



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Χριστοπούλου Γεωργία

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

***“ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ
ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ”***

Τριμελής Επιτροπή

Χίου Αντωνία
Επικ. Καθηγήτρια Χ.Π.
(Επιβλέπουσα)

Καλιώρα Ανδριάννα
Λέκτορας Χ.Π.

Καλογερόπουλος Νικόλαος
Επικ. Καθηγητής Χ.Π.

Αθήνα 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	8
ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΣΤΑΦΙΔΑ	9
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	9
1.2 ΓΕΝΙΚΑ.....	10
1.3 ΕΙΔΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ.....	13
1.3.1 ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ	13
1.3.2 ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	15
1.4 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ.....	16
1.4.1 ΞΗΡΑΝΣΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	16
1.4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	16
1.4.3 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	18
1.5 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	19
1.6 Η ΣΤΑΦΙΔΑ ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	22
2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	22
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	22
2.2.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ.....	23
2.2.2 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	24
2.2.3 ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ	30
2.2.4 ΛΙΓΝΑΝΕΣ.....	31
2.2.5 ΑΛΛΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	31
2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	32

2.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & ΥΓΕΙΑ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	35
3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	35
3.2 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ.....	36
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	40
3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	41
ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
4.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ	48
4.1.1 ΛΥΟΦΙΛΟΠΟΙΗΣΗ.....	48
4.1.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	48
4.1.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	49
4.1.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPE).....	50
4.1.5 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	51
4.1.6 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, GC-MS).....	52
4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ	55
4.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ.....	55
4.2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΘΕΠΚΟΥ ΧΑΛΚΟΥ.....	59
4.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	60
4.2.4.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	60
4.2.4.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPE).....	61
4.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
5.1 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	63
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ IN VIVO, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	66
5.2.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ.....	66
5.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, από τη φοιτήτρια του τμήματος Χριστοπούλου Γεωργία, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011- 2012, υπό την επίβλεψη της κ. Αντωνίας Χίου, επίκουρης Καθηγήτριας Χημικής Ανάλυσης και Σύνθεσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Χίου για την πολύτιμη βοήθεια της και την καθοδήγησή της σε όλη την διάρκεια της μελέτης αυτής, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ανδριάννα Καλιώρα, Λέκτορα του τμήματος και τον κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξαν για τη μελέτη αυτή καθώς και για τις γνώσεις και τις συμβουλές τους, που με βοήθησαν να την ολοκληρώσω.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Βάιο Καραθάνο, Καθηγητή του τμήματος για τις γνώσεις που μου μετέφερε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Παναγιώτη Κανέλλο, υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος για την άριστη συνεργασία και για τη συνεισφορά και την βοήθειά του, τόσο στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους, όσο και στο γραπτό κείμενο. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Αριστεά Γκιοζάρη, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος για την πολύτιμη συμβολή της στην πειραματική διαδικασία και στη συγγραφή της πτυχιακής μελέτης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω του εθελοντές που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη για τη συνεισφορά τους και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ευχαριστώ επίσης τους συμφοιτητές μου, που εργαστήκαμε μαζί στο εργαστήριο Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων, για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε, καθώς και για τη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια του έτους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου, Οδυσσέα και Ρούλα, και τα αδέρφια μου, Κωνσταντίνα και Χρήστο που στέκονται κοντά μου σε κάθε δυσκολία, καθώς και για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των θετικών επιδράσεών τους στην υγεία των ανθρώπων. Σημαντικό είναι να μελετηθεί η βιοδιαθεσιμότητα των μικροσυστατικών αυτών προκειμένου να κατανοήσουμε τον τρόπο δράσης και τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Η σταφίδα είναι ένα τρόφιμο πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, των οποίων η βιοδιαθεσιμότητα δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα.

Σκοπός: Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου της σταφίδας στο πλάσμα, της μεταβολής της αντίστασης του ορού στην οξείδωση και των επιμέρους πολυφαινολών στο πλάσμα μετά από την κατανάλωση σταφίδας σε υγιείς ενήλικες.

Μεθοδολογία: Χρησιμοποιήθηκαν 10 φαινομενικά υγιείς εθελοντές οι οποίοι μετά από 12ωρη νηστεία κατανάλωσαν 144 γρ. κορινθιακής σταφίδας. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στους χρόνους 0 (πριν την κατανάλωση), 1,2,3 και 4 ώρες μετά την κατανάλωση. Για την εκτίμηση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του πλάσματος εφαρμόζεται χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με Folin- Ciocalteu, ενώ για τη μέτρηση της αντίστασης του ορού στην οξείδωση εφαρμόζεται η μέθοδος αναγωγής του Cu^{2+} προς Cu^{+} . Ακολουθεί ποιοτική και ποσοτική ανάλυση στα δείγματα και πρότυπα διαλύματα με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC- MS). Η ίδια μέθοδος ακολουθείται και για τον προσδιορισμό των επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών στην κορινθιακή σταφίδα.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του πλάσματος και της αντίστασης του ορού στην οξείδωση των εθελοντών 1 ώρα μετά την κατανάλωση του γεύματος, η οποία ήταν η μέγιστη. Η αύξηση διατηρήθηκε μέχρι το πέρας της δοκιμασίας. Στην κορινθιακή σταφίδα ανιχνεύθηκαν 24 φαινολικά συστατικά καθώς και ολεανολικό οξύ, 15 από τα οποία εντοπίστηκαν και στο πλάσμα των εθελοντών. Παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση αυτών των πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση του γεύματος.

ABSTRACT

Background: Polyphenols (PP) are receiving increasing interest, in recent years, due to their potential effect on human's health. Epidemiological evidences indicate an inverse relationship between the intake of polyphenol- rich foods and the risk of several diseases. It is of great importance to study the bioavailability of these compounds in order to understand their biological activity and beneficial effects. Corinthian raisins (*Vitis Vinifera L.*), are dried vine fruits, rich in polyphenols, whose bioavailability has not been studied so far.

Objective: The purpose of this thesis was the detection and quantification of total polyphenol content of raisins in plasma, the determination of total serum oxidizability and the quantification of plasma individual polyphenols after the consumption of raisins.

Methods: Ten healthy subjects aged between 18 and 40 years were recruited for the study. All subjects included in the study were healthy. After overnight fasting, blood samples were obtained from volunteers prior to Corinthian raisins (CR) consumption (time 0). Next, each volunteer consumed 8 servings of CR (approximately 144g) alone. Blood samples were collected at 1, 2, 3 and 4h after meal consumption. Total PP content in plasma was measured using the Folin–Ciocalteu reagent. Serum samples were oxidized with copper (Cu^{2+}), to measure the total serum oxidizability. Both plasma and raisins individual polyphenols were measured by using GC- MS.

Results: A total of 25 PP were identified and quantified in CR and 15 PP in volunteer's plasma by GC–MS analysis. Among the phenolics detected, oleanolic acid was detected. A statistically significant increase ($p<0.05$) in total PP was observed after the first hour of CR consumption compared with time 0. This increase was in compliance with the increment ($p=0.041$) of serum oxidation resistance after the first hour of CR consumption compared with time 0.

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΣΤΑΦΙΔΑ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η καλλιέργεια της σταφιδάμπελου εικάζεται ότι άρχισε κατά τους πρώτους αιώνες της Β' μ.Χ. χιλιετίας, ωστόσο δεν υπάρχουν ακριβή ιστορικά στοιχεία για την έναρξή της. Πιθανολογείται ότι οι Φράγκοι, όταν είχαν υπό την κατοχή τους την Πελοπόννησο (1212-1360), είναι εκείνοι που ανακάλυψαν τη σταφιδάμπελο και άρχισαν να την καλλιεργούν, στην αρχή στις περιοχές Πάτρας και Ηλείας- Δουκάτο Γλαρέντζας- και αργότερα στην επαρχία Κορίνθου- κυρίως στην περιοχή του Κιάτου- χωρίς να επεκτείνουν την καλλιέργειά της μέχρι την πόλη της Κορίνθου. Μετά την κατάληψη της Πελοποννήσου από τους Ενετούς (1389), η σταφίδα αρχίζει να αποτελεί είδος εμπορίου προς τις χώρες της Ευρώπης. Κατά την περίοδο της Α' τουρκικής κατοχής της Πελοποννήσου (1540-1685) ελαττώθηκε κατά πολύ η παραγωγή σταφίδας λόγω της γενικότερης ερήμωσης και οικονομικής εξάντλησης της περιοχής.

Όταν οι Ενετοί κατέλαβαν εκ νέου την Πελοπόννησο -κατά τη διάρκεια της δεύτερης ενετοκρατίας (1658-1715) -ο ενετός αρχιστράτηγος και μετέπειτα δόγης Φραγκίσκος Μοροζίνης κατέβαλε μεγάλες προσπάθειες για την ανάπτυξη της καλλιέργειας της σταφίδας. Ωστόσο, και αυτή η προσπάθεια για περαιτέρω ενίσχυση της σταφιδοκαλλιέργειας σύντομα ανακόπηκε λόγω της ανάκτησης της Πελοποννήσου από τους Τούρκους για δεύτερη φορά.

Κατά τη διάρκεια των αγώνων για την ανεξαρτησία της Ελλάδας (1821-1878) περιορίστηκε σημαντικά η παραγωγή σταφίδας αφού οι σταφιδάμπελοι είχαν καταστραφεί σχεδόν ολοκληρωτικά. Με την άφιξη του Καποδίστρια ενισχύθηκε η καλλιέργεια σταφιδάμπελων με νέες φυτείες που κάλυψαν την περιοχή από Πάτρα μέχρι Κόρινθο. Όμως η παραγωγή θα αργήσει πολύ να φτάσει τα προ-επανάστασης επίπεδα, επειδή το αμπέλι αρχίζει να καρποφορεί κατά το 5^ο έτος και φτάνει σε πλήρη καρποφορία κατά το 10^ο. Η πολύ μεγάλη, ωστόσο, επέκταση της σταφιδοκαλλιέργειας επιτελείται κατά τις πρώτες δεκαετίες μετά την ανεξαρτησία, με συνεχώς επιταχυνόμενους ρυθμούς.

Τα πρώτα σύννεφα εκδηλώθηκαν κατά την δεκαετία του 1850 εξαιτίας της επιδημίας φυλλοξήρας και το 1877, τα σύννεφα επανεμφανίζονται με την ύφεση της αγγλικής αγοράς. Την κατάρρευση των τιμών απέτρεψε το μεγάλο άνοιγμα στις γαλλικές αγορές τον Οκτώβριο του

1879, το οποίο οφειλόταν στην πτώση της γαλλικής οινοπαραγωγής λόγω της φυλλοξήρας που έπληξε τις γαλλικές καλλιέργειες.

Εφόσον η υπέρμετρη επέκταση της σταφιδοκαλλιέργειας και η εξαγωγή της σταφίδας στο εξωτερικό ακολούθησε αλόγιστα συγκυριακές ανάγκες κατανάλωσης του προϊόντος, φυσικό επακόλουθο ήταν η *σταφιδική κρίση* λόγω του μεγάλου πλεονάσματος αδιάθετου προϊόντος, που έπληξε τις σταφιδοπαραγωγούς περιοχές της Βορειοδυτικής Πελοποννήσου μετά την ανάκαμψη των γαλλικών αμπελώνων και το οριστικό πλέον κλείσιμο της γαλλικής αγοράς κατά την τελευταία δεκαετία του 19^{ου} αιώνα. Έτσι φτάνουμε στη μεγάλη σταφιδική κρίση που έγινε οδυνηρά αισθητή σε ολόκληρη την οικονομία της χώρας.

Τον Αύγουστο του 1925 με Ν.Δ. ιδρύθηκε ο Αυτόνομος Σταφιδικός Οργανισμός (Α.Σ.Ο.) Νομικό Πρόσωπο εποπτευόμενο από το Ελληνικό Δημόσιο για την προστασία της καλλιέργειας και εμπορίας της Κορινθιακής Σταφίδας, ο οποίος μέχρι και το Δεκέμβριο του 1997 που με Νόμο αποφασίστηκε η διάλυση του έπαιξε κυρίαρχο ρόλο στη σταφίδα. Ίδρυσε εργοστάσια σταφίδας, οινοποιία, αποθήκες, που εξακολουθούν μέχρι σήμερα να σημαδεύουν το τοπίο και να θυμίζουν τα χρόνια της σταφίδας, που σφράγισαν την ιστορία της περιοχής και των ανθρώπων της για πάνω από εκατό έτη, καθορίζοντας καταλυτικά μέχρι σήμερα την πορεία τους (Αρώνη - Τσίχλη, 1999, Ξένος, 1888).

1.2 ΓΕΝΙΚΑ

Η χρήση του όρου «σταφίδα» (raisin) χρονολογείται στη Μέση Αγγλία και προέρχεται ουσιαστικά από την παλιά Γαλλία. Στα γαλλικά, η λέξη «σταφίδα» αναφέρεται στην πραγματικότητα στα νωπά σταφύλια, ενώ ο όρος «raisin sec», που η ακριβής του μετάφραση είναι «ξηρό σταφύλι», αναφέρεται στη σταφίδα. Οι κυνηγοί-συλλέκτες ίσως να είχαν αναγνωρίσει τις ιδιότητες των άγριων σταφυλιών και πιθανών να είχαν παρατηρήσει ότι τα σταφύλια αποκτούσαν μια βρώσιμη αποξηραμένη μορφή όταν έπεφταν από το αμπέλι και παρέμεναν στον ήλιο για κάποιο χρονικό διάστημα.

Στην χώρα μας, οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν τη λέξη σταφίδα γενικώς για τα αποξηραμένα σταφύλια της αμπέλου. Ωστόσο σήμερα, ο όρος έχει διευρυνθεί και συμπεριλαμβάνει τους αποξηραμένους καρπούς σταφυλιών κάθε ποικιλίας. Σταφίδα, υπό την ευρεία έννοια, σύμφωνα με το Σταυρακάκη (1986) ορίζεται ως ο επεξεργασμένος με κάθε τρόπο καρπός, όλων των ειδών ποικιλιών του αμπελιού του οποίου η βρώση είναι εφικτή. Διεθνώς

όμως έχει επικρατήσει ο ορισμός αυτός να αποδίδεται στα αποξηραμένα σταφύλια ορισμένων μόνο ποικιλιών της αμπέλου και συγκεκριμένα:

- της Κορινθιακής σταφίδας, με μικρή, μαύρη και άσπερμη ρόγα,
- της Σουλτανίνας, γνωστή και ως Thompson Seedless (Καλιφόρνια), με ρόγα άσπερμη ωχροκίτρινη,
- και του Μοσχάτου Αλεξάνδρειας, γνωστό ως Gordo Blanco (Αυστραλία) ή White Hanepoot (Ν. Αφρική) με ρόγα που περιέχει μεγάλα σπέρματα.

Σταφιδοποιία είναι το σύνολο των μεθόδων, των τεχνικών και των μέσων που χρησιμοποιούνται σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, για να μετατραπούν τα σταφύλια σε σταφίδες. Στη χώρα μας σταφιδοποιούνται σταφύλια των δύο πρώτων ποικιλιών (Σουλτανίνα και Κορινθιακή σταφίδα) (Σταυρακάκης, 1986).

Στα πανάρχαια χρόνια έχει τις ρίζες του το ευρέως διαδεδομένο φυτό του αμπελιού, το οποίο ανήκει στο γένος *Vitis* της οικογένειας των αμπελιδών (*Ampelidae*, *Vitaceae*). Περιλαμβάνει μια ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλία ειδών με σημαντικότερο αυτών την άμπελο την οινοφόρο ή *Vitis Vinifera* var. *aryreana* ή όπως κοινώς ονομάζεται σταφιδάμπελος, η οποία καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του πλανήτη. Λόγω της υψηλής γενετικής τους ποικιλίας, τα είδη της σταφιδάμπελου ξεπερνούν τα 10.000 παγκοσμίως (Χαλουλάκος, 1993, Williamson et al., 2010).

Βάσει του κριτηρίου «προορισμός χρήσης των προϊόντων», οι ποικιλίες κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες :

- Επιτραπέζιες
- Οινοποιίας
- Σταφιδοποιίας
- Χυμοποίησης
- Κονσερβοποίησης

Για να καταταχθεί μια ποικιλία στην κατηγορία της σταφιδοποιίας πρέπει να πληροί πολύ αυστηρά κριτήρια. Έτσι, λίγες ποικιλίες θεωρούνται κατάλληλες για την παραγωγή σταφίδας.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.1** η Τουρκία είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή σταφίδας παγκοσμίως, ακολουθούν οι ΗΠΑ, το Ιράν και στην 4^η θέση η Ελλάδα. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μείωση στην παραγωγή σταφίδας στην Ελλάδα, συμβάλλοντας όλο και λιγότερο στη παγκόσμια παραγωγή.

Πίνακας 1.1. Παραγωγή σταφίδας σε τόνους. Δεδομένα για τα έτη 2004- 2005. [Βάση δεδομένων FAOSTAT (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας)].

Χώρα	2004		2005	
Τουρκία	329 000,00	30 %	343 100,00	30 %
ΗΠΑ	310 500,00	28 %	320 000,00	28 %
Ιράν	145 000,00	13 %	145 500,00	13 %
<u>Ελλάδα</u>	<u>73 269,00</u>	<u>7 %</u>	<u>71 194,00</u>	<u>6 %</u>
Χιλή	53 700,00	5 %	64 000,00	6 %
Νότια Αφρική	39 500,00	4 %	40 000,00	4 %
Ουζμπεκιστάν	37 500,00	3 %	37 500,00	3 %
Αφγανιστάν	33 750,00	3 %	33 750,00	3 %
Αυστραλία	28 500,00	3 %	22 000,00	2 %
Συρία	12 000,00	1 %	12 000,00	1 %
Άλλες χώρες	44 351,96	4 %	44 849,00	4 %
Σύνολο	1 107 070,96	100 %	1 133 893,00	100 %

Στην αρχαιότητα συναντώνται οι σταφίδες με άλλες ονομασίες όπως ασταφίδες, σταφυλίδες και οσταφίδες, από τις οποίες έχει πιθανότατα προέλθει η σύγχρονη λέξη, και ιδίως από την τελευταία. Οι ονομασίες αυτές πιστεύεται ότι είναι βασισμένες στη λέξη «οστέινη» που χρησιμοποιούνταν για να περιγράψει την έννοια του σκληρού και του ξηρού (όπως οστούν, οστακός, αστακός). Η ονομασία αυτή προήλθε από το γεγονός ότι η ρίζα της αμπέλου είναι οστεώδης. Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, η σταφίδα ενδεχομένως να πήρε το όνομά της λόγω της ιδιότητάς της να είναι ξηρή.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ξήρανση των στέμφυλων για την παραγωγή σταφίδας. Η πρώτη περιλαμβάνει την ξήρανση στον ήλιο για 1-2 εβδομάδες, η δεύτερη την ξήρανση σε σκιά και η τρίτη μια σύντομη έκθεση σε ζεστό νερό (87-93° C) και έπειτα τοποθέτηση σε σήραγγα αφυδάτωσης στους 71° C για 20-24 ώρες. Η σταφίδα αποκτά το σκούρο μαύρο χρώμα από τη συσσώρευση χρωστικών ουσιών μελανίνης, που παράγονται από τη δράση μιας οξειδάσης πολυφαινόλων και από μια μη ενζυμική αντίδραση. Οι ξανθές σταφίδες παράγονται από τη χρήση σταφυλιών «Thompson Seedless», τα οποία έχουν βυθιστεί σε ζεστό νερό και επεξεργάζονται σε διοξείδιο του θείου ώστε να αδρανοποιηθεί ή πολυφαινολική οξειδάση και να εμποδιστούν ή να μειωθούν οι αντιδράσεις σκούρυνσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τη διαδικασία της ξήρανσης δεν καταστρέφονται τα θρεπτικά συστατικά της σταφίδας όπως έχει φανεί από αρκετές μελέτες. Η μόνη διαφοροποίηση ανάμεσα στα νωπά σταφύλια και τις αποξηραμένες σταφίδες είναι το ποσοστό του περιεχόμενου νερού (Williamson et al., 2010).

1.3 ΕΙΔΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

1.3.1 ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ

Η Κορινθιακή σταφίδα αποτελεί προϊόν αμπελιού που καλλιεργείται και επεξεργάζεται για εκατοντάδες χρόνια. Η παραγωγή της αντιπροσωπεύει το 8-10% της παραγωγής αποξηραμένων καρπών αμπελιού παγκοσμίως (συμπεριλαμβανομένων της Σουλτανίνας και του Μοσχάτου Αλεξάνδρειας). Ανάμεσα στα αποξηραμένα προϊόντα αμπελιού που κυκλοφορούν στην αγορά, η Κορινθιακή σταφίδα κατέχει την υψηλότερη τιμή πιθανών εξαιτίας της έλλειψης του (αφού καλλιεργείται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας), της επεξεργασμένης καλλιέργειάς του, τις διαδικασίες ξήρανσης που έχουν υιοθετηθεί καθώς και λόγω του ξεχωριστού χρώματος και αρώματος που διαθέτει.

Ως νεαρό φυτό, η κορινθιακή σταφιδάμπελος έχει χρώμα τεφροπράσινο με ερυθρά παρυφή καλυμμένη με βαμβακώδες χνούδι. Το φύλλο είναι μεγάλου μεγέθους, βαθυπράσιμου χρώματος, σχήματος κυκλικού προς σφηνοειδές, με παχύ έλασμα, συνήθως πεντάκολπο και εμφανίζει οδόντες σε δυο σειρές και νευρώσεις κιτρινοπράσινου χρώματος. Η άνω επιφάνεια είναι λεία, ενώ η κάτω χνουδωτή βαμβακώδης.

Το σταφύλι είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδρικό, συνήθως διπλό και πυκνόραγο. Ο ποδίσκος (το τμήμα που ενώνει το άνθος με το βλαστό) είναι μετρίου μεγέθους και πάχους και εύκολα αποκοπώμενος. Ένα μέσο σταφύλι ζυγίζει 200 γραμμάρια. Οι ράγες αποτελούν το 98% του βάρους του σταφυλιού και είναι μικρές και σφαιρικές. Σε ποσοστό περίπου 98% είναι χωρίς κουκούτσι (αγίγαρτες). Οι εγίγαρτες ράγες είναι και αυτές μεγάλης διαμέτρου και θεωρούνται κακής ποιότητας προϊόν (Κριμπά, 1943).

Οι σταφίδες είναι μικρές, αποξηραμένες στον ήλιο ράγες, με μαύρο προς σκούρο μπλε χρώμα που παράγονται σχεδόν αποκλειστικά στη νότια Ελλάδα (σε μικρή κλίμακα καλλιεργείται σήμερα στην Αυστραλία και τη Νότια Αφρική). Χαρακτηριστικό είναι ότι καλλιεργείται σε πολύ μεγάλες εκτάσεις, της τάξεως των 400.000 στρεμμάτων περίπου και καταλαμβάνει την πρώτη θέση ανάμεσα στις καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπελιού στην Ελλάδα. Ο πιο αντιπροσωπευτικός τύπος κορινθιακής σταφίδας απαντάται στην περιφέρεια του χωριού Παναρίτη, στην περιοχή της Αιγιαλείας (Howard, 2002).

Ο μήνας ωρίμανσης διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Στα πεδινά συμβαίνει αρχές Αυγούστου, ενώ στα ορεινά μπορεί τέλος Σεπτεμβρίου. Η κορινθιακή σταφίδα ευδοκimeί σε ελαφρά εδάφη, καλώς στραγγιζόμενα, έστω και χαλικώδη. Είναι καλλιέργεια ευαίσθητη στα παθογόνα (περονόσπορο, ωίδιο, ίσκα, ευδεμίδα) και για αυτό απαιτεί ιδιαίτερο κόπο και προσοχή.

