



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**Αξιολόγηση της κατανομής φυτοχημικών σε βιολογικό υλικό ζωικών προτύπων
μετά την κατανάλωση ξηρού φρούτου**

Πτυχιακή εργασία

Κυριακή Ριζοπούλου

A.M.: 217082

Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCE & EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

**Evaluation of phytochemicals distribution in biospecimen of animal model that
consumed dried fruit**

B.Sc. THESIS

Kiriaki Rizopoulou

A.M.: 217082

Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντωνία Χίου (Επιβλέπουσα),

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημικής Ανάλυσης και Σύνθεσης

Βάϊος Καραθάνος,

Καθηγητής Φυσικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης

Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αμαλία Γιάννη

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ), Τμήμα Επιστήμης

Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Κυριακή Ριζοπούλου,

Δηλώνω υπεύθυνα ότι,

1) Είμαι η κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

3) Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστώ από καρδιάς την κ. Χίου Αντωνία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου και επιβλέπουσα μου, για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και τη δυνατότητα συμμετοχής μου σε μία πειραματική διαδικασία, ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Η εμπιστοσύνη και η συνεχής στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού πρωτόκολλου καθώς και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας αποτέλεσε κινητήρια δύναμη για την επιτυχή ολοκλήρωση της όλης διαδικασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας - Βιοχημείας - Φυσικοχημείας Τροφίμων, και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Βασιλακοπούλου, της οποίας η βοήθεια ήταν πολύτιμη, προσφέροντας γνώσεις, συνεχόμενη καθοδήγηση και χρήσιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μελέτης. Ακόμα, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια μου Κατερίνα Βαρδάκα, για την άψογη συνεργασία και βοήθεια κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης των εργαστηριακών πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την αμέτρητη στήριξη και εμπύχωση σε κάθε μου προσπάθεια, καθώς και τους φίλους μου, οι οποίοι είναι παρόντες σε ό,τι κάνω.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	13
Α' ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ	15
1.1 Ορισμός	15
1.2 Ταξινόμηση φυτοχημικών	15
1.3 Περιεχόμενο τροφίμων σε φυτοχημικά	16
1.4 Διαιτητική πρόσληψη και ρόλος για την υγεία	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	19
2.1 Ορισμός	19
2.2 Ταξινόμηση.....	20
2.3 Βιοσύνθεση & Ρόλος στα φυτά	22
2.4 Περιεχόμενο τροφίμων σε πολικές φαινόλες	24
2.5 Διαιτητική πρόσληψη	26
2.6 Βιολογική δράση – οφέλη για την υγεία	26
2.6.1 Καρδιαγγειακά Νοσήματα	27
2.6.2 Καρκίνος	27
2.6.3 Διαβήτης.....	27
2.6.4 Παχυσαρκία.....	28
2.6.5 Νευροεκφυλιστικά Νοσήματα	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΞΗΡΑ ΦΡΟΥΤΑ.....	29
3.1 Εισαγωγικά	29
3.2 Κορινθιακή Σταφίδα.....	30
3.2.1 Περιεχόμενο Κορινθιακής Σταφίδας σε μακροσυστατικά και πολικά φαινολικά συστατικά	31
3.2.2 Κορινθιακή Σταφίδα και υγεία.....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ & ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	34
4.1 Πέψη, απορρόφηση και μεταβολισμός πολικών ΦΕ	34
4.2 Βιοδιαθεσιμότητα	35
4.3 Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών ενώσεων.....	36
4.4 Προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικό υλικό.....	37
4.4.1 Προκατεργασία Βιολογικών Δειγμάτων	38
4.4.2 Ανάλυση των βιολογικών υλικών	40
B' ΜΕΡΟΣ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	45
5.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός	45
5.2 Αντιδραστήρια και διαλύματα εργασίας	46
5.3 Πρότυπες ουσίες	47
5.4 Διατροφική παρέμβαση	48
5.5 Προκατεργασία Δειγμάτων	48
5.5.1 Προκατεργασία Βιολογικού Υλικού	48
5.5.2 Προκατεργασία Κορινθιακής Σταφίδας και τροφής επίμυων.....	49
5.6 Χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων.....	49
5.7 Στατιστική ανάλυση	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
6.1 Προσδιορισμός επιμέρους πολικών φαινολικών ενώσεων στην Κορινθιακή Σταφίδα & στη τροφή	54
Γενιστεΐνη.....	55
6.2 Προσδιορισμός επιμέρους πολικών φαινολικών ενώσεων στο βιολογικό υλικό των επίμυων	56
6.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων & συζήτηση	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις, είναι συστατικά που υπάρχουν σε αφθονία στα φυτικής προέλευσης τρόφιμα, όπως είναι τα ξηρά φρούτα. Αποτελούν ίσως την πιο μελετημένη ομάδα φυτοχημικών, καθώς φαίνεται πως εκδηλώνουν ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία. Στην Ελλάδα, κατά βάση, ένα από τα πιο συχνά καταναλισκόμενα ξηρά φρούτα είναι η Κορινθιακή σταφίδα, η οποία φέρει πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο το οποίο έχει μελετηθεί για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Για να μπορέσουν οι πολικές φαινολικές ενώσεις να εκδηλώσουν την προστατευτική τους δράση ιστοειδικά στον οργανισμό, πρέπει να καταστούν βιοδιαθέσιμες. Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες μελέτες που διερευνούν την ιστοειδική κατανομή των πολικών φαινολών, κατόπιν χορήγησης κάποιου εκχυλίσματος ή συμπληρώματος που τις περιέχει, σε ζωικά μοντέλα κατά βάση. Ωστόσο, ιδιαίτερα μεγάλη σημασία έχει ο προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων στα διάφορα βιολογικά υλικά, ως απόρροια κατανάλωσης ολόκληρου του τροφίμου, προσομοιάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο πραγματικές συνθήκες θρέψης.

Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικό υλικό επίμυων που τους χορηγήθηκε συμπληρωματικά της διατροφής τους, Κορινθιακή σταφίδα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο ιππόκαμπος, μια περιοχή του εγκεφάλου που αποτελεί τον κινητήριο μοχλό της μνήμης. Τα δείγματα ιστού, προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας μεθόδους προκατεργασίας όπως είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) για την καλύτερη δυνατή απομόνωση των πολικών φαινολικών συστατικών που δυνητικά περιέχουν. Η ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων, έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας (UHPLC-MS). Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι ήταν επιτυχής ο προσδιορισμός πολικών φαινολικών ενώσεων της Κορινθιακής σταφίδας, στα δείγματα ιστού (ιππόκαμπου) που μελετήθηκαν. Μάλιστα, ορισμένες πολικές φαινολικές ενώσεις βρέθηκαν σε υψηλότερες ποσότητες στον ιππόκαμπο της ομάδας που κατανάλωσε Κορινθιακή σταφίδα συμπληρωματικά με την διατροφή τους, συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε μόνο την τυπική δίαιτα.

Λέξεις - κλειδιά: Κορινθιακή σταφίδα, βιολογικό υλικό, πολικές φαινολικές ενώσεις, υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

ABSTRACT

Polar phenols are compounds that are abundant in plant-based foods, such as dried fruits. They are, probably, the most studied group of phytochemicals, as they appear to exhibit beneficial health effects. In Greece, one of the most frequently consumed dried fruits is Corinthian currant, which has a rich phenolic content that has been studied for its beneficial effects. In order, for polar phenolic compounds, to manifest their tissue-specific protective effect in the body, they must be bioavailable. More and more studies investigate the tissue-specific distribution of polar phenols, following the administration of a phenolic extract or supplement, basically, in animal models. However, the determination of polar phenolic compounds in various biological samples, as a consequence of consuming the whole food, is of significant importance, simulating, in this way, nutritional conditions.

Taking the above into consideration, the purpose of this study is the determination of polar phenolic compounds in biological material of rats that were given Corinthian currants as a supplement to their diet. Particularly, the hippocampus was studied, an area of the brain, which is the engine of memory. The tissue samples were prepared using pretreatment methods such as solid-phase extraction (SPE) for the better isolation of polar phenolic compounds that, potentially, contain. The analysis of samples was done using the technique of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS). The results of the experiment showed that the determination of polar phenolic compounds of Corinthian currants was successful in the tissue samples (hippocampus) studied. In fact, specific polar phenolic compounds were found in higher amounts in the hippocampus of the group that consumed Corinthian currants as a supplement to their diet, compared to the group that received only the standard diet.

Key words: Corinthian currant, biospecimen, polar phenolic compounds, LC-MS

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: α) Γαλλικό οξύ, απλή φαινολική ένωση β) Σησαμινόλη, μία λιγνίνη (Del Rio et al., 2013).	19
Εικόνα 2: Χημική δομή σκελετού флаβονοειδών (Del Rio et al., 2013).....	21
Εικόνα 3: Περιεκτικότητα ξηρών φρούτων σε διαφορετικές κατηγορίες φαινολικών συστατικών (Alasalvar et al., 2020).....	30
Εικόνα 4: Η Κορινθιακή σταφίδα.	32
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας SPE (Theodoridis et al., 2016).....	40
Εικόνα 6: Χρωματογραφικός διαχωρισμός με εφαρμογή HPLC, μείγματος αποτελούμενο από τρία μόρια διαφορετικής πολικότητας. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε (Kumar, 2017).....	41
Εικόνα 7: Διατομή του αναλυτή Orbitrap, στην οποία φαίνονται η δύο άξονες r και z (Hu et al., 2005).	42
Εικόνα 8: Υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης UHPLC, συζευγμένο με αναλυτή μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).....	46
Εικόνα 9: ΧIC Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπου διαλύματος των πολικών φαινολικών ενώσεων, συγκέντρωσης 1 µg/mL. Οι ενώσεις που αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης του χρωματογραφήματος φαίνονται στον Πίνακα 4.	53
Εικόνα 10: Χρωματογραφήματα των πολικών φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν (Α) στην Κορινθιακή σταφίδα και (Β) στην τροφή των επίμυων.	54
Εικόνα 11: Χρωματογραφήματα (Α) ομάδας ελέγχου (τυπική δίαιτα), (Β) ομάδας παρέμβασης (τυπική δίαιτα + Κορινθιακή σταφίδα).	57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ενδεικτική περιεκτικότητα τροφίμων σε φυτοχημικά συστατικά	17
Πίνακας 2: Ευεργετικές ιδιότητες φυτοχημικών (Koche et al., 2018).	18
Πίνακας 3: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg/μερίδα) τροφίμων από κάθε ομάδα τροφίμων (Pinto & Santos, 2017).	24
Πίνακας 4: Μοριακά Ιόντα, ακρίβεια μάζας (mass error, ppm) και χρόνοι κατακράτησης των πολικών φαινολικών ενώσεων στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (-ESI).	50
Πίνακας 5: Πολικά φαινολικά συστατικά στην Κορινθιακή σταφίδα.	55
Πίνακας 6: Πολικά φαινολικά συστατικά στην τροφή των επίμυων.	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ενδεικτικές κατηγορίες φυτοχημικών (Koche et al., 2018).	16
Σχήμα 2: Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μαζών σε 3 βήματα.....	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα ιππόκαμπου επίμυων της ομάδας ελέγχου (τυπική διαίτα), (B) ομάδας παρέμβασης (τυπική διαίτα + Κορινθιακή σταφίδα).57

Α' ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

1.1 Ορισμός

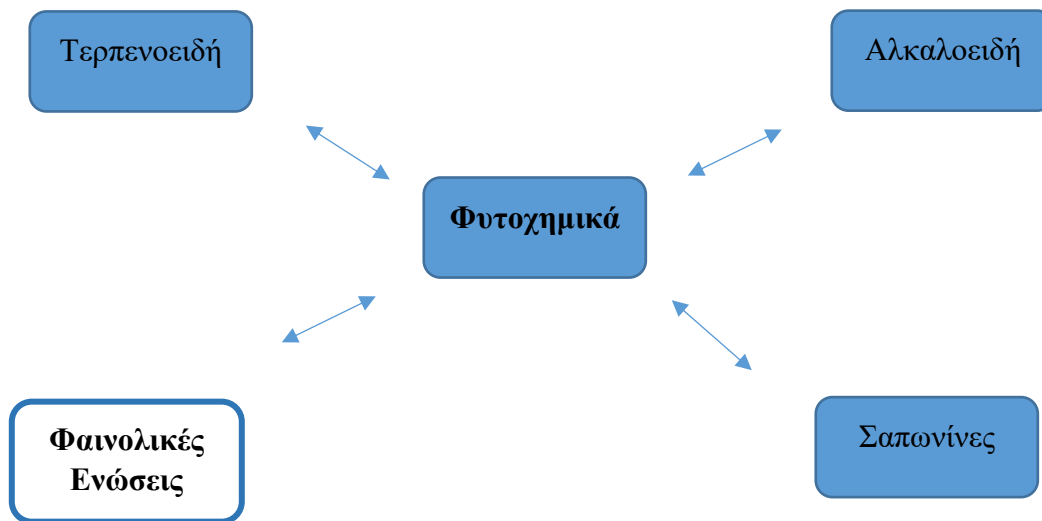
Ο όρος “φυτοχημικά” χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ευρεία, ετερογενή ως προς τη δομή, ομάδα μη θρεπτικών, βιοδραστικών ενώσεων που παράγονται από τα φυτά και έχουν εν δυνάμει ευεργετικές, για την υγεία, ιδιότητες. Δεν αποτελούν συστατικά του κύριου μεταβολισμού των φυτών, αλλά αντίθετα παράγονται σε ειδικά κύτταρα ως δευτερογενείς μεταβολίτες, συμμετέχοντας στη ρύθμιση της ανάπτυξης τους και στην προστασία έναντι μικροοργανισμών, εντόμων, και ασθενειών. Επίσης, τα φυτοχημικά ευθύνονται για το χρώμα και, σε κάποιο βαθμό, για τη γεύση και το άρωμα αυτών. Κάθε φυτό περιέχει μοναδικούς συνδυασμούς φυτοχημικών όσον αφορά τα είδη και τις ποσότητες αυτών, οι οποίες κυμαίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όταν καταναλώνονται από τον άνθρωπο φαίνεται να προσφέρουν μια πληθώρα φαρμακολογικών επιδράσεων, συνδέοντας την πρόσληψη αυτών με την πιθανή πρόληψη έναντι χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Δεν κατατάσσονται στις θρεπτικές ουσίες, με την ακριβή σημασία του όρου, καθώς δεν είναι απαραίτητες για να διατηρηθεί η ζωή του ανθρώπου (Leitzmann, 2016).

1.2 Ταξινόμηση φυτοχημικών

Έως τώρα, δεν έχει γίνει εφικτή η ακριβής κατηγοριοποίηση των φυτοχημικών λόγω του μεγάλου πληθυσμού και της ετερογένειας. Σε πρώτο επίπεδο, τα φυτικά συστατικά κατηγοριοποιούνται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες ανάλογα με το ρόλο που διαδραματίζουν στο μεταβολισμό των φυτών. Ως πρωτογενείς μεταβολίτες χαρακτηρίζονται τα μακροσυστατικά των φυτών, δηλαδή τα σάκχαρα, τα αμινοξέα και τα νουκλεϊκά οξέα. Από την άλλη, στους δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις που προκύπτουν όπως τα αλκαλοειδή, τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, τα φυτοοιστρογόνα, οι σαπωνίνες, οι φαινόλες και οι γλυκοζίτες, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των φυτοχημικών. (Kocher et al., 2018).

Στο **Σχήμα 1** φαίνονται ορισμένες, ενδεικτικές κατηγορίες φυτοχημικών. Έχει γίνει προσπάθεια κατηγοριοποίησης αυτών με διάφορους τρόπους, όπως ανάλογα με τη χημική τους δομή, τα φυτά στα οποία περιέχονται, καθώς και τα μέρη του φυτού όπου απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες, τις ευεργετικές τους ιδιότητες ή τις βιοσυνθετικές πορείες που ακολουθούν (Patra, 2012). Εστιάζοντας περισσότερο στην ανατομία του φυτού, διαφορετικά είδη και συγκεντρώσεις αυτών

παρατηρούνται στα διαφορετικά τμήματα των φυτών, όπως στη ρίζα, στο βλαστό, στο φύλλωμα, στα άνθη ή στους καρπούς. Για παράδειγμα, ομάδες φυτοχημικών, όπως τα φλαβονοειδή ή οι ανθοκυάνες, οι οποίες προσδίδουν χρώμα στα φυτά, εντοπίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα εξωτερικά μέρη αυτών, όπως τα φύλλα, ή οι καρποί, δηλαδή τα φρούτα και τα λαχανικά. Γενικότερα, το κάθε φυτό διαθέτει ξεχωριστό προφίλ φυτοχημικών, το οποίο, επιπλέον, επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειάς τους (Kocher et al., 2018).



Σχήμα 1: Ενδεικτικές κατηγορίες φυτοχημικών (Kocher et al., 2018).

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν εξαιρετικά μεγάλη και διαδεδομένη ομάδα φυτοχημικών στα διάφορα είδη φυτών. Η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων διακρίνεται από μεγάλη ετερογένεια, περιέχοντας από απλές φαινόλες, όπως τα φαινολικά οξέα, μέχρι σύνθετα, πολυμερή μόρια, όπως οι ταννίνες. Τα φλαβονοειδή απαρτίζουν το μεγαλύτερο μέρος αυτών, έχοντας μελετηθεί εκτενέστερα (Kocher et al., 2018).

