



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Μελέτη Βιοπροσβασιμότητας Πολυφαινολών και Θρεπτικών Συστατικών σε
Φρούτα και Χυμούς μέσω Εξωσωματικής Προσομοίωσης της Ανθρώπινης
Πέψης »**

ΤΖΕΜΠΕΤΖΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ιωάννινα, 2025



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας
Τομέας Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας
451 10 Ιωάννινα

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ κ. ΙΩΑΝΝΑΣ ΤΖΕΜΠΕΤΖΗ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΝΟΜΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων»,
ΤΟΥ Π.Μ.Σ. ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με την απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Συνεδρίαση 1150/10.10.2025) για την κρίση της Μεταπτυχιακής Διατριβής της **κ. Ιωάννας Τζεμπετζή**, απόφοιτο του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, συνήλθε σε συνεδρίαση την **Παρασκευή 12 Δεκεμβρίου 2025 και ώρα 13:00**, όπου παρακολούθησε τη δημόσια υποστήριξη της Μεταπτυχιακής Διατριβής με τίτλο: **“Μελέτη Βιοπροσβασιμότητας Πολυφαινόλων και Θρεπτικών Συστατικών σε Φρούτα και Χυμούς μεσω Εξωσωματικής Προσομοίωσης της Ανθρώπινης Πεψης”**.

Πριν την έναρξη της συνεδρίας ο πρόεδρος της επιτροπής ενημέρωσε τα μέλη για την διαδικασία με βάση τις κείμενες διατάξεις. Η κ. Ιωάννα Τζεμπετζή ανέπτυξε για περίπου τριάντα λεπτά της ώρας τα κυριότερα αποτελέσματα της εργασίας της, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στη συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής.

Στη συνέχεια η κ. Ιωάννα Τζεμπετζή μαζί με το ακροατήριο αποχώρησαν από την αίθουσα, ενώ η τριμελής εξεταστική επιτροπή μετά από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση έκρινε ότι η Μεταπτυχιακή Διατριβή είναι πρωτότυπη και συμβάλλει στην εξέλιξη της επιστήμης και έτσι αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει στη Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων την έγκριση της απονομής του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδικεύσης στην κ. Ιωάννα Τζεμπετζή με βαθμό **"ΑΡΙΣΤΑ-Δέκα (10)"**.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ο Επιβλέπων Καθηγητής
DIMOSTHENIS GKIOKAS
12.12.2025 13:50 UTC

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής
ATHANASIOS VLESSIDIS
12.12.2025 13:56 UTC

Δημοσθένης Γκιώκας
Καθηγητής

Αθανάσιος Βλεσσίδης
Καθηγητής

Παντελέμιον Τάκης
Επίκουρος Καθηγητής

Ψηφιακή Βεβαίωση Εγγράφου

Μπορείτε να ελέγξετε την ισχύ του εγγράφου
σκανάροντας το QR code ή εισάγοντας τον κωδικό
στο docs.gov.gr/validate



Επιβεβαιώνεται το γνήσιο. Υπουργείο
Ψηφιακής Διακυβέρνησης / Verified by the Ministry
of Digital Governance, Hellenic Republic
20251212160148+02'00"

Κωδικός εγγράφου: **onjCp3mT8eY_tdfahuyiJg**

: 1/1

Υπογραφή:
ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΟΝ ΤΑΚΗΣ
Πατρώνυμο: ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΑΦΜ: 110994480
Ημ. Υπογραφής: 12/12/2025 16:01:43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αυτή η μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δημοσθένη Γκιώκα. Με την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να εκφράσω ένα ειλικρινές ευχαριστώ προς όλους όσοι συνέβαλαν με τον δικό τους τρόπο στην επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την πολύτιμη καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Παντελεήμων Τάκη, για την αποδοχή της συμμετοχής τους στην επιτροπή, για τις πολύτιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον κ. Παντελεήμων Τάκη καθώς εκτός από την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, συνέβαλε σημαντικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας με τις πολύτιμες συμβουλές του και τις αναλύσεις NMR που διεξήγαγε.

Ευχαριστώ επίσης, θερμά τους συμφοιτητές και συναδέλφους με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ αυτά τα δύο χρόνια και ειδικότερα την μεταδιδάκτορα Τατιάνα Χολέβα και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Κωστοπούλου. Η θετική τους διάθεση, καθώς και το ευχάριστο και ομαδικό κλίμα συνέβαλαν τόσο στην πορεία της έρευνας μου όσο και στην καθημερινή μου παρουσία στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους φίλους μου, που στάθηκαν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα, αποτελώντας πηγή δύναμης στις πιο απαιτητικές στιγμές ο καθένας με τον δικό του μοναδικό τρόπο.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την πιο βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς την οικογένειά μου, για την αμέριστη αγάπη, την υπομονή και την αδιάκοπη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η πίστη τους στις δυνατότητές μου και η ηθική τους υποστήριξη αποτέλεσαν το πιο σταθερό σημείο αναφοράς σε όλη αυτή τη διαδρομή.

Η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής αποτελεί όχι μόνο επιστημονικό, αλλά και προσωπικό επίτευγμα, το οποίο δε θα ήταν δυνατό χωρίς όλους εσάς. Σας ευχαριστώ από καρδιάς.

Ιωάννα Α. Τζεμπετζή

Ιωάννινα , Νοέμβριος 2025

*Στους γονείς μου,
με αγάπη και ευγνωμοσύνη...*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκτίμηση της βιοπροσβασιμότητας των αντιοξειδωτικών στον ανθρώπινο οργανισμό απασχολεί ολοένα και περισσότερα τα τελευταία χρόνια επιστήμονες και καταναλωτές, λόγω των θετικών επιδράσεων των αντιοξειδωτικών στην υγεία. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μέθοδοι, με τις τελευταίες να προτιμώνται όχι μόνο λόγω ευκολίας και χαμηλού κόστους αλλά κυρίως λόγω συμμόρφωσης στην επιστημονική ηθική αφού δεν απαιτούν την χρήση πειραματόζωων. Στην παρούσα επιστημονική εργασία χρησιμοποιήθηκε η εξωσωματική μέθοδος UBM για τον προσδιορισμό της απελευθέρωσης αντιοξειδωτικών από χυμούς και φρούτα κατά την γαστρική και γαστρεντερική πέψη. Πιο συγκεκριμένα, από την UBM προέκυψαν γαστρικά και γαστρεντερικά εκχυλίσματα, στα οποία προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα φαινολικών και φλαβονοειδών και η αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, TFC και Cuprac αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίστηκαν με τα αντίστοιχα στα αρχικά δείγματα προ πέψης και έδειξαν ότι στα φρούτα και στο χυμό μπανάνας τόσο τα φαινολικά όσο και η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνονται μετά την πέψη με μεγαλύτερη αύξηση στην εντερική φάση, ενώ τα φλαβονοειδή είναι ασταθή μετά την πέψη. Όσον αφορά τους υπόλοιπους χυμούς, παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την πέψη σε σύγκριση με τα αρχικά δείγματα. Ωστόσο, τα φαινολικά μειώθηκαν ακόμα περισσότερο στην εντερική φάση, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε αρχικά στην γαστρική φάση και αυξήθηκε ξανά στην εντερική. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώθηκαν μετά από μη στοχευμένη ανάλυση NMR, μέσω της οποίας αναδείχθηκαν επίσης αλλαγές στην σύσταση των μεταβολιτών και ειδικότερα των σακχάρων, του κιτρικού και μηλονικού οξέος κατά την πέψη.

ABSTRACT

The assessment of antioxidant bioaccessibility in the human body has become an increasingly important focus for both scientists and consumers in recent years, due to the beneficial effects of antioxidants on health. For this purpose, both *in vivo* and *in vitro* methods have been developed, with the latter being preferred not only for their simplicity and low cost but chiefly for their compliance with scientific ethics, since they do not require the use of experimental animals. In the present study, the *in vitro* UBM method was employed to determine the release of antioxidants from juices and fruits during gastric and gastrointestinal digestion. Specifically, gastric and gastrointestinal extracts were obtained through UBM, in which the total phenolic and flavonoid contents as well as the antioxidant capacity were determined using the Folin–Ciocalteu, TFC, and CUPRAC methods, respectively. These results were compared with those of the initial, pre-digestion samples and revealed that in fruits and banana juice both phenolic compounds and antioxidant capacity increased following digestion, with a greater rise observed in the intestinal phase, whereas flavonoids appeared to be unstable after digestion. Regarding the other juices, a decrease in phenolic content and antioxidant capacity was observed post-digestion compared with the initial samples. However, phenolics were further reduced during the intestinal phase, while antioxidant capacity initially decreased in the gastric phase and subsequently increased in the intestinal phase. These findings were corroborated through untargeted NMR analysis, which also indicated compositional changes in metabolites, particularly in sugars, citric acid, and malic acid during digestion.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	9
1.1. 1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ-ROS-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	9
1.1.2. ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	13
1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΗΓΕΣ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	14
1.2.1. ΦΥΣΙΚΑ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	15
1.2.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	19
1.3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	20
1.4. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	23
1.4.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΤΟΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (HAT)	23
1.4.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ (SET ή ET).....	24
1.5. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ	28
1.5.1. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ..	28
1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	31
1.6.1. IN VIVO ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
1.6.2. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ	33
1.6.2.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ (IN VITRO DIGESTION MODELS-CELL FREE)	33
1.6.2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
1.7. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ.....	43
1.7.1. pH	43
1.7.2. ΧΡΟΝΟΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ (RESIDENCE TIME).....	44
1.7.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	45
1.7.4. ΜΕΓΕΘΟΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	45
1.8. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	46
1.8.1. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	46
1.8.2. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ.....	47
1.8.3. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ.....	48
1.9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ NMR ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	52
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	55
2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	55
2.2.2. IN VITRO ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ	56
2.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ (ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ FOLIN-CIOCALTEU).....	56
2.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ (ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ CUPRAC).....	57
2.2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	57
2.2.6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ NMR-ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ¹ H NMR	58
2.2.7. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ- ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ/ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	58
2.2.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	59
2.2.9. ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	59
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60
2.3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ, ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΡΟΥΤΩΝ ΚΑΙ ΧΥΜΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ.....	60
2.3.2. NMR ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ουσίες με καθοριστικό ρόλο τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και στα συστήματα τροφίμων. Συγκεκριμένα, στον οργανισμό παράγονται για να τον προστατεύσουν από τις συνέπειες της δράσης συγκεκριμένων μορίων ή ατόμων όπως οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS-Reactive Oxygen Species), οι οποίες επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες λόγω οξειδωτικής καταπόνησης. Αντίστοιχα, στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται για να τα προστατεύσουν από τις οξειδώσεις άλλων συστατικών.^{1,2} Επομένως, σε έναν γενικό ορισμό τα αντιοξειδωτικά αναφέρονται ως μόρια που είναι ικανά να καθυστερούν ή και να αναστέλλουν την οξείδωση άλλων μορίων-στόχων.^{2,3}

Ιστορικά ο όρος «αντιοξειδωτικά», εντοπίζεται για πρώτη φορά στα τέλη του 19^{ου} με τις αρχές του 20^{ου} αιώνα καθώς την περίοδο εκείνη πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες που αφορούσαν την χρήση των αντιοξειδωτικών σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες, όπως η πρόληψη της διάβρωσης των μετάλλων και ο βουλκανισμός του καουτσούκ.¹ Στην πορεία και όσον αφορά τον βιολογικό ρόλο των αντιοξειδωτικών, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην πρόληψη της τάγγισης των ακόρεστων λιπών, η οποία είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης τους.^{1,3} Τελικά, η πλήρης κατανόηση του ρόλου των αντιοξειδωτικών στους οργανισμούς πραγματοποιήθηκε αργότερα με την αναγνώριση των βιταμινών A, C, και E ως αντιοξειδωτικά και ειδικότερα με τις έρευνες που σχετίζονταν με τον ρόλο της βιταμίνης E στον μηχανισμό υπεροξειδωσίας των λιπών.^{1,3}

1.1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ-ROS-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες και τα ROS είναι δυο χημικά είδη που μοιάζουν αρκετά έχοντας αμφότερα την ικανότητα να προκαλούν οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, συχνά συγχέονται λανθασμένα. Ακολούθως επεξηγείται τόσο η λειτουργία τους, όσο και οι συνέπειες που προκαλούν στον οργανισμό όταν υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Ως ελεύθερες ρίζες μπορούν να οριστούν οποιαδήποτε μοριακά είδη περιέχουν ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια σε ένα ατομικό τροχιακό και είναι ικανά να υπάρχουν ανεξάρτητα.^{4,5} Λόγω αυτών των μη ζευγαρωμένων ηλεκτρονίων, οι

ελεύθερες ρίζες εμφανίζουν εξαιρετική αστάθεια και υψηλή αντιδραστικότητα ειδικά με διάφορα οργανικά υποστρώματα, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA.^{1,5,6} Πιο συγκεκριμένα μπορούν είτε να δωρίσουν ένα ηλεκτρόνιο, είτε να το δεχτούν από άλλα μόρια δρώντας ως οξειδωτικό ή αναγωγικό μέσο αντίστοιχα. Αποτέλεσμα αυτής της έντονης ικανότητας των ελεύθερων ριζών να αντιδρούν είναι ότι οι πιο πολλές από αυτές έχουν πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής, ο οποίος δεν ξεπερνά τα μερικά δευτερόλεπτα.^{3,4} Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι παράγωγα οξυγόνου, αζώτου ή θείου· ωστόσο, οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες λόγω των σοβαρών επιπτώσεων τους στην υγεία είναι τα παράγωγα οξυγόνου (εμφανίζονται στην βιβλιογραφία και σαν ROS) με κυριότερα τη ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) και τη ρίζα υπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$).²⁻⁴

Τα ROS που αναφέρονται παραπάνω είναι ένας συμπεριληπτικός όρος, ο οποίος αναφέρεται σε όλες τις αντιδραστικές μορφές οξυγόνου, είτε αυτές είναι ελεύθερες ρίζες, είτε είναι μη ριζικά αντιδραστικά παράγωγα. Τα μη ριζικά είδη είναι πιο σταθερές ενώσεις από τις ελεύθερες ρίζες, αλλά η αντιδραστικότητά τους είναι αρκετά πιο χαμηλή. Μερικές από τις πιο γνωστές ROS, ρίζες και μη, που εμφανίζονται είναι οι εξής: ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), ρίζα υπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$), υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και υποχλωριώδες οξύ (HOCl).^{2,6,7}

Οι ελεύθερες ρίζες και τα υπόλοιπα ROS στα οποία εκτίθενται ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να παράγονται είτε φυσιολογικά μέσα στον ίδιο τον οργανισμό ως αποτέλεσμα μεταβολικών διεργασιών (ενδογενείς πηγές), είτε από εξωτερικούς παράγοντες (εξωγενείς πηγές).^{1,5} Πιο συγκεκριμένα, ο σχηματισμός των ROS μέσα στον οργανισμό μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μέσω ενζυμικών, όσο και μη ενζυμικών αντιδράσεων.⁶ Οι ενζυμικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν αντιδράσεις που σχετίζονται με την αναπνευστική αλυσίδα, την σύνθεση προσταγλανδινών, την φαγοκυττάρωση και το σύστημα κυτοχρώματος P-450, ενώ οι μη ενζυμικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν αντιδράσεις οξυγόνου με οργανικές ενώσεις καθώς και αντιδράσεις υποκινούμενες από ιονίζουσα ακτινοβολία.^{3,5,6} Μη ενζυμική διεργασία που οδηγεί σε παραγωγή ROS μπορεί να πραγματοποιηθεί και στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση.⁶ Επίσης, στις ενδογενείς πηγές ROS μπορούν να συμπεριληφθούν το στρες, η φλεγμονή, ο καρκίνος καθώς και η γήρανση.⁶ Στις εξωγενείς πηγές σχηματισμού ROS συγκαταλέγονται τα εξής: κάπνισμα, αλκοόλ, ναρκωτικά, έκθεση σε ακτίνες X, όζον, ορισμένα φάρμακα, ατμοσφαιρική και υδάτινη ρύπανση.^{3,5,6,8}

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ROS είναι ο διπλός τους ρόλος, καθώς μπορεί να είναι τόσο επιβλαβή, όσο και ωφέλιμα ανάλογα με τις συνθήκες.⁸ Ειδικότερα, όταν οι ελεύθερες ρίζες και τα οξειδωτικά βρίσκονται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις, είναι ευεργετικά για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς είναι απαραίτητα για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, την διαδικασία πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των κυττάρων και κυρίως για την εξάλειψη μικροοργανισμών ως μέρος του αμυντικού μηχανισμού του σώματος έναντι ασθενειών.^{3,6,8} Πιο αναλυτικά, κάποιες από τις ευεργετικές ιδιότητες των οξειδωτικών στην άμυνα του οργανισμού είναι οι εξής:

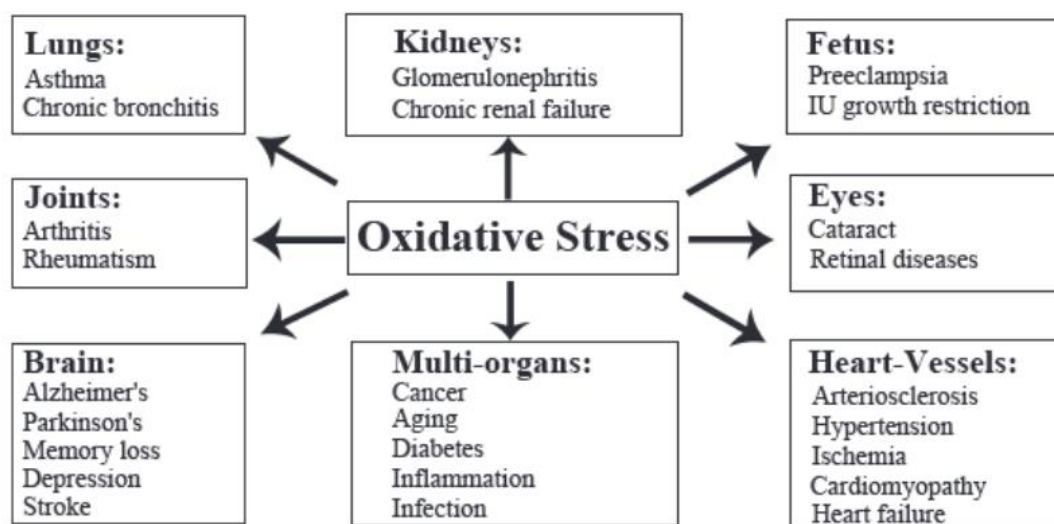
- Τα φαγοκύτταρα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες για να καταστρέψουν τα εισβάλλοντα παθογόνα μικρόβια.
- Οι ελεύθερες ρίζες καταπολεμούν τις μολύνσεις ελέγχοντας την ροή του αίματος στις αρτηρίες.
- Ορισμένες ελεύθερες ρίζες έχουν την ιδιότητα να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα. Γι' αυτό και κάποια αντικαρκινικά φάρμακα δρουν μέσω της αύξησης των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό.^{6,8}

Ωστόσο, σε αντίθεση με τις παραπάνω επωφελείς ιδιότητες των οξειδωτικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε περιπτώσεις που αυτά βρίσκονται σε περίσσεια, τότε μετατρέπονται σε επιβλαβή και προκαλείται μια κατάσταση η οποία ονομάζεται οξειδωτικό στρες και έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την εκδήλωση πολλών ασθενειών.

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Τα ROS σε μικρές συγκεντρώσεις υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό και δρουν ευεργετικά. Γι' αυτό, αποτελεί απαραίτητη υπόθεση για την καλή υγεία του οργανισμού η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και στα αντιοξειδωτικά που αναλαμβάνουν την εξουδετέρωσή τους.^{3,6,7} Οποιαδήποτε ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της εξουδετέρωσης των ROS, οδηγεί τελικά στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες, μιας κατάστασης επικίνδυνης αύξησης των οξειδωτικών ενώσεων, σε σημείο που απειλούνται οι κυτταρικές δομές.^{3,6,7} Οι λόγοι για τους οποίους προκαλείται οξειδωτικό στρες στα βιολογικά συστήματα μπορεί να είναι η υπερπαραγωγή ROS ή /και η ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών. Η ανεπάρκεια αυτή μπορεί να οφείλεται και σε απενεργοποίηση των ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση.^{3,5}

Το οξειδωτικό στρες βλάπτει τον οργανισμό, καθώς καταστρέφει πολύ σημαντικά βιομόρια όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA.³ Πιο συγκεκριμένα, κάποιες ρίζες μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων μπορούν να προκαλέσουν υπεροξείδωση των λιπιδίων καταστρέφοντας τελικά τις κυτταρικές μεμβράνες. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με ασθένειες όπως, ο διαβήτης, οι καρδιακές παθήσεις και οι νευρογενετικές ασθένειες.^{6,7} Η οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες περιλαμβάνει την τροποποίηση της πεπτιδικής αλυσίδας και κατ' επέκταση την απώλεια του βιολογικού τους ρόλου. Ο καταρράκτης και κυρίως η γήρανση έχουν συνδεθεί άμεσα με τις οξειδωμένες πρωτεΐνες. Εν συνεχεία, η οξειδωτική βλάβη στο DNA οδηγεί στον σχηματισμό οξειδωτικών αλλοιώσεων, οι οποίες με την σειρά τους ευθύνονται για μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί στενά με την εμφάνιση καρκίνου.^{6,7} Άλλες ασθένειες που είναι δυνατόν να εμφανιστούν ως αποτέλεσμα των οξειδωτικών βλαβών στα κυτταρικά βιομόρια του οργανισμού είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος του Αλτσχαιμερ και νόσος του Πάρκινσον, αυτισμός, αθηροσκλήρωση), οι φλεγμονώδεις ασθένειες (αρθρίτιδα, λύκος) και οι ισχαιμικές ασθένειες (καρδιακές παθήσεις, εγκεφαλικό επεισόδιο).^{1,3} Μερικές από τις πιο γνωστές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία αναφέρονται στο Σχήμα 1 :



Σχήμα 1: Ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες⁶

1.1.2. ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται λόγω της περίσσειας ελευθέρων ριζών, είναι ιδιαίτερα επιβλαβές για τους οργανισμούς, καθώς έχει διαπιστωθεί πως σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών ασθενειών. Επομένως, ο οργανισμός έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς προκειμένου να αντιμετωπίσει την αρνητική επίδραση των ελεύθερων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί αυτοί θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και ο στόχος τους είναι η αντιστάθμιση του οξειδωτικού στρες και η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και ελευθέρων ριζών, όχι η πλήρης καταστροφή των τελευταίων.³ Τα αντιοξειδωτικά που επιστρατεύονται για τον παραπάνω σκοπό μπορεί να παράγονται ενδογενώς στον οργανισμό ή να προέρχονται από εξωτερικές πηγές και ο κύριος τρόπος δράσης τους σχετίζεται με την απομάκρυνση ή την σύζευξη των ασύζευκτων (unpair) ηλεκτρονίων τους.^{3,9} Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθούν πιο αναλυτικά κάποιοι από τους πιο βασικούς μηχανισμούς:

➤ Preventive mechanism – secondary antioxidants

Αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Σε αυτόν τον μηχανισμό τα αντιοξειδωτικά δρουν έμμεσα, σχηματίζοντας χηλικό σύμπλοκο με μεταβατικά μέταλλα ή δεσμεύοντας ρίζες ή με την αποσύνθεσή τους σε μη ριζικά προϊόντα. Άλλοι τρόποι δράσης των δευτεροταγών αντιοξειδωτικών είναι η αναστολή των οξειδωσών NADPH και ξανθίνης.^{1,10}

Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά → SOD(δισμουτάση υπεροξειδίου του υδρογόνου) , CAT (καταλάση)¹⁰

➤ Chain breaking mechanism – primary antioxidants

Όπως γίνεται αντιληπτό και από το όνομα του, είναι ένα μηχανισμός διάσπασης της αλυσίδας και κατ' επέκταση της αναστολής των αντιδράσεων οξείδωσης. Σε αυτή την κατηγορία τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά δεσμεύουν ROS με σκοπό να εμποδίσουν είτε την έναρξη της αλυσίδας, είτε την διάδοσή της. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι υδρόφιλα ή λιπόφιλα.^{1,3,10}

Υδρόφιλα πρωτογενή αντιοξειδωτικά → Βιταμίνη C, ουρικό οξύ , αλβουμίνη

Λιπόφιλα πρωτογενή αντιοξειδωτικά → Βιταμίνη E, ουμπικινόλη¹

➤ Συνεργιστικός μηχανισμός

Δύο αντιοξειδωτικά συνεργάζονται προκειμένου να συμπληρώσει το ένα την δράση του άλλου (ίσως συνδυασμός πρωτοταγών και δευτεροταγών αντιοξειδωτικών).¹⁰

➤ Repair system- μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Περιλαμβάνει ένζυμα, ο ρόλος των οποίων είναι η επιδιόρθωση ή η αντικατάσταση των βιομορίων που έχουν υποστεί βλάβες λόγω του οξειδωτικού στρες, όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν αυτή την λειτουργία είναι τα ένζυμα επιδιόρθωσης DNA όπως πολυμεράσες και τα πρωτεολυτικά ένζυμα όπως πρωτεάσες, οι πεπτιδάσες και οι πρωτεϊνάσες.^{1,8,11}

Οι παραπάνω μηχανισμοί αναδεικνύουν την σημασία και τα οφέλη των αντιοξειδωτικών στους ζωντανούς οργανισμούς ως άμυνα σε διάφορες ασθένειες. Ωστόσο, η χρήση των αντιοξειδωτικών δεν περιορίζεται μόνο στους οργανισμούς, αλλά επεκτείνεται και στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων ως μέσα πρόληψης της τάγγισης των τροφίμων λόγω οξείδωσης.⁷

Όσον αφορά την δράση των αντιοξειδωτικών, έχει παρατηρηθεί διαφορά στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, δηλαδή στην ικανότητα τους να δεσμεύουν ρίζες, ανάλογα με τον αριθμό των δραστικών ομάδων όπως το OH καθώς και την θέση αυτών των ομάδων, όρθο-, πάρα- ή μέτα-, με την όρθο θέση να είναι η πιο δραστική και τη μέτα θέση η λιγότερο δραστική.³

1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΗΓΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η άμυνα του οργανισμού έναντι στις αρνητικές επιπτώσεις της δράσης των ελευθέρων ριζών βασίζεται σε ένα σύνολο αντιοξειδωτικών συστημάτων που περιλαμβάνουν τόσο ένζυμα, όσο και άλλες μη ενζυμικές ενώσεις. Τα αντιοξειδωτικά αυτά είτε παράγονται μέσα στον οργανισμό ως μια μορφή άμυνας, είτε εισέρχονται σε αυτόν μέσω της διατροφής και συμπληρωμάτων, είτε παρασκευάζονται εργαστηριακά και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων και καλλυντικών.^{1,3} Επομένως η ταξινόμηση τους ανάλογα με την προέλευση και τον τρόπο δράσης τους κρίνεται αναγκαία για την καλύτερη κατανόηση τους.

Σε πρώτη φάση, τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους διακρίνονται σε φυσικά και συνθετικά.

