίζα DPPH και βασίστηκε στην εργασία των Andreadou και συν. (1997). Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως IC₅₀, η τιμή της οποίας ορίζεται ως η συγκέντρωση του δείγματος (μM) που προκαλεί 50% μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH ή 50% μείωση στην απορρόφηση του δείγματος ελέγχου.

Αντιοξειδωτική ικανότητα των καθαρών φαινολικών ουσιών

Οι φαινόλες που εξετάστηκαν ήταν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το ελλαγικό οξύ, η κερκετίνη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η ρεσβερατρόλη και η ρουτίνη. Αν και υπάρχουν ενδεικτικές τιμές στη βιβλιογραφία (Duthie και συν., 2003) για την αντιοξειδωτική ικανότητα πολλών πολυφαινολών, στις μελέτες αυτές συνήθως εξετάζονται υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ οι συγκεντρώσεις στις οποίες

συναντώνται στο πλάσμα είναι συχνά χαμηλές και κυμαίνονται στο εύρος 0,1-10 μ M (*Kroon και συν., 2004, Scalbert και Williamson, 2000*). Επίσης, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παραπάνω φαινολών στην παρούσα μελέτη κρίθηκε απαραίτητος για τον καθορισμό τους στις συνθήκες του εργαστηρίου και διότι οι τιμές αυτές θα χρησίμευαν ως δεδομένα για τις επόμενες πειραματικές μετρήσεις.

Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασαν το ελλαγικό οξύ με IC₅₀ ίσο με 6,932 μ M και το γαλλικό οξύ με IC₅₀ ίσο με 7,144 μ M. Ακολουθούν η επικατεχίνη (IC₅₀=10,522 μ M), το καφεϊκό οξύ (IC₅₀=10,901 μ M), η ρουτίνη (IC₅₀=11,873 μ M), η κερκετίνη (IC₅₀=12,399 μ M), η κατεχίνη (IC₅₀=15,437 μ M) και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (IC₅₀=26,281 μ M). Μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασε το φερουλικό οξύ με % αναστολή στα 50 μ M ίση με 23,765 μ M, ακολουθούμενο από τη ρεσβερατρόλη με % αναστολή στα 50 μ M ίση με 25,37 μ M. Το *p*-κουμαρικό οξύ δεν εμφάνισε καμία αντιοξειδωτική δράση απέναντι στη ρίζα DPPH.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών έγκειται στις χημικές ιδιότητες τους ως δότες υδρογόνων του φαινολικού δακτυλίου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Επίσης η ικανότητα να προσφέρουν ηλεκτρόνια εξαρτάται από τη χημική του δομή (*Rice-Evans και συν., 1996*). Η ικανότητα ορισμένων φαινολών να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα, βασίζεται επίσης στη χημική τους δομή και είναι ουσιαστική, καθώς ο χαλκός και ο σίδηρος συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, η οποία είναι μια σημαντική πηγή ριζών οξυγόνου (*Mylonas και Kouretas, 1999*). Επίσης είναι πιθανό, να αναστέλλουν ένζυμα, τα οποία έχουν οξειδωτική δράση επειδή παράγουν ROS (ένζυμα που εξαρτώνται από το κυτοχρώμα P450 ή ένζυμα, όπως η κυκλοοξυγενάση, η λιποοξυγενάση, η οξειδάση της ξανθίνης) (*Cook και Samman, 1996, Ferguson και συν., 2001*).

Συμπερασματικά, η διαβάθμιση στην αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν οι φαινολικές ουσίες που εξετάστηκαν, οφείλεται στις διαφορές που έχουν στις χημικές τους δομές και στην ικανότητα να προσφέρουν ηλεκτρόνια στη ρίζα DPPH. Το ελλαγικό οξύ παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από όλες τις φαινόλες που εξετάστηκαν. Πολλές μελέτες αναφέρονται στην αντιοξειδωτική, αλλά και στην προοξειδωτική του δράση, μέσω της παραγωγής ROS σε καρκινικά κύτταρα (*Bhosle και συν., 2005*). Οι ομάδες λακτόνης που περιέχει φαίνεται να είναι πολύ σημαντικές για τη δραστηριότητά του, ενώ οι 3- και 4-υδροξυλικές ομάδες είναι πιθανό να μη παίζουν σημαντικό ρόλο (*Nepka και συν., 1999*). Το γαλλικό οξύ, το οποίο δεν περιέχει ομάδες λακτόνης, αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ της δομής του ελλαγικού οξέος, καθώς δύο μόρια γαλλικού οξέος ενώνονται για να σχηματιστεί το μόριο του ελλαγικού οξέος. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει περίπου την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα με το ελλαγικό οξύ, η οποία έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες (*Kumagai*

και συν., 2003). Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Nerka και συν., 1999), είναι πιθανόν το καρβοξυλικό οξύ σε συνδυασμό με τον κορεσμένο δακτύλιο του γαλλικού οξέος να αντικαθιστούν τη λειτουργία της ομάδας λακτόνης του ελλαγικού οξέος.

