

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της Ιωάννου Ελίνας

«Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών της
ελιάς στο αίμα»



Επιβλέπων καθηγητής:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Μπόσκου Γεώργιος

Χίου Αντωνία

Αθήνα, Ιούνιος 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	
A.1.1. Αντιοξειδωτικές ουσίες	7
A.1.2. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών	7
A.1.3. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών	10
A.1.4. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών	10
A.1.4.1. Βιολογικά αντιοξειδωτικά	10
A.1.4.2. Συνθετικά αντιοξειδωτικά	11
A.1.4.3. Φυσικά αντιοξειδωτικά	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	
A.2.1. Πολυφαινόλες	18
A.2.2. Πολυφαινόλες ελιάς	23
A.2.3. Πολυφαινόλες ελαιολάδου	27
A.2.4. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικών συστατικών της ελιάς και του ελαιολάδου	33
A.2.5. Τσάι	34
A.2.6. Κρασί	35
A.2.7. Κακάο	35
A.2.8. Φρούτα και λαχανικά	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ	
A.3.1. Αντιοξειδωτικές ουσίες και υγεία	37
A.3.2. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στη Μεσογειακή διαίτα	38
A.3.3. Καρδιαγγειακά νοσήματα	38
A.3.3.1. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και καρδιαγγειακά νοσήματα	40

A.3.3.2. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και υπέρταση	41
A.3.4. Καρκίνος	41
A.3.4.1. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και νεοπλασματικές παθήσεις	42
A.3.5. Άλλες παθήσεις	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	
A.4.1. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών	44
A.4.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών	44
A.4.3. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου	49
A.4.4. Απορρόφηση και μεταβολισμός πολυφαινολών	56
A.4.5. Συνοπτική παρουσίαση μελετών βιοδιαθεσιμότητας	60
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
B.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς τυροσόλης	66
B.1.1. Όργανα/ Υλικά	66
B.1.2. Αντιδραστήρια	66
B.1.3. Εκτέλεση	66
B.1.4. Αποτελέσματα	67
B.1.5. Πρότυπη καμπύλη τυροσόλης	68
B.2. Επεξεργασία πιλοτικών δειγμάτων αίματος	68
B.2.1. Διατροφική παρέμβαση	68
B.2.2. Αιμοληψία με την τεχνική του φλεβοκαθετηριασμού	69
B.2.2.1. Αντιδραστήρια	69
B.2.2.2. Εκτέλεση αιμοληψίας	69
B.2.3. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος	70
B.2.3.1. Όργανα/ Υλικά	70
B.2.3.2. Αντιδραστήρια	70
B.2.3.3. Εκτέλεση	70
B.2.4. Επεξεργασία πλάσματος	71
B.2.4.1. Όργανα/ Υλικά	71

B.2.4.2. Αντιδραστήρια	71
B.2.4.3. Εκτέλεση	72
B.2.5. Μέθοδος Folin – Ciocalteu	73
B.2.6. Αποτελέσματα	73
B.3. Διατροφική παρέμβαση για την ανάλυση των πολυφαινολών της ελιάς στο πλάσμα	78
B.4. Αιμοληψία – Επεξεργασία δειγμάτων αίματος	78
B.4.1. Όργανα/ Υλικά	78
B.4.2. Εκτέλεση	79
B.5. Επεξεργασία πλάσματος	79
B.5.1. Όργανα/ Υλικά	79
B.5.2. Αντιδραστήρια	80
B.5.3. Εκτέλεση	80
B.5.4. Μέθοδος Folin – Ciocalteu	81
B.5.5. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteu	81
B.6. Επεξεργασία πλάσματος με SPE	82
B.6.1. Όργανα/ Υλικά	82
B.6.2. Αντιδραστήρια	82
B.6.3. Εκτέλεση	83
B.7. Μέθοδος DPPH	84
B.7.1. Όργανα/ Υλικά	84
B.7.2. Αντιδραστήρια	84
B.7.3. Εκτέλεση	84
B.8. Αποτελέσματα	85
B.8.1. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteu	85
B.8.2. Αποτελέσματα DPPH	86
B.9. Επανάληψη πειράματος	88
B.9.1. Αποτελέσματα DPPH	89
B.9.2. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteu	90
B.10. Μέθοδος προσδιορισμού πολυφαινολών στο πλάσμα με Αεριοχρωματογραφία Φασματοφωτομετρία Μαζών (GC-MS)	90
B.10.1. Ανάλυση προτύπων πολυφαινολών	93
B.10.2. Ανάκτηση των πολυφαινολών από το	

πλάσμα	95
B.10.3. Ανάλυση δειγμάτων πλάσματος με GC-MS	96
B.11. Αποτελέσματα GC-MS	96
B.11.1. Δείγματα πλάσματος που έχουν παραλειφθεί με οξικό αιθυλεστέρα	96
B.11.2. Δείγματα πλάσματος που έχουν παραλειφθεί με SPE	103
B.12. Χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης	103
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις διατεμένες ευχαριστίες μου στην Γεωργία Μπόσκου, Λέκτορα του Τμήματος Ενσώματης Διατροφής – Διατροφής, για τη συνεχή πρόθυμη και αξιόλογη βοήθειά μου στην οργάνωση και εκπόνηση του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής αλλά και για τις ανώματες παρεμβάσεις του κατά την ακλόνητη συνεχιστή του θεωρητικού μέρους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αντωνία Λιου, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) καθώς και για τις υποδείξεις της κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Μυλιωνά για τις εύστοχες υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης αυτής καθώς επίσης και για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας με Αέριο χρωματογραφία - Φασματοφωτομετρία Μάζας (GC – MS).

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Φωτεινή Σάλλα, ΠΔ 407/80, για τη συνεχή και πολύτιμη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειραματικού μέρους αλλά και για τη συντολόγιστη ιξική συμπαράστασή της.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2002 – 2003 από την Ιωάννου Ελίνα, φοιτήτρια του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Εργαστήριο Χημείας, Φυτικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων και είχε ως θέμα τη μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών της ελιάς στο αίμα.

Αισθάνομαι την ανάγκη να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μια σειρά ανθρώπων, χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Νικόλαο Κ. Ανδρικόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, για την ανάθεση της πτυχιακής αυτής μελέτης, αλλά και για την πολύτιμη συμβολή του στη διεκπεραίωσή της.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Δρ. Γεώργιο Μπόσκου, Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, για τη συνεχή, πρόθυμη και αξιόλογη βοήθειά του κατά την οργάνωση και εκπόνηση του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής, αλλά και για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του κατά την αναλυτική συγγραφή του θεωρητικού μέρους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αντωνία Χίου, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) καθώς και για τις υποδείξεις της κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Μυλωνά για τις εύστοχες υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης αυτής καθώς επίσης και για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας με Αέριο χρωματογραφία - Φασματοφωτομετρία Μάζας (GC – MS).

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Φωτεινή Σάλτα, ΠΔ 407/80, για τη συνεχή και πολύτιμη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειραματικού μέρους αλλά και για τη ανυπολόγιστη ηθική συμπαράσταση της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα, Ε.Τ.Ε.Π., για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή των αιμοληψιών που πραγματοποιήθηκαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στους συμφοιτητές μου Βασίλη Μπελέκο, Νίκο Γιαννόπουλο, Δημήτρη Καίσαρη, Εύη Καμποσιώρα και Νίκο Σόλομον, για την εθελοντική συμμετοχή τους στις αιμοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Ευχαριστώ το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για τη διάθεση των χώρων και την παροχή των οργάνων για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και συμφοιτήτριά μου Σταυρούλα Χρυσοστόμου για την παρέα και συμπαράστασή της, κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων στο χώρο του εργαστηρίου.

Ιωάννου Ελίνα

Αθήνα, Ιούνιος 2003

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών στην υγεία του ανθρώπου έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Οι πολυφαινόλες, εντάσσονται στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών και παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, ιδιαίτερα παρέχοντας προστασία στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), αλλά και παρεμποδίζοντας τους μηχανισμούς των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες ευθύνονται για την πρόκληση πολλών παθολογικών καταστάσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί της βιολογικής δράσης των πολυφαινολών παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Εμπόδιο στη διερεύνησή τους αποτελούν οι ελλιπείς επιστημονικές γνώσεις όσον αφορά στις διαδικασίες απορρόφησης, μεταβολισμού και απέκκρισης των πολυφαινολών, καθώς και η δυσκολία προσδιορισμού τους σε βιολογικά υγρά, λόγω της έλλειψης μιας τυποποιημένης μεθόδου. Οι επιστημονικές δημοσιεύσεις για τις διαδικασίες απορρόφησης, μεταβολισμού και απέκκρισης των πολυφαινολών περιορίζονται είτε σε δοκιμές σε πειραματόζωα είτε σε διατροφική πρόσληψη από άλλες πηγές πολυφαινολών που δεν περιλαμβάνουν ελαιόλαδο και ελιές.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να συμβάλει πιλοτικά στη μεθοδολογία προσδιορισμού της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών της ελιάς, αφού μέχρι σήμερα δεν έχει δημοσιευτεί καμιά μελέτη που να αναφέρεται στο θέμα αυτό. Η αναλυτική μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα του αίματος, μπορεί με κατάλληλες τροποποιήσεις να αξιοποιηθεί για την εκπόνηση ερευνητικών μελετών με αντικείμενο τον ευρύτερο προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας των ουσιών αυτών σε ανθρώπινους πληθυσμούς.

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών έγινε με Αεροχρωματογραφία - Φασματοφωτομετρία Μαζών (GC-MS).

Έγινε επίσης εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) σε όλα τα δείγματα πλάσματος. Ποσοτική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu, τη μέθοδο DPPH, με GC-MS και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην υγεία του ανθρώπου έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Σε πειράματα που έχουν γίνει *in vitro*, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Οι ακριβείς μηχανισμοί της *in vivo* βιολογικής δράσης των πολυφαινολών παραμένουν ωστόσο αδιευκρίνιστοι.

Στην παρούσα πτυχιική μελέτη αναφέρεται η χημεία των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι μηχανισμοί δράσης τους και οι πηγές τους. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στις πολυφαινόλες, με έμφαση στις πολυφαινόλες της ελιάς και του ελαιολάδου. Ακόμη, αναφέρονται επιδημιολογικά και πειραματικά στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν την προστατευτική δράση τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στον καρκίνο και σε άλλα νοσήματα. Τέλος, παρουσιάζονται οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών από διάφορες διαιτητικές πηγές, συμπεριλαμβανομένου του ελαιολάδου και στα έως τώρα επιστημονικά δεδομένα γύρω από την πέψη, απορρόφηση και μεταβολισμό των πολυφαινολών.

Ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας πτυχιικής μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών στο πλάσμα μετά από κατανάλωση ελαιοκάρπων. Η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης στο αίμα έγινε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Έγινε επίσης συλλογή αίματος από έξι ενήλικες εθελοντές πριν και μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να ακολουθήσουν δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών την προηγούμενη ημέρα και η διαιτητική πρόσληψη αξιολογήθηκε με ανάκληση 24ώρου. Από τα δείγματα αίματος έγινε παραλαβή πλάσματος, καταβύθιση των πρωτεϊνών και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών έγινε με Αεριοχρωματογραφία - Φασματοφωτομετρία Μαζών (GC-MS).

Έγινε επίσης εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) σε όλα τα δείγματα πλάσματος. Περαιτέρω ανάλυση έγινε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, τη μέθοδο DPPH, με GC-MS και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Σημαντικά ευρήματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων καθώς και ο προσδιορισμός του χρόνου στον οποίο σημειώνεται η μέγιστη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον, διαπιστώθηκε το πλεονέκτημα της εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα -ως μεθόδου παραλαβής των πολυφαινολών της ελιάς στο αίμα- έναντι της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) μετά από αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την εφαρμογή τους στα δείγματα πλάσματος. Τέλος, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η τήρηση δίαιτας ελεύθερης πολυφαινολών πριν από τη διεξαγωγή ενός πειράματος βιοδιαθεσιμότητας αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επίτευξη σωστών αποτελεσμάτων.

The aim of the present study was to investigate the bioavailability of plasma polyphenols after the consumption of olives. Blood samples were collected from six adult volunteers before and after olive fruit consumption. Volunteers had been asked to follow a polyphenol-free diet the previous day and their dietary intake was evaluated by a 24-hour recall. Plasma was obtained from all blood samples, proteins were precipitated and were then extracted using ethyl acetate. Polyphenol analysis, qualitative and quantitative, was carried out with Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).

Solid-Phase Extraction (SPE) was carried out as well in all plasma samples. Further analysis occurred using Folin – Ciocalteu method, DPPH method, GC-MS and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

We found that the concentration of total polyphenols in plasma is increased after the consumption of olives. We have also determined the time when maximum concentration occurs. Extraction with ethyl acetate gives better results compared with solid phase extraction, as far as the quantitative and qualitative determination of plasma polyphenols is concerned. Finally, we found that a polyphenol-free diet plays an important role on the reliability of the results on a bioavailability study.

ABSTRACT

In recent years there has been an increased interest regarding the effects of antioxidants on human health. Polyphenols are endowed with important antioxidant properties *in vitro*. The exact mechanisms by which polyphenols act *in vivo* are, however, unclarified.

In the present thesis study antioxidants are extensively described. Emphasis was given on olive fruit and olive oil olive polyphenolic compounds. Epidemiological and experimental data on the protective role of polyphenolic compounds on cardiovascular disease, cancer and other diseases have also been reviewed. Special reference is provided on polyphenolic compounds' bioavailability.

The aim of the present study was to investigate the bioavailability of plasma polyphenols after the consumption of olives. Blood samples were collected from six adult volunteers before and after olive fruit consumption. Volunteers had been asked to follow a polyphenol-free diet the previous day and their dietary intake was evaluated by a 24-hour recall. Plasma was obtained from all blood samples, proteins were precipitated and were then extracted using ethyl acetate. Polyphenol analysis, qualitative and quantitative, was carried out with Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).

Solid-Phase Extraction (SPE) was carried out as well in all plasma samples. Further analysis occurred using Folin – Ciocalteu method, DPPH method, GC-MS and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

We found that the concentration of total polyphenols in plasma is increased after the consumption of olives. We have also determined the time when maximum concentration occurs. Extraction with ethyl acetate gives better results compared with solid phase extraction, as far as the quantitative and qualitative determination of plasma polyphenols is concerned. Finally, we found that a polyphenol-free diet plays an important role on the reliability of the results on a bioavailability study.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΧΗΜΕΙΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Α.1.1: Αντιοξειδωτικές ουσίες

Ος αντιοξειδωτικές ουσίες χαρακτηρίζονται εκείνες οι ουσίες που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης των ελεύθερων ριζών, διατηρώντας τις πελυτοίες και εμποδίζοντας τις να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και το λιπίδια (Μητσόσκου, 1997). Συνήθως με τον όρο αντιοξειδωτικό υποδηλώνεται η ικανότητα ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρονίου προς ένα οξειδωτικό παράγοντα και κατά συνέπεια η προφύλαξη άλλων μορίων τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα (Γαλάρης και Δούλιας, 2001).

Κατά τη διάρκεια της ζωής ο ανθρώπινος οργανισμός βρίσκεται αντιμέτωπος με την παρουσία οξειδωτικών ουσιών. Η ικανότητα να οξειδώνουν διάφορα μόρια - στόχους και να επηρεάσουν μια μεταβολή, η οποία με τη σειρά της, προκαλεί οργανικές δυσλειτουργίες. Η παρουσία στον οργανισμό μεγάλου αριθμού οξειδωτικών ουσιών είναι των αντιοξειδωτικών ουσιών, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες.

Α. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Α.1.2. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών

Ος ελεύθερη ρίζα, ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια (Μητσόσκου, 1997).

Παραδείγματα ελεύθερων ριζών φαίνονται στον πίνακα Α.1.2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**ΧΗΜΕΙΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ****A.1.1. Αντιοξειδωτικές ουσίες**

Ως αντιοξειδωτικές ουσίες χαρακτηρίζονται εκείνες οι ουσίες που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης των ελευθέρων ριζών, δεσμεύοντας τις τελευταίες, και εμποδίζοντας τις να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια (Μπόσκου, 1997). Συνήθως, με τον όρο αντιοξειδωτικό υποδηλώνεται η τάση ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρονίου προς ένα οξειδωτικό παράγοντα και κατά συνέπεια η προφύλαξη άλλων μορίων τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα (Γαλάρης και Δούλιας, 2001).

Κατά τη διάρκεια της ζωής ο ανθρώπινος οργανισμός βρίσκεται «αντιμέτωπος» με ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν διάφορα μόρια - στόχους και να επιφέρουν μια μεταβολή, η οποία με τη σειρά της, προκαλεί οργανικές δυσλειτουργίες. Η παρουσία στον οργανισμό μεγαλύτερου αριθμού οξειδωτικών ουσιών έναντι των αντιοξειδωτικών ουσιών, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες.

A.1.2. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια (Μπόσκου, 1997).

Παραδείγματα ελευθέρων ριζών φαίνονται στον πίνακα A.1.2.

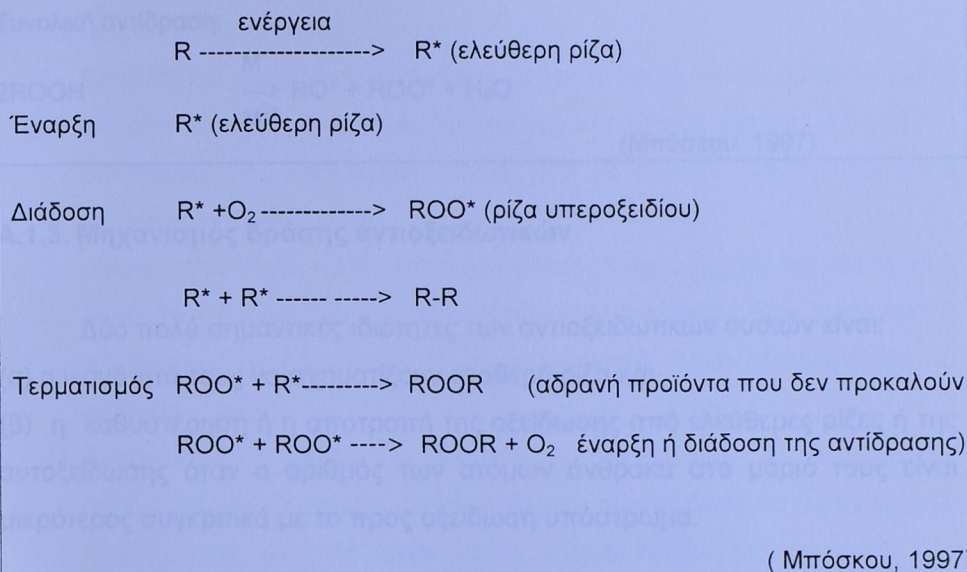
Πίνακας Α.1.2.: Παραδείγματα ελευθέρων ριζών

Όνομα	Χημικός τύπος	Σχόλια
Άτομο υδρογόνου	H^*	Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα
Υπεροξειδίο του οξυγόνου	O_2^*	Δημιουργείται από μεταφορά ηλεκτρονίων στις μεμβράνες του μιτοχονδρίου.
Ρίζα υδροξυλίου	OH^*	Πολύ δραστική. Επιτίθεται σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού.
Υδροπεροξυλική ρίζα	HO_2	Παράγεται κατά τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό.
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2	Παράγεται κατά τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό.
Μονοξειδίο του αζώτου	NO^*	Σχηματίζεται <i>in vivo</i> από το αμινοξύ L- αργινίνη.
Διοξειδίο του αζώτου	NO_2^*	Βρίσκεται στον μολυσμένο αέρα. Σχηματίζεται κατά την αντίδραση NO^* με O_2^* .

Οι ελεύθερες ρίζες είναι συνήθως ασταθείς ενώσεις. Σχηματίζονται κατά τον κανονικό μεταβολισμό στον ανθρώπινο οργανισμό ή από το περιβάλλον (π.χ. μόλυνση, ακτινοβολία, τοξίνες, κ.τ.λ.).

Ο μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών έχει ως εξής: Αρχικά δημιουργείται με κάποιο τρόπο η ελεύθερη ρίζα που αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μη ριζικά μόρια προκύπτουν συνεχώς, με αλυσιδωτές αντιδράσεις, νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι αντιδράσεις αυτές θα σταματήσουν όταν πλέον οι ελεύθερες ρίζες μετατραπούν σε αδρανή προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες (σχήμα Α.1.2.1.).

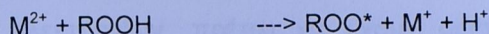
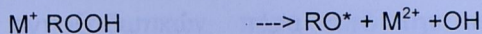
Σχήμα A.1.2.1. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των ελευθέρων ριζών



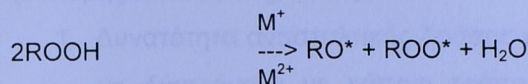
Με τον παραπάνω μηχανισμό προκαλείται και η αυτοξειδωση των λιπών και ελαίων που έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική τάγγιση του ελαίου.

Η διευκρίνιση της προέλευσης των ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη και μεγάλος αριθμός επιστημόνων ασχολείται συστηματικά με έρευνα στο πεδίο αυτό. Γνωρίζουμε όμως ότι για τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό απαιτείται μεταφορά ηλεκτρονίων από τις μεμβράνες του μιτοχονδρίου όπου δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες όπως υδροπεροξυλική ρίζα, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ρίζα υδροξυλίου. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών πιθανόν να οφείλεται και σε μοριακό σχηματισμό από το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης, το οποίο σχηματίζεται από το φως με τη βοήθεια ενός φωτοευαισθητοποιητή (π.χ. χλωροφύλλη). Κατά τη μετάπτωση του οξυγόνου στην απλή διεγερμένη κατάσταση σχηματίζονται υδροϋπεροξείδια και συνεχίζεται η αντίδραση με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Τέλος, κάποια μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προκαλούν το σχηματισμό νέων ριζών κι έτσι δρουν ως προοξειδωτικά (Μπόσκου, 1997) (σχήμα A.1.2.2.).

Σχήμα Α.1.2.2. Δράση προοξειδωτικών



Συνολική αντίδραση:



(Μπόσκου, 1997)

Α.1.3. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Δύο πολύ σημαντικές ιδιότητες των αντιοξειδωτικών ουσιών είναι:

- (α) η ικανότητά τους να σχηματίζουν σταθερή ρίζα και
- (β) η καθυστέρηση ή η αποτροπή της οξειδωσης από ελεύθερες ρίζες ή της αυτοοξειδωσης όταν ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στο μόριό τους είναι μικρότερος συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα.

Α.1.4. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών

Αντιοξειδωτική δράση έχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός ουσιών. Για το λόγο αυτό είναι τόσο απαραίτητος όσο και χρήσιμος ο διαχωρισμός τους και η τοποθέτησή τους σε διάφορες κατηγορίες.

Α.1.4.1. Βιολογικά αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό, με τη βιολογική έννοια του όρου, είναι κάθε ουσία, η παρουσία της οποίας είναι ικανή να προστατεύσει ένα βιολογικό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα κύτταρο ή ένα οργανισμό, από βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έκθεσή του σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες.

Στα βιολογικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται:

- Δεσμευτές ελευθέρων ιόντων μετάλλων
- Ουσίες οι οποίες προκαλούν την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας
- Ουσίες οι οποίες ενισχύουν την επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων

Οι ενώσεις που εντάσσονται στην κατηγορία των βιολογικών αντιοξειδωτικών, πέρα από την ικανότητά τους να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, πρέπει να έχουν ορισμένες από τις παρακάτω ιδιότητες: (Γαλάρης και Δούλιας, 2001)

1. Δυνατότητα ανασταλτικής δράσης ενδοκυτταρικά, να μπορούν δηλαδή να διαπερνούν με κάποιο τρόπο τις κυτταρικές μεμβράνες και να βρίσκονται την κατάλληλη στιγμή στο κατάλληλο σημείο και στην κατάλληλη συγκέντρωση.
2. Δυνατότητα συμμετοχής στους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου.
3. Δυνατότητα αναστολής των μεταγωγικών σημάτων που προκαλεί ο οξειδωτικός παράγοντας με προστατευτικά αποτελέσματα για το κύτταρο – στόχο.
4. Δυνατότητα δράσης χηλικών παραγόντων δεσμεύοντας οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα μετάλλων ούτως ώστε να αναστέλλεται η συμμετοχή τους σε αντιδράσεις τύπου Fenton, τα προϊόντα των οποίων συνήθως προκαλούν κυτταρικές βλάβες.
5. Δυνατότητα βιοσύνθεσης νέων πρωτεϊνών οι οποίες ενέχονται στην άμυνα ή τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων.

A.1.4.2. Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που προστίθενται στα λίπη και στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση και να καταστήσουν έτσι τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

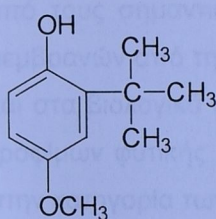
Οι αντιοξειδωτικές ουσίες αυτής της κατηγορίας πρέπει να συνδυάζουν τις εξής ιδιότητες: (Μπόσκου, 1997)

1. Να είναι αποτελεσματικά σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
2. Να μην έχουν καμιά βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
3. Να μην προσδίδουν στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
4. Να είναι ελάχιστα λιποδιαλυτές.
5. Να είναι όσο γίνεται σταθερές στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου.

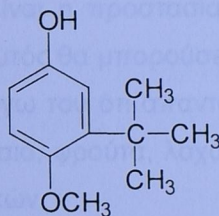
Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία Τροφίμων είναι:

1. Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), μίγμα δύο ισομερών της 2-*τριτ.-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης* και 3-*τριτ.-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης*.
 2. Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), δηλαδή η 2,6-*δι-τριτ.-βουτυλοπαρακρεσόλη*.
 3. Εστέρες του γαλλικού οξέος, όπως ο προπυλικός (PG), ο οκτυλικός και ο δωδεκυλικός.
 4. Η δι-*τριτ.-βουτυλο-υδροκινόνη* (TBHQ)
- Οι χημικοί τύποι φαίνονται παρακάτω (σχήμα Α.1.4.2.1.).

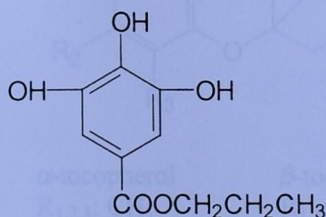
Σχήμα Α.1.4.2. Συνθετικά αντιοξειδωτικά



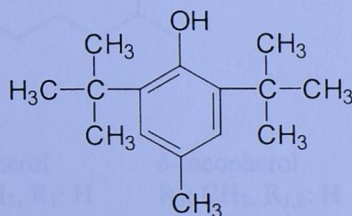
και



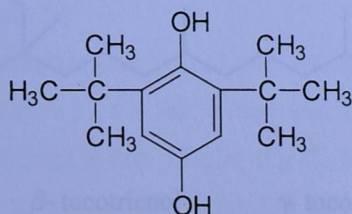
BHA



PG



BHT



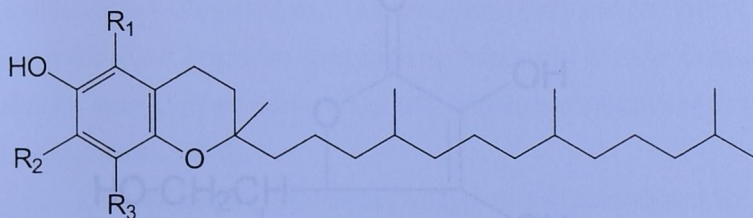
TBHQ

A.1.4.3. Φυσικά αντιοξειδωτικά

Με τον όρο φυσικά αντιοξειδωτικά (natural antioxidants), καλούνται οι ουσίες που προέρχονται από φυσικές πηγές. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν κάποιες ουσίες με βιταμινική δράση (βιταμίνη E, καροτενοειδή, βιταμίνη C), κάποια μέταλλα, τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες και τα τερπένια. Παρακάτω, αναφέρονται πιο αναλυτικά τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους.

► Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E ανήκει στις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Είναι ένα σύμπλεγμα οκτώ ενώσεων: τις α -, β -, γ - και δ - τοκοφερόλες και α -, β -, γ - και δ - τοκοτριενόλες. Η αντιοξειδωτική δράση αφορά κυρίως τις τοκοφερόλες. Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους της είναι η προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από την οξείδωση. Ο ρόλος αυτός θα μπορούσε να την κατατάξει και στα βιολογικά αντιοξειδωτικά, αλλά λόγω του ότι απαντάται σε πληθώρα τροφίμων φυτικής προέλευσης (φυτικά έλαια, φρούτα, λαχανικά), εντάσσεται στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών.

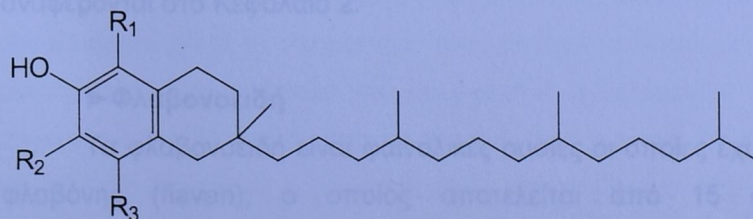


α -tocopherol
R_{1,2,3}: CH₃

β -tocopherol
R_{1,3}: CH₃, R₂: H

γ -tocopherol
R_{2,3}: CH₃, R₁: H

δ -tocopherol
R₃: CH₃, R_{1,2}: H



α -tocotrienol
R_{1,2,3}: CH₃

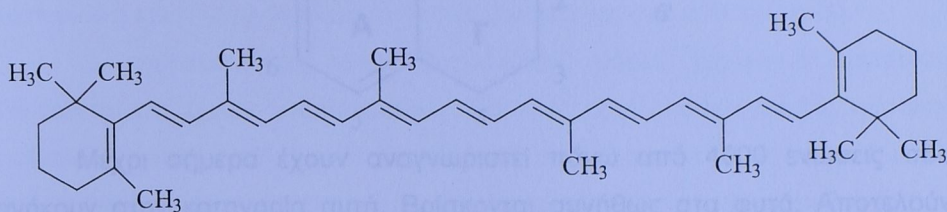
β -tocotrienol
R_{1,3}: CH₃, R₂: H

γ -tocotrienol
R_{2,3}: CH₃, R₁: H

δ -tocotrienol
R₃: CH₃, R_{1,2}: H

► Βιταμίνη Α και Καροτενοειδή

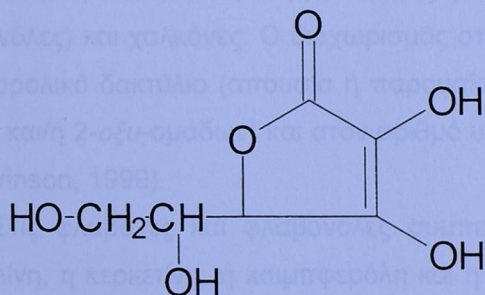
Η βιταμίνη Α ανήκει επίσης στην κατηγορία των λιποδιαλυτών βιταμινών. Στα φυτικά τρόφιμα βρίσκεται με τη μορφή προβιταμίνης που καλείται β-καροτένιο, το οποίο παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη βιταμινική δραστικότητα έναντι των υπόλοιπων καροτενοειδών.



vit. A

► Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ανήκει στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Συμμετέχει σε πληθώρα λειτουργιών στον ανθρώπινο οργανισμό και ανάμεσα σ' αυτές έχει και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

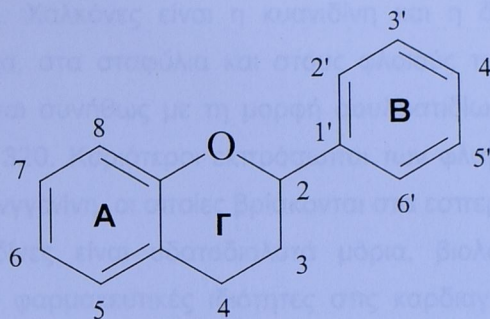


► Φαινόλες και Πολυφαινόλες

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των αντιοξειδωτικών αυτών ουσιών αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.

► Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες οι οποίες έχουν έναν πυρήνα φλαβόνης (flavan), ο οποίος αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα τοποθετημένους σε τρεις δακτύλιους ($C_6-C_3-C_6$). Οι δακτύλιοι καλούνται Α, Β και Γ, όπως φαίνεται και στο σχήμα Α.1.4.3.1.

Σχήμα Α.1.4.3.1: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί πάνω από 4000 ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Βρίσκονται συνήθως στα φυτά. Αποτελούν συστατικά της δίαιτας και παρόλο που δεν συμπεριλαμβάνονται στα θρεπτικά συστατικά, συμμετέχουν σε πληθώρα αντιδράσεων του ανθρώπινου οργανισμού, όπως αποτροπή της οξείδωσης, ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, μείωση των αλλεργικών αντιδράσεων, αποτροπή σχηματισμού καρκινωμάτων και προστασία από βακτήρια και ιούς.

Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, φλαβόνες, κατεχίνες (φλαβανόλες) και χαλκόνες. Ο διαχωρισμός στις τάξεις αυτές γίνεται με βάση τον πυρρολικό δακτύλιο (απουσία ή παρουσία διπλού δεσμού, παρουσία 3-υδροξυ και/ή 2-οξυ-ομάδων) και στον αριθμό υδροξυλίων στους δακτυλίους Α και Β (Vinson, 1999).

Στις φλαβόνες και φλαβονόλες συμπεριλαμβάνονται η απιγενίνη, η λουτεολίνη, η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη. Για τη βιοσύνθεση τους απαιτείται η παρουσία ενζύμων –μεθυλοτρανσφερασών και γλυκοζυλοτρανσφερασών –για την επίτευξη της μεθυλίωσης ή γλυκοζυλίωσης. Η μεταβολική πορεία που ακολουθείται εξαρτάται από το φυτό. Τα μεθυλιωμένα παράγωγα είναι γενικά πιο βιολογικά ενεργά από τα μη μεθυλιωμένα. Μετά το σχηματισμό τους μπορεί να προκύψουν δευτερογενείς μετατροπές. Έχουν βρεθεί και σουλφατίδια φλαβονολών σε μικρές όμως συγκεντρώσεις. Παραδείγματα φλαβονών είναι η απιγενίνη και η λουτεολίνη, που βρίσκονται στους ξηρούς καρπούς και σε βότανα ενώ η μυρισετίνη και κερκετίνη ανήκουν στις φλαβονόλες και η παρουσία τους είναι συνήθης σε διάφορα φρούτα και στα κρεμμύδια.

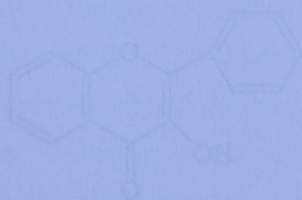
Οι χαλκόνες μετατρέπονται σε φλαβανόνες είτε αυθόρμητα ή με ενζυματική επίδραση. Χαλκόνες είναι η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη, που βρίσκονται στα μούρα, στα σταφύλια και στους φλοιούς των φρούτων. Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως με τη μορφή σουλφατιδίων και ο αριθμός τους κυμαίνεται στις 320. Κυριότεροι εκπρόσωποι των φλαβανονών είναι η εσπεριδίνη και η ναρινγγενίνη, οι οποίες βρίσκονται στα εσπεριδοειδή.

Οι ανθοκυανιδίνες είναι υδατοδιαλυτά μόρια, βιολογικά δραστικά. Πιστεύεται ότι έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες στις καρδιαγγειακές και στις οφθαλμολογικές παθήσεις. Η βιοσύνθεσή τους προκύπτει με το ακόλουθο σχήμα αντιδράσεων: φλαβανόνες → διϋδροφλαβονόλες → *φλαβαν-3,4-διόλες* → ανθοκυανιδίνες.

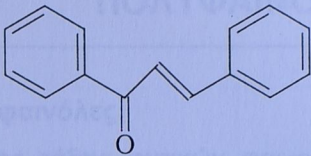
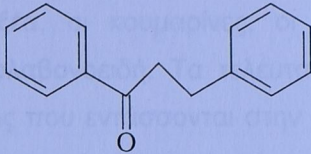
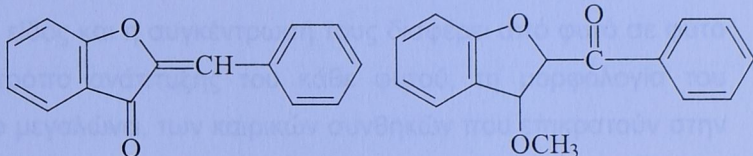
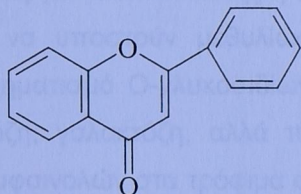
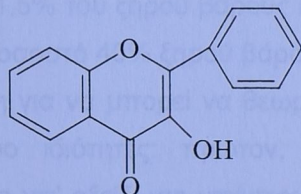
Τα φλαβονοειδή μπορούν να είναι μονομερή, διμερή ή ολιγομερή και έχουν μεγάλες διαφορές στο μοριακό βάρος. Οι ταννίνες-πολυμερή παράγωγα των φλαβονοειδών - χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη δομή τους: τις συμπυκνωμένες και τις υδρολυμένες. Οι υδρολυμένες ταννίνες περιέχουν γαλλικό οξύ.

Στον πίνακα Α.1.4.3. φαίνονται τα φλαβονοειδή και η βασική δομή τους.

Φλαβονόλες



Πίνακας Α.1.4.3.: Βασική δομή κυριότερων φλαβονοειδών

Φλαβονοειδή	Βασική Δομή
Χαλκόνες	
Διυδροχαλκόνες	
Αουρόνες (χρυσόνες)	
Φλαβόνες	
Φλαβονόλες	

ν' απαιτείται την αυτοοξείδωση ή την οξείδωση που προκαλείται από τη δράση των ελευθέρων ριζών και δεύτερον, η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακής δεσμεύσης υδρογόνου) σε περαιτέρω οξείδωση. Τα υποστρώματα που είναι επιρρεπή σε οξείδωση είναι πάρα πολλά και σ' αυτό συμπεριλαμβάνονται λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και το DNA. Οι ελεύθερες ρίζες που είναι υπεύθυνες για την ευθρόνηση ασθενειών και με τις οποίες οι πολυφαινόλες είναι ενεργές, συμπεριλαμβάνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το υδραζύλιο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλες.

Στον επόμενο πίνακα φαίνονται οι κυριότερες τάξεις φυτικών φαινόλων και πολυφαινόλων, ο βασικός σκελετός και η βασική δομή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

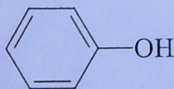
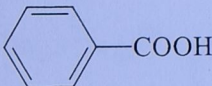
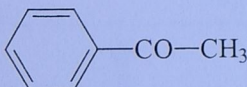
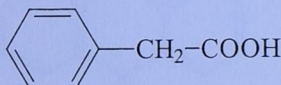
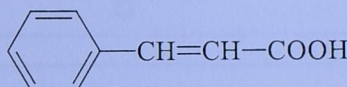
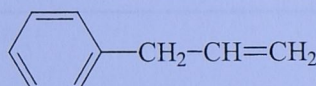
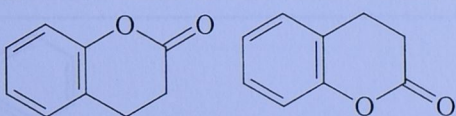
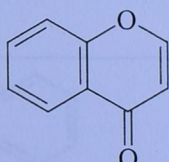
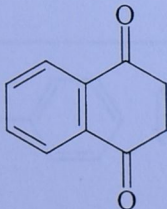
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

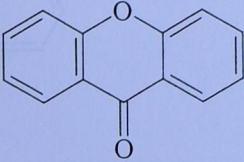
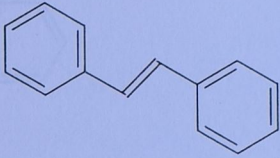
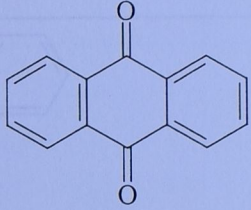
A.2.1. Πολυφαινόλες

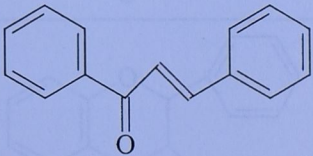
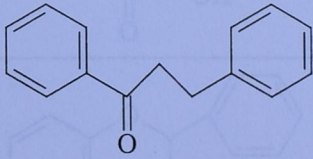
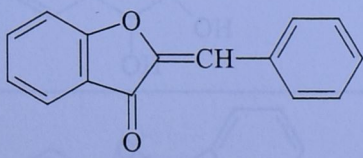
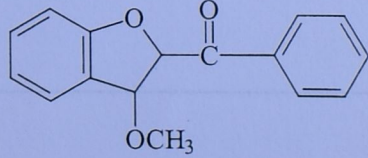
Οι κυριότερες τάξεις φυτικών φαινολών και πολυφαινολών είναι τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι κουμαρίνες, οι ναφθοκινόνες, οι ξανθόνες, τα σιλβένια και τα φλαβονοειδή. Τα τελευταία χρόνια συνεχώς ανιχνεύονται καινούργιες ενώσεις που εντάσσονται στην κατηγορία αυτή. Είναι υπεύθυνες για πολλά χαρακτηριστικά των φυτών, όπως για παράδειγμα το χρώμα και η γεύση. Ωστόσο, το είδος και η συγκέντρωσή τους διαφέρει από φυτό σε φυτό ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξης του κάθε φυτού, τη μορφολογία του εδάφους στο οποίο μεγαλώνει, των καιρικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή όπου καλλιεργείται αλλά και της ηλικίας του. Τα υδροξύλια αυτών των ουσιών μπορούν να υποστούν μεθυλίωση ή εστεροποίηση με διάφορα σάκχαρα προς σχηματισμό Ο-γλυκοσιδίων. Οι αντιδράσεις αυτές συνήθως γίνονται με ραμνόζη, γαλακτόζη, αλλά πιο συχνά με μόρια γλυκόζης. Η συγκέντρωση πολυφαινολών στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης είναι συνήθως της τάξης του 0,1-1,5% του ξηρού βάρους και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και σε ποσοστό 40% ξηρού βάρους.

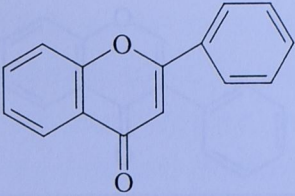
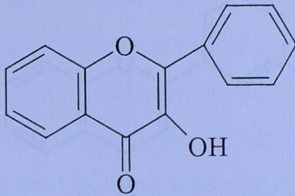
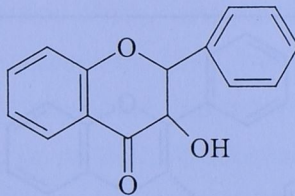
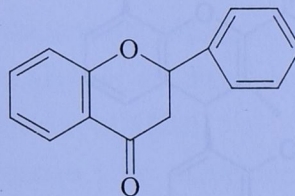
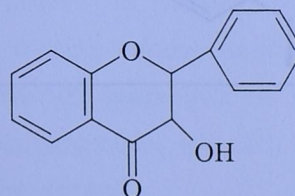
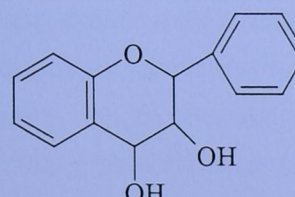
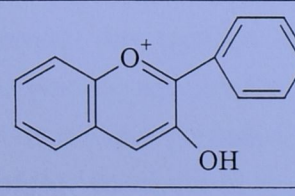
Μια φαινόλη για να μπορεί να θεωρηθεί ως αντιοξειδωτικό πρέπει να έχει τις εξής δύο ιδιότητες: πρώτον, όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση με το υπ' οξειδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή ν' αποτρέψει την αυτοοξειδωση ή την οξειδωση που προκαλείται από τη δράση των ελευθέρων ριζών και δεύτερον, η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακής δέσμμευσης υδρογόνου) σε περαιτέρω οξειδωση. Τα υποστρώματα που είναι επιρρεπή σε οξειδωση είναι πάρα πολλά και σ' αυτά συμπεριλαμβάνονται λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και το DNA. Οι ελεύθερες ρίζες που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ασθενειών και με τις οποίες οι πολυφαινόλες είναι ενεργές, συμπεριλαμβάνουν το υπεροξειδίο του οξυγόνου, το υδροξύλιο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλες.

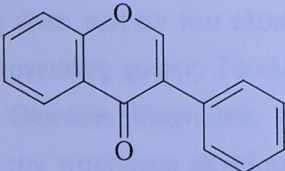
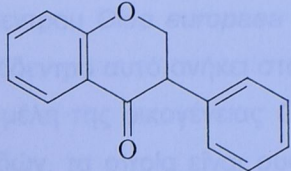
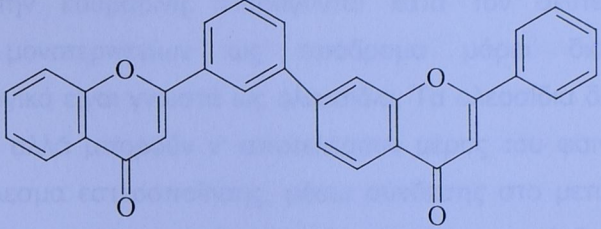
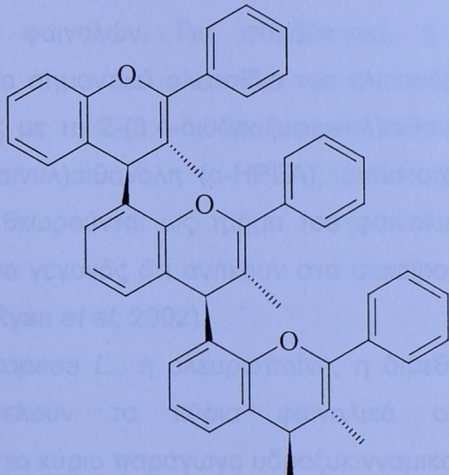
Στον επόμενο πίνακα φαίνονται οι κυριότερες τάξεις φυτικών φαινολών και πολυφαινολών, ο βασικός σκελετός και η βασική δομή τους.

Τάξη	Βασικός Σκελετός	Βασική Δομή
Απλές Φαινόλες	C ₆	
Βενζοκινόνες	C ₆	
Φαινολικά Οξέα	C ₆ -C ₁	
Ακετοφαινόλες	C ₆ -C ₂	
Φαινυλοξικά Οξέα	C ₆ -C ₂	
Υδροξυκινναμικά Οξέα	C ₆ -C ₃	
Φαινυλοπροπένια	C ₆ -C ₃	
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες	C ₆ -C ₃	
Χρωμόνες	C ₆ -C ₃	
Ναφθοκινόνες	C ₆ -C ₄	

Τάξη	Βασικός Σκελετός	Βασική Δομή
Ξανθόνες	$C_6-C_1-C_6$	
Στιλβένια	$C_6-C_2-C_6$	
Ανθρακοκινόνες	$C_6-C_2-C_6$	
Φλαβονοειδή	$C_6-C_3-C_6$	
Λιγνάνες, Νεολιγνάνες	$(C_6-C_3)_2$	
Λιγνίνες	$(C_6-C_3)_n$	

Φλαβονοειδή	Βασική Δομή
Χαλκόνες	
Διυδροχαλκόνες	
Αουρόνες (χρυσόνες)	 

Φλαβονοειδή	Βασική Δομή
Φλαβόνες	
Φλαβονόλες	
Διυδροφλαβονόλη	
Φλαβανόνες	
Φλαβανόλη	
Φλαβανδιόλη ή λευκοανθοκυανιδίνη	
Ανθοκυανιδίνη	

Φλαβονοειδή Ισοφλαβονοειδή	 
Διφλαβονοειδή	
Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες	

Φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε όλα τα μέρη του ελασθέντρου (φρούτα, πόαα, φύλλα, κουκούτσι, φλούδα). Η φύση και η συνέντρωσή τους όμως διαφέρει από ιστό σε ιστό.

Στα φύλλα πιάς έχουν απομονωθεί πολλά φαινολικά συστατικά, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται η ολεουρωπίνη (που είναι και η κύρια φαινολική ουσία), η διμεθυλολεουρωπίνη και η λεγκιστροσίδη. Συμπεριλαμβάνονται επίσης γλυκοσίδια φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα η κερκετίνη και η λουτεολίνη (Ryan *et al.*, 2002).

Ο καρπός φαίνεται ότι παράγει ένα μεγάλο αριθμό φαινολικών συστατικών. Παρό το γεγονός ότι απ' όλα τα μέρη της Ο αυραπασα L. ο καρπός έχει εξηραστεί σε μεγαλύτερο βαθμό, σπρόγγος, οι γλυκές γύαα από τη σύσταση των διαφόρων ποικιλιών σε πολυφαινόλικα υποδείχθηκαν είναι απόλυτα ελάχιστα. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των ελαίων πολυφαινόλων

A.2.2. Πολυφαινόλες ελιάς

Ο ελαιόκαρπος είναι προϊόν του ελαιόδεντρου *Olea europaea* L. που καλλιεργείται στις Μεσογειακές χώρες. Το ελαιόδεντρο αυτό ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας *Oleaceae*. Βιοχημικά, τα μέλη της οικογένειας *Oleaceae* χαρακτηρίζονται από την παρουσία σεκοϊροειδών, τα οποία είναι συστατικά που μοιάζουν με την κουμαρίνη. Παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των μονοτερπενίων ως πρόδρομα μόρια διαφόρων αλκαλοειδών. Λειτουργικά είναι γνωστά ως ολεοσίδια. Τα ολεοσίδια δεν είναι φαινολικά συστατικά, αλλά μπορούν ν' αποτελέσουν μέρος του φαινολικού τμήματος, ως αποτέλεσμα εστεροποίησης, μέσω σύνδεσης στο μεταβολικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, κατά το οποίο προκύπτει η σύνθεση των τερπενίων και των φαινολών. Για παράδειγμα, η ολεωρωπαΐνη και λιγκστροσίδη – τα πιο σημαντικά ολεοσίδια του ελαιοκάρπου – είναι εστέρες του ελενολικού οξέος με τη 2-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)αιθανόλη (3,4-DHPEA), και τη 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλη (p-HPEA), αντίστοιχα. Γι' αυτό και τα φαινολικά ολεοσίδια θεωρούνται ως τμήμα του φαινολικού κλάσματος του ελαιοκάρπου, παρά το γεγονός ότι ανήκουν στα σεκοϊροειδή, τα οποία είναι μη φαινολικά μόρια (Ryan *et al*, 2002).

Στην *Olea europaea* L., η ολεωρωπαΐνη, η διμεθυλολεωρωπαΐνη και λιγκστροσίδη, αποτελούν τα κύρια φαινολικά ολεοσίδια, ενώ η βερμπασκοσίδη είναι το κύριο παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος.

Φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε όλα τα μέρη του ελαιόδεντρου (φρούτο, πάστα, φύλλα, κουκούτσι, φλούδα). Η φύση και η συγκέντρωσή τους όμως διαφέρει από ιστό σε ιστό.

Στα φύλλα ελιάς έχουν απομονωθεί πολλά φαινολικά συστατικά, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται η ολεωρωπαΐνη (που είναι και η κύρια φαινολική ουσία), η διμεθυλολεωρωπαΐνη και η λιγκστροσίδη. Συμπεριλαμβάνονται επίσης γλυκοσίδια φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα η κερκετίνη και η λουτεολίνη (Ryan *et al*, 2002).

Ο καρπός φαίνεται ότι περιέχει ένα μεγάλο αριθμό φαινολικών συστατικών. Παρά το γεγονός ότι απ' όλα τα μέρη της *O. europaea* L. ο καρπός έχει εξεταστεί σε μεγαλύτερο βαθμό, εντούτοις, οι γνώσεις γύρω από τη σύσταση των διαφόρων ποικιλιών σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι ακόμη ελάχιστες. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών

στις διάφορες ποικιλίες οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι ανάλογα με την άδρευση της περιοχής όπου καλλιεργούνται τα ελαιόδεντρα επηρεάζει τη συγκέντρωσή τους. Πιο συγκεκριμένα, όσο πιο πολύ νερό παρέχονταν σ' αυτά, τόσο πιο πολύ η συγκέντρωση σε πολυφαινόλες μειώνονταν (Patumi *et al*, 2002).

Οι πιο σημαντικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων του ελαιοκάρπου περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή.

Οι κύριες φαινολικές αλκοόλες της ελιάς είναι η 3,4-διϋδροξυφαινύλ-αιθανόλη ή υδροξυτυροσόλη ή (3,4-DHPEA) και η p-υδροξυφαινύλ-αιθανόλη ή τυροσόλη ή (p-HPEA).

Η υδροξυτυροσόλη είναι η κύρια πολυφαινόλη στις ακατέργαστες ελιές και βρίσκεται είτε ελεύθερη ή συνδεδεμένη με άλλα μόρια (Blekas *et al*, 2002_β). Προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από οξειδωτικές αλλοιώσεις που προκαλεί το υπεροξείδιο του οξυγόνου (Manna *et al*, 1999) και μειώνει την έκκριση του F_2 -ισοπροστανο-PGF_{2α}, που είναι βιολογικός δείκτης του οξειδωτικού στρες (Visioli *et al*, 2000_α). Σε μια έρευνα έχει βρεθεί ότι οι ελιές Καλαμάτας («Καλαμών») περιέχουν 250-760 mg υδροξυτυροσόλης/Kg, οι ισπανικού τύπου πράσινες ελιές 170-510 mg υδροξυτυροσόλης/Kg και οι ελληνικού τύπου μαύρες ελιές 100-340 mg υδροξυτυροσόλης /Kg (Blekas *et al*, 2002_β).

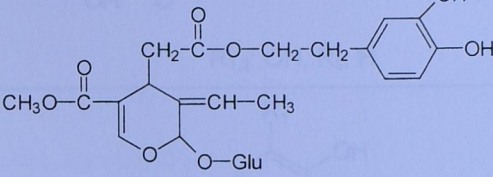
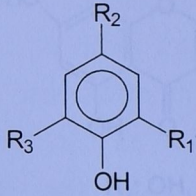
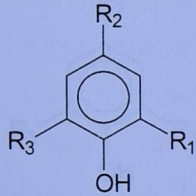
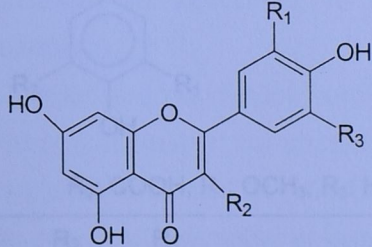
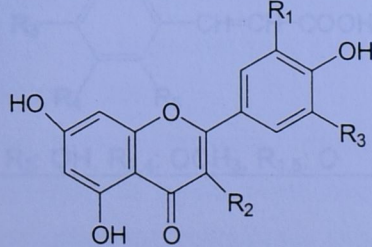
Η τυροσόλη είναι το αμέσως σημαντικότερο φαινολικό συστατικό της ακατέργαστης ελιάς και, όπως η υδροξυτυροσόλη, είτε είναι ελεύθερη ή συνδεδεμένη με άλλα μόρια (Blekas *et al*, 2002_α). Η συγκέντρωση της κυμαίνεται στα 30-160 mg/kg (Bastoni *et al*, 1998).

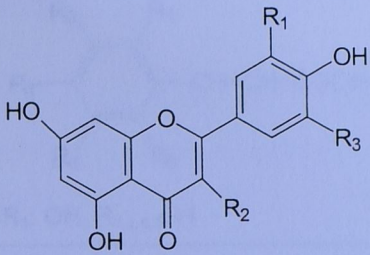
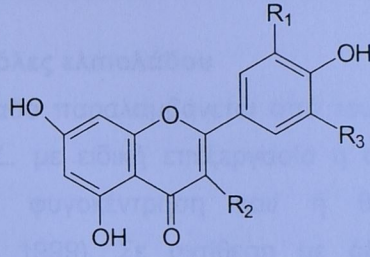
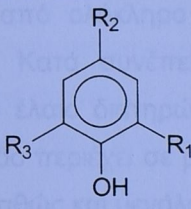
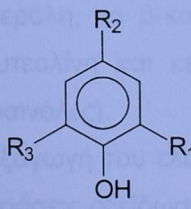
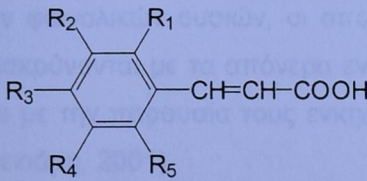
Η ολεωρωπαΐνη είναι εστέρας της υδροξυτυροσόλης και του ελενολικού οξέος και είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του ελαιοκάρπου (Blekas *et al*, 2002). Μπορεί να θεωρηθεί και δείκτης ωρίμανσης της ελιάς. Έχει βρεθεί ότι καθώς η ελιά ωριμάζει η συγκέντρωσή της σε ολεωρωπαΐνη μειώνεται (Esti *et al*, 1998). Συμμετέχει επίσης και σε άλλες λειτουργικές ιδιότητες.

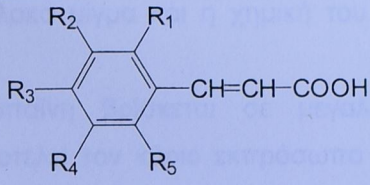
Άλλα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης είναι η ολεωρωπαΐνη άγλυκον, η διμεθυλολεωρωπαΐνη και διάφορα γλυκοσίδια (Blekas *et al*, 2002).