1.2.1. ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται αντιοξειδωτικά που παράγονται φυσιολογικά μέσα στον οργανισμό (ενδογενή αντιοξειδωτικά), αλλά και αντιοξειδωτικά φυσικής προέλευσης, τα οποία εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της διατροφής (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Όλα τα φυσικά αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν διακρίνονται με την σειρά τους σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι ενδογενή, ενώ τα μη ενζυμικά μπορεί να είναι και ενδογενή και εξωγενή, με τα δεύτερα να είναι πιο διαδεδομένα.^{12,13}

Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Τα ένζυμα αυτά αποτελούν τους ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού και λειτουργούν καταλύοντας αντιδράσεις εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και των ROS με σκοπό την προστασία των κυττάρων.⁷ Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι τα παρακάτω:

Υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs) → Οι SODs είναι μια κατηγορία στενά συνδεδεμένων ενζύμων τα οποία καταλύουν την αντίδραση διάσπασης της ρίζας του υπεροξειδίου ($O_2 \cdot^-$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οξυγόνο. Τα SODs είναι μεταλλοένζυμα, επομένως χρειάζονται ένα μέταλλο ως συμπράγοντα για να δράσουν. Ανάλογα με το είδος του μεταλλικού συμπράγοντα αλλάζει και η μορφή του ενζύμου. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις μορφές SOD, η SOD₁ που είναι διμερής και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και οι SOD₂ και SOD₃ που είναι τετραμερείς και εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και εκτός κυττάρου (εξωκυτταρική) αντίστοιχα.^{1,6,11}

Καταλάση (CAT) → Η καταλάση είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο στην ουσία ολοκληρώνει την διαδικασία αποτοξίνωσης που ξεκινάει η SOD. Το ένζυμο αυτό επομένως, αναλαμβάνει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που δημιουργείται μέσω της SOD σε νερό και οξυγόνο.^{6,11} Η καταλάση χρησιμοποιεί επίσης μεταλλικούς συμπράγοντες όπως η SOD και ειδικότερα σίδηρο ή μαγγάνιο.¹¹

Εμφανίζεται σε όλα τα όργανα των ζωντανών οργανισμών με μεγαλύτερη συγκέντρωση να εντοπίζεται στο ήπαρ.¹

Γλουταθειονική υπεροξειδάση (GPx) → Είναι ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα το σελήνιο. Ο ρόλος του είναι να διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό, αλλά και τα υπεροξείδια των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους, γεγονός που το καθιστά απαραίτητο καθώς αποτρέπει την υπεροξειδωση των λιπών και κατ' επέκταση προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Η δράση του εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και στον άνθρωπο εμφανίζεται τουλάχιστον με οχτώ μορφές GPx (GPx1-GPx8), με την πιο άφθονη να είναι η GPx1, η οποία υπάρχει σε όλα τα κύτταρα.¹¹

Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αυτής της κατηγορίας θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σε μεταβολικά και θρεπτικά αντιοξειδωτικά, κατηγοριοποίηση που συνδέεται άμεσα με την προέλευσή τους. Πιο συγκεκριμένα, ως μεταβολικά χαρακτηρίζονται τα αντιοξειδωτικά που παράγονται ενδογενώς κατά την διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού στον οργανισμό, ενώ θρεπτικά χαρακτηρίζονται οι εξωγενείς ενώσεις, δηλαδή εκείνες που δεν μπορούν να παραχθούν μέσα στο σώμα και εισέρχονται μέσω της τροφής ή συμπληρωμάτων.^{2,3,6}

➤ Ενδογενή- μεταβολικά αντιοξειδωτικά

Ουρικό οξύ (UA) → Είναι ένα υδρόφιλο αντιοξειδωτικό, χαμηλού μοριακού βάρους το οποίο παράγεται κατά τον μεταβολισμό των πουρινών και είναι υπεύθυνο για τα 2/3 της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.^{1,7,14} Αποτελεί έναν ικανό δεσμευτή ριζών, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι συμβάλλει επίσης στην προστασία αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η SOD₁ και η SOD₃.¹⁴

Γλουταθειόνη (GSH) → Είναι ένα τριπεπτίδιο χαμηλού μοριακού βάρους, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμινικό οξύ. Η GSH υπάρχει στον οργανισμό σε πολλές μορφές, ωστόσο η κύρια μορφή της είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη GSH και σε μικρή ποσότητα εμφανίζεται και στην πλήρως οξειδωμένη της κατάσταση GSSG. Γλουταθειόνη παράγεται σε όλα τα κύτταρα

αλλά αυξημένη σύνθεση παρατηρείται στα κύτταρα του ήπατος. Η GSH σαν αντιοξειδωτικό έχει τους παρακάτω ρόλους: δρα ως δεσμευτής ριζών, χρησιμεύει σαν συμπαράγοντας σε κάποια ένζυμα όπως η GPx, επιδιορθώνει κατεστραμμένα κύτταρα που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη και τέλος συμβάλει στη αναγέννηση άλλων μικρότερων αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E .^{7,14}

Μελατονίνη (MEL) → Ταξινομείται σαν ινδόλη και είναι μια ένωση χαμηλού μοριακού βάρους.¹⁴ Αποτελεί μια ορμόνη που απαντάται στην φύση κυρίως στα ζώα αλλά και σε άλλους οργανισμούς όπως τα φύκια.¹ Οι βασικότερες λειτουργίες της μελατονίνης αφορούν την μείωση του οξειδωτικού στρες, ως αποτέλεσμα της δέσμευσης ριζών μέσω της ρύθμισης της δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων και της διέγερσης άλλων ενδογενών αντιοξειδωτικών.¹⁴ Ωστόσο, η μελατονίνη έχει το εξής ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ' δεν υφίσταται οξειδοαναγωγικό κύκλο. Επομένως, όταν οξειδωθεί δεν μπορεί να επιστρέψει στην προηγούμενη κατάσταση της, λόγω των πολύ σταθερών προϊόντων που σχηματίζει. Αυτό την καθιστά ως ένα «τελικό-αυτοκτονικό» αντιοξειδωτικό, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία.¹

➤ Εξωγενή-θρεπτικά αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι απαραίτητα ειδικά όταν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά που επιστρατεύονται πρώτα από τον οργανισμό δεν είναι αρκετά για να τον προστατεύσουν από τις ελεύθερες ρίζες.³ Περιλαμβάνουν ενώσεις που προέρχονται τόσο από την καθημερινή διατροφή, όπως τα λαχανικά, όσο και από βοτανικές πηγές που δεν αποτελούν ωστόσο μέρος της καθημερινής διατροφής, όπως τα άγρια βότανα.¹² Τα βασικότερα αντιοξειδωτικά που απαρτίζουν αυτή την κατηγορία είναι οι βιταμίνες -με κυριότερες τις βιταμίνες C και E-, κάποια ιχνοστοιχεία - όπως το σελήνιο και το μαγγάνιο-, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες. Πιο αναλυτικά:

Βιταμίνες → Οι βιταμίνες είναι οργανικές ενώσεις που είναι απαραίτητες για τον οργανισμό σε μικρές ποσότητες -γι' αυτό ονομάζονται αλλιώς μικροθρεπτικά συστατικά- ωστόσο, ο ίδιος δεν μπορεί να τις συνθέσει, οπότε παρέχονται μέσω της τροφής. Οι περισσότερες βιταμίνες δεν συντίθεται στον οργανισμό, και ακόμα και αν υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις όπως η βιταμίνη D, η ποσότητα δεν είναι αρκετή

για να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού.¹³ Οι πιο γνωστές βιταμίνες γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι οι βιταμίνες C και E.

Η βιταμίνη C, γνωστή και ως ασκορβικό οξύ, είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που λειτουργεί σαν δότης ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση σαν αναγωγικός παράγοντας, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Η βιταμίνη αυτή μπορεί να λειτουργήσει επίσης και σαν συμπαράγοντας άλλων ενζύμων.^{1,7,13} Τέλος, η δράση της σχετίζεται άμεσα με την εξάλειψη εκφυλιστικών ασθενειών και καρκίνου και εντοπίζεται κυρίως στα εσπεριδοειδή με πιο γνωστή πηγή τα πορτοκάλια, αλλά και σε άλλα φρούτα όπως μύρτιλλα και φράουλες, σε λαχανικά όπως το σπανάκι καθώς και σε διάφορους ξηρούς καρπούς.^{2,7,12,13}

Η βιταμίνη E είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό και αποτελεί μια ομάδα μεθυλιωμένων φαινολικών ενώσεων γνωστές ως τοκοφερόλες με την α-τοκοφερόλη να είναι η βασικότερη μορφή της.^{7,13} Η α-τοκοφερόλη προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες καθώς εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες αποτρέποντας έτσι την οξείδωση των λιπιδίων εντός των μεμβρανών.^{6,7} Έχει βρεθεί ότι η σχετίζεται με την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου και ορισμένων καρδιαγγειακών παθήσεων και εντοπίζεται κυρίως στα φυτικά έλαια, τα δημητριακά και τους ξηρούς καρπούς.⁶

Πολυφαινόλες → Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία εξωγενών αντιοξειδωτικών που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και ο ρόλος τους είναι η παρεμπόδιση οξείδωσης των λιπιδίων. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται κυρίως στα φυτά και ευθύνονται σε μεγάλο ποσοστό για την γεύση, το χρώμα και την υφή τους.^{2,12} (Βλ. ενότητα 1.3.)

Καροτενοειδή → Τα καροτενοειδή είναι ενώσεις που λειτουργούν σαν φυσικές χρωστικές σε πολλά φρούτα και λαχανικά και η αντιοξειδωτική τους δράση περιλαμβάνει την απομάκρυνση ριζών όπως οι ρίζες οξυγόνου και υπεροξυλίου. Συμβάλλουν στην προστασία κατά του καρκίνου και καρδιαγγειακών νοσημάτων.⁷ Τα πιο σημαντικά καροτενοειδή είναι το β-καροτένιο που θεωρείται προβιταμίνη γιατί μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A και το λυκοπένιο, το οποίο δεν μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A σε αντίθεση με το β-καροτένιο και η κύρια πηγή του είναι οι τομάτες όπου ευθύνεται για το κόκκινο χρώμα τους.^{6,13}

Ιχνοστοιχεία → Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα αντιοξειδωτικά μέταλλα δρουν κατά βάση σαν συμπράγοντες αντιοξειδωτικών ενζύμων (βλ. SOD, CAT, GPx), επηρεάζοντας έτσι την ενζυμική τους δραστηριότητα.¹²

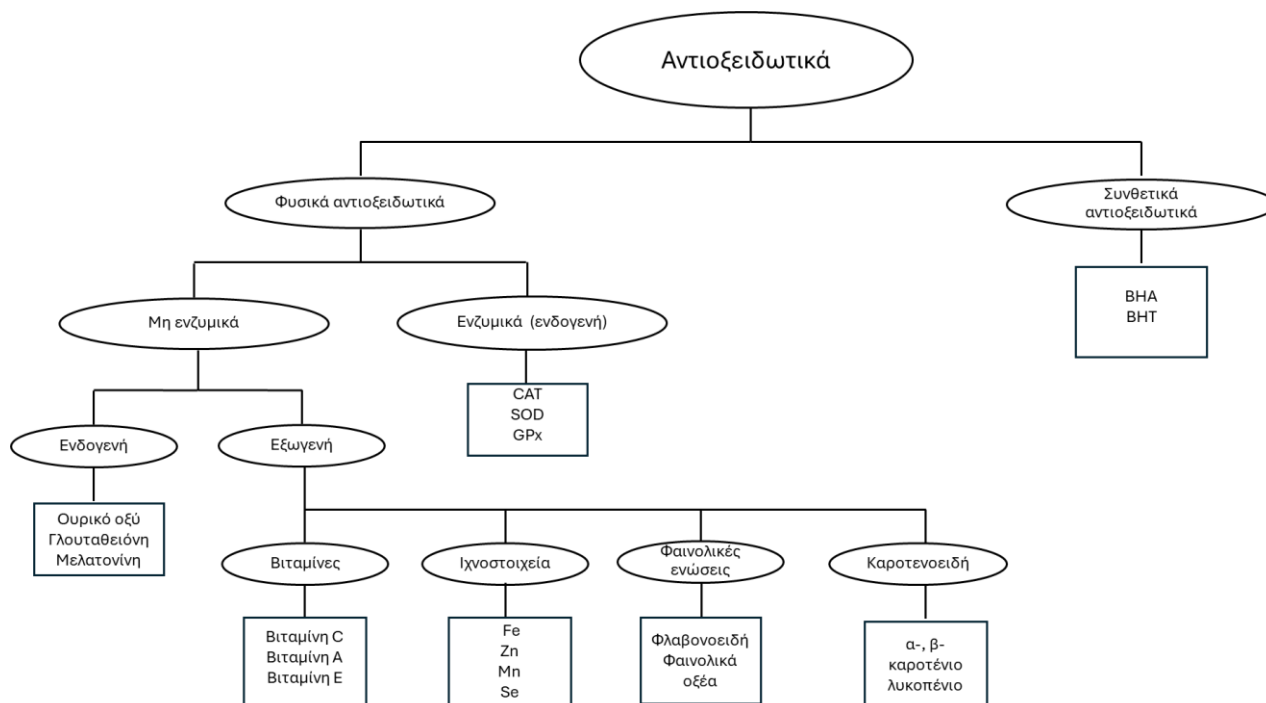
Συμπερασματικά, φαίνεται ότι μια διατροφή πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, ξηρούς καρπούς αυξάνει τα αντιοξειδωτικά και συμβάλει στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, ενώ έχει και ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της εύκολης εύρεσης τους στην φύση και της υψηλής διαθεσιμότητάς τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί εναλλακτικές πηγές αντιοξειδωτικών όπως κάποια βακτήρια και λειχήνες αλλά και κάποιες φυτικές πηγές που δεν περιλαμβάνονται στο καθημερινό διαιτολόγιο, κυρίως άγρια βότανα, όπως η *ginkgo biloba*.^{2,3,13}

1.2.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι μια σειρά από φαινολικές ενώσεις οι οποίες δεν εμφανίζονται στην φύση, αλλά συντίθεται χημικά σε εργαστήρια και δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και διακόπτοντας τις αλυσιδωτές τους αντιδράσεις. Αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία σαν πρόσθετα σε τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά.^{1,7,15} Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι το βουτυλιωμένο υδροξυτουλουολιο (BHT) και η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA). Παρά τα οφέλη τους ως προς την σταθεροποίηση που προσφέρουν σε λίπη και έλαια, η υψηλή τους πτητικότητα, η αστάθεια τους σε υψηλές θερμοκρασίες και κυρίως η καρκινογόνος φύση τους έχουν οδηγήσει σε μία στροφή από τα συνθετικά στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα συνθετικά υστερούν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα από τα φυσικά πρώτον, λόγω της σύνθεσής τους και δεύτερον λόγω του ότι δεν μπορούν να συνεργαστούν με άλλες ενώσεις που υπάρχουν φυσιολογικά στα τρόφιμα.^{1,7,15,16}

Τα ευρέως πλέον χρησιμοποιούμενα συμπληρώματα διατροφής αποτελούν μια εναλλακτική μορφή χορήγησης αντιοξειδωτικών στον οργανισμό και προκύπτουν με χημική σύνθεση ενώ σε κάποιες περιπτώσεις και μέσω εκχύλισης φυσικών συστατικών από τρόφιμα.⁶ Ωστόσο, όπως γίνεται αντιληπτό δεν έχουν την ίδια σύσταση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά γεγονός που έχει προκαλέσει αμφιβολίες για το αν τελικά είναι τόσο επωφελή για τον οργανισμό.⁶

Η ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών ανάλογα με την προέλευση τους σε φυσικά, συνθετικά, ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά αλλά και με βάση την δράση τους σε ενζυμικά και μη φαίνεται στο Σχήμα 2. :



Σχήμα 2: Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών ^{3,12}

1.3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις φυσικής προέλευσης απαρτίζουν μια τεράστια ομάδα ουσιών με περισσότερες από 8000 διαφορετικές ενώσεις.¹¹ Οι ενώσεις αυτές αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, γι' αυτό και εντοπίζονται κυρίως σε αυτά και ευθύνονται για το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση τους. Ως φαινολικές χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που φέρουν μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες σε αρωματικούς δακτυλίους.^{17,18} Η δράση των πολυφαινολών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την λειτουργία των φυτών καθώς, συμβάλλουν στην ρύθμιση της ανάπτυξης και της άμυνας τους από μικροοργανισμούς. Ωστόσο, εκτός από την συμβολή τους στα φυτά, λόγω της πολύ υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης που εμφανίζουν συνδέονται άμεσα και με την καλή υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.^{11,18} Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δρουν σαν δότες ηλεκτρονίων, μέσω της μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου από την υδροξυλομάδα που περιέχουν, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο

την δράση των ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον μερικοί τύποι φαινολικών ενώσεων έχει διαπιστωθεί από μελέτες ότι έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν την οξειδωση ενζύμων συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της λειτουργικότητάς τους.^{11,12} Οι παραπάνω αντιοξειδωτικές ικανότητες των ενώσεων αυτών σχετίζονται με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς και αλλεργιών.^{11,15}

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπάρχει μια τεράστια ποικιλία φαινολικών ενώσεων οι οποίες αρχικά κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με την δομή τους με τις πιο γνωστές να είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες και οι ταννίνες. Στην συνέχεια, οι ενώσεις αυτές μπορούν να χωριστούν σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με την θέση και τον αριθμό των υδροξυλομάδων αλλά και με την ύπαρξη επιπλέον υποκαταστατών. Για παράδειγμα, η πιο διαδεδομένη και πολυπληθέστερη ομάδα πολυφαινολών, τα φλαβονοειδή, γνωστά για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική τους δράση, χωρίζονται σε πολλές υποκατηγορίες, όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες.^{15,18} Η αντιοξειδωτική ικανότητα διαφέρει από είδος σε είδος και σχετίζεται με την δομή της κάθε ένωσης. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις γενικά υπερισχύουν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε σχέση με άλλα αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες και τα καροτενοειδή.¹²

Στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 1) παρουσιάζονται μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές κατηγορίες και υποκατηγορίες φαινολικών ενώσεων με σημαντική αντιοξειδωτική δράση καθώς και οι διατροφικές πηγές τους:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Χαρακτηριστικές κατηγορίες και υποκατηγορίες φαινολικών ενώσεων φυσικής προέλευσης.^{12,13,17,18}

Φαινολικές ενώσεις	Κατηγορίες	Υποκατηγορίες	Διατροφικές πηγές
	Φαινολικά οξέα	Φερουλικό οξύ	Δημητριακά Λαχανικά Ελαιόλαδο
		Γαλλικό οξύ	Καφές Φρούτα Μαύρο τσάι
	Φλαβονοειδή	Φλαβόνες	Λαχανικά Φρούτα (εσπεριδοειδή)
		Φλαβονόλες	Λαχανικά Φρούτα Τσάι Κόκκινο κρασί
		Ανθοκυανίνες	Φρούτα Λαχανικά Ξηροί καρποί
		Ισοφλαβόνες	Σόγια και παράγωγα της Όσπρια
	Λιγνάνες		Φακές Φρούτα Λαχανικά
	Ταννίνες		Καφές Φρούτα Λαχανικά Κρασί Τσάι

1.4. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ολοένα και πιο αποτελεσματικές in vitro μέθοδοι για την μέτρηση της δράσης των αντιοξειδωτικών. Οι σύγχρονες μέθοδοι συνδυαστικά με ευαίσθητες και αυτοματοποιημένες τεχνικές ανάλυσης στηρίζονται στα χαρακτηριστικά των αντιοξειδωτικών που αφορούν κυρίως την ικανότητά τους, είτε να δωρίζουν το υδρογόνο με τα ηλεκτρόνια του, είτε να απομακρύνουν το ασύζευτο ηλεκτρόνιο που υπάρχει στην αρωματική τους δομή.¹⁹ Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι δεν αντικατοπτρίζουν τις πραγματικές συνθήκες, οι πληροφορίες που παρέχουν για το οξειδωτικό δυναμικό με ελάχιστη παρέμβαση στη σύσταση και τη μήτρα του δείγματος είναι πολύ σημαντικές.²⁰

Γενικά, οι in vitro μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με κριτήριο τις εμπλεκόμενες χημικές αντιδράσεις : τις μεθόδους που στηρίζονται σε μηχανισμούς μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT- Hydrogen Atom Transfer) και τις μεθόδους μηχανισμού μεταφοράς (ενός) ηλεκτρονίου (SET/ET- Single Electron Transfer). Ωστόσο υπάρχουν και μέθοδοι που ακολουθούν συνδυασμό των δύο μηχανισμών.²⁰

1.4.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΤΟΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (HAT)

Οι δοκιμές που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία μετρούν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου.²⁰

Ο μηχανισμός HAT συνοψίζεται στην παρακάτω αντίδραση:



Όπου, ArOH → φαινόλη (αντιοξειδωτικό)

AH → προστατευμένο βιομόριο

ROO• → ρίζα υπεροξυλίου

ArO•) → ρίζα αρυλοξυλίου

Σύμφωνα με τον μηχανισμό HAT, όπως υποδεικνύεται από την αντίδραση (1), η φαινόλη αντιδρά με την υπεροξυλική ρίζα μέσω μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου. Από την αντίδραση αυτή σχηματίζεται μία ρίζα αρυλοξυλίου, η οποία στην συνέχεια σταθεροποιείται μέσω συντονισμού.

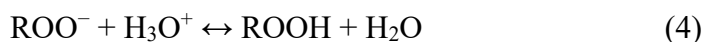
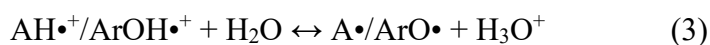
Για να είναι ένα αντιοξειδωτικό αποτελεσματικό πρέπει να αντιδρά ταχύτερα από το αντίστοιχο βιομόριο με τις ελεύθερες ρίζες, έτσι ώστε να αποτρέπει την οξείδωση του τελευταίου. Οι αντιδράσεις HAT δεν εξαρτώνται από τον διαλύτη και το pH και είναι πολύ γρήγορες (ολοκληρώνονται σε λεπτά ή και δευτερόλεπτα).²¹⁻²³ Μια από τις πιο χαρακτηριστικές τεχνικές που στηρίζονται στον μηχανισμό αυτό είναι η δοκιμασία ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου ORAC.

➤ Oxygen Radical Absorbance Capacity method – ORAC

Είναι η δοκιμασία με την οποία μετράται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να διασπών τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών, μέσω της παρακολούθησης της αναστολής της οξείδωσης της ρίζας υπεροξυλίου. Σύμφωνα με την δοκιμή αυτή, η ρίζα υπεροξυλίου που παράγεται από μία αζω-ένωση (συνήθως AAPH), η οποία λειτουργεί σαν παραγωγός ριζών, αντιδρά με μία φθορίζουσα ουσία και στην συνέχεια καταγράφεται με την βοήθεια φθορισμομέτρου η απώλεια του φθορισμού. Ως ένωση αναφοράς στην ORAC χρησιμοποιείται ένα αντιοξειδωτικό συνήθως, το Trolox.²⁰

1.4.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ (SET ή ET)

Οι δοκιμές που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία μετρούν την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να απομακρύνει ένα μόνο ηλεκτρόνιο με σκοπό, να ανάγει μεταλλικά ιόντα, καρβονυλικές ομάδες και ελεύθερες ρίζες.²⁰ Ο μηχανισμός SET συνοψίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:

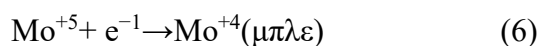
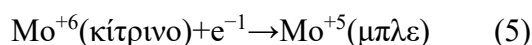


Σύμφωνα με τον μηχανισμό ET, η κατιονική αντιοξειδωτική ένωση που προκύπτει από την αντίδραση (2) στην συνέχεια αντιδρά με νερό και αποπρωτονιώνεται (3). Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων HAT και SET είναι το ίδιο, με την διαφορά ότι όπως φαίνεται η αντίδραση (2) της SET υπόκειται σε περαιτέρω αντιδράσεις διάδοσης ριζών.²² Οι αντιδράσεις SET σε αντίθεση με τις HAT εξαρτώνται από το pH.²⁰ Στην πραγματικότητα, στις περισσότερες δοκιμασίες που βασίζονται σε SET, χρησιμοποιείται ένας κατάλληλος ανιχνευτής οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Πιο συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με έναν έγχρωμο ή φθορίζον ανιχνευτήρα

(probe), ο οποίος λειτουργεί ως οξειδωτικό μέσο, αντί για ρίζες υπεροξυλίου. Έτσι στις φασματοφωτομετρικές μεθόδους που βασίζονται στον μηχανισμό SET μετράται η ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να ανάγει ένα οξειδωτικό μέσω της αλλαγής χρώματος. Στη συνέχεια, ο βαθμός της αλλαγής χρώματος συσχετίζεται με την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών.^{20,23} Οι πιο γνωστές δοκιμές που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι δοκιμές Folin-Ciocalteu, CUPRAC και TFC, οι οποίες είναι όλες δοκιμασίες αποχρωματισμού.²¹

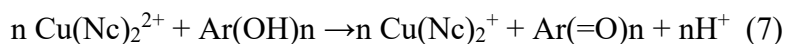
➤ Δοκιμασία ολικών φαινολικών – Folin-Ciocalteu (FC)

Η δοκιμή Folin-Ciocalteu, που πήρε το όνομά της από το αντίστοιχο αντιδραστήριο που χρησιμοποιεί, αποτελεί μια από τις πιο γνωστές μεθόδους που αποσκοπεί στον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών, γι' αυτό και πολλές φορές αναφέρεται και ως TPC (Total Phenolic Content).²⁰ Η μέθοδος αυτή αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών όπως η τυροσίνη, αλλά στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας αντιοξειδωτικών στο κρασί από τους Singleton, Orthofer και Lamuela-Raventos το 1999.^{20,23,24} Έκτοτε χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φαινολικών αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα και φυτικά εκχυλίσματα.^{20,23,24} Είναι μια μέθοδος ευαίσθητη σε παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία, οπότε απαιτείται έλεγχος των συνθηκών διεξαγωγής των αντιδράσεων.^{20,23} Ωστόσο, προτιμάται για την απλότητα και την αναπαραγωγικότητα της.^{20,23} Η δοκιμή FC βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu από φαινολικές ενώσεις. Η ακριβής σύνθεση του αντιδραστήριου αυτού δεν είναι πλήρως γνωστή, αν και πιστεύεται ότι περιέχει ένα σύμπλοκο φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού οξέος. Το ιόν του μολύβδου σε αυτό το σύμπλοκο ανάγεται από Mo^{+6} σε Mo^{+5} δεχόμενο ένα ηλεκτρόνιο από το φαινολικό αντιοξειδωτικό παράγοντας μπλε χρώμα (5), με επακόλουθο σχηματισμό έγχρωμων ιόντων Mo^{+4} (6). Η ένταση της απορρόφησης που λαμβάνει το φασματοφωτόμετρο είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των φαινολικών και τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ισοδύναμα γαλλικού οξέος μιας και το γαλλικό οξύ χρησιμοποιείται σαν πρότυπο αναφοράς. Παρακάτω αναγράφεται η αντίδραση αναγωγής του αντιδραστήριου FC:^{20,23,24}



➤ CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

Η δοκιμασία CUPRAC χρησιμοποιείται για την μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση της αναγωγή του χαλκού από Cu^{2+} σε Cu^+ .²⁰ Πιο συγκεκριμένα, όπως και στην μέθοδο FC χρησιμοποιείται ένας υποκατάστατης, συνήθως νεοκουπροΐνη (nc), που σχηματίζει με τον χαλκό ένα σύμπλοκο, το οποίο αποτελεί το χρωμογόνο οξειδωτικό αντιδραστήριο της δοκιμασίας. Το χρωμογόνο οξειδωτικό αντιδραστήριο Cu^{2+} -nc αντιδρά με την δραστική AR-OH των αντιοξειδωτικών μετατρέποντας τις στις αντίστοιχες κινόνες και το σύμπλοκο Cu^{2+} -nc ανάγεται στο αντίστοιχο Cu^+ -nc, δίνοντας ένα έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα (7).^{20,25} Η αντίδραση αναγωγής αναγράφεται παρακάτω:

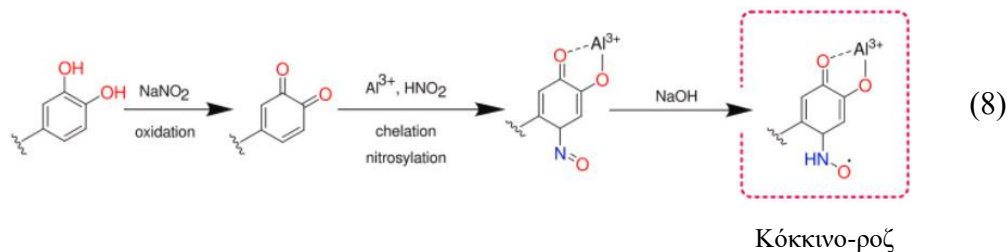


Η μέθοδος αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες ET δοκιμές καθώς, είναι ανεξάρτητη από παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία, το pH εργασίας είναι ουδέτερο και όχι αλκαλικό όπως στην μέθοδο FC και τέλος είναι εφαρμόσιμη για όλους του τύπους αντιοξειδωτικών.^{23,25}

➤ TFC (Total Flavonoid Content)

Η δοκιμασία TFC με την χρήση AlCl_3 αποτελεί την πιο γνωστή χρωματομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών. Όπως οι περισσότερες χρωματομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην δημιουργία συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα έτσι και στην TFC το μεταλλικό ιόν που χρησιμοποιείται είναι το Al^{3+} .²⁶ Η δοκιμασία χλωριούχου αργιλίου βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ του AlCl_3 και των φλαβονοειδών σε όξινο περιβάλλον, η οποία προτάθηκε πρώτη φορά το 1960 για τον προσδιορισμό παραγώγων φλαβονολών σε φάρμακα. Στην συνέχεια, η μέθοδος αυτή υπέστη διάφορες τροποποιήσεις με βασικότερη και επικρατέστερη την προσθήκη νιτρώδους νατρίου (NaNO_2) πριν από την προσθήκη AlCl_3 . Πιο συγκεκριμένα, το νιτρώδες νάτριο αντιδρά με το φλαβονοειδές και λειτουργεί σαν παράγοντας νίτρωσης γειτονικών αρωματικών διολών, δίνοντας ένα παράγωγο φλαβονοειδούς-νιτροξυλίου.^{26,27} Έπειτα, με την προσθήκη AlCl_3 δημιουργείται το αντίστοιχο σύμπλοκο.²⁶ Τέλος, προστίθεται NaOH το οποίο, ξεκινά τον σχηματισμό κόκκινο-ροζ χημικών ενώσεων, των οποίων μετράται η απορρόφηση. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση ένα αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται σαν

πρότυπο αναφοράς και συνήθως είναι η κουερσετίνη (quercetin). ²⁷ Η αντίδραση της δοκιμής TFC με την χρήση $AlCl_3$ παρουσία $NaNO_2$ όπως την διατύπωσαν οι A. Nicolescu, C. I. Bunea και A. Mocan είναι η ²⁶:



Οι δοκιμασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελούν κάποιες από τις πιο κλασικές περιπτώσεις στην κατηγορία των δοκιμών που βασίζονται στον μηχανισμό μεταφοράς ενός μόνο ηλεκτρονίου (SET). Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες τεχνικές, όπως η DPPH, που μερικοί υποστηρίζουν ότι ακολουθούν τον SET μηχανισμό ^{21,23,25}, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι ακολουθούν έναν μεικτό μηχανισμό HAT-SET ^{20,22}.