Το γαλλικό οξύ έχει ακριβώς την ίδια δομή, αλλά μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου σε σχέση με το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (5-OH). Παρόλα αυτά, σε σύγκριση με το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το γαλλικό είναι πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό, γεγονός που ενισχύεται και από μελέτες συσχέτισης δομής και αντιοξειδωτικής δράσης, σύμφωνα με τις οποίες, ο βαθμός υδροξυλίωσης των φαινολικών οξέων είναι ανάλογος με την αντιοξειδωτική τους δράση (Fukumoto και Mazza, 2001). Επίσης, η εισαγωγή σε θέση *όρθο* ή *πάρα* μιας υδροξυλικής ομάδας σε ένα μονοφαινολικό οξύ αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση (Rice-Evans και συν., 2001). Ίσως για τον λόγο αυτό το *p*-κουμαρικό οξύ είναι λιγότερο δραστικό από ότι το καφεϊκό (*ορθό*) ή το πρωτοκατεχοϊκό (*παρά*). Πρέπει να αναφερθεί ότι, οι μεθοξυλικές ομάδες φαίνεται να μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων (Fukumoto και Mazza, 2001). Η μειωμένη δραστηριότητα του φερουλικού οξέος σε σχέση με το καφεϊκό ίσως να εξηγείται από την η υποκατάσταση μιας υδροξυλομάδας από μια μεθυλομάδα στο μόριο του φερουλικού οξέος.

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη έχουν όμοια δομή, αλλά με διαφορετική διαμόρφωση στο χώρο, η οποία όμως φαίνεται να έχει σημαντική επιρροή στις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες καθώς η επικατεχίνη αποδεικνύεται πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό από ότι η κατεχίνη, γεγονός που ενισχύεται και από άλλες μελέτες (Steffen και συν., 2005). Πιθανώς, η διαμόρφωση της 3-υδροξυλομάδας χώρο επηρεάζει σημαντικά την δέσμευση των ουσιών αυτών με τις ελεύθερες ρίζες.

Η ρουτίνη αποτελεί ένα γλυκοσίδιο της κερκετίνης και συγκεκριμένα περιέχει ένα σάκχαρο, τη ρουτινόζη, στον άνθρακα 3, στη θέση όπου η κερκετίνη έχει μια υδροξυλομάδα. Πιθανότατα επειδή η ο όγκος της ομάδας του σακχάρου εμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της καρβονυλικής ομάδας της θέσης 4 του δακτυλίου C, η ρουτίνη παρουσιάζει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Rice-Evans και συν., 2001, Zhao και συν., 2003), η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την αντιοξειδωτική τους δράση, μειώνοντας την πρόσδεση ελεύθερων ριζών ή μετάλλων. Παρόλα αυτά, πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι τα γλυκοσίδια των φλαβονοειδών, υφίστανται υδρόλυση μέσα στον οργανισμό (Cook και Samman, 1996).

Η ρεσβερατρόλη παρουσίασε τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρονται στην αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης μέσω ποικίλων ενζυμικών μηχανισμών και μόνο εν μέρει μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης (Dong, 2003, Martin και συν., 2004). Η αντιοξειδωτική της δράση μέσα στον οργανισμό ίσως να οφείλεται

στην αναστολή ενζύμων που παράγουν ROS, είτε μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με μέταλλα, παρά με την απ' ευθείας εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.

Το *p*-κουμαρικό οξύ εμφάνισε εντελώς διαφορετική δράση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φαινόλες που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισε μικρή και σχεδόν σταθερή επαγωγική δράση. Ωστόσο σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία της LDL από την οξείδωση, τερματίζοντας την αλυσίδα των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Zang και συν., 2000). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε σύγκρουση με άλλες μελέτες που τονίζουν την αντιοξειδωτική δράση της πολυφαινόλης αυτής (Zang και συν., 2000). Οι διαφορές αυτές ίσως να οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών μορίων στο πλάσμα είναι συχνά χαμηλές, κυμαίνονται στο εύρος 0,1-10μM (Kroon και συν., 2004, Scalbert και Williamson, 2000). Για να διευκρινιστεί η δράση των φαινολών σε συγκεντρώσεις που ανήκουν σε αυτό το εύρος, ελέγχθηκε η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH από τις παραπάνω φαινόλες σε συγκεντρώσεις 0,5μM και 1μM.

Δραστηριότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (% αναστολή) στα 0,5μM και στο 1μM παρουσίασαν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, η επικατεχίνη, το ελλαγικό οξύ και η κερκετίνη. Αντιθέτως, επαγωγική δράση στα 0,5μM και στο 1μM παρουσίασαν το φερούλικό οξύ, η ρεσβερατρόλη και η κατεχίνη. Τέλος, το καφεϊκό οξύ και η ρουτίνη παρουσίασαν επαγωγική δράση στα 0,5μM και ανασταλτική δράση στο 1μM.