1.3 Περιεχόμενο τροφίμων σε φυτοχημικά

Τα φυτοχημικά απαντώνται σε πληθώρα τροφών όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια, οι σπόροι κ.α., γι' αυτό και είναι εύκολο να τα συμπεριλάβει κανείς στη διατροφή του. Μάλιστα, τρόφιμα με έντονα χρώματα, όπως το μπρόκολο, τα κεράσια, το σπανάκι, το πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί

κτλ., οφείλουν το χρώμα τους στην υψηλή περιεκτικότητα φυτοχημικών που διαθέτουν (Liu, 2004). Στον **Πίνακα 1** παρατίθενται μερικά παραδείγματα τροφίμων πλούσια σε ορισμένες υποκατηγορίες φυτοχημικών.

Πίνακας 1: Ενδεικτική περιεκτικότητα τροφίμων σε φυτοχημικά συστατικά

Φυτοχημικό	Τρόφιμο	Περιεκτικότητα	Αναφορά
Καροτενοειδή	Γλυκοπατάτα (μαγειρ.)	12500 µg/ 100 g	(FoodData Central, n.d.- a)
	Καρότο	8280 µg/ 100 g	
	Σπανάκι (μαγειρ.)	7240 µg/ 100 g	
	Αμπελόφυλλα	16200 µg/ 100 g	
	Κίτρινη κολοκύθα	6740 µg/ 100 g	
	Πάπρικα	26200 µg/ 100 g	
Φυτοστερόλες	Ρυζέλαιο	1190 mg/ 100 g	(FoodData Central, n.d.- b)
	Σιτέλαιο	553 mg/ 100 g	
	Σουσάμι	714 mg/ 100 g	
	Ηλιόσποροι	534 mg/ 100 g	
	Φασκόμηλο	244 mg/ 100 g	
	Ρίγανη	203 mg/ 100 g	
Πολικές φαινολικές ενώσεις			(Pérez-Jiménez et al., 2010)
Ανθοκυάνες	Μαύρη σταφίδα	595 mg/ 100 g	
	Αρόνια	878 mg/ 100 g	
Φλαβονόλες	Κακάο	3410 mg/ 100 g	
	Μαύρη σοκολάτα	1589 mg/ 100 g	
Φλαβονόλες	Κόκκινο κρεμμύδι	158 mg/ 100 g	
	Σπανάκι	119 mg/ 100 g	
Ταννίνες	Μαύρο τσάι	13.36%	
	Λωτός	17-32%	

1.4 Διαιτητική πρόσληψη και ρόλος για την υγεία

Δεν υπάρχει προτεινόμενη ημερήσια πρόσληψη, ωστόσο, συστήνεται η κατανάλωση ποικιλίας φρούτων και λαχανικών - τόσο σε χρώμα, όσο και σε είδος - στο πλαίσιο μιας ισορροπημένης διατροφής. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συστήνει την ημερήσια κατανάλωση τουλάχιστον 400g φρέσκων φρούτων και λαχανικών, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 5 μερίδες/ ημέρα. Η οδηγία αυτή έχει ως στόχο την προαγωγή της υγείας και την προστασία έναντι χρόνιων νόσων (Siegel, 2019). Φυτοχημικά μπορούν να βρεθούν και σε συμπληρώματα διατροφής είτε μαζί με άλλα

συστατικά, είτε απομονωμένα. Παρόλα αυτά, δεδομένα δείχνουν πως είναι αποτελεσματικότερη η πρόσληψη αντιοξειδωτικών και βιοδραστικών ενώσεων από την τροφή. Αυτό οφείλεται σε συνέργειες των συστατικών που απαντώνται στο τρόφιμο (Liu, 2004).

Τα φυτοχημικά εκδηλώνουν ποικίλες βιολογικές δράσεις, προς όφελος του ανθρώπινου οργανισμού. Στον **Πίνακα 2** φαίνονται ορισμένες από αυτές ανάλογα με την κάθε κατηγορία. Ειδικότερα για τις φαινόλες, χαρακτηριστική είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, επιδεικνύουν πρόσθετες βιολογικές δράσεις, οι οποίες, πιθανότατα, προσφέρουν προστασία έναντι νόσων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Πληθώρα μελετών έχει αναδείξει τον καρδιοπροστατευτικό τους ρόλο, όπως, επίσης, και τους ευεργετικούς μηχανισμούς που φαίνεται να παρέχουν έναντι του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Alara et al., 2021).

Πίνακας 2: Ευεργετικές ιδιότητες φυτοχημικών (Kocher et al., 2018).

Κατηγορία Φυτοχημικών	Ευεργετικές ιδιότητες
Φαινολικές Ενώσεις	Αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αγγειοδιασταλτικές, κυτταροτοξικές
Τερπενοειδή	Αντιμικροβιακές, αποτοξινωτικές, αντιρευματικές, ενδυναμωτικές
Αλκαλοειδή	Αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, ηρεμιστικές, νευροφαρμακευτικές
Λοιπά	Αντιφλεγμονώδεις, ανοσοτονωτικές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

2.1 Ορισμός

Ο όρος «πολικές» έχει προταθεί προκειμένου να διακρίνει τους εν λόγω δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών από λιποδιαλυτές φαινόλες της διατροφής, όπως η βιταμίνη E (Boskou et al., 2005). Ανάλογα με το αν διαθέτουν ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια στο μόριό τους, οι πολικές φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές και σύνθετες (ή πολυφαινόλες) αντίστοιχα. Για λόγους απλούστευσης, συχνό φαινόμενο αποτελεί στη βιβλιογραφία η ταύτιση των δύο αυτών ονομασιών. Ωστόσο, μιλώντας αυστηρά με χημικούς όρους, ο χαρακτηρισμός «πολυφαινόλη» όπως ορίστηκε πιο πάνω, θα πρέπει να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για μόρια που φέρουν τουλάχιστον δύο φαινολικές μονάδες, ασχέτως με τον αριθμό των υδροξυλομάδων που η καθεμιά εξ' αυτών φέρει (Harborne, 1989). Ακόμα, σύμφωνα με τα παραπάνω, όταν γίνεται αναφορά συγκεκριμένα στις πολικές φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης, θεωρείται πιο δόκιμο στον ορισμό τους να συμπεριλαμβάνονται τόσο τα δομικά τους χαρακτηριστικά όσο και η βιοσυνθετική οδός τους (Harborne, 1989).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι Quideau et al., (2011) προτείνουν τον εξής ορισμό για τις πολικές φαινολικές ενώσεις: «Ο όρος πολικές φαινολικές ενώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να ορίσουμε τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προέρχονται αποκλειστικά από τη βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος όπου βιοσυντίθενται τα φαινυλοπροπανοειδή ή/και από τη βιοσυνθετική οδό του μηλονικού οξέος (ή οδό πολυκετιδίου), διαθέτουν έναν ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους και δεν διαθέτουν καμία λειτουργική ομάδα που να φέρει άτομο αζώτου στη βασική της δομή».



Εικόνα 1: α) Γαλλικό οξύ, απλή φαινολική ένωση β) Σησαμινόλη, μία λιγνίνη (Del Rio et al., 2013).

2.2 Ταξινόμηση

Λόγω της μεγάλης τους ετερογένειας, οι πολυφαινόλες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ομάδες με βάση την πηγή προέλευσης, τις βιολογικές τους λειτουργίες, την κατανομή τους στη φύση και τη χημική τους δομή. Μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι προκύπτουσες ομάδες πολυφαινολών διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα, τη σταθερότητα, και τις δράσεις όσον αφορά στην υγεία του ανθρώπου. Ο πιο συχνός τρόπος κατηγοριοποίησης γίνεται με βάση τη χημική τους δομή, και συγκεκριμένα, τον ανθρακικό σκελετό τους, και έτσι προκύπτουν οι εξής κατηγορίες:

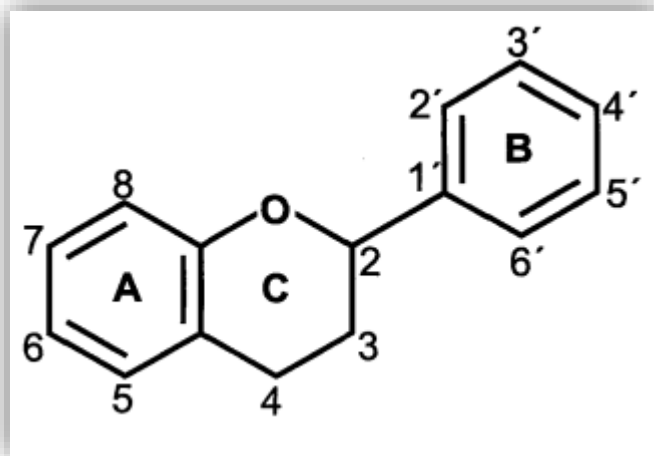
- **C6: Απλές φαινόλες και Βενζοκινόνες**
- **C6-C1: Φαινολικά οξέα**
- **C6-C2: Ακετοφαινόλες και Φαινυλοξικά οξέα**
- **C6-C3: Υδροξυκιναμωμικά οξέα, Φαινυλοπροπενονειδή, Κουμαρίνες, Χρωμόνες**
- **C6-C4: Ναφθοκινόνες**
- **C6-C1-C6: Ξανθόνες**
- **C6-C2-C6: Στυλβένια, Ανθρακινόνες**
- **(C6-C3-C6): Φλαβονοειδή**
- **(C6-C3)₂: Λιγνάνες, Νεολιγνάνες**
- **(C6-C3)₂ⁿ: Λιγνίνες**
- **(C6)ⁿ: Κατεχολικές μελανίνες**
- **(C6-C3-C6)ⁿ: Συμπυκνωμένες ταννίνες και Προανθοκυανιδίνες**

Όλες οι παραπάνω ενώσεις μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερη μορφή, αλλά πολλές εξ αυτών, συνήθως, είναι συζευγμένες με άλλα μόρια, όπως υδατάνθρακες και οργανικά οξέα σχηματίζοντας γλυκοζίτες, εστέρες κτλ. (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

Τα φλαβονοειδή (C3-C6-C3), η συχνότερα απαντώμενη στη φύση ομάδα πολυφαινολών, διακρίνεται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες, περιλαμβάνοντας πάνω από 5000 ενώσεις. Αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο, ο οποίος

περιέχει ένα άτομο οξυγόνου. Η δομή απεικονίζεται στην εικόνα 2.2. Οι υποκατηγορίες φλαβονοειδών είναι:

- Χαλκόνες
- Διυδροχαλκόνες
- Χρυσόνες
- Φλαβόνες
- Φλαβονόλες
- Διυδροφλαβονόλες
- Φλαβανόνες
- Φλαβανόλες
- Φλαβονοδιόλες
- Ανθοκυανιδίνες
- Ισοφλαβονοειδή
- Διφλαβονοειδή
- Προανθοκυανιδίνες ή Συμπυκνωμένες ταννίνες (Bravo, 1998)



Εικόνα 2: Χημική δομή σκελετού φλαβονοειδών (Del Rio et al., 2013).

Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως ένας επιπλέον τρόπος διάκρισης μεταξύ των φαινολικών ενώσεων αφορά στη διαλυτότητα αυτών. Με βάση τη θέση τους στον φυτικό οργανισμό, διακρίνονται οι ελεύθερες φαινόλες, όπως τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες βρίσκονται ελεύθερες στο διαλυτό μέρος του κυττάρου και οι συμπυκνωμένες φαινόλες, οι οποίες

συνδέονται με συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, παραδείγματος χάρη οι συμπτυκνωμένες ταννίνες, τα φαινολικά οξέα, ή άλλες φαινολικές ενώσεις οι οποίες σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Η διαλυτότητα της εκάστοτε φαινολικής ένωσης είναι μεγάλης σημασίας, καθώς επηρεάζει τη μεταβολική της τύχη στο γαστρεντερικό σωλήνα (Belščak-Cvitanović et al., 2018). Οι αδιάλυτες πολυφαινόλες, σε αντίθεση με τις διαλύτες, απορροφώνται σε μικρό ποσοστό (5-10%) στο λεπτό έντερο, ενώ, το μεγαλύτερο μέρος αυτών υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία από το μικροβίωμα του παχέος εντέρου (Shahidi & Yeo, 2016).

2.3 Βιοσύνθεση & Ρόλος στα φυτά

Η σύνθεση των πολικών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών μεταβολικών οδών γι' αυτό και προκύπτουν οι διάφορες τάξεις αυτών. Οι πολικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να συντεθούν μέσω δύο βασικών πορειών: α) την πορεία του σικιμικού οξέος, από το οποίο προκύπτουν, κυρίως, φαινυλοπροπανοειδή και β) την πορεία του μηλικού οξέος, μέσω του οποίου παράγονται, κατά κύριο λόγο, απλές φαινόλες (Belščak-Cvitanović et al., 2018). Συγκεκριμένα, ο κύκλος του μηλικού οξέος αποτελεί τη σημαντικότερη οδό βιοσύνθεσης φαινολικών ενώσεων στους μύκητες και τα βακτήρια απ' ότι στα ανώτερα φυτά. Οι υδατάνθρακες που προκύπτουν από τον πρωτογενή μεταβολισμό, όπως ήδη αναφέραμε, και συγκεκριμένα, τη γλυκόλυση και τον κύκλο των φωσφοπεντοζών τροφοδοτούν την πορεία του σικιμικού οξέος. Μέσω αυτής της οδού, τα απλά σάκχαρα μετατρέπονται στα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, μέσω των οποίων, τελικά, προκύπτουν τα επονομαζόμενα, λόγω κοινής χημικής δομής, φαινυλοπροπανοειδή. Μάλιστα, η φαινυλαλανίνη είναι κυριότερο υπόστρωμα από την τυροσίνη για τη σύνθεση αυτών. Ως αποτέλεσμα, παράγονται απλές φαινολικές ενώσεις, όπως το trans-κινναμωμικό οξύ και p-κουμαρικό οξύ και τα παράγωγα αυτού, οι κουμαρίνες κ.α. Πιο περίπλοκες πολυφαινόλες, όπως τα φλαβονοειδή, προκύπτουν μέσω της προσθήκης επιπλέον μορίων στο βασικό ανθρακικό σκελετό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω παραγωγής μεταβολικών ενδιάμεσων στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, τα οποία, στη συνέχεια, εκκρίνονται στο κυτταρόπλασμα, και ενσωματώνονται στο τελικό μόριο. Τα εν λόγω μεταβολικά ενδιάμεσα προέρχονται και από την πορεία του σικιμικού οξέος αλλά και από την πορεία του μηλικού, αντίστοιχα (Yahia, 2017).

Το ένζυμο το οποίο κατέχει κομβικό ρόλο στη βιοσύνθεση των φυτικών φαινολών είναι η λύαση αμμωνίας φαινυλαλανίνης (PAL). Αποτελεί ένζυμο-κλειδί στην παραγωγή φαινυλοπροπανοειδών, καθώς συνδέει τον κύριο με το δευτερογενή μεταβολισμό, καταλύοντας την

απαμίνωση της L-φαινυλαλανίνης σε trans-κινναμωνικό οξύ και αμμωνία. Το αντίστοιχο ένζυμο για την τυροσίνη είναι η λυάση αμμωνίας τυροσίνης (TAL), μέσω του οποίου παράγεται 4-υδροξυκινναμωνικό οξύ και αμμωνία. Οι προαναφερθείσες απαμινώσεις σηματοδοτούν την έναρξη παραγωγής των φυτικών φαινολικών ενώσεων. Η δραστηριότητα των συγκεκριμένων ενζύμων ρυθμίζεται με βάση το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, τον τύπο κυττάρου στο οποίο περιέχονται, και μία σειρά από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία - η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της βιοσύνθεσης - και η παρουσία μικροβιακών παθογόνων (Tsao, 2010; Yahia, 2017).

Η παραγωγή φαινολικών ουσιών από τα φυτά αποτελεί εδώ και χρόνια ένα μηχανισμό προσαρμογής στις αλλαγές του περιβάλλοντος και εξέλιξης σε βάθος χρόνου. Με βάση τον τρόπο βιοσύνθεσης κάθε φαινολικής ένωσης προκύπτει και η αντίστοιχη φυσιολογική λειτουργία της. Για παράδειγμα, ο ρόλος μιας φαινολικής ένωσης μπορεί να είναι δομικός ή προστατευτικός έναντι στρεσογόνων παραγόντων όπως η υπερβολική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και οι χαμηλές θερμοκρασίες. Εκτός αυτού, οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν ως μόρια-“σηματοδότες” για την αναπαραγωγή του φυτικού οργανισμού, την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών έναντι εισβολέων, μικροοργανισμών και παθογόνων ή, ακόμα, σαν αποτρεπτικοί παράγοντες της υπερβολικής απώλειας νερού από τα φυτικά κύτταρα. Μια άλλη λειτουργία αυτών, είναι να δρουν σαν μεσολαβητές στην επικοινωνία μεταξύ τόσο των φυτών, όσο και μεταξύ του φυτού και των ζώντων οργανισμών, όπως π.χ. ο άνθρωπος, στοχεύοντας στη διατήρηση μιας οικολογικής ισορροπίας. Ένα σχετικό, χαρακτηριστικό φαινόμενο που συμβαίνει μεταξύ των φυτών ονομάζεται “αλληλοπάθεια”, κατά το οποίο, οι φαινολικές ενώσεις, δρουν ως ανταγωνιστικοί και, πολλές φορές, ανασταλτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη των γειτονικών φυτών, διευκολύνοντας την επιβίωση του φυτού από το οποίο παράχθηκαν. Τέλος, συγκεκριμένες ομάδες πολυφαινολών, όπως οι ανθοκυάνες και τα καροτενοειδή, ευθύνονται για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτών, όπως η γεύση και το χρώμα. Αυτά, με τη σειρά τους, παίζουν ρόλο στην άμυνα του φυτού έναντι του βιοτικού και αβιοτικού στρες, ενώ, παράλληλα, έλκουν επικονιαστές και άλλα έντομα τα οποία πραγματοποιούν το διασκορπισμό των σπόρων στο γύρω οικοσύστημα (Belščak-Cvitanović et al., 2018; Lattanzio, 2013).