➤ DPPH method

Η μέθοδος αυτή έχει πάρει το όνομα της από την αντίστοιχη ρίζα που χρησιμοποιεί, την DPPH• (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο) και βασίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας αυτής από αντιοξειδωτικά, μέσω της δωρεάς ηλεκτρονίων. ²⁰ Η DPPH είναι μια σταθερή ρίζα η οποία μπορεί να παγιδεύσει εύκολα άλλες ρίζες και δεν διμερίζεται. Το διάλυμα της ρίζας DPPH έχει ένα βαθύ ιώδες χρώμα και αποχρωματίζεται (ή γίνεται ελαφρώς κίτρινο) όταν αναμειγνύεται με διάλυμα ουσίας που μπορεί να δωρίζει ένα υδρογόνο.^{11,23,28} Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται για όλους τους τύπους αντιοξειδωτικών.¹¹ Η αντίδραση αναγωγής της DPPH για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ριζών από τα αντιοξειδωτικά είναι η παρακάτω:



1.5. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

Στην εποχή μας, τα φυτικά τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά, ελκύουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον τόσο των ερευνητών, όσο και των καταναλωτών λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε βιταμίνες και άλλες βιοδραστικές ενώσεις που εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες.²⁹ Ωστόσο, η συμβολή των βιοδραστικών αυτών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία τους στα τρόφιμα, αλλά και από το αν μπορούν να απελευθερωθούν και να μεταβολιστούν κατά την διάρκεια της πέψης, ώστε να γίνουν διαθέσιμες για απορρόφηση.^{29,30} Στο πλαίσιο αυτό, χρησιμοποιείται ο όρος της βιοαποδοτικότητας που περιγράφει την συνολική ικανότητα ενός τροφίμου να καλύπτει τις μεταβολικές ανάγκες των καταναλωτών. Ο όρος αυτός παρόλα αυτά είναι πολύ γενικός και είναι δύσκολο να εκφραστεί ποσοτικά. Αντί αυτού, η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω των εννοιών της Βιοδιαθεσιμότητας, της Βιοπροσβασιμότητας και της Βιοδραστικότητας και με την εφαρμογή τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* δοκιμών.³¹

1.5.1. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η βιοπροσβασιμότητα και η βιοδιαθεσιμότητα είναι δύο έννοιες που πολλές φορές συγχέονται εσφαλμένα λόγω των μικρών εννοιολογικών διαφορών που παρουσιάζουν. Ωστόσο, η μια αποτελεί συνέχεια της άλλης και είναι έννοιες που συνδυαστικά με αυτή της βιοδραστικότητας επεξηγούνται ακολούθως προκειμένου να γίνουν πλήρως κατανοητές.

Η **βιοδιαθεσιμότητα**, σύμφωνα με τον Wood (2005), ορίζεται ως το κλάσμα της προσλαμβανόμενης ουσίας η οποία μετά την απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα, φτάνει στην συστηματική κυκλοφορία και είναι διαθέσιμη για χρήση και αποθήκευση στους ιστούς.^{29,32-34} Στον τομέα της φαρμακολογίας, η βιοδιαθεσιμότητα δίνεται μετρώντας την περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC τόσο όταν η χορήγηση γίνεται από το στόμα, όσο και όταν γίνεται ενδοφλέβια.^{31,34,35} Στην δεύτερη περίπτωση θεωρείται ότι η βιοδιαθεσιμότητα βρίσκεται στο 100%, ενώ στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται σημαντική μείωση λόγω της διαφοράς στην απορρόφηση.^{35,36} Η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να εκφραστεί με δύο τρόπους, ως απόλυτη και σχετική, με την δεύτερη να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη έκφραση στον τομέα των φαρμάκων.³⁶ Το 2014 προτάθηκε από τους Joye, Davidov-Pardo και McClements μια

μαθηματική σχέση (10) η οποία εκφράζει την βιοδιαθεσιμότητα ως το γινόμενο άλλων παραγόντων.³⁴ Πιο συγκεκριμένα :

$$F = F_C * F_B * F_A * F_M \quad (10)$$

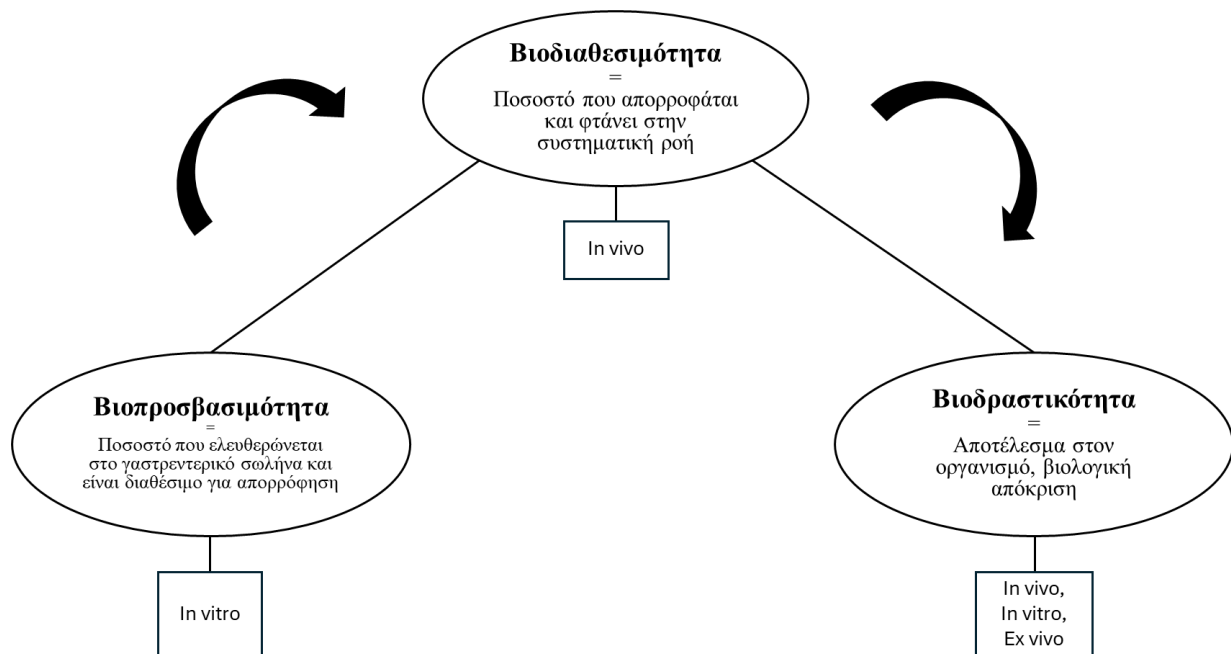
Στην παραπάνω εξίσωση ο παράγοντας F_C εκφράζει το κλάσμα του βιοσυστατικού από την κατανάλωση μέχρι και την είσοδο στο στομάχι, ο F_B εκφράζει την βιοπροσβασιμότητα, ο F_A εκφράζει την απορρόφηση και ο F_M τον μεταβολισμό.³⁴ Αν και η εξίσωση αυτή προτάθηκε σε μια προσπάθεια να αποδειχτεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί *in vitro* μέσω του προσδιορισμού άλλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων, η βιοδιαθεσιμότητα αξιολογείται κυρίως με *in vivo* μεθόδους κυρίως καθώς, οι *in vitro* δεν μπορούν να προσομοιώσουν με ακρίβεια τις βιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν μέσα στο σώμα.

Η **βιοπροσβασιμότητα** ορίζεται σύμφωνα με πολλούς επιστήμονες ως «το κλάσμα ή η ποσότητα μιας ουσίας που απελευθερώνεται στον γαστρεντερικό σωλήνα και είναι διαθέσιμη προς απορρόφηση μέσω των επιθηλιακών κυττάρων».^{29,31,33,35-38} Η βιοπροσβασιμότητα στην ουσία αποτελεί υποσύνολο της βιοδιαθεσιμότητας, όπως φάνηκε και από την εξίσωση (10), καθώς αποτελεί το πρώτο στάδιο μιας σειράς διαδικασιών που περιλαμβάνουν την πέψη της τροφής, την απορρόφηση των βιοδραστικών συστατικών και τέλος τον μεταβολισμό τους στο έντερο και το ήπαρ.²⁹ Αξιολογείται με την χρήση *in vitro* μεθόδων οι οποίες στοχεύουν στην προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών και διεργασιών που συμβαίνουν στο στόμα, στο στομάχι, στο λεπτό και το παχύ έντερο.³¹ Η βιοπροσβασιμότητα τέλος, μπορεί να εκφραστεί σαν ένα κλάσμα BF (bioaccessibility factor), το οποίο ορίζεται ως το πηλίκο της βιοπροσβάσιμης ποσότητας ενός βιοδραστικού συστατικού προς την ολική ποσότητα του^{30,39} :

$$BF = \frac{\text{Βιοπροσβάσιμη ποσότητα}}{\text{Ολική ποσότητα}} * 100\% \quad (11)$$

Η **βιοδραστικότητα** είναι μια έννοια που σχετίζεται άμεσα με τις δυο προηγούμενες, καθώς επηρεάζεται από αυτές και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως το τελευταίο στάδιο της πορείας ενός βιοδραστικού συστατικού μέσα στον οργανισμό.^{29,31} Η έννοια αυτή, εκφράζει την ικανότητα ενός βιοδραστικού συστατικού να προκαλεί οποιαδήποτε βιολογική απόκριση μόνο εφόσον φτάνει επιτυχώς σε ιστούς στόχους, αντιδρά με άλλα βιομόρια και μεταβολίζεται. Η βιολογική απόκριση που προκαλείται έχει θετικές επιπτώσεις στην υγεία και μπορεί να σχετίζεται με αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις.^{31,33} Η άμεση συσχέτιση και επίδραση της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας φαίνεται και από το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά παραδείγματα βιοδραστικών συστατικών, όπως οι πολυφαινόλες και οι βιταμίνες, που ενώ εισέρχονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον οργανισμό μέσω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών, τελικά μικρή ποσότητα καταφέρει να φτάσει στους ιστούς στόχους και να γίνει βιοδραστική.³¹ Η βιοδραστικότητα μπορεί να αξιολογηθεί με *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* μεθόδους οι οποίες στηρίζονται στην μέτρηση βιολογικών δεικτών που αντικατοπτρίζουν την απόκριση.^{29,31,33}

Η συσχέτιση των εννοιών της βιοδιαθεσιμότητας, της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδραστικότητας περιγράφεται στο Σχήμα 3. :



Σχήμα 3: Ορισμοί των εννοιών της βιοδιαθεσιμότητας, της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδραστικότητας και τρόποι αξιολόγησής τους²⁹

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός της βιοπροσβασιμότητας των βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα έχει σπουδαία σημασία, τόσο για τους καταναλωτές, για να γνωρίζουν τα οφέλη της κατανάλωσης συγκεκριμένων τροφίμων στην υγεία τους, όσο και για τους επιστήμονες, για ερευνητικούς και ιατρικούς σκοπούς. Η ανάγκη ερμηνείας των πολύπλοκων μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν τα βιοδραστικά συστατικά και των αλληλεπιδράσεων τους με τον οργανισμό, οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες, αποσκοπούν σε όσο το δυνατόν πιο πιστή αναπαράσταση της ανθρώπινης φυσιολογίας.³¹ Οι πρώτες μελέτες που διεξήχθησαν, έγιναν τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους *in vivo*, ενώ αργότερα ξεκίνησαν και *in vitro* δοκιμές, κυρίως λόγω ηθικών προβληματισμών.³¹

1.6.1. *IN VIVO* ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι *in vivo* μέθοδοι αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας, οι οποίες και έθεσαν τα θεμέλια για τις *in vitro* μεθόδους που αναπτύχθηκαν αργότερα, ακολουθούν κάποιες προσεγγίσεις, διαφορετικές, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Οι δυο βασικότερες στρατηγικές που υπάρχουν είναι οι :

➤ Balance studies (μελέτες ισορροπίας)

Η προσέγγιση αυτή παρέχει μια εκτίμηση της βιοπροσβάσιμης ποσότητας ενός βιοδραστικού συστατικού αφαιρώντας την ποσότητα που εκκρίνεται από τον οργανισμό από την αρχική προσλαμβανόμενη ποσότητα.^{33,40,41} Το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν «ποσοστό απορρόφησης».⁴¹

➤ Tissue studies (μελέτες ιστών)

Σε αυτή την στρατηγική που χαρακτηρίζεται αλλιώς και ως φαρμακοκινητική προσέγγιση πραγματοποιείται υπολογισμός της συγκέντρωσης του βιοδραστικού συστατικού ή μεταβολιτών του στο πλάσμα/ορό.^{33,40,41} Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την χορήγηση γνωστής ποσότητας της βιοδραστικής ουσίας και συχνή παρακολούθηση της στα βιολογικά υγρά (ούρα, αίμα). Στην συνέχεια, με βάση αυτά τα στοιχεία, δημιουργούνται κινητικές καμπύλες και υπολογίζονται χρήσιμοι δείκτες, οι οποίοι προσφέρουν δεδομένα για την ένταση και τον ρυθμό της απορρόφησης, όπως η περιοχή κάτω από την καμπύλη, η C_{max} και η t_{max} .⁴¹

Κάποια πειράματα περιλαμβάνουν την χρήση ιχνηθετών ως εξωγενή μορφή σήμανσης για την καλύτερη παρακολούθηση των βιοδραστικών συστατικών στο αίμα.

Οι παραπάνω προσεγγίσεις βασίζονται σε πειράματα τα οποία πραγματοποιούνται τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε πειραματόζωα. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται είναι κατά κανόνα, τρωκτικά, πρωτεύοντα θηλαστικά και χοίροι.^{31,36} Τα πρωτεύοντα θηλαστικά προτιμώνται από ερευνητικής άποψης, επειδή έχουν υψηλό βαθμό συγγένειας με την φυσιολογία του ανθρώπου. Ωστόσο, απορρίπτονται στην πράξη λόγω κόστους.³⁶ Γι' αυτό πολύ καλή επιλογή επίσης αποτελούν και τα τρωκτικά λόγω του μικρού τους μεγέθους τους και του χαμηλού κόστους.³⁶ Τα τελικά σημεία στον προσδιορισμό της βιοπροσβασιμότητας διαφέρουν από πείραμα σε πείραμα και επιλέγονται ανάλογα με το ζωικό μοντέλο με τα κυριότερα να είναι το αίμα, τα ούρα και τα κόπρανα.³³

Οι *in vivo* μέθοδοι παρά το γεγονός ότι είναι πολύ αξιόπιστες πηγές πληροφοριών για την βιοπροσβασιμότητα, στην πράξη είναι πολύ δύσκολο να εφαρμοστούν λόγω του υψηλού χρόνου και κόστους που απαιτούν για την διεξαγωγή τους αλλά και κυρίως λόγω ηθικών παραγόντων που πλέον καθιστούν τις δοκιμές σε ζώα και ανθρώπους απαγορευτικές.^{31,40}

1.6.2. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι περιορισμοί που προέκυψαν από την χρήση των in vivo μεθόδων αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας οδήγησαν στην ανάγκη για ανάπτυξη και χρήση in vitro μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτές, αν και δεν μπορούν να προσομοιώσουν πλήρως και να φτάσουν την ακρίβεια των in vivo μεθόδων, αποτελούν μια πολύ καλή εναλλακτική λόγω του χαμηλού τους κόστους, της ευκολίας τους και κυρίως επειδή δεν χρησιμοποιούν ζωικά και ανθρώπινα μοντέλα και συμμορφώνονται στο πλαίσιο της επιστημονικής ηθικής.⁴²⁻⁴⁴ Οι in vitro μέθοδοι μπορούν να διακριθούν σε δύο επιμέρους κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται τα in vitro μοντέλα προσομοίωσης της πέψης, στατικά και δυναμικά, και στην δεύτερη κατηγορία υπάρχουν οι κυτταρικές μέθοδοι, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιούνται και συνδυαστικά με τα μοντέλα προσομοίωσης της πέψης.^{40,45}

1.6.2.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΧΩΝΕΥΣΗΣ (IN VITRO DIGESTION MODELS-CELL FREE)

Οι μέθοδοι εξωσωματικής χώνευσης εμφανίζουν πολλές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους που σχετίζονται με παραμέτρους όπως, ο αριθμός των τμημάτων του πεπτικού συστήματος που προσομοιώνονται, η σύσταση των πεπτικών υγρών κυρίως ως προς τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται, και τέλος οι μηχανικές τάσεις κάθε βήματος.^{43,45} Ωστόσο, παρά τις παραπάνω διαφοροποιήσεις τα περισσότερα in vitro μοντέλα ακολουθούν μια κοινή πορεία, η οποία διαφοροποιείται κατά περίπτωση, και ένας γενικός ορισμός που θα μπορούσε να τα χαρακτηρίσει είναι ότι, πρόκειται για πειραματικά συστήματα που στοχεύουν στην μίμηση διεργασιών πέψης που συμβαίνουν κυρίως στην στοματική κοιλότητα, το στομάχι και το λεπτό έντερο.⁴² Επομένως τα στάδια προσομοίωσης κατά σειρά είναι τα παρακάτω :

➤ Στοματική φάση

Η είσοδος της τροφής στην στοματική κοιλότητα αποτελεί το πρώτο από τα στάδια προσομοίωσης της πέψης. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η άλεση της τροφής προκειμένου να προκύψουν μικρότερα κομμάτια, οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής.⁴² Η μάσηση της τροφής γίνεται με την βοήθεια του σάλιου που υπάρχει στο στόμα και το οποίο δρα ως λιπαντικό στα θραύσματα τροφής που στην συνέχεια θα συνεχίσουν την πορεία τους προς το στομάχι.⁴² Η διαδικασία της μάσησης-άλεσης λαμβάνει μέρος σε pH περίπου 6,5 και έχει μικρή διάρκεια της

τάξης των μερικών δευτερολέπτων/λεπτών.⁴² Το βασικότερο ένζυμο σε αυτό το στάδιο είναι η αμυλάση, η οποία στοχεύει στην μετατροπή του άμυλου σε ολιγοσακχαρίτες/μονοσακχαρίτες, ενώ ανάλογα με την μέθοδο μπορεί να υπάρχουν και άλλα ένζυμα όπως βλεννίνη (mucin) και ουρικό οξύ.

➤ Γαστρική φάση

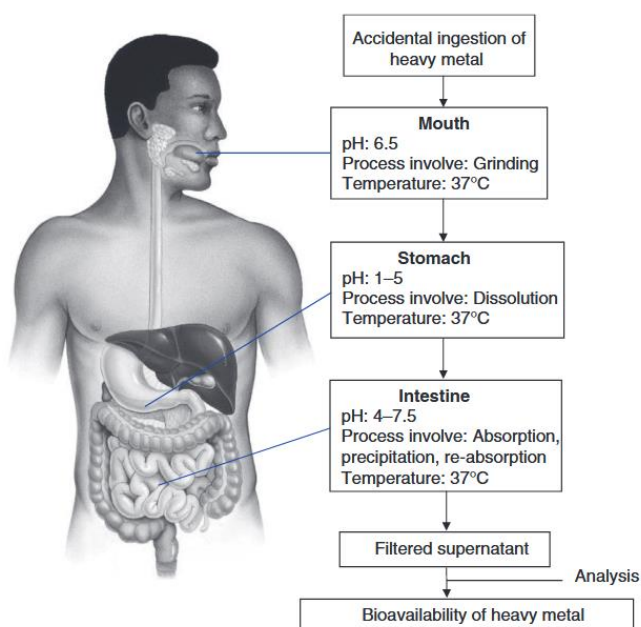
Αμέσως μετά την μάσηση η τροφή καταλήγει μέσω του οισοφάγου στο στομάχι, όπου στην ουσία λαμβάνει χώρα η διάλυση της τροφής με την βοήθεια ενζύμων.⁴² Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι οι εξαιρετικά όξινες συνθήκες που επικρατούν στο στομάχι με pH της τάξης του 1-5, οι οποίες συμβάλουν στην διάλυση ασταθών ενώσεων και στην ενεργοποίηση και ενίσχυση της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων.^{42,45} Το βασικότερο πρωτεολυτικό ένζυμο που υπάρχει στο στομάχι είναι η πεψίνη βασικός ρόλος της οποίας είναι η διάσπαση των πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτίδια ή αμινοξέα.^{42,45} Η ρύθμιση του pH αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την δράση της πεψίνης καθώς, σε pH μεγαλύτερο του 5 μετουσιώνεται και χάνει την λειτουργικότητά της.⁴⁵ Τα δείγματα παραμένουν στο τμήμα του στομάχου από λίγα λεπτά έως και κάποιες ώρες.⁴²

➤ Εντερική φάση

Το τμήμα του λεπτού εντέρου αποτελεί το τελευταίο βήμα στα περισσότερα in vitro μοντέλα προσομοίωσης της πέψης. Σε αυτό το τμήμα λαμβάνει χώρα η μεγαλύτερη απορρόφηση των βιοδραστικών συστατικών αν και σε μικρότερο βαθμό μπορεί να απορροφούνται συστατικά και σε άλλα τμήματα όπως το στόμα και το στομάχι.⁴² Στο λεπτό έντερο τα δείγματα υπόκεινται σε επιπλέον επεξεργασία από εντερικούς χυμούς, που περιέχουν πληθώρα ενζύμων με κυριότερα την παγκρεατίνη, την αμυλάση και την θρυψίνη καθώς και χολικά και διαττανθρακικά άλατα.⁴² Η παρουσία των παραπάνω ενζύμων και η επεξεργασία με αυτά αποσκοπεί στην διάσπαση λιπών, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών και ακολούθως στην απορρόφηση των χρήσιμων συστατικών.^{42,43} Η διάρκεια παραμονής των δειγμάτων στο λεπτό έντερο εξαρτάται από το τμήμα του λεπτού εντέρου στο οποίο βρίσκονται και το οποίο μπορεί να είναι ο δωδεκαδακτυλος, ο ειλεός και η νηστίδα, καθώς και από το pH.⁴²

Ως προς τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας της πέψης, σε όποια φάση και να βρίσκεται, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι τόσο ανθρώπινης, όσο και ζωικής και φυτικής προέλευσης.⁴³ Επίσης είναι σημαντικό τα ενζυμικά διαλύματα να παρασκευάζονται την μέρα των αναλύσεων, έτσι ώστε να είναι φρέσκα, καθώς έχει παρατηρηθεί μείωση της δραστητικότητάς τους με το πέρασμα του χρόνου.⁴³

Στην απεικόνιση του Σχήματος 4. αναγράφονται αναλυτικά τα στάδια της πέψης σε μια μέθοδο εξωσωματικής χώνευσης, οι συνθήκες που επικρατούν (pH, θερμοκρασία) σε κάθε στάδιο καθώς και οι διεργασίες που πραγματοποιούνται (άλεση, διάλυση, απορρόφηση).



Σχήμα 4 : Αναπαράσταση των φάσεων της πέψης στα διάφορα τμήματα του σώματος (η προκειμένη εικόνα αναφέρεται σε ανάλυση βαρέων μετάλλων, ωστόσο η διαδικασία είναι κοινή και για άλλα βιοδραστικά συστατικά)⁴²

Τα *in vitro* μοντέλα προσομοίωσης της πέψης διακρίνονται με την σειρά τους σε δυο επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το πόσο ρεαλιστικά ή όχι προσομοιώνουν τις διεργασίες της πέψης στον ανθρώπινο οργανισμό.⁴⁰ Έτσι, υπάρχουν τα στατικά και τα δυναμικά μοντέλα.

ΣΤΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Στα στατικά μοντέλα προσομοίωσης της πέψης προσομοιώνονται διαδοχικά οι διάφορες διεργασίες που συμβαίνουν κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού σε διάφορα τμήματά της με κύρια το στόμα, το στομάχι και το λεπτό έντερο.^{40,46} Σε αυτά τα τμήματα φυσιολογικά πραγματοποιούνται κάποιες διεργασίες όπως ανάμιξη και περισταλτισμός.^{33,40,46} Ωστόσο, οι στατικές μέθοδοι αδυνατούν να μιμηθούν αυτές τις διεργασίες και παρόλο πραγματοποιείται ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα με σκοπό την μίμηση των περισταλτικών κινήσεων των τοιχωμάτων του γαστρεντερικού σωλήνα, τελικά τα προϊόντα της πέψης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό στάσιμα.^{40,46} Στο πέρασμα του χρόνου έχουν αναπτυχθεί διάφορα στατικά μοντέλα για την *in vitro* προσομοίωση της πέψης, με πιο χαρακτηριστικά να είναι τα παρακάτω:

➤ INFOGEST Method

Το μοντέλο αυτό αποτελεί το πιο διαδεδομένο και διεθνώς αποδεκτό στατικό μοντέλο προσομοίωσης της πέψης. Προτάθηκε από τον Andre Brodtkorb αλλά δέχτηκε διάφορες παραλλαγές με σημαντική αυτή του Minekus.⁴⁷ Ωστόσο, η τελική συναινετική μέθοδος είναι ιδιαίτερα απλή και στηρίζεται στην προσομοίωση τριών διαφορετικών φάσεων στοματική, γαστρική και εντερική με προκαθορισμένες ποσότητες ενζύμων, τιμές pH, θερμοκρασίας και χρόνου.⁴⁷⁻⁴⁹ Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο και ίσως σημαντικότερο βήμα σε αυτό το πρωτόκολλο είναι η παρασκευή των πεπτικών υγρών με μεγάλη αυστηρότητα και προσοχή στις συγκεντρώσεις των ενζύμων, διότι το παραμικρό λάθος μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.⁴⁹ Αφού γίνει η παρασκευή των διαλυμάτων, αρχικά η τροφή αναμειγνύεται με το τεχνητό σάλιο (SSF) σε αναλογία 1:1, με ή χωρίς την χρήση αμυλάσης και στην συνέχεια το δείγμα επωάζεται πάλι με αναλογία 1:1 με το τεχνητό γαστρικό υγρό (SGF), που περιέχει πεψίνη και γαστρική λιπάση, σε pH= 3 για 2 ώρες, στους 37 °C.^{48,49} Τέλος, το δείγμα καθώς κινείται στον γαστρεντερικό σωλήνα αραιώνεται εκ νέου 1:1 με τεχνητό εντερικό χυμό (SIF), που περιέχει παγκρεατικά ένζυμα με κύρια την παγκρεατίνη και χολικά άλατα, σε ουδέτερο pH για ακόμα 2 ώρες.^{48,49} Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται για την αναπαραγωγικότητα της, είναι απλή και εύκολη στην χρήση καθώς και χαμηλού κόστους. Ωστόσο, τα παραπάνω πλεονεκτήματα της δεν αναιρούν τους περιορισμούς που εμφανίζει και σχετίζονται όπως σε όλα τα *in vitro* μοντέλα

προσομοίωσης της πέψης με το πόσο ρεαλιστικά είναι και το πόσο καταφέρνουν να λάβουν υπόψη όλες τις παραμέτρους.⁴⁹

➤ Unified Bioaccessibility Method – UBM

Η μέθοδος UBM αποτελεί μια ενοποιημένη, πλήρως τυποποιημένη και επικυρωμένη μέθοδο που προτάθηκε από την ομάδα ερευνητών BARGE (Bioaccessibility Research Group of Europe) ως αποτέλεσμα της ανάγκης για μια κοινή μέθοδο αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας.^{39,50,51} Η BARGE υιοθέτησε την μέθοδο RIVM και πάνω σε αυτή πραγματοποίησε κάποιες αλλαγές, δημιουργώντας τελικά την UBM. Η UBM είναι ένα *in vitro* μοντέλο για την αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας, το οποίο αν και αρχικά χρησιμοποιήθηκε για μολυσμένα εδάφη, ανταποκρίνεται σε οποιαδήποτε μήτρα (πχ λαχανικά, φρούτα) και προσομοιώνει τις φυσιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στην στοματική κοιλότητα, το στομάχι και το λεπτό έντερο.^{39,51,52} Γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται τέσσερα συνθετικά πεπτικά υγρά -σάλιο, γαστρικό υγρό, δωδεκαδακτυλικό υγρό και χολικά υγρά- που είναι πλούσια σε ανόργανα άλατα, οργανικές ενώσεις και ένζυμα.⁵¹⁻⁵³ Κύριο χαρακτηριστικό της UBM είναι ότι αποτελεί μια διεργασία δύο φάσεων, της γαστρικής και της γαστρεντερικής, κάθε μια από τις οποίες δίνει και ένα εκχύλισμα για κάθε δείγμα.^{39,51,54} Πιο συγκεκριμένα, η γαστρική φάση αποτελείται από ένα εκχύλισμα που προκύπτει μετά από διαδοχική επαφή του δείγματος με το σάλιο και το γαστρικό υγρό (1 ώρα ανακίνηση των υγρών στους 37 °C), ενώ η γαστρεντερική φάση αποτελείται από ένα εκχύλισμα που προκύπτει από διαδοχική επαφή του δείγματος τόσο με το σάλιο και το γαστρικό υγρό (1 ώρα ανακίνηση στους 37 °C) αλλά και εν συνεχεία με τα δωδεκαδακτυλικά και χολικά υγρά (4 ώρες ανακίνηση στους 37 °C).^{39,53,54} Τέλος, η μέθοδος αυτή αν και προσομοιώνει αρκετά αποτελεσματικά την ανθρώπινη πέψη και παρέχει καλά αποτελέσματα ειδικά για ανόργανους ρύπους, η πολυπλοκότητα παρασκευής των διαλυμάτων ενδέχεται να προκαλέσει τεχνικές δυσκολίες.^{51,52}

➤ RIVM method- National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις πιο πολύπλοκες μεθόδους αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας καθώς περιλαμβάνει πολυάριθμα χημικά συστατικά για την παρασκευή των συνθετικών πεπτικών υγρών.⁵⁰ Η RIVM περιλαμβάνει δύο διαφορετικές εκδοχές ανάλογα με τα συστατικά που προσδιορίζει και την σύσταση των πεπτικών υγρών που χρησιμοποιεί.^{50,55} Πιο συγκεκριμένα, το *fasted model* εφαρμόζεται κυρίως για την αξιολόγηση ανόργανων συστατικών και χρησιμοποιεί «μη διεγερμένα» (non-stimulated) πεπτικά υγρά, ενώ το *fed model* εφαρμόζεται κυρίως για οργανικά συστατικά και χρησιμοποιεί «διεγερμένα» πεπτικά υγρά, όπως σάλιο με αυξημένη αμυλάση και μειωμένη βλεννίνη, γαστρικό υγρό με αυξημένη πεψίνη και γαστρεντερικά υγρά με αυξημένη λιπάση για τα δωδεκαδακτυλικά και αυξημένη χολή για τα χολικά υγρά αντίστοιχα.^{50,55} Οι διεγερμένοι πεπτικοί χυμοί χρησιμοποιούνται διότι συμβάλουν στην προσομοίωση των αλλαγών που παρατηρούνται στις εκκρίσεις μετά από κατανάλωση τροφής από τους οργανισμούς.⁵⁰ Τέλος, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η μέθοδος RIVM αποτέλεσε την βάση για την ενοποιημένη μέθοδο αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας UBM.⁵⁰

➤ PBET method - Physiologically Based Extraction Test

Η μέθοδος PBET είναι μια μέθοδος που προτάθηκε αρχικά για την αξιολόγηση βαρέων μετάλλων από στερεές μήτρες.⁵⁶ Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι ότι χωρίζεται σε δύο στάδια: την γαστρική φάση (G), όπου το δείγμα επεξεργάζεται σε όξινο περιβάλλον (το pH ρυθμίζεται με HCl) με την παρουσία ενζύμων όπως η πεψίνη, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ, και τη γαστρεντερική φάση (GI), όπου το διάλυμα που προκύπτει από την γαστρική φάση εν συνεχεία επεξεργάζεται σε ουδέτερο προς ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον (το pH ρυθμίζεται με NaHCO₃) με παγκρεατίνη και χολικά άλατα.^{54,56}

➤ SBET method- Simple Bioaccessibility Extraction Test

Η μέθοδος SBET αποτελεί μια απλοποιημένη εκδοχή της μεθόδου PBET που αναφέρθηκε προηγουμένως και αναπτύχθηκε από την USEPA.⁵¹ Η SBET είναι η μοναδική από τις μεθόδους που έχουν αναφερθεί ως τώρα η οποία είναι μονοφασική, δηλαδή προσομοιώνει μόνο την γαστρική φάση με την χρήση διαλύματος γλυκίνης για να επιτευχθούν οι όξινες συνθήκες του στομάχου, απουσία πεπτικών ενζύμων.^{42,51} Η μέθοδος αυτή έχει καθιερωθεί κυρίως για την αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας μετάλλων και αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μοντέλα λόγω της απλότητας του.^{42,51}

➤ SHIME method – Simulator of the Human Intestinal Ecosystem

Η μέθοδος SHIME είναι μια μέθοδος η οποία περιλαμβάνει πεπτικά υγρά πλούσια σε ένζυμα και άλατα όπως και οι υπόλοιπες μέθοδοι, ωστόσο είναι πιο περίπλοκη γιατί δεν προσομοιώνει μόνο το στομάχι και το λεπτό έντερο αλλά και τρία τμήματα του παχέος εντέρου και τη μικτή μικροβιακή κοινότητα.^{50,55} Το ιδιαίτερο με την μέθοδο SHIME είναι ότι με κάποιες τροποποιήσεις, όπως η λήψη διαλυμάτων από την εντερική φάση (λεπτό ή παχύ έντερο) ανά τακτά χρονικά διαστήματα ή η αργή αλλαγή των τιμών του pH, μπορεί να μετατραπεί από στατικό σε δυναμικό μοντέλο.⁵⁰

Τα στατικά μοντέλα in vitro προσομοίωσης της πέψης που αναφέρθηκαν παραπάνω αν και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας βιοδραστικών συστατικών, συνεχίζουν να έχουν το μειονέκτημα ότι διατηρούν σταθερές συνθήκες όπως το pH και άρα δεν αναπαράγουν με απόλυτη ακρίβεια τις φυσιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό.⁴⁶ Γι' αυτό έχουν αναπτυχθεί τα δυναμικά μοντέλα τα οποία είναι σαφώς πιο ρεαλιστικά.⁴⁰

ΔΥΝΑΜΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Εν αντιθέσει με τα στατικά, τα δυναμικά μοντέλα επιτρέπουν την πιο ρεαλιστική προσομοίωση των πολύπλοκων διεργασιών που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της πέψης, διότι λαμβάνουν υπόψη παραμέτρους όπως η ανάμιξη, οι περισταλτικές κινήσεις των τοιχωμάτων του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς και η μεταβολή του pH, των συγκεντρώσεων των ενζύμων, του ιζώδους και του μεγέθους των σωματιδίων.^{31,40,45,46} Σε πολλά από αυτά τα δυναμικά μοντέλα οι παραπάνω παράμετροι ελέγχονται με την βοήθεια υπολογιστή.⁴⁰ Έχουν αναπτυχθεί διάφορα δυναμικά μοντέλα προσομοίωσης της ανθρώπινης πέψης, κάποια από αυτά είναι το TIM, το DGM (Dynamic Gastric Model), το HGS (Human Gastric Simulator) ή ακόμα και το μοντέλο SHIME που όπως αναφέρθηκε με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί από στατικό να γίνει δυναμικό.^{46,50} Ωστόσο αξίζει να γίνει πιο εκτενής αναφορά στο πιο συχνά χρησιμοποιούμενο δυναμικό μοντέλο, το TIM.

TIM model- TNO Gastro-Intestinal Model

Το μοντέλο TIM σχεδιάστηκε αρχικά από το TNO με την ονομασία Tiny-TIM και αποτελούσε ένα σύστημα τριών φάσεων.^{40,46} Το Tiny -TIM συνδύαζε την στοματική φάση με την γαστρεντερική (γαστρική και εντερική) υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και περισταλτικών κινήσεων.⁴⁰ Στην συνέχεια αυτό το μοντέλο βελτιώθηκε ακόμα περισσότερο και πήρε την τελική του μορφή με την ονομασία TIM-1.⁴⁰ Το TIM-1 αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο δυναμικό μοντέλο αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας και το κύριο χαρακτηριστικό του είναι ότι προσομοιώνει το λεπτό έντερο όχι σαν μονάδα αλλά τρία ξεχωριστά τμήματα του.^{40,46,57} Τελικά, το TIM-1 προσομοιώνει τέσσερα διαμερίσματα το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, την νηστίδα και τον ειλεό με τα τρία τελευταία να αποτελούν τμήματα του λεπτού εντέρου.^{40,57} Με την έναρξη της διαδικασίας η τροφή εισέρχεται στο στόμα, διασπάται και αναμειγνύεται με συνθετικό σάλιο πλούσιο σε α-αμυλάση.^{31,46} Στην συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται τόσο στο γαστρικό, όσο και στο γαστρεντερικό διαμέρισμα όπου εκκρίνονται τα πεπτικά υγρά μέσω περισταλτικών βαλβίδων.^{31,40} Γίνεται υποβοήθηση της ανάμιξης με την χρήση εύκαμπτων τοιχωμάτων ικανά να προκαλούν συσπάσεις.^{31,46} Τέλος, παράμετροι όπως το pH και η θερμοκρασία ελέγχονται διαρκώς καθ' όλη την διάρκεια της προσομοίωσης με την χρήση αισθητήρων.^{31,40}

Στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 2.) αναγράφονται τα πιο γνωστά in vitro μοντέλα προσομοίωσης πέψης καθώς και τα τμήμα του σώματος των οποίων την λειτουργία μιμούνται.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύνοψη των in vitro digestion models και των τμημάτων που περιλαμβάνουν.

ΜΟΝΤΕΛΟ	ΕΙΔΟΣ ΜΟΝΤΕΛΟΥ	ΤΜΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΝΟΝΤΑΙ
INFOGEST	Στατικό	Στοματική Κοιλότητα Στομάχι Λεπτό Έντερο
UBM	Στατικό	Στοματική Κοιλότητα Στομάχι Λεπτό Έντερο
RIVM	Στατικό	Στοματική Κοιλότητα Στομάχι Λεπτό Έντερο
PBET	Στατικό	Στομάχι Λεπτό Έντερο
SBET	Στατικό	Στομάχι
SHIME	Στατικό/Δυναμικό	Στομάχι Λεπτό Έντερο Παχύ Έντερο
Tiny-TIM	Δυναμικό	Στοματική Κοιλότητα Στομάχι Λεπτό Έντερο (1 Τμήμα Ολόκληρο)
TIM	Δυναμικό	Στοματική Κοιλότητα Στομάχι Δωδεκαδακτυλος Νηστίδα Ειλεός

1.6.2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αν και η προσομοίωση της πέψης αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα για την αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας από πολλούς επιστήμονες πιστεύεται ότι αποτελεί μόνο το πρώτο βήμα και στην πραγματικότητα χρειάζεται και ένα επιπλέον το οποίο θα καθορίσει την ποσότητα των βιοδραστικών συστατικών που απορροφώνται τελικά από τα κύτταρα των τοιχωμάτων του εντέρου αφού ολοκληρωθεί η πέψη.⁴⁰ Η απορρόφηση αυτή χαρακτηρίζεται ως εντερική απορρόφηση και ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους εκτίμησης της είναι η χρήση κυτταρικών σειρών και ειδικότερα της κυτταρικής σειράς Caco-2.^{40,58}

Κυτταρική σειρά Caco-2

Η κυτταρική σειρά Caco-2 προέρχεται από το έντερο μετά από απομόνωση από καρκινικό ιστό του παχέος εντέρου.^{31,40,50,58} Παρόλα αυτά, για άγνωστους λόγους μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί ότι όταν καλλιεργείται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες έχει την ικανότητα να διαφοροποιείται και να εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των εντερικών κυττάρων.^{50,58} Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν μια μονοστιβάδα η οποία λειτουργεί σαν φράγμα.⁵⁰ Κατά συνέπεια, προσδιορίζοντας την συγκέντρωση των βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονται πάνω στο φράγμα και των συστατικών που το έχουν διαπεράσει, παρέχεται μια εκτίμηση της συγκέντρωσης των συστατικών που έχουν απορροφηθεί από τα εντερικά τοιχώματα.⁵⁰ Το μοντέλο Caco-2 θεωρείται πολύ αξιόπιστο ιδιαίτερα στην αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας μετάλλων, αρκετά κοντά στα πραγματικά δεδομένα και οικονομικό.^{41,43} Ωστόσο, η προέλευση της κυτταρικής σειράς Caco-2 από το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου έχει βρεθεί ότι συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση καρκινογένεσης.⁴⁰ Για τον παραπάνω λόγο, έχει ευνοηθεί η ανάπτυξη και χρήση μοντέλων που στηρίζονται σε άλλες κυτταρικές σειρές που δεν συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου. Τέτοιες σειρές είναι οι : H4, PS4 και CLAB.⁴⁰

1.7. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

Το πόσο βιοπροσβάσιμη είναι μια ουσία είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, οι οποίοι αφορούν τόσο τα χαρακτηριστικά του ίδιου του δείγματος που αναλύεται, όσο και τις συνθήκες διεξαγωγής της εκάστοτε μεθόδου που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας.^{42,50} Τέτοιοι παράγοντες είναι το pH τόσο στην γαστρική, όσο και στην γαστρεντερική φάση, η σύσταση των δειγμάτων που αναλύονται, το μέγεθος των σωματιδίων τους καθώς και ο χρόνος παραμονής τους σε κάθε διαμέρισμα, και μπορούν να διαφοροποιήσουν σημαντικά την βιοπροσβασιμότητα. Ειδικότερα, η περαιτέρω έρευνα αυτών των μεταβλητών και του ρόλου τους συμβάλει αφενός στην αναγνώριση παραγόντων που θα προσθέτουν πολυπλοκότητα στα *in vitro* συστήματα αξιολόγησης της πέψης και θα τα καθιστά πιο ρεαλιστικά, αφετέρου στην αξιολόγηση της επικινδυνότητας ρύπων μέσα από την αύξηση ή την μείωση της βιοπροσβασιμότητας.⁵⁰ Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι είναι απαραίτητος σε κάθε περίπτωση ο σχεδιασμός της κάθε μεθόδου αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες.⁴²

1.7.1. pH

Το pH αποτελεί ίσως τον πιο καθοριστικό παράγοντα που επιδρά στην αποτελεσματικότητα των *in vitro* μεθόδων προσομοίωσης της ανθρώπινης πέψης καθώς και στην βιοπροσβασιμότητα ιδιαίτερα των ανόργανων συστατικών.^{42,45,50,59} Έρευνες έχουν δείξει ότι χαμηλό γαστρικό pH ευνοεί την διάλυση συστατικών (κυρίως μετάλλων), ενώ αύξηση σε αυτή την τιμή του pH παρεμποδίζει την διάλυση δυνητικά βιοπροσβάσιμων συστατικών, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την βιοπροσβασιμότητά τους.^{42,50,59} Ωστόσο, γενικότερα για όλα τα είδη βιοδραστικών συστατικών έχει βρεθεί ότι παρουσιάζεται βέλτιστη απορρόφηση σε γαστρικό pH 1,5-2 για κατάσταση νηστείας το οποίο μπορεί να φτάσει περίπου το 4-5 σε κατάσταση πέψης (μετά από σίτιση), ενώ το pH του λεπτού εντέρου έχει ουδέτερη τιμή 7 που αντιστοιχεί στις συνθήκες που επικρατούν στον ειλεό, δεδομένου ότι εκεί η τροφή έχει τον μεγαλύτερο χρόνο παραμονής.^{42,45,59} Η ρύθμιση του pH επιδρά στην διάσπαση των συστατικών μέσα από την επίδραση στα ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις στην εκάστοτε φάση. Πιο συγκεκριμένα, ένα από τα κυριότερα ένζυμα της γαστρικής φάσης, η πεψίνη, που καταλύει την διάσπαση πρωτεϊνών, σε pH μεγαλύτερο του 5 μετουσιώνεται και χάνει

την λειτουργικότητα της.⁴⁵ Επομένως η ύπαρξη εξαιρετικά όξινων (1,5-2) συνθηκών στο στομάχι κρίνεται απαραίτητη. Επίσης, στην εντερική φάση η παγκρεατική και τα χολικά υγρά συμβάλουν στην γαλακτωματοποίηση ή στην διάσπαση λιποδιαλυτών ενώσεων.⁴⁵ Για τα οργανικά συστατικά από την άλλη φαίνεται ότι το pH δεν έχει τόσο μεγάλη επίδραση, με εξαίρεση κάποιες οργανικές ενώσεις όπως καροτενοειδή, πολυφαινόλες όπου το όξινο pH όντως μπορεί να ευνοήσει την απορρόφηση.^{45,50}

1.7.2. ΧΡΟΝΟΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ (RESIDENCE TIME)

Ο χρόνος παραμονής, δηλαδή ο χρόνος που παραμένει το δείγμα στο κάθε διαμέρισμα (στομάχι και έντερο) αποτελεί έναν επίσης πολύ σημαντικό παράγοντα που πρέπει να ρυθμίζεται και να εξατομικεύεται για κάθε μέθοδο προσομοίωσης της πέψης, καθώς αποτελεί βασικό στοιχείο στην ολοκληρωμένη αναπαράσταση των φυσιολογικών ρυθμών λειτουργίας του στομάχου και του λεπτού εντέρου.⁵⁰ Οι Intawongse και Dean (2006) υποστήριξαν ότι συνολικά το δείγμα παραμένει στην γαστρική και την εντερική φάση για περίπου 2-3 ώρες.^{42,59} Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι χρόνος παραμονής των δειγμάτων κυμαίνεται στις 1-2 για την γαστρική φάση και στις 2-6 (2-4 είναι ο ιδανικός χρόνος καθώς δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση στην βιοπροσβασιμότητα) για την γαστρεντερική, ανάλογα με το μοντέλο που χρησιμοποιείται.⁵⁰ Έχει διαπιστωθεί ότι απόκλιση από τους παραπάνω χρόνους και αυξημένος χρόνος παραμονής είναι πιθανό να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της βιοπροσβασιμότητας.^{42,59} Ο χρόνος παραμονής επηρεάζεται και από άλλες μεταβλητές που σχετίζονται τόσο με το άτομο, όπως η ηλικία και το φύλο, όσο και με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων όπως το μέγεθος των σωματιδίων ή η σύσταση τους.⁴³ Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι τρόφιμα που είναι πλούσια σε λιπίδια απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα εντερικών ενζύμων όπως η λιπάση και καθυστερούν περισσότερο την ολοκλήρωση της πέψης.⁴³

1.7.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η κατανόηση της τροφικής μήτρας και των αλληλεπιδράσεών της με τα πεπτικά υγρά αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας. Ειδικότερα, για τα ανόργανα συστατικά έχει βρεθεί ότι παρουσία τροφής επηρεάζεται σημαντικά η βιοπροσβασιμότητα σε σύγκριση με καταστάσεις νηστείας.⁵⁰ Υπάρχουν για παράδειγμα περιπτώσεις όπου παρατηρείται αύξηση της βιοπροσβασιμότητας μετάλλων με την ύπαρξη σκόνης γάλακτος και περιπτώσεις όπου παρατηρείται μείωση παρουσία ζύμης.⁵⁰ Παρατηρείται ωστόσο μια ποικιλία στον τρόπο που επηρεάζεται η βιοπροσβασιμότητα. Για τα οργανικά συστατικά από την άλλη υπάρχει μεγαλύτερη συνέπεια και συγκεκριμένα παρουσιάζεται αύξηση στην βιοπροσβασιμότητα τους παρουσία τροφής.⁵⁰ Αυτό συμβαίνει γιατί η τροφή περιέχει συστατικά όπως λιπίδια που συμβάλλουν στην διάλυση και την γαλακτωματοποίηση τους.⁵⁰ Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η παρατήρηση της βιοπροσβασιμότητας των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών παρουσία λίπους.⁶⁰ Γενικά τροφές όπως το γάλα και το ψωμί, φαίνεται ότι είναι ικανά να τροποποιούν την έκκριση των βιοδραστικών συστατικών στα πεπτικά υγρά.^{42,59}

1.7.4. ΜΕΓΕΘΟΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Με τον όρο μέγεθος σωματιδίων γίνεται συνήθως αναφορά στο κλάσμα του δείγματος το οποίο μπορεί να διέρχεται μέσα από κόσκινο καθορισμένης διαμέτρου.^{42,50,59} Η παράμετρος αυτή παίζει καθοριστικό ρόλο στην αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας καθώς έμμεσα επιδρά στην επιφάνεια επαφής και κατ' επέκταση και στην διάρκεια της προσομοίωσης της πέψης. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι περισσότερες μέθοδοι προτιμούν ένα μέγεθος σωματιδίων < 250μm, καθώς αυτό είναι το ανώτερο μέγεθος σωματιδίων που είναι ικανό να προσκολλάται στα χέρια και να καταναλώνεται τυχαία.^{42,50,59}

1.8. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Τα αντιοξειδωτικά -τα οποία μελετώνται και στην παρούσα διπλωματική εργασία- συμπεριλαμβανομένου των πολυφαινόλων, των καροτενοειδών και των βιταμινών, αποτελούν τμήμα μιας ευρύτερης κατηγορίας βιοδραστικών συστατικών, τα οποία χάρη στην προστασία που παρέχουν λόγω της ικανότητας τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες κατέχουν σπουδαία διατροφική αξία.²⁹ Γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η εκτίμηση της βιοπροσβασιμότητας τους. Ωστόσο, η βιοπροσβασιμότητα δεν είναι ίδια για όλα τα είδη αντιοξειδωτικών και διαφοροποιείται ανάλογα με την επεξεργασία των τροφίμων, με την ύπαρξη άλλων μακροθρεπτικών συστατικών και την αλληλεπίδραση τόσο με αυτά τα συστατικά όσο και εν συνεχεία με τα πεπτικά υγρά.²⁹ Στις επόμενες υποενότητες γίνεται μια σύντομη αναφορά στα δεδομένα που έχουν προκύψει μέχρι σήμερα από διάφορες μελέτες σχετικά με την βιοπροσβασιμότητα των πολυφαινόλων, των καροτενοειδών και των βιταμινών.