Όσον αφορά την επαγωγική δράση που παρουσίασαν το καφεϊκό οξύ και η ρουτίνη, δεν είναι βέβαιο αν η δράση αυτή είναι ίδια και μέσα στον οργανισμό. Στα *in vitro* πειράματα απουσιάζουν οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην προστατευτική δράση που παρουσιάζουν ορισμένες φαινόλες *in vivo*. Η προοξειδωτική δράση και η αυτοοξειδωση των φαινολών ευνοείται σε αυξημένα επίπεδα οξυγόνου και παρουσία μετάλλων μετάπτωσης, που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίζωσης της φαινολικής ρίζας. Στις φωτομετρικές κυψελίδες η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη από ότι στα κύτταρα του οργανισμού, συνθήκη που ευνοεί την αντίδραση της φαινολικής ρίζας με το μοριακό οξυγόνο (Galati και συν., 2002, Sakihama και συν., 2002).

Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, ανεξαρτήτως του τύπου του ποτού, μειώνει τον κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών (Rimm και συν., 1996). Σε αντίθεση όμως με τα άλλα αφεψήματα, το κρασί περιέχει μια πληθώρα φαινολικών ουσιών που εκχυλίζονται από τα σταφύλια κατά την οινοποίηση και για τον λόγο

αυτό μελετήθηκε ιδιαίτερα για την αναστολή της οξειδωσης της LDL. Επειδή η λιπιδική υπεροξειδωση πιστεύεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αθηροσκλήρυνση, η κατανάλωση αντιοξειδωτικών ουσιών είναι πολύ ελκυστική πρόταση για την πρόληψη της ασθένειας αυτής (Caccetta και συν., 2000). Έχει βρεθεί ότι το κόκκινο κρασί έχει περίπου την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα με ή χωρίς αλκοόλ (dealcoholized), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική δράση είναι ανεξάρτητη του αλκοόλ (Stocker και O'Halloran, 2004). Ο χυμός σταφυλιών παρουσιάζει μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από το κρασί, με πιθανή εξήγηση ότι τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κόκκινο κρασί απορροφώνται από το εντερικό επιθήλιο πιο αποτελεσματικά από ότι τα φλαβονοειδή του χυμού. Πιστεύεται ότι επειδή ορισμένες πολυφαινόλες είναι αδιάλυτες στο νερό, η αιθανόλη μπορεί να δρα ως διαλύτης με επακόλουθη αύξηση της διαλυτότητάς τους (Stocker και O'Halloran, 2004). Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στην αντιοξειδωτική δράση διάφορων κρασιών ή εκχυλισμάτων τους. Σε μία πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου παρουσίαζαν αντιοξειδωτική δράση (Guendez και συν., 2005).

Στην παρούσα μελέτη, το εκχύλισμα που βρέθηκε ότι έχει την χαμηλότερη τιμή IC_{50} , είναι το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=23,548\mu\text{g/ml}$). Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=31,686\mu\text{g/ml}$), το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου ($IC_{50}=35,442\mu\text{g/ml}$) και τέλος το υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου ($IC_{50}=52,403\mu\text{g/ml}$). Από τα κλάσματα που μελετήθηκαν, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασε το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς ($IC_{50}=18,326\mu\text{g/ml}$), ακολουθούμενο από το μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=44,535\mu\text{g/ml}$), και τέλος από το μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=83,014\mu\text{g/ml}$).

Τα κόκκινα κρασιά συνήθως έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες από ότι τα λευκά κρασιά, γεγονός που οφείλεται στη διαφορετική φαινολική σύσταση των κόκκινων και λευκών σταφυλιών, αλλά και στις διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής κρασιού. Σε αντίθεση με την παραγωγή κόκκινου κρασιού, κατά την παραγωγή λευκού κρασιού, η φλούδα των σταφυλιών, η οποία περιέχει σημαντικές ποσότητες φαινολών, απομακρύνεται κατά την οινοποίηση (Paradopolou και συν., 2005).

Τα εκχυλίσματα δεν έχουν την ίδια σύσταση και περιεκτικότητα σε φαινόλες (Πίνακας 2.1.-Πίνακας 2.3.). Στην παρούσα μελέτη, το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα, ενώ το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έχει μικρότερη περιεκτικότητα ακόμη και από τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Ασύρτικο που είναι λευκή ποικιλία. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εξηγείται με βάση την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH από τις φαινόλες που περιέχουν. Το μεθανολικό εκχύλισμα

Μανδηλαριάς, που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ($IC_{50}=23,548\mu\text{g/ml}$), έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες ($31,65\text{mg/g}$) με κύρια φαινόλη το γαλλικό οξύ. Το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς, παρόλο που έχει τη μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες ($2,66\text{mg/g}$), έχει αρκετά μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα ($IC_{50}=31,686\mu\text{g/ml}$). Η κύρια φαινόλη που περιέχει είναι το γαλλικό οξύ σε ποσότητα μεγαλύτερη απ' ό,τι τα εκχυλίσματα Ασύρτικου. Τέλος, μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου ($IC_{50}=44,535\mu\text{g/ml}$), έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου ($IC_{50}=83,014\mu\text{g/ml}$), αν και το πρώτο έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες ($3,86\text{mg/g}$) από το δεύτερο ($6,78\text{mg/g}$). Οι κύριες φαινόλες που περιέχουν είναι αντίστοιχα η κατεχίνη με την επικατεχίνη, και η κατεχίνη με το γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τη μελέτη των Murthy και συν. (2002), όπου το μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών (*Vitis vinifera*) παρουσίαζε μεγαλύτερη περιεκτικότητα και αντιοξειδωτική ικανότητα από ότι το υδατικό εκχύλισμα.

Φαίνεται λοιπόν, ότι το γαλλικό οξύ επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων περισσότερο από ότι η συνολική τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες. Σύμφωνα με τα πειραματικά μας αποτελέσματα, το γαλλικό οξύ έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ίση σχεδόν με αυτήν του ελλαγικού οξέος (τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν δεν περιείχαν αρκετά μεγάλες ποσότητες ελλαγικού οξέος). Συμπερασματικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, δεν οφείλεται μόνο στη συνολική περιεκτικότητά τους σε φαινόλες. Σημαντική επιρροή φαίνεται να έχει και η φαινόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Για τα κλάσματα που μελετήθηκαν δεν υπάρχουν στοιχεία για την περιεκτικότητα και τη σύστασή τους σε φαινόλες. Σύμφωνα με μελέτες (Torres και συν., 2002, Matito και συν., 2002), το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς είναι συνήθως το πρώτο κλάσμα που προκύπτει από το ακατέργαστο απόσταγμα των εκχυλισμάτων και ως εκ τούτου, περιέχει τις περισσότερες φαινόλες. Ίσως με αυτόν τον τρόπο εξηγείται η υψηλή αντιοξειδωτική του ικανότητα ($IC_{50}=18,326\mu\text{g/ml}$). Για την ακρίβεια, η αντιοξειδωτική του δράση είναι μεγαλύτερη ακόμη και από αυτή των εκχυλισμάτων. Πιθανολογώντας, ίσως μαζί με το εκχύλισμα παρασύρεται μεγάλο ποσοστό φαινολικών ουσιών, που καταλήγουν σε μικρότερο όγκο διαλύματος με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι βρισκόταν στο εκχύλισμα. Το μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=44,535\mu\text{g/ml}$) και το μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ($IC_{50}=83,014\mu\text{g/ml}$), παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα που ίσως να οφείλεται στην μικρότερη περιεκτικότητά τους σε φαινόλες..

Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμη πλήρως εξακριβωμένο ποια συστατικά ή συνδυασμός συστατικών που βρίσκονται στο κρασί, αλλά και σε πολλά φρούτα και λαχανικά, είναι προστατευτικά και με ποιον ακριβώς μηχανισμό δρουν (Papadopoulou και συν., 2005). Οι φαινόλες, στις οποίες αποδίδεται ο βιοπροστατευτικός ρόλος του κρασιού, μπορεί να αλληλεπιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με άλλα συστατικά των εκχυλισμάτων του, ούτως ώστε η τελική δράση του εκχυλίσματος να οφείλεται είτε στη συνεργική δράση πολλών συστατικών, είτε σε άλλες ουσίες που βρίσκονται σ' αυτά και που η δράση τους δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί.

Συνδυαστική δράση των φαινολικών ουσιών

Οι φαινόλες παρουσιάζονται συνήθως στα φρούτα και στα λαχανικά, καθώς επίσης και στα παράγωγά τους με τη μορφή μιγμάτων. Για να εξεταστεί η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των φαινολών και συνεργικής δράσης μεταξύ τους στα μίγματα αυτά, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε πιθανού συνδυασμού που προκύπτει ανάμεσα στις φαινόλες που μελετήθηκαν. Με αυτόν τον τρόπο, μια πιθανή αύξηση στη αντιοξειδωτική δράση του μίγματος σε σχέση με τις μεμονωμένες φαινόλες, θα οδηγούσε στο συμπέρασμα ότι οι φαινόλες αυτές δρουν συνεργικά, μια περίπου ίση τιμή θα σήμαινε ότι δεν παρουσιάζεται καμία αλληλεπίδραση, ενώ μια μείωση ότι παρουσιάζεται ανασταλτική δράση.