Εστιάζοντας, μάλιστα, στην επίδραση της θερμοκρασίας, μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή πολικών φαινολικών ενώσεων από τα φυτά μπορεί να αυξηθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, υπάρχει ένα εύρος χαμηλών θερμοκρασιών στο οποίο αυξάνεται η δραστηριότητα του

ενζύμου PAL, συνεπώς και η παραγωγή φαινολικών ενώσεων, χωρίς να προκαλείται ιστική βλάβη στα φυτικά κύτταρα. Αυτό βρίσκει εφαρμογή στην αποθήκευση των φρούτων και λαχανικών σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρατείνοντας το χρόνο ζωής τους και αποτρέποντας την αμαύρωση (Lattanzio, 2013).

2.4 Περιεχόμενο τροφίμων σε πολικές φαινόλες

Η περιεκτικότητα του κάθε τροφίμου σε πολικές φαινολικές ενώσεις διαφέρει τόσο ποιοτικά, αφού το καθένα περιλαμβάνει διαφορετικά είδη φαινολικών ενώσεων, όσο και ποσοτικά. Παράγοντες, όπως γενετικοί και περιβαλλοντικοί, σε συνδυασμό με το στάδιο ανάπτυξης και ωρίμανσης του κάθε φυτού, τις συνθήκες βλάστησης, συγκομιδής και αποθήκευσης του τελικού προϊόντος καθορίζουν, τελικά, το περιεχόμενο των τροφών σε φαινολικά συστατικά σε κάθε στάδιο ζωής τους. Τα επίπεδα φαινολών μπορούν να διαφέρουν ακόμα και ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες του ίδιου τροφίμου, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών μερών του φυτικού οργανισμού.

Πλήθος μελετών έχουν ταυτοποιήσει και ποσοτικοποιήσει τις φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε μία πληθώρα τροφίμων. Σε κάθε περίπτωση, είτε υπολογίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο κάθε προϊόντος, είτε η περιεκτικότητα αυτού σε επιμέρους φαινολικά συστατικά ξεχωριστά. Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιείται η δοκιμασία Folin-Ciocalteu (FC). Αποτελεί μέθοδο με χαμηλή εκλεκτικότητα, καθώς μια σειρά από άλλα συστατικά της τροφής μπορούν να αντιδράσουν με το συγκεκριμένο διάλυμα, όπως το ασκορβικό οξύ ή κάποια αρωματικά αμινοξέα. Λόγω απλότητας της μεθόδου, χρησιμοποιείται για την παροχή μιας αρχικής, αδρής εικόνας του συνολικού αντιοξειδωτικού περιεχομένου ενός δείγματος. Από την άλλη, για το διαχωρισμό και ακριβή προσδιορισμό μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων εφαρμόζονται χρωματογραφικές μέθοδοι, σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές. Ακόμα, τα τελευταία χρόνια, έχουν διαμορφωθεί ειδικές βάσεις δεδομένων, οι οποίες παρέχουν πληροφόρηση για το φαινολικό περιεχόμενο του κάθε τροφίμου, όπως η USDA και η Phenol Explorer (Belščak-Cvitanović et al., 2018; Bravo, 1998; Miniati, 2007). Ανάμεσα στις ομάδες τροφίμων, τα φρούτα, και ιδιαίτερα η οικογένεια των μούρων, αποτελούν την ομάδα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Στον **Πίνακα 3** καταγράφεται ενδεικτικά η περιεκτικότητα τροφίμων σε φαινόλες (Pinto & Santos, 2017).

Πίνακας 3: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg/μερίδα) τροφίμων από κάθε ομάδα τροφίμων (Pinto & Santos, 2017).

Ομάδα τροφίμων	Τρόφιμο	mg ΠΦ/ μερίδα	Μέγεθος μερίδας (g)
Φρούτα	Αρόνια	2568	1 φλιτζάνι (145)
	Μαύρη σταφίδα	850	1 φλιτζάνι (112)
	Μαύρο σταφύλι	235	1 φλιτζάνι (151)
Λαχανικά	Αγκινάρα	332	1 φλιτζάνι (128)
	Κόκκινο κρεμμύδι	161	1 φλιτζάνι (115)
	Μπρόκολο	159	1 φλιτζάνι (91)
Δημητριακά	Δημητριακά πρωινού ολικής αλέσως	85	1 φλιτζάνι (30)
Σπόροι και προϊόντα αυτών	Μαύρη σοκολάτα	2722	1 πλάκα (91)
	Πράσινα φασολάκια	1329	1 φλιτζάνι (194)
	Σουσάμι	220	1 χούφτα (28)
Μπαχαρικά & βότανα	Γαρύφαλο	319	1 κουτ. γλυκού (2)
	Φασκόμηλο (αποξηρ.)	64	1 κουτ. γλυκού (5)
	Ρίγανη (αποξηρ.)	41	1 κουτ. γλυκού (1)

Η επεξεργασία των τροφίμων αποτελεί ένα βασικό παράγοντα που επηρεάζει το περιεχόμενο των τροφίμων σε φαινολικά συστατικά, άλλοτε ενισχύοντας και άλλοτε μειώνοντας το φαινολικό περιεχόμενο. Ο κύριος λόγος επεξεργασίας της τροφής είναι η εξασφάλιση ενός ασφαλούς γεύματος προς κατανάλωση, απαλλαγμένο από δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς και, φυσικά, η δημιουργία ενός θρεπτικού, πλην νόστιμου, αποτελέσματος. Ωστόσο, μέσω αυτής της διαδικασίας μπορεί να μεταβληθεί το προφίλ του τροφίμου, όσον αφορά στα φαινολικά συστατικά. Στις μεθόδους επεξεργασίας συμπεριλαμβάνεται μια ποικιλία τεχνικών, όπως η μηχανική και θερμική επεξεργασία, ενζυμικές και χημικές διεργασίες, το οικιακό μαγείρεμα, η παστερίωση κ.α. Η επίδραση που επιφέρει η κάθε μέθοδος μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Για παράδειγμα, μέσω της εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών σε ένα τρόφιμο, συνήθως, υποβαθμίζεται το περιεχόμενο αυτού σε φαινόλες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η θερμική επεξεργασία δρα θετικά, διευκολύνοντας την παραλαβή φαινολικών ουσιών από το υπόστρωμα του τροφίμου. Το αν θα επικρατήσει το πρώτο ή το δεύτερο αποτέλεσμα εξαρτάται τόσο από τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών ενός τροφίμου, όσο και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη σταθερότητα της κάθε φαινολικής ένωσης, υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας. Ακόμα και τεχνικές που εφαρμόζονται σε πρώιμο στάδιο, όπως αυτό της συγκομιδής, μπορούν να επιφέρουν μεταβολή στη σύσταση των φυτικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, είναι δυνατή η αύξηση της περιεκτικότητας των φρέσκων φρούτων και λαχανικών σε φαινόλες, ύστερα από χημικές διεργασίες οι οποίες μιμούνται

στρεσογόνες συνθήκες. Το προκαλούμενο στρες αυξάνει την παραγωγή φαινολικών συστατικών από τα φυτά, ως μέσο προστασίας έναντι αυτών (Ribas-Agustí et al., 2018).

2.5 Διαιτητική πρόσληψη

Παρόλο τον μεγάλο όγκο μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί ανά τα χρόνια, δεν έχει καθιερωθεί μέχρι σήμερα Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (ΣΗΠ), τόσο για το σύνολο των φαινολικών ενώσεων, όσο και για κάθε κατηγορία αυτών, ανεξάρτητα. Αυτό οφείλεται στην ετερογένεια των μελετών, στις οποίες άλλοτε έχει γίνει προσπάθεια προσέγγισης και υπολογισμού της Μέσης Ημερήσιας Πρόσληψης πολυφαινολών σε διαφορετικούς πληθυσμούς, και άλλοτε διερεύνηση του τρόπου μεταβολισμού και της τελικής βιοδιαθεσιμότητας αυτών. Για τον προσδιορισμό της διαιτητικής πρόσληψης φαινολικών συστατικών χρησιμοποιούνται οι παραδοσιακοί τρόποι αξιολόγησης, δηλαδή η ανάκληση 24ωρου και το ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων (FFQ). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται, επίσης, διάφοροι βιοδείκτες για την αξιολόγηση της πρόσληψης φαινολικών συστατικών. Αποτελούν μέρος της επιστήμης της μεταβολομικής, η οποία καταγράφει διάφορους μεταβολίτες στα βιολογικά υγρά. Τα ερευνητικά δεδομένα προτείνουν τη χρήση τέτοιων βιοδεικτών, συμπληρωματικά με την εφαρμογή των παραδοσιακών μεθόδων αξιολόγησης διαιτητικής πρόσληψης φαινολικών συστατικών, με στόχο το βέλτιστο προσδιορισμό της διαιτητικής πρόσληψης (Guasch-Ferré et al., 2018). Μια συστηματική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε το 2019, στην οποία μελετήθηκε η βιβλιογραφία που είναι διαθέσιμη την τελευταία 10ετία, σχετικά με τον προσδιορισμό της πρόσληψης πολυφαινολών κατέληξε σε μία ΜΗΠ φαινολικών ίση με περίπου 900 mg/ day, χωρίς, ωστόσο, να είναι δυνατή η καθιέρωση της συγκεκριμένης ποσότητας ως ΣΗΠ (Del Bo' et al., 2019). Εξαιτίας των διαφορετικών διαιτητικών συνηθειών κάθε πληθυσμού, καθώς και των ξεχωριστών αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ φαινολικών ουσιών είναι δύσκολο να κάνουμε λόγο για διαιτητικά σχήματα, και όχι τόσο για κάθε φαινολική ένωση ξεχωριστά. Με αυτή τη λογική, μία διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες φαίνεται να επιδρά, μακροπρόθεσμα, θετικά στον οργανισμό. Ωστόσο, αν μελλοντικά, ο στόχος είναι η παροχή ΣΗΠ, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα, ο μεταβολισμός, καθώς και το κατώφλι της δόσης πάνω από την οποία είναι πιθανή η εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών στον οργανισμό (Williamson & Holst, 2008).

2.6 Βιολογική δράση – οφέλη για την υγεία

Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να προσφέρουν ποικίλα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου μακροπρόθεσμα, συμβάλλοντας στην προστασία του ανθρώπινου οργανισμού από το οξειδωτικό

στρες και μια πληθώρα χρόνιων παθήσεων. Μελέτες συνδέουν την κατανάλωση τροφών πλούσιες σε πολυφαινόλες με την πρόληψη έναντι χρόνιων νοσημάτων όπως τα καρδιαγγειακά, τα νευροεκφυλιστικά, τον καρκίνο, την παχυσαρκία καθώς και το διαβήτη τύπου 2. Βάζοντας στο μικροσκόπιο τις κυριότερες, μη μεταδιδόμενες νόσους που ταλανίζουν το σύγχρονο κόσμο και τους μηχανισμούς, μέσω των οποίων τα φαινορικά συστατικά πιθανώς δρουν προστατευτικά απέναντι τους, έχει αποδειχτεί ότι, πέρα από την αντιοξειδωτική τους δράση, ασκούν δράση και μέσω άλλων λειτουργιών όπως αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιθρομβωτικές ιδιότητες κ.α. Συγκεκριμένα:

2.6.1 Καρδιαγγειακά Νοσήματα

Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν καταλήξει, επανειλημμένα, σε μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης πολυφαινολών από φρούτα και λαχανικά και εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων. Με άλλα λόγια, δηλαδή, όσο αυξάνεται η πρόσληψη φαινολικών συστατικών τόσο φαίνεται να μειώνεται ο κίνδυνος για καρδιαγγειακό συμβάν. Εκτός από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, φαίνεται πως τα συγκεκριμένα συστατικά, ασκούν αγγειοδιασταλτική δράση, ενισχύοντας περαιτέρω τις καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, μειώνουν την πιθανότητα δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, μέσω περιορισμού της οξείδωσης των LDL λιποπρωτεϊνών και βελτίωσης της ενδοθηλιακής λειτουργίας.

2.6.2 Καρκίνος

Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην εμφάνιση κυτταρικών βλαβών, συνεπώς και καρκίνου. Η κατανάλωση πολυφαινολών έχει συνδεθεί με την επαγωγή της απόπτωσης, καθώς και την αναστολή της ταχείας αναπαραγωγής των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, έχει φανεί ότι διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία ποικιλίας ενζύμων και κυτταρικών υποδοχέων, επηρεάζοντας μία σειρά κυτταρικών διεργασιών, όπως η έκφραση γονιδίων ή διάφορες βιοχημικές πορείες. Ως αποτέλεσμα είναι δυνατή η πυροδότηση ή η καταστολή διαδικασιών όπως η καρκινογένεση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι συμμετέχουν σε διεργασίες τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε μοριακό επίπεδο, παρεμβαίνοντας, με αυτόν τον τρόπο, σε διάφορα στάδια καρκινογένεσης.

2.6.3 Διαβήτης

Όσον αφορά στο διαβήτη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινορικά συστατικά βελτιώνουν την ινσουλινοευαισθησία, και αποτρέπουν τα φαινόμενα υπεργλυκαιμίας. Η αυξημένη παραγωγή ινσουλίνης, η μειωμένη δράση πεπτικών ενζύμων, η μειωμένη απορρόφηση γλυκόζης από το έντερο

και η ελαττωμένη παραγωγή ηπατικής γλυκόζης είναι ορισμένοι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται παρουσία φαινολικών συστατικών (Costa et al., 2017).

2.6.4 Παχυσαρκία

Τα τελευταία χρόνια η παχυσαρκία αποτελεί νόσο που προσβάλλει όλο και μεγαλύτερο μερίδιο του πληθυσμού. Βασικοί μηχανισμοί, οι οποίοι μπορούν, όχι μόνο να προστατέψουν αλλά και να διαχειριστούν την παχυσαρκία είναι η αύξηση της ενεργειακής κατανάλωσης μέσω άσκησης σε συνδυασμό με τη μείωση της ενεργειακής πρόσληψης, η μείωση της λιπογένεσης, και ταυτόχρονα η αύξηση της λιπόλυσης. Έχειδειχθεί ότι φαινολικές ενώσεις σχετίζονται με τις παραπάνω διεργασίες, συμβάλλοντας στην πρόληψη έναντι της παχυσαρκίας (Singh et al., 2020).