1.8.1. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η βιοπροσβασιμότητα των πολυφαινόλων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και διαφοροποιείται από ένωση σε ένωση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες με βασικότερους την χημική τους κατάσταση, την αλληλεπίδραση τους με άλλα συστατικά του τροφικού πλέγματος και με τα πεπτικά υγρά καθώς και την επεξεργασία που έχουν υποστεί τα τρόφιμα.^{29,60} Οι πολυφαινόλες εντοπίζονται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών, εστέρων ή ως ενώσεις υψηλού πολυμερισμού, γεγονός που τις καθιστά μη απορροφήσιμες στην φυσική τους μορφή.^{18,60} Απαιτείται προηγουμένως υδρόλυση από τα εντερικά ένζυμα ή το μικροβίωμα του παχέος εντέρου.^{18,60} Επομένως, αυτές οι ενώσεις καθώς ξεκινάνε την πορεία τους προς την απορρόφηση περνούν αρχικά από το στόμα, όπου λόγω του μικρού χρόνου παραμονής τους δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα.⁶⁰ Συνεχίζουν προς το στομάχι όπου συνήθως παραμένουν άθικτες και φτάνουν τελικά στο λεπτό έντερο.^{18,60} Εκεί, μόνο οι αγλυκόνες και ορισμένες μονομερείς μορφές μπορούν να απορροφηθούν εύκολα, ενώ οι πολυμερείς χρειάζονται εκτεταμένη επεξεργασία για να απορροφηθούν που περιλαμβάνει διεργασίες όπως η μεθυλίωση και απογλυκοζυλίωση.^{18,29,45,60} Το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης συμβαίνει στο λεπτό έντερο ωστόσο, ένα ποσοστό

πολυφαινολών μπορεί να παραμείνει άπεπτο και να περάσει στο παχύ έντερο όπου μεταβολίζεται σε άλλες ενώσεις.^{18,60}

Η επεξεργασία των τροφίμων και η σύσταση της διατροφής παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στην βιοπροσβασιμότητα των πολυφαινολών.⁶⁰ Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη φυτικών ινών προκαλεί μείωση της βιοπροσβασιμότητας λόγω του εγκλωβισμού των πολυφαινολών στα τοιχώματα τους.⁶⁰ Εκτός από τις φυτικές ίνες και άλλα συστατικά των τροφίμων όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια μπορούν να οδηγήσουν σε τροποποίηση της βιοπροσβασιμότητας με τα τελευταία να έχει παρατηρηθεί ότι την αυξάνουν.⁶⁰ Τέλος, πειράματα έχουν δείξει ότι η θερμική επεξεργασία των τροφίμων οδηγεί σε αύξηση της βιοπροσβασιμότητας.²⁹

1.8.2. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Η βιοπροσβασιμότητα των καροτενοειδών επηρεάζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες παρόμοιους με αυτούς που επηρεάζουν τις πολυφαινόλες. Ειδικότερα, το τροφικό πλέγμα, η επεξεργασία των τροφίμων και η παρουσία άλλων μακροθρεπτικών συστατικών στην δίαιτα επιδρούν στην απορρόφηση των καροτενοειδών.^{29,61} Ένας από τους πιο επιδραστικούς παράγοντες είναι η παρουσία λίπους καθώς, το λίπος συμβάλει στον σχηματισμό μικκυλίων τα οποία με την σειρά τους προωθούν την διαλυτοποίηση των λιποδιαλυτών καροτενοειδών και την μεταφορά τους εντός του γαστρεντερικού σωλήνα.^{29,61} Υπάρχουν όμως και συστατικά τα οποία μπορούν να προσληφθούν ταυτόχρονα μέσω της τροφής και τα οποία παρεμποδίζουν την μικκυλίωση, μειώνοντας κατά συνέπεια την βιοπροσβασιμότητα των καροτενοειδών.^{45,61} Τέτοια συστατικά είναι οι φυτικές ίνες, οι στερόλες και οι στανόλες.^{45,61}

Τα καροτενοειδή στο τροφικό πλέγμα εντοπίζονται συνήθως συνδεδεμένα με πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα. Διάφορες τεχνικές επεξεργασίας τροφίμων, όπως το μαγείρεμα, η παστερίωση και τα μικροκύματα, προάγουν την διάσπαση αυτών των συμπλόκων, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την βιοπροσβασιμότητα των καροτενοειδών.^{45,61} Ωστόσο, αν και τα καροτενοειδή υπάρχουν σε αφθονία στην διατροφή, τελικά έχουν περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα και μόνο ένα μικρό ποσοστό είναι διαθέσιμο για απορρόφηση.²⁹

1.8.3. ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

Η βιταμίνη C είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι διαθέσιμο για απορρόφηση στο λεπτό έντερο. Συγκεκριμένα, η βιταμίνη C γνωστή και ως ασκορβικό οξύ απορροφάται κυρίως σε δυο συγκεκριμένα τμήματα του λεπτού εντέρου, στην νηστίδα και στον ειλεό.⁴⁵

Απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφηση της βιταμίνης E είναι η διάλυση της και η ενσωμάτωσή της σε μικκύλια, όμοια με τα καροτενοειδή.^{29,45} Η βιταμίνη E δεν διαλύεται ούτε απορροφάται στο στομάχι, αλλά μπορεί να απορροφηθεί παθητικά με την συμβολή παγκρεατικών ενζύμων στο έντερο και στην συνέχεια να αποθηκευτεί στο ήπαρ.⁴⁵

Η βιοπροσβασιμότητα της βιταμίνης D επηρεάζεται κατά βάση από την παρουσία λιπαρών συστατικών, όχι τόσο από την ποσότητά τους, αλλά κυρίως από το είδος της λιπαρής ουσίας.⁴⁵ Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν αναδείξει ότι η ύπαρξη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στην διατροφή οδηγεί σε αύξηση της βιοπροσβασιμότητας της βιταμίνης D σε αντίθεση με τα πολυακόρεστα.⁴⁵

1.9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ NMR ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η κατανόηση των μεταβολικών διεργασιών που πραγματοποιούνται στον οργανισμό και οδηγούν τελικά στην απορρόφηση και τον μεταβολισμό βιοδραστικών συστατικών και μεταβολιτών τους, παίζει σημαντικό ρόλο στην καλύτερη αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας. Σε αυτό πλαίσιο ένα από τα καταλληλότερα εργαλεία για το σκοπό αυτό είναι η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR.⁶² Το NMR αποτελεί μια από τις βασικότερες τεχνικές η οποία αξιοποιεί τις μαγνητικές ιδιότητες ορισμένων πυρήνων όπως ^1H και ^{13}C παρουσία ισχυρού μαγνητικού πεδίου παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την δομή, την σύσταση και την αλληλεπίδραση των μορίων σε βιολογικά δείγματα.⁶² Ειδικότερα η φασματοσκοπία πρωτονίου ^1H - NMR επιτρέπει την μη καταστροφική και επαναλήψιμη ανάλυση ενός μεγάλου πλήθους μεταβολιτών συγχρόνως, γεγονός που την καθιστά ιδανική για την διερεύνηση του μεταβολικού αποτυπώματος που προκύπτει μετά την πρόσληψη βιοδραστικών ενώσεων.^{63–65} Μέσω της ανάλυσης των φασμάτων ^1H -NMR, είναι δυνατός ο εντοπισμός διαφορών στη συγκέντρωση μεταβολιτών που αντανακλούν φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις.⁶⁶

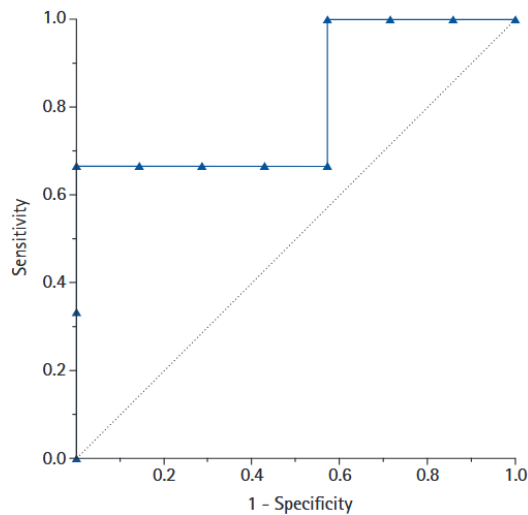
Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις αναλύσεις NMR χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη πολυπλοκότητα και μεγάλο αριθμό μεταβλητών, για αυτόν τον λόγο απαιτείται για την ερμηνεία τους η χρήση εξειδικευμένων στατιστικών εργαλείων, γνωστά ως τεχνικές πολυπαραγοντικής ανάλυσης MVA (multivariate analysis). Η πολυπαραγοντική ανάλυση επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία όλων των μεταβλητών και κυρίως παρέχει την δυνατότητα εντοπισμού μεταβολικών διαφορών μεταξύ ομάδων (π.χ. πριν και μετά την πέψη).^{62,67,68}

Μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους πολυπαραγοντικής ανάλυσης, είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών PCA (Principal Component Analysis). Η PCA είναι μια μη επιβλεπόμενη πολυπαραγοντική μέθοδος ανάλυσης η οποία εφαρμόζεται για την οπτική απεικόνιση των διαφορών μεταξύ δειγμάτων που έχουν τα ίδια συστατικά. Αυτό το κάνει μέσω του μετασχηματισμού του αρχικού συνόλου των μεταβλητών σε ένα σύνολο γραμμικά εξαρτημένων κύριων συνιστωσών, επιτρέποντας την αναγνώριση των μεταβολών ανάμεσα στα δείγματα και την ομαδοποίηση τους σύμφωνα με το μεταβολικό τους αποτύπωμα.⁶⁹ Όσον αφορά την βιοπροσβασιμότητα, η PCA έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάδειξη των μεταβολικών μεταβολών που προκαλούνται από την πρόσληψη βιοδραστικών συστατικών,

προσφέροντας μια αρχική εκτίμηση των σχετικών βιοχημικών μηχανισμών^{69,70}. Μέσω της PCA λαμβάνονται πληροφορίες τόσο για την ομαδοποίηση των δειγμάτων μέσα από την ερμηνεία των *score plots*, όσο και για το ποιες είναι οι μεταβλητές που οφείλονται για αυτή την ομαδοποίηση μέσα από την ερμηνεία των *loading plots*.^{65,66}

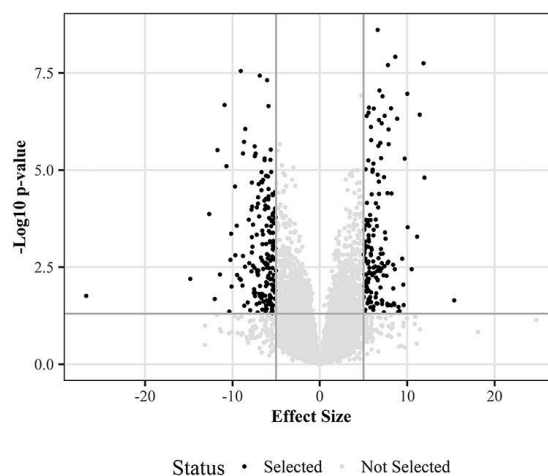
Για περαιτέρω αύξηση της διακριτικής ικανότητας χρησιμοποιείται η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS (Partial Least Squares) και η διακριτική εκδοχή της PLS-DA (Partial Least Squares–Discriminant Analysis). Η PLS-DA σε αντίθεση με την PCA είναι μια επιβλεπόμενη μέθοδος η οποία στοχεύει στον εντοπισμό μεταβολιτών με υψηλή διακριτική ισχύ ανάμεσα σε προκαθορισμένες ομάδες, χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες πληροφορίες για τις ετικέτες των ομάδων⁷¹. Άρα, φαίνεται ότι για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων το ιδανικό και πιο ασφαλές είναι να γίνεται πρώτα ανάλυση των δεδομένων με την PCA, για μία πιο γενική διερεύνηση των δειγμάτων, χωρίς να είναι γνωστό σε ποια ομάδα ανήκουν και στην συνέχεια να ακολουθεί και ανάλυση PLS-DA, όπου θα είναι γνωστό σε ποια ομάδα ανήκουν τα δείγματα και θα εξετάζεται η διαφορά των μεταβολιτών σε αυτές τις γνωστές πλέον ομάδες.

Η ακρίβεια των παραπάνω μοντέλων ταξινόμησης είναι δυνατόν να αξιολογηθεί με την χρήση των λεγόμενων καμπύλων λειτουργικού χαρακτηρισμού δείκτη - ROC (Receiver Operating Characteristic), οι οποίες αναδεικνύουν την σχέση μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας για κάθε μεταβολικό δείκτη.⁷² Συγκεκριμένα, σε μία καμπύλη ROC σαν αυτή του Σχήματος 5 φαίνεται η ειδικότητα- «specificity», δηλαδή το ποσοστό των ψευδώς θετικών τιμών (άξονας x), σε συνάρτηση με την ευαισθησία- «sensitivity», δηλαδή το ποσοστό των αληθώς θετικών τιμών (άξονας y) ενός μοντέλου ταξινόμησης για κάθε έναν βιοδείκτη.⁶⁷ Στην συνέχεια, μετράται το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη AUC. Όσο η τιμή πλησιάζει το 1 τόσο πιο ακριβής είναι η ταξινόμηση και αντίστοιχα αξιόπιστο είναι το μοντέλο που αξιολογείται, ενώ όσο πλησιάζει στο 0.5 τόσο πιο τυχαία είναι η ταξινόμηση.⁶⁷



Σχήμα 5. : Τυπική μορφή μια καμπύλης ROC ⁶⁶

Παράλληλα, υπάρχει και ακόμα μία διαδικασία γνωστή για τον ταυτόχρονο έλεγχο δύο παραμέτρων. Η μέθοδος αυτή αναλύει τα λεγόμενα *volcano plots*, τα οποία αξιολογούν τόσο την στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των μεταβολιτών, όσο και το μέγεθος αυτής της διαφοράς.⁷³ Συγκεκριμένα, τα volcano plots είναι διαγράμματα διασποράς, όπου ο άξονας x δείχνει την στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών (p-values) έναντι του άξονα y ο οποίος δείχνει το μέγεθος αυτής της μεταβολής.⁷³ Όσο πιο ψηλά στο διάγραμμα εντοπίζεται μια κουκίδα, η διαφορά αυτού του μεταβολίτη είναι στατιστικά σημαντική, ενώ αν είναι τέρμα δεξιά ή αριστερά η διαφορά αυτή είναι μεγάλη ή μικρή αντίστοιχα. Αντιθέτως, αν η κουκίδα εντοπίζεται στην αρχή του διαγράμματος και χαμηλά, ο μεταβολίτης δεν αλλάζει σχεδόν καθόλου ή η διαφορά του δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο Σχήμα 6, παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός volcano plot και της ερμηνείας των σημμάτων του.



Σχήμα 6 : Παράδειγμα ενός volcano plot (πιο ασθενή εμφανίζονται τα σήματα των μεταβολιτών οι οποίοι είτε δεν αλλάζουν είτε η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική) ⁷³

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάλυση των τροφίμων και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά βρίσκεται στο επίκεντρο των ακαδημαϊκών και βιομηχανικών ερευνών εδώ και πολλές δεκαετίες λόγω της σημασίας των τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς, έχει αναπτυχθεί πληθώρα αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό συστατικών των τροφίμων είτε ως συγκεκριμένες ενώσεις (βιταμίνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, μεταλλικά ιόντα, φαινολικές ενώσεις κ.λπ.), είτε ως κατηγορίες ενώσεων (ολικά αντιοξειδωτικά, ολικά φλαβονοειδή κ.λπ.).⁷⁴⁻⁷⁷ Ωστόσο, οι περισσότερες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων που εφαρμόζονται για την ανάλυση των τροφίμων στηρίζονται στην αποσύνθεση της τροφικής μήτρας, με σκοπό την απελευθέρωση των συστατικών στο μέσο εκχύλισης (π.χ. οργανικοί διαλύτες, υπερκρίσιμα ρευστά ή ανόργανα οξέα).^{76,77} Αυτή η προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών-στόχων, αλλά απαιτεί αυστηρές συνθήκες οι οποίες δεν είναι συμβατές με τις φυσιολογικές συνθήκες που απαντώνται κατά την διάρκεια της ανθρώπινης πέψης. Επομένως, παρόλο που αυτές οι μέθοδοι παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ολική σύσταση των τροφίμων, δεν παρέχουν σαφή δεδομένα για την απελευθέρωση αυτών των συστατικών στον γαστρεντερικό σωλήνα και την πιθανή βιοδιαθεσιμότητα και βιοπροσβασιμότητά τους στον οργανισμό.

Προκειμένου να καλυφθεί αυτή η ανάγκη, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που προσομοιώνουν την γαστρεντερική πέψη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* δοκιμές σε ανθρώπους και ζώα για την προσομοίωση και την αξιολόγηση της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού, της απέκκρισης και της τοξικότητας σε συνθήκες πανομοιότυπες ή παρόμοιες με αυτές που επικρατούν στο ανθρώπινο σώμα.^{29,31,78} Ωστόσο, λόγοι που σχετίζονται με την μεγάλη διάρκεια των ερευνών, το υψηλό κόστος, τη χαμηλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων καθώς και ηθικοί λόγοι οδήγησαν στην ανάπτυξη *in vitro* μεθόδων.^{31,33,43} Αυτές οι μέθοδοι αποσκοπούν στην όσο το δυνατόν πιο πιστή αναπαράσταση της κύριας ακολουθίας των φυσικοχημικών διεργασιών και των συνθηκών εντός του γαστρεντερικού σωλήνα με την χρήση χημικών μοντέλων και χωρίς την συμμετοχή ζωντανών οργανισμών, μετριάζοντας με αυτόν τον τρόπο πολλά από τα μειονεκτήματα των *in vivo* μεθόδων.^{29,31,33,43,78} Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται συνθετικά πεπτικά υγρά (σάλιο, γαστρικό υγρό,

δωδεκαδακτυλικό υγρό και χολή), των οποίων η χημική σύσταση ρυθμίζεται ώστε να είναι παρόμοια με αυτή της ανθρώπινης φυσιολογίας, σε συνθήκες που ταιριάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο με αυτές που συναντώνται στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν αρκετές διαφορές ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους που δεν επιτρέπουν την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων ακόμα και κατά την ανάλυση παρόμοιων ειδών.^{29,31,33,43}

Παρά τις εξελίξεις αυτές, η έλλειψη συνεκτίμησης της συμβολής της μικροβιακής χλωρίδας και η δυναμική φύση της ανθρώπινης πέψης μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση ή υπερεκτίμηση της βιοπροσβασιμότητας ορισμένων συστατικών των τροφίμων από τα *in vitro* μοντέλα προσομοίωσης της πέψης.^{29,79} Έχουν αναπτυχθεί επομένως πιο προηγμένα εργαλεία, βασισμένα στην αρχή των «omics», ως απάντηση στην πρόκληση για μια πιο ολιστική προσέγγιση στην έρευνα για την βιοπροσβασιμότητα των τροφίμων. Στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων, η *Foodomics*, ως μια σύνθετη προσέγγιση που συνδυάζει διάφορες *omics* τεχνολογίες, παρέχει σημαντικές βελτιώσεις στις μελέτες της *in vitro* αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας, συμβάλλοντας στην διαλεύκανση των πολύπλοκων βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της πέψης. Κατ'αυτόν τον τρόπο, η *Foodomics*, μπορεί να ταυτοποιήσει συγκεκριμένους μεταβολίτες που απελευθερώνονται κατά την διάρκεια της πέψης και οι οποίοι μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών⁸⁰ και να επιτρέψουν την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των τροφίμων και των βιολογικών συστημάτων σε μοριακό επίπεδο⁸⁰⁻⁸². Αυτή η προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει σε πιο συνεπή αξιολόγηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των τροφίμων και της γαστρεντερικής πέψης, βελτιώνοντας έτσι την αξιοπιστία των μεθόδων αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας και παρέχοντας βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην απελευθέρωση και την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών των τροφίμων.^{81,83,84}

Ανάμεσα στα πιο δημοφιλή είδη τροφίμων είναι τα φρούτα, τα οποία συμβάλλουν σε μια ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή. Για τον λόγο αυτό έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες μελέτες τόσο για τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης των φρούτων⁸⁵⁻⁸⁷, όσο και για την εκτίμηση της βιοπροσβασιμότητας σημαντικών συστατικών των φρούτων.^{29,88-90} Τα φρούτα μπορούν να καταναλωθούν και με την μορφή χυμού, γεγονός που τα καθιστά ένα από τα πιο δημοφιλή προϊόντα παγκοσμίως. Ωστόσο, λόγω της σύντομης διάρκειας ζωής τους, μεγάλες ποσότητες χυμών

παστεριώνονται για να καταστεί δυνατή η μακροχρόνια συντήρηση και αποθήκευσή τους. Σε μερικές περιπτώσεις, οι χυμοί υποβάλλονται σε πρόσθετες μεθόδους επεξεργασίας, όπως αποστείρωση ή διαδικασίες ελαφριάς επεξεργασίας.⁹¹ Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια των βιοδραστικών ενώσεων και την μείωση της ποιότητας και των ευεργετικών επιδράσεων τους σε σύγκριση με τα φρέσκα ανάλογά τους, καθιστώντας απαραίτητη την προσθήκη πρόσθετων (π.χ. βιταμίνες, ζάχαρη κ.λπ.) προκειμένου να αυξηθεί η θρεπτική τους αξία. Σε κάθε περίπτωση, η παστερίωση και η επεξεργασία των χυμών με ή χωρίς την προσθήκη πρόσθετων για την βελτίωση της ποιότητάς τους, μπορεί να δυσκολέψει την αξιολόγηση των ευεργετικών επιδράσεων τους, καθώς ορισμένες παράμετροι που σχετίζονται με την ποιότητα (για παράδειγμα αντιοξειδωτική δράση, κατάσταση οξειδωτικού στρες, επίπεδα βιταμίνης C κ.λπ.) ενδέχεται να φαίνονται ισοδύναμες με αυτές των φρέσκων χυμών, ενώ άλλες (π.χ. επίπεδα σακχάρων, φαινολικές ενώσεις) να διαφέρουν σημαντικά.⁹¹⁻⁹³ Ωστόσο, με εξαίρεση τις ολικές συγκεντρώσεις, τα περισσότερα πρόσθετα και οι συνθετικές βιταμίνες εμφανίζουν μειωμένη βιολογική δραστηριότητα συγκριτικά με τα φυσικά τους ανάλογα και ως εκ τούτου παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις.^{93,94}

Αξιοποιώντας τον συνδυασμό των *in vitro* μελετών βιοπροσβασιμότητας και της διατροφικής μεταβολομικής με βάση την φασματομετρία NMR, η παρούσα εργασία στοχεύει στην επαναξιολόγηση των ωφελειών που προκύπτουν από την κατανάλωση χυμών και φρέσκων φρούτων. Για τον σκοπό αυτό, αξιολογήθηκε αρχικά *in vitro* η βιοπροσβασιμότητα των φαινολικών, των φλαβονοειδών και η αντιοξειδωτική δράση σε φρέσκα φρούτα και χυμούς. Η σχετική αφθονία σημαντικών συστατικών των φρούτων (όπως σάκχαρα, βιταμίνες, λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας και μικρά μόρια) προσδιορίστηκε περαιτέρω με την χρήση NMR μέσω μη στοχευμένης σε κάθε βήμα της διαδικασίας της ανθρώπινης πέψης (γαστρική και γαστρεντερική πέψη). Με βάση αυτά τα δεδομένα, εντοπίστηκαν διαφορές και ομοιότητες στην βιοπροσβασιμότητα και το μεταβολικό προφίλ μεταξύ φρούτων, φρέσκων χυμών, χυμών μακράς διάρκειας και μιγμάτων φρέσκων χυμών, οι οποίες επιτρέπουν την σαφή διαφοροποίηση τους. Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρέχει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την αξιολόγηση των ωφελειών στην υγεία που προκύπτουν από την κατανάλωση προϊόντων φρούτων και υποστηρίζει την ανάπτυξη εργαλείων για τον προσδιορισμό της σύνθεσης συγκεκριμένων μητρών με βάση τα φρούτα.

2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Όλα τα αντιδραστήρια (άλατα και οργανικά χημικές ουσίες) ήταν τουλάχιστον αναλυτικής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από βασικούς προμηθευτές. Για την προσομοίωση της ενζυμικής σύνθεσης των γαστρικών και γαστρεντερικών υγρών χρησιμοποιήθηκαν άλφα αμυλάση (*Bacillus* sp. ≥ 1500 μονάδες/mg πρωτεΐνης, Merck), βλεννίνη (από στομάχι χοίρου, τύπος II, Sigma-Aldrich), πεψίνη (από γαστρικό βλεννογόνο χοίρου, ≥ 500 U/mg, Merck), αλβουμίνη (ή λευκωματίνη) ορού βοοειδών (Sigma-Aldrich), λιπάση (από πάγκρεας χοίρου, >150 μονάδες/mg πρωτεΐνης, Sigma-Aldrich), παγκρεατίνη (από πάγκρεας χοίρου, 350 FIP-U/g πρωτεάση, 6000 FIP-U/g λιπάση, 7500 FIP-U/g αμυλάση, Merck) και χολή (από πάγκρεας χοίρου Sigma).

Τα υγρά με φυσιολογική συνάφεια με τα αντίστοιχα σωματικά υγρά παρασκευάστηκαν από ανόργανα άλατα, οργανικά αντιδραστήρια και πεπτικά ένζυμα.⁹⁵ Το σάλιο αποτελούταν από 900 mg L^{-1} KCl, 300 mg L^{-1} NaCl, 890 mg L^{-1} NaH_2PO_4 , 200 mg L^{-1} KSCN, 570 mg L^{-1} Na_2SO_4 , $1,8 \text{ mL L}^{-1}$ NaOH 1M, 200 mg L^{-1} ουρία, 15 mg L^{-1} ουρικό οξύ, 1350 mg L^{-1} άλφα αμυλάση και 50 mg L^{-1} βλεννίνη με τελικό pH $6,5 \pm 0,5$.

Η σύσταση του γαστρικού υγρού ήταν η εξής : 820 mg L^{-1} KCl, 270 mg L^{-1} NaH_2PO_4 , 2750 mg L^{-1} NaCl, 400 mg L^{-1} CaCl_2 , 310 mg L^{-1} NH_4Cl , $8,3 \text{ mL L}^{-1}$ HCl 37%, 85 mg L^{-1} ουρία, 650 mg L^{-1} γλυκόζη, 20 mg L^{-1} γλυκουρονικό οξύ, 330 mg L^{-1} υδροχλωρική γλυκοζαμίνη, 3000 mg L^{-1} βλεννίνη, 1000 mg L^{-1} πεψίνη και 1000 mg L^{-1} αλβουμίνη ορού βοοειδών BSA, με τελικό pH $1,1 \pm 0,1$.

Το δωδεκαδακτυλικό υγρό αποτελείται από 565 mg L^{-1} KCl, 7000 mg L^{-1} NaCl, 5610 mg L^{-1} NaHCO_3 , 80 mg L^{-1} KH_2PO_4 , 50 mg L^{-1} MgCl_2 , 200 mg L^{-1} CaCl_2 , $0,18 \text{ mL L}^{-1}$ HCl 37%, 100 mg L^{-1} ουρία, 1000 mg L^{-1} BSA, 500 mg L^{-1} λιπάση και 3000 mg L^{-1} παγκρεατίνη με ρύθμιση του pH στο $7,4 \pm 0,2$.

Τέλος, το υποκατάστατο του χολικού υγρού παρασκευάστηκε με ανάμιξη 380 mg L^{-1} KCl, 5260 mg L^{-1} NaCl, 5790 mg L^{-1} NaHCO_3 , 220 mg L^{-1} CaCl_2 , $0,18 \text{ mL L}^{-1}$ HCl 37%, 250 mg L^{-1} ουρίας, 1800 mg L^{-1} BSA και 6000 mg L^{-1} χολής και το pH ρυθμίστηκε στο $8,0 \pm 0,2$.

Κάθε βιομιμητικό υγρό αναδεύτηκε για 4 ώρες στους 37°C ώστε να αναμειχθούν τα συστατικά και στην συνέχεια διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου όλη το βράδυ.

Πριν την χρήση, τα υγρά επωάστηκαν στους 37 °C για 90 λεπτά με σκοπό την ενεργοποίηση των ενζύμων.

2.2.2. IN VITRO ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ

Για τα πειράματα ζυγίστηκαν 1mL χυμού ή 1g (χωρίς ξήρανση) αποφλοιωμένων και πολτοποιημένων φρέσκων φρούτων σε φιάλες πολυπροπυλενίου (50mL). Για την προσομοίωση της γαστρικής πέψης προστέθηκαν αρχικά 4,5mL διαλύματος σάλιου (S) και το μίγμα αναδεύτηκε χειροκίνητα για 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν 6,75mL γαστρικού υγρού (G), το pH ρυθμίστηκε στο $1,2 \pm 0,05$ με την χρήση HCl και το μίγμα επωάστηκε για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση σε αναδευτήρα end-over-end. Η γαστρική εκχύλιση ολοκληρώθηκε με φυγοκέντρηση της φιάλης στα 4500 g για 15 λεπτά, συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος (γαστρικό βιοπροσβάσιμο κλάσμα) και οξίνιση αυτού με 250μL πυκνού HNO₃.

Για την διαδικασία της γαστρεντερικής πέψης, ένα ξεχωριστό σύνολο δειγμάτων υποβλήθηκε αρχικά σε επεξεργασία όπως παραπάνω με την προσθήκη σάλιου και γαστρικού υγρού για την προσομοίωση της γαστρικής πέψης. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 13,5 mL δωδεκαδακτυλικού και 4,5 mL χολικού υγρού, το pH ρυθμίστηκε στο $6,3 \pm 0,5$ με NaOH και οι φιάλες επωάστηκαν στους 37 °C υπό ανάδευση σε αναδευτήρα end-over-end. Για τον τερματισμό της ενζυμικής πέψης, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 4500 g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο (γαστρεντερικό βιοπροσβάσιμο κλάσμα) οξινίστηκε με 500 μL πυκνού HNO₃.