Οι δομές των κυριότερων φαινολικών συστατικών της ελιάς φαίνονται στον πίνακα Α.2.2.

Πίνακας Α.2.2.: Χημική δομή κυριότερων φαινολικών συστατικών της ελιάς

Ονομασία	Χημικός τύπος	Κατηγορία φαινολικής ένωσης
Ολευρωπαΐνη		Γλυκοζίτης υδροxyτυροσόλης
Τυροσόλη	 $R_2: CH_2CH_2OH, R_{1,3}: H$	Απλή φαινόλη
Υδροxyτυροσόλη	 $R_2: CH_2CH_2OH, R_1: OH, R_3: H$	Απλή φαινόλη
Λουτεολίνη		
Απιγενίνη	 $R_{1,2,3}: H$	

Κερκετίνη	 $R_{1,2}: OH, R_3: H$	Φλαβονόλη
Ρουτίνη (3-O- ρουτινοζίτης της κερκετίνης)	 $R_1: OH, R_3: H, R_2: O\text{-}ρουτινοσίδη$	Φλαβονόλη
Συρινγγικό οξύ	 $R_2: COOH, R_{1,3}: OCH_3$	Απλή φαινόλη
Βανιλικό οξύ	 $R_2: COOH, R_1: OCH_3, R_3: H$	Απλή φαινόλη
Σιναπτικό οξύ	 $R_3: OH, R_{2,4}: OCH_3, R_{1,5}: O$	Κινναμικό οξύ

π-κουμαρικό οξύ	 R₃: OH, R_{1,2,4,5}: H	Κινναμικό οξύ
-----------------	--	---------------

(Ryan et al, 2001)

A.2.3. Πολυφαινόλες ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται από τους καρπούς του ελαιόδεντρου *Olea europaea* L. με ειδική επεξεργασία η οποία περιλαμβάνει πλύσιμο, άλεση, μάλαξη, φυγοκέντρηση και/ ή θέρμανση του ελαιοκάρπου (Ανδρικόπουλος, 1999). Σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα έλαια που παραλαμβάνονται από τους σπόρους των φυτών, το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται από ολόκληρο τον καρπό και μάλιστα χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών. Κατά συνέπεια, όλα τα λιπόφυλα μόρια του καρπού μεταφέρονται στο έλαιο διατηρώντας έτσι τις οργανοληπτικές ιδιότητες της ελιάς. Το ελαιόλαδο περιέχει σε μεγάλες ποσότητες το μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, ελαϊκό οξύ, καθώς και μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως η α- και γ-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο, οι φυτοστερόλες, τα τερπένια, τα φλαβονοειδή (λουτεολίνη και κερκετίνη), το σκουαλένιο και τα φαινολικά συστατικά (πολυφαινόλες).

Κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου, κυρίως στο στάδιο της πίεσης και μάλαξης, οι αντιδράσεις οξείδωσης και υδρόλυσης προκαλούν την εμφάνιση απλούστερων φαινολικών ενώσεων. Η διάλυση αυτή έχει σαν συνέπεια ένα μεγάλο μέρος των φαινολικών ουσιών, οι οποίες υπάρχουν στη σάρκα του καρπού, να απομακρύνονται με τα απόνερα ενώ ένα μικρό μέρος να μπαίνει στο ελαιόλαδο και με την παρουσία τους ενισχύεται σημαντικά η αντοχή του στην οξείδωση (Βεκιάρη, 2001).

Τα φαινολικά συστατικά τα οποία υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι μέρος του πολικού κλάσματος το οποίο παραλαμβάνεται από το ελαιόλαδο με εκχύλιση με χρήση μείγματος μεθανόλης- νερού (Boskou, 1996). Το κλάσμα

αυτό είναι πολύπλοκο μίγμα και η χημική του φύση δεν έχει διευκρινιστεί εντελώς.

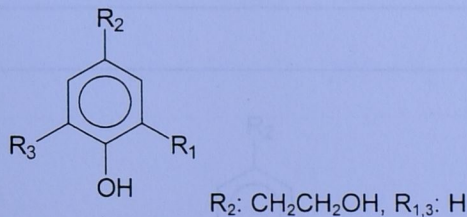
Η ολευρωπαΐνη βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο και αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Visioli και Galli, 2000).

Προτού αναφερθούμε στα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, αξίζει να αναφέρουμε ότι η χρήση του όρου «πολυφαινόλες» (με εξαίρεση τα φλαβονοειδή) δεν είναι απόλυτα σωστός. Για παράδειγμα, η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη –οι πιο άφθονες απλές φαινόλες του ελαιολάδου- έχουν ένα μόνο αρωματικό δακτύλιο και μία ή δύο υδροξυλομάδες, σε αντίθεση με τις «πραγματικές» πολυφαινόλες που έχουν αρκετές υδροξυ-αρωματικές ομάδες στο μόριό τους. Παράγωγα των δύο αυτών φαινολών έχουν επίσης βρεθεί στο ελαιόλαδο-κυρίως στο λιγότερο πολικό κλάσμα του- και περιλαμβάνουν την ολευρωπαΐνη άγλυκον και λιγκστροσίδη. Στο κλάσμα αυτό υπάρχουν επίσης ελενολικό οξύ, φλαβονοειδή (λουτεολίνη, απιγενίνη) και κινναμικό οξύ (Boskou και Visioli, 2003).

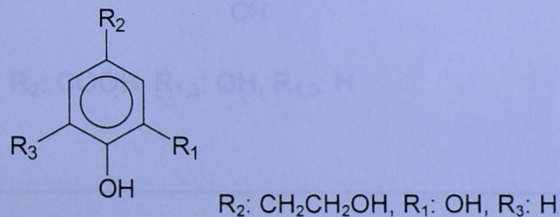
Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που έχουν βρεθεί από διάφορους ερευνητές στο ελαιόλαδο φαίνονται στον πίνακα Α.2.3.1.

Πίνακας Α.2.3.1.: Κύρια φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου

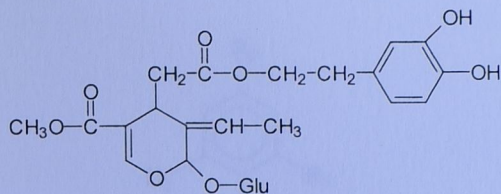
Τυροσόλη



Υδροξυτυροσόλη

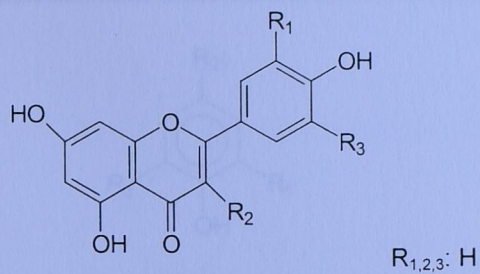


Ολευρωπαΐνη

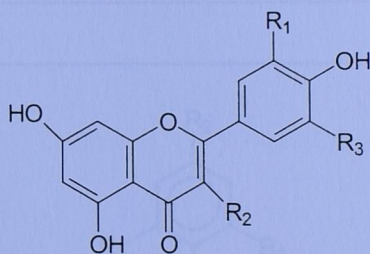


Ολευρωπαΐνη άγλυκον

Απιγενίνη

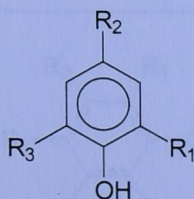


Λουτεολίνη



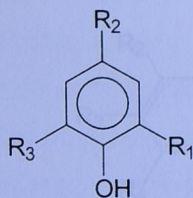
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ

Γαλλικό οξύ



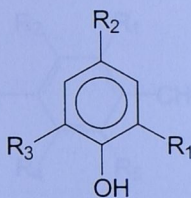
$R_2: COOH, R_{1,3}: OH, R_{1,3}: H$

Βανιλικό οξύ



$R_2: \text{COOH}, R_1: \text{OCH}_3, R_3: \text{H}$

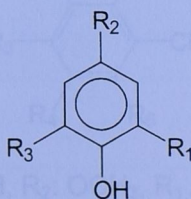
Συρινγγικό οξύ



$R_2: \text{COOH}, R_{1,3}: \text{OCH}_3$

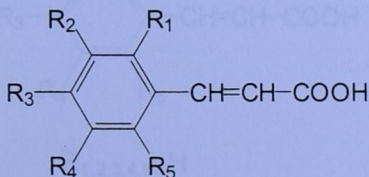
4-υδροξυφαιλυλοξικό οξύ

Ομοβανιλικό οξύ



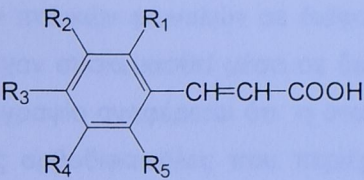
$R_2: \text{CH}_2\text{COOH}, R_1: \text{OCH}_3, R_3: \text{H}$

ο-κουμαρικό οξύ



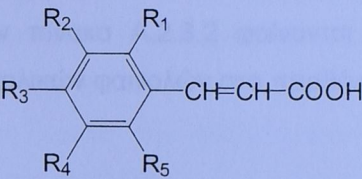
$R_1: \text{OH}, R_{2,3,4,5}: \text{H}$

π-κουμαρικό οξύ



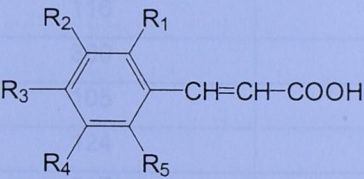
R₃: OH, R_{1,2,4,5}: H

Καφεϊκό οξύ



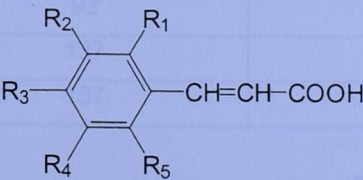
R_{2,3}: OH, R_{1,4,5}: H

Φερουλικό οξύ



R₃: OH, R₂: OCH₃, R_{1,4,5}: H

Σιναιπικό οξύ



R_{1,2,3,4,5}: H

(Boskou και Visioli, 2003)

1. Την ποσότητα των ελαίων.
2. Την ωριμότητα του καρπού.

Έχει βρεθεί ότι οι πολικές φαινόλες έχουν άμεση σχέση με τη σταθερότητα του παρθένου ελληνικού ελαιολάδου. Σε μια πρόσφατη έρευνα μετρήθηκε η συγκέντρωση ολικών πολικών φαινολών σε διάφορους τύπους παρθένου ελαιολάδου τα οποία είχαν συσκευασθεί μέσα σε διάστημα τριών χρόνων. Επειδή στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η σταθερότητα του ελαιολάδου οφείλεται κυρίως στις ορθοδιφαινόλες που περιέχει, στην ίδια έρευνα εξετάστηκε και η σχέση των ορθοδιφαινολών σε σχέση με το ολικό φορτίο πολικών φαινολών και βρέθηκε ότι η συγκέντρωσή τους αυξάνεται όταν αυξάνεται και η συγκέντρωση του ολικού πολικού φαινολικού φορτίου (Blekas *et al*, 2002_a). Στον πίνακα Α.2.3.2 φαίνονται χαρακτηριστικά οι συγκεντρώσεις των ολικών πολικών φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο.

Πίνακας Α.2.3.2.: Συγκέντρωση ολικών πολικών φαινολών του ελαιολάδου

Φαινολική ένωση	Ολικές πολικές φαινόλες	
	[mg/Kg]	[μM]
Τυροσόλη	116	840
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	380	2753
Γαλλικό οξύ	105	618
Βανιλικό οξύ	124	738
Συρινγγικό οξύ	217	1096
4-υδροξυφαιλυλοξικό οξύ	70	417
π-κουμαρικό οξύ	159	969
Καφεϊκό οξύ	92	511
Φερουλικό οξύ	137	706
Σιναπτικό οξύ	137	611

(Blekas *et al*, 2002)

Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι το ποσοστό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με:

1. Την ποικιλία των ελιών.
2. Την ωριμότητα του καρπού.

Έχει δειχθεί ότι στα ώριμα φρούτα το περιεχόμενο των πολυφαινολών σχεδόν είναι το μισό σε σχέση με αυτό των άγουρων φρούτων.

3. Το σύστημα παραλαβής του ελαιολάδου.

Το περιεχόμενο των πολυφαινολών του ελαιολάδου διαφέρει ανάλογα με την τεχνική εξαγωγής που χρησιμοποιείται. Γενικά, φαίνεται ότι:

- Τα συστήματα πίεσης εγγυώνται ελαιόλαδο με υψηλότερο περιεχόμενο σε συνολικές πολυφαινόλες, σε ορθοδιφαινόλες και υδροξυτυροσόλη.
- Το σύστημα φυγοκέντρωσης της πάστας ολόκληρων των φρούτων της ελιάς δίνει ελαιόλαδο με συνολικές πολυφαινόλες πιο χαμηλές σε σχέση με αυτό που λαμβάνεται με τα παραπάνω συστήματα. Η μείωση σε πολυφαινολικές ουσίες καταλογίζεται στη δράση διάλυσης του νερού που χρησιμοποιείται.
- Η λεπτή άλεση ευνοεί την αύξηση του περιεχόμενου των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο.
- Η διάρκεια μάλαξης επιδρά αρνητικά στα συστατικά αυτά, πιθανότατα λόγω της δράσης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και άλλων φαινολοξειδωσών που καταλύουν την οξείδωση των φαινολών σε κινόνες και μετά σε πολυμερη.
- Η υψηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ευνοεί τη διάλυση μερικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στην πάστα και δημιουργεί στη συνέχεια εμπλουτισμό στις πολυφαινόλες του ελαιολάδου (Βεκιάρη, 2001).

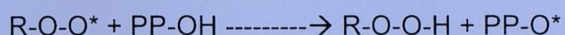
A.2.4. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικών ουσιών της ελιάς και του ελαιολάδου

Η ποιότητα του ελαιολάδου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες ανάμεσα στους οποίους και η αυτοοξείδωση, η οποία αντιπροσωπεύει μια διεργασία που μπορεί σημαντικά να επηρεάσει το άρωμα και τη σταθερότητά του. Η παρουσία των φυσικών αντιοξειδωτικών (τοκοφερολών και πολυφαινολών) μπορεί να επηρεάσει την αυτοοξείδωση του ελαιολάδου με τον εξής τρόπο: οι πολυφαινόλες εξαιτίας της χημικής δομής τους, δρουν σαν δωρητές υδρογόνου δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σχηματιστεί στα αρχικά στάδια της οξείδωσης. Με τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών παρεμποδίζεται η έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η αντίδραση των

ουσιών με τις ελεύθερες ρίζες έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή μέρους της υδροξυυροσόλης στην αντίστοιχη κινόνη. Εξαιτίας της δράσης μερικών από τις πολυφαινόλες σαν αντιοξειδωτικά, δικαιολογείται η μεγάλη σταθερότητα που εμφανίζουν τα παρθένα ελαιόλαδα (Βεκιάρη, 2002).

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών φαίνεται στο σχήμα Α.2.4.

Σχήμα Α.2.4. Δράση πολυφαινολών (PP-OH)



Ρίζα φαινοξειδίου
(σταθεροποίηση)

Α.2.5. Τσάι

Το τσάι περιέχει κυρίως φλαβονοειδή. Σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκονται τέσσερις κατεχίνες: η επικατεχίνη (EC), ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG), η επιγαλλοκετεχίνη (EGC) και ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG). Οι κατεχίνες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών, αποτελούν το 30-50% του ξηρού βάρους του πράσινου τσαγιού και σ' αυτές οφείλεται η γεύση, το χρώμα και το άρωμά του.

Στο τσάι βρίσκονται επίσης φλαβονόλες με κυριότερους εκπροσώπους την κερκετίνη, την καιμπφερόλη και την μυρισετίνη.

Οι φλαβονόλες και οι φλαβονόλες του τσαγιού αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά που σε μερικές περιπτώσεις ξεπερνούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των βιταμινών E και C (Dreosti, 2000).

Κατά την παρασκευή του μαύρου τσαγιού οι κατεχίνες οξειδώνονται και σχηματίζουν τις χρωστικές ουσίες θειοφλαβίνες και θειαρουμπίνες.

Α.2.6. Κρασί

Το κόκκινο κρασί περιέχει διάφορες υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες όπως φαινολικά οξέα, το τρι-υδροξυ-σιλβένιο, ρεσβερατρόλη, φλαβονόλες, φλαβανόλες, προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες. Σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκονται οι προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (500-900mg/L). Το κόκκινο

κρασί είναι πολύ πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες από το άσπρο κρασί (1000-4000mg/L και 200-300mg/L, αντίστοιχα). Στην συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών οφείλεται και η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα του κόκκινου κρασιού. Τα νεαρά κόκκινα κρασιά έχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις προκυανιδινών και ανθοκυανινών, γι' αυτό και έχουν μωβ απόχρωση. Τα επίπεδά τους μειώνονται κατά την ωρίμανση του κρασιού λόγω σχηματισμού νέων ολιγομερών και πολυμερών κοκκινο-πορτοκαλί χρωστικών (Dreosti, 2000).

A.2.7. Κακάο

Το ωμό κακάο αποτελεί πλούσια πηγή πολυφαινολών και κυρίως περιέχει μονομερή φλαβονόλης και προκυανινδικά ολιγομερή της επικατεχίνης, το ποσοστό των οποίων φτάνει έως και το 60% των ολικών πολυφαινολών. Σε μικρότερη ποσότητα περιέχει την φλαβονόλη κερκετίνη και το γλυκοσίδιο της ισοβιτεξίνη. Τα φαινολικά κλοβαμίδιο και δεοξυκλοβαμίδιο και μερικές ανθοκυανίνες προσδίδουν στο ωμό κακάο το μωβ χρώμα (Dreosti, 2000).

Οι πολυφαινόλες του κακάο παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro*.

Η φαινολική σύσταση των προϊόντων που παραλαμβάνονται από το ωμό κακάο (σκόνη κακάο, μαύρη σοκολάτα και σοκολάτα γάλακτος) είναι διαφορετική. Η μαύρη σοκολάτα περιέχει περίπου την τριπλάσια ποσότητα κατεχίνης (53,3 gr /100 gr) από την σοκολάτα γάλακτος (15,9 gr /100 gr).

Έχει βρεθεί ότι 41gr σοκολάτας γάλακτος περιέχουν περίπου την ίδια ποσότητα ολικών πολυφαινολών με μια μερίδα κόκκινου κρασιού ενώ ένα φλιτζάνι ζεστής σοκολάτας περιέχει σε σχέση με μια μερίδα κόκκινου κρασιού περίπου τα 2/3 των ολικών πολυφαινολών αυτού (Waterhouse *et al*, 1996).

Στην Ολλανδία η κατανάλωση σοκολάτας συμβάλλει σε ποσοστό 20% στην ημερήσια πρόσληψη ολικών πολυφαινολών (Arts *et al*, 1999).

A.2.8. Φρούτα και λαχανικά

Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών και κυρίως βιταμίνη C, καροτενοειδή και βιταμίνη E. Επειδή οι παραπάνω ουσίες βρίσκονται σε μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις

στα φρούτα και τα λαχανικά, η σύσταση του φαινολικού φορτίου από εκπροσώπους των δύο αυτών ομάδων τροφίμων δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Πάντως έχει διαπιστωθεί η παρουσία κερκετίνης στο κρεμμύδι, στα μήλα, σταφύλια, μούρα, μπρόκολα και βατόμουρα. Σε μούρα και σταφύλια υπάρχει επίσης μυρισετίνη ενώ τα μήλα περιέχουν και ρουτίνη. Καιμπφερόλη έχει βρεθεί σε μπρόκολα, ραδίκια, και γκρέιπ-φρουτ, η απιγενίνη αποτελεί συστατικό του σέλινου και του μαϊντανού και τέλος η χρυσίνη βρίσκεται στην φλούδα των φρούτων (Rice-Evans και Miller, 1995).

Σε μια έρευνα εξετάστηκε η περιεκτικότητα φλαβονοειδών σε επτά διαφορετικά είδη ελληνικών εδώδιμων άγριων χόρτων (Trichopoulou *et al*, 2000). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής φαίνονται στον πίνακα Α.2.8.

Πίνακας Α.2.8.: Περιεχόμενα φλαβονοειδή σε 7 είδη ελληνικών άγριων χόρτων

Φλαβονοειδές	μυρισετίνη	κερκετίνη	καιμπφερόλη	ισορχαμνετίνη	λουτεολίνη	απιγενίνη
<u>Χορταρικό</u>	Συγκέντρωση (mg/100gr)					
Μάραθο	19,8	46,8	6,5	9,3	0,1	<0,07
Αγριόπρασο	<0,03	10,4	12,5	8,5	0,3	<0,07
Ζάχος	3,6	16,0	3,8	0,7	6,5	3,8
Καυκαλίθρα	1,6	29,3	2,9	5,1	0,6	0,08
Κουτσουνάδα	1,1	26,3	2,3	1,1	0,1	0,1
Λάπαθο	5,7	86,2	10,3	<0,03	<0,02	<0,05
Σταφυλίνακας	0,4	1,1	0,2	<0,06	34,1	12,6

(Trichopoulou *et al*, 2000).

Τα εσπεριδοειδή περιέχουν επίσης μεγάλες συγκεντρώσεις φλαβονονών όπως είναι η εσπεριδίνη και η ναρινγγίνη (Manach *et al*, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

A.3.1. Αντιοξειδωτικές ουσίες και υγεία

Είναι γεγονός ότι η διαίτα αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών που ταλανίζουν τη σημερινή εποχή. Την ίδια στιγμή όμως η διαίτα μπορεί να αποτελέσει μέσο θεραπείας και πρόληψης εμφάνισης των νοσημάτων αυτών. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών που υπάρχουν στα τρόφιμα και τη σχέση που μπορεί να έχουν με διάφορες ασθένειες.

Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι δίαιτες που περιέχουν μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών παρέχουν προστασία από διάφορες ασθένειες, ιδιαίτερα τις καρδιοπάθειες και τον καρκίνο. Τα φαινορικά συστατικά των δημητριακών, λαχανικών, ξηρών καρπών, ελαιολάδου, φρούτων, τσαγιού και κόκκινου κρασιού, έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και μερικές έρευνες έχουν υποδείξει προστατευτική δράση έναντι στη θρόμβωση και καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη που περιέχεται στο κόκκινο κρασί και σε ξηρούς καρπούς έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες και παρεμποδίζει την καρκινογένεση. Η υδροξυτυροσώλη της ελιάς είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό. Το λυκοπένιο πιστεύεται ότι παρεμποδίζει την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου (Kris-Etherton, 2002). Η βιταμίνες C και E είναι επίσης ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες και έχει διαπιστωθεί η προστασία που παρέχουν έναντι στην οξείδωση της LDL, στο κρύωμα, στον καταρράκτη, στον σακχαρώδη διαβήτη και άλλες πολλές.

A.3.2. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στη Μεσογειακή διαίτα

Η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή έχει ως βασική διαφορά με τις δυτικού τύπου δίαιτες την υψηλή περιεκτικότητα σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Παρά το γεγονός ότι οι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης διαφόρων χρόνιων νοσημάτων κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα σε

όλους τους πληθυσμούς, εντούτοις στις Μεσογειακές χώρες η θνησιμότητα από διάφορα χρόνια νοσήματα είναι χαμηλότερη. Παρακάτω γίνεται αναφορά στα κυριότερα χρόνια νοσήματα και τη σχέση τους με τη μεσογειακή δίαιτα.

A.3.3. Καρδιαγγειακά νοσήματα

Η στεφανιαία καρδιοπάθεια αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στη σημερινή εποχή, ιδιαίτερα στις δυτικού τύπου κοινωνίες. Είναι μια νόσος που αφορά στο σύστημα των αγγείων που παρέχουν αίμα στο μυοκάρδιο και πιο συγκεκριμένα είναι μια στένωση των αγγείων αυτών. Η κυριότερη αιτία πρόκλησης της στένωσης αυτής αποτελεί η αθηροσκλήρωση, η οποία είναι μια σύνθετη διαταραχή. Στην παθογένειά της συμμετέχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου που μπορούν να προληφθούν (υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, κάπνισμα, δυσανεξία της γλυκόζης, παχυσαρκία, καθιστική ζωή) αλλά και η γενετική προδιάθεση και το φύλο. Στην αρχή, λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και μονοπύρρηνα του αίματος εισέρχονται στο αγγειακό ενδοθήλιο, όπου ένα μέρος των LDL οξειδώνεται και προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα και μετά από μια σειρά άλλων μετατροπών προκαλείται αθηροσκληρυντική πλάκα η οποία προκαλεί στένωση του αγγειακού αυλού. Η επίδραση της πλάκας στη ροή του αίματος επηρεάζεται επίσης από το μήκος και την κατανομή της αλλοίωσης, αλλά για να περιοριστεί σημαντικά η ροή απαιτείται γενικά ελάττωση της διαμέτρου του αυλού κατά 70%.

Η LDL ή αλλιώς λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας είναι ένα σφαιρικό μόριο το οποίο περιέχει μια μεγάλη πρωτεΐνη που καλείται απολιποπρωτεΐνη B (apo B). Η apo B περιβάλλεται εξωτερικά από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων και ελεύθερα μόρια χοληστερόλης. Η στοιβάδα αυτή βρίσκεται γύρω από ένα κεντρικό πυρήνα, από εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια. Ένα τέτοιο μόριο LDL περιέχει περίπου 3600 λιπαρά οξέα εκ των οποίων τα μισά σχεδόν είναι πολυακόρεστα. Επιπλέον, η LDL περιέχει πολλά αντιοξειδωτικά με πιο σημαντικό τη βιταμίνη E.

Η οξείδωση της LDL είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση αυτοοξείδωσης των λιπαρών οξέων την οποία προκαλούν ελεύθερες ρίζες, λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου που περιέχουν στο μόριό τους. Η αλυσιδωτή αντίδραση αρχίζει όταν μια ενεργή ελεύθερη ρίζα αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από ένα μόριο

πολυακόρεστου λιπαρού οξέος από το μόριο της LDL. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι πολύ επιδεκτικά στην οξείδωση, διότι όσο αυξάνει ο αριθμός των διπλών δεσμών τόσο πιο επιρρεπές είναι ένα μόριο στην οξείδωση. Σχηματίζονται τότε ρίζες υπεροξειδίων των λιπιδίων οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να προκαλέσουν οξείδωση στα γειτονικά λιπαρά οξέα. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, με συνεπακόλουθη παραγωγή αλδεϋδών, κετονών και άλλων προϊόντων, τα οποία σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με την apo B.

Αφού η οξείδωση της LDL αποτελεί κυρίαρχο τμήμα της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας, εύκολα συμπεραίνεται ότι τρόποι αναστολής της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης αυτής θα αποτελούν και τρόπους πρόληψης εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και κατ' επέκταση της στεφανιαίας νόσου. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι οξείδωση της LDL μπορεί να προκληθεί *in vitro* από μεταλλικά ιόντα (χαλκός, σίδηρος), ένζυμα, ρίζες οξυγόνου ή υπεριώδη ακτινοβολία.

Ένας σημαντικός αριθμός ερευνητικών εργασιών έχει λάβει χώρα τα τελευταία χρόνια σχετικά με την *in vitro* αλλά και την *in vivo* αναστολή της οξείδωσης της LDL από διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες. Επειδή οι πληροφορίες που αφορούν στο θέμα αυτό είναι πάρα πολλές, περιοριζόμαστε στην αναφορά πειραματικών ερευνών που αφορούν στη δράση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου τόσο σε σχέση με την οξείδωση της LDL αλλά και το γενικότερο ρόλο τους στην υγεία.

A.3.3.1. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και καρδιαγγειακά νοσήματα

Το ελαιόλαδο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους στη μεσογειακή δίαιτα, γι' αυτό και θεωρείται ότι η μικρότερη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων στους κατοίκους των περιοχών που ακολουθούν τον συγκεκριμένο τύπο διατροφής, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σ' αυτό.

Το ελαιόλαδο περιέχει σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών, ανάμεσα στις οποίες είναι ορισμένα φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η ρητίνη και η λουτεολίνη και η α-τοκοφερόλη. Μετά από επώαση της LDL με θειικό χαλκό και την επικείμενη παραγωγή TBARS (thiobarbituric acid-reactant substances) και μετά την διεξαγωγή ενός blank-test για λόγους σύγκρισης, εκτιμήθηκε το ποσοστό μέσης προστασίας (%Mean Protection, %MP) των

oxLDL TBARS σε σχέση με την αυτοξείδωση της LDL όπως φαίνεται από το oxLDL blank-test. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας αυξάνεται και η μέση προστασία της LDL από την οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα 10μM α-τοκοφερόλης παρείχαν 33.6% προστασία, ενώ για την ίδια συγκέντρωση ρουτίνης, λουτεολίνης, κερκετίνης και ολευρωπαΐνης οι τιμές %MP ήταν 53.7%, 49.5%, 46.8% και 49.0%, αντίστοιχα. Οι τιμές για τις ίδιες ουσίες στη συγκέντρωση των 20μM ήταν 35.5%, 58.7%, 53.3%, 55.6% και 53.7% (Andrikopoulos *et al*, 2002).