2.6.5 Νευροεκφυλιστικά Νοσήματα

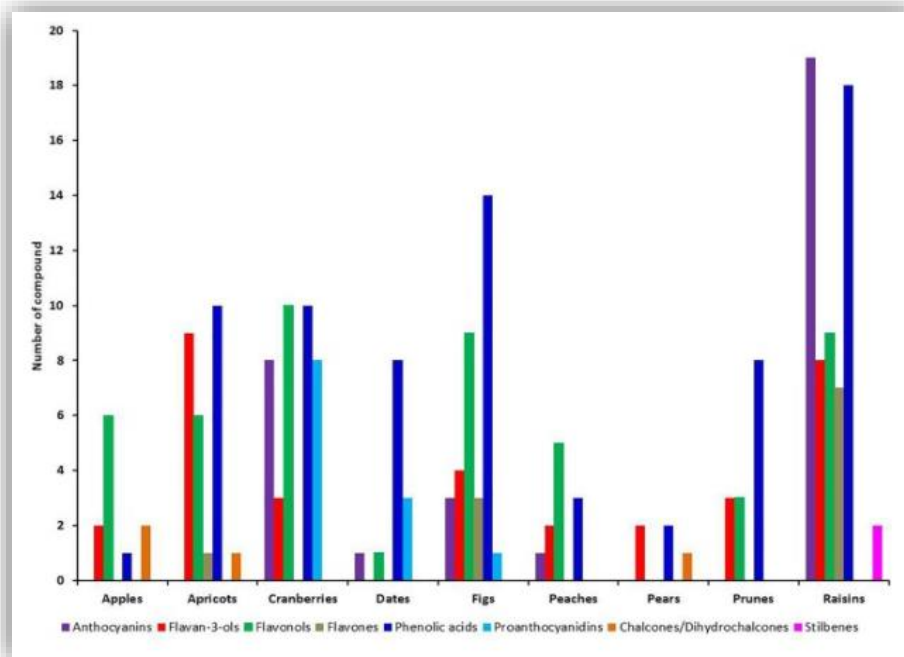
Ως πιθανοί προστατευτικοί παράγοντες έχουν αναδειχθεί οι πολυφαινόλες έναντι νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η νόσος Parkinson, η νόσος Αλτσχάιμερ και η Άνοια, από πλήθος μελετών. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση φυτικών προϊόντων, πλούσια σε φαινολικά συστατικά, έχει φανεί να βελτιώνει τις γνωστικές λειτουργίες, τη μνήμη, και τη διάθεση. Εκτός αυτού, έχουν συσχετιστεί με τη βελτίωση των κινητικών διαταραχών, οι οποίες, συχνά, περιλαμβάνονται στη συμπτωματολογία ανάλογων ασθενειών. Τέλος, έρευνες έχουν καταγράψει τη μείωση των επιπέδων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες παράγονται στα αρχικά στάδια των νευροεκφυλιστικών νόσων, ύστερα από κατανάλωση τροφών, πλούσιων σε πολυφαινόλες (Costa et al., 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΞΗΡΑ ΦΡΟΥΤΑ

3.1 Εισαγωγικά

Τα αποξηραμένα φρούτα αποτελούν τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας και ενεργειακής πυκνότητας. Προκύπτουν ύστερα από την αφαίρεση του μεγαλύτερου ποσοστού νερού που φυσικά περιέχουν, μέσω διάφορων τρόπων ξήρανσης, όπως η έκθεση στον ήλιο. Η αποξήρανση αποτελεί μία παραδοσιακή μέθοδο συντήρησης και παράτασης της ζωής του φρούτων, μιας και η παραγωγή της πλειοψηφίας τους είναι εποχιακή. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται εύκολη η αποθήκευσή τους και η διάθεση όλο το χρόνο. Τα αποξηραμένα φρούτα που καταναλώνονται πιο συχνά είναι οι σταφίδες, τα σύκα, οι χουρμάδες, τα βερίκοκα, τα cranberries, τα δαμάσκηνα κ.α. Στο μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούνται από υδατάνθρακες, και συγκεκριμένα, φυσικά σάκχαρα. Με εξαίρεση, τους χουρμάδες και τα βερίκοκα, που περιέχουν σακχαρόζη, οι κύριοι μονοσακχαρίτες που εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα ξηρά φρούτα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Μια μερίδα ξηρού φρούτου ορίζεται στα 30-43 g ανάλογα με το είδος του φρούτου, ή αλλιώς $\frac{1}{4}$ της κούπας. Μια τέτοια ποσότητα αποτελεί εξαιρετική πηγή ενέργειας, διαιτητικών ινών, υδατοδιαλυτών βιταμινών, ιχνοστοιχείων και βιοδραστικών ενώσεων. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι προανθοκυανιδίνες, τα στυλβένια, οι χαλκόνες, τα φυτοοιστρογόνα, καθώς και τα καροτενοειδή. Στην εικόνα που ακολουθεί, φαίνεται ο αριθμός πολικών φαινολών διαφόρων κατηγοριών που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα ξηρά φρούτα.

Διάφορες μελέτες παρατήρησης έχουν αναδείξει την αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ κατανάλωσης ξηρών φρούτων και εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων, που πιθανώς οφείλεται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και λοιπές ευεργετικές δράσεις των βιοδραστικών συστατικών. Παρόλα αυτά, υπάρχει ανάγκη σχεδιασμού τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών οι οποίες θα επιβεβαιώνουν τα υπάρχοντα δεδομένα (Alasalvar et al., 2020; Chang et al., 2016).



Εικόνα 3: Περιεκτικότητα ξηρών φρούτων σε διαφορετικές κατηγορίες φαινολικών συστατικών (Alasalvar et al., 2020).

3.2 Κορινθιακή Σταφίδα

Πρόκειται για ένα τρόφιμο το οποίο κατέχει βασικό ρόλο στη Μεσογειακή Διατροφή. Καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στη Δυτική Ελλάδα, αποτελώντας προϊόν αποξήρανσης του καρπού της ποικιλίας αμπελιού *Vitis vinifera* var. Argyreia. Κύριο χαρακτηριστικό της Κορινθιακής σταφιδαμπέλου είναι η επίτευξη υψηλής απόδοσης σε ελαφρύ και καλά στραγγιζόμενο έδαφος. Συγκεκριμένα, η Κορινθιακή σταφίδα είναι μικρού μεγέθους, χρώματος μαύρου ή σκούρου μωβ. Κατηγοριοποιείται σε 2 κύριες κατηγορίες με βάση την ποιότητα, η οποία καθορίζεται από το βαθμό καθαρότητας και ομοιομορφίας του προϊόντος και τις καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η ποικιλία “*Βοστίτσα*”, η οποία αποτελεί και προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης καθώς και η ποικιλία “*Κορίνθου*”. Και τα δύο αυτά είδη καλλιεργούνται στην βορειοδυτική Πελοπόννησο και θεωρούνται υψηλότερης ποιότητας. Στην άλλη κατηγορία, ανήκει η ποικιλία “*Επαρχιακή*”, η οποία καλλιεργείται στην δυτική Πελοπόννησο, όπως, επίσης, στην Κεφαλονιά και στην Ζάκυνθο. Η κορινθιακή σταφίδα αντιπροσωπεύει το 8-10% της παγκόσμιας παραγωγής σταφίδας. Επίσης, διατηρεί την υψηλότερη τιμή ανάμεσα στις υπόλοιπες ποικιλίες, πιθανότατα λόγω των οργανοληπτικών της χαρακτηριστικών, της απαιτητικής καλλιέργειας και

διαδικασίας αποξήρανσης καθώς και της υψηλής ζήτησης (Chiou et al., 2007, 2014; Nikolidaki et al., 2017).

3.2.1 Περιεχόμενο Κορινθιακής Σταφίδας σε μακροσυστατικά και πολικά φαινολικά συστατικά

Η Κορινθιακή σταφίδα περιλαμβάνει μεγάλο ποσοστό από απλά σάκχαρα, ενώ περιέχει, επίσης, μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, λίπους, υγρασίας και τέφρας. Επίσης, είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, συμβάλλοντας στην καλή λειτουργία του εντέρου, καθώς και σε βιταμίνες και μέταλλα. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη βρίσκονται σε ίσες ποσότητες και αποτελούν τα κύρια σάκχαρα της. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απαντώνται η σακχαρόζη και η μαλτόζη. Μικρές διαφοροποιήσεις στη σύσταση της σταφίδας μπορούν να εντοπιστούν, καθώς διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν το περιεχόμενο της. Αυτοί μπορεί να είναι:

- Η ποικιλία
- Το έδαφος
- Οι καιρικές συνθήκες
- Το υψόμετρο
- Η μέθοδος αποξήρανσης κ.α. (Nikolidaki et al., 2017)

Μελέτη, που πραγματοποιήθηκε το 2018, αξιολόγησε την επίδραση του τρόπου αποξήρανσης της Κορινθιακής σταφίδας στο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και στο προφίλ σακχάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το περιεχόμενο βιοδραστικών ενώσεων ήταν υψηλότερο κατά την εφαρμογή αποξήρανσης υπό σκιά, σε σύγκριση με την αποξήρανση στον ήλιο. Από την άλλη, δε φάνηκε να επηρεάστηκε το περιεχόμενο της Κορινθιακής σταφίδας σε σάκχαρα (Panagoroulou et al., 2019).

Αναφορικά με το φαινολικό περιεχόμενο, η Κορινθιακή σταφίδα περιέχει πληθώρα φαινολικών συστατικών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με στόχο τον προσδιορισμό του φαινολικού προφίλ της Κορινθιακής σταφίδας φάνηκε ότι περιείχε ένα σύνολο 17 διαφορετικών πολυφαινολικών ενώσεων. Τη φαινόλη με την υψηλότερη συγκέντρωση αποτέλεσε το βανιλικό οξύ. Σε σημαντικές ποσότητες εντοπίστηκαν, επίσης, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το συριγνικό οξύ, το p-κουμαρικό, το πρωτοκατεχικό, το φερουλικό οξύ, και η κερκετίνη (Chiou et al., 2007). Σε άλλη μελέτη, η οποία προσδιόρισε το περιεχόμενο της Κορινθιακής σταφίδας σε ανθοκυάνες, καθώς και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, πραγματοποιήθηκε η σύγκριση μεταξύ των τριών ποικιλιών Κορινθιακής

σταφίδας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποικιλία «Επαρχιακή» κατείχε το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο, ενώ η «Βοστίτσα» φάνηκε να έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα πολυφαινολών και αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, βρέθηκε με το υψηλότερο περιεχόμενο ανθοκυανών (Chiou et al., 2014). Η κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας συνεισφέρει στην ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών καθώς και στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (Chiou et al., 2007).



Εικόνα 4: Η Κορινθιακή σταφίδα.

3.2.2 Κορινθιακή Σταφίδα και υγεία

Λόγω του υψηλού περιεχομένου σε φυτοχημικά, η κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση ευνοϊκής αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού. Πληθώρα μελετών έχουν συσχετίσει την κατανάλωση σταφίδας με την πρόληψη έναντι νόσων και τη βελτίωση δεικτών υγείας και συμπτωμάτων (Chiou et al., 2007). Στη μελέτη των Fanarioti et al., (2022), όπου χορηγήθηκε Κορινθιακή σταφίδα σε παρκινσονικό μοντέλο επίμυων για 38 ημέρες συμπληρωματικά με τη διατροφή τους, μελετήθηκε ο πιθανός νευροπροστατευτικός ρόλος της. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των κινητικών προβλημάτων, καθώς και, της απώλειας των κυττάρων που παράγουν ντοπαμίνη. Επίσης, η μελέτη των Yanni et al., (2015) εξέτασε τον τρόπο που επηρεάζει η συμπληρωματική χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, καθώς και τα επίπεδα φαινολικών συστατικών στο πλάσμα κουνελιών με υπερχοληστερολαιμία. Τα αποτελέσματα έδειξαν εξασθένηση των αθηρωματικών βλαβών, και μείωση του οξειδωτικού στρες, αναδεικνύοντας τις πιθανές καρδιοπροστατευτικές της ιδιότητες. Ακόμα, το 2013 μελετήθηκε η μεταβολική απόκριση

υγιών και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ύστερα από την χορήγηση 74 g Κορινθιακή σταφίδας ή 50 g γλυκόζης (τρόφιμο αναφοράς). Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλότερη μεταγευματική γλυκαιμική απόκριση και στις 2 ομάδες εθελοντών, μετά την κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας. Το γεγονός αυτό την καθιστά κατάλληλη προς κατανάλωση, ακόμα και για άτομα με διαταραγμένα επίπεδα σακχάρου (Kanellos et al., 2013). Σε άλλη μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της κατανάλωσης Κορινθιακής σταφίδας, πριν την άσκηση, στο μεταβολισμό, την απόδοση και τους δείκτες οξειδωτικού στρες του αίματος 11 υγιών εθελοντών. Εναλλακτικά της Κορινθιακής σταφίδας, οι εθελοντές κατανάλωσαν ισοθερμιδικό διάλυμα γλυκόζης ή νερό, και, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ληφθέντων μετρήσεων. Παρόλο που, η χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας δεν μετέβαλε την αθλητική απόδοση και το οξειδωτικό προφίλ του πλάσματος, κρίθηκε το ίδιο αποτελεσματική, στη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης κατά τη διάρκεια παρατεταμένης άσκησης, με το διάλυμα γλυκόζης (Deli et al., 2018). Τέλος, σκοπός της μελέτης των Mountaki et al., (2021) αποτέλεσε η διερεύνηση του τρόπου δράσης των πολικών φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος Κορινθιακής σταφίδας στους παθολογικούς μηχανισμούς της πρωτεΐνης apoE4. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Alzheimer. Συνολικά, φάνηκε ότι, οι βιοδραστικές ενώσεις του εκχυλίσματος Κορινθιακής σταφίδας είχαν την ικανότητα τροποποίησης της δομής των σχηματιζόμενων ApoE4, βελτιώνοντας τα παθογενετικά μονοπάτια που σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου Alzheimer.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ & ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

4.1 Πέψη, απορρόφηση και μεταβολισμός πολικών ΦΕ

Οι πολικές φαινόλες ακολουθούν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, και υφίστανται ποικίλες δομικές αλλαγές, κατά τη διάρκεια της πέψης και απορρόφησης, του εκτεταμένου μεταβολισμού, της ιστικής κατανομής και, τελικά, της απέκκρισης τους από τον οργανισμό. Ως αποτέλεσμα, συχνά, διαφέρουν από την αρχική μορφή με την οποία απαντώνται στα τρόφιμα. Λόγω συνύπαρξης των φαινολικών ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά των φυτικών τροφίμων, απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφηση αυτών από το γαστρεντερικό σωλήνα αποτελεί η απελευθέρωση τους από το τροφικό πλέγμα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μηχανικών και χημικών διεργασιών, καθώς και με τη δράση ενζύμων κατά τη διαδικασία της πέψης (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Ο μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων ξεκινάει από τη διαδικασία της μάσησης, κατά την οποία η τροφή διασπάται σε μικρότερα κομμάτια. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής της τροφής με τα υδρολυτικά ένζυμα που βρίσκονται στη σίελο, τα οποία συμβάλλουν στην απελευθέρωση και διάσπαση ορισμένων συστατικών της τροφής. Στη συνέχεια, ο σχηματισμένος βλωμός προχωρά προς το στομάχι, όπου εκεί το όξινο περιβάλλον συμβάλλει στην περαιτέρω διάσπαση των δεσμών μεταξύ φαινολικών ενώσεων και των υπόλοιπων συστατικών του χυλού. Μάλιστα, ένας μικρός αριθμός απλών φαινολικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα τα φαινολικά οξέα, μπορούν να απορροφηθούν κατευθείαν από τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου. Ο υδρολυμένος πολτός της τροφής περνάει στη συνέχεια στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου, που αποτελεί, μαζί με τη νήστιδα, το κυριότερο σημείο απορρόφησης των πολικών φαινολικών συστατικών. Εκεί, οι ελεύθερες και μη γλυκοζυλιωμένες φαινόλες απορροφώνται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω παθητικής μεταφοράς, ενώ, αντίθετα, οι γλυκοζίτες, είτε περνούν με ενεργή μεταφορά τον εντερικό φραγμό μέσω ειδικών μεταφορέων, είτε κατευθύνονται προς το παχύ έντερο, όπου και μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και προκύπτουν μικρότερου μοριακού βάρους φαινολικά οξέα. Οι φαινόλες που απορροφώνται από το κυτοσόλιο του εντεροκυττάρων, στο οποίο πλέον προκύπτουν εξ ολοκλήρου μη γλυκοζυλιωμένες φαινολικές ενώσεις, περνούν, μέσω διάχυσης, στην κυκλοφορία του αίματος και κατευθύνονται προς το ήπαρ.

Από τα φαινολικά συστατικά που φτάνουν στο ήπαρ, ένα ποσοστό αυτών μετατρέπονται σε μεταβολίτες φάσης II με τη δράση των κατάλληλων ενζύμων. Έτσι, αναλόγως της αντίδρασης που

καταλύει κάθε τύπος ενζύμου, προκύπτουν και οι ανάλογοι μεταβολίτες φάσης II που είναι, κατά βάση, παράγωγα των πολικών φαινολικών ενώσεων συζευγμένα με γλυκουρονικό οξύ, ή με μια σουλφονική ομάδα ή με μια μεθυλομάδα. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν είτε επιστρέφουν στο λεπτό έντερο μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, είτε εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος από όπου μεταφέρονται στους υπόλοιπους ιστούς. Τα πολικά φαινολικά συστατικά και τα παράγωγα του μεταβολισμού τους μπορεί να παραμείνουν στον οργανισμό από μερικά λεπτά μέχρι και λίγες ώρες, ενώ απεκκρίνονται, σχεδόν αμέσως, μέσω των ούρων και των κοπράνων. Λόγω της ετερογένειας που χαρακτηρίζει την ομάδα των πολικών φαινολικών ενώσεων ως προς τη χημική τους δομή, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, την αλληλεπίδραση τους μεταξύ των υπόλοιπων συστατικών των τροφίμων αλλά και τη διαφορετικότητα του κάθε οργανισμού, ο μεταβολισμός και ο βαθμός απορρόφησης των φυτοχημικών αυτών διαφέρει (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

4.2 Βιοδιαθεσιμότητα

Ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται, απορροφώνται και εκδηλώνουν την βιοδραστικότητά τους στον οργανισμό τα πολικά φαινολικά συστατικά που καταναλώνονται μέσω της διατροφής, είναι απόρροια της βιοδιαθεσιμότητας και της βιοπροσβασιμότητάς τους. Με τον όρο «βιοδιαθεσιμότητα», στην επιστήμη της διατροφής εννοείται η ποσότητα του καταναλισκόμενου συστατικού το οποίο έχει απορροφηθεί και είναι διαθέσιμο για χρήση ή αποθήκευση. Για να απορροφηθεί ένα συστατικό θα πρέπει, πρώτα, να καταστεί βιοπροσβάσιμο. Ο όρος «βιοπροσβασιμότητα» αναφέρεται στην ποσότητα ενός συστατικού της τροφής, το οποίο έχει αποδεσμευτεί από το υπόλοιπο τροφικό πλέγμα και είναι παρών στον εντερικό αυλό, καθιστώντας το δυνητικά διαθέσιμο προς απορρόφηση. Συνεπώς, συνδέοντας αυτούς τους δύο όρους, η βιοδιαθέσιμη ποσότητα ενός βιοπροσβάσιμου συστατικού είναι αυτή η οποία περνάει στην κυκλοφορία του αίματος και είναι διαθέσιμη για ιστική κατανομή και εκτεταμένο μεταβολισμό.

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι σχετικά χαμηλή. Αυτό οφείλεται στη φτωχή απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, το οποίο κατά ένα μεγάλο μέρος οφείλεται στο σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών σε συνδυασμό με όλη τη διαδικασία της πέψης που έχει προηγηθεί. Σημαντικό ρόλο, επίσης, διαδραματίζει η εκτενής ιστική κατανομή καθώς και η σχετικά γρήγορη αποβολή από το σώμα, αφού οι εν λόγω ουσίες αναγνωρίζονται ως ξενοβιοτικά. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές ίνες αυξάνουν την απορρόφηση των πολυφαινολών, όταν βρίσκονται στο τροφικό πλέγμα, καθώς επιβραδύνουν την όλη διαδικασία στο έντερο, αυξάνοντας, έτσι, την έκθεση του εντερικού επιθηλίου στις εν λόγω ουσίες.

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών συστατικών επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Εκτός από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων, παίζει ρόλο και το τρόφιμο μέσα στο οποίο περιέχονται καθώς και τα τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται ταυτόχρονα. Επιπρόσθετα, η βιοδιαθεσιμότητα ενός συστατικού μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο, καθώς επηρεάζεται από τα μεταβολικά και φυσιολογικά του χαρακτηριστικά. Τέλος, σημαντική θέση στη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών έχει και η επεξεργασία του τροφίμου, όπως η θέρμανση, η αποθήκευση, κ.α. (Shahidi & Peng, 2018; Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

4.3 Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών ενώσεων

Τα τελευταία χρόνια, η ολοένα και αυξανόμενη ανάδειξη των πολικών φαινολικών συστατικών ως βιοδραστικά συστατικά της διατροφής που συμβάλλουν στην ανθρώπινη ευζωία, έχει οδηγήσει στην αύξηση των *in vivo* μελετών που διερευνούν τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Για τον καθορισμό της βιολογικής δράσης των πολικών φαινολών, καθοριστικής σημασίας είναι η μελέτη τόσο της βιοδιαθεσιμότητας, όσο και της ιστικής κατανομής. Δεδομένα δείχνουν την πρόσληψη φαινολικών συστατικών από ιστούς, όπως το ήπαρ, τα νεφρά, την καρδιά, τους πνεύμονες κ.α. Πολικές φαινόλες έχουν εντοπιστεί ακόμα και στον εγκέφαλο, διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Galmés et al., 2021).

Στη μελέτη των López de las Hazas et al., (2015) χορηγήθηκε δια του στόματος σε ποντίκια εμπλουτισμένο ελαιόλαδο με υδροξυτυροσόλη (HT) σε δόσεις των 1, 10 και 100 mg/kg. Οι ιστοί συλλέχθηκαν 5 ώρες μετά, και αναλύθηκαν με UPLC-MS/MS, με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων υδροξυτυροσόλης και των παραγώγων τους στους διάφορους ιστούς. Η HT και οι μεταβολίτες της εντοπίστηκαν σε δοσοεξαρτώμενες συγκεντρώσεις, κυρίως, στο ήπαρ, το νεφρό και, σε μικρότερη συγκέντρωση, στον εγκέφαλο, εξηγώντας έτσι τον πιθανό νευροπροστατευτικό της ρόλο. Ακόμα, μέρος της μελέτης των Zeng et al., (2019) εξέτασε το μεταβολισμό και την ιστική κατανομή της ναριγκίνης και του μεταβολίτη της ναρινγκενίνη σε γηρασμένα ποντίκια. Η μέγιστη συγκέντρωση στους ιστούς παρατηρήθηκε τις πρώτες 3-6 ώρες. Ακόμα, η κατανομή στα διάφορα όργανα διέφερε τόσο μεταξύ της ναριγκίνης και του μεταβολίτη της, όσο και μεταξύ γηρασμένων και ενήλικων ποντικών, μέσω συγκρινόμενης μελέτης, δηλώνοντας μια άμεση συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και ιστικής κατανομής. Στη μελέτη των Hithamani & Srinivasan, (2017) χορηγήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα κεχριού σε ποντίκια (100 mg/kg^{-1}), με την ταυτόχρονη χορήγηση, ή μη, πιπερίνης (20 mg/kg^{-1}). Η

ταυτόχρονη χορήγηση πιπερίνης φάνηκε ότι αύξησε την απορρόφηση και, στη συνέχεια, κατακράτηση φαινολικών συστατικών από τους διάφορους εξεταζόμενους ιστούς, όπως το πλάσμα, το ήπαρ, το έντερο, τα νεφρά, και τον εγκέφαλο. Τέλος, στη μελέτη των Luceri et al., (2017), παρατηρήθηκε βελτίωση των γνωστικών και κινητικών δυνατοτήτων μεσήλικων ποντικών, ύστερα από κατανάλωση εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου (ποσότητα φαινολών/ ημέρα: 6 mg/kg). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πολυφαινόλες διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επιδρώντας στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με γνωστικές λειτουργίες.

4.4 Προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικό υλικό

Ο επιτυχής προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα όπως είναι το πλάσμα και ορός αίματος, οι διάφοροι ιστοί (ήπαρ, νεφροί, εγκέφαλος, κλπ.) αλλά και τα ούρα είναι ύψιστης σημασίας προκειμένου να μελετηθεί η *in vivo* δράση τους. Στον τομέα της βιοανάλυσης, η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε βιολογικό υλικό, θέτει τα θεμέλια για την επίτευξη της κατανόησης του μεταβολισμού, της βιοδιαθεσιμότητας και της κατανομής τους στον οργανισμό, συνεπώς και της επακόλουθης βιολογικής τους δράσης. Ακόμη, με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης της φαρμακολογικής τους επίδρασης έναντι χρόνιων νοσημάτων όπως πχ. οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και τα καρδιαγγειακά.

Για όλα τα παραπάνω, αποτελεί βασική προϋπόθεση η χρήση κατάλληλων τεχνικών προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων και μεθόδων προσδιορισμού με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Τέτοιες μελέτες βιοανάλυσης αποτελούνται κατά βάση από 5 διακριτά στάδια: 1) δειγματοληψία του επιθυμητού βιολογικού υλικού (ιστός, βιολογικά υγρά), 2) αποθήκευση σε κατάλληλες συνθήκες μέχρι την επεξεργασία του, 3) κατάλληλη προκατεργασία του βιολογικού δείγματος για την, όσο το δυνατόν, καλύτερη απομόνωση των πολικών φαινολικών ενώσεων και, ταυτόχρονα, απομάκρυνση παρεμποδιστικών συστατικών, 4) εφαρμογή κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων όπως HPLC-MS/MS, HPLC-DAD, GC-MS, NMR, κ.α. για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πολικών φαινολικών ενώσεων και 5) στατιστική ανάλυση και ερμηνεία αποτελεσμάτων (Theodoridis et al., 2016).

4.4.1 Προκατεργασία Βιολογικών Δειγμάτων

Τα βιολογικά υλικά αποτελούν αρκετά βεβαρημένα υποστρώματα καθώς είναι πλούσια σε πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, άλατα, κ.α. και γι' αυτό, το στάδιο της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων καθορίζεται αναλόγως με το σκοπό της εκάστοτε βιοαναλυτικής μελέτης. Η προκατεργασία των βιολογικών υλικών αποτελεί κρίσιμο στάδιο καθώς, αφενός, είναι σημαντικό να επιτευχθεί η απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ενώσεων που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ανάλυση και, αφετέρου, η απομόνωση των υπό μελέτη συστατικών, καθώς και η προσυγκέντρωση τους, ειδικά σε περιπτώσεις όπου απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα. Ακόμη, εφαρμόζοντας κατάλληλους τρόπους προκατεργασίας των βιολογικών υλικών, εξασφαλίζεται και η προστασία του εξοπλισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση (Olmo-García et al., 2020).

Ειδικότερα στις περιπτώσεις των ιστών όπως ήπαρ, νεφροί, πνεύμονες, καρδιά, εγκέφαλος, κλπ., απαιτείται μια προκαταρκτική διαδικασία, όπως η λυοφιλίωση, με σκοπό να προκύψει μια μορφή του δείγματος, η οποία θα είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμη στην περαιτέρω επεξεργασία. Στην περίπτωση της λυοφιλίωσης, προκύπτει ιστός με πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό, ο οποίος ομογενοποιείται και εκχυλίζεται πιο εύκολα με την προσθήκη του επιθυμητού διαλύτη. Συγκεκριμένα, λόγω της αύξησης της επιφάνειας επαφής των μικρότερων σωματιδίων του λυοφιλιωμένου δείγματος που προκύπτουν, ο διαλύτης έρχεται σε καλύτερη επαφή με τα συστατικά του δείγματος, ευνοώντας την εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών. Ως διαλύτες εκχύλισης των πολικών φαινολικών ενώσεων από τους ιστούς, συνήθως, χρησιμοποιούνται οξινισμένα υδατικά ή μεθανολικά διαλύματα. Κατά βάση, προστίθενται οργανικά οξέα όπως το μυρμηκικό οξύ ή το οξικό οξύ, ενώ, ορισμένες φορές, και ανόργανα οξέα, όπως το φωσφορικό οξύ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις για την αποφυγή της όξινης υδρόλυσης των γλυκοζιτών. Η προσθήκη οξινισμένων οργανικών διαλυτών βοηθά στην μετουσίωση των περιεχόμενων πρωτεϊνών που υπάρχουν στα βιολογικά υλικά, οι οποίες, συχνά δρουν ως παρεμποδιστές κατά την ανάλυση των πολικών φαινολικών συστατικών (Miniati, 2007).

Στη συνέχεια, αφού στο δείγμα προστεθεί ο κατάλληλος διαλύτης, συνήθως, τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνονται φαινόμενα διεύθυνσης και μεταφοράς, καθώς και διάχυσης και διαλυτοποίησης, βελτιώνοντας την εκχύλιση των ενώσεων προς μελέτη (Majid et al., 2015). Ακολούθως, φυγοκεντρώντας τα δείγματα επιτυγχάνεται διαχωρισμός των προσμίξεων, εφόσον διαφέρουν ως προς τη μάζα ή την πυκνότητα των υπό μελέτη συστατικών (Theodoridis et al.,

2016). Το υπερκείμενο υγρό παραλαμβάνεται και, στη συνέχεια, είτε οδηγείται προς ανάλυση, είτε υφίσταται επιπλέον επεξεργασία, αν αυτό απαιτείται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα επιπλέον επεξεργασίας αποτελεί η ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Αποτελεί ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού του δείγματος από τα υπολειπόμενα συστατικά του βιολογικού υποστρώματος, όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, τα οποία, δυνητικά, μπορούν να παρεμποδίσουν τις επακόλουθες μεθόδους προσδιορισμού των πολικών φαινολικών συστατικών.

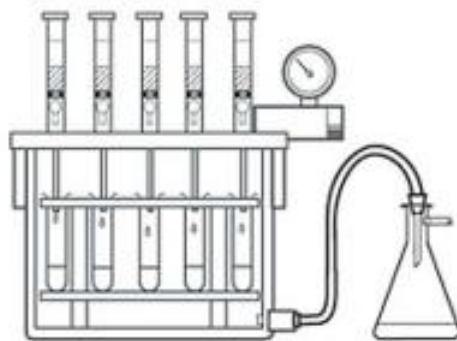
Η αρχή του SPE βασίζεται στο διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος παρουσία μιας στερεής και μιας υγρής φάσης. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό περιέκτη, το φυσίγγιο (SPE cartridge), στον οποίο υπάρχει η στερεή φάση, δηλαδή το πληρωτικό ή προσροφητικό υλικό, από την οποία διοχετεύεται το υγρό δείγμα με την επίδραση της βαρύτητας ή με την εφαρμογή κενού. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις με την υψηλότερη συγγένεια με το πληρωτικό υλικό, συγκρατούνται από αυτό. Σε μεταγενέστερη φάση, οι ενώσεις που έχουν προσκολληθεί στο πληρωτικό υλικό παραλαμβάνονται με κατάλληλο διαλύτη έκλουσης, με τον οποίο έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με το πληρωτικό υλικό. Όλη η διαδικασία δέσμευσης και έκλουσης των επιθυμητών συστατικών οφείλεται στην ανάπτυξη διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ προσδιοριζόμενων ενώσεων του δείγματος και του προσροφητικού υλικού.

Τα πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης προσομοιάζουν αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αλλά σε διαφορετική κοκκομετρική σύσταση. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία πληρωτικών υλικών διαθέσιμη εμπορικά, καλύπτοντας μεγάλο εύρος πολικότητας (υδροφοβικότητα/ υδροφιλικότητα) και μεγάλο εύρος όγκων και διαστάσεων, ανάλογα με τα συστατικά που πρόκειται να απομονωθούν. Πιο συγκεκριμένα, για τις πολικές φαινολικές ενώσεις, τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή τους από βιολογικά υλικά, φέρουν, ως βάση τους, είτε πολυμερή πυριτίου (silica-based, πχ C8, C18) είτε άλλα πολυμερικά υλικά (polymer sorbent, πχ OASIS HLB, Strata-X). Τα τελευταία βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή λόγω της δυνατότητας συνδυαστικής υδρόφοβης και υδρόφιλης αλληλεπίδρασης που διαθέτουν.

Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης αποτελούνται κατά βάση από τα εξής πέντε κύρια βήματα:

1. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού με διαλύτες όπως η μεθανόλη (MeOH) και το ακετονιτρίλιο (AcCN).

2. Εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού με την προσθήκη δεύτερου διαλύτη, ο οποίος, τις περισσότερες φορές, είναι το νερό, το οποίο μπορεί να είναι οξιτισμένο με κάποιο οργανικό οξύ.
3. Τοποθέτηση δείγματος στο φυσίγγιο.
4. Έκπλυση της στήλης SPE, με στόχο την απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ουσιών και, παράλληλα, την αποφυγή της ταυτόχρονης απομάκρυνσης των υπό μελέτη ενώσεων. Στο στάδιο αυτό, χρησιμοποιείται διαλύτης μέσης ισχύος, όμοιος με αυτόν του δεύτερου βήματος.
5. Ποσοτική παραλαβή και αποθήκευση των ενώσεων προς ανάλυση με χρήση κατάλληλου διαλύτη (Ötles & Kartal, 2016; Rodríguez et al., 2000).



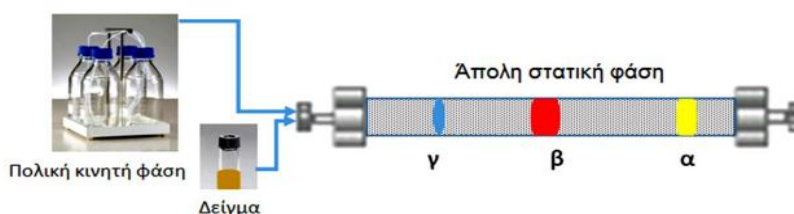
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας SPE (Theodoridis et al., 2016).

4.4.2 Ανάλυση των βιολογικών υλικών

Οι χρωματογραφικές τεχνικές, συζευγμένες με διάφορους τύπους ανιχνευτών, αποτελούν τους πιο διαδεδομένους τρόπους για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Ειδικότερα, η υγρή χρωματογραφία, συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, αποτελεί την πιο δημοφιλή τεχνική προσδιορισμού και ανάλυσης των πολικών φαινολικών ενώσεων τα τελευταία χρόνια. Σε πρώτο στάδιο, τα πολικά φαινολικά συστατικά διαχωρίζονται στη στήλη χρωματογραφίας από την οποία περνούν, και στη συνέχεια, αφού εκλουστούν, περνούν στον ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, ο οποίος τις ανιχνεύει βάσει των παραγόμενων μοριακών τους ιόντων.

Σε κάθε είδος χρωματογραφίας υπάρχουν δύο φάσεις: μια κινητή και μία στατική. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσω ροής της κινητής φάσης κατά μήκος του πορώδους υλικού της στατικής. Το κάθε αναλυόμενο συστατικό αλληλεπιδρά με κάθε φάση, εμφανίζοντας διαφορετική χημική συγγένεια για την καθεμία, συνεπώς και, διαφορετική ταχύτητα διόδου από τη χρωματογραφική στήλη. Η διαφορετική συγγένεια της κάθε ουσίας με την κινητή και στατική φάση είναι αποτέλεσμα διαφορών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπως το μοριακό βάρος, το φορτίο, η διαλυτότητα κ.α., καθώς και της σύστασης των δύο φάσεων.

Η Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί μια εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, αφού η κινητή υγρή φάση δεν ρέει με την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη χρήση ειδικής αντλίας. Το γεγονός, αυτό, μειώνει το χρόνο ολοκλήρωσης της ανάλυσης, βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα και προσφέρει επαναλήψιμα αποτελέσματα για ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων. Ανάλογα με την πολικότητα μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε κανονικής ή αντίστροφης φάσης. Η HPLC αντίστροφης φάσης είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών συστατικών. Ακόμη, όταν πρόκειται για διαχωρισμό ενός μίγματος φαινολικών ενώσεων, επιλέγεται βαθμωτή έκλυση, επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων (Karkalousos et al., 2016; Kumar, 2017; Theodoridis et al., 2016).



Εικόνα 6: Χρωματογραφικός διαχωρισμός με εφαρμογή HPLC, μίγματος αποτελούμενος από τρία μόρια διαφορετικής πολικότητας. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε (Kumar, 2017).

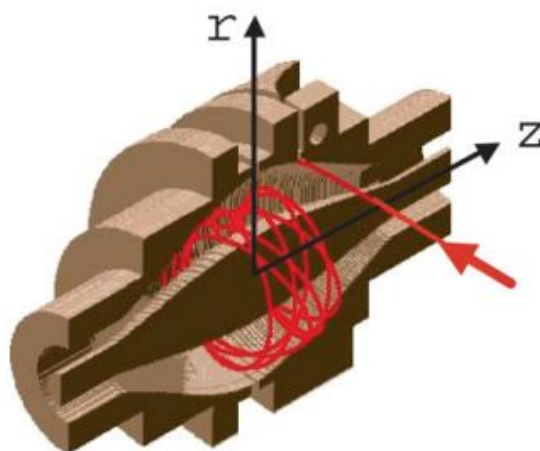
Για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση μεγάλου εύρους ενώσεων, η φασματομετρία μάζας αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο, κατά την εφαρμογή του οποίου, τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα, τα οποία διαχωρίζονται με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η διαδικασία αυτή απαρτίζεται από τα εξής 3 στάδια: τον ιονισμό, την ανάλυση μάζας και την ανίχνευση.



*Η ένταση του οποίου αποτελεί συνάρτηση του λόγου m/z

Σχήμα 2: Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μαζών.

Οι συγκεκριμένοι τύποι ανιχνευτών προτιμώνται για την ανάλυση φαινολικών ουσιών σε βιολογικά δείγματα, καθώς δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης συστατικών ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (της τάξεως $\text{pmol} - \text{nmol}$) και επιτρέπει την ταυτοποίηση αυτών με μεγάλη ακρίβεια. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας. Τις τελευταίες δεκαετίες, ο αναλυτής μαζών τεχνολογίας **Orbitrap**, αποτελεί μια από τις πιο κορυφαίες επιλογές για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Η αρχή λειτουργίας του συγκεκριμένου αναλυτή είναι αρκετά απλή και απεικονίζεται στην **Εικόνα 7**. Συγκεκριμένα, εξαναγκάζει τα προκύπτοντα ιόντα σε κίνηση κατά μήκος δύο αξόνων (r και z). Οι τροχιές που διαγράφουν τα ιόντα ανιχνεύονται και αποτυπώνονται σε εικόνα, και, τελικά, λαμβάνεται το φάσμα μάζας. (El-Aneed et al., 2009; Kumar, 2017; Theodoridis et al., 2016)



Εικόνα 7: Διατομή του αναλυτή Orbitrap, στην οποία φαίνονται η δύο άξονες r και z (Hu et al., 2005).

Β' ΜΕΡΟΣ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής, περιλαμβάνονται τα κάτωθι: αναδευτήρας Vortex (Velp Scientific), φυγόκεντρος (Centurion Scientific Ltd), συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (IST VacMaster), συσκευή παραγωγής δις απεσταγμένου νερού ειδικής αντίστασης 17,8 MΩ/cm (Barnstead, EASYpure RF), συσκευή περιστροφικού συμπυκνωτή υπό κενό (speed vacuum, Labconco), καταψύκτης (-40°C) και υπερκαταψύκτης (-80°C).

Ακόμη, στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνονται: γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 2, 5, 10, 250 και 1000 mL, γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 100 mL, γυάλινα ογκομετρικά σιφώνια των 2 και 5 mL, γυάλινες πιπέτες Pasteur, σωλήνες φυγοκέντρωσης (Eppendorf tubes) χωρητικότητας 1.5 mL, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 mL, αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-100 µL και 100-1000 µL (Eppendorf, Reference), καθώς και κατάλληλα ρύγχη (tips) για τις αυτόματες πιπέτες και γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (vials) των 2 mL, με κατάλληλους υποδοχείς δειγμάτων (inserts) των 250 µL. Για την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιήθηκαν φυσίγγια OASIS® HLB 60 mg/3 mL (Waters).

Για τις αναλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών και αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (Ultra-High Pressure/Performance Liquid Chromatography, UHPLC) της σειράς DIONEX, UltiMate 3000™ Rapid Separation UHPLC+ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης Accucore™ C18 (Thermo Fisher Scientific), διαμέτρου 2,1 mm, μήκους 150 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 2,6 µm. Η ανίχνευση των υπό μελέτη πολικών φαινολικών συστατικών, έγινε βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) με φασματόμετρο μαζών Orbitrap Exactive Plus™ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).



Εικόνα 8: Υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης UHPLC, συζευγμένο με αναλυτή μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

Για τη ρύθμιση και τον έλεγχο των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Exactive Plus Tune (Version 2.8 SP1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Το λογισμικό XCalibur 4.1 Thermo Scientific χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση των αναλύσεων, ενώ για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TraceFinder™ (Version 4.1, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

5.2 Αντιδραστήρια και διαλύματα εργασίας

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προκατεργασία των δειγμάτων και την μετέπειτα χρωματογραφική ανάλυση είναι οι κάτωθι:

- Ακετονιτρίλιο (ACN) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).
- Μεθανόλη (MeOH) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).
- Νερό (H₂O) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Μυρμηκικό οξύ (HCOOH) υψηλής καθαρότητας, Optima™ LC/MS grade formic acid 99,0%+ (Fisher Chemical)
- PBS ταμπλέτες (Gibco, Life Technologies™)

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης παρασκευάστηκαν τα κάτωθι δ/ματα ως εξής:

- Δ/μα μυρμηκικού οξέος (HCOOH) 0,1% (v/v): 1 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος αραιώθηκε με νερό (H₂O), LC-MS grade σε τελικό όγκο 1 L.
- Δ/μα ακετονιτρίλιου με μυρμηκικό οξύ (ACN, HCOOH) 0,1% (v/v): 1 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος αραιώθηκε με ακετονιτρίλιο (ACN), LC-MS grade σε τελικό όγκο 1 L.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Μία ταμπλέτα PBS (Gibco, Life Technologies™) διαλύθηκε σε 500 mL δις απεσταγμένου νερού και φυλάχθηκε στο ψυγείο (4°C).

5.3 Πρότυπες ουσίες

Οι πρότυπες ουσίες των υπό μελέτη πολικών φαινολικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας πτυχιακής ήταν : apigenin, (+)-catechin, caftaric acid, chlorogenic acid, chrysin, daidzein, (-)-3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), -epicatechin, (-)-epigallocatechin, , ferulic acid, formononetin , genistein, (±)-hesperetin, homovanillic acid (HVA), 3-hydroxytyrosol (DOPET) , kaempferol-3-O-glucoside (astragalin) , (±)-naringenin, kaempferol, luteolin, neochlorogenic acid, *p*-coumaric acid, procyanidin B2, sinapic acid, syringic acid, *trans*-cinnamic acid, *trans*-resveratrol, tyrosol και vanillin (Supelco, Bellefonte, PA, USA), (-)-epigallocatechin gallate, 3-O-methyl quercetin (isorhamnetin), oleuropein, quercetin, quercetin-3-O-glucoside (isoquercetin), και quercetin-3-*o*-rutinoside (rutin) (Extrasynthèse, Genay-Sedex, France), caffeic acid, epicatechin gallate, (+)-E-viniferin, , gallic acid, myricetin, *o*-coumaric acid, phloretic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid, protocatechuic acid, *trans*-coutaric acid και vanillic acid (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA), και piceid (polydatin) (Fluorochem, Hadfield, UK). Ως εσωτερικό πρότυπο (IS) χρησιμοποιήθηκε η quercetin-d3 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Για κάθε πρότυπο παρασκευάστηκε αρχικά πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ mL σε μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (LC-MS grade). Κατόπιν, με αραιώση παρασκευάστηκε

ενδιάμεσο μείγμα διαλύματος εργασίας όλων των ενώσεων με συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$ σε τελικό όγκο 10 mL, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την προετοιμασία μεταγενέστερων προτύπων δ/ματων για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς των υπό μελέτη ενώσεων. Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάχθηκαν στους -20°C .

5.4 Διατροφική παρέμβαση

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη αναλύθηκαν δείγματα εγκεφάλου από επίμυες που είχαν λάβει τυπική δίαιτα ή δίαιτα εμπλουτισμένη με Κορινθιακή σταφίδα. Τα ζωικά πρότυπα, χωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε 2 διακριτές ομάδες με βάση την διατροφή τους (τυπική δίαιτα ή δίαιτα με Κορινθιακή σταφίδα) : (Α) ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ: Υγιή ζώα που έλαβαν τυπική δίαιτα ($n=4$) και (Β) ΟΜΑΔΑ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ: Υγιή ζώα που ταυτόχρονα με την τυπική δίαιτα έλαβαν και σταφίδα ($n=5$).

Οι επίμυες τρέφονταν καθημερινά και για χρονικό διάστημα ενός (1) μήνα με σταθερή ποσότητα τροφής κατά τη διάρκεια ολόκληρης της παρέμβασης. Συγκεκριμένα, η ομάδα ελέγχου λάμβανε την τυπική δίαιτα των επίμυων, ενώ η ομάδα παρέμβασης, λάμβανε συμπληρωματικά με την τυπική δίαιτα και Κορινθιακή σταφίδα, 3% επί της ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Στους επίμυες παρέχονταν την ίδια ώρα, κάθε πρωί, φρέσκια τροφή, ενώ όση τροφή παρέμενε από την προηγούμενη ημέρα, αφαιρούνταν από το κλουβί τους. Η Κορινθιακή σταφίδα παρέχονταν με τον ίδιο τρόπο κάθε πρωί, ολόκληρη ως τρόφιμο. Η τυπική δίαιτα των επίμυων που τους χορηγούνταν, ήταν ξηρά τροφή σε μορφή σύμψηκτων (pellets) η οποία αποτελείται κατά βάση από σιτάρι, αραβόσιτο, σόγια και σογιέλαιο.

Ακόμη, προσδιορίστηκαν τα πολικά φαινολικά συστατικά της τυπικής δίαιτας των επίμυων, καθώς της χορηγούμενης Κορινθιακής σταφίδας, όπως περιγράφονται στην ενότητα **6.1**.

5.5 Προκατεργασία Δειγμάτων

5.5.1 Προκατεργασία Βιολογικού Υλικού

Η προκατεργασία του βιολογικού υλικού βασίστηκε στην μέθοδο προκατεργασίας των Li et al., (2014), και αφού έγιναν τροποποιήσεις, ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Σε 60 mg παγωμένου νωπού ιστού προστέθηκαν 500 μL ρυθμιστικό δ/μα φωσφορικού οξέος (PBS, pH 7.0). Ακολούθησε ομογενοποίηση (Ultra-Turrax) και έπειτα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερήχους από ομογενοποιητή υπερήχων (Sonopuls). Στη συνέχεια, το δείγμα

φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm, 10 min) και το παραληφθέν υπερκείμενο υπέστη περαιτέρω προκατεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης (στηλάκια OASIS® HLB 60 mg/3 mL, Waters) (Vasilakopoulou et al., 2022). Η πορεία που ακολουθήθηκε για το SPE ήταν η εξής:

1. Ενεργοποίηση των στηλών, πρώτα προσθέτοντας 1.5 mL MeOH (LC-MS) και ύστερα 1.5 mL 0.1% HCOOH για εξισορρόπηση.
2. Εναπόθεση του προς ανάλυση δείγματος στη στήλη.
3. Έκπλυση με HCOOH (0.1% v/v, 1.5 mL).
4. Έκλουση των πολικών φαινολικών ενώσεων με 4 mL MeOH (LC-MS).

Τα εκλούσματα από την εκχύλιση στερεάς φάσης στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν επί ξηρού στον περιστροφικό συμπυκνωτή (2.5 hrs, 38°C). Τέλος, έγινε αναδιάλυση με 200 µL MeOH-H₂O (1:1, v/v, LC-MS).

5.5.2 Προκατεργασία Κορινθιακής Σταφίδας και τροφής επίμυων

Τα πολικά φαινολικά συστατικά της σταφίδας και την τροφής των επίμυων απομονώθηκαν με μεθανόλη όπως περιγράφεται από τους Chiu et al., (2007). Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν επί ξηρού στον περιστροφικό συμπυκνωτή (2.5 hrs, 38°C) και πραγματοποιήθηκε ανασύσταση σε τελικό όγκο 2 mL μεθανόλης. Κλάσματα όγκου 200 µL των εκχυλισμάτων σταφίδας και τροφής των επίμυων υπέστη περαιτέρω προκατεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης, όπως περιγράφεται προηγουμένως στην ενότητα 5.4.3.

5.6 Χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (Vasilakopoulou et al., 2022). Με την υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των διάφορων συστατικών βάσει των δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης που αναπτύσσονται μεταξύ τους, του υλικού πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης και της υγρής κινητής φάσης. Για την χρωματογραφική ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων σε δείγματα ορού και πλάσματος, επιλέχθηκε η χρήση της στήλης Accucore™ C18 (Thermo Fisher Scientific) με διαλύτες κινητής φάσης: (Α) υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (HCOOH) (0,1% v/v) και (Β) διάλυμα ακετονιτριλίου οξινομένο με HCOOH (0,1% v/v). Για την έκλουση των συστατικών χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ως ακολούθως: αρχικές συνθήκες 5% (Β) ισοκρατικά για 1.1 min, 25% (Β) σε 1.1 min και ισοκρατικά για 1.1 min, 40% (Β) σε 0.6 min και ισοκρατικά για 2.6 min, 95% (Β) σε 3 min και ισοκρατικά για 2.5 min

και επιστροφή του συστήματος στις αρχικές συνθήκες σε 0.4 min και ισοκρατικά για 6 min για εξισορρόπηση της στήλης. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 0,12 mL/min και η θερμοκρασία στήλης στους 25°C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 5 μ L.

Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών Orbitrap Exactive Plus™. Στο φασματόμετρο αυτό αρχικά πραγματοποιείται ο ιοντισμός των ενώσεων με θερμαινόμενο ηλεκτροψεκασμό (H-ESI). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η κινητή φάση καθώς και ο διαλύτης της εγχυμένης ποσότητας του δείγματος περνά στην αέρια φάση, τα περιεχόμενα μόρια ιοντίζονται και στη συνέχεια με τη βοήθεια του διερχόμενου αερίου αζώτου σε συνδυασμό με τα ηλεκτροστατικά πεδία που αναπτύσσονται καθοδόν εντός του φασματόμετρου μαζών, αυτά φτάνουν στον αναλυτή μάζας όπου διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε ο αρνητικός ιοντισμός ((-)ESI), με πλήρη σάρωση (Full Scan MS) και ανιχνεύθηκαν τα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ της κάθε πολικής φαινόλης. Οι παράμετροι λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών ήταν οι ακόλουθοι: δυναμικό ψεκασμού (spray voltage) - 3,80 kV, ροή αερίου εκνέφωσης N_2 (seath gas) 40 AU, ροή αερίου ξήρανσης N_2 (auxiliary gas) 11 AU, ροή αερίου σάρωσης (sweep gas) 2 AU, θερμοκρασία αερίου ξήρανσης 200°C, θερμοκρασία αγωγού μεταφοράς ιόντων (ion transfer capillary temperature) 320°C, και επίπεδο οπτικών φακών (S-lens RF level) 50 AU.

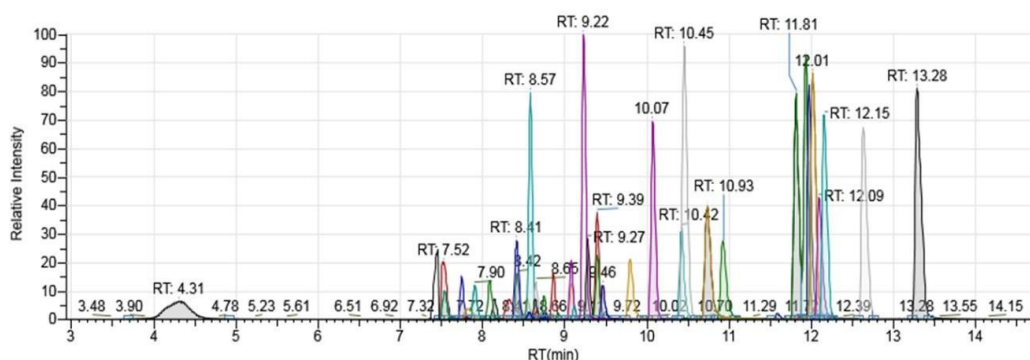
Στον **Πίνακα 4**, αναγράφονται τα μοριακά ιόντα ($[M-H]^-$), η ακρίβεια μάζας (mass error, ppm), καθώς και οι χρόνοι κατακράτησης (RT, min) για κάθε πολική φαινολική ένωση. Ακολουθώς στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα XIC (Extracted Ion Chromatogram). Σύμφωνα με τις συνθήκες του υγροχρωματογραφικού συστήματος που προαναφέρθηκαν, όλες οι προσδιοριζόμενες πολικές φαινολικές ενώσεις εκλύονται εντός 13 λεπτών. Παρόλο που οι περισσότερες ενώσεις συνεκλύονται, η χρήση ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας καθιστά τον διαχωρισμό τους εφικτό, ακόμα και στην περίπτωση των ισομερών ενώσεων, χάρις στην ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων που παρέχει ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών.

