

Διερεύνηση των βοστρύχων της αμπέλου
(*Vitis vinifera*) ως πλούσιας πηγής
βιοδραστικών πολυφαινολών και μελέτη
της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων
τους

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Σ. ANNA



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ ΣΕΡΚΟ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

«Διερεύνηση των βοστρύχων της αμπέλου (*Vitis vinifera*) ως πλούσιας πηγής βιοδραστικών πολυφαινολών και μελέτη της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων τους»

Άννα Σ. Αποστόλου
Τεχνολόγος γεωπόνος

Επιβλέπων:

Χαρουτουνιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Εξεταστική Επιτροπή:

Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ταραντίλης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χαρουτουνιάν Σέρκο, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθήνα 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία έλαβε χώρα κατά το χρονικό διάστημα 2008-2011 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την εκπόνηση της εργασίας, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουιάν, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος για την μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία, δίνοντας μου έτσι την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο. Οι γνώσεις, η βοήθεια και οι συμβουλές που μου παρείχε, πάνω στα θέματα της εργασίας ήταν πολύ χρήσιμες και πολύτιμες.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά το λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για τους βιολογικούς προσδιορισμούς που μου προσέφερε πάνω στις βιοδραστικές μεθόδους που ασχολήθηκα.

Οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Ιωάννου για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος. Επίσης ευχαριστώ θερμά την Δρ. Σοφία Κουλοχέρη για τις υποδείξεις και τις σημαντικές παρατηρήσεις της επάνω στην εργασία.

Θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Μιχάλη Χριστοδούλου για την αμέριστη βοήθεια του και τις υποδείξεις του στο πειραματικό μέρος της εργασίας, καθώς και για την υπομονή, που επέδειξε κατά την διάρκεια εξαγωγής του. Επιπλέον, εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην φίλη υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Τζαννέτου για τις πολύτιμες συμβουλές της και για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για την ενθάρρυνση, την καθοδήγηση, την ηθική και υλική υποστήριξη που μου προσέφεραν από την αρχή των σπουδών μου.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες των οίνων αποτέλεσε το έναυσμα για τη μελέτη των υποπροϊόντων οινοποίησης σταφυλιών από σημαντικές για την Ελλάδα γηγενείς ποικιλίες αμπέλου του γένους *Vitis vinifera* L. Συγκεκριμένα, στην παρούσα ερευνητική εργασία το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη μελέτη εκχυλισμάτων βόστρυχων και γιγάρτων με στόχο τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε αυτά των έντεκα σημαντικότερων βιοδραστικών πολυφαινολών. Στο πλαίσιο αυτό, στα δείγματα που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω προσδιορισμοί:

- ❖ Ολικών φλαβονοειδών
- ❖ Ολικών φαινολικών
- ❖ Συγκέντρωσης των βιοδραστικών πολυφαινολών (γαλλικό οξύ,επικατεχίνη, καμφερόλη, καφεϊκό οξύ, (+)-κατεχίνη, κερκετίνη, π-κουμαρικό οξύ, ρουτινοσίδης της κερκετίνης (ρουτίνη), *trans*-ρεσβερατρόλη, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ).

Επιπλέον, αποτιμήθηκε η βιολογική δράση των εκχυλισμάτων με βάση τους προσδιορισμούς της:

- ❖ Αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH και ABTS.
- ❖ Αντικαρκινικής δράσης με βάση τη μέθοδο ΧΤΤ σε ηπατικά κύτταρα.
- ❖ Αντιμεταλλαξιόγону δράσης έναντι μεταλλάξεων προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet) με τη μέθοδο του DNA plasmid relaxation.
- ❖ Αντιαγγειογενετικής δράσης με τη μέθοδο της μελέτης σχηματισμού σωλήνων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι βόστρυχοι, που αποτελούν σημαντικά υποπροϊόντα της οινοποίησης, παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό και οικονομικό ενδιαφέρον και αξιόλογες βιολογικές δράσεις. Ειδικότερα, οι προσδιορισμοί που διενεργήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής έδειξαν ότι:

- ✓ Οι βόστρυχοι εμπεριέχουν τις μεγαλύτερες ποσότητες των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν σε σχέση με τα γιγάρτα.

- ✓ Από τα μόρια που μελετήθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκαν το γαλλικό οξύ και η *trans*-ρεσβερατρόλη στην ποικιλία Βοϋδόματο, η ρουτίνη και το συριγγικό οξύ στην ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου και η επικατεχίνη στην ποικιλία Ξινόμαυρο. Σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύθηκε η παρουσία των μορίων καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και καμφερόλη.
- ✓ Την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες είχαν τα εκχυλίσματα βοστρύχων των ποικιλιών Ρομπόλα, Μανδηλαριά και Μοσχάτο Αμβούργου.
- ✓ Τα εκχυλίσματα βοστρύχων των ποικιλιών Ρομπόλα, Ασύρτικο και Μαυροτράγανο είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών.
- ✓ Όλα τα εκχυλίσματα των βοστρύχων έδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα γιγάρτων και στις δυο μεθόδους που μελετήθηκαν (DPPH και ABTS). Από τα εκχυλίσματα βοστρύχων η ποικιλία Ασύρτικο έδειξε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.
- ✓ Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε έναντι των μεταλλάξεων που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet) και περοξυλίου (ROOH^\bullet) με τη μέθοδο DNA plasmid relaxation. Την ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση έδειξαν τα δείγματα της ποικιλίας Βοϋδόματο και την ασθενέστερη της ποικιλίας Ξινόμαυρο.
- ✓ Τα εκχυλίσματα βοστρύχων των ποικιλιών Μαυροτράγανο και Βοϋδόματο διαθέτουν την ισχυρότερη χημειοπροστατευτική αντικαρκινική δράση σε ηπατοκύτταρα (μέθοδος ΧΤΤ).
- ✓ Τα εκχύλισματα βοστρύχων της ποικιλίας Ασύρτικο αναστέλλουν τον σχηματισμό σωλήνων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που αποτελεί ισχυρή ένδειξη για σημαντική αντιαγγειογενετική δράση.

SUMMARY

The significant biological activity of wine polyphenols has triggered our interest to investigate the vinification byproducts of the major native grape varieties (*Vitis Vinifera L.*) cultivated in Greece. Specifically, the main focus of this endeavor was the investigation of grape stems and seeds extracts to determine their content of the eleven most important bioactive polyphenols. In this context, we have determined their content of:

- ❖ Total flavonoids.
- ❖ Total polyphenols.
- ❖ Eleven bioactive polyphenols concentration, namely gallic acid, epicatechin, campherol, caffeic acid, (+)-catechine, quercetine, π -coumaric acid, routine, *trans*-resveratrol, syringic acid and feroulic acid.

❖ Additionally, the biological activities of the extracts were evaluated through the following assays:

- ❖ Antioxidant activity by DPPH and ABTS methods.
- ❖ Anticancer activity by XTT method on liver cells.
- ❖ Antimutagenetic activity against mutations caused by hydroxy free radicals (OH^\bullet) via the DNA plasmid relaxation method.
- ❖ Antiangiogenic activity, via the assessment of tube formation by endothelial cells

The experimental results established that grape stems, which constitute vinification byproducts, present significant research and financial interest and remarkable biological properties. Specifically, the performed assessments indicated that:

- ✓ Grape stems display larger polyphenol content as compared to their respective seeds

- ✓ Most abundant among assayed molecules were gallic acid and *trans*-resveratrol for the Voidomato variety, routine and syringic acid for the Muscat Hamburg variety and epicatechin for Xinomavro variety. In smaller concentrations were the molecules caffeic acid, π -coumaric acid and Kaempherol.
- ✓ The highest total polyphenolic content were found in stem extracts of Robola, Mandilaria and Muscat Hamburg varieties
- ✓ The highest total flavonoids content were determined in stem extracts of Robola, Asyrtiko and Mavrotragano varieties.
- ✓ Both antioxidant activity assessment methods (DPPH and ABTS) indicated that stem extracts posses more potent antioxidant properties as compared to their respective seeds extracts, with stem extracts of Asyritko variety being the most potent
- ✓ The antimutagenic activity of the extracts was determined against mutations caused by the free radicals (OH^\bullet) and (ROOH^\bullet) using the DNA plasmid relaxation method. The most intense activity against both radicals were from the stems of the Voidomato variety, while stems of the Xinomavro variety displayed –in both assays- the weakest activities.
- ✓ Stem extracts of Mavrotragano and Voidomato varieties display the most intense chemopreventive anticancer ability tested in liver cells (method XTT).
- ✓ Extracts of Asyrtiko stems inhibit the tube formation in endothelial cells, indicating that they possess significant antiangiogenic properties.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Φυσικά Προϊόντα.....	1
1.1.1 Χρήσεις Φυσικών Προϊόντων.....	2
1.1.1.1 Εμπορική διάσταση	4
1.2 Υποπροϊόντα γεωργικών διεργασιών.....	5
1.2.1 Υποπροϊόντα Οινοποιειών.....	7
1.3 Σύγχρονη γνώση για τον οίνο.....	9
1.4 Βιοσύνθεση Φαινολικών Φυτοχημικών.....	10
1.4.1 Οδός σικιμικού οξέος.....	12
1.4.2 Οδός φαινυλανίνης /υδροξυκινναμωμικού οξέος.....	18
1.4.3 Βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων.....	18
1.4.4 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών.....	21
1.4.5 Βιοσύνθεση στιλβενίων.....	25
1.5 Βιολογική δράση πολυφαινολών.....	26
1.5.1 Αντικαρκινική δράση πολυφαινολών	26
1.5.1.1 Αντικαρκινική δράση των κυριότερων πολυφαινολών των σταφυλιών	27
1.5.2 Αντιαγγειογενετική δράση των σταφυλιών.....	29
1.5.3 Αντιαθηρωματική δράση.....	30
1.5.4 Άλλες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών.....	31
2.1 Απομόνωση-Παραλαβή των Πολυφαινολών από Φυτικό υλικό.....	34
2.1.1 Εισαγωγή.....	34
2.1.2 Εκχύλιση.....	35
2.1.3 Εκχύλιση με υπερήχους.....	36
2.1.4 Δείγματα που μελετήθηκαν.....	37
2.1.5 Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων.....	38
2.1.6 Αναλώσιμα-Συσκευές.....	38
2.1.7 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών.....	38
2.2 Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC: Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός Πολυφαινολών.....	40
2.2.1 Κριτήρια επιλογής μεθόδου.....	40
2.2.2 Εξοπλισμός.....	41

2.2.3 Αναλώσιμα	41
2.2.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων.....	42
2.2.5 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολών	42
2.2.6 Συνθήκες ανάλυσης.....	43
2.3 Προσδιορισμός Φαινολών	45
2.3.1 Μέθοδος Ολικών Φαινολικών- Folin Ciocalteu.....	48
2.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	49
2.4 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών	50
2.5 Τεχνικές Μέτρησης Αντιοξειδωτικής Δράσης	51
2.5.1 Εισαγωγή.....	51
2.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH*	52
2.5.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS**	53
2.6 Προσδιορισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης έναντι μεταλλάξεων προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (OH•) με τη μέθοδο του DNA plasmid relaxation.	54
2.6.1 Εισαγωγή.....	54
2.6.2 Πειραματική διαδικασία.....	55
2.6.2.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA	55
2.6.2.2 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)	56
2.6.2.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•) ..	57
2.7 Μελέτη της επίδρασης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων με τη μέθοδο ΧΤΤ.	59
2.7.1 Σκοπός.....	59
2.7.2 Πειραματική Διαδικασία.....	59
2.8 Επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχο στον σχηματισμό σωλήνων από ενδοθηλιακά κύτταρα.	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
3.1 Αποτελέσματα αναλύσεων με HPLC	61
3.2 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	69
3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων DPPH και ABTS	74
3.4 Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)	76
3.5 Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•).....	78
3.6 Αποτελέσματα μεθόδου ΧΤΤ.....	80

<i>3.7 Αποτελέσματα εκχυλίσματος της ποικιλίας Ασύρτικου στον σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων</i>	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσικά Προϊόντα

Η φύση υπήρξε πάντα πλούσια πηγή μορίων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις και σημαντικές εφαρμογές σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς. Με τον όρο φυσικά προϊόντα χαρακτηρίζονται όλες οι χημικές ενώσεις -ανόργανες και οργανικές- που βρίσκονται στη φύση. Στην πράξη όμως έχει καθιερωθεί η έννοια αυτή να αντιστοιχεί μόνο στα οργανικά μόρια που απαρτίζουν τους ζωντανούς οργανισμούς ή παράγονται από αυτούς. Έτσι, στα φυσικά προϊόντα δεν συγκαταλέγονται συστατικά όπως το πετρέλαιο, παρότι αυτά αναφέρονται σε μόρια που παράγονται από ζώντες οργανισμούς, αφού η δημιουργία τους είναι αποτέλεσμα επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων.

Η συστηματική επιστημονική μελέτη των φυσικών προϊόντων ανάγεται στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, οπότε εκτός από την απομόνωσή τους άρχισε και η μελέτη της δομής τους με τα αναλυτικά μέσα της εποχής. Οι κατηγορίες των μορίων που συγκαταλέγονται στα φυσικά προϊόντα διακρίνονται –ανάλογα με την προέλευση και το λειτουργικό τους ρόλο- σε προϊόντα :

➤ Πρωτογενούς μεταβολισμού, όπως υδατάνθρακες, α-αμινοξέα, πρωτεΐνες, λίπη, νουκλεϊνικά οξέα κ.λ.π. Αυτά αποτελούν τα θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων των έμβιων οργανισμών.

➤ Δευτερογενούς μεταβολισμού, όπως φαινολικά παράγωγα (ανθοκυάνες, φλαβονοειδή), τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα. Αυτά διαφοροποιούνται και χαρακτηρίζουν τον οργανισμό που τα παράγει, χωρίς όμως να συμμετέχουν στις βασικές οργανικές τους λειτουργίες.

Στη σύγχρονη εποχή ο όρος «φυσικό προϊόν» έχει περιοριστεί αποκλειστικά στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτικών και ζωικών οργανισμών, συμπεριλαμβάνοντας και τα αντίστοιχα προϊόντα των θαλάσσιων οργανισμών και μικροοργανισμών. Επιπλέον, η χημεία των φυσικών προϊόντων έχει και αυτή μετεξελιχθεί, αφού η παραδοσιακά περιγραφική της

μορφή έχει αντικατασταθεί από τη μελέτη των μηχανισμών προέλευσης των φυσικών προϊόντων και την έρευνα των χημικών μετατροπών που συντελούνται στους οργανισμούς σε συνδυασμό με τη βιολογία και τη βιοχημεία τους. Σήμερα, η ανθρωπότητα οφείλει πολλά στην ανάπτυξη της χημείας των φυσικών προϊόντων, αφού πολλά από τα νέα φάρμακα, τους σύγχρονους τρόπους καταπολέμησης ασθενειών των φυτών και των ζώων, των συμπληρωμάτων διατροφής, όπως και η κατανόηση πολλών βιολογικών διαδικασιών είναι άρρητα συνδεδεμένα με την εξέλιξη της χημείας των φυσικών προϊόντων.¹

1.1.1 Χρήσεις Φυσικών Προϊόντων

Τα τελευταία χρόνια ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων έχει υιοθετήσει ένα «υγιεινό» τρόπο ζωής ως μέσον πρόληψης ασθενειών. Στα πλαίσια της τάσης αυτής, έχει αυξηθεί η ζήτηση διατροφικών προϊόντων που εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους έχουν και ευεργετική επίδραση στην υγεία. Οι αγγλικοί όροι "functional foods" και "medical & nutritional foods" αναφέρονται σε προϊόντα που συνδυάζουν την θρεπτική αξία με την πρόληψη ασθενειών. Ενδιαφέρουσα επίσης είναι η ετυμολογία του όρου "nutraceuticals" που είναι συνδυασμός των λέξεων "nutritional & pharmaceuticals"

Τα nutraceuticals, βιολειτουργικά τρόφιμα ή φαρμακευτικά τρόφιμα είναι όροι που συχνά χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τρόφιμα ή προϊόντα που βοηθούν τη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού και/ή μειώνουν την πιθανότητα χρόνιων παθήσεων. Παρόλο που οι όροι nutraceuticals ή βιολειτουργικά τρόφιμα χρησιμοποιούνται ευρέως, δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς τη σημασία τους. Έχουν προταθεί οι ακόλουθοι ορισμοί:

- Nutraceuticals είναι τα προϊόντα που απομονώνονται από τρόφιμα και πωλούνται σε φαρμακευτική μορφή συχνά μη συσχετιζόμενη με τρόφιμο. Θεωρείται ότι αυτά τα προϊόντα βοηθούν τη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού και/ή μειώνουν την πιθανότητα χρόνιων παθήσεων.

- Τα βιολειτουργικά τρόφιμα (functional foods) είναι όμοια σε εμφάνιση με τα συνήθη τρόφιμα ή μπορεί να είναι τυπικά τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται ως

μέρος της συνήθους διατροφής, αλλά πέραν της βασικής διατροφικής τους χρησιμότητας βοηθούν τη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού και/ή μειώνουν την πιθανότητα χρόνιων παθήσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα βιολειτουργικού ζωικού τροφίμου που παράγεται με αλλαγή της ζωοτροφής είναι η παραγωγή αυγών με αυξημένο περιεχόμενο σε ω-3 λιπαρά οξέα. Η κατανάλωση τέτοιων προϊόντων έδειξε ότι μειώνει αποτελεσματικά τον κίνδυνο καρδιοπαθειών.

Η τάση κατανάλωσης των προαναφερθέντων προϊόντων ενισχύεται σημαντικά και από την σημαντική αύξηση του μέσου προσδόκιμου χρόνου ζωής που έχει ως επακόλουθο την παράλληλη αύξηση ασθενειών που συνήθως εκδηλώνεται σε μεγάλες ηλικίες. Έτσι, ασθένειες όπως η ανεπάρκεια του κυκλοφορικού συστήματος και οι καρκίνοι είναι πλέον αιτίες για το 66% των θανάτων σε ανθρώπους των χωρών με υψηλό κατά κεφαλήν εισόδημα. Για παράδειγμα, ο καρκίνος θεωρείται υπεύθυνος για θανάτους ανδρών ηλικίας 55-64 ετών σε ποσοστό >60 %, ενώ για τις ηλικίες <35 ετών το ποσοστό είναι 10% (World Health Organization, 1998).

Σχετικά με τις ασθένειες αυτές έχει ολοκληρωθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών που κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σημαντικός παράγοντας για την εμφάνισή τους θεωρείται ο «δυτικός» τρόπος ζωής και διατροφής του ανθρώπου. Είναι όμως χαρακτηριστικό ότι η συχνότητα εκδήλωσης των ασθενειών αυτών μειώνεται σημαντικά σε ομάδες ανθρώπων που διατρέφονται κυρίως με φρούτα και λαχανικά. Αν και μέχρι τώρα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ποια από τα συστατικά που εμπεριέχονται στα φυτικής προέλευσης τρόφιμα ασκούν προστατευτικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου (και μέσω ποιου μηχανισμού), εντούτοις υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις/αποδείξεις που αποδίδουν έναν ουσιαστικό ρόλο στην πρόληψη των χρόνιων ασθενειών στην παρουσία ορισμένων φυσικών φυτοχημικών προϊόντων. Στην κατηγορία αυτή των φυτοχημικών ουσιών περιλαμβάνονται τα τερπενοειδή (καροτενοειδή, στεροειδή κ.ά.), οι πολυφαινόλες (ταννίνες, κινόνες, флаβονοειδή κ.ά.), οι πολυσακχαρίτες και τα πεπτίδια. Από τις ενώσεις αυτές, που παράγουν τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες με σκοπό την ικανοποίηση μιας σειράς λειτουργικών τους αναγκών, οι πολυφαινόλες (π.χ. флаβονοειδή, ρεσβερατρόλη, ελαιοευρωπαϊνή, τυροσόλη κλπ)

ασκούν σαφώς ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου, δρώντας ως αντιοξειδωτικά, δεδομένου ότι η ανεπαρκής πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών (π.χ. βιταμίνης E και C, καροτενοειδών κ.ά.) οδηγεί στην οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA *in vivo*, με αποτέλεσμα την εκδήλωση πολλών χρόνιων παθήσεων και ασθενειών.

Με δεδομένα λοιπόν τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, για τον σύγχρονο καταναλωτή υπάρχουν δύο επιλογές: η μία είναι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και η άλλη -εναλλακτική- είναι ο εμπλουτισμός των ζωικής προέλευσης προϊόντων (γάλα, κρέας, αυγά και των παραπροϊόντων τους) με τις φυσικές αυτές φυτοχημικές ουσίες μέσω της διατροφής των ζώων. Στα πλαίσια αυτά, το γάλα συνιστά μια τροφή που καταναλώνεται σε καθημερινή βάση από όλους τους ανθρώπους, κάθε ηλικίας, και επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει μια εύκολη και αποτελεσματική οδό πρόσληψης αντιοξειδωτικών με θετικές επιδράσεις στην υγεία του. Ως προσιτή/φτηνή πηγή φυτοχημικών ενώσεων με αποδεδειγμένη ευεργετική επίδραση στην υγεία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα φυσικά συστατικά που εμπεριέχονται στα υποπροϊόντα διαφόρων γεωργικών διεργασιών (π.χ. ελαιόφυλλα, ελαιοπυρήνες) ή βιομηχανιών (π.χ. στέμφυλα οινοποιίας και τοματοποιίας κ.ά.), τα οποία χρησιμοποιούνται στη διατροφή των μηρυκαστικών ζώων (βοοειδή-αιγοπρόβατα) εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Τα εν λόγω υποπροϊόντα είναι γνωστό ότι εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες από φυσικά αντιοξειδωτικά με γνωστή και αποδεδειγμένη βιολογική αξία, όπως η ελαιοευρωπαϊνή, η τυροσόλη και η υδροτυροσόλη (ελαιουργία), η ρεσβερατρόλη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η ρουτίνη και η κερκετίνη (οινοποιία) και το λυκοπένιο (τοματοβιομηχανία).

1.1.1.1 Εμπορική διάσταση

Σύμφωνα με την Nutrition Business Journal (NBJ) (San Diego, California) οι πωλήσεις των σχετικών προϊόντων το 1996 έφτασαν τα 86 δις \$, με άνοδο 7.5 % σε σχέση με το 1995. Ο κατάλογος του NBJ περιλαμβάνει όλα τα καταναλώσιμα τρόφιμα, ποτά και συμπληρώματα που αγοράζονται κυρίως για λόγους υγείας, περιλαμβανομένης της πρόληψης και της θεραπείας διαφόρων ασθενειών.

Αναλυτικότερα, στα 86 δισ \$ περιλαμβάνονται οι πωλήσεις των φυσικών τροφίμων (8.5%), συμπληρωμάτων (12.1 %), βιολειτουργικών τροφίμων (functional foods) (16.6%, τροφίμων εμπλουτισμένων με συστατικά που έχουν θετική επίδραση στην υγεία), μερικά «λιγότερο ανθυγιεινά» τρόφιμα (28.5 %), τρόφιμα των οποίων τα «ανθυγιεινά» συστατικά όπως λίπη, ζάχαρη, καφεΐνη, αλάτι κ.λ.π έχουν απομακρυνθεί. Το υπόλοιπο 34.3% αφορά πωλήσεις τροφίμων που καταναλώνονται καθαρά για λόγους υγείας (π.χ χυμός δαμάσκηνου) ή τροφίμων που συχνά θεωρούνται ότι κάνουν καλό στην υγεία (π.χ χυμός πορτοκαλιού, γιαούρτια, ψάρια, φρούτα, τσάι) ή βιολειτουργικών τροφίμων που έχουν πλέον καθιερωθεί στην αγορά (π.χ. ιωδιούχο αλάτι, γαλακτοκομικά προϊόντα με χαμηλά λιπαρά, εμπλουτισμένο ψωμί κ.τ.λ).

Όσον αφορά τα καθαρώς βιολειτουργικά τρόφιμα, Οι πωλήσεις τους ήταν 25 δισ. δολάρια (USD) το 1995 και υπερέβησαν τα 35 δισ. το 2000. Η αύξηση αναμένεται να είναι της τάξεως του 8% ανά έτος στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ.

Παράγοντες που θα είναι καθοριστικοί για τη διεύρυνση στην εν λόγω αγορά θα είναι η επιστημονική έρευνα και καινοτομία καθώς και η εξασφάλιση αποκλειστικότητας των ενδείξεων υγείας των εν λόγω προϊόντων. Επιπλέον, ισχυροί δημογραφικοί και κοινωνικοί παράγοντες δημιουργούν μεγάλες ευκαιρίες για την ανάπτυξη των βιολειτουργικών τροφίμων από τις βιομηχανίες τροφίμων. Οι καταναλωτές πλέον ενδιαφέρονται σοβαρά για την καθυστέρηση της γήρανσης, για την πρόληψη ασθενειών και την βελτιστοποίηση της υγείας τους. Αυτό το ενδιαφέρον των καταναλωτών υποστηρίζει τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (15-20%) της βιομηχανίας τροφίμων και ωθεί τις παραδοσιακές φαρμακευτικές βιομηχανίες και τις βιομηχανίες τροφίμων στην παραγωγή νέων προϊόντων.

1.2 Υποπροϊόντα γεωργικών διεργασιών

Η μετατροπή της πρωτογενούς γεωργικής παραγωγής σε τελικά εμπορεύσιμα προϊόντα και τρόφιμα προϋποθέτει την κατεργασία τους από εξειδικευμένες γεωργικές βιομηχανίες. Στο πλαίσιο αυτό, εκτός από ποικίλα χρήσιμα προϊόντα (ποτά, ελαιόλαδο, κομπόστες, χυμοί κ.λ.π) παράγεται και μια

σειρά υποπροϊόντων ως απόβλητα της αντίστοιχης βιομηχανικής διεργασίας. Αυτά, παρότι έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό το πλούσιο περιεχόμενο σε βιοδραστικά φυσικά προϊόντα, εντούτοις οι γεωργικές επιχειρήσεις να τα «ξεφορτώνονται» είτε με καύση ή την εναπόθεσή τους στο περιβάλλον για βιοδιάσπαση. Οι δυο αυτές πρακτικές είναι επιβαρυντικές για το περιβάλλον, αφού κατά την

- **καύση**, παράγεται ένας σημαντικός όγκος αερίων του θερμοκηπίου η οποία έχει σημαντική επίπτωση στην κλιματική αλλαγή,
- **εναπόθεση**, στο περιβάλλον τα περιεχόμενα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα θανατώνουν τους μικροοργανισμούς που προάγουν τη βιοδιάσπαση, με αποτέλεσμα αυτή να επιβραδύνεται. Ως αποτέλεσμα, το μεγάλο οργανικό φορτίο των υποπροϊόντων παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον προκαλώντας σημαντικά φαινόμενα φυτοτοξικότητας, μολύνοντας τον υδροφόρο ορίζοντα και θανατώνοντας τους ευαίσθητους υδρόβιους οργανισμούς.

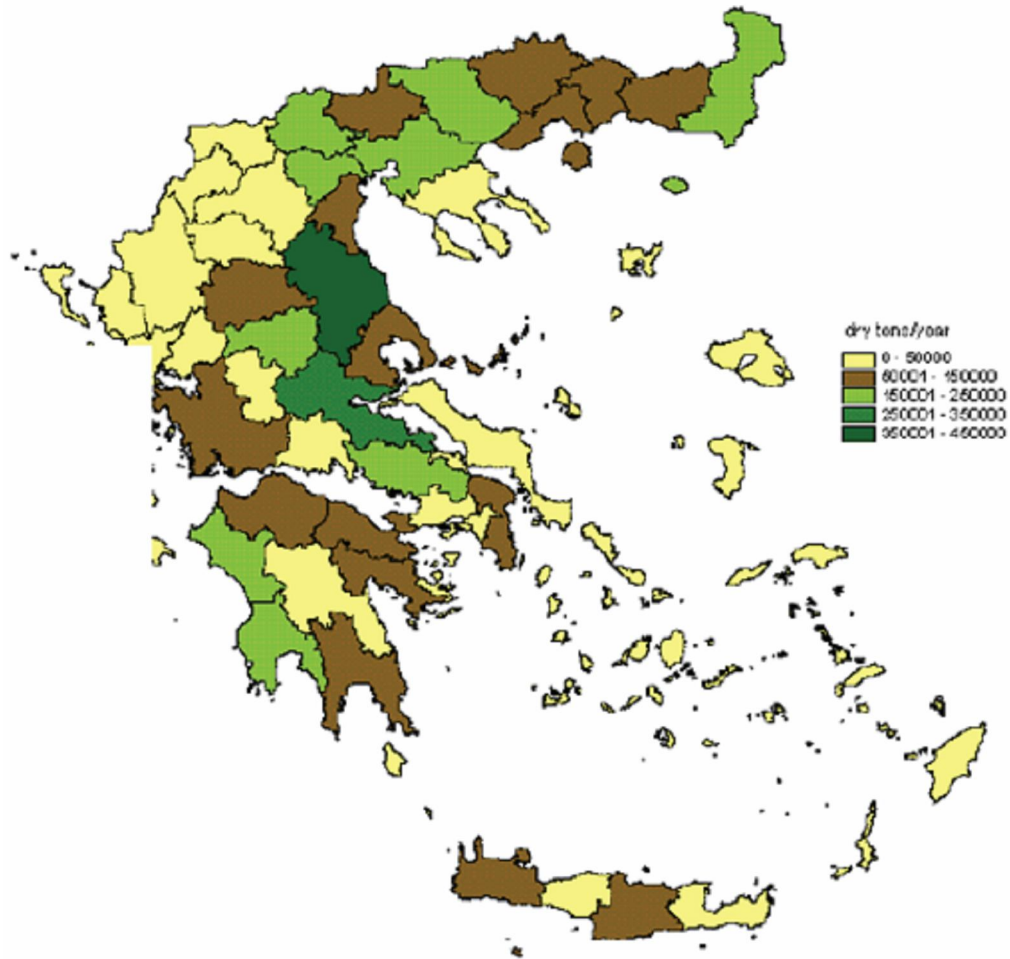
Στο πλαίσιο της πράσινης ανάπτυξης και των σύγχρονων μεθόδων διαχείρισης του περιβάλλοντος, τα γεωργικά υποπροϊόντα μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια πλούσια πηγή πρώτων υλών για την παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Έτσι είναι δυνατόν να αποτελέσουν ένα πρόσθετο οικονομικό πόρο στις επιχειρήσεις αυτές, μειώνοντας το κόστος παραγωγής ανά μονάδα και δημιουργώντας ταυτόχρονα νέες θέσεις εργασίας.

Από τα στερεά (ή ημιστερεά) οργανικά αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα του Ελλαδικού χώρου, σημαντικό ενδιαφέρον -από πλευράς ποσοτήτων- παρουσιάζουν τα:

- 1) Άχυρα των δημητριακών
- 2) Στελέχη του καλαμποκιού και του βάμβακος
- 3) Υποπροϊόντα ελαιουργείων (κασιγάρος, ελαιοκλαδέμματα, πυρήνες κλπ)
- 4) Υπολείμματα βιομηχανιών παραγωγής χυμών (κυρίως εσπεριδοειδών)
- 5) Υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα, γίγαρτα, βόστρυχοι κλπ)

Επιπλέον θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αξιοποίηση και διαχείριση των αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων οδηγεί στην έκδοση οικολογικού σήματος (Eco-label) για τις επιχειρήσεις αυτές (και τα προϊόντα τους). Το σήμα αυτό δίνεται μόνο

στα προϊόντα που προέρχονται από διαδικασίες με μικρή ή καθόλου περιβαλλοντική επίπτωση.



Εικόνα 1.1 Γεωγραφική κατανομή γεωργικών παρα-προϊόντων στην Ελλάδα

Για την Ελλάδα σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υποπροϊόντα της οινοποίησης, κυρίως λόγω του σημαντικού τους μεγέθους και της περιεκτικότητας τους σε πολυφαινόλες που αποτελούν φυτοχημικά υψηλής προστιθέμενης αξίας.

1.2.1 Υποπροϊόντα Οινοποιείων

Η καλλιέργεια των σταφυλιών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη παγκοσμίως, κυρίως στις χώρες της εύκρατης ζώνης αποτελώντας έναν δυναμικό κλάδο της οικονομίας. Το 2004 η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών έφτασε τα 61 εκατομμύρια τόνους, αποτελώντας τη δεύτερη σε μέγεθος παραγωγή, υπολειπόμενη κατά ένα

μικρό ποσοστό της παραγωγής των πορτοκαλιών. Είναι αξιοσημείωτο ότι το 80% περίπου της παραγωγής αυτής χρησιμοποιείται για οινοποίηση, με αποτέλεσμα τα οινοποιεία να παράγουν ετησίως τεράστιες ποσότητες οργανικών υποπροϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, τανίνες και άλλες οργανικές ενώσεις.

Ανά έτος το σύνολο των υποπροϊόντων αντιστοιχεί περίπου σε 10 εκατομμύρια τόνους, τάξης που ισοδυναμεί με το 23% του βάρους των σταφυλιών που οινοποιούνται. Το ποσοστό αυτό συνεχώς μεγαθύνεται ως αποτέλεσμα της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης για τη παραγωγή οίνων ανώτερης ποιότητας. Στην Ελλάδα τα οινοποιεία επεξεργάζονται ανά έτος 525.000 τόνους σταφυλιών, παράγοντας περίπου 142.000 τόνους υποπροϊόντων.

Παγκοσμίως, τα περισσότερα οινοποιεία είναι μικρής κλίμακας επιχειρήσεις που είναι διάσπαρτες στην επαρχία και δεν διαθέτουν τα μέσα και τις δυνατότητες να διαχειριστούν κατάλληλα τα οργανικά τους απόβλητα. Έτσι είναι συνήθης πρακτική να τα εναποθέτουν σε αγρούς, με στόχο τη μετατροπή τους σε λίπασμα με αερόβια διάσπαση (βιοαποικοδόμηση). Τα στερεά απόβλητα κατά τη διαδικασία αυτή παραμένουν εκτεθειμένα, αποτελώντας σημαντική εστία μόλυνσης, κυρίως λόγω του όγκου και των πολλών φυσικών προϊόντων που εμπεριέχουν.

Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα οινοποιητικά υποπροϊόντα παράγονται μαζικά μέσα σε ελάχιστο χρονικό διάστημα (όσο διαρκεί ο τρυγητός και η οινοποίηση). Το μεγαλύτερο τους μέρος αντιστοιχεί στα στέμφυλα (περισσότερο από το 50% του συνολικού βάρους), ακολουθούμενο από τους βόστρυχους και τις οινολάσπες. Ένας επιπλέον παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι το γεγονός ότι το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο διαθέτει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση των βακτηρίων που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση. Έτσι, παραμένουν στο περιβάλλον δημιουργώντας σημαντική όχληση και συμβάλλοντας στην εμφάνιση φυτοτοξινών φαινομένων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών, την υποβάθμιση της ποιότητας του πόσιμου ύδατος, τον θάνατο των ευπαθών θαλάσσιων ζωικών οργανισμών κ.λ.π.

Ο χαρακτηρισμός των οργανικών αυτών αποβλήτων ως υποπροϊόντων της οινοποίησης υποδηλώνει ότι υπάρχει σημαντική δυνατότητα αξιοποίησής τους για

την παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων, όπως για παράδειγμα ποικίλων αποσταγμάτων (τσίπουρο, ρακί κλπ), καθαρής αιθανόλης, ζωοτροφών και οργανικού λιπάσματος. Εκτός όμως από τις παραδοσιακές και περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος αυτές χρήσεις, το ενδιαφέρον για τη διαχείριση των υποπροϊόντων της οινοποίησης έχει τα τελευταία χρόνια ανανεωθεί, αφού αυτά αποτελούν μια πλούσια πηγή για την ανάκτηση από αυτά βιοδραστικών μορίων (κυρίως πολυφαινολών) υψηλής βιολογικής και οικονομικής αξίας. Είναι γνωστό ότι τα σταφύλια, περιέχουν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών, που κατανέμονται κυρίως στα στερεά μέρη του φυτού (φλοιοί, γίγαρτα, βόστυχοι). Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών εκχυλίζεται στον παραγόμενο οίνο -κυρίως κατά την ερυθρά οινοποίηση- ενώ οι υπόλοιπες καταλήγουν στα υποπροϊόντα της οινοποίησης. Η παρουσία των πολυφαινολών σε αυτά, σε συνδυασμό με την τάση αντικατάστασης των συνθετικών χημικών με αντίστοιχα φυτικής προέλευσης, έχει ελκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών για την αξιοποίηση του υλικού αυτού, προς την κατεύθυνση της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.²

1.3 Σύγχρονη γνώση για τον οίνο

Η αμπελοκομία και η οινοποίηση είναι τέχνες/διαδικασίες γνωστές στον άνθρωπο για πολλούς αιώνες. Η πρώτη διαπιστωμένη δραστηριότητα τοποθετείται στη Μ. Ασία και ανάγεται στο έτος 7.000 πΧ. Έκτοτε ο οίνος έχει συμβάλει πολλαπλά στη δημιουργία της ανθρώπινης κουλτούρας εξυπηρετώντας διατροφικές, ιατρικές και θρησκευτικές του δραστηριότητες. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι οι γνωστές από την αρχαιότητα ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες του οίνου είχαν οδηγήσει στην αναγνώριση του οίνου ως «φαρμάκου» και την συμπερίληψή στις φαρμακοποιείες διαφόρων χωρών, έως τη δεύτερη δεκαετία του εικοστού αιώνα, οπότε και απαλείφθηκε ως συνέπεια της τότε εκστρατείας ποτο-απαγόρευσης.

Το ενδιαφέρον για τον οίνο αναζωπυρώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 ως συνέπεια πολλών επιδημιολογικών παρατηρήσεων που συνέδεσαν τη

λογική ημερίσια κατανάλωση ερυθρού οίνου στη Γαλλία με το μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων στη χώρα αυτή.³ Η υπόθεση αυτή προτάθηκε ως μια πιθανή εξήγηση για τη σχετικά χαμηλή θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα που παρατηρούνται εκεί, παρά τους υψηλούς δείκτες επικινδυνότητας -όπως κάπνισμα, υψηλή αρτηριακή πίεση, διατροφή πλούσια σε κεκορεσμένα λιπαρά, παχυσαρκία- που επίσης καταγράφονται. Το επιδημιολογικό αυτό εύρημα ονομάστηκε Γαλλικό Παράδοξο (French Paradox).⁴

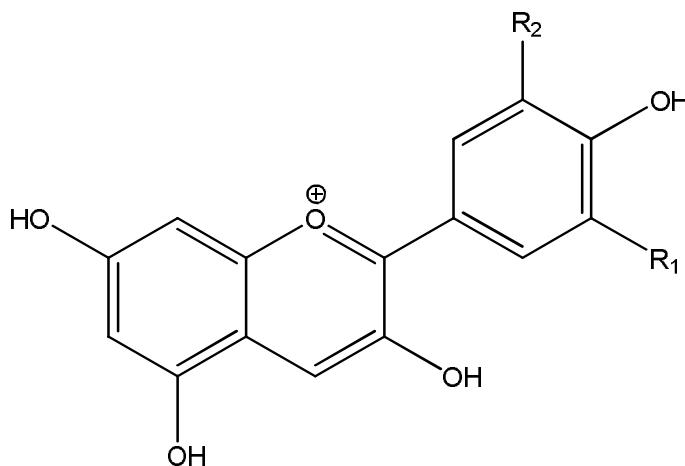
Η ευεργετική αυτή δράση των ερυθρών οίνων αποδόθηκε στην παρουσία των βιοδραστικών φαινολών, που βρίσκονται σε αυξημένο ποσοστό στον ερυθρό οίνο. Έκτοτε έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών και κλινικών ερευνών που παρήγαγαν ένα σημαντικό αριθμό ενδείξεων και αποδείξεων που στηρίζουν την υπόθεση αυτή.⁵⁻⁷

1.4 Βιοσύνθεση Φαινολικών Φυτοχημικών

Τα φαινολικά φυτοχημικά είναι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθενται από τα φυτά τόσο κατά τη φυσιολογική τους ανάπτυξη, όσο και σε περιπτώσεις στρες, όπως για παράδειγμα οι μολύνσεις από μικροοργανισμούς, η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας και ο τραυματισμός των ιστών.⁸ Παρότι τα περισσότερα μόρια της κατηγορίας αυτής έχουν ήδη αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί κατά την κλασική περίοδο της οργανικής χημείας, η αναγνώρισή τους ως ξεχωριστής ομάδας συγγενών γενετικά φυτικών μεταβολιτών έγινε το 1957, με την ίδρυση στη Μ. Βρετανία του Plant Phenolic Group (στη συνέχεια μετεξελίχθηκε σε Phytochemical Society of Europe).⁹ Τα μόρια αυτά βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά και προκύπτουν από την οδό του σικιμικού οξέος και του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανίων.⁸⁻⁹

Μια από τις πρώτες επιτυχίες της επιστήμης στην κατανόηση του μεταβολισμού των μορίων αυτών στα φυτά ήταν οι έρευνες για το χημικό υπόβαθρο της ποικιλίας των χρωμάτων στα άνθη. Στην εργασία αυτή συνεργάστηκαν γενετιστές, βιοχημικοί και χημικοί για να αποδείξουν ότι οι γενετικές διαφορές στο χρώμα των ανθοκυανινών οφείλεται κυρίως σε μικρές δομικές διαφοροποιήσεις οι οποίες είναι αποτέλεσμα απλών χημικών μεταβολών

(πχ υδροξυλίωση, μεθυλίωση) στο βασικό μόριο της ανθοκυανιδίνης¹⁰⁻¹¹ (Σχήμα 1.1). Ιδιαίτερη ώθηση στην αναγνώριση και περιγραφή της δομής των φαινολικών παραγώγων στα φυτά δόθηκε από τη συνδυασμένη χρήση τεχνικών της χρωματογραφίας και της ραδιοσήμανσης.



Σχήμα 1.1 Βασικός σκελετός ανθοκυανιδινών

Ως επακόλουθο των μελετών αυτών το ενδιαφέρον για τη βιοχημεία του μεταβολισμού των πολυφαινολών κυριολεκτικά άνθησε, με αποτέλεσμα σήμερα να έχουν περιγραφεί λεπτομερειακά τα βιοσυνθετικά μονοπάτια για τις κυριότερες κατηγορίες των φυτικών φαινολικών μορίων, ενώ πρόσφατα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα ένζυμα που συμμετέχουν στα διάφορα στάδια των βιοχημικών αυτών διαδικασιών.¹²

Η βιοσύνθεση των φαινολικών μορίων πραγματοποιείται μέσω των παρακάτω πέντε διαφορετικών βιοσυνθετικών οδών:

- α. της Γλυκόλυσης
- β. της Φωσφορικής Πεντόζης
- γ. του Σικιμικού οξέος
- δ. του Οξικού-Μαλονικού οξέος (ή οδού των πολυακετιδίων)
- ε. του Οξικού- Μεβαλονικού οξέος

Οι τρεις τελευταίες βιοσυνθετικές οδοί μπορούν να ενσωματωθούν στο γενικότερο πλαίσιο του αρωματικού μεταβολισμού, ενώ οι οδοί του σικιμικού και του οξικού-μαλονικού οξέος θεωρούνται ως οι πλέον σημαντικές για τη βιοσύνθεση των φυτικών φαινολικών μορίων.¹³ Στη συνέχεια, ακολουθεί η παρουσίαση των

διαφόρων βιοχημικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα φυτά κατά την βιοσύνθεση των φαινολικών μορίων.

1.4.1 Οδός σικιμικού οξέος

Η οδός του σικιμικού οξέος περιγράφηκε πρώτη φορά το 1885 από τον Eykman, και είναι το μονοπάτι που οδηγεί στη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων L-φαινυλαανίνη, L-τυροσίνη και L-τρυπτοφάνη. Τα αμινοξέα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των απαραίτητων, τα οποία ενώ βιοσυντίθενται από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, στα ζώα πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής.¹⁴ Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν σημαντικές πρόδρομες ουσίες των αυξητικών φυτοορμονών και ποκίλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως των φαινυλοπροπανοειδών.

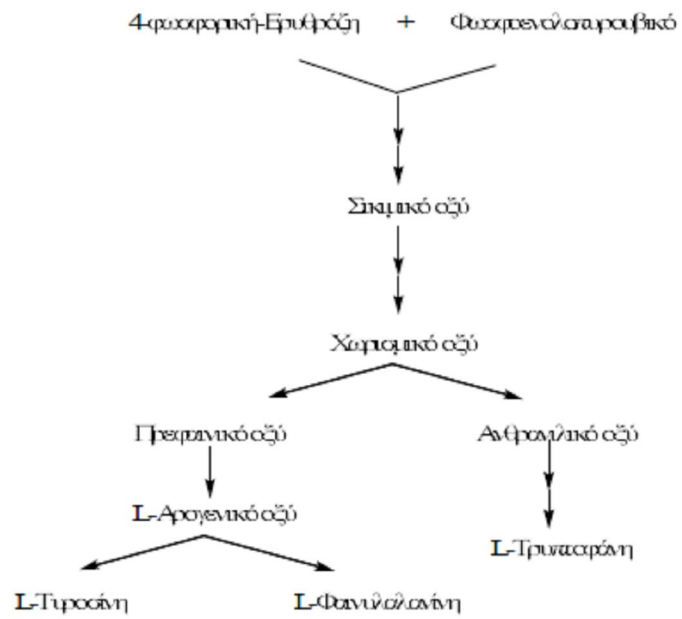
Σύμφωνα δε με τους Kubitzki¹⁵ και Gottlieb¹⁶ η καταγωγή και η πρώιμη εξέλιξη των χερσαίων φυτών, πρέπει να συνδέεται με την επέκταση του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών (οδός σικιμικού οξέος).

Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται περιληπτικά η σειρά των αντιδράσεων που οδηγούν στη σύνθεση της L-φαινυλαανίνης και L-τυροσίνης. Στην πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων συμμετέχουν συνολικά τα έντεκα ένζυμα του Πίνακα 1.1.

Το μονοπάτι του σικιμικού αρχίζει με δύο αντιδράσεις συμπύκνωσης που οδηγούν στο σχηματισμό του εξαμελούς δακτυλίου. Η πρώτη (ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση), καταλύεται από τη συνθετάση του DAHP και αφορά τη συμπύκνωση της 4-φωσφορικής ερυθρόζης (DEP, ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου της φωσφορικής πεντόζης) με φωσφοενολοπυρουβικό οξύ (PEP, ενδιάμεσο της γλυκόλυσης).

Το προϊόν της συμπύκνωσης είναι ένα σάκχαρο με C-7 ανοιχτή αλυσίδα (DAHP). Στη συνέχεια το DAHP μετατρέπεται σε 3-δεϋδροκινικό οξύ (DHQ) μέσω μιας σύνθετης αλυσίδας αντιδράσεων που περιλαμβάνουν οξείδωση, β-απόσπαση και μια ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση, έτσι ώστε τελικά να σχηματιστεί η κυκλική δομή. Ακολουθεί αναγωγή με NADH δίνοντας το 3-δεϋδροκινικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αφυδατώνεται ενζυμικά σε 3-δεϋδροσικιμικό οξύ (DSA).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Σχημα 1.2 Περιληπτική αναπαράσταση της οδού του σικιμικού οξέος¹³

Πίνακας 1.1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενζύμα που συμμετέχουν στην οδό του Σικιμικού οξέος	
E1-1	2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (=DAHP synthase)
E1-2	3-Dehydroquininate synthase
E1-3	3-Dehydroquininate dehydratase
E1-4	Shikimate 3-dehydrogenase
E1-5	Shikimate kinase
E1-6	3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (=EPSP synthase)
E1-7	Chorismate synthase
E1-8	Chorismate mutase
E1-9	Prephenate aminotransferase
E1-10	Arogenate dehydrogenase
E1-11	Arogenate dehydratase
E11-12	Anthranilate Synthase
E1-13	Anthranilate Phosphoribosyl transferase
E1-14	Phosphoribosylanthranilate isomerase
E1-15	Indol-3-glycerol phosphate synthase
E1-16	Tryptophan synthase a-subunit
E1-17	Tryptophan synthase b-subunit

Το τελευταίο ανάγεται από μια αφυδρογονάση σε σικιμικό οξύ που αφού φωσφορυλιωθεί σε 3- φωσφοσικιμικό οξύ, αντιδρά με το PEP για την παραγωγή του 3-φωσφο-Σενολοπυρουβυλοσικιμικού οξέος (EPSP).

Τέλος, με απόσπαση του φωσφορικού οξέος από το EPSP παράγεται το χωρισμικό οξύ. Στο Σχήμα 1.3 απεικονίζονται σχηματικά οι αντιδράσεις για τη βιοσύνθεση του χωρισμικού οξέος.

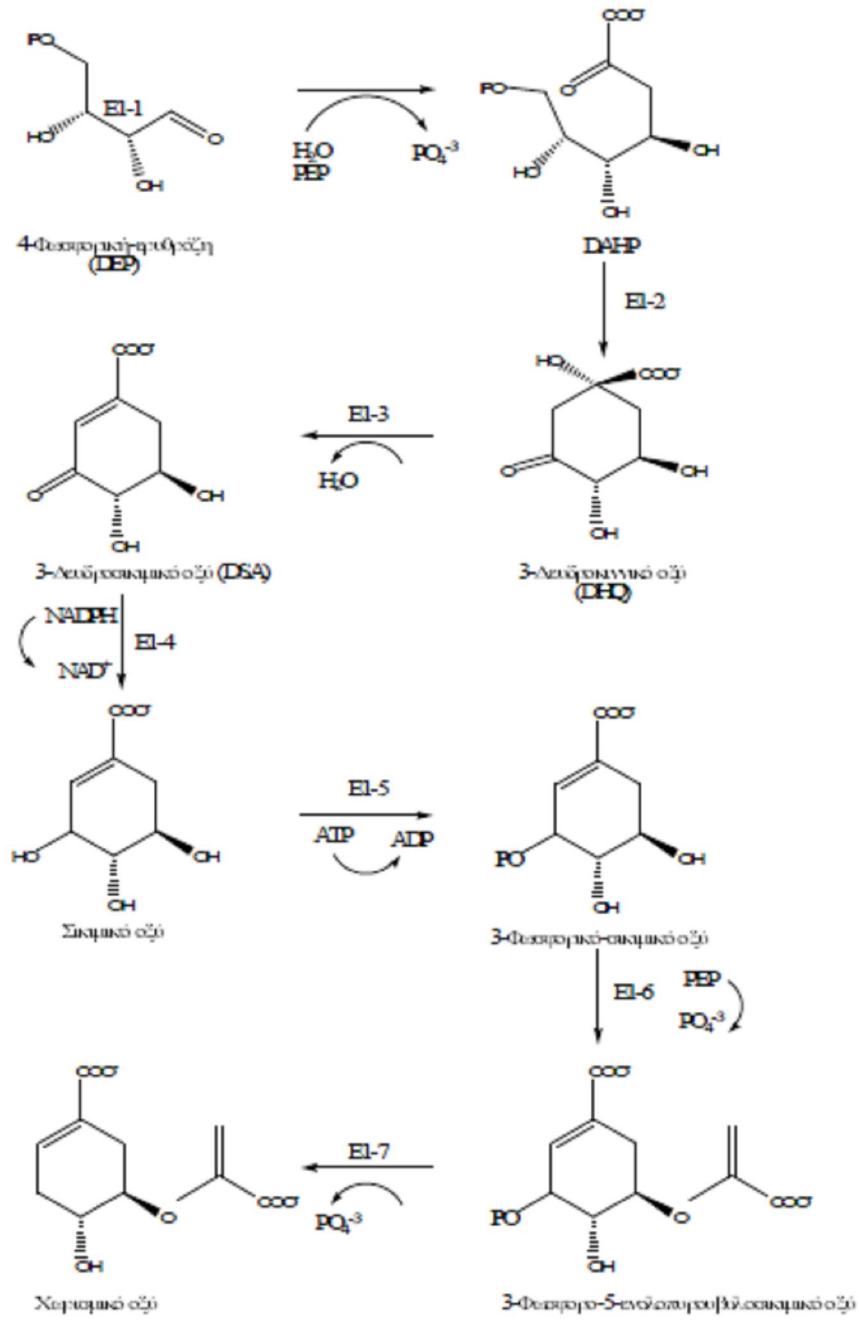
Οι δύο επόμενες ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν στη δημιουργία της πρώτης μεγάλης διακλάδωσης της οδού του σικιμικού οξέος, αφού η ανθρανιλική συνθετάση οδηγεί στη σύνθεση της τρυπτοφάνης, ενώ η μουτάση του χωρισμικού οδηγεί στη σύνθεση της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης.

Συγκεκριμένα, η μουτάση του χωρισμικού καταλύει μια περικυκλική μετάθεση Claisen που παράγει το πρεφαινικό οξύ. Στην αντίδραση αυτή η πυρουβική πλευρική αλυσίδα του χωρισμικού οξέος μεταφέρεται από τον C-1 στον C-5, συνθέτοντας τον βασικό φαινυλοπροπανοϊκό σκελετό των μορίων αυτών. Τα

επόμενα βήματα που οδηγούν από το πρεφαινικό οξύ στην φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του οργανισμού.¹⁷⁻¹⁸ Στα ανώτερα φυτά το πλέον χαρακτηριστικό μονοπάτι είναι αυτό του αρογενικού οξέος και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.4.

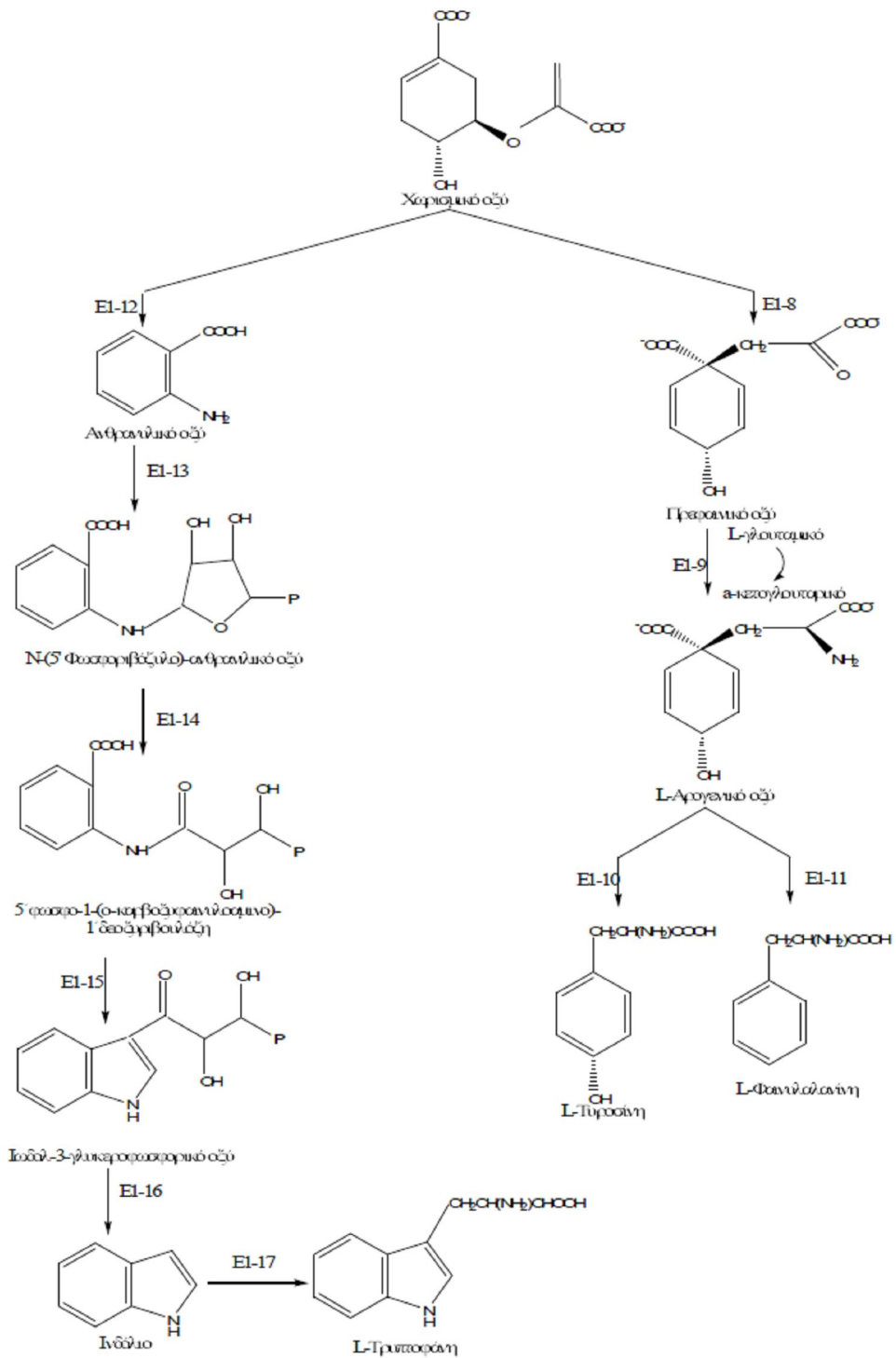
Η μετατροπή του πρεφαινικού σε αρογενικό οξύ καταλύεται παρουσία γλουταμικού οξέος από μια αμινοτρανσφεράση. Οι επακόλουθες δύο διακλαδώσεις από το αρογενικό καταλύονται από τα ένζυμα αρογενική αφυδρογονάση και αρογενική αφυδρατάση, που οδηγούν στη σύνθεση της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης αντίστοιχα. Αυτή η διακλάδωση λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας της σύνθεσης των δύο αμινοξέων, αφού η δράση της αφυδρατάσης παρεμποδίζεται από την παρουσία της φαινυλαλανίνης και της αφυδρογονάσης από την παρουσία τυροσίνης. Επιπλέον, τα δύο αυτά αμινοξέα παρεμποδίζουν τη δράση της μούτάσης του χωρισμικού.¹⁴

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Σχήμα 1.3 Βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος- βιοσύνθεση χωριστικού οξέος(Deg και συνεργάτες).¹³

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Σχήμα 1.4 Βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων L-τρυπτοφάνη, L-τυροσίνη και L-φαινυλανίνη από το χωρισμικό οξύ (Strack και συνεργάτες).¹⁴

1.4.2 Οδός φαινυλαλάνης /υδροξυκινναμωμικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φαινυλαλάνη λαμβάνει μέρος αφενός στην πρωτεϊνοσύνθεση και αφετέρου στη σύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Η οδός της φαινυλαλάνης/υδροξυκινναμωμικού, ορίζεται ως ο "Γενικός Μεταβολισμός Φαινυλοπροπανίων" και περιλαμβάνει αντιδράσεις που οδηγούν στον μετασχηματισμό της L-φαινυλαλάνης, σε υδροξυκινναμικά οξέα, θειοεστέρες του συνενζύμου A (CoA) και 1-Ο-ακυλογλυκοσίδες.¹⁴

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της φαινυλαλάνης και των δευτερογενών φαινυλοπροπανίων ελέγχεται από μια λυάση (phenylalanine ammonia lyase, PAL).¹⁹ Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μη οξειδωτική αποαμίνωση της φαινυλαλάνης, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό του *trans*-κινναμωμικού οξέος. Στη συνέχεια με ενζυματική υδροξυλίωση παράγεται το 4-κουμαρικό οξύ που αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση μιας σειράς φαινολικών φυτοχημικών, όπως των εστέρων των φαινυλοπροπανίων, των φλαβονοειδών, των ανθοκυανινών και των λιγνινών.

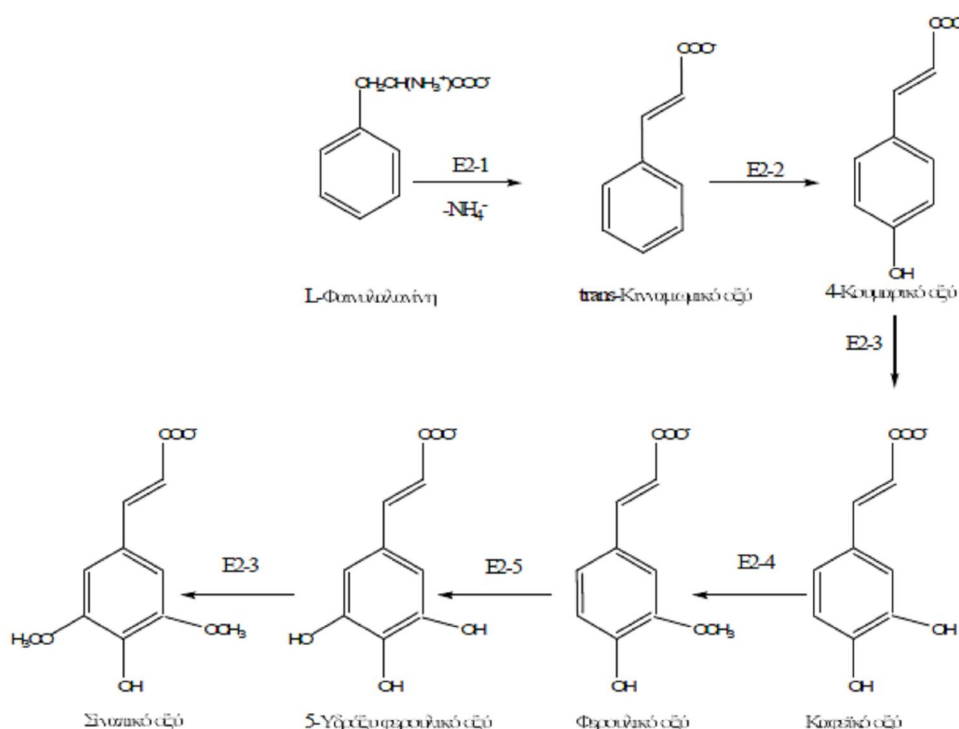
1.4.3 Βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων

Μια σειρά από αντιδράσεις μεθυλίωσης και υδροξυλίωσης έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της φαινυλαλάνης σε τέσσερα από τα πλέον συνηθισμένα κινναμωμικά οξέα που περιλαμβάνουν τον χαρακτηριστικό C-3, C-6 φαινυλοπροπανικό σκελετό. Αναλυτικότερα τα οξέα αυτά είναι το 4-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ (Σχήμα 1.5). Παρότι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα συνήθως βρίσκονται σε *trans* (E) διαμόρφωση, όμως και τα *cis* (Z) ισομερή τους είναι δυνατόν να προκύψουν μέσω φωτοχημικού ή ενζυμικού ισομερισμού.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι παρασκευής των φαινυλοπροπανίων αποτελεί το αρχικό στάδιο για τη σύνθεση των περισσότερο περίπλοκων δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτό επιτυγχάνεται με την "ενεργοποίηση" των υδροξυκινναμικών οξέων, μέσω του σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ υδροξυκινναμικών και υδροξυκινναμικού συνενζύμου A, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες επιμέρους

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα η συμπύκνωση των φαιτυλοπροπανίων με το μαλονυλο-συνένζυμο Α (για τη σύνθεση των φλαβονοειδών των ισοφλαβονοειδών και των στιλβενίων),²⁰ οι αντιδράσεις αναγωγής με το NADPH (για το σχηματισμό των λιγνινών) και οι αντιδράσεις σύζευξης (οδηγούν στο σχηματισμό εστέρων και αμιδίων τους).



Σχήμα 1.5 Βιοσύνθεση υδροξυκινναμικών οξέων από τη φαιτυλανίνη
(<http://biocyc.org>)³⁸

Ο σχηματισμός των υδροξυκινναμικών συμπλόκων είναι ανάλογος με την ενεργοποίηση των λιπαρών οξέων με ATP και CoA.

Στη συνέχεια, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα μεταβολίζονται μέσω ποικίλων βιοσυνθετικών οδών με αντίδραση της πλευρικής τους αλυσίδας μέσω:

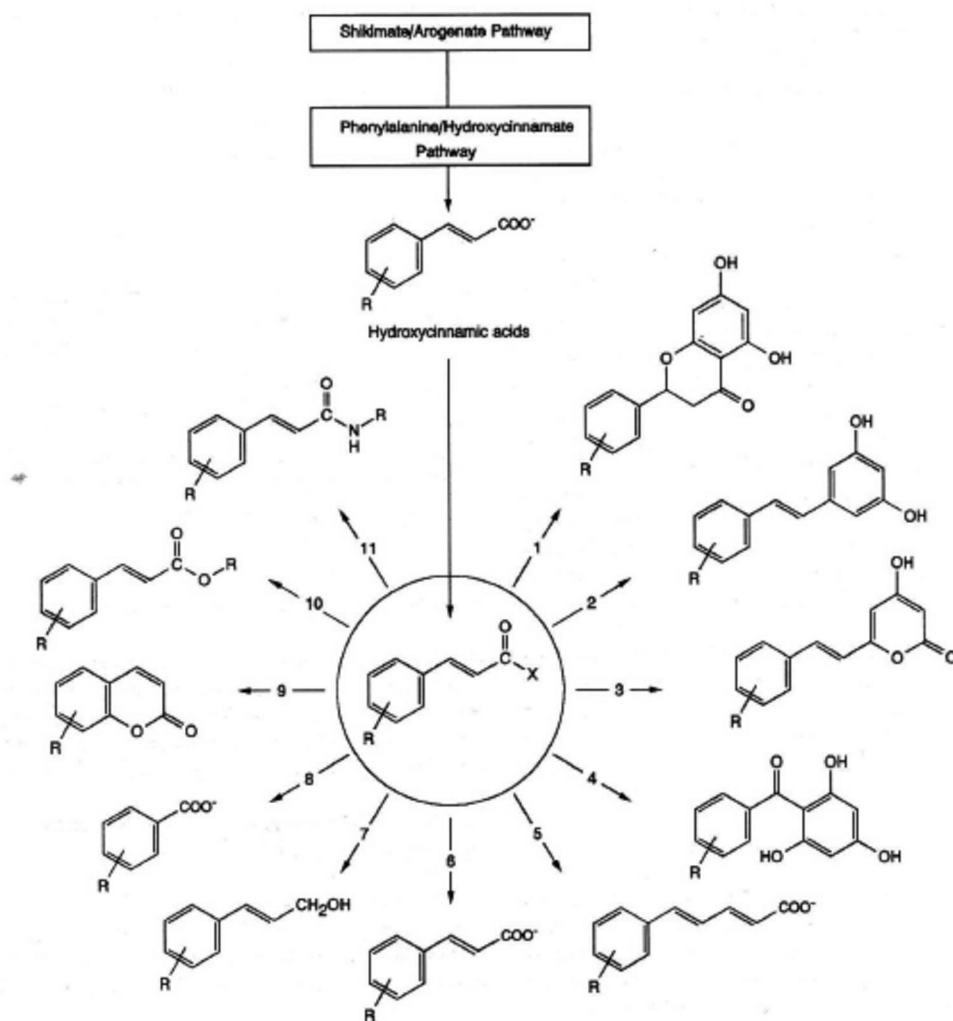
- συμπύκνωσης, που οδηγούν στη σύνθεση φλαβονοειδών
- διάσπασης, που οδηγούν στη σύνθεση υδροβενζοϊκών οξέων
- αναγωγής, που οδηγούν στη σύνθεση υδροξυκινναμωμικών αλκοόλων και πρόδρομων ενώσεων των λιγνινών
- σύζευξης, που οδηγούν στη σύνθεση εστέρων, αμιδίων και γλυκοζιτών.

Στα φυτά, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, αφού συνήθως είναι ως εστέρες ή αμίδια. Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζεται

διαγραμματικά ο κεντρικός τους ρόλος στη γενικότερη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Από αυτά, οι λιγνίνες, τα υδροξυκιναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στα ανώτερα φυτά, ενώ άλλες τάξεις όπως τα ισοφλαβονοειδή και τα σιλβένια έχουν περιορισμένη παρουσία στο φυτικό βασίλειο.

Η φυσιολογική δράση των φαινυλοπροπανίων ποικίλει ανάλογα με τη διαμόρφωσή τους. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να έχουν το ρόλο χρωστικού, φυτοαλεξίνης, φωτοπροστατευτικού ή ως μέσου μετάδοσης μηνυμάτων μεταξύ φυτών και μικροβίων. Επιπλέον έχουν τη δυνατότητα να πολυμεριστούν συμβάλλοντας στη σταθερότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και εμποδίζοντας την αφυδάτωση των φυτών.²¹⁻²²

Στη συνέχεια θα εξεταστεί με περισσότερη λεπτομέρεια η βιοσύνθεση των φαινολικών παραγώγων που απαντώνται συχνότερα στα σταφύλια και τους οίνους.



Σχήμα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση του κεντρικού ρόλου των υδροξυκιναμμωμικών οξέων στη βιοσύνθεση διαφόρων φαινυλοπροπανίων.

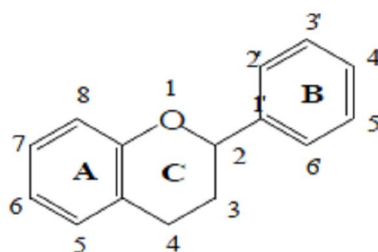
Οι αντιδράσεις **1** έως **5** αφορούν την επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας. Αναλυτικά η αντίδραση **1** οδηγεί στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών η **2** των στυλβενίων η **3** των στυρυλοπυρονών, η **4** των βενζοφαινονών που στη συνέχεια κυκλοποιούνται σε ξανθόνες και η **5** των υδροξυκιναμμωμικών οξέων με επιμηκυμένη πλευρική αλυσίδα. Η αντίδραση **6** οδηγεί σε διϋδροκιναμμωμικά οξέα, η **7** σε υδροξυκιναμμωμικές αλκοόλες, η **8** σε υδροξυβενζοϊκά οξέα, η **9** σε υδροξυκουμαρίνες, η **10** οδηγεί στους εστέρες των υδροξυκιναμμωμικών οξέων και η **11** σε αμίδια των υδροξυκιναμμωμικών οξέων (Dey και συνεργάτες)¹³

1.4.4 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια σχετικά ξεχωριστή υποκατηγορία αρωματικών ενώσεων που βιοσυντίθενται από τη φαινυλαλανίνη (η οποία

προέρχεται από την οδό του σικιμικού οξέος) και το μαλονυλοσυνένζυμο A, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του οξικού-μαλονικού οξέος.²³⁻²⁵ Τα φλαβονοειδή συνιστούν την πλέον πολυπληθή ομάδα φυτοχημικών φαινολικών, αριθμώντας περίπου τα μισά από τα συνολικά 8.000 φαινολικά παράγωγα που απαντώνται στα φυτά.²⁶

Έξι είναι οι κύριες ομάδες των φυτών φλαβονοειδών που συναντώνται στην πλειοψηφία των ανώτερων φυτών, δηλαδή οι : χαλκόνες,φλαβόνες. Φλαβονόλες, φλαβανδιόλες, ανθοκυανίνες και συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανιδίνες). Μια έβδομη ομάδα αποτελούν οι ορόνες, που όμως δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες. Η χημική δομή των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ένα σκελετό 15 ατόμων C (C6.C3.C6) (Σχήμα 1.7) .



Σχήμα 1.7 Σκελετός φλαβονοειδών

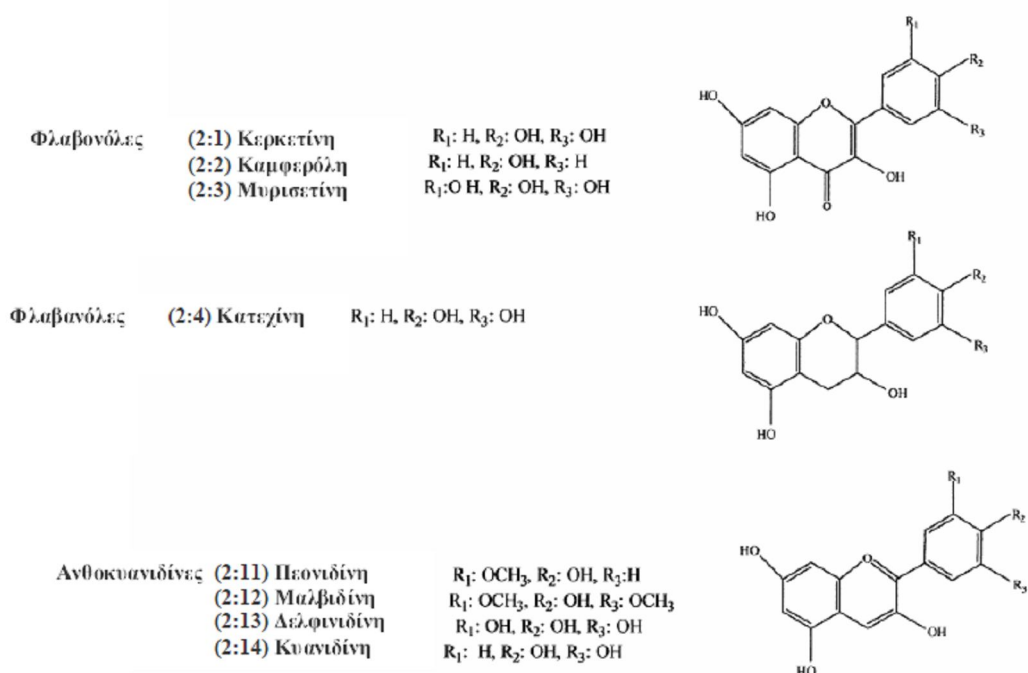
Ο αρωματικός δακτύλιος A είναι συμπυκνωμένος με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C), ο οποίος είναι υποκατεστημένος με έναν επιπλέον αρωματικό δακτύλιο στις θέσεις 2, 3 ή 4.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ο εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος είναι δυνατόν να αντικατασταθεί από ένα πενταμελή (ορόνες) ή έχει ανοίξει." Πειράματα με χρήση ισοτόπων έδειξαν ότι ο δακτύλιος A των φλαβονοειδών προέρχεται από τη μεταβολική οδό του οξικού-μαλονικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος B από τη φαινυλαλανίνη, δηλαδή την οδό του σικιμικού οξέος.²⁷

Η οξειδωτική κατάσταση του δακτυλίου C είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατάταξη των φλαβονοειδών. Στο Σχήμα 1.8 παρουσιάζεται σε γενικές γραμμές η δομή των κυριότερων φλαβονοειδών με το χαρακτηριστικό ότι οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες και δομικά διαφοροποιημένες μορφές. Στη φύση, τα περισσότερα φλαβονοειδή -εκτός από τις φλαβαν-3-όλες-

βρίσκονται ως γλυκοζυλιωμένα υδατοδιαλυτά παράγωγα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα κενοτόπια των κυττάρων.²⁸⁻²⁹

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα, με τη δράση των ενζύμων που συνδέονται με τις ενδοπλασματικές μεμβράνες, όπου τα ένζυμα σχηματίζουν ένα μεγάλο μακρομοριακό σύμπλεγμα.³⁰⁻
³¹ Στο Σχήμα 1.9 παριστάνεται διαγραμματικά η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ενώ ο Πίνακας 1.2 εμπεριέχει όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή.

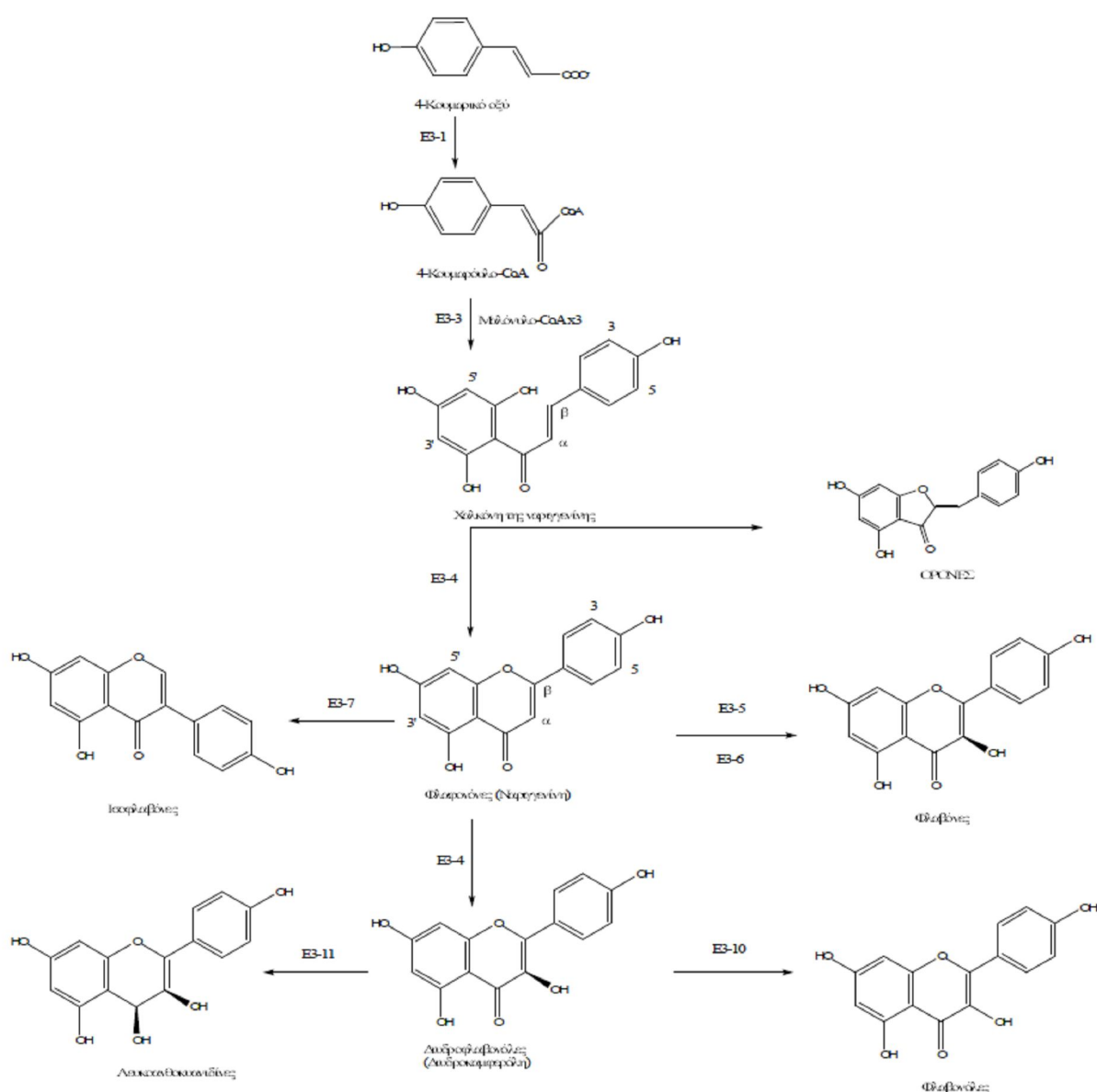


Σχήμα 1.8 Κυριότερες ομάδες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια και τους οίνους (Μοναγας και συνεργάτες).³²

Αναλυτικότερα, η συνθετάση της χαλκόνης είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση των υδροξικιναμωμικών οξέων για το σχηματισμό του βασικού σκελετού 15 C στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών. Η αντίδραση που καταλύει είναι η συμπύκνωση του -4-κουμαροϋλοσυνένζυμου Α με τρία μόρια μαλονυλοσυνένζυμου Α σχηματίζοντας τη χαλκόνη της ναριγενίνης που αποτελεί το πρώτο ενδιάμεσο προϊόν που διαθέτει το δακτύλιο Β, ο οποίος αποτελεί το χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των φλαβονοειδών. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της παραπάνω αντίδρασης αναφέρεται στη σταδιακή προσθήκη μορίων οξικού οξέος από το μαλονυλοσυνένζυμο Α στο 4-κουμαροϋλοσυνένζυμο Α. Ο "τυχαίος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

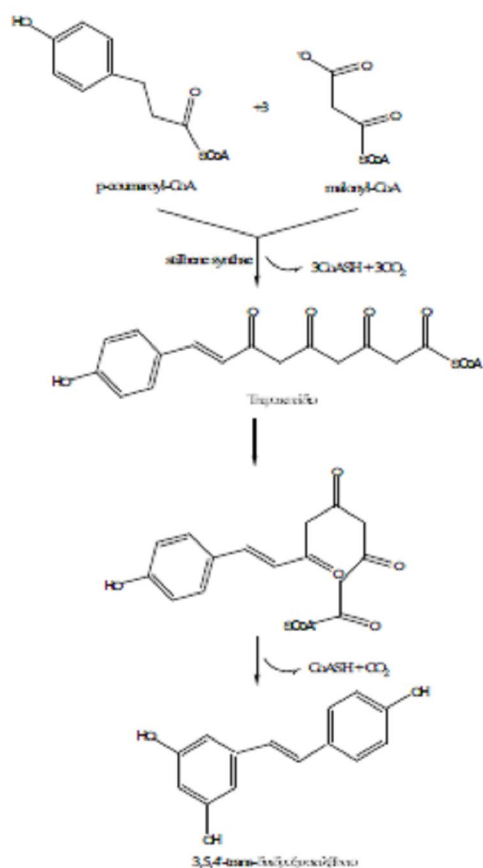
προσανατολισμός" των μονάδων του οξικού δημιουργεί το δακτύλιο A των φλαβοβοειδών, ενώ το μαλόσυλοσυνένζυμο A συμμετέχει στη σύνθεση της χαλκόνης από την καρβοξυλάση του ακετυλοσυνενζύμου A, η οποία καταναλώνει ATP. Αυτή είναι μια τυπική ενζυματική αντίδραση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων και θεμελιώδης για τη σύνθεση των φλαβονοειδών. Στη συνέχεια, η κυκλοποίηση της χαλκόνης προς τη φλαβονόνη ναριγγενίνη καταλύεται από την ισομεράση της χαλκόνης. Η ναριγγενίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την ενζυματική σύνθεση ποικίλων φλαβονοειδών. Η διάκριση των φλαβονοειδών όπως ήδη αναφέρθηκε εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του πυρανικού δακτυλίου C.¹⁴



Σχήμα 1.9 Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών (Strack και συνεργάτες).¹⁴

1.4.5 Βιοσύνθεση στυλβενίων

Τα στυλβένια είναι φαινολικά παράγωγα μικρού μοριακού βάρους που προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη κατά τη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Το κυριότερο μέλος της



οικογένειας των στυλβενίων που απαντώνται στα σταφύλια και τους οίνους είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, (3, 5, 4' -*trans*-υδροξυστυλβένιο). Αυτή ανήκει σε μια κατηγορία ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως *φυτοαλεξίνες*, αφού παράγονται σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η ρεσβερατρόλη παράγεται από πολύ περιορισμένο αριθμό φυτών -περίπου 31 γένη- στα οποία περιλαμβάνονται τα γένη: *Vitis*, *Arachis* and *Pinus*.³³⁻³⁵

Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μορφές *cis* και *trans*, αλλά και ως γλυκοζίτης (πικεΐδης, piceid).

Σχήμα 1.10 Βιοσύνθεση *trans*-ρεσβερατρόλης³⁸

Επίσης αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση μιας σειράς μορίων, όπως τα μεθυλιωμένα της παράγωγα (πτεροστυλβένια)³⁵ ή τα ολιγομερή της παράγωγα (α και ε βινιφερίνη)³⁶ Είναι δε χαρακτηριστικό ότι μερικά από τα μόρια αυτά εμφανίζουν υψηλότερη μυκητοστατική δράση από την ίδια τη ρεσβερατρόλη.

Η γλυκοσιδίωση της ρεσβερατρόλης έχει αναφερθεί ότι λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην ενζυματική οξείδωση του μορίου, με αποτέλεσμα να επεκτείνεται ο χρόνος ημιζωής του μορίου στα κύτταρα.³⁷ Η *trans*-ρεσβερατρόλη συντίθεται από π-κουμαροϋλοσυνένζυμο Α και τρία μόρια μαλονυλοσυνένζυμου Α. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση των στυλβενίων, ενώ όλη η διαδικασία της βιοσύνθεσης της *trans*-ρεσβερατρόλης παρουσιάζεται στο Σχήμα

1.10

1.5 Βιολογική δράση πολυφαινολών

Οι φαρμακολογικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών -μορίων που διαθέτουν περισσότερες από μια φαινολομάδες- έχουν κατά καιρούς διερευνηθεί σε βάθος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη βιοδραστικότητά τους. Στο πλαίσιο αυτό, έχει διαπιστωθεί ότι οι πολυφαινόλες διαθέτουν σημαντική αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, αντιμεταλλαξιγόνο και αγγειοδιασταλτική δράση. Αρκετές από τις δράσεις αυτές σχετίζονται με τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, δηλαδή στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ποικίλες ελεύθερες ρίζες, όπως τις υπεροξυ-ρίζες των λιπιδίων που συντίθενται στα κύτταρα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών.³⁹⁻⁴² Επιπλέον, οι πολυφαινόλες έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτουν σημαντική αντικρκική δράση έναντι των ιών HIV, Herpes simplex, Influenza και Rhinovirus, ενώ παράλληλα δρουν και ως αναστολείς των κινασών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.⁴³⁻⁴⁵

1.5.1 Αντικαρκινική δράση πολυφαινολών

Το πλήθος των επιδημιολογικών μελετών για την προστατευτική δράση των πολυφαινολών στην πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου είναι εντυπωσιακό.⁴⁶ Σε μια έρευνα που διεξήχθη στη Σαγκάη από το 1996 έως 1998 σε 250 γυναίκες με καρκίνο του μαστού, οι Dai⁴⁷ και συνεργάτες ανέφεραν ότι η συγκέντρωση ισοφλαβονοειδών και λιγνανίων στα ούρα τους ήταν σημαντικά μικρότερη, σε σύγκριση με αντίστοιχο δείγμα γυναικών που δεν είχαν αναπτύξει καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι η διατροφή πλούσια σε φλαβονοειδή πιθανόν να σχετίζεται με τη μειωμένη εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Σε μια μεγάλη πληθυσμιακή έρευνα στη Φινλανδία η οποία διήρκεσε 25 χρόνια και περιελάμβανε άτομα 15 - 90 ετών -τα οποία αρχικά δεν είχαν καρκίνο- βρέθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής ήταν

αντιστρόφως ανάλογη με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα και άλλων κακοήθων όγκων, σε σύγκριση με τα άτομα που το διαιτολόγιο τους ήταν φτωχό σε πολυφαινόλες. Αναλύοντας σχετικά δεδομένα οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι στον ανδρικό πληθυσμό η αυξημένη πρόσληψη της κερκετίνης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, ενώ η αυξημένη πρόσληψη της μυρισετίνης συνδέεται με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.⁴⁸

Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλες επιδημιολογικές μελέτες,⁴⁹⁻⁵⁰ ενώ επιπλέον βρέθηκε ότι η πρόσληψη πολυφαινολών μειώνει σε ποσοστό 70% τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του φάρυγγα, του οισοφάγου και της στοματικής κοιλότητας.⁵¹

1.5.1.1 Αντικαρκινική δράση των κυριότερων πολυφαινολών των σταφυλιών

Κερκετίνη

Η φλαβονόλη κερκετίνη επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικής δραστηριότητας, αφού είναι γνωστή η ικανότητα της να παρεμποδίζει την ανάπτυξη κυττάρων σε καρκινικούς όγκους του ανθρώπου και καρκίνους του στομάχου, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι σε μύες καταστέλλει την ανάπτυξη των καρκίνων του τραχήλου, της μήτρας, του μελανώματος και του εντέρου. Κατά τη φάση I των κλινικών ερευνών η χορήγηση κερκετίνης σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου των ωοθηκών μείωσε κατά έξι φορές τη συγκέντρωση του καρκινικού πρωτεϊνικού δείκτη CA125 στο πλάσμα. Σε άλλους ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο στο ήπαρ, η χορήγηση κερκετίνης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του καρκινικού δείκτη φετοπρωτεΐνη στον ορό του αίματος. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η χορήγηση της υδατοδιαλυτής πρόδρομης ένωσης της κερκετίνης ήταν αναποτελεσματική, πιθανότατα λόγω κακής απορρόφησης.⁵²⁻⁵⁶

(+)-Κατεχίνη

Κλινικές έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη της φλαβονόνης κατεχίνης παρεμποδίζει την ανάπτυξη ανθρώπινων κυτταρικών σειρών από καρκίνο του

προστάτη και του μαστού και αναστέλλει τη καρκινογένεση στο ήπαρ των μυών. Νεότερες έρευνες έδειξαν ότι η (+)-κατεχίνη μειώνει κατά 75% την εμφάνιση όγκων σε μύες με ελαττωματική σειρά γονιδίων, η οποία προκαλεί την αυτόματη ανάπτυξη όγκων στο έντερο.⁵⁷⁻⁵⁸

trans-ρεσβερατρόλη

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες της *trans*-ρεσβερατρόλης έχουν ερευνηθεί σε βάθος. Το 1997 αναφέρθηκε ότι η χορήγηση 1 έως 25 μM *trans*-ρεσβερατρόλης παρεμπόδισε την έναρξη και εξάπλωση καρκίνων του δέρματος και του μαστού στους επίμυες.⁵⁹ Επίσης, αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες σχετικά με την αντιμεταλλαξιγόνο δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης έδειξαν ότι το μόριο αυτό διαθέτει ιδιαίτερα αποτελεσματικές αντικαρκινικές ιδιότητες σε ποικίλα στάδια ανάπτυξης των νεοπλασιών.⁶⁰ Η αυξημένη δραστηριότητα της *trans*-ρεσβερατρόλης σχετίζεται πιθανότατα με τη διαπιστωμένη ιδιότητά της να ενεργοποιεί -σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<1μM)- μηχανισμούς που σχετίζονται είτε με την απόπτωση ή το σύστημα των υποδοχέων των αμυλο-υδρογονανθράκων, ενός μηχανισμού που επάγει την πρόληψη της καρκινογένεσης.

Τέλος, η *trans*-ρεσβερατρόλη εμποδίζει τη μετάσταση πρώιμων όγκων σε μύες μέσω παρεμπόδισης της αγγειογένεσης, ενός μηχανισμού που επάγει την παραγωγή αιμοφόρων αγγείων από καρκινικούς ιστούς, διακόπτοντας την προμήθεια οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στα μεταλλαγμένα κύτταρα.⁶¹

Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων και είναι ευρέως διαδεδομένο σε φρούτα και λαχανικά. Το γαλλικό οξύ και οι εστέρες του έχει βρεθεί ότι διαθέτουν σημαντική κυτταροστατική δράση σε όγκους του πνεύμονα, στομάχου και έντερου των ζώων και σε λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου.⁶² Οι ενώσεις του γαλλικού οξέος έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού και τις μεταλλάξεις σε μύες, ενώ επάγουν την απόπτωση σε λεμφοκύτταρα του ανθρώπινου αίματος και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη.⁶³⁻⁶⁴

Καφεϊκό και Φερουλικό Οξύ

Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, επιδεικνύουν αξιοσημείωτη προστατευτική δράση κατά της καρκινογένεσης, πιθανότατα μέσω της παρεμπόδισης του σχηματισμού των N-νιτροσοπροϊόντων στον οργανισμό. Σε *in vitro* πειράματα, τα οξέα αυτά έδειξαν ότι αντιδρούν με NO₂, ενώ σε *in vivo* δοκιμασίες ανέστειλαν το σχηματισμό της νιτροζαμίνης. Αντίστοιχα, σε προσομοιώσεις του γαστρικού υγρού, τα οξέα αυτά αντέδρασαν ταχύτατα και ποσοτικά με ισομοριακή ποσότητα NaNO₂.

Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι όσο στα *in vivo* όσο και στα *in vitro* πειράματα, το καφεϊκό πάντοτε παρουσίασε υψηλότερη δραστηριότητα σε σύγκριση με το φερουλικό.⁶⁵

1.5.2 Αντιαγγειογενετική δράση των σταφυλιών

Αγγειογένεση είναι η διαδικασία ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων από τους οργανισμούς και εμπλέκεται αφενός σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η επούλωση των τραυμάτων, οι αναπαραγωγικοί κύκλοι, και αφετέρου σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη ή/και μετάσταση των καρκινικών όγκων, ο διαβήτης και οι χρόνιες λοιμώξεις. Επομένως, η καταστολή της μη φυσιολογικής αγγειογένεσης είναι δυνατόν να αποτελέσει βασική στρατηγική για τη θεραπεία των αντίστοιχων νοσημάτων.⁶⁶

Αρκετές φυσικής προέλευσης πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, με επακόλουθο να παρεμποδίζουν και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων στα ζώα. Για παράδειγμα, η *trans*-ρεσβερατρόλη καταστέλλει τη *in vivo* αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ενώ αναστέλλει άμεσα τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων.⁶⁷ Ένας από τους στόχους της ρεσβερατρόλης στα κύτταρα του ενδοθηλίου είναι το μονοπάτι των κινασών της MAP (Mitogen Activated

Protein), όπως είναι εμφανές από πειράματα για την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης των κινασών της MAP. Αντίστοιχα, η κερκετίνη είναι μια πολυφαινόλη με αντίστοιχες βιολογικές ιδιότητες με την *trans*-ρεσβερατρόλη, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις. Η παρεμποδιστική δράση αυτών των μορίων αυτών είναι δυνατόν να συνδεθεί και με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τις πρωτεάσες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, όπως για παράδειγμα τις MMPs (Matrix MetalloProteinases).⁶⁸

1.5.3 Αντιαθηρωματική δράση

Η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω διατροφής έχει αναφερθεί ότι μειώνει τα ποσοστά εμφάνισης συμβαμάτων των στεφανιαίων νόσων.⁶⁹ Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι φαινόλες συμβάλουν στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι η παρεμπόδιση της οξείδωσης της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη)-χοληστερόλης. Σύμφωνα με την υπόθεση της οξειδωτικής τροποποίησης της αθηροσκλήρωσης, η οξείδωση της LDL συμβάλει καθοριστικά στην αρχική γένεση της αθηρωμάτωσης.⁷⁰ Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από αναφορές ότι η οξείδωση της LDL-χοληστερόλης λαμβάνει χώρα *in vivo*, συμβάλλοντας σημαντικά στην κλινική εκδήλωση της αθηρωμάτωσης. Η οξειδωμένη μορφή της LDL είναι περισσότερο επικίνδυνη για την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης -σε σχέση τη μη οξειδωμένη- αφού συμβάλει και στην ενδοκυτταρική συσσώρευση οξειδωμένων λιπιδίων και στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.⁷¹

Οι πολυφαινόλες μπορούν να αποτρέψουν την οξείδωση των λιπιδίων της LDL χοληστερόλης, είτε μέσω της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών ή της συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων, ή τέλος προστατεύοντας τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού που συνδέονται με την LDL. Επιπλέον, η παρουσία των πολυφαινολών μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες αφού είναι δυνατόν να παρεμποδίσει τη δράση των κυτταρικών οξυγενασών, όπως της NADPH-οξειδάσης ενεργοποιώντας τη δράση των κυτταρικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, όπως το σύστημα της γλουταθειόνης.⁷²

Μια από τις συναφείς ιδιότητες των πολυφαινολών που συμβάλει στην πρόληψη της αθηρωμάτωσης αναφέρεται στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο ενδοθήλιο των αγγείων. Το NO παράγεται από την αργινίνη, μέσω ενός πολύπλοκου ενζυματικού συστήματος, θεωρείται δε ως ένας από τους πρωτεύοντες παράγοντες της αγγειοδιαστολής. Το 1993 οι Fitzpatrick⁷³ και συνεργάτες, έδειξαν ότι ο οίνος, ο χυμός σταφυλιών και το εκχύλισμα από φλοιό σταφυλιών, εμποδίζουν τη συστολή των αορτικών δακτυλίων σε ποντίκια. Αντίστοιχο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήσαν μόρια κερκετίνης και ρεσβερατρόλης υποδεικνύοντας ότι πιθανότατα η παρουσία των δυο αυτών πολυφαινολών είναι η αιτία για τη δράση αυτή.

1.5.4 Άλλες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

Αρκετές πολυφαινόλες έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντικρκικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, τα μόρια (+)-κατεχίνη, *trans*-ρεσβερατρόλη, απιγενίνη, ναριγενίνη, κερκετίνη και γλυκοζίτες, τα οξέα γαλλικό και καφεϊκό κλπ. διαθέτουν αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, τα μόρια αυτά επιδεικνύουν συνεργιστική δράση με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες κατά ανθεκτικών στελεχών των βακτηρίων.⁷⁴⁻⁷⁶ Τέλος, δυο έρευνες αναφέρονται στην *in vivo* χορήγηση φλαβονοειδών, όπως στην από το στόμα χορήγηση κερκετίνης σε ινδικά χοιρίδια (δόσεις των 142,9 mg/kg και 214,3 mg/kg) η οποία προστάτευσε από μόλυνση με τον παθογόνο μικροοργανισμό *shigella*, ενώ οι αντίστοιχοι μάρτυρες πέθαναν.⁷⁷

Ποικίλα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν σημαντική δράση κατά των ιών που καταστέλλουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για παράδειγμα ο HIV (Human Immunodeficiency Virus) και ιδιαίτερα το στέλεχος του HIV-1. Οι φλαβονόλες μυρισετίνη και κερκετίνη παρεμποδίζουν το ένζυμο ιντεγγραση του ιού, ενώ σε έρευνα των Hu και συνεργατών⁷⁸, βρέθηκε ότι το φλαβονοειδές χρύσινο οδηγεί σε καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με 21 φυσικά και 13 συνθετικά φλαβονοειδή.

Όμως τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν προστατευτική δράση και έναντι άλλων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ιών, αφού η κερκετίνη, η ρουτίνη, η διυδροκερκετίνη, η μορίνη, η λευκοκυανιδίνη, η πελαργονιδίνη και η κατεχίνη, έχει αποδειχθεί ότι είναι δραστικά κατά διαφόρων τύπων ιών, όπως οι herpes simplex virus (HSV), poliovirus και sindbis virus.⁷⁹ Τέλος, οι πολυφαινόλες εμφανίζουν συνεργιστική δράση είτε μεταξύ τους ή σε συνδυασμό με άλλους αντιικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, το μίγμα καμφερόλης με λουτεολίνη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση του HSV.⁸⁰

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 Απομόνωση-Παραλαβή των Πολυφαινολών από Φυτικό υλικό

2.1.1 Εισαγωγή

Τα φαινολικά παράγωγα κατανέμονται στους φυτικούς ιστούς ανάλογα με τη δομή τους. Έτσι, οι διαλυτές πολυφαινόλες χαμηλού μοριακού βάρους βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων, ενώ τα αδιάλυτα φαινολικά παράγωγα (πχ πολυμερείς λιγνίνες) αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων συμβάλλοντας στη σταθερότητα και μορφολογία των φυτών, καθώς και στην απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στρες. Τα φαινολικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό και το φερουλικό, συνήθως βρίσκονται υπό τη μορφή μη υδατοδιαλυτών εστέρων, όπως οι πηκτίνες και οι αραβινοξυλάνες και παρεμβάλλονται ως ενδιάμεσα μόρια στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων με τη μορφή διμερών όπως το δεϋδροφερουλικό και το τρουξιλικό οξύ.⁸¹

Η διαδικασία της εκχύλισης απελευθερώνει τα φαινολικά παράγωγα από τα κύτταρα και τους ιστούς, οδηγώντας στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Η συνήθης διαδικασία που ακολουθείται αναφέρεται στη χρήση ενός ομογενοποιητή για τη ρήξη των κυτταρικών ιστών και τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εμβάπτιση σε κατάλληλο διαλύτη, με σκοπό την παραλαβή των φαινολικών παραγώγων μέσω διάχυσης.⁸²

Η παραλαβή των πολυφαινολών από το φυτικό υλικό επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων, όπως η χημική σύσταση, η εφαρμοζόμενη διαδικασία εκχύλισης, οι συνθήκες και ο χρόνος αποθήκευσης, το μέγεθος των ιστών και η παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών. Συνήθως τα εκχυλίσματα αποτελούνται από μίγματα ποικίλων πολυφαινολών που είναι διαλυτά στο σύστημα διαλυτών, όμως περιέχουν και μόρια που είναι ανεπιθύμητα, όπως λίπη, κηροί, τερπένι, και

χλωροφύλλες. Για να απομακρυνθούν τα τελευταία συχνά απαιτούνται επιπλέον διαδικασίες, όπως η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) ή η κλασματοποίηση με βάση την πολικότητα των ουσιών.⁸³

Η διαλυτότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται, το βαθμό πολυμερισμού καθώς και την αλληλεπίδραση τους με άλλα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες) προς σχηματισμό αδιάλυτων προϊόντων. Για τους παραπάνω λόγους δεν υπάρχει μια ενιαία διαδικασία παραλαβής από ένα φυτικό δείγμα όλων των φαινολικών παραγώγων ή μιας μόνο κατηγορίας φαινολών. Η πλέον συνηθισμένη τεχνική που εφαρμόζεται για την παραλαβή των φαινολικών παραγώγων από τα φυτά είναι η εκχύλιση.⁸¹

2.1.2 Εκχύλιση

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την εκχύλιση των πολυφαινολών είναι η μεθανόλη, τα μίγματα μεθανόλης-νερού και σπανιότερα αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας (ή και μίγματά τους), με μικρότερες όμως αποδόσεις.

Οι συνηθέστεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση στην εκχύλιση των πολυφαινολών είναι:

- Το pH του εκχυλιστικού μέσου, το οποίο επιδρά στη διαλυτότητα των ευδιάλυτων συστατικών και επηρεάζει τη διαλυτοποίηση των υδρολυόμενων φαινολικών παραγώγων. Η εκχύλιση σε όξινες συνθήκες αποσκοπεί στην υδρόλυση των γλυκοζιτών των φαινολών, ενώ η εκχύλιση σε αλκαλικό περιβάλλον αποσκοπεί στην υδρόλυση των εστέρων των φαινολών και την παράλληλη απελευθέρωση των πολυφαινολών που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα.⁸⁴
- Η θερμοκρασία. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες εξασφαλίζει καλύτερες αποδόσεις. Όμως επειδή οι πολυφαινόλες είναι θερμοευαίσθητα μόρια που διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως η θερμοκρασία της εκχύλισης δεν πρέπει να ξεπερνά

τους 25°C.