2.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ (ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ FOLIN-CIOCALTEU)

Ποσότητες από τα οξινισμένα γαστρικά και γαστρεντερικά υπερκείμενα (50-500μL) αναμίχθηκαν με 0,8 mL Na₂CO₃ (7,5% w/v) και μετά από 5 λεπτά προστέθηκε 1mL Folin-Ciocalteu 5%. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 5mL και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 40 λεπτά. Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε στα 765nm έναντι του τυφλού διαλύματος. Δεδομένου ότι οι διαφορετικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στην μέθοδο

Folin-Ciocalteu, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (δηλαδή, mg γαλλικού οξέος ανά g δείγματος)

2.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ (ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ CUPRAC)

Η δοκιμή CUPRAC για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την προηγούμενη μελέτη.²¹ Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα μίγμα αντίδρασης που περιείχε 1mL CuCl_2 (10^{-2} M), 1mL νεοκουπροΐνης ($7,5 \times 10^{-3}$ M) και 1mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (pH 7, 1M). Σε αυτό το δείγμα προστέθηκαν 50-1000μL δείγματος (ή πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος) για να προκύψει τελικός όγκος 4mL και η απορρόφηση καταγράφηκε στα 450nm έναντι του τυφλού διαλύματος. Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (δηλαδή, mg γαλλικού οξέος ανά g δείγματος).

2.2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή βασίστηκε στον σχηματισμό ενός συμπλόκου φλαβονοειδούς-αργιλίου. Πιο συγκεκριμένα, ποσότητες του εκχυλίσματος (35,5-1775 μL) ή πρότυπων διαλυμάτων κουερσετίνης αραιώθηκαν κατάλληλα με διπλά απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 1,775 mL. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 75μL NaNO_2 5% και το μίγμα επώαστηκε στο σκοτάδι για 6 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 150μL AlCl_3 10% και μετά από 5 λεπτά 0,5 mL NaOH 1mM για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος στα 2,5 mL. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 355 nm έναντι τυφλού διαλύματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα κουερσετίνης (δηλαδή, mg κουερσετίνης ανά g δείγματος).

2.2.6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ NMR-ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ^1H NMR

Τα δείγματα NMR κάθε μήτρας παρασκευάστηκαν με την χρήση του κοινώς χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού διαλύματος ούρων [ρυθμιστικό διάλυμα ούρων: 1,5 M KH_2PO_4 διαλυμένο σε 99,9% $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4, 2 mM NaN_3 και 5,8 mM 3-(τριμέθυλοσισουλ)προπιονικό οξύ- d_4 (TSP)] για μεταβολομική. Τα δείγματα αποτελούνταν από 10% ρυθμιστικό διάλυμα και 90% του προς ανάλυση μίγματος. 600 μL του μείγματος μεταφέρθηκαν σε σωλήνες NMR των 5mm. Τα φάσματα ^1H NMR όλων των δειγμάτων αποκτήθηκαν με την χρήση φασματομέτρου Bruker 500 MHz (Bruker BioSpin) με ενσωματωμένη cryoprobe 5 mm. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους $300 \pm 0,1$ K. Για κάθε δείγμα NMR, πραγματοποιήθηκε ένα ^1H NMR πείραμα με αυτοματισμό: η τυπική παλμική ακολουθία 1D-NOESY με την καταστολή του σήματος του H_2O (Bruker pulse sequence: noesygppr1d). Τα FID πολλαπλασιάστηκαν με μια εκθετική συνάρτηση ισοδύναμη με μια διεύρυνση εύρους κορυφής 0,3 Hz πριν από την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier. Όλα τα φάσματα μετασχηματισμού Fourier διορθώθηκαν αυτόματα (ή χειροκίνητα όπου χρειάστηκε) για αλλοιώσεις φάσης και βάσης και χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς το TSP.

2.2.7. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ- ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ/ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Πριν από την μη στοχευμένη πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, τα φάσματα NMR ομαδοποιήθηκαν σε ισομεγέθη διαστήματα των 0,02 ppm με την του αλγορίθμου (create_buckets.m) Matlab (https://github.com/pantakis/SMoIESY_platform). Οι στοχευμένες αναλύσεις επιβεβαιώθηκαν μέσω SMoIESY⁹⁶ και SMoIESY-select⁹⁷ για την υποστήριξη της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών αντίστοιχα, μέσω του λογισμικού MATLAB (MathWorks, version R2021b).

2.2.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις (π.χ. PCA, PLS-DA) πραγματοποιήθηκαν από το PLS_toolbox 9.0 (www.eigenvector.com) στο λογισμικό MATLAB (MathWorks, version R2021b). Για τις μη στοχευμένες και υπό επίβλεψη αναλύσεις, τα χαρακτηριστικά των δεδομένων υποβλήθηκαν σε κεντράρισμα ως προς τον μέσο όρο (mean-centering) και μοναδιαία διακύμανση (unit-variance scalling). Όλα τα μοντέλα πολυπαραγοντικής ανάλυσης (MVA) και τα αναφερόμενα στατιστικά τους εξήχθησαν μέσω διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) με την μέθοδο leave-two-out και η διαδικασία επαναλήφθηκε τουλάχιστον 5 φορές. Οι μονοπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με ενσωματωμένο statistical toolbox του λογισμικού MATLAB (MathWorks, έκδοση R2021b) , καθώς και με το GraphPad Prism 10.5.

2.2.9. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Φρέσκοι και μακράς διάρκειας χυμοί, καθώς και φρέσκα φρούτα (μπανάνα και μήλο) από μη βιολογικές καλλιέργειες, προμηθεύτηκαν από τοπικά καταστήματα. Τα δείγματα προέρχονταν από ευρέως διαθέσιμες εμπορικές μάρκες και επιλέχθηκαν με βάση τη δημοτικότητα τους, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη η χώρα προέλευσης, η περίοδος συγκομιδής, η επεξεργασία ή η προσθήκη πρόσθετων (π.χ. βιταμίνες, συντηρητικά, αρώματα κ.λπ.).

Οι χυμοί ανακινήθηκαν και ελήφθη 1 mL με την χρήση αυτόματης πιπέτας. Τα φρέσκα φρούτα πολτοποιήθηκαν και 1 gr φρούτου (σε υγρή βάση) εκχυλίστηκε σε 10 mL μεθανόλης με την βοήθεια υπερήχων για 20 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχθηκε το υπερκείμενο, ενώ το υπόλειμμα εκχυλίστηκε δύο φορές ακόμα με τον ίδιο τρόπο (συνολικά η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές). Τα υπερκείμενα αναμείχθηκαν ώστε να προκύψει τελικός όγκος 30 mL. Για τις μελέτες NMR τα πολτοποιημένα φρούτα διαλύθηκαν σε 30 mL απεσταγμένου νερού και αναδεύτηκαν σε αναδευτήρα end-over-end για 15 λεπτά.

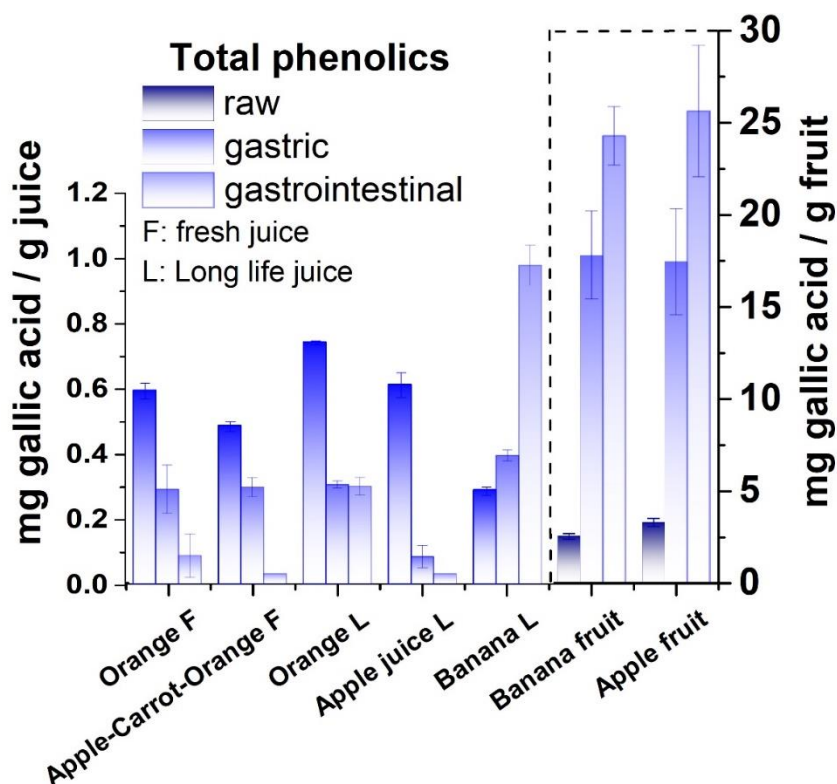
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ, ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΡΟΥΤΩΝ ΚΑΙ ΧΥΜΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ

Το συνολικό προφίλ του βιοπροσβάσιμου κλάσματος φαινολικών, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών καθώς και της ικανότητας δέσμευσης ριζών απεικονίζεται στα ραβδογράμματα των Σχημάτων 7-9. Οι αναφερόμενες τιμές υπολογίστηκαν αφαιρώντας τις τιμές που προσδιορίστηκαν στα τυφλά δείγματα (γαστρικά και γαστρεντερικά υγρά χωρίς δείγμα).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, η συγκέντρωση των φαινολικών σε χυμούς και φρούτα ακολουθεί διαφορετικά πρότυπα. Στους χυμούς η συγκέντρωση των φαινολικών μειώνεται στην γαστρική και εντερική φάση, ενώ στα ολόκληρα φρούτα η συγκέντρωση των φαινολικών αυξάνεται. Παρόμοια τάση παρατηρείται και στον χυμό μπανάνας, πιθανώς επειδή στην περίπτωση του χρησιμοποιείται ολόκληρο το φρούτο (ως πολτός αραιωμένος σε νερό) για την παρασκευή του. Η αύξηση των φαινολικών στο γαστρικό εκχύλισμα φρούτων (και στον χυμό μπανάνας) μπορεί να αποδοθεί στην διάσπαση των κυτταρικών δομών της μήτρας του φρούτου και στην απελευθέρωση φαινολικών που είναι δεσμευμένα σε πρωτεΐνες, ίνες και υδατάνθρακες εξαιτίας του χαμηλού pH και της δράσης των ενζύμων στην γαστρική πέψη.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Στην εντερική φάση, οι δεσμευμένες φαινολικές ενώσεις που αντέχουν το όξινο γαστρικό περιβάλλον υδρολύονται από τρυψίνη, λιπάση και χολή (για παράδειγμα φαινολικές ενώσεις εστεροποιημένες με σάκχαρα ή οργανικά οξέα) απελευθερώνοντας φαινολικές ενώσεις και προκαλώντας αύξηση της μετρούμενης TPC.¹⁰¹⁻¹⁰³

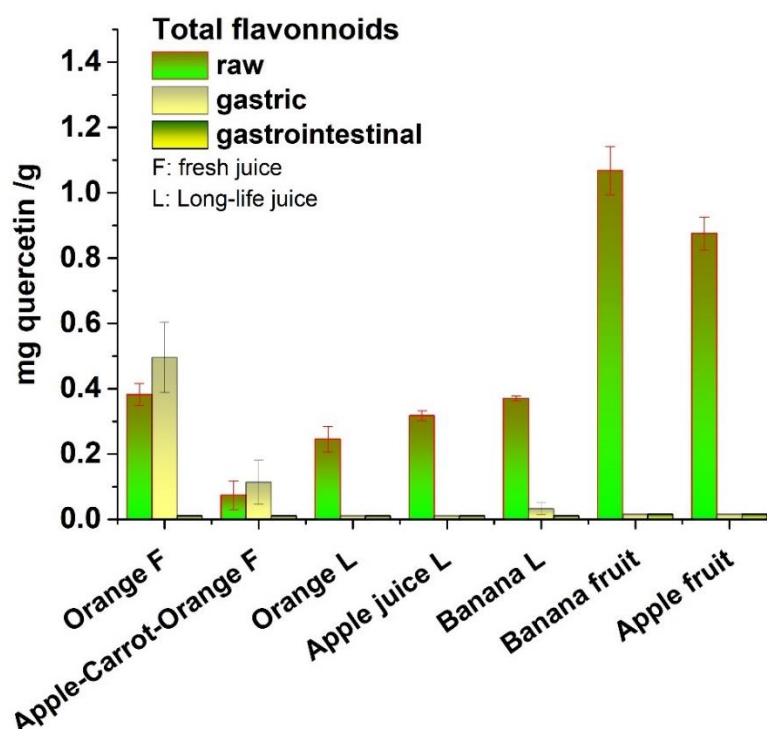
Αντίθετα, οι διαλυμένες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στους χυμούς ενδέχεται να υποστούν μείωση της διαλυτότητάς τους εξαιτίας πρωτονίωσης στο εξαιρετικά όξινο περιβάλλον ή δομικών αλλαγών λόγω όξινης ή αλκαλικής υδρόλυσης.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η βιοπροσβασιμότητα των φαινολικών δεν σχετίζεται πάντα με την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο αρχικό δείγμα,¹⁰⁹ αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την μήτρα ακόμα και αν προέρχονται από το ίδιο είδος. Ωστόσο, διαφαίνεται ότι η κατανάλωση νωπών φρούτων είναι πιο ευεργετική όσον αφορά την απελευθέρωση και την βιοπροσβασιμότητα των φαινολικών στο γαστρεντερικό σωλήνα σε σύγκριση με τους χυμούς.



Σχήμα 7: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στο αρχικό δείγμα καθώς και στο γαστρικό και το γαστρεντερικό εκχύλισμα

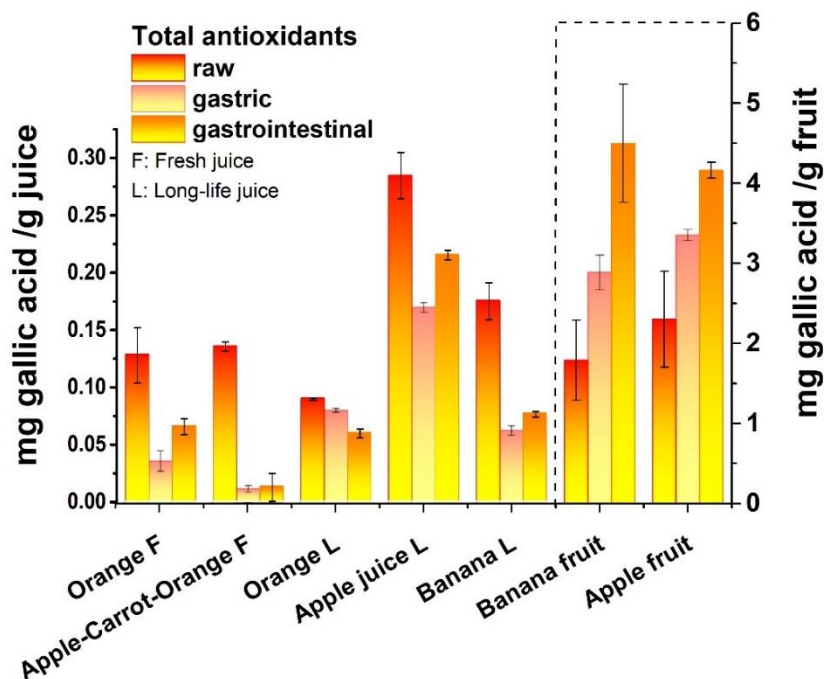
Όσον αφορά τα φλαβονοειδή (Σχήμα 8.), η βιοπροσβασιμότητα στην γαστρική φάση αυξάνεται στους φρέσκους χυμούς που περιέχουν χυμό πορτοκαλιού, αλλά μειώνεται στους χυμούς μακράς διάρκειας και τα φρούτα όπως και στον εντερικό σωλήνα. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή κατά την γαστρική πέψη του χυμού πορτοκαλιού έχει αναφερθεί προηγουμένως και αποδίδεται σε ενώσεις όπως η εσπεριδίνη¹¹⁰ ή στην υδρόλυση των γλυκοζιτών (όπως η κουερσετίνη ή η ρουτίνη, οι οποίες απαντώνται κυρίως σε χυμούς εσπεριδοειδών) προς τις αγλυκόνες τους, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη βιοδραστηριότητα.¹¹¹ Σε επεξεργασμένους χυμούς μακράς διάρκειας, καθώς και στα φρούτα, η συγκέντρωση των φλαβονοειδών μειώθηκε στην γαστρική φάση. Αν και αρκετές μελέτες αναφέρουν αύξηση ή μηδενική αλλαγή της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών στην γαστρική φάση, η μείωση της δεν είναι ασυνήθιστη και έχει αποδοθεί στον πολυμερισμό, την οξείδωση και την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών διαιτητικών ενώσεων, όπως ο σχηματισμός συμπλόκων φλαβονοειδών-πρωτεΐνης.¹¹²⁻¹¹⁵ Στις αλκαλικές συνθήκες της εντερικής φάσης, τα φλαβονοειδή τείνουν να εμφανίζουν χαμηλή σταθερότητα,^{99,116,117} ενώ η αλληλεπίδραση τους με τα χολικά άλατα και τα πεπτικά ένζυμα μπορεί να οδηγήσει

στον σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων, μειώνοντας έτσι την διαλυτότητά τους υπό εντερικές συνθήκες.¹¹⁸



Σχήμα 8: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών στο αρχικό δείγμα καθώς και στο γαστρικό και το γαστρεντερικό εκχύλισμα

Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στους χυμούς (Σχήμα 9.) μειώνεται στην γαστρική φάση και αυξάνεται ξανά στο εντερικό εκχύλισμα· ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη από αυτή που προσδιορίστηκε στα ακατέργαστα (άπεπτα) δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αρκετές προηγούμενες μελέτες που επίσης κατέδειξαν μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στην γαστρική φάση και αύξηση αυτής στον εντερικό σωλήνα. Το συγκεκριμένο μοτίβο μπορεί να αποδοθεί στην μετάβαση από το όξινο περιβάλλον του γαστρικού υγρού στο αλκαλικό διάλυμα στην εντερική φάση, η οποία προκαλεί αποπρωτονίωση της υδροξυλομάδας στον αρωματικό δακτύλιο,^{102,119–123} αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την απελευθέρωση και την διαλυτότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών. Ωστόσο, μη αντιοξειδωτικές διατροφικές ενώσεις, όπως αμινοξέα και σάκχαρα, μπορούν επίσης να απελευθερωθούν μετά από *in vitro* προσομοίωση της πέψης και να επιφέρουν θετική παρεμβολή σε δοκιμασίες αντιοξειδωτικής ικανότητας.¹²⁴



Σχήμα 9 : Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την συγκέντρωση των ολικών αντιοξειδωτικών στο αρχικό δείγμα καθώς και στο γαστρικό και το γαστρεντερικό εκχύλισμα

Μια αρχική προσπάθεια για να διαλευκανθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαινολικών ενώσεων, των φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε μέσω της ανάλυσης συσχέτισης Pearson, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 3. Η αντιοξειδωτική δράση συσχετίστηκε αρνητικά τόσο με τα φαινολικά όσο και με τα φλαβονοειδή, υποδηλώνοντας ότι άλλα είδη είναι κυρίως υπεύθυνα. Τέτοια είδη μπορεί να είναι η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή, το μηλικό και το ουρικό οξύ (κυρίως στον χυμό μήλου). Στον χυμό μπανάνας και στα φρούτα η παρουσία ντοπαμίνης και μελατονίνης ενδέχεται επίσης να συμβάλλει στην αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων. Στην γαστρική φάση και στις εντερικές φάσεις, η αντιοξειδωτική δράση συσχετίστηκε θετικά με τα φαινολικά αλλά όχι με τα φλαβονοειδή, γεγονός που υποδεικνύει αλλαγές στην σύσταση της μήτρας των φρούτων και των χυμών κατά την διάρκεια της πέψης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αποτελέσματα ανάλυσης συσχέτισης Pearson

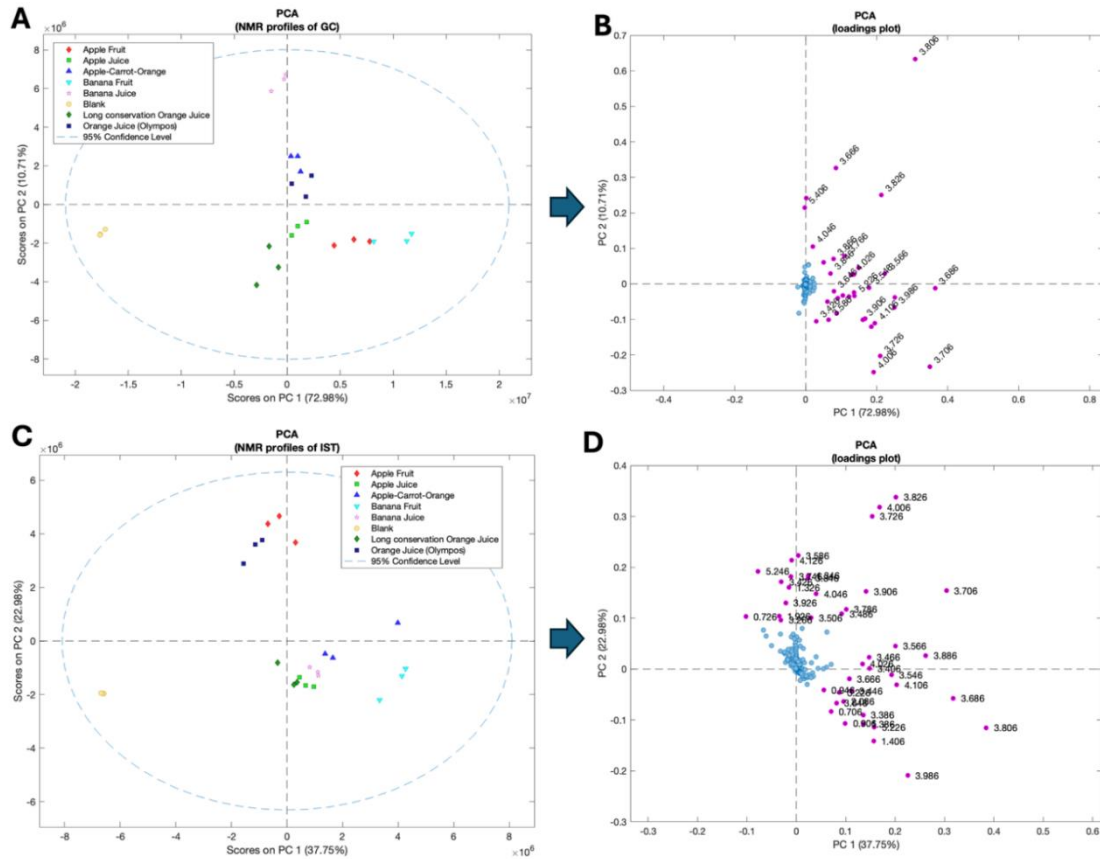
	TPC RAW	TPC GC	TPC IST	CUPRAC RAW	CUPRAC GC	CUPRAC IST	TFC RAW	TFC GC	TFC IST
TPC RAW	1								
TPC GC	0,973	1							
TPC IST	0,979	0,998	1						
CUPRAC RAW	-0,715	-0,748	-0,740	1					
CUPRAC GC	0,988	0,994	0,997	-0,718	1				
CUPRAC IST	0,966	0,998	0,996	-0,725	0,990	1			
TFC RAW	0,890	0,947	0,943	-0,616	0,926	0,953	1		
TFC GC	-0,477	-0,437	-0,434	0,136	-0,451	-0,448	- 0,277	1	
TFC IST	0,976	0,999	0,999	-0,743	0,995	0,998	0,945	0,945	1

Τα παραπάνω δεδομένα φανερώνουν ότι οι ολικές δοκιμασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ληφθεί μια μακροσκοπική εικόνα της βιοπροσβασιμότητας των συστατικών χυμών και φρούτων, χωρίς ωστόσο να μπορούν να διαλευκάνουν πολύπλοκους μηχανισμούς και διεργασίες που μπορεί να επηρεάσουν την βιοπροσβασιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Τέτοιες διεργασίες μπορεί να επηρεάζονται από την σύνδεση των φαινολικών με διάφορα συστατικά της μήτρας του τροφίμου, (π.χ. ίνες, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, κ.λπ.), από την αλληλεπίδρασή τους με τα γαστρικά και διαιτητικά συστατικά, καθώς και από ανταγωνιστικές ή συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ή με άλλες ουσίες. Οι πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βιοπροσβασιμότητας (π.χ. σύσταση των βιο-υγρών, pH, περιεκτικότητα σε άλατα, χρόνος παραμονής κ.λπ.) μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Επομένως, απαιτούνται πιο εξελιγμένες τεχνικές για την απόκτηση καλύτερου αποτυπώματος των συστατικών των τροφίμων κατά την πέψη.

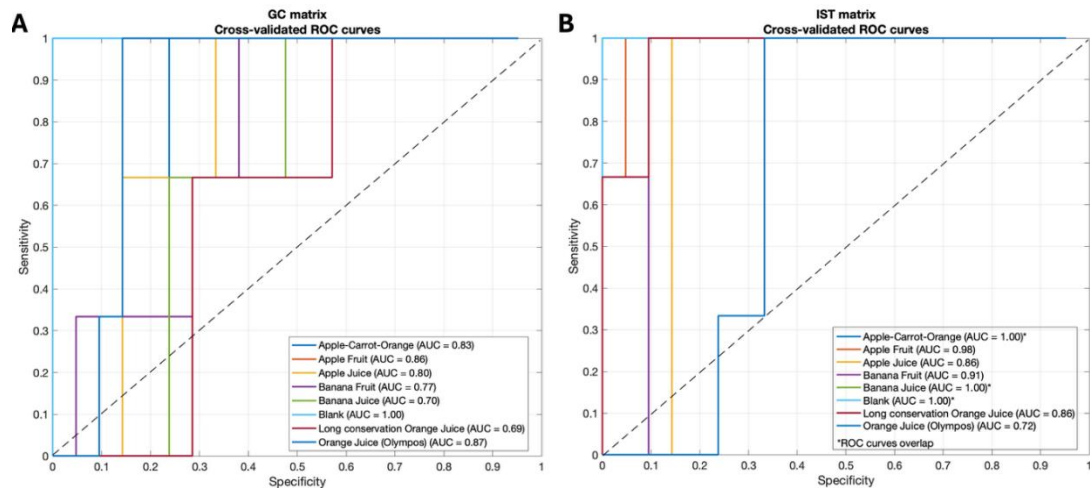
2.3.2. NMR METABOLOΜΙΚΗ

Η μεταβολομική με βάση το NMR χρησιμοποιήθηκε για την καλύτερη κατανόηση των αλλαγών στην σύσταση κατά την διάρκεια της πέψης και για τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών. Όσον αφορά το κλάσμα του υπολείμματος, δεν πραγματοποιήθηκε σχετική ανάλυση, καθώς το περιεχόμενό του δεν θεωρείται διατροφικά σημαντικό για τον άνθρωπο. Στην πραγματικότητα, προσομοιώνει το αποβαλλόμενο υλικό του οργανισμού, όπως τα κόπρανα.

Τα φασματικά προφίλ ^1H NMR όλων των μιγμάτων αποκτήθηκαν με σκοπό την διερεύνηση των διαφορών στην σύσταση των μητρών GC (γαστρική) και IST (γαστρεντερική), τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη κάθε φρούτου ή χυμού. Αυτή η μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση επέτρεψε την αξιολόγηση όχι μόνο των αλλαγών που προκαλούνται από τις ίδιες τις μήτρες, αλλά και των ενδογενών μεταβολικών χαρακτηριστικών κάθε ωμού φρούτου/χυμού και επί μέρους συστατικών τους, καθώς και του τρόπου με τον οποίο οι ενώσεις αυτές «χωνεύονται» ή μετασχηματίζονται εντός των GC και IST περιβαλλόντων. Συνεπώς, για την αποτύπωση αυτών των μεταβολικών διαφορών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) στα συνολικά προφίλ ^1H NMR των μιγμάτων GC-φρούτου/χυμού (Σχήμα 10. A-B) και IST-φρούτου/χυμού (Σχήμα 10. C-D). Τα PCA score plots έδειξαν ότι κάθε φρούτο ή χυμός παρουσίαζε ένα διακριτό μεταβολικό αποτύπωμα, το οποίο επέτρεψε την εξαιρετικά ακριβή διάκριση μεταξύ των μιγμάτων. Για την περαιτέρω βελτίωση της ανάλυσης και της ταξινόμησης, εφαρμόστηκε εποπτευόμενη πολυπαραγοντική ανάλυση (MVA), και συγκεκριμένα ανάλυση διακρίσεων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Τα μοντέλα αυτά πέτυχαν εξαιρετική ακρίβεια διάκρισης, όπως επιβεβαιώθηκε από διασταυρούμενες καμπύλες λειτουργικού χαρακτηρισμού δείκτη (ROC) (Σχήμα 11. A-B), γεγονός που υπογραμμίζει την αξιοπιστία της προσέγγισής μας στην διάκριση του μεταβολικού αποτυπώματος κάθε μίγματος.

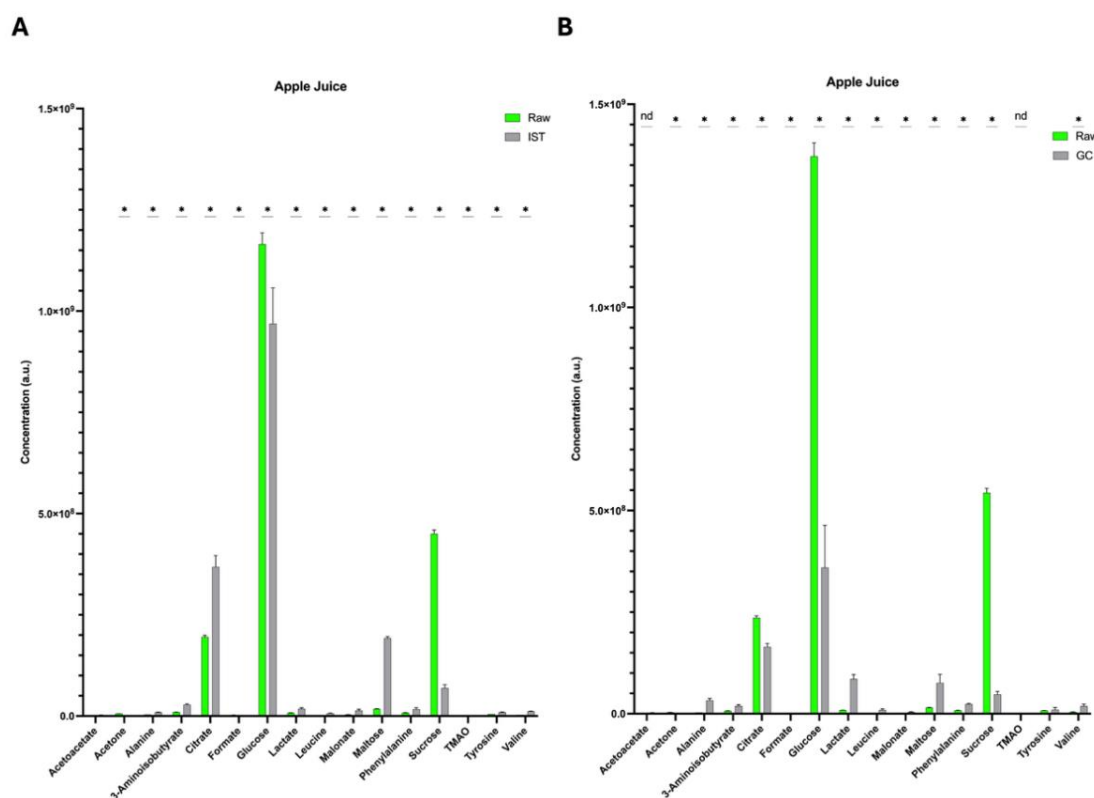


Σχήμα 10 : PCA score (A-C) και loading plots (B-D) για την γαστρική (A-B) και την γαστρεντερική (C-D) μήτρα.

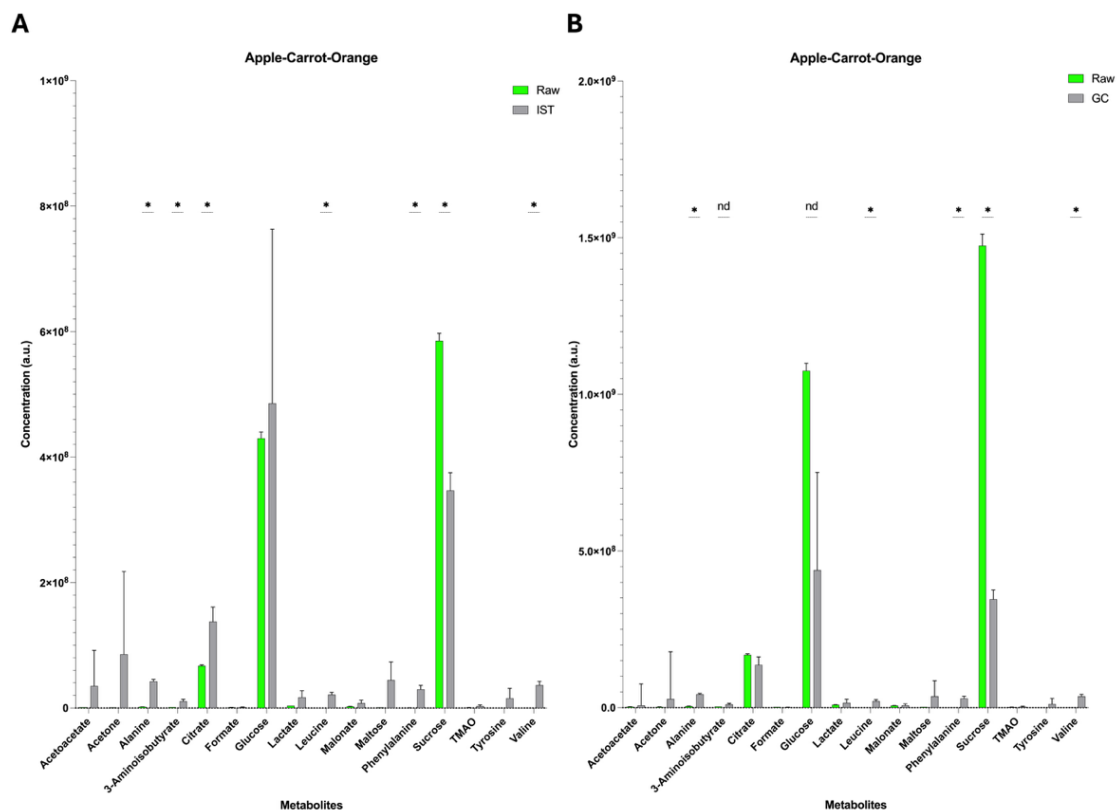


Σχήμα 11 : Καμπύλες ROC τόσο για την γαστρική (A) όσο και για την γαστρεντερική (B) μήτρα για τον έλεγχο της ακρίβειας των ταξινομητικών μοντέλων PLS-DA. (φαίνεται ότι όλα τα μίγματα έχουν AUC με τιμή ίση ή κοντινή στο 1 $\rightarrow$ πολύ καλή διακριτική ικανότητα του μοντέλου)

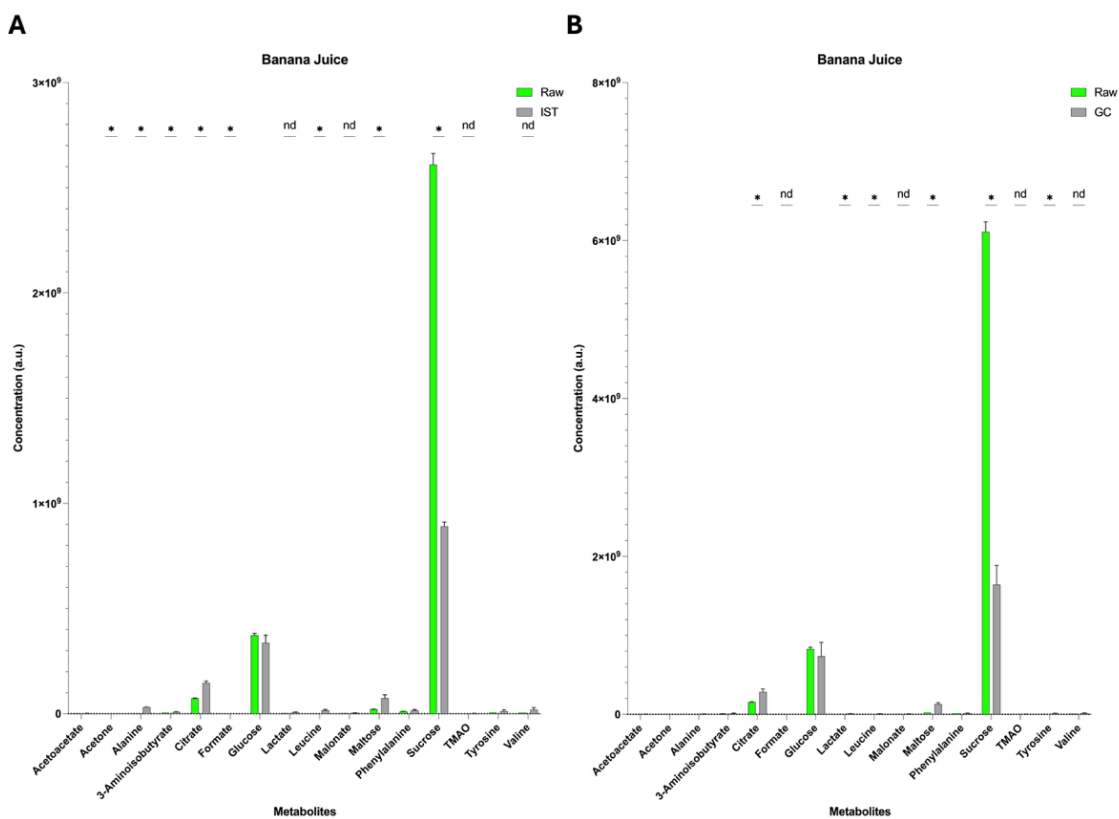
Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών που ευθύνονται για την παρατηρούμενη ομαδοποίηση, εξετάστηκαν λεπτομερώς τα αντίστοιχα loading plots από τις αναλύσεις PCA και PLS για κάθε πεπτική μήτρα. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε έντονες φασματικές διαφορές που συνδέονται κυρίως με διαφοροποιήσεις στην περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Σχήμα 10. B-D), συνδυαστικά με αλλαγές στους μεταβολίτες. Έτσι πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση μέσω της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών -συμπεριλαμβανομένων αρκετών σακχάρων- σε όλα τα μίγματα GC- και IST- φρούτου/χυμού, καθώς και στα αντίστοιχα ωμά φρούτα και χυμούς πριν την πέψη. Η συγκριτική ανάλυση πριν και μετά την ενσωμάτωση στις μήτρες GC και IST αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στη σύσταση των μεταβολιτών, ειδικότερα ως προς τις συγκεντρώσεις των ειδών των σακχάρων, του κιτρικού και του μηλονικού οξέος. Τα αποτελέσματα επικυρώθηκαν με πολλαπλές στατιστικές δοκιμές με διόρθωση FDR (Σχήμα 12-15.), καθώς και με την ανάλυση volcano plots (Σχήμα 16.).



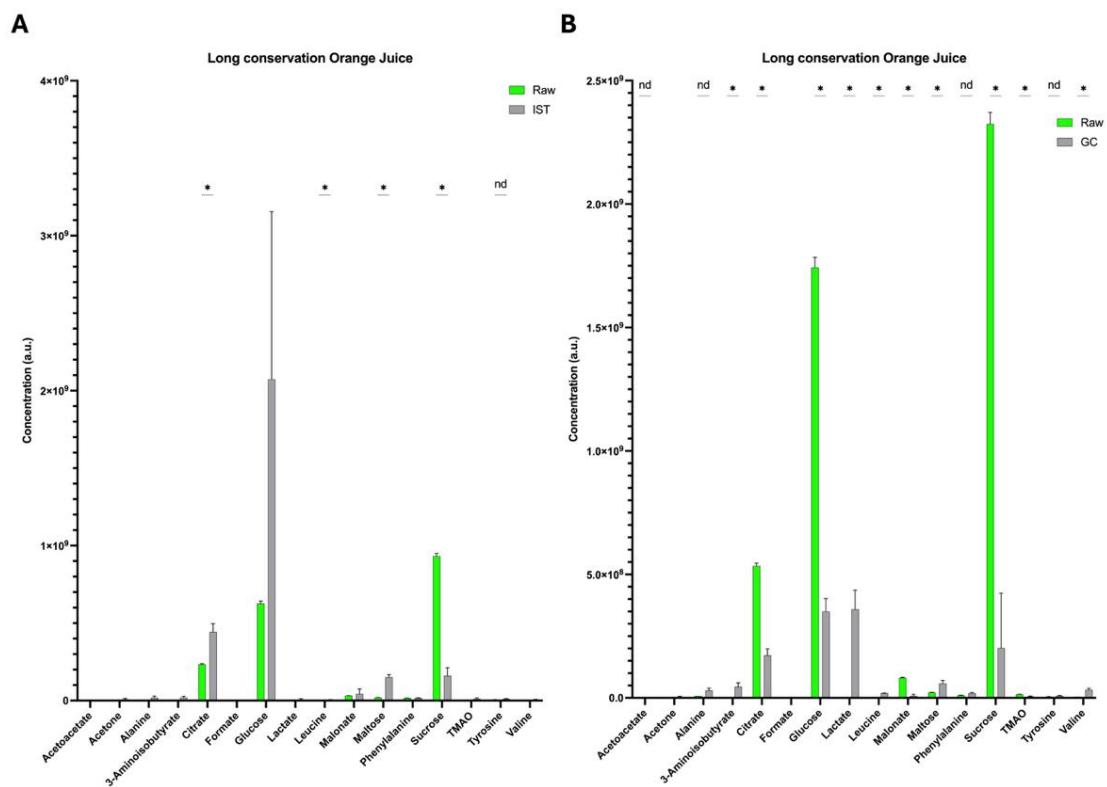
Σχήμα 12. Αναπαράσταση σε μορφή ραβδογράμματος της συγκέντρωσης διάφορων μεταβολιτών του χυμού μήλου μετά την πέψη τόσο στην γαστρική (B) όσο και στην γαστρεντερική μήτρα (A).



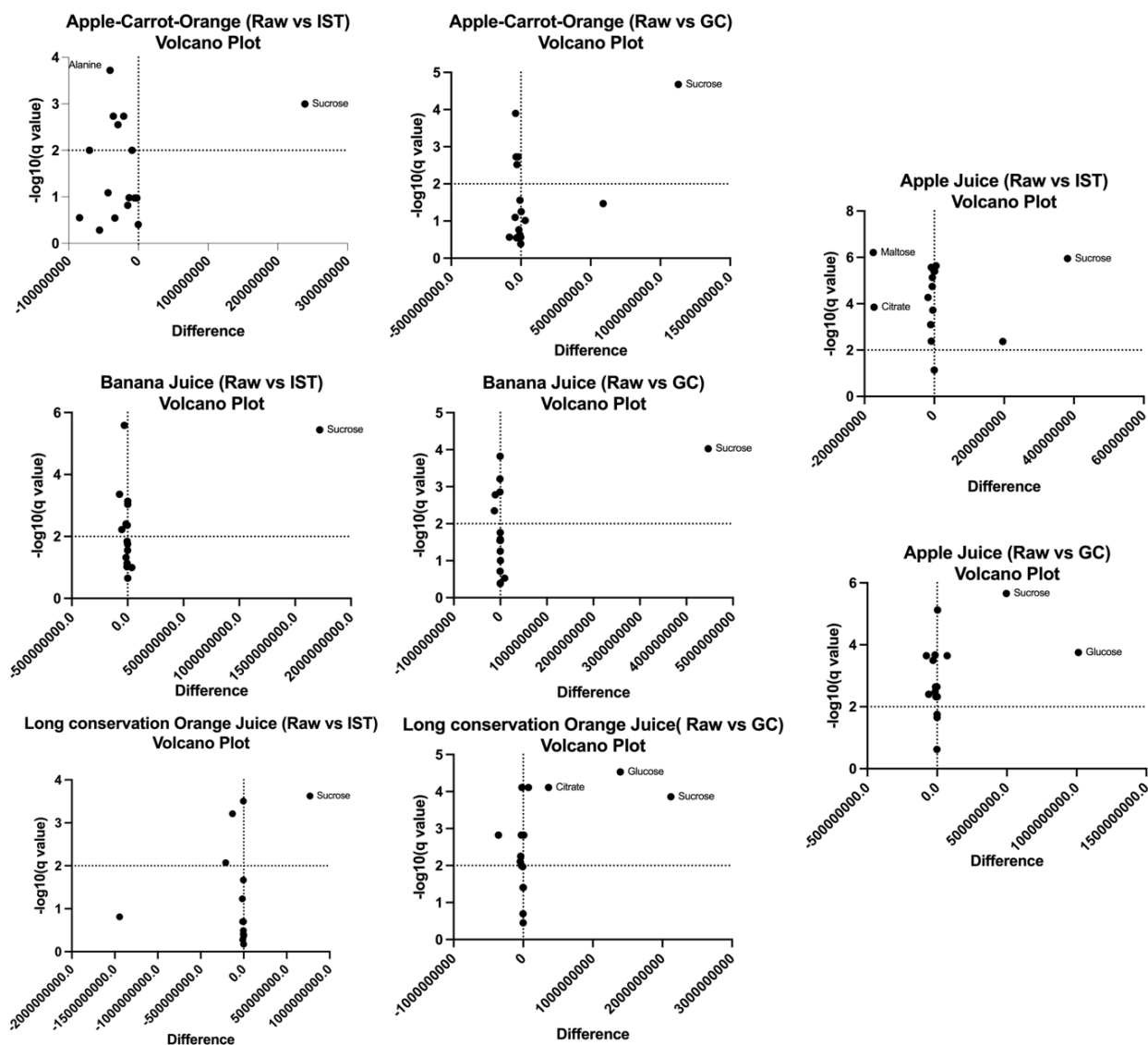
Σχήμα 13: Αναπαράσταση σε μορφή ραβδογράμματος της συγκέντρωσης διάφορων μεταβολιτών του χυμού καρότο-μήλο-πορτοκάλι μετά την πέψη τόσο στην γαστρική (B) όσο και στην γαστρεντερική μήτρα (A).



Σχήμα 14: Αναπαράσταση σε μορφή ραβδογράμματος της συγκέντρωσης διάφορων μεταβολιτών του χυμού μπανάνας μετά την πέψη τόσο στην γαστρική (B) όσο και στην γαστρεντερική μήτρα (A).



Σχήμα 15: Αναπαράσταση σε μορφή ραβδογράμματος της συγκέντρωσης διάφορων μεταβολιτών του χυμού πορτοκαλιού μακράς διάρκειας μετά την πέψη τόσο στην γαστρική (A) όσο και στην γαστρεντερική μήτρα (B).



Σχήμα 16: Volcano plots για τους μεταβολίτες των χυμών μήλου, μήλου-καρότου-πορτοκαλιού, μπανάνας και πορτοκαλιού μακράς διάρκειας στην γαστρική και γαστρεντερική μήτρα.

Αυτά τα ευρήματα παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την διαφορική μεταβολική επεξεργασία των φρέσκων ωμών φρούτων σε σχέση με τους αντίστοιχους χυμούς του εμπορίου στα περιβάλλοντα πέψης GC και IST. Σημαντικό είναι, ότι οι δύο μήτρες δεν παρουσίασαν πανομοιότυπους μεταβολικούς μετασχηματισμούς: τόσο η συγκέντρωση όσο και η χημική φύση των σακχάρων, καθώς και η αφθονία άλλων μεταβολιτών, μετατοπίστηκαν σε πρότυπα ειδικά για την μήτρα. Αυτό αποδεικνύει ότι η μεταβολική μοίρα των σακχάρων-είτε πρόκειται για μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, είτε για πιο σύνθετους υδατάνθρακες- επηρεάζεται όχι μόνο από την σύσταση του περιβάλλοντος πέψης, αλλά και από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του υποστρώματος (ολόκληρο φρούτο έναντι χυμού).

Επιπρόσθετα, τέτοιες διαφορές μπορεί να προκύπτουν από διαφοροποιήσεις στην ενζυμική δραστηριότητα, στην σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και στις φυσικοχημικές παραμέτρους μεταξύ των μητρών GC και IST. Για παράδειγμα, η μήτρα GC ενδέχεται να εμφανίζει υψηλότερη γλυκοσιδασική δραστικότητα, οδηγώντας σε πιο εκτεταμένη υδρόλυση σύνθετων σακχάρων σε μονοσακχαρίτες, ενώ η IST μήτρα μπορεί να ευνοεί οδούς ζύμωσης που μεταβολίζουν επιλεκτικά συγκεκριμένα σάκχαρα έναντι άλλων. Οι διαφορές στο pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής και το ιοντικό περιεχόμενο μεταξύ των μητρών θα μπορούσαν να τροποποιήσουν περαιτέρω τον μεταβολικό μετασχηματισμό οργανικών οξέων, όπως το κιτρικό και το μηλονικό οξύ, μεταβάλλοντας την σταθερότητα και την μετατροπή τους σε μεταγενέστερα ενδιάμεσα.

Επιπλέον, η δομική ακεραιότητα και ιστορικό επεξεργασίας του υποστρώματος πιθανότατα παίζουν ρόλο: τα φρέσκα φρούτα διατηρούν συνήθως υδατάνθρακες προσδεδεμένους στα κυτταρικά τοιχώματα και άθικτη αρχιτεκτονική ιστών, γεγονός που μπορεί να επιβραδύνει την πρόσβαση των ενζύμων και την απελευθέρωση των σακχάρων· αντιθέτως οι χυμοί του εμπορίου περιέχουν άμεσα διαθέσιμα, διαλυτά σάκχαρα που ενδέχεται να μεταβολιστούν ταχύτερα και πιο ομοιόμορφα. Αυτοί οι βιοχημικοί και φυσικοχημικοί παράγοντες από κοινού διαμορφώνουν τα προηγούμενα προφίλ πέψης, τονίζοντας την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της σύνθεσης της μήτρας, της δομής του υποστρώματος και των μεταβολικών οδών στον προσδιορισμό του μετασχηματισμού των θρεπτικών συστατικών στην διάρκεια της πέψης. Οι παρατηρήσεις σχετικά με την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική δράση συνάδουν επίσης με αυτές τις παρατηρήσεις, αναδεικνύοντας την πολυπλοκότητα των μηχανισμών και την σημαντική μεταβλητότητα ακόμη και μεταξύ δειγμάτων προερχόμενα από την ίδια πηγή (π.χ. μήλο φρούτο/χυμός/ανάμεικτος χυμός, φρέσκος/επεξεργασμένος/ανάμεικτος χυμός πορτοκαλιού. Επομένως, θα πρέπει να γίνει μια έρευνα ειδική για κάθε φρούτο και τα προϊόντα του, αντί για γενικές διατυπώσεις. Τέλος, από τα δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι χυμοί που παρασκευάζονται από ολόκληρα φρούτα (π.χ. μπανάνα) διατηρούν αρκετές ομοιότητες και αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να αποτελέσει βάση για την πρόβλεψη της βιοπροσβασιμότητας ορισμένων από τις κύριες ενώσεις τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το συνολικό βιοπροσβάσιμο κλάσμα φαινολικών, φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας φρούτων και χυμών πριν και μετά την πέψη όπως εκτιμήθηκε στην παρούσα μελέτη ανέδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την μήτρα και το είδος του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα έδειξαν ότι στους χυμούς παρατηρείται μείωση των φαινολικών, των φλαβονοειδών αλλά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την πέψη, γαστρική και εντερική. Αντιθέτως, στην περίπτωση των φρούτων, όπως και του χυμού μπανάνας που πιθανόν κατασκευάζεται από ολόκληρο το φρούτο, παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας των φαινολικών μετά την γαστρική πέψη. Στην εντερική φάση σε αυτή την περίπτωση παρότι ευνοείται η περαιτέρω απελευθέρωση φαινολικών, τα φλαβονοειδή εμφανίζουν μεγάλη αστάθεια λόγω της μειωμένης διαλυτότητας τους. Η μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την πέψη επιβεβαιώνει ότι δεν αρκεί μόνο η γνώση της αρχικής περιεκτικότητας των δειγμάτων σε βιοδραστικές ενώσεις προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την βιοπροσβασιμότητά τους, καθώς η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν συσχετίζεται απόλυτα με τα φαινολικά και τα φλαβονοειδή. Το γεγονός αυτό καθιστά ενδιαφέρουσα την μελέτη του ρόλου και άλλων ενώσεων όπως σάκχαρα, αμινοξέα και άλλα οργανικά οξέα.

Η εφαρμογή $^1\text{H-NMR}$ μεταβολομικής και πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης (PCA, PLS-DA) παρείχε μια πιο ολιστική προσέγγιση, η οποία αποκάλυψε διακριτά μεταβολικά προφίλ μεταξύ φρούτων και χυμών, καθώς και σημαντικές μεταβολές στην σύσταση των μεταβολιτών και κυρίως των σακχάρων, του κιτρικού οξέος και του μηλονικού οξέος μετά την πέψη.

Συνολικά, η μεταβολική πορεία των αντιοξειδωτικών και εν συνεχεία η βιοπροσβασιμότητα τους δεν ορίζονται αποκλειστικά από την αρχική συγκέντρωση τους στο δείγμα ή από το φυτικό είδος, αλλά αποτελούν αποτέλεσμα σύνθετων παραγόντων που σχετίζονται με την δομή της μήτρας, την μέθοδο επεξεργασίας και την αλληλεπίδραση με άλλους μεταβολίτες.

Εν κατακλείδι, μέσα από την παρούσα μελέτη γίνεται αντιληπτή η ανάγκη για εξατομικευμένο σχεδιασμό της διαδικασίας αξιολόγησης της βιοπροσβασιμότητας αντιοξειδωτικών για κάθε φρούτο και τα προϊόντα του, η οποία καλό είναι να συνδυάζει την εξωσωματική προσομοίωση της πέψης με μεθόδους που παρέχουν υψηλή διακριτική ικανότητα - όπως η NMR μεταβολομική και η πολυπαραγοντική στατιστική

ανάλυση- για την βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν την συμπεριφορά των βιοδραστικών συστατικών στο γαστρεντερικό σωλήνα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4* (8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- (2) Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94* (3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- (3) Flieger, J.; Flieger, W.; Baj, J.; Maciejewski, R. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials* **2021**, *14* (15), 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>.
- (4) Young, I. S. Antioxidants in Health and Disease. *J. Clin. Pathol.* **2001**, *54* (3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.
- (5) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- (6) Department of Pharmacy, Lucile Salter Packard Children's Hospital, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA, USA; Pham-Huy, L. A.; He, H.; Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing, China; Pham-Huyc, C.; Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Paris 5, Paris, France. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4* (2), 89–96. <https://doi.org/10.59566/IJBS.2008.4089>.
- (7) Azat Aziz, M.; Shehab Diab, A.; Abdulrazak Mohammed, A. Antioxidant Categories and Mode of Action. In *Antioxidants*; Shalaby, E., Ed.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83544>.
- (8) Khot, V. S.; Upadhye, S. S.; Kothali, B. K.; Apte, A. K.; Kulkarni, A. A.; Patil, A. A.; Danole, A. B. Free Radicals, Oxidative Stress and Diseases An Overview. *Am. J. PharmTech Res.* **2018**, *8* (4), 59–67. <https://doi.org/10.46624/ajptr.2018.v8.i4.007>.
- (9) Sundaram Sanjay, S.; Shukla, A. K. Mechanism of Antioxidant Activity. In *Potential Therapeutic Applications of Nano-antioxidants*; Springer Singapore: Singapore, 2021; pp 83–99. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1143-8_4.

- (10) Mamta; Misra, K.; Dhillon, G. S.; Brar, S. K.; Verma, M. Antioxidants. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*; Brar, S. K., Dhillon, G. S., Soccol, C. R., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2014; pp 117–138. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_6.
- (11) Francenia Santos-Sánchez, N.; Salas-Coronado, R.; Villanueva-Cañongo, C.; Hernández-Carlos, B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*; Shalaby, E., Ed.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>.
- (12) Anwar, H.; Hussain, G.; Mustafa, I.; Anwar, H.; Hussain, G.; Mustafa, I. Antioxidants from Natural Sources. In *Antioxidants in Foods and Its Applications*; IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75961>.
- (13) Romero, A. C.; Hernández, E. G. O.; Cerón, T. F.; Chávez, A. Á.; Romero, A. C.; Hernández, E. G. O.; Cerón, T. F.; Chávez, A. Á. The Exogenous Antioxidants. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*; IntechOpen, 2013. <https://doi.org/10.5772/52490>.
- (14) Mirończuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A. M.; Zujko, M. E. Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body. *Adv. Med. Sci.* **2018**, 63 (1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- (15) Atta, E. M.; Mohamed, N. H.; Abdelgawad, A. A. M. ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES. *Eur. Chem. Bull.* **2017**, 6 (8), 365. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>.
- (16) Stokes, P.; Belay, R. E.; Ko, E. Y. Synthetic Antioxidants. In *Male Infertility*; Parekattil, S. J., Esteves, S. C., Agarwal, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 543–551. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_44.
- (17) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- (18) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79 (5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- (19) Kotha, R. R.; Tareq, F. S.; Yildiz, E.; Luthria, D. L. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants* **2022**, 11 (12), 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>.

- (20) Munteanu, I. G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- (21) Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S. E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K. I.; Özyurt, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* **2007**, *12* (7), 1496–1547. <https://doi.org/10.3390/12071496>.
- (22) Craft, B. D.; Kerrihard, A. L.; Amarowicz, R.; Pegg, R. B. Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11* (2), 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>.
- (23) D. Gupta, *METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY: A REVIEW*, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **6** (2), 2014.
- (24) Platzer, M.; Kiese, S.; Herfellner, T.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P. How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants* **2021**, *10* (5), 811. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>.
- (25) Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R. The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (4), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>.
- (26) Nicolescu, A.; Bunea, C. I.; Mocan, A. Total Flavonoid Content Revised: An Overview of Past, Present, and Future Determinations in Phytochemical Analysis. *Anal. Biochem.* **2025**, *700*, 115794. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2025.115794>.
- (27) Shraim, A. M.; Ahmed, T. A.; Rahman, M. M.; Hijji, Y. M. Determination of Total Flavonoid Content by Aluminum Chloride Assay: A Critical Evaluation. *LWT* **2021**, *150*, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
- (28) Alam, Md. N.; Bristi, N. J.; Rafiquzzaman, Md. Review on *in Vivo* and *in Vitro* Methods Evaluation of Antioxidant Activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21* (2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- (29) Carbonell-Capella, J. M.; Buniowska, M.; Barba, F. J.; Esteve, M. J.; Frígola, Ana. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>.
- (30) Choleva, T. G.; Tziasiou, C.; Gouma, V.; Vlessidis, A. G.; Giokas, D. L. In Vitro Assessment of the Physiologically Relevant Oral Bioaccessibility of Metallic

- Elements in Edible Herbs Using the Unified Bioaccessibility Protocol. *Molecules* **2023**, *28* (14), 5396. <https://doi.org/10.3390/molecules28145396>.
- (31) Dima, C.; Assadpour, E.; Dima, S.; Jafari, S. M. Bioavailability and Bioaccessibility of Food Bioactive Compounds; Overview and Assessment by *in Vitro* Methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19* (6), 2862–2884. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12623>.
 - (32) Allen, L.; Prentice, A.; Caballero, B. *Encyclopedia of Human Nutrition: Four-Volume Set*, 2nd ed.; Elsevier: Burlington, 2005.
 - (33) Fernández-García, E.; Carvajal-Lérída, I.; Pérez-Gálvez, A. In Vitro Bioaccessibility Assessment as a Prediction Tool of Nutritional Efficiency. *Nutr. Res.* **2009**, *29* (11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>.
 - (34) Joye, I. J.; Davidov-Pardo, G.; McClements, D. J. Nanotechnology for Increased Micronutrient Bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *40* (2), 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.006>.
 - (35) Ruby, M. V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33* (21), 3697–3705. <https://doi.org/10.1021/es990479z>.
 - (36) Ng, J. C.; Juhasz, A.; Smith, E.; Naidu, R. Assessing the Bioavailability and Bioaccessibility of Metals and Metalloids. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (12), 8802–8825. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1820-9>.
 - (37) Heaney, R. P. Factors Influencing the Measurement of Bioavailability, Taking Calcium as a Model. *J. Nutr.* **2001**, *131* (4), 1344S–1348S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.4.1344S>.
 - (38) Kramer, B. K.; Ryan, P. B. SOXHLET AND MICROWAVE EXTRACTION IN DETERMINING THE BIOACCESSIBILITY OF PESTICIDES FROM SOIL AND MODEL SOLIDS. **2000**.
 - (39) Tokalioglu, Ş. Bioaccessibility of Cu, Mn, Fe, and Zn in Fruit and Vegetables by the In Vitro UBM and Statistical Evaluation of the Results. *Biol. Trace Elem. Res.* **2023**, *201* (3), 1538–1546. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03253-z>.
 - (40) Cardoso, C.; Afonso, C.; Lourenço, H.; Costa, S.; Nunes, M. L. Bioaccessibility Assessment Methodologies and Their Consequences for the Risk–Benefit

- Evaluation of Food. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *41* (1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.008>.
- (41) Nair, K. M.; Augustine, L. F. Food Synergies for Improving Bioavailability of Micronutrients from Plant Foods. *Food Chem.* **2018**, *238*, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.115>.
- (42) Yuswir, N. S.; Praveena, S. M.; Aris, A. Z.; Hashim, Z. Bioavailability of Heavy Metals Using in Vitro Digestion Model: A State of Present Knowledge. *Rev. Environ. Health* **2013**, *28* (4). <https://doi.org/10.1515/reveh-2013-0012>.
- (43) Hur, S. J.; Lim, B. O.; Decker, E. A.; McClements, D. J. In Vitro Human Digestion Models for Food Applications. *Food Chem.* **2011**, *125* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>.
- (44) Llorente-Mirandes, T.; Llorens-Muñoz, M.; Funes-Collado, V.; Sahuquillo, À.; López-Sánchez, J. F. Assessment of Arsenic Bioaccessibility in Raw and Cooked Edible Mushrooms by a PBET Method. *Food Chem.* **2016**, *194*, 849–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.047>.
- (45) Thakur, N.; Raigond, P.; Singh, Y.; Mishra, T.; Singh, B.; Lal, M. K.; Dutt, S. Recent Updates on Bioaccessibility of Phytonutrients. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *97*, 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.019>.
- (46) *The Impact of Food Bioactives on Health*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.
- (47) Mackie, A.; Rigby, N. InfoGest Consensus Method. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 13–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_2.
- (48) Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A Standardised Static *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International

- Consensus. *Food Funct* **2014**, *5* (6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.
- (49) Brodkorb, A.; Egger, L.; Alminger, M.; Alvito, P.; Assunção, R.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu-Lacanal, C.; Boutrou, R.; Carrière, F.; Clemente, A.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Edwards, C.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A. R.; Martins, C.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Minekus, M.; Portmann, R.; Santos, C. N.; Souchon, I.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Recio, I. INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nat. Protoc.* **2019**, *14* (4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- (50) Koch, I.; Reimer, K. Bioaccessibility Extractions for Contaminant Risk Assessment. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*; Elsevier, 2012; pp 487–507. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00091-0>.
- (51) Zingaretti, D.; Baciocchi, R. Different Approaches for Incorporating Bioaccessibility of Inorganics in Human Health Risk Assessment of Contaminated Soils. *Appl. Sci.* **2021**, *11* (7), 3005. <https://doi.org/10.3390/app11073005>.
- (52) Mohamed, D. F. M. S.; Kim, D. Y.; An, J.; Kim, M.; Chun, S.-H.; Kwon, J.-H. Simplified Unified BARGE Method to Assess Migration of Phthalate Esters in Ingested PVC Consumer Products. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20* (3), 1907. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031907>.
- (53) UBM Procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices, INERIS
- (54) Tokalıoğlu, Ş.; Clough, R.; Foulkes, M.; Worsfold, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from Nutritional Supplements by the Unified BARGE Method. *Food Chem.* **2014**, *150*, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.151>.
- (55) Van De Wiele, T. R.; Oomen, A. G.; Wragg, J.; Cave, M.; Minekus, M.; Hack, A.; Cornelis, C.; Rempelberg, C. J. M.; De Zwart, L. L.; Klinck, B.; Van Wijnen, J.; Verstraete, W.; Sips, A. J. A. M. Comparison of Five in Vitro Digestion Models to in Vivo Experimental Results: Lead Bioaccessibility in the Human Gastrointestinal Tract. *J. Environ. Sci. Health Part A* **2007**, *42* (9), 1203–1211. <https://doi.org/10.1080/10934520701434919>.

- (56) Ruby, M. V.; Davis, A.; Schoof, R.; Eberle, S.; Sellstone, C. M. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30* (2), 422–430. <https://doi.org/10.1021/es950057z>.
- (57) Etcheverry, P.; Grusak, M. A.; Fleige, L. E. Application of in Vitro Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E. *Front. Physiol.* **2012**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.
- (58) Etcheverry, P.; Grusak, M. A.; Fleige, L. E. Application of in Vitro Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E. *Front. Physiol.* **2012**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.
- (59) Intawongse, M.; Dean, J. R. In-Vitro Testing for Assessing Oral Bioaccessibility of Trace Metals in Soil and Food Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25* (9), 876–886. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.03.010>.
- (60) Wojtunik-Kulesza, K.; Oniszczyk, A.; Oniszczyk, T.; Combrzyński, M.; Nowakowska, D.; Matwijczuk, A. Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12* (5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>.
- (61) Etcheverry, P.; Grusak, M. A.; Fleige, L. E. Application of in Vitro Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E. *Front. Physiol.* **2012**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.
- (62) Gao, H.; Lu, Q.; Liu, X.; Cong, H.; Zhao, L.; Wang, H.; Lin, D. Application of ¹H NMR-based Metabonomics in the Study of Metabolic Profiling of Human Hepatocellular Carcinoma and Liver Cirrhosis. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (4), 782–785. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01086.x>.
- (63) Aminu, M.; Ahmad, N. A. Complex Chemical Data Classification and Discrimination Using Locality Preserving Partial Least Squares Discriminant Analysis. *ACS Omega* **2020**, *5* (41), 26601–26610. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03362>.
- (64) Berker, Y.; Muti, I. H.; Cheng, L. L. Visualizing Metabolomics Data with R. *NMR Biomed.* **2023**, *36* (4), e4865. <https://doi.org/10.1002/nbm.4865>.

- (65) Jolliffe, I. T.; Cadima, J. Principal Component Analysis: A Review and Recent Developments. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374* (2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.
- (66) Abdi, H.; Williams, L. J. Principal Component Analysis. *WIREs Comput. Stat.* **2010**, *2* (4), 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- (67) Nahm, F. S. Receiver Operating Characteristic Curve: Overview and Practical Use for Clinicians. *Korean J. Anesthesiol.* **2022**, *75* (1), 25–36. <https://doi.org/10.4097/kja.21209>.
- (68) Hatzakis, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18* (1), 189–220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>.
- (69) Prakash, C.; Mahar, R. Chemical Profiling and Quality Assessment of Food Products Employing Magnetic Resonance Technologies. *Foods* **2025**, *14* (14), 2417. <https://doi.org/10.3390/foods14142417>.
- (70) Dogan, B.; Karaer, A.; Tuncay, G.; Tecellioglu, N.; Mumcu, A. High-Resolution ¹H-NMR Spectroscopy Indicates Variations in Metabolomics Profile of Follicular Fluid from Women with Advanced Maternal Age. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2020**, *37* (2), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01693-x>.
- (71) Ringnér, M. What Is Principal Component Analysis? *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (3), 303–304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>.
- (72) Tec, M. ROC Analysis for Classification and Prediction in Practice: Christos T. Nakas, Leonidas E. Bantis, and Constantine A. Gatsonis, Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC Press, 2023, Xv + 217 Pp., [Dollar]120.00(H), ISBN: 978-1-482-23370-4. *J. Am. Stat. Assoc.* **2025**, *120* (549), 585–586. <https://doi.org/10.1080/01621459.2024.2423434>.
- (73) Ebrahimpour, M.; Goeman, J. J. Inflated False Discovery Rate Due to Volcano Plots: Problem and Solutions. *Brief. Bioinform.* **2021**, *22* (5), bbab053. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab053>.
- (74) Ferreira, M. M.; Marins-Gonçalves, L.; De Souza, D. An Integrative Review of Analytical Techniques Used in Food Authentication: A Detailed Description for Milk and Dairy Products. *Food Chem.* **2024**, *457*, 140206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140206>.
- (75) *Methods in Food Analysis*, 0 ed.; Cruz, R. M. S., Khmelinskii, I., Vieira, M., Eds.; CRC Press, 2016. <https://doi.org/10.1201/b16964>.

- (76) *Nielsen's Food Analysis*; Ismail, B. P., Nielsen, S. S., Eds.; Food Science Text Series; Springer International Publishing: Cham, 2024. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-50643-7>.
- (77) Kaloo, I.; Naqash, S.; Majid, D.; Makroo, H. A.; Dar, B. N. Traditional Analytical Methods in Food Industry: Current Challenges and Issues in Food Analysis. In *Green Chemistry in Food Analysis*; Elsevier, 2024; pp 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18957-9.00008-0>.
- (78) Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Romarís-Hortas, V.; Moscoso-Pérez, C.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Bermejo-Barrera, P.; Prada-Rodríguez, D. In-Vivo and in-Vitro Testing to Assess the Bioaccessibility and the Bioavailability of Arsenic, Selenium and Mercury Species in Food Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (2), 324–345. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.008>.
- (79) Al-Yafeai, A.; Böhm, V. In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E in Rosehip Products and Tomato Paste As Affected by Pectin Contents and Food Processing. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (15), 3801–3809. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05855>.
- (80) Zhang, W.; Qi, S.; Xue, X.; Al Naggari, Y.; Wu, L.; Wang, K. Understanding the Gastrointestinal Protective Effects of Polyphenols Using Foodomics-Based Approaches. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 671150. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671150>.
- (81) Ortea, I. Foodomics in Health: Advanced Techniques for Studying the Bioactive Role of Foods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *150*, 116589. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116589>.
- (82) Mahato, D. K.; Kamle, M.; Pandhi, S.; Pandey, S.; Gupta, A.; Paul, V.; Kalsi, R.; Agrawal, S.; Islam, D.; Khare, S.; Singh, A.; Kumar, P.; Rab, S. O.; Saeed, M. Foodomics: A Sustainable Approach for the Specific Nutrition and Diets for Human Health. *Food Chem. X* **2024**, *24*, 101872. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101872>.
- (83) Valdés, A.; Álvarez-Rivera, G.; Socas-Rodríguez, B.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Foodomics: Analytical Opportunities and Challenges. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (1), 366–381. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04678>.

- (84) Mengucci, C.; Bordoni, A.; Capozzi, F. Understanding the Kinetics of Nutrients Bioaccessibility by Modelling Foodomics Data. *Curr. Opin. Food Sci.* **2020**, *31*, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.001>.
- (85) Sarkar, T.; Salauddin, M.; Kirtonia, K.; Pati, S.; Rebezov, M.; Khayrullin, M.; Panasenko, S.; Tretyak, L.; Temerbayeva, M.; Kapustina, N.; Azimova, S.; Gruzdeva, L.; Makhmudov, F.; Nikitin, I.; Kassenov, A.; Shariati, M. A.; Lorenzo, J. M. A Review on the Commonly Used Methods for Analysis of Physical Properties of Food Materials. *Appl. Sci.* **2022**, *12* (4), 2004. <https://doi.org/10.3390/app12042004>.
- (86) Wang, H.; Peng, J.; Xie, C.; Bao, Y.; He, Y. Fruit Quality Evaluation Using Spectroscopy Technology: A Review. *Sensors* **2015**, *15* (5), 11889–11927. <https://doi.org/10.3390/s150511889>.
- (87) Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126* (4), 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- (88) Bortolini, D. G.; Barros, L.; Maciel, G. M.; Peralta, R. M.; Corrêa, V. G.; Finimundy, T. C.; Isidoro Haminiuk, C. W. Bioaccessibility Performance of Phenolic Compounds from Red Fruits During Simulated Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation. *ACS Food Sci. Technol.* **2025**, *5* (2), 569–577. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00707>.
- (89) Uğur, H.; Çatak, J.; Mızrak, Ö. F.; Çebi, N.; Yaman, M. Determination and Evaluation of in Vitro Bioaccessibility of Added Vitamin C in Commercially Available Fruit-, Vegetable-, and Cereal-Based Baby Foods. *Food Chem.* **2020**, *330*, 127166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127166>.
- (90) Gonçalves Santana, M.; Freitas-Silva, O.; Mariutti, L. R. B.; Teodoro, A. J. A Review of *in Vitro* Methods to Evaluate the Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Tropical Fruits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, *64* (6), 1780–1790. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2119203>.
- (91) Alim, Md. A.; Karim, A.; Shohan, Md. A. R.; Sarker, S. C.; Khan, T.; Mondal, S.; Esrafil, Md.; Linkon, K. Md. M. R.; Rahman, Md. N.; Akther, F.; Begum, R. Study on Stability of Antioxidant Activity of Fresh, Pasteurized, and Commercial Fruit Juice during Refrigerated Storage. *Food Humanity* **2023**, *1*, 1117–1124. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.09.008>.

- (92) Mandha, J.; Shumoy, H.; Matemu, A. O.; Raes, K. Characterization of Fruit Juices and Effect of Pasteurization and Storage Conditions on Their Microbial, Physicochemical, and Nutritional Quality. *Food Biosci.* **2023**, *51*, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102335>.
- (93) Meziane, S.; Magand, J.; Mathé, M.; Raimond, S.; Yvon, J.-L.; Kaci, M.-M. Bioavailability of Natural and Synthetic Vitamins: A Significant Difference on Oxidative Stress Status (OSS). *Integr. Food Nutr. Metab.* **2021**, *8* (1). <https://doi.org/10.15761/IFNM.1000301>.
- (94) Thiel, R. J. Natural Vitamins May Be Superior to Synthetic Ones. *Med. Hypotheses* **2000**, *55* (6), 461–469. <https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1090>.
- (95) Herrera, M. A.; Rosende, M.; Arruda, M. A. Z.; Miró, M. On-Line Coupling of Physiologically Relevant Bioaccessibility Testing to Inductively Coupled Plasma Spectrometry: Proof of Concept for Fast Assessment of Gastrointestinal Bioaccessibility of Micronutrients from Soybeans. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *939*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.030>.
- (96) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Sands, C. J.; Chekmeneva, E.; Lewis, M. R. SMolESY: An Efficient and Quantitative Alternative to on-Instrument Macromolecular¹ H-NMR Signal Suppression. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (23), 6000–6011. <https://doi.org/10.1039/D0SC01421D>.
- (97) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Al-Saffar, N. M. S.; Harvey, N.; Chekmeneva, E.; Misra, S.; Lewis, M. R. A Computationally Lightweight Algorithm for Deriving Reliable Metabolite Panel Measurements from 1D ¹H NMR. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (12), 4995–5000. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00113>.
- (98) Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. Intake and Bioaccessibility of Total Polyphenols in a Whole Diet. *Food Chem.* **2007**, *101* (2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>.
- (99) Rodríguez-Roque, M. J.; Rojas-Graü, M. A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (8), 1859–1867. <https://doi.org/10.1021/jf3044204>.
- (100) Quan, W.; Tao, Y.; Lu, M.; Yuan, B.; Chen, J.; Zeng, M.; Qin, F.; Guo, F.; He, Z. Stability of the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Five Fruit (Apple, Orange, Grape, Pomelo and Kiwi) Juices during *in Vitro* -simulated

- Gastrointestinal Digestion. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53* (5), 1131–1139. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13682>.
- (101) Tu, F.; Xie, C.; Li, H.; Lei, S.; Li, J.; Huang, X.; Yang, F. Effect of in Vitro Digestion on Chestnut Outer-Skin and Inner-Skin Bioaccessibility: The Relationship between Biotransformation and Antioxidant Activity of Polyphenols by Metabolomics. *Food Chem.* **2021**, *363*, 130277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130277>.
- (102) Mihaylova, D.; Desseva, I.; Stoyanova, M.; Petkova, N.; Terzyiska, M.; Lante, A. Impact of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phytochemical Compounds from Eight Fruit Juices. *Molecules* **2021**, *26* (4), 1187. <https://doi.org/10.3390/molecules26041187>.
- (103) Chen, G.-L.; Chen, S.-G.; Zhao, Y.-Y.; Luo, C.-X.; Li, J.; Gao, Y.-Q. Total Phenolic Contents of 33 Fruits and Their Antioxidant Capacities before and after in Vitro Digestion. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *57*, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.018>.
- (104) Kasprzak-Drozd, K.; Oniszcuk, T.; Kowalska, I.; Mołdoch, J.; Combrzyński, M.; Gancarz, M.; Dobrzański, B.; Kondracka, A.; Oniszcuk, A. Effect of the Production Parameters and In Vitro Digestion on the Content of Polyphenolic Compounds, Phenolic Acids, and Antiradical Properties of Innovative Snacks Enriched with Wild Garlic (*Allium ursinum* L.) Leaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (22), 14458. <https://doi.org/10.3390/ijms232214458>.
- (105) Baeza, G.; Sarriá, B.; Bravo, L.; Mateos, R. Polyphenol Content, *in Vitro* Bioaccessibility and Antioxidant Capacity of Widely Consumed Beverages. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98* (4), 1397–1406. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8607>.
- (106) Siracusa, L.; Kulisic-Bilusic, T.; Politeo, O.; Krause, I.; Dejanovic, B.; Ruberto, G. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after Submission to a Two-Step in Vitro Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (23), 12453–12459. <https://doi.org/10.1021/jf203096q>.
- (107) Dacrema, M.; Sommella, E.; Santarcangelo, C.; Bruno, B.; Marano, M. G.; Insolia, V.; Saviano, A.; Campiglia, P.; Stornaiuolo, M.; Daglia, M. Metabolic Profiling, in Vitro Bioaccessibility and in Vivo Bioavailability of a Commercial Bioactive *Epilobium angustifolium* L. Extract. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110670. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110670>.

- (108) Ziółkiewicz, A.; Kasprzak-Drozd, K.; Wójtowicz, A.; Oniszczyk, T.; Gancarz, M.; Kowalska, I.; Mołdoch, J.; Kondracka, A.; Oniszczyk, A. The Effect of In Vitro Digestion on Polyphenolic Compounds and Antioxidant Properties of Sorghum (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench) and Sorghum-Enriched Pasta. *Molecules* **2023**, *28* (4), 1706. <https://doi.org/10.3390/molecules28041706>.
- (109) Dutra, M. D. C. P.; Martins Da Silva, A. B.; De Souza Ferreira, E.; Carvalho, A. J. D. B. A.; Lima, M. D. S.; Telles Biasoto, A. C. Bioaccessibility of Phenolic Compounds from Brazilian Grape Juices Using a Digestion Model with Intestinal Barrier Passage. *Food Biosci.* **2023**, *52*, 102501. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102501>.
- (110) Jannat, S.; Ali, M. Y.; Kim, H.-R.; Jung, H. A.; Choi, J. S. Protective Effects of Sweet Orange, Unshiu Mikan, and Mini Tomato Juice Powders on t-BHP-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2016**, *21* (3), 208–220. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.3.208>.
- (111) Zhang, W.; Lian, Y.; Li, Q.; Sun, L.; Chen, R.; Lai, X.; Lai, Z.; Yuan, E.; Sun, S. Preventative and Therapeutic Potential of Flavonoids in Peptic Ulcers. *Molecules* **2020**, *25* (20), 4626. <https://doi.org/10.3390/molecules25204626>.
- (112) Li, G.; Yan, N.; Li, G. The Effect of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Antioxidants, Antioxidant Activity, and Hypolipidemic Activity of Green Jujube Vinegar. *Foods* **2022**, *11* (11), 1647. <https://doi.org/10.3390/foods11111647>.
- (113) González-Montiel, L.; Figueira, A. C.; Medina-Pérez, G.; Fernández-Luqueño, F.; Aguirre-Álvarez, G.; Pérez-Soto, E.; Pérez-Ríos, S.; Campos-Montiel, R. G. Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion. *Appl. Sci.* **2022**, *12* (15), 7892. <https://doi.org/10.3390/app12157892>.
- (114) Wanyo, P.; Chamsai, T.; Toontom, N.; Nghiep, L. K.; Tudpor, K. Differential Effects of In Vitro Simulated Digestion on Antioxidant Activity and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Purple Rice Bran Extracts. *Molecules* **2024**, *29* (13), 2994. <https://doi.org/10.3390/molecules29132994>.
- (115) Aumasa, T.; Ogawa, Y.; Singh, J.; Panpipat, W.; Donlao, N. The Role of Herbal Teas in Reducing the Starch Digestibility of Cooked Rice (*Oryza Sativa* L.): An in Vitro Co-Digestion Study. *NFS J.* **2023**, *33*, 100154. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.100154>.

- (116) Bouayed, J.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Total Phenolics, Flavonoids, Anthocyanins and Antioxidant Activity Following Simulated Gastro-Intestinal Digestion and Dialysis of Apple Varieties: Bioaccessibility and Potential Uptake. *Food Chem.* **2011**, *128* (1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>.
- (117) Fawole, O. A.; Opara, U. L. Stability of Total Phenolic Concentration and Antioxidant Capacity of Extracts from Pomegranate Co-Products Subjected to in Vitro Digestion. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16* (1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1343-2>.
- (118) Qin, W.; Ketnawa, S. Exploring the Bioaccessibility of Roasted Japanese Green Tea: Impact of Simulated Gastrointestinal Digestion. *Foods* **2025**, *14* (2), 311. <https://doi.org/10.3390/foods14020311>.
- (119) McDougall, G. J.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (15), 5896–5904. <https://doi.org/10.1021/jf050131p>.
- (120) Bermudezsoto, M.; Tomasbarberan, F.; Garciaconesa, M. Stability of Polyphenols in Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Subjected to in Vitro Gastric and Pancreatic Digestion. *Food Chem.* **2007**, *102* (3), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.025>.
- (121) Desseva, I.; Mihaylova, D. Influence of in Vitro Gastrointestinal Digestion on Phytochemicals in Pomegranate Juice. *Food Sci. Technol.* **2020**, *40* (suppl 1), 211–216. <https://doi.org/10.1590/fst.07219>.
- (122) Dantas, A. M.; Mafaldo, I. M.; Oliveira, P. M. D. L.; Lima, M. D. S.; Magnani, M.; Borges, G. D. S. C. Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Native and Exotic Frozen Pulps Explored in Brazil Using a Digestion Model Coupled with a Simulated Intestinal Barrier. *Food Chem.* **2019**, *274*, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.099>.
- (123) Dutra, R. L. T.; Dantas, A. M.; Marques, D. D. A.; Batista, J. D. F.; Meireles, B. R. L. D. A.; De Magalhães Cordeiro, Â. M. T.; Magnani, M.; Borges, G. D. S. C. Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Frozen Pulps of Brazilian Exotic Fruits Exposed to Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 650–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.047>.

- (124) Cilla, A.; Bosch, L.; Barberá, R.; Alegría, A. Effect of Processing on the Bioaccessibility of Bioactive Compounds – A Review Focusing on Carotenoids, Minerals, Ascorbic Acid, Tocopherols and Polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *68*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>.