Πίνακας 4: Μοριακά Ιόντα, ακρίβεια μάζας (mass error, ppm) και χρόνοι κατακράτησης των πολικών φαινολικών ενώσεων στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (-ESI).

Πολική Φαινόλη					
----------------	--	--	--	--	--

	Μοριακός τύπος	[M-H] ⁻ Μοριακό Ιόν (Θεωρητική τιμή)	[M-H] ⁻ Μοριακό Ιόν (Πειραματική τιμή)	Ακρίβεια μάζας (mass error, ppm)	Χρόνος Κατακράτησης (RT, min)
Φλαβαν-3-ολες					
(-) Επικατεχίνη	C15H14O6	289,0718	289,0720	-0,69	8,41
(-) Επιγαλοκατεχίνη	C15H14O7	305,0667	305,0668	-0,33	7,72
(-) Γαλλικός εστέρας επιγαλοκατεχίνης	C22H18O11	457,0776	457,0783	-1,53	8,52
(±)-Κατεχίνη	C15H14O6	289,0718	289,072	-0,69	8,07
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	C22H18O10	441,0827	441,0831	-0,91	9,06
Φλαβόνες					
Απιγενίνη	C15H10O5	269,0455	269,0457	-0,74	11,82
Χρυσίνη	C15H10O4	253,0506	253,0507	-0,4	13,29
Λουτεολίνη	C15H10O6	285,0405	285,0406	-0,35	10,76
Φλαβονόλες					
3-O-Μεθυλοκερκετίνη	C16H12O7	315,051	315,0514	-1,27	12,09
Καμπφερόλη	C15H10O6	285,0405	285,0406	-0,35	12,01
Μυρισετίνη	C15H10O8	317,0303	317,0305	-0,63	9,81
Κερκετίνη	C15H10O7	301,0354	301,0355	-0,33	10,94
Φλαβανόνες					
(±)-Εσπερετίνη	C16H14O6	301,0718	301,072	-0,66	12,15
(±)-Ναρινγκενίνη	C15H12O5	271,0612	271,0616	-1,48	11,97
Ισοφλαβόνες					
Δαϊσδεΐνη	C15H10O4	253,0506	253,0507	-0,4	10,48
Φορμονονετίνη	C16H12O4	267,0663	267,0667	-1,5	12,63
Γενιστεΐνη	C15H10O5	269,0455	269,0459	-1,49	11,93
Στιλβένια					
trans-Ρεσβερατρόλη	C14H12O3	227,0714	227,0711	1,32	10,44
(+)-Ε-Βινιφερίνη	C28H22O6	453,1344	453,1351	-1,54	11,58
Γλυκοζίτες					
Αστραγαλίνη	C21H20O11	447,0933	447,0938	-1,12	9,07
Πισεΐδη (Πολυδατίνη)	C20H22O8	389,1242	389,1251	-2,31	8,86
Ισοκερκετίνη	C21H20O12	463,0882	463,0891	-1,94	8,92
Ρουτίνη	C27H30O16	609,1461	609,1469	-1,31	8,64

Προανθοκυανιδίνες					
Προκυανιδίνη	C30H26O12	577,1351	577,136	-1,56	8,13
Φαινυλαιθανοειδή					
3-υδροξυ-τυροσόλη	C9H12O3	153,0546	153,0544	1,31	7,47
Ελευρωπαΐνη	C25H32O13	539,1759	539,1779	3,71	9,41
Τυροσόλη	C8H10O2	137,0597	137,0594	2,19	8,74
Φαινολικά Οξέα					
Καφεϊκό οξύ	C9H8O4	179,0339	179,0341	-1,12	8,58
Καφταρικό οξύ	C13H12O9	311,0409	311,0412	-0,96	7,72
Χλωρογενικό οξύ	C16H18O9	353,0878	353,0882	-1,13	7,89
Φερουλικό οξύ	C9H10O4	193,0495	193,0499	-2,07	9,4
Γαλλικό οξύ	C9H10O4	169,0131	169,0132	-0,59	4,43
Νεοχλωρογενικό οξύ	C16H18O9	353,0878	353,0883	-1,42	7,49
p-Κουμαρικό οξύ	C9H8O3	163,039	163,039	0	10,09
o-Κουμαρικό οξύ	C9H8O3	163,039	163,039	0	9,24
3-(4-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ	C9H10O3	165,0546	165,0546	0	9,11
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	C7H6O3	137,0233	137,023	2,19	8,41
p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	C8H8O3	151,039	151,0387	1,99	8,57
Σιναπικό οξύ	C11H12O5	223,0612	223,0608	1,79	9,28
Συριγγικό Οξύ	C9H10O5	197,0444	197,0447	-1,52	8,64
trans-κινναμωμικό οξύ	C9H8O2	147,0441	147,0438	2,04	11,88
trans-κουταρικό οξύ	C13H12O8	295,0459	295,0461	-0,68	8,26
Βανιλλικό Οξύ	C8H8O3	167,0339	167,0339	0	8,66
Φαινολικές Αλδεΐδες					
Βανιλίνη	C8H8O4	151,039	151,0388	1,32	9,47
Εσωτερικό πρότυπο (IS)					
Κερκετίνη-d3	C15H7D3O7	304,0531	304,0543	3,95	10,9



Εικόνα 9: XIC Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπου διαλύματος των πολικών φαινολικών ενώσεων, συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/mL}$. Οι ενώσεις που αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης του χρωματογραφήματος φαίνονται στον Πίνακα 4.

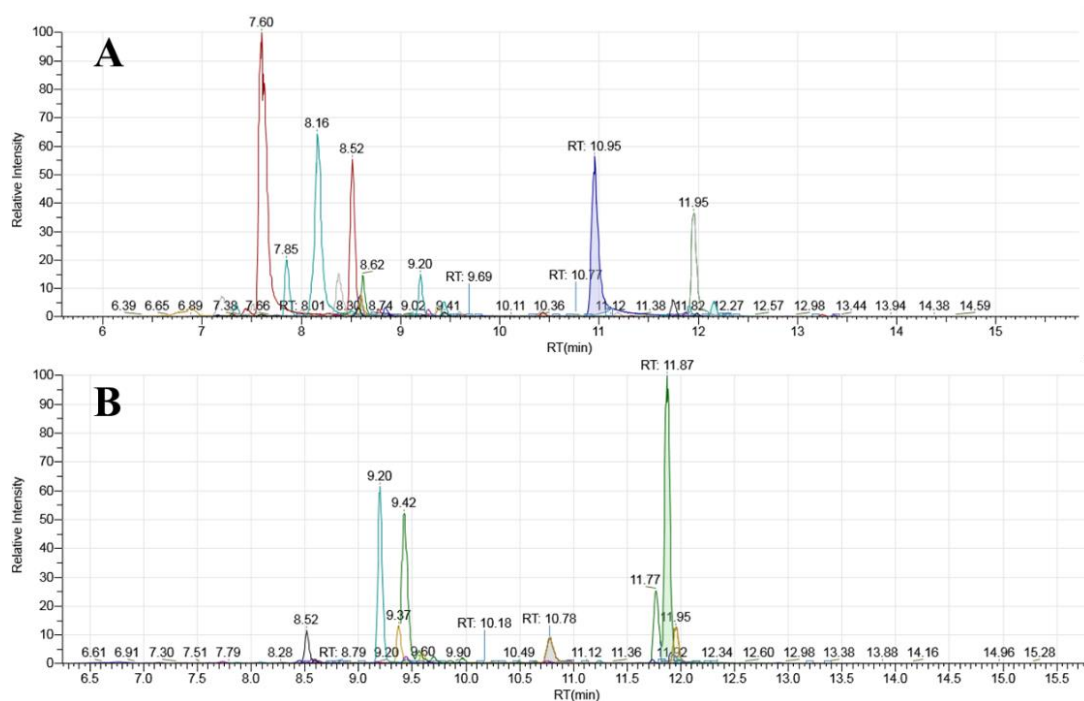
5.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS for Windows, version 26.0, IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Για να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας παρέμβασης, εφαρμόστηκε στατιστικός έλεγχος T-τεστ για ανεξάρτητα δείγματα (Independent Samples T-test). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ STDEV).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Προσδιορισμός επιμέρους πολικών φαινολικών ενώσεων στην Κορινθιακή Σταφίδα & στη τροφή

Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα πολικά φαινολικά συστατικά στη σταφίδα & στην τροφή των επίμυων. Σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών, βενζοϊκών και κινναμωνικών οξέων εντοπίζονται στην Κορινθιακή σταφίδα. Από την άλλη, η ζωοτροφή φαίνεται να περιέχει ένα σύνολο πολικών φαινολικών ενώσεων, το οποίο υπάρχει και στην Κορινθιακή σταφίδα, σε μικρότερες, ωστόσο, ποσότητες. Στην **Εικόνα 10** φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα των πολικών ΦΕ που προσδιορίστηκαν **(Α)** στην Κορινθιακή σταφίδα και **(Β)** στην τροφή των επίμυων.



Εικόνα 10: Χρωματογραφήματα των πολικών φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν (Α) στην Κορινθιακή σταφίδα και (Β) στην τροφή των επίμυων.

Τα επιμέρους πολικά φαινολικά συστατικά που προσδιορίστηκαν στην Κορινθιακή σταφίδα και στη ζωοτροφή φαίνονται στους **Πίνακες 5** και **6** αντίστοιχα. Μεταξύ των φαινολικών συστατικών που προσδιορίστηκαν η ισοκερκετίνη, η κερκετίνη, η ρουτίνη και ορισμένα παράγωγα του βενζοϊκού

οξέος ήταν αυτά με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην Κορινθιακή σταφίδα, συγκριτικά με την τροφή των επίμυων.

Πίνακας 5: Πολικά φαινολικά συστατικά στην Κορινθιακή σταφίδα.

Φλαβονοειδή	Περιεκτικότητα (μg/100 g)	Άλλες πολικές φαινόλες	Περιεκτικότητα (μg/100 g)
Φλαβόνες		Στιλβένια	
Χρυσίνη	0.2±0.1	<i>trans</i> -Ρεσβερατρόλη	3.0±0.4
Λουτεολίνη	1.1±0.2	E-Βινιφερίνη	3.2±0.6
Φλαβονόλες		Πισεΐδη	25.7±4.5
Ισοραμνετίνη	27.8±1.5	Φαινολικές Αλδεΐδες	
Καμπφερόλη	32.4±4.8	Βανιλίνη	11.8±1.3
Κερσετίνη	160.6±21.1	Παράγωγα κινναμωνικών οξέων	
Γλυκοζίτες Φλαβονολών		Καφεϊκό οξύ	50.0±3.6
Ισοκερκετίνη	445.4±70.2	Φερουλικό οξύ	9.3±1.2
Ρουτίνη	111.5±16.3	<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	10.1±1.3
Φλαβανόνες		Παράγωγα βενζοϊκών οξέων	
Εσπερετίνη	0.5±0.1	Γαλλικό οξύ	178.8±24.1
Ναρινγκενίνη	2.0±0.3	Συριγγικό οξύ	111.0±20.7
Ισοφλαβόνες		Βανιλικό οξύ	261.4±46.7
Γενιστεΐνη	0.1±0.1		

Πίνακας 6: Πολικά φαινολικά συστατικά στην τροφή των επίμυων.

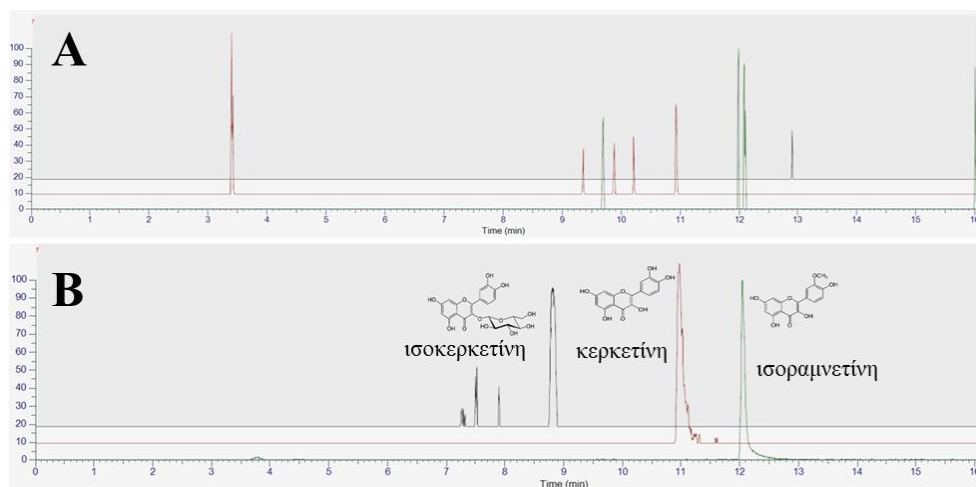
Φλαβονοειδή	Περιεκτικότητα (μg/100g)	Άλλες πολικές φαινόλες	Περιεκτικότητα (μg/100g)
Φλαβόνες		Στιλβένια	
Απιγενίνη	34.0±5.2	Πισεΐδη	9.6±1.3
Λουτεολίνη	31.4±7.4		
Φλαβονόλες		Φαινολικές Αλδεΐδες	
Ισοραμνετίνη	0.9±0.2	Βανιλίνη	40.1±10.2
Καμπφερόλη	14.0±3.1		
Κερκετίνη	5.0±1.4	Παράγωγα κινναμωνικών οξέων	
Γλυκοζίτες Φλαβονολών		Καφεϊκό οξύ	21.4±3.1
Ισοκερκετίνη	3.9±1.4	Φερουλικό οξύ	69.0±17.3
Ρουτίνη	12.5±2.6	<i>p</i> -Κουμαρικό οξύ	87.3±17.9

Φλαβανόνες		Παράγωγα βενζοϊκών οξέων	
Εσπερετίνη	1.4±0.4	Γαλλικό οξύ	5.4±1.7
Ναρινγενίνη	3.1±1.3	Συριγγικό οξύ	37.6±7.0
Ισοφλαβόνες		Βανιλικό οξύ	44.3±9.4
Δαϊσδεΐνη	126.1±24.5		
Φορμονονετίνη	7.2±1.8		
Γενιστεΐνη	322.7±60.0		

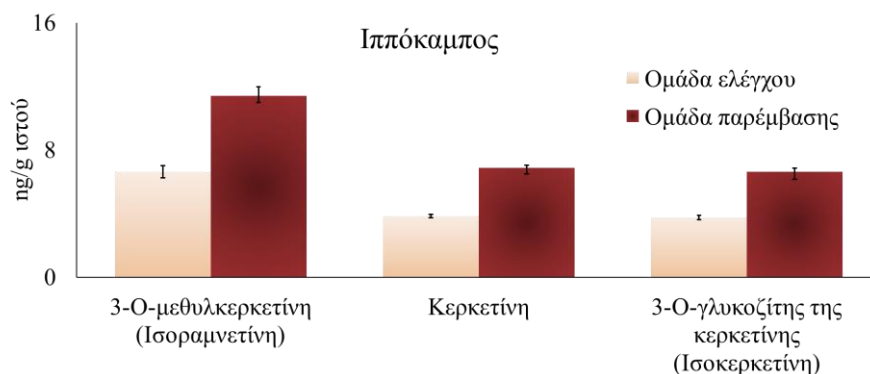
6.2 Προσδιορισμός επιμέρους πολικών φαινολικών ενώσεων στο βιολογικό υλικό των επίμυων

Κατόπιν κατάλληλης πειραματικής προεργασίας, προσδιορίστηκαν τα πολικά φαινολικά συστατικά στον ιππόκαμπο 2 ομάδων επίμυων: αυτών οι οποίοι κατανάλωσαν μια τυπική διαίτα, και αυτών στους οποίους χορηγήθηκε Κορινθιακή σταφίδα συμπληρωματικά με τη διατροφή τους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων. Στην **Εικόνα 11** παρουσιάζονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα ιππόκαμπου από τις 2 ομάδες επίμυων : **(Α)** ομάδας ελέγχου (τυπική διαίτα) και **(Β)** ομάδας παρέμβασης (τυπική διαίτα + Κορινθιακή σταφίδα). Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 11 (Β)** απεικονίζονται οι 3 ενώσεις οι οποίες ανιχνεύθηκαν στον ιππόκαμπο της ομάδας επίμυων που έλαβε Κορινθιακή σταφίδα συμπληρωματικά με τη διατροφή τους: την ισοκερκετίνη, κερκετίνη και ισοραμνετίνη.

Ειδικότερα, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του **Γραφήματος 1**, η ισοκερκετίνη βρέθηκε σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στον ιππόκαμπο των επίμυων που κατανάλωσαν Κορινθιακή σταφίδα ($11,39 \pm 0,415$ ng/g ιστού), σε σύγκριση με τη συγκέντρωση αυτής στην ομάδα ελέγχου ($6,64 \pm 0,389$ ng/g ιστού). Επίσης, η κερκετίνη βρέθηκε σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα στα εγκεφαλικά κύτταρα του ιππόκαμπου της ομάδας παρέμβασης ($6,88 \pm 0,391$ ng/g ιστού), συγκριτικά με την ομάδα επίμυων που κατανάλωσαν τυπική διαίτα ($3,84 \pm 0,108$ ng/g ιστού). Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά σημειώθηκε στη συγκέντρωση της ισοραμνετίνης στην περιοχή του ιππόκαμπου μεταξύ της εξεταζόμενης ομάδας ($6,63 \pm 0,481$ ng/g ιστού) και της ομάδας ελέγχου ($3,75 \pm 0,137$ ng/g ιστού).



Εικόνα 11: Χρωματογραφήματα (Α) ομάδας ελέγχου (τυπική διαίτα), (Β) ομάδας παρέμβασης (τυπική διαίτα + Κορινθιακή σταφίδα).



Γράφημα 1: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα ιππόκαμπου επίμυων της ομάδας ελέγχου (τυπική διαίτα), (Β) ομάδας παρέμβασης (τυπική διαίτα + Κορινθιακή σταφίδα).

6.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων & συζήτηση

Τα πολικά φαινολικά συστατικά αποτελούν το επίκεντρο των φυτοχημικών που, τα τελευταία χρόνια, μελετώνται σε μεγάλο βαθμό λόγω του ευεργετικού τους ρόλου στην υγεία των ανθρώπων. Τα τελευταία χρόνια, στη βιβλιογραφία ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των μελετών που υποστηρίζει το ρόλο τους στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Parkinsons, Alzheimer's, κ.α.), χωρίς να είναι απολύτως κατανοητοί οι μηχανισμοί δράσης τους. Οι πολικές φαινόλες αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά που,

ασχέτως της χαμηλής τους *in vivo* βιοδιαθεσιμότητας, αναδεικνύεται από αρκετές μελέτες η ευεργετική τους επίδραση στον οργανισμό.

Βιοαναλυτικές μελέτες που αφορούν στον προσδιορισμό της ιστοειδικής κατανομής φυτοχημικών συστατικών των τροφίμων μετά την κατανάλωση είναι δύσκολο, έως αδύνατο για λόγους βιοηθικής, να διενεργηθούν με ανθρώπους – εθελοντές και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ζωικά πρότυπα, κυρίως ποντίκια, επίμυες και χοίροι. Αν και ο μεταβολισμός τους από αυτόν του ανθρώπου διαφέρει, αποτελούν την κοντινότερη εναλλακτική – προσομοίωση.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί πως τα πολικά φαινολικά συστατικά διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και κατανέμονται, τελικά, στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, με σημαντικές ποσότητες να εντοπίζονται στον ιππόκαμπο, το μετωπιαίο λοβό και την παρεγκεφαλίδα. Η πολυπλοκότητα της δομής του εγκεφάλου αποτελεί πρόκληση για τη διασφάλιση ορθών αποτελεσμάτων. Υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων, και στερολών είναι πιθανό να επηρεάσουν τον προσδιορισμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η εφαρμογή μεθόδων προκατεργασίας υψηλής απόδοσης, όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) για την απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ουσιών.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάσθηκε η ιστοειδική κατανομή των πολικών φαινολικών της Κορινθιακής σταφίδας σε υγιείς επίμυες που την κατανάλωναν, ως ολόκληρο τρόφιμο, συμπληρωματικά με τη διατροφή τους. Ακόμη, προσδιορίσθηκαν τα επιμέρους πολικά φαινολικά συστατικά της Κορινθιακής σταφίδας αλλά και της τυπικής τροφής που καταναλώνουν οι επίμυες. Η επιλογή της Κορινθιακής σταφίδας για προσδιορισμό των πολικών φαινολικών συστατικών της σε βιολογικό υλικό, στηρίζεται στο γεγονός ότι έχει βρεθεί από προηγούμενες μελέτες (Chiou et al., 2007; Kanellos et al., 2013; Yanni et al., 2015) ότι έχει πλούσιο πολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ακόμη, αποτελεί προϊόν που παράγεται σχεδόν αποκλειστικά στην νοτιοδυτική Ελλάδα (Πελοπόννησο), όμως καθίσταται ευρέως διαθέσιμο σε όλη τη χώρα αλλά και το εξωτερικό. Από την άλλη, η τροφή των επίμυων αποτελεί προϊόν φυτικής προέλευσης και επομένως περιέχει πολικά φαινολικά συστατικά, σε μικρότερη όμως περιεκτικότητα συγκριτικά με την Κορινθιακή σταφίδα. Συνεπώς, η διατροφή που καταναλώνουν (τυπική δίαιτα) δεν είναι πλήρως απαλλαγμένη από πολικά φαινολικά συστατικά. Στο γεγονός αυτό οφείλεται ο προσδιορισμός ορισμένων πολικών φαινολικών συστατικών στον ιππόκαμπο των επίμυων που δεν τους χορηγήθηκε Κορινθιακή σταφίδα. Παρόλα αυτά, η αύξηση στις συγκεντρώσεις των πολικών φαινολικών ενώσεων, που εντοπίστηκαν στον ιππόκαμπο της ομάδας

παρέμβασης, φαίνεται να σχετίζεται με την κατανάλωση της Κορινθιακής σταφίδας, η οποία διαθέτει πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο.

Τις τελευταίες δεκαετίες, ορισμένος αριθμός μελετών έχει μελετήσει, ως ένα βαθμό, την ιστική κατανομή των πολικών φαινολικών συστατικών στον εγκέφαλο. Στη μελέτη των Rangel-Ordóñez et al., (2010) ποντίκια κατανάλωσαν εκχύλισμα του φυτού *Gingo biloba* για 8 ημέρες σε δύο δόσεις: α) 100 mg/kg εκχυλίσματος και β) 600 mg/kg εκχυλίσματος. Η κερκετίνη, η ισοραμνετίνη καθώς και η καμπερόλη φάνηκαν να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ, στη συνέχεια, ανιχνεύτηκαν σε σημαντικές ποσότητες στον ιππόκαμπο και σε άλλα τμήματα του εγκεφάλου. Αντίστοιχα, στη μελέτη των Paulke et al., (2012) χορηγήθηκαν σε ποντίκια 12 mg/kg/d κερκετίνης ή, εναλλακτικά, 18 mg/kg/d ισοκερκετίνης σε χρονικό διάστημα 8 ημερών. Και οι δύο φαινολικές ενώσεις ανιχνεύτηκαν στην παρεγκεφαλίδα, ενώ η ισοραμνετίνη ανιχνεύτηκε, επίσης, στον μετωπιαίο λοβό και τον ιππόκαμπο.

Συνοψίζοντας, στη βιβλιογραφία οι περισσότερες μελέτες που διερευνούν την ιστοειδική κατανομή των πολικών φαινολικών ενώσεων ύστερα από την κατανάλωσή του, αφορούν στην χορήγηση εκχυλίσματος τροφίμου ή συμπληρώματος φαινολικών συστατικών. Για την καλύτερη αξιολόγηση της κατανομής των φυτοχημικών στα διάφορα βιολογικά υλικά ζωικών προτύπων μετά την κατανάλωση τροφίμων όπως είναι τα ξηρά φρούτα, απαιτούνται περισσότερες μελέτες παρέμβασης όπου θα χορηγείται το τρόφιμο ολόκληρο, με σκοπό την προσομοίωση οι πραγματικών συνθηκών θρέψης.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η περιοχή του ιππόκαμπου σχετίζεται άμεσα με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ. Η παρουσία φαινολικών συστατικών, που προέρχονται από τη διατροφή, στο συγκεκριμένο τμήμα του εγκεφάλου, σε επίπεδα ng/g ιστού, αποτελεί ισχυρή ένδειξη της πιθανής προστατευτικής τους δράσης έναντι των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της γενικότερης φθοράς του εγκεφάλου από το οξειδωτικό στρες. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περισσότερες μελέτες, με σκοπό τη διασαφήνιση των μηχανισμών μεταβολισμού και δράσης των φαινολικών συστατικών στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου με τη χρήση ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Alasalvar, C., Salvadó, J.-S., & Ros, E. (2020). Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. *Food Chemistry*, 314, 126192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126192>
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). 1—Overview of polyphenols and their properties. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 3–44). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Bento-Silva, A., Koistinen, V. M., Mena, P., Bronze, M. R., Hanhineva, K., Sahlstrøm, S., Kitryté, V., Moco, S., & Aura, A.-M. (2020). Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: Do we understand individual variability? *European Journal of Nutrition*, 59(4), 1275–1293. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01987-6>
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2005). Phenolic compounds in olive oil and olives, D. Boskou, G Blekas and M. Tsimidou. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3, 125–136.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2016). Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 21, 113–132. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034>
- Chiou, A., Karathanos, V. T., Mylona, A., Salta, F. N., Preventi, F., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *EFFoST 2005*

Annual Meeting: Innovations in Traditional Foods, 102(2), 516–522.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.009>

- Chiou, A., Panagopoulou, E. A., Gatzali, F., De Marchi, S., & Karathanos, V. T. (2014). Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). *Food Chemistry*, 146, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.062>
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., Tsoukalas, D., Margina, D., Dardiotis, E., Kouretas, D., & Fenga, C. (2017). Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.023>
- Del Bo', C., Bernardi, S., Marino, M., Porrini, M., Tucci, M., Guglielmetti, S., Cherubini, A., Carrieri, B., Kirkup, B., Kroon, P., Zamora-Ros, R., Liberona, N. H., Andres-Lacueva, C., & Riso, P. (2019). Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients*, 11(6), E1355. <https://doi.org/10.3390/nu11061355>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Deli, C. K., Poullos, A., Georgakouli, K., Papanikolaou, K., Papoutsis, A., Selemekou, M., Karathanos, V. T., Draganidis, D., Tsiokanos, A., Koutedakis, Y., Fatouros, I. G., & Jamurtas, A. Z. (2018). The effect of pre-exercise ingestion of corinthian currant on endurance performance and blood redox status. *Journal of Sports Sciences*, 36(19), 2172–2180. <https://doi.org/10.1080/02640414.2018.1442781>

- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- Fanarioti, E., Tsarouchi, M., Vasilakopoulou, P. B., Chiou, A., Karvelas, M., Karathanos, V. T., & Dermon, C. R. (2022). Brain polar phenol content, behavioural and neurochemical effects of Corinthian currant in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *Nutritional Neuroscience*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2080792>
- FoodData Central*. (n.d.-a). Retrieved July 16, 2022, from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?component=1107>
- FoodData Central*. (n.d.-b). Retrieved July 16, 2022, from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?component=1283>
- Galmés, S., Reynés, B., Palou, M., Palou-March, A., & Palou, A. (2021). Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Main Olive Tree Phenols and Polyphenols: A Literature Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(18), 5281–5296. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00737>
- Gómez-Juaristi, M., Martínez-López, S., Sarria, B., Bravo, L., & Mateos, R. (2018). Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. *Food Chemistry*, 240, 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.003>
- Guasch-Ferré, M., Bhupathiraju, S. N., & Hu, F. B. (2018). Use of Metabolomics in Improving Assessment of Dietary Intake. *Clinical Chemistry*, 64(1), 82–98. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.272344>
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*. Academic Press Ltd.

- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2017). Bioavailability of finger millet (*Eleusine coracana*) phenolic compounds in rat as influenced by co-administered piperine. *Food Bioscience*, 19, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.008>
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4), 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>
- Kanellos, P. T., Kaliora, A. C., Liaskos, C., Tentolouris, N. K., Perrea, D., & Karathanos, V. T. (2013). A study of glycemic response to Corinthian raisins in healthy subjects and in type 2 diabetes mellitus patients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 145–148.
- Karkalousos, P., Zoi, G., Kroupis, C., Papaioannou, A., Plageras, P., Spyropoulos, V., Tsotsou, G. E., Fountzoula, C., Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ. Ε., & Φούντζουλα, Χ. (2016). *Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα*. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/5388>
- Koche, D., Shirsat, R., & Kawale, M. (2018). AN OVERERVIEW OF MAJOR CLASSES OF PHYTOCHEMICALS: THEIR TYPES AND ROLE IN DISEASE PREVENTION. 9, 2016.
- Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.005>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1543–1580). https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Leitzmann, C. (2016). Characteristics and Health Benefits of Phytochemicals. *Complementary Medicine Research*, 23(2), 69–74. <https://doi.org/10.1159/000444063>

- Li, T., Hu, L., Zhang, M., Sun, J., Qiu, Y., Rui, J., & Yang, X. (2014). A sensitive UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of eleven bioactive components of Tong-Xie-Yao-Fang decoction in rat biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 944, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.015>
- Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- López de las Hazas, M.-C., Rubió, L., Kotronoulas, A., de la Torre, R., Solà, R., & Motilva, M.-J. (2015). Dose effect on the uptake and accumulation of hydroxytyrosol and its metabolites in target tissues in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7), 1395–1399. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500048>
- Luceri, C., Bigagli, E., Pitozzi, V., & Giovannelli, L. (2017). A nutrigenomics approach for the study of anti-aging interventions: Olive oil phenols and the modulation of gene and microRNA expression profiles in mouse brain. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1134-4>
- Majid, I., Nayik, G. A., & Nanda, V. (2015). Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1071022. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1071022>
- Miniati, E. (2007). Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 362.
- Mountaki, C., Dafnis, I., Panagopoulou, E. A., Vasilakopoulou, P. B., Karvelas, M., Chiou, A., Karathanos, V. T., & Chroni, A. (2021). Mechanistic insight into the capacity of natural polar phenolic compounds to abolish Alzheimer's disease-associated pathogenic effects of apoE4 forms. *Free Radical Biology and Medicine*, 171, 284–301. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.022>
- Nikolidaki, E. K., Chiou, A., Christea, M., Gkegka, A. P., Karvelas, M., & Karathanos, V. T. (2017). Sun dried Corinthian currant (*Vitis Vinifera* L., var. Apyrena) simple sugar profile and

macronutrient characterization. *Food Chemistry*, 221, 365–372.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.070>

Olmo-García, L., Monasterio, R. P., Bajoub, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2020). Analytical Strategies for Determining Polyphenols in Foods and Biological Samples. In *Dietary Polyphenols* (pp. 85–128). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch3>

Ötles, S., & Kartal, C. (2016). Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 15(1), 5–15.
<https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.1>

Panagopoulou, E. A., Chiou, A., Nikolidaki, E. K., Christea, M., & Karathanos, V. T. (2019). Corinthian raisins (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) antioxidant and sugar content as affected by the drying process: A 3-year study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 915–922. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9263>

Patra, A. K. (2012). An Overview of Antimicrobial Properties of Different Classes of Phytochemicals. In A. K. Patra (Ed.), *Dietary Phytochemicals and Microbes* (pp. 1–32). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_1

Paulke, A., Eckert, G. P., Schubert-Zsilavecz, M., & Wurglics, M. (2012). Isoquercitrin provides better bioavailability than quercetin: Comparison of quercetin metabolites in body tissue and brain sections after six days administration of isoquercitrin and quercetin. *Die Pharmazie*, 67(12), 991–996.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4959–4969.
<https://doi.org/10.1021/jf100128b>

Pinto, P., & Santos, C. N. (2017). Worldwide (poly) phenol intake: Assessment methods and identified gaps. *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1393–1408.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységou, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rangel-Ordóñez, L., Nöldner, M., Schubert-Zsilavecz, M., & Wurglics, M. (2010). Plasma Levels and Distribution of Flavonoids in Rat Brain after Single and Repeated Doses of Standardized Ginkgo biloba Extract EGb 761®. *Planta Medica*, 76(15), 1683–1690. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249962>
- Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531–2548. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1331200>
- Rodríguez, I., Llompart, M. P., & Cela, R. (2000). Solid-phase extraction of phenols. *Journal of Chromatography A*, 885(1), 291–304. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00116-3)
- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11–68. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4162>
- Shahidi, F., & Yeo, J.-D. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(9), E1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., Gat, Y., & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 40(4), 432–444. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813>
- Siegel, K. R. (2019). Insufficient Consumption of Fruits and Vegetables among Individuals 15 Years and Older in 28 Low- and Middle-Income Countries: What Can Be Done? *The Journal of Nutrition*, 149(7), 1105–1106. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz123>
- Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., & Adhikari, B. (2020). Managing obesity through natural polyphenols: A review. *Future Foods*, 1–2, 100002. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2020.100002>

- Theodoridis, G., Girousi, S., Zachariadis, G., Zotou, A. S., Samanidou, V., Θεοδοωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α. Σ., & Σαμανίδου, Β. (2016). *Βιοαναλυτική χημεία*. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/3667>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vasilakopoulou, P. B., Fanarioti, E., Tsarouchi, M., Kokotou, M. G., Dermon, C. R., Karathanos, V. T., & Chiou, A. (2022). Polar phenol detection in rat brain: Development and validation of a versatile UHPLC-MS method and application on the brain tissues of Corinthian currant (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) fed rats. *Food Chemistry*, 390, 133131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133131>
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C.-Y. O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & Function*, 5(2), 189–197. <https://doi.org/10.1039/c3fo60361j>
- Wang, Q., Qian, Y., Wang, Q., Yang, Y., Ji, S., Song, W., Qiao, X., Guo, D., Liang, H., & Ye, M. (2015). Metabolites identification of bioactive licorice compounds in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.013>
- Williamson, G., & Holst, B. (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: Are we heading in the right direction? *The British Journal of Nutrition*, 99 Suppl 3, S55-8. <https://doi.org/10.1017/S0007114508006867>
- Yahia, E. M. (2017). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2 Volumes. John Wiley & Sons.
- Yanni, A. E., Efthymiou, V., Lelovas, P., Agrogiannis, G., Kostomitsopoulos, N., & Karathanos, V. T. (2015). Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on

atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. *Food & Function*, 6(3), 963–971.
<https://doi.org/10.1039/C4FO01106F>

Zeng, X., Su, W., Zheng, Y., He, Y., He, Y., Rao, H., Peng, W., & Yao, H. (2019). Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Naringin in Aged Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00034>