ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της Μπαλαμώτη Χριστίνας

"Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών ουσιών μετά από κατανάλωση αφεψημάτων βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου"

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Μπόσκου Γεώργιος

Χίου Αντωνία

Αθήνα, Ιούνιος 2002

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της Μπαλαμώτη Χριστίνας

"Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών ουσιών μετά από κατανάλωση αφεψημάτων βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου"

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:

Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Μπόσκου Γεώργιος

Χίου Αντωνία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....1
"Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας.....1
Αθήνα, Ιούνιος 2002.....1
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....2
"Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας.....2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....1
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....4
ABSTRACT.....5
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 6
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο.....7
Α.1. Χημεία φυσικών αντιοξειδωτικών.....7
Α.1.1. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών.....7
Α.1.2. Αντιοξειδωτικά.....8
Α. 1.2.1. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών.....9
Α.1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών 9
Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά.....9
Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά.....10
Ενώσεις με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση.....11
Άλλοι παρεμποδιστές οξείδωσης λιπιδίων.....11
Α.1.3. Αντιοξειδωτικά στο τσάι.....12
Φλαβανόλες.....12
Θεαφλαβίνες και Θεαρουμπιγίνες.....15
.....17
Σχήμα 5. Δομή αλκαλοειδών.....17
Α.1.3.1. Επίδραση της προετοιμασίας του τσαγιού στην αντιοξειδωτική ικανότητα....17
Α.1.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών του τσαγιού στις διάφορες ελεύθερες ρίζες. 18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο.....20
Α.2. Πηγές πολυφαινολών.....20
Α.2.1. Αφεψήματα.....20
Α.2.1.1. Τσάι.....20
.....21

Α.2.1.2. Σοκολάτα.....22
Α.2.1.3. Καφές.....23
Α.2.1.4. Άλλα αφεψήματα.....23
Α.2.2. Φρούτα και λαχανικά.....25
Καροτενοειδή.....27
Α.2.3. Ελαιόλαδο.....28
Α.2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο 29
Α.2.4. Αλκοολούχα.....29
Α.2.4.1. Κρασί.....29
Α.2.4.2. Μπύρα.....30
Α.2.5. Όσπρια.....31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο.....32
Α.3. Αντιοξειδωτικά και Υγεία.....32
Α.3.1. Αντιοξειδωτικά και καρκίνος.....32
Α.3.1.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης.....33
Α.3.1.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού.....33
Α.3.1.3. Καρκίνος δέρματος.....34
Α.3.1.4. Καρκίνος πνευμόνων.....34
Α.3.1.5. Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος και άλλες μορφές καρκίνου.....35
Προώθηση.....36
Έναρξη.....36
Α.3.2. Αντιοξειδωτικά και καρδιαγγειακά νοσήματα.....37
Α.3.2.1. Υπέρταση.....38
Α.3.3. Προστατευτικές επιδράσεις του τσαγιού σε άλλες ασθένειες.....38
Α.3.3.1 Νεφρικές παθήσεις.....38
Α.3.3.2. Διαβήτης.....39
Α.3.3.3. Προστασία δέρματος και οφθαλμών 39
Α.3.3.4. Αντιισταμινικές και αντιαρθριτικές επιδράσεις του τσαγιού.....39
Α.3.3.5. Αντιβακτηριδιακές επιδράσεις του τσαγιού.....40
Α.3.3.6. Επιδράσεις του τσαγιού σε οδοντικά προβλήματα.....40
Α.3.3.7. Επιδράσεις του τσαγιού κατά των ιών.....40
Α.3.3.8. Μεταβολικές επιδράσεις του τσαγιού.....41
Α.3.3.9. Νευρολογικές και φυσιολογικές επιδράσεις τσαγιού.....41
Α.3.4. Χρήση τσαγιού ως πρόσθετο τροφίμων.....42

Α.3.5. Αντιοξειδωτικά και ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ).....43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο.....44
Α.4. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών.....44
Α.4.1. Διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών.....44
Α.4.2. Πέψη πολυφαινολών.....44
Α.4.3. Απορρόφηση πολυφαινολών.....45
Απορρόφηση κατεχινών μετά από προσθήκη γάλατος στο τσάι.....47
Απορρόφηση προκυανιδίνης.....47
Α.4.4. Μεταβολισμός.....48
Α.4.5. Απέκκριση.....48
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 50
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....51
Β.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για γαλλικό οξύ, επικατεχίνη και τυροσόλη. 51
Β.1.1. Όργανα / Υλικά 51
Β.1.2. Αντιδραστήρια.....51
Β.1.3. Εκτέλεση.....51
Β.1.4. Ανάλυση προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών με HPLC.....52
Γαλλικό οξύ.....53
Επικατεχίνη.....53
Τυροσόλη.....53
.....57
Β.2. Δημιουργία Εσωτερικού Προτύπου α – ναφθόλης.....58
Β.2.1. Όργανα / Υαλικά.....58
Β.2.2. Αντιδραστήρια.....58
Β.2.3. Εκτέλεση.....58
Β.3. Παρασκευή διαλύματος ασκορβικού οξέος (AsAc) 10 % v/v.....60
Β.3.1. Όργανα / Υλικά.....60
Β.3.2. Αντιδραστήρια.....60
Β.3.3. Εκτέλεση.....60
Β.4. Διατροφική παρέμβαση.....62
Β.4.1. Προετοιμασία τσαγιού.....62
Β.5. Αιμοληψία με την τεχνική του φλεβοκαθετηριασμού.....63
Β.5.1. Υλικά / Σκεύη.....63
Β.5.2. Αντιδραστήρια.....63

Β.5.3. Εκτέλεση αιμοληψίας.....63
Β.5.4. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος 64
Β.5.4.1. Όργανα / Υλικά.....64
Β.5.4.2. Αντιδραστήρια.....64
Β.5.4.3. Εκτέλεση.....64
Β.6. Συλλογή και επεξεργασία ούρων.....66
Β.6.1. Όργανα / Υλικά.....66
Β.6.2. Αντιδραστήρια.....66
Β.6.3. Εκτέλεση.....66
Α] Ογκομέτρηση ούρων.....66
Β.6.4. Τυφλό δείγμα ούρων.....67
Β.7. Πιλοτική δοκιμή μεθόδου.....68
Β.7.1. Πιλοτική αιμοληψία.....68
Β.7.1.1. Υλικά / Σκεύη.....68
Β.7.1.2. Αντιδραστήρια.....68
Β.7.1.3. Εκτέλεση πιλοτικής αιμοληψίας.....68
Β. 7.1.4. Επεξεργασία πιλοτικών δειγμάτων αίματος.....69
Β.7.1.4.1. Όργανα / Υλικά.....69
Β.7.1.4.2. Αντιδραστήρια.....69
Β.7.1.4.3. Εκτέλεση.....70
Β.8. Αποτελέσματα.....74
Ποιοτική ανάλυση.....81
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....87
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....89

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2001 – 2002 από την Μπαλαμώτη Χριστίνα, φοιτήτρια του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων, με θέμα "Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών ουσιών μετά από κατανάλωση αφεψημάτων βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου".

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μία 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 Διαιτολογίας – Διατροφής για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης. Η συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης ήταν διττή, αφού εκτός από την πολύτιμη καθοδήγηση, προσέφερε και την αμέριστη βοήθειά του για την πραγμάτωση της σε κάθε στιγμή που τη χρειάστηκα.

Καταλυτική υπήρξε επίσης η βοήθεια του Δρ. Γεώργιου Μπόσκου, διδάσκοντα ΠΔ 407/80. Τον ευχαριστώ θερμά για την εθελοντική ενεργή συμμετοχή του στις αιμοληψίες που έγιναν για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας μελέτης καθώς επίσης και για την οργάνωση του πειραματικού σκέλους. Ουσιαστικές και εύστοχες ήταν και οι παρεμβάσεις του κατά τη συγγραφή του θεωρητικού τμήματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στη Δρ. Αντωνία Χίου, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 για τις εύστοχες υποδείξεις της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της μελέτης καθώς επίσης και για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την αδερφή μου κ.Ευαγγελία Μπαλαμώτη για την εθελοντική συμμετοχή της στις αιμόληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα για την εθελοντική συμμετοχή της στην πραγμάτωση των αιμοληψιών και για τις κατατοπιστικές πληροφορίες όσον αφορά στα διάφορα σκευάσματα και σκεύη του Χημικού Εργαστηρίου.

Μπαλαμώτη Χριστίνα

Τελειόφοιτη Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

Αθήνα, Ιούνιος 2002

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον των τελευταίων ετών για μια κατηγορία ουσιών με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, τις πολυφαινόλες, έχει επιφέρει μια σειρά ανακαλύψεων σχετικά με το ρόλο αυτών των ουσιών στην υγεία του ανθρώπου. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί της βιολογικής δράσης των πολυφαινολών παραμένων 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 αντίστοιχης τυποποιημένης μεθόδου.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να συμβάλλει πιλοτικά στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας προσδιορισμού των πολυφαινολών στο αίμα και στα ούρα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών, θα μπορούσε, με ενδεχόμενες βελτιώσεις, να επιτελέσει σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση άλλων ερευνητικών και επιδημιολογικών μελετών, για τη διερεύνηση της ακριβούς αντιοξειδωτικής και βιολογικής δράσης των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην υγεία του ανθρώπου έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και η κατανάλωσή τους, κυρίως ως συμπληρώματα διατροφής, έχει παρουσιάσει σημαντική αύξηση. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη αναφέρεται η χημεία των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι μηχανισμοί δράσης καθώς επίσης και οι πηγές τους. Ακόμη, αναφέρονται επιδημιολογικά και πειραματικά στοιχεία τα οποία οδηγούν στην άποψη της προστατευτικής δράσεως τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες στον καρκίνο, στα καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και σε πληθώρα άλλων παθήσεων. Συνοπτικά παρατίθενται παθοφυσιολογικά στοιχεία αναφορικά με τη δημιουργία και εξέλιξη των παθήσεων αυτών. Ακόμη περιγράφονται – στο βαθμό που είναι αυτό εφικτό με τις ως τώρα επιστημονικές γνώσεις – η πέψη, απορρόφηση, ο μεταβολισμός στο σώμα και η απέκκριση των πολυφαινολών του τσαγιού. Η συγγραφή του θεωρητικού μέρους βασίστηκε σε μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφεται αναλυτικά όλη η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του τσαγιού και σχολιάζονται κριτικά τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, έγινε εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης (στο αίμα και στα ούρα) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteau. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των πολυφαινολών έγινε με HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) με ανιχνευτή UV (DAD)/FLD και με Τριχοειδή Αέρια Χρωματογραφία (CGC) με ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας MSD (TIC).

Έγινε αιμοληψία και συλλογή ούρων 24ώρου σε ενήλικες εθελοντές, οι οποίοι κατανάλωσαν συγκεκριμένη ποσότητα τσαγιού. Έγινε ανάκληση 24ώρου στους εθελοντές και έλεγχος της διατροφικής πρόσληψης σε ενδιάμεσα διαστήματα βάσει ερωτηματολογίων. Από τα δείγματα αίματος έγινε παραλαβή του πλάσματος, καταβύθιση των πρωτεϊνών, εκχύλιση με διαλύτη μέτριας πολικότητας και παραγωγοποίηση του εκχυλίσματος πριν από την ανάλυσή του.

ABSTRACT

The interest for the effects of antioxidants in human health has been dramatically increased within the last few years. In the same time, their consumption tents to be incremental. In the current thesis, the chemistry of antioxidants as well as their mechanisms of action and their sources are being discussed. Moreover, there are quoted epidemiological and experimental data, which confirm the protective effect of rich in antioxidants foods against cancer, coronary heart disease and other pathologies. Pathophysiological data concerning the onset and progression of these pathologies are briefly cited. Furthermore, there are described – in the degree that current scientific knowledge permits it – the digestion, absorption, metabolism and excretion of phenolic components of tea. The writing of the theoretical part resulted from a scrutinus literature review.

At the experimental part there is an analytical description of the whole experimental procedure that was enforced for the determination of the bioavailability of tea polyphenols and the results are being critically annotated. More specifically, polyphenol analysis, quantitative and qualitative, was carried out with HPLC (High Performance Liquid Chromatography) using UV (DAD)/FLD detector and with Capillary Gas Chromatography (CGC) using mass spectroscopy MSD (TIC) detector.

Blood and 24-hour urine samples were collected from adult volunteers, after they had consumed a certain quantity of tea. The dietary intake of the volunteers and food use at intervals in-between were assessed by 24-hour recall using questionnaires. From the blood samples was obtained the plasma, after precipitation of proteins, extraction using solvent of average polarity and derivitization of the extract prior to analysis.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

Α.1. Χημεία φυσικών αντιοξειδωτικών

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων(Krause, 2000).

Σύμφωνα με την υπόθεση των ελευθέρων ριζών, οι σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της αδυναμίας του οργανισμού να ανταπεξέλθει στο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της ζωής. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών σε βάρος των δεύτερων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται οξειδωτικές βλάβες σε μόρια όπως το DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες. Επίσης, επί μακράν προσβολή ενός οργάνου από ελεύθερες ρίζες, το οποίο είναι ήδη ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες, παρατηρούνται οργανικές δυσλειτουργίες. Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να αυξηθούν από εξωμεταβολικές (π.χ. μόλυνση, ακτινοβολία, τοξίνες κ.τ.λ.) ή ενδομεταβολικές πηγές. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι αυτές που οδηγούν στη δημιουργία (O_2^-) από μεταφορά ηλεκτρονίων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Για τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό αποκτείται μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά τις αντιδράσεις αυτές παράγονται (HO_2) (υδροπεροξυλική ρίζα), (H_2O_2) (υπεροξείδιο του υδρογόνου) και (OH^*) (ρίζα υδροξυλίου) που είναι το πιο δραστικό προ-οξειδωτικό. Άλλες κυτταρικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι το ηπατικό μικρόσωμα και οι πυρηνικές μεμβράνες οι οποίες περιέχουν συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων που μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες (Prior and Cao, 1999).

Α.1.1. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών

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

Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες, είναι ασταθείς ενώσεις, οι οποίες οξειδώνουν ένα συγκεκριμένο μόριο στόχο, κυρίως μακρομόριο. Ο μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών στηρίζεται στην ακόλουθη αρχή: Πρώτα, δημιουργείται με κάποιο τρόπο η ελεύθερη ρίζα που αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα (έναρξη). Η προέλευση των ριζών που στη

συνέχεια προκαλούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις αποτελεί έναν από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς έρευνας. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών πιθανόν να οφείλεται και σε μοριακό μηχανισμό από το οξυγόνο απλής διηγερμένης κατάστασης (singlet oxygen). Το τελευταίο σχηματίζεται με τη βοήθεια του φωτός παρουσία ενός φωτοευαισθητοποιητή π.χ. χλωροφύλλης. Κατά τη μετάπτωση του οξυγόνου στην απλή διηγερμένη κατάσταση σχηματίζονται υδροϋπεροξείδια και συνεχίζεται η αντίδραση με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Επίσης, κάποια μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προκαλούν το σχηματισμό νέων ριζών κι έτσι δρουν ως προοξειδωτικά.

$M^+ + ROOH \longrightarrow RO^* + M^{2+} + OH^-$

$M^{2+} + ROOH \longrightarrow ROO^* + M^+ + H^+$

Η συνολική αντίδραση είναι:

$$2ROOH \xrightarrow[M^{2+}]{M^+} RO^* + ROO^* + H_2O$$

Από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών με μη ριζικά μόρια προκύπτουν νέες ελεύθερες ρίζες (διάδοση). Έτσι, με αυτόν τον τρόπο οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές αναγεννώντας συνεχώς νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η αντίδραση θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες.

Η αλληλουχία των αντιδράσεων μπορεί να παρασταθεί σχηματικώς ως εξής:

Έναρξη	R^* (ελεύθερη ρίζα)	
Διάδοση	$R^* + O_2 \longrightarrow ROO^*$ (ρίζα υπεροξειδίου)	
Τερματισμός	$R^* + R^* \longrightarrow R\text{-}R$	
	$ROO^* + R^* \longrightarrow ROOR$	
	$ROO^* + ROO^* \longrightarrow ROOR + O_2$ (αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης)	

Με βάση τον ανωτέρω μηχανισμό πιστεύεται ότι επιτελείται η αυτοξείδωση των λιπών και των ελαίων, δηλαδή η αντίδρασή τους με το οξυγόνο (Μπόσκου, 1997; Zhu *et al*, 2001).

Α.1.2. Αντιοξειδωτικά

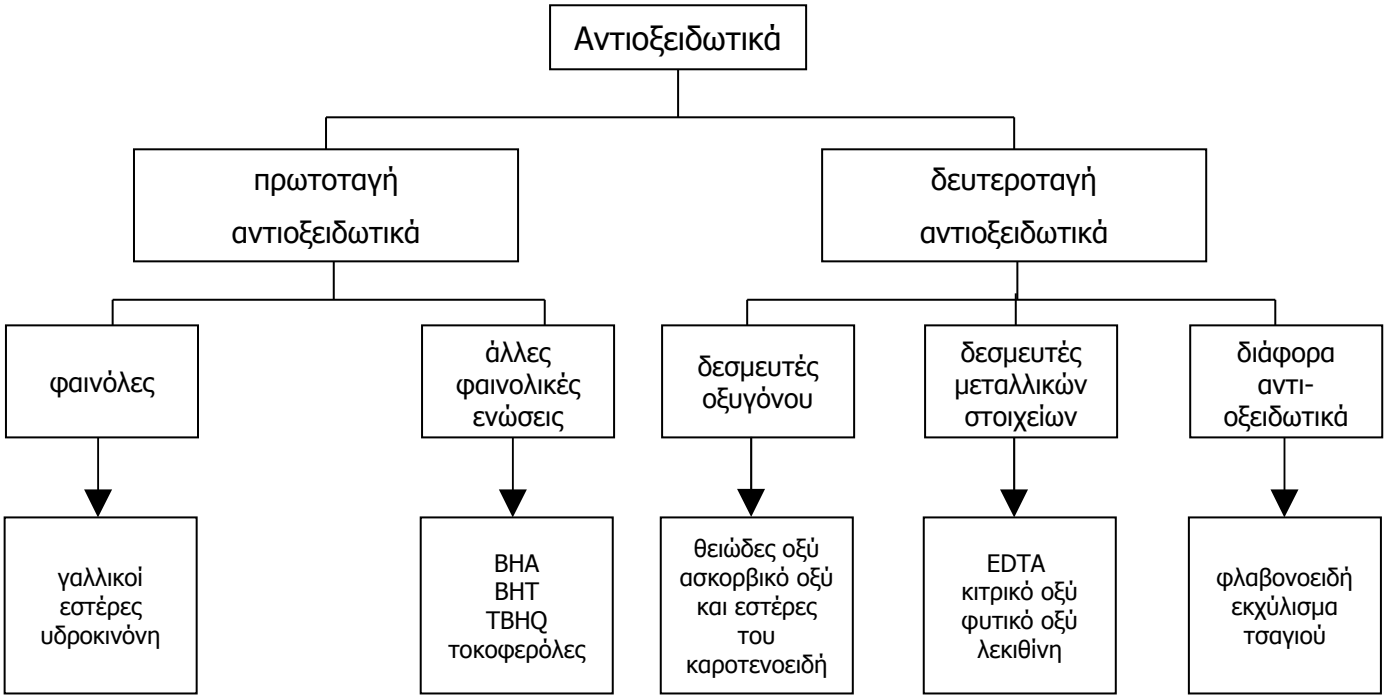
Μια συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπών που περιέχονται στα λιπαρά τρόφιμα είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων προστατεύοντας τα από τη φθορά, την τάγγιση ή τον αποχρωματισμό που μπορεί να λάβει

χώρα κατά την οξείδωση. Τα αντιοξειδωτικά δεν μπορούν να αντιστρέψουν την οξείδωση των ήδη ταγγισμένων ελαίων, ούτε είναι αποτελεσματικά έναντι της υδρολυτικής τάγγισης δηλαδή της ενζυματικά καταλυόμενης υδρόλυσης των λιπαρών ουσιών (Μπόσκου, 1997; http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001).

Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες:

- Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό.
- Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου (Μπόσκου, 1997).

Α. 1.2.1. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών



Α.1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών

<u>Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά</u>

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες.

Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται φαινολικές ενώσεις όπως BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), TBHQ (δι-τριτ.-βούτυλο-

υδροκινόνη), PG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά.

Οι τοκοφερόλες ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Τέσσερα ομόλογα είναι γνωστά – η α, β, γ και δ-τοκοφερόλη – που η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από το α-ομόλογο προς το δ, εν αντιθέσει με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται κατά την ίδια σειρά.

Οι τοκοφερόλες δρουν ως βιολογικά αντιοξειδωτικά, δηλαδή προστατεύουν βιολογικά συστήματα όπως κύτταρα ή όργανα από βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έκθεση τους σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες (Γάλαρης και Δούλιας, 2001).

Όσον αφορά στα φαινολικά αντιοξειδωτικά αυτά εμφανίζουν αυξημένη δράση όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό λέγεται συνέργεια ή συνεργισμός (Μπόσκου, 1997).

Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά με την ευρύτερη έννοια του όρου.

Τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά μπορεί να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου, δηλαδή αντιδρούν με το οξυγόνο και ελαττώνουν τη συγκέντρωση του σε ένα κλειστό σύστημα. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του καθώς και το θειώδες οξύ και τα άλατά του αλλά και τα καροτενοειδή.

Το ασκορβικό οξύ ως αναγωγικό μέσο μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες που σχηματίζονται κατά την ενζυμική αμαύρωση φαινολικών ουσιών και αυτό παρέχει μια προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών. Επίσης, το ασκορβικό οξύ πιστεύεται ότι με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα αναγεννά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχοντας υδρογόνο στις φαινοξυ ρίζες (A^*) κι έτσι έχει μια έμμεση αντιοξειδωτική δράση.

Το θειώδες οξύ και τα άλατα του αντιδρούν εύκολα με το οξυγόνο και παρέχουν μια σχετική προστασία στα αποξηραμένα φρούτα και λαχανικά.

Τα καροτενοειδή δρουν καταστέλλοντας το οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen) δηλαδή δρουν ως αποσβέστες διηγερμένου οξυγόνου.

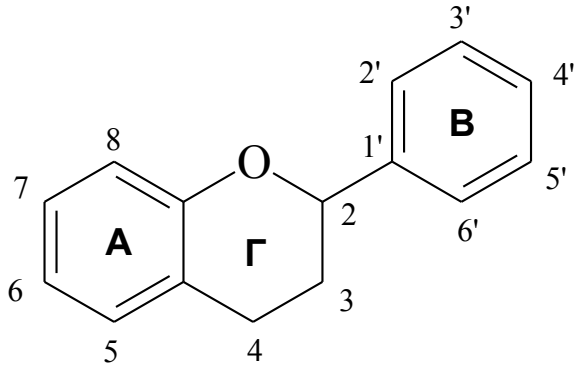
Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των δευτερογενών αντιοξειδωτικών είναι η δέσμευση μετάλλων τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χημικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό οξύ, φυτικό οξύ, λεκιθίνη.

Το EDTA και το κιτρικό οξύ σχηματίζουν χημικές ενώσεις με τα μέταλλα, κυρίως το σίδηρο και το χαλκό, τα οποία προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. ενότητα Α.1.1.)

Ενώσεις με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση

Μια κατηγορία ενώσεων με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικά συστατικά των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπών, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και το ενεργό οξυγόνο, δεσμεύουν ιόντα σιδήρου και απενεργοποιούν την λιποξυγενάση. Η βασική δομή των φλαβονοειδών φαίνεται στο σχήμα 1.

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων είναι οι ταννίνες οι οποίες περιλαμβάνουν τις κατεχίνες, τις λευκοανθοκυανίνες και ορισμένα υδροξυοξέα. Η κατεχίνη και η κερσετίνη έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιούν το λαρδί (Μπόσκου, 1997; http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001).



Σχήμα 1. Βασική δομή φλαβονοειδών

Άλλοι παρεμποδιστές οξείδωσης λιπιδίων

Υπάρχουν ορισμένα ένζυμα που απομακρύνουν τα ενεργά είδη οξυγόνου κι έτσι παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων. Εδώ ανήκουν η δισμουτάση σουπεροξειδίου, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, η οξειδάση γλυκόζης και η καταλάση.

Μια άλλη κατηγορία παρεμποδιστών είναι η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα οι οποίες εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια. Εδώ εντάσσονται τα πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο και η Δ^5-αβεναστερόλη – κιτροσταδιενόλη.

Τέλος, υπάρχουν αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση που παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Mailllard.

Α.1.3. Αντιοξειδωτικά στο τσάι

Το τσάι είναι το δεύτερο σε κατανάλωση αφέψημα ανά τον κόσμο μετά το νερό. Το τσάι σε αντίθεση με το νερό περιέχει οργανικά συστατικά ορισμένα εκ των οποίων φαίνεται ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία οι οποίες ήταν γνωστές στους κινέζικους πολιτισμούς από το 3000 π.Χ. (Beecher *et al*, 1999).

Το τσάι παράγεται από τα τρυφερά φύλλα δύο ποικιλιών του φυτού *Camellia sinensis: assamica και sinensis*. Υπάρχουν διάφορα είδη τσαγιού τα οποία κατατάσσονται σε 3 κυρίως τύπους: πράσινο τσάι (δεν έχει υποστεί ζύμωση), oolong (ημιζυμωμένο) και μαύρο τσάι (πλήρως ζυμωμένο).

Κατά την παραγωγή του πράσινου τσαγιού γίνεται απενεργοποίηση των ενζύμων είτε με τροφοδοσία φωτιάς είτε με ατμό. Το μαύρο τσάι παράγεται με καταλυτική οξείδωση των κατεχινών από μια οξειδάση πολυφαινολών. Έτσι, οι κατεχίνες μετατρέπονται σε πιο πολύπλοκα μόρια τα οποία προσδίδουν στο μαύρο τσάι το τυπικό χρώμα και τη δυνατή γεύση. Στην περίπτωση του τσαγιού oolong τα φύλλα θερμαίνονται ελαφρώς κι έτσι γίνεται μερική ζύμωση με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά του να είναι μεταξύ πράσινου και μαύρου τσαγιού (Wang *et al*, 2000; Sava *et al*, 2001).

Το τσάι περιέχει φλαβονοειδή. Τα τελευταία είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες: φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες ανάλογα με την δομή του ετεροκυκλικού δακτυλίου οξυγόνου (δακτύλιος –C). Οι κύριες τάξεις φλαβονοειδών που απαντώνται στο τσάι είναι οι φλαβανόλες και οι φλαβονόλες.

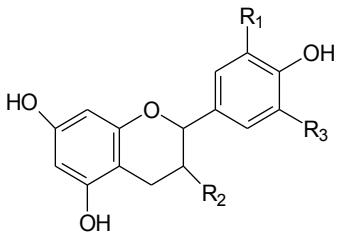
<u>Φλαβανόλες</u>

Οι κατεχίνες είναι δομικά φλαβανόλες οι οποίες αποτελούν το 20% του ξηρού βάρους του πράσινου τσαγιού, ενώ οι φλαβονόλες αποτελούν το 2-3% των υδατοδιαλυτών στερεών του τσαγιού (Wang *et al*, 2001). Οι κυριότερες κατεχίνες στα φρέσκα φύλλα τσαγιού και στο πράσινο τσάι είναι: (-) – εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), (-) – επιγαλλοκατεχίνη (EGC), (-) – εστέρας επικατεχίνης (ECG) και (-) – επικατεχίνη (EC). Η δομή των κυριότερων κατεχινών φαίνεται στο σχήμα 2.