Η Κορινθιακή σταφίδα μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες βάσει ποιότητας :

- Η σταφίδα που ανήκει στην κατηγορία υψηλότερης ποιότητας παράγεται στη βόρεια Πελοπόννησο και μπορεί να διακριθεί σε δύο υποκατηγορίες: *Vostizza*, Προϊόν Ονομασίας Προέλευσης που παράγεται στο Αίγιο και *Gulf* που παράγεται στην περιοχή Κορινθίας-Νεμέας- Κιάτου.
- Η σταφίδα *Provincial*, της δεύτερης κατηγορίας, παράγεται στη δυτική Πελοπόννησο και σε δύο Ιόνια νησιά, τη Ζάκυνθο και την Κεφαλονιά.

Η κατηγοριοποίηση αυτή με βάση την ποιότητα, σχετίζεται τόσο με τις ιδιότητες του προϊόντος, όσο και με τις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται καθώς και το βαθμό καθαρότητας και ομοιογένειας του προϊόντος (Chiou et al., 2007).

Η κορινθιακή σταφίδα αποτελεί ένα από τα βασικότερα αγροτικά εξαγωγικά προϊόντα της Ελλάδας. Σήμερα οι εξαγωγές σταφίδας αποτελούν το 2-3% της αξίας των συνολικών εξαγωγών με σταθερή ή και ανερχόμενη τάση λόγω μείωσης του όγκου των συνολικών ελληνικών εξαγωγών. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα απετέλεσε το βασικό μοχλό εκσυγχρονισμού της οικονομίας της χώρας και των μεγάλων έργων (διώρυγα της Κορίνθου, σιδηροδρομικό σίκτυο) επειδή αποτελούσε το 70% των ελληνικών εξαγωγών.

1.3.2 ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ

Η Σουλτανίνα καλλιεργείται και παράγεται σε πολλές χώρες στον κόσμο όπως η Τουρκία, το Ιράν, το Αφγανιστάν, η Αυστραλία, η Νότια Αφρική, η Χιλή και η Ελλάδα (Kaliora et al., 2009).

Το όνομα Σουλτανίνα το πήρε από την περιοχή Σουλτανιέ της Περσίας, απ' όπου προέρχεται. Η διάδοση της καλλιέργειάς της στην αργολική πεδιάδα και από εκεί στα άλλα μέρη της Ελλάδας οφείλεται στον Α. Λογοθέτη, ο οποίος από το 1838 έφερε από τη Σμύρνη και φύτεψε στα κτήματά του κοντά στο Ναύπλιο τα πρώτα κλήματα του είδους αυτού.

Σήμερα καλλιεργείται κυρίως στο νομό Ηρακλείου Κρήτης αλλά και στους νομούς Κορινθίας, Ρεθύμνης, Λασιθίου, Ηλείας, Χανίων και Δωδεκανήσου σε έκταση περίπου 340.000 στρεμμάτων. Η Σουλτανίνα ευδοκimeί και εκτός Ελλάδας και συγκεκριμένα στην Καλιφόρνια, την Αυστραλία, την Τουρκία, τη Ν. Αφρική, το Ιράν, το Αφγανιστάν, την Κύπρο και άλλες περιοχές.

Ο καρπός του φυτού (σταφυλή) έχει ένα αρκετά μεγάλο μέγεθος (το μέσο βάρος του είναι 500γρ.), ενώ το σχήμα του είναι κυλινδρoκωνικό και είναι μετρίως πυκνόρραγο. Ο ποδίσκος της σταφυλής κατά την ωρίμανση ξυλοποιείται. Ο φλοιός είναι μετρίου πάχους, χρώματος κίτρινου χρυσίζοντος κατά την πλήρη ωρίμανση και η επιδερμίδα λεπτή καλυμμένη από λεπτό στρώμα άχνης. Η ράγα είναι απύρηνη (αγίγερτη) ελλειψοειδής, και έχει μέτριο ή μεγάλο μεγέθους. Η σάρκα είναι χυμώδης, γλυκιά, εύγεστη και μετρίως ανθεκτική. Ωριμάζει κατά τα τέλη Ιουλίου- αρχές Αυγούστου.

Η ποικιλία της Σουλτανίνας χαρακτηρίζεται από τη ζωνρότητα και την παραγωγικότητά της. Ευδοκίμει σε μαργώδη, καλά αποστραγγισμένα εδάφη ενώ πολύ σημαντική είναι η θετική συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα στο βαθμό ευφορίας του εδάφους και της απόδοσης του θαμνοειδούς φυτού. Αντίθετα ένα αβαθές και στεγνό έδαφος κρίνεται ακατάλληλο για την ευδοκίμησή του (Κριμπά, 1943, Γενάδιος Π., 1959).

1.4 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

1.4.1 ΞΗΡΑΝΣΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

Η ξήρανση της σταφίδας πραγματοποιείται είτε στον ήλιο με διάφορες μεθόδους, είτε στη σκιά. Πιο διαδεδομένη θεωρείται η πρώτη, η οποία πραγματοποιείται σε ακάλυπτα χωμάτινα ξηραντήρια επάνω σε σταφιδόχαρτο, σε ξηραντήρια από σκυρόδεμα και σε τζιβιέρες (σιδερένια ή ξύλινα πλαίσια με συρμάτινη επιφάνεια). Ο χρόνος της ξήρανσης στα ακάλυπτα ξηραντήρια κυμαίνεται από 10-12 ημέρες ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες. Τα σταφύλια μπορούν να ξηρανθούν επίσης σε ειδικά χαμωτά ξηραντήρια με κάλυψη.

Η διαδικασία ξήρανσης στη σκιά δίνει ανώτερης ποιότητας σταφίδες. Με βάση τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται ανάρτηση των σταφυλιών σε σύρματα σε μόνιμο ξηραντήριο - στέγαστρο ή ξήρανσή τους υπό τη σκιά του φυλλώματος του πρεμνού. Η διάρκεια ξήρανσης στη σκιά είναι περίπου 20 μέρες και στη συνέχεια για την πλήρη αποξήρανση πραγματοποιείται έκθεση των σχεδόν αποξηραμένων σταφίδων στον ήλιο για 2 ημέρες. Η μέθοδος αυτή δεν είναι πλέον τόσο διαδεδομένη λόγω του μεγάλου χρόνου που απαιτείται για την ξήρανση (Χαλουλάκος, 1993).

1.4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

Το επόμενο βήμα στην κατεργασία της σταφίδας είναι το «τρίψιμο», η απομάκρυνση δηλαδή των βοστρύχων. Ακολουθεί το «λίχνισμα» και το «κοσκίνισμα» κατά το οποίο γίνεται η ρήψη της σταφίδας από ένα ορισμένο ύψος και ο διαχωρισμός της, λόγω του ρεύματος αέρος, από ξένες ύλες, σκόνη και ξερούς μίσχους. Έπειτα γίνεται διαλογή του τελικού προϊόντος ώστε να ολοκληρωθούν όλα τα στάδια πριν την επεξεργασία της. Το τελικό προϊόν έχει χρώμα καστανωπό έως σκούρο καστανό, είναι μαλακό και ήπιας γεύσης. Ακολουθεί η ενσάρκωση της

σταφίδας σε σάκους από λινάτσα χωρητικότητας περίπου 80 kg. Σήμερα η σταφίδα οδηγείται στον τόπο επεξεργασίας της με μεγάλα πλαστικά κιβώτια.

Τα σταφιδοεργοστάσια είναι οι ειδικοί χώροι στους οποίους γίνεται η επεξεργασία της σταφίδας. Τα στάδια της επεξεργασίας είναι : η πρόπλυση - στράγγισμα, η απομίσχωση - στίλπνωση και η τυποποίηση - συσκευασία. (Στην επεξεργασία της σουλτανίνας απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο, θείωση - πλύση - ρύθμιση υγρασίας.)

- *Πρόπλυση – στράγγισμα*

Αποσκοπεί στην απαλλαγή της σταφίδας από ξένες ύλες, την απομάκρυνση κούφιων ραγών, τη διάσπαση των σβόλων της σταφίδας και τον καθαρισμό της επιφάνειας από τα σάκχαρα, που προέρχονται από τους τραυματισμούς των ραγών. Η Κορινθιακή σταφίδα πλένεται περίπου για ένα λεπτό ώστε να μην απορροφηθεί νερό. (όσον αφορά στη Σουλτανίνα, η ύγρανση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχημένη θείωση που ακολουθεί). Το στράγγισμα επιτυγχάνεται με ταλαντευόμενα κόσκινα ενώ παράλληλα απομακρύνεται ένα ποσοστό μίσχων και λοιπών ξένων υλών.

- *Απομίσχωση – Στίλπνωση*

Για την απομίσχωση συνήθως χρησιμοποιούνται μηχανήματα που περιέχουν διάτρητα κόσκινα μέσα στα οποία περιστρέφονται περύγια και απομακρύνουν τους μίσχους. Επειδή στο στάδιο αυτό η σταφίδα υφίσταται αρκετές ζημιές που εξαρτώνται από το ποσοστό υγρασίας των σταφίδων και τις συνθήκες λειτουργίας των μηχανημάτων, χρησιμοποιούνται διάφορες ελαιώδεις ουσίες ώστε να μειωθούν οι κακώσεις και να αποκτήσει το προϊόν κάποια στιλπνότητα. Η χρήση των ουσιών αυτών βοηθά επίσης στη παρεμπόδιση του σβολιάσματος και στην τόνωση του χρωματισμού. Τα έλαια που χρησιμοποιούνται είναι: α) Ελαιόλαδο ραφινέ σε πυρηνέλαιο χαμηλής οξύτητας σε ποσοστό έως 0,3%, β) Παραφινέλαιο σε αναλογία 0,3 - 0,5% του ξηρού βάρους της σταφίδας, γ) Εμπορικά σκευάσματα όπως το Sultanol, το Migryol, το Myraget κ.ά. Η εφαρμογή των σκευασμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς μπορεί να προκαλέσουν εμφάνιση ανεπιθύμητων οσμών.

- *Τυποποίηση - Συσκευασία*

Η τυποποίηση της σταφίδας γίνεται ανάλογα με το μέγεθος και επιτυγχάνεται με το πέρασμα των σταφίδων από σειρά κόσκινων με τρύπες ανάλογες με τους επιζητούμενους ποιοτικούς τύπους.

A) Η κορινθιακή σταφίδα κατατάσσεται σύμφωνα με το μέγεθος σε Bold, Medium, Small, Siltings, Ungraded. Στην εμπορική πρακτική έχουν καθιερωθεί τα τοπωνυμικά σήματα όπως Vostizza, Gulf, Zante, Patras κ.ά.

B) Επίσης κατατάσσεται σε μία από τις εξής ποιοτικές κατηγορίες:

1.Extra Choicest 2.Choicest και 3.Choice. Η κατάταξη αυτή γίνεται βάσει του χρώματος, της περιεχόμενης υγρασίας, των ξένων υλών και του ποσοστού ισχνών, κόκκινων βεβλαμένων, πολύ χονδρών ή πολύ ψιλών και αναπομίσχων ραγών.

Η συσκευασία γίνεται με χάρτινα κιβώτια με πλαστικά σακουλάκια ή σε μικροσυσκευασία πλαστικών ή σελοφάν.

1.4.3 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

Η σταφίδα διατηρείται μέχρι την τελική της επεξεργασία σε αποθήκες για εξισορρόπηση της υγρασίας της. Οι αποθήκες πρέπει να είναι κατάλληλων προδιαγραφών, με ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, αερισμού και φωτισμού για την αποτροπή αλλοιώσεων. Οι κυριότερες αλλοιώσεις είναι :

- το κρυστάλλωμα (ζαχάρωμα)
- το σβόλιασμα
- η αλλοίωση του χρώματος
- και η προσβολή από έντομα και μύκητες.

Η ευρωτίαση (μούχλα) και η προσβολή από έντομα είναι οι πιο σημαντικές αλλοιώσεις της σταφίδας. Η πρώτη παρατηρείται όταν δεν έγινε κανονική ξήρανση και όταν η σταφίδα μολύνθηκε προ της συγκομιδής λόγω βροχοπτώσεων.

Σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των σταφίδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παίζει η μέθοδος αποξήρανσης των σταφυλιών και η περιεκτικότητά τους σε υγρασία. Η υγρασία που πρέπει να έχουν οι σταφίδες ώστε να διατηρηθούν σε καλή κατάσταση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης κυμαίνεται από 13 -15%. Στη χώρα μας κατά την παράδοση από τον παραγωγό στο εργοστάσιο, η εκτίμηση της περιεκτικότητας σε υγρασία γίνεται με εμπορικά

κριτήρια. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης, κυρίως τα τελευταία χρόνια, οδηγεί σε ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος (Χαλουλάκος, 1993).

1.5 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

Όσον αφορά στη διατροφική της σύσταση, η σταφίδα έχοντας αυτή τη γλυκιά γεύση αποτελεί ένα ιδανικό εναλλακτικό γλυκαντικό, πλούσιο σε φυτικές ίνες, σύνθετους υδατάνθρακες, μέταλλα και βιταμίνες απαραίτητα για τη ζωή ενώ παράλληλα δεν περιέχουν λίπος και χοληστερόλη (Kaliora et al., 2009). Τα συστατικά της σταφίδας παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 1.2**.

Έχει βρεθεί ότι 3-4kg σταφυλιών αποδίδουν 1kg οποιασδήποτε ποικιλίας σταφίδας, είτε Κορινθιακής είτε Σουλτανίνας. Οι σταφίδες είναι πλούσιες τόσο σε σύνθετους υδατάνθρακες όσο και σε απλά σάκχαρα όπως φρουκτόζη και γλυκόζη, τα οποία ως γνωστό αποτελούν την αμεσότερη πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης η παρουσία των σακχάρων αυτών κινητοποιεί μια αλκαλική αντίδραση με την οποία πραγματοποιείται εξουδετέρωση των οξέων που σχηματίζονται στον οργανισμό μετά από την κατανάλωση τροφών όπως το κρέας και τα αυγά.

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα έχουν δείξει ότι η σταφίδα έχει πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι οι σταφίδες όχι μόνο περιέχουν πολλές πολυφαινόλες, αλλά αυτές απορροφώνται σε σημαντικό βαθμό και είναι βιοδιαθέσιμες στον ανθρώπινο οργανισμό (Williamson and Manach, 2005). Πιο συγκεκριμένα, το βαννιλικό οξύ ήταν αυτό που εμφάνιζε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ανιχνεύθηκαν επίσης καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, p- υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ, p- υδρόξυ- βενζοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κερκετίνη (Chiou et al., 2007, Kaliora et al., 2009, Williamson et al., 2010).

Πίνακας 1.2. Διατροφική αξία σταφίδας (*Currants, zante, dried*) (Πηγή : USDA)

Συστατικά	Διατροφική αξία ανά 100 g
ΜΑΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ	
Νερό (g)	19,21
Ενέργεια (Kcal)	283
Πρωτεΐνη (g)	4,08
Ολικά λιπίδια (g)	0,27
Υδατάνθρακες (g)	74,08
Φυτικές ίνες (g)	6,8
Ολικά σάκχαρα (g)	67,28
ΛΙΠΙΔΙΑ	
Κορεσμένα (g)	0,028
Μονοακόρεστα (g)	0,047
Πολυακόρεστα (g)	0,180
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	
Βιταμίνη C (mg)	4,7
Θιαμίνη (mg)	0,160
Ριβοφλαβίνη (mg)	0,142
Νιασίνη (mg)	1,615
Βιταμίνη B6 (mg)	0,296
Φυλλικό οξύ (μg DFE)*	10
Βιταμίνη A (IU)	73
Βιταμίνη E (mg)	0,11
Βιταμίνη K (μg)	3,3

*DFE= Dietary Folate Equivalent

1.6 Η ΣΤΑΦΙΔΑ ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η σταφίδα αποτελεί ένα προϊόν το οποίο καλλιεργείται στην περιοχή της Μεσογείου και σε μεγαλύτερο βαθμό στον ελλαδικό χώρο. Το γεγονός αυτό καθιστά τη σταφίδα σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής Δίαιτας. Η πυραμίδα της μεσογειακής Διατροφής προτείνει κατανάλωση 3-5 μικρομερίδων φρούτων την ημέρα. Μια μικρομερίδα σταφίδας (ισοδυναμο φρούτου) ισοδυναμεί με ποσότητα ίση με 2 κοφτές κουταλιές της σούπας, δηλαδή περίπου 18γρ. σταφίδας.

Οι σταφίδες μπορούν να καταναλωθούν με διάφορους τρόπους, είτε ως έχουν είτε μαγειρεμένες μέσα σε διάφορες συνταγές. Χρησιμοποιούνται όπως οι ξηροί καρποί σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής, κέικ και γεμιστά νηστίσιμα κυρίως εδέσματα. Η υψηλή συγκέντρωση της σε σάκχαρα τις καθιστά πολύ μαλακές και όταν αποθηκεύονται για μεγάλη χρονική περίοδο τα σάκχαρα κρυσταλλοποιούνται στο εσωτερικό των φρούτων. Αυτό κάνει το φρούτο πιο σκληρό χωρίς αυτό να επηρεάζει την βρωσιμότητά του (De Lorgeril M., 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Σύμφωνα με τις τρέχουσες διατροφικές οδηγίες, ο άνθρωπος πρέπει να καταναλώνει σε καθημερινή βάση, τουλάχιστον πέντε μερίδες φρούτων και λαχανικών για τη βελτίωση της υγείας του. Τα επιδημιολογικά στοιχεία για το όφελος μιας διατροφής πλούσιας σε φρούτα και λαχανικά είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Δεν υπάρχουν ωστόσο επαρκή στοιχεία ώστε να συστήνεται η κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων και ειδικά συγκεκριμένων φυτοχημικών. Η καλύτερη συμβουλή που μπορεί να δοθεί είναι η κατανάλωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποικιλίας. Τα φυτοχημικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, δηλαδή ουσίες που στα φυτά έχουν ελάχιστο ή καθόλου ρόλο στη φωτοσύνθεση, στην αναπνοή και στην ανάπτυξη, τα οποία όμως συσσωρεύονται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις. Οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις που περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες σε αρωματικό δακτύλιο.

Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές βιταμίνες, ως διατροφικά συστατικά, δεν είναι απαραίτητα για βραχυπρόθεσμη ευεξία, και λαμβάνοντας υπ' όψη ότι το σώμα έχει ειδικούς μηχανισμούς για τη συσσώρευση και διατήρηση των βιταμινών, τα φυτοχημικά θεωρούνται μη διατροφικά ξеноβιοτικά συστατικά και μεταβολίζονται έτσι ώστε να αποβάλλονται αποτελεσματικά. Τα φλαβονοειδή και τα άλλα φαινολικά και πολυφαινολικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των τανινών και των παραγώγων των πολυφαινολών, αποτελούν μια σημαντική ομάδα φυτοχημικών (Gozier et al., 2009).

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η ποικιλία και η ευρεία διανομή των πολυφαινολών στα φυτά οδήγησε στη κατάταξη τους με διαφορετικούς τρόπους. Έτσι, μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την πηγή της προέλευσής τους, τη βιολογική λειτουργία και τη χημική τους δομή. Ο πιο διαδεδομένος και ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος είναι η ταξινόμησή τους με βάση τη χημική δομή και διακρίνονται σε : φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004, Tsao, 2010).

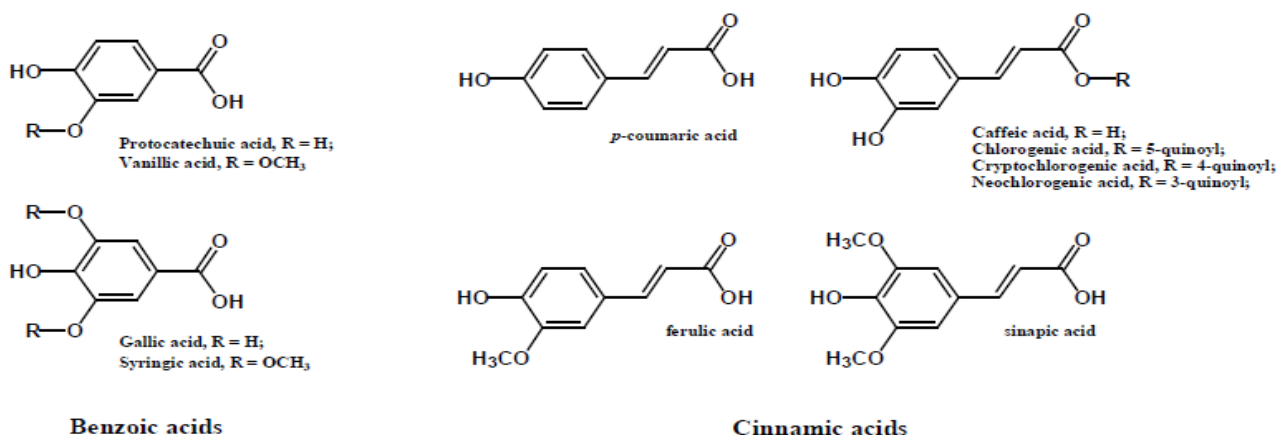
2.2.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα φαινολικά οξέα είναι άφθονα στα φυτά. Μπορούν επιπλέον να διαχωριστούν σε α) παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και β) παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Το περιεχόμενο του υδροβενζοϊκού οξέος στα εδώδιμα φυτά είναι γενικά αρκετά χαμηλό με εξαίρεση συγκεκριμένα κόκκινα φρούτα, τα μαύρα ραπανάκια, τα κρεμμύδια και το τσάι τα οποία περιέχουν αρκετά mg/kg φρέσκου προϊόντος. Επειδή τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τόσο ελεύθερα όσο και εστεροποιημένα υπάρχουν σε λίγα μόνο φυτά τα οποία καταναλώνονται από τον άνθρωπο, δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά και δε θεωρούνται ενώσεις με μεγάλο διατροφικό ενδιαφέρον (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004). Τα δεσμευμένα φαινολικά οξέα μπορούν να απελευθερωθούν ή να υδrolυθούν με όξινη ή αλκαλική υδρόλυση ή από ένζυμα (Tsao, 2010).

Τα παράγωγα του υδροκινναμωμικού οξέος απαντώνται πιο συχνά στα φυτά σε σχέση με τα παράγωγα του υδροβενζοϊκού και αποτελούνται κυρίως από p-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ. Αυτά τα οξέα απαντώνται κυρίως εστεροποιημένα με ένα σάκχαρο, συνήθως γλυκόζη ή με το κουϊνικό οξύ, το σικιμικό οξύ ή το ταρταρικό οξύ, και σπάνια σε ελεύθερη μορφή. Στην ελεύθερη μορφή τους βρίσκονται σε τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία όπως ψύξη, θέρμανση ή ζύμωση. Το καφεϊκό αντιδρά με το κουϊνικό οξύ προς σχηματισμό χλωρογενικού οξέος, το οποίο απαντάται σε πολλά φρούτα και λαχανικά και σε μεγάλη περιεκτικότητα στον καφέ.

Το καφεϊκό οξύ, τόσο στην ελεύθερη όσο και την εστεροποιημένη του μορφή είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% του συνολικού υδροξυκινναμωμικού περιεχομένου στα περισσότερα φρούτα. Τα παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος απαντώνται σε όλα τα μέρη του φρούτου αλλά οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο εξωτερικό μέρος των ώριμων καρπών.

Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ που απαντάται κυρίως στο εξωτερικό τμήμα στους σπόρους των δημητριακών, οι οποίοι αποτελούν την κύρια διατροφική τους πηγή και αντιπροσωπεύει το 90% των ολικών περιεχομένων πολυφαινολών (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004).



Σχήμα 2.1. Δομή φαινολικών οξέων. Αριστερά: βενζοϊκά οξέα, δεξιά: κινναμωμικά οξέα

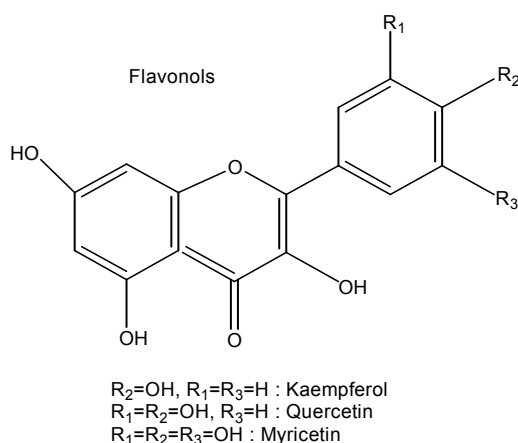
2.2.2 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από έναν C6- C3- C6 σκελετό στον οποίο οι δύο C6 μονάδες είναι φαινολικής φύσεως. Ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του οξυγονομένου ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορούν να διακριθούν σε : φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τα ισοφλαβονοειδή, τις φλαβανόλες, που περιλαμβάνουν τις κατεχίνες και τις προανθοκυανιδίνες και, τέλος, τις ανθοκυανίνες (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004, Tsao, 2010). Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερείς ενώσεις, διμερείς ή ολιγομερείς, που ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό στο μοριακό τους βάρος. Τα πολυμερή παράγωγα ονομάζονται τανίνες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους: σε συμπυκνωμένες και υδρολυμένες τανίνες. Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι πολυμερή των φλαβονοειδών και οι υδρολυμένες περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ (Vinson, 1998).

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι τα πιο συχνά απαντώμενα φλαβονοειδή στα φυτά με κύριους εκπροσώπους τους την κερκετίνη και την καμπφερόλη. Πλούσιες πηγές αυτών αποτελούν τα κρεμμύδια, τα κατσαρά λάχανα, τα πράσα και τα μπρόκολα. Το κόκκινο κρασί και το τσάι

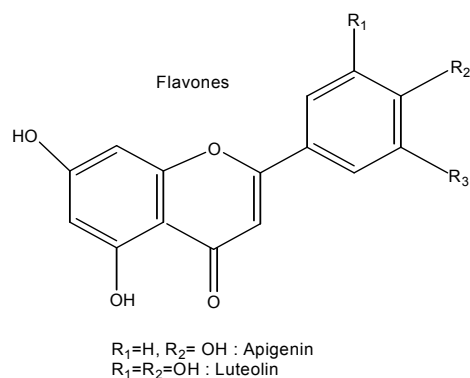
περιέχουν επίσης αρκετή ποσότητα φλαβονολών. Βρίσκονται κυρίως σε γλυκοζυλιομένη μορφή, συνδεδεμένα με μόρια γλυκόζης, ραμνόζης ή/και γαλακτόζης, αραβινόζης, ξυλόζης και γλυκουρονικού οξέος. Τα φρούτα συχνά περιέχουν 5-10 διαφορετικούς φλαβονολικούς γλυκοζίτες. Βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των φρούτων, στην επιδερμίδα και στα φύλλα επειδή η βιοσύνθεσή τους ενεργοποιείται από το φως. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωσή τους παρατηρούνται σε διαφορετικά φρούτα του ίδιου δέντρου και διαφορετικά τμήματα του ίδιου φρούτου λόγω της αυξημένης ή μειωμένης έκθεσης στο ηλιακό φως. Ομοίως, στα φυλλώδη λαχανικά όπως το λάχανο και το μαρούλι, η συγκέντρωσή τους είναι δέκα φορές μεγαλύτερη στα εξωτερικά πράσινα φύλλα σε σχέση με τα εσωτερικά ανοιχτόχρωμα που δεν εκτίθενται στο φως. Ακόμα τα τοματάκια έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονολών σε σύγκριση με τις μεγάλες τομάτες λόγω της διαφορετικής αναλογίας επιφάνειας/όγκου (Vinson, 1998, Manach et al., 2004, Tsao, 2010).



Σχήμα 2.2. Δομή φλαβονολών

Φλαβόνες

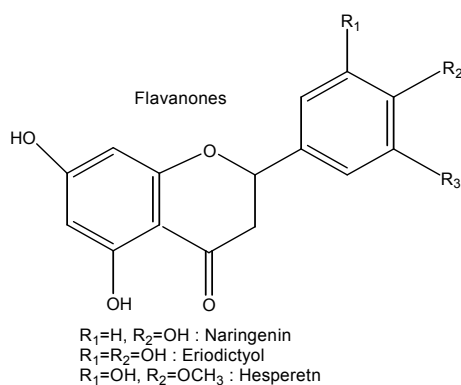
Οι φλαβόνες απαντώνται σε μικρότερη συχνότητα από τις φλαβονόλες στα φρούτα και τα λαχανικά. Η κύρια μορφή τους είναι οι εστέρες τους με μόρια λουτεολίνης ή απιγενίνης. Οι κύριες πηγές τους είναι το σέλινο (απιγενίνη), ο μαϊντανός, οι γλυκές κόκκινες πιπεριές (λουτεολίνη), η επιδερμίδα του κίτρου και ορισμένα δημητριακά, όπως το κεχρί και το σιτάρι (Vinson, 1998, Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004, Tsao, 2010).



Σχήμα 2.3. Δομή φλαβονών

Φλαβανόνες

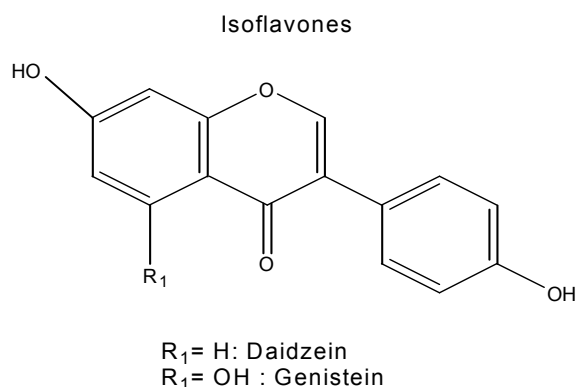
Στα ανθρώπινα τρόφιμα, οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες και σε ορισμένα αρωματικά φυτά όπως ο δυόσμος, αλλά υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή. Είναι ισομερή με τις χαλκόνες, που είναι μόρια με παρόμοια δομή με τις φλαβανόνες μόνο που πρόκειται για ακόρεστες ενώσεις, οι οποίες έχουν έναν ανοικτό δακτύλιο και η αρίθμησή τους είναι διαφορετική από αυτή των υπόλοιπων φλαβονοειδών. Οι κύριες φλαβανόνες είναι η ναριγκενίνη των γκρέιπφρουτ, η εσπερεδίνη των πορτοκαλιών και εριοδικτυόλη των λεμονιών. Γενικά γλυκοζυλιώνονται με δισακχαρίτες, που μπορεί να είναι είτε νεοεσπεριδόζη που προσδίδει μία πικρή γεύση, είτε ρουτινόζη που είναι άγευστη, στη θέση 7. Επειδή τα στερεά τμήματα των εσπεριδοειδών και ειδικά το λευκό σπογγώδες, καθώς και οι μεμβράνες που χωρίζουν τα διάφορα τμήματα είναι αυξημένα σε φλαβανονικό περιεχόμενο, ολόκληρο το φρούτο μπορεί να περιέχει έως και 5 φορές περισσότερες σε σχέση με ένα ποτήρι χυμό (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004, Tsao 2010).



Σχήμα 2.4. Δομή φλαβανονών

Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες είναι φλαβονοειδή με δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Παρόλο που δεν είναι στεροειδή έχουν ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 7 και 4 του φαινολικού δακτυλίου, ανάλογες με αυτές στο μόριο της οιστραδιόλης. Αυτό τους προσδίδει ψευδο-ορμονικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων και συνεπώς κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια αλλά και στη σόγια και τα επεξεργασμένα προϊόντα της, τα οποία αποτελούν τη βασική πηγή τους στην ανθρώπινη διαίτα. Υπάρχουν 3 κύριες ισοφλαβόνες στα τρόφιμα αυτά : η γενιστεΐνη, η δαϊζεΐνη και η γλυσιτεΐνη και βρίσκονται κυρίως με τη μορφή γλυκοζυλιωμένων παραγώγων, τα οποία υδρολύονται προς ελεύθερα μόρια με ζύμωση που πραγματοποιείται κατά την παρασκευή προϊόντων σόγιας. Το ισοφλαβονικό περιεχόμενο της σόγιας και των προϊόντων της διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη γεωγραφική ζώνη, τις συνθήκες καλλιέργειας, και τη διαδικασία (Vinson, 1998, Manach et al., 2004).



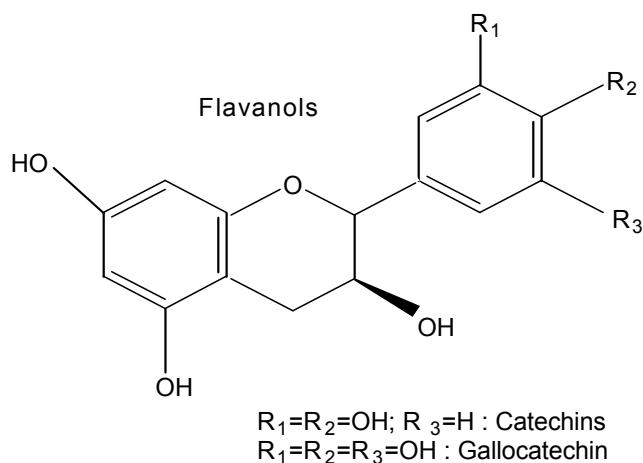
Σχήμα 2.5. Δομή ισοφλαβονών

Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες υπάρχουν τόσο με τη μονομερή τους δομή (κατεχίνες) όσο και την πολυμερή τους (προανθοκυανιδίνες) (Guendez et al., 2005). Οι κατεχίνες είναι οι κύριες φλαβανόλες και βρίσκονται σε πολλά είδη φρούτων (το βερίκοκο είναι η κύρια πηγή) και στο κόκκινο κρασί, αλλά οι πλουσιότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Στο μαύρο τσάι, το περιεχόμενό τους μειώνεται στο μισό καθώς περιέχει λιγότερες μονομερείς φλαβανόλες, οι οποίες έχουν οξειδωθεί κατά τη θέρμανση των φύλλων του τσαγιού προς

σχηματισμό σύνθετων συμπυκνωμένων πολυφαινολών, τις διμερείς θεαφλαβίνες και τα πολυμερή θεαρουβιγίνες. Οι κατεχίνες και οι επικατεχίνες είναι οι κύριες φλαβανόλες των φρούτων, ενώ οι γαλλοκατεχίνες, οι επιγαλλοκατεχίνες και οι εστέρες της επιγαλλοκατεχίνης, βρίσκονται σε συγκεκριμένα όσπρια, στα σταφύλια και κυρίως στο τσάι (Arts et al., 2000). Οι κατεχίνες είναι ισομερή με trans διαμόρφωση, ενώ οι επικατεχίνες με cis διαμόρφωση (Tsao, 2010). Σε αντίθεση με τις άλλες κατηγορίες των φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δε βρίσκονται γλυκοζυλιωμένες στα τρόφιμα. Οι επικατεχίνες του τσαγιού είναι ιδιαίτερα σταθερές όταν εκτίθενται σε θέρμανση εφ' όσον το pH είναι όξινο (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004). Οι κατεχίνες και οι επικατεχίνες μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή, που συχνά αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες (Tsao, 2010, Arts et al., 2005).

Οι προανθοκυανιδίνες, που επίσης είναι γνωστές και ως συμπυκνωμένες τανίνες, είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή των κατεχινών, που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς μεταξύ των ατόμων C₄ και C₈ (ή C₆). Ο βαθμός πολυμερισμού του στα τρόφιμα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Μέσω της δέσμευσής τους με πρωτεΐνες του σιέλου, οι συμπυκνωμένες τανίνες, είναι υπεύθυνες για τη στυφή γεύση που χαρακτηρίζει κάποια φρούτα, όπως τα μήλα, τα αχλάδια, τα σταφύλια, τα ροδάκινα και τα βατόμουρα, και κάποια ποτά-ροφήματα, όπως η μπίρα, το κρασί και το τσάι, αλλά και για την πικρή γεύση της σοκολάτας. Η σηπτικότητα αλλάζει κατά την ωρίμανση του τροφίμου και φαίνεται να εξαφανίζεται κατά την τελική ωρίμανση του, που οφείλεται σε αντιδράσεις πολυμερισμού των τανινών με μόρια ακεταλδεΐδης στο τρόφιμο (Scalbert et al., 2000). Οι αντιδράσεις πολυμερισμού φαίνεται να είναι υπεύθυνες και για τη μείωση της συγκέντρωσης των τανινών κατά την ωρίμανση του φρούτου. Είναι ιδιαίτερα δύσκολο να εκτιμήσουμε το περιεχόμενο των τροφίμων σε προανθοκυανιδίνες επειδή έχουν μεγάλη ποικιλία στη δομή και το μοριακό τους βάρος. Τα μόνα διαθέσιμα δεδομένα αφορούν στα διμερή και τριμερή που είναι τόσο άφθονα όσο οι ίδιες οι κατεχίνες (Vinson, 1998, Manach et al., 2004, Tsao, 2010).

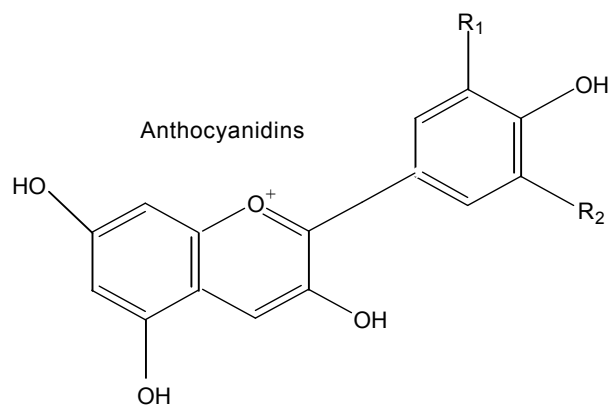


Σχήμα 2.6. Δομή φλαβανολών

Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτά μόρια που βρίσκονται κυρίως στο χυμοτόπιο, στους επιδερμικούς ιστούς των λουλουδιών και των φυτών και τους προσδίδουν το ροζ, το κόκκινο, το μπλε ή το μωβ χρώμα. Βρίσκονται σε διάφορες χημικές δομές, τόσο έγχρωμες όσο και άχρωμες ανάλογα με το pH. Οι ανθοκυανίνες στα φυτά απαντούν στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή και είναι σταθερές στο φως, στο pH και σε οξειδωτικές συνθήκες. Η αποδόμηση εμποδίζεται από τη γλυκοζυλίωση με ένα μόριο γλυκόζης στη θέση 3 ή την εστεροποίηση με τα προαναφερθέντα φαινολικά ή/και οργανικά οξέα (κιτρικό και μηλικό οξύ) ή τη δημιουργία συμπλόκων με άλλα φλαβονοειδή (Manach et al., 2004). Οι ανθοκυανίνες που έχουν βρεθεί ευρέως είναι οι κυανιδίνες, οι δελφινιδίνες και οι πελαργονιδίνες. Στην πραγματικότητα το 90% των ανθοκυανιδινών είναι βασισμένα στα παραπάνω και στα μεθυλιωμένα παράγωγά τους. Οι ανθοκυανίνες είναι χημικά σταθερές σε όξινα διαλύματα (Tsao, 2010, Anderson et al., 2006).

Στην ανθρώπινη διατροφή οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, σε ορισμένες ποικιλίες δημητριακών και στα φυλλώδη-ριζώδη λαχανικά, όπως η μελιτζάνα, το λάχανο, τα φασόλια, οι κόκκινες πατάτες και οι μοβ γλυκοπατάτες, ο βασιλικός, ο μάραθος, το κόκκινο μαρούλι, τα κρεμμύδια και τα ραδίκια, αλλά πιο άφθονα είναι στα φρούτα, όπως στα κόκκινα πορτοκάλια, στα μούρα, στα σταφύλια, στις φράουλες και στα κεράσια (Schalbert et al., 2000). Βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιδερμίδα του τροφίμου, εκτός από ορισμένα συγκεκριμένα κόκκινα φρούτα, φράουλες και κεράσια, που βρίσκονται και στη σάρκα (Manach et al., 2004).

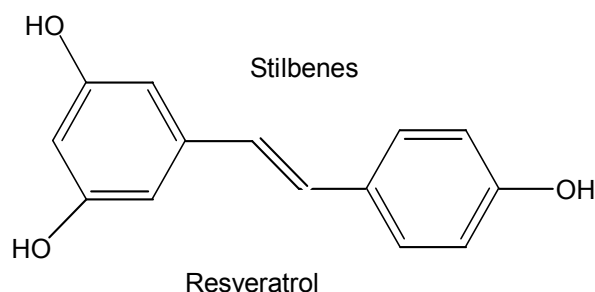


$R_1=R_2=H$: Pelargonidin
 $R_1=OH, R_2=H$: Cyanidin
 $R_1=R_2=OH$: Delphinidin
 $R_1=OCH_3, R_2=OH$: Petunidin
 $R_1=R_2=OCH_3$: Malvidin

Σχήμα 2.7. Δομή ανθοκυανιδινών

2.2.3 ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

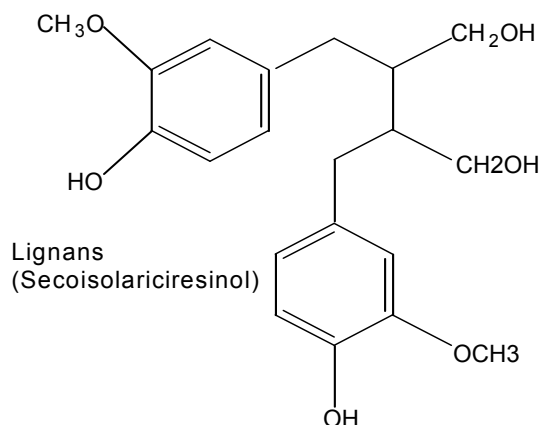
Συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Οι ομάδες υποκατάστατα του κινναμωμικού οξέος καθορίζουν τις ομάδες υποκατάστατα του δακτυλίου B των στιλβενίων. Δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στα προϊόντα φυτικής προέλευσης και βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διατροφή. Μία από αυτές, η ρεσβερατρόλη, η οποία έχει φανεί να έχει αντικαρκινική δράση από φαρμακετικά φυτά και η οποία έχει μελετηθεί αρκετά, βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση στα σταφύλια και το κόκκινο κρασί (Schalbert et al., 2000). Ωστόσο, επειδή η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στη διατροφή, η προστατευτική της δράση δεν είναι πιθανή σε μια συνηθισμένη δίαιτα (Manach et al., 2004, Tsao, 2010).



Σχήμα 2.8. Δομή στιλβενίων

2.2.4 ΛΙΓΝΑΝΕΣ

Οι λιγνάνες συντίθενται από δύο μόρια φαινυλ-προπανόνης. Μπορούν να καταταχθούν στα φυτοοιστρογόνα λόγω της δράσης τους ως αγωνιστές και ανταγωνιστές των οιστρογόνων (Schalbert et al., 2000). Βρίσκονται στο λιναρόσπορο με κύριες τις σεκοΐσολαρισιρεσινόλη και ματερερινόλη, τα δημητριακά (σιτάρι), τα όσπρια (φακές) τους σπόρους, τα φρούτα (κυρίως αχλάδια και δαμάσκηνα) και σε συγκεκριμένα λαχανικά (σκόρδο, καρότα και σπαράγγια). Ο λιναρόσπορος και το λινέλαιο αποτελούν την πιο πλούσια πηγή λιγνανών και η συγκέντρωσή τους μπορεί να είναι και 1000 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγκέντρωση τους στα άλλα τρόφιμα. Στον οργανισμό μεταβολίζονται προς εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Επειδή οι συγκεντρώσεις σεκοΐσολαρισιρεσινόλης και ματερερινόλης σε μια φυσιολογική διαίτα είναι χαμηλές, ενώ οι συγκεντρώσεις εντεροδιόλης και εντερολακτόνης στο αίμα και στα ούρα υψηλές, η ύπαρξη άλλων λιγνανών - πρόδρομων ενώσεων των μεταβολιτών αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι προφανής (Scalbert et al., 2000, Manach et al., 2004, Tsao, 2010, Arts et al., 2005).



Σχήμα 2.9. Δομή λιγνανών

2.2.5 ΑΛΛΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Άλλες διαιτητικές πολυφαινόλες δεν έχουν σαφώς προσδιοριστεί ως χημικές δομές και προκύπτουν από τον οξειδωτικό πολυμερισμό των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων. Αυτό μπορεί να συμβεί κατά την ωρίμανση και την επεξεργασία των τροφίμων (άλεσμα,

θέρμανση, αποθήκευση, μαγείρεμα και άλλες διαδικασίες). Αυτές οι φαινολικές ενώσεις κυριαρχούν στο μαύρο τσάι και το κρασί, και ειδικά στο παλαιωμένο (Scalbert et al., 2000).

2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Τα φρούτα και τα αφεψήματα όπως το τσάι και το κόκκινο κρασί αποτελούν τις βασικές πηγές πολυφαινόλων. Ωστόσο, για αρκετά φυτικά προϊόντα, το περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες δεν είναι αρκετά γνωστό διότι η γνώση περιορίζεται σε μία ή λίγες ποικιλίες και τα στοιχεία που υπάρχουν δεν αφορούν τα βρώσιμα τμήματα του τροφίμου. Για παράδειγμα, εξωτικά φρούτα και ορισμένα δημητριακά δεν έχουν ακόμα αναλυθεί. Επιπλέον, πολυάριθμοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ποικιλίας, μπορούν να επηρεάσουν το πολυφαινολικό περιεχόμενο των φυτών. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν η ωρίμανση κατά την ώρα της συγκομιδής, περιβαλλοντικοί παράγοντες, η αποθήκευση και η επεξεργασία του φυσικού προϊόντος (Manach et al., 2004).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν σημαντικά στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων. Μπορεί να είναι εδαφολογικοί (έκθεση στον ήλιο, βροχοπτώσεις) ή αγρονομικοί (καλλιέργειες σε θερμοκήπιο ή σε χωράφι, βιολογική καλλιέργεια, υδροπονική καλλιέργεια κτλ). Η έκθεση στον ήλιο επιδρά στα περισσότερα φλαβονοειδή. Ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση και την αναλογία των διάφορων πολυφαινόλων στα φυτικά προϊόντα. Γενικά, η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ η συγκέντρωση των ανθοκυανινών αυξάνεται. Οι Arts και συν. (2000), αναφέρουν ότι οι κατεχίνες μειώνονται κατά την ωρίμανση τόσο στα μήλα και στα αχλάδια, όσο και στα κεράσια και τις φράουλες.

Αρκετές πολυφαινόλες, ειδικά τα φαινολικά οξέα, εμπλέκονται άμεσα στην ανταπόκριση των φυτών σε διάφορους τύπους στρες : συνεισφέρουν στην επούλωση με την παραγωγή λιγνίνης από τις κατεστραμμένες περιοχές, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, και η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί μετά τη μόλυνση (Parr et al., 2000). Το φαινολικό περιεχόμενο των λαχανικών που παράγονται με οργανική καλλιέργεια είναι υψηλότερο από εκείνο των λαχανικών που αναπτύσσονται χωρίς στρες, όπως εκείνα που καλλιεργούνται σε εναλλακτικές ή υδροπονικές συνθήκες. Αυτό φάνηκε και στην περίπτωση των φραουλών, των μαύρων βατόμουρων και του καλαμποκιού (Asami et al., 2003).

Με τις γνώσεις που έχουμε αποκτήσει μέχρι τώρα είναι δύσκολο να προσδιορίσει κανείς για κάθε οικογένεια φυτών τους παράγοντες κλειδιά που είναι υπεύθυνοι για την ποικιλία που υπάρχει στο περιεχόμενο της κάθε πολυφαινόλης και τη σημαντικότητα των παραγόντων αυτών. Περαιτέρω και εκτεταμένη ανάλυση είναι απαραίτητη για να αποκτηθεί αυτή η πληροφορία. Για παράδειγμα, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε p-κουμαρικό οξύ περισσότερων από 500 ποικιλίες κόκκινων κρασιών, έδειξε ότι οι γενετικοί παράγοντες είναι πιο σημαντικοί από την έκθεση στο φως ή το κλίμα (Clifford, 2000).

2.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & ΥΓΕΙΑ

Η διαφοροποιημένη χρήση του οξυγόνου ή/και ο αυξημένος σχηματισμός δραστικών μορίων οξυγόνου (ROS), συμβάλλουν στην εμφάνιση ενός μεγάλου αριθμού εκφυλιστικών ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση και η εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου. Τα ROS σχηματίζονται κατά τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και ελέγχονται από την αντιοξειδωτική άμυνα. Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS μπορεί να ξεπεράσει την ενδοκυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα, προκαλώντας την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, υπεροξείδωση των λιπιδίων, τροποποίηση των πρωτεϊνών και θραύσεις στο DNA. Υπερβολικές ποσότητες ROS μπορεί να οδηγήσουν στην εξάντληση της προστατευτικής ολικής γλουταθειόνης (GSH).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των λιποπρωτεϊνών είναι ευάλωτα στα ROS. Στην περίπτωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL), οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεση και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης στους ανθρώπους, οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στην LDL του πλάσματος και την οξειδώνουν (oxLDL). Η oxLDL είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα οι οποίοι δεσμεύουν τα μονοκύτταρα και προωθούν τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, καθορίζοντας την εμφάνιση φλεγμονωδών διαδικασιών.

Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, του κρασιού, του τσαγιού, του κακάο, των φρούτων, και των λαχανικών έχουν συσχετιστεί με ευεργετικές δράσεις στην υγεία. Έχειδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτική δράση και βοηθούν στη μείωση των επιπέδων της oxLDL και την αύξηση της αντιοξειδωτικής GSH. Η oxLDL συνδέεται με την παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, ένα βασικό αρχικό στάδιο της καρδιαγγειακής νόσου. Οι πολυφαινόλες έχουν

βρεθεί ότι δρουν κατά της οξείδωσης της LDL, και η αντιοξειδωτική τους αυτή ικανότητα σχετίζεται με τη χημική τους δομή (Kaliora et al., 2009).

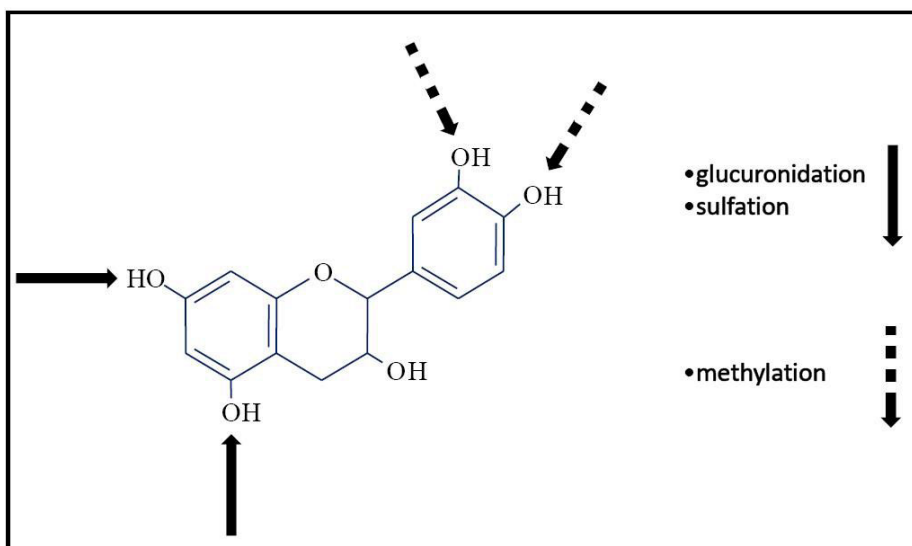
Άλλες μελέτες δείχνουν την επίδραση των πολυφαινολών στη βελτίωση της εντερικής φλεγμονής, στην παχυσαρκία, στο διαβήτη, στην υπέρταση, και στο μεταβολικό σύνδρομο. Οι επιπτώσεις στην υγεία των πολυφαινολών σχετίζονται με την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και την αντιοξειδωτική τους δράση. Οι ελεύθερες ρίζες και η οξείδωση είναι σημαντικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση κύριων χρόνιων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου. Πρόσφατα στοιχεία, ωστόσο, έδειξαν ότι η επίδραση των αντιοξειδωτικών είναι λιγότερο σημαντική από ό,τι αναμενόταν, καθώς οι αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες απορροφώνται ελάχιστα και μεταβολίζονται εκτενώς σε μεταβολίτες που δεν έχουν αντιοξειδωτική δράση (Huang et al., 2005, Wolfe et al., 2007, Wolfe et al., 2008, Finley et al., 2011). Επιπλέον, πολλές από αυτές ενώσεις είναι ελάχιστα βιοδιαθέσιμες και δεν φτάνουν ποτέ στους ιστούς, που ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση, σε επαρκείς ποσότητες (Manach et al., 2004, Manach et al., 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι πολυφαινόλες, οι οποίες είναι το πιο κοινό συστατικό στη διατροφή του ανθρώπου δεν είναι απαραίτητα τα πιο ενεργά συστατικά μέσα στο σώμα, είτε επειδή έχουν χαμηλότερη εγγενή δραστηριότητα ή επειδή ελάχιστα απορροφούνται από το έντερο είτε γιατί μεταβολίζονται σε μεγάλο βαθμό ή γρήγορα αποβάλλονται. Επιπλέον, οι μεταβολίτες που εντοπίζονται στο αίμα και στα όργανα-στόχους και είναι αποτέλεσμα πεπτικής και ηπατικής δραστηριότητας, μπορεί να διαφέρουν από την αρχική ουσία όσον αφορά τη βιολογική τους δράση (Manach et al., 2004). Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών ποικίλει ανάλογα με το είδος τους και δε συνεπάγεται ότι αυτές που είναι πιο άφθονες στη διατροφή μας έχουν και καλύτερο προφίλ βιοδιαθεσιμότητας. Επομένως είναι σημαντικό να γνωρίζουμε όχι μόνο την περιεκτικότητα των τροφίμων σε πολυφαινόλες και άλλα συστατικά αλλά και την βιοδιαθεσιμότητά τους στον οργανισμό. Βιοδιαθέσιμο είναι ένα συστατικό ή μια ουσία που έχει καταναλωθεί από του στόματος, και ένα τμήμα του φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία και σε συγκεκριμένο σημείο στο σώμα και μπορεί να επιτελέσει τη βιολογική του δράση (Visioli et al., 2011).

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός κοινού μονοπατιού. Το άγλυκον μπορεί να απορροφηθεί από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, οι περισσότερες πολυφαινόλες είναι παρούσες στα τρόφιμα ως εστέρες, γλυκοζίτες ή πολυμερή που δε μπορούν να απορροφηθούν στην εγγενή μορφή τους. Οι ουσίες αυτές πρέπει πρώτα να υδρολυθούν από τα πεπτικά ένζυμα ή από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και στη συνέχεια να απορροφηθούν. Κατά την απορρόφηση, οι πολυφαινόλες εμφανίζονται συζευγμένες στο λεπτό έντερο και στη συνέχεια στο ήπαρ. Η διαδικασία περιλαμβάνει μεθυλίωση, θείωση και γλυκουρονιδίωση. Αυτή είναι μια μεταβολική διεργασία αποτοξίνωσης κοινή για πολλές ξеноβιοτικές ουσίες που περιορίζει πιθανές τοξικές επιδράσεις και που αυξάνει την υδροφιλικότητα τους ώστε να διευκολύνεται η αποβολή τους στα ούρα και τη χολή.



Σχήμα 3.1. Οι πιθανές θέσεις σύζευξης των φαινολικών συστατικών απεικονίζονται σχηματικά. Τα διακεκομμένα βέλη δηλώνουν τις πιθανές θέσεις μεθυλίωσης ενώ τα πλήρη βέλη δηλώνουν τις πιθανές θέσεις γλυκουρονιδίωσης και θείωσης (Πηγή : D' Archivio et al., 2010).

Οι μηχανισμοί σύζευξης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί ώστε το άγλυκον ή να απουσιάζει από το αίμα ή να εντοπίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις μετά την κατανάλωση συγκεκριμένης ποσότητας. Οι κυκλοφορούντες πολυφαινόλες είναι συζευγμένα παράγωγα που δεσμεύονται σε μεγάλο βαθμό από την αλβουμίνη κι έτσι έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν σε ιστούς, ιδιαίτερα σε εκείνους που μεταβολίζονται. Ωστόσο, η ικανότητά τους να συσσωρεύονται στους συγκεκριμένους ιστούς-στόχους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Οι πολυφαινόλες και τα παράγωγά τους αποβάλλονται κυρίως στα ούρα και τη χολή. Απεκκρίνονται μέσω της χοληφόρου κυκλοφορίας στο δωδεκαδάκτυλο όπου υποβάλλονται στη δράση βακτηριακών ενζύμων (κυρίως γλυκουρονιδασών) στα άπω τμήματα του εντέρου, μετά τα οποία μπορούν να απορροφηθούν εκ νέου. Αυτή η εντεροηπατική κυκλοφορία οδηγεί στην παρουσία πολυφαινολών μέσα στο σώμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Manach et al., 2004).

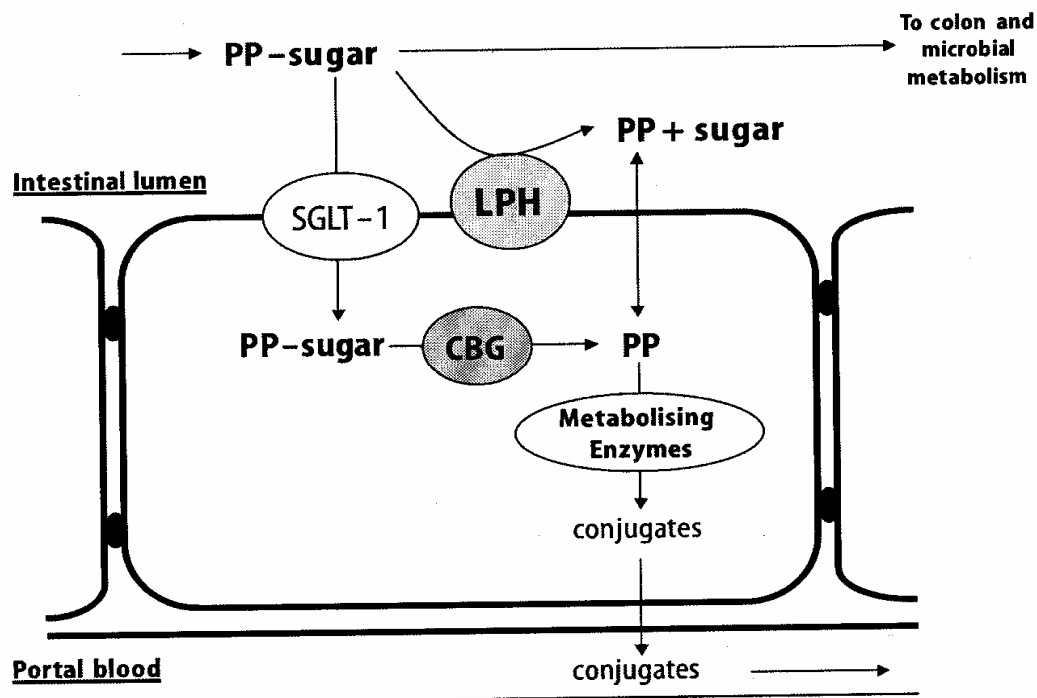
3.2 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Λίγα στοιχεία υπάρχουν μέχρι σήμερα για το μηχανισμό της γαστρεντερικής απορρόφησης των πολυφαινολών. Οι περισσότερες είναι πιθανόν πολύ υδρόφιλες για να διαπεράσουν τα τοιχώματα των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου με παθητική διάχυση.

Επιπλέον οι μεταφορείς που βρίσκονται στη μεμβράνη και θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην απορρόφηση των πολυφαινολών δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί. Μέχρι σήμερα, ο μοναδικός μηχανισμός ενεργητικής μεταφοράς που έχει περιγραφεί, είναι ένας Na^+ - εξαρτώμενος κορεσμένος μεταφορικός μηχανισμός, ο οποίος σχετίζεται με την απορρόφηση της κερκετίνης, του κινναμωμικού και του φερουλικού οξέος στη νήστιδα ποντικών.

Στα τρόφιμα, όλα τα φλαβονοειδή, εκτός από τις φλαβαν-3-όλες βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και η γλυκοζυλίωση επηρεάζει την απορρόφησή τους. Η τύχη των γλυκοζιτών στο στομάχι δεν είναι ξεκάθαρη. Πειράματα με τη χρήση χειρουργημένων ποντικών ώστε η απορρόφηση να περιορίζεται στο στομάχι, έδειξαν ότι η απορρόφηση σε γαστρικό επίπεδο ήταν δυνατή για φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη αλλά όχι για τους γλυκοζίτες τους. Για να επιτύχουν επαρκείς συγκεντρώσεις στον τόπο δράσης τους οι πολυφαινόλες που έχουν καταναλωθεί πρέπει να ξεπεράσουν μια σειρά εμποδίων. Αρχικά, πρέπει να διαλυθούν στα υγρά του γαστρεντερικού σωλήνα και να επιβιώσουν στο χαμηλού pH περιβάλλον που συναντούν στο στομάχι. Μπορούν επίσης να υποστούν διάσπαση και μεταβολισμό από εντερικά ένζυμα όπως οι γλυκοσιδάσες, εστεράσες, οξειδάσες και υδρολάσες. Μια ομάδα εντερικών ενζύμων, τα MAO (monoamine oxidase enzymes), απαμινώνουν τις διαιτητικές μονοαμίνες και είναι ένας πιθανός στόχος για το σχεδιασμό των συνεργειών (στρατηγικές που πιθανόν να είναι χρήσιμες για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και συνεπώς της βιολογικής δράσης των πολυφαινολών). Οι περισσότεροι από τους γλυκοζίτες πιθανών αντιστέκονται στην όξινη υδρόλυση του στομάχου και έτσι φτάνουν άθικτοι στο δωδεκαδάκτυλο (Manach et al., 2004, Scheepens et al., 2010).

Στο λεπτό έντερο πραγματοποιείται υδρόλυση, με τη δράση της LPH (Lactase Phloridizin Hydrolase) των επιθηλιακών κυττάρων των μικρολαχνών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του άγλυκου. Η LPH παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για τους O-b-D-γλυκοζίτες των φλαβονοειδών και το απελευθερωθέν άγλυκον μπορεί έπειτα να εισέλθει στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση, ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιποφιλικότητας και της εγγύτητάς του στην κυτταρική μεμβράνη. Ένας εναλλακτικός τρόπος υδρόλυσης συμβαίνει με την CBG (cytosolic b-glucosidase) στο εσωτερικό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Για να πραγματοποιηθεί αυτού του είδους η υδρόλυση, οι πολικοί γλυκοζίτες πρέπει να μεταφερθούν μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα με ενεργή μεταφορά και συγκεκριμένα με έναν Na^+ -εξαρτώμενο μεταφορέα γλυκόζης, τον SGLT1. Έτσι, έχει γίνει αποδεκτό ότι υπάρχουν δύο πιθανές διαδρομές με τις οποίες οι συζευγμένοι γλυκοζίτες υδrolύονται και το ελεύθερο άγλυκον εμφανίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, η «LPH / διάχυση» και η «Μεταφορά / CBG» (Grozier et al., 2009).



Σχήμα 3.2. Σχηματική παράσταση της απορρόφησης των γλυκοζιτών των πολυφαινολών. Οι γλυκοζίτες των πολυφαινολών φτάνουν στο περιβάλλον του λεπτού εντέρου εφόσον δεν απορροφώνται από το στομάχι. Στο λεπτό έντερο μπορεί να υδρολυθούν από την LPH ή να μεταφερθούν στο εσωτερικό του εντέρου μέσω του SGLT-1 και μετά να υδρολυθούν από την CBG προς ελεύθερα μόρια τα οποία μετά θα μεταβολιστούν προς συζευγμένες πολυφαινόλες [Πηγή :Nemeth et al., 2003].

Πριν τη μεταφορά στην κυκλοφορία του αίματος, το άγλυκον υφίσταται μεταβολισμό, σχηματίζοντας σουλφίδια, γλυκουρονίδια, ή/και μεθυλιωμένους μεταβολίτες μέσω της αντίστοιχης δράσης SULT (sulfotransferases), UGTs (uridine-50-diphosphate glucuronosyltransferases) και COMT (catechol-O-methyltransferases). Η COMT καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου από την αδενοσυλ-μεθειονίνη στις πολυφαινόλες που περιέχουν ένα διφαινολικό τμήμα, όπως η κερκερίνη, η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ και η κυανιδίνη. Αυτό το ένζυμο είναι παρόν σε πολλούς ιστούς, αλλά η δραστηριότητά του είναι υψηλότερη στο ήπαρ και τα νεφρά. Η SULT καταλύει τη μεταφορά του σουλφιδικού τμήματος από τη φωσφοαδενοσίνη-φωσφοσουλφίδιο σε μια ομάδα υδροξυλίου σε διάφορα υποστρώματα,

μεταξύ των οποίων είναι και οι πολυφαινόλες. Η θείωση συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ. Οι UGTs είναι ένζυμα συνδεδεμένα με τη μεμβράνη και βρίσκονται σε πολλούς ιστούς, καταλύοντας την μεταφορά ενός γλυκουρονικού οξέος από το UDP-γλυκουρονικό οξύ στις πολυφαινόλες. Η γλυκουρονίδωση των πολυφαινόλων γίνεται πρώτα στα εντεροκύτταρα πριν από την περαιτέρω σύζευξη στο ήπαρ (Boersma et al., 2002).

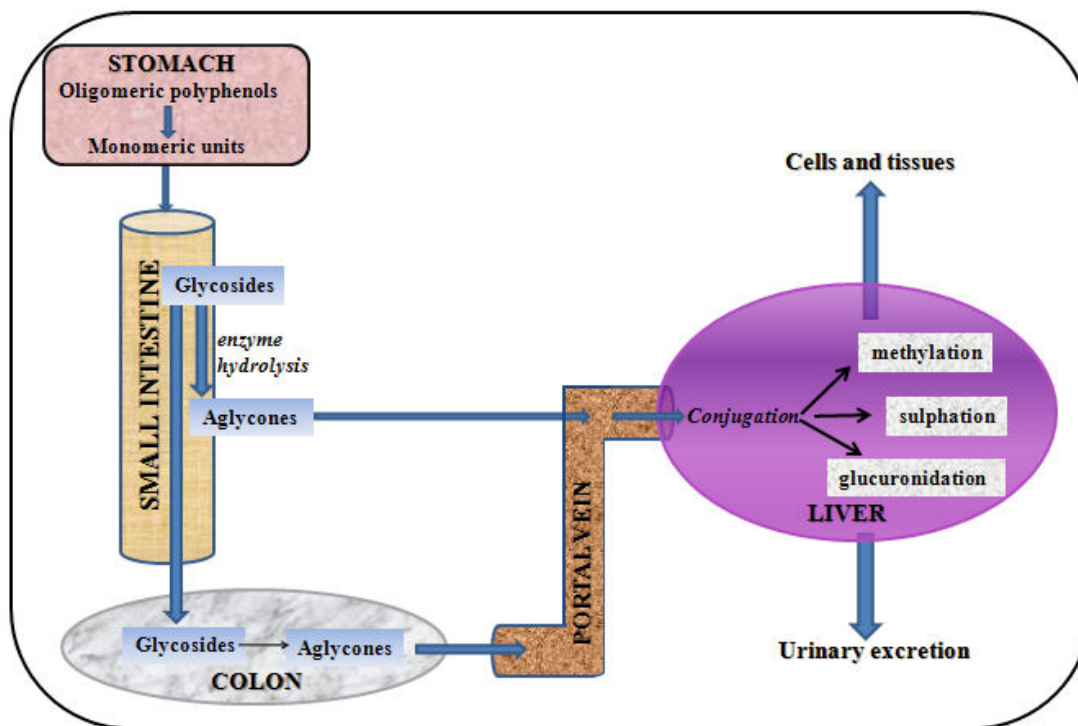
Όταν οι μεταβολίτες περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος, ξεκινά η φάση II του μεταβολισμού, με περαιτέρω μετατροπές που πραγματοποιούνται στο ήπαρ, όπου εξαιτίας της εντεροηπατικής κυκλοφορίας παρατηρείται ανακύκλωση μεταβολιτών και επιστροφή στο λεπτό έντερο (Grozier et al., 2009).

Μόνο το άγλυκον και κάποιοι γλυκοζίτες μπορούν να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο, ενώ πολυφαινόλες που συνδέονται με μία ρίζα ραμνόζης πρέπει να περιέλθουν στο κόλον και εκεί να υδρολυθούν από ραμνοσιδάσες της μικροχλωρίδας προτού απορροφηθούν. Το ίδιο πιθανόν συμβαίνει και στις πολυφαινόλες που συνδέονται με αραβινόζη ή ξυλόζη αν και χρειάζεται περεταίρω έρευνα.

Επειδή η απορρόφηση εμφανίζεται λιγότερο στο παχύ έντερο σε σχέση με το λεπτό έντερο, λόγω της μικρότερης περιοχής ανταλλαγής καθώς και της μικρότερης πυκνότητας των συστημάτων μεταφοράς, κατά γενικό κανόνα, οι γλυκοζίτες με ραμνόζη απορροφώνται βραδύτερα και λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με το άγλυκον και τους γλυκοζίτες. Αυτό έχει φανεί ξεκάθαρα σε ανθρώπους, όσον αφορά στους γλυκοζίτες της κερκετίνης: η μέγιστη απορρόφηση πραγματοποιείται 0,5-0,7 ώρες μετά την πρόσληψη 4'-γλυκοζιτών της κερκετίνης και 6-9 ώρες μετά την πρόσληψη ίσης ποσότητας ρουτίνης (κερκετίνη-3-ρουτινοζίτες). Η βιοδιαθεσιμότητα της ρουτίνης είναι μόλις 15-20% από αυτή του 4'γλυκοζίτη της κερκετίνης (Graefe EU et al., 2001).

Στην περίπτωση των γλυκοζιτών κερκετίνης, η απορρόφηση λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο και ο βαθμός απορρόφησης είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν του άγλυκου (Morand et al., 2000).

Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της απορρόφησης των πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες τροποποιούνται σημαντικά κατά την απορρόφηση. Οι γλυκοζίτες μπορούν να υδρολυθούν στο λεπτό έντερο ή στο κόλον και το άγλυκον που απελευθερώνεται μπορεί να απορροφηθεί. Προτού μεταφερθεί στην κυκλοφορία του αίματος υφίσταται δομικές τροποποιήσεις κυρίως στο ήπαρ (Πηγή : D' Archivio και συν. 2010).



3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Όπως έχει αναφερθεί, οι πολυφαινόλες που δεν έχουν απορροφηθεί στο λεπτό έντερο φθάνουν στο παχύ έντερο. Η μικροχλωρίδα εκεί υδρολύει τους γλυκοζίτες σε άγλυκα και εν συνεχεία τα μεταβολίζει σε διάφορα αρωματικά οξέα. Πιο συγκεκριμένα, οι φλαβανόλες παράγουν κυρίως υδροξυφαινυλοξικά οξέα, οι φλαβόνες και οι φλαβανόνες υδροξυφαινυλοπροπιονικά οξέα, και οι φλαβανόλες φαινυλ-βαλερολακτόνες και υδροξυφαινυλοπροπιονικά οξέα. Τα οξέα αυτά στη συνέχεια μεταβολίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος. Τα μεταβολικά μονοπάτια θεωρούνται γνωστά, όσον αφορά στα ζώα, καθώς επίσης και η σχέση μεταξύ της χημικής δομής και της αποδόμησης των πολυφαινόλων. Για παράδειγμα, η απουσία ενός ελεύθερου υδροξυλίου στις θέσεις 5, 7, 4' προστατεύει την ένωση από τη διάσπαση.

Ωστόσο, τα δεδομένα όσον αφορά στον άνθρωπο είναι περιορισμένα. Οι διατομικές διαφοροποιήσεις, η σύνθεση της μικροχλωρίδας και η συνήθης διατροφή, καθώς και το πώς αυτά επηρεάζουν την παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών, πρέπει να αξιολογούνται. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα και η απέκκριση στα ούρα των μικροβιακών μεταβολιτών στους ανθρώπους, μπορεί να είναι υψηλότερες από εκείνες των μεταβολιτών στους ιστούς, ιδιαίτερα για τις πολυφαινόλες όπως αυτές που περιέχονται στο κρασί και δεν απορροφώνται εύκολα (Manach et al., 2004).

3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθούν, καθώς υπάρχουν πολλοί πιθανοί παράγοντες που επηρεάζουν είτε άμεσα τη βιοδιαθεσιμότητα, είτε έμμεσα, μειώνοντας το πολυφαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων. Τα αποτελέσματα που είναι διαθέσιμα για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών προέρχονται από *in vivo* μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε άπαξ μια δόση τροφίμου που περιείχε την υπό εξέταση πολυφαινόλη (single dose). Με τον τρόπο αυτό, η αύξηση της συγκέντρωσης στο αίμα είναι μεταβατική, και αντανakλά κυρίως την ικανότητα του οργανισμού να παραλαμβάνει την πολυφαινόλη από το χορηγούμενο τρόφιμο (food matrix). Ωστόσο, η παρατηρούμενη αυτή αύξηση μπορεί να οδηγεί σε μικρή μόνο πρόσληψη από τους ιστούς και επομένως μειωμένη βιολογική δράση. Αντιθέτως, υπό τις συνθήκες συνήθους πρόσληψης, ακόμα και μικρές ποσότητες πολυφαινολών μπορεί να απορροφώνται "επανελημμένα" και μπορεί να αυξήσουν σημαντικά τις συγκεντρώσεις τόσο στο πλάσμα όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Οριστικά αποτελέσματα για τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιολογική δράση οποιασδήποτε φαινολικής ένωσης είναι δύσκολο να βρεθούν, εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης του μίγματος των πολυφαινολών που βρίσκονται στα υπό εξέταση τρόφιμα (Massimo D' Archivio et al., 2010).

Εξωτερικοί παράγοντες

Πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν το περιεχόμενο των πολυφαινολών στα φυτά και συνεπώς τη βιοδιαθεσιμότητα τους στον άνθρωπο. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι περιβαλλοντικοί, όπως η έκθεση στον ήλιο και οι βροχοπτώσεις (Manach et al., 2004, Gomez-Rico et al., 2006). Επιπλέον, ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει τη συγκέντρωση και την αναλογία των διαφόρων πολυφαινολών με διαφορετικό τρόπο: γενικά, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών

οξέων μειώνονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών αυξάνονται. Έχει ευρέως αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο παρθένο ελαιόλαδο μειώνεται με την ωρίμανση των καρπών (Gomez-Rico et al., 2006, Bonoli et al., 2004).

Παράγοντες που σχετίζονται με την επεξεργασία των τροφίμων

Η **θερμική επεξεργασία** επηρεάζει το περιεχόμενο και, κατά συνέπεια, το ποσό της απορροφούμενων φαινολικών ενώσεων με διαφορετικούς τρόπους. Μέθοδοι θερμικής επεξεργασίας προκάλεσαν σημαντική μείωση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και των αντιοξειδωτικών τους δράσεων στα φασόλια (Xu et al., 2009) και τα όσπρια (Xu et al., 2009). Ωστόσο, οι Rocha- Guzman et al. ανέφεραν σημαντική αύξηση στην αντιοξειδωτική δράση στα φασόλια (*Phaseolus vulgaris* L.), μαγειρεμένα στους 121°C. Ομοίως, οι Khatun et al. παρατήρησαν ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση αυξήθηκαν μετά τη θερμική επεξεργασία πολλών μπαχαρικών. Επίσης έχει φανεί ότι οι ανθοκυανίνες της συμβατικής σταφίδας διατηρούνται σε ποσοστό 60% με το πέρας 50 min θερμικής επεξεργασίας στους 100° C (Κωνσταντίνου, 2008).

Το **μαγείρεμα** έχει αξιοσημείωτη επίδραση στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων, καθώς επηρεάζει τόσο τη βιοδιαθεσιμότητα όσο και τη βιολογική τους δράση. Οι Miglio et al. έδειξαν ότι οι φυτικοχημικές παράμετροι και οι διατροφικές ιδιότητες σε ορισμένα λαχανικά (κυρίως καρότα, κολοκυθάκια και μπρόκολο) τροποποιούνται με τις κοινές πρακτικές μαγειρέματος. Τα καρότα χάνουν εντελώς τις πολυφαινόλες τους, μετά το βράσιμο, ενώ η θέρμανση στον ατμό και το τηγάνισμα έχουν λιγότερο αρνητικά αποτελέσματα (-43% και -31%, αντίστοιχα). Όσον αφορά στο μπρόκολο και τα κολοκύθια, το βράσιμο και το τηγάνισμα προκάλεσαν μεγαλύτερη απώλεια των ολικών φαινολών σε σύγκριση με τον ατμό. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι για κάθε λαχανικό, πρέπει να προτιμάται συγκεκριμένη μέθοδος μαγειρέματος για τη διατήρηση ή τη βελτίωση των θρεπτικών τους ιδιοτήτων.

Αν και η κατανάλωση ωμών λαχανικών υποστηρίζεται ευρέως, υπάρχουν ενδείξεις ότι η βιοδιαθεσιμότητα πολλών προστατευτικών ενώσεων αυξάνεται όταν μαγειρευτούν τα λαχανικά. Μια σημαντική αύξηση στα επίπεδα της ναριγκενίνης και του χλωρογενικού οξέος στο πλάσμα βρέθηκε μετά την κατανάλωση μαγειρεμένων ντοματών σε σχέση με τα νωπά προϊόντα (Bugianesi et al., 2004). Το μαγείρεμα στον ατμό μπρόκολου είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της περιεκτικότητας του σε πολυφαινόλες και της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Gliszczyńska-Swigło et al., 2006).

Επιπλέον, η **αποθήκευση** επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων. Η αποθήκευση χυμού μήλου για 11 μήνες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των φαινολικών οξέων κατά 5-21% (Gliszczynska-Swiglo et al., 2003). Η μείωση του περιεχόμενου ελεύθερου p-κουμαρικού οξέος παρατηρήθηκε επίσης σε κατεψυγμένα κόκκινα βατόμουρα (Mullen et al., 2002). Μετά την αποθήκευση σε ψύξη, το μπρόκολο έχασε περίπου το 75% των καφεουλοκινικό παραγώγων και το 40-50% του σιναπικού οξέος και των φερουλόυλ- παραγώγων (Vallejo et al., 2003). Μελετήθηκε επίσης, το πολυφαινόλικό περιεχόμενο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε διάστημα μεγαλύτερο από επτά μήνες στο σκοτάδι σε ερυθρά κρασιά: οι ανθοκυανίνες μειώθηκαν κατά 88%, ενώ δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στο συνολικό φλαβονολικό περιεχόμενο (Zafrilla et al., 2003).

Από την άλλη πλευρά, τα μήλα (ποικιλία Annurca) παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε χλωρογενικό οξύ μετά από τέσσερις μήνες αποθήκευσης (από 101 σε 144 mg/kg νωπού βάρους) (Napolitano et al., 2004). Επίσης και το περιεχόμενο των φαινολικών οξέων αυξήθηκε όταν τα καρότα ήταν αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες (Klaiber et al., 2005).

Αλλαγές που συμβαίνουν σε φαινολικές ενώσεις στο παρθένο ελαιόλαδο, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, έχουν αναφερθεί από αρκετούς συγγραφείς. Τριάντα-τέσσερα μπουκάλια διαφορετικής ποιότητας με έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) ήταν αποθηκευμένα για έξι μήνες σε συνθήκες παρόμοιες με εκείνες στα σημεία πώλησης: το συνολικό πολυφαινόλικό περιεχόμενο μειώθηκε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Gutierrez et al., 2002). Υπό διάχυτο φως, περίπου το 45% των φαινολών χάθηκαν μέσα σε τέσσερις μήνες (Okogeri et al., 2002). Από την άλλη πλευρά, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι οι αντιοξειδωτική δράση των EVOOs, κατά τη διάρκεια οκτώ μηνών αποθήκευσης σε κλειστά μπουκάλια στο σκοτάδι, διατηρήθηκε (Lavelli et al., 2002).

Τεχνολογικές διαδικασίες, όπως η **ομογενοποίηση** των λαχανικών, θα μπορούσαν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών με την τροποποίηση του τροφίμου, όπως έχει αποδειχθεί για το λυκοπένιο και το β-καροτένιο, δύο από τα πιο σημαντικά καροτενοειδή. Στην πραγματικότητα έχει δειχθεί ότι η ντομάτα, σε μορφή πουρέ ή πάστας είναι πιο βιοδιαθέσιμη πηγή λυκοπενίου από ότι η ωμή (Porrini et al., 1998).

Παράγοντες που σχετίζονται με τα τρόφιμα

Οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της σύστασης των τροφίμων στη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων αυξάνονται τα τελευταία χρόνια. Άμεση

αλληλεπίδραση μεταξύ των επιμέρους πολυφαινολών και ορισμένων συστατικών των τροφίμων, όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οι φυτικές ίνες, το λίπος και το αλκοόλ μπορεί να συμβεί, επηρεάζοντας την απορρόφηση τους. Οι Meng et al. πρότειναν την πιθανή επίδραση των περιεχόμενων σακχάρων στη βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης, και έδειξαν τη χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα των γλυκοζιτών ρεσβερατρόλης σε χυμό σταφυλιών σε σύγκριση με τα άγλυκα. Από την άλλη πλευρά, η απορρόφηση της κερκετίνης, της κατεχίνης, και της ρεσβερατρόλης στον άνθρωπο έχει αποδειχθεί ότι είναι ισοδύναμη, όταν αυτές οι πολυφαινόλες προσλήφθηκαν από τρία διαφορετικά τρόφιμα: το λευκό κρασί, το χυμό σταφυλιού, και το χυμός λαχανικών (Goldberg et al., 2003).

Η πιθανή επίδραση του διατροφικού λίπους στη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών μελετήθηκε από τους Lesser et al., δείχνοντας ότι το περιεχόμενο διαιτητικό λίπος βελτιώνει την απορρόφηση των φλαβονοειδών. Επίσης, το περιεχόμενο λίπος του κακάο ενισχύει την πέψη ορισμένων φαινολικών συστατικών (κυρίως προκυανιδίνες) (Ortega et al., 2009). Από την άλλη, μπορεί να υπάρχει μια φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των φλαβονοειδών και του λίπους, που επιβραδύνει το χρόνο διέλευσης στο λεπτό έντερο. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση, αλλά όχι τη μείωση της απορρόφησης των φλαβονοειδών, όπως στην περίπτωση των πλούσιων σε ανθοκυανίνη φραουλών όταν τρώγονται με κρέμα (Mullen et al., 2008). Αντίθετα, το πλήρες σε λιπαρά γιαούρτι, είχε μικρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβανονών του χυμού πορτοκαλιού (Mullen et al., 2008).

Η πιθανή επίδραση των φυτικών ινών στην βιοδιαθεσιμότητα της κερκετίνης μελετήθηκε από τους Tamura et al. Ανέφεραν ότι η πηκτίνη θα μπορούσε να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα της κερκετίνης από ρουτίνη, τροποποιώντας το μεταβολική δραστηριότητα της εντερικής χλωρίδας ή/και τη φυσιολογική λειτουργία του εντέρου. Πρόσφατα έχει επίσης δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες που συνδέονται με φυτικές ίνες είναι τουλάχιστον εν μέρει βιοδιαθέσιμες στον άνθρωπο, αν και οι φυτικές ίνες φαίνεται να καθυστερούν την απορρόφηση (Perez-Jimenez et al., 2009).

Αλληλεπίδραση με άλλες ενώσεις

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα είναι η αλληλεπίδραση με άλλες ενώσεις. Η ικανότητα των πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους, να δεσμεύονται σε πρωτεΐνες πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον προσδιορισμό της συνολικής βιολογικής τους δράσης. Έχει αναφερθεί η ύπαρξη διαμοριακών δεσμών μεταξύ της λευκωματίνης του ορού και των μεταβολιτών της κερκετίνης, η οποία υποστηρίζει την αργή αποβολή τους από το σώμα

(Manach et al., 2004). Η δέσμευση στη λευκωματίνη και σε άλλες πρωτεΐνες του αίματος μπορεί να έχει συνέπειες στη μεταφορά των πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους στα κύτταρα και τους ιστούς. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις με άλλες φαινολικές ενώσεις με παρόμοιους μηχανισμούς απορρόφησης μπορεί να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών (Cicerale et al., 2009).

Χημική δομή

Ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα είναι η χημική δομή των ενώσεων. Στα τρόφιμα, οι περισσότερες πολυφαινόλες υπάρχουν ως πολυμερή ή στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή. Η ομάδα του σακχάρου είναι γνωστή ως γλυκόνη και η μη-σακχαρούχα ομάδα (η πολυφαινόλη), ονομάζεται άγλυκον. Σε αυτές τις μορφές οι πολυφαινόλες δεν μπορούν να απορροφηθούν και πρέπει να υδρολυθούν από τα ένζυμα του εντέρου ή η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου πριν την απορρόφηση. Οι ανθοκυάνες αποτελούν εξαίρεση, γιατί οι γλυκοζίτες άθικτοι μπορούν να απορροφηθούν και να ανιχνευθούν στην κυκλοφορία (Nurmi et al., 2009). Η εξήγηση για αυτό μπορεί να βρίσκεται στην πιθανή αστάθεια του άγλυκου ή σε ειδικούς μηχανισμούς απορρόφησης ή μεταβολισμού των ανθοκυανινών, όπως προτείνεται από πολλές μελέτες (Passamonti et al., 2002; Wu et al., 2002). Η συγκεκριμένη χημική δομή των πολυφαινολών καθώς και το είδος του σακχάρου στο γλυκοζίτη, καθορίζουν το ρυθμό και την έκταση της εντερικής απορρόφησης.

Παράγοντες που σχετίζονται με τον άνθρωπο

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τον άνθρωπο που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε εντερικούς παράγοντες και συστημικούς παράγοντες. Οι εντερικοί παράγοντες πιθανών αποτελούν τους πιο σημαντικούς. Μετά την κατανάλωση των διαιτητικών πολυφαινολών, η απορρόφηση ορισμένων, αλλά όχι όλων των συστατικών, πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν οι γλυκοζίτες να υδρολυθούν.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη δράση της LPH που υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Η LPH έχει δύο καταλυτικούς ρόλους: να υδρολύει τη λακτόζη (LH) και έναν που σχετίζεται με την απογλυκοζυλίωση πιο υδροφοβικών υποστρωμάτων. Η αναστολή της LH της LPH μειώνει σημαντικά την απογλυκοζυλίωση των πολυφαινολών (Wilkinson et al., 2003), δείχνοντας ότι η πλειοψηφία της δραστηριότητας της είναι στον τομέα της LH. Το

απελευθεροθέν άγλυκον μπορεί να εισέλθει στη συνέχεια στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση, ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιποφιλικότητας του (Day et al., 2000).

Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στην CBG, η οποία βρίσκεται εντός των επιθηλιακών κυττάρων, όπου οι πολικοί γλυκοζίτες μεταφέρονται ενεργητικά μέσω ενός Na⁺-εξαρτώμενου μεταφορέα γλυκόζης SGLT1 (Gee et al., 2000).

Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο, φτάνουν στο κόλον, όπου υποβάλλονται σε ουσιαστικές δομικές τροποποιήσεις. Στην πραγματικότητα, η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου υδρολύει τους γλυκοζίτες σε άγλυκον και τους διασπά σε απλά φαινολικά οξέα (Aura et al., 2005). Αυτή η δραστηριότητα έχει μεγάλη σημασία για τη βιολογική δράση των πολυφαινολών, καθώς οι ενεργοί μεταβολίτες παράγονται από την εντερική μικροχλωρίδα. Για παράδειγμα, η δαϊδζεΐνη μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη της (εκουόλη) με τέτοιο τρόπο (Setchell et al., 2002; Munoz et al., 2009). Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων στην παραγωγή αυτών των δραστικών μεταβολιτών. Για παράδειγμα, μόνο το 30-40% των ανθρώπων των δυτικών χωρών εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες εκουόλη μετά την κατανάλωση ισοφλαβονών (Setchell et al., 2002), ενώ το ποσοστό αυτό στους Ιάπωνες είναι περίπου 60% (Morton et al., 2002). Αυτή η μεταβλητότητα εξαρτάται από το γενετικά χαρακτηριστικά των ατόμων. Ένας κρίσιμος παράγοντας είναι τα εξειδικευμένα βακτήρια που παράγουν εκουόλη (Setchell et al., 2005).

Πριν από τη μεταφορά στην κυκλοφορία του αίματος, οι πολυφαινόλες, που τώρα είναι απλά άγλυκα, υποβάλλονται και σε άλλες δομικές τροποποιήσεις που οφείλονται στη διαδικασία σύζευξης η οποία λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο και, κυρίως, στο ήπαρ (Felgines et al., 2005).

Παρά το γεγονός ότι η διαδικασία της σύζευξης αφενός παράγει ενεργούς μεταβολίτες από κάποιες διαιτητικές πολυφαινόλες, από την άλλη μειώνει τη συνολική ποσότητα των πολυφαινολών στην κυκλοφορία του αίματος, αυξάνοντας την απέκκριση τους. Η σχετική σημασία των τριών τύπων της σύζευξης ποικίλει ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος και η δόση που καταναλώθηκε. Επίσης, η ισορροπία μεταξύ θείωσης και γλυκουρονιδίωσης των πολυφαινολών φαίνεται να επηρεάζεται από το φύλο και είδος (DuPont et al., 2000).

Ως εκ τούτου, είναι σαφές ότι οι πολυφαινόλες τροποποιούνται εκτενώς όχι μόνο στο λεπτό έντερο και στο κόλον, όπως έχει συζητηθεί παραπάνω, αλλά και στο ήπαρ, όπου λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της σύζευξης. Έτσι, κάθε επιμέρους πολυφαινόλη παράγει

αρκετούς μεταβολίτες, έως και 20 στην περίπτωση των γλυκοζιτών κερκετίνης, αν και δύο ή τρεις συνήθως κυριαρχούν (Mullen et al., 2006).

Όλες αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη βιολογική δράση των πολυφαινολών. Κατά συνέπεια, οι ενώσεις που φτάνουν στα κύτταρα και τους ιστούς είναι χημικά, βιολογικά και, σε πολλές περιπτώσεις, λειτουργικά διαφορετικές από τις διαιτητικές τους μορφές (D' Archivio et al., 2010).

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ

4.1.1 ΛΥΟΦΙΛΟΠΟΙΗΣΗ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Λυοφιλοποιητής

Φιάλες λυοφιλοποιητή

Αναλυτική πορεία

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος μέσα σε ειδικά προζυγισμένες φιάλες λυοφιλοποιητή. Οι φιάλες τοποθετούνται για 24h στους -40°C . Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετούνται σε ειδικούς υποδοχείς στον λυοφιλοποιητή υπό πίεση 1mbar και σε θερμοκρασία -40°C για 24 ώρες. Μετά την πάροδο των 24 h η φιάλη του λυοφιλοποιητή, που περιέχει το δείγμα, ζυγίζεται ξανά για να βρεθεί η υγρασία του δείγματος. Ακολουθεί η πολτοποίηση του δείγματος με μπλέντερ και η αποθήκευσή του στους -40°C σε ειδικά δοχεία.

4.1.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Λυοφιλοποιημένα δείγματα Κορινθιακής σταφίδας

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS) ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Αναδευτήρας VORTEX

Λουτρό υπερήχων (sonicator)

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (HermLe 2320)

Εξατμιστήρας κενού (speed vac)

Δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 10mL

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή ουσιών σε διάφορους διαλύτες ανάλογα με τη συγγένεια που εμφανίζει με τον κάθε διαλύτη.

Αναλυτική πορεία

Εντός δοκιμαστικού σωλήνα με βιδωτό πώμα ζυγίζεται από το δείγμα λυοφιλοποιημένης σταφίδας ποσότητα ίση με 0,5g με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στο δείγμα προστίθενται 5mL διαλύτη μεθανόλης και αναδεύονται σε vortex για 2 min. Ακολουθεί παραμονή του δείγματος για 24 ώρες και επαναλαμβάνεται η ανάδευση σε vortex για άλλα 5 min. Στη συνέχεια τοποθετείται σε sonicator για 10 min και φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 5 min. Γίνεται παραλαβή του υπερκείμενου σε άλλο καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα κι επαναλαμβάνεται η διαδικασία για άλλες 3 φορές (εκχύλιση 4 φορές επί συνόλου). Το μεθανολικό εκχύλισμα από όλες τις εκχυλίσεις συλλέγεται στον ίδιο σωλήνα κι εξατμίζεται μέχρι ξηρού.

4.1.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

Αντιδραστήρια- Όργανα

Υδατόλουτρο

Αναδευτήρας Vortex

Μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας που έχει συμπυκνωθεί μέχρι ξηρού

Ρυθμιστικό διάλυμα (ΡΔ) $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 100 μM (0,1 mol/L)

Ένζυμο β-γλυκοζιδάση δραστηριότητας 12,4 U/mg

Ενζυμική υδρόλυση

Σε δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίζεται ένζυμο 5 mg και προστίθεται 1 mL ΡΔ οξικών. Το διάλυμα αναδεύεται σε vortex και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει

συμπυκνωμένο μέχρι ξηρού μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας (0.5 mL). Ακολουθεί και πάλι ανάδευση σε vortex και το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37° C.

4.1.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPE)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας που έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση

Στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), Isolute C-8 (EC), 500 mg, 3mL

Οξικός αιθυλεστέρας

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

3-(4-υδροξύφαινυλ)-1-προπανόλη (IS-εσωτερικό πρότυπο)

Συσκευή SPE

Αναδευτήρας Vortex

Φυγοκεντρικός εξατμιστής κενού (speed vacuum)

Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό (πυριτικά άλατα) και ανάλογα με τις δραστικές ομάδες του προσροφητικού υλικού (χημικά συνδεδεμένες ομάδες) μπορούν να εκτελεσθούν διάφορα είδη εκχυλίσεων (πολικές, μη πολικές, ομοιοπολικές, κατιονανταλλακτικές, και ανιονανταλλακτικές).

Αναλυτική πορεία

Προετοιμασία της στήλης:

Η στήλη C-8 τοποθετείται στη συσκευή SPE. Γίνεται *καθαρισμός* και ενεργοποίηση της στήλης με τη χρήση οργανικών διαλυτών (3mL EtOAc και 3 mL MeOH). Ακολουθεί *εξισορρόπηση* της στήλης με απιονισμένο νερό (5 mL), αφού το δείγμα που τοποθετούμε στη συνέχεια στη στήλη είναι σε υδατικό διάλυμα. Η στήλη είναι έτοιμη για χρήση όταν το νερό φθάσει οριακά στο προσροφητικό υλικό (δεν αφήνουμε τη στήλη να στεγνώσει).

Ανάλυση δείγματος:

Το δείγμα τοποθετείται στη στήλη πάνω από σωλήνα συλλογής. Αφήνεται να διέλθει εξ ολοκλήρου από τη στήλη. Εφαρμόζεται στη συσκευή κενό μέσω αντλίας ξήρανσης ώστε να στεγνώσει εντελώς η στήλη και να απομακρυνθούν όλα τα μη προσροφημένα συστατικά. Τοποθετείται νέος σωλήνας συλλογής και προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (3 mL) προκειμένου να παραληφθούν τα φαινολικά συστατικά. Η διέλευση της μεθανόλης από τη στήλη γίνεται αρχικά με την επίδραση της βαρύτητας και στη συνέχεια με χρήση κενού (αντλία ξήρανσης). Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη σε speed vac. Αναδιαλύεται το στερεό υπόλειμμα σε 600μL μεθανόλης και μεταφέρεται σε vial. Ακολουθεί η προσθήκη 50μL IS και εξάτμιση μέχρι ξηρού.

4.1.5 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Αντιδραστήρια-Όργανα

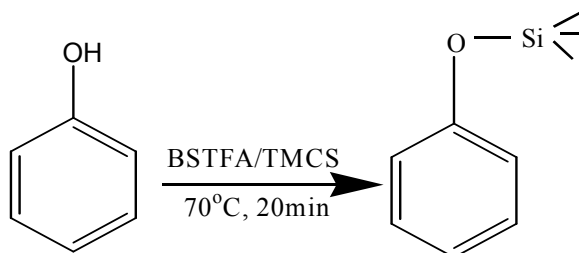
TMCS (trimethylchlorosilane), BSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide]

Αναδευτήρας Vortex

Υδρόλουτρο

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας στην επίδραση υψηλής θερμοκρασίας μέσω της δημιουργίας τριμέθυλοσιλλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS (Σχήμα 2.3)



Αναλυτική πορεία

Το ξηρό υπόλειμμα παραγωγοποιείται με προσθήκη BSTFA-TMCS (250μL). Ακολουθεί ανακίνηση με vortex και επώαση για 20 min στους 70°C. Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και αναλύονται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

4.1.6 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, GC-MS)

Αντιδραστήρια και όργανα

Αέρια χρωματογράφο Φασματομέτρο μάζας (GC-MS)

Αέριο ήλιο

Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0,25 mm x 250 μ).

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης ή το υλικό κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα παραγωγοποιημένου δείγματος ίση με 1μL εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο σε λόγο σχάσης 1:20. Το δείγμα διαχωρίζεται με τη χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30mm x 0,25mm x 250μm). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο με ρυθμό έκχυσης 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς ρυθμίζεται στους 280°C και 300°C αντίστοιχα. Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίζεται ως εξής:

Πίνακας 4.1. Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου GC / MS

Αρχική	70 °C για 5 λεπτά
1^η άνοδος	15 °C / min μέχρι 130 °C
2^η άνοδος	4 °C / min μέχρι 160 °C 160 °C για 15min
3^η άνοδος	10 °C / min μέχρι 300 °C
Τελική	300 °C για 15min

Για τον προσδιορισμό των 25 φαινολικών συστατικών και των τερπενοειδών που ελέγχονται χρησιμοποιείται η μέθοδος selective ion monitoring (SIM) GC/MS. Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών βασίζεται στη παρουσία 2 ή 3 ιόντων για κάθε φαινολικό συστατικό σε χρόνο κατακράτησης $\pm 0,05$ του χρόνου κατακράτησης του αντίστοιχου προτύπου. Το ιόν στο οποίο βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός συμβολίζεται με T ενώ τα ιόντα που καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας κάθε πολικής φαινόλης στο δείγμα συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται (T, Q1, Q2) για καθεμία από τις 25 φαινολικές ενώσεις καταγράφονται στον **πίνακα 4.2**.

Πίνακας 4.2. *Ιόντα παρακολούθησης πολικών φαινολών και χρόνοι κατακράτησης*

No	Φαινολικά	Χρόνος κατακράτησης (RT)	Ιόντα παρακολούθησης
1	Βανιλίνη	17.52	194, 209
2	Κινναμικό οξύ	17.68	205, 220
3	Τυροσόλη	18.49	179, 267, 282
4	<i>p</i> -Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	20.28	267, 223, 193
5	<i>p</i> -Υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	20.77	252, 296, 281
6	Ομοβανιλλική αλκοόλη	23.92	209, 179
7	Φλωρετικό οξύ	26.73	192, 310
8	Βαννιλικό οξύ	27.02	297, 267, 312
9	Πρωτοκατεχικό οξύ	31.42	193, 355, 370
10	3,4-Δι-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ	32.24	384, 267, 179
11	Συριγγικό οξύ	35.04	327, 342, 312
12	<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	35.92	308, 293, 219
13	Γαλλικό οξύ	36.84	281, 458, 443
14	Φερουλικό οξύ	38.91	338, 323, 308
15	Καφεϊκό οξύ	39.61	396, 219, 381
16	Σιναπικό οξύ	40.88	368, 353, 338
17	Ρεσβερατρόλη	45.14	444, 445, 443
18	Χρυσίνη	45.53	383, 384
19	Επικατεχίνη	46.46	368, 355, 474
20	Ναριγκενίνη	46.39	473, 296
21	Κατεχίνη	46.52	368, 355, 474

Η 3-(4-υδρόξυφαινυλ)-1-προπανόλη χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο στο χαρακτηριστικό ιόν m/z 206 και τα προσδιοριστικά 191 και 179. Η ένωση αυτή δεν περιέχεται στα υπό ανάλυση δείγματα και η κορυφή της είναι ευδιάκριτη και ικανή να διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά. Η ποσοτικοποίηση του εσωτερικού προτύπου γίνεται με βάση μία σειρά 9 πρότυπων μιγμάτων των πολυφαινολικών αναλόγων, που περιέχουν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα δείγματα.

4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ

4.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ

Πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων το πρωτόκολλο τυγχάνει της έγκρισης εφαρμογής του από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Οι εθελοντές ενημερώνονται για τους σκοπούς της μελέτης, το πρωτόκολλο και τις υποχρεώσεις τους, όπως και τα πιθανά οφέλη από τη συμμετοχή. Κατόπιν, υπογράφουν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής και καθορίζεται η ακριβής ημέρα κατά την οποία θα προσέλθουν στο Εργαστήριο.

Τα κριτήρια επιλογής των εθελοντών ήταν:

- Ηλικία 18-40 ετών
- $18,5 < \text{BMI} < 24,9$ (εκφρασμένο με kg/m^2)
- Φαινομενικά υγιείς. Λήφθηκε ιατρικό ιστορικό και δεν αναφέρθηκε η ύπαρξη κάποιας νόσου
- Μη- καπνιστές

Τα κριτήρια αποκλεισμού εθελοντών ήταν:

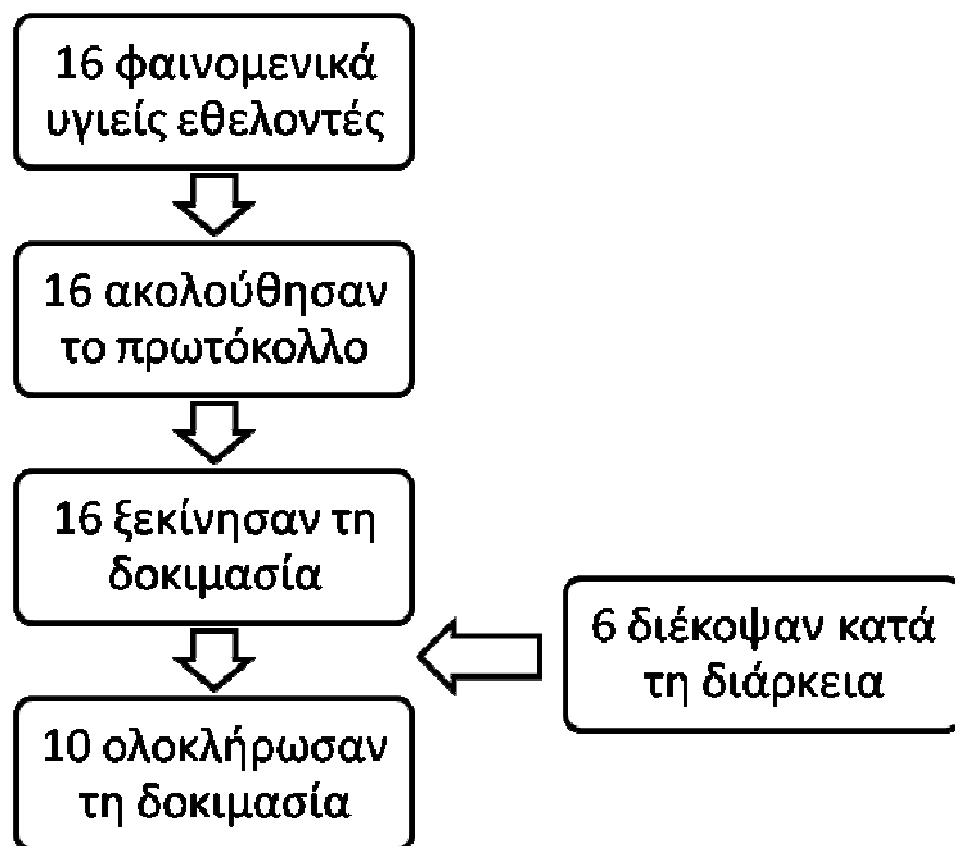
- Ύπαρξη νοητικής νόσου
- Κατάχρηση φαρμάκων ή αλκοόλης
- Εγκυμοσύνη ή γαλουχία
- Ύπαρξη αλλεργιών
- Πρόσληψη συμπληρωμάτων διατροφής (βιταμίνες ή άλλα αντιοξειδωτικά)
- Μονοφαγία (χορτοφαγία, μακροβιοτική διατροφή κ.ά)
- ΙΦΝΕ ή άλλες γαστρεντερικές διαταραχές

Σύμφωνα με το εγκεκριμένο πρωτόκολλο:

(Α) Μετά από 12h νηστεία οι εθελοντές προσέρχονται στο Εργαστήριο για να ληφθεί φλεβικό αίμα προ του γεύματος (χρόνος 0)

(Β) Το γεύμα αποτελούν 8 ισοδύναμα φρούτου (144g) Κορινθιακής σταφίδας. Ακολουθεί συλλογή φλεβικού αίματος (όγκου 15mL) σε χρόνους 1, 2, 3 και 4 ώρες μετά από την κατανάλωση της σταφίδας. Για τη μέτρηση του χρόνου από την κατανάλωση της σταφίδας,

καταγράφεται η στιγμή της ολοκλήρωσης της κατανάλωσης της σταφίδας. Κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας οι εθελοντές καταναλώνουν μόνο νερό.



Σχήμα 4.1. Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας των εθελοντών.

4.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)

Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 45% w/v)

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα χωρητικότητας 10mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Διάλυμα Βανιλλικού οξέος (VA) μητρικό: Ζυγίζονται 1mg VA και διαλύονται σε 1mL μεθανόλης

Μεταφωσφορικό οξύ (MPA) 2M: Ζυγίζονται 16g μεταφωσφορικού οξέος και διαλύονται σε 100mL απιονισμένου νερού

Διάλυμα NaOH 2M: Ζυγίζονται 80g NaOH και διαλύονται σε 75% μεθανόλη

Διάλυμα HCl 1M

Διάλυμα ακετόνης-νερού 1:1

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{-7} \rightarrow \text{H}_4\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{-8}$, $\text{H}_2\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{-6} \rightarrow \text{H}_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{-7}$). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου–βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (725nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (35% w/v) που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αφενός, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

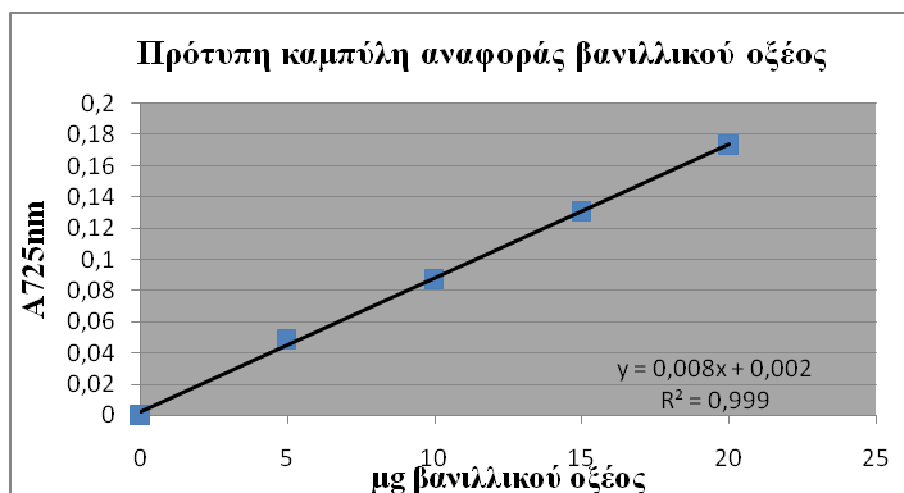
Αναλυτική πορεία

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα των 10mL προσθέτουμε 0,5mL πλάσμα και 1mL HCl 1M. Ανακινούμε για 1 λεπτό κι επωάζουμε στους 37°C για 0,5h. Μετά το τέλος της επώασης προσθέτουμε 1mL NaOH 2M και ανακινούμε για 3 min. Επωάζουμε για άλλη 0,5h στους 37 °C και προσθέτουμε 1mL MPA 2M. Αναμιγνύουμε για 3 min και φυγοκεντρούμε για 10 min στις 3000 rpm. Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και φυλάσσεται σε πάγο και στο σκοτάδι. Στο υπόλειμμα προσθέτουμε 1mL μίγματος ακετόνης/νερό και ανακινούμε. Το δείγμα φυγοκεντρείται πάλι για 10 min στις 5000 rpm και το υπερκείμενο προστίθεται στο σωλήνα με το άλλο και φυγοκεντρείται για 6 min στις 4000 rpm. Ακολουθεί η μέτρηση των ολικών πολυφαινόλων με το αντιδραστήριο FC.

Σε 200μL δείγματος ή νερού (τυφλό) προστίθενται 5 mL νερό και 0,5mL αντιδραστηρίου FC. Ανακινούμε και το δείγμα φυλάσσεται στο σκοτάδι για 3 min. Ακολουθεί η προσθήκη 1mL κορεσμένου Na_2CO_3 και συμπληρώνουμε μέχρι τα 10mL με απιονισμένο νερό. Επωάζουμε για 1 h στο σκοτάδι και μετράτε η απορρόφηση στα 725nm.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

Από το μητρικό διάλυμα VA (1mg/mL) με αραιώση παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας 100μg/mL. Από το τελευταίο, όγκοι 0, 50, 100, 150 και 200μL, που περιέχουν αντίστοιχα 0, 5, 10, 15 και 20μg VA, μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του VA σε μg και ψ η απορρόφηση στα 725nm.



4.2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΘΕΙΚΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αναδευτήρας VORTEX

Eppendorf σωληνάκια των 1,5mL

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10mL και 50mL

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Πιπέτες αναλυτικής ακρίβειας (20-1000μL)

Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων

ELISA reader Biotek PowerWave XS2

Διάλυμα CuSO_4 20mM: Ζυγίζονται 0,0250g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MB=249.68) και διαλύονται σε 2,5mL H_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα PBS buffer: Διαλύεται μια ταμπλέτα PBS σε 200mL απιονισμένο H_2O .

Αρχή της μεθόδου

Με το διάλυμα του θεικού χαλκού (CuSO_4) προκαλείται οξείδωση της LDL κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια. Η ανίχνευση τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime).

Αναλυτική πορεία

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα των 10mL παρασκευάζεται διάλυμα CuSO_4 200mM με αραιώση 1:100 του διαλύματος CuSO_4 20mM. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50mL παρασκευάζεται μίγμα CuSO_4 και PBS με τελική συγκέντρωση 16μM. Τα δείγματα ορού αραιώνονται 1:12 με PBS Buffer. Σε κάθε “πηγαδάκι” (well) τοποθετούνται 20μL αραιωμένου ορού και στη συνέχεια προστίθενται 230μL του ανωτέρω μίγματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 3,5 ώρες ανά 2 λεπτά σε ELISA reader, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 37° C.

4.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Eppendorf των 2mL

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10mL

Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας 90%

Ένζυμο β-γλουκουρονιδάση

Διάλυμα HCL 1M

Ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος

Αναδευτήρας VORTEX

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Υδατόλουτρο των 100, 80 και 37 °C

Εξατμιστήρας κενού (speed vacuum)

Πιπέτες αναλυτικής ακρίβειας

Πιπέτες paster

Πεχάμετρο

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5, 0,1M και φωσφορικού καλίου pH 6,8, 1M

4.2.4.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Καθίζηση πρωτεϊνών

Σε 2 eppendorf tubes των 2mL προσθέτουμε 0,5 mL πλάσμα στο καθένα. Στη συνέχεια προστίθεται 1,5mL αιθανόλη και αναμιγνύουμε με vortex. Φυγοκεντρούμε για 5 min, στα 17500 rcf και στους 4°C. Παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο και από τα δύο eppendorfs με πιπέτες Paster και τα μεταφέρουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα (10mL) με πόμα. Στη συνέχεια στα

ependorf tubes με το ίζημα των πρωτεϊνών προσθέτουμε 0,5mL αιθανόλη, ανακινούμε με vortex και φυγοκεντρούμε για 5 min στις ίδιες συνθήκες. Συλλέγουμε τα υπερκείμενα στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζουμε μέχρι ξηρού σε εξατμιστήρα κενού στους 38-40°C και ακολουθεί ενζυμική κατεργασία του δείγματος.

Ενζυμική υδρόλυση

Το ξηρό υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M οξικού νατρίου pH 5 και αναμιγνύουμε αναδευτήρα για 5 min. Ακολουθεί η προσθήκη ενζύμου β-γλουκουρονιδάσης (20μL) και το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 104μL HCL 1N ώστε το δείγμα να αποκτήσει pH=3 και ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).

4.2.4.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPE)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), Isolute C-8 (EC), 500 mg, 3mL

Οξικός αιθυλεστέρας

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Συσκευή SPE

Αναδευτήρας Vortex

Φυγοκεντρικός εξατμιστής κενού (speed vacuum)

3-(4-υδρόξυφαινυλ)-1-προπανόλη (IS-εσωτερικό πρότυπο)

Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό (SiO₂) και ανάλογα με τις δραστικές ομάδες του προσροφητικού υλικού (χημικά συνδεδεμένες ομάδες) μπορούν να εκτελεστούν διάφορα είδη εκχυλίσεων (πολικές, μη πολικές, ομοιοπολικές, κατιονανταλλακτικές, και ανιονανταλλακτικές).

Αναλυτική πορεία

Προετοιμασία της στήλης:

Η στήλη C-8 τοποθετείται στη συσκευή SPE. Γίνεται *καθαρισμός* και ενεργοποίηση της στήλης με τη χρήση οργανικών διαλυτών (3mL EtOAc και 3 mL MeOH). Ακολουθεί *εξισορρόπηση* της στήλης με απιονισμένο νερό (5 mL), αφού το δείγμα που τοποθετούμε στη συνέχεια στη στήλη είναι σε υδατικό διάλυμα. Η στήλη είναι έτοιμη για χρήση όταν το νερό φθάσει οριακά στο προσροφητικό υλικό (δεν αφήνουμε τη στήλη να στεγνώσει).

Ανάλυση δείγματος:

Το δείγμα τοποθετείται στη στήλη πάνω από σωλήνα συλλογής. Αφήνεται να διέλθει εξ ολοκλήρου από τη στήλη. Εφαρμόζεται στη συσκευή κενό μέσω αντλίας ξήρανσης ώστε να στεγνώσει εντελώς η στήλη και να απομακρυνθούν όλα τα μη προσροφημένα συστατικά. Τοποθετείται νέος σωλήνας συλλογής και προστίθεται μεθανόλη (3mL) προκειμένου να παραληφθούν τα φαινολικά συστατικά. Η διέλευση της μεθανόλης από τη στήλη γίνεται αρχικά με την επίδραση της βαρύτητας και στη συνέχεια με χρήση κενού (αντλία ξήρανσης). Ακολουθεί συμπίκνωση του διαλύτη σε speed vac. Το στερεό υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 600μL μεθανόλης και μεταφέρεται σε vial. Ακολουθεί η προσθήκη 50μL IS και εξάτμιση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί παραγωγοποίηση του δείγματος και ανάλυση των επιμέρους φαινολικών συστατικών με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας όμοια με τις παραγράφους 4.1.5 και 4.1.6.

4.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS for Windows, version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Η κανονικότητα των μεταβλητών ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των επιμέρους πολυφαινολών, στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο πλάσματος καθώς στην αντίσταση του ορού στην οξειδωση μεταξύ του χρόνου 0 και των χρονικών στιγμών μετά την κατανάλωση του γεύματος ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας το κριτήριο t του Student (Paired Samples T-test). Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικό σφάλμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

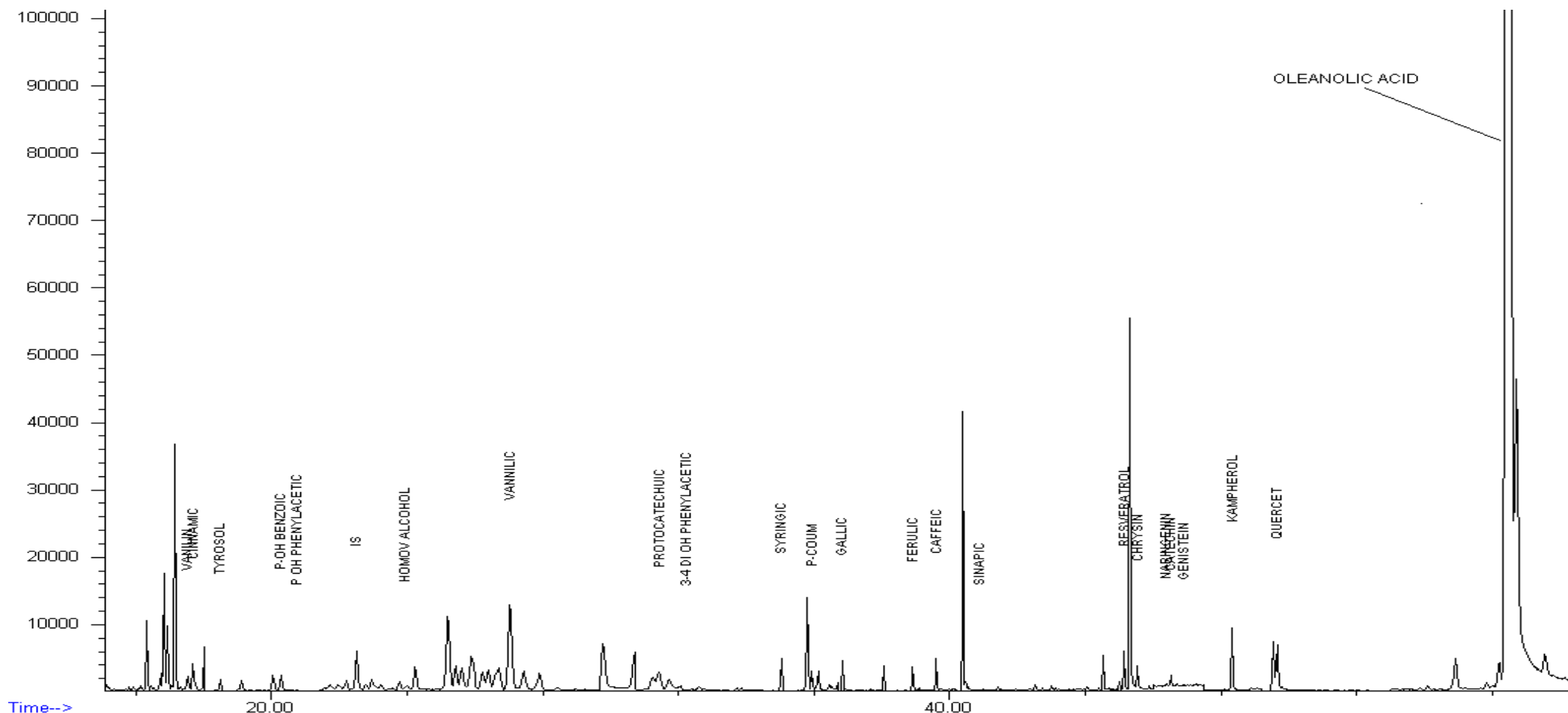
Στον **Πίνακα 5.1** παρατίθεται η ανάλυση των 25 φαινολικών συστατικών της σταφίδας, που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία βιοδιαθεσιμότητας, με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών αναλύσεων δυο διαφορετικών δειγμάτων σταφίδας. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως $\mu\text{g}/100\text{g}$ μη λυοφιλοποιημένης σταφίδας. Το ολεανολικό οξύ ήταν εκείνο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ($70,25 \text{ mg}/100\text{g}$ σταφίδας) και ακολουθούσε η καμφερόλη ($89,36 \text{ mg}/100\text{g}$ σταφίδας) η χρυσίνη ($77,36 \text{ mg}/100\text{g}$ σταφίδας) και το βαννιλικό οξύ ($61,76 \text{ mg}/100\text{g}$ σταφίδας). Άλλες πολυφαινόλες που ανιχνεύθηκαν είναι η βανιλίνη, το κινναμικό οξύ, η τυροσόλη, το *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το *p*-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ, η ομοβανιλική αλκοόλη, το φλωρετικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το 3,4-δι-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σιναπικό οξύ, η ρεσβερατρόλη, η επικατεχίνη, η ναριγκενίνη, η κατεχίνη, η γενιστεΐνη και η κερκετίνη.

Πίνακας 5.1. Περιεχόμενο Κορινθιακής σταφίδας σε φαινολικά συστατικά και ολεανολικό οξύ μετά από ανάλυση με GC-MS.

No	Αντιοξειδωτικά	$\mu\text{g}/100\text{g}$ Κορινθιακής σταφίδας
1	Βανιλίνη	9,70
2	Κινναμικό οξύ	24,35
3	Τυροσόλη	0,89
4	<i>p</i> -υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	3,39
5	<i>p</i> -υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	0,49
6	Ομοβανιλική αλκοόλη	0,75
7	Φλωρετικό οξύ	0,90
8	Βαννιλικό οξύ	61,76

9	Πρωτοκατεχικό οξύ	14,49
10	3,4-δι-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ	0,39
11	Συριγγικό οξύ	26,55
12	<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	14,40
13	Γαλλικό οξύ	11,57
14	Φερουλικό οξύ	12,73
15	Καφεϊκό οξύ	18,25
16	Σιναπικό οξύ	0,15
17	Ρεσβερατρόλη	39,68
18	Χρυσίνη	77,36
19	Επικατεχίνη	10,36
20	Ναριγκενίνη	4,79
21	Κατεχίνη	5,00
22	Γενιστεΐνη	0,44
23	Καμφερόλη	89,36
24	Κερκετίνη	56,53
25	Ολεανολικό οξύ	70254.79

Στο **Σχήμα 5.1** φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα από GC-MS SIM ανάλυση ενός δείγματος σταφίδας. Το δείγμα έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκοζιδάση.. Παρουσιάζονται οι «κορυφές» των φαινολικών συστατικών και του ολεανολικού οξέος, και ο χρόνος κατακράτησής τους (RT). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη συγκέντρωση του ολεανολικού οξέος, καθώς μέχρι τώρα δεν έχει ποσοτικοποιηθεί αυτό το συστατικό.



Σχήμα 5.1. Σχήμα 5.3. Τυπικό GC-MS SIM χρωματογράφημα από την ανάλυση του ενός δείγματος της σταφίδας με ενζυμική υδρόλυση. Ανιχνεύθηκαν: βανιλίνη, κινναμικό οξύ, τυροσόλη, *p*- υδροξύ-βενζοϊκό οξύ, *p*- υδροξύ- φαινυλοξικό οξύ, ομοβανιλική αλκοόλη, βαννιλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, 3,4- δι-υδροξύ- φαινυλοξικό οξύ, συριγγικό οξύ, *p*- κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναπικό, ρεσβερατρόλη, χρυσίνη, ναριγκενίνη, κατεχίνη, γενιστεΐνη, καμφερόλη, κερκετίνη και ολενολικό

5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ IN VIVO, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ

Στόχος ήταν η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας φαινολικών συστατικών του πλάσματος των εθελοντών που είχαν καταναλώσει Κορινθιακή σταφίδα και της συνεισφοράς τους στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διατροφική παρέμβαση σε 10 εθελοντές όπως περιγράφεται στο **Σχήμα 4.1**. Εκτιμήθηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο στο πλάσμα και η μεταβολή στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση, καθώς επίσης ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι επιμέρους πολυφαινόλες στο πλάσμα.

5.2.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

Για να προσδιοριστεί το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του πλάσματος των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Follin- Ciocalteu. Το βαννιλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα βαννιλικού οξέος (mg VA/ mL πλάσματος).

Όσον αφορά στον προσδιορισμό της αντίστασης του ορού στην οξείδωση, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία αντίστασης του ορού στην οξείδωση μετά από προσθήκη θεικού χαλκού. Η πιο άμεση προσέγγιση για να αποδειχθεί ή να διαψευστεί η υπόθεση οξείδωσης είναι να προσδιοριστεί το αντι-αθηρογόνο δυναμικό των αντιοξειδωτικών, το οποίο αναστέλλει την οξείδωση της LDL.

Στον **Πίνακα 5.2** φαίνονται οι μεταβολές στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο πλάσματος και στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση. Την 1^η ώρα μετά το γεύμα παρατηρείται η μέγιστη τιμή τόσο του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου όσο και της αντίστασης του ορού στην οξείδωση. Στατιστικά σημαντική αύξηση στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο παρατηρήθηκε την 1^η ώρα μετά την κατανάλωση του γεύματος (144γρ. σταφίδες) ($p=0,05$). Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο στο πλάσμα παρέμεινε αυξημένο μέχρι και την 4^η ώρα μετά την κατανάλωση των σταφίδων. Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε επίσης και στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση μια ώρα μετά το γεύμα ($p=0,041$), και η αύξηση αυτή διατηρήθηκε μέχρι και το τέλος της δοκιμασίας.

Πίνακας 5.2. Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο ως ισοδύναμα βανιλικού οξέος (VA) (mg/mL πλάσματος) και αντίσταση του ορού στην οξείδωση εκφρασμένη σε δευτερόλεπτα t_{LAG} . Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα. Ο «*» δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ του χρόνου 0 και της 1^{ης} ώρας για το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, καθώς και για την αντίσταση του ορού στην οξείδωση.

Χρόνος Συλλογής	Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg VA/mL πλάσματος)	Αντίσταση του ορού στην οξείδωση (t_{LAG} , sec)
0 h	12,91 $\pm$ 0,63	1630,4 $\pm$ 172,3
1 h	14,12 $\pm$ 0,91*	3010,6 $\pm$ 641*
2 h	13,20 $\pm$ 1,04	2215,8 $\pm$ 541,9
3 h	13,72 $\pm$ 0,94	1932,5 $\pm$ 382,3
4 h	13,80 $\pm$ 0,96	2378 $\pm$ 558,9

5.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Η ανίχνευση των επιμέρους πολυφαινολών (pp) στο πλάσμα των ασθενών έγινε με τη χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC- MS). Στον **Πίνακα 4.2** παρουσιάζονται οι πολυφαινόλες που ανιχνεύθηκαν, ο χρόνος κατακράτησής τους καθώς και τα ιόντα παρακολούθησης. Στον **Πίνακα 5.3** παρατίθεται η ανάλυση των 15 φαινολικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στην περιεκτικότητα των πολυφαινολών του πλάσματος των εθελοντών που κατανάλωσαν σταφίδα. Τη μέγιστη συγκέντρωση παρουσίασε το πρωτοκατεχικό οξύ (93.23 ng/mL πλάσματος) και ακολούθως το καφεϊκό οξύ, το p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, η χρυσίνη, και η καμφερόλη (87,65, 87,16, 61,56, 58,31 ng/mL πλάσματος αντίστοιχα). Επίσης ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες το βαννιλικό οξύ, το φλωρετικό οξύ, το 3,4-δι-υδοξυ-φαινυλοξικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σιναπικό οξύ, η ναριγκενίνη, η κερκετίνη και τα ολεανολικό οξύ.

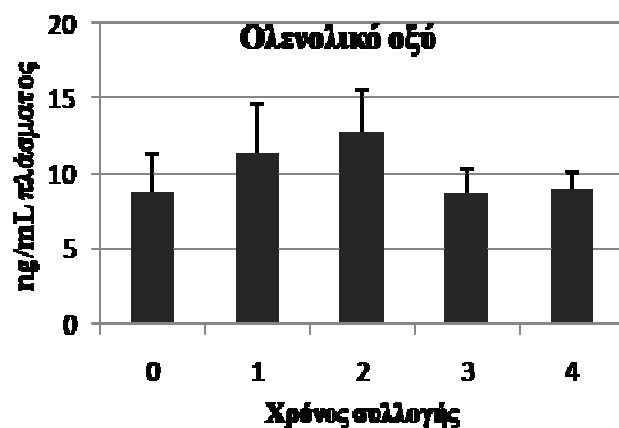
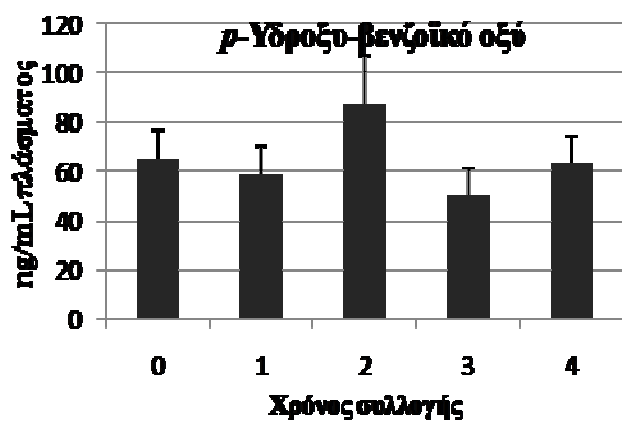
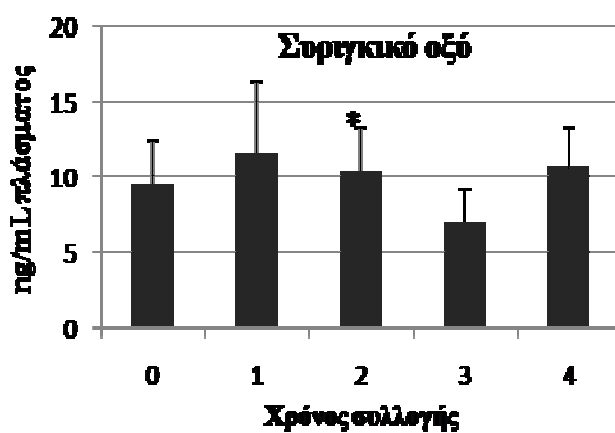
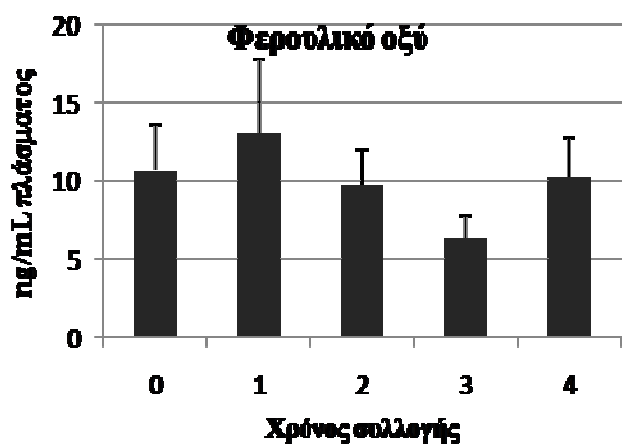
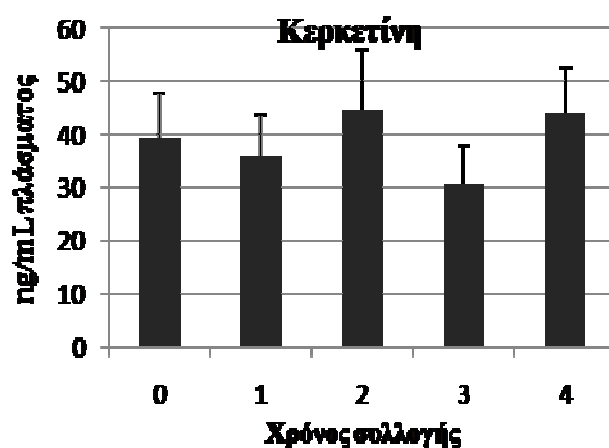
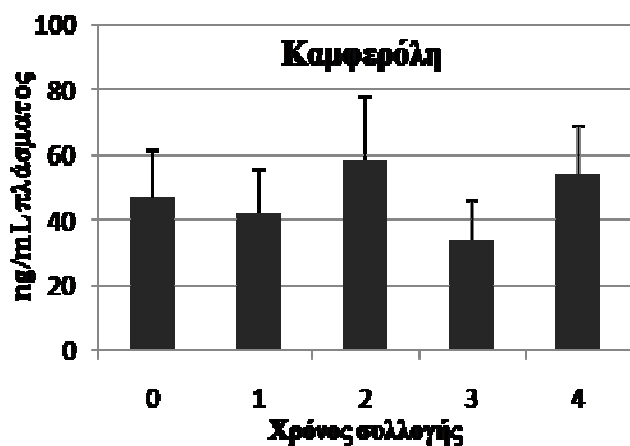
Όπως φαίνεται δεν υπάρχει συγκεκριμένη χρονική στιγμή που να παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωση όλες οι πολυφαινόλες. Πιο συγκεκριμένα, το φλωρετικό οξύ, το βαννιλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το 3,4-δι-υδοξυ-φαινυλοξικό οξύ και η χρυσίνη παρουσιάζουν μέγιστο στη συγκέντρωσή τους την 4^η ώρα μετά την κατανάλωση του γεύματος. Την 1^η ώρα φαίνεται να

παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωση το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Η κινητική των υπολοίπων πολυφαινολών αναλύεται στη συνέχεια.

Πίνακας 5.3. Πολυφαινολικό περιεχόμενο πλάσματος εθελοντών μετά από ανάλυση με GC-MS. Παρουσιάζεται ο χρόνος μέγιστης συγκέντρωσης (h) και ο μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών καθώς και του ολεανολικού οξέος των 10 εθελοντών στο χρόνο αυτό (ng/mL πλάσματος).

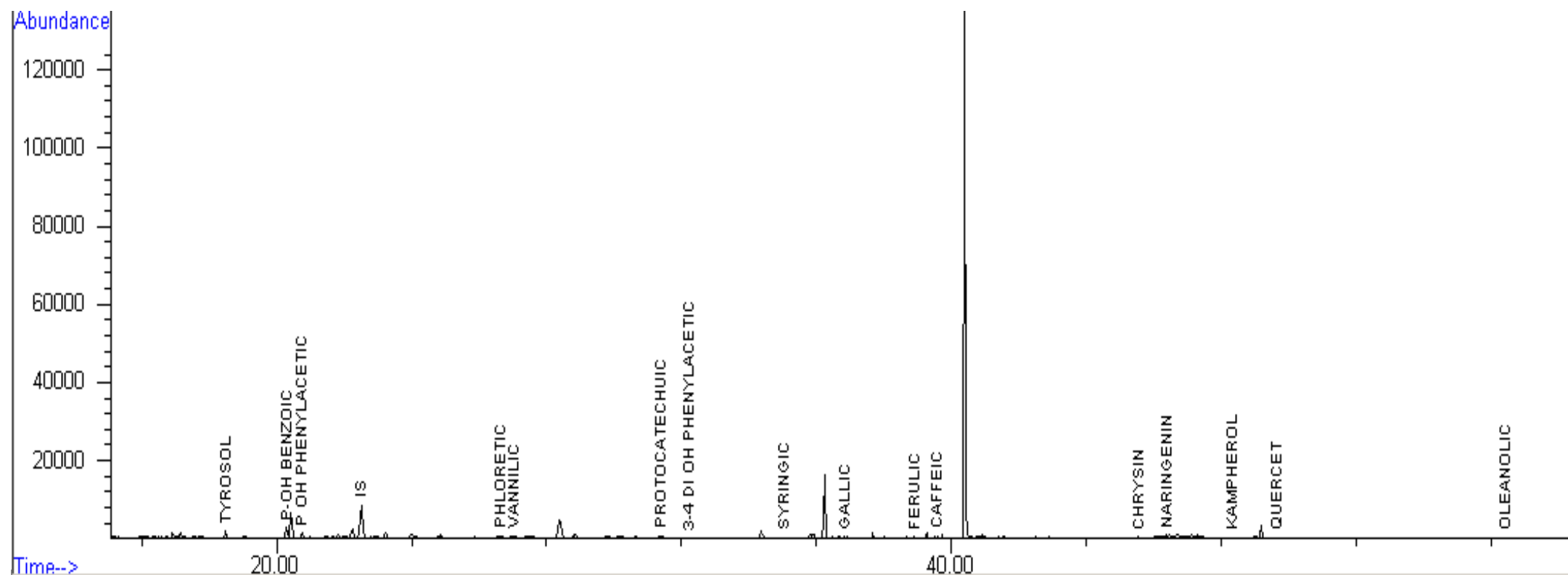
Αντιοξειδωτικά	Χρόνος μέγιστης συγκέντρωσης (h)	Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων πλάσματος (ng/mL πλάσματος)
p-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	2	87,2 $\pm$ 19,6
Φλωρετικό οξύ	4	48,9 $\pm$ 13,2
Βαννιλικό οξύ	4	35,9 $\pm$ 8,9
Πρωτοκατεχικό οξύ	4	93,2 $\pm$ 25,8
3,4-Δι-Υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	4	30,9 $\pm$ 9,9
Συριγγικό οξύ	1	11,6 $\pm$ 4,7
Γαλλικό οξύ	1	9,9 $\pm$ 6,6
Φερουλικό οξύ	1	13 $\pm$ 4,7
Καφεϊκό οξύ	1	87,7 $\pm$ 49,9
Χρυσίνη	4	61,6 $\pm$ 10,2
Καμφερόλη	2	58,3 $\pm$ 19,5
Κερκετίνη	2	44,6 $\pm$ 11,4
Ολεανολικό οξύ	2	12,8 $\pm$ 2,8

Κάθε πολυφαινόλη ακολουθεί διαφορετική κινητική κατά τη διάρκεια της 4ωρης δοκιμασίας. Στο **Σχήμα 5.2** παρουσιάζεται η κινητική έξι φαινολικών συστατικών: της καμφερόλης, της κερκετίνης, του φερουλικού οξέος, του συριγγικού οξέος, του p- υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και του ολεανολικού οξέος. Όπως φαίνεται, η καμφερόλη, η κερκετίνη, το p- υδροξυ- βενζοϊκό οξύ καθώς και το ολεανολικό οξύ παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος, ενώ το φερουλικό και το συριγγικό οξύ την 1^η ώρα. Η αύξηση που παρατηρείται στο συριγγικό οξύ τη 2^η ώρα είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 5.2. Κινητική που παρουσιάζουν η καμφερόλη, η κερκετίνη, το φερουλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το *p*- υδροξυ- βενζοϊκό οξύ και το ολεανολικό οξύ. Παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση των φαινολικών αυτών συστατικών στο πλάσμα των εθελοντών μετά την κατανάλωση του γεύματος (χρόνος = 0). Ο «*» δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ του χρόνος = 0 και της 2^{ης} ώρας για το συριγγικό οξύ.

Στο **Σχήμα 5.3** φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα από τη GC-MS SIM ανάλυση ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος πλάσματος εθελοντή μετά την κατανάλωση σταφίδας. Το δείγμα έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση. Παρουσιάζονται οι «κορυφές» των φαινολικών συστατικών και του ολεανολικού οξέος και ο χρόνος κατακράτησής τους (RT).



Σχήμα 5.3. Τυπικό χρωματογράφημα από την GC-MS SIM ανάλυση του πλάσματος επεξεργασμένου με ενζυμική υδρόλυση μετά την κατανάλωση του γεύματος. Ανιχνεύθηκαν : *p*- υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ, *p*- υδρόξυ- φαινυλοξικό οξύ, φλωρετικό οξύ, βανιλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, 3,4- δι-υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ, συριγγικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χρυσίνη, ναριγκενίνη, καμφερόλη, κερκετίνη και ολεονολικό οξύ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολυφαινολικές ενώσεις των τροφίμων βρίσκονται στο επίκεντρο των ερευνητών, των διαιτολόγων, των επιστημόνων τροφίμων και των καταναλωτών λόγω του ευεργετικού τους ρόλου στην υγεία των ανθρώπων. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια υποστηρίζει το ρόλο τους στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών, ιδιαίτερα κάποιων μορφών καρκίνου, της καρδιαγγειακής νόσου και νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, που συμπληρώνουν τις λειτουργίες των αντιοξειδωτικών βιταμινών και ενζύμων, και δρουν ως άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα στοιχεία της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών βασίζονται σε *in vitro* μελέτες, αυξανόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι μπορούν να επιτελέσουν τον αντιοξειδωτικό, και όχι μόνο, ρόλο τους *in vivo* (Tsao, 2010).

Σημαντικό είναι να μελετηθεί η βιοδιαθεσιμότητα των μικροσυστατικών αυτών ώστε να κατανοήσουμε τον ευεργετικό τους ρόλο, καθώς και τον τρόπο δράσης τους. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στον οργανισμό και συνοψίζονται στον **Πίνακα 6.1**.

Πίνακας 6.1. Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών πολυφαινολών στους ανθρώπους (Πηγή : D'Archivio et al., 2010).

Εξωτερικοί παράγοντες	Περιβαλλοντικοί παράγοντες (πχ. ηλιακή έκθεση, βαθμός ωρίμανσης), διαθεσιμότητα τροφίμων
Παράγοντες που σχετίζονται με την επεξεργασία του τροφίμου	Θερμική επεξεργασία, μαγείρεμα, ομογενοποίηση, αποθήκευση

Παράγοντες που σχετίζονται με το τρόφιμο	Σύσταση τροφίμου, παρουσία συστατικών που επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την απορρόφηση (πχ. λιπίδια, φυτικές ίνες)
Αλληλεπίδραση με άλλες ενώσεις	Δεσμοί με πρωτεΐνες (πχ. αλβουμίνη) ή με πολυφαινόλες με παρόμοιο μηχανισμό απορρόφησης
Παράγοντες που σχετίζονται με τις πολυφαινόλες	Χημική δομή, συγκέντρωση στα τρόφιμα, δοσολογία που προτείνεται
Παράγοντες που σχετίζονται με τον άνθρωπο	Εντερικοί παράγοντες (πχ. ενζυμική δραστηριότητα, χρόνος μεταφοράς στο έντερο, μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου) Συστημικοί παράγοντες (πχ. φύλο και ηλικία, διαταραχές ή/και παθολογικές καταστάσεις, γενετικοί παράγοντες, φυσιολογική κατάσταση)

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών της σταφίδας σε 10 υγιείς εθελοντές. Οι εθελοντές κατανάλωσαν 144 γρ. κορινθιακής σταφίδας και προσδιορίστηκαν: το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και οι επιμέρους φαινολικές ενώσεις του πλάσματος, και η αντίσταση του ορού στην οξειδωση. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κορινθιακής σταφίδας για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των επιμέρους φαινολικών συστατικών και του ολεανολικού οξέος που περιέχει.

Η επιλογή της κορινθιακής σταφίδας, για τον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητάς των φαινολικών συστατικών της, στηρίζεται στο γεγονός ότι έχει βρεθεί από προηγούμενες μελέτες (Kaliora et al., 2007, Chiou et al., 2009) ότι έχει πλούσιο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον είναι ένα προϊόν που παράγεται σχεδόν αποκλειστικά στη Δυτική Ελλάδα, η παραγωγή, η τυποποίηση και η μεταφορά του όμως σε όλη την χώρα το καθιστούν ευρέως διαθέσιμο. Παράλληλα αποτελεί προϊόν με σημαντική συνεισφορά και δυναμική στον τομέα των εξαγωγών.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.2** περιέχει ένα μεγάλο αριθμό θρεπτικών συστατικών (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, βιταμίνες), απαραίτητων για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Μπορεί να καταναλωθεί με πολλούς τρόπους: ως σνακ, ως συνοδευτικό, όπως οι ξηροί, μέσα σε γλυκά καθώς και σε αρτοσκευάσματα. Είναι επομένως δυνατό και έχει νόημα να ενσωματωθεί στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου και να επιτελέσει τον ευεργετικό του ρόλο.

Είκοσι τέσσερις πολυφαινόλες ανιχνεύθηκαν στη σταφίδα, μεταξύ αυτών το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το p- κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και η κερκετίνη τα οποία εντοπίστηκαν και από τους Chiou et al. Άλλες πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν σε σημαντικές ποσότητες ήταν η καμφερόλη, η χρυσίνη και η ρεσβερατρόλη (89,36, 77,36, 39,68 mg/100g σταφίδας αντίστοιχα). Ποσοτικοποιήθηκε επίσης, για πρώτη φορά ολεανολικό οξύ, σε μεγάλη συγκέντρωση (70,25mg/100g σταφίδας). Από τα παραπάνω στοιχεία, επιβεβαιώνεται ότι η κορινθιακή σταφίδα είναι ένα τρόφιμο πλούσιο σε πολυφαινόλες και άλλα δραστικά συστατικά, το οποίο θα πρέπει να καταναλώνεται, σε συνδυασμό με άλλα τρόφιμα που ανήκουν στη μεσογειακή δίαιτα (ελαιόλαδο, κόκκινο κρασί, φρούτα και λαχανικά), ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής πρόσληψη αντιοξειδωτικών από τον οργανισμό (Chiou et al., 2009).

Το ολεανολικό οξύ (3b-υδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ) είναι μια βιολογικά ενεργή πεντακυκλική τριτερπενοειδής ένωση που έχει απομονωθεί από περισσότερα από 1620 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών τροφίμων και φαρμακευτικών φυτών. Μια από τις σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες που του αποδίδονται είναι η ηπατοπροστατευτική του δράση. Έχει αποδειχθεί ότι το ολεανολικό οξύ είναι αποτελεσματικό στην προστασία του ήπατος από χημικά προκαλούμενη οξεία ηπατική βλάβη, αλλά και προστατεύει το ήπαρ από ίνωση και κίρρωση που προκαλούνται από χρόνιες παθήσεις του. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την αντιοξειδωτική δράση του (Somova et al., 2003, Ovesná et al., 2006, Sultana and Ata, 2008). Ωστόσο, πρόσφατα έχει δείχθει ότι ο αντιοξειδωτικός του ρόλος δεν σχετίζεται μόνο με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών αλλά και με την αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση, καθώς και με την ενίσχυση της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (Wang et al., 2010). Έχει φανεί επίσης ότι το ολεανολικό οξύ έχει αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση (Dzubak et al., 2006, Petronelli et al., 2009). Η πιο εξελιγμένη, τέλος, φαρμακευτική εφαρμογή των συνθετικών τριτερπενοειδών είναι στη θεραπεία της

χρόνιας νεφρικής νόσου (XNN), η οποία χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική και μη αναστρέψιμη απώλεια της νεφρικής λειτουργίας που τελικά οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια (Pergola et al., 2011).

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου του πλάσματος καθώς και της αντίστασης του ορού στην οξείδωση είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Φάνηκε ότι 1 ώρα μετά την κατανάλωση του γεύματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση και των δύο, συγκρινόμενα με το χρόνο 0. Η τιμή των μεταβλητών αυτών, από την 1^η ώρα και μέχρι και την 4^η, παρέμεινε υψηλότερη από αυτή στο χρόνο 0, παρά τις αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Η μέγιστη τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου καθώς και της αντίστασης του ορού στην οξείδωση εντοπίστηκε την 1^η ώρα μετά το γεύμα, αποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις της σταφίδας όχι μόνο είναι βιοδιαθέσιμες αλλά και άμεσα απορροφούμενες. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον και σημαντικό είναι να μελετηθεί το χρονικό διάστημα στο οποίο παραμένουν αυξημένες οι μεταβλητές αυτές, ώστε να προσδιοριστεί η συχνότητα με την οποία θα πρέπει να καταναλώνεται η σταφίδα για να ασκεί τον αντιοξειδωτικό της ρόλο.

Αρκετές από τις φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στη σταφίδα, ανιχνεύθηκαν και στο πλάσμα των εθελοντών, επιβεβαιώνοντας ότι είναι βιοδιαθέσιμες. Η συγκέντρωση αρκετών από αυτές (καμφερόλη, κερκετίνη, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, p- υδρόξυ- βενζοϊκό οξύ) καθώς και του ολεανολικού οξέος παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά την κατανάλωση του γεύματος. Ο χρόνος που παρουσιάστηκε η μέγιστη συγκέντρωση δεν ήταν ίδιος για κάθε φαινολική ένωση (φλωρετικό οξύ 4^η ώρα, καμφερόλη 2^η ώρα, φερουλικό 1^η ώρα). Μια πιθανή εξήγηση είναι η διαφορετική τους χημική δομή, η οποία όπως είναι γνωστό, επηρεάζει την απορρόφηση και το μεταβολισμό τους, τόσο στο λεπτό έντερο, όσο και στο κόλον από τη μικροβιακή μικροχλωρίδα (D' Archivio et al., 2010). Ωστόσο, φαίνεται ότι μετά το χρόνο που εμφανίζεται η μέγιστη συγκέντρωση, παρατηρείται μείωση και μετά εκ νέου αύξηση στις περισσότερες πολυφαινόλες (**Σχήμα 5.1**). Η αύξηση αυτή πιθανώς οφείλεται στην εντεροηπατική επανακυκλοφορία, κατά την οποία οι φαινόλες επαναπορροφώνται από το έντερο και μένουν στον οργανισμό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Η ανίχνευση του ολεανολικού οξέος στο πλάσμα των εθελοντών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς είναι ένα τριτερπένιο με πολλές βιολογίες δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Όπως έχει αναφερθεί, έχει ηπατοπροστατευτική, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και

αντιφλεγμονώδη δράση και χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ΧΝΝ. Επομένως, ο προσδιορισμός του στις σταφίδες αλλά και στο πλάσμα των εθελοντών καθιστά τη σταφίδα ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας.

Ένας σημαντικός αριθμός από τις φαινολικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στο πλάσμα των εθελοντών μετά την κατανάλωση της σταφίδας, έχει προσδιοριστεί και από άλλες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε μούρα και ελιές (Koli et al., 2010, Kountouri et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, στο πλάσμα των εθελοντών, μετά την κατανάλωση μούρων σε καθημερινή βάση, ανιχνεύθηκε κερκετίνη, καφεϊκό οξύ, p- κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ και 3,4- διυδροξυ- φαινυλοξικό οξύ των οποίων η συγκέντρωση στην ομάδα που κατανάλωνε μούρα ήταν αυξημένη σε σχέση με το χρόνο 0 καθώς και με την ομάδα που δεν κατανάλωνε. Οι Kountouri et al. το 2007 έδειξαν ότι το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του πλάσματος των εθελοντών, που είχαν καταναλώσει ελιά, αυξήθηκε μετά το γεύμα (23.74 ± 2.22 τη 2^η ώρα έναντι 20.74 ± 0.99 στο χρόνο 0). Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τη αντίσταση του ορού στην οξειδωση-ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ($0,109 \pm 0,07$ την 3^η ώρα έναντι $0,071 \pm 0,05$ στο χρόνο 0). Επιπλέον στο πλάσμα των εθελοντών ανιχνεύθηκε p- υδοξυ-βενζοϊκό οξύ, του οποίου η συγκέντρωση παρουσίασε μέγιστο 2 ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος, όπως συνέβη και στην παρούσα δοκιμασία. Επομένως, παρά το γεγονός ότι η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών επηρεάζεται, εκτός των άλλων, από τη σύσταση του τροφίμου, είναι φανερό ότι τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών δεν διαφέρουν σημαντικά και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι βασικές αρχές βιοδιαθεσιμότητας είναι κοινές.

Όσον αφορά στις πολυφαινόλες που δεν ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα των εθελοντών, αλλά εντοπίστηκαν στη σταφίδα, πολλοί παράγοντες ενδεχομένως εμπλέκονται. Αρχικά, είναι πιθανό να έχουν μεταφερθεί σε κάποιο όργανο-ιστό και να μην ανιχνεύονται στο αίμα. Περαιτέρω έρευνα και γνώση είναι απαραίτητη για να προσδιοριστούν όλα τα μεταβολικά μονοπάτια και να κατανοηθεί ο μεταβολισμός των πολυφαινολικών ενώσεων. Επιπλέον μπορεί να μεταβολίζονται σε μεταβολίτες και ενώσεις οι οποίες είναι άγνωστες ως τώρα και επομένως δεν τις ανιχνεύουμε. Τέλος, είναι πιθανό είτε να απορροφώνται και να αποβάλλονται ταχύτατα είτε να καθυστερεί πολύ η απορρόφησή τους και να μην μπορούμε να τις ανιχνεύσουμε με το παρόν πρωτόκολλο.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας (GC- MS). Η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία για ένα ευρύ φάσμα πολυφαινολικών ενώσεων (Shahrzad et al., 1998) 1998). Η ανίχνευση με αέρια

χρωματογραφία πραγματοποιείται με διάφορους ανιχνευτές, όπως η φασματομετρία μάζας, η οποία προσφέρει πολύ καλή ανάλυση και επιλεκτικότητα. Απαραίτητη διεργασία πριν τη χρήση της GC- MS είναι η παραγωγοποίηση του δείγματος, ώστε να μην προσροφηθεί στη στατική φάση με επακόλουθη απώλεια δείγματος και επιβάρυνση του συστήματος (Konacs et al., 2008).

Περιοριστικοί παράγοντες

Γνωρίζουμε ότι η εντερική απορρόφηση αρκετών πολυφαινολών είναι υψηλή. Ωστόσο, η συγκέντρωση στο πλάσμα της κάθε φαινολικής ένωσης, σπάνια υπερβαίνει το 1mM μετά την κατανάλωση 10 -100 mg αυτής. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού ή του πλάσματος υποδεικνύει ότι περισσότερες φαινολικές ενώσεις είναι παρούσες, κυρίως με τη μορφή μεταβολιτών, που παραμένουν άγνωστοι, και παράγονται είτε στους ιστούς μας είτε από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Περαιτέρω ερευνητική μελέτη είναι απαραίτητη ώστε να ανιχνεύσουμε αυτούς τους μεταβολίτες, κυρίως λόγω της ισχυρής βιολογικής τους δράσης (Scalbert et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη, στο πλάσμα των εθελοντών αναλύθηκαν και ανιχνεύθηκαν οι πολυφαινολικές ενώσεις που εντοπίστηκαν προηγουμένως στην Κορινθιακή σταφίδα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν ίδια για τα δείγματα αίματος και τα δείγματα σταφίδας (ενζυμική υδρόλυση, SPE, παραγωγοποίηση, GC- MS) και φάνηκε ότι η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα ήταν αρκετά μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στη σταφίδα. Δεν ανιχνεύθηκαν πιθανοί μεταβολίτες των φαινολικών αυτών ενώσεων, οι οποίοι ενδεχομένως να έχουν βιολογική δράση και να συμβάλλουν στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του πλάσματος καθώς και στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση.

Η μικροβιακή μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πολυφαινολών. Ο ακριβής μηχανισμός, καθώς και η αναλογία των φαινολικών ενώσεων που απορροφώνται στο λεπτό έντερο ή στο κόλον δεν είναι ακόμα γνωστά και χρειάζεται περεταίρω έρευνα. Οι διαφορές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου και ο πιθανός διαφορετικός μεταβολισμός των πολυφαινολών θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις μεγάλες ατομικές διαφορές που παρατηρούνται στη βιοδιαθεσιμότητα τους (Scalbert et al., 2000).

Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολικών συστατικών είναι η ηλικία (D' Archivio et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη, οι εθελοντές που συμμετείχαν είχαν ηλικία 18-40 ετών. Επομένως δε μπορούμε να γνωρίζουμε την κινητικότητα

των πολυφαινολών και την αντίσταση του ορού στην οξειδωση σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας ή ακόμα και τρίτης, όπου η παραγωγή των ελεύθερων ριζών αυξάνεται.

Τέλος, η δοκιμασία ολοκληρώθηκε μετά την 5^η αιμοληψία (4^η ώρα) και παρατηρήθηκε η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών μέχρι την ώρα αυτή. Έτσι, δε μπορούμε να γνωρίζουμε την τύχη τους περισσότερες ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος ή ακόμα και το χρονικό διάστημα που παραμένουν στον οργανισμό. Μελλοντικά θα ήταν σκόπιμο να μελετηθεί η κινητική των φαινολικών συστατικών στο πλάσμα και στα ούρα των εθελοντών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μεταγευματικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anderson, O.M., Jordheim, M.: The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: *Boca Raton, FL, USA*, **2006**, 472-551.
2. Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. *J Agric Food Chem.* **2000**, 48, 1746-1751.
3. Arts ICW, van De Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 1752–7.
4. Arts ICW., Hollman PCH.: Polyphenols and disease risk in epidemiological studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 317-325.
5. Asami DK, Hong YJ, Barrett DM, Mitchell AE.: Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1237– 41.
6. Aura, A.M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K.A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K.M., Poutanen, K., Santos-Buelga, C.: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* **2005**, 44, 133–142.
7. Boersma, M.G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N.H., van Iersel, M.L., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.: Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 662–670.
8. Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., Toschi, T.G.: Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7026–7032.

9. Bugianesi, R., Salucci, M., Leonardi, C., Ferracane, R., Catasta, G., Azzini, E., Maiani, G.: Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and betacarotene in cherry tomatoes. *Eur. J. Nutr.* **2004**, 43, 360–366.
10. Chiou A., Karathanos V. T., Mylona A., Salta F. N., Preventi F., Andrikopoulos N. K.: Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chem.* **2007**, 102: 516–522.
11. Cicerale, S., Conlan, X.A., Barnett, N.W., Sinclair, A.J., Keast, R.S.: Influence of heat on biological activity and concentration of oleocanthal--a natural anti-inflammatory agent in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 1326–1330.
12. Clifford MN.: Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1033– 43.
13. Crozier A., Jaganathb In., Cliffordc M.: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 1001–1043.
14. D' Archivio M., Filesì C., Vari R., Scazzocchio B., Masella R.: Bioavailability of polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, 11, 1321-1342.
15. Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., Williamson, G.: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **2000**, 468, 166–170.
16. De Lorgeril M., Salen P., Paillard P., Laporte P., Boucher P., De Leiris J.: Mediterranean diet and the French Paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc. Res.* **2002**, 54: 503-515.
17. DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R.: Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3957–3964.

18. Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J.: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 394–411.
19. Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., Remesy, C.: Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7721–7727.
20. Ferracane, R., Pellegrini, N., Visconti, A., Graziani, G., Chiavaro, E., Miglio, C., Fogliano, V.: Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8601–8608.
21. Finley, J. W., Kong, A. N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., Lei, X. G.: Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 6837–6846.
22. Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T.: Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2765–2771.
23. Gliszczynska-Swiglo, A., Ciska, E., Pawlak-Lemanska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T., Tyrakowska, B.: Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit. Contam.* **2006**, 23, 1088–1098.
24. Gliszczynska-Swiglo, A., Tyrakowska, B.: Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci* **2003**, 68, 1844–1849.
25. Goldberg, D.M., Yan, J., Soleas, G.J.: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* **2003**, 36, 79–87.
26. Gomez-Rico, A., Salvador, M.D., La Greca, M., Fregapane, G.: Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7130–7136.

27. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al.: Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* **2001**, 41: 492–9.
28. Guentez R., Kallithraka S., Makris D., Kefalas P.: An Analytical Survey of the Polyphenol of seeds of varieties of Grape (*Vitis vinifera*) cultivated in Greece: Implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. *Phytochem. Anal.* **2005**, 16, 17-23.
29. Gutierrez, F., Fernandez, J.L.: Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 571–577.
30. Howard A., Chorpá M., Thurnham D.I., Strain J.J., Fuhrman B., Aviram M: Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Medical Hypoth.* **2002**, 59(1): 101-104.
31. Huang, D. J., Ou, B. X., Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841–1856.
32. Kaliora A., Kountouri A., Karathanos V.: Antioxidant Properties of Raisins (*Vitis vinifera* L.). *J. Med. Food* 12 (6) **2009**, 1302-1309.
33. Khatun, M., Eguchi, S., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T.: Effect of the thermal treatment on radical-scavenging activity of some spices. *Food Sci. Technol. Res.* **2006**, 12, 178–185
34. Klaiber, R.G., Baur, S., Koblo, A., Carle, R.: Influence of washing treatment and storage atmosphere on phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic acid content of minimally processed carrot sticks. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1065–1072.
35. Koli R., Erlund I., Jula A., Merniemi J., Mattila P., Alfthan G.: Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agric Food Chem.* **2010**, 58, 3927-3932.

36. Kountouri A., Mylona A., Kaliora A., Andrikopoulos N.: Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*, **2007**, 14 659–667.
37. Kovacs A., Kende A., Mortl M., Volk G, Rikker T., Torkos K.: Determination of phenols and chlorophenols as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1194, 139–142
38. Lavelli, V., Fregapane, G., Salvador, M.D.: Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3002–3007.
39. Lesser, S., Cermak, R., Wolfram, S.: Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J. Nutr.* **2004**, 134, 1508–1511.
40. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727–747.
41. Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M.J., Yang, C.S.: Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 935–942.
42. Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N.: Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 139–147.
43. Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C.: Quercetin 3-*O*-β-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* **2000**, 33: 667–76.
44. Morton, M.S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L.D., Evans, B.A.: Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J. Nutr.* **2002**, 132, 3168–3171.

45. Mullen, W., Archeveque, M.A., Edwards, C.A., Matsumoto, H., Crozier, A.: Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: Impact of a full-fat yogurt. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 11157–11164.
46. Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A.: Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br. J. Nutr.* **2006**, 96, 107–116.
47. Mullen, W., Edwards, C.A., Serafini, M., Crozier, A.: Bioavailability of pelargonidin-3-Oglucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 713–719.
48. Mullen, W., Stewart, A.J., Lean, M.E., Gardner, P., Duthie, G.G., Crozier, A.: Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5197–5201.
49. Munoz, Y., Garrido, A., Valladares, L.: Equol is more active than soy isoflavone itself to compete for binding to thromboxane A(2) receptor in human platelets. *Thromb Res.* **2009**, 123, 740–744.
50. Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A., Fogliano, V.: Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6526–6531.
51. Nemeth K, Plumb WG, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA.: Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr.* **2003**, 42: 29-42
52. Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., Voutilainen, S.: Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2274–2281.
53. Okogeri, O., Tasioula-Margari, M.: Changes occurring in phenolic compounds and alphanatocopherol of virgin olive oil during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1077–1080.

54. Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.P., Macia, A., Motilva, M.J.: Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 5743–5749.
55. Ovesna, Z., Kozics, K., Slameṅova, D.: Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res.* **2006**, 600, 131–137.
56. Parr AJ, Bolwell GP.: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 80, 985–1012.
57. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F.: The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 296, 631–636.
58. Perez-Jimenez, J., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Diaz-Rubio, M. E., Garcia-Diz, L., Goni, I., Saura-Calixto, F.: Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2009**, 64, 102–107
59. Pergola, P.E., Krauth, M., Huff, J.W., Ferguson, D.A., Ruiz, S., Meyer, C.J., Warnock, D.G.: Effect of bardoxolone methyl on kidney function in patients with T2D and Stage 3b-4 CKD. *Am. J. Nephrol.* **2011**, 33, 469–476.
60. Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U.: Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs*, **2009**, 20, 880–892.
61. Porrini, M., Riso, P., Testolin, G.: Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *Br. J. Nutr.* **1998**, 80, 353–361.
62. Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Ibarra-Prez, F.J., Nava-Bermen, C.A., GallegosInfante, J.A.: Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Food Chem.* **2007**, 100, 31–35.
63. Scalbert A, Williamson G.: Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, 130: 2073-2085.

64. Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarch, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 81(suppl.), 215S–217S.
65. Scheepens Ar., Tan K., Paxton J.: Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr.* **2010**, 5, 75-87.
66. Setchell, K.D., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E.: The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* **2002**, 132, 3577–3584.
67. Setchell, K.D., Clerici, C., Lephart, E.D., Cole, S.J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B.E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N.M., Lund, T.D., Handa, R.J., Heubi, J.E.: S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 1072–1079.
68. Shahrzad S., Bitsch I.: Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **1998**, 705, 87–95.
69. Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A.: Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, 84, 299–305.
70. Sultana, N., Ata, A.: Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 739–756.
71. Tamura, M., Nakagawa, H., Tsushida, T., Hirayama, K., Itoh, K.: Effect of pectin enhancement on plasma quercetin and fecal flora in rutin-supplemented mice. *J. Food. Sci.* **2007**, 72, S648–S651.
72. Tsao Rong: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2: 1231-1246.

73. Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., Garcia-Viguera, C.: Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3029–3034.
74. Vinson JA: Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, 439, 151-164.
75. Visioli F., De La Lastra C., Andres-Lacueva C., Aviram M., Calhau C., Cassano Al., D'Archivio M., Faria An., Fave G., Fogliano V., Llorach R., Vitaglione P., Zoratti M., Edeas M.: Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2011**, 51 (6), 524-546.
76. Wang, X., Ye, X.-l., Liu, R., Chen, H.-L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.-D., Wang, Z., Li, W.-I Hai, C.-X. :Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, 184, 328–337.
77. Wilkinson, A.P., Gee, J.M., Dupont, M.S., Needs, P.W., Mellon, F.A., Williamson, G., Johnson, I.T.: Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro. *Xenobiotica* **2003**, 33, 255–264.
78. Williamson G., Carughi Ar.: Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutrition Research* **2010**, Vol. 30, Issue 8, Pages 511-519.
79. Williamson G., Manach C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 243-255.
80. Wolfe, K. L., Kang, X. M., He, H. J., Dong, M., Zhang, Q. Y., Liu, R. H.: Cellular antioxidant activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8418–8426.
81. Wolfe, K. L., Liu, R. H.: Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 8896–8907
82. Wu, X., Cao, G., Prior, R.L.: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.* **2002**, 132, 1865–1871.

83. Xu, B., Chang, S.K.: Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 10718–10731.
84. Xu, B., Chang, S.K.: Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 4754–4764.
85. Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martinez-Cacha, A., Pardo, F., Lopez Nicolas, J.M.: Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51: 4694–4700.
86. Αρώνη - Τσίχλη Καίτη: Το σταφιδικό ζήτημα και οι κοινωνικοί αγώνες, εκδ. Παπαζήση, Αθήνα **1999**.
87. Γεννάδιος Π. «Λεξικόν Φυτολογικόν», 1959, έκδ. β'.
88. Καρδούλης Γ. Αλέξανδρος: Εγκυκλοπαιδικό λεξικό τροφίμων και ποτών, εκδ. Παπασωτηρίου, Αθήνα **2003**.
89. Κριμπά Β.Δ.: Ελληνική Αμπελογραφία, Αθήνα **1943**, 1^{ος} τόμος.
90. Κριμπά Β.Δ.: Ελληνική Αμπελογραφία, Αθήνα **1943**, 1^{ος} τόμος.
91. Κωνσταντίνου Χάρης: Προσδιορισμός ανθοκυανινών στην Κορινθιακή σταφίδα πριν και μετά από θερμική της επεξεργασία. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα **2008**.
92. Ξένος Στέφανος: Ιστορία του σταφιδοκαρπού, εκδ. Ακρόπολις Φιλολογική, Τόμ. 1, Αρ. 11, Αθήνα **1888**.
93. Σταυρακάκης Μ.: Σταφιδοποιία, έκδ. Γεωπονικού Πανεπιστημίου, Αθήνα **1986**.
94. Χαλουλάκος Τζανέτος-Ιωάννης: Μελέτη μεγεθών και διεργασιών που επηρεάζουν την αποθήκευση και τη διακίνηση της Σουλτανίνας. Πτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικών Βιομηχανιών, Αθήνα **1993**.

