ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

«ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΠΟΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: Ανάκτηση και αξιολόγησή τους ως πρόσθετα σε μοντέλα τροφίμων»

Καρβέλα Ευαγγελία

Τριμελής Επιτροπή

Καραθάνος Βάιος	**Καλογερόπουλος Νικόλαος**	**Ντουρτόγλου Βασίλειος**
Καθηγητής Χ.Π.	**Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π.**	**Καθηγητής ΤΕΙ Αθήνας**
(Επιβλέπων)		

Αθήνα 2011

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων

Καραθάνος Βάιος, Καθηγητής Χ.Π.

Μέλη

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π. &

Ντουρτόγλου Βασίλειος, Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Αθήνας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καραθάνος Βάιος, Καθηγητής Χ.Π.

Ντουρτόγλου Βασίλειος, Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Αθήνας

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π.

Κωμαΐτης Μιχαήλ, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ωραιοπούλου Βασιλική, Καθηγήτρια Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Χίου Αντωνία, Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π.

Μακρής Δημήτριος, Λέκτορας Πανεπιστημίου Αιγαίου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Βάιου Καραθάνου.

Με το πέρας της διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Βάιο Καραθάνο για την καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καλογερόπουλο Νικόλαο, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για την πολύτιμη βοήθεια του και την υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Τον Καθηγητή κ. Ντουρτόγλου Βασίλειο, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τις χρήσιμες υποδείξεις του, που συνετέλεσαν στην διαμόρφωση του προσανατολισμού της παρούσας διατριβής καθώς επίσης και στην βελτίωση του κειμένου.

Για την μεγάλη τιμή και τις παρατηρήσεις επί του κειμένου και την υποστήριξη, ευχαριστώ τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής την Καθηγήτρια κ. Ωραιοπούλου Βασιλική, τον Καθηγητή κ. Κωμαΐτη Μιχάλη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χίου Αντωνία.

Τον Λέκτορα του Πανεπιστημίου Αιγαίου κ. Μακρή Δημήτρη, για την καθοδήγησή του, τη συνεχή βοήθειά του, την ηθική και επιστημονική υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του Χ.Π., κυρίως τη Λέκτορα Α. Καλιώρα, τη Δρ. Α. Κουντούρη, την κ. Μ. Χρηστέα, την Α. Γκιοξάρη, την Ε. Παραμέρα, τον Π. Κανέλλο καθώς επίσης τον κύριο Κοντελέ Σπύρο απο το Τ.Ε.Ι. Αθηνών για την εποικοδομητική συνεργασία τους κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Τους γονείς μου, οι οποίοι ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν σε όλες τις επιλογές μου, για την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους.

Στους γονείς μου Δημήτρη & Μαρία

Ολικές Πολυφαινόλες	TP
Ολικές Φλαβανόλες	TFl
Ολικές Φλαβόνες	TFn
Προανθοκυανιδίνες	PC
Ικανότητα Δέσμευσης Ελεύθερης Ρίζας DPPH	A_{AR}
Μέτρηση της αναγωγικής δύναμης με την μέθοδο FRAP	P_R
Προσδιορισμός Αλληλεπίδρασης	ME
Συζυγή Διένια	CD
Ασκορβικό Οξύ	AA
Α- Τοκοφερόλη	a-Tcp
Στατιστικά προγράμματα για την ανάλυση δεδομένων	SigmaPlot™ 11 JMP™ 8
Βόστρυχες Αγιωργίτικο	St-Ag
Βόστρυχες Σαββατιανό	St-Sv
Βόστρυχες Μοσχοφίλερο	St-Mf
Γίγαρτα Αγιωργίτικο	Sd-Ag
Γίγαρτα Σαββατιανό	Sd-Sv
Γίγαρτα Μοσχοφίλερο	Sd-Mf

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ **9**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ **11**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ **13**

Περίληψη **14**

Abstract **16**

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **19**

Πρόλογος **19**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο} **21**

Εισαγωγή – Τα υποπροϊόντα της διαδικασίας οινοποίησης **21**
Γενικά 21
Έκταση αμπελοκαλλιέργειας, μέγεθος οινοπαραγωγής και οινοκατανάλωσης 21
Σύσταση του σταφυλιού 24
Μορφολογία και σύσταση του βοστρύχου 25
Μορφολογία και σύσταση της ρώγας 27
Μορφολογία και σύσταση των γιγάρτων 28
Υποπροϊόντα οινοποιείου 30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο} **32**

Πολυφαινόλες **32**
Φυσικά και σύνθετα αντιοξειδωτικά 32
Χημεία και βιοχημεία των πολυφαινολών 34
Προσδιορισμός πολυφαινολών 47
Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών 48
Τρόπος δράσης των πολυφαινολών 50
Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} **54**

Εκχύλιση Διαλυμάτων και Αιωρημάτων **54**
Απλή εκχύλιση 54
Πολλαπλή εκχύλιση 55
Εκχύλιση των στερεών 56
Πολλαπλή κατανομή 58
Διαλύτες εκχύλισης 60
Μέθοδοι εκχύλισης πολυφαινολών 61

Εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical fluid extraction) **62**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο} **65**

Λίπη, Έλαια και Λιποσώματα Λεκιθίνης **65**
Λίπη και έλαια στα τρόφιμα 65
Οξείδωση των λιπών και των ελαίων που περιέχονται στα τρόφιμα 66