- Ο αριθμός των διαδοχικών εκχυλίσεων και ο όγκος του διαλύτη. Η απόδοση μιας εκχύλισης αυξάνει με τον αριθμό των διαδοχικών εκχυλίσεων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι για συγκεκριμένο όγκο διαλύτη είναι προτιμότερη η πραγματοποίηση πολλαπλών εκχυλίσεων-χρησιμοποιώντας μικρότερους όγκους-σε σύγκριση με μία μόνο εκχύλιση που χρησιμοποιεί το σύνολο του διαλύτη. Γενικά, η ποσοτική παραλαβή των φαινολικών παραγώγων απαιτεί 3-5 διαδοχικές εκχυλίσεις.

Για δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό -όπως τα σταφύλια- συνιστάται η κατάψυξή τους πριν από τη διαδικασία της εκχύλισης, προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι ενζυμικές λειτουργίες και να προστατευθούν οι ασταθείς πολυφαινόλες. Επιπλέον, η εκχύλιση των πολυφαινολών διευκολύνεται όταν έχει προηγηθεί κατάψυξη των δειγμάτων, καθώς οι κρύσταλλοι του νερού που σχηματίζονται καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα ευνοώντας την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου υλικού. Τέλος, μια άλλη πρακτική που ακολουθείται είναι η λυοφυλίωση των δειγμάτων, η οποία πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και αφήνει ανέπαφες τις πολυφαινόλες, επιτρέποντας τη διατήρηση των δειγμάτων για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.1.3 Εκχύλιση με υπερήχους

Η εκχύλιση των πολυφαινολών, υποβοηθείται συχνά με τη χρήση υπερήχων, η οποία εξασφαλίζει μεγαλύτερες αποδόσεις. Η διαδικασία αυτή είναι ταχύτερη και αποδοτικότερη σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές, οι οποίες στηρίζονται στην απλή διάχυση των συστατικών, αφού η επιφάνεια επαφής μεταξύ της υγρής και της στερεής φάσης αυξάνει σημαντικά λόγω της διάσπασης των σωματιδίων που συνεπάγεται η χρήση τους. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης των υπερήχων αφορά στη μείωση του συνολικού χρόνου της εκχύλισης, η οποία μπορεί να ολοκληρωθεί ακόμη και εντός 30min. Επίσης η χρήση των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη καλύτερων αποδόσεων σε χαμηλές

θερμοκρασίες, σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, γεγονός πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της σταθερότητας των πολυφαινολών.⁸⁵

2.1.4 Δείγματα που μελετήθηκαν

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στη διατριβή συλλέχθηκαν από διάφορα οινοποιεία κατά τις οινοποιητικές περιόδους 2008 έως 2009. Στον Πίνακα 2.1 που ακολουθεί συνοψίζονται οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ως Β, Γ, Ρ χαρακτηρίστηκαν αντίστοιχα οι βόστρυχοι, τα γίγαρτα και τα σταφύλια/ράγες. Στον πίνακα επίσης παρουσιάζεται η μέθοδος ξήρανσης που ακολουθήθηκε και η ονομασία εκάστου δείγματος.

Πίνακας 2.1 Δείγματα της διατριβής

Κ.Δ	ΜΕΡΟΣ ΦΥΤΟΥ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
ΑΣΥΣ	Ράγα (σταφύλι)	Ασύρτικο	Σαντορίνη	Λυοφιλίωση
ΑΣΥΓ	Γίγαρτα	Ασύρτικο	Σαντορίνη	Αέρας
ΑΣΥΒ	Βόστρυχοι	Ασύρτικο	Σαντορίνη	Αέρας
ΒΙΝΒ	Βόστρυχοι	Βινσάντο	Σαντορίνη	Αέρας
ΒΟΥΒ	Βόστρυχοι	Βοϋδόματο	Σαντορίνη	Αέρας
ΜΑΝΒ	Βόστρυχοι	Μανδηλαριά	Σαντορίνη	Αέρας
ΜΑΥΒ	Βόστρυχοι	Μαυροτράγανο	Σαντορίνη	Αέρας
ΜΟΣΒ	Βόστρυχοι	Μοσχάτο Αμβούργου	Τύρναβος	Αέρας
ΞΙΝΒ	Βόστρυχοι	Ξινόμαυρο	Νάουσα	Αέρας
ΞΙΝΓ	Γίγαρτα	Ξινόμαυρο	Νάουσα	Αέρας
ΡΟΜΒ	Βόστρυχοι	Ρομπόλα	Κεφαλονιά	Αέρας
ΡΟΜΓ	Γίγαρτα	Ρομπόλα	Κεφαλονιά	Αέρας

2.1.5 Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων

Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν απουσία φωτός μέχρι την ανάλυση τους, οι ράγες σε θερμοκρασία -25°C και τα υπόλοιπα σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από την εκχύλιση τους, οι μεν ράγες αποκολλήθηκαν μηχανικά, διαχωρίστηκαν από τα γίγαρτα και λυοφιλοποιήθηκαν παράγοντας ένα κολλώδες στερεό υπόλειμμα που ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί το βάρος επί ξηρού. Τα γίγαρτα και οι βόστρυχοι ξηράθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα και στη συνέχεια ζυγίστηκαν για να προσδιοριστεί το βάρος επί ξηρού.

2.1.6 Αναλώσιμα-Συσκευές

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις των δειγμάτων ήταν βαθμού αναλυτικής καθαρότητας και η προμήθειά τους έγινε από την εταιρεία SDS. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων και την παρασκευή της κινητής φάσης ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC της εταιρείας SDS. Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο ύδωρ, ενώ στη χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιήθηκε αντίστροφης όσμωσης ύδωρ που παρήχθη με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus. Το ψηφιακή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του pH των δειγμάτων ήταν της εταιρείας HACH μοντέλο sesion3.

2.1.7 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Μετά τη ξήρανση (ή λυοφιλίωση για τις ράγες), τα δείγματα κονιοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50g δείγματος βοστρύχων ή γιγάρτων (ή 250 g ραγών) σε κωνική φιάλη και εκχυλίστηκαν με μίγμα $\text{MeOH-H}_2\text{O-HCl}$ 0,1N (90:9,5:0,5), σε λουτρό υπερήχων (Εικόνα 2.1), λαμβάνοντας μέριμνα ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 25°C . Έκαστο δείγμα εκχυλίστηκε τέσσερις φορές σε 100 mL διαλύτη επί 10min κάθε φορά. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε σε χωνί Buchner (Εικόνα 2.2) με χάρτινο ηθμό. Το σύνολο των διηθημάτων συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C , δίνοντας ένα παχύρευστο υπόλειμμα. Αυτό επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα

μεθανόλης-νερού (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα.



Εικόνα 2.1 Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων



Εικόνα 2.2 Διήθηση σε χωνί Buchner

Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με πετρελαϊκό αιθέρα -για την απομάκρυνση των λιπών και των χλωροφυλλών- και ακολούθησε απομάκρυνση της μεθανόλης με νέα εξάτμιση υπό κενό (κάτω των 35°C) σε ένα κολλώδες στερεό. Το τελευταίο επαναδιαλυτοποιήθηκε με τη βοήθεια υπερήχων σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και εκχυλίστηκε τέσσερις φορές διαδοχικά με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανική φάσες ενώθηκαν, ξηράθηκαν με προσθήκη MgSO₄ (για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της υγρασίας) και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Μετά το τέλος της εκχύλισης το στερεό υπόλειμμα ζυγίστηκε (για να προσδιοριστεί η τελική απόδοση), επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη και διηθήθηκε με φίλτρα σύριγγος PVDF 0,45μm για να είναι δυνατή η ειαγωγή τους στο HPLC.

Όλες οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν απουσία φωτός.

2.2 Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC: Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός Πολυφαινολών

2.2.1 Κριτήρια επιλογής μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολών προσφέροντας ευκολία, εξοικονόμηση χρόνου στον ερευνητή εφόσον η ανάλυση είναι αρκετά σύντομη και τα δείγματα δεν απαιτείται να έχουν υποστεί ιδιαίτερη κατεργασία πριν από την ανάλυση. Για τους λόγους αυτούς, οι εφαρμογές της έχουν επεκταθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες και έχει σχεδόν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές χρωματογραφικές τεχνικές όπως τη χρωματογραφία χάρτου (PC) και τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC).

Αν και σε κάποιες περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης για το διαχωρισμό των φαινολών από διάφορα φρούτα και λαχανικά, η τεχνική αυτή δεν είναι η ενδεικνυόμενη, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος συστατικά υψηλής πολικότητας να παραμείνουν μόνιμα στη στήλη αλλοιώνοντας τα χαρακτηριστικά και τη διαχωριστική της ικανότητα.⁸⁶ Αντίθετα, η υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) αποτελεί πλέον την πρώτη επιλογή για το διαχωρισμό μίγματος φαινολικών ουσιών με χρήση στηλών C₈ ή C₁₈, καθώς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Η χρησιμότητα της RP-HPLC έχει γίνει φανερή στο διαχωρισμό όλων των ομάδων φαινολικών ουσιών αλλά κυρίως των ανθοκυανινών οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολικές και ο διαχωρισμός τους δεν ήταν δυνατός με χρωματογραφία κανονικής φάσης.⁸⁷

Υπό τις συνηθισμένες συνθήκες ανάλυσης στη RP-HPLC οι περισσότερο πολικές ουσίες εκλούνται πρώτες. Επομένως οι γλυκοζίτες με περισσότερες μονάδες σακχάρων εκλούνται πρώτες, ακολουθούν οι μονογλυκοζίτες και τέλος τα άγλυκα συστατικά. Επίσης η σειρά έκλουσης των φλαβονοειδών είναι φλαβανόνες<φλαβονόλες<φλαβόνες. Τέλος τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι περισσότερο πολικά από τα υδροξυκιναμμομικά οξέα, με αποτέλεσμα να εκλούνται

πρώτα.

Η ανίχνευση των φαινολών στην HPLC βασίζεται συνήθως στη μέτρηση της απορρόφησης τους στο UV-Vis σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Για παράδειγμα, οι ανθοκυανίνες απορροφούν στα 515-520 nm και οι φλαβανόλες στα 280 nm, ενώ η αναγνώριση τους γίνεται με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του χαρακτηριστικού τους φάσματος απορρόφησης με αυτό των πρότυπων ουσιών.

2.2.2 Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Hewlet Packard HP1100 με αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P4000), απαερωτή, ανιχνευτή UV-Vis και θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας. Το λογισμικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το Chemstation.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Macheray-Nagel τύπου Kromasil C₁₈ με 250 mm x 4,6 mm εσωτερική διάμετρο και διάμετρο σωματιδίων 5μm. Επίσης χρησιμοποιήθηκε προστήλη με τα ίδια χαρακτηριστικά.

Η παραγωγή υπερκάθαρου νερού για HPLC, έγινε με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus, ενώ η διήθηση των διαλυτών πρίνα από την χρήση τους για την παρασκευή της κινητής φάσης έγινε με σύστημα διήθησης υπο κενό σε συσκευή Millipore. Το ψηφιακό pH-μετρο που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του pH της κινητής φάσης ήταν της HACH το μοντέλο session3.

2.2.3 Αναλώσιμα

Οι παρακάτω πρότυπες φαινολές που χρησιμοποιήθηκαν για τους προσδιορισμούς αγοράσθηκαν από την Sigma-Aldrich:

- ✓ γαλλικό οξύ,
- ✓ επικατεχίνη,
- ✓ καμφερόλη,
- ✓ καφεϊκό οξύ,

- ✓ (+)-κατεχίνη,
- ✓ κερκετίνη,
- ✓ π-κουμαρικό οξύ,
- ✓ ρουτινοσίδης της κερκετίνης (ρουτίνη)
- ✓ *trans*-ρεσβερατρόλη,
- ✓ συριγγικό οξύ,
- ✓ φερουλικό οξύ.

Οι διαλύτες μεθανόλη, ακεονοτρίλιο και οξικό οξύ ήταν της εταιρείας SDS και καθαρότητας HPLC.

2.2.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Παρασκευή κινητής φάσης

Διαλύτης A: Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa 20 mM με pH 2,7.

Το διάλυμα παρασκευάστηκε με διάλυση 2,72g CH₃COONa σε 1L νερού καθαρότητας nanopure. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στα 2,7 με προσθήκη CH₃COOH. Το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό μέσω φίλτρου ώστε να κατακρατηθούν τα στερεά σωματίδια και να γίνει απαέρωση του διαλύματος προκειμένου να μη δημιουργηθούν υπερβολικές φυσαλίδες κατά τη ροή του διαμέσου της στήλης.

Διαλύτης B: Ακετονιτρίλιο HPLC. Ο διαλύτης διηθήθηκε υπό κενό μέσω φίλτρου, πριν χρησιμοποιηθεί για τη χρωματογραφική ανάλυση.

2.2.5 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολών

Για κάθε μία από τις πρότυπες ενώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) συγκέντρωσης 1000 ppm σε μεθανόλη. Τα διαλύματα αυτά φυλάχθηκαν στους -25°C απουσία φωτός. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν με αραιώσεις τρία πολυπρότυπα διαλύματα φαινολών διαφόρων συγκεντρώσεων προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς. Αναλυτικότερα:

Πίνακας 2.2

Πρότυπη Ένωση	1 ^ο πρότυπο συγκέντρωση (ppm)	2 ^ο πρότυπο συγκέντρωση (ppm)	3 ^ο πρότυπο συγκέντρωση (ppm)
Κατεχίνη	40	10	0,5
Επικατεχίνη	40	10	0,5
π-κουμαρκό οξύ	40	10	0,5
Γαλλικό οξύ	40	10	0,5
Καφεϊκό οξύ	10	5	0,12
Φερουλικό οξύ	10	5	0,12
Ρουτίνη	10	5	0,12
<i>trans</i> - ρεσβερατρόλη	10	5	0,12
Συριγγικό οξύ	10	5	0,12
Κερκετίνη	10	5	0,12

2.2.6 Συνθήκες ανάλυσης

Ο διαχωρισμός των φαινολών από τα εκχυλίσματα ή τα δείγματα των οίνων έγινε με βαθμιδωτή έκλυση που διήρκεσε 95min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των Tsao & Yang⁸⁸ με ορισμένες τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των μορίων.⁸⁹ Το χρονοδιάγραμμα της ανάλυσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3

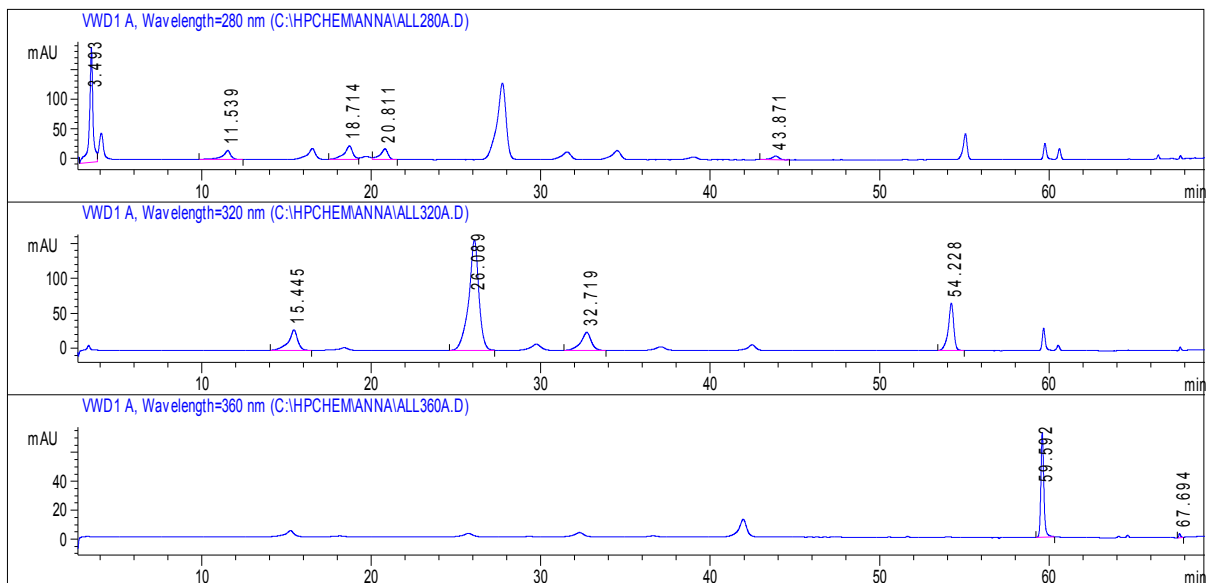
Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ροή mL/min
0	95	5	1,0
45	85	15	1,0
60	65	35	1,0
65	50	50	1,0
70	0	100	1,0

Πρίν την έναρξη της ανάλυσης προηγήθηκε έκπλυση των καναλιών (purge) με διαλύτη με ροή 5 mL/min για να απομακρυνθεί ο προηγούμενος διαλύτης και οι τυχόν φυσαλίδες από το σύστημα. Ακολούθησε ενεργοποίηση της στήλης με την αρχική αναλογία διαλυτών και η εξισορρόπηση της για τουλάχιστον 60 min. Ο όγκος του δείγματος που εισήλθε στη στήλη μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη ήταν 20 μ L, η ροή του διαλύτη παρέμεινε σταθερή και ίση με 1,0 mL/min για όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και η απορρόφηση των συστατικών παρακολούθηθηκε σε δύο μεθόδους, (280 nm-360 nm και 320 nm).

Ο καθαρός χρόνος της ανάλυσης έκαστου δείγματος ήταν 70 min όμως ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν περίπου 95 min, αφού μετά το πέρας της μεσολαβεί ένα διάστημα 25min στο οποίο περνάει διαδοχικά 100% ακετονιτρίλιο (5 min) από τη στήλη και 100% H₂O (5 min) προκειμένου να εκλουσθούν οι τυχόν εναπομένουσες ουσίες. Τέλος, επανέρχεται η αρχική αναλογία διαλυτών (95% A και 5% B) για 15 min προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση της στήλης πριν την επόμενη ανάλυση. Η διοχέτευση του H₂O αποσκοπεί εκτός από το να καθαρίσει τη στήλη και στην απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη αφού η απότομη αλλαγή από 100% AcCN σε 95% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα θα προκαλούσε καταβύθιση των μορίων του άλατος μέσα στη στήλη με αρνητικές συνέπειες για τη στήλη και την ποιότητα της ανάλυσης.

Μετά το πέρας των αναλύσεων ακολούθησε πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με H₂O / AcCN και τα κανάλια των διαλυτών ξεπλύθηκαν με H₂O για 10 min τουλάχιστον ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα οξέος και άλατος.

Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζονται τρία τυπικά χρωματογραφήματα όλων των προτύπων ουσιών από τρία μήκη κύματος που αναλύθηκαν με την προηγούμενη μέθοδο.



Εικόνα 2.3 Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα πρότυπων ουσιών σε 280 nm, 320 nm και 360 nm

2.3 Προσδιορισμός Φαινολών

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολών πραγματοποιήθηκε με βάση τον χρόνο κατακράτησης τους (Retention Time) και του φάσματος απορρόφησης των προτύπων μορίων. Οι φαινόλες ανάλογα με τη δομή τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis, με αποτέλεσμα η ανάλυσή τους να απαιτεί τη χρήση τριών διαφορετικών μηκών κύματος. Συγκεκριμένα, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι флаβονόλες και οι προκυανιδίνες ανιχνεύονται στα 280 nm, τα σιλβένια, τα υδρόξυκιναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους, αναλύονται στα 320 nm, ενώ οι флаβονόλες και οι γλυκοζίτες τους στα 360 nm. Στον Πίνακα 2.4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν σε κάθε πρότυπη ουσία που χρησιμοποιήθηκε

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των προτύπων ουσιών για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις, μέσω των οποίων προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση τους στα δείγματα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Πρότυπη ουσία	Μήκος Κύματος (nm)	Εύρος Συγκεντρώσεων (ppm)	Εξίσωση	R ²	Όριο Ανίχνευσης (mg/L)	Όριο Ποσοτικοποίησης (mg/L)
Γαλλικό οξύ	280	40-0,5	$y=0,0156x+2,8505$	0,9802	0,019	0,059
Επικατεχίνη	280	40-0,5	$y=0,0623x+3,0931$	0,9791	0,159	0,477
Καμφερόλη	360	10-0,12	$y=0,0316x + 0,508$	0,9983	0,016	0,048
Κατεχίνη	280	40-0,5	$y=0,0439x+2,8724$	0,981	0,016	0,076
Καφεϊκό οξύ	320	10-0,12	$y= 0,009x - 0,1223$	0,9973	0,016	0,049
Κερκετίνη	360	10-0,12	$y=0,0467x-3,1577$	0,9564	0,01	0,031
π-κουμαρικό οξύ	320	40-0,5	$y=0,006x + 0,6821$	0,9977	0,02	0,061
Ρουτίνη	280	10-0,12	$y=0,0485x+1,2631$	0,8978	0,024	0,072
Συριγγικό οξύ	280	10-0,12	$y=0,0244x+1,2586$	0,9155	0,012	0,038
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	320	10-0,12	$y = 0,0064x + 0,55$	0,978	0,02	0,006
Φερουλικό οξύ	320	10-0,12	$y=0,0089x+0,4437$	0,9863	0,031	0,089

Πίνακας 2.4 Στοιχεία της μεθόδου ανάλυσης πολυφαινολών με HPLC

2.3.1 Μέθοδος Ολικών Φαινολικών- Folin Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalten (F-C), για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, είναι μια φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών. Εκμεταλλεύεται δε το γεγονός ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης, σχηματίζοντας έγχρωμο προϊόν. Στη συνέχεια οι Singleton και Rossi βελτίωσαν τη μέθοδο και τη χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών στο κρασί. Η μέθοδος έγινε πολύ δημοφιλής και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου διαφόρων φυσικών προϊόντων.

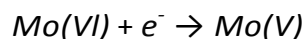
Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος F-C χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών, στην πραγματικότητα προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος, αφού η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μια οξειδοαναγωγή. Ως εκ τούτου η παραπάνω μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί και ως μία μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ανήκει στην κατηγορία της μεταφοράς ηλεκτρονίων, γι' αυτό δεν πρέπει να ξαφνιάζει το γεγονός ότι το «πολυφαινολικό προφίλ» που προσδιορίζεται με αυτή τη μέθοδο παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα η FRAP.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu , παρασκευάζεται με ανάμιξη

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, π. HCl , $85\%H_3PO_4$ σε ύδωρ και βράσιμο για 10 h. Κατόπιν προστίθεται $Li_2SO_4 \cdot 4H_2O$, το οποίο δίνει στο αντιδραστήριο ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα.

Η ακριβής χημική σύσταση του αντιδραστηρίου δεν είναι γνωστή, η αντίδραση όμως που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου.



Προφανώς η παραπάνω αντίδραση δεν είναι επιλεκτική μόνο για τις

φαινόλες, αφού μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την παρουσία και άλλων αναγωγικών παραγόντων (βιταμίνη C, Cu(I), κ.τ.λ.). Οι φαινόλες αντιδρούν με το αντιδραστήριο F-C μόνο σε βασικό περιβάλλον. Έτσι, πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου F-C το pH του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό ($pH \approx 10$) με την προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 . Η απόσπαση ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαινολικού ανιόντος που ανάγει το αντιδραστήριο F-C σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε σύμπλοκο που απορροφά σε μήκος κύματος 745-750 nm.

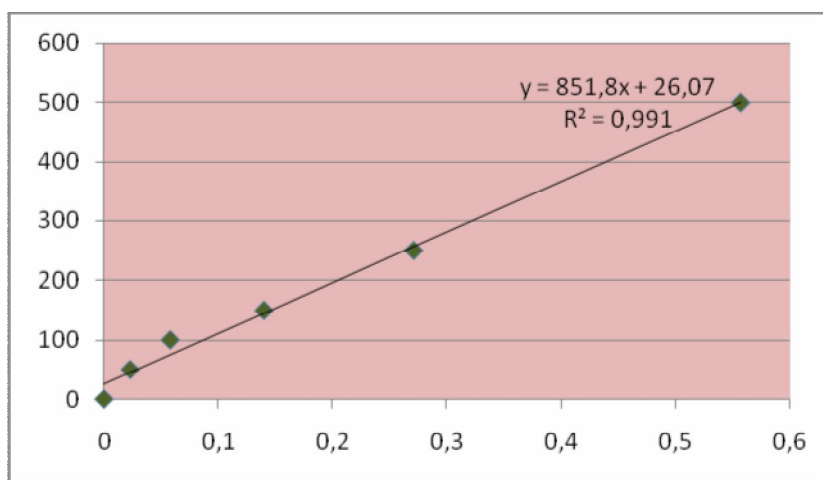
Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται από τους Singleton και Rossi⁹⁰ είναι η εξής: 1 mL δείγματος κατάλληλα αραιωμένου, αναμιγνύεται με 60 mL ύδατος και 5 mL αντιδραστήριου F-C. Στη συνέχεια προστίθενται 15ml διαλύματος Na_2CO_3 και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100ml με προσθήκη ύδατος. Μετά από επώαση για 2 h απουσία φωτός, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ ως πρότυπο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος F-C είναι απλή, επαναλήψιμη και εύκολη. Έτσι έχει εξελιχθεί σε μια μέθοδο ρουτίνας τόσο για την μέτρηση των ολικών φαινολικών, όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης των εκχυλισμάτων σε MeOH συγκέντρωσης 10 mg/mL (stock solutions), παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα μετά από κατάλληλες αραιώσεις σε διαλύτη $H_2O/ EtOH$ (85:15). Από το διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις τα πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 50-500 mg/L προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς (Γράφημα 2.1). Οι αραιώσεις κρίθηκαν απαραίτητες προκειμένου η απορρόφηση να είναι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου και παράλληλα να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert. Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml τοποθετήθηκαν 100 μ L δείγματος (ή προτύπου για την καμπύλη αναφοράς).

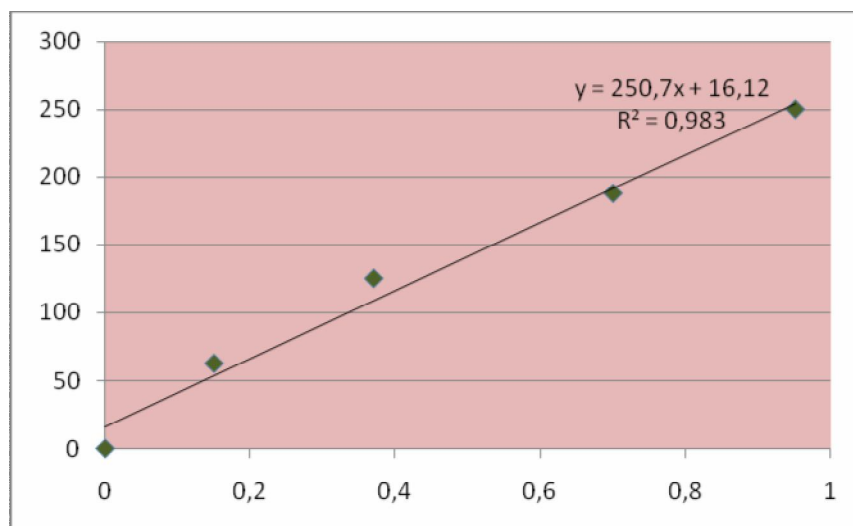
Στη συνέχεια προστέθηκαν 6 mL απεσταγμένου νερού και 0,5 mL αντιδραστήριου Folin- Ciocalteu (2N). Μετά από 8½ min προστέθηκαν 1,5 mL διαλύματος Na_2CO_3 , 20 % w.v. και συμπληρώθηκαν με νερό μέχρι την χαραγή. Όλες οι ογκομετρικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν σε σκιερό μέρος για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου για να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Η απορρόφηση των δειγμάτων καταγράφηκε στα 765 nm.⁹¹ Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών προσδιορίστηκε με βάση τη καμπύλη αναφοράς σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.



Γράφημα 2.1 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

2.4 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών

Τα ολικά φλαβονοειδή υπολογίστηκαν με κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου των Gunes.⁹² Δείγμα 1mL κατάλληλα αραιωμένου αναμείχθηκε με 4mL διπλά απεσταγμένου νερού και 0,3 mL διαλύματος $NaNO_2$, 5%. Στη συνέχεια μετά από 5 min προστέθηκαν 0,3 ml διαλύματος $AlCl_3$, 10%. Μετά από 1 min προστέθηκε διάλυμα 2 mL $NaOH$ 1M και διπλά απεσταγμένου νερού. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου, ενώ παράλληλα μετρήθηκαν οι απορροφήσεις διάφορων συγκεντρώσεων κατεχίνης για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης (Γράφημα 2.2). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανα g ξηρού βάρους.



Γράφημα 2.2 Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης

2.5 Τεχνικές Μέτρησης Αντιοξειδωτικής Δράσης

2.5.1 Εισαγωγή

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Ως αποτέλεσμα, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών μορίων ή και εκχυλισμάτων τους, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* δοκιμές. Δεδομένης όμως της πολυπλοκότητας των βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνονται στις οξειδωτικές διαδικασίες στα κύτταρα, καθώς και κάποιων μειονεκτημάτων στην πειραματική διαδικασία, δύσκολα κάποια από αυτές τις μεθόδους μπορεί να θεωρηθεί απόλυτα ακριβής για να καθιερωθεί ως πρότυπη μέθοδος. Για το λόγο αυτό συνήθως η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάποιου συστήματος γίνεται με μια σειρά από δοκιμασίες που έχουν ως σκοπό την κάλυψη όσο το δυνατό μεγαλύτερου εύρους παραγόντων που συμμετέχουν στις οξειδωτικές διαδικασίες.

Μέσα στα βιολογικά συστήματα υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις κατηγορίες αντιοξειδωτικών:

1. Ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η περοξειδάση της γλουταθειόνης και διάφορες καταλάσες.

2. Μεγαλομόρια όπως η φεριτίνη, η αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες.
3. Μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, τα καρτενοειδή, η τοκοφερόλη και οι πολυφαινόλες.
4. Κάποιες ορμόνες, όπως η μελατονίνη, τα οιστρογόνα και η αγγιοτενσίνη.
5. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν πολλαπλές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών προϊόντων όπως $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$, $HOCl$, $RO(O)^{\cdot}$, $LO(O)^{\cdot}$.

Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς, ανάλογα με το σύστημα, ή να εκδηλώνουν την αντιοξειδωτική τους δράση με διαφορετικούς μηχανισμούς ακόμα και στο ίδιο σύστημα.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές δοκιμασίες για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και των καθαρών μορίων. Οι μέθοδοι περιγράφονται στη συνέχεια.⁹³

2.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH[•]

Η μέθοδος, αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του και στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Σχήμα 2.2). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλέ χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 2.1), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική του απορρόφηση.⁹⁴

Κατά τη μέθοδο αυτή, σε 950μl μεθανόλης προστίθενται 50μl διαλύματος DPPH έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της ρίζας να είναι 100μM. Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Ενώ δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 25⁰C για 20 λεπτά στο σκοτάδι (το DPPH είναι φωτοευαίσθητο) και μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή

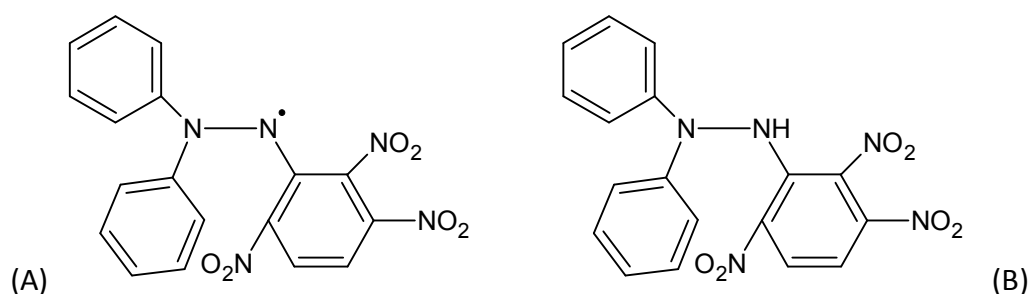
Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1mL. Επίσης, ελέγχθηκε εάν τα εκχυλίσματα απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 517nm. Σε κάθε πείραμα οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και έγιναν τουλάχιστον δύο πειράματα για την εξέταση κάθε δείγματος.

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

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

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm



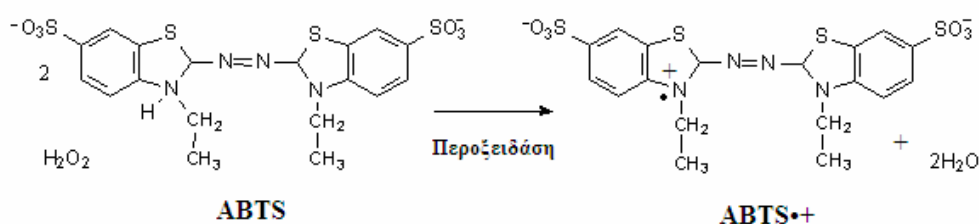
Σχήμα 2.1 (A) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•). (B) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

2.5.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller⁹⁵ και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αφού βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνονται δημιουργώντας τη δραστική ρίζα, του κατιόντος ABTS^{•+} (Σχήμα2.2).

Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός μορίου πρέπει πρώτα να

προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στη συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενου μορίου. Όταν στο διάλυμα προστεθεί ένα μόριο με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω της προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm.



Σχήμα 2.2 Σχηματισμός της ρίζας του ABTS.

[2.6 Προσδιορισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης έναντι μεταλλάξεων προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου \(\$OH\bullet\$ \) με τη μέθοδο του DNA plasmid relaxation.](#)

2.6.1 Εισαγωγή

Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες στο DNA, όπως το οξειδωτικό στρες, θεωρούνται ένα σημαντικό στάδιο της καρκινογένεσης, καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως είναι οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και η πρόωρη γήρανση.⁹⁶ Για παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του “πολυσταδιακού μοντέλου” της καρκινογένεσης, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: την έναρξη, την προαγωγή και την πρόοδο.

Η έναρξη, (πρώτο στάδιο) προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA, πιθανότατα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, σε ένα “αρχικό κύτταρο” που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε.⁹⁷

Στο δεύτερο στάδιο, την προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται υπό από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων), με τελική κατάληξη το σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από τα κύτταρα αυτά, μια “κρίσιμη” μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο, αφού η αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει ‘αρχικά κύτταρα.

Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, την πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης.

2.6.2 Πειραματική διαδικασία

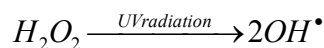
2.6.2.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA

Ορισμένοι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (π.χ. $O_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet}), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν κοψίματα (nicks) σε έναν από τους κλώνους ενός δίκλωνου DNA. Οι βλάβες αυτές στο DNA μπορούν να οδηγήσουν στη συνέχεια σε μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση. Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν ένα μόριο έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δημιουργία των παραπάνω βλαβών στο DNA είναι η επώαση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα με πλασμιδιακό DNA. Το κυκλικό δίκλωνο πλασμιδιακό DNA όταν βρίσκεται στην υπερελικωμένη του μορφή (supercoiled), λόγω της συμπαγούς διαμόρφωσής του παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε μία πηκτή αγαρόζης.

Εάν προκληθούν κοψίματα σε έναν από τους κλώνους του -από έναν μεταλλαξιγόνο παράγοντα- τότε το υπερελικωμένο DNA ξετυλίγεται και μετατρέπεται σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA το οποίο έχει μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτή αгарόζης (Εικόνα 2.4). Έτσι σε μία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης το υπερελικωμένο και το χαλαρωμένο DNA θα δώσουν διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ζώνες. Δίκλινα κοψίματα οδηγούν στο σχηματισμό γραμμικού DNA, το οποίο σε μία πηκτή αгарόζης μετακινείται ανάμεσα στο υπερελικωμένο και στο χαλαρωμένο DNA. Εάν στην αντίδραση προστεθεί ένα μόριο που παρεμποδίζει τη δράση της μεταλλαξιγόνου ένωσης τότε θα ανασταλεί και η μετατροπή του υπερελικωμένου DNA σε χαλαρωμένο.

2.6.2.2 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)

Στην περίπτωση αυτή ως μεταλλαξιγόνο ένωση χρησιμοποιήθηκε το H₂O₂, το οποίο υπό την επίδραση υπεριώδου ακτινοβολίας διασπάται σε ρίζες OH• οι οποίες είναι πολύ δραστικές και προκαλούν μονόκλινα ή δίκλινα σπασίματα στο DNA.



Συγκεκριμένα, πλασμιδιακό DNA pGem-3z (1 μg/10μL) επώαστηκε για 3 λεπτά παρουσία UV με 10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=8.0) και 40 mM H₂O₂ παρουσία ή απουσία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μL και η αντίδραση έγινε σε σωλήνες των 0,5mL. Μετά την επώαση, στα δείγματα προστέθηκαν 3μL διαλύματος φόρτωσης (30%w/v γλυκερόλη, 0,25%w/v κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) για 90 λεπτά σε πηκτή αгарόζης 0,8%w/v. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TAE pH 8,0 (40mM Tris-οξικό οξύ, 2mM EDTA). Ακολούθησε χρώση των ζωνών του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/mL) για 30 λεπτά και αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Οι πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε συσκευή εκπομπής UV φωτογραφήθηκαν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001. Στη

συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Η.Π.Α.) έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.

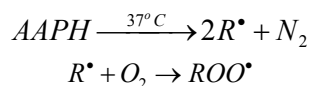
Κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (pGem-3z DNA χωρίς H₂O₂ ή εξεταζόμενες ουσίες), ένα θετικό μάρτυρα (pGem-3z DNA με H₂O₂) καθώς και δείγματα που περιείχαν το pGem-3z, το H₂O₂ και τις εξεταζόμενες ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην επαγωγή θραύσεων από τις OH[•] στο πλασμιδιακό DNA προσδιορίστηκε από την εξίσωση :

$$\% \text{Αναστολή} = (S - S_0) / (S_{\text{control}} - S_0) \times 100$$

Όπου S_{control} είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα αρνητικός μάρτυρας. S₀ είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα θετικός μάρτυρας και S είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στα δείγματα που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και το H₂O₂.

2.6.2.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH[•])

Στην περίπτωση αυτή ως μεταλλαξιγόνος ουσία χρησιμοποιήθηκε το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) το οποίο σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•] οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα στο DNA με τις εξής αντιδράσεις:



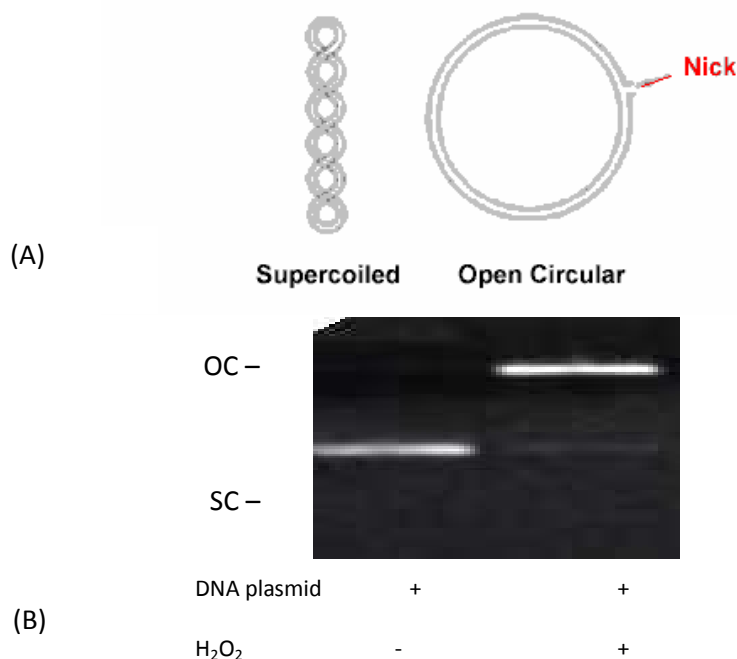
Συγκεκριμένα, πλασμιδιακό DNA pGem-3z (1 μg/10μL) επώαστηκε για 45 λεπτά στους 37°C σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH=7,4) με AAPH (2,5 mM). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μL και η αντίδραση έγινε σε σωλήνες των 0,5mL. Μετά την επώαση, στα δείγματα προστέθηκαν 3μL διαλύματος φόρτωσης (30%w/v γλυκερόλη, 0,25%w/v κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) για 90 λεπτά σε πηκτή αγαρόζης 0,8%w/v. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TAE pH 8,0 (40mM Tris-οξικό οξύ, 2mM EDTA). Ακολούθησε χρώση των ζωνών του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/mL) για 30 λεπτά και αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Οι πηκτές αφού

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

τοποθετήθηκαν σε συσκευή εκπομπής UV φωτογραφήθηκαν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Η.Π.Α.) έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (pGem-3z DNA χωρίς H₂O₂ ή εξεταζόμενες ουσίες), ένα θετικό μάρτυρα (pGem-3z DNA με H₂O₂) καθώς και δείγματα που περιείχαν το pGem-3z, το AAPH και τις εξεταζόμενες ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην επαγωγή θραύσεων από τις OH[•] στο πλασμιδιακό DNA προσδιορίστηκε από την εξίσωση:

$$\% \text{Αναστολή} = (S - S_0) / (S_{\text{control}} - S_0) \times 100$$

Όπου S_{control} είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα αρνητικός μάρτυρας. S₀ είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα θετικός μάρτυρας και S είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στα δείγματα που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και το H₂O₂.



Εικόνα 2.4 Απεικονίζεται η μετατροπή ενός υπερελικωμένου δίκλωνου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (supercoiled) σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (open circular) μετά τη δημιουργία ενός κοψίματος (nick). (A) Σχηματική παράσταση. (B) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω.

2.7 Μελέτη της επίδρασης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων με τη μέθοδο ΧΤΤ.

2.7.1 Σκοπός

Ο καρκίνος του ήπατος είναι μία από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Επειδή οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι αποτελεσματικές καθώς και η μεγάλη συχνότητα επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα. Χημειοπροφύλαξη είναι η διακοπή ή η αντιστροφή της καρκινογένεσης με τη χορήγηση φυσικών ή συνθετικών χημικών ενώσεων. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα εκχυλισμάτων από βόστρυχους αμπέλου καθώς και φυτικών πολυφαινολών που βρέθηκαν σε αυτά να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών ηπατοκυττάρων.

Επίσης, εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) στα καρκινικά ηπατοκύτταρα. Η απόπτωση θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας έναντι του καρκίνου.

2.7.2 Πειραματική Διαδικασία

Καρκινικά κύτταρα του ήπατος (HepG2) προστέθηκαν (10000 κύτταρα ανά θέση) σε τρυβλία με 96 θέσεις και επώαστηκαν για 24 ώρες σε κλίβανο με 37⁰ C και 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στην επιφάνεια του τριβλίου. Στη συνέχεια προστέθηκε το εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις στα κύτταρα και έγινε επώαση για 24 ώρες. Μετά την επώαση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ για να προσδιοριστεί η κυτταρική αύξηση. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως το % της κυτταρικής αύξησης στις καλλιέργειες των κυττάρων που είχαν προστεθεί οι εξεταζόμενες ουσίες, σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα (δηλαδή την καλλιέργεια που δεν περιείχε το εκχύλισμα). Σε κάθε εκχύλισμα υπολογίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία το εκχύλισμα αναστέλλει κατά 50% την κυτταρική αύξηση.

2.8 Επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχο στον σχηματισμό σωλήνων από ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ο σχηματισμός σωλήνων από ενδοθηλιακά κύτταρα όταν αναπτύσσονται σε ένα εξωκυτταρικό υπόστρωμα θεωρείται ένδειξη της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Συνεπώς, η αναστολή του σχηματισμού των σωλήνων μετά την προσθήκη ενός μορίου ή εκχυλίσματος στην καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένδειξη αντι-αγγειογενετικής δράσης. Στο συγκεκριμένο πείραμα 250 μL διαλύματος εξωκυτταρικού υπόστρώματος (Matrigel, BD Biosciences) προστέθηκαν σε τριβλία με 24 θέσεις και το διάλυμα αφέθηκε να πήξει για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 37°C . Στη συνέχεια 160×10^5 ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EAhy926) προστέθηκαν στο εξωκυτταρικό υπόστρωμα μαζί με διάφορες συγκεντρώσεις (20, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) εκχυλίσματος από βόστρυχο της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες και στη συνέχεια έγινε μικροσκοπική παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών. Ο σχηματισμός των σωλήνων ποσοτικοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ το οποίο υπολογίζει το συνολικό μήκος των σχηματιζόμενων σωλήνων. Το κάθε πείραμα έγινε 3 φορές και σε κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε 3 φορές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα αναλύσεων με HPLC

Τα δείγματα των υποπροϊόντων οινοποίησης που μελετήθηκαν συλλέχθηκαν από διάφορα οινοποιεία κατά τις οινοποιητικές περιόδους 2008 έως και 2009. Τα δείγματα -όπως προαναφέρθηκε- ξηράθηκαν σε ατμοσφαιρικό αέρα, σε έναν προστατευμένο χώρο απουσία φωτός μέχρι την ανάλυση τους. Πριν την εκχύλιση ζυγίστηκε ποσότητα 50g από ένα δείγμα, και εκχυλίστηκε σε λουτρό υπερήχων σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που ήδη περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2.

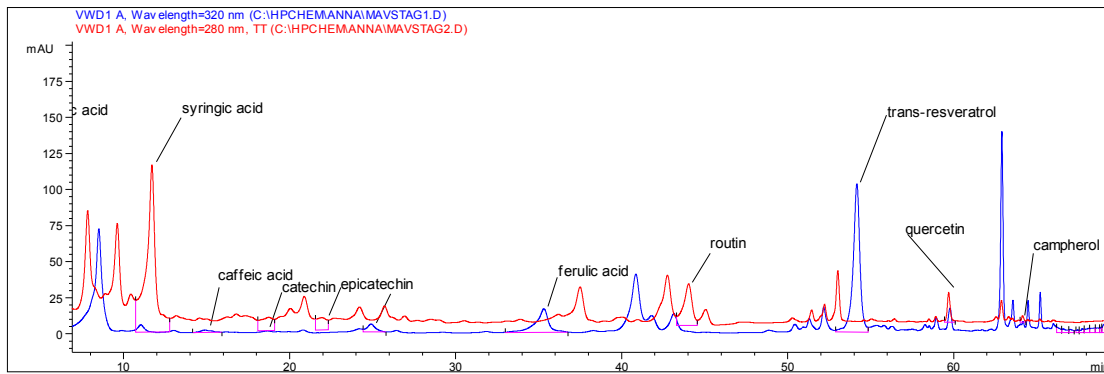
Μετά το τέλος της εκχύλισης το στερεό υπόλειμα ζυγίστηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, διηθήθηκε με φίλτρα σύριγγος PVDF 0,45μm και το περιεχόμενο του ποσοτικοποιήθηκε με HPLC. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/50g ξηρού δείγματος και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα βοστρύχων.

Πίνακας 3.1 Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων

	ΑΣΥΓ	ΑΣΥΒ	ΒΙΝΒ	ΒΟΥΒ	ΜΑΝΒ	ΜΑΥΒ	ΜΟΣΒ	ΞΙΝΒ	ΞΙΝΓ	ΡΟΜΒ	ΡΟΜΓ
Γαλλικό οξύ	2,15	8,38	7,32	42,29	26,96	11,48	14,82	7,39	7,08	24,57	1,52
Συριγγικό οξύ	0,00	0,80	0,80	2,85	13,60	17,44	32,23	15,98	11,56	12,94	1,15
Καφεϊκό οξύ	0,00	0,31	0,42	1,78	2,32	0,54	0,58	0,64	0,00	0,00	0,24
Κατεχίνη	0,00	7,35	4,74	9,10	12,49	12,18	9,33	8,49	13,75	7,06	2,37
Επικατεχίνη	0,00	15,23	4,74	4,51	9,83	19,13	13,32	6,63	28,31	7,00	0,00
π-κουμαρικό οξύ	0,00	0,41	0,90	1,55	1,31	0,75	0,93	0,60	0,00	0,00	0,00
Φερουλικό οξύ	0,00	0,31	2,55	0,59	4,10	3,59	0,51	0,97	0,52	11,68	0,28
Ρουτίνη	0,00	16,00	1,92	4,47	12,06	15,93	41,83	14,81	0,00	24,89	0,82
trans-ρεσβερατρόλη	0,44	2,15	7,78	25,41	21,43	9,09	15,32	5,97	0,43	4,51	0,33
Κερκετίνη	0,00	7,54	4,63	10,24	17,33	3,94	8,21	8,01	0,00	18,53	0,00
Καμφερόλη	0,00	1,04	0,84	4,08	3,63	0,74	0,67	1,83	0,00	2,93	0,00

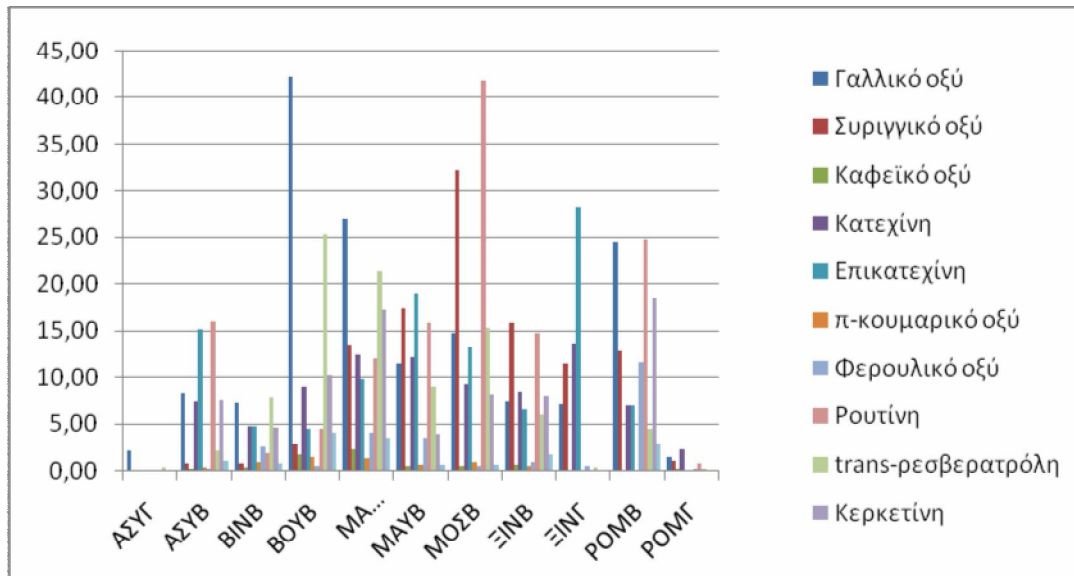
Σε αντίθεση με την πληθώρα εργασιών που έχουν εκπονηθεί για την φαινολική σύσταση των οίνων και των σταφυλιών, οι βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με την σύσταση των υποπροϊόντων οινοποίησης είναι περιορισμένες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Εικόνα 3.1 Χρωματογράφημα βόστρυχων ποικιλίας μαυροτράγανου.

Σε γενικές γραμμές στους βόστρυχους ανιχνεύθηκαν πολυφαινόλες ποιοτικά σχέδον αντίστοιχες με αυτές των γιγάρτων, αλλά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες.



Σχήμα 3.1 Σύγκριση φαινολικής σύστασης δειγμάτων

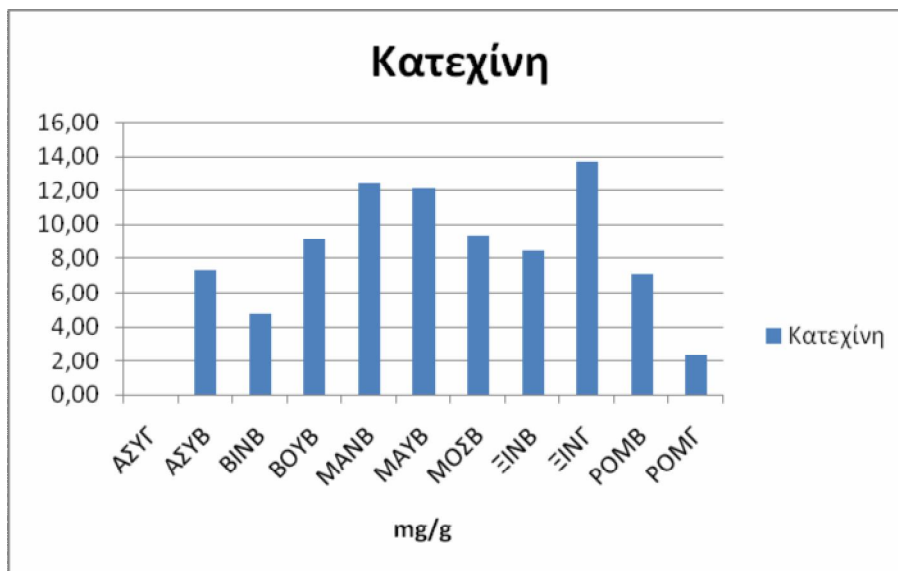
Οι κυριότερες πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν ανήκουν στις παρακάτω κατηγορίες (Σχήμα 3.1):

Φλαβανόλες:

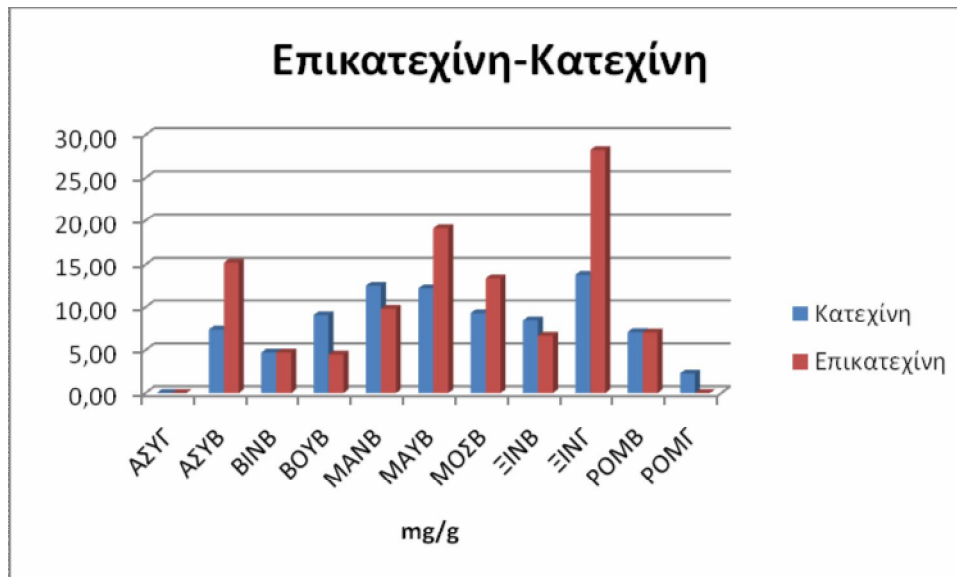
Η παρουσία της κατεχίνης και του ισομερούς της, επικατεχίνη πιστοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις από 2,37-13,75 mg/g (Σχήμα 3.2) και 4,51-28,31 mg/g αντίστοιχα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των μορίων αυτών καταγράφηκαν σε γίγαρτα της ποικιλίας Ξινόμαυρο, ενώ όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3 η επικατεχίνη στα περισσότερα εκχυλίσματα υπερέχει ποσοτικά της κατεχίνης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντίθετα, σε προηγούμενη μελέτη οι Souquet και συνεργάτες, κατά την ανάλυση βοστρύχων της ποικιλία Merlot, ανίχνευσαν την παρουσία της επικατεχίνης μόνο σε ίχνη και της κατεχίνης σε πολύ μικρή ποσότητα.⁹⁸



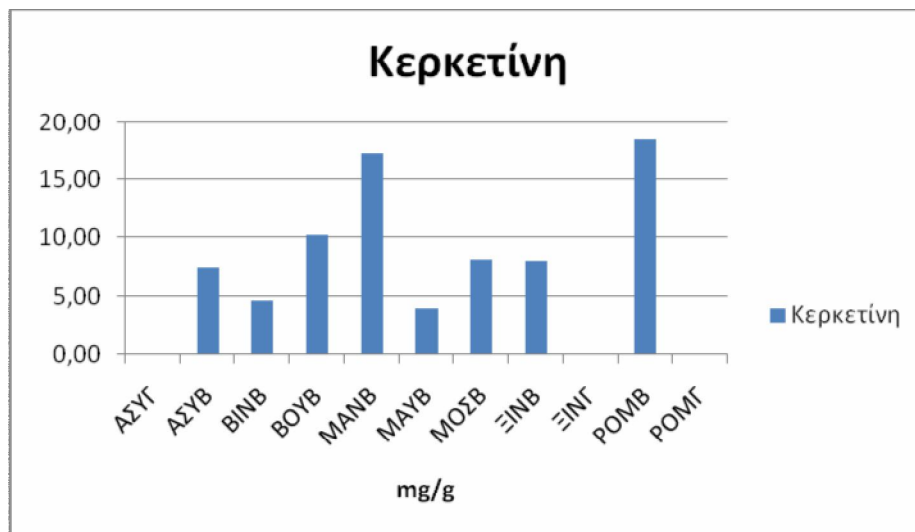
Σχήμα 3.2 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση κατεχίνης



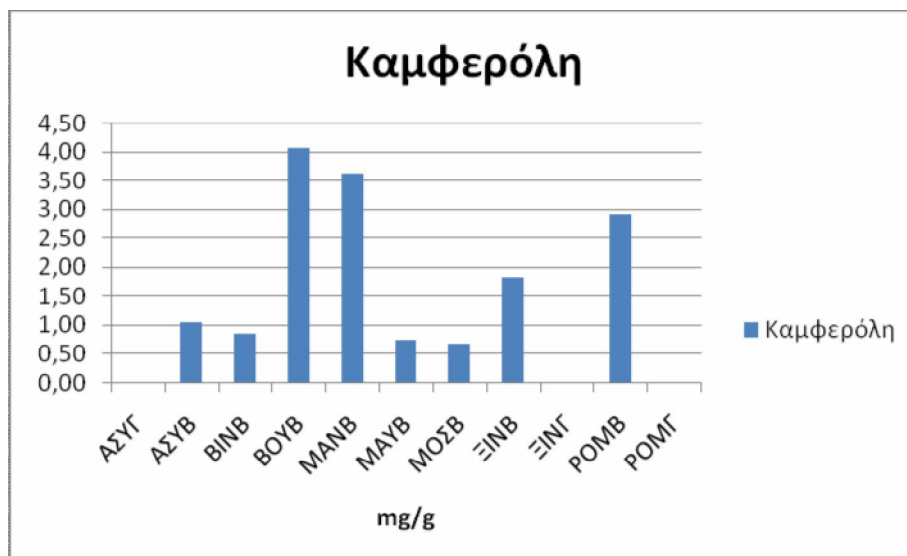
Σχήμα 3.3 Σύγκριση σύστασης κατεχίνης-επικατεχίνης στα δείγματα

Φλαβονόλες:

Οι βόστρυχοι και τα γίγαρτα βρέθηκε ότι περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονολών, τόσο υπό τη μορφή άγλυκων, όπως η κερκετίνη (Σχήμα 3.4) και η καμφερόλη (Σχήμα 3.5), όσο και με τη μορφή των γλυκοζιτών τους. Το μόριο της κερκετίνης ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις από 3,94-18,53 mg/g και της καμφερόλης από 0,74-4,08 mg/g.



Σχήμα 3.4 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση κερκετίνης



Σχήμα 3.5 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση καμφερόλης

Όπως φαίνεται και στα σχήματα 3.4 και 3.5, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κερκετίνης και καμφερόλης παρατηρήθηκαν στις ποικιλίες Ρομπόλα, Μανδηλαριά

και Βοϋδόματο, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις ποικιλίες Μαυροτράγανο και Βινσάντο. Είναι όμως χαρακτηριστικό ότι οι δύο αυτές φλαβονόλες δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου σε κανένα δείγμα από τα γίγαρτα. Σε όλους τους προσδιορισμούς της διατριβής, η παρουσία της κερκετίνης ήταν πάντοτε σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με την καμφερόλη. Η παρατήρηση αυτή είναι σε αντιστοιχία με τη σύσταση που συναντάται στους οίνους.⁹⁹

Γενικότερα οι συγκεντρώσεις των φλαβονολών παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις ως αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η βιοσύνθεση τους έχει αποδειχθεί ότι επάγεται από την ηλιακή ακτινοβολία. Έτσι τα αμπέλια που είναι άμεσα εκτεθειμένα στον ήλιο παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονολών.¹⁰⁰

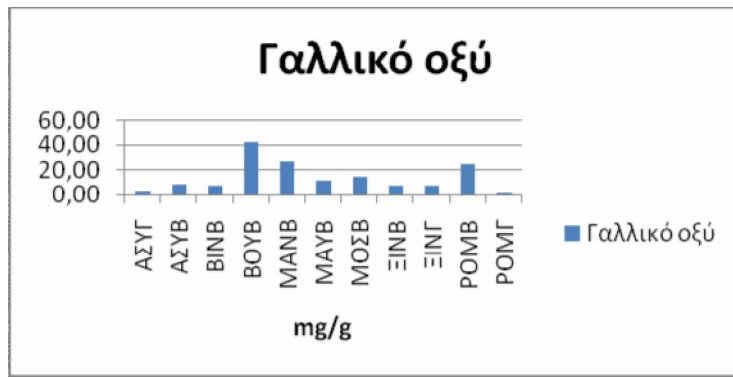
Φαινολικά οξέα:

Από τα υδοξυβενζοϊκά οξέα ανιχνεύθηκαν το γαλλικό και το συριγγικό, ενώ από τα υδροξυκιναμμωμικά οξέα ανιχνεύθηκαν το καφεϊκό (Σχήμα 3.8), π-κουμαρικό (Σχήμα 3.9) και φερουλικό (Σχήμα 3.10).

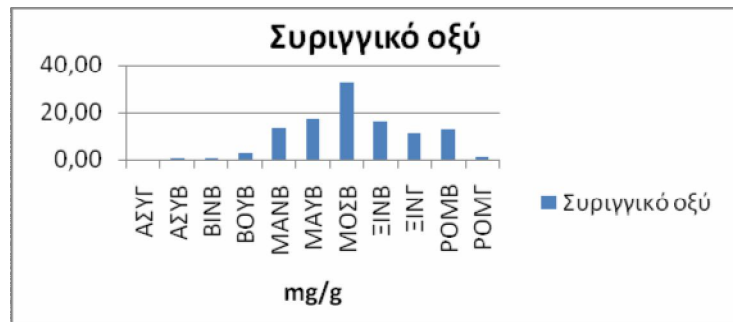
Το γαλλικό και το συριγγικό οξύ ανιχνεύθηκαν σε σημαντικά μεγάλες συγκεντρώσεις σε τιμές που κυμάνθηκαν από 1,52-42,29 mg/g και 0,80-32,23 mg/g αντίστοιχα. Το γαλλικό οξύ βρέθηκε σε ιδιαίτερα μεγάλες συγκεντρώσεις στις ποικιλίες Βοϋδόματο, Μανδηλαριά και Ρομπόλα ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις του παρατηρήθηκαν στα γίγαρτα των ποικιλιών Ρομπόλα και Ασύρτικο (Σχήμα 3.6). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.7 στο συριγγικό οξύ είναι ιδιαίτερα αυξημένο στη ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου και τις ακολουθούν οι ποικιλίες Μαυροτράγανο και Ξινόμαυρο, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις του ανιχνεύθηκαν στις ποικιλίες Ασύρτικο και Βινσάντο.

Τα υδροξυκιναμμωμικά οξέα, καφεϊκό και π-κουμαρικό βρέθηκαν σε μικρές ποσότητες (0,24-2,32 mg/g), ενώ το δεύτερο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στα γίγαρτα. Αντίθετα, το φερουλικό οξύ ανιχνεύθηκε σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις (0,28-11,68 mg/g) στις ποικιλίες Ρομπόλα, Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο.

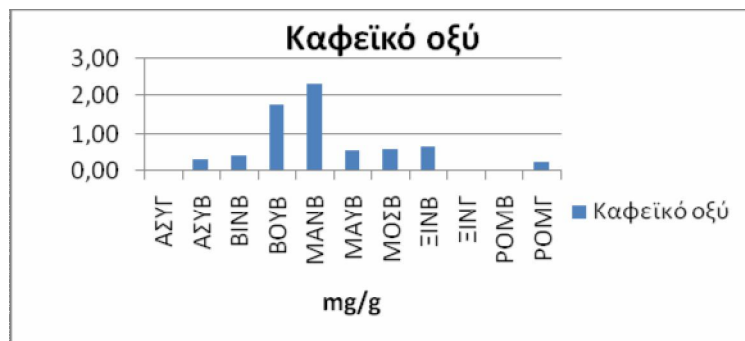
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



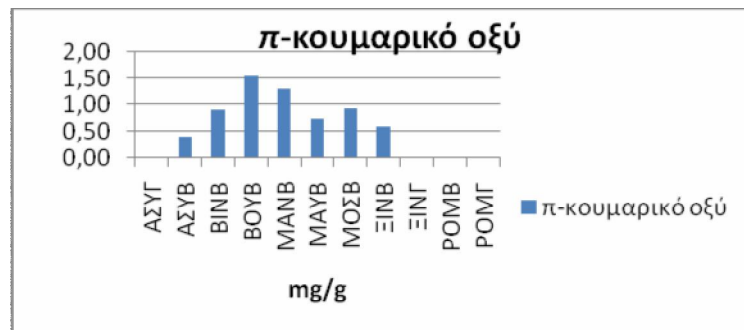
Σχήμα 3.6 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση γαλλικού οξέος



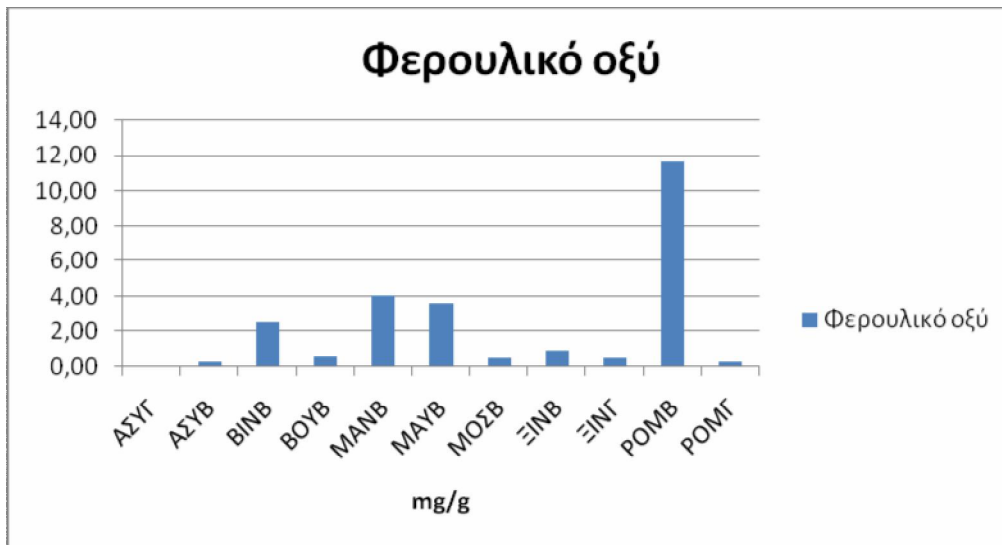
Σχήμα 3.7 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση συριγγικού οξέος



Σχήμα 3.8 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση καφεϊκού οξέος



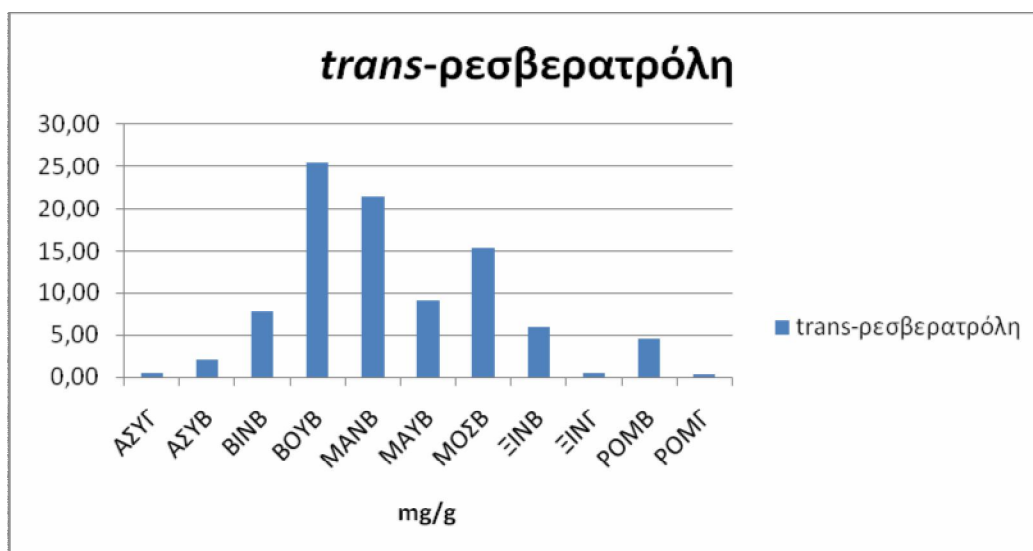
Σχήμα 3.9 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση συριγγικού οξέος



Σχήμα 3.10 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση φερουλικού οξέος

Στιλβένια:

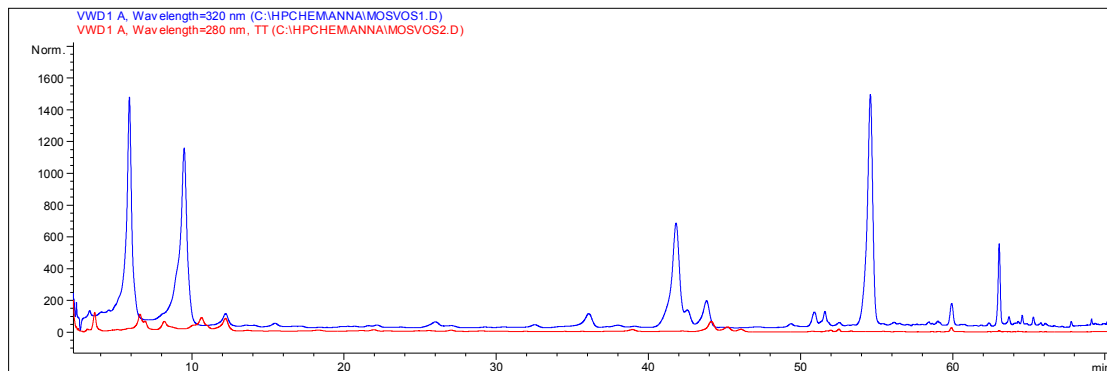
Από τα στιλβένια είναι χαρακτηριστικό ότι ανιχνεύθηκε σε μεγάλες ποσότητες το μόριο της *trans*-ρεσβερατρόλης. Οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 0,33-25,41 mg/g και οι μικρότερες τιμές αντιστοιχούν στα γίγαρτα και ιδιαίτερα στις ποικιλίες Ρομπόλα και Ασύρτικο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παταρτηρήθηκε στη ποικιλία Βοϋδόματο. Ακολουθούν οι ποικιλίες Μανδηλαριά και Ρομπόλα (σχήμα 3.11). Ιδιαίτερα σημαντικό λόγω της μεγάλης βιοδραστηκότητας της *trans*-ρεσβερατρόλης και της υψηλής προστιθέμενης αξίας του χαρακτηριστικό είναι ότι η τιμή του αγγίζει τα 108 ευρώ τα 100 mg.