Κανένας συνδυασμός δεν οδήγησε σε αύξηση της ανασταλτικής δράσης και κατ' επέκταση δεν παρουσιάστηκε συνεργική δράση μεταξύ των φαινολών, κρίνοντας από το γεγονός ότι όλες οι θεωρητικές τιμές ήταν μεγαλύτερες από τις πειραματικές. Ορισμένες πειραματικές αναστολές εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με τις αναμενόμενες θεωρητικές, δηλαδή η δράση της μιας φαινόλης αναιρούσε εν μέρει τη δράση της δεύτερης. Εξ' αιτίας του όγκου των αποτελεσμάτων, μόνο οι συνδυασμοί με τη μεγαλύτερη μείωση αναφέρονται παρακάτω και είναι οι εξής:

1. Επικατεχίνη με ρεσβερατρόλη
2. Επικατεχίνη με φερουλικό οξύ
3. Επικατεχίνη με *p*-κουμαρικό οξύ
4. Ελλαγικό οξύ με φερουλικό οξύ
5. Ελλαγικό οξύ με ρεσβερατρόλη
6. Ελλαγικό οξύ με κερκετίνη
7. Φερουλικό οξύ με κατεχίνη
8. Ρεσβερατρόλη με κερκετίνη.

Ορισμένες χημικές ομάδες των φαινολών, όπως για παράδειγμα οι υδροξυλομάδες και οι καρβονυλομάδες, είναι απαραίτητες για την αντιοξειδωτική τους δράση (*Fukumoto και Mazza, 2001, Rice-Evans και συν., 2001*). Η μεταξύ τους σύνδεση πιθανότατα γίνεται μέσω των ομάδων αυτών ή οδηγεί στην κάλυψή τους έτσι ώστε αυτές να μην μπορούν δράσουν. Επίσης, είναι πιθανόν η συνεργική δράση μεταξύ των φυτικών φαινολών να συμβαίνει παρουσία περισσότερων των δύο φαινολικών μοριών. Είναι γνωστό ότι στα φρούτα και στα φυτά οι φαινόλες μπορούν να πολυμεριστούν σχηματίζοντας ουσίες υψηλού μοριακού βάρους, τις ταννίνες (*Nerka και συν., 1999*).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως οι συνδυασμοί των αντιοξειδωτικών, και ιδιαίτερα των φαινολών, είναι πιο δραστικοί από ότι τα μεμονωμένα αντιοξειδωτικά. Σε μια πρόσφατη μελέτη (*Sasaki και συν., 2004*) αναφέρεται ότι ένα κλάσμα εκχυλίσματος τσαγιού oolong (συνδυασμός πράσινου και μαύρου τσαγιού) που ήταν πλούσιο σε μονομερείς φαινόλες, παρουσίασε ισχυρότερη αντιβακτηριδιακή δράση από ότι οι καθαρές φαινόλες. Επίσης μερικοί συνδυασμοί μεταξύ μονομερών φαινολικών ουσιών έδειξαν πολύ υψηλή αντιβακτηριδιακή δράση. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αντιβακτηριδιακή δράση του εκχυλίσματος προκαλείται από τη συνεργική δράση των μονομερών φαινολών, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν πιο εύκολα στις πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη ο χυμός του ροδιού (*Punica granatum L.*) έχει πιθανές αντιοξειδωτικές και αντιαθηρογενετικές ικανότητες που αποδίδονται στην ελλαγιταννίνη punicalagin και στο ελλαγικό οξύ. Η υπεροχή στην αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει ο χυμός συγκρινόμενος με τις καθαρές φαινόλες που απομονώθηκαν από αυτόν, πιθανόν να οφείλεται εν μέρει στην σύνδεση των φαινολικών ουσιών με ποικίλους υδρογονάνθρακες και οργανικά οξέα που περιέχονται σε αυτόν (*Seeram και συν., 2005*).

Η Conte και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη και η κατεχίνη προστατεύουν τα κύτταρα PC12 από την τοξικότητα που προκαλεί το β- Αμυλοειδές Πεπτιδίο (β-AP), το οποίο δρα κυτταροτοξικά στους νευρώνες *in vitro* και *in vivo*, και η δράση τους αυτή είναι συνεργική. Αυτή η προστασία πιθανόν δεν οφείλεται μόνο στην αντιοξειδωτική τους δράση, αλλά και στις διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες τους σε διάφορους τύπους κυττάρων, προτείνοντας ότι διαφορετικές ενώσεις που εμφανίζουν συνεργική δράση, προστατεύουν πιο αποτελεσματικά από τους πολύπλοκους μηχανισμούς που προκαλούν τοξικότητα (*Conte και συν., 2003*).

Η συνδυαστική δράση των πολυφαινολών μπορεί να βρει εφαρμογή και στη χημειοθεραπεία. Η ταυτόχρονη ή η διαδοχική χορήγηση πολλαπλών αναστολέων της καρκινικής εξεργασίας έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα και μειώνει την τοξικότητα τους. Μια τέτοια προσέγγιση χρησιμοποιεί τους διαφορετικούς μηχανισμούς αναστολής

ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες, έτσι ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δραστηριότητα. Επιπλέον, η αυξημένη αποτελεσματικότητα οδηγεί στα επιθυμητά επίπεδα αναστολής του καρκίνου σε μικρότερες και πιθανόν λιγότερο τοξικές δόσεις του κάθε παράγοντα. (Kelloff, 1996).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe N., Nemoto A., Tsuchiya Y., Hojo H., Hirota A. *Studies on the 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2 pyrone compound*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000, 64 (2): 306-313.
- Ahmad A., Syed F.A., Singh S, Hadi S.M. *Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA*. Toxicol Lett. 2005, article in press.
- Aiub C., Stankevicius L., da Costa V., Ferreira F., Mazzei J., Ribeiro da Silva A., Soares De Moura R., Felzenszwalb I. *Genotoxic evaluation of vinifera skin extract that present pharmacological activities*. Food and Chemical Toxicology 2004, 42: 969-973.
- Andreadou I., Tasouli A., Iliodromitis E., Tsantili-Kakoulidou A., Papalois A., Siatra T., Kremastinos D. Th. *Reduction of myocardial infarct size in rabbits by a novel indole derivative with antioxidant and free radical scavenging properties*. European Journal of Pharmacology 2002, 453: 271-277.
- Aruoma O. I. *Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods*. Mutation Research. 2003, 20 (9): 523-524.
- Azam S., Hadi N., Khan N.U., Hadi S.M. *Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties*. Toxicology in Vitro 2004, 18: 555-561.
- Babich H., Sedletcaia A., Kenigsberg B. *In Vitro Cytotoxicity of Protocatechuic Acid to Cultured Human Cells from Oral Tissue: Involvement in Oxidative Stress*. Pharmacology & Toxicology 91 (5): 245.
- Beecher G. R. *Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake*. J. Nutr. 2003, 133: 3248S-3254S.
- Bhat K.P., Pezzuto J.M. *Cancer chemopreventive activity of resveratrol*. Ann N Y Acad Sci. 2002, 957: 210-29.
- Bhosle S. M., Huilgol N. G., Mishra K. P. *Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid*. Clinica Chimica Acta 2005.
- Burda S., Oleszek W. *Antioxidant and antiradical activities of flavonoids*. J. Agric. Food Chem 2001, 49: 2774-2779.
- Caccetta R., Croft K., Beilin L., Puddey I. *Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability*. American Journal of Clinical Nutrition 2000, 71 (1): 67-74.
- Cao G., Sofic E., Prior R. L. *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radical Biology & Medicine 1997, 22 (5): 749-760.
- Casagrande F., Darbon JM. *Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK1 and CDK2*. Biochem Pharmacol. 2001, 61: 1205-1215.

- Chan T., Galati G., O'Brien P. J. *Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones*. *Chemico-Biological Interactions* 1999, 122: 15–25.
- Conte A., Pellegrini S., Tagliazucchi D. *Synergistic protection of PC12 cells from β -amyloid toxicity by resveratrol and catechin*. *Brain Research Bulletin* 2003, 62 (1): 29-38.
- Cook N. C., Samman S. *Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. *J. Nutr. Biochem.* 1996, 7: 66-76.
- Damas J., Bourdon V., Remacle-Volon G., Lecomte J. *Proinflammatory flavonoids which are inhibitors of prostaglandin biosynthesis*. *Prostaglandins Leukot. Med.* 1985, 19: 11-24.
- Davalos A., Bartolome B., Gomez-Cordoves C. *Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars*. *Food chemistry* 2004, article in press.
- Dong Z. *Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol*. *Mutation Research* 2003, 523-524: 145-150.
- Dorai T., Aggarwal B. B. *Role of chemopreventive agents in cancer therapy*. *Cancer Letters* 2004, 215: 129–140.
- Duthie G., Gardner P., Kyle J. *Plant polyphenols: are they the new magic bullet?* *Proceedings of the Nutrition Society* 2003, 62: 599–603.
- Ferguson L. R. *Role of plant polyphenols in genomic stability*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001, 475 (1-2): 89-111.
- Filipe P., Haigle J., Silva J. N., Freitas J., Fernandes A., Maziere J. C., Maziere C., Santus R., Morlière P. *Anti- and pro-oxidant effects of quercetin in copper-induced low density lipoprotein oxidation. Quercetin as an effective antioxidant against pro-oxidant effects of urate*. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271: 1991-1999.
- Fotsis T., Pepper MS., Aktas E. *Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis*. *Cancer Res.* 1997, 57: 2916-2921.
- Fukumoto L.R., Mazza G. *Assesing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48: 3597-3604.
- Fuhrman B., Volkova N., Suraski A., Aviram M. *White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49:3164-3168.
- Galati G., O'Brien P. *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties*. *Free Radical Biology and Medicine* 2004, 37(3): 287-303.
- Goldstein J. C., Waterhouse P., Juin P., Evan G.I., Green R.I *The coordinate release of cytochrome c is rapid, complete and kinetically invariant*. *Nat. Cell Biol.* 2000, 2:156-162.
- Graf E. *Antioxidant potential of ferulic acid*. *Free Radic Biol Med.* 1992, 13 (4): 435-48.

- Guendez R., Kallithraka S., Makris DP., Kefalas P. *Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis vinifera sp) seed extracts: Correlation with antiradical activity.* Food Chemistry 2005, 89: 1-9.
- Guglielmi F., Luceri C., Giovannelli L., Dolara P., Lodovici M. *Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa.* Br J Nutr. 2003, 89 (5): 581-7.
- Jeong-Chae Lee, Ju Kim^a, Jong-Kun Park^b, Gook-Hyun Chung^a and Yong-Suk Jang. *The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis.* Experimental Cell Research 2003, 291 (2): 386-397
- Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D. *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships.* The Journal of Nutritional Biochemistry 2002, 13:572-584.
- Hertog MG., Kromhout D., Aravanis C. *Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study.* Arch. Intern Med. 1995, 155: 381-386.
- Hodek P., Trefil P., Stiborova M. *Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450.* Chem.-biol. Interact. 2002, 139: 1-21.
- Halliwell B. *Free radicals and other reactive species in disease.* Encyclopedia of life sciences 2001.
- Hollman P.C., Katan M.B. *Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability.* Food and Chemical Toxicology 1999, 37: 937-942.
- Huang D., Ou B. Prior R.L. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.* J. Agric. Food Chem. 2005, 53: 1841-1856.
- Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Gao HY, Onodera S, Ikejima T. *(+)-catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest.* J Pharmacol Sci. 2005 98 (1): 16-24.
- Huisman A., Van de Wiel A., Rabelink T. J., Van Faassen E. E. *Wine polyphenols and ethanol do not affect endothelial nitric oxide production.* Journal of Nutritional Biochemistry 2004, 15: 426-432.
- Inoue M., Suzuki R., Koide T., Sakaguchi N., Ogihara Y., Yabu Y. *Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells.* Biochem Biophys Res Commun. 1994 204(2): 898-904.
- Kampa M., Alexaki VI., Notas G., Nifli AP., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. *Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action.* Breast cancer Research 2004, 6:R63-R74.
- Καράταγλης Σ. Σ. *Φυσιολογία Φυτών.* Art of text 1994, 391-407.
- Kelloff G. J., Boone C. W., Crowell J. A., Steele V. E., Lubet R. A., Doody L. A., Malone W. F., Hawk E. T., Sigman C. C. *New Agents for Cancer Chemoprevention.* Journal of Cellular Biochemistry. 1996, 26S:1-28.

Κουρέτας Δ. *Βιοχημική τοξικολογία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας. 2003, 43-45.

Krajka-Kuzniak V., Szaefer H., Baer-Dubowska W. *Modulation of cytochrome P450 and phase II enzymes by protocatechuic acid in mouse liver and kidney*. Toxicology 2005, article in press.

Kroon PA., Clifford MN., Crozier A., Day AJ., Donovan JL., Manach C., Williamson G. *How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?* American Journal of Clinical Nutrition 2004, 80:15-21.

Kumagai J., Kawaura T., Miyazaki T., Prost M., Prost E., Watanabe M., Quetin-Laclercq J. *Test for antioxidant ability by scavenging long lived mutagenic radicals in mammalian cells and by blood test with intentional radicals: an application of gallic acid*. Radiation Physics and Chemistry 2003, 66: 17-25.

Lamuela-Raventos R., Covas M., Fito M., Marrugat J., de la Torre-Boronat M. C. *Detection of Dietary Antioxidant Phenolic Compounds in Human LDL*. Clinical Chemistry 1999 45:1870-1872.

Laughton MJ., Evans PJ., Moroney Houlst JR., Halliwell B. *Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability*. Biochem. Pharmacol 1991, 42: 1673-1681.

Lim E., Higgins G., Li Y., Bowles D. *Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in planta*. Biochem. J. 2003, 373: 987-992.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. Am. J. Clin. Nutr. 2004, 79:727-47.

Mathew S., Abraham T.E. *Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications*. Crit Rev Biotechnol. 2004, 24 (2-3): 59-83.

McMurry J. *Οργανική Χημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2001, 185.

Miller M. JS., Angeles F. M., Reuter B. K., Bobrowski P., Sandoval M. *Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2001, 1:11.

Murty K. N. C., Singh R. P., Jayaprakasha G. K. *Antioxidant activities of grape (Vitis Vinifera) pomace extracts*. 2002, 50: 5909-5914.

Mylonas C. and Kouretas D. *Lipid peroxidation and tissue damage*. In Vivo 1999, 13 (3): 295-309.

Narayanan BA., Geoffroy O., Willingham M.C., Re G.G., Nixon D.W. *p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells*. Cancer Lett 1999 136 (2): 215-21.

Nijveldt R. J, Van Nood E., Van Hoorn D. EC., Boelens P. G, Van Norren K., Van Leeuwen P. AM. *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. American Journal of Clinical Nutrition 2001, 74 (4): 418-425.