Υπάρχουν επίσης και σημαντικές ενδείξεις για αύξηση του χρόνου επώασης της LDL *in vivo* μετά από κατανάλωση ελαιολάδου. Μετά από πρόσληψη 4 διαφορετικών ειδών ελαιολάδου από δώδεκα εθελοντές παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στο χρόνο επώασης της LDL, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ελαιόλαδο αυξάνει τη μεταγευματική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Visser *et al*, 2001). Σημαντική μεταγευματική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος έχει σημειωθεί και μετά από κατανάλωση 100 g έξτρα παρθένου ελαιολάδου σε χρόνο 120 λεπτά (Bonanome *et al*, 2000).

A.3.3.2. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και υπέρταση

Η κατανάλωση ελαιολάδου μειώνει την ανάγκη χορήγησης φαρμακευτικής θεραπείας σε υπερτασικούς ασθενείς, πιθανότατα λόγω ενεργοποίησης της παραγωγής νιτρικού οξειδίου από τις πολυφαινόλες (Ferrara *et al*, 2000).

Χορήγηση ολευρωπαΐνης σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή νιτρικού οξειδίου από τα μακροφάγα (Visioli *et al*, 1998_β).

Η χορήγηση 60mg/Kg ολευρωπαΐνης από φύλλα ελιάς σε αρουραίους για διάρκεια έξι εβδομάδων, μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης και αθηροσκλήρωσης (Somova *et al*, 2003).

A.3.4. Καρκίνος

Στις ευρωπαϊκές χώρες η θνησιμότητα από καρκίνο φτάνει το 20% των συνολικών θανάτων με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στις Μεσογειακές χώρες. Η διαίτα παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου αλλά δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς με ποιο τρόπο. Υπολογίζεται όμως ότι διαιτητικοί παράγοντες ευθύνονται σε ποσοστό περίπου 35% για τους θανάτους από καρκίνο. Πιθανοί τρόποι με τους οποίους διαιτητικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την παθογένεση αλλά και την εξέλιξη του καρκίνου μπορεί να είναι οι καρκινογόνες ή αντικαρκινογόνες ιδιότητες συγκεκριμένων συστατικών των τροφίμων, πιθανή ανεπάρκεια ή τοξικότητα από κάποιο θρεπτικό συστατικό που οδηγεί σε βιοχημικές αλλοιώσεις που προωθούν τη νεοπλασματική διαδικασία ή ακόμη αλλαγές στη διαιτητική πρόσληψη κάποιων μακροθρεπτικών συστατικών που προκαλούν μεταβολικές και βιοχημικές αλλαγές, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Πολλές επιδημιολογικές έρευνες υποδεικνύουν ότι η πρόσληψη συγκεκριμένων τροφίμων, ιδιαίτερα φρούτων και λαχανικών προστατεύουν από καρκίνο. Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν μια πληθώρα αντικαρκινογόνων ουσιών ανάμεσα στα οποία είναι τα καροτενοειδή, η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, οι φυτικές ίνες, το σελήνιο, τα φλαβονοειδή και οι φυτοστερόλες. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, αναστολή του σχηματισμού νιτροζαμινών, δέσμευση και αραίωση των καρκινογόνων ουσιών στη γαστρεντερική οδό.

Πιο συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή ενδέχεται να έχουν αντινεοπλασματική δράση, αφού έχει αποδειχθεί η εμπλοκή τους σε κυτταρικό επίπεδο τόσο σε μηχανισμούς διαφοροποίησης αλλά και μηχανισμούς απόπτωσης των κυττάρων. Διαπιστώθηκε επίσης ότι έχουν αντιοξειδωτική δράση, αυξάνουν την δραστικότητα ενζύμων της φάσης II στο ήπαρ και αναστέλλουν τις πρωτεϊνικές κινάσες. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν πιθανή χρήση των πολυφαινολικών συστατικών ως φαρμακευτική αγωγή για τη θεραπεία νεοπλασματικών παθήσεων (Gee και Johnson, 2001).

Η νικοτίνη - ως το κύριο αλκαλοειδές του καπνού του τσιγάρου - αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που ευθύνονται για την

πρόκληση των επιπλοκών καρκινογένεσης. Η πρόσληψη πολυφαινόλων φαίνεται ότι ασκεί προστατευτική δράση έναντι στη καρκινογόνο δράση των τοξικών παραγώγων της νικοτίνης του τσιγάρου (Cheng *et al*, 2003).

Η μεσογειακή δίαιτα λόγω της μεγάλης ποικιλίας που περιέχει σε τρόφιμα που ανήκουν στις δύο αυτές ομάδες αλλά και από τα χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας που σημειώνονται εδώ και πολλά χρόνια στις μεσογειακές χώρες μπορεί να αποτελέσει σημαντικό μέσο θεραπευτικής παρέμβασης αλλά κυρίως πρόληψης του χρόνιου αυτού προβλήματος υγείας.

A.3.4.1. Πολυφαινόλες ελαιολάδου και νεοπλασματικές παθήσεις

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και πληθαίνουν οι απόψεις που υποστηρίζουν ότι το ελαιόλαδο - ως κυρίαρχο συστατικό της μεσογειακής διατροφής - ευθύνεται για τα χαμηλά ποσοστά εμφάνισης νεοπλασματικών παθήσεων στις χώρες της Μεσογείου. Στοιχεία επιδημιολογικών ερευνών δείχνουν αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση ελαιολάδου και την εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του στομάχου.

Σε μια έρευνα εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μεγάλου αριθμού των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. Σχεδόν όλες οι ουσίες είχαν την ικανότητα να δίνουν ένα πρωτόνιο στη ρίζα $\text{HO}^{\bullet}$. Οι ολικές πολυφαινόλες του ελαιολάδου ανάμεσα στις οποίες και η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη πέρα από την ικανότητά τους να ανιχνεύουν τις ενεργές ρίζες και να αναστέλλουν τη δράση τους πιθανώς παρέχουν προστασία αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία θεωρείται ότι προκαλεί καρκινογένεση (Owen *et al*, 2000).

A.3.5. Άλλες παθήσεις

Οι πολυφαινόλες λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, παρέχουν προστασία έναντι σε πολλές παθήσεις και διαταραχές στο μηχανισμό των οποίων εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Αναφέρεται ενδεικτικά ότι μετά από έλεγχο των επιπέδων των κυκλοφορούντων αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του παχέος εντέρου βρέθηκε ότι όσο χαμηλότερη ήταν η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα, τόσο υψηλότερα ήταν τα επίπεδα ελευθέρων ριζών που προκαλούν

βλάβη στο DNA και ταυτόχρονα η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ήταν πολύ χαμηλή (d' Odorico *et al*, 2001).

Οι πολυφαινόλες και τα παράγωγά τους μπορούν να συμβάλουν στη θεραπεία ασθενειών του γαστρεντερικού συστήματος που προκαλείται από το βακτηρίδιο *H.pylori* (Tombola *et al*, 2003).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες της δίαιτας και ιδιαίτερα η βιταμίνη Ε και οι πολυφαινόλες – που αποτελούν κατεξοχήν συστατικά του ελαιολάδου, μπορούν να αναστείλουν την καταστροφή νευρώνων από ζώα, *in vitro*. Η καταστροφή αυτή είναι υπεύθυνη για τη νόσο Parkinson και τη νόσο Alzheimer (di Matteo και Esposito, 2003).

Οι πολυφαινόλες που υπάρχουν στα ελαιόλαδα προέρχουν από τα φύλλα και το κέλυφος των καρπών των ελαιοειδών φυτών. Η ποσότητα των πολυφαινόλων ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του φυτού, την καλλιέργεια, την επεξεργασία και την αποθήκευση.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια προσπάθεια αναφοράς στα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουν να κάνουν με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων συστατικών από διάφορα τρόφιμα, τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στις μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινόλων του ελαιολάδου.

4.4.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων

Μετά από παράυκτα που έχουν γίνει οι πληροφορίες σχετικά με τις πολυφαινόλες έχουν ισχυρή αντικαταστατική δράση. Το πρώτο που απασχολεί τον επιστημονικό κόσμο είναι κατά πόσο η πρόσληψη τροφών πλούσιων στις ουσίες αυτές, παρέχει στον ανθρώπινο οργανισμό προστασία έναντι στις οξειδωτικές αντιδράσεις. Άλλο κρίσιμο ερώτημα αποτελεί η μεταβολική τύχη των πολυφαινόλων μετά την κατανάλωσή τους. Υπάρχουν τρεις πιθανότητες για το τι μπορεί να συμβεί με τις προσλαμβανόμενες πολυφαινόλες: (α) να μεταβληθούν στο στομάχι σε απλά μόρια, (β) να μεταβληθούν στο στομάχι σε απλά μόρια, (γ) να μεταβληθούν στο στομάχι σε απλά μόρια. Το πρώτο είναι το πιο πιθανό να συμβεί, καθώς οι πολυφαινόλες είναι πολύ εύκολο να μεταβληθούν σε απλά μόρια. Το δεύτερο είναι το πιο πιθανό να συμβεί, καθώς οι πολυφαινόλες είναι πολύ εύκολο να μεταβληθούν σε απλά μόρια. Το τρίτο είναι το πιο πιθανό να συμβεί, καθώς οι πολυφαινόλες είναι πολύ εύκολο να μεταβληθούν σε απλά μόρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

A.4.1. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Με τον όρο βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το μέρος από τη συνολική προσληφθείσα ποσότητα ενός θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για τις φυσιολογικές του λειτουργίες.

Τα στοιχεία που υπάρχουν για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών είναι ακόμη λίγα και πολλές φορές παρουσιάζουν αντιφάσεις μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται τόσο στο γεγονός ότι οι μελέτες που αφορούν στη σύσταση του πολυφαινολικού φορτίου στα διάφορα τρόφιμα βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη, αλλά και στο ότι οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας είναι δύσκολες στην υλοποίησή τους.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια προσπάθεια αναφοράς στα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουν να κάνουν με τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών από διάφορα τρόφιμα, τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στις μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του ελαιολάδου.

A.4.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών

Μετά από πειράματα που έχουν γίνει *in vitro* έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Το ερώτημα που απασχολεί τον επιστημονικό κύκλο είναι κατά πόσο η πρόσληψη τροφών πλούσιων στις ουσίες αυτές, παρέχει στον ανθρώπινο οργανισμό προστασία έναντι στις οξειδωτικές αντιδράσεις. Άλλο καίριο ερώτημα αποτελεί η μεταβολική τύχη των πολυφαινολών μετά την κατανάλωσή τους. Υπάρχουν τρεις πιθανότητες για το τι μπορεί να συμβεί με τις προσληφθείσες πολυφαινόλες: (α) να κυκλοφορούν στο πλάσμα είτε σε ελεύθερη μορφή ή με άλλη μορφή (μεταβολίτες τους), (β) να απεκκριθούν από τους νεφρούς και (γ) να αποβληθούν από το παχύ έντερο. Τα πράγματα όμως δεν είναι τόσο απλά διότι πολλές παράμετροι μπορεί να μεσολαβήσουν. Για παράδειγμα, υπάρχει η πιθανότητα μια πολυφαινόλη να μετατραπεί σε κάποια άλλη ένωση και

μέρος αυτής να κυκλοφορεί στο αίμα, κάποια άλλη να απεκκριθεί στα ούρα σε ελεύθερη ή συζευγμένη μορφή - η χρονική στιγμή που θα συμβεί αυτό μπορεί να κυμαίνεται σε ένα μεγάλο εύρος- και κάποια να μην έχει απορροφηθεί καν, και να απεκκριθεί στα κόπρανα.

Όσον αφορά στις κατεχίνες του τσαγιού οι τροποποιήσεις που μπορεί να υποστούν είναι η γλυκοσυλίωση, η μεθυλίωση και η σουλφονίωση. Πολλές έρευνες έδειξαν ότι κατά την απορρόφησή τους τα μονομερή φλαβονολών μεταβολίζονται σε μεγάλο βαθμό προς Ο-μεθυλιωμένες μορφές ή γίνεται σύζευξη με γλυκουρονίδια και σουλφατίδια (Spencer *et al*, 2001). Έχει βρεθεί ότι στον ανθρώπινο οργανισμό η επιγαλλοκατεχίνη (EGC), βρίσκεται με τη μορφή γλυκουρονιδίου σε ποσοστό 57-71% και ως σουλφατίδιο σε ποσοστό 23-36%, ενώ σε ελεύθερη μορφή βρίσκεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 3-13% . Η μεθυλίωση που υφίσταται η EGC οδηγεί στο σχηματισμό 4'-Ο-μεθυλ-EGC, που ανιχνεύεται κυρίως ως γλυκουρονίδιο ή ως σουλφατίδιο. Αντίθετα, η επικατεχίνη (EC) βρίσκεται κυρίως ως σουλφατίδιο (66%) παρά ως γλυκουρονίδιο (33%), ενώ ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), ανιχνεύεται στο πλάσμα κυρίως στην ελεύθερη μορφή του (Lambert και Yang, 2003).

Όσον αφορά στη μελέτη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των πολυφαινολών του τσαγιού έχουν γίνει έρευνες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Μετά από κατανάλωση τσαγιού από εθελοντές παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση των κατεχινών στο πλάσμα σημειώθηκε στις 1,5-2,5 ώρες. Τα επίπεδα τους μειώνονταν μετά το διάστημα αυτό και δεν ήταν ανιχνεύσιμες μετά την πάροδο του 24ώρου. Παρόλο που ο EGCG δεν ανιχνεύτηκε στα ούρα, 90% της EC και του ECG απεκκρίνονταν στα ούρα μέχρι και 8 ώρες μετά (Yang *et al*, 1998).

Μία άλλη έρευνα έγινε σε αρουραίους με σκοπό τη διερεύνηση της απορρόφησης, κατανομής και απέκκρισης των προαναφερθέντων κατεχινών του πράσινου τσαγιού. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του τσαγιού βρέθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση των EGCG, EGC και EC ήταν στα 212, 45 και 21 λεπτά αντίστοιχα. Παρόλ' αυτά, όταν χορηγήθηκε «καθαρός» EGCG, η μέγιστη συγκέντρωση σημειώθηκε πιο σύντομα (135 λεπτά). Πιθανή εξήγηση είναι ότι το τσάι περιέχει άλλα συστατικά που επηρεάζουν τη συγκέντρωση και την απέκκριση του EGCG. Ο EGCG βρέθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στο

έντερο ενώ στα νεφρά βρέθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις EGC και EC (Chen *et al*, 1997).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μιας έρευνας που είχε ως κύριο σκοπό τη μέτρηση των επιπέδων των κατεχινών που είναι συνδεδεμένες στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μετά από κατανάλωση τσαγιού. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι ένα ποσοστό 23% των κατεχινών ήταν συνδεδεμένες με την HDL ενώ το ποσοστό σύνδεσής τους με την LDL ήταν χαμηλότερο από 10% και ακόμη χαμηλότερο ήταν στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Μεγαλύτερο από 50% ήταν το ποσοστό των κατεχινών που ανακτήθηκε στο πρωτεϊνικό κλάσμα του πλάσματος (van het Hoff *et al*, 1999). Τα ευρήματα αυτά είναι πολύ σημαντικά για την εξήγηση του φαινομένου που παρατηρείται στις περισσότερες έρευνες βιοδιαθεσιμότητας, όπου δεν μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών που είτε κυκλοφορούν στο πλάσμα ή αποβάλλονται στα ούρα.

Η βιοδιαθεσιμότητα των θειαφλαβινών που βρίσκονται κυρίως στο μαύρο τσάι είναι μικρότερη από τη βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών. Η μέγιστη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα υπολογίστηκε στο $1 \mu\text{g L}^{-1}$ μετά από συνολική πρόσληψη 700 mg (Mulder *et al*, 2001) ενώ η αντίστοιχη τιμή για τις κατεχίνες είναι $300 \mu\text{g L}^{-1}$ μετά από πρόσληψη 300 mg (Yang *et al*, 1998). Ο χρόνος ημιζωής των θειαφλαβινών στο πλάσμα κυμαίνεται στο διάστημα 1-3 ωρών και είναι παρόμοιος με το χρόνο ημιζωής των κατεχινών. Η μέγιστη συγκέντρωση των θειαφλαβινών στα ούρα υπολογίστηκε στα $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ και η συνολική ποσότητα που συλλέχθηκε στα ούρα 24ώρου ήταν 4 μg , που αντιστοιχεί σε ποσοστό χαμηλότερο από 0,0006% της χορηγούμενης δόσης (Mulder *et al*, 2001). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά η κατανάλωση μαύρου τσαγιού - που είναι η κύρια πηγή των θειαφλαβινών - δεν προκαλεί αύξηση των συγκεκριμένων θειαφλαβινών στο αίμα.

Από μελέτες που έχουν γίνει *in vitro* έχει προταθεί ότι οι ανθοκυανίνες του κόκκινου κρασιού είναι εν μέρει υπεύθυνες για την προστασία της LDL από οξειδωτικές αλλοιώσεις. Σκοπός της έρευνας που αναφέρεται παρακάτω ήταν η σύγκριση των αλλαγών που υφίσταται το γλυκοσίδιο της 3-μαλβιδίνης (M-3-G), στο πλάσμα και η αποβολή της ανθοκυανίνης αυτής στα ούρα μετά από κατανάλωση κόκκινου κρασιού, μη-αλκοολούχου κόκκινου κρασιού και χυμού από κόκκινο σταφύλι. Όλοι οι εθελοντές κατανάλωσαν 500mL από το

έντερο ενώ στα νεφρά βρέθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις EGC και EC (Chen *et al*, 1997).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μιας έρευνας που είχε ως κύριο σκοπό τη μέτρηση των επιπέδων των κατεχινών που είναι συνδεδεμένες στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μετά από κατανάλωση τσαγιού. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι ένα ποσοστό 23% των κατεχινών ήταν συνδεδεμένες με την HDL ενώ το ποσοστό σύνδεσής τους με την LDL ήταν χαμηλότερο από 10% και ακόμη χαμηλότερο ήταν στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Μεγαλύτερο από 50% ήταν το ποσοστό των κατεχινών που ανακλήθηκε στο πρωτεϊνικό κλάσμα του πλάσματος (van het Hoff *et al*, 1999). Τα ευρήματα αυτά είναι πολύ σημαντικά για την εξήγηση του φαινομένου που παρατηρείται στις περισσότερες έρευνες βιοδιαθεσιμότητας, όπου δεν μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών που είτε κυκλοφορούν στο πλάσμα ή αποβάλλονται στα ούρα.

Η βιοδιαθεσιμότητα των θειαφλαβινών που βρίσκονται κυρίως στο μαύρο τσάι είναι μικρότερη από τη βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών. Η μέγιστη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα υπολογίστηκε στο $1 \mu\text{g L}^{-1}$ μετά από συνολική πρόσληψη 700 mg (Mulder *et al*, 2001) ενώ η αντίστοιχη τιμή για τις κατεχίνες είναι $300 \mu\text{g L}^{-1}$ μετά από πρόσληψη 300 mg (Yang *et al*, 1998). Ο χρόνος ημιζωής των θειαφλαβινών στο πλάσμα κυμαίνεται στο διάστημα 1-3 ωρών και είναι παρόμοιος με το χρόνο ημιζωής των κατεχινών. Η μέγιστη συγκέντρωση των θειαφλαβινών στα ούρα υπολογίστηκε στα $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ και η συνολική ποσότητα που συλλέχθηκε στα ούρα 24ώρου ήταν 4 μg , που αντιστοιχεί σε ποσοστό χαμηλότερο από 0,0006% της χορηγούμενης δόσης (Mulder *et al*, 2001). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά η κατανάλωση μαύρου τσαγιού - που είναι η κύρια πηγή των θειαφλαβινών - δεν προκαλεί αύξηση των συγκεκριμένων θειαφλαβινών στο αίμα.

Από μελέτες που έχουν γίνει *in vitro* έχει προταθεί ότι οι ανθοκυανίνες του κόκκινου κρασιού είναι εν μέρει υπεύθυνες για την προστασία της LDL από οξειδωτικές αλλοιώσεις. Σκοπός της έρευνας που αναφέρεται παρακάτω ήταν η σύγκριση των αλλαγών που υφίσταται το γλυκοσίδιο της 3-μαλβιδίνης (M-3-G), στο πλάσμα και η αποβολή της ανθοκυανίνης αυτής στα ούρα μετά από κατανάλωση κόκκινου κρασιού, μη-αλκοολούχου κόκκινου κρασιού και χυμού από κόκκινο σταφύλι. Όλοι οι εθελοντές κατανάλωσαν 500mL από το

κάθε ρόφημα σε διαφορετικές μέρες με τη συγκέντρωση M-3-G να είναι 68mg, 58mg και 117mg, αντίστοιχα. Το M-3-G βρέθηκε στο πλάσμα, χωρίς ωστόσο οι διαφορές στη συγκέντρωση να είναι στατιστικά σημαντικές μετά την κατανάλωση των προαναφερθέντων ροφημάτων. Η συγκέντρωση του M-3-G στο πλάσμα ήταν μεν η διπλάσια μετά από κατανάλωση του χυμού από κόκκινο σταφύλι σε σχέση με τα δύο κρασιά αλλά αυτό αποδίδεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωσή του στον χυμό. Εντούτοις, βρέθηκε ότι υπήρχε μια ανάλογη σχέση όσον αφορά στη σχέση της συγκέντρωσης στο πλάσμα με την ποσότητα που καταναλώθηκε. Τα τελικά συμπεράσματα της έρευνας αυτής ήταν ότι οι ευεργετικές ιδιότητες του κόκκινου κρασιού οφείλονται σε μεταβολίτες των ανθοκυανινών ή και σε άλλες πολυφαινόλες που ακόμη δεν έχουν προσδιοριστεί, αφού η απορρόφηση του M-3-G είναι μικρή. Τέλος φαίνεται ότι το αλκοόλ δεν επηρεάζει την ολική συγκέντρωση των κατεχινών που κυκλοφορούν, παρά μόνο επηρεάζει το χρόνο στον οποίο παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα (Bub *et al*, 2001).

Πιο καλά αποτελέσματα σημειώθηκαν σε μια έρευνα που αφορούσε στη μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας, μεταβολισμού και απέκκρισης των πολυφαινολών χυμού μούρων. Πιο συγκεκριμένα τα τέσσερα κύρια γλυκοσίδια ανθοκυανινών που αποτελούν συστατικά του χυμού αυτού εντοπίστηκαν σε μικρές ποσότητες μετά την κατανάλωση του χυμού τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα. Η απέκκριση των ανθοκυανινών έγινε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (1 ώρα). Ωστόσο, τα υδροξυκινναμικά οξέα (φερουλικό, ισοφερουλικό, π-κουμαρικό, σιναπτικό και βανιλικό) εντοπίστηκαν στο πλάσμα και στα ούρα τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και σε συζευγμένη. Αυξημένη ήταν η απέκκριση στα ούρα 24ώρου του ιππουρικού, 4-υδροξυιππουρικού και 3-υδροξυιππουρικού οξέος σε όλους τους εθελοντές. Τα γλυκουρονίδια της κερκετίνης και καιμπφερόλης και ο προτεινόμενος ως κολονικός μεταβολίτης 3-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, εντοπίστηκαν σε κάποιους μόνο εθελοντές (Rechner *et al*, 2002).

Λίγες πληροφορίες υπάρχουν επίσης και όσον αφορά στη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβανονών που περιέχονται στα εσπεριδοειδή. Μια πολύ πρόσφατη έρευνα έγινε σε πέντε εθελοντές μετά από κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού για τη διερεύνηση των κυκλοφορούντων μεταβολιτών των κύριων φλαβανονών του χυμού, εσπεριδίνης και ναρινγγίνης καθώς και της

απέκκρισής τους στα ούρα. Τρεις ώρες μετά την κατανάλωση ενός λίτρου χυμού εμφανίστηκαν οι πρώτοι μεταβολίτες στο πλάσμα, οι οποίοι έφτασαν στη μέγιστη συγκέντρωση πέντε με επτά ώρες μετά. Μετά την πάροδο 24ωρών επέστρεψαν στην αρχική τιμή. Η μέγιστη συγκέντρωση εσπεριδίνης στα ούρα υπολογίστηκε στα $0,46 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$ μετά την κατανάλωση 0,5l χυμού και $1,28 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ μετά την κατανάλωση 1 L. Η μέγιστη συγκέντρωση για την ναρινγγίνη ήταν πιο χαμηλή ($0,20 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$). Η εσπεριδίνη κυκλοφορούσε με τη μορφή γλυκουρονιδίων σε ποσοστό 87% και σουλφατιδίων σε ποσοστό 13%. Και οι δύο φλαβανόνες είχαν σχεδόν απεκκριθεί στα ούρα μέσα στο διάστημα 24 ωρών. Η απέκκριση όμως δεν ήταν ανάλογη της προσληφθείσας δόσης ($4,1 \pm 1,2$ και $7,9 \pm 1,7\%$, αντίστοιχα) (Manach *et al*, 2003).

Μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση αμφισβητεί τη δυνατότητα δράσης των φαινολικών συστατικών *in vivo* παρά τις ισχυρές ενδείξεις προστασίας από διάφορες ασθένειες όπως καρδιοπάθειες, καρκίνο και φλεγμονώδεις παθήσεις που παρουσιάζονται σε πολλά *in vitro* πειράματα. Ο ισχυρισμός αυτός προέκυψε από τα ευρήματα μιας έρευνας που είχαν σκοπό τη διερεύνηση της απορρόφησης τριών φαινολικών συστατικών από τρία διαφορετικά ροφήματα που χορηγήθηκαν σε εθελοντές *per os*. Εξετάστηκαν οι πολυφαινόλες trans-ρεσβερατρόλη (25mg/70Kg), [+]-κατεχίνη (25mg/70kg) και κερκετίνη (10mg/70Kg). Κάθε πολυφαινόλη δόθηκε τυχαία σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε τρία διαφορετικά είδη: άσπρο κρασί, χυμό γκρέιπφρουτ και ομογενοποιημένο χυμό λαχανικών. Έγινε συλλογή αίματος σε χρόνους 0, 30, 60, 120 λεπτά και 4 ώρες και συλλογή ούρων στο χρόνο 0 λεπτά και για το επόμενο 24ωρο. Και οι τρεις πολυφαινόλες ανιχνεύτηκαν και στο αίμα και στα ούρα κυρίως συζευγμένα με γλυκουρονίδια και σουλφατίδια και η μέγιστη συγκέντρωση σημειώθηκε πολύ νωρίς (30 λεπτά). Πιο καλή ήταν η απορρόφηση της trans-ρεσβερατρόλης, αφού η απέκκριση στα ούρα ήταν 16-17% της συνολικά χορηγούμενης δόσης. Η απέκκριση στα ούρα της [+]-κατεχίνης και κερκετίνης ήταν σε ποσοστό 1,2-3,0% και 2,9-7,0% της συνολικά χορηγούμενης δόσης, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των ελεύθερων πολυφαινολών βρέθηκε να είναι 1,7-1,9% της μέγιστης συγκέντρωσης στο

πλάσμα για την trans-ρεσβερατρόλη, 1,1-6,5% για την [+] -κατεχίνης και 17,2-26,9% για την κερκετίνη. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε ποσότητα 10-40 nmol/L, τιμή πολύ μικρότερη από την τιμή των 5-100 μ mol/l που έχει συσχετιστεί με την *in vitro* βιολογική δραστικότητα των πολυφαινολών (Goldberg *et al*, 2003).

A.4.3. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου

Η παρούσα πτυχιακή έχει σκοπό τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών της ελιάς στο αίμα. Παρόλα αυτά, μετά από εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν βρέθηκε κάποια δημοσίευση που να διαπραγματεύεται το θέμα αυτό. Γι' αυτό και στην παρούσα παράγραφο θα αναφερθούν μελέτες που ασχολήθηκαν με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου αφού ως προϊόν που παραλαμβάνεται από τις ελιές, θα παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες. Γίνεται μια αναλυτική αναφορά στις μεθόδους που η κάθε ερευνητική ομάδα έχει χρησιμοποιήσει και στα αποτελέσματά τους.

Είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και ενδεχομένως επηρεάζουν και την άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού έναντι στις οξειδωτικές αλλοιώσεις που προκαλούν διάφορες ελεύθερες ρίζες. Ο μηχανισμός απορρόφησης των πολυφαινολών του ελαιολάδου δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Πιστεύεται όμως ότι αφού η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη είναι σχετικά πολικά μόρια, μετά την απορρόφηση, πιθανώς αποβάλλονται από τους νεφρούς είτε σε ελεύθερη είτε σε συζευγμένη μορφή.

Έξι νηστικοί υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν 50 mL από τέσσερα είδη ελαιολάδου διαφορετικής συγκέντρωσης πολυφαινολών. Το κάθε είδος καταναλώνονταν με διαφορά ενός μήνα. Κάθε φορά γινόταν συλλογή ούρων 24ώρου. Για τον προσδιορισμό των ελεύθερων, μη-συζευγμένων πολυφαινολών έγινε προσθήκη α-ναφθόλης, ως εσωτερικό πρότυπο. Για των προσδιορισμό των ολικών απλών φαινολών έγινε προσθήκη β-γλυκουρονιδάσης. Για λόγους σύγκρισης έγινε καμπύλη με ούρα που δεν περιείχαν πολυφαινόλες. Τα επίπεδα ελεύθερης, μη-συζευγμένης τυροσόλης (T) και υδροξυτυροσόλης (HT) στα ούρα έδειξαν μια ανάλογη σχέση με τη

δόση που καταναλώθηκε, με εξαίρεση το δείγμα που περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών στο οποίο τα επίπεδα T και HT ήταν χαμηλότερα από το δείγμα με την αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών. Παρόλα αυτά όταν έγινε προσθήκη β-γλυκουρονιδάσης υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ποσότητες απλών φαινολών που καταναλώθηκαν και που απεκκρίθηκαν. Η αναλογία ολικής τυροσόλης που απεκκρίθηκε στα ούρα κυμαίνονταν σε ποσοστό 20-22% της προσλαμβανόμενης δόσης και η αντίστοιχη τιμή για την υδροξυτυροσόλη κυμαίνονταν στο 30-60%. Ο λόγος T/HT στα ούρα είναι παρόμοιος με το λόγο των δύο φαινολών στο ελαιόλαδο (~1,7).

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη μετά την πρόσληψη απορροφώνται και απεκκρίνονται στα ούρα ως γλυκουρονίδια. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το εύρημα ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά τόσο μεγαλύτερη είναι η σύζευξη με γλυκουρονίδια. Αυτό το γεγονός ενισχύει την υποψία ότι η αντίδραση αυτή είναι η τελευταία αντίδραση των άθικτων φαινολικών συστατικών (Visioli *et al*, 2000_β). Η απέκκριση της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης με τη μορφή συζευγμένων μορφών έχει αποδειχτεί και σε μια άλλη παρόμοια μελέτη που έγινε την ίδια περίπου χρονική περίοδο με την προηγούμενη, όπου μόνο 5,9±1,4% και 13,8±5,4% της συνολικά χορηγούμενης υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, αντίστοιχα, απεκκρίθηκαν στα ούρα σε ελεύθερη μορφή (Miró-Casas *et al*, 2001). Στην έρευνα αυτή, η δόση των χορηγούμενων φαινολικών συστατικών υπολογίστηκε σε σχέση με τις ελεύθερες μορφές που υπάρχουν στα εκχυλίσματα παρθένου ελαιολάδου προτού και αφού υποβληθούν σε υδρολυτικές συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές μιμούνται τις συνθήκες που επικρατούν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά την απορρόφηση. Η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στα ούρα αυξήθηκε- όπως και στη μελέτη των Visioli *et al* (2000_β) - μετά τη χορήγηση του ελαιολάδου, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να σημειώνονται κατά τις πρώτες τέσσερις ώρες.

Σε μια πολύ πρόσφατη έρευνα έχει αποδειχθεί ότι η τυροσόλη αποτελεί καλύτερο δείκτη από την υδροξυτυροσόλη για την αξιολόγηση της σχέσης δοσοεξάρτησης ελαιολάδου και απεκκριθέντων στα ούρα μεταβολιτών των πολυφαινολών που περιέχονται σ' αυτό. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν

αφού έκαναν σύγκριση των συγκεντρώσεων των δύο πολυφαινολών στα ούρα μετά από χορήγηση εφάπαξ δόσης 50 mL παρθένου ελαιολάδου και μετά από καθημερινή κατανάλωση του ίδιου ελαιολάδου για μια εβδομάδα (25 mL/ ημέρα). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν αύξηση της συγκέντρωσης και των δύο πολυφαινολών μετά και από τις δύο παρεμβάσεις με τη διαφορά ότι οι συγκεντρώσεις της τυροσόλης μετά την εβδομαδιαία κατανάλωση ήταν χαμηλότερες απ' ότι μετά την άμεση πρόσληψη των 50 mL ενώ για την υδροξυτυροσόλη ήταν μεν παρόμοιες αλλά παραδόξως ξεπερνούσαν το 100% (Miró-Casas *et al*, 2003). Οι ανακτήσεις των δύο πολυφαινολών στα ούρα μετά τις δύο παρεμβάσεις φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικό	Εφάπαξ δόση (50 mL)		Καθημερινή δόση για 1 εβδομάδα (25mL/ημέρα)	
	Πρόσληψη(μg)	Αποβολή στα ούρα(%)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	Αποβολή στα ούρα(%)
Τυροσόλη	1720	16.9±4.8	860	19.4±12.2
Υδροξυτυροσόλη	1370	78.5±14.1	685	121.5±45.9

(Miró-Casas *et al*, 2003)

Μια ένδειξη για μεταγευματική απορρόφηση των πολυφαινολών του ελαιολάδου φάνηκε και στα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης όπου έγινε συλλογή αίματος από 8 υγιείς εθελοντές οι οποίοι κατανάλωσαν 100gr έξτρα παρθένου ελαιολάδου. Η αιμοληψία έγινε σε χρόνους 0, 30, 60, 120, 240 και 360 λεπτά μετά την κατανάλωση του ελαιολάδου. Η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη ανιχνεύτηκαν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με τη μέγιστη συγκέντρωση (peak) να εμφανίζεται μεταξύ 60 και 120 λεπτών. Ωστόσο παρουσιάστηκε μεγάλη διακύμανση στην απορρόφηση τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης μεταξύ των εθελοντών. Επίσης, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σε χρόνο 120 λεπτά ενώ μειώνονταν σταδιακά, φτάνοντας στο baseline σε χρόνο 360 λεπτά. Συμπέρασμα αυτής της εργασίας ήταν ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου απορροφώνται στο έντερο, όχι όμως από κάποιο μονοπάτι που εξαρτάται από το σχηματισμό των χυλομικρών και μπορεί να παρουσιάσουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση *in vivo*, ιδιαίτερα στη μεταγευματική φάση (Bonanome *et al*, 2000).

Η *in vivo* απορρόφηση και απέκκριση της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης μελετήθηκε και σε αρουραίους με ραδιοσήμανση των δύο πολυφαινολών αυτών (H^3 -T και H^3 -HT). Οι δύο ουσίες χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως στο σάλιο και *per os* σε υδατικό διάλυμα και σε διάλυμα λίπους. Η αποβολή H^3 -T και H^3 -HT ήταν μεγαλύτερη στα ούρα 24ώρου μετά τη χορήγηση του διαλύματος λίπους συγκριτικά με τα υδατικά διαλύματα, τόσο στην *per os* όσο και στην ενδοφλέβια χορήγηση. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των ραδιοσημασμένων πολυφαινολών που απεκκρίθηκαν στα ούρα μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σε σχέση με την *per os* χορήγηση. Η βιοδιαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης χορηγούμενης από το στόμα, υπολογίστηκε στο διάλυμα λίπους στο 99% και στο υδατικό διάλυμα στο 75%. Οι αντίστοιχες τιμές για την τυροσόλη ήταν 98% και 71% (Tuck *et al*, 2001). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι παραπάνω πολυφαινόλες του ελαιολάδου πιθανότατα είναι συστηματικά βιοδιαθέσιμες κι επομένως μπορούν να έχουν άμεση αντιοξειδωτική δράση.

Εκτεταμένος ηπατικός μεταβολισμός της τυροσόλης υποδεικνύεται και από άλλη μελέτη στην οποία και πάλι το ποσοστό ελεύθερης τυροσόλης που απεκκρίθηκε στα ούρα ήταν χαμηλό (6-11% της συνολικά χορηγούμενης δόσης) ενώ μεγαλύτερο ποσοστό απεκκρίθηκε σε συζευγμένη μορφή. Η συνολική ποσότητα τυροσόλης που απεκκρίθηκε στα ούρα 24ώρου ήταν 281-708μg μετά από κατανάλωση 50ml έξτρα παρθένου ελαιολάδου (Miró-Casas *et al*, 2001_a).

Η σχέση δοσοεξάρτησης-απορρόφησης της υδροξυτυροσόλης έχει διαπιστωθεί και με χορήγηση OMWW (Olive Mill Waste Water) σε αρουραίους. Μάλιστα, σε υψηλή συγκέντρωσή της παρατηρήθηκε και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Visioli *et al*, 2001).

Η αποσαφήνιση της μεταβολικής τύχης της υδροξυτυροσόλης μετά από κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου αποτέλεσε αντικείμενο άλλης μίας ερευνητικής εργασίας. Όπως προαναφέραμε η υδροξυτυροσόλη αποβάλλεται στα ούρα κυρίως συζευγμένη με γλυκουρονίδια. Στα ούρα ανιχνεύθηκαν οι μεταβολίτες της, ομοβανιλική αλκοόλη, (HVA1c) και ομοβανιλλικό οξύ, (HVA). Φαίνεται ότι η αυξημένη έκκριση της HVA1c οφείλεται στο γεγονός ότι η ουσία αυτή ξεφεύγει τη δράση του ενζύμου κατεχολ-Ο-μεθυλ-τρανσφεράσης (COMT), που εμπλέκεται στον καταβολισμό

των κατεχολαμινών. Η αυξημένη συγκέντρωση HVA υποδεικνύει πιθανή οξείδωση του αιθανολικού τμήματος του μορίου της υδροξυτυροσόλης ή και της HVA1c. Η απέκκριση και των δύο μεταβολιτών είχε σχέση δοσοεξάρτησης με την χορηγούμενη υδροξυτυροσόλη (Caruso *et al*, 2001).

Η πιο εμπεριστατωμένη έρευνα που βρέθηκε από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και αφορούσε στη μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του ελαιολάδου περιγράφεται αναλυτικά πιο κάτω. Στην έρευνα συμμετείχαν άτομα με ειλεοστομία στα οποία όμως το λεπτό έντερο λειτουργούσε κανονικά. Η επιλογή αυτών των ατόμων είχε να κάνει για να βρεθεί κατά πόσο η κολονική μικροχλωρίδα επηρεάζει σε όποιο ποσοστό την απορρόφηση των πολυφαινολών του ελαιολάδου. Για σκοπούς σύγκρισης συμμετείχαν στην έρευνα και εθελοντές χωρίς ειλεοστομία. Σε όλους τους εθελοντές έγινε επίσης και συλλογή ούρων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της έρευνας για διάστημα τριών εβδομάδων όλοι οι συμμετέχοντες δεν κατανάλωναν καθόλου ελιές και ελαιόλαδο. Την όγδοη ημέρα όλοι οι εθελοντές λάμβαναν ένα σκεύασμα με μη-πολικές φαινόλες ενώ την δεκατηπέμπτη ημέρα λάμβαναν σκεύασμα που περιείχε πολικές φαινόλες. Την 22^η ημέρα οι συμμετέχοντες με ειλεοστομία λάμβαναν ένα συμπλήρωμα που περιείχε γλυκοσίδιο ολευρωπαΐνης ενώ οι υπόλοιποι έλαβαν placebo. Οι πολυφαινολική σύσταση των σκευασμάτων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

Παρουσία συγκέντρωση τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης και γλυκοσιδίου ολευρωπαΐνης μετά από επίθεση σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό in vitro και ειλεοστομικό έκκριση in vivo

	Γαστρικό υγρό		Δωδεκαδακτυλικό υγρό		Ειλεοστομικό έκκριση
	0.5h	2h	1h	4h	2h
	%				
Τυροσίνη	113	128	90	95	76 (70-77)
Υδροξυτυροσίνη	95	112	89	79	51 (29-72)
Γλυκοσίδιο ολευρωπαΐνης	99	98	101	98	81 (79-82)

(Vassari *et al*, 2002)

Σκεύασμα	Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών στο σκεύασμα (mmol/kg)	Πρόσληψη σκευά- σματος (g)	Τυρο- σόλη (μmol)	Υδρο- ξυτυρο- σόλη (μmol)	Αγλυ- κόνη- λιγκαστρο- σίδης (μmol)	Αγλυ- κόνη Ολευρω- παΐνης (μmol)	Γλυκο- σίδιο ολευρω- παΐνης (μmol)	Συνολική πρόσληψη (μmol)
Μη πολικό								
Ειλεοστομία	22	17.2	116	3	208	44	0	371
Χωρίς ειλεοστομία	26	14.5	123	9	199	51	0	382
Πολικό								
Ειλεοστομία	49	10.3	150	198	29	121	0	498
Χωρίς ειλεοστομία	60	8.7	166	235	23	103	0	526
Γλυκοσίδιο ολευρωπαΐνης								
Ειλεοστομία	100	1.9	0	0	0	0	190	190
Placebo								
Χωρίς ειλεοστομία	0	14.5	0	0	0	0	0	0

(Vissers *et al*, 2002)

Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες:

Ποσοστιαία ανάκτηση τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης και γλυκοσιδίου ολευρωπαΐνης μετά από επώαση σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό *in vitro* και ειλεοστομικό έκκριμα *ex vivo*

	Γαστρικό υγρό		Δωδεκαδακτυλικό υγρό		Ειλεοστομικό έκκριμα
	0,5h	2h	1h	4h	2h
	%				
Τυροσόλη	113	128	99	95	76 (76-77)
Υδροξυτυροσόλη	96	112	89	79	51 (29-72)
Γλυκοσίδιο ολευρωπαΐνης	99	98	101	98	81 (79-82)

(Vissers *et al*, 2002)

Απέκκριση ολικών πολυφαινολών στο ειλεοστομικό έκκριμα 24ώρου

Συμπλήρωμα	Πρόσληψη	Ολική απέκκριση	Συνολική φαινομενική απορρόφηση	Συνολική φαινομενική απορρόφηση ως αναλογία της πρόσληψης
Μη πολικό	371 μ mol	<127 μ mol	>205 μ mol	>55-66mol/100mol
Πολικό	498 μ mol	<153 μ mol	>343 μ mol	>68-69mol/100mol
Γλυκοσίδιο ολεωρωπαΐνης	190 μ mol	<51 μ mol	>125 μ mol	>66-73mol/100mol

(Vissers *et al*, 2002)

Συμπλήρωμα	Απέκκριση στα ούρα				
	Πρόσληψη μ mol	Τυροσόλη μ mol	Υδροξυτυροσόλη μ mol	Άθροισμα μ mol	Απέκκριση στα ούρα ως ποσοστό της πρόσληψης %
<u>Πολικό</u>					
Ειλεοστομία	371	33.5 $\pm$ 13.9	10.8 $\pm$ 4.5	44.3	12
Χωρίς ειλεοστομία	382	15.5 $\pm$ 4.6	6.0 $\pm$ 1.7	21.5	6
<u>Μη πολικό</u>					
Ειλεοστομία	498	4.1 $\pm$ 3.1	24.7 $\pm$ 10.9	28.8	6
Χωρίς ειλεοστομία	526	5.6 $\pm$ 8.8	21.6 $\pm$ 4.8	27.2	5
<u>Γλυκοσίδιο Ολεωρωπαΐνης</u>					
Ειλεοστομία	190	1.3 $\pm$ 1.5	28.4 $\pm$ 8.7	29.7	16
<u>placebo</u>					
Χωρίς ειλεοστομία	0	1.4 $\pm$ 3.5	1.2 $\pm$ 1.2	2.6	–

(Vissers *et al*, 2002)

Όπως φαίνεται κι από τους παραπάνω πίνακες τα άτομα με ειλεοστομία απορροφούν $>55\text{mol}/100\text{mol}$ των συνολικά προσλαμβανόμενων πολυφαινολών του ελαιολάδου υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες απορροφώνται στο λεπτό έντερο. Αυτό ενισχύεται και από τη μέτρηση της απέκκρισής των δύο πολυφαινολών στα ούρα στους εθελοντές χωρίς ειλεοστομία, η οποία έδειξε παρόμοιες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις των δύο πολυφαινολών. Εάν γινόταν απορρόφηση στο κόλον στους εθελοντές αυτούς οι συγκεντρώσεις στα ούρα θα ήταν αυξημένες. Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι η πιθανή μετατροπή του γλυκοσιδίου της ολεωρωπαΐνης σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, αφού μετά τη χορήγηση του σκευάσματος που περιείχε καθαρό γλυκοσίδιο ολεωρωπαΐνης $15\text{mol}/100\text{mol}$ αποβλήθηκε στα ούρα ως τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη (Visser *et al*, 2002).

A.4.4. Απορρόφηση και μεταβολισμός των πολυφαινολών

Παρακάτω γίνεται μια προσπάθεια σύντομης αναφοράς στα δεδομένα που υπάρχουν γύρω από την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την απέκκριση των διαιτητικών πολυφαινολών.

❖ Διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών

Η μέση ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών από τη δίαιτα κυμαίνεται στο 1 γραμμάριο (Scalbert *et al*, 2002). Οι κυριότερες πηγές είναι τα φρούτα, το τσάι, ο καφές, η σοκολάτα και τα παράγωγά της, το κρασί, οι ελιές και το ελαιόλαδο. Μικρότερες ποσότητες πολυφαινολών προσλαμβάνονται από τα λαχανικά και τα δημητριακά. Το είδος (η τάξη) και η συγκέντρωση των πολυφαινολών διαφέρει σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα τρόφιμα, ακόμη και ανάμεσα σε τρόφιμα από το ίδιο είδος. Σε μια μελέτη που έγινε στην Ολλανδία βρέθηκε ότι η μέση πρόσληψη όλων των φλαβονοειδών κυμαίνονταν στα $23\text{mg}/\text{ημέρα}$. Η κερκετίνη, της οποίας η μέση πρόσληψη βρέθηκε να είναι $16\text{mg}/\text{ημέρα}$ αποτελούσε και την κύρια πηγή πρόσληψης (Hertog *et al*, 1993).

❖ **Απορρόφηση των πολυφαινολών στον εντερικό αυλό**

Ένδειξη για την απορρόφηση των πολυφαινολών στον εντερικό αυλό αποτελεί η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά από κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες. Η απέκκρισή τους στα ούρα μετά από χορήγηση συγκεκριμένης δόσης κάποιας τέτοιας ουσίας αποτελεί σημαντική ένδειξη για τη βιοδιαθεσιμότητα της εκάστοτε εξεταζόμενης πολυφαινόλης. Όπως φαίνεται και από τις προαναφερθέντες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, οι ποσότητες που ανακτώνται άθικτες στα ούρα διαφέρει από το ένα φαινολικό συστατικό στο άλλο.

Ανάμεσα στα φλαβονοειδή, ιδιαίτερα χαμηλή είναι η συγκέντρωση της κερκετίνης και της ρουτίνης (γλυκοσίδιο της κερκετίνης) στα ούρα (0,3-1,4% της συνολικά χορηγούμενης δόσης) (Scalbert *et al*, 2002). Υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις παρουσιάζουν οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού (3-13%) (Lambert και Yang, 2003), οι φλαβανόνες των εσπεριδοειδών και οι ανθοκυανίνες του κόκκινου κρασιού (Scalbert *et al*, 2002). Η χαμηλότερη ανάκτηση στα ούρα σημειώθηκε για τις θειαφλαβίνες του τσαγιού (Mulder *et al*, 2001).

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις ορισμένων πολυφαινολών στα ούρα πιθανώς να μην οφείλεται σε αδυναμία αποικοδόμησής τους στον εντερικό αυλό αλλά στο γεγονός ότι παραμένουν σταθερές στα γαστρικά και τα εντερικά υγρά. Άλλη πιθανή εξήγηση είναι η απέκκρισή τους στη χολή, για την οποία δεν υπάρχουν ακόμη καθόλου ερευνητικά δεδομένα.

Η χημική δομή των πολυφαινολών διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στην εντερική απορρόφησή τους. Σε μεγαλύτερο ποσοστό επηρεάζουν το μοριακό βάρος, η γλυκοσυλίωση και η εστεροποίησή τους. Όσον αφορά στο μοριακό βάρος γενικά ισχύει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος τόσο μικρότερη είναι και η απορρόφησή τους στον εντερικό αυλό. Ο βαθμός γλυκοσυλίωσης των πολυφαινολών επηρεάζει την εντερική απορρόφηση μερικές φορές διευκολύνοντας την κι άλλοτε επηρεάζοντάς την αρνητικά. Με τον ίδιο τρόπο επηρεάζει και ο βαθμός εστεροποίησης.

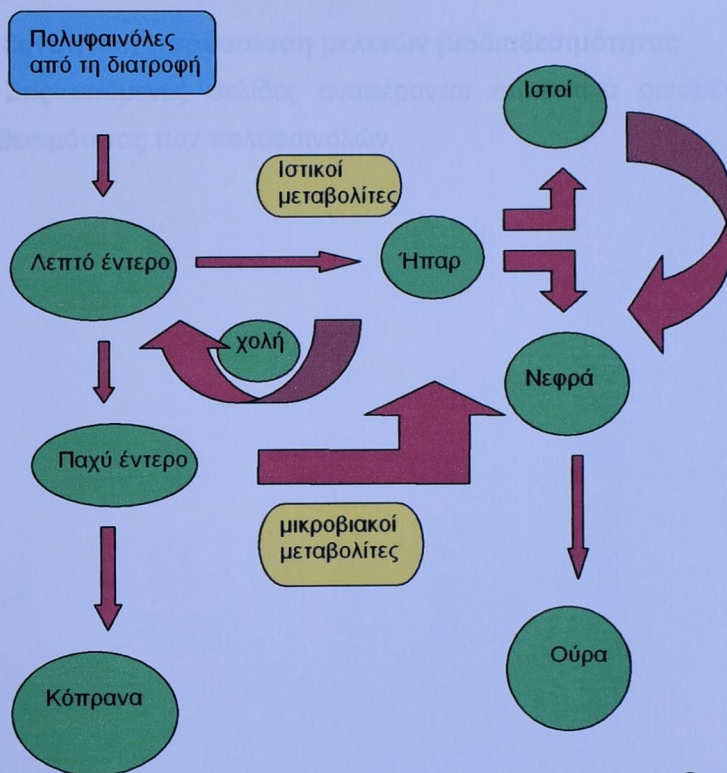
Οι περισσότερες πολυφαινόλες απορροφώνται σχετικά γρήγορα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σημειώνονται περίπου στο διάστημα 0-2 ωρών μετά την κατανάλωση πολυφαινολικού γεύματος, οι οποίες μειώνονται εξίσου γρήγορα φτάνοντας στο baseline στις επόμενες 24 ώρες. Υπάρχουν βέβαια διαφοροποιήσεις στον χρόνο που σημειώνεται η μέγιστη συγκέντρωσή, ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκουν. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν κατά πόσο συνεχής πρόσληψη πολυφαινολών προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης που κυκλοφορούν συστηματικά στο αίμα, κι αυτό θα πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο έρευνας στο μέλλον.

❖ **Μεταβολισμός πολυφαινολών**

Οι πολυφαινόλες της δίαιτας αποτελούν υπόστρωμα για τη β-γλυκουρονιδάση και την κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση στο λεπτό έντερο αλλά και για έναν αριθμό ενζύμων της φάσης I και II ήπαρ. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες που δεν έχουν απορροφηθεί ή έχουν επαναρροφηθεί στη χολή υπόκεινται σε υδρόλυση και αποικοδόμηση στο κόλον που οφείλεται στη δράση ενζύμων της κολονικής μικροχλωρίδας.

Κυριολεκτικά όλες οι πολυφαινόλες που κυκλοφορούν στο πλάσμα είναι γλυκοζυλιωμένες ή/και σε μορφή σουλφατιδίων και δεν κυκλοφορούν -παρά μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις- σε ελεύθερη μορφή. Παρά το γεγονός ότι οι συζευγμένες μορφές των πολυφαινολών ανιχνεύονται πάντα στο πλάσμα και στα ούρα δεν είναι γνωστή η βιολογική τους δραστηριότητα γιατί δεν υπάρχουν στο εμπόριο σκευάσματα με τις ενώσεις αυτές. Γι' αυτό και όλες οι μελέτες που έχουν να κάνουν με τις πολυφαινόλες τις χρησιμοποιούν στην ελεύθερη μορφή τους.

Σχηματική απεικόνιση της απορρόφησης, μεταβολισμού και απέκκρισης των πολυφαινολών



Scalbert *et al*, 2002

Όλα τα παραπάνω δεδομένα έχουν αποσαφηνίσει πολλές απορίες σχετικά με τις πολυφαινόλες ως συστατικά της διαίτας. Εντούτοις, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα και πολλά άλλα έχουν αναγεννηθεί. Γι' αυτό και χρειάζεται συστηματική διερεύνηση για εξακρίβωση του μηχανισμού απορρόφησης και μεταβολισμού της κάθε πολυφαινόλης αλλά και ακριβής αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης -ιδιαίτερα της δράσης των συζευγμένων τους μορφών, διότι όπως φάνηκε και από τις έρευνες που αναφέρθηκαν στις παραγράφους A.4.2. και A.4.3. οι περισσότερες μελετούσαν την πρόσληψη και την αποβολή των πολυφαινολών στα ούρα, χωρίς να δίνουν έμφαση στους μεταβολίτες που σχηματίζονται *in vivo*, οι οποίοι πιθανότατα είναι και οι υπεύθυνοι για την πρόληψη των διαφόρων ασθενειών. Αυτό θα βοηθήσει στον καθορισμό του δραστικού κλάσματος των φαιολικών συστατικών ανάμεσα σ' αυτές που κυκλοφορούν στον

ανθρώπινο οργανισμό και στον καθορισμό των καλύτερων διαιτητικών πηγών.

A.4.5. Συνοπτική παρουσίαση μελετών βιοδιαθεσιμότητας

Στις επόμενες σελίδες αναφέρονται συνοπτικά ορισμένες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών.

Είδος μελέτης	Πολυφαινόλη (pp)	Διατηρητική ύλη	Ποσότητα pp που καταναλώθηκε	Μέγιστη συγκέντρωση pp στο πλάσμα	Χρόνος μέγιστης συγκέντρωσης pp στο πλάσμα	Ανταγωνισμός στα κύτταρα
per os κατανάλωση από ανθρώπους	KATECHINES	EDCG	1.5g	118 ng/mL	1.5 h	n.d.
			3.0g	328 ng/mL	2.4 h	n.d.
	EGCG	Πρόσινο τσάι	1.5g	148 ng/mL	1.4 h	90%
			3.0g	508 ng/mL	1.8 h	97%
Ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντίκια	EC	Πρόσινο τσάι	1.5g	55 ng/mL	1.4 h	97%
			3.0g	189 ng/mL	1.8 h	98%
	EGCG	Πρόσινο τσάι	25 mg (73 mg/g)	1.5 dL/Kg	212 min	
			10 mg/Kg (73 mg/g)	22.5 dL/Kg	133 min	
Ενδοφλέβια χορήγηση σε σκύλους	EGCG	Πρόσινο τσάι	200 mg (73 mg/g)	0.1%	-	
			10 mg/Kg (73 mg/g)	2.1 dL/Kg	45 min	
	EC	Πρόσινο τσάι	25 mg (58 mg/g)	-13.7%	-	
			10 mg/Kg (27 mg/g)	3.6 dL/Kg	41 min	
Ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντίκια	EC	Πρόσινο τσάι	25 mg (27 mg/g)	11.2%	-	
			10 mg/Kg (27 mg/g)	11.2%	-	
	EGCG	Πρόσινο τσάι	25 mg (27 mg/g)	11.2%	-	
			10 mg/Kg (27 mg/g)	11.2%	-	

Είδος μελέτης	Πολυφαινόλη (PP)	Διαιτητική πηγή	Ποσότητα PP που καταναλώθηκε	Μέγιστη συγκέντρωση PP στο πλάσμα	Χρόνος μέγιστης συγκέντρωσης PP στο πλάσμα	Απέκκριση στα ούρα	Μέθοδος ανάλυσης PP	Πηγή
	KATEXINEΣ							
per os κατανάλωση από ανθρώπους	EGCG	Πράσινο τσάι	1,5g	119 ng/mL	1,6 h	n.d.	HPLC	Yang et al, 1998
			3,0g	326 ng/mL	2,4 h	n.d.		
	EGC		1,5g	148 ng/mL	1,4 h	90%		
			3,0g	508 ng/mL	1,8 h	90%		
	EC		1,5g	55 ng/mL	1,4 h	90%		
			3,0g	189 ng/mL	1,8 h	90%		
Ενδοφλέβια χορήγηση σε αρουραίους	EGCG	Πράσινο τσάι	25 mg τσαγιού/ Kg (73 mg/g)	1,5 dL/ Kg	212 min	-	HPLC	Chen et al, 1997
Ενδογαστρική χορήγηση σε αρουραίους		Καθαρό συστατικό	10 mg/Kg (73 mg/g)	22,5 dL/Kg	135 min	-		
Ενδοφλέβια χορήγηση σε αρουραίους		Πράσινο τσάι	200 mg τσαγιού/ Kg (73 mg/g)	0,1%	-	-		
Ενδογαστρική χορήγηση σε αρουραίους			25 mg τσαγιού/ Kg (68 mg/g)	2,1 dL/Kg	45 min	-		
Ενδοφλέβια χορήγηση σε αρουραίους			200 mg τσαγιού/ Kg (68 mg/g)	~13,7%	-	-		
Ενδοφλέβια χορήγηση σε αρουραίους	EC	Πράσινο τσάι	25 mg τσαγιού/ Kg (27 mg/g)	3,6dL/Kg	41 min	-		
Ενδογαστρική χορήγηση σε αρουραίους			200 mg τσαγιού/ Kg (27 mg/g)	31,2%	-	-		

per os κατανάλωση από ανθρώπους	<u>ΘΕΙΑΦΛΑΒΙΝΕΣ</u>	Μαύρο τσάι	700 mg	1μg/L	1-3 h	0,006%	GC-MS	Mulder et al, 2001
	ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ							
per os κατανάλωση από ανθρώπους	M-3-G	Κόκκινο κρασί	68 mg/ 500mL	~1,2nM	50 min	<0,03% (16,4μg)	HPLC	Bulb et al, 2001
		Μη αλκοολούχο κόκκινο κρασί	58 mg/ 500mL	~1,6 nM	90 min	<0,03% (13,3μg)		
		Χυμός από κόκκινο σταφύλι	117 mg/ 500mL	~2,6 nM	120 min	<0,03% (27 μg)		
	ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΙΚΑ							
per os κατανάλωση από ανθρώπους	OΞΕΑ							
	Δελφιδίνη-3- γλυκοσίδιο							
	Δελφινίνη- 3 ρουτινοσίδη							
	Κυανιδίνη-3- γλυκοσίδη							
	Κυανιδίνη-3- ρουτινοσίδη	Χυμός μούρων	0-128,6 nmol/L	-	-	0,007 -0,133% (0,07 -1,35mg)	HPLC & LC-MS	Rechner et al, 2002

ΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ								
per os κατανάλωση από ανθρώπους	Εσπεριδίνη	Χυμός πορτοκάλι (0,5L)	444 mg/L	0,46±0,07 μmol/L		5-7 h	4,1±1,2%	
	Χυμός πορτοκάλι (1L)	1,28±0,13 μmol/L		-				
	Ναρινγγίνη	Χυμός πορτοκάλι (0,5 L)	96,4 mg/L	0,20±0,04 μmol/L			7,9±1,7%	
ΑΛΛΕΣ								
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ								
Κερκετίνη	Άσπρο κρασί	10 mg/L	1,7-1,9% ~10 nmol/L		30 min	2,9-7%		
	Χυμό γκρέιπ- φρουτ							
	Ομογενοποιημένος χυμός λαχανικών							
trans- Ρεσβερατρόλη	Άσπρο κρασί	25 mg/L	17,2-26% ~40 nmol/L		4 h	17,2-26%		
	Χυμό γκρέιπ- φρουτ							
	Ομογενοποιημένος χυμός λαχανικών							
[+]-κατεχίνη	Άσπρο κρασί	25 mg/L	6,5%		1h	6,5%		
	Χυμό γκρέιπ- φρουτ							
	Ομογενοποιημένος χυμός λαχανικών							
per os κατανάλωση από ανθρώπους							GC-MS	Goldberg et al, 2003)

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ							
Είδος μελέτης: per os κατανάλωση ελαιολάδου από ανθρώπους (50mL)	Συγκέντρωση ολικών PP (mg/L)	Συγκέντρωση τυροσόλης (μg/mL)	Συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (μg/mL)	Απέκκριση στα ούρα(%)		Μέθοδος ανάλυσης των πολυφαινολών	Πηγή
				τυρ.	OH-τυρ		
				21±11	29 ± 27		
				28±21	64 ± 36		
				21±6	35 ± 19		
	487,5 975	36 72	20 44			GC-MS	Visioli <i>et al</i> , 2000 _b
	1462,5	110	66				
	1950	140	84		40±21		

B.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς τυροσόλης

B.1.1. Όργανα / Υλικά

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης UVICON spectrophotometer 831
- Ζυγός ακριβείας (Ohaus Analytical Standard)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Σιφόνιο των 10 mL
- Μικροπιπέτες Eppendorf των 100 μ L και των 1000 μ L
- Vortex (MSI Minishaker) στις 1800 στροφές
- Σπάτουλα
- Υακινθάκι

B.1.2. Αντιδραστήρια **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

- Τυροσόλη (Fluka, 58105)
- Μεθανόλη
- Αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu (Aldrich)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3
- Αποιονισμένο νερό

B.1.3. Εκτέλεση

Παρασκευή διαλύματος τυροσόλης σε μεθανόλη (1%, w/v)

- Ζυγίζονται 100mg τυροσόλης σε ζυγό ακριβείας μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα
- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται περίπου 25 mL μεθανόλης (MeOH)
- Με σιφόνιο των 10 mL λαμβάνονται ακριβώς 10 mL μεθανόλης τα οποία μεταφέρονται στον δοκιμαστικό σωλήνα με την τυροσόλη
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex

B.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς τυροσόλης

B.1.1. Όργανα / Υλικά

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης UVICON spectrophotometer 931
- Ζυγός ακριβείας (Ohaus, Analytical Standard)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Σιφώνιο των 10 mL
- Μικροπιπέττες Eppendorf των 100 μL και των 1000 μL
- Vortex (MSI Minishaker) στις 1800 στροφές
- Σπάτουλα
- Υαλογράφος

B.1.2. Αντιδραστήρια

- Τυροσόλη (Fluka, 56105)
- Μεθανόλη
- Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu (Aldrich)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3
- Απιονισμένο νερό

B.1.4. Αποτέλεσμα

B.1.3. Εκτέλεση

Παρασκευή διαλύματος τυροσόλης σε μεθανόλη (1%, w/v)

- Ζυγίζονται 100mg τυροσόλης σε ζυγό ακριβείας μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα
- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται περίπου 25 mL μεθανόλης (MeOH)
- Με σιφώνιο των 10 mL λαμβάνονται ακριβώς 10 mL μεθανόλης τα οποία μεταφέρονται στον δοκιμαστικό σωλήνα με την τυροσόλη
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex

Παρασκευή διαλύματος τυροσόλης σε μεθανόλη (1M)

- Με μικροπιπέτα Errendorf λαμβάνεται 1 mL από το δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει τυροσόλη και μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα
- Με σιφώνιο των 10 mL λαμβάνονται ακριβώς 9 mL μεθανόλης τα οποία και μεταφέρονται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex

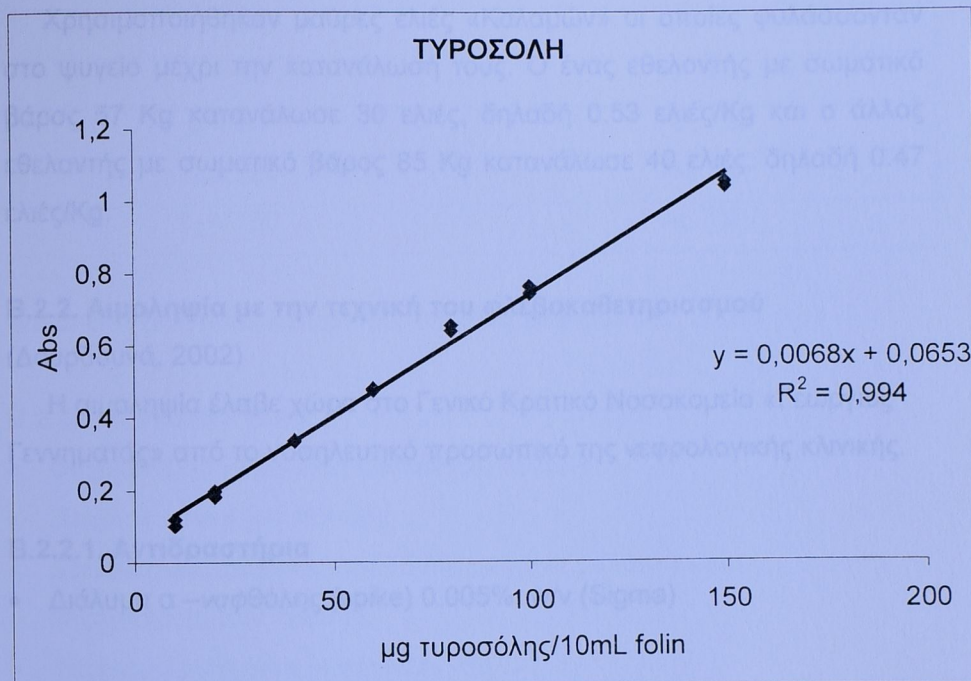
Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων για Folin – Ciocalteau

- Από το δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει τυροσόλη 1 M λαμβάνονται με μικροπιπέτα Errendorf ποσότητες 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L και 150 μ L, τα οποία τοποθετούνται σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου περιέχουν τα δείγματα τυροσόλης προστίθενται 5 mL νερού και 0.5 mL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteau
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 3 λεπτά
- Ακολούθως προστίθεται από 1 mL κορεσμένου Na_2CO_3 σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Το περιεχόμενο αναδεύεται και αραιώνεται με νερό έως τελικό όγκο 10 mL

B.1.4. Αποτελέσματα

Συγκέντρωση (μ g/ 10ml F-C)	Abs ₁	Abs ₂
10	0.1018	0.1202
20	0.1817	0.1987
40	0.3356	0.3376
60	0.4760	0.4806
80	0.6560	0.6401
100	0.7640	0.7434
150	1.0544	1.0398

B.1.5. Πρότυπη καμπύλη τυροσόλης



B.2. Επεξεργασία πιλοτικών δειγμάτων αίματος

Κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας της Δουρδουνά Αγγελικής («Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών μετά από κατανάλωση ελαιοκάρπων», Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2002) έγινε παραλαβή δειγμάτων αίματος ανά μισή ώρα έως και 2.5 ώρες μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων από δύο εθελοντές. Τα δείγματα αυτά έτυχαν της κατάλληλης επεξεργασίας και τοποθετήθηκαν στην υπερκατάψυξη. Η περαιτέρω επεξεργασία τους έγινε στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής. Παρακάτω αναφέρονται όλα τα βήματα που ακολουθήθηκαν.

B.2.1. Διατροφική παρέμβαση (Δουρδουνά, 2002)

Την προηγούμενη ημέρα της αιμοληψίας οι εθελοντές ακολούθησαν δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών, δηλαδή απέφυγαν την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως είναι το ελαιόλαδο, οι ελιές,

το τσάι, τα φρούτα, τα λαχανικά, το κόκκινο κρασί, ο καφές και η σοκολάτα. Ο έλεγχος της διατροφικής πρόσληψης έγινε με ανάκληση 24ώρου.

Χρησιμοποιήθηκαν μαύρες ελιές «Καλαμών» οι οποίες φυλάσσονταν στο ψυγείο μέχρι την κατανάλωσή τους. Ο ένας εθελοντής με σωματικό βάρος 57 Kg κατανάλωσε 30 ελιές, δηλαδή 0.53 ελιές/Kg και ο άλλος εθελοντής με σωματικό βάρος 85 Kg κατανάλωσε 40 ελιές, δηλαδή 0.47 ελιές/Kg.

B.2.2. Αιμοληψία με την τεχνική του φλεβοκαθετηριασμού

(Δουρδουνά, 2002)

Η αιμοληψία έλαβε χώρα στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο «Γεώργιος Γεννηματάς» από το νοσηλευτικό προσωπικό της νεφρολογικής κλινικής.

B.2.2.1. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα α -ναφθόλης (spike) 0.005%, w/v (Sigma)

B.2.2.2. Εκτέλεση αιμοληψίας

- Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε 2 εθελοντές (Α και Γ)
- Έγινε λήψη 10 mL αίματος σε χρόνο $t_0=0$, δηλαδή πριν από την κατανάλωση ελιών.
- Τα 10 mL αίματος που ελήφθησαν από κάθε εθελοντή μεταφέρθηκαν σε 3 vaccuete με EDTA (των 3 mL)
- Στη συνέχεια οι εθελοντές Α και Γ κατανάλωσαν μαύρες ελιές «καλαμών»: 30 ελιές ο εθελοντής Α και 40 ελιές ο εθελοντής Γ.
- Μετά χρόνο 30 min από το τέλος της κατανάλωσης των ελιών έγινε η 2^η αιμοληψία, κατά την οποία συνελέχθησαν πάλι από 10 mL αίματος από το κάθε εθελοντή
- Ομοίως επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία κάθε 30 min έως και τα 150min
- Αφού ολοκληρώθηκαν οι αιμοληψίες (6 για κάθε εθελοντή) μεταφέρθηκαν σε όλα τα vaccuete από 30 μ L α -ναφθόλης με μικροπιπέτα των 100 μ L.

Χρόνος αιμοληψίας (min)	Δείγματα
$t_0 = 0$	A0, Γ0
$t_1 = 30$	A1, Γ1
$t_2 = 60$	A2, Γ2
$t_3 = 90$	A3, Γ3
$T_4 = 120$	A4, Γ4
$T_5 = 150$	A5, Γ5

B.2.3. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος (Δουρδουνά, 2002)

B.2.3.1. Όργανα / Υλικά

- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge, 5810 R
- Πιπέτα Pasteur (με πουάρ)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Μικροπιπέτα των 1000 μ L
- Υπερκατάψυξη ultra low freezer -80°C

B.2.3.2. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα As Ac (ασκορβικό οξύ) 10%, v/v με pH = 5.5

B.2.3.3. Εκτέλεση

- Έγινε φυγοκέντρηση των 36 vaccuete στα 2500 g (3520 rpm) για 10 min σε 15°C , οπότε διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος
- Έγινε παραλαβή του υπερκείμενου (πλάσμα) με πιπέτα Pasteur
- Οι προσληφθείσες ποσότητες πλάσματος από κάθε τριάδα vaccuete μεταφέρθηκαν στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα (χρειάστηκαν συνολικά 12 δοκιμαστικοί σωλήνες)
- Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε όγκο πλάσματος 6 mL κατά προσέγγιση, οπότε προστέθηκαν από 0.6 mL As Ac (10%, v/v) με μικροπιπέτα Eppendorf
- Οι 12 δοκιμαστικοί σωλήνες φυλάχθηκαν στην υπερκατάψυξη στους -80°C

Τα παρακάτω βήματα έγιναν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής

B.2.4. Επεξεργασία πλάσματος

B.2.4.1. Όργανα / Υλικά

- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge, 5810 R
- Πιπέτες Pasteur (με πουάρ)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Μικροπιπέτα των 1000 μ L
- Φιάλη N_2
- Επωαστήριο (Mettmert INCO 2)
- Vortex
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 100 μ L
- Σιφώνια των 5 mL και του 1 mL
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UVICON spectrophotometer 931
- Κυψελίδα
- RP - HPLC διάταξη (HP1150) με ανιχνευτή UV-Vis (HP 1050)
- Vials
- Διάταξη GC/MSD (TIC) / Autosampler (αέριος χρωματογράφος) (Hewlett Packard, 6890)
- EASY pure RF (compact ultrapure water system)
- Υδρόλουτρο (Edelstache, Rost frei)

B.2.4.2. Αντιδραστήρια

- Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση από *Helix pomatia* (S.E.R.V.A.)
- Ακετόνη (SDS p.a.)
- Οξικός αιθυλεστέρας (SDS p.a.)
- Μεθανόλη (HPLC grade) (Sigma)
- Αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu (Sigma)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3

- Νερό από EASY pure RF
- Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) 485-8, Aldrich
- Trimethylchlorosilan (TMCS) (2333, Merck)

B.2.4.3. Εκτέλεση

- Παίρνουμε τα δείγματα από την κατάψυξη τα οποία αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου
- Από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρουμε από 1 mL πλάσματος σε 2 καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες (συνολικά 12 δοκιμαστικοί σωλήνες)
- Στον έναν από τους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 100 μ L ενζύμου (β -γλυκουρονιδάση)
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το ένζυμο αναδεύονται σε Vortex και τοποθετούνται σε επωαστήριο στους 37°C για 1 ώρα και κατόπιν αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσουν
- Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες (με ένζυμο και χωρίς ένζυμο) προστίθεται από 0.5 mL ακετόνης και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex
- Έπειτα προστίθενται από 2 mL οξικού αιθυλεστέρα και γίνεται πάλι ανάδευση σε Vortex
- Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρούνται επί 5 λεπτά στα 2500 g (3520 rpm)

Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται 3 φάσεις που από κάτω προς τα πάνω είναι:

- ο Η υδατική φάση της ακετόνης
- ο Η ενδιάμεση στιβάδα γαλακτώματος
- ο Η φάση του οξικού αιθυλεστέρα με τα οργανικά κλάσματα
- Με πιπέτες Pateur γίνεται παραλαβή της υπερκείμενης φάσης του οξικού αιθυλεστέρα και μεταφορά αυτής σε αντίστοιχους καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες
- Η διαδικασία της εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα επαναλαμβάνεται για άλλες δυο φορές και το νέο εκχύλισμα προστίθεται στο προηγούμενο
- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το εκχύλισμα γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2

- Τα στερεά υπολείμματα επαναδιαλύονται σε 1 mL MeOH
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex
- Με μικροπιπέτα Eppendorf λαμβάνονται 100 μ L από καθέναν από τους 12 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία μεταφέρονται σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος Folin - Ciocalteu

B.2.5. Μέθοδος Folin – Ciocalteu

- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου περιέχουν τα 100 μ L δείγματος προστίθενται από 5 mL νερού και από 0.5 mL αντιδραστήριου Folin – Ciocalteu
- Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 3 λεπτά
- Προστίθεται από 1 mL κορεσμένου Na_2CO_3 σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Το περιεχόμενο αναδεύεται και αραιώνεται έως τελικό όγκο 10 mL (3.4 mL νερό)

Η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετράται μετά από μια ώρα σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 725 nm ως προς τυφλό δείγμα νερού.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυφαινολών γίνεται με αναφορά στην πρότυπη καμπύλη τυροσόλης.

B.2.6. Αποτελέσματα

Απορροφήσεις δειγμάτων χωρίς ένζυμο

Δείγμα	Abs δείγματος Α	Abs δείγματος Γ
$t_0 = 0$	0.4132	0.2238
$t_1 = 30$	0.5008	0.3424
$t_2 = 60$	0.4093	0.5342
$t_3 = 90$	0.6388	0.3730
$t_4 = 120$	0.4885	0.6894
$t_5 = 150$	0.4311	0.3127

Απορροφήσεις δειγμάτων με ένζυμο β-γλυκουρονιδάση

Δείγμα	Abs δείγματος Α	Abs δείγματος Γ
$t_0 = 0$	0.4878	0.2929
$t_1 = 30$	0.5926	0.2365
$t_2 = 60$	0.443	-
$t_3 = 90$	0.4884	-
$t_4 = 120$	0.4911	1.2140
$t_5 = 150$	0.3822	1.1168

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της τυροσόλης υπολογίζεται η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών για κάθε δείγμα. Η εξίσωση της καμπύλης είναι : $y = 0.888x + 0.1066$

όπου y : Abs

x : μg τυροσόλης /10mL F-C

Για εύρεση της συγκέντρωσης πολυφαινολών στο πλάσμα αντικαθιστούμε στην παραπάνω σχέση. Έτσι έχουμε: $x = (y - 0.1066)/0.888$.

Έπειτα κάνουμε αναγωγή στο 1 mL, που είναι ο όγκος του δείγματος που παίρναμε.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

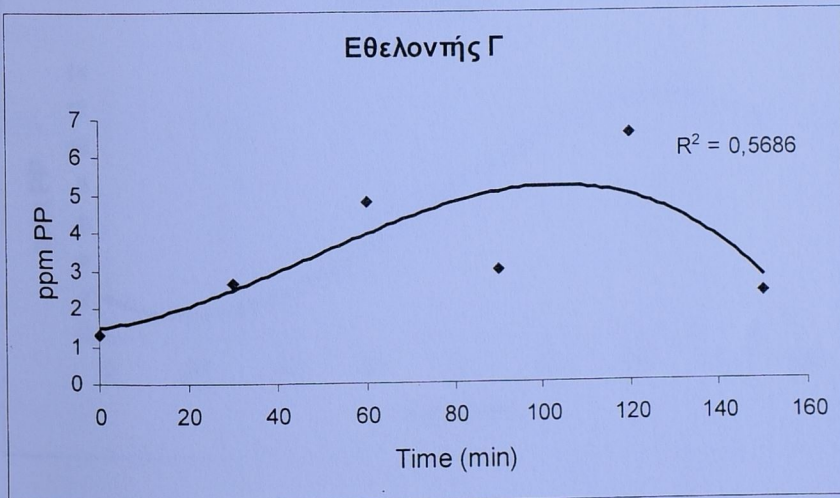
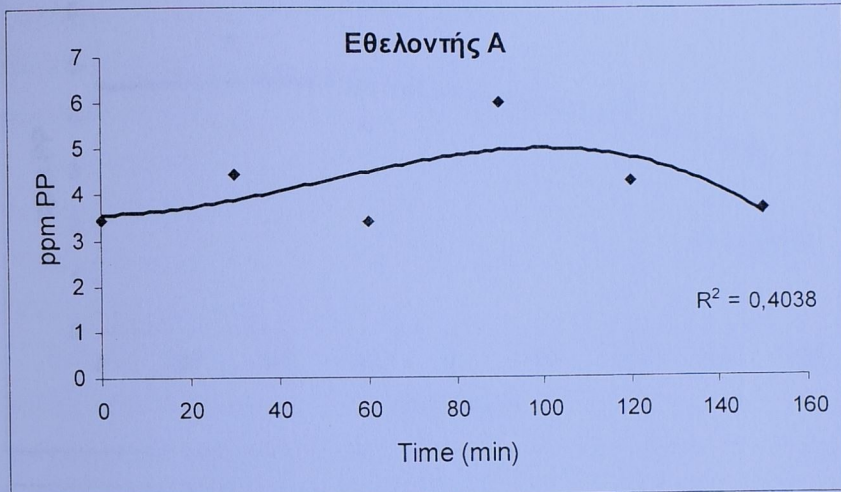
Δείγματα <u>χωρίς</u> ένζυμο	y (Abs)	x (g/10mL F-C)	Συγκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα (ppm)
<u>Εθελοντής Α</u>			
A0(α)	0.4132	0.3453	3.4527
A1(α)	0.5008	0.4439	4.4392
A2(α)	0.4093	0.3409	3.4088
A3(α)	0.6588	0.5993	5.9932
A4(α)	0.4885	0.4301	4.3006
A5(α)	0.4311	0.3654	3.6543

<u>Εθελοντής Γ</u>			
Γ0(α)	0.2238	0.1320	1.320
Γ1(α)	0.3424	0.2655	2.655
Γ2(α)	0.5342	0.4815	4.815
Γ3(α)	0.3730	0.300	3.000
Γ4(α)	0.6894	0.6563	6.563
Γ5(α)	0.3127	0.2321	2.321

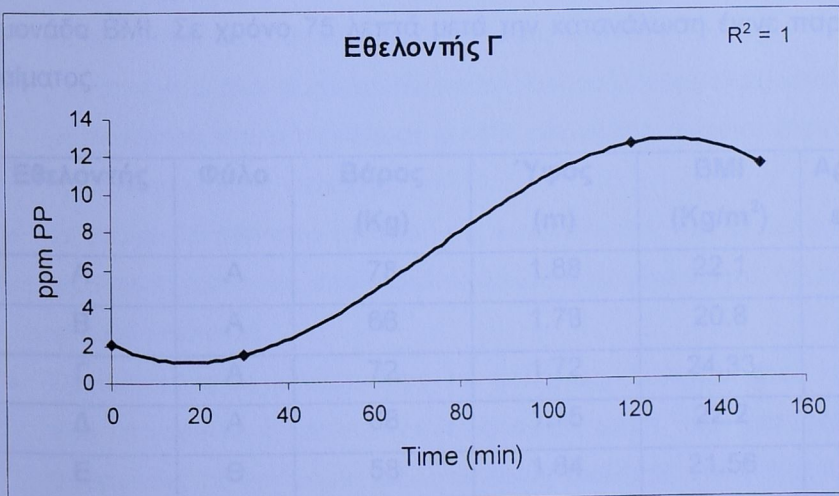
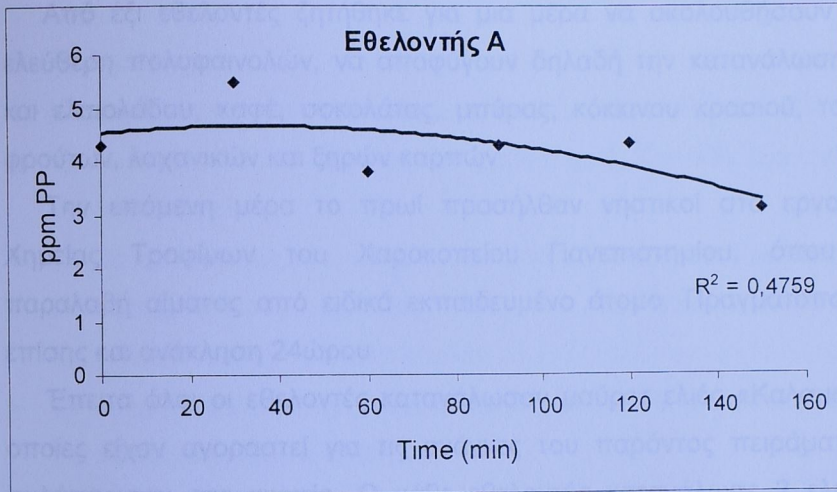
Δείγματα <u>με</u> ένζυμο (β- γλυκουρονιδάση)	y(Abs)	x (g/10mL F-C)	Συγκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα(ppm)
<u>Εθελοντής Α</u>			
A0(β)	0.4878	0.4293	4.2928
A1(β)	0.5926	0.5473	5.4730
A2(β)	0.443	0.3788	3.788
A3(β)	0.4884	0.4300	4.300
A4(β)	0.4911	0.4330	4.330
A5(β)	0.3822	0.3104	3.104
<u>Εθελοντής Γ</u>			
Γ0(β)	0.2929	0.2097	2.097
Γ1(β)	0.2365	0.146	1.460
Γ2(β)	-	-	-
Γ3(β)	-	-	-
Γ4(β)	1.2140	1.2471	12.471
Γ5(β)	1.1168	1.1376	11.376

Κατασκευάζεται οι καμπύλες της συγκέντρωσης των πολυφαινολών σε συνάρτηση με τον χρόνο για όλα τα δείγματα.

Δείγματα πλάσματος χωρίς ένζυμο



Δείγματα πλάσματος με ένζυμο β-γλυκουρονιδάση



Β.4. Απολάργισι- Επεξεργασία δειγμάτων αίματος

Β.4.1. Όργανα / Υλικά

- Συσκευή for single use-sterilized της εταιρείας DIMES-ELVONY
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ml με μπλε βιδωτό πώμα
- Ηπαρίνη (αντιπηκτικό)

B.3. Διατροφική παρέμβαση για την ανάλυση των πολυφαινολών της ελιάς στο πλάσμα

Από έξι εθελοντές ζητήθηκε για μια μέρα να ακολουθήσουν δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών, να αποφύγουν δηλαδή την κατανάλωση ελιάς και ελαιολάδου, καφέ, σοκολάτας, μπίρας, κόκκινου κρασιού, τσαγιού, φρούτων, λαχανικών και ξηρών καρπών.

Την επόμενη μέρα το πρωί προσήλθαν νηστικοί στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, όπου έγινε παραλαβή αίματος από ειδικά εκπαιδευμένο άτομο. Πραγματοποιήθηκε επίσης και ανάκληση 24ώρου.

Έπειτα όλοι οι εθελοντές κατανάλωσαν μαύρες ελιές «Καλαμών», οι οποίες είχαν αγοραστεί για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος και φυλάσσονταν στο ψυγείο. Ο κάθε εθελοντής κατανάλωσε 2 ελιές ανά μονάδα BMI. Σε χρόνο 75 λεπτά μετά την κατανάλωση έγινε παραλαβή αίματος.

Εθελοντής	Φύλο	Βάρος (Kg)	Ύψος (m)	BMI (Kg/m ²)	Αριθμός ελιών
A	A	78	1.88	22.1	44
B	A	66	1.78	20.8	42
Γ	A	72	1.72	24.33	48
Δ	A	68	1.75	22.2	44
E	Θ	58	1.64	21.56	42
ΣΤ	Θ	49	1.65	18.1	36

B.4. Αιμοληψία- Επεξεργασία δειγμάτων αίματος

B.4.1. Όργανα / Υλικά

- Syringes for single use-sterilized της εταιρείας DIMES-ELVIONY
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ηπαρίνη (αντιπηκτικό)

- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge, 5810 R
- Λευκοπλάστ
- Υπερκατάψυξη ultra low freezer -80°C

B.4.3. Εκτέλεση

- Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε 6 εθελοντές (Α,Β,Γ,Δ,Ε,ΣΤ)
- Έγινε λήψη 10 mL αίματος σε χρόνο $t_0=0$, δηλαδή πριν από την κατανάλωση ελιών.
- Τα 10 mL αίματος που ελήφθησαν από κάθε εθελοντή μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 mL στους οποίους είχε προηγουμένως προστεθεί ηπαρίνη.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 3520 rpm για να διαχωριστεί το πλάσμα.
- Έγινε παραλαβή του πλάσματος με πιπέτα Pasteur το οποίο μεταφέρθηκε σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Στη συνέχεια όλοι οι εθελοντές κατανάλωσαν μαύρες ελιές «Καλαμών» (η ποσότητα που κατανάλωσε ο κάθε εθελοντής φαίνεται στον πίνακα της προηγούμενης σελίδας).
- Σε χρόνο 75 min από το τέλος της κατανάλωσης των ελιών έγινε η 2^η αιμοληψία, κατά την οποία συλλέχθηκαν πάλι από 10 mL αίματος από το κάθε εθελοντή.
- Ομοίως το αίμα μεταφέρθηκε σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ηπαρίνη, έγινε φυγοκέντρηση και μεταφορά του πλάσματος σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες όπως περιγράφεται πιο πάνω.
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στην υπερκατάψυξη στους -80°C.

B.5. Επεξεργασία πλάσματος

B.5.1. Όργανα / Υλικά

- Βλέπε § B.2.4.1.
- Ακολουθεί αντίδραση σε Vortex

B.5.2. Αντιδραστήρια

Βλέπε § B.2.4.2

B.5.3. Εκτέλεση

- Παίρνουμε τα δείγματα από την κατάψυξη τα οποία αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου
- Από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρουμε από 2 mL πλάσματος σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα
- Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται από 1 mL ακετόνης και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex
- Από αυτούς τους δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται με μικροπιπέτα Eppendorf 100 μ L σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος Folin - Ciocalteau
- Έπειτα προστίθενται 10 μ L κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 σε όλους τους σωλήνες οι οποίοι ακολούθως αναδεύονται σε Vortex
- Ακολούθως προστίθενται από 4 mL οξικού αιθυλεστέρα και γίνεται πάλι ανάδευση σε Vortex
- Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρούνται επί 5 λεπτά στα 2500 g (3520 rpm)

Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται 3 φάσεις που από κάτω προς τα πάνω είναι:

- ο Η υδατική φάση της ακετόνης
- ο Η ενδιάμεση στιβάδα γαλακτώματος
- ο Η φάση του οξικού αιθυλεστέρα με τα οργανικά κλάσματα
- Με πιπέτες Pateur γίνεται παραλαβή της υπερκείμενης φάσης του οξικού αιθυλεστέρα και μεταφορά αυτής σε αντίστοιχους καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες
- Η διαδικασία της εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα επαναλαμβάνεται για άλλες δυο φορές και το νέο εκχύλισμα προστίθεται στο προηγούμενο
- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το εκχύλισμα γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2
- Τα στερεά υπολείμματα επαναδιαλύονται σε 1 mL MeOH
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex

- Με μικροπιπέτα Eppendorf λαμβάνονται 100 μL από καθέναν από τους 6 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία μεταφέρονται σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος Folin – Ciocalteu
- Επιπροσθέτως λαμβάνονται 500 μL , τα οποία τοποθετούνται σε vials για ανάλυση με GC

B.5.4. Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Βλέπε § B.2.5.

B.5.5. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteu

A) Μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών με ακετόνη

Δείγμα	Απορρόφηση <u>πριν</u> από την κατανάλωση ελιών	Απορρόφηση <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
A	1.455	1.100
B	1.434	1.106
Γ	1.277	1.147
Δ	1.312	1.145
E	1.414	1.144
ΣΤ	1.126	1.097

B) μετά την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα

Δείγμα	Απορρόφηση <u>πριν</u> από την κατανάλωση ελιών	Απορρόφηση <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
A	0.090	0.082
B	0.082	0.105
Γ	0.072	0.085
Δ	0.066	0.099
E	0.116	0.120
ΣΤ	0.088	0.060

Σχόλια:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυφαινολών γίνεται με πρότυπη αναφορά στην πρότυπη καμπύλη τυροσόλης. Οι παραπάνω τιμές απορρόφησης όμως είναι πολύ μικρές και η όποια αναγωγή στην πρότυπη καμπύλη είναι άσκοπη αφού οι συγκεντρώσεις πολυφαινολών θα κυμαίνονται σε μηδενικά επίπεδα. Επίσης μετά την κατανάλωση ελιών δεν παρουσιάστηκε κάποια αύξηση στην τιμή της απορρόφησης που θα συνεπάγονταν και αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο πλάσμα.

B.6. Επεξεργασία πλάσματος με SPE (Solid - Phase Extraction)

B.6.1. Όργανα/ Υλικά

- Σύστημα SPE με στηλάκια C_{18}
- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge, 5810 R
- Πιπέτες Pasteur (με πουάρ)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Μικροπιπέτα των 1000 μ L
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UVICON spectrophotometer 931
- Κυψελίδα
- RP - HPLC διάταξη (HP1150) με ανιχνευτή UV-Vis (HP 1050)
- Vials
- Διάταξη GC/MSD (TIC) / Autosampler (αέριος χρωματογράφος) (Hewlett Packard, 6890)

B.6.2. Αντιδραστήρια

- Ακετόνη (SDS p.a.)
- Μεθανόλη (HPLC grade)
- Διάλυμα $\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (99:1,v/v)
- Folin- Ciocalteau (Sigma)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3

- Νερό από EASY pure RF
- Νερό HPLC
- Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) 485-8, Aldrich
- Trimethylchlorosilan (TMCS) (2333, Merck)

B.6.3.Εκτέλεση

- Τα δείγματα που βρίσκονται στην υπερκατάψυξη αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με μικροπιπέτα Eppendorf περνάμε από 1 mL MeOH σε έξι στηλάκια C₁₈ (κάθε στηλάκι αντιστοιχεί σε ένα δείγμα πλάσματος)
- Ακολούθως ξεπλένουμε με 2 mL νερού HPLC
- Με μικροπιπέτα Eppendorf παραλαμβάνονται 2 mL πλάσματος τα οποία μεταφέρονται σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Με σιφώνιο προστίθεται από 1 mL ακετόνης σε όλους τους σωλήνες, οι οποίοι φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 2500 g (3520 rpm)
- Με πιπέτα Pasteur παραλαμβάνεται η φάση της ακετόνης η οποία μεταφέρεται στο αντίστοιχο για κάθε δείγμα στηλάκι (ροή: 1 mL / min)
- Αφήνουμε για 30 sec
- Έπειτα ξεπλένουμε δύο φορές με 1 mL νερού HPLC
- Εφαρμόζουμε πίεση -0.6 bar για 15 min
- Τα ξεπλύματα αδειάζονται και τοποθετούνται στο σύστημα SPE καθαρά σωληνάκια
- Με μικροπιπέτα Eppendorf τοποθετείται σε κάθε στηλάκι από 1 mL διαλύματος MeOH:CH₃COOH (99:1, v/v) για 3 φορές
- Στα σωληνάκια με το εκχύλισμα γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂
- Παραλαμβάνουμε σε 1 mL MeOH
- Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex
- Με μικροπιπέτα Eppendorf λαμβάνονται 100 μL από καθέναν από τους 6 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία μεταφέρονται σε ισάριθμους καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος Folin – Ciocalteu
- Άλλα 200 μL μεταφέρονται σε vials για ανάλυση HPLC

- Επιπροσθέτως λαμβάνονται 300 μL , τα οποία τοποθετούνται σε vials για ανάλυση με GC
- Τέλος, 100 μL μεταφέρονται σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος DPPH

Δείγμα	Απορρόφηση πριν από την κατανάλωση ελίων	Απορρόφηση μετά την κατανάλωση ελίων
B.7. Μέθοδος DPPH	0.047	0.067
B	0.061	0.044
B.7.1. Όργανα / Υλικά	0.053	0.050
• Ογκομετρική φιάλη των 50 mL		0.050
• Πιπέτα Pasteur (με πουάρ)	0.047	0.053

- Σιφώνιο των 5 mL
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης UVICON spectrophotometer 931
- Κυψελίδα
- Αλουμινοχάρτο

B.7.2. Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη
- Αντιδραστήριο DPPH ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$)

B.7.3. Εκτέλεση

- Από το διάλυμα DPPH ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) το οποίο βρίσκεται στην κατάψυξη λαμβάνονται με σιφώνιο 3 mL και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL
- Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη, οπότε προκύπτει διάλυμα DPPH με συγκέντρωση $6 \times 10^{-3} \text{ M}$
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που έχουν 100 μL δείγματος προστίθενται από 1.900 mL DPPH ($6 \times 10^{-3} \text{ M}$)
- Αναδεύονται σε Vortex και με πιπέτα Pasteur μεταφέρονται σε κυψελίδα για να φωτομετρηθούν σε μήκος κύματος 515 nm

B.8. Αποτελέσματα

B.8.1. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteau

Χρόνος (min)	Αbs πριν την κατανάλωση ελιών	Αbs μετά την κατανάλωση ελιών
Δείγμα	Απορρόφηση <u>πριν</u> από την κατανάλωση ελιών	Απορρόφηση <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
A	0.047	0.057
B	0.051	0.044
Γ	0.053	0.050
Δ	0.050	0.050
E	0.047	0.053

Σχόλια:

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου Folin – Ciocalteau στα δείγματα πλάσματος που έτυχαν επεξεργασίας με εκχύλιση στερεής φάσης δεν έχουν δείξει κάτι αξιόλογο, όπως ακριβώς και τα αποτελέσματα μετά από εκχύλιση των δειγμάτων με οξικό αιθυλεστέρα. Οι απορροφήσεις είναι πολύ μικρές και η όποια αναγωγή στην πρότυπη καμπύλη είναι άσκοπη αφού οι συγκεντρώσεις πολυφαινόλων θα κυμαίνονται σε μηδενικά επίπεδα. Επιπλέον, δεν έχει σημειωθεί καμιά στατιστικά σημαντική αύξηση στην απορρόφηση των δειγμάτων μετά την κατανάλωση ελιών.

B.8.2. Αποτελέσματα DPPH

Εθελοντής Α

Χρόνος (min)	Abs <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Abs <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
0	0.746	0.624
10	0.745	0.459
20	0.745	0.416
30	0.661	0.372
40	0.623	0.343
50	0.569	0.324
60	0.541	0.314
70	0.503	0.307
80	0.468	0.304
90	0.443	0.300
100	0.420	-
110	0.390	-
120	0.398	-

Εθελοντής Β

Χρόνος (min)	Abs <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Abs <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
0	0.756	0.756
10	0.738	0.746
20	0.732	0.742
30	0.727	0.738
40	0.725	0.736

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα αντιπροσωπευτική κανονότητα έχει μόνο το πλάσμα του εθελοντή Α. Αφού τα υπόλοιπα δείγματα δεν έχουν δείξει θετική αντίδραση στη μέθοδο DPPH υποθέτουμε ότι το αποτέλεσμα του πρώτου δείγματος οφείλεται σε αστάθμητους παράγοντες ή σε πιθανό σφάλμα κατά την εκτέλεση του πειράματος.

Εθελοντής Γ

Χρόνος (min)	Abs <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Abs <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
0	0.753	0.747
10	0.743	0.740
20	0.740	0.740
30	0.740	-

Εθελοντής Δ

Χρόνος (min)	Abs <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Abs <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
0	0.745	0.745
10	0.736	0.735
20	0.734	0.731
30	0.731	0.728
40	0.731	0.730

Εθελοντής Ε

Χρόνος (min)	Abs <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Abs <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
0	0.760	0.759
10	0.753	0.760
20	0.757	0.762
30	0.765	0.764
40	0.776	-

Σχόλια:

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα αντιοξειδωτική ικανότητα έχει μόνο το πλάσμα του εθελοντή Α. Αφού τα υπόλοιπα δείγματα δεν έχουν δείξει θετική αντίδραση στη μέθοδο DPPH υποθέτουμε ότι το αποτέλεσμα του πρώτου δείγματος οφείλεται σε αστάθμητους παράγοντες ή σε πιθανό σφάλμα κατά την εκτέλεση του πειράματος.

B.9. Επανάληψη πειράματος

Ένας από τους εθελοντές που συμμετείχαν και στο προηγούμενο πείραμα προσήλθε άλλη μέρα στο εργαστήριο για επανάληψη του πειράματος. Αφού έκανε δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών για μια ημέρα, προσήλθε νηστική και έγινε παραλαβή αίματος. Έπειτα, κατανάλωσε την ίδια με την προηγούμενη φορά ποσότητα ελιών (36) και έγινε αιμοληψία 2 ώρες μετά.

Το σωληνάκι με το αίμα και την ηπαρίνη φυγοκεντρήθηκε στις 3520 rpm για 10 λεπτά και με πιπέτα Pasteur το πλάσμα μεταφέρθηκε σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα έγινε καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετόνη και επαναλήφθηκε το πείραμα με τα στηλάκια (SPE).

Σε ένα στηλάκι έγινε προσθήκη 1 mL πλάσματος και σε άλλο στηλάκι 2 mL πλάσματος, για να διαπιστωθεί αν η ποσότητα πλάσματος που χρησιμοποιείται επηρεάζει το όποιο αποτέλεσμα.

Τα σωληνάκια με το εκχύλισμα MeOH:CH₃COOH (99:1,v/v) εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL μεθανόλης και με μικροπιπέτα Eppendorf μεταφέρθηκαν από 50 μL σε δύο σωληνάκια για να εφαρμοστεί η μέθοδος DPPH.

Άλλα 100 μL μεταφέρθηκαν σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες για να γίνει η μέθοδος Folin – Ciocalteau.

Επίσης 300 μL από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε vials για να επεξεργαστούν με GC ενώ από 200 μL μεταφέρθηκαν σε δύο άλλα vials για να επεξεργαστούν με HPLC.

Δείγμα	0.722	0.713	0.742	0.752	0.762	-
ΣΤ (2mL)						
μετά την						
κατανάλωση						
ελιών						

Β.9.1. Αποτελέσματα DPPH

	Χρόνος (min)					
	0	10	20	30	40	50
Abs δείγματος ΣΤ (1mL) <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	0.744	0.737	0.736	0.745	-	-
Abs δείγματος ΣΤ (1mL) <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών	0.735	0.727	0.727	-	-	-
Abs δείγματος ΣΤ (2mL) <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	0.735	0.730	0.737	0.738	-	-
Abs δείγματος ΣΤ (2mL) <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών	0.722	0.716	0.742	0.752	0.762	-

B.9.10. Αποτελέσματα Folin - Ciocalteu

Δείγμα	Abs
ΣΤ (1mL) <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	0.049
ΣΤ (1mL) <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών	0.050
ΣΤ (2mL) <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	0.052
ΣΤ (2mL) <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών	0.053

Σχόλια:

Όπως και στα προηγούμενα δείγματα (B,Γ,Δ,Ε) δεν σημειώθηκε κάποιο αποτέλεσμα ούτε με τη μέθοδο DPPH ούτε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

B.10. Μέθοδος προσδιορισμού πολυφαινολών στο πλάσμα με Αεριοχρωματογραφία Φασματοφωτομετρία Μαζών (GC-MS)

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος μάζας GC 6890 (Hewlett Packard, Wallbronn) συζευγμένος με ανιχνευτή μαζών MSD 5972 (Hewlett Packard, Wallbronn), εφοδιασμένος με εισαγωγή split – splitless και αυτόματο δειγματολήπτη. Το φέρον αέριο ήταν Ηεμε ροή 0.6 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 280°C και η γραμμή μεταφοράς του φασματόμετρου μάζας (transfer line MSD) 300°C. Η αναλυτική στήλη ήταν τριχοειδής μήκους 30 m, εσωτερική διάμετρο 250μm και με πάχος φιλμ 0.25μm. Το υλικό πλήρωσης της ήταν 5% φαίνυλο-, 95% μεθυλο- σιλοξάνιο (HP5MS).

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Αρχική θερμοκρασία: 70°C για 5 min

1^η άνοδος της θερμοκρασίας: 15°C/min μέχρι τους 130°C

2^η άνοδος της θερμοκρασίας: 4°C/min μέχρι τους 170°C

Παραμονή στους 170°C για 15 min

3^η άνοδος της θερμοκρασίας: 10°C/min μέχρι τους 300°C

Τελική θερμοκρασία: 300°C για 30 min

Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 77 λεπτά. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος δεν εκλούονταν τίποτα από τη στήλη.

Ο ανιχνευτής MSD λειτούργησε στα 2250 EMV, τιμή υψηλότερη από την τιμή αυτορύθμισης του οργάνου με PFTBA κατά 300 EMV (1950 EMV +300 EMV), για να επιτυγχάνεται η καλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση των πολυφαινολών.

Η έγχυση στη στήλη έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη και ήταν 3μL σε splitless mode (χωρίς σχάση του δείγματος)

Για την ταυτοποίηση των πολυφαινολών τα δείγματα αναλύονται σε "Single Ion Monitoring" (SIM mode). Με αυτή τη μέθοδο ο ανιχνευτής ρυθμίζεται ώστε να παρακολουθεί εκλεκτικά ένα έως τρία χαρακτηριστικά ιόντα για κάθε πολυφαινόλη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης κατά 10 με 50 φορές τουλάχιστον. Τα ιόντα που παρακολουθούνται για κάθε πολυφαινόλη έχουν επιλεγεί με κριτήριο την επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας έστω κι αν αυτό γίνεται σε βάρος της ευαισθησίας της μεθόδου. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα «παράθυρα» χρόνων κατακράτησης (Retention Time, RT) για κάθε ομάδα πολυφαινολών και τα αντίστοιχα ιόντα που παρακολουθούνται για κάθε πολυφαινόλη.

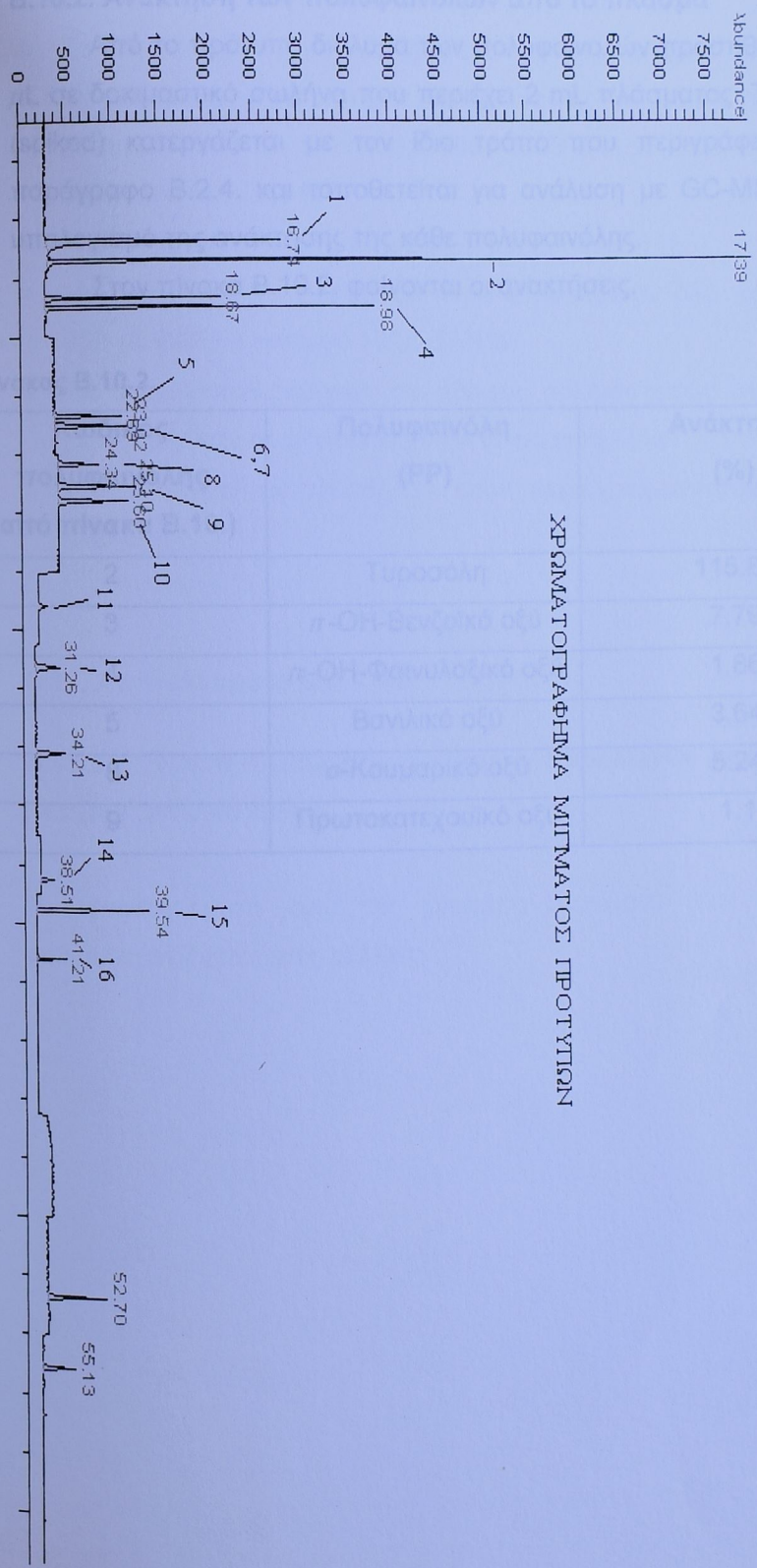
Πίνακας Β.10

A/A	«Παράθυρο» χρόνου κατακράτησης (RT) (min)	Πολυφαινόλη (PP)	Ιόντα που παρακολουθούνται
1	6.00 - 18.00	Κινναμικό οξύ	205, 220, 161
2		Τυροσόλη	179, 282, 193
3	18.00 - 20.00	<i>π</i> -ΟΗ-βενζοϊκό οξύ	282, 267, 223
4		<i>π</i> -ΟΗ-φαινυλοξικό οξύ	296, 179, 164
5	20.00 - 24.00	Βανιλλικό οξύ	312, 297, 267
6		Υδροxyτυροσόλη	370, 267, 193
7		Ομοβαννιλικό οξύ	326, 209, 179
8	24.00 - 28.00	<i>ο</i> -κουμαρικό οξύ	308, 293, 219
9		Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	370, 355, 173
10		3,4- δι(ΟΗ)φαινυλοξικό	384, 267, 179
11	28.00 - 30.50	Συρινγγικό οξύ	342, 327, 312, 297
12	30.50 – 33.00	<i>π</i> -κουμαρικό οξύ	308, 293, 219
13	33.00 – 37.00	Γαλλικό οξύ	458, 281, 179
14	37.00 – 39.00	Φερουλικό οξύ	338, 323, 308
15	39.00 – 40.00	Καφεϊκό οξύ	396, 381, 219
16	40.00 – 44.00	Σιναπτικό οξύ	368, 353, 338

B.10.1. Ανάλυση προτύπων πολυφαινολών

Παρασκευάζεται ένα πρότυπο διάλυμα των πολυφαινολών 1-6 και 8-16 (του πίνακα B.10) σε MeOH σε συγκεντρώσεις 0,1-0,5mg/ mL. Ακολούθως 100 μ L από το διάλυμα αυτό εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και μετά από προσθήκη 200 μ L BSTFA και 10 μ L TMCS τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο 70°C για μισή ώρα. Έπειτα χρωματογραφήθηκε στις προαναφερθείσες συνθήκες όπου βρέθηκε ο χρόνος κατακράτησης (RT) της κάθε σιλανοποιημένης πολυφαινόλης. Το χρωματογράφημα αυτό φαίνεται στην επόμενη σελίδα.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΜΗΤΑΓΟΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ



B.10.2. Ανάκτηση των πολυφαινολών από το πλάσμα

Από το πρότυπο διάλυμα των πολυφαινολών προστίθενται 100 μL σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 2 mL πλάσματος. Το δείγμα (spiked) κατεργάζεται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο B.2.4. και τοποθετείται για ανάλυση με GC-MS για τον υπολογισμό της ανάκτησης της κάθε πολυφαινόλης.

Στον πίνακα B.10.2. φαίνονται οι ανακτήσεις.

Πίνακας B.10.2.

Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	Ανάκτηση (%)
2	Τυροσόλη	115.81
3	<i>π</i> -OH-Βενζοϊκό οξύ	7.79
4	<i>π</i> -OH-Φαινυλοξικό οξύ	1.86
5	Βανιλικό οξύ	3.64
8	<i>ο</i> -Κουμαρικό οξύ	5.24
9	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	1.1

B.10.3. Ανάλυση δειγμάτων πλάσματος με GC – MS

- Τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με οξικό αιθυλεστέρα αλλά και τα δείγματα που έτυχαν επεξεργασία με τη μέθοδο SPE μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχα vials (300 μ L σε κάθε vial) για να αναλυθούν με GC- MS.
- Τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2
- Με μικτροπιπέτα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε όλα τα vials από 200 μ L BSTFA και από 10 μ L TMCS
- Τα vials τοποθετήθηκαν σε άδειους δοκιμαστικούς σωλήνες και μεταφέρθηκαν σε υδρόλουτρο 70°C για μισή ώρα
- Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον αεριοχρωματογράφο για να αναλυση

B.11. Αποτελέσματα GC – MS

B.11.1. Δείγματα πλάσματος που έχουν παραληφθεί με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα

Τα αποτελέσματα από τα χρωματογραφήματα των εθελοντών φαίνονται στις επόμενες σελίδες.

Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	RT (min)	Εμβαδόν κορυφής <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Εμβαδόν κορυφής <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
Εθελοντής Β				
2	Τυροσόλη	17.39	-	-
3	<i>π</i> -ΟΗ-Βενζοϊκό οξύ	18.67	-	-
4	<i>π</i> -ΟΗ- Φαινυλοξικό οξύ	18.98	-	-
17	οx-Τυροσόλη	22.57	18006	308651
5	Βανιλικό οξύ	22.69	12273	172605
6	Υδροξυτυροσόλη	22.82	0	7878
14	Φερουλικό οξύ	38.51	2017	26234

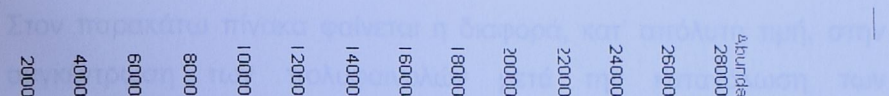
Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	RT (min)	Εμβαδόν κορυφής <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Εμβαδόν κορυφής <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
Εθελοντής Γ				
2	Τυροσόλη	17.39	0	1360
3	<i>π</i> -ΟΗ-Βενζοϊκό οξύ	18.67	3523	7027
4	<i>π</i> -ΟΗ- Φαινυλοξικό οξύ	18.98	-	-
17	οx-Τυροσόλη	22.57	17708	42638
5	Βανιλικό οξύ	22.69	11242	28007
6	Υδροξυτυροσόλη	22.82	-	-
14	Φερουλικό οξύ	38.51	890	1136

Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	RT (min)	Εμβαδόν κορυφής <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Εμβαδόν κορυφής <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
Εθελοντής Δ				
2	Τυροσόλη	17.39	89507	108047
3	π-OH-Βενζοϊκό οξύ	18.67	-	-
4	π-OH- Φαινυλοξικό οξύ	18.98	287973	325165
17	οx-Τυροσόλη	22.57	-	-
5	Βανιλικό οξύ	22.69	-	-
6	Υδροξυτυροσόλη	22.82	-	-
14	Φερουλικό οξύ	38.51	-	-

Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	RT (min)	Εμβαδόν κορυφής <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Εμβαδόν κορυφής <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
Εθελοντής Ε				
2	Τυροσόλη	17.39	-	-
3	π-OH-Βενζοϊκό οξύ	18.67	0	6019
4	π-OH- Φαινυλοξικό οξύ	18.98	333334	9503
17	οx-Τυροσόλη	22.57	0	97126
5	Βανιλικό οξύ	22.69	0	56918
6	Υδροξυτυροσόλη	22.82	-	-
14	Φερουλικό οξύ	38.51	0	7838

Κωδικός πολυφαινόλης (από πίνακα B.10.)	Πολυφαινόλη (PP)	RT (min)	Εμβαδόν κορυφής <u>πριν</u> την κατανάλωση ελιών	Εμβαδόν κορυφής <u>μετά</u> την κατανάλωση ελιών
<u>Εθελοντής ΣΤ</u>				
2	Τυροσόλη	17.39	0	15610
3	π-OH-Βενζοϊκό οξύ	18.67	5345	7174
4	π-OH- Φαινυλοξικό οξύ	18.98	0	5611
17	οx-Τυροσόλη	22.57	0	276620
5	Βανιλικό οξύ	22.69	0	140739
6	Υδροξυτυροσόλη	22.82	0	21222
14	Φερουλικό οξύ	38.51	0	6213

Ενδεικτικά παρατίθενται στην επόμενη σελίδα τα χρωματογραφήματα του εθελοντή ΣΤ, πριν και μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων.



Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η διαφορά, κατ' απόλυτη τιμή, στην συγκέντρωση των πολυφαινολών μετά την κατανάλωση των ελαιοκάρπων.

Πολυφαινόλη (PP)	Απόλυτη τιμή της αύξησης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών μετά την κατανάλωση των ελαιοκάρπων (ppm PP _{μετά} - ppm PP _{πριν})				
	Β	Γ	Δ	Ε	ΣΤ
Τυροσόλη	-	0,01	0,16	0	0,3
π-OH- Βενζοϊκό οξύ	-	1,3	-	2,3	0,7
π-OH- Φαινυλοξικό οξύ	-	-	70	-	10,6
Βανιλικό οξύ	7	30,5	-	9,6	25
οx-Τυροσόλη	2,5	-	-	0,8	0,8
OH-Τυροσόλη	3,9	-	-	-	-
Φερουλικό οξύ	<0.01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

	Β	Γ	Δ	Ε	ΣΤ
Συγκέντρωση ολικών PP στο πλάσμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων (ppm)	13,49	32,01	0,16	12,7	36,6
Συγκέντρωση ολικών PP στο αίμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων (mg/5L αίμα)	67,45	160,05	0,8	63,5	183

B.11.2. Δείγματα πλάσματος που έχουν παραληφθεί με εκχύλιση φάσης (SPE)

Σχόλιο

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων σημειώθηκε αύξηση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών του πλάσματος. Η ποσότητα ελαιοκάρπων που οι εθελοντές κατανάλωσαν αντιστοιχούσε σε περίπου 250 mg ολικών πολυφαινολών. Η ποσότητα των πολυφαινολών που ανιχνεύτηκε στο πλάσμα ήταν μικρότερη από τη προσληφθείσα δόση ολικών πολυφαινολών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μεταβολική τύχη των πολυφαινολών δεν αντανakλάται στην απλή παρουσία τους στο πλάσμα.

B.12. Χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης (HPLC)

• Διαλύματα για την HPLC ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα πλάσματος που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο SPE και έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη. Ο όγκος δείγματος που αναλύεται κάθε φορά ήταν 100μL.

• Μέθοδος Ανάλυσης HPLC

-Μέθοδος Ανάλυσης HPLC: Χρωματογραφία HPLC αναστρέφου φάσεως με βοθριδωτή έκλυση.

-Στήλη: αναλυτική στήλη C18 nucleosell 120 (5 μm) (120 × 4mm)

-Ανιχνευτής: UV-Vis (280, 214, 295, 254 nm), Fluorescence (λ_{ex}=295 nm, λ_{em}=330 nm).

-Ροή διαλυτών: 1 mL/min

-Πρόγραμμα Βοθριδωτής Έκλυσης (N.K. Anikaroulis et al, 1991):

B.11.2. Δείγματα πλάσματος που έχουν παραληφθεί με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)

Τα χρωματογραφήματα όλων των εθελοντών δεν έδειξαν εμφάνιση κάποιας πολυφαινόλης ή κάποια αύξηση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση των ελιών.

Εξαίρεση ήταν τα χρωματογραφήματα του εθελοντή ΣΤ όπου εμφανίστηκε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη μετά την κατανάλωση ελιών. Τα χρωματογραφήματα ήταν καλύτερα στο δείγμα που περιείχε 2 mL πλάσματος. Εξάλλου οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν ήταν 85% για την τυροσόλη και <2% για το καφεϊκό οξύ μετά την εφαρμογή της μεθόδου SPE.

B.12. Χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης (HPLC)

- **Διαλύματα για την HPLC ανάλυση**

Χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα πλάσματος που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο SPE και έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη. Ο όγκος δείγματος που αναλύοταν κάθε φορά ήταν 100μL.

- **Μέθοδος Ανάλυσης HPLC**

-Μέθοδος Ανάλυσης HPLC: Χρωματογραφία HPLC αναστρόφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλουση.

-Στήλη: αναλυτική στήλη C18 Nucleosil 120 (5 μm) (120 × 4mm)

-Ανιχνευτής: UV-Vis (280, 214, 295, 254 nm), Fluorescence (λ_{ex} =295 nm, λ_{em} =330 nm).

-Ροή διαλυτών: 1 mL/min

-Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλουσης (N.K. Andrikopoulos *et al*, 1991):

Χρόνος (min)	%A	%B	%C	%D
0	70,0	17,5	12,5	0
35	0	58,3	41,7	0
45	0	58,3	41,7	0
51	0	23,4	16,6	60,0
56	0	23,4	16,6	60,0
60	0	58,3	41,7	0
65	70,0	17,5	12,5	0
70	70,0	17,5	12,5	0

A = Υδατικό δ/μα ορθοφωσφορικού οξέος (pH=3), B = CH₃CN,
C = CH₃OH, D = CH₃CH(OH)CH₃

Σχόλιο

Τα χρωματογραφήματα που πήραμε δεν έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών πριν και μετά την κατανάλωση των ελαιοκάρπων εκτός από το δείγμα πλάσματος του εθελοντή «ΣΤ».

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολικών συστατικών στον άνθρωπο αποτελεί ανοιχτό πεδίο που συγκεντρώνει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η πλειοψηφία των ερευνητικών μελετών που διαπραγματεύονται το συγκεκριμένο θέμα, αναφέρονται σε μοντέλα ζώων. Η παρούσα πτυχιακή μελέτη αποτελεί μια άρτια προσπάθεια ανεύρεσης μιας αξιόπιστης πιλοτικής μεθόδου προσδιορισμού των πολυφαινολών στο αίμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων, μελετώντας μια σειρά συνιστωσών που ορίζουν το πολύπλευρο θέμα της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών ενώσεων.

Στη μελέτη μας προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε τον ακριβή χρόνο στον οποίο σημειώνεται η μέγιστη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο αίμα (peak) με επεξεργασία δειγμάτων πλάσματος δύο εθελοντών που είχαν καταναλώσει ελιές. Τα δείγματα αντιστοιχούσαν σε χρονικά διαστήματα μισής έως 2,5 ωρών μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων και σημείο αναφοράς ήταν ο χρόνος μηδέν όπου η παραλαβή αίματος έγινε πριν την κατανάλωση.

Επιπλέον, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε ποιοτικά και ποσοτικά τις πολυφαινόλες του αίματος μετά από κατανάλωση ελαιοκάρπων από έξι εθελοντές και να συγκρίνουμε τα επίπεδα τους με τα αντίστοιχα πριν την κατανάλωση.

Κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους ανέκυψαν αστάθμητοι παράγοντες, όπως άλλωστε αναμενόταν για μια πιλοτική μελέτη. Η δυσκολία επιλογής της κατάλληλης μεθοδολογίας αποτέλεσε τον κυριότερο ανασταλτικό παράγοντα. Η εύρεση εθελοντών για τη συμμετοχή στη μελέτη, η επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, καθώς και ο προσδιορισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων, ήταν μερικοί άλλοι παράγοντες.

Όσον αφορά στη διερεύνηση της σχέσης χρονοεξάρτησης μετά από κατανάλωση ελαιοκάρπων, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, όπου παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων, με τη μέγιστη συγκέντρωση (peak) να σημειώνεται μεταξύ 60 και 120 λεπτών από την κατανάλωση. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις ολικών πολυφαινολών που υπολογίστηκαν πιθανότατα οφείλονται στην παρουσία ασκορβικού οξέος στα

δείγματα πλάσματος, το οποίο ανιχνεύεται από το αντιδραστήριο Folin λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης.

Για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών που βρίσκονται στο πλάσμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων, ζητήθηκε από έξι υγιείς ενήλικες εθελοντές να καταναλώσουν συγκεκριμένη ποσότητα ελιών «Καλαμών», αφού είχαν ακολουθήσει δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών το προηγούμενο 24ωρο. Έγινε αιμοληψία πριν την κατανάλωση και 75-80 λεπτά μετά την κατανάλωση των ελιών. Η επιλογή της χρονικής στιγμής παραλαβής αίματος μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων αποφασίστηκε βασιζόμενη στα προηγούμενα αποτελέσματα αλλά και από βιβλιογραφικά δεδομένα μελετών βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του ελαιολάδου. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν για παραλαβή του πλάσματος, έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών με ακετόνη και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα από την από την εφαρμογή της μεθόδου Folin – Ciocalteu δεν έδειξαν κάποια αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων ενώ οι τιμές των απορρόφησης ήταν τόσο μικρές οπότε κρίθηκε άσκοπος ο ποσοτικός προσδιορισμός τους αφού οι συγκεντρώσεις θα ήταν αμεληταίες.

Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών του πλάσματος έγινε με επιτυχία με τη μέθοδο αεριοχρωματογραφίας φασματοφωτομετρίας μαζών (GC-MS). Ανιχνεύτηκαν οι εξής πολυφαινόλες: τυροσόλη, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, οξειδωμένη τυροσόλη, βανιλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη και φερουλικό οξύ. Ο ποσοτικός υπολογισμός έγινε με αναγωγή του εμβαδού της κορυφής κάθε πολυφαινόλης στα δείγματα πλάσματος πριν και μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων προς το εμβαδόν της κορυφής της αντίστοιχης πολυφαινόλης από το πρότυπο διάλυμα, στο οποίο είχε προηγουμένως υπολογιστεί η συγκέντρωση της κάθε πολυφαινόλης. Οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα ήταν υψηλότερες μετά την κατανάλωση σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση τους στο πλάσμα πριν από την κατανάλωση ελαιοκάρπων. Έπειτα, υπολογίστηκε η ποσότητα των πολυφαινολών που αντιστοιχούσε στην αύξηση που σημειώθηκε μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων. Οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα δείγματα πιθανότατα οφείλονται σε αστάθμητους παράγοντες μεταξύ των οποίων και η μη τήρηση δίαιτας

ελεύθερης πολυφαινολών τη μέρα που προηγήθηκε της αιμοληψίας. Πιο αξιόπιστα κρίνονται τα αποτελέσματα του δείγματος πλάσματος του εθελοντή «ΣΤ», στον οποίο οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα πλάσματος που παραλήφθηκε πριν την κατανάλωση ελαιοκάρπων ήταν μηδενικές. Έτσι εξάγεται με περισσότερη βεβαιότητα το συμπέρασμα ότι η αύξηση που σημειώθηκε μετά την κατανάλωση, οφείλεται στις πολυφαινόλες που περιέχονται στις ελιές.

Πρέπει να σημειώσουμε ότι μετά από προσθήκη προτύπου διαλύματος πολυφαινολών στο πλάσμα, οι ανακτήσεις των πολυφαινολών που είχαν προηγουμένως ανιχνευτεί στο πλάσμα ήταν πολύ μικρές (<10%), με εξαίρεση την τυροσόλη της οποίας η ανάκτηση υπολογίστηκε στο ~100%. Οι μικρές ανακτήσεις και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου Folin – Ciocalteu στα δείγματα πλάσματος, υποδεικνύουν ότι ο οξικός αιθυλεστέρας έχει μικρή ικανότητα παραλαβής των πολυφαινολών του πλάσματος.

Έγινε επίσης εκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE) στα δείγματα πλάσματος για διαπίστωση της καταλληλότητας της μεθόδου ως προς τον προσδιορισμό των πολυφαινολών της ελιάς στο πλάσμα. Όπως και με την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις πολυφαινολών πριν και μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Προσπάθεια έγινε ακόμη και για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, με τη μέθοδο DPPH, σε όλα τα δείγματα πλάσματος. Δεν σημειώθηκε επίσης κάποια διαφορά. Εξαίρεση ήταν το δείγμα πλάσματος του εθελοντή «Α» στο οποίο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων. Το γεγονός αυτό δεν κρίνεται σημαντικό, αν λάβουμε υπόψη τα αποτελέσματα των υπόλοιπων δειγμάτων στα οποία δεν σημειώθηκε αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος. Τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων, εκτός από το δείγμα του εθελοντή «Α», ήταν αναμενόμενα αφού ούτε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu έγινε προσδιορισμός των πολυφαινολών πριν και μετά την κατανάλωση ελιών. Τα αποτελέσματα από την αεριοχρωματογραφία φασματοφωτομετρία μαζών στα δείγματα που παραλήφθηκαν με SPE δεν αξιολογήθηκαν καθώς δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός πολυφαινολών πριν και μετά την κατανάλωση. Τα ίδια αποτελέσματα είχαμε και μετά την

ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Εξαίρεση ήταν το δείγμα του εθελοντή «ΣΤ» στο οποίο ανιχνεύτηκε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων.

Η εκχύλιση στερεής φάσης κρίνεται αναποτελεσματική ως μέθοδος προσδιορισμού των πολυφαινολών της ελιάς στο πλάσμα αφού μετά από δύο επαναλήψεις της διατροφικής δοκιμής στον εθελοντή «ΣΤ», με δοκιμασία δύο διαφορετικών ποσοτήτων πλάσματος κατά την εκχύλιση, δε σημειώθηκε καμιά σημαντική αλλαγή. Εξάλλου οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν μετά την εφαρμογή της μεθόδου SPE ήταν 85% για την τυροσόλη ενώ <2% για το καφεϊκό οξύ. Ενδείξεις για την αναποτελεσματικότητα της μεθόδου SPE αποτελούν και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των μεθόδων Folin – Ciocalteau και DPPH σε όλα τα δείγματα.

Ευελπιστούμε η μελέτη αυτή να αποτελέσει έναυσμα για την εκπόνηση περαιτέρω μελετών για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στο πλάσμα, αφού με κατάλληλες τροποποιήσεις ενδέχεται να έχουμε ακόμη πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Από διατροφικής πλευράς, είναι ενδιαφέρον να γνωρίζουμε, όχι μόνο την ποσότητα των καταναλισκόμενων πολυφαινολών, αλλά και τη συμπεριφορά τους στο πεπτικό σύστημα από την οποία επηρεάζεται τόσο η διατροφική τους αξία όσο και οι συστηματικές επιδράσεις τους.

Η τεκμηρίωση της σχέσης ανάμεσα στην πρόσληψη και τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να σηματοδοτήσει την απαρχή *in vivo* και *ex vivo* μελετών για τις επιδράσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών στην υγεία. Ένα τέτοιο βήμα θα μπορούσε να έχει προεκτάσεις ως προς την κατεύθυνση βελτίωσης της ποιότητας ζωής του σύγχρονου ανθρώπου μέσω μιας ενδεχόμενης χρησιμοποίησης των αντιοξειδωτικών ουσιών για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα πτυχιακή μελέτη είναι τα εξής:

- Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα αυξάνεται μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων.
- Ο χρόνος στον οποίο σημειώνεται η μέγιστη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 60 και 120 λεπτών μετά την κατανάλωση ελαιοκάρπων.
- Η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα είναι καλύτερη μέθοδος προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών στο πλάσμα σε σχέση με την εκχύλιση στερεής φάσης.
- Η δίαιτα ελεύθερη σε πολυφαινόλες πριν από τη διεξαγωγή ενός πειράματος βιοδιαθεσιμότητας αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.
- Υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των πολυφαινολών που ανιχνεύονται στο πλάσμα με Αεριοχρωματογραφία Φασματοφωτομετρία Μαζών.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανδρικόπουλος Ν. Κ. (1999). *Σημειώσεις Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Τόμος II*. Αθήνα. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
- Andrikopoulos N. K., Kaliora A.C., Assimopoulou A. N. and Papageorgiou V.P. (2002). Inhibitory Activity of Minor Polyphenolic and Nonpolyphenolic Constituents of Olive Oil Against In Vitro Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Medical*. 5(1): 1-7
- Arts I. C. W., Hollman P. C. H. and Krowbout D. (1999). Chocolate as a source of flavonoids. *Lancet*. 354: 488
- Bastoni L., Bianco A., Piccioni F. and Uccella N. (2001). Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. *Food Chem*. 73: 145-151
- Βεκιάρη Σ. Α. (2001). Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και η σημασία τους. *Χημικά Χρονικά*. 2: 45-48
- Blekas G., Psomiadou F., Tsimidou M. and Boskou D. (2002_β). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur J. Lipid Sci Technol*. 104: 340-346
- Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C. Tsimidou M. and Boskou D. (2002_α). Biophenols in Table Olives. *J. Agric. Food Chemistry*. 50: 3688-3692
- Bonanome A., Pagnan A., Caruso D., Toia A. Xamin A., Fedeli E., Berra B., Zamburlini A., Urcini F. and Galli G. (2000). Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 10(3): 111-120
- Boskou D. (1996). OLIVE OIL: Chemistry and Technology. USA; AOCS Press. 71-75
- Boskou D. and Visioli F. (2003). Biophenols in olive oil and olives. *Research Signpost*. Kerala, India
- Bub A., Watzi B., Heeb D., Rechkemmer G. and Briviba K. (2001). Malvidin-3-glucoside bioavailability in human after ingestion of red wine, dealcoholised red wine and red grape juice. *Eur J Nutr* 40: 113-120
- Carluccio M. A., Sicuella L., Ancora M. A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distant A. and De Caterina R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic

- properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 23(4): 622-629
- Caruso D., Visioli F., Patelli R., Galli C. and Galli G. (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*. 50(12): 1426-1428
- Chen L., Lee M.J., Li H. and Young C.S. (1997). Absorption, Distribution, and Elimination of Tea Polyphenols in Rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 25(9): 1045-1050
- Cheng Y., Li H. L., Wang H. F., Sun H. F., Liu Y. F., Peng S. X., Liu K. X. and Guo Z. Y. (2003). Inhibition of nicotine-DNA adduct formation in mice by six dietary constituents. *Food Chem Toxicol*. 41(7): 1045-1050
- Γαλάρης Δ. και Δούλιας Π. Θ. (2001). Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. *Χημικά Χρονικά*. 2: 49-50
- Dreosti I. E. (2002). Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa and Wine. *Nutrition*. 16: 692-694
- Di Matteo V. and Esposito E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord*. 2(2): 95-107
- d' Odorico A., Bortolan S., Cardin R., D' Inca R., Martines D. Ferronat A. and Sturniolo G. C. Reduced plasma antioxidant concentrations and increase oxidative DNA damage in inflammatory disease. *Scand J Gastroenterol* 36(12): 1289-1294
- Δουρδουνά Α. (2002). «Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών μετά από κατανάλωση ελαιοκάρπων». *Πτυχιακή Μελέτη*. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής
- Esti M., Cinquanta L. and La Notte E. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *J Agric Food Chem*. 46(1): 32-35
- Ferrara L. A., Raimondi S., d' Episcopico L., Guida L., Dello R. and Marotta T. (2000). Olive Oil and Reduced Need for Antihypertensive Medications. *Arch Intern Med*. 160: 837-842
- Gee J. M. and Johnson I. T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem*. 8(11): 1245-1255

- Girotti S., Ferri E., Maccagnani L., Budini R. and Bianci G. (2002). Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrometric assays. *Talanta*. 407-414
- Goldberg D. M., Yan J. and Soleas G. J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*. 36: 79-87
- Gordon M. H., Paiva – Martins F. and Almeida M. (2001). Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with that of other Olive Oil Polyphenols. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 2480-2485
- Hertog M. G., Hollman P. C., Katan M. B. and Kromhout D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer*. 20(1): 21-29
- Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A., Hilpert K. F., Griel A. E. and Etherton T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. 30: 71-88
- Lambert J. D. and Yang C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 523-524: 201-208
- Leighton F., Cuevas A., Guasch V., Perez D. D., Strobel P., San Martin A., Urzua U., Diez M. S., Foncea R., Castillo O., Mizon C., Espinoza M. A., Urquiaga I., Rozowski J., Maiz A. and Germain A. (1998). Plasma Polyphenols and Antioxidants, Oxidative DNA damage, and Endothelial function, in diet and wine intervention study in Humans. *International Congress on Wine and Health, Florence, Italy*
- Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montetoro G. and Zappia V. (1999). Olive Oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr Biochem*. 10: 159-165
- Mannach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C. and Ramsey C. (2003). Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and naringin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57(2): 235-242
- Marsilio V., Campestre C. and Lanza B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*. 74: 55-60

- Miro-Casas E., Farré-Albadalejo M., Covas M. I., Rodriguez J. O., Colomer M. F., Planells M. I. C., Lamuella-Raventós R. M. and de la Torre R. (2001_a). Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine after Olive Oil Intake. *Analytical Biochemistry*. 294(1): 63-72
- Miro-Casas E., Farré-Albadalejo M., Planells M. I. C., Colomer M. F., Lamuella-Raventós R. M. and de la Torre R. (2001_b). Tyrosol Bioavailability in Humans after Ingestion of Virgin Olive Oil. *Clinical Chemistry*. 47(2): 341-343
- Miro-Casas E., Covas M. I., Fitó M., Farré-Albadalejo M., Marrugat J. and de la Torre R. (2003). Tyrosol and Hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J of Clinical Nutrition*. 57: 186-190
- Montetoro G., Servili M., Baldiodi M. and Miniati E. (1992). Simple and Hydrolyzable Phenolic compounds in Virgin olive Oil. I. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40:1571-1576
- Mosca L., De Marco C., Visioli F. and Cannella C. (2000). Enzymatic Assay for the Determination of Olive Oil Polyphenol Content: Assay Conditions and Validation of the Method. *J Agric Food Chem*. 48: 297-301
- Μπόσκου Δ. (1997). *Χημεία Τροφίμων*. 4^η Έκδοση. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Γαρταγάνη. 157-158, 240, 298-299
- Mulder T. P. I., van Platerink C. J., Wijnand-Schuyt P. J. and van Amelsvoort J. M. M. (2001). Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 760: 271-279
- Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Spiegelhalder and Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal Of Cancer*. 36: 1235-1347
- Patumi M., d'Andria R., Marsilio V., Fontanazza G., Morelli G. and Lanza B. (2002). Olive and Olive oil quantity after intensive monoculture olive growing (*Olea europaea* L. cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*. 77: 27-34
- Pellegrin N., Visioli F., Buratti S. and Brighenti F. (2001). Direct analysis of

- total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J Agric Food Chem.* 49(5): 2532-2538
- Rechner A. R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., Moore K. P. and Rice-Evans C. (2002). The Metabolic Fate of Dietary Polyphenols in Humans. *Free Radical Biology & Medicine.* 33: 220-235
- Rechner A. R., Kuhnle G., Hu H., Roedig-Penman A., van den Braak M. Moore K. P. and Rice-Evans C. (2002). The Metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radic Res.* 36(11): 1129-1241
- Rice-Evans C. and Miller J. N. (1995). Antioxidants-the Case for Fruits and Vegetables in the Diet. *British Food Journal.* 97(9): 35-40
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K. and Lavee S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticultae.* 92: 147-176
- Ryan D., Robards K., Prenzler P., Jardin D., Herlt T. and Antolovich M. (1999). Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J. Chromatogr. A.* 885(2): 529-537
- Scalbert A., Morand C., Manach C. and Rémésy C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 56: 276-282
- Scalbert A. and Williamson G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 130: 2073-2085
- Somova L.I., Shode F. O., Ramnanan P. and Nadar A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J Ethnopharmacol.* 84 (2-3): 299-305
- Spencer J. P. E., Schroeder H., Rechner A. R. and Rice-Evans C. (2001). Bioavailability of Flavan-3-ols and Procyanidins: Gastrointestinal Tract Influences and their Relevance to Bioactive Forms In Vivo. *Antioxidants and Redox Signaling.* 3(6): 1023-1039
- Tombola F., Campello S., De Luca L., Ruggiero P., Del Giudice G., Papini E. and Zoratti M. (2003). Plant polyphenols inhibit VacA, A toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters.* 543: 184-189

- Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Hollman P., Chamalides Ch., Foufa E., Kaloudis Tr., Kromhout D., Miskaki Ph., Petrochilou I., Poulima E., Stafilakis K. and Theophilou D. (2000). Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 70: 319-323
- Tsarbopoulos A., Gikas E., Papadopoulos N., Aligiannis N. and Kafatos A. (2003). Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 785: 157-164
- Tuck K. L., Freeman M. P., Hayball P. J., Stretch G. L. and Stupans I. (2001). The In Vivo Fate of Hydroxytyrosol and Tyrosol, Antioxidant Phenolic Constituents of Olive Oil, after Intravenous and Oral Dosing of Labeled Compounds to Rats. *Journal of Nutrition*. 131: 1993-1996
- van het Hof K. H., Wiseman S. A., Yang C. S. and Tijburg L. B. M. (1999). Plasma and Lipoprotein Levels of Tea Catechins Following Repeated tea Consumption. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 220(4): 203-209
- Vinson J. A. (1999). Flavonoids in Foods As *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Advances in Experimental Medical and Biology*. 472: 115-130
- Visioli F., Bellomo G. and Galli C. (1998_a). Free Radical Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and biophysical Research Communications*. 274: 60-64
- Visioli F., Bellosta S. and Galli C. (1998_b). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science*. 62(6): 541-546
- Visioli F., Caruso D., Plasmati E., Patelli R., Mulinacci N., Romani A., Galli G. and Galli C. (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res*. 34(3): 301-305
- Visioli F., Caruso D., Galli C., Viappiani S., Galli G. and Sala a. (2000_a). Olive oils rich in catecholic phenols decrease isoprostane excretion in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 278: 797-799
- Visioli F. and Galli C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev*. 56: 142-147

- Visioli F. and Galli C. (2000). Olive oil: more than just oleic acid. *Am J Clin Nutr.* 72: 853
- Visioli F. and Galli C. (2001). Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep.* 3: 64-67
- Visioli F. and Galli C., Bornet F., Mattei A., Patelli R., Galli G. and Caruso D. (2000_β). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS.* 468: 159-160
- Visioli F. and Galli C., Plasmatic E., Viappiani S., Hernandez A., Colombo C. and Sala A. (2000_γ). *Circulation.* 102: 2169-2171
- Vissers M. V., Zock P.L., Leenen R., Roodenburg A. J., van Putte K. P. and Katan M. B. (2001). Effect on consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res.* 35(5): 619-629
- Vissers M. V., Zock P.L., Roodenburg A. J., Leenen R. and Katan M. B. (2002)). Olive Oil Phenolics Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 132: 409-417
- Waterhouse A. L., Shirley J. R. and Donovan J. L. (1996). Antioxidants in chocolate. *Lancet.* 348: 834
- Watson D. G. and Oliveira E. J. (1999). Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of Grinkgo biloba tablets. *Journal of Chromatography.* 723: 203-210
- Yang C. S., Chen L., Lee M. J., Balentine D., Kuo M. C. and Schantz S. P. (1998). Blood and Urine Levels of Tea Catechins after Ingestion of Different Amounts of Green Tea by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 7: 351-354

ΒΙΟΒΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΑΣ

ΠΤΥ 12 Α

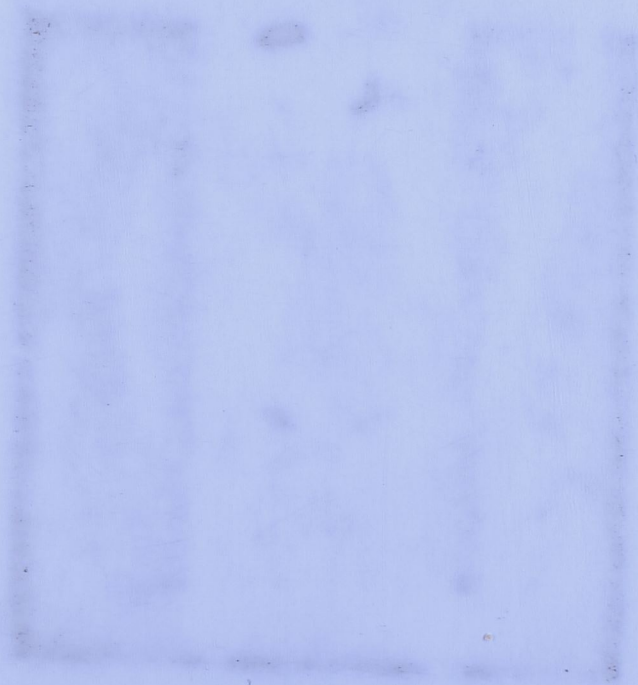
ΙΩΑΝΝΟΥ ΣΛ.

11309

9938

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



* 1 1 3 0 9 *