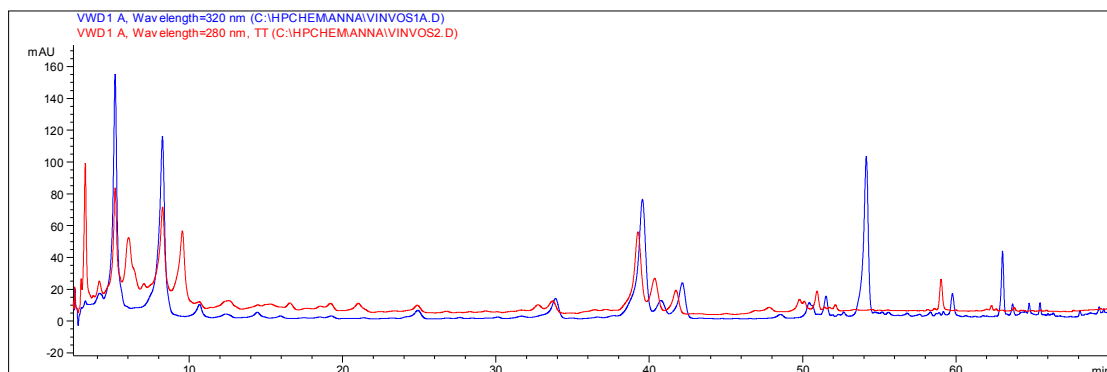
Σχήμα 3.11 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση *trans*-ρεσβερατρόλης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ως φυτοαλεξίνη, η βιοσύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι γνωστό ότι εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η χαμηλή της συγκέντρωση στα σταφύλια, μπορεί να οφείλεται και στο σχηματισμό γλυκοζιτών της κατά αντιστοιχία με τους γλυκοζίτες των φλαβονολών. Πράγματι οι γλυκοζίτες της *trans*- και *cis*-ρεσβερατρόλης (*trans*- και *cis*-πικεΐδης) έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί από το φλοιό και τους βόστρυχους σταφυλιών.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Οι Roldan και συνεργάτες,¹⁰⁸ βρήκαν ότι σε υγιή σταφύλια η συγκέντρωση των γλυκοζιτών της ρεσβερατρόλης είναι δεκαπλάσια σε σχέση με την ελεύθερη της μορφή. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές η συγκέντρωση των γλυκοσιλιωμένων και των ελεύθερων μορφών της ρεσβερατρόλης αύξανε τη σημαντικά ανάλογα με το βαθμό προσβολής τους από βοτρυτή (*botrytis cinerea*).



Εικόνα 3.2 Χρωματογράφημα βόστρυχων ποικιλίας Μοσχάτου Αμβούργου.



Εικόνα 3.3 Χρωματογράφημα βόστρυχων ποικιλίας Βινσάντου.

Στις Εικόνες 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των βόστρυχων των ποικιλιών Μοσχάτο Αμβούργου και Βινσάντο. Ο χρόνος έκλουσης της *trans*-ρεσβερατρόλης ήταν στα 53.8 min και η παρουσία της πιστοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα. Στα 44.1 min ανιχνεύθηκε η ρουτίνη και στα 59.6 min η κερκετίνη.

3.2 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο

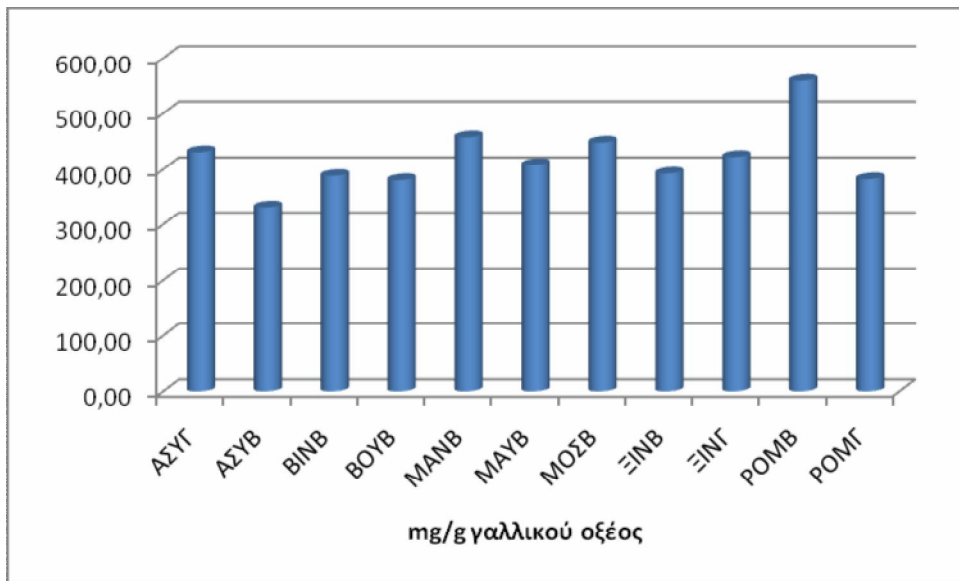
Στη διατριβή αυτή μελετήθηκαν προϊόντα-υποπροϊόντα από 8 ποικιλίες αμπέλου, στα εκχυλίσματα των οποίων οι εμπεριεχόμενες πολυφαινόλες προσδιορίστηκαν. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για των ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ήταν των Folin-Ciocalteu, ενώ για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μια παραλλαγή της μεθόδου του Gunes και συνεργατών.⁹²

Παρακάτω παραντίθεται ο Πίνακας 3.2 με τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και συγκριτικά σχήματα. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών και την κατεχίνη για τα ολικά φλαβονοειδή (Κεφάλαιο 2). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg γαλλικού οξέος και κατεχίνης ανα g ξηρού δείγματος αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2

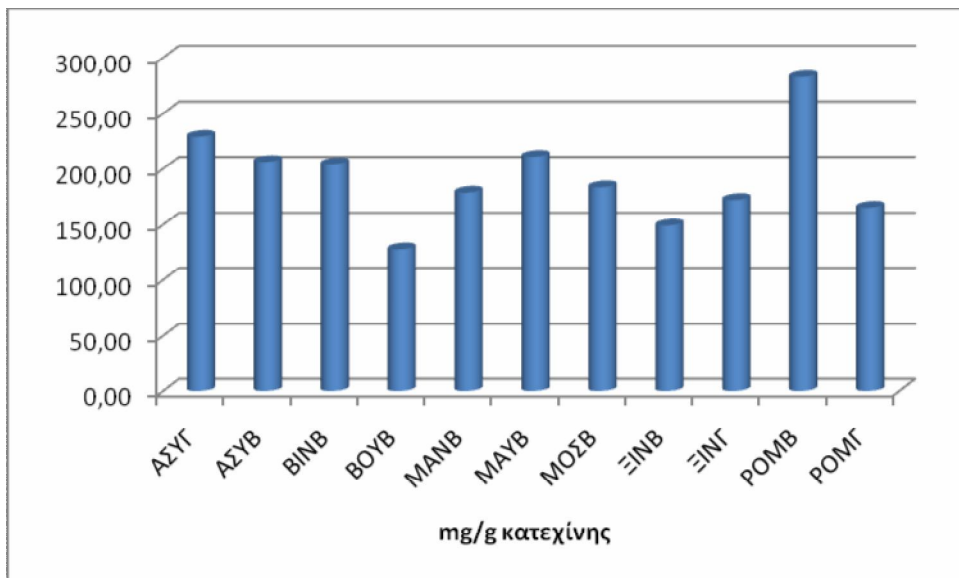
Δείγμα	Ολικά Φαινολικά (mg/g γαλλικού οξέος)	Ολικά Φλαβονοειδή (mg/g κατεχίνης)
ΑΣΥΓ	430,69±0,08	229,02±0,14
ΑΣΥΒ	331,03±0,11	206,20±0,09
BINB	388,10±0,16	204,19±0,09
ΒΟΥΒ	380,43±0,04	127,71±0,06
ΜΑΝΒ	457,10±0,16	178,61±0,08
ΜΑΥΒ	407,69±0,012	210,96±0,12
ΜΟΣΒ	447,73±0,09	183,38±0,08
ΞΙΝΒ	392,36±0,12	149,28±0,07
ΞΙΝΓ	422,17±0,14	172,09±0,08
POMB	559,32±0,14	282,68±0,12
POMΓ	382,14±0,116	165,32±0,08

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.12 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση ολικών φαινολικών.

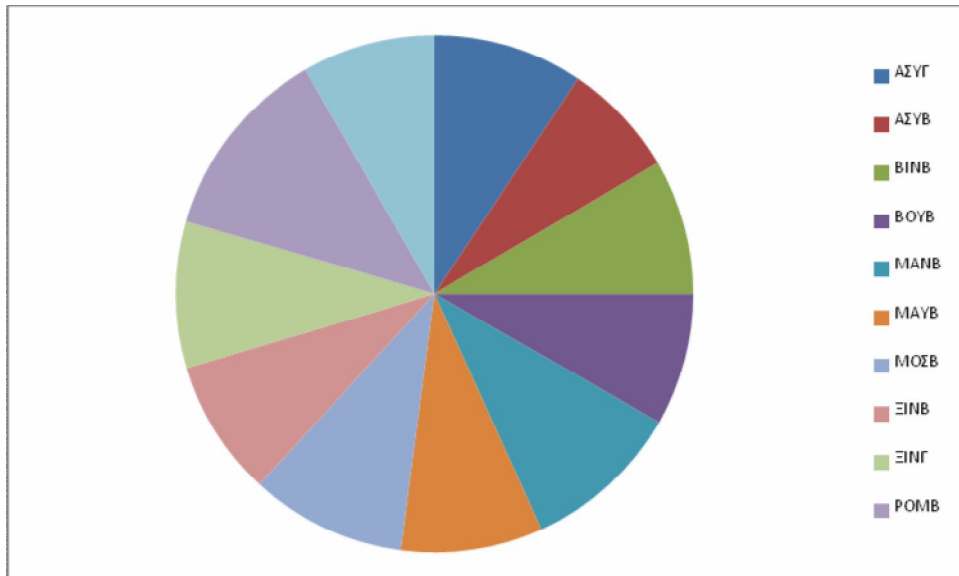
Με βάση τον παραπάνω Πίνακα 3.2 και το Σχήμα 3.12 παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα με πλουσιότερο περιεχόμενο ολικών φαινολικών είναι οι βόστρυχοι των ποικιλιών Ρομπόλα, Μανδηλαριά και Μοσχάτο Αμβούργου ενώ τα γίγαρτα της



Σχήμα 3.13 Απεικόνιση δειγμάτων σε συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών.

ποικιλία Ασύρτικο είναι περισσότερο πλούσια σε σύγκριση με τους αντίστοιχους βόστρυχους. Το εύρος των συγκεντρώσεων σε ολικά φαινολικά ήταν από 331,03-559,32 mg/g γαλλικού οξέος και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στις ποικιλίες Βοϋδόματο και Ασύρτικο. Γενικά δεν υπήρχαν σημαντικές

διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των ολικών περιεχομένων δειγμάτων όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.14.

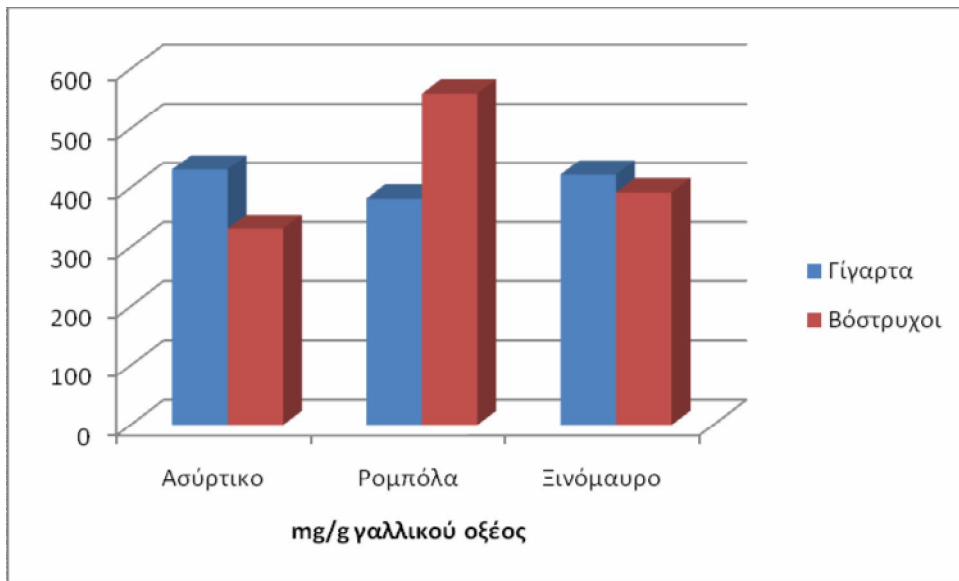


Σχήμα 3.14 Κατανομή δειγμάτων με βάση το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

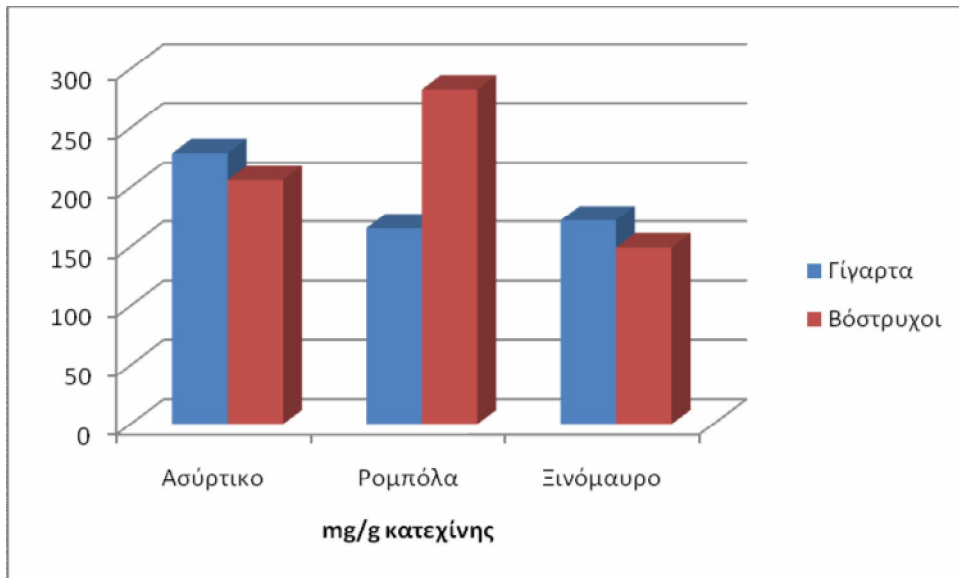
Από τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των ολικών флаβονοειδών, φαίνεται ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στις ποικιλίες Ρομπόλα, Ασύρτικο, Βινσάντο και Μαυροτράγανο (Σχήμα 3.13) για τους βόστρυχους, ενώ πάλι σημαντική ήταν η συγκεντρωση τους στα γίγαρτα της ποικιλίας Ασύρτικο. Το εύρος των συγκεντρώσεων στον προσδιορισμό των ολικών флаβονοειδών κυμάνθηκε από 127,71-282,68 mg/g κατεχίνης, ενώ οι χαμηλότερες τιμές συγκεντρώσεων εντοπίστηκαν στις ποικιλίες Βοϋδόματο και Ξινόμαυρο.

Είναι χαρακτηριστικό ότι στις ποικιλίες Ασύρτικο και Ξινόμαυρο των οποίων αναλύθηκαν οι βόστρυχοι και τα γίγαρτα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν -και στις δύο μεθόδους- στα γίγαρτα. Αντίθετα στην ποικιλία Ρομπόλα οι βόστρυχοι περιείχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών флаβονοειδών από τα γίγαρτα (Σχήμα 3.15). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν από τους Guendez και συνεργάτες¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των πολυφαινολών σε εκχυλίσματα γιγάρτων, ελληνικών ποικιλιών, με απ'ευθείας εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



(A)

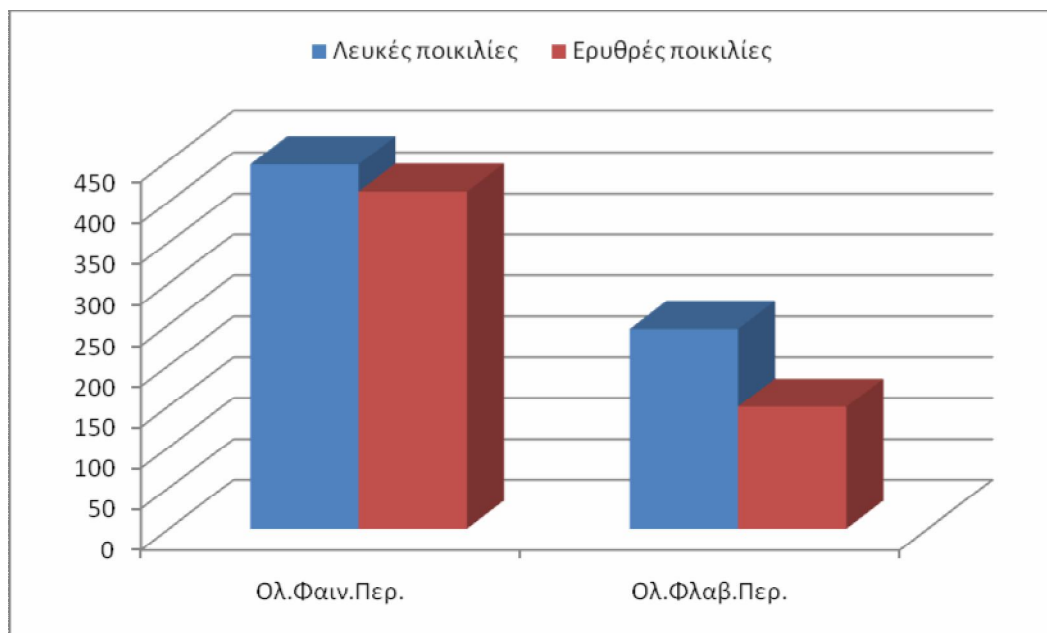


(B)

Σχήμα 3.15 (A) Σύγκριση βόστρυχων-γιγάρτων ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, (B) Σύγκριση βόστρυχων-γιγάρτων ως προς το ολικό φλαβονοειδών περιεχόμενο

Στο Σχήμα 3.16 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων που προσδιορίστηκαν για τις ολικές πολυφαινόλες και για τα ολικά φλαβονοειδή, για ερυθρές και λευκές ποικιλίες σε δείγματα βοστρύχων. Μεταξύ των ερυθρών ποικιλιών το υψηλότερο πολυφαινολικό προφίλ εμφανίζει η ποικιλία Μανδηλαριά και την υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών η ποικιλία Μαυροτράγανο

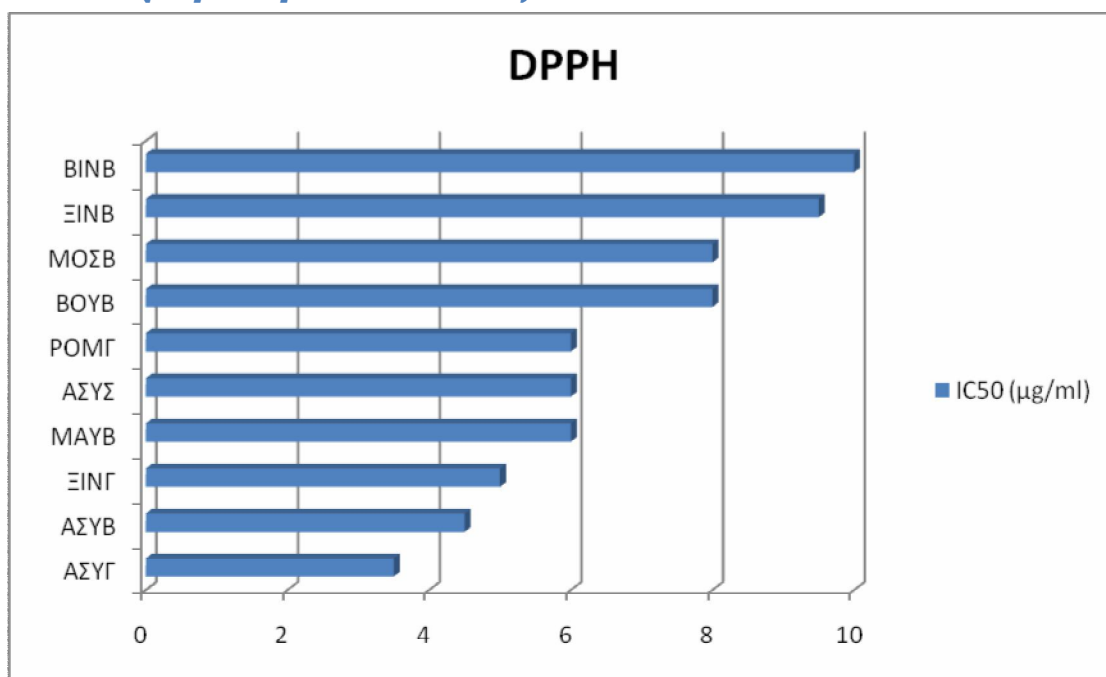
ενώ μεταξύ των λευκών υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή η ποικιλία Ρομπόλα.



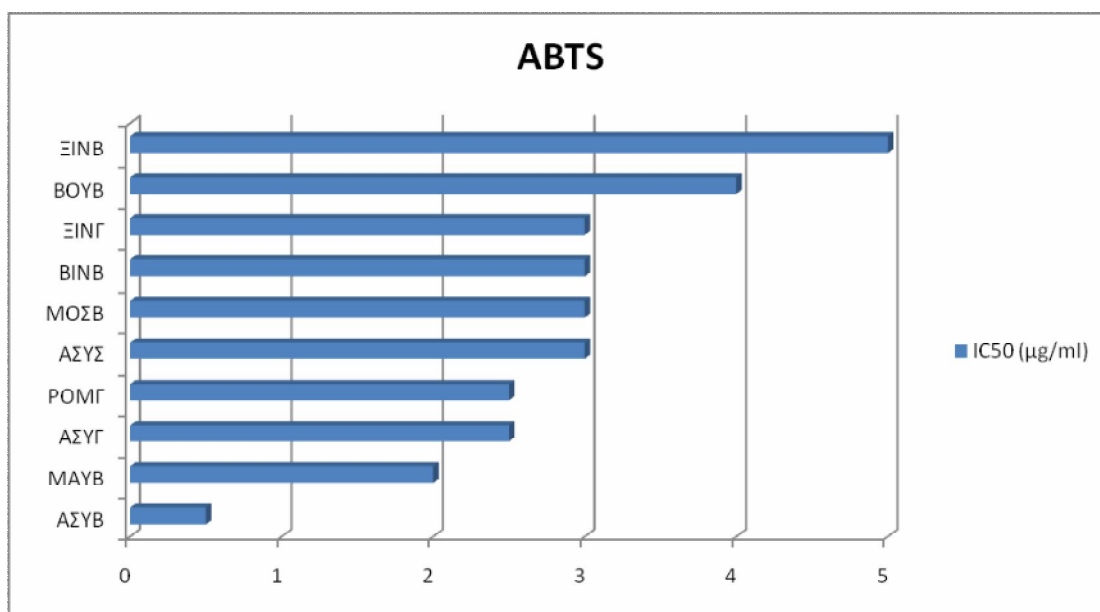
Σχήμα 3.16 Σύγκριση βόστρυχων ερυθρών και λευκών ποικιλιών ως προς το ολικό φαινολικό και το ολικό φλαβονοειδών περιεχόμενο

Αντίστοιχες μελέτες ως προς την πολυφαινολική σύσταση βοστρύχων ελληνικών ποικιλιών είναι ελάχιστες, ενώ δεν υπάρχει καμία ως προς την ολική σύσταση των φλαβονοειδών.

3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων DPPH και ABTS



Σχήμα 3.17 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου έναντι της ρίζας DPPH.



Σχήμα 3.18 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου έναντι της ρίζας ABTS.

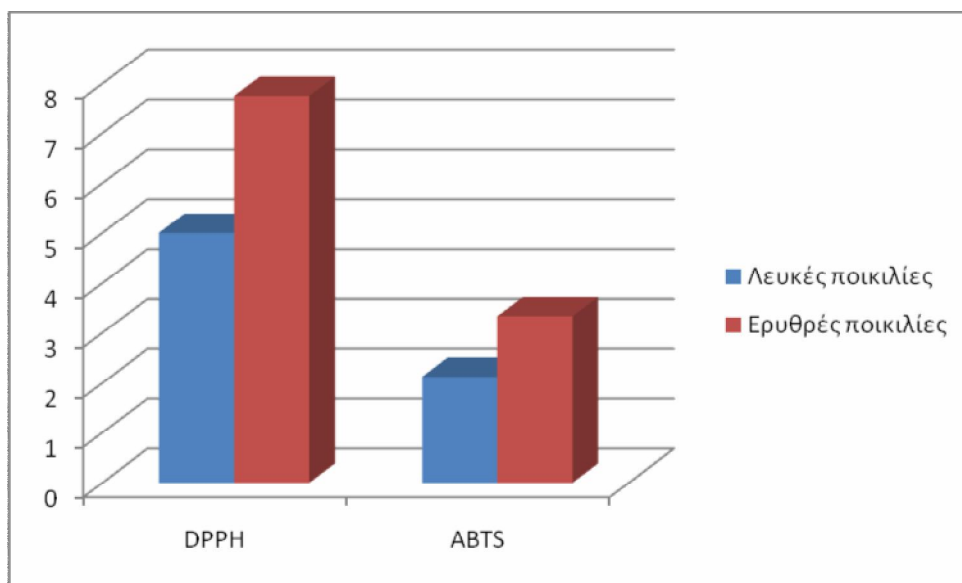
Η σειρά δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι των ριζών DPPH και ABTS παρουσιάζεται στα Σχήματα 3.17 και 3.18. Τα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

εκχυλίσματα των βόστρυχων έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων των γιγάρτων. Και στις δύο μεθόδους την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των εκχυλισμάτων από βόστρυχους είχε η ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης.

Η σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης μεταξύ των εκχυλισμάτων διαφέρει μεταξύ των δύο μεθόδων, το οποίο οφείλεται στη διαφορετική χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Επίσης, αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

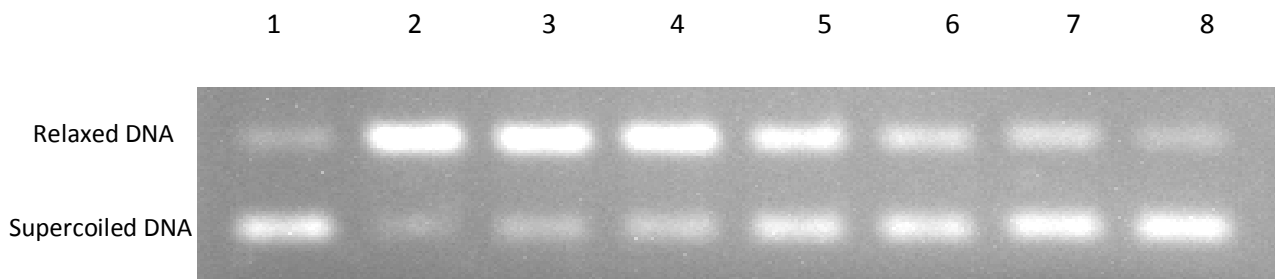
Επομένως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από βόστρυχους σταφυλιών παρουσιάζουν ενδιαφέρον όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και πιθανώς να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση των εκχυλισμάτων από βόστρυχους για την παραγωγή αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί οι βόστρυχοι αποτελούν μη οινοποιήσιμο τμήμα του φυτού το οποίο όταν απορρίπτεται στο περιβάλλον μπορεί να αποτελέσει και πηγή ρύπανσης.



Σχήμα 3.19 Σύγκριση αποτελεσμάτων ερυθρών και λευκών ποικιλιών έναντι στις ρίζες DPPH και ABTS

Στο Σχήμα 3.19 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της αντιοξειδωτικής δράσης για κάθε μέθοδο που εφαρμόστηκε για λευκές και ερυθρές ποικιλίες. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών ποικιλιών είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με αυτή των λευκών με όλες τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν.

3.4 Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)



Εικόνα 3.4 Αντιπροσωπευτική εικόνα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + H₂O₂

Σειρά 3: DNA plasmid + H₂O₂ + 100 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

Σειρά 4: DNA plasmid + H₂O₂ + 200 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

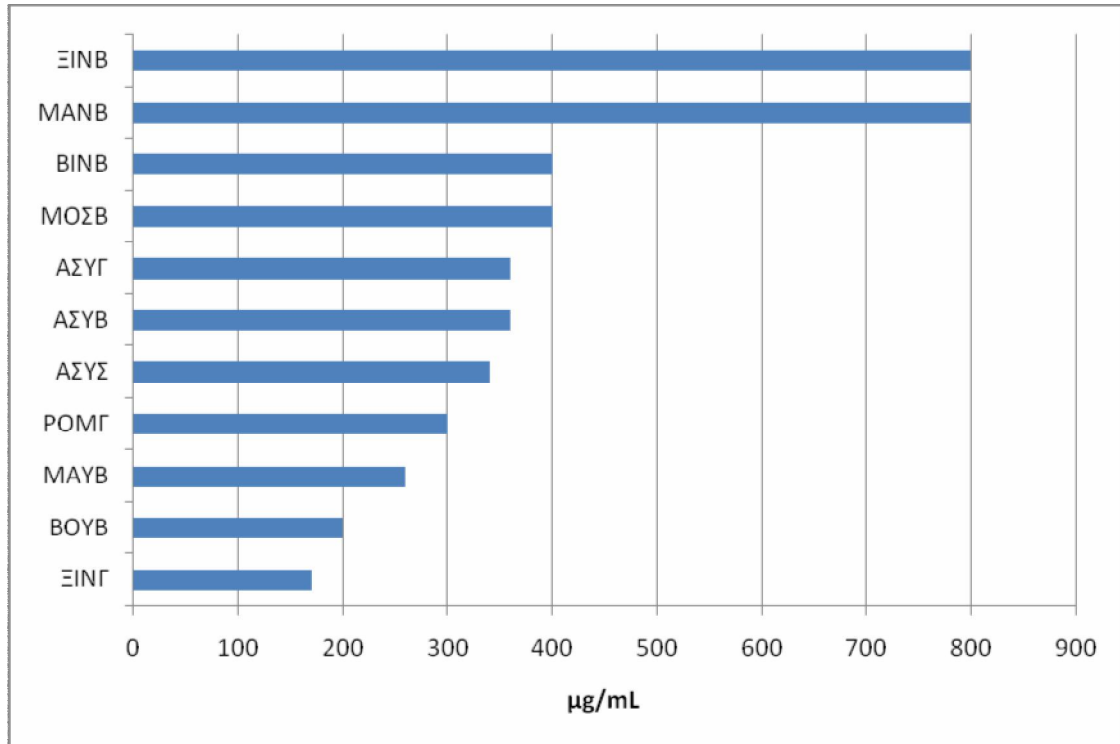
Σειρά 5: DNA plasmid + H₂O₂ + 400 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

Σειρά 6: DNA plasmid + H₂O₂ + 800 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

Σειρά 7: DNA plasmid + H₂O₂ + 1200 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

Σειρά 8: DNA plasmid + 1200 µg/mL εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

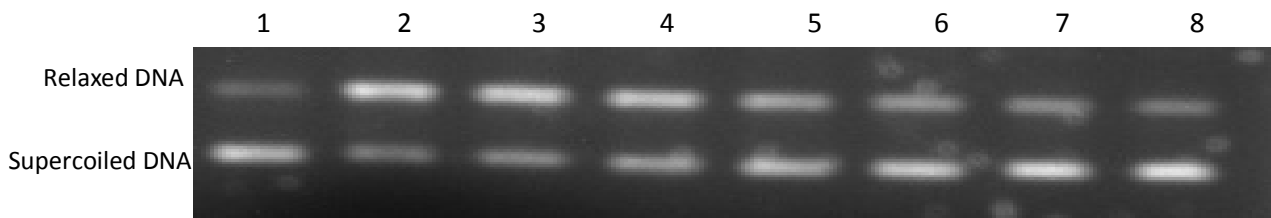


Σχήμα 3.20 Οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου έναντι των επαγόμενων από ρίζες OH[•] ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA

Τα εκχυλίσματα των βοστρύχων έδειξαν ότι έχουν τη ικανότητα να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες OH[•] βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές IC₅₀ από 170-800 μg/ml. Ισχυρότερη δράση είχε το εκχύλισμα γιγάρτων της ποικιλίας Ξινόμαυρο, ενώ από τους βόστρυχους η ποικιλία Βοϋδόματο Σαντορίνης και ασθενέστερη από η ποικιλία Ξινόμαυρο.

Η χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των βοστρύχων έναντι βλαβών που προκαλούνται στο DNA από τις ελεύθερες ρίζες ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων των γιγάρτων.

3.5 Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•)



Εικόνα 3.5 Αντιπροσωπευτική εικόνα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

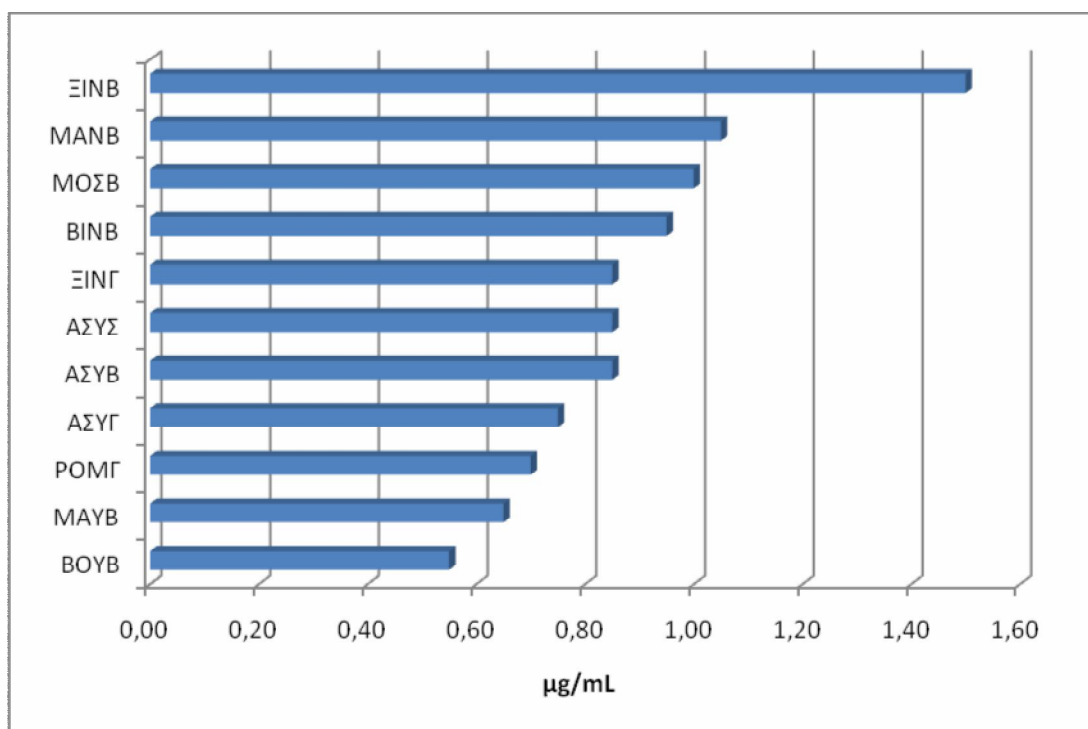
Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 8: DNA plasmid + 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης



Σχήμα 3.21 Οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου έναντι των επαγόμενων από ρίζες ROOH• ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA.

Τα εκχυλίσματα των βοστρύχων έδειξαν ότι αναστέλλουν ισχυρά τις προκαλούμενες από ρίζες ROOH^{*} βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές IC₅₀ από 0,55-1,5 µg/mL. Ισχυρότερη δράση είχαν τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Βουδόματο και ασθενέστερη της ποικιλία Ξινόμαυρο.

Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από ελεύθερες ρίζες ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις παραπλήσια ή και ισχυρότερη από την αντίστοιχη των γιγάρτων.

Σύγκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα με τις ρίζες υδροξυλίου και περοξυλίου

Η σειρά δραστηριότητας των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων έναντι των ριζών υδροξυλίου και περοξυλίου παρουσίαζε ομοιότητες σε μεγάλο βαθμό. Για παράδειγμα και στις δύο μεθόδους ασθενέστερο ήταν το εκχύλισμα από την ποικιλία Ξινόμαυρο.

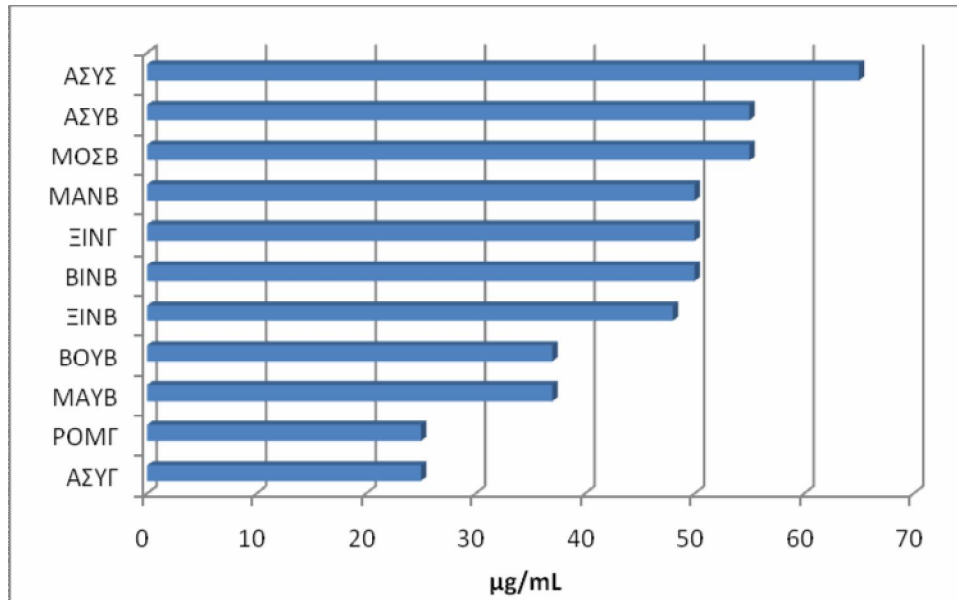
Ωστόσο, παρατηρήθηκαν και διαφορές ανάμεσα στις δύο μεθόδους. Οι κυριότερες αφορούν τα εκχυλίσματα των γιγάρτων των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Ρομπόλα που έδειξαν ισχυρή δράση έναντι των ριζών υδροξυλίου και ασθενή έναντι των ριζών περοξυλίου. Το αντίθετο παρατηρήθηκε με το εκχύλισμα βοστρύχων από Ασύρτικο Σαντορίνης (γίγαρτα).

Οι διαφορές αυτές οφείλονται πιθανώς στην διαφορετική φύση των ριζών περοξυλίου και υδροξυλίου με αποτέλεσμα οι βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτά να παρουσιάζουν διαφορετική δράση έναντι των ριζών. Προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ισχύ της είναι η χημειοπροστατευτική δράση ενός εκχυλίσματος θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων έναντι των βλαβών που προκαλούνται από τις ρίζες OH^{*} στο DNA δείχνει ότι πιθανώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σε παθολογικές

καταστάσεις (π.χ. καρκινογένεση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες) που οφείλονται σε επαγόμενες από ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA.

3.6 Αποτελέσματα μεθόδου ΧΤΤ



Σχήμα 3.22 Οι τιμές IC₅₀ (μg/mL) της αναστολής των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων HepG2.

Τα εκχυλίσματα των βοστρύχων ότι διαθέτουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος με τιμές IC₅₀ από 25-65 μg/ml.

Ισχυρότερη δράση έδειξαν τα εκχυλίσματα των γιγάρτων των ποικιλιών Ασύρτικο και Ρομπόλα, ενώ από τους βόστρυχους οι ποικιλίες Βοϋδόματο και Μαυροτράγανο. Ασθενέστερη δράση είχαν τα στέμφυλα και οι βόστρυχοι από την ποικιλία Ασύρτικο. Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις παραπλήσια ή και ισχυρότερη σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα των γιγάρτων.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων δείχνει ότι πιθανώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες της καρκινογένεσης.

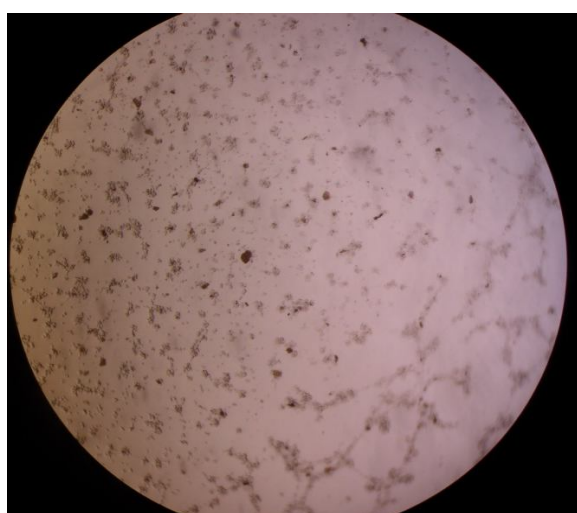
3.7 Αποτελέσματα εκχυλίσματος της ποικιλίας
Ασύρτικου στον σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων



Control



50mg

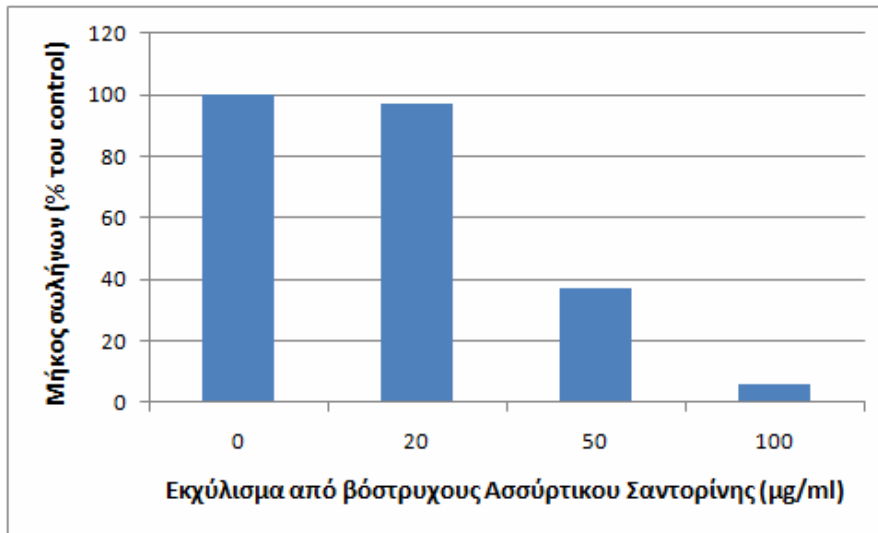


100mg

Εικόνα 3.6 Εκχύλισμα βοστρύχων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνη στην αναστολή σχηματισμού σωλήνων σε ενδοθηλιακά κύτταρα που αναπτύσσονται σε Matrigel. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το σχηματισμό των σωλήνων σε καλλιέργεια μάρτυρα (χωρίς προσθήκη του εκχυλίσματος) και σε καλλιέργειες με 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ του εκχυλίσματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 3.20) φαίνεται το ποσοστό (%) του μήκους των σωλήνων σε σύγκριση με την καλλιέργεια του μάρτυρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα με διάφορες συγκεντρώσεις (20, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) του εκχυλίσματος. Το συνολικό μήκος των σωλήνων μετρήθηκε με το λογισμικό ImageJ.



Σχήμα 3.20 Σύγκριση μάρτυρα με διάφορες συγκεντρώσεις ποικιλίας Ασύρτικου

Το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης ανέστειλε σε συγκεντρώσεις 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ τον σχηματισμό σωλήνων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά περίπου 63% και 95% αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το εκχύλισμα διαθέτει πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση. Η αντι-αγγειογενετική δράση οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στις πολυφαινόλες του εκχυλίσματος όπως η *trans*-ρεσβερατρόλη αφού έχει αποδειχτεί ότι φυτικές πολυφαινόλες έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Θα πρέπει όμως να γίνουν επιπλέον μελέτες για να βρεθεί με ποιο μηχανισμό το εκχύλισμα αναστέλλει τον σχηματισμό των σωλήνων. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εξεταστεί αν το εκχύλισμα μειώνει την έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF ή αν επηρεάζει την έκφραση και την δράση άλλων παραγόντων που είτε προάγουν είτε αναστέλλουν την αγγειογένεση. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους αμπέλου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ιγνατιάδου –Ραγκούση Β. *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*. Εκδ. Συμμετρία, Αθήνα **1998**
2. Sort X. environmental problem of agro-industrial spill, Environmental management, *Electr. J. Environm. Agric. Food Chem.* **2003**, 2 (1).
3. German J. B. The Health Benefits Of Wine. *Ann. Rev. Nutr.* **2000**, 20, 561-593.
4. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, 339, 523-536.
5. Criqui M. H. and Ringel B. L. Does diet or alcohol explain the French paradox?, *Lancet* **1994**, 334, 1719-1723.
6. Gronbaek M. Alcohol, Type of Alcohol, and All-Cause and Coronary Heart Disease Mortality. *Ann. New Yor. Acad. Sci.* **2002**, 957, 16-20.
7. Renaud S. C., Gueguen R., Siest G., Salamon R. Wine, Beer, and Mortality in Middle-aged Men From Eastern France. *Arch. Intern. Ed.* **1999**, 159, 1865-1870.
8. Naczki M. and Shahibi F. Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 95-111.
9. Robards K. and Antonovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. A Review. *Analyst* **1997**, 122, 11R-34R.
10. Harborne J. B. The genetic variation of anthocyanin pigment in plant tissues, Phenolics in Plants In Health and Disease, ed J. B Pridham, *Pergamon Press: Oxford and London* **1960**.
11. Scott-Moncrieff R. The classical period I chemical genetics. *Notes Rec. Royal Soc. London* **1981**, 36 (1), 125-154.
12. Simpson T. J. Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Pathway. *Top. Cur. Chem.* **1998**, 195, 1-48.
13. Dey P.M. and Harborne J.B., Editors. Plant biochemistry , *Academic Press London, U.K.* **1997**.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

14. Strack D. Phenolic Metabolism in : Plant Biochemistry, Ed. Dey P.M. and Harborne J.B. Academic Press, 1st edn, *London and San Diego* **1997**.
15. Kubitzki K. and Gottlieb O.R. Phytochemical aspects of angiosperm origin and evolution. *Acta Botanica Neerlandica* **1984**, 33, 457-468.
16. Kubitzki K. Phenylpropanoid metabolism in reaction to land plant origin and diversification. *J. Plant Phys.* **1987**, 131, 17-24.
17. Bonner C. A. and Jensen R. A. Novel features of prephenate aminotransferase from cell cultures of *Nicotiana glauca*. *Arc. Biochem. Biophys.* **1985**, 238 (1), 237-246.
18. Jung E., Zamir L. O. and Jensen R.A. Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, 83 (19), 7231-7235.
19. Achnine L., Blancaflor E. B., Rasmussen S. and Dixon R. A. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis, *The Plant Cell* **2004**, 16, 3098-3109.
20. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defense-a genomics perspective. *Mol. Plant Path.* **2002**, 3 (5), 371-390.
21. Hrazdina G., T, Zobel A. M., and Hoch H. C. Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8966-8970.
22. Hahlbrock K. and Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, 40, 347-369.
23. Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126, 485-493.
24. Bohm, B. A. introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers **1998**.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

25. Merken, H. M., & Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577-599.
26. Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (eds.). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.)*. London: Taylor & Francis **1999**.
27. H. Grisebach, *Z. Naturforsch. Teil B*, **1957**, *12*, 22.
28. Seigler D. *Flavonoids. Plant Secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts **1998**.
29. Harborne, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry, vol.1 Plant Phenolics*, London: Academic Press **1989**.
30. Burbulis I. E. and Winkel-Shirley B. Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Path Biol.* **1999**, *96 (22)*, 12929-12934.
31. Koes R., Verweij W. and Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10 (5)*, 236-242.
32. Monagas M., Bartolome B. and Gomez-Cordoves C. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 85-118.
33. Langcake P. and Pryce R.J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **1977**, *33*, 151-152.
34. Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **2001**, *411*, 843-847.
35. Langcake P., Cornford C. A. , Pryce R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochem.* **1979**, *18*, 1025-1027.
36. Douillet-Breuil A.C., Jeandet P., Adrian M., Bessis R. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. In response to ultraviolet C elicitation. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47 (10)*, 4456-4461.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

37. Regev-Shoshani G., Shoseyov O., Bilkis I., Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.* **2003**, 374, 157-163.
38. <http://biocyc.org>
39. Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganda G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 20 (7),900-956.
40. Duarte J., Perez- Vizcainom F., Utrilla P., Jimenes J., Tanargo J. and Zarzuelo A. Vasodilatiry effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* **1993a**, 24, 857 - 862.
41. Duarte J., Perez-Vizcainom F., Zarzuelo A., Jimenes J. and Tanargo J. Vasodilatiry effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **1993b**, 239, 1-7.
42. Cody v., Middleton E., Harborne J. B and Beretz A (eds). Plant flavonoids in biology and medicine II-Biological, cellular and medicinal properties, Liss A R., New York **1998**.
43. Nonaka G., Nishioka I., Nishizawa M., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman G. E., Bodner A J., Kilkuskie R. E., Cheng Y.-C. and Lee K-H. Anti-AIDS agents 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cels. *J. Natl. Prod.* **1990**,53, 587 - 595.
44. Nakane H. and Ono K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* **1990**, 29, 2841-2845.
45. Khana M. T .. H., Ather A.,Thompson K. D. and Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses, *Antiv. Res.* **2005**, 67, 107-119.
46. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: Promising AnticancerAgents. *Med. Res. Rev.* **2003**, vol 23, (4), 519-534.
47. Dai Q., Franke A. A., Jin F., Shu X.O., Hebert J. R., Custer L. J., Cheng J., Gao Y.-T., and Zheng W. Urinary Excretion of Phytoestrogens and Risk of Breast Cancer among Chinese Women in Shanghai, *Cancer Epidemiol., Biomark Prevent.* **2002**, 11, 815-821.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

48. Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Hellevoora M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *146*, 223-230.
49. Le Marchand L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 154-160.
50. De Stefani E.D., Boffetta P., Deneo-Pellegrini H., Mendilaharsu M., Carzoglio J.C., Ronco A., Olivera L. Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* **1999**, *34*, 100-110.
51. De Stefani E., Ronco A., Mendilaharsu M., Deneo-Pellegrini H. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-II. Nutrients. *Oral Oncol.* **1999**, *35*, 22-26.
52. Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N., Marui N., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett.* **1990**, *260*, 10-13.
53. Hosokawa N., Hosokawa Y, Sakai T., Yoshida M., Aoike A, Kawai K, Nishino H., Fukushima M. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possible cell-cycle-related 17 kDa protein in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 1119-1124.
54. Pawlikowska-Pawlega B., Jakubowicz-Gil J., Rzymowska J., Gawron A. The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2001**, *39*, 217-218.
55. Kampa M., Hatzoglou A., Notas G., Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P. M., Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* **2000**, *37*, 223-233.
56. Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A, Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P. M., Castanas E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **2000**, *78*, 429-441.
57. Chung L.Y., Cheung T. C., Kong S. K, Fung K P., Choy Y. M., Chan Z. Y., Kwok T. T. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.*, **2001**, *68*, 1207-1214.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

58. Weyant M. J., Carothers A. M., Dannenberg A. J., Bertagnolli M. M. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation, and suppresses focal adhesion kinase activation in the *minI+* mouse. *Cancer Res* **2001**, *61*, 118-125.
59. Uenobe F., Nakamura S-I, Miyazawa M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat. Res.* **1997**, *373*, 197-200.
60. Ciolino H. P., Daschner P. J., Yeh G. C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5707-5712.
61. Kimura Y., Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth, and metastasis to lung, and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr.* **2001**, *131*, 1844-1849.
62. Saeki K., You A., Isemura M., Abe I.I., Seki T., Noguchi H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1391-1394.
63. Li H. C., Yashiki S., Sonoda J., Lou H., Ghosh S. K., Byrnes J. J., Lema C., Fujiyoshi T., Karasuyama M., Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis *in vitro* in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**, *91*, 34-40.
64. Gupta S., Ahmad N., Nieminen A.L., Mukhtar H. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *164*, 82-90.
65. Kuenzig W., Chan J., Norkus E., et al. Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 309-313.
66. Cao Y. , Cao R., Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 380-390.
67. Igura K, Ohta T., Kuroda Y., Kaji K Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* **2001**, *171*, 11-16.
68. Garbisa S., Biggin S., Cavallarin N., Sartor L. Benelli R., Albini A. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1216.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

69. Hertog M. G., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S., Pekkarinen M, Simic B. S., Toshima H., Feskens E.J.M, Hollman P. C. H., Katan M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven country study. *Arch. Int. Medic.* **1995**, 155, 381-386.
70. Parthasarathy S., Santanam N., Auye N. Oxidized low density lipoprotein, a two faced janus in coronary artery disease? *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 279- 284.
71. Hertzuala S. Y. Is oxidized low density lipoprotein present in vivo? *Cur. Opin. Lipidol.* **1998**, 9, 337-344.
72. Rosenbalt M., Belinky P., Vaya J., Levy R., Hayek T., Coleman R., Merchav S., Aviram M. Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin, inhibits NADPH oxidase induced cell mediated oxidation of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13790-13799.
73. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL and Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* **1993**, 265, H774-H778.
74. Cushnie T. P. T. and Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Intern. J. Antimicrob. Agents* **2005**, 26, 343-356.
75. Harborne J. B. and Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* **2000**, 55, 481- 504.
76. Vaquero M. J. R., Alberto M. R. and Manca de Nadra M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **2007**, 8, 93 -101.
77. Vijaya K. and Ananthan S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian J. Pharm. Sci.* **1996**, 58, 191-193.
78. Hu C. Q., Chen K, Shi Q., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K H. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoid. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 42-51.
79. Middleton J. E. and Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, In: Harborne J.B.,

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- editor. The flavonoids: advances in research since 1986. London, UK: Chapman & Hall **1993**.
80. Selway J. W. T. Antiviral activity of flavones and flavans In: Cody V. Middleton E, Harborne J. B., editors. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships. New York, NY: Alan R. Liss, Inc **1986**.
81. Naczki M. and Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1054*, 95 -111.
82. Santos-Buelga C., ed. Methods in polyphenol analysis, Universidad de Salamanca, Spain **2003**.
83. Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 2866-2887.
84. Krygier K., Sosulski F. and Hogge L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 330-334.
85. Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.I., Lazurca D., Mason T.J. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason. Sonochem.* **1997**, *4*, 135-139.
86. Galensa, R., and Herrmann, K Analysis of flavonoids by HPLC. *J. Chromatogr.*, **1980**, *189*, 217.
87. Robards K. and Antonovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, A Review. *Analyst* **1997**, *122*, 11R-34R.
88. Tsao R. and Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1018*, 29-40.
89. Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A-L., Harotounian S., Bioactive non coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts, *Food Research International*, **2010**, *43*, 805-813.
90. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144-158.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

91. Waterhouse A. Folin-Ciocalteu Micro method for Total Phenol in Wine. Department of Viticulture&Enology, University of California, Davis.
92. Gunes G., Liu R. And Watkins B.C. Controlled-Atmosphere Effects on Postharvest Quality and Antioxidant Activity of Cranberry Fruits, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5932-5938 .
93. Prior R. L., Wu X. And Schaich K. Standardized methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem*,**2005**, *53*, 4290-4302.
94. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* **1995** *28*, 25-30.
95. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, **1993**, *84*, 407–412.
96. Wiseman H., Kaur H., Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 113-120.
97. Trosko J.E., Chang C.C., Medcalf A. Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.* **1983**, *6*, 511-526.
98. Souquet J.M., Labarbe B., Le Guerneve C., Cheynier V., Moutounet M. Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1076-1080.
99. Spayd S.E., Tarara J.M., Mee D.L., and Ferguson J.C. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53(3)*, 171-182.
100. Waterhouse A.L and Lamuela-Raventos, R.M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries, *Phytochemistry*, **1994**, *37(2)*, 571-573.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

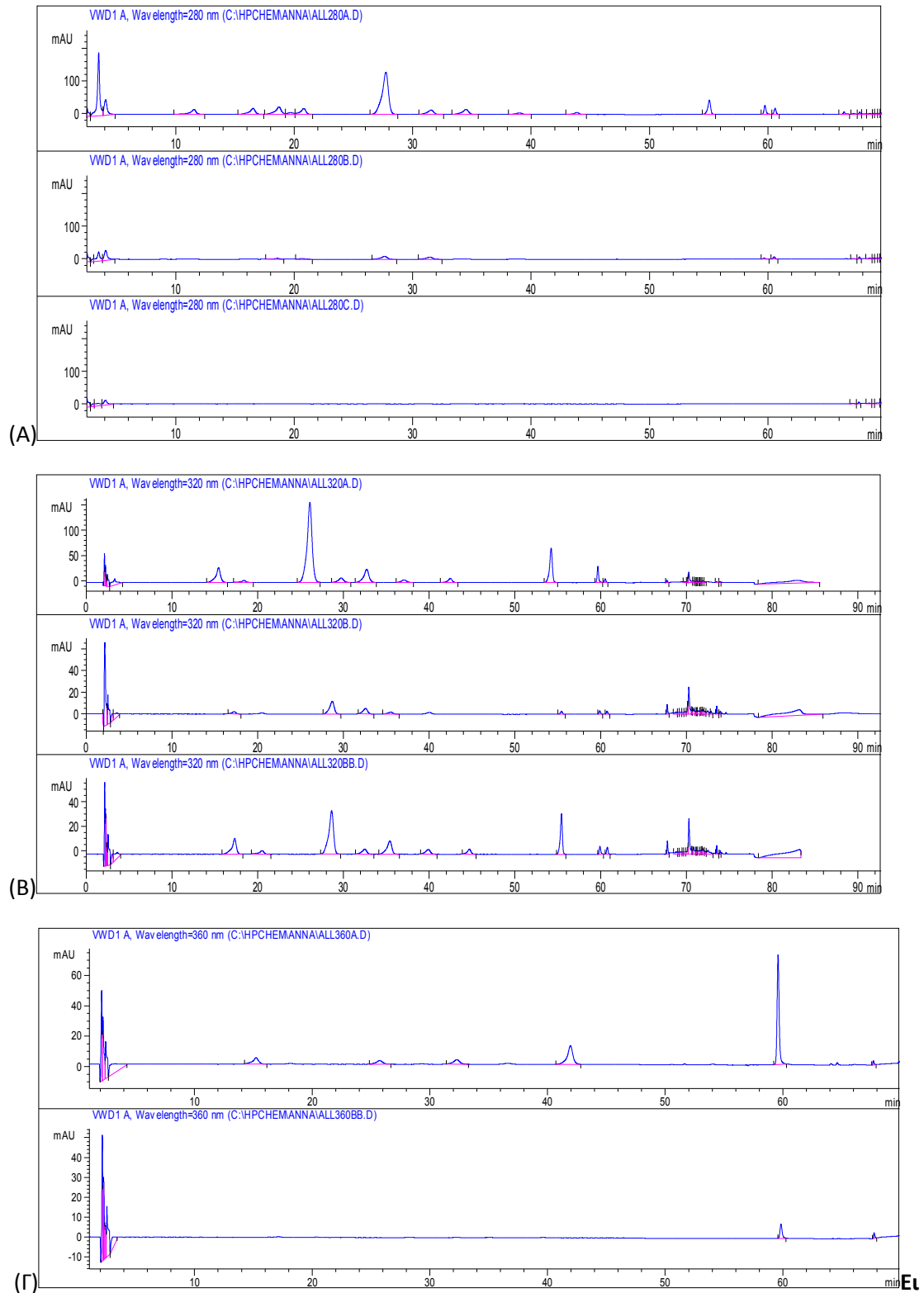
101. Waterhouse A.L and Romero-Perez A.I., Lamuela-Raventos, R.M. Direct HPLC Analysis of cis- and trans- Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red Vitis Vinifera Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 281-283.
102. Delaunay J.-C., Castagnino C., Cheze C., Vercauteren J. Preparative isolation of polyphenolic compounds from Vitis Vinifera by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *964*, 123-128.
103. Cantos E., Garcia-Viguera C., De Pascual-Teresa S., Tomas-Barberan F. A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4606-4612.
104. Roldanan A., Palacios V., Caro I., Perez L. Resveratrol content of Palomino fino grapes influence of vintage and fungal infection. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *52*, 1464-1468.
105. Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P., Kefalas P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis Vinifera sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. *Food Chem.* **2005a**, *89* (1), 1-9.
106. Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P., Kefalas P. an analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis Vinifera*) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals, *Phytochem. Anal.* **2005b**, *16*, 17-23.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DAHP	7-φωσφορο-3-δεοξυ-D-αραβινοεπτουλοσονικό οξύ
FGF-2	Εσωτερική περιοχή εισόδων ριβοσωμάτων
VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
DPPH	2,2-διφαινυλο- 1- πικρυλυδραζύλιο
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
FRAP	Ικανότητα του πλάσματος να ανάγει το Fe (III)
ROS	Ενεργές μορφές Οξυγόνου
ABTS	2,2'- αζινιδινο-3-αιθυλοβενζοθειαζολινικό σουλφονικό άλας
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
AcCN	Ακετονιτρίλιο
RT	Χρόνος Συγκράτησης
UV-VIS	Υπεριώδες- Ορατό
PVDF	πολύ-1,1-διφλωαιθένιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας

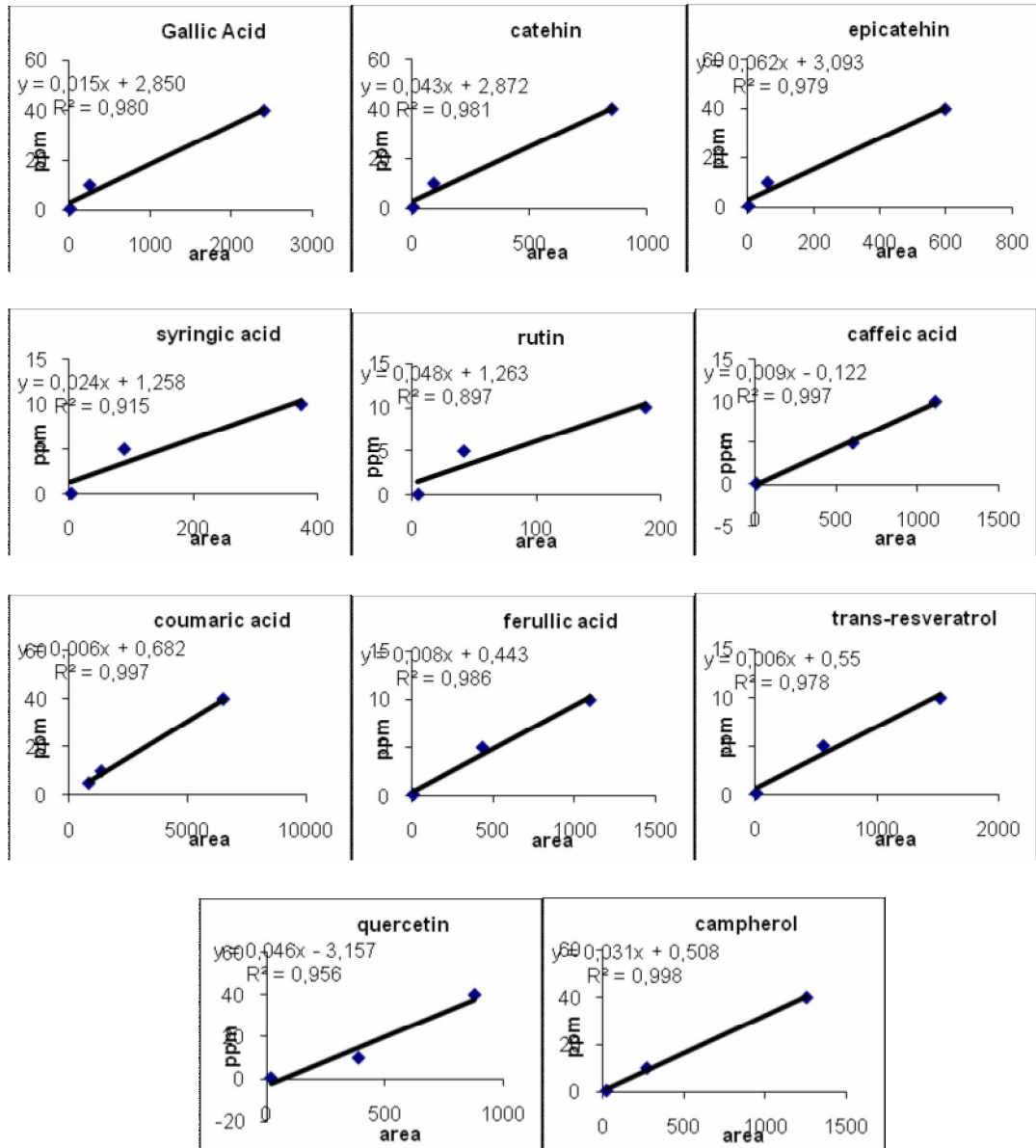
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα Α



Ελ
κόνα 4.1 Χρωματογραφήματα διαλυμάτων παρακαταθήκης σε μήκος κύματος (Α) 280 nm, (Β) 320nm, (Γ) 360nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Εικόνα 4.2 Καμπύλες αναφοράς πρότυπων φαινολών

Παράρτημα Β

Πίνακας 4.1 Απορροφήσεις δειγμάτων (F-C)

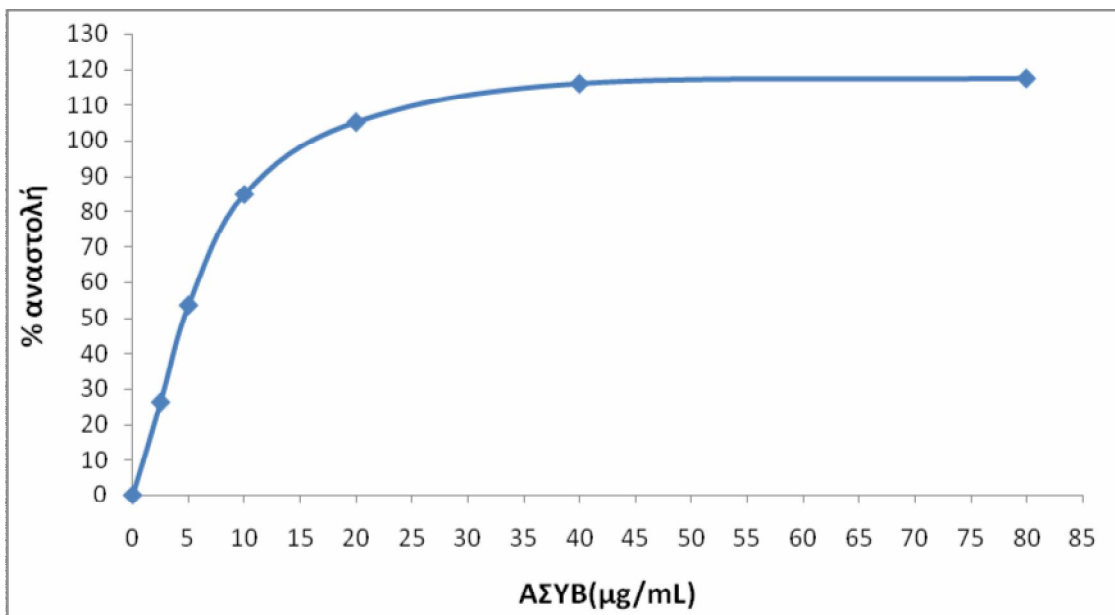
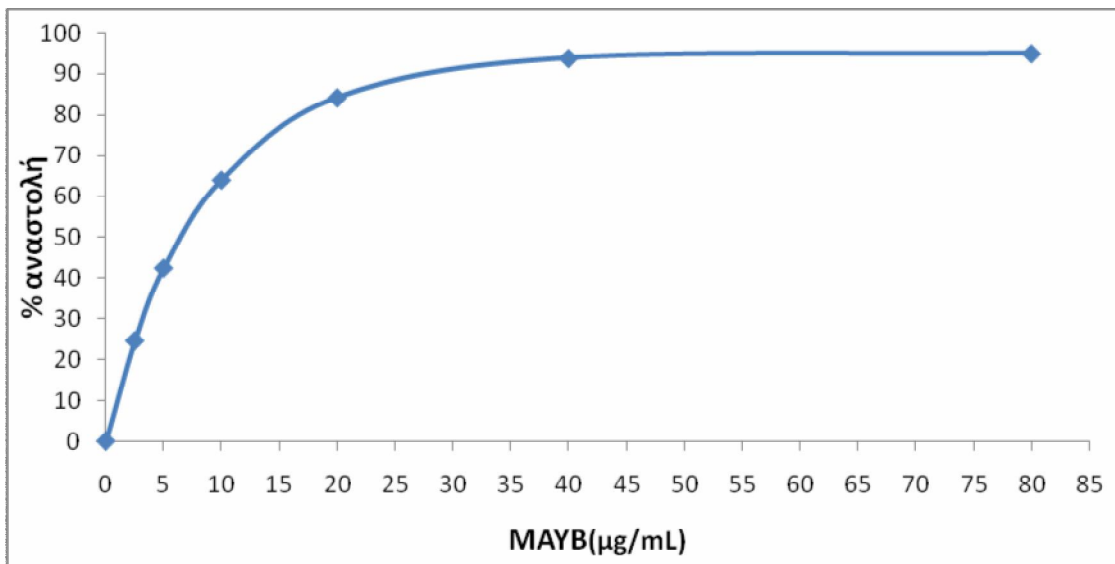
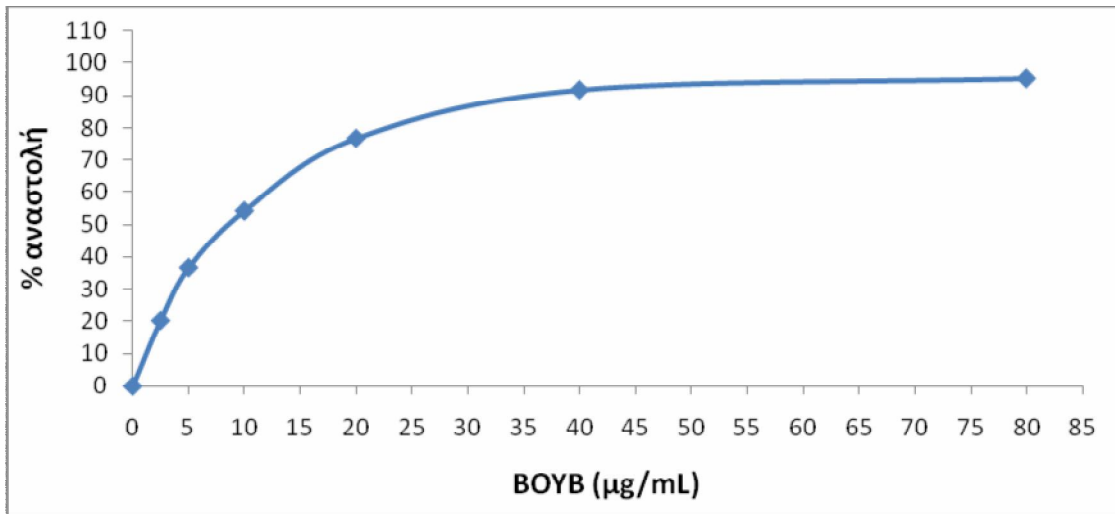
Κ.Δ	Απορρόφηση
ΑΣΥΓ	0,475
ΑΣΥΒ	0,358
ΒΙΝΒ	0,425
ΒΟΥΒ	0,416
ΜΑΝΒ	0,506
ΜΑΥΒ	0,448
ΜΟΣΒ	0,495
ΞΙΝΒ	0,43
ΞΙΝΓ	0,465
ΡΟΜΒ	0,626
ΡΟΜΓ	0,418

Πίνακας 4.2 Απορροφήσεις δειγμάτων (Ολικά φλαβονοειδή)

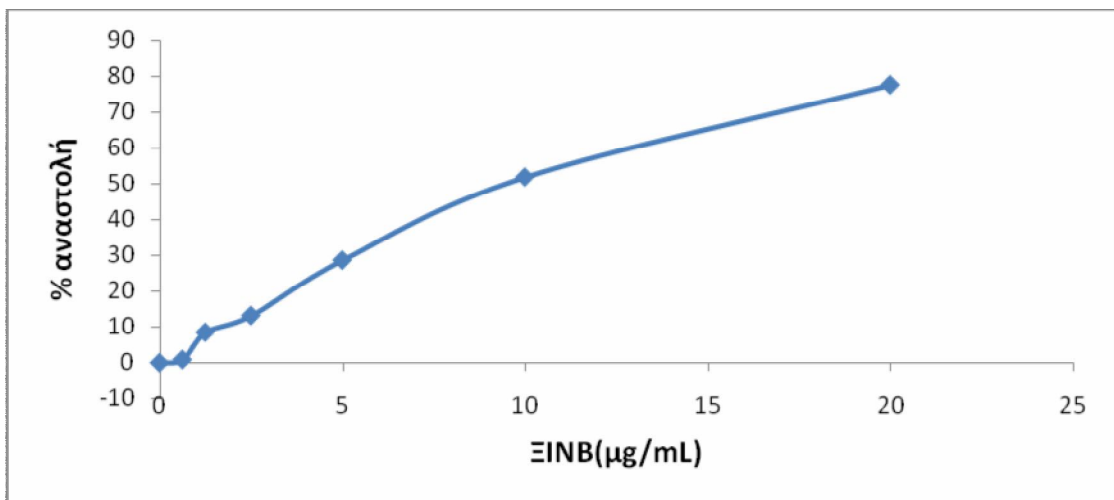
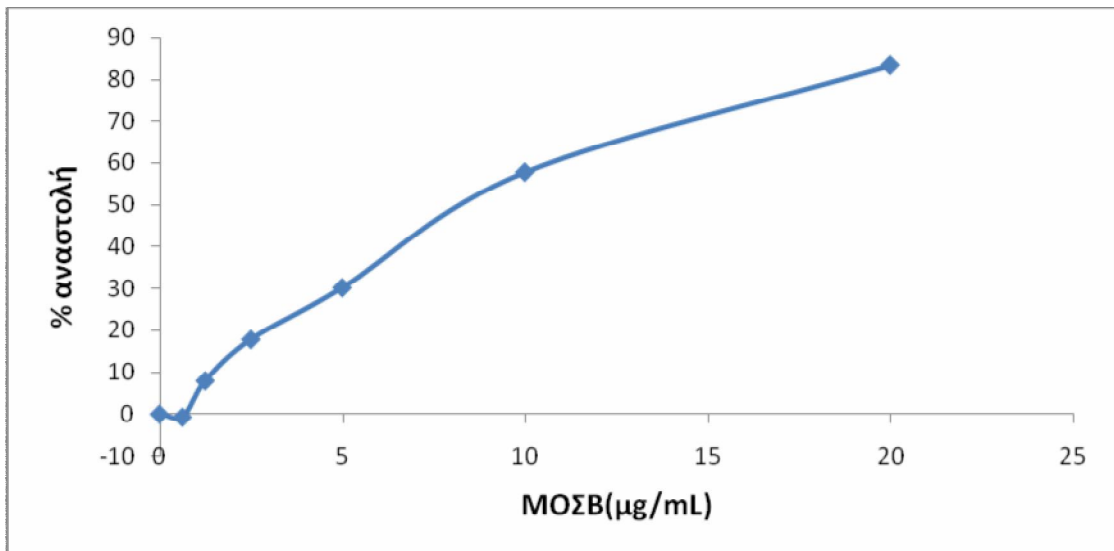
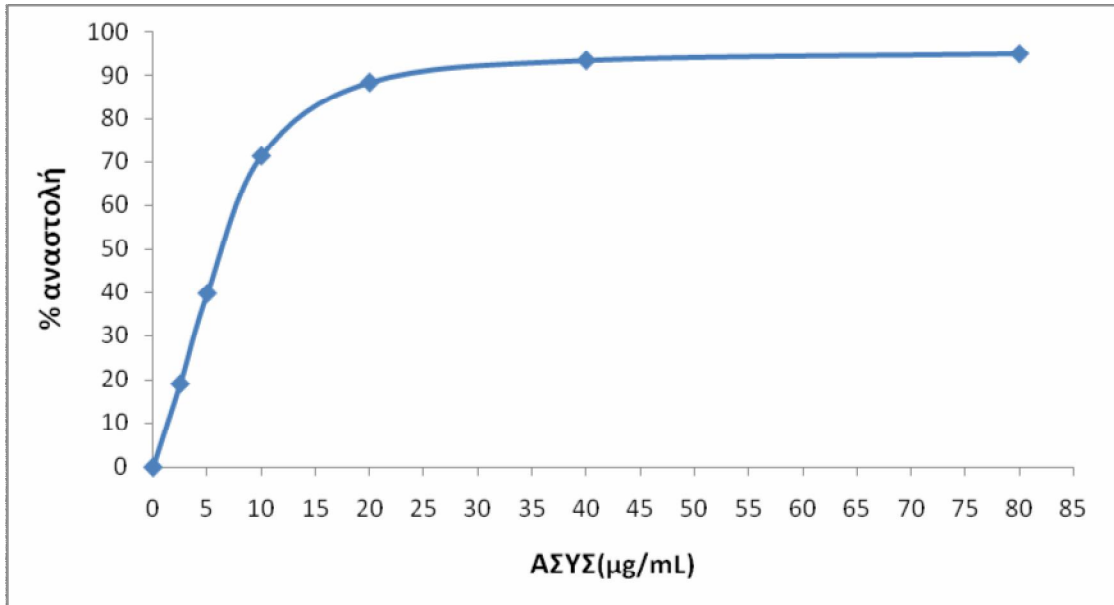
Κ.Δ	Απορρόφηση
ΑΣΥΓ	0,849
ΑΣΥΒ	0,758
ΒΙΝΒ	0,75
ΒΟΥΒ	0,445
ΜΑΝΒ	0,648
ΜΑΥΒ	0,777
ΜΟΣΒ	0,667
ΞΙΝΒ	0,531
ΞΙΝΓ	0,622
ΡΟΜΒ	1,063
ΡΟΜΓ	0,595

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

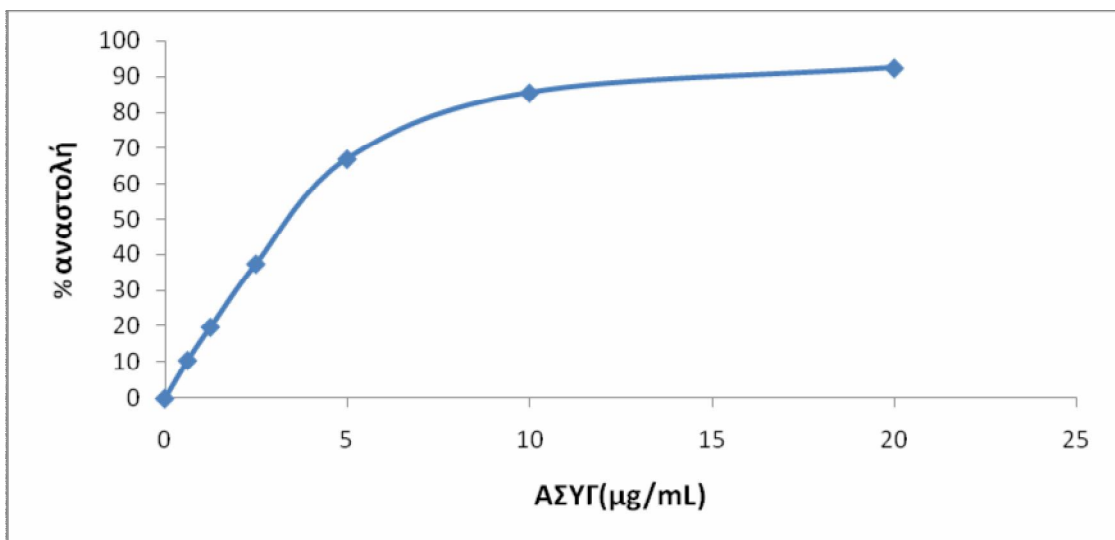
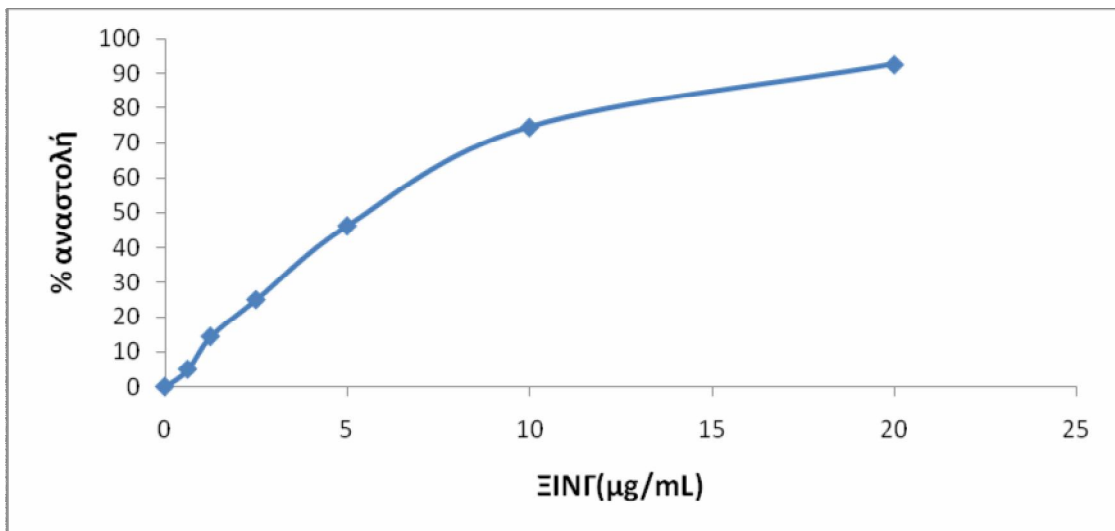
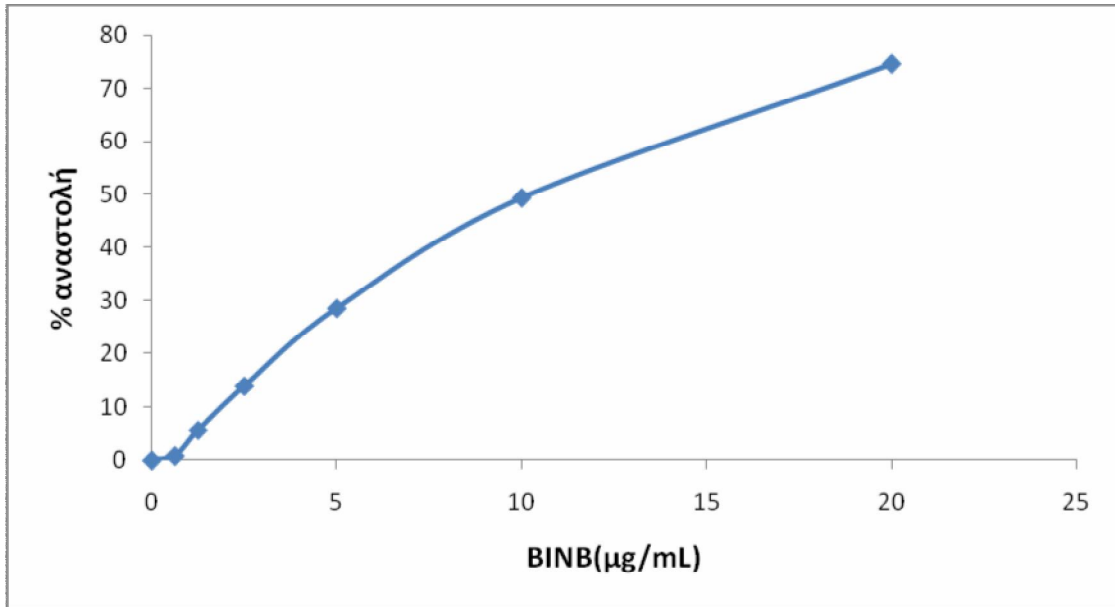
Γραφήματα DPPH



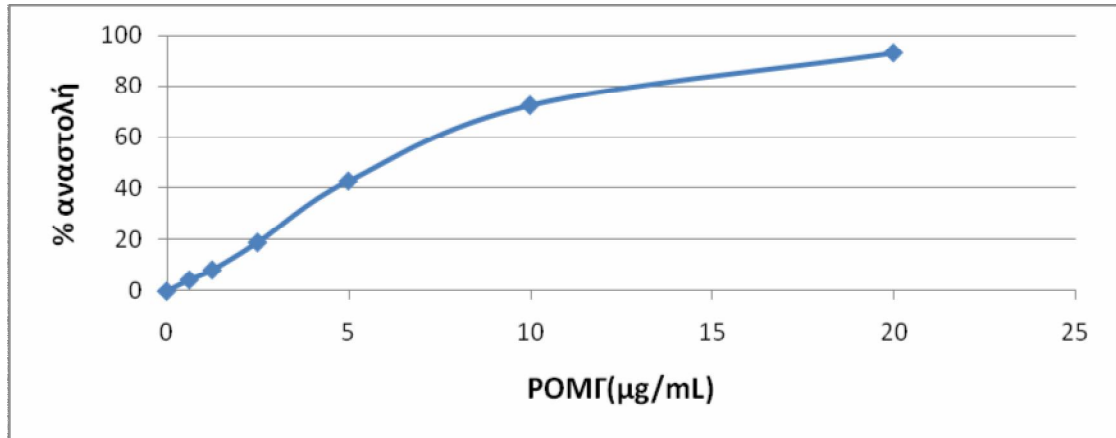
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



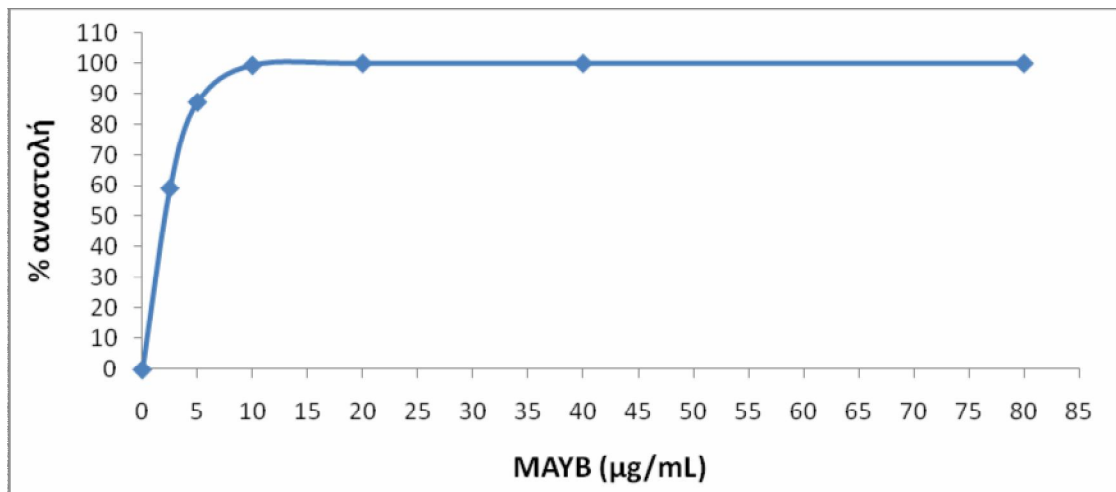
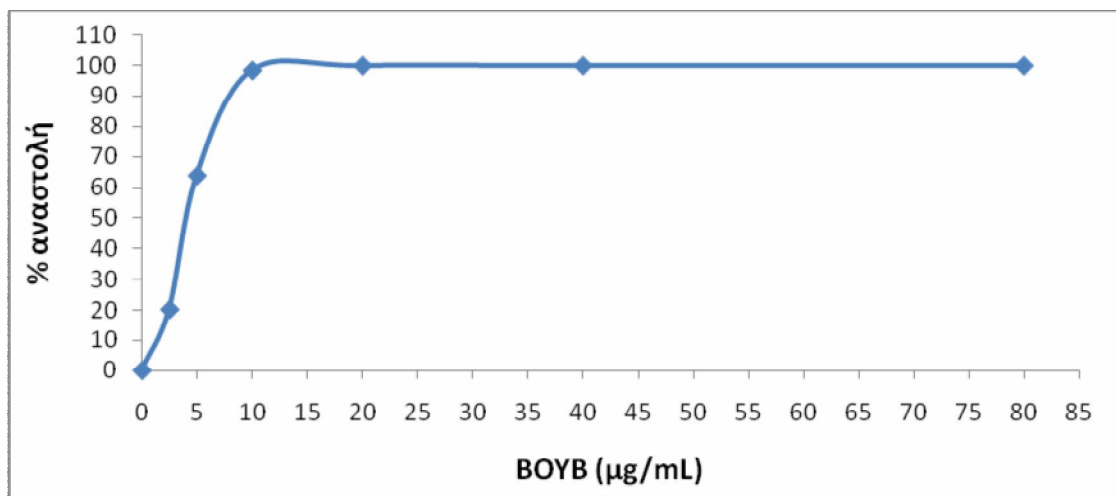
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



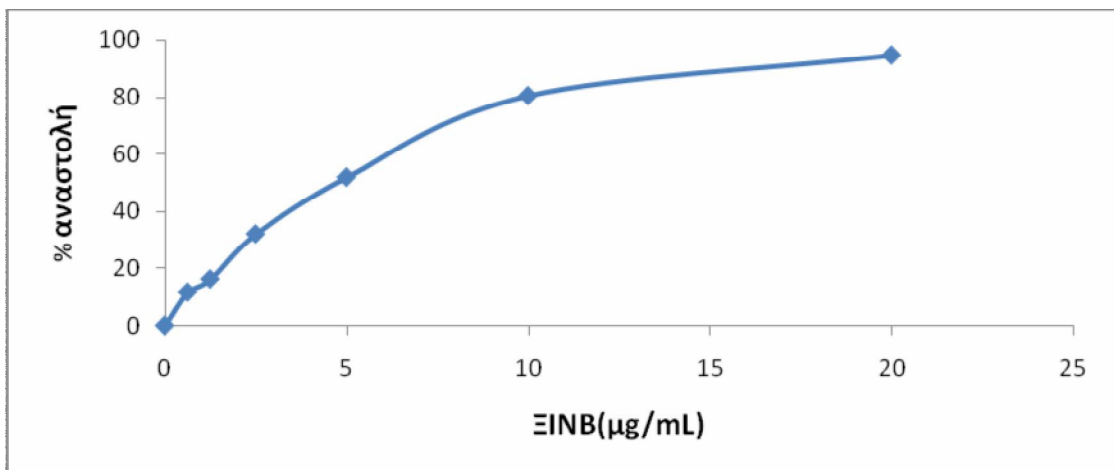
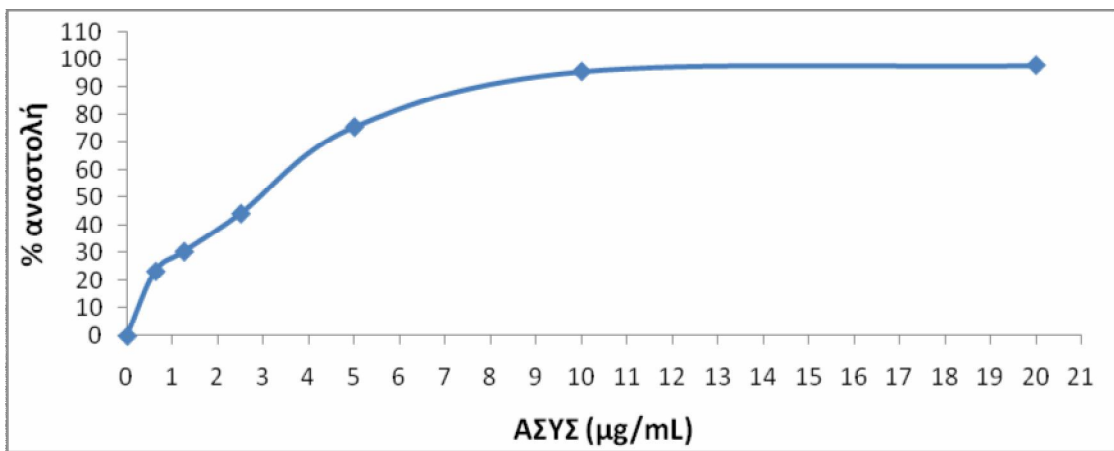
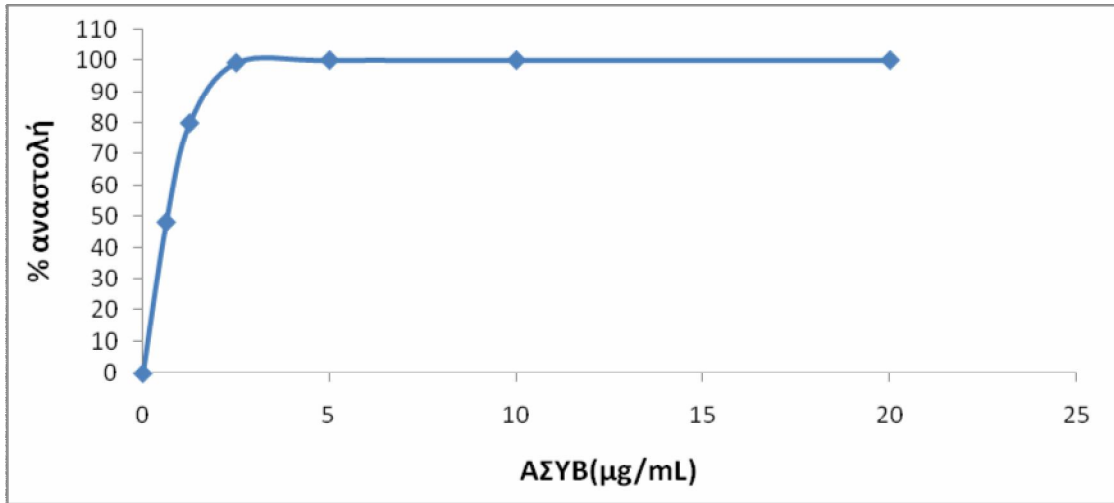
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



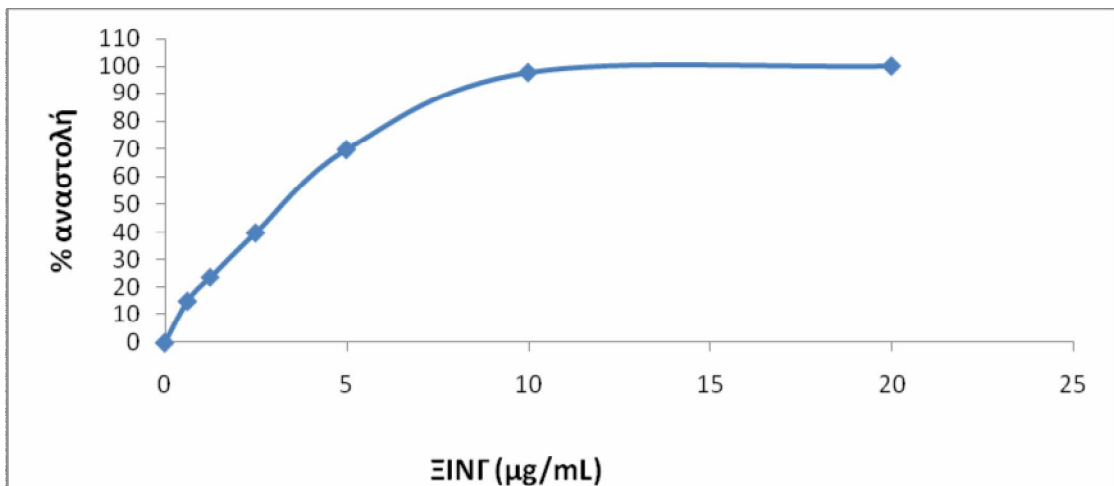
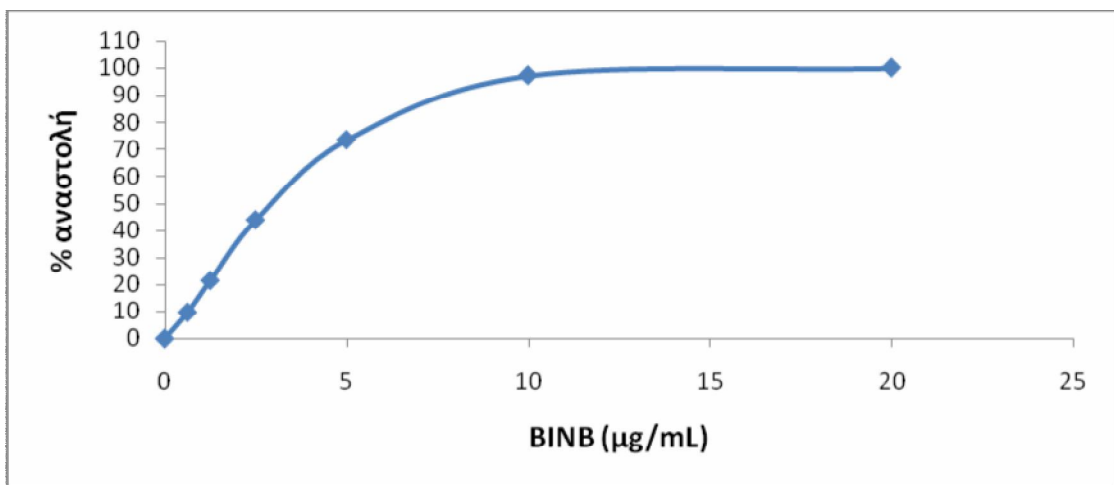
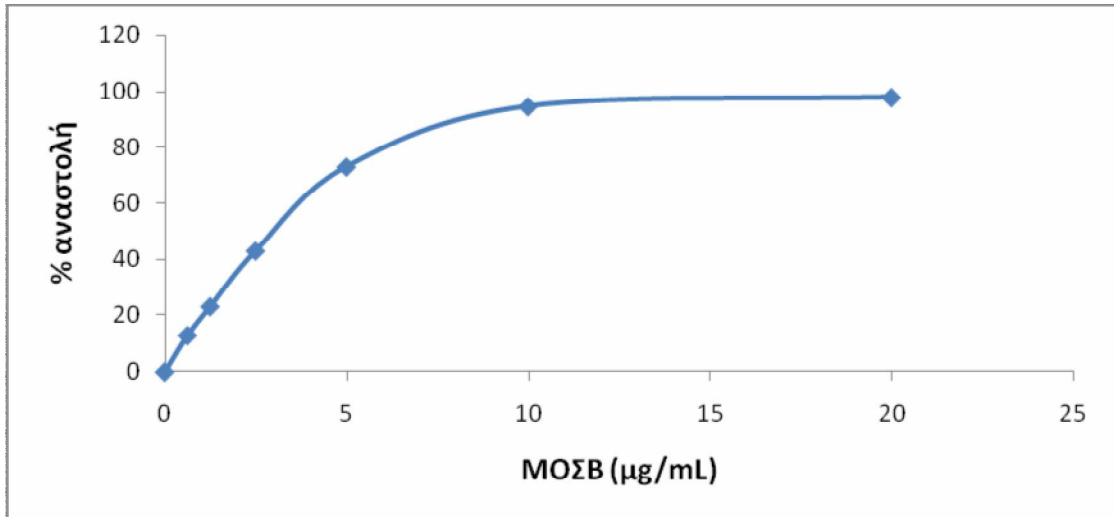
Γραφήματα ABTS



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