- Papadopoulou C., Soulti K., Roussis I. *Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans*. Food Technol. Biotechnol. 2005, 43 (1): 41-46.
- Patrineli A., Clifford M. N., Ioannides C. *Contribution of phenols, quinones and reactive oxygen species to the mutagenicity of grape juice in the Ames test*. Food and Chemical Toxicology 1996, 34: 869-872.
- Pierre-Louis Teissedre and Nicolas Landrault: *Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability*. Food Research International 2000, 33: 461-467.
- Prior R. L. *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage*. American Journal of Clinical Nutrition 2003, 78 (3) 570S-578S.
- Rasmussen S. E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K., Poulsen L. *Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability and protection against cardiovascular disease*. Mol. Nut. Food Res. 2005, 49:159-174.
- Rechner A. R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., P. Moore K., Rice-Evans C. A. *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radical Biology and Medicine 2002, 33 (2): 220-235.
- Renaud S., de Lorgeril M. *Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet 1992, 339: 1523-1526.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. *Flavonoids: Promising anticancer agents*. Medicinal Research Reviews 2003, 23(4): 519-534.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. *Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids and Phenolic Acids*. Free Radical Biology & Medicine 1996, 20 (7): 933-956.
- Ruf J. C. *Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis*. Drugs Exp. Clin. Res. 1999, 25: 125-131.
- Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H. *Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants*. Toxicology 2002, 177: 67-80.
- Sasaki H., Matsumoto M., Tanaka T., Maeda M., Nakai M., Hamada S., Ooshima T. *Antibacterial activity of polyphenolic components in Oolong tea extract against Streptococcus mutans*. Caries Research 2004, 38:2-8.
- Scalbert A., Williamson G. *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J. Nutr. 2000, 130: 2073S-2085S.
- Seeram N. P., Adams L. S., Henning S. M., Niu Y., Zhang Y., Nair M. G., Heber D. *In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. The Journal of Nutritional Biochemistry 2005, 16 (6): 360-367.

- Shahrzad S., Aoyagi K., Winter A., Koyama A., Bitsch I. *Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans*. Journal of Nutrition 2001, 131: 1207-1210.
- Simopoulos A. P. *The traditional diet of Greece and cancer*. European Journal of Cancer Chemoprevention 2004, 13:219-230.
- Sohi K.K., Mittal N., Hundal M.K., Khanduja K.L. *Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism*. J Nutr Sci Vitaminol 2003 49(4): 221-7.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. *Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention*. J Clin Lab Anal 1997, 11(5): 287-313.
- Sroka Z., Cisowski W., *Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids*. Food and Chemical Toxicology 2003, 41: 753-758.
- Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos K., Kouretas D. *Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA*. Int J Mol Med. 2005, 15(6):1013-22.
- Steffen Y., Schewe T., Sies H. *Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase*. Biochem Biophys Res Commun. 2005, 331(4): 1277-83.
- Stocker R., O'Halloran R. *Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall*. American Journal of Clinical Nutrition 2004, 79 (1): 123-130.
- Suzuki R., Kohno H., Sugie S., Tanaka T. *Dietary procatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis*. Asian Pac J Cancer Prev. 2003 4 (4): 319-26.
- Tedesco I., Russo M., Russo P., Iacomino G., Russo G. L., Carraturo A., Faruolo C., Moio L., Palumbo R. *Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells*. The Journal of Nutritional Biochemistry 2000, 11 (2): 114-119.
- Torres J., Varela B., Garcia M., Carilla J., Matito C., Centeles J., Cascante M., Sort X., Bobet R. *Valorization of grape (Vitis vinifera) Byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content*. J. Agric Food Chem 2002, 50: 7548-7555.
- Undeger U., Aydin S., Basaran A., Basaran N. *The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage*. Toxicology Letters 2004, 151: 143-149.
- Urquiaga I., Leighton F. *Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress*. Biological Research 2000, 33 (2).
- Van de Wiel A., Van Golde P. H. M., Hart H. Ch. *Blessings of the grape*. European Journal of Internal Medicine 2001, 12: 484-489.

Wang D., Xiang D., He Y., Li Z., Wu X., Mou J., Xiao H., Zhang Q. *Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro*. World J Gastroenterol 2005 26:4008-4012.

Weber G., Shen F., Prajda N., Yang H., Li W., Yeh A., Csokay B., Olah E, Look KY. *Regulation of the signal transduction program by drugs*. Adv. Enzyme Regul 1997, 37: 35-55.

Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C. *Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?* Free Radic. Biol. Med. 2004, 36: 838-849.

Zang L., Cosma G., Gardner H., Shi X., Castranova V., Vallyat V. *Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation*. Am J Physiol Cell Physiol 2000, 279: C954-C960.

Zhao C., Yimin S., Wang W., Zhongjian J., Yao S., Botao F., Zheng R. *Fast repair of deoxythymidine radical anions by two polyphenols: rutin and quercetin*. Biochem Pharmacol 2003, 65:1967-1971.