Οι κατεχίνες είναι άχρωμα, υδατοδιαλυτά συστατικά που προσδίδουν στο πράσινο τσάι την πικρή και στυφή γεύση. Όλα τα χαρακτηριστικά του τσαγιού συμπεριλαμβανομένων της γεύσης, του χρώματος και του αρώματος, σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τροποποιήσεις των κατεχινών.

Έτσι, για παράδειγμα, μείωση στις περιεχόμενες κατεχίνες σχετίζεται με αύξηση της περιεκτικότητας σε μονοτερπενικές αλκοόλες κατά την παρασκευή μαύρου τσαγιού, γεγονός που βελτιώνει την αρωματική ποιότητα του τσαγιού.

Επιμερισμός των κατεχινών, δηλαδή μετατροπή στις ισομερείς τους μορφές μπορεί να συμβεί κατά την παραγωγή, το βράσιμο ή την αποθήκευση του τσαγιού. Μάλιστα σημαντικό ρόλο παίζει όχι μόνο η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος θέρμανσης του τσαγιού (Wang and Helliwell, 2000).



(+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη

$R_{1,2}$: OH, R_3: H

(-)-γαλλοκατεχίνη ή επιγαλλοκατεχίνη

$R_{1,2,3}$: OH

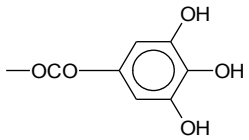
(-)-3-γαλλικός εστέρας της κατεχίνης ή επικατεχίνης

R_1: OH, R_3: H, R_2:G

(-)-3-γαλλικός εστέρας της γαλλοκατεχίνης ή επιγαλλοκατεχίνης

R_1: OH, R_3: OH, R_2:G

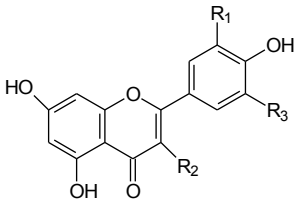
Όπου G:



Σχήμα 2. Δομή φλαβανολών

<u>Φλαβονόλες</u>

Οι κύριες φλαβονόλες στα φύλλα του τσαγιού είναι η κερσετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών παρά ως αγλυκόνες (μη γλυκοσυλιωμένες μορφές). Έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 14 γλυκοζίτες μυρισετίνης, κερσετίνης και καιμπφερόλης στο τσάι. Το γλυκό μέρος αποτελείται είτε από γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη ή φρουκτόζη. Μόνο-, δι- και τρι-γλυκοζίτες έχουν αναγνωριστεί. Οι αγλυκόνες δεν απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στα αφεψήματα τσαγιού διότι διαλύονται ελάχιστα στο νερό. Η δομή των φλαβονόλων φαίνεται στο σχήμα 3 (Wang *et al*, 2000).



Απιγενίνη	Κερσετίνη	Καιμπφερόλη	Μυρισετίνη
$R_{1,2,3}$: H	$R_{1,2}$: OH, R_3: H	R_2: OH, $R_{1,3}$: H	$R_{1,2,3}$: OH

Σχήμα 3. Δομή φλαβονόλων

Το περιεχόμενο σε φλαβονόλες των φύλλων του πράσινου και μαύρου τσαγιού φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Περιεχόμενες φλαβονόλες στα φύλλα του πράσινου και μαύρου τσαγιού (g/Kg ξηρού βάρους) (Wang, 2000)

Φλαβονόλες	**Πράσινο τσάι**	**Μαύρο τσάι**
Μυρισετίνη	0,83 – 1,59	0,24 – 0,52
Κερσετίνη	1,79 – 4,05	1,04 – 3,03
Καιμπφερόλη	1,56 – 3,31	1,72 – 2,31

Στον πίνακα 2 φαίνεται το περιεχόμενο κατεχινών και φλαβονολών σε τρία διαφορετικά αφεψήματα τσαγιού.

Πίνακας 2. Περιεχόμενο κατεχινών και φλαβονολών σε αφεψήματα τσαγιού (mg/Lt) (Wang *et al*, 2000)

Αφέψημα	1ο	2ο	3°	Σύνολο
Κατεχίνες				
(+) – GC	30,0	18,7	3,80	52,5
(-) – EGC	228	131	37,2	396,2
(+) – C	10,4	5,9	0,9	17,2
(-) – EGCG	306	223	2,3	531,3
(-) – EG	52,8	28,1	6,3	87,2
(-) – CGC	10,0	9,6	μη ανιχνεύσιμη	19,6
(-) – CG	76,8	52,0	0,5	129,3
Φλαβονόλες				
Μυρισετίνη	6,4	4,2	2,7	13,3
Κερσετίνη	23,9	15,9	10,0	49,8
Καιμπφερόλη	9,0	6,5	3,5	19,0

1° αφέψημα: 1gr σκόνης από φύλλα τσαγιού αναμίχθηκε με 100ml βραστό νερό για 5min και 70ml υγρού φιλτραρίστηκαν και αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου κάτω από τρέχον νερό.

2° αφέψημα: προστέθηκαν άλλα 70ml βραστού νερού στα φύλλα τσαγιού για 5min και φιλτραρίστηκαν 70ml υγρού τα οποία αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου κάτω από τρέχον νερό.

3° αφέψημα: ως άνω.

Με βάση τα στοιχεία του πίνακα 2 παρατηρείται μείωση του περιεχομένου των πολυφαινολών καθώς πηγαίνουμε από το πρώτο στο τρίτο αφέψημα.

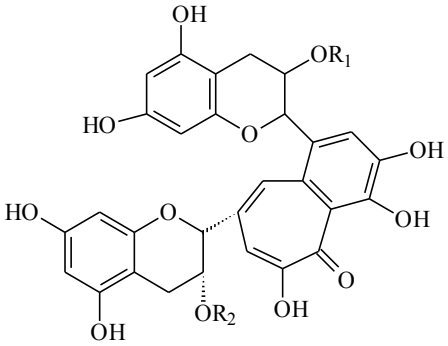
Θεαφλαβίνες και Θεαρουμπιγίνες

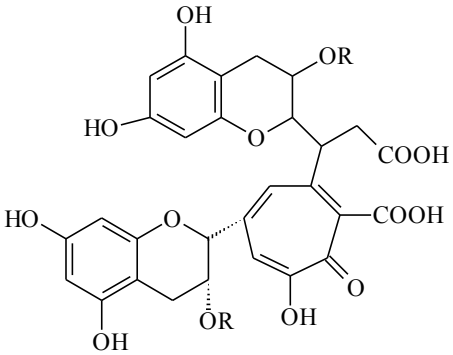
Κατά την παρασκευή μαύρου τσαγιού, οι κατεχίνες μπορεί να οξειδωθούν προς σχηματισμό του τυπικού χρώματος και γεύσης του μαύρου τσαγιού. Οι χρωστικές του μαύρου τσαγιού διακρίνονται στις πορτοκαλόχρωμες θεαφλαβίνες (TFs) και στις καφετί θεαρουμπιγίνες (TRs). Υπάρχουν 4 κύριες TFs στο μαύρο τσάι – θεαφλαβίνη, 3-γαλλική θεαφλαβίνη, 3'-γαλλική θεαφλαβίνη – οι οποίες σχηματίζονται κατά την αντίδραση κινονών και γαλλοκατεχίνης. Η περιεκτικότητα του τσαγιού σε TFs αυξάνει όταν η εκχύλιση γίνεται σε χαμηλό pH (Liang and Xu, 2001).

Οι TRs είναι ένα ετερογενές γκρουπ φαινολικών χρωστικών. Το περιεχόμενο του μαύρου τσαγιού σε TFs είναι 0,3-2% επί του ξηρού βάρους, ενώ το κλάσμα των TRs αποτελεί το 10-20% του ξηρού βάρους του μαύρου τσαγιού. Οι TFs και TRs συντελούν στον

καθορισμό των χαρακτηριστικών του τσαγιού όπως είναι το χρώμα, η ένταση και το σώμα (Wang, 2000).

Η δομή των θεαφλαβινών και θεαρουμπιγινών του μαύρου τσαγιού φαίνεται στο σχήμα 4.





Θεαφλαβίνες (TFs)

θεαφλαβίνη (TF-1)

R1,2: H

3-γαλλικός εστέρας της θεαβλαβίνης (TF-2α)

R1: G, R2: H

3΄-γαλλικός εστέρας της θεαβλαβίνης (TF-2β)

R1: H, R2: G

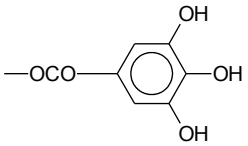
3,3΄-διγαλλικός εστέρας της θεαβλαβίνης (TF-3)

R1: G, R2: G

Θεαρουμπιγίνες

R= G

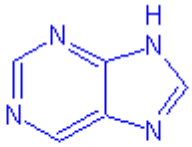
Όπου G:



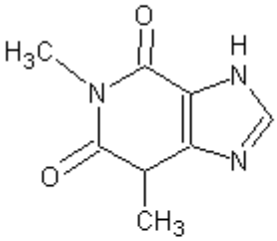
Σχήμα 4. Δομή θεαφλαβινών και θεαρουμπιγινών μαύρου τσαγιού

<u>Αλκαλοειδή</u>

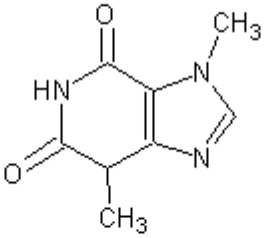
Το τσάι, καθώς επίσης ο καφές και το κακάο, περιέχουν αλκαλοειδή. Τα κυριότερα αλκαλοειδή –που περιέχουν δακτύλιο ξανθίνης- είναι η καφεΐνη, η θεοφυλλίνη και η θεοβρωμίνη, οι δομές των οποίων φαίνονται στο σχήμα 5 (Ανδρικόπουλος, 1998).



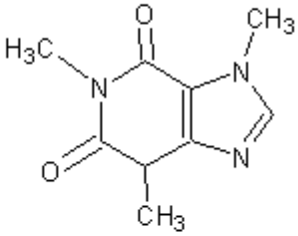
πουρίνες



θεοφυλλίνη



θεοβρωμίνη



καφεΐνη

Σχήμα 5. Δομή αλκαλοειδών

Α.1.3.1. Επίδραση της προετοιμασίας του τσαγιού στην αντιοξειδωτική ικανότητα

Σε μία εργασία του Langley – Evans (2000) μελετήθηκε η επίδραση της προετοιμασίας σε πράσινο τσάι, σε τσάι από φύλλα μαύρου τσαγιού και σε μαύρο τσάι σε φακελάκια. Τόσο το πράσινο, όσο και το μαύρο τσάι βρέθηκε ότι απελευθερώνουν σημαντικά ποσά αντιοξειδωτικών ουσιών στο ζεστό νερό μετά από 2 λεπτά βράσιμο. Η προετοιμασία του τσαγιού σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 20 έως 90° C έδειξε ότι παρόλο που απελευθερώνονταν πιο πολλά αντιοξειδωτικά στα πιο κρύα αφεψήματα, η αύξηση της θερμοκρασίας ίσως αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το μαύρο τσάι σε φακελάκια εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το τσάι από τα φύλλα μαύρου τσαγιού σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 70° C. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το υλικό από το οποίο κατασκευάζονται τα φακελάκια ίσως εμποδίζει την εκχύλιση των φλαβονοειδών στο διάλυμα του τσαγιού. Η προσθήκη γάλατος στο τσάι φαίνεται ότι εξαλείφει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μαύρου τσαγιού. Η επίδραση αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνταν πλήρες αγελαδινό γάλα και φαίνεται ότι σχετίζεται με το περιεχόμενο λίπος του γάλατος που προστίθεται. Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και άρα το μέγιστο όφελος για την υγεία επιτεύχθηκε όταν πράσινο τσάι ή τσάι από φύλλα μαύρου τσαγιού προετοιμάστηκε στους 90° C για 2min και καταναλώθηκε είτε με άπαχο γάλα είτε χωρίς καθόλου γάλα.

Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Stach and Schmitz, 2001), με την αύξηση του χρόνου παραμονής του πράσινου τσαγιού μετά την παρασκευή, μειώνονταν το περιεχόμενο του σε κατεχίνες και καφεΐνη. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των EGCG και EGC μειώθηκαν

κατά 14% και 21% αντίστοιχα. Έτσι, η αποθήκευση του τσαγιού σε θερμός οδηγεί σε μείωση της αντιοξειδωτικής και αντικαρκινικής του ιδιότητας. Δεν υπήρχε σημαντική αλλαγή στις συγκεντρώσεις των ECG και EC, ενώ η ποσότητα της κατεχίνης (C) και της καφεΐνης αυξήθηκε με το χρόνο (53% και 48% αντίστοιχα, σε 60min). Λόγω της μικρής περιεκτικότητας των δειγμάτων τσαγιού σε C αυτή η αύξηση δεν ήταν σημαντική. Όσον αφορά στην αύξηση της καφεΐνης αυτή οφείλεται στη σταδιακή απελευθέρωση της καφεΐνης από τα σύμπλοκά της με πολυφαινόλες λόγω διάσπασης των συμπλόκων. Αυτός ίσως είναι και ο λόγος των διαφορετικών επιδράσεων ίδιας ποσότητας καφεΐνης που περιέχεται στον καφέ και στο τσάι. Η καφεΐνη στον καφέ δεν σχηματίζει σύμπλοκα με πολυφαινόλες και η εγρήγορση παρατηρείται αμέσως μετά την κατανάλωση. Στο τσάι αυτή η επίδραση επέρχεται πιο αργά αλλά διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Α.1.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών του τσαγιού στις διάφορες ελεύθερες ρίζες

Οι πολυφαινόλες του τσαγιού εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, ο EGCG μείωσε το ρυθμό έναρξης και παρέτεινε τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης της οξείδωσης που προκαλείτο από υπεροξειδική ρίζα σε ένα διφασικό μοντέλο (φωσφολιπιδιακό λιποσωμικό μοντέλο) *in vitro* (Hu and Kitts, 2001). Επίσης οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού EGCG και GGC αντιδρούν και παγιδεύουν τις υπεροξειδικές ρίζες που γεννώνται με θερμόλυση του 2,4-διμεθυλοβαλερονιτριλίου (AMVN) (Valcic *et al*, 2000; Caldwell, 2001).

Από την αντίδραση των EGCG και EGC με H_2O_2 προκύπτουν ορισμένα προϊόντα λόγω οξείδωσης και αποκαρβοξυλίωσης του Α-δακτυλίου στο μόριο των κατεχινών. Ενδεχομένως λοιπόν και ο Α-δακτύλιος να αποτελεί αντιοξειδωτική πλευρά (Zhu *et al*, 2000). Επιπροσθέτως, τα παράγωγα των πολυφαινολών (και κυρίως η EC και EGCG) έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικοί εκκαθαριστές της ρίζας του διοξειδίου του αζώτου (NO_2^*) και της ανθρακικής ρίζας (CO_3^{*-}). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:

EC (ή EGCG) + NO_2^* ⟶ EC(-H)* (ή EGCG(-H)*) + H^+ + NO_2^-

EC (-H)$^-$ (ή EGCG (-H)$^-$) + CO_3^{*-} ⟶ EC (-H)* (ή EGCG (-H)*) + CO_3^{2-}

(Miao *et al*, 2001)

Πρόσφατα, μια σχετικά σταθερή ρίζα η 2-2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κατεχινών. Η ικανότητα εκκαθάρισης της ρίζας DPPH από κατεχίνες ακολουθεί την εξής σειρά: EGCG>ECG>EGC>EC (Zhu *et al*, 2001). Η ίδια ρίζα (DPPH) χρησιμοποιήθηκε και για την αξιολόγηση της εκκαθαριστικής ικανότητας του ασκορβικού οξέος, της α-τοκοφερόλης, του γαλλικού αιθυλεστέρα και της κατεχίνης. Η σειρά που βρέθηκε είναι: ασκορβικό οξύ>α-τοκοφερόλη=γαλλικό αιθυλεστέρα> (+) – κατεχίνη (Sawai and Moon, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

Α.2. Πηγές πολυφαινολών

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες μπορεί να υπάρχουν στα τρόφιμα είτε ως ενδογενείς παράγοντες, είτε ως πρόσθετα συντηρητικά (Shahidi, 2000).

Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία Συντήρησης Τροφίμων είναι:

α) Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA)

β) Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT)

γ) Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός (PG), ο οκτυλικός και δωδεκυλικός

δ) Η δι-τριτ-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ)

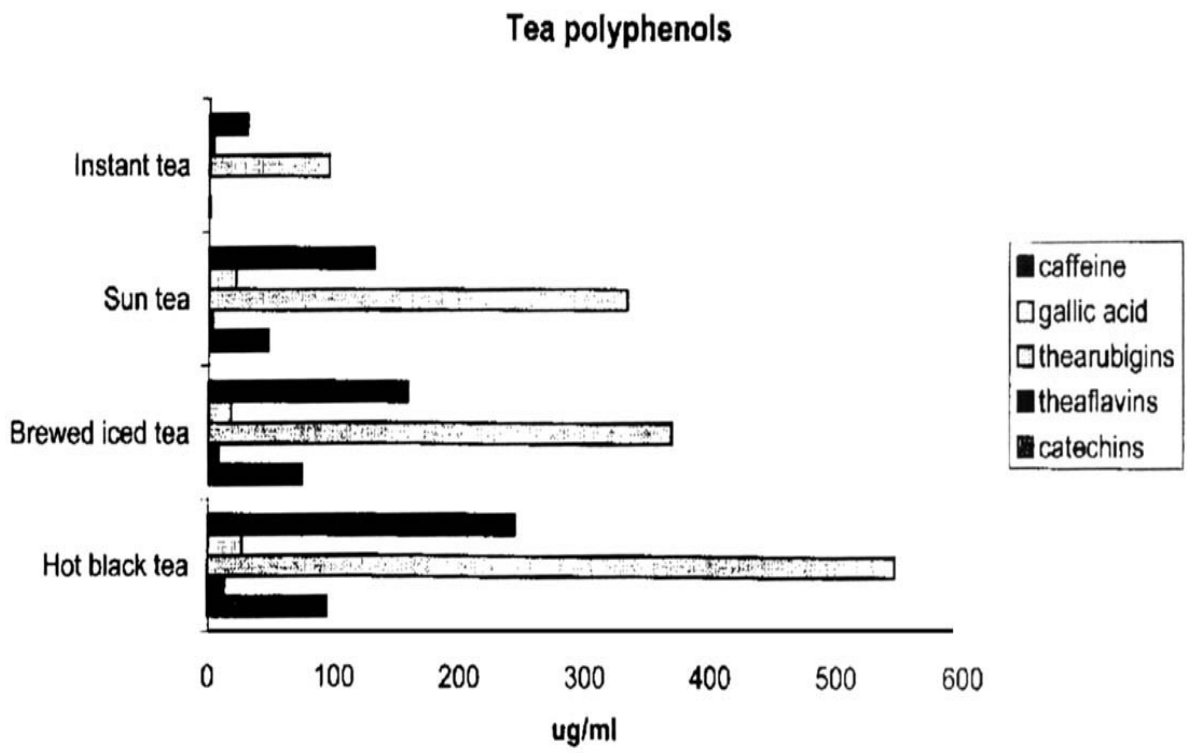
Παρόλα αυτά, για λόγους ασφαλείας έχει ενταθεί το ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά (Μπόσκου, 1997; Shahidi, 2000).

Α.2.1. Αφεψήματα

Α.2.1.1. Τσάι

Το τσάι αποτελεί σημαντική πηγή φλαβονοειδών και κυρίως EC, ECG, EGC και EGCG. Σε μικρότερη αναλογία περιέχονται οι φλαβονόλες και γλυκοζίτες φλαβονολών. Οι φλαβανόλες και φλαβονόλες του τσαγιού αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορεί να είναι έως και 5 φορές πιο αποτελεσματικά από τις βιταμίνες C και E (Dreosti, 2000). Στο σχήμα 6 φαίνεται η σύσταση ορισμένων αφεψημάτων μαύρου τσαγιού.

Σχήμα 6. Σύσταση αφεψημάτων μαύρου τσαγιού (Hakim *et al*, 2000)



Α.2.1.2. Σοκολάτα

Το κακάο αποτελεί πλούσια πηγή πολυφαινολών και κυρίως κατεχινών και προκυανιδινών (Wollgast and Anklam, 2000). Το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες των προϊόντων του κακάο διαφέρει. Έτσι, για παράδειγμα, το ωμό κακάο περιέχει διαφορετικές πολυφαινόλες από τη σκόνη κακάο ή τη σοκολάτα τα οποία υπόκεινται σε ζύμωση, ξήρανση και ψήσιμο. Το ωμό κακάο είναι πλούσιο σε μονομερή φλαβανολών και προκυανιδίνες ενώ περιέχει σε μικρότερη ποσότητα κερσετίνη (φλαβονόλη), ισοβιτεξίνη (φλαβόνη), κλοβαμίδιο και δεοξυκλοβαμίδιο (φαινόλες) καθώς και ορισμένες ανθοκυανίνες που προσδίδουν στο ωμό κακάο το μωβ χρώμα του (Dreosti, 2000). Η σκούρα σοκολάτα έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα κατεχινών (53,5 mg ανά 100 gr) ενώ η σοκολάτα γάλακτος περιέχει 15,9 mg ανά 100 gr. Στον πίνακα 3 φαίνεται το περιεχόμενο ορισμένων προϊόντων κακάο σε πολυφαινόλες.

Πίνακας 3. Περιεχόμενες πολυφαινόλες σε σκόνη κακάο, σκούρα σοκολάτα και σοκολάτα γάλακτος (Wollgast and Anklam, 2000)

Source	Extraction solvent	Analysis method	Quantity
Cocoa powder	95% Aqueous methanol	Folin–Ciocalteau (gallic acid standard)	20 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	Folin–Ciocalteau (catechin standard)	65±19 mg/g Total polyphenols[a]
Cocoa powder (non-alkalinised)	70% Aqueous methanol	Folin–Ciocalteau (gallic acid standard)	Ca 58 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders (instant)	70% Aqueous methanol	Folin–Ciocalteau (gallic acid standard)	6.46±2.44 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	RP–HPLC (catechin standards)	2.96–3.27 mg/g Catechin and epicatechin
Cocoa powder (non-alkalinised)	75% Aqueous acetone	RP–HPLC (epicatechin standard)	Ca 3 mg/g Epicatechin
Cocoa powder (instant)	75% Aqueous acetone	RP–HPLC (epicatechin standard)	0.26±0.05 mg/g Epicatechin
Dark chocolate	95% Aqueous methanol	Folin–Ciocalteau (gallic acid standard)	8.4 mg/g Total polyphenols
Dark chocolates	Methanolic HCl	Folin–Ciocalteau (catechin standard)	36.5±5 mg/g Total polyphenols[a]
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP–HPLC (procyanidin standards)	1.7±0.08 mg/g total procyanidins
Dark chocolate	70% Aqueous methanol	RP–HPLC (catechin standards)	0.5 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	Methanolic HCl	RP–HPLC (catechin standards)	0.48–1.37 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP–HPLC (procyanidin standards)	0.8±0.08 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	n.a.	n.a.	2 mg/g Epicatechin
Milk chocolate	95% Aqueous methanol	Folin–Ciocalteau (gallic acid standard)	5 mg/g Total polyphenols
Milk chocolate	Methanolic HCl	Folin–Ciocalteau (catechin standard)	15±5.8 mg/g Total polyphenols[a]
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP–HPLC (procyanidin standards)	0.7±0.17 mg/g Total procyanidins
Milk chocolate	70% Aqueous methanol	RP–HPLC (catechin standards)	0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	Methanolic HCl	RP–HPLC (catechin standards)	0.15–0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP–HPLC (procyanidin standards)	0.2±0.05 mg/g Catechin and epicatechin

Το 1994 η κατά κεφαλή κατανάλωση σοκολάτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση κυμαίνονταν από 1,3 Kg ανά έτος στην Πορτογαλία έως 8,8 Kg ανά έτος στη Γερμανία. Γενικά στις Βόρειες χώρες καταναλώνεται περισσότερη σοκολάτα απ' ότι στις Νότιες, κι έτσι η σοκολάτα μπορεί να αποτελεί καλή πηγή αντιοξειδωτικών για ορισμένους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Wollgast and Anklam, 2000). Πρόσφατες εκτιμήσεις για τη συνεισφορά της σοκολάτας στη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών έδειξαν ότι 41 g σοκολάτας γάλακτος περιέχουν παρόμοια ποσότητα πολυφαινολών με ένα σερβίρισμα (μερίδα) κόκκινου κρασιού, ενώ 1 φλιτζάνι σοκολάτας παρέχει περίπου τα 2/3 αυτής της ποσότητας (Dreosti, 2000). Επιπροσθέτως, το περιεχόμενο της σοκολάτας σε κατεχίνες είναι τετραπλάσιο απ' αυτό του τσαγιού. Βέβαια, υπάρχει διαφορά ως προς τον τύπο των κατεχινών που περιέχονται στη σοκολάτα και στο τσάι. Έτσι, η σοκολάτα περιέχει μόνο (+) – κατεχίνη και (-) – επικατεχίνη, ενώ το τσάι περιέχει κυρίως (-) – γαλλικό εστέρα επικατεχίνης, (-) – γαλλικό εστέρα επιγαλλοκατεχίνης με μικρές συγκεντρώσεις (+) – κατεχίνης, (-) – επικατεχίνης, (-) – επιγαλλοκατεχίνης και (+) – γαλλοκατεχίνης (Arts *et al*, 1999).

Α.2.1.3. Καφές

Ο καφές έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό για τις ταννίνες που περιέχει επειδή η παρουσία των ενώσεων αυτών έχει ιδιαίτερη σημασία για την ποιότητα αυτών των προϊόντων (Μπόσκου, 1997). Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει βρεθεί ότι έχουν τα μέσης σκουρότητας ψημένα αφεψήματα καφές (Nicoli *et al*, 1997).

Α.2.1.4. Άλλα αφεψήματα

Τα μίγματα βοτάνων *Essiac* και *Flor-Essence* πωλούνται ως διατροφικά συμπληρώματα και χρησιμοποιούνται από ασθενείς για τη θεραπεία χρόνιων καταστάσεων, κυρίως καρκίνου. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα βότανα αυτά μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική δράση (Tomayo *et al*, 2000).

Το εκχύλισμα φύλλων από *Strobilanthes crispus* αποτελεί πλούσια πηγή υδατοδιαλυτών βιταμινών (C, B_1 και B_2) οι οποίες συνδράμουν στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση των φύλλων. Τα φύλλα αυτά επίσης περιέχουν μέτριες ποσότητες κατεχινών, αλκαλοειδών, καφεΐνης, ταννίνης που συνεισφέρουν επίσης στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατανάλωση 5g ημερησίως από αυτό το εκχύλισμα μπορεί να προμηθεύσει τον

οργανισμό με τα επιπλέον θρεπτικά συστατικά και αντιοξειδωτικά που χρειάζεται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (βλ. πίνακα 4).

Πίνακας 4. Χημική σύσταση 5 αφεψημάτων: *Strobilanthes crispus*, *Yerbamate*, Ινδικό, πράσινο και μαύρο τσάι (Maznah *et al*, 2000)

Analysis	Mean ± SD	Yerbamate[a]	Indian tea[a]	Green tea[b]	Black tea[b]
Proximate analysis					
Moisture content (%)	69.3 ± 0.1	9.00	9.3	—[c]	3.9–9.5
Total ash (%)	21.6 ± 0.1	6.7	—	6.1–9.2	4.9–6.5
Water-insoluble ash (%)	13.8 ± 1.0	—	—	5.2–7.2	—
Water-soluble ash (%)	7.9 ± 1.0	2.3	—	2.6–1.6	3.0–4.2
Alkalinity of soluble ash (mL acid/g)	6.5 ± 2.0	—	—	2.6–1.6	1.2–1.6
Acid-insoluble ash (%)	2.2 ± 0.8	—	—	0.05–0.9	0.2–0.4
Extractivities (%)	6.7 ± 0.4	33.1	—	33–45	30–50
Protein content	13.3 ± 0.9	9.8	14.1	—	5.0–6.2
Total carbohydrate (%)	4.3 ± 0.7	—	0.0	—	—
Crude fiber (%)	13.9 ± 0.6	15.5	—	9–15	—
Ether extract (%)	1.9 ± 0.7	2.1	—	—	14–18
Minerals (mg/100 g dried sample)					
Sodium	2,953 ± 60	1,112	44.5	—	—
Potassium	10,900 ± 498	2,227	2,160	—	—
Calcium	5,185 ± 359	664	426	—	—
Iron	255 ± 163	—	15.2	—	—
Phosphorus	201 ± 22	394	628	—	—
Vitamins (mg/100 g sample)					
Ascorbic acid (C)*	9.8 ± 1.2	—	0.0	—	—
Riboflavin (B_2)	0.11 ± 0.04	—	0.9	—	—
Thiamin (B_1)	0.14 ± 0.001	0.2	0.14	—	—
Other chemical components					
Caffeine (%)	0.0 (11)	0.6–1.4	2.5	1.5–4.3	10–11
Tannin (%)	1.0 ± 0.30	9.8	—	—	—
Alkaloid (%)	3.2 ± 0.60	4.4	—	—	—
Catechin (%)	1.18 ± 0.08	0.9	—	5.8	—

Ένα άλλο αφέψημα, το MitoLife που περιέχει μίγμα εκχυλίσματος από φρούτα, και τσάι έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης ανάλογη με αυτή του πράσινου τσαγιού (Weisburger *et al*, 2001).

Το *Salvia officinalis* (φασκόμηλο) αποτελεί ένα ευρέως καλλιεργούμενο βότανο το οποίο χρησιμοποιείται για μαγειρικούς σκοπούς. Οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες αποδίδονται κυρίως στην παρουσία του καρνοσικού και ροζμαρινικού οξέος, όμως περιέχει και ορισμένα φαινολικά συστατικά που προσδίνουν μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα. Το κυριότερο

αντιοξειδωτικό που περιέχεται σε αυτό το βότανο είναι το σαλβιανολικό οξύ L το οποίο είναι διμερές του ροζμαρινικού οξέος (Lu and Foo, 2001).

Τα εκχυλίσματα 6 διαφορετικών βοτάνων της οικογένειας Lamiaceae (δίκταμο, lemonbalm, μέντα, φασκόμηλο, τσάι βουνού και μαντζουράνα) βρέθηκε ότι είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως υδροξυκιναμικό οξύ και φλαβονοειδή.

Επίσης έχει ανιχνευτεί ροζμαρινικό και καφεϊκό οξύ σε όλα τα εκχυλίσματα εκτός από τη μέντα και το τσάι βουνού. Ακόμη βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα μαντζουράνα, μέντα και δίκταμο συντελούν στην επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπών (Triantaphyllou, Blekas and Boskou, 2001).

Α.2.2. Φρούτα και λαχανικά

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι δίαιτες πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά σχετίζονται με μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης λόγω των αντιοξειδωτικών που περιέχουν (Toit *et al*, 2001). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συστήνει την κατανάλωση τουλάχιστον 500g/ημέρα φρούτων και λαχανικών. Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν κύριες πηγές δύο μειζόνων διαιτητικών αντιοξειδωτικών: της βιταμίνης C και των καροτενοειδών (βλ. πίνακα 5).

Πίνακας 5. Κύριες πηγές βιταμίνης C και καροτενοειδών (Rice – Evans and Miller, 1995; Marken and Beecher, 2000)

	Βιταμίνη C (mg / 100g)	**Καροτενοειδή (μg / 100g)**
Πορτοκάλι	54 (εύρος: 44-79)	28
Λεμόνι	58	18
Φράουλα	77	8
Πιπέρι		
Πράσινο	120	265
Κόκκινο	140	3840
Σπανάκι	26	3535
Μπρόκολο	87	575
Ανοιξιάτικα χόρτα	180	2630
Καρότα	6	8115 (εύρος: 4300-11000)
Τομάτα	17	640

Η βιταμίνη C βρίσκεται κυρίως σε ξινά φρούτα, στο πράσινο πιπέρι, στο λάχανο, στις φράουλες, στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Το β-καροτένιο απαντάται κυρίως στα καρότα, στα σκούρα φυλλώδη λαχανικά, στο πορτοκάλι και στα κίτρινα λαχανικά (Rice – Evans and

Miller, 1995). Η μέση πρόσληψη βιταμίνης C και β-καροτενίου σε παιδιά φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Μέση πρόσληψη αντιοξειδωτικών σε παιδιά (Hassapidou and Bairaktari, 2001)

	Σύνολο παιδιών (n=65)	Αγόρια (n=41)	Κορίτσια (n=24)
βιταμίνη C (mg)	116 ± 123	104,3 ± 95,4	136,9 ± 160,7
β-καροτένιο (μg)	2.652,8 ± 2.560	2.584 ± 1.820	2.770 ± 3.527

Πολλά φρούτα και λαχανικά περιέχουν το τρίτο κατά σειρά κυριότερο αντιοξειδωτικό, δηλαδή βιταμίνη Ε αν και οι κύριες πηγές της είναι το ελαιόλαδο και οι ξηροί καρποί. Επίσης περιέχουν και άλλα αντιοξειδωτικά όπως είναι το λυκοπένιο το οποίο προσδίδει το κόκκινο χρώμα στις τομάτες και στις κόκκινες πιπεριές, η καψανθίνη που αποτελεί το κόκκινο συστατικό των πιπεριών καθώς και άλλα φλαβονοειδή (βλ. πίνακες 7 και 8).

Πίνακας 7. Περιεχόμενο φρούτων και λαχανικών σε καροτενοειδή (Rice – Evans and Miller, 1995)

Καροτενοειδή	Πηγή
Κανθαξανθίνη	Μανιτάρια
Καψανθίνη	Κόκκινα και κίτρινα πιπέρια, πορτοκάλια
α-καροτένιο και β- καροτένιο	Καρότα, κόκκινο φοινικέλαιο, γλυκοπατάτα, πορτοκάλι, μούρα[1], σταφύλια, μαύρες σταφίδες
α-καροτένιο	Πορτοκάλι, μπανάνα
β-καροτένιο	Μπανάνα, μάνγκο, παπάγια, καρπούζι, πάπρικα, πατάτα, κόκκινο πιπέρι
α-κρυπτοξανθίνη	Παπάγια, καρπούζι
β-κρυπτοξανθίνη	Μάνγκο[2], παπάγια, ροδάκινο, πορτοκάλι, μανταρίνι
Λουτεϊνη	Μπανάνα, πορτοκάλι, μανταρίνι, κίτρινο πιπέρι, πατάτα, μούρα, σταφύλια, μαύρες σταφίδες
Λυκοπένιο	Τομάτα, παπάγια, καρπούζι
Φυτοένιο	Κολοκύθα, μάνγκο, παπάγια
Φυτοφλουένιο	Βερίκοκο, ροδάκινο
Ζεαξανθίνη	Πάπρικα, κόκκινα και κίτρινα πιπέρια

Πίνακας 8. Διαιτητικές πηγές πολυφαινολών (Rice – Evans and Miller, 1995)

Πολυφαινόλη	Διαιτητική πηγή	Οικογένεια
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Επιγαλλοκατεχίνη	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη

[1] Στο χυμό των μούρων έχουν ανιχνευτεί 8 φλαβονόλες: 6 γλυκοζίτες κερσετίνης και 2 καιμπφερόλης (Gil-Izquierdo and Mellenthin, 2001).

[2] Στον πυρήνα του Νιγηριανού μάνγκου έχει βρεθεί ότι περιέχονται ταννικό οξύ, γαλλικό οξύ και επικατεχίνη σε αναλογία 17:10:1 (Arogba, 2000).

Κερσετίνη	Τσάι, κρεμμύδι, μήλα, κόκκινο κρασί, σταφύλια, μούρα, μπρόκολα, βατόμουρα	Φλαβονόλη
Μυρισετίνη	Μούρα, σταφύλια, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Ρουτίνη (ρουτινοσίδη κερσετίνης)	Μήλα	Φλαβόνη
Καιμπφερόλη	Μπρόκολα, ραδίκια, γκρέιπ φρουτ, τσάι	Φλαβονόλη
Ταξιφολίνη	Ξινά φρούτα	Φλαβανόνη
Απιγενίνη	Σέλινο, μαϊντανό	Φλαβόνη
Χρυσίνη	Φλούδα φρούτων	Φλαβόνη

Όσον αφορά στα άγρια εδώδιμα χόρτα, από την ανάλυση 7 διαφορετικών ειδών βρέθηκε το περιεχόμενο τους σε φλαβονοειδή και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Περιεχόμενα φλαβονοειδή σε 7 είδη Ελληνικών εδώδιμων άγριων χόρτων (Trichopoulos *et al*, 2000)

mg /100gr τρόφιμο	Μυρισετίνη	Κερσετίνη	Καιμπφερόλη	Ισορχαμνετίνη	Λουτεολίνη	Απιγενίνη
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
Ζόχος	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

Τα άγρια χόρτα, συνήθως καταναλώνονται με ελαιόλαδο που είναι το μόνο εδώδιμο λίπος που περιέχει πολυφαινόλες. Έτσι, τα πιάτα με άγρια χορταρικά περιέχουν μίγμα πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών. Αυτός ο συνδυασμός των άγριων χορταρικών με το ελαιόλαδο ίσως συνδράμει στις θετικές για την υγεία επιπτώσεις της Ελληνικής δίαιτας (Trichopoulos *et al*, 2000).

Α.2.3. Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο εξάγεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές διαδικασίες (Caponio *et al*, 2001). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος φαινολικών ουσιών που υπάρχουν στη σάρκα του καρπού να απομακρύνονται με τα απόνερα, ενώ ένα μικρό μέρος τους μεταβαίνει στο ελαιόλαδο.

Τα φαινολικά συστατικά τα οποία υπάρχουν στο ελαιόλαδο ονομάζονται πολυφαινόλες κι είναι μέρος του πολικού κλάσματος το οποίο συνήθως παραλαμβάνεται από το ελαιόλαδο με εκχύλιση με χρήση μίγματος μεθανόλης – νερού. Το κλάσμα αυτό είναι πολύπλοκο μίγμα και η χημική του φύση δεν έχει διευκρινιστεί εντελώς. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, συνήθως αναφέρονται σαν κύρια συστατικά. Ακολουθούν τα οξέα ομοβανιλλικό, πρωτοκατεχικό, συρινγκικό και π-υδροξυ-φαινυλοξικό. Τόσο η τυροσόλη όσο και η υδρόξυ-τυροσόλη πιστεύεται ότι προέρχονται από την υδρόλυση της ολευρωπαΐνης, ενώ οι άλλες (βενζοϊκό και κινναμικό οξύ) από την υδρόλυση των φλαβονοειδών (ανθοκυάνες, φλαβόνες). Άλλα φαινολικά συστατικά τα οποία εμφανίζονται συχνά στους πίνακες της φαινολικής σύνθεσης του ελαιολάδου είναι η ολευρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ, το βαννιλικό οξύ, το συρινγκικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το π-υδροξυφαινυλογαλακτικό οξύ και το ομοβανιλλικό οξύ. Το κινναμικό, ελεανολικό, σικιμικό και κουϊνικο οξύ αναφέρονται συχνά σαν φαινόλες του ελαιολάδου, παρ' όλο που τους λείπει μια φαινολική ομάδα ή ακόμα και ένας αρωματικός δακτύλιος.

Α.2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο

Είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αξιόλογες ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές κατά τον βιολογικό κύκλο της ελιάς που έχουν σχέση με:

- την ποικιλία των ελιών
- την ωριμότητα του καρπού: έχει δειχθεί ότι στα ώριμα φρούτα το περιεχόμενο των πολυφαινολών σχεδόν είναι το μισό εν συγκρίσει με αυτό των άγουρων φρούτων
- το σύστημα παραλαβής του ελαιολάδου: τα συστήματα πίεσης δίνουν ελαιόλαδο με υψηλότερο περιεχόμενο σε συνολικές πολυφαινόλες σε σχέση με το σύστημα φυγοκέντρησης (Βεκιάρη, 2001).

Α.2.4. Αλκοολούχα

Α.2.4.1. Κρασί

Οι πολυφαινόλες του κρασιού βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο κόκκινο κρασί (1000-4000 mg/L) σε σχέση με το άσπρο κρασί (200-300 mg/L). Το κόκκινο κρασί περιέχει διάφορες υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες όπως φαινολικά οξέα, το τρι-υδροξυ-στιλβένιο

(ρεσβερατρόλη), φλαβονόλες, φλαβανόλες, προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (Dreosti, 2000). Οι πολλυφαινόλες του κόκκινου κρασιού όπως η ρεσβερατρόλη τροποποιούν το μεταβολισμό των λιπών και εμποδίζουν την οξείδωση της LDL- χοληστερόλης καθώς και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Frémont, 2000). Το κόκκινο κρασί έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το άσπρο κρασί η οποία σχετίζεται άμεσα με το φαινολικό του περιεχόμενο. Τα "νεαρά" κόκκινα κρασιά έχουν σχετικά υψηλά επίπεδα προκυανιδινών και ανθοκυανινών που προσδίδουν στο κρασί μια μωβ απόχρωση. Καθώς το κρασί ωριμάζει, αυτά τα επίπεδα μειώνονται καθώς σχηματίζονται πιο σταθερές κοκκινο-πορτοκαλόχρωμες χρωστικές. Η συσσώρευση προκυανινών συντελεί στην πτώση των ουσιών αυτών κι έτσι τα ώριμα κρασιά έχουν λιγότερο στυφή γεύση (Dreosti, 2000).

Α.2.4.2. Μπύρα

Στη μπύρα περιέχονται διάφορα φαινολικά οξέα. Σε μεγαλύτερη αναλογία απαντώνται το μ-κουμαρικό, το φερουλικό, το ο-κουμαρικό, το π-κουμαρικό και το 3-υδρόξυ-βενζοϊκό. Σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονται το βανιλλικό, το χλωρογενικό, το ομοβανιλλικό, το ρ-υδρόξυ-βενζοϊκό, το 2,6-διυδρόξυ-βενζοϊκό, το συρινγκικό, το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό, το καφεϊκό και το 3,5-διυδρόξυ-βενζοϊκό οξύ (Montanari *et al*, 2000).

Α.2.5. Όσπρια

Οι φακές αποτελούν σημαντικό τρόφιμο για τους ανθρώπους στις μεσογειακές χώρες. Οι φακές είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες, σύνθετους υδατάνθρακες, άμυλο και διαιτητικές ίνες. Παρόλα αυτά περιέχουν και ορισμένους αντιδιατροφικούς παράγοντες όπως είναι οι αναστολείς θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, το φυτικό οξύ, οι συμπυκνωμένες ταννίνες, σαπωνίνες κ.ά. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες της τροφής και έχουν ανασταλτική δράση έναντι των πεπτικών ενζύμων. Επίσης μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του περιεχομένου σιδήρου στις φακές. Παρόλα αυτά, η παρουσία των ταννινών και γενικότερα των φαινολικών συστατικών έχει συσχετισθεί με προστατευτική δράση έναντι των οξειδωτικών βλαβών που συμβαίνουν στο ανθρώπινο σώμα. Στον πίνακα 10 φαίνεται η σύσταση της ωμής φακής σε φαινολικά συστατικά.

Πίνακας 10. Περιεχόμενα φαινολικά συστατικά στη φακή (Bartolomé *et al*, 1997)

Φαινολικό συστατικό	**Ποσότητα (μg / g ξηρής ωμής φακής)**
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,36 ± 0,04
Πρωτοκατεχική αλδεϋδη	0,13 ± 0,02
π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	1,48 ± 0,10
B_3 [κατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	8,65 ± 0,69
B_1 [επικατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	4,44 ± 0,31
T_2 [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	3,42 ± 0,25
(+) – κατεχίνη	7,31 ± 0,54
Παράγωγο του π-κουμαρικού οξέος	0,74 ± 0,09
T_3 [επικατεχίνη-(4→6)-επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	1,30 ± 0,11
B_2 [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	5,66 ± 0,41
Βανιλλίνη	0,12 ± 0,02
C_1 [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	0,22 ± 0,04
π-κουμαρικο οξύ	7,51 ± 0,62
T_4 (τετραμερές προκυανιδίνης)	0,32 ± 0,03
Φερουλικό οξύ	0,06 ± 0,02

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

Α.3. Αντιοξειδωτικά και Υγεία

Τα τελευταία 5 χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες παγκοσμίως που αφορούν τις θετικές επιδράσεις της τροφής στην υγεία. Ολοένα αυξανόμενη έμφαση έχει δοθεί στις διεργασίες που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο (Colic and Pavelic, 2000). Ενδιαφέρον επίσης έχει αναπτυχθεί για το ρόλο της οξειδωτικής / αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στη διαδικασία της γήρανσης και των εκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης. Τα εν δυνάμει ενεργά συστατικά φρούτων, λαχανικών, βοτάνων, ριζών και φύλλων έχουν μελετηθεί εκτεταμένως. Προσοχή έχει δοθεί στα μη διατροφικά συστατικά φυτικής προελεύσεως όπως τσάι, καρυκεύματα και βότανα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο πολυφαινόλες και ειδικά τα φλαβονοειδή έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δύναμη που προστατεύει τα κύτταρα από την βλαπτική επίδραση των ελεύθερων ριζών (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.1. Αντιοξειδωτικά και καρκίνος

Η καρκινογένεση εμπεριέχει μια παρατεταμένη συσσώρευση βλαβών σε διάφορα βιολογικά επίπεδα που περιλαμβάνουν τόσο γενετικές όσο και βιοχημικές αλλαγές στα κύτταρα. Σε καθένα από αυτά τα επίπεδα υπάρχει δυνατότητα παρέμβασης ώστε να εμποδιστεί, να μειωθεί ή και να σταματήσει η εκφύλιση των κυττάρων. Η τροποποίηση της δίαιτας είναι ένας τρόπος παρέμβασης. Υπάρχουν διάφορα διατροφικά στοιχεία που έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία καθώς και μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η παρατήρηση ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μειώνεται με την κατανάλωση διαιτών πλούσιων σε φρούτα, λαχανικά και πράσινο τσάι έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα φυτικά συστατικά έχουν προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης του DNA (Abdulla and Gruber, 2000). Μάλιστα, πιστεύεται ότι οι διαιτητικές πολυφαινόλες έχουν προστατευτικές και θεραπευτικές ικανότητες όσον αφορά στις σχετιζόμενες με οξειδωτικές βλάβες παθήσεις (Ciovannelli *et al*, 2000; Shankel *et al*, 2000).

Α.3.1.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα πειραματικής καρκινογενέσεως. Φαίνεται ότι ποικίλοι περιβαλλοντικοί, χημικοί και μεταβολικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στη μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει διάφορα στάδια με τα οποία:

1) το γενετικό υλικό του κυττάρου τροποποιείται (μέσω μεθυλιώσεως ή οξειδώσεως των βάσεων του DNA) ή με τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων ή προσθήκης βάσεων
2) τα ένζυμα επανορθώσεως του DNA τροποποιούνται και δεν μπορούν να δράσουν
3) ο μηχανισμός της κυτταρικής αποπτώσεως τροποποιείται ή / και καθίσταται ανενεργός
4) εκφράζονται διάφορα γονίδια (ογκογονίδια) τα οποία τροποποιούν το μηχανισμό διαβιβάσεως του σήματος
5) στην εξέλιξη της καρκινικής νόσου όλοι οι μηχανισμοί αυτοί αυτοτροφοδοτούνται και ενισχύονται.

Έτσι, η καρκινική νόσος θεωρείται ότι είναι μια πολυπαραγοντική συνάθροιση παραγόντων και μηχανισμών οι οποίοι οδηγούν στον άναρχο και απρογραμμάτιστο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενός ιστού (Καστανάς, 2002).

Α.3.1.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού

Οι κατεχίνες του τσαγιού έχουν δείξει τη μεγαλύτερη αντικαρκινική ικανότητα (Colic and Pavelic, 2000).

Υπάρχουν 3 προτεινόμενοι μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης για τις κατεχίνες του τσαγιού:

1) Οι κατεχίνες, λόγω της κατεχολικής δομής τους δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα και έτσι μειώνονται τα επίπεδα τα ελεύθερων κυτταρικών Fe^{+2} και Fe^{+3} τα οποία απαιτούνται για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών.
2) Οι κατεχίνες του τσαγιού είναι δεσμευτές των υπεροξειδικών και υδροξυλικών ριζών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA καθώς και σε άλλα μόρια.
3) Οι κατεχίνες παγιδεύουν τις υπεροξειδικές ρίζες και έτσι εμποδίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Zhu *et al*, 2001).

Α.3.1.3. Καρκίνος δέρματος

Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι τοπική εφαρμογή ή ένεση με πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού ή EGCG εμποδίζουν την έναρξη της καρκινογένεσης και την προώθηση από χημικές καρκινογόνες ουσίες και UV ακτινοβολία. Επιπρόσθετα η καφεΐνη του τσαγιού έχει βρεθεί ότι έχει χημειοπροστατευτική δράση έναντι της προκαλούμενης από UVb ακτινοβολία καρκινογένεσης (Dufresne and Farnworth, 2001; Ichihashi *et al*, 2000; Katiyar *et al*, 2001). Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε ντεκαφεϊνέ μαύρο τσάι δε εμποδίστηκε η καρκινογένεση από UVb ακτινοβολία ή από χημικό προωθητή. Οι διαδικασίες απομάκρυνσης της καφεΐνης ίσως συντελούν στην παραγωγή τοξικών προϊόντων. Η βιοενεργοποίηση και ο μεταβολισμός μεταλλαξιογόνων και προμεταλλαξιογόνων που χορηγήθηκαν per oz σε ποντίκια ρυθμίζονται από το πράσινο και το μαύρο τσάι, και η καφεΐνη φαίνεται ότι είναι το ενεργό συστατικό. Τοπική εφαρμογή κλάσματος πολυφαινολών πράσινου τσαγιού σε δέρμα ποντικιών μπορεί να μειώσει την μετατροπή των καλοήθων όγκων σε κακοήθεις. Η από του στόματος χορήγηση πράσινου τσαγιού, μαύρου τσαγιού ή EGCG εμπόδισε την περαιτέρω ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί και υποχώρηση του καρκίνου (Dufresne and Farnworth, 2001). Βάσει των θετικών επιδράσεων του πράσινου τσαγιού στο δέρμα ποντικιών πολλές φαρμακευτικές εταιρείες και εταιρείες καλλυντικών ενισχύουν τα προϊόντα περιποίησης δέρματος με εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού (Katiyar and Elmets, 2001). Πιστεύεται ότι η χρήση αυτών των εκχυλισμάτων σε συνδυασμό με αντηλιακά και σωστή επιμόρφωση ίσως αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση της εμφάνισης καρκίνου του δέρματος σε ανθρώπους (Ahmad and Mukhtar, 2001).

Α.3.1.4. Καρκίνος πνευμόνων

Μελέτες σε ποντίκια για την επίδραση του μαύρου και πράσινου τσαγιού στην ανάπτυξη καρκίνου των πνευμόνων έχουν δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των πνευμονικών καρκίνων σε ποντίκια που τους δόθηκε πράσινο τσάι, μαύρο τσάι, EGCG ή ντεκαφεϊνέ τσάι πριν από την έναρξη της καρκινογένεσης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και με χορήγηση ενός καρκινογόνου του καπνού [4-(μεθυλονιτροσάμινο)-1-(3-περίδυλ)-1-βουτανόνη, (NNK)] (Dufresne and Farnworth, 2001; Yang *et al*, 1999). Οι EGCG, EGC και η διγαλλική–3-3'-θεαφλαβίνη είναι τα κυριότερα δραστικά συστατικά.

Α.3.1.5. Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος και άλλες μορφές καρκίνου

Έχει προταθεί ότι η κατανάλωση τσαγιού έχει προστατευτική δράση έναντι των διαφόρων μορφών καρκίνου (Trevisanato and Kim, 2000). Μάλιστα επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση τσαγιού ίσως μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Hakim *et al*, 2001; Weisburger, 2000). Έτσι, υψηλές δόσεις θειαφλαβίνης, πολυφαινολών μαύρου και πράσινου τσαγιού ή EGCG μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στον οισοφάγο ποντικιών παρέχοντας αντικαρκινική προστασία στα τρωκτικά (Dufresne and Farnworth, 2001; Muto *et al*, 2001). Σε άλλη μελέτη πάλι, αναφέρθηκε η εμφάνιση και ο πολλαπλασιασμός του καρκίνου σε ποντίκια τα οποία λάμβαναν χαμηλές δόσεις ντεκαφεϊνέ μαύρου ή πράσινου τσαγιού (Dufresne and Farnworth, 2001). Το εύρημα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα μιας Ιαπωνικής έρευνας σύμφωνα με την οποία η κανονική κατανάλωση πράσινου τσαγιού δεν σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου (Nagano *et al*, 2001).

Δίαιτες με υψηλή πρόσληψη αλατιού και χαμηλή πρόσληψη λαχανικών και τσαγιού ίσως προκαλούν καρκίνο του στομάχου (Weisburger, 2000). Επιπροσθέτως, τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού εμποδίζουν τον χημικώς προκαλούμενο καρκίνο του στομάχου σε ποντίκια (Dufresne and Farnworth, 2001; Abdula and Gruber, 2000).

Όσον αφορά στον καρκίνο στο κόλον, μια μελέτη αναφέρει ότι το τσάι απέτυχε να μειώσει την εμφάνιση ή τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου στο κόλον, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν μείωση των κακοήθων όγκων με κατανάλωση εκχυλίσματος μαύρου τσαγιού και υψηλής δόσης EGCG (Dufresne and Farnworth, 2001). Πάντως τα φλαβονοειδή έχουν αντιβλαστικές ιδιότητες έναντι των καρκινικών κυττάρων (Kuntz *et al*, 1999). Η EC έχει δείξει τη μικρότερη επίδραση σε σχέση με τις ECG και EGCG (Uesato *et al*, 2001). Το μαγειρεμένο κρέας περιέχει ετεροκυκλικές αμίνες που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση καρκίνου σε τρωκτικά και ανθρώπους. Αυτό μπορεί να παρεμποδιστεί με χορήγηση πολυφαινολών μαύρου και πράσινου τσαγιού καθώς και EGCG. Στο παχύ έντερο ποντικιών η χορήγηση πολυφαινολών πράσινου τσαγιού μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου.

Οι ευεργετικές επιδράσεις του τσαγιού σε σχέση με τον καρκίνο του ήπατος έχουν παρατηρηθεί σε αρουραίους, ποντίκια ή χάμστερ (Dufrense and Farnworth, 2001). Συγκεκριμένα τα φαινολικά συστατικά του μαύρου τσαγιού και του κόκκινου κρασιού έχουν προστατευτική δράση έναντι των οξειδωτικών βλαβών του DNA (Anderson *et al*, 2001; Lodovici *et al*, 2001; Russo *et al*, 2000; Shi *et al*, 2000).

Δύο άλλες μορφές καρκίνου στις οποίες επιδρά θετικά το τσάι είναι ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη. Έχει δειχθεί ότι ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκια με

EGCG – αλλά όχι άλλες κατεχίνες – εμποδίζει την αύξηση και μειώνει το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων σε στήθος και προστάτη (Dufresne and Farnworth, 2001). Επιπρόσθετα ασθενείς με καρκίνο μαστού που κατανάλωναν ημερησίως περισσότερα από 5 φλιτζάνια πράσινου τσαγιού είχαν μικρότερο ρυθμό επανεμφάνισης καρκίνου σε σχέση με αυτούς που κατανάλωναν λιγότερα από 4 φλιτζάνια (Fujiki, 1999; Suganuma, 1999). Όσον αφορά στον καρκίνο του προστάτη έχει δειχθεί ότι οι χορτοφάγοι έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σε σχέση με μη χορτοφάγους (De la Taille *et al*, 2001; Norrish *et al*, 2000).

Στον πίνακα 11 συνοψίζονται οι επιδράσεις του τσαγιού και των συστατικών τους στα διάφορα στάδια του καρκίνου σε μοντέλα ζώων.

Πίνακας 11. Επιδράσεις τσαγιού στον καρκίνο (Dufresne and Farnworth, 2001)

Ανάπτυξη Καρκίνου →		
	Καρκίνος Δέρματος	
Έναρξη	Προώθηση	Εξάπλωση
πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού	EGCG	EGCG
μαύρο τσάι	πράσινο τσάι	πράσινο τσάι
πολυφαινόλες τσαγιού	μαύρο τσάι	μαύρο τσάι
καφεΐνη		πολυφαινόλες μαύρου τσαγιού
	Καρκίνος Πνευμόνων	
Έναρξη	Προώθηση	Εξάπλωση
	πράσινο τσάι	πράσινο τσάι
		μαύρο τσάι
	Καρκίνος Πεπτικού Συστήματος / Άλλες Μορφές Καρκίνου	
Έναρξη	Προώθηση	Εξάπλωση
EGCG	EGCG	πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού
	μαύρο τσάι	EGCG
	πράσινο τσάι	πολυφαινόλες μαύρου τσαγιού

Εκτός από το τσάι και τα συστατικά του σημαντική είναι η επίδραση και των πολυφαινολών του ελαιολάδου στον καρκίνο. Υψηλή κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου το οποίο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχει σημαντική προστασία έναντι του καρκίνου διότι εμποδίζει το οξειδωτικό στρες (Owen *et al*, 2000).

Α.3.2. Αντιοξειδωτικά και καρδιαγγειακά νοσήματα

Η εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες και μπορεί να ρυθμιστεί από τα συστατικά της δίαιτας. Μια μεγάλη προοπτική έρευνα που διεξήχθη σε 7 χώρες έδειξε ότι η μέση πρόσληψη φλαβονόλων και φλαβόνων σχετίζεται αντιστρόφως με τη θνητότητα από στεφανιαία νόσο (Dufrense and Farnworth, 2001; Hirvonen *et al*, 2001). Πιστεύεται ότι η κατανάλωση τσαγιού ίσως έχει προστατευτική επίδραση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα φλαβονοειδή του τσαγιού προστατεύουν την LDL-χοληστερόλη από οξειδωτικές βλάβες (Langley – Evans, 2001; Cheng, 2000; Giugliano, 2000; Hodgson, 2000; Vinson, 2000). Η σειρά της αντιοξειδωτικής ικανότητας έναντι της οξείδωσης της LDL είναι:

διγγαλική θειαφλαβίνη > θειαφλαβίνη ≥ γαλλικό εστέρα επιγαλλοκατεχίνης > επιγαλλοκατεχίνη > γαλλικό οξύ (Yoshida *et al*, 1999).

Παρόλα αυτά η κατανάλωση τσαγιού δεν είχε καμία επίδραση στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά σε καπνιστές (De Maat *et al*, 2000).

Η βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη κατανάλωση μαύρου τσαγιού αντιστρέφει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Το εύρημα αυτό εξηγεί εν μέρει την συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης τσαγιού και της μειωμένης εμφάνισης καρδιαγγειακών (Duffy *et al*, 2001). Σύμφωνα με άλλη μελέτη όπου οι εθελοντές κατανάλωσαν ποσότητα μαύρου τσαγιού ισοδύναμη με 6 φλιτζάνια, δε βρέθηκε αύξηση της αντίστασης του πλάσματος όσον αφορά στην οξείδωση των λιπών (Cherubini *et al*, 1999).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε άτομα που καταναλώνουν μέτρια ποσότητα κρασιού καθημερινώς μειώνεται σημαντικά η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με άτομα που απέχουν από τη κατανάλωση αλκοόλ ή καταναλώνουν υπερβολική ποσότητα. Τα μόρια που υπάρχουν στο σταφύλι και στο κρασί τροποποιούν τον κυτταρικό μεταβολισμό που συνδέεται με μείωση της αρτηριακής πίεσης (German and Walzem, 2000). Οι θετικές επιδράσεις του κρασιού στην υγεία διαφαίνονται και από το λεγόμενο «Γαλλικό Παράδοξο» όπου οι Γάλλοι παρόλο που καταναλώνουν δίαιτα υψηλή σε κορεσμένα έχουν χαμηλή θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, εξαιτίας της συστηματικής κατανάλωσης κόκκινου κρασιού (Dreosti, 2000; Russo *et al*, 2000; Serafini *et al*, 2000).

Η Μεσογειακή δίαιτα έχει επίσης συσχετισθεί με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Visioli *et al*, 1997). Αυτή η δίαιτα είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και

ελαιόλαδο. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, εκτός από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχει και φαινολικά αντιοξειδωτικά τα οποία συμβάλλουν εν μέρει στις καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις της Μεσογειακής δίαιτας (Visioli and Galli, 2001; Wiseman *et al*, 1996). Βέβαια το ελαιόλαδο καταναλώνεται μαζί με λαχανικά. Έχει δειχθεί ότι κατανάλωση τομάτας μαζί με ελαιόλαδο –αλλά όχι με ηλιέλαιο – βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (Lee *et al*, 2000). Επιπλέον, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική επίδραση στην LDL-χοληστερόλη σε σχέση με το ραφιναρισμένο ελαιόλαδο (Fitó *et al*, 2000).

Α.3.2.1. Υπέρταση

Η υψηλή πίεση, που ορίζεται ως συστολική πίεση μεγαλύτερη από 140mmHg και διαστολική μεγαλύτερη από 90mmHg, έχει επηρεάσει εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο (Moline *et al*, 2000). Η παθογένεση της υπέρτασης αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακές επιπλοκές. Η ισορροπία στο ενδοθήλιο μεταξύ αγγειοσυσταλτικών και αγγειοδιασταλτικών ουσιών συντελεί στην αγγειακή αντίσταση και στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο συστολή. Τα αντιοξειδωτικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία της ενδοθηλιακής λειτουργίας. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή, και κυρίως η κερσετίνη, έχουν χαλαρωτική επίδραση στη συστολή των αορτικών αγγείων σε ποντίκια. Σε μια επιδημιολογική μελέτη η κατανάλωση μαύρου τσαγιού σχετίστηκε αντιστρόφως με τη συστολική πίεση. Πάντως, η κατανάλωση μαύρου ή πράσινου τσαγιού σε μέτριες ποσότητες δεν βελτίωσε την πίεση σε ανθρώπους (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3. Προστατευτικές επιδράσεις του τσαγιού σε άλλες ασθένειες

Α.3.3.1 Νεφρικές παθήσεις

Η νεφρική υπέρταση είναι μια μορφή υπέρτασης που σχετίζεται με συστολή της νεφρικής αρτηρίας ή με βλάβες στα νεφρά. Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού συντελούν στη μείωση της πίεσης βελτιώνοντας έτσι τη νεφρική λειτουργία σε ποντίκια. Επίσης οι κατεχίνες αυξάνουν την έκκριση νατρίου και βελτιώνουν την αιματική κυκλοφορία στα νεφρά. Σε ποντίκια που έχουν υποστεί νεφρεκτομή, οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού εμποδίζουν την πρόοδο της νεφρικής ανεπάρκειας και ανακουφίζουν από τις σπειραματικές σκληρωτικές βλάβες. Επιπροσθέτως, ποντίκια που λάμβαναν πράσινο τσάι πριν υποστούν

νεφροπάθεια είχαν χαμηλότερα επίπεδα ουρίας, αζώτου και κρεατίνης ούρων καθώς και χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης και γλυκόζης στα ούρα γεγονός που υποδηλώνει μείωση των αρνητικών επιπτώσεων του νεφρού που υπολειτουργεί (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3.2. Διαβήτης

Το πράσινο τσάι μπορεί να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης αίματος σε γηρασμένους αρουραίους. Το τσάι εμποδίζει τη δραστηριότητα των μεταφορέων γλυκόζης στο εντερικό επιθήλιο και πιστεύεται ότι ελαττώνει τη διαιτητική πρόσληψη γλυκόζης (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3.3. Προστασία δέρματος και οφθαλμών

Ο ιστός του δέρματος έχει υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και είναι ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες από εξωγενείς και ενδογενείς πηγές. Οι πολυφαινόλες του μαύρου τσαγιού παρέχουν προστασία έναντι του ερυθήματος και της φλεγμονής του δέρματος που προκαλείται από UVb ακτινοβολία τόσο σε ποντίκια όσο και στον άνθρωπο. Οι EGCG και ECG εμποδίζουν την δράση της 5-α-ρεδουκτάσης η οποία σχετίζεται με εξαρτώμενες από ανδρογόνα δερματολογικές διαταραχές όπως η ακμή.

Το μάτι είναι επίσης ευαίσθητο σε βλάβες από ακτινοβολία, οξυγόνο, χημικά, μολυσματικούς παράγοντες και γήρας. Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού όπως η EGCG προστατεύουν τον οπτικό φακό λαγών από το φωτοοξειδωτικό στρες που προκαλείται από UVa ακτινοβολία (Dufresne and Farnworth, 2001). Επίσης, η χορήγηση πράσινου ή μαύρου τσαγιού σε ποντίκια είχε καταρρακτοστατική επίδραση (Thiagarajan, 2001).

Α.3.3.4. Αντιισταμινικές και αντιαρθριτικές επιδράσεις του τσαγιού

Η έκκριση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα (mast cells) σχετίζεται με φλεγμονή, δερματίτιδα, μαστοκυττάρωση και άσθμα σε περιπτώσεις αλλεργίας από περιβαλλοντικά αντιγόνα. Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του, το τσάι έχει αντιισταμινική επίδραση στα περιτοναϊκά μαστοκύτταρα (Yamada and Tachibana, 2000). Η EGCG μπορεί να μειώσει την έκκριση ισταμίνης έως και 90% σε καλλιέργεια κυττάρων αρουραίων. Αυτό ίσως οφείλεται στο τριφαινολικό τμήμα του μορίου. Η κερσετίνη έχει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα και προκαλεί δοσοεξαρτώμενη παρεμπόδιση της έκκρισης ισταμίνης. Επίσης η

κερσετίνη εμποδίζει την πρωτεϊνική κινάση C, ένα ένζυμο απαραίτητο για την ενεργοποίηση της εκκριτικής διαδικασίας.

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού μειώνουν σημαντικά το ενδεχόμενο εμφάνισης αρθρίτιδας με σημαντική μείωση των μεσολαβητών φλεγμονής στις αρθρώσεις ποντικιών (Dufresne and Farnworth, 2001). Ακόμη, υψηλές δόσεις αντιοξειδωτικών έχει αναφερθεί ότι έχουν θετικές επιδράσεις στην οστεοαρθρίτιδα (Darlington and Stone, 2001).

Α.3.3.5. Αντιβακτηριδιακές επιδράσεις του τσαγιού

Το εκχύλισμα μαύρου τσαγιού επηρεάζει την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα επιταχύνοντας το χρόνο διέλευσης σε ποντίκια. Οι κατεχίνες του τσαγιού επίσης, βελτιώνουν την δραστηριότητα του παχέως εντέρου. Τα εκχυλίσματα τσαγιού εμποδίζουν τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών όπως *Vibrio cholerae, Salmonella typhi, Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Helicobacter pylori, Shigella, Salmonella, Clostridium, Pseudomonas, Candida, Mycoplasma και Cryptococcus*. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για τα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη. Γενικά, τα κατά Gram-θετικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στα εκχυλίσματα τσαγιού από τα κατά Gram–αρνητικά. Το τσάι μπορεί να επιδράσει και στο μεταβολισμό, τροποποιώντας τα βακτήρια του εντέρου. Έτσι, η κατανάλωση τσαγιού οδηγεί σε μείωση των εντεροβακτηρίων που παράγουν αμμωνία και άλλες βλαβερές αμίνες και σε αύξηση των γαλακτοβάκιλλων και bifido-βακτηρίων τα οποία παράγουν οργανικά οξέα και μειώνουν το εντερικό pH. Το τσάι μπορεί ακόμα να εμποδίσει την αύξηση του *Staphylococcus aureus* και του *Vibrio parahaemolyticus* που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση χολέρας και διαρροϊκών ασθενειών (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3.6. Επιδράσεις του τσαγιού σε οδοντικά προβλήματα

Το πράσινο τσάι, ο EGCG και η ECG εμποδίζουν την προσκόλληση και την αύξηση βακτηρίων στην επιφάνεια των δοντιών. Τα αρωματικά συστατικά του τσαγιού παρουσιάζουν συνεργιστική δράση για την εμπόδιση της αύξησης του *Streptococcus mutans*. Ο EGCG επίσης εμποδίζει την ανάπτυξη και προσκόλληση του *Porphyromonas gingivalis*, ενός βακτηρίου που είναι υπεύθυνο για περιοδοντικές ασθένειες (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3.7. Επιδράσεις του τσαγιού κατά των ιών

Το τσάι έχει ευεργετικές επιδράσεις έναντι των μολύνσεων από ιούς. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ρετροϊού (rotavirus) σε καλλιέργειες κυττάρων πιθήκων και του ιού της γρίπης Α σε καλλιέργειες κυττάρων ζώων. Έχει αναφερθεί ότι διάφορα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων των EGCG και ECG, εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ρετροϊού της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV), εμποδίζοντας τη δράση της ανάστροφης μεταγραφάσης, ενός ενζύμου που επιτρέπει την εγκατάσταση του ιού στα κύτταρα – ξενιστές.

Α.3.3.8. Μεταβολικές επιδράσεις του τσαγιού

Η κατανάλωση μαύρου τσαγιού μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα του μυελού από τα κυτταροτοξικά άλατα χρωμίου και αρσενικού σε ποντίκια μειώνοντας τη χρωμοσωμική διαταραχή που προκαλείται από τα άλατα αυτά. Ο EGCG και η ECG έχουν κυτταροπροστατευτική δράση έναντι της ηπατοτοξικότητας από κινόνη που επιτυγχάνεται μέσω μείωσης της διαφυγής της γαλακτικής δεϋδρογενάσης. Τα γλυκοζιτικά φλαβονοειδή του πράσινου τσαγιού εμποδίζουν την αύξηση των επιπέδων αλανίνης και αμινοτρανσφερασών ασπαρτικού που προκαλούνται από την D-γαλακτοζαμίνη κι έτσι εμποδίζουν τις ηπατικές βλάβες σε αρουραίους. Σε αρουραίους που λαμβάνουν πράσινο ή μαύρο τσάι έχει παρατηρηθεί αύξηση του αριθμού των ηπατικών υπεροξειδιοσωμάτων και αύξηση της υδοξυλίωσης του λαυρικού οξέος στο μικρόσωμα. Η πρόσληψη πράσινου τσαγιού, EGCG και καφεΐνης πρίν από τη λήψη αιθανόλης σε ποντίκια βελτίωσε το μεταβολισμό μειώνοντας τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεΰδης στο αίμα και στο ήπαρ. Χορήγηση EGCG με μορφή ένεσης σε αρουραίους οδηγεί σε μείωση της πρόσληψης τροφής, του σωματικού βάρους, των επιπέδων τεστοστερόνης, οιστραδιόλης, λεπτίνης, ινσουλίνης, IGF-I, γλυκόζης, χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων στο αίμα. Το τσάι ίσως επιδρά και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Έχει δειχθεί ότι η κατανάλωση μισού φλιντζανιού τσάι ή περισσοτέρων ημερησίως διπλασιάζει τις πιθανότητες σύλληψης κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.3.9. Νευρολογικές και φυσιολογικές επιδράσεις τσαγιού

Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι το τσάι μπορεί να βελτιώσει νευρολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες. Ένεση τσαγιού οδηγεί σε ταχεία αύξηση της εγρήγορσης και της ικανότητας επεξεργασίας πληροφοριών. Αυτές οι επιδράσεις δεν οφείλονται εξ' ολοκλήρου στην καφεΐνη. Η θεοφυλλίνη δρα ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και μειώνει

σημαντικά την πίεση σε υπερτασικούς αρουραίους. Η θεοφυλλίνη τροποποιεί τα επίπεδα σεροτονίνης και ντοπαμίνης βελτιώνοντας έτσι την μνήμη, την ικανότητα εκμάθησης και επηρεάζοντας τα συναισθήματα. Έχει δειχθεί πάντως, ότι η προσθήκη καφείνης σε ροφήματα βελτιώνει τη διάθεση και μειώνει την ανησυχία 30 με 60min μετά την κατανάλωση (Quinlan *et al*, 1997).

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, διάλειμμα για τσάι στη δουλειά σχετίζεται με χαλάρωση στις γυναίκες. Δίαιτες πλούσιες σε αντιοξειδωτικά εμποδίζουν τη μείωση των νευρωνικών λειτουργιών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Επίσης καθυστερούν τις απώλειες σε επίπεδο κεντρικού νευρικού συστήματος που σχετίζονται με την γήρανση (Dufresne and Farnworth, 2001). Ορισμένα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τους νευρώνες από το οξειδωτικό στρες το οποίο σχετίζεται με τη νόσο Parkinson και Alzheimer (Ishige *et al*, 2001). Παρόλα αυτά το τσάι δεν έχει αξιολογηθεί όσον αφορά στη θεραπεία αυτών των παθήσεων.

Κατά την διαδικασία της γήρανσης, φαίνεται ότι χάνεται η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα να αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Τα αντιοξειδωτικά της δίαιτας απαλύνουν τις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες και των σχετιζόμενων με την ηλικία ασθενειών (Dufresne and Farnworth, 2001).

Α.3.4. Χρήση τσαγιού ως πρόσθετο τροφίμων

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό ή σε μαγειρεμένα προϊόντα αντικαθιστώντας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

Τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού παρέχουν αποτελεσματική προστασία κατά της οξείδωσης σε διαλύματα ελαίου – νερού με pH 5,5 κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, απουσία ιόντων σιδήρου. Η προσθήκη πολυφαινολών πράσινου τσαγιού σε χυμούς ή άλλα τρόφιμα βελτιώνει την ποιότητά τους. Τα εκχυλίσματα τσαγιού προστίθενται σε τσίχλες και καραμέλες ώστε να μειώνουν τα οδοντικά προβλήματα και να αρωματίζουν την αναπνοή από οσμές σκόρδου, ψαριών (τριμεθυλαμίνη), μεθυλικής μερκαπτάνης, αμμωνίας και καπνού. Η L- θεοφυλλίνη μπορεί να προστεθεί σε ροφήματα, μπισκότα, καραμέλες ή παγωτά για να προκαλέσει χαλάρωση και για να καλύψει την πικρή γεύση σε ορισμένα τρόφιμα (Dufresne and Farnworth, 2001). Σε επίπεδο επάρκειας αντιοξειδωτικών, συμπληρώματα θα πρέπει να δίδονται μόνο όταν η διατροφή δεν μπορεί να καλύψει τις αποκτήσεις του οργανισμού (Giugliano, 2000).

Α.3.5. Αντιοξειδωτικά και ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ)

Οι ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας έχουν πληθώρα παθήσεων και υψηλή θνησιμότητα παρά την υποστήριξη οργάνων που τους παρέχεται. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου πιστεύεται ότι κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση των οργανικών δυσλειτουργιών. Οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών έχουν καλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με άλλους ασθενείς που έχουν χαμηλότερα επίπεδα. Παρόλα αυτά, μονοθεραπεία με αντιοξειδωτικά σε ασθενείς σε ΜΕΘ μάλλον δε θα είχε αποτέλεσμα αν αναλογιστεί κανείς τις πολύπλοκες παθοφυσιολογικές καταστάσεις που αντιμετωπίζονται στη ΜΕΘ. Τα αντιοξειδωτικά θα πρέπει να αποτελούν μέρος μιας λογικής συνολικής θεραπευτικής αγωγής (Coleman, 2001).

Στην Ανατολική παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιούνται εδώ και εκατοντάδες χρόνια διάφορα φυτά και μπαχαρικά που περιέχουν φλαβονοειδή. Παρόλα αυτά στη Δυτική ιατρική δεν έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί, αν και το ιστορικό ασφάλειάς τους είναι εξαιρετικό (Middleton *et al*, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

Α.4. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το μέρος από τη συνολική προσληφθείσα ποσότητα ενός θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται για τις φυσιολογικές σωματικές λειτουργίες (Fairweather – Tait, 1999). Τα στοιχεία που υπάρχουν για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών τσαγιού ή των φρούτων και λαχανικών είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Τροχοπέδη αποτελεί η έλλειψη ευαίσθητων οργάνων για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών καθώς και των μεταβολιτών τους στα φυσιολογικά υγρά (Prior and Cao, 1999).

Α.4.1. Διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών

Η μέση ημερήσια πρόσληψη το 1970 στην Αμερική είχε υπολογιστεί ότι είναι 1-1,1gr/ημέρα (εκφρασμένο ως γλυκοσίδες), ανάλογα με την εποχή (Wollgast and Anklam, 2000; Scalbert and Williamson, 2000). Παρόλα αυτά, τα ανωτέρω στοιχεία θεωρούνται αναξιόπιστα λόγω ελλιπούς προσδιορισμού της διαιτητικής πρόσληψης. Πρόσφατα, υπολογίστηκε βάσει 5 φλαβονόλων και φλαβονόνων η πρόσληψη φλαβονοειδών στην Ολλανδική δίαιτα, η οποία βρέθηκε ότι είναι 23 mg/ημέρα. Στη Δανία η πρόσληψη φλαβονοειδών υπολογίστηκε ότι είναι 28 mg/ημέρα (βάσει φλαβονόλων, φλαβονόνων και φλαβανόνων). Αξιοσημείωτο είναι ότι αυτές οι εκτιμήσεις δεν περιλαμβάνουν κατεχίνες (φλαβανόλες) και / ή προανθοκυανιδίνες. Η πρόσληψη αυτών των συστατικών ίσως έχει μεγάλη ποσοτική σημασία, αφού βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο τσάι, στο κρασί και στο κακάο τα οποία καταναλώνονται συχνά στις Δυτικές χώρες (Wollgast and Anklam, 2000).

Α.4.2. Πέψη πολυφαινολών

Πολλοί συγγραφείς διαχωρίζουν τις πολυφαινόλες για διατροφικούς σκοπούς σε "εκχυλιζόμενες" (EPP) και "μη-εκχυλιζόμενες" (NEPP). Οι EPP είναι φαινόλες χαμηλού και μέτριου μοριακού βάρους και συμπεριλαμβάνουν και ορισμένες υδρολυόμενες ταννίνες και προανθοκυανιδίνες που μπορούν να εκχυλιστούν με τη χρήση διαφόρων διαλυτών όπως είναι το νερό, η αιθανόλη και η μεθανόλη. Οι NEPP είναι συστατικά ή φαινόλες μεγάλου

μοριακού βάρους που προσδένονται σε διαιτητικές ίνες ή πρωτεΐνες και παραμένουν αδιάλυτες στους συνήθειες διαλύτες. Μελέτες σε ζώα και *in vitro* πειράματα με πεπτικά ένζυμα έχουν δείξει ότι ορισμένες πολυφαινόλες – κυρίως NEPP – δεν είναι βιοδιαθέσιμες. Οι NEPP από το περικάρπιο χαρουπιού έχει βρεθεί ότι κατά 98% αποβάλλονται στα περιττώματα των αρουραίων γεγονός που επιβεβαιώνει την αντίσταση αυτών των συστατικών στην εντερική πέψη και απορρόφηση καθώς επίσης και στην αποδόμηση από τη μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου. Οι EPP αντιθέτως απεκκρίθηκαν σε μικρές ποσότητες που σημαίνει ότι υπόκεινται σε εκτενή πέψη, απορρόφηση και βακτηριδιακή αποδόμηση.

Α.4.3. Απορρόφηση πολυφαινολών

Εκτός από τη διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών, σημαντικό είναι να γνωρίζουμε και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, αφού η διατροφική τους σημασία και οι συστηματικές επιδράσεις τους εξαρτώνται από την συμπεριφορά τους στον πεπτικό σωλήνα. Παρόλα αυτά οι διαθέσιμες πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση των πολυφαινολών στον άνθρωπο είναι ελάχιστες (Wollgast and Anklam, 2000). Η εντερική απορρόφηση και μεταφορά των φλαβονοειδών αποτελεί περιοχή με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Μέχρι τώρα πιστεύονται ότι μόνο οι αγλυκόνες τυγχάνουν απορρόφησης σε περιορισμένο βαθμό από το παχύ έντερο (Boyle *et al*, 2000). Από μελέτες βασισμένες σε πειραματόζωα είχε εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα φλαβονοειδή της τροφής δεν μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο γιατί σχηματίζουν γλυκοσίδες με σάκχαρα (με εξαίρεση τις κατεχίνες). Μόνο τρία φλαβονοειδή χωρίς μόριο σακχάρου (αγλυκόνες) θεωρούνται ότι μπορούσαν να περάσουν το εντερικό τοίχωμα αφού στο έντερο ή στα εντερικά τοιχώματα δεν εκκρίνονται ένζυμα που διασπούν τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Hollman, 1997). Αργότερα, άλλες μελέτες, έδειξαν ότι στο λεπτό έντερο γίνεται απορρόφηση γλυκοζίτων κερσετίνης και ότι το μέσο μεταφοράς είναι ο εντερικός μεταφορέας γλυκόζης. Τα φλαβονοειδή που περιέχουν 3',4'-ορθο-διυδρόξυ-Β δακτύλιο απορροφώνται κυρίως ως γλυκουρονίδια (88-100%) ενώ η κερσετίνη–3-γλυκοσίδη και η ρουτίνη απορροφώνται χωρίς να μεταβολιστούν (Boyle *et al*, 2000). Η θέση απορρόφησης φαίνεται ότι είναι διαφορετική για την κερσετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη και για την κερσετίνη-4-Ο-γλυκοσίδη (Graefe *et al*, 2001). Ο τύπος του σακχάρου και η θέση γλυκοσυλίωσης επηρεάζουν το ρυθμό απορρόφησης (Gil-Izquierdo and Mellenthin, 2001). Ακόμη, υπάρχουν στοιχεία για εντερική απορρόφηση γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών μετά από κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε φλαβονοειδή (Boyle *et al*, 2000). Η απορρόφηση των πολυφαινολών καθορίζεται κυρίως από τη χημική δομή τους. Η τελευταία εξαρτάται από άλλους παράγοντες

όπως ο βαθμός γλυκοσυλίωσης / ακετυλίωσης, η σύζευξη με άλλες φαινόλες, το μοριακό βάρος, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητα (Wollgast and Anklam, 2000).

Απορρόφηση φλαβονόλων και φλαβόνων

Έχει δειχθεί ότι η απορρόφηση της από του στόματος χορηγούμενης αγλυκόνης κερσετίνης είναι πολύ μικρή (<2%) στον άνθρωπο. Αντίθετα σε αρουραίους η απορρόφηση είναι 20%. Μελέτη σε ανθρώπους με ειλεοστομία έδειξε ότι η απορρόφηση γλυκοζιτών κερσετίνης οι οποίοι χορηγήθηκαν από το στόμα ήταν 24%. Η απορρόφηση γλυκοζιτών κερσετίνης από κρεμμύδια στην ίδια μελέτη ήταν 52% και 17% για τη ρουτινοσίδη κερσετίνης. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική απορρόφηση κερσετίνης στον άνθρωπο και ότι είναι δυνατή η απορρόφηση γλυκοζιτών από το λεπτό έντερο. Πράγματι λοιπόν από έρευνα σε ανθρώπους βρέθηκε ότι φλαβονόλες και μία φλαβόνη έφθασαν στην κυκλοφορία του αίματος μετά από του στόματος χορήγηση των γλυκοζιτών τους (Hollman, 1997).

Απορρόφηση φλαβανόνων

Δύο ανθρώπινες μελέτες έδειξαν ότι ο μεταβολισμός της ναρινγκίνης και εσπεριδίνης στον άνθρωπο, είναι παρόμοιος με των ζώων. Μετά από πρόσληψη ναρινγκίνης εκκρίνεται ένα φαινολικό οξύ στα ούρα, ενώ η εσπεριδίνη απορροφάται χωρίς να διασπασθεί (Hollman, 1997).

Απορρόφηση κατεχινών

Σύμφωνα με μια έρευνα, οι κατεχίνες απορροφώνται από τον πεπτικό σωλήνα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε αρουραίους. Μάλιστα, μετά από per oz χορήγηση 56mg EGC σε αρουραίους, τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα παρατηρήθηκαν σε 30 min. Αυξήσεις των επιπέδων EGC παρατηρήθηκαν στον άνθρωπο 60 min μετά από του στόματος χορήγηση 97mg EGC υπό τη μορφή συμπληρώματος, μετά από 10ωρη νηστεία (Prior and Cao, 1999). Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα αποτελέσματα μιας άλλη μελέτης, όπου χορηγήθηκε per oz μια εφάπαξ δόση πράσινου τσαγιού ισοδύναμη με 6 φλιτζάνια τσάι. Τα μέγιστα επίπεδα στο αίμα βρέθηκαν 60 min μετά την κατανάλωση του τσαγιού (Gerard *et al*, 1997). Μετά από του στόματος χορήγηση 0,5, 1 και 2 g κατεχίνης σε ανθρώπους παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα σε 1-2 ώρες. Σύμφωνα με άλλη μελέτη, η απορρόφηση των κατεχινών του τσαγιού αντιστοιχεί στο 0,2-0,9% της αρχικής δόσης (Wollgast and Anklam, 2000). Πράγματι, η αδέσμευτη (+) – κατεχίνη στο πλάσμα ανθρώπου 3 ώρες μετά την κατανάλωση τσαγιού ήταν ίση με το 0,3% της αρχικής δόσης. Σε παρόμοιο

πείραμα, η μεθυλιωμένη (+) – κατεχίνη βρέθηκε ότι αντιστοιχεί στο 3% της αρχικής δόσης 2 ώρες μετά (Hollman, 1997). Πάντως, ανεξάρτητα από τη δόση, το 0,5% των κατεχινών βρίσκεται στο πλάσμα με την αδέσμευτη μορφή, ενώ το ίδιο ποσό ελεύθερων κατεχινών απεκκρίνεται και στα ούρα. Το 25% των κατεχινών ανευρίσκεται στο πλάσμα υπό τη μορφή διάφορων μεταβολιτών (Wollgast and Anklam, 2000). Υπάρχουν στοιχεία τα οποία δείχνουν πρόσδεση των κατεχινών και του ταννικού οξέος με ενδογενείς πρωτεΐνες του εντερικού βλενογόνου γεγονός που ενδεχομένως μειώνει την απορρόφησή τους από τον εντερικό βλενογόνο (Carbonaro *et al*, 2001). Πάντως, αφού απορροφηθούν οι κατεχίνες, τα επίπεδα των μεταβολιτών της EC στο πλάσμα μειώνονται μετά πάροδο 6 ωρών (Prior and Cao, 1999).

Εκτός από την εντερική απορρόφηση, οι κατεχίνες είναι δυνατό να απορροφηθούν κι από τη στοματική κοιλότητα. Μετά από κατανάλωση δόσης πράσινου τσαγιού ισοδύναμης με 2-3 φλιτζάνια τσαγιού, παρατηρήθηκαν μέγιστα επίπεδα EGC, EGCG και EC εντός ολίγων λεπτών. Τα επίπεδα αυτά ήταν πολύ υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα στο πλάσμα. Επιπροσθέτως, η κατακράτηση διαλύματος τσαγιού στη στοματική κοιλότητα για λίγα λεπτά, οδήγησε σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα κατεχινών, ενώ η χορήγηση στερεών τσαγιού υπό τη μορφή κάψουλας δεν έδωσε ανιχνεύσιμα επίπεδα κατεχινών. Η κατακράτηση διαλύματος EGCG στη στοματική κοιλότητα οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων EGCG και EGC στο σάλιο γεγονός που υποδηλώνει ότι ο EGCG μετατρέπεται σε EGC στη στοματική κοιλότητα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας εστεράσης κατεχινών (Yang *et al*, 1999).

Απορρόφηση κατεχινών μετά από προσθήκη γάλατος στο τσάι

Ορισμένες πολυφαινόλες σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Έχει προταθεί λοιπόν, ότι η προσθήκη γάλατος σε μαύρο τσάι μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών. Πράγματι, η προσθήκη γάλατος σε μαύρο και πράσινο τσάι, ανέστειλε την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, ενώ δεν επηρεάστηκε η συγκέντρωση των κατεχινών. Εξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ανασταλτική επίδραση του γάλατος στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ίσως οφείλεται σε μείωση άλλων αντιοξειδωτικών εκτός από κατεχίνες (Wollgast and Anklam, 2000; Hollman *et al*, 2001).

Απορρόφηση προκυανιδίνης

Στο όξινο γαστρικό περιβάλλον, τα ολιγομερή προκυανιδίνης υδρολύονται προς μίγματα μονομερών και διμερών επικατεχίνης κι έτσι αυξάνεται η δυνατότητα απορρόφησής τους από το λεπτό έντερο (Spencer *et al*, 2000). Επίσης έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης προκυανιδίνης και της συγκέντρωσης της στο πλάσμα (Wang *et al*, 2000).

Α.4.4. Μεταβολισμός

Μετά την απορρόφηση των πολυφαινολών ακολουθεί ο μεταβολισμός, για τον οποίο, τα περισσότερα στοιχεία προέρχονται από μελέτες σε ζώα.

Σε μία μελέτη, η έγχυση φλαβανόλων στο δωδεκαδάκτυλο είχε ως αποτέλεσμα τη σύζευξη αυτών με γλυκουρονίδια (περίπου 45%), τη μεθυλίωση (περίπου 30%) ή και τα δύο (περίπου 20%) κατά την μεταφορά τους από τα εντεροκύτταρα στον ορογόνο χιτώνα. Το γεγονός αυτό δείχνει τη δραστηριότητα μίας κατεχολικής-Ο-μεθυλ-τρανσφεράσης στο μεταβολισμό των φλαβανόλων και υποδηλώνει ότι οι μεταβολίτες ίσως εισέρχονται στην πυλαία κυκλοφορία. Αντίθετα, με έγχυση στον ειλεό, οι φλαβανόλες εμφανίζονταν στην ορογόνια πλευρά χωρίς να έχουν μεταβολιστεί και το συνολικό ποσοστό των φλαβανολών που μεταφέρονταν ήταν υψηλότερο σε σχέση με αυτό στο δωδεκαδάκτυλο (Kuhnle *et al*, 2000). Επίσης οι υδροξυλικές ομάδες των ανέπαφων μορίων υφίστανται σύζευξη με γλυκουρονικό ή θειικό οξύ στο ήπαρ (Wollgast and Anklam, 2000). Το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολιτών υφίσταται μεθυλίωση στο ήπαρ (Manach *et al*, 1999). Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κόλον υδρολύουν τα συζευγμένα μόρια κι έτσι ελευθερώνεται το τμήμα αγλυκόνης το οποίο μπορεί να απορροφηθεί. Επίσης, τα συζευγμένα μόρια μπορεί να επαναπορροφηθούν και να εισέλθουν στην εντεροηπατική κυκλοφορία. Η μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου συντελεί και στην διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου των φλαβονοειδών οπότε παράγονται διάφορα φαινολικά οξέα. Στην περίπτωση της κατεχίνης έχουν εντοπισθεί και ενδιάμεσοι μεταβολίτες που είναι οι δ-φαινυλ-βαλερολακτόνες. Τα φαινολικά οξέα απορροφώνται και απεκκρίνονται στα ούρα.

Όσον αφορά στην κατανομή των πολυφαινολών στους ιστούς, λίγα είναι γνωστά. Σημαντικά ποσά EGC και EC έχουν βρεθεί στον οισοφάγο αρουραίου, στο παχύ έντερο, στους νεφρούς, στην χοληδόχο κύστη, στους πνεύμονες και στον προστάτη. Μικρότερα ποσά βρέθηκαν στο συκώτι, στη σπλήνα, στην καρδιά και στο θυρεοειδή αδένα. Το ποσό του EGCG ήταν μεγαλύτερο στον οισοφάγο και στο παχύ έντερο λόγω της άμεσης επαφής και χαμηλότερο στα άλλα όργανα λόγω της χαμηλής απορρόφησης του EGCG στη συστηματική κυκλοφορία (Yang *et al*, 1999).

Α.4.5. Απέκκριση

Μετά από χορήγηση πράσινου τσαγιού, βρέθηκαν σε δείγματα ούρων ανθρώπου, ποντικού και αρουραίων μονογλυκουρονίδια και μονοθειϊκοί εστέρες EGC και (-)-επικατεχίνης. Επίσης έχουν βρεθεί Ο-μεθυλ-EGC-Ο-γλυκουρονίδια και Ο-θειική-επικατεχίνη

σε δείγμα ανθρώπινων ούρων. Η (-)-5-(3',4',5'–τριυδροξυφαινυλ)-γ-βαλερολακτόνη (M4) και η (-)-5-(3',4'-διυδρόξυφαινυλ)-γ-βαλερολακτόνη (M6) που είναι μεταβολίτες της EGC και της (-)-επικατεχίνης βρίσκονται επίσης στα ούρα είτε ως μονογλυκουρονίδια, είτε με τη μονοθειική μορφή (Li *et al*, 2001).

Η κατανάλωση πράσινου τσαγιού οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα κατεχινών στα ούρα σε σχέση με το μαύρο τσάι. Επίσης ο EGCG, εν αντιθέσει με την EC και την EGC, απεκκρίνεται κυρίως μέσω της χολής κι όχι μέσω των ούρων (van het Hof *et al*, 1999). Περισσότερο από το 90% της συνολικής ποσότητας των EGC και EC που ανευρίσκεται στα ούρα, απεκκρίνεται μέσα σε 8 ώρες από την κατανάλωση (Yang *et al*, 1999).

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Β.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για γαλλικό οξύ, επικατεχίνη και τυροσόλη.

Β.1.1. Όργανα / Υλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Ζυγός ακριβείας (Ohaus, Analytical Standard)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Σιφώνιο των 10 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μL και των 100 μL
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές
- Υαλογράφος
- HPLC διάταξη (Hewlett Packard, 1050), (HPLC/ VV-DAD/FLD/Autosampler)

Β.1.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι :

- Γαλλικό οξύ (sigma, G-7384)
- Επικατεχίνη (Fluka, 45300)
- Τυροσόλη (Fluka, 56105)
- Μεθανόλη (HPLC grade,SDS)

Β.1.3. Εκτέλεση

<u>Παρασκευή διαλύματος ουσίας (γαλλικού οξέος, επικατεχίνης, τυροσόλης) σε μεθανόλη, 1% W/V.</u>

- Ζυγίζονται 0,1 g ουσίας μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα με ζυγό ακριβείας
- Ρίχνονται περίπου 15 mL μεθανόλης (MeOH) σε ποτήρι ζέσεως
- Λαμβάνονται ακριβώς 10 mL MeOH (με σιφώνιο των 10 mL) τα οποία μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα με την ουσία
- Ακολουθεί ανάδευση σε VORTEX

Παρασκευή διαλυμάτων των τριών ουσιών.

Τα διαλύματα των ουσιών που παρασκευάζονται έχουν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0,1 γ/λ, 0,25 γ/λ, 0,5 γ/λ, 0,75 γ/λ, 1 γ/λ, 1,25 γ/λ, 1,5 γ/λ, 1,75 γ/λ και 2 γ/λ (όπου γ/λ= μg/μL ή g/L).

Σχηματικά η πορεία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής :

0,1 γ/λ ⟹ 990 μL MeOH + 10 μL δ/τος 1%
0,25 γ/λ ⟹ 975 μL MeOH + 25 μL δ/τος 1%
0,5 γ/λ ⟹ 950 μL MeOH + 50 μL δ/τος 1%
0,75 γ/λ ⟹ 925 μL MeOH + 75 μL δ/τος 1%
1 γ/λ ⟹ 900 μL MeOH + 100 μL δ/τος 1%
1,25 γ/λ ⟹ 875 μL MeOH + 125 μL δ/τος 1%
1,5 γ/λ ⟹ 850 μL MeOH + 150 μL δ/τος 1%
1,75 γ/λ ⟹ 825 μL MeOH + 175 μL δ/τος 1%
2 γ/λ ⟹ 800 μL MeOH + 200 μL δ/τος 1%

Σε καθέναν από τους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες σημειώνουμε ένα «στεφάνι» στο κάτω μέρος του κοίλου μηνίσκου με τη βοήθεια υαλογράφου. Αυτό γίνεται ώστε να δούμε αν έγινε εξάτμιση. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο.

Β.1.4. Ανάλυση προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών με HPLC.

Για κάθε διάλυμα 0,1 γ/λ ως 2 γ/λ μεταφέρονται από 500 μl σε vials, τα οποία αφού πωματιστούν τοποθετούνται στον HPLC autosampler της HPLC διάταξης.

Εν συνεχεία, γίνεται παραλαβή του HPLC χρωματογραφήματος και ακολουθεί καταγραφή του εμβαδού επιφάνειας κορυφής και του χρόνου κατακράτησης (Retention time) που αντιστοιχεί σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα είναι :

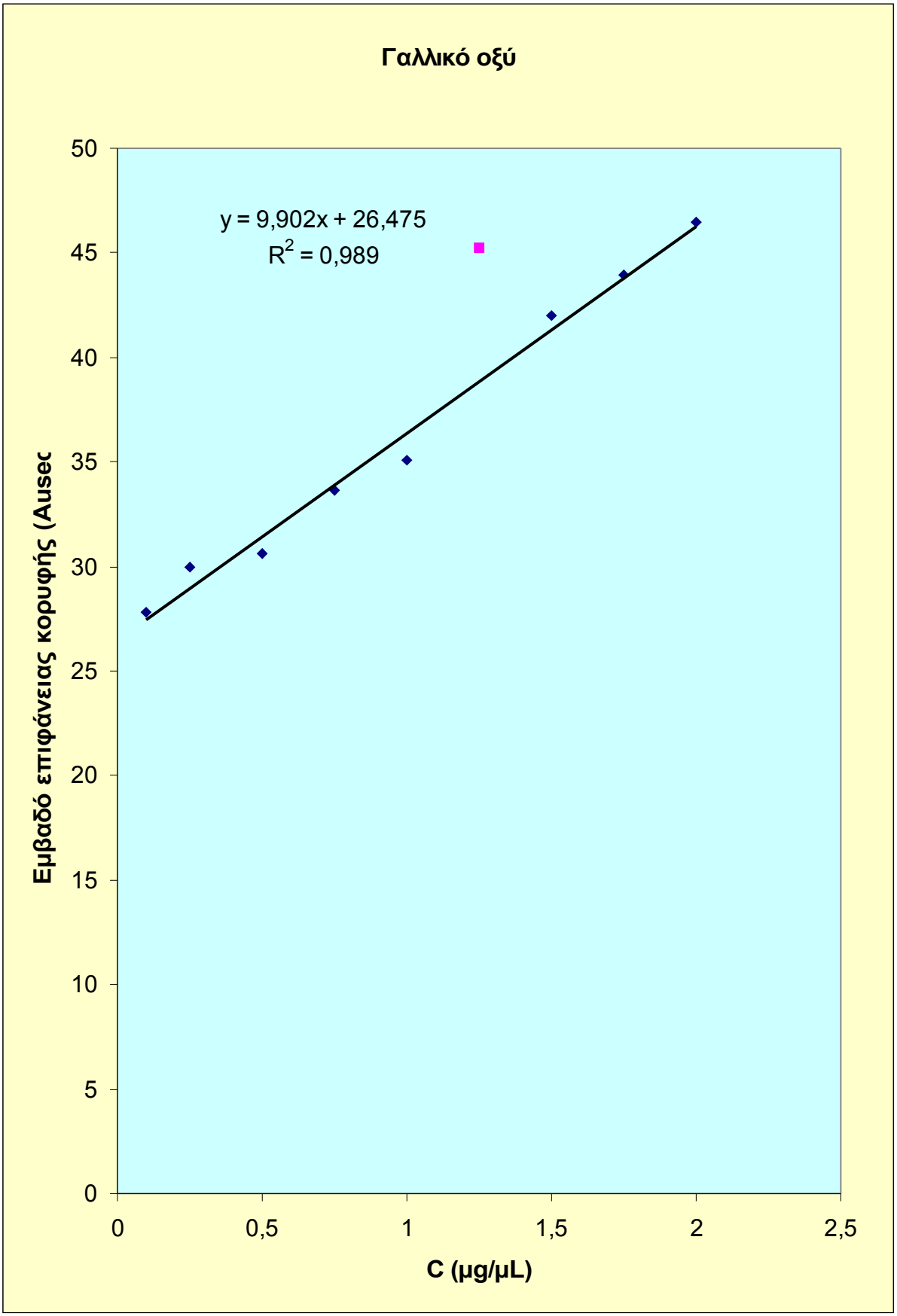
Γαλλικό οξύ		
C (ug/ul) (γ/λ)	**Εμβ.επιφ. κορυφής (Au.sec)**	**Ret. Time (min)**
0,1	27,80	1,688
0,25	29,96	1,683
0,5	30,63	1,617
0,75	33,67	1,639
1	35,1	1,616
1,25	45,25	1,715
1,50	41,97	1,675
1,75	43,95	1,633
2	46,45	1,648

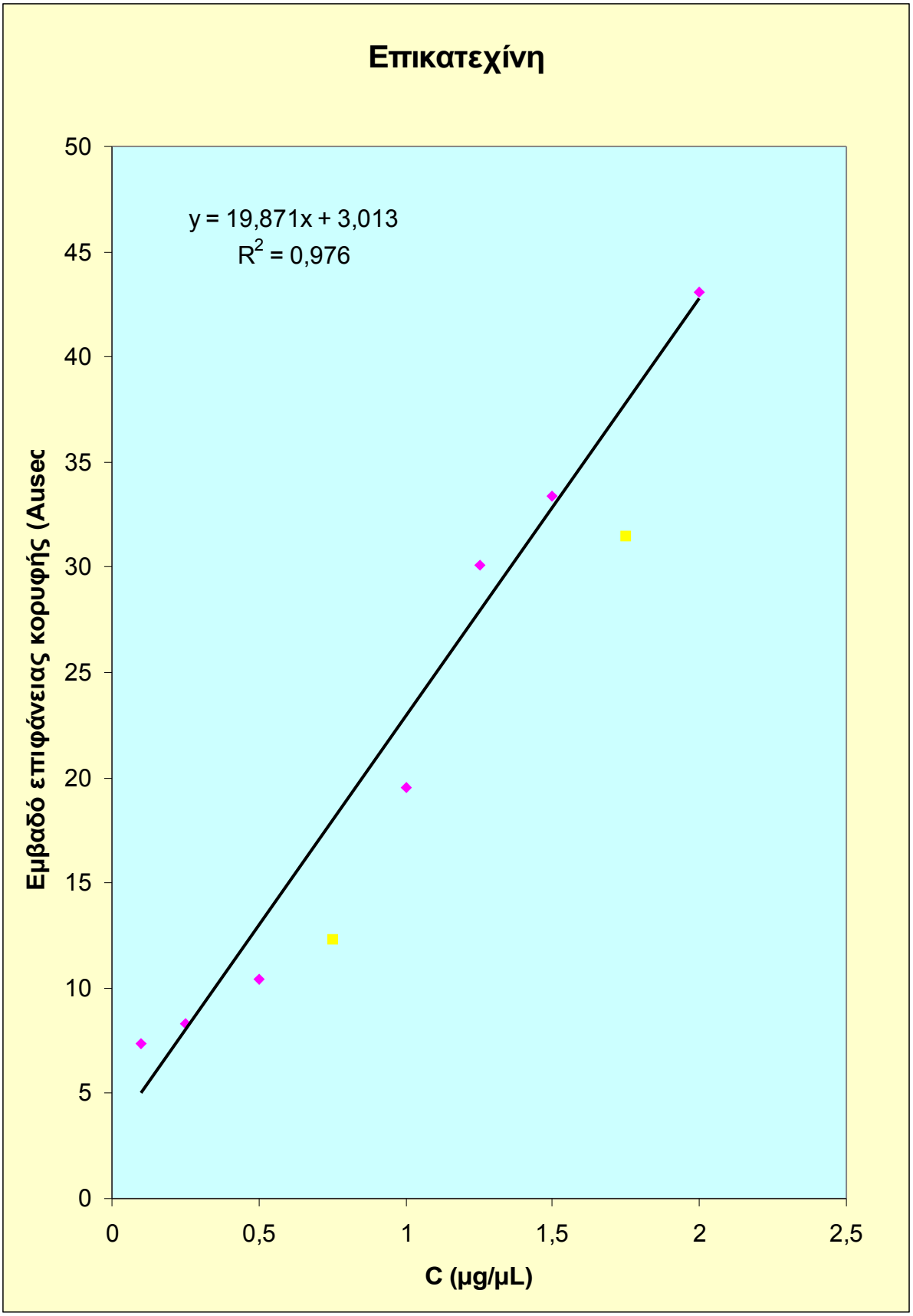
Επικατεχίνη		
C (ug/ul) (γ/λ)	**Εμβ.επιφ. κορυφής (Au.sec)**	**Ret. Time (min)**
0,1	7,37	2,131
0,25	8,34	2,135
0,5	10,44	2,130
0,75	12,33	2,108
1	19,56	2,118
1,25	30,1	2,149
1,5	33,36	2,126
1,75	31,49	2,133
2	43,07	2,123

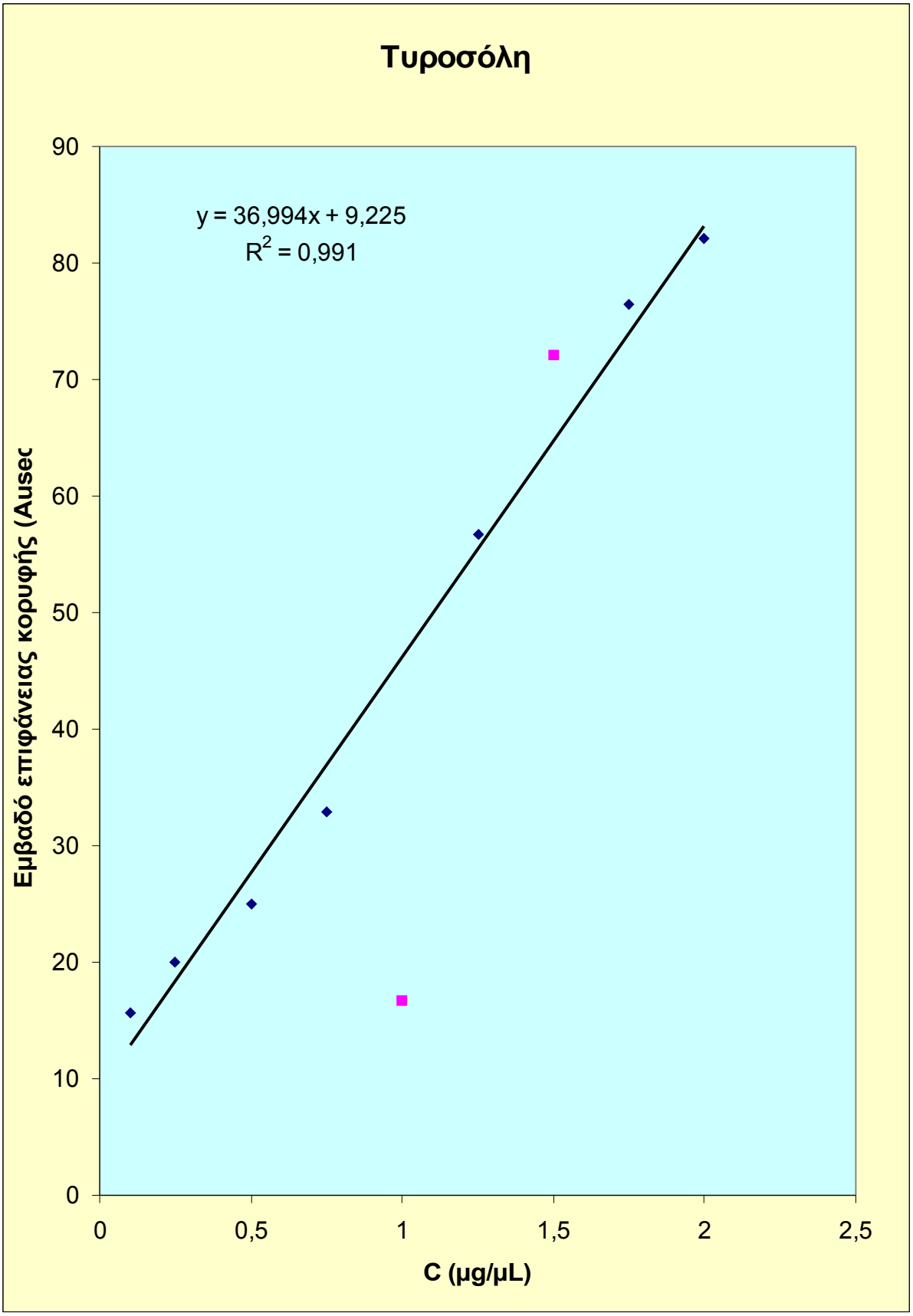
Τυροσόλη		
C (ug/ul) (γ/λ)	**Εμβ.επιφ. κορυφής (Au.sec)**	**Ret. Time (min)**
0,1	15,62	2,202
0,25	19,94	2,201
0,5	24,97	2,190
0,75	32,87	2,188

1	16,65	2,179
1,25	56,70	2,196
1,5	72,07	2,164
1,75	76,51	2,184
2	82,12	2,174

Με βάση τα στοιχεία των ανωτέρω πινάκων προκύπτουν οι ακόλουθες πρότυπες καμπύλες αναφοράς (βλ. σελίδες 53, 54 και 55) :


Γαλλικό οξύ
y = 9,902x + 26,475
R2 = 0,989
Εμβαδό επιφάνειας κορυφής (Ausec
C (μg/μL)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
0,5
1
1,5
2
2,5


Επικατεχίνη
y = 19,871x + 3,013
R2 = 0,976
Εμβαδό επιφάνειας κορυφής (Ausec
C (μg/μL)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
0,5
1
1,5
2
2,5


Τυροσόλη
y = 36,994x + 9,225
R2 = 0,991
Εμβαδό επιφάνειας κορυφής (Ausec
C (μg/μL)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
0,5
1
1,5
2
2,5

Β.2. Δημιουργία Εσωτερικού Προτύπου α – ναφθόλης.

Ο ρόλος του εσωτερικού προτύπου (spike) είναι ο εξής : κατά τη χρωματογραφική ανάλυση προκύπτει χαρακτηριστική κορυφή για την α – ναφθόλη της οποίας η συγκέντρωση είναι εκ των προτέρων γνωστή (και ισούται με το εμβαδόν της επιφάνειας κορυφής). Επομένως, το εμβαδόν επιφάνειας κορυφής μιας άλλης ουσίας άγνωστης συγκέντρωσης συγκρίνεται με αυτό της α-ναφθόλης και αναλογικά υπολογίζεται η συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας.

Β.2.1. Όργανα / Υαλικά

- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Σπάτουλα
- Σιφώνιο των 5 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Φιάλη αζώτου (N2)

Β.2.2. Αντιδραστήρια

- α-ναφθόλη (Sigma)
- MeOH (HPLC grade)

Β.2.3. Εκτέλεση

- Ζυγίζονται με ακρίβεια 5 g α-ναφθόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml όπου η ουσία μεταφέρεται με τη βοήθεια σπάτουλας
- Προστίθεται MeOH μέχρι χαραγής στην ίδια φιάλη, οπότε προκύπτει δ/μα α-ναφθόλης 5% W/V
- Γίνονται διαδοχικές αραιώσεις 1/10

Η πειραματική διαδικασία σχηματικά έχει ως εξής :

5 gr α-ναφθόλης + 100 ml MeOH ⟹ 5% W/V (Α)

10 mL (Α) + 90 mL MeOH ⟹ 0,5 % W/V (Β)

10 mL (Β) + 90 mL MeOH ⟹ 0,05 % W/V (Γ)

10 mL (Γ) + 90 mL MeOH ⟹ 0,005 % W/V (Δ)

10 mL (Δ) + 90 mL MeOH ⟹ 0,0005 % W/V (E)

10 mL (E) + 90 mL MeOH ⟹ 0,00005 % W/V ή 5 ppm (Z)

Οι ογκομετρικές φιάλες που φέρουν τα ανωτέρω διαλύματα φυλάσσονται στο ψυγείο.

Β.3. Παρασκευή διαλύματος ασκορβικού οξέος (AsAc) 10 % v/v

Το διάλυμα AsAc αποτελείται από :

- 20% W/V AsAc
- 0,4 M Na_2HPO_4 .$2H_2$ O
- 0,1 % W/V Na_2EDTA

Το διάλυμα AsAc προστέθηκε για την αύξηση της απόδοσης παραλαβής των πολυφαινολών στο πλάσμα.

Β.3.1. Όργανα / Υλικά

- ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- σπάτουλα
- ζυγός ακριβείας

Β.3.2. Αντιδραστήρια

- AsAc
- Na_2HPO_4 .$2H_2$ O
- Na_2EDTA
- EDTA 0,1 M

Β.3.3. Εκτέλεση

- Ζυγίζονται 20 g AsAc σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Ζυγίζονται 7,1196 g Na_2HPO_4 .$2H_2O$ σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Ζυγίζονται 0,1 g Na_2EDTA σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Οι ζυγισμένες ποσότητες από τα τρία αντιδραστήρια μεταφέρονται σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι χαραγής
- Η ογκομετρική φιάλη ανακινείται καλά για την πλήρη διαλυτοποίηση των ουσιών

Το διάλυμα As Ac με πεχαμέτρηση βρέθηκε ότι έχει pH = 3,77 και ρυθμίστηκε σε pH = 3,7 με προσθήκη λίγων σταγόνων διαλύματος EDTA 0,1 M. Έτσι, με προσθήκη του

ρυθμιστικού αυτού διαλύματος (buffer) στο αίμα το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 5. Η ογκομετρική φιάλη με το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

Β.4. Διατροφική παρέμβαση

Την προηγούμενη ημέρα της αιμοληψίας όλοι οι εθελοντές ακολούθησαν δίαιτα ελεύθερη πολυφαινολών, δηλαδή απέφυγαν την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως είναι το τσάι, το ελαιόλαδο, οι ελιές, τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, ο καφές, η σοκολάτα. Ο έλεγχος της διατροφικής πρόσληψης έγινε με ανάκληση εικοσιτετραώρου.

Την ημέρα της αιμοληψίας, οι μισοί εθελοντές κατανάλωσαν τσάι και οι υπόλοιποι ελιές.

Β.4.1. Προετοιμασία τσαγιού

- Σε μαγειρικό σκεύος (κατσαρολάκι) βράζεται 1 Lt εμφιαλωμένο νερό έως ότου κοχλάσει
- Αφού κοχλάσει απομακρύνεται από τη φωτιά και τοποθετούνται για 3 min, 10 φακελάκια μαύρο τσάι Lipton Yellow Label Tea (το κάθε φακελάκι περιείχε 1,5 g τσαγιού)
- Το αφέψημα αφήνεται να κρυώσει και τοποθετείται σε 2 πλαστικά μπουκαλάκια του 0,5 Lt τα οποία φυλάσσονται στο ψυγείο.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία ώστε να ετοιμαστούν άλλα 2 μπουκαλάκια τσάι.

Συνολικά ετοιμάστηκαν 4 μπουκαλάκια τσάι του 0,5 Lt που αντιστοιχούν από 2 σε κάθε έναν εκ των δύο εθελοντών. Σε κάθε μπουκαλάκι τσάι προστέθηκε γλυκαντική ουσία canderel ώστε να είναι πιο εύγευστο το τσάι.

Β.5. Αιμοληψία με την τεχνική του φλεβοκαθετηριασμού

Η αιμοληψία έλαβε χώρα στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο «Γεώργιος Γεννηματάς».

Β.5.1. Υλικά / Σκεύη

- Syringes for singe use-sterilized της εταιρείας DIMES-ELVIONY
- Πεδίο i.v. dressing 7,5 cm X 9 cm της εταιρείας Smith & Nephew
- Φλεβοκαθετήρας με σύστημα 3-way
- Ηπαρίνη (αντιπηκτικό)
- Λευκοπλάστ
- Ισοθερμικό με παγοκύστες
- Vacuette των 3 mL της εταιρείας greiner bio-one 454086 με αντιπηκτικό EDTA
- Μικροπιπέτα των 100 μL (Eppendorf)

Β.5.2. Αντιδραστήρια

- α-ναφθόλη (spike) 0,005% W/V

Β.5.3. Εκτέλεση αιμοληψίας

- Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε 2 εθελοντές (Χ και Ε)
- Σε όλους τους εθελοντές έγινε λήψη 10 mL αίματος σε χρόνο to=0, δηλαδή πριν από την κατανάλωση τσαγιού.
- Τα 10 mL αίματος, που ελήφθησαν από κάθε εθελοντή μεταφέρθηκαν σε 3 vacuette με EDTA (των 3 ml)
- Στη συνέχεια οι εθελοντές Χ και Ε κατανάλωσαν από 1 Lt συμπυκνωμένο τσάι (15 g μαύρο τσάι / Lt νερού).
- Μετά χρόνο 30 min από το τέλος της κατανάλωσης του τσαγιού έγινε η $2^{η}$ αιμοληψία, κατά την οποία συνελέχθησαν πάλι 10 mL αίματος από τον κάθε εθελοντή.
- Ομοίως επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία κάθε 30 min έως τα 150 min
- Αφού ολοκληρώθηκαν οι αιμοληψίες (6 για κάθε εθελοντή) μεταφέρθηκαν σε όλα τα vacuette από 30 μL α-ναφθόλης με μικροπιπέτα των 100 μL.

Συνοπτικά το πειραματικό πλάνο έχει ως εξής :

Χρόνος λήψης αίματος (min)	Δείγματα (επί 3)
to = 0	X0, E0
t1 = 30	X1, E1
t2 = 60	X2, E2
t3 = 90	X3, E3
t4 = 120	X4, E4
t5 = 150	X5, E5

- Τα 36 συνολικά vacuette μεταφέρθηκαν από το νοσοκομείο ως το χώρο ανάλυσης τους (Εργαστήριο Χημείας Χαροκοπείου Πανεπιστημίου) μέσα σε ισοθερμικό δοχείο.

Β.5.4. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος

Β.5.4.1. Όργανα / Υλικά

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

Β.5.4.2. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα AsAc 10% v/v

Β.5.4.3. Εκτέλεση

- Έγινε φυγοκέντρηση των 36 vacuette στις 2500 g (3520 rpm) για 10 min σε θερμοκρασία 15 °C, οπότε διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος.
  - Έγινε παραλαβή του υπερκείμενου (πλάσμα) με πιπέτα pasteur
- Οι παραληφθείσες 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, AsAc (10% v/v) με μικροπιπέτα Eppendorf

- Οι 12 δοκιμαστικοί σωλήνες φυλάχτηκαν σε υπερκατάψυξη στους -80° C

Β.6. Συλλογή και επεξεργασία ούρων

Β.6.1. Όργανα / Υλικά

- Πλαστικοί ογκομετρικοί ουροσυλλέκτες του 1,5 Lt
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- Μεγάλο πλαστικό χωνί
- Κωνική φιάλη των 1000 mL
- Διηθητικός ηθμός
- Γυάλινο μικρό χωνί
- Κωνική φιάλη των 100 mL
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Αποστειρωμένα πλαστικά ημιδιαφανή μπουκαλάκια

Β.6.2. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα AsAc 10% (v/v)

Β.6.3. Εκτέλεση

Την ημέρα της αιμοληψίας συνελέχθησαν ούρα 24ώρου για κάθε εθελοντή στους πλαστικούς ουροσυλλέκτες. Κατά τα μεσοδιαστήματα της συλλογής τα ούρα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία ψυγείου.

Α] Ογκομέτρηση ούρων

- Με τη βοήθεια πλαστικού χωνιού μεταφέρονται τα πρώτα 1000 cc ούρων από το δοχείο συλλογής σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 ml.
- Εν συνεχεία, τα εν λόγω ούρα αδειάζονται σε κωνική φιάλη των 1000 ml και επαναλαμβάνεται η μεταφορά των ούρων από το δοχείο συλλογής στον ογκομετρικό κύλινδρο έως ότου ογκομετρηθούν όλα τα ούρα

<u>Αποτελέσματα</u>

V ούρων (X) = 2190 mL

V ούρων (E) = 1760 mL

Β] Διήθηση ούρων

Η διήθηση των ούρων γίνεται ώστε να απομακρυνθούν οι στερεές κολλοειδείς ουσίες και να προκύψει ομογενές διάλυμα για την ανάλυση.

- Με τη βοήθεια διηθητικού ηθμού και χωνιού διηθούμε μια ποσότητα ούρων (> 50 ml) και το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη.

Γ] Συλλογή 50 mL διηθήματος ούρων

- Ογκομετρούνται 50 mL ακριβώς διηθήματος ούρων με ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml
- Το διήθημα ούρων από τον κάθε εθελοντή μεταφέρεται σε πλαστικό μπουκαλάκι
- Προστίθενται από 5 mL διαλύματος AsAc σε κάθε μπουκαλάκι
- Όλα τα δείγματα φυλάσσονται σε κατάψυξη στους –20° C μέχρι την ανάλυσή τους.

Β.6.4. Τυφλό δείγμα ούρων

Πραγματοποιήθηκε συλλογή τυφλού δείγματος ούρων 24ώρου την ημέρα που οι εθελοντές ακολούθησαν δίαιτα φτωχή σε πολυφαινόλες. Η συλλογή και επεξεργασία των ούρων έγινε κατά τα γνωστά.

Τα αποτελέσματα της ογκομέτρησης είναι :

V ούρων (Χτ) = 1020 mL

V ούρων (Ετ) = 1500 mL

Τα 50 mL διηθήματος που συνελέχθησαν – κατόπιν προσθήκης διαλύματος AsAc - φυλάχθηκαν σε κατάψυξη στους –20° C.

Β.7. Πιλοτική δοκιμή μεθόδου

Επειδή δεν υπάρχει συγκεκριμένο πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών, πραγματοποιήθηκε πιλοτική δοκιμή της προτεινόμενης μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων. Η επιλογή της προτεινόμενης μεθόδου στηρίχθηκε κατά ένα μέρος στην τεχνική που εφάρμοσαν οι Mulder *et al* (2001).

Β.7.1. Πιλοτική αιμοληψία

Β.7.1.1. Υλικά / Σκεύη

- Αποστειρωμένες σύριγγες των 10 mL
- Vacuette των 3 mL της εταιρείας greiner bio-one 454086 με αντιπηκτικό EDTA
- Μικροπιπέτα των 100 μL (Eppendorf)
- Λευκοπλάστ

Β.7.1.2. Αντιδραστήρια

- α-ναφθόλη (spike) 0,005% w/v

Β.7.1.3. Εκτέλεση πιλοτικής αιμοληψίας

  - Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε έναν εθελοντή (N)
  - Έγινε λήψη 8 mL αίματος σε χρόνο to=0, δηλαδή πριν από την κατανάλωση τσαγιού
  - Τα 8 mL αίματος που ελήφθησαν μεταφέρθηκαν σε 2 vacuette με EDTA (των 3 ml)
- Εν συνεχεία, ο εθελοντής N κατανάλωσε 1 Lt συμπυκνωμένο Lipton Ice Tea (instant), (διαλύθηκε 1 φακελάκι = 125 g τσαγιού σε 1 Lt εμφιαλωμένου νερού)
- Έγινε ξανά λήψη αίματος 8 mL 2 ώρες μετά την κατανάλωση τσαγιού, οπότε και αναμενόταν το μέγιστο της συγκέντρωσης (peak) των πολυφαινολών στο αίμα.

Β. 7.1.4. Επεξεργασία πιλοτικών δειγμάτων αίματος

Β.7.1.4.1. Όργανα / Υλικά

- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge, 5810 R
- Πιπέτα pasteur
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μL
- Υπερκατάψυξη ultra low freezer (-80 ^{o}C)
- Φιάλη N_2
- Επωαστήριο (memmert INCO 2)
- VORTEX
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 100 μL
- Σιφώνια : των 5 mL και 1 mL
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UVIKON spectrophotometer 931
- Κυψελίδα
- Λευκό χαρτί κουζίνας
- HPLC διάταξη
- Vials
- GC διάταξη (αέριος χρωματογράφος), (Hewlett Packard, 6890), [GC/MSD(TIC)/Autosampler]
- EASY pure RF (compact ultrapure water system)
- Υδρόλουτρο (Edelstahl, Rost Frei)

Β.7.1.4.2. Αντιδραστήρια

- Διάλυμα AsAc 10% v/v
- Ενζυμο β-γλυκουρονιδάση από Helix pomatia (SERVA)
- Ακετόνη (SDS p.a.)
- Οξικό αιθυλεστέρα (SDS p.a.)
- MeOH (HPLC grade)
- Folin – Ciocalteau (Sigma)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3

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

Β.7.1.4.3. Εκτέλεση

- Έγινε φυγοκέντρηση των 4 vacuette στις 2500 g (3520 rpm) για 10 min σε θερμοκρασία 15°C
- Έγινε παραλαβή του υπερκείμενου πλάσματος με πιπέτα pasteur
- Οι παραληφθείσες ποσότητες πλάσματος από κάθε δυάδα vacuette μεταφέρθηκαν στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα (χρειάστηκαν συνολικά 2 δοκιμαστικοί σωλήνες).
- Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε όγκο πλάσματος 4-4,5 mL κατά προσέγγιση, οπότε προστέθηκαν 0,4 mL διαλύματος AsAc (10% v/v) με μικροπιπέτα Eppendorf
- Οι 2 δοκιμαστικοί σωλήνες φυλάχτηκαν σε υπερκατάψυξη στους -80 °C
- Από κάθε αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρουμε από 1 mL σε 2 νέους δοκιμαστικούς σωλήνες, και στον ένα προσθέτουμε 100 μL ενζύμου (β-γλυκουρονιδάση) ενώ στον άλλο όχι.

  Το ένζυμο διασπά τα γλυκουρονίδια, τους θειϊκούς εστέρες, καθώς επίσης και τους γαλλικούς εστέρες, οι οποίοι δεν θέλουμε να διασπαστούν . Έτσι, προσθέτουμε ένζυμο μόνο στον έναν εκ των δύο δοκιμαστικών σωλήνων προκειμένου να διαπιστώσουμε πόσοι γαλλικοί εστέρες έχουν διασπασθεί.
- Οι 4 νέοι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται σε VORTEX και απομακρύνεται ο αέρας με ρεύμα N_2 και πωματίζονται
- Εν συνεχεία τοποθετούνται σε επωαστήριο στους 37 °C για 1 ώρα και κατόπιν αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται από 0,5 mL ακετόνης και ακολουθεί ανάδευση σε VORTEX
- Προστίθενται από 2 mL οξικού αιθυλεστέρα και γίνεται πάλι ανάδευση σε VORTEX
- Οι 4 δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρούνται επί 5 min στις 2500 g (3520 rpm) σε θερμοκρασία 15 °C.

  Παρατηρούμε ότι σχηματίζονται 3 φάσεις που από κάτω προς τα πάνω είναι :
  - Η υδατική φάση της ακετόνης
  - Η ενδιάμεση στιβάδα γαλακτώματος
  - Η φάση του οξικού αιθυλεστέρα με τα οργανικά κλάσματα
- Με πιπέτες pasteur γίνεται παραλαβή της υπερκείμενης φάσης του οξικού αιθυλεστέρα και μεταφορά αυτής σε αντιστοίχους καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες

- Η διαδικασία της εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα επαναλαμβάνεται 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 4 δοκιμαστικούς σωλήνες τα οποία και μεταφέρονται σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους θα εφαρμοστεί η μέθοδος Folin-Ciocalteau.
- Επιπροσθέτως λαμβάνονται 500 μL τα οποία τοποθετούνται σε vials για HPLC
- Τα 400 μL που υπολείπονται θα αναλυθούν με GC

Α] Μέθοδος Folin-Ciocalteau (F-C)

- Στους 4 δοκιμαστικούς σωλήνες με τα 100 μL δείγματος προστίθενται από 5 mL νερό από EASY pure RF. Στη συνέχεια προστίθενται από 0,5 mL αντιδραστηρίου F-C και περιμένουμε 3 min ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ακολούθως προστίθεται από 1 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 10 mL με νερό από EASY pure RF (3,4 mL νερού)
- Με τον ίδιο τρόπο γίνεται η προετοιμασία τυφλού για την F-C μέθοδο, με την διαφορά ότι το τυφλό δεν περιέχει δείγμα και ο όγκος συμπληρώνεται στα 10 mL με 3,5 mL νερού.
- Έγινε καλή ανάδευση όλων των δοκιμαστικών σωλήνων σε VORTEX οι οποίοι φυλάχθηκαν σε σκιά για 1 ώρα.
- Τα δείγματα φασματοφωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης με μήκος κύματος λ=725 nm.

Οι τιμές απορρόφησης (Abs) των δειγμάτων δεν υπερβαίνουν τη μονάδα, οπότε υπακούουν στο νόμο των Lambert- Beer.

Β] HPLC

Οι συνθήκες ανάλυσης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης περιλαμβάνουν τις εξής παραμέτρους :

- Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε MeOH (της εταιρείας SDS, France)
- Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18, Nucleosil 120 (5 μm), (120X4mm) σε χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
- Ο ανιχνευτής ήταν υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος

<u>HPLC ανάλυση</u>

- Τα vials που προορίζονται για HPLC πωματίζονται και εισάγονται στον HPLC αναλυτή
- Για κάθε δείγμα συλλέγεται το αντίστοιχο έκλουσμα στους εξής χρόνους :
  - 0 – 2,1 min
  - 2,1 – 5 min
  - 5 – 10 min
  - 10 – 16 min

Γ] GC

Οι συνθήκες ανάλυσης της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τις εξής παραμέτρους :

- Ως αέριο κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε He της εταιρείας Αεροσκόπιο
- Ως εγχυτής δείγματος χρησιμοποιήθηκε σύριγγα μεγέθους 10 μl, ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 1 μl
- Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φασματογραφίας μάζας (auxiliary detector, MSD, HP 6890) η θερμοκρασία του οποίου ήταν ρυθμισμένη στους 280°C
- Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη, με στοιχεία :

HP – 19091Z – 413

HP – 1 Methyl Siloxane (μη πολική)

Μέγιστη θερμοκρασία : 325 ^{o}C

Η στήλη έχει μήκος 30 m, διάμετρο 320 μm και πάχος φιλμ επικάλυψης 0,25 μm.

- Τα στοιχεία του λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε είναι :

Enhanced Chem Station

G 1701 AA Version A.03.00

Hewlett Packard 1996, σε υπολογιστή HP Vectra Xn

- Η θερμοκρασία του φούρνου μεταβάλλεται με σταδιακή άνοδο ως εξής :

Oven ramp	°C / min	Next °C	Hold min	Run time
Initial		70	1.00	1.00
Ramp 1	2.00	135	10.00	43.50
Ramp 2	4.00	220	20.00	74.75
Ramp 3	3.50	270	0	109.04
Ramp 4(off)				

GC ανάλυση

- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες που προορίζονται για GC προστίθενται από 100 μL σιλιλιωτικού μέσου BSTFA και 50 μL TMCS
- Εν συνέχεια οι σωλήνες αναδεύονται σε VORTEX και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 80 °C για 45 min
- Τα σιλιλιωμένα πλέον διαλύματα εισάγονται σε inner tubes με στηρίγματα μέσα σε vials και τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη του οργάνου (Ανδρικόπουλος, 1999).

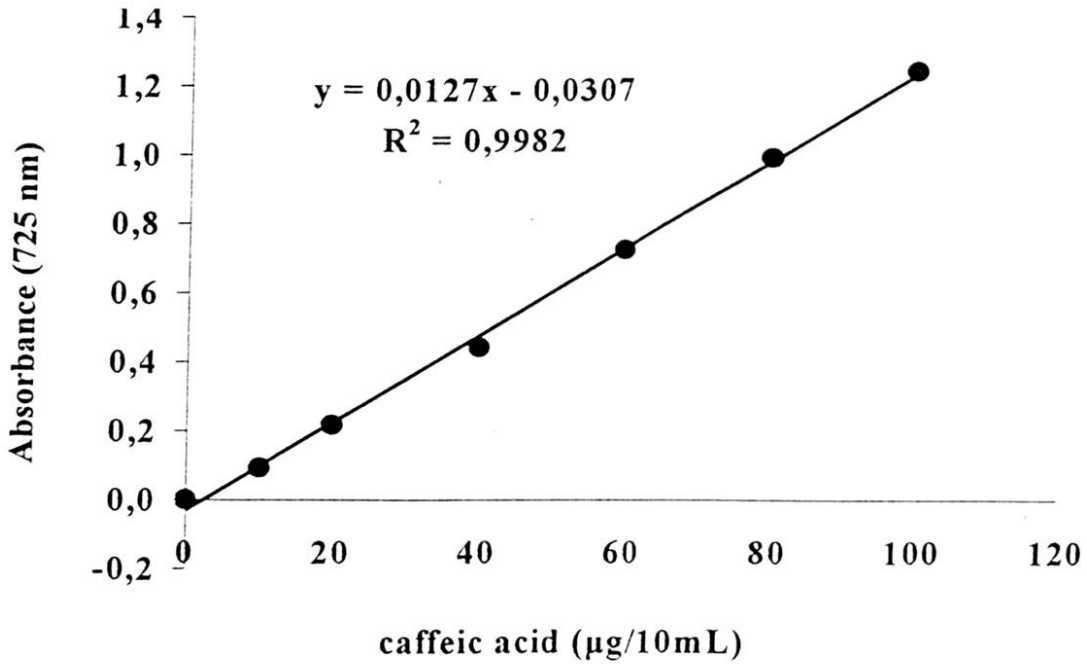
Β.8. Αποτελέσματα

Α] Αποτελέσματα F-C

Η απορρόφηση του τυφλού είναι : $Abs_{(T)}$ = 0,0518

	Τιμές χωρίς αφαίρεση της $Abs_{(T)}$	**Τιμές με αφαίρεση της $Abs_{(T)}$ (τελική τιμή)**
Abs πριν από την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο (Abs_1)	0,3016	0,2498
Abs μετά από την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο (Abs_2)	0,2897	0,2379
Abs πριν από την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο (Abs_3)	0,2644	0,2126
Abs μετά από την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο(Abs_4)	0,2397	0,1879

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος είναι:



Με βάση την ανωτέρω πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος υπολογίζεται η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος) για κάθε δείγμα. Είναι :

$y = 0{,}0127\,X + 0{,}0307 \Longrightarrow$

$$x = \frac{y - 0{,}0307}{0{,}0127} \quad (1)$$

$$(1) \Longrightarrow C_1 = \frac{Abs\,(1) + 0{,}0307}{0{,}0127} \Longrightarrow$$

$$C_1 = \frac{0{,}2498 + 0{,}0307}{0{,}0127} \Longrightarrow$$

C_1 = 22,09 μg / 10 ml καφεϊκού οξέος ή $\boxed{C_1 = 2{,}209 \text{ ppm}}$ εκφρασμένα σε συγκέντρωση καφεϊκού οξέος

Ομοίως,

$\boxed{C_2 = 2{,}115 \text{ ppm}}$

$\boxed{C_3 = 1{,}196 \text{ ppm}}$

$\boxed{C_4 = 1{,}721 \text{ ppm}}$

'Οπου:

C_1 : συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών πριν από την κατανάλωση τσαγιού χωρίς ένζυμο

C_2 : συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών μετά την κατανάλωση τσαγιού χωρίς ένζυμο

C_3 : συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών πριν από την κατανάλωση τσαγιού με ένζυμο

C_4 : συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών μετά την κατανάλωση τσαγιού με ένζυμο

Β] Αποτελέσματα HPLC

	Συνολικό εμβαδόν (AU·sec)
Δείγμα πριν από την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο	8,96
Δείγμα μετά την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο	4,705
Δείγμα πριν από την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο	7,29
Δείγμα μετά την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο	5,64

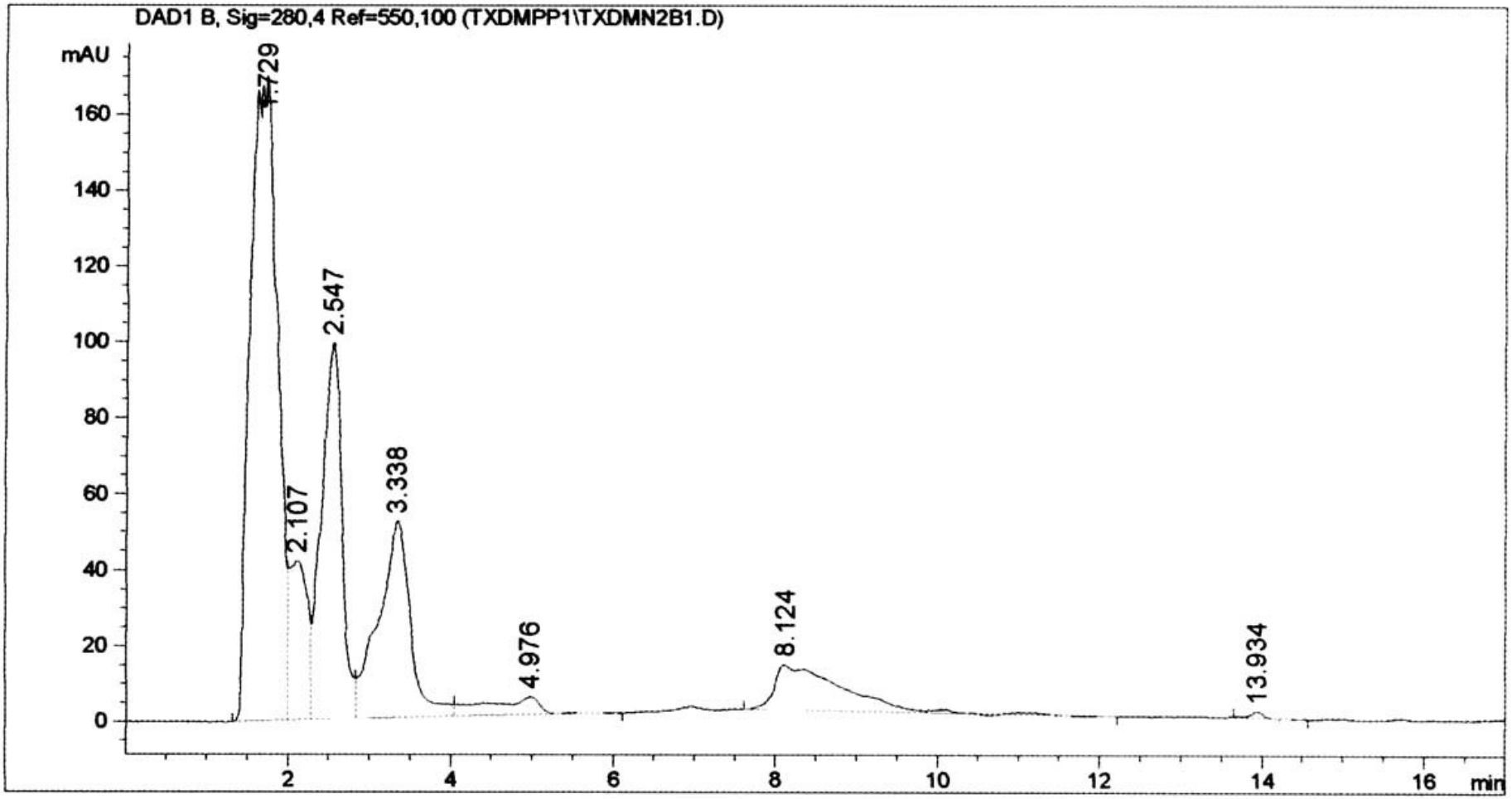
Ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC δεν μπορεί να γίνει για τους εξής δύο λόγους:

i. κατά την επεξεργασία των πιλοτικών δειγμάτων δεν προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο (α-ναφθόλη). Εφόσον δεν προστέθηκε γνωστή ουσία, γνωστής συγκέντρωσης δεν μπορούν να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων

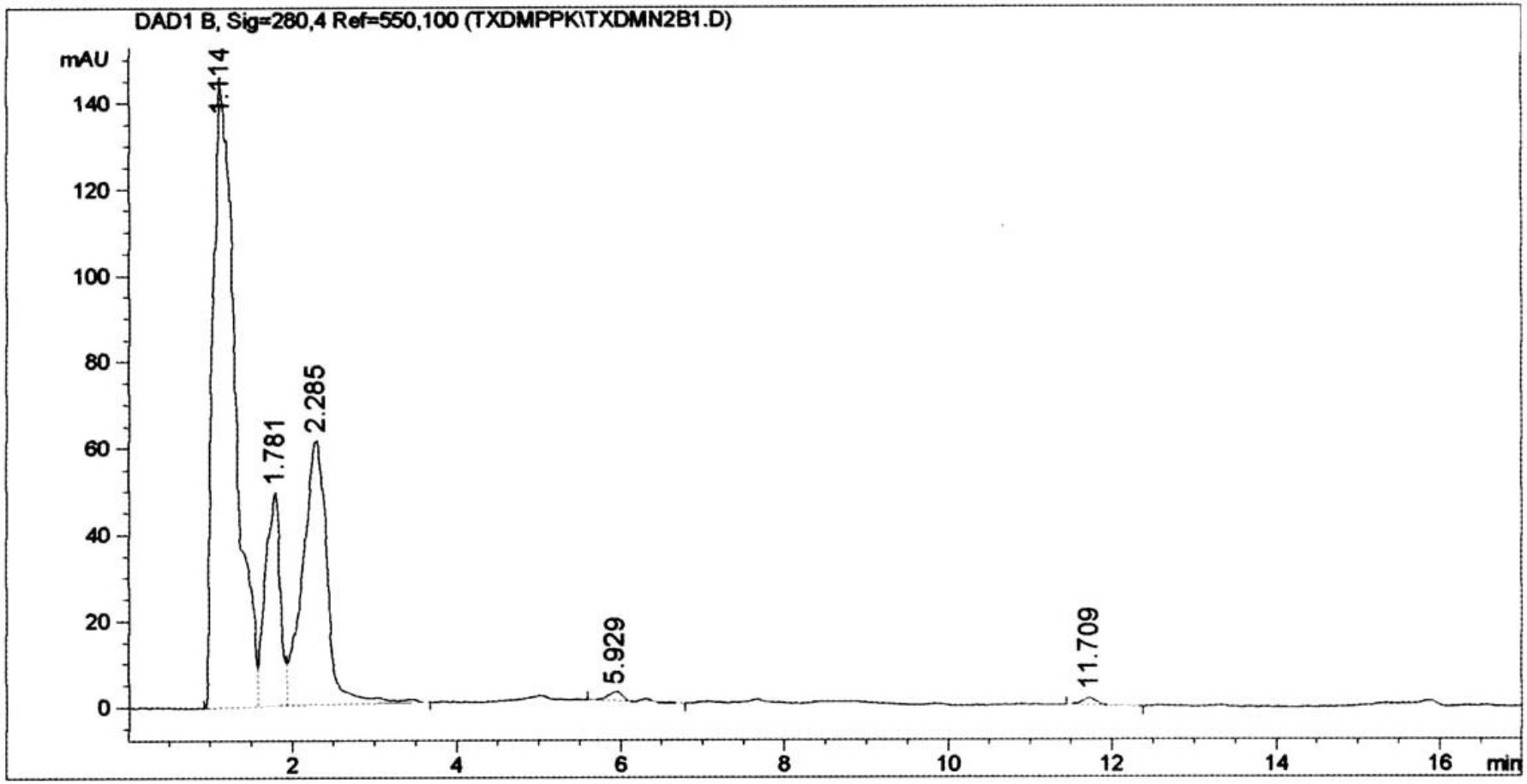
ii. για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος, της τυροσόλης και της επικατεχίνης χρησιμοποιήθηκαν πολύ πυκνά δείγματα της τάξεως των μg/μL (ή g/Lt) αντί της τάξεως των ppm (ή μg/mL)

Επομένως, η ποσοτική ανάλυση βασίστηκε στην F-C ενώ η ποιοτική στην GC.

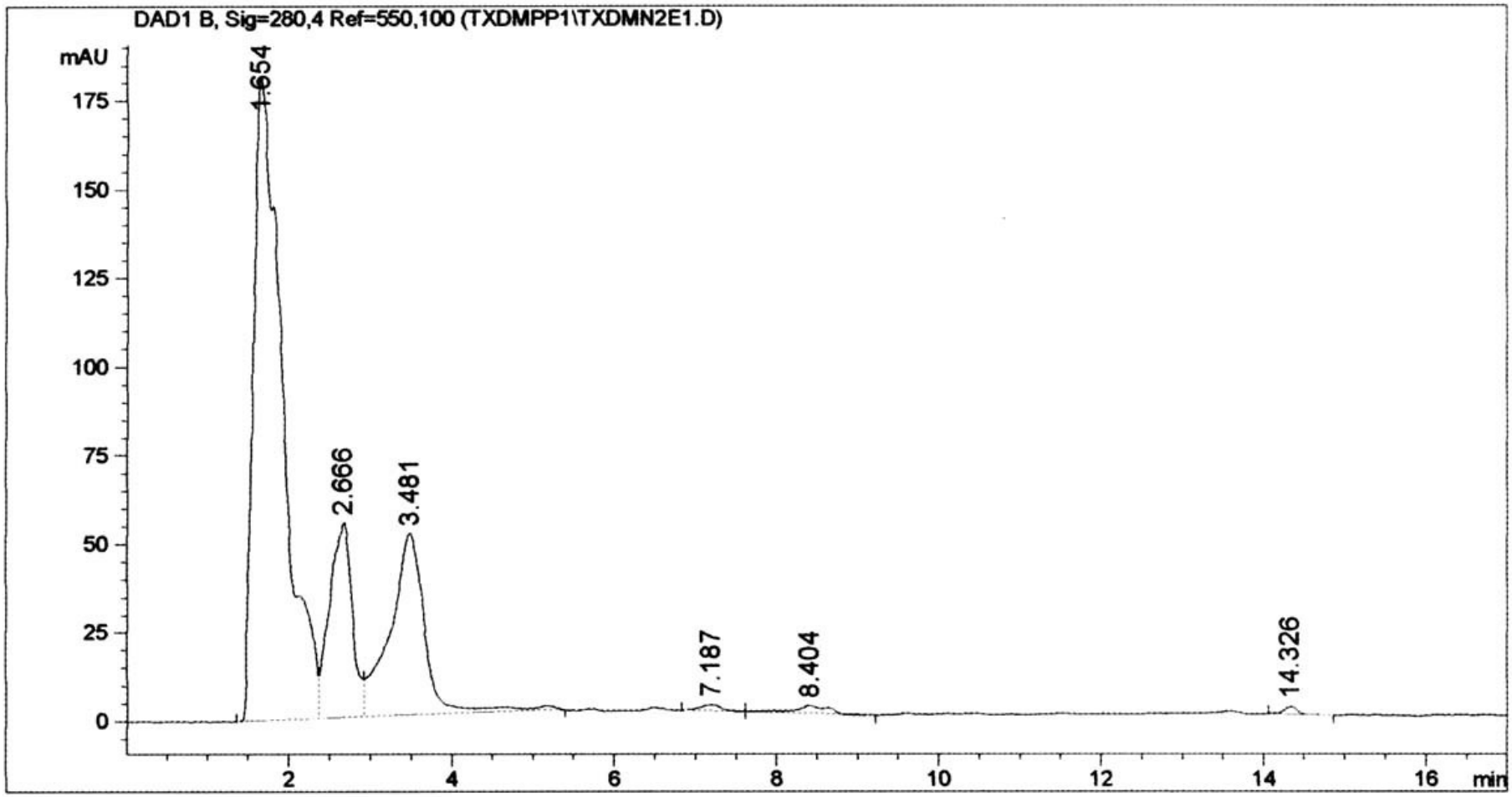
Ενδεικτικά παρατίθενται τα ακόλουθα χρωματογραφήματα (βλ. σελίδες 75, 76, 77 και 78)



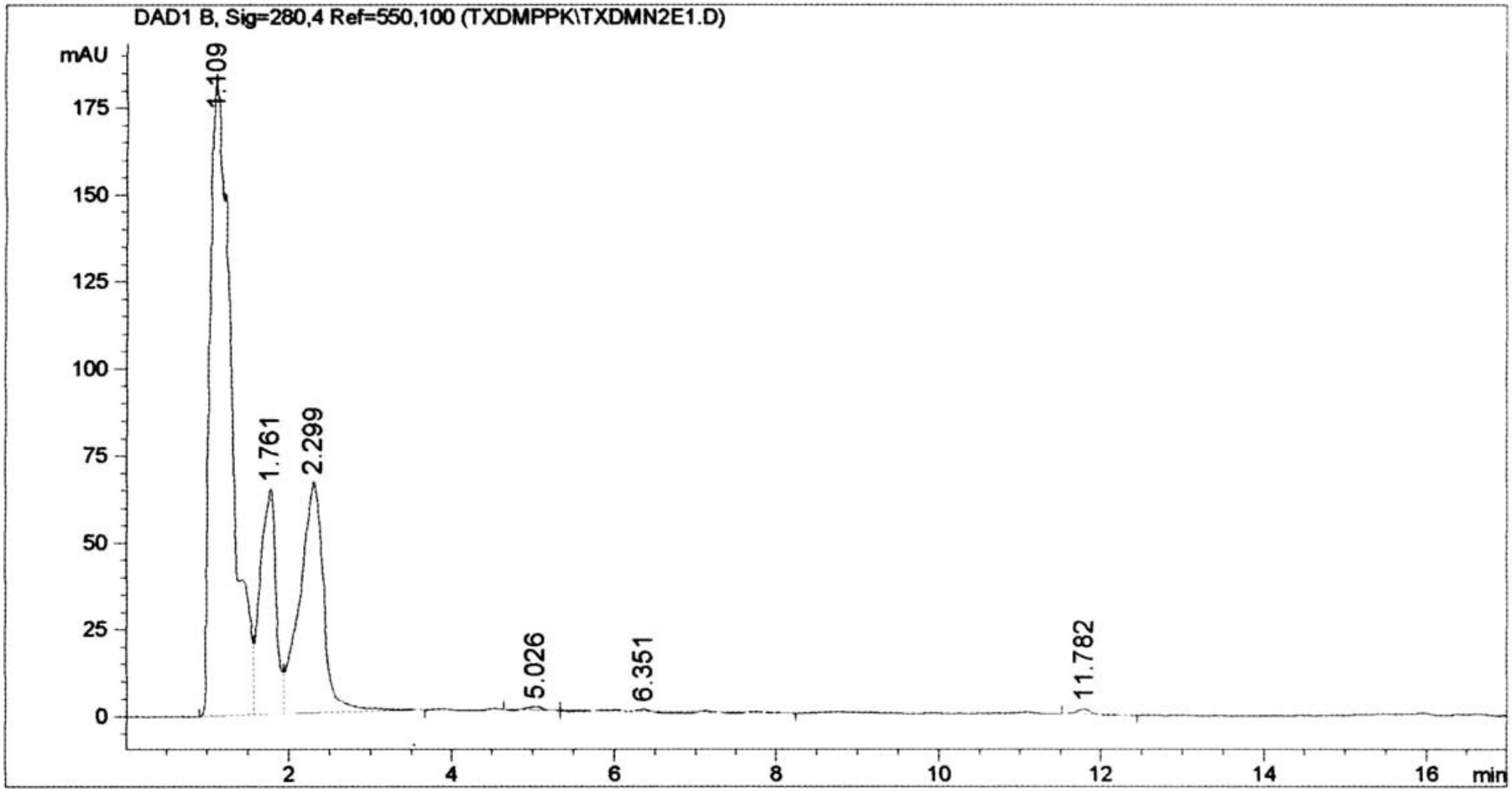
Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος πριν την παρέμβαση, χωρίς προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος μετά την παρέμβαση, χωρίς προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος πριν την παρέμβαση, με προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος μετά την παρέμβαση, με προσθήκη ενζύμου.

Γ] Αποτελέσματα GC

	Συνολικό εμβαδόν (Abu· sec) (t = 0 – 105 min)
Δείγμα πριν από την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο (Α)	1.072 10^6
Δείγμα μετά την κατανάλωση τσαγιού, χωρίς ένζυμο (Β)	1.031 10^6
Δείγμα πριν από την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο (Γ)	8.987 10^6
Δείγμα μετά την κατανάλωση τσαγιού, με ένζυμο (Δ)	8.833 10^6

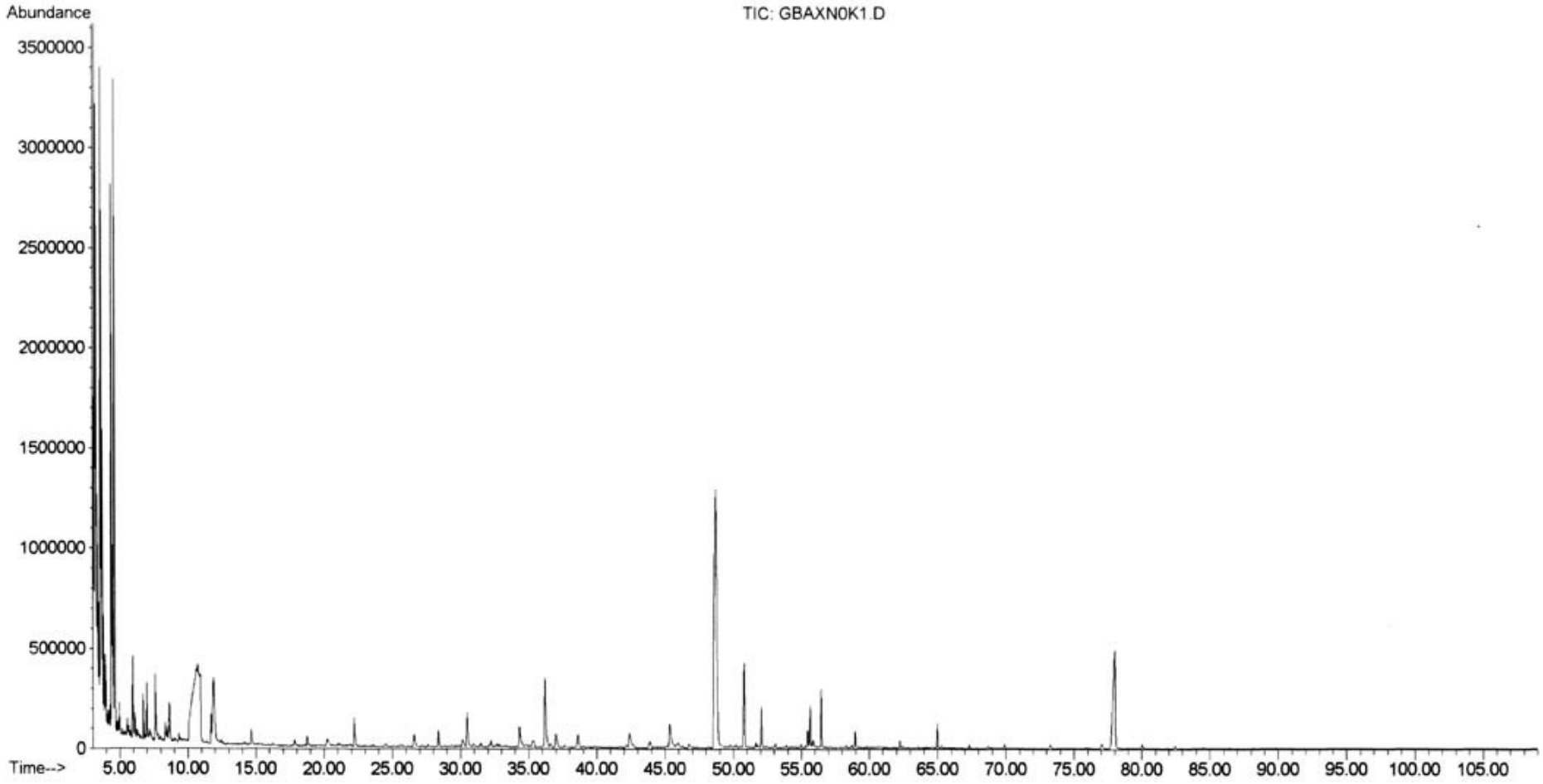
Κάνοντας μία ποσοτική εκτίμηση, διαπιστώνουμε μείωση των πολυφαινολών αρκετό χρόνο μετά την κατανάλωση (t > 2 ωρών).

Ποιοτική ανάλυση

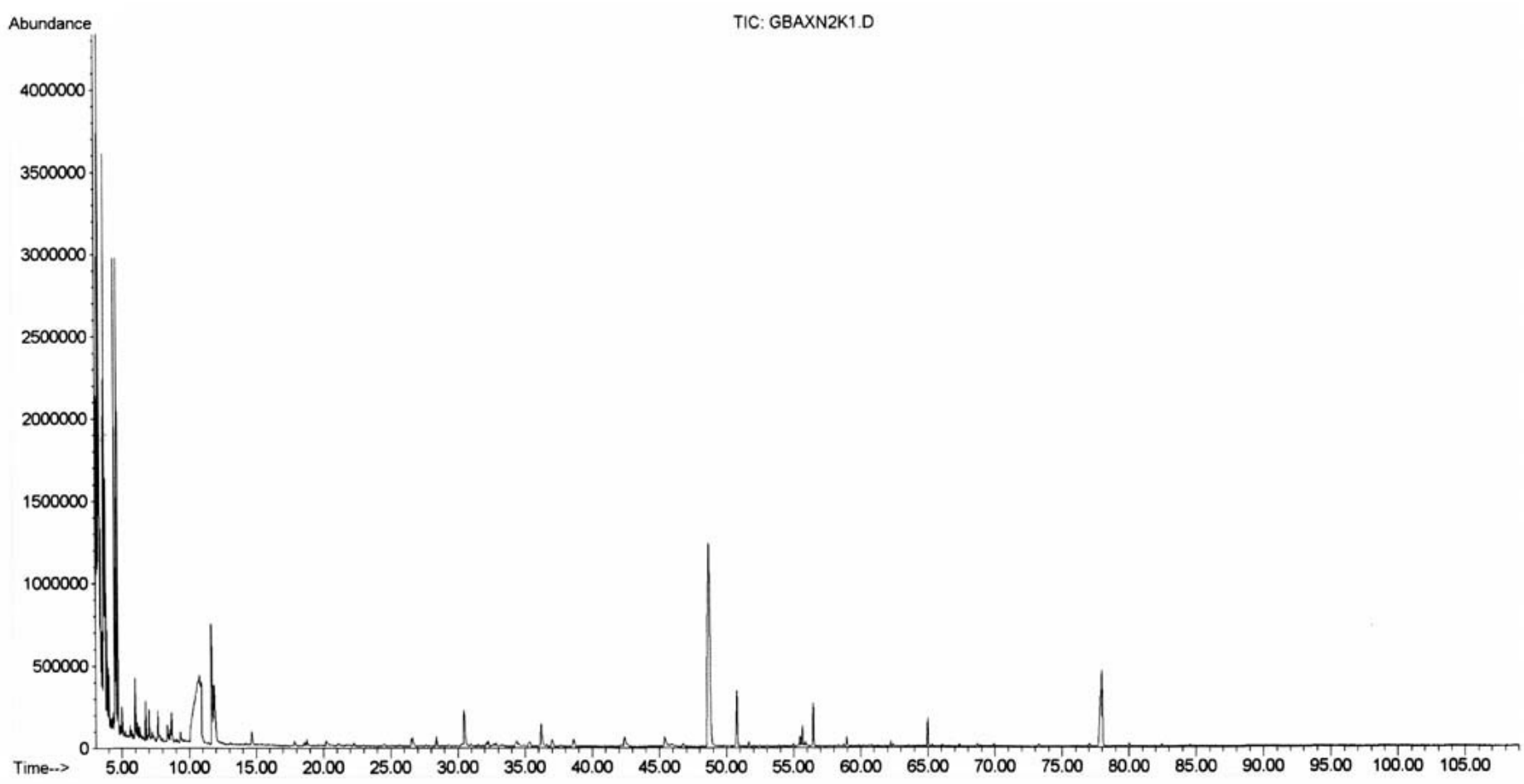
Δείγμα	**RT (min)**	**Ουσία**
Α	30,9	π-υδρόξυ βενζοικό οξύ
Α	36,8	Βανιλλικό οξύ
Α	45,3	3,4-διυδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ
Α	48.5	Συρινγκικό οξύ
Α	52,4	Γαλλικό οξύ
Α	55,4	Φερουλικό οξύ
Α	58,3	Ταννικό οξύ
Α	64,9	Ρεσβερατρόλη
Β	30,9	π-υδρόξυ βενζοικό οξύ
Β	36,8	Βανιλλικό οξύ
Β	45,3	3,4-διυδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ
Β	48.5	Συρινγκικό οξύ
Β	52,4	Γαλλικό οξύ
Β	55,4	Φερουλικό οξύ
Β	58,3	Ταννικό οξύ
Β	64,9	Ρεσβερατρόλη
Γ	48,5	Συρινγκικό οξύ
Γ	50,0	π-κουμαρικό οξύ
Γ	55,4	Φερουλικό οξύ
Γ	57,3	Καφεϊκό οξύ
Γ	58,3	Ταννικό οξύ
Γ	59,3	Σιναπικό οξύ
Δ	48,5	Συρινγκικό οξύ
Δ	50,0	π-κουμαρικό οξύ
Δ	55,4	Φερουλικό οξύ
Δ	57,3	Καφεϊκό οξύ
Δ	58,3	Ταννικό οξύ

Δ	59,3	Σιναπικό οξύ

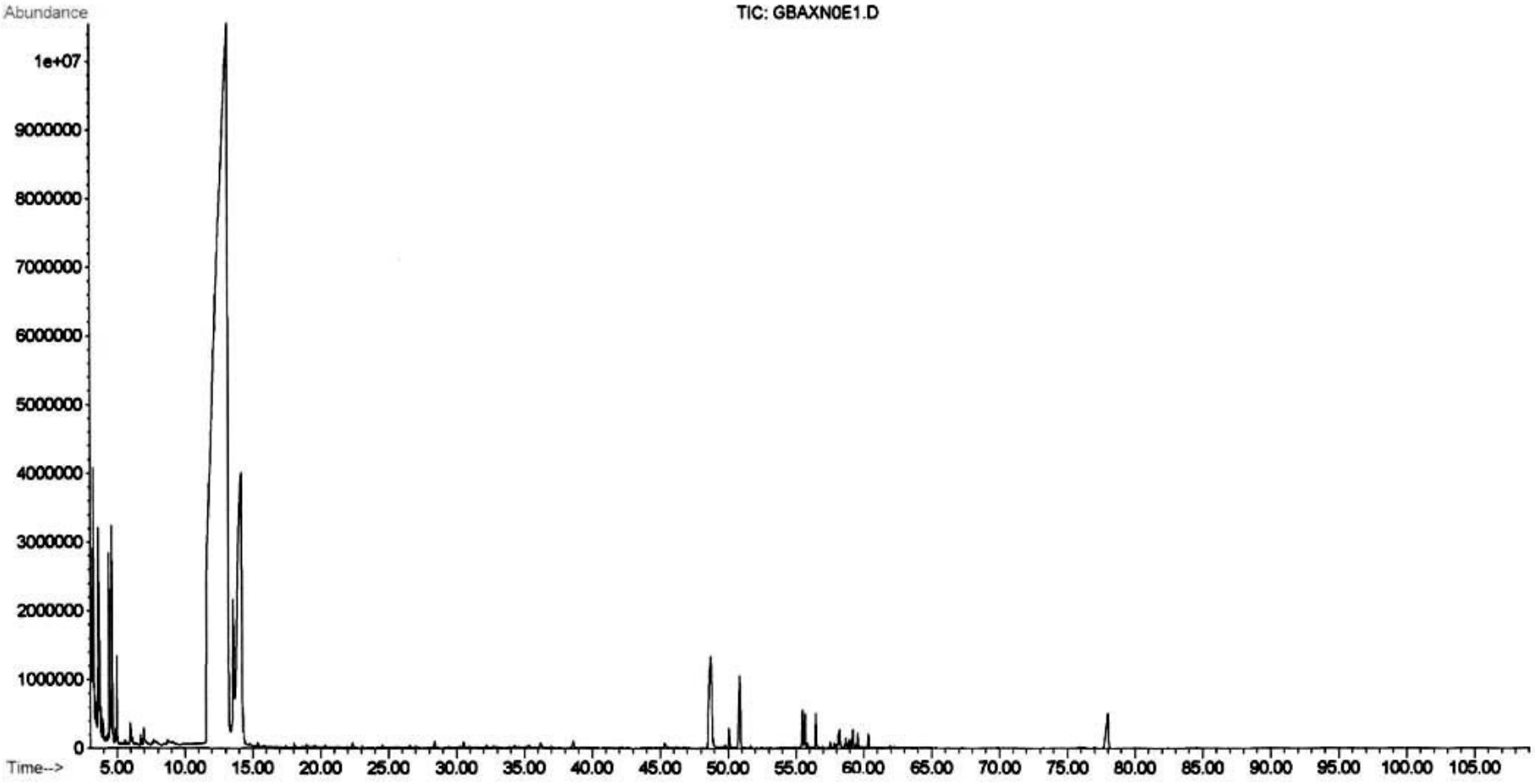
Ενδεικτικά παρατίθενται τα ακόλουθα χρωματογραφήματα (βλ. σελίδες 81, 82, 83 και 84)



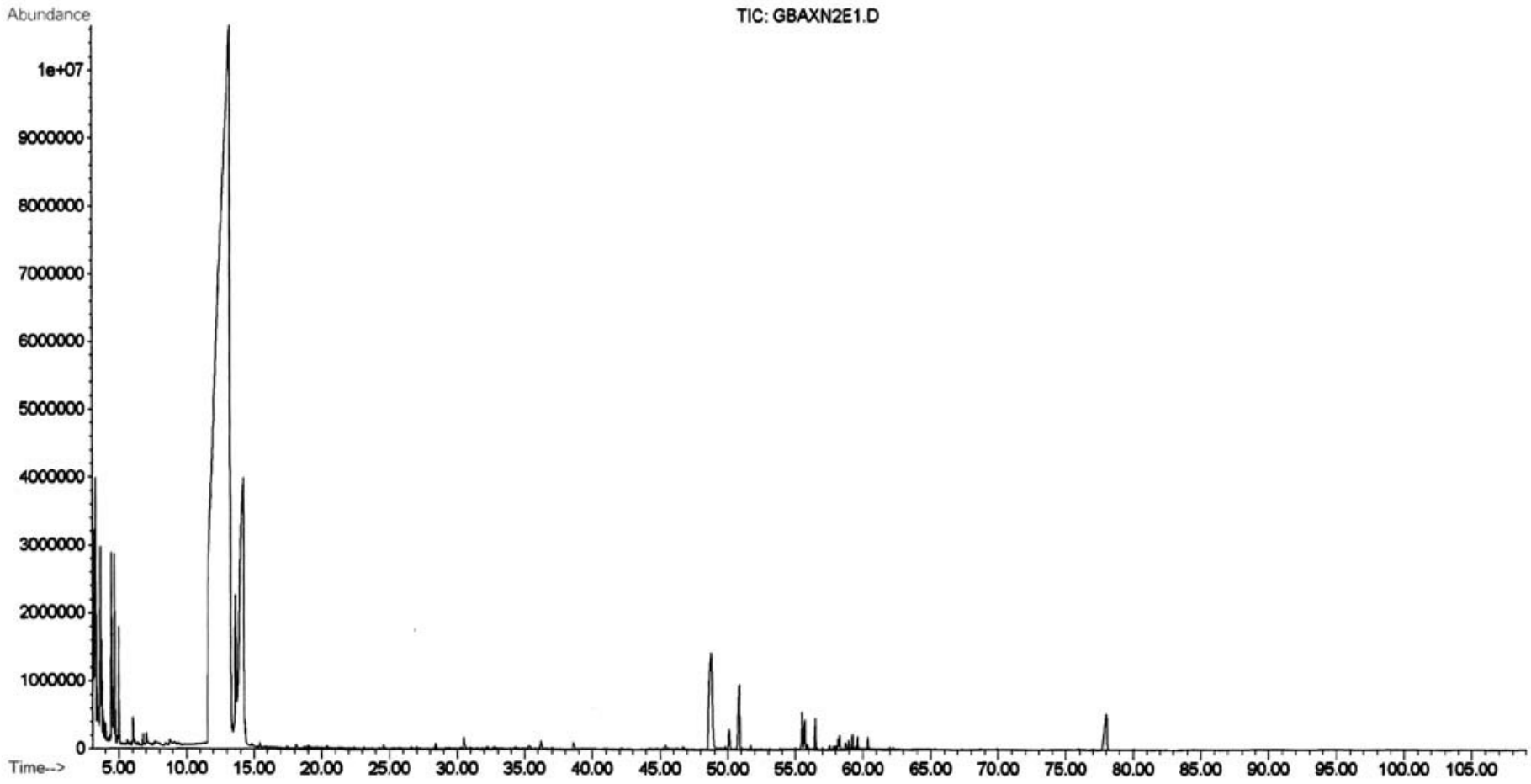
Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος πριν την παρέμβαση, χωρίς προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος μετά την παρέμβαση, χωρίς προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος πριν την παρέμβαση, με προσθήκη ενζύμου.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος μετά την παρέμβαση, με προσθήκη ενζύμου.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών στον άνθρωπο αποτελεί ένα 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 μία άρτια προσπάθεια ανεύρεσης πιλοτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε αίμα και ούρα ανθρώπου μετά από μια δόση φόρτισης.

Στη μελέτη μας προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε την κινητική της απορρόφησης των βιοφαινολών με λήψη αίματος σε τακτά χρονικά διαστήματα πριν και μετά τη δόση φόρτισης. Επίσης επιχειρήσαμε να προσδιορίσουμε το ποσοστό απέκκρισης των καταναλισκόμενων πολυφαινολών στα ούρα. Με άλλα λόγια επιδιώξαμε να μελετήσουμε τις συνιστώσες που ορίζουν το πολύπλευρο θέμα της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών ενώσεων.

Κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους ανέκυψαν αστάθμητοι παράγοντες όπως άλλωστε αναμενόταν για μία πιλοτική μελέτη. Η δυσκολία επιλογής κατάλληλης μεθοδολογίας αποτέλεσε τον κυριότερο ανασταλτικό παράγοντα. Η αιμοληψία με την τεχνική του φλεβοκαθετηριασμού, η επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων καθώς και ο προσδιορισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων ήταν μερικοί άλλοι παράγοντες.

Ο απώτερος σκοπός του πιλοτικού αυτού πειράματος ήταν η εύρεση μιας αξιόπιστης μεθόδου προσδιορισμού των πολυφαινολών στο αίμα μετά από κατανάλωση τσαγιού και η σύγκριση των επιπέδων τους με τα αντίστοιχα πριν την κατανάλωση. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι ανάλυσης – FC, HPLC και GC- και ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με FC. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση των συγκεντρώσεων των πολυφαινολών στο αίμα 2 ώρες μετά την κατανάλωση των δειγμάτων. Η φαινομενικά αντιφατική αυτή μείωση εξηγείται από το γεγονός ότι είχαν παρέλθει περισσότερες των 2 ωρών μέχρι την αιμοληψία, αφού η κατανάλωση των δειγμάτων διήρκησε περίπου μία ώρα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα επιτυγχάνεται πολύ νωρίτερα. Για να τεκμηριωθεί μια σχέση μεταξύ δόσης – συγκέντρωσης πολυφαινολών στο αίμα, θα πρέπει το δείγμα να καταναλωθεί σε μία εφ' άπαξ δόση εντός ολίγων λεπτών. Εν αντιθέσει η κατανάλωση δειγμάτων στο πιλοτικό πείραμα έγινε σταδιακά με αποτέλεσμα να μην υπάρχει σαφής τάση μεταβολής της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο.

Ένας άλλος παράγοντας που εξηγεί την παρατηρούμενη μείωση είναι το οξειδωτικό στρες στο οποίο είχαν εκτεθεί οι εθελοντές κατά τη μέρα της αιμοληψίας. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται σε ψυχολογικούς παράγοντες αλλά και στο γεγονός ότι οι

εθελοντές ήταν καπνιστές. Ιδανικά, ένα αντίστοιχο πείραμα, θα πρέπει να διεξαχθεί σε ελεγχόμενο περιβάλλον υπό συνθήκες απόλυτης ηρεμίας.

Επιπροσθέτως, το τσάι δεν καταναλώθηκε αμέσως μετά την παρασκευή του. Όμως, όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής του τσαγιού μέχρι την κατανάλωση, τόσο μειώνεται το περιεχόμενο του σε πολυφαινόλες. Το γεγονός αυτό εξηγεί επίσης την μικρή μείωση που παρατηρείται.

Για να διαπιστωθεί ο ακριβής χρόνος μέσα στον οποίο γίνεται μέγιστη η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο αίμα (peak), ελήφθησαν δείγματα αίματος ανά μισή ώρα από τη στιγμή της κατανάλωσης μέχρι και 2,5 ώρες μετά. Επίσης συνελέχθησαν ούρα 24ώρου προκειμένου να υπολογιστεί η απέκκριση των πολυφαινολών στα ούρα. Τα δείγματα αυτά είναι προς ανάλυση.

Ευελπιστούμε η μελέτη αυτή να αποτελέσει το έναυσμα για την εκπόνηση περαιτέρω μελετών για τη βιοδιαθεσιμότητα στον ανθρώπινο οργανισμό. 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 χρησιμοποίηση 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. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdulla, M. and Gruber, P. *Role of Diet Modification in Ccancer Prevention*. BioFactors. 2000: 12 (1–4), pp. 45-51.

Ahmad, N. and Mukhtar, H. *Cutaneous Photochemoprotection by Green Tea: a brief review*. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. 2001: 14 (2), pp. 69-76.

Anderson, R.F. *et al*. *Green Tea Catechins Partially Protect DNA From (.) OH radical-induced Strand Breaks and Base Damage Through Fast Chemical Repair of DNA Radicals*. Carcinogenesis. 2001: 22 (8), pp. 1189-1193.

Ανδρικόπουλος, Κ. Ν. *Σημειώσεις Οργανικής Χημείας και Δομικής Βιοχημείας (τόμος Ι)*. Αθήνα. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.1998: pp. 174.

Ανδρικόπουλος, Κ. Ν. *Σημειώσεις Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων (τόμος ΙΙ)*. Αθήνα. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. 1999: pp. 161-220.

Angerosa, F., d' Alessandro, N., Konstntinou, P. and Di Giacinto. *GC-MC Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil.* J.Agric.Food Chem.1995: 43, pp1802-1807.

Arogba, S. S. *Mango (Mangifera indica) Kernel: Chromatographic Analysis of the Tannin and Stability Study of the Associated Polyphenol Oxidase Activity*. Journal of Food Composition and Analysis. 2000: 13 (2), pp. 149–156.

Arts, C.W.I., Hollman, C.H.P. and Kromhout, D. *Chocolate as a Source of Tea Flavonoids*. The Lancet. 1999: 354, p. 488.

Bartolomé, B. *et al. Changes in Phenolic Compounds in Lentils (Lens culinaris) Dduring Germination and Fermentation*. Z Lebensm Unters Forsch A. 1997: 205, pp. 290–294.

Beecher, R.G., Warden, A.B. and Merken, H. *Analysis of Tea Polyphenols*. Proceedings Society for experimental Biology and Medicine. 1999: 220, pp. 267-270.

Βεκιάρη, Σ.Α. *Οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου και η Σημασία τους στην Ποιότητά του*. Χημικά χρονικά. 2001: 2, pp. 45-48.

Boyle, S.P. *et al*. *Absorption and DNA Protective Effects of Flavonoids Glycosides From an Onion Meal*. European Journal of Nutrition. 2000: 39, pp. 213-223.

Caldwell, C.R. *Oxygen Radical Absorbance Capacity of the Phenolic Compounds in Plant Extracts Fractionated by High-Performance Liquid Chromatography*. Analytical Biochemistry. 2001: 293 (2), pp. 232-238.

Caponio, F. *et al*. *Phenolic Compounds in Virgin Olive Oils: Influence of the Degree of Olive Ripeness on Organoleptic Characteristics and Shelf-Life*. Eur Food Res Technol. 2001: 212, pp. 329–333.

Carbonare, M., Grant, G. and Pusztai, A. *Evaluation of Polyphenol Bioavailability in Rat Small Intestine*. European Journal of Nutrition. 2001: 40, pp. 84-90.

Cheng, T.O. *Tea is Good for the Heart*. Archives of Internal Medicine. 2000: 160 (15), p.

2397.
Cherubini, A. *et al*. *Black tea Increases the Resistance of Human Plasma to Lipid Peroxidation in Vitro, but not ex Vivo*. Free Radical Biology & Medicine. 1999: 27 (3/4), pp. 381-387.
Coleman, N.A. *Antioxidants in Critical Care Medicine*. Environmental care medicine. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2001: 10, pp. 183-188.
Colic, M. and Pavelic, K. *Molecular Mechanisms of Anticancer Activity of Natural Dietetic Products*. Journal of Molecular Medicine. 2000: 78 (6), pp. 333–336.
De Maat, M.P. *et al*. *Consumption of Black and Green Tea had no Effect on Inflammation, Homeostasis and Endothelial Markers in Smoking Healthy Individuals*. European Journal of Clinical Nutrition. 2000: 54 (10), pp. 757-763.
De la Taille, A. *et al*. *Cancer of the Prostate: Influence of Nutritional Factors. A New Nutritional Approach*. Presse Medicale. 2001: 30 (11), pp. 561-564.
Dreosti, E.I. *Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa and Wine*. Nutrition. 2000: 16, pp. 692-694.
Duffy, S.J. *et al*. *Short – and Long – Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease*. Circulation. 2001: 104 (2), pp. 151-156.
Dufresne, J.C. and Farnworth, R.E. *A Review of Latest Research Findings on the Health Promotion Properties of Tea*. Journal of Nutritional Biochemistry. 2001: 12, pp. 404-421.
Fairweather – Tait, J.S. *The Importance of Trace Element Speciation in Nutritional Sciences*. Fresenius J. Anal. Chem. 1999: 363, pp. 536-540.
Fitó, M. *et al*. *Protective Effect of Olive Oil and its Phenolic Compounds Against Low-Density Lipoprotein Oxidation*. Lipids. 2000: 35 (6), pp. 633-638.
Frémont, L. *Biological Effects of Resveratrol*. Life Sciences. 2000: 66 (8), pp. 663-673.
Fujiki, H. *Two Stages of Cancer Prevention With Green Tea*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 1999: 125, pp. 589-597.
Γαλάρης, Δ. και Δούλιας, Π.Θ. *Βιολογικά Αντιοξειδωτικά*. Χημικά Χρονικά. 2001: 2, pp. 49-50.
Gerard, A.A. *et al*. *Analysis of Catechins from Green and Black Tea in Humans: A specific and Sensitive Colorimetric Assay of Total Catechins in Biological Fluids*. International Journal of Food Science and Nutrition. 1997: 48, pp. 387-392.
German, J. B. and Walzem, R. L. *The Health Benefits of Wine*. Annual Review of Nutrition. 2000: 20, pp. 561–593.
Gil-Izquierdo, A. and Mellenthin, A. *Identification and Quantitation of Flavonols in Rowanberry (Sorbus aucuparia L.) juice*. Eur. Food Res. Technol. 2001: 213, pp. 12-17.

Giovanneli, L. *et al*. *Effect of Complex Polyphenols and Tannins From Red Wine on DNA Oxidative Damage of Rat Colon Mucosa in Vivo*. European Journal of Nutrition. 2000: 39 (5), pp. 207-212.
Giugliano, D. *Dietary Antioxidants for Cardiovascular Prevention*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases: NMCD. 2000: 10 (1), pp. 38-44.
Graefe, E.U. *et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans*. Journal of Clinical Pharmacology. 2001: 41 (5), pp. 492-499.
Hakim *et al*. *Reproducibility and Relative Validity of a Questionnaire to Assess Intake of Black Tea Polyphenols in Epidemiological Studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001: 10 (6), pp. 667-678.
HaKim, I.A. *et al*. *Preparation, Composition and Consumption Patterns of Tea-Based Beverages in Arizona*. Nutrition Research. 2000: 20(12), pp. 1715-1724.
Hassapidou, N. M. and Bairactari, M. *Dietary Intake of Pre-adolescent Children in Greece*. Nutrition & Food Science. 2001: 31 (3), pp. 136–140.
Hirvonen, T. *et al*. *Intake of Flavonols and Flavones and Risk of Coronary Heart Disease in Male Smokers*. Epidemiology. 2001: 12 (1), pp. 62-67.
Hodgson, J. M. *et al*. *Acute Effects of Ingestion of Black and Green Tea on Lipoprotein Oxidation*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000: 71 (5), pp. 1103-1107.
Hollman, P.C. *et al*. *Addition of Milk does not Affect the Absorption of Flavonols from Tea in Man*. Free Radical Research. 2001: 34 (3), pp. 297-300.
Hollman, P.C.H. *Bioavailability of Flavonoids*. European Journal Clinical Nutrition. 1997: S1 (1), pp. S66-S69.
http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001.
Hu, C. and Kitts, D.D. *Evaluation of Antioxidant Activity of Epigallocatechin, Gallate in Biphasic Model Systems in Vitro*. Molecular and Cellular Biochemistry. 2001: 218, pp. 147-155.
Ichihashi, M. et al. *Preventive Effect of Antioxidant on Ultraviolet-Induced Skin Cancer in Mice*. Journal of Dermatological Science. 2000: 23 (1), pp. S45-S50.
Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, Y. *Flavonoids Protect Neuronal Cells From Oxidative Stress by Three Distinct Mechanisms.* Free Radical Biology and Medicine.2001: 30 (4), pp433-446.
Καστανάς, Η. *Επιδράσεις Αντιοξειδωτικών στην Αθηρογένεση και την καρκινογένεση.* Πρακτικά Ημερίδας για τα Λειτουργικά Τρόφιμα. Ένωση Ελλήνων Χημικών: 31-5-2002.
Katiyar, S.K. and Elmets, C.A. *Green Tea Polyphenolic Antioxidants and Skin Photoprotection (Review).* International Journal of Oncology. 2001: 18 (6), pp. 1307-1313.
Katiyar, S.K. *et al*. *Green Tea Polyphenol (-)- epigallocatechin-3-gallate Treatment of Human Skin Inhibits Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Stress*. Catcinogenesis. 2001: 22(2), pp. 287-294.
Krause Mendelson, M. *Food, Nutrition and Diet Therapy*, 10th ed. In: Mahan, L.K., Escott-

Stymp, S. (eds). USA: W.B. Saunders Company, 2000.
Kuhnle, G. *et al*. *Epicatechin and Catechin are O-methylated and Glucuronidated in the Small Intestine*. Biochemical and Biophysical Research. 2000: 277 (2), pp. 507-512.
Kuntz, S. *et al*. *Comparative Analysis of the Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity and Apaptosis in Human Colon Cancer Cell Lines*. European Journal of Nutrition. 1999: 38, pp. 133-142.
Langley – Evans, S. *Tea as a Protective Agent in Cardiovascular Health*. Nutrition and Food Science. 2001: 31 (2), pp. 75-78.
Langley – Evans, S.C. *Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using the Ferric Reducing Power (FRAP) assay*. International Journal of Food Science and Nutrition. 2000: 51(3), pp. 181-188.
Lee, A., Thurnham, I. D. and Chopra, M. *Consumption of Tomato Products With Olive Oil But not Sunflower Oil Increases the Antioxidant Activity of Plasma*. Free Radical Biology and Medicine. 2000: 29 (10), pp. 1051–1055.
Li, C. *et al*. *Analysis of Urinary Metabolites of Tea Catechins by Liquid Chromatography / Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Chemical Research in Toxicology. 2001: 14 (6), pp. 702-707.
Liang, Y. and Xu, Y. *Effect of PH on Cream Particle Formation and Solids Extraction Yield of Back Tea*. Food Chemistry. 2001: 77, pp. 155-160.
Lodovici, M. *et al*. *Effect of Natural Phenolic Acids on DNA Oxidation in Vitro*. Food and Chemical Toxicology. 2001: 39j, pp. 1205-1210.
Lu, Y. and Foo, Y.L. *Salvianolic Acid L, a Potent Phenolic Antioxidant From Salvia Officinalis*. Tetrahedron Letters. 2001: 42, pp. 8223-8225.
Manach, C. *et al*. *Comparison of the Bioavailibility of Quercetin and Catechin in Rats*. Free Radical Biology & Medicine. 1999: 27 (11/12), pp. 1259-1266.
Marken, H. M. and Beecher, G. R. *Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000: 48 (3), pp. 577–599.
Maznah, I. *et al*. *Chemical Composition and Antioxidant Activity of Strobilanthes Crispus Leaf Extract*. J. Nutr. Biochem. 2000: 11, pp. 536-542.
Miao, J.L. *et al*. *The Scavenging Reactions of Nitrogen Dioxide Radical and Carbonate Radical by Tea Polyphenol Derivatives: a Pulse Radiolysis study*. Radiation Physics and Chemistry. 2001: 60, pp. 163-168.
Middleton, E.Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. *The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer*. Pharmacological Reviews. 2000: 52 (4), pp. 673–751.
Montanari, L. *et al. Organic and Phenolic Acids in Beer.* [Electronic Text Center, University of Basilacata, University of Perugia and National Institute of Nutrition in Rome]. http://www.idealibrary.com/links/artid/fstl.1999.0593
Moline, J. *et al*. *Dietary Flavonoids and Hypertension: Is There a Link*? Medical Hypotheses.

2000: 55 (4), pp. 306-309.
Μπόσκου, Δ. *Χημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις Γαρταγάνη: Θεσσαλονίκη, 1997.
Mulder, P.J.T. *et al*. *Analysis of Theaflavins in Biological Fluids Using Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry*. Journal of Chromatography. 2001: 760, pp. 271-279.
Muto, S. *et al*. *Inhibition by Green Tea Catechins of Metabolic Activation of Procarcinogens by Human Cytochrome P 450*. Mutation Research. 2001: 479, pp. 197-206.
Nagano, J. *et al*. *A Prospective Study of Green Tea Consumption and Cancer Incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan).* Cancer Causes and Control. 2001: 12, pp. 501-508.
Nicoli, M.C. *et al*. *Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree*. Lebensimittel-Wissenschaft und-Technologie/FST. 1997: 30 (3), pp. 1096-1127.
Norrish, A. E. *et al*. *Men Who Consume Vegetable Oils Rich in Monounsaturated Fat: Their Dietary Patterns and Risk of Prostate Cancer (New Zealand).* Cancer Causes and Control. 2000: 11 (7), pp. 609-615.
Owen, W.R. *et al*. *Olive–Oil Consumption and Health: the Possible Role of Antioxidants*. The Lancet Oncology. 2000: 1, pp. 107-112.
Prior, R.L. and Cao, G. *Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components of Teas: Implications for Altering In vivo Antioxidant Status*. Society for Experimental Biology and Medicine. 1999: 220 (4), pp. 255-261.
Quinlan, P., Lane, J. and Aspinall, L. *Effects of Hot Tea, Coffee and Water Ingestion on Physiological Responses and Mood: the Role of Caffeine, Water and Beverage Type*. Psycopharmacology. 1997: 134, pp. 164-173.
Rice-Evans, C. and Miller, J. N. *Antioxidants-the Case for Fruits and Vegetables in the Diet*. British Food Journal. 1995: 97 (9), pp. 35–40.
Russo, A. *et al*. *Bioflavonoids as Antiradicals, Antioxidants and DNA Cleavage Protectors*. Cell Biology and Toxicology. 2000: 16, pp. 91-98.
Saya, M.V. *et al*. *Isolation and Characterization of Melanic Pigments Derived From Tea and Tea Polyphenols*. Food Chemistry. 2001: 73, pp. 177-184.
Sawai, Y. and Moon, J.H. *NMR Analytical Approach to Clarify the Molecular Mechanisms of the Antioxidative and Radical – Scarenging Activities of Antioxidants in Tea Using 11-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000: 48(12), pp. 6247-6253.
Scalbert, A. and Williamson, G. *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*. The Journal of Nutrition. 2000: 130 (8S), pp. 2073S-2085S.
Serafini, M. *et al*. *Inhibition of Human LDL Lipid Peroxidation by Phenol-rich Beverages and Their Impact on Plasma Total Antioxidant Capacity in Humans*. J. Nutr. Biochem. 2000: 11, pp. 585-590.
Shahidi, F. *Antioxidants in Food and food antioxidants*. Die Nahrung. 2000: 44(3), pp. 158-163.

Shankel, D.M. *et al*. *Role of Antimutagens / Anticarcinogens in Cancer Prevention*. Biofactors. 2000: 12 (1-4), pp. 113-121.
Shi, X. *et al*. *Antioxidant Properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its Inhibition of Cr (I)-Induced DNA Damage and Cr (CI) –or TPA- Stimulated NF-KB Activation*. Molecular and Cellular Biochemistry. 2000: 206, pp. 125-132.
Spencer, P.E.J. *et al*. *Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000: 272 (1), pp. 236-241.
Stach, D. and Schmitz, J.O. *Decrease in Concentration of Free Catechins in Tea Over Time Determined by Micellar Electrokinetic Chromatography*. Journal of Chromatography. 2001: 924, pp. 519-522.
Suganuma, M. *et al*. *Green Tea and Cancer Chemoprevention*. Mutation Research. 1999: 428, pp. 339-344.
Thiagarajan, G. *et al*. *Antioxidant Properties of Green and Black Tea and their Potential Ability to Retard the Progression of Eye Lens Cataract*. Experimental Eye Research. 2001: 73 (3), pp. 393-401.
Toit, R. *et al*. *Comparison of the Antioxidant Content of Fruits, Vegetables and Tea Measured as Vitamin C Equivalents*. Toxicology. 2001: 166, pp. 63-69.
Tomayo, C., Richardson, M.A., Diamond, S. and Skoda, I. *The Chemistry and Biological Activity of Herbs Used in Flor-Essence Herbal Tonic and Essiac*. Polytotherapy Research. 2000: 14(1), pp. 1-14.
Trevisanato, S. I. and Kim, Y. I. *Tea and Health*. Nutrition Reviews. 2000: 58 (1), pp. 1-10.
Triantaphyllou, K., Blekas, G. και Boskou, D. *Antioxidative Properties of Water Extracts Obtained From Herbs of the Species Lamiaceae*. International Journal of Food Science and Nutrition. 2001: 52 (4), pp. 313-317.
Trichopoulou, A. *et al*. *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. 2000:70, pp. 319-323.
Uesato, S. *et al*. *Inhibition of Green Tea Catechins Against the Growth of Cancerous Human Colon and Hepatic Epithelial Cells*. Cancer Letters. 2001: 170, pp. 41-44.
Valcic, S. *et al*. *Antioxidant Chemistry of Green Tea Catechins. New Oxidation Products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin From their Reactions With Peroxyl Radicals*. Chemical Research in Toxicology. 2000: 13(9), pp. 801-810.
van het Hof, H.K. *et al*. *Plasma and Lipoprotein Levels of Tea Catechins Following Repeated Tea Consumption*. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine. 1999: 220 (4), pp. 203-209.
Vinson, A. J. *Black and Green Tea and Heart Disease: a Review*. BioFactors. 2000: 13 (1-4), pp. 127-132.
Visioli, F. and Gall, C. *Antiatherogenic Components of Olive Oil*. Current Atherosclerosis Report. 2001: 3 (1), pp. 64-67.
Visioli, F. *et al*. *Cardioprotective Properties of Olive Oil-Derived Polyphenols*. 11th

International Symposium on Atherosclerosis: 9-10-1997.
Wang, F.J. *et al*. *A Dose-Response Effect From Chocolate Consumption on Plasma Epicatechin and Oxidative Damage*. Journal of Nutrition. 2000: 130, pp. 2115S-2119S.
Wang, H., Helliwell, K. *Epimerisation of Catechins in Green Tea Infusions*. Food Chemistry. 2000: 70, pp. 337-344.
Wang, H., Helliwell, K. *Determination of Flavonols in Green and Black Tea Leaves and Green Tea Infusions by High-Performance Liquid Chromatography*. Food Research International. 2001: 34, pp. 223-227.
Wang, H., Provan, J.G., and Helliwell, K. *Tea Flavonoids: their Functions, Utilization and Analysis*. Trends in Food Science and Technology. 2000:11, pp. 152-160.
Weisburger, H. J. *Approaches for Chronic Disease Prevention Based on Current Understanding of Underlying Mechanism*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000: 71 (6), pp. 1710S-1714S.
Weisburger, H. J. *Eat to Live, not Live to Eat.* Nutrition. 2000: 16, pp. 767-773.
Weisburger, H.J. *et al*. *Investigation of Commercial Mitolife as an Antioxidant and Antimutagen*. Nutrition. 2001: 17, pp. 322-325.
Wiseman, A.S. *et al*. *Dietary Non-Tocopherol Antioxidants Present in Extra Virgin Olive Oil Increase the Resistance of Low-Density Lipoproteins to Oxidation in Rabbits*. Atherosclerosis. 1996: 120, pp. 15-23.
Wollgast, J. and Anklam, E. *Polyphenols in Chocolate: is There a Contribution to Human Health*? Food Research International. 2000: 33, pp. 449-459.
Yamada, K. and Tachibana, H. *Recent Topics in Anti-oxidative factors*. BioFactors. 2000: 13 (1-4), pp. 167-172.
Yang, C. S. *et al*. *Inhibition of Carcinogenesis by Tea: Bioavailability of Tea Polyphenols and Mechanisms of Actions*. Society for Experimental Biology and Medicine. 1999, pp. 213-217.
Yoshida, H. *et al*. *Inhibitory Effect of Tea Flavonoids on the Ability of Cells to Oxidize Low Density Lipoprotein*. Biochemical Pharmacology. 1999: 58, pp. 1695-1703.
Zhu, N. *et al*. *Identification of Reaction Products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and Pyrogallol With 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical*. Food Chemistry. 2001: 73, pp. 345-349.
Zhu, N. *et al*. *Identification of Oxidation Products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin With* H_2O_2. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000:48 (4), pp. 979-981.