Ορισμός και ιδιότητες λεκιθίνης 67
Μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης 70

ΣΚΟΠΟΣ 73

ΜΕΡΟΣ Β΄: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο} 74

Βελτιστοποίηση εκχύλισης και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων 74

Υλικά και Μέθοδοι 74

Παραλαβή και προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών 74
Παραλαβή δείγματος 74
Αναλυτική πορεία 74
Λυοφιλίωση 74
Παραλαβή φαινολικών συστατικών 75

Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων 77
Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (TF) 78
Προσδιορισμός των ολικών φλαβανολών (TFl) 79
Προσδιορισμός ολικών φλαβονών (TFn) 80
Προσδιορισμός Προανθοκυανιδινών (PC) 80
Προσδιορισμός πολυφαινολών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) 82
Προσδιορισμός πολυφαινολών με Υγρή Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μάζας (LC/MS) 82

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης 83
Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR}) 83
Μέτρηση της αναγωγικής δύναμης με την μέθοδο FRAP (P_R) 84

Επίδραση των εκχυλισμάτων σε πρότυπη λιπαρή ύλη 86

Παρασκευή λιποσωμάτων 86
Δημιουργία λιποσωμάτων λεκιθίνης (πρότυπη λιπαρή ύλη) 86
Προσδιορισμός συζυγών διενίων (Conjugated Dienes) (CD) 86

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκχυλισμάτων και πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών 87
Δημιουργία μιγμάτων: Εκχυλίσματα- Πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες 87
Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR}) 89
Προσδιορισμός Αλληλεπιδράσεων (Mixture Effect, ME) 89

Στατιστική επεξεργασία 90
Εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης 90

ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ 91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο} 91

Βελτιστοποίηση εκχύλισής και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων 91

Βόστρυχες 91
Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης 91
Αξιολόγηση αποτελεσμάτων ανά κατηγορία φαινολικών κλάσεων 100
Συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση 101
Πολυφαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων 102

Γίγαρτα 106

Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης 106
Συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση 113
Κατανομή πολυφαινολών στα εκχυλίσματα 114

Συζήτηση αποτελεσμάτων 118

Βόστρυχες 118
Βελτιστοποίηση εκχύλισης και επιδρώσες παράμετροι 118
Πολυφαινολική σύσταση και αντιοξειδωτικές ιδιότητες 120

Γίγαρτα 121
Βελτιστοποίηση εκχύλισης και επιδρούσες Παράμετροι 121
Φαινολική σύσταση και αντιοξειδωτικές ιδιότητες 122

Επίδραση των εκχυλισμάτων στην οξείδωση μοντέλων λιπαρών υλών 124
Παραγωγή διαλυμάτων από εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποίησης 124
Δραστικότητα των εκχυλισμάτων στην παραγωγή συζυγών διενίων 126

Συζήτηση αποτελεσμάτων 130

Μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ εκχυλισμάτων και πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών 134
DPPH: Εκχυλίσματα Βοστρύχων- Πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες 134
Προσέγγιση γραμμικής συσχέτισης 134
Προσέγγιση μέσω παραγοντικού σχεδιασμού 138

Συζήτηση αποτελεσμάτων 144

ΜΕΡΟΣ Ε΄: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^{Ο} 147

Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων και αξιολόγηση εκχυλισμάτων 147

Συμπεριφορά των εκχυλισμάτων σε οξειδωτικά φαινόμενα λιποσωμάτων λεκιθίνης 148

Συνέργεια ή Ανταγωνισμός 149

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 150

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 162

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1*:* Εκτάσεις φυτεμένες με αμπέλια σε εκτάρια παγκοσμίως (www.oiv.org). 22

Πίνακας 2 *:* Παραγωγή οίνου παγκοσμίως σε hL (εκατόλιτρα) (www.oiv.org) . 23

Πίνακας 3 : Κοινοί διαλύτες εκχύλισης 61

Πίνακας 4 : Κωδικοποίηση και πειραματικές τιμές για τις ανεξάρτητες μεταβλητές που μελετήθηκαν για τον 2^3 πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό. 77

Πίνακας 5 : Κωδικοποίηση και πειραματικές τιμές για τις ανεξάρτητές μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον 3×3 πειραματικό σχεδιασμό. 88

Πίνακας 6 : Πειραματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα των χρησιμοποιούμενων ανεξάρτητων μεταβλητών για το 2^3 πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό. 91

Πίνακας 7 : Πειραματικές και Εκτιμώμενες τιμές ολικών πολυφαινολών (TP) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 92

Πίνακας 8 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβανολών (TFl) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 93

Πίνακας 9 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβονών (TFn) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 94

Πίνακας 10 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές προανθοκυανιδινών (PC) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 95

Πίνακας 11 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών κατά την ανάκτηση πολυφαινολών διαφορετικών τάξεων οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 2^3 πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού. 96

Πίνακας 12 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και προβλεφθείσες τιμές για την παραλαβή πολυφαινολών. 97

Πίνακας 13 : Στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν τη συσχέτιση των διαφόρων πολυφαινολικών δομών με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες (A_{AR} and P_R). Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης. 101

Πίνακας 14 : UV-vis και χαρακτηριστικά φασματοσκοπίας μάζας από τις κύριες δομές των φυτοχημικών πολυφαινολών που παρατηρήθηκαν στα εκχυλίσματα βοστρύχων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο (*V. vinifera*). 105

Πίνακας 15 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών πολυφαινολών (TP) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 107

Πίνακας 16 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβανολών (TFl) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 108

Πίνακας 17 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές προανθοκυανιδινών (PC) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 109

Πίνακας 18 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών κατά την ανάκτηση πολυφαινολών διαφορετικών τάξεων οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 2^3 πλήρους παραγοντικού συστήματος. 110

Πίνακας 19 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και θεωρητικά υπολογισμένες τιμές για την απόκτηση πολυφαινολών διαφόρων τάξεων. 111

Πίνακας 20 : Στατιστικοί παράμετροι που περιγράφουν την συσχέτιση των διαφόρων πολυφαινολικών δομών με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες(A_{AR} and P_R). Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης. 114

Πίνακας 21 : Βέλτιστες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση εκχυλισμάτων με το υψηλότερο A_{AR}. 124

Πίνακας 22 : Πολυφαινολικές παράμετροι και τιμές A_{AR} των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν από τα εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποίησης. 125

Πίνακας 23 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξεως υπολογισμένες για τα τυφλά δείγματα και τα καθαρά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν. 128

Πίνακας 24 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξης υπολογισμένες για τα δείγματα των βοστρύχων. 129

Πίνακας 25 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξης υπολογισμένες για τα δείγματα των γιγάρτων. 130

Πίνακας 26 : Εύρος συγκέντρωσης και στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ του $\%\Delta A_{515}$ και καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών αλλά και των εκχυλισμάτων. 134

Πίνακας 27 : Εύρος συγκεντρώσεων και στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόζοντας γραμμική συσχέτιση μεταξύ του $\%\Delta A_{515}$ και μιγμάτων καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών/εκχυλισμάτων. 137

Πίνακας 28 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο $\%\Delta A_{515}$ για όλα τα αντιοξειδωτικά μίγματα, οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 3×3 παραγοντικού συστήματος 138

Πίνακας 29 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Αγιωργίτικου/ Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 139

Πίνακας 30 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Σαββατιανό/Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 139

Πίνακας 31 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Μοσχοφίλερο/Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 139

Πίνακας 32 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Αγιωργίτικο/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 140

Πίνακας 33 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Σαββατιανό/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 140

Πίνακας 34 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Μοσχοφίλερο/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό. 141

Πίνακας 35 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για όλα τα δοκιμασμένα μίγματα, μετά την εφαρμογή του 3x3 παραγοντικού συστήματος. 142

Πίνακας 36 : Η αλληλεπίδραση μίγματος (ΜΕ: mixture effect) που παρατηρήθηκε από την αλληλεπίδραση των εκχυλισμάτων και των αντιοξειδωτικών ουσιών. 144

Περιεχόμενο Γραφημάτων

Γράφημα 1 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών πολυφαινολών (TP). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο. 98

Γράφημα 2 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβανολών (TFl). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο. 98

Γράφημα 3 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβονών (TFn). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο. 99

Γράφημα 4 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των προανθοκυανιδινών (PC). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο. 99

Γράφημα 5 : Ενώσεις των ολικών πολυφαινολών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που περιέχονται στα εκχυλίσματα σύμφωνα με την ανάλυση με HPLC. Καταγραφή κορυφών: 1: καφταρικό οξύ (καφεϊκό παράγωγο του τρυγικού οξέος), 2: διμερές φλαβανολών, 3:κατεχίνη, 4: γαλλικά παράγωγα διμερών φλαβανολών, 5: αστιλβίνη (ραμνοζίτης της διυδρόξυκερκετίνης), 6: 3-*O*-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης, και 7: ρουτίνη (3-*O*-ρουτινοζίτης της κερκετίνης). 102

Γράφημα 6 : Χρωματογραφήματα από εκχυλίσματα Σαββατιανού και Αγιωργίτικου τα οποία παρουσιάζουν το μεγαλύτερο φαινολικό δυναμικό. 103

Γράφημα 7 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών πολυφαινολών (TP). A, Μοσχοφίλερο, B, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο. 112

Γράφημα 8 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβανολών (TFl). A, Μοσχοφίλερο, B, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο. 112

Γράφημα 9 : Τρισδιάστατες πλάκες-επιφάνειας που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των προανθοκυανιδινών (PC). A, Μοσχοφίλερο, B, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο. 113

Γράφημα 10 : Ενώσεις των ολικών πολυφαινολών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που περιέχονται στα εκχυλίσματα σύμφωνα με την ανάλυση με HPLC (Μοσχοφίλερο). Καταγραφή κορυφών: 1: γαλλικό οξύ, 2: ταννικό οξύ, 3:κατεχίνη, 4,5 και 7: γαλλικά παράγωγα διμερών φλαβανολών, 6: A-τύπος γαλλικού παραγώγου διμερών φλαβανολών. 115

Γράφημα 11 : Χρωματογραφήματα από τα βέλτιστα εκχυλίσματα (μέγιστο φαινολικό δυναμικό) γιγάρτων Σαββατιανού και Μοσχοφίλερου 115

Γράφημα 12 : Τυπικό παράδειγμα κινητικής μηδενικής τάξης της δημιουργίας συζυγών διενίων (CDV) σε λιποσώματα λεκιθίνης, ορών αντιοξειδωτικών διαλυμάτων, σε διαφορετικό pH. Συνδυασμοί: ST-Sd: εκχύλισμα γιγάρτων από την ποικιλία Σαββατιανό (*V. Vinifera),* AG-Sm: εκχύλισμα βοστρύχων από την ποικιλία Αγιωργίτικο (*V. vinifera*), ST-Sm: εκχύλισμα βοστρύχων από την ποικιλία Σαββατιανό (*V. vinifera*). 127

Γράφημα 13 : Συγκριτικά διαγράμματα που επεξηγούν τις τιμές *k* της κινητικής της μηδενικής τάξεως παραγωγής των συζυγών διενίων (CDV) στα λιποσώματα λεκιθίνης, παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών σε διαφορετικές τιμές pH. 131

Γράφημα 14 : Γράφημα που περιγράφει τη συσχέτιση μεταξύ του (%ΔA_{515}) και των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών ασκορβικό οξύ (ΑΑ) και α-τοκοφερόλη (α-Tcp) (Α) και εκείνη με τα εκχυλίσματα των βοστρύχων (Β). 135

Γράφημα 15 : Γράφημα που περιγράφει τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του (%ΔA_{515}) και της συνολικής συγκέντρωσης (Α) εκχυλισμάτων + ασκορβικό οξύ και (Β) εκχυλισμάτων + α-τοκοφερόλη σε ίσες ποσότητες. 136

Γράφημα 16 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔΑ515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (Α) ΤΡ και ΑΑ και (Β) ΤΡ και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Αγιωργίτικου. 142

Γράφημα 17 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔΑ515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (Α) ΤΡ και ΑΑ και (Β) ΤΡ και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Σαββατιανού. 143

Γράφημα 18 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔΑ515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (Α) ΤΡ και ΑΑ και (Β) ΤΡ και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Μοσχοφίλερου. 143

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1 : Δομή φαινολών 34
Σχήμα 2 : Χημικός τύπος της γλυκοζυλιωμένης ρεσβερατρόλης. 36
Σχήμα 3 : Δομή φαινολικών οξέων 37
Σχήμα 4 : Γενική δομή φλαβονοειδών 38
Σχήμα 5 : Δομή φλαβονολών 39
Σχήμα 6 : Δομή φλαβονών 39
Σχήμα 7 : Δομή Φλαβανονών 40
Σχήμα 8 : Δομή Ισοφλαβονών 41
Σχήμα 9 : Δομή (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης 42
Σχήμα 10 : Δομή Φλαβανολών 43
Σχήμα 11 : Δομή Ανθοκυανιδινών 45
Σχήμα 12 : Δομή Λιγνανών 46
Σχήμα 13 : Δομή Στιλβενίων (απεικόνιση ρεσβερατρόλης) 47
Σχήμα 14 : Δομή Κερκετίνης 52
Σχήμα 15 : Διαχωριστικό χωνί για απλή εκχύλιση 55
Σχήμα 16 : Συσκευές συνεχούς εκχυλίσεως υγρών 56
Σχήμα 17 : Εκχυλιστικές συσκευές στερεών 57
Σχήμα 18 : Συστοιχία πολλαπλής κατανομής 58
Σχήμα 19 : Γραφική μέθοδος, για τον υπολογισμό του ορισμού βαθμίδων χρησιμοποιώντας μη αναμίξιμους διαλύτες. 59
Σχήμα 20 : Αρχή της μεθόδου υπερκρίσιμης εκχύλισης. 63
Σχήμα 21 : Δομή μίας φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφολιπιδίων που υπάρχουν στη λεκιθίνη 67
Σχήμα 22 : Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με φλαβονοειδή μέσω 3΄-4΄ο-διφαινολικής ομάδα σε Β δακτύλιο (a) και κετολ- δομές 4-κετο,3-υδροξυ σε C δακτύλιο (b) ή 4-κετο, 5-υδρόξυ στον C και A δακτύλιο (c). (Laguerre και συν., 2007). 72
Σχήμα 23 : Δομές των πολυφαινολικών φυτοχημικών που προσδιορίστηκαν στο βέλτιστο εκχύλισμα του Μοσχοφίλερου. 104
Σχήμα 24 : Δομές των πολυφαινολικών φυτοχημικών που προσδιορίστηκαν στο βέλτιστο εκχύλισμα του Μοσχοφίλερου. 116
Σχήμα 25 : Σχηματική αναπαράσταση των σταδιακών βημάτων που ακολουθούνται για αξιολογηθεί η ικανότητα των αντιοξειδωτικών διαλυμάτων που δημιουργήθηκαν για να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων σε πρότυπο μοντέλο λιποσωμάτων λεκιθίνης. 125

Περίληψη

Με αφορμή την αυξανόμενη παραγωγή υποπροϊόντων οινοποιείου και την ταυτόχρονη αυξανόμενη ζήτηση για παραγωγή φιλική προς το περιβάλλον δημιουργήθηκε η ιδέα για την εκμετάλλευση των υποπροϊόντων με διάφορους τρόπους, υπό μορφή οργανικών λιπασμάτων, ζωοτροφών κ.τ.λ. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η πιθανή χρήση εκχυλισμάτων των βιοοργανικών υποπροϊόντων οινοποιίας, κυρίως γιγάρτων και βοστρύχων, ως φυσικών αντιοξειδωτικών σε λιπαρές ύλες λόγω της περιεκτικότητάς τους σε βιοδραστικά μικροσυστατικά, όπως φλαβονόλες, στιλβένια, μονομερείς και ολιγομερείς φλαβανόλες που παρουσιάζονται σε άλλα υποπροϊόντα.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθούν:

1. Οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης υποπροϊόντων οινοποιίας σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία αιθανόλης **:** νερού στο εκχυλιστικό μέσο και το pH του διαλύτη. Τα εκχυλίσματα αυτά αξιολογήθηκαν με προσδιορισμό ολικών πολυφαινολών (TP), ολικών φλαβανολών (TFl), ολικών φλαβονών (TFn), και προανθοκυανιδινών (PC), ενώ μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική τους δράση με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR}) και με την μέθοδο FRAP (P_R). Τέλος έγινε ποιοτικός προσδιορισμός πολυφαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία (HPLC) και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (LC/MS).

2. Η δράση των εκχυλισμάτων (προοξειδωτική ή αντιοξειδωτική) όταν εφαρμόζονται σε μοντέλο λιπαρής ύλης (λιποσώματα λεκιθίνης) μέσω προσδιορισμού συζυγών διενίων (CD value) παρουσία τόσο των εκχυλισμάτων όσο και πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών.

3. Η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα και αυτών που ευρίσκονται κυρίως στα τρόφιμα, όπως ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικά pH μέσω μέτρησης των A_{AR} και P_R.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι:

1. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την βελτιστοποίηση της εκχυλισιμότητας των φαινολικών συστατικών από φυτικούς ιστούς, ποικίλλουν ακόμα και όταν πρόκειται για την ίδια κατηγορία ιστού που προέρχεται από διαφορετικές ποικιλίες, χωρίς να μπορεί να προσδιοριστεί ένα μοντέλο εκχύλισης γενικής χρήσης που να παρουσιάζει τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης. Η εκχύλιση των φλαβανολών απαιτεί υψηλή περιεκτικότητα αιθανόλης (60%), σε αντίθεση με τις φλαβόνες που απαιτούν χαμηλότερο ποσοστό αιθανόλης (40%), ενώ όσον αφορά τις

προανθοκυανιδίνες περιεκτικότητες αιθανόλης μεταξύ 44% και 53% θεωρούνται περισσότερο ικανοποιητικές σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Σε σχέση με το pH, η εκχύλιση των φλαβανολών και των προανθοκυανιδινών ήταν πιο αποτελεσματική σε τιμές pH 2,0-3,0, ενώ οι φλαβόνες εκχυλίστηκαν καλύτερα σε τιμές pH 4,5-6,0. Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης των ολικών φλαβανολών και των ολικών φλαβονών ήταν 1-3,5 και 1-5 ώρες, αντιστοίχως.

2. Οι ενώσεις που καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την αντιοξειδωτική ικανότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων είναι οι ολιγομερείς φλαβανόλες και οι προανθοκυανιδίνες (πολυμερείς φλαβανόλες).

3. Ανάλογα με το pH τα εκχυλίσματα μπορούν να μετατραπούν από αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικά, με τα εκχυλίσματα των βοστρύχων να παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα, πιθανώς λόγω της ύπαρξης των φλαβονών οι οποίες ίσως είναι περισσότερο προστατευτικές στην αυτοξείδωση, ως αποτέλεσμα του περισσότερο λιπόφιλου χαρακτήρα τους.

4. Τέλος μια πρώτη προσέγγιση που έγινε με τα εκχυλίσματα των βοστρύχων και τις αντιοξειδωτικές ουσίες ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη παρατηρήθηκε ανταγωνισμός σε όλες τις περιπτώσεις, η αιτία του φαινομένου θα πρέπει όμως να μελετηθεί εκτενέστερα.

Abstract

Due to the generation of large quantities of winery by-products and the simultaneous increasing demand for environmentally friendly production, wine industries have started to adopt the idea of integrated waste management approach, for example through their utilization as fertilizers, feeds, etc. The present thesis examined the potential use of extracts obtained from bio-organic materials, mainly seeds and stems, as natural antioxidants in fats, due to their polyphenolic composition e.g. flavonols, stilbenens, monomeric and oligomeric flavanols.

The purpose of this thesis was to study:

1. The optimum extraction conditions in relation to the extraction time, the ethanol/water ratio, and the pH of the solvent. The extracts were assessed by determining TP, TFl, TFn, PC, as well as antioxidant activity indeces A_{AR} and P_R. Qualitative polyphenolic analysis was performed by HPLC and LC/MS.
2. The pro-oxidant and antioxidant action of the extracts on fatty material (lecithin liposome) was studied by measuring CD value in both extracts and standard antioxidants.
3. The possible interactions between the antioxidants present in the extracts and those usually found in foods (ascorbic acid; α-tocopherol).

The results of this study showed that:

- The optimization of phenolic extracts from plant material may vary substantially, even for the same tissue originating from different varieties. For example, the extracts of flavanols required solvent system with 60% ethanol, in contrast to flavones which required 40% ethanol. The values of pH also influenced the extractability. as the extraction of flavanols and proanthocyanidins was optimum at pH values between 2-3, while extractability of flavones was optimum at pH 4.5-6. The optimum extraction times for TFn and TFl were 1-3.5 and 1-5 hours, respectively.
- The antioxidant activity of the extracts is mainly determined by the concentrations of oligomeric flavanols and proanthocyanidins.
- Depending on the pH of the solvent, the action of extracts can change from antioxidant to prooxidant. Stems' extracts presented a higher stability due to the presence of the more lipophilic flavones.
- The assessment of the mixture effects when the extracts were combined with ascorbic acid (AA) and α-tocopherol (α-Tcp) with a simple linear regression analysis is not sufficient, therefore the response surface methodology might be a valuable statistical tool of binary mixtures of antioxidants.

- In all combinations tested it was found that an antagonism is manifested, presumably as a result of AA and α-Tcp regeneration by the extract polyphenols.

Η παρούσα διατριβή υποστηρίζεται από τις παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. **Evangelia Karvela**, Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (Vitis vinifera) stems polyphenols. *Talanta*, 79(5), 2009, 1311-1321.

2. **Evangelia Karvela,** Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos, Panagiotis Kefalas. Factorial design optimisation of grape (Vitis vinifera) seed polyphenol extraction. *European Food Research Technology*, 229(5), 2009, 731-743.

3. **Evangelia Karvela,** Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos. The Effect of pH on the Efficiency of Vinification By-Product Extracts to Inhibit Lipid Peroxidation in a Lecithin Liposome Model Matrix, *Journal of Food Quality*, 34, 2011, 299-305.

4. **Evangelia Karvela,** Dimitris P. Makris, Vaios T. Karathanos**.** Implementation of Response Surface Methodology to Assess the Antiradical Behaviour in Mixtures of Ascorbic Acid and α-Tocopherol with Grape (*Vitis vinifera*) Stem Extracts **(Accepted in Food Chemistry).**

ΜΕΡΟΣ Α΄: Θεωρητικό μέρος

Πρόλογος

Η βιομηχανική παραγωγή του οίνου συνοδεύεται από την παραγωγή ανόργανων (μπεντονίτης), αλλά κυρίως βιοοργανικών (φλοιοί, γίγαρτα, στέμφυλα) υλικών, που προκύπτουν κατά τη διαδικασία παραγωγής. Την ίδια στιγμή, η αυξανόμενη ζήτηση για παραγωγή φιλική προς το περιβάλλον, υψηλότερο κέρδος και παραγωγή λειτουργικών προϊόντων, ωθεί την βιομηχανία οίνου σε αναζήτηση αποτελεσματικών τρόπων εκμετάλλευσης των υποπροϊόντων της. Στην Ευρώπη, εκτιμάται ότι παράγονται ετησίως 14,5 εκατομμύρια τόνοι υποπροϊόντων από τις βιομηχανίες οίνου (Pinelo et al., 2006).

Οι βόστρυχες (μίσχοι), που αποτελούν ένα μέρος των συνολικών αποβλήτων σταφυλιών που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, είναι πλούσιοι σε πολυφαινόλες. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Pezzuto, 2008), εμφανίζονται να περιέχουν βιοδραστικά μικροσυστατικά όπως φλαβονόλες, στιλβένια, μονομερείς και ολιγομερείς φλαβανόλες που δεν παρουσιάζονται σε άλλα υποπροϊόντα (Pussa et al., 2006, Makris et al., 2008). Επιπλέον, το πολυφαινολικό περιεχόμενο των μίσχων αποδείχθηκε πως ανέρχεται περίπου στο 5,8% w/w επί ξηρού βάρους (Makris et al., 2007) και επομένως οι βόστρυχες μπορούν να αποτελέσουν μια πηγή βιοενεργών πολυφαινολών που δεν πρέπει να αγνοηθεί. Επιπρόσθετα, τα γίγαρτα (κουκούτσια) των σταφυλιών, αποτελούν μια ιδιαίτερη περίπτωση υποπροϊόντων οινοποίησης, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία φλαβανολών και στην υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, που μπορεί να φθάσει μέχρι το 13,8% w/w επί ξηρού βάρους (Makris et al., 2007, Guendez et al., 2005a).

Η χρήση των παραπάνω εκχυλισμάτων ως φυσικών αντιοξειδωτικών σε λιπαρές ύλες φαντάζει δελεαστική, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων που έχουν τα εκχυλίσματα (υδατοδιαλυτά) ως προς την λιπαρή ύλη. Σε ετερογενή συστήματα τροφίμων, οι φυσικές ιδιότητες όπως η κατανομή μεταξύ υδατικής και λιπαρής φάσης, μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο τύπος και η πολικότητα της λιπαρής ύλης επηρεάζουν ουσιαστικά την δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών. Στην παρούσα εργασία έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης βοστρύχων και γιγάρτων με υδραλκοολικά διαλύματα ως προς τον χρόνο εκχύλισης, συγκέντρωση αιθανόλης και pH. Τα βέλτιστα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα σε

λιποσώματα. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε λιποσώματα λεκιθίνης σε διαφορετικά pH, λόγω της ικανότητάς τους να διαλυτοποιούν τα εκχυλίσματα των υποπροϊόντων, για να εντοπίσουμε τις τιμές pH στις οποίες παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (διατηρώντας τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού σταθερές).

Στην φύση υπάρχουν διαφορετικοί τύποι αντιοξειδωτικών και η επιλογή τους για την προστασία των τροφίμων γίνεται με βάση τις φυσικές ιδιότητες του ίδιου του τροφίμου. Ταυτόχρονα οι συνδυασμοί τους είναι ποικίλοι και οι αλληλεπιδράσεις τους αρκετά ισχυρές. Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η λιποδιαλυτή α-τοκοφερόλη (μορφή της βιταμίνης Ε που απορροφάται περισσότερο από τον ανθρώπινο οργανισμό) και το υδατοδιαλυτό ασκορβικό οξύ που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Επίσης μελετήθηκε η τυχόν αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με τα φυσικά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στα υποπροϊόντα οινοποιίας.

Κεφάλαιο 1^{ο}

Εισαγωγή – Τα υποπροϊόντα της διαδικασίας οινοποίησης

Γενικά

Η καλλιέργεια του αμπελιού φαίνεται ότι ξεκίνησε από τη νότια περιοχή του Καυκάσου, ωστόσο η καλλιέργειά του και η παραγωγή οίνου αποτελούν χαρακτηριστικές δραστηριότητες του ελληνικού λαού από την αρχαιότητα. Η ανάπτυξη της αμπελοκαλλιέργειας και της οινοποίησης στην χώρα μας θεωρούνται αποτέλεσμα της μετανάστευσης ανατολικών λαών στον ελλαδικό χώρο και τοποθετούνται χρονολογικά γύρω στην 3^{η} χιλιετηρίδα π.Χ.

Το κρασί διατηρούσε εξέχουσα θέση σε πολλές γιορτές της αρχαιότητας, όπως τα Ανθεστήρια, τα Λήναια και τα Διονύσια, λόγω της θεϊκής προέλευσης που του είχε αποδοθεί. Διάφορες πόλεις φέρονται να έχουν ονομασίες συναφείς με τον οίνο ενώ το θέμα της αμπελουργίας- οινοποιίας ήταν μεταξύ των παραστάσεων που κοσμούσαν αρχαία ελληνικά νομίσματα και αγγεία. Όλα τα στοιχεία που προέρχονται από φιλολογικά ή επιγραφικά κείμενα και αρχαιολογικά ευρήματα αποδεικνύουν τη μεγάλη σημασία του αμπελιού και του κρασιού στην ζωή των αρχαίων Ελλήνων. Στο πέρασμα του χρόνου παρέμεινε άρρηκτα συνδεδεμένο με τον ελληνικό πολιτισμό και αποτέλεσε διατροφικό σύμβολο και λατρευτικό στοιχείο του χριστιανισμού.

Στις μέρες μας το κρασί θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της ελληνικής παράδοσης και της Μεσογειακής διατροφής γενικότερα. Η κατανάλωση του από την ελληνική οικογένεια γίνεται σε καθημερινή βάση και σε αυτή αποδίδονται πιθανές ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως η προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες έρευνες που αποσκοπούν τόσο στην κατανόηση των προστατευτικών μηχανισμών που ενεργοποιεί, όσο και στον εντοπισμό των πιθανών ωφέλιμων συστατικών του.

Έκταση αμπελοκαλλιέργειας, μέγεθος οινοπαραγωγής και οινοκατανάλωσης

Σήμερα το αμπέλι καλλιεργείται σε όλο σχεδόν τον κόσμο, στο Βόρειο και στο Νότιο ημισφαίριο και σε γεωγραφικά πλάτη με εύκρατο κλίμα, όπου η καλλιέργειά του ταιριάζει. Εντούτοις, είναι χαρακτηριστικό ότι στις χώρες που βρίσκονται γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου είναι συγκεντρωμένο περίπου το 90% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης και

παραγωγής. Πρέπει να σημειώσουμε ότι και στις χώρες της Λατινικής Αμερικής, όπου το αμπέλι καλλιεργείται τα τελευταία χρόνια, οι εκτάσεις ήδη είναι σημαντικές καθιστώντας την Αργεντινή και τη Χιλή ανταγωνιστικές χώρες.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Γραφείου Αμπέλου και Οίνου (O.I.V., www.oiv.org), στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ των δύο παγκοσμίων πολέμων η έκταση της παγκόσμιας αμπελοκαλλιέργειας ανερχόταν στα 65 εκατομμύρια στρέμματα. Το 1962 και για την επόμενη εικοσαετία η έκταση του παγκόσμιου αμπελώνα ήταν περίπου 100 εκατομμύρια στρέμματα ενώ κατά τη δεκαετία 1981-1991, η έκταση των αμπελώνων περιορίστηκε στα 85 εκατομμύρια στρέμματα.

Πίνακας 1*:* Εκτάσεις φυτεμένες με αμπέλια σε εκτάρια παγκοσμίως (www.oiv.org).

Χρονικές περίοδοι	**Εκτάσεις (στρέμματα)**
1971-1975	99 610 000
1976-1980	102 130 000
1981-1985	98 230 000
1986-1990	88 130 000
1991-1995	80 910 000
1996-2000	77 050 000
2001-2005	78 730 000
2001	78 880 000
2002	79 020 000
2003	79 090 000
2004	78 490 000
2005	78 160 000
2006	78 120 000

Την χρονική περίοδο 1986-1990 παρουσιάστηκε μείωση στην παγκόσμια και στην ελληνική παραγωγή κρασιού σε σύγκριση με τις αρχές της δεκαετίας του 1980 **(Πίνακας 2)**. Την επόμενη 5ετία η παγκόσμια οινοπαραγωγή εμφάνισε πτώση 13%. Από το 1995 και μετά το φαινόμενο ανεστράφη με αποτέλεσμα την αύξηση του παραγόμενου οίνου.

Πίνακας 2 : Παραγωγή οίνου παγκοσμίως σε hL (εκατόλιτρα) (www.oiv.org) .

Χρονικές περίοδοι	**Παραγωγή (hL)**
1971-1975	313 115 000
1976-1980	326 046 000
1981-1985	333 552 000
1986-1990	304 192 000
1991-1995	263 092 000
1996-2000	272 557 000
2001-2005	272 735 000
2001	265 671 000
2002	257 123 000
2003	264 089 000
2004	296 911 000
2005	279 880 000
2006	282 779 000

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 μέχρι τα μέσα τις δεκαετίας του 1990 η κατανάλωση κρασιού ακολούθησε φθίνουσα πορεία. Σε αντιστοιχία με την οινοπαραγωγή, το επόμενο χρονικό διάστημα εμφανίστηκαν αυξητικές τάσεις. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η πρωτιά στην κατανάλωση κρασιού ανήκει στους Ευρωπαίους (69,5% της παγκόσμιας κατανάλωσης το 2001). Ανάμεσα στις χώρες με την μεγαλύτερη κατανάλωση συγκαταλέγονται η Γαλλία (57 lt/κάτοικο) και η Ιταλία (53 lt/κάτοικο), ενώ η χαμηλότερη κατανάλωση συναντάται σε χώρες όπως η Ρουμανία (21 lt/κάτοικο) και η Μολδαβία (14 lt/κάτοικο). Παρά το γεγονός ότι η Ελλάδα είναι χώρα με παραδοσιακή οινοπαραγωγή, η κατανάλωση κρασιού δεν την κατατάσσει μεταξύ των πρώτων (25-30 lt/κάτοικο) (Bacchus 2008).

Σύσταση του σταφυλιού

Το αμπέλι δεν είναι ούτε θάμνος ούτε δέντρο. Στην φυσική του άγρια κατάσταση, το συναντάμε μόνο σαν αναρριχώμενο φυτό, δηλαδή κρεμασμένο πάνω σε άλλα δέντρα ή φυσικά υποστηρίγματα.

Ο άνθρωπος που για οικονομικούς λόγους το καλλιεργεί από την αρχαιότητα, το προσάρμοσε, ανάλογα με τα καλλιεργητικά μέσα που είχε στην διάθεσή του σε κάθε εποχή και για πρακτικούς λόγους, στα διάφορα καλλιεργητικά σχήματα στα οποία το συναντάμε (Κούσουλας, 2002).

Το αμπέλι ανήκει στο γένος Vitis της οικογένειας των αμπελιδών (Ampelidae, Vitaceae), το οποίο περιλαμβάνει μία ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλία ειδών. Ανάμεσα σε αυτά είναι και η άμπελος η οινοφόρος ή *Vitis Vinifera var. apyrena* ή όπως κοινώς ονομάζεται σταφιδάμπελος, η οποία καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του πλανήτη (Χαλουλάκος, 1993). Οι ποικιλίες της «Αμπέλου της Οινοφόρου» (Vitis vinifera), λόγω της υψηλής γενετικής ετερογένειας, υπερβαίνουν τις 10.000 παγκοσμίως. Ο αριθμός όμως των ποικιλιών, που καλλιεργούνται για παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων, περιορίζεται σε μερικές εκατοντάδες που ομαδοποιούνται με διάφορα κριτήρια.

Με βάση το κριτήριο «προορισμός χρήσης των προϊόντων», οι ποικιλίες κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες:

- ✓ Επιτραπέζιες
- ✓ Οινοποιΐας
- ✓ Σταφιδοποιΐας
- ✓ Χυμοποίησης
- ✓ Κονσερβοποίησης

Στο φυτό του αμπελιού, σε οποιαδήποτε μορφή και να το συναντάμε –στα υποστηριγμένα ή στα απλά χωρίς στήριξη σχήματα, σε κρεβατίνες, κορδόνια ή κύπελλα– διακρίνουμε σταθερά το υπόγειο και το υπέργειο μέρος. Το υπόγειο μέρος είναι οι ρίζες. Το υπέργειο είναι ο κορμός, οι βραχίονες (τα μπράτσα) και οι κληματίδες (βέργες) με τα φύλλα, τις έλικες και τα σταφύλια **(Ε*ικόνα 1*).**

Ο καρπός της αμπέλου είναι οι ρώγες ή ράγες, που όλες μαζί αποτελούν το σταφύλι. Είναι σαρκώδεις και περικλείονται από την φλούδα, ενώ μέσα τους έχουν τα γίγαρτα (κουκούτσια).

Το μέγεθος, το χρώμα αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού εξαρτώνται από την ποικιλία. Όλες μαζί οι ρώγες είναι κολλημένες στο βόστρυχο (τσάμπουρο). Στο βόστρυχο διακρίνουμε τη ράχη και τις διακλαδώσεις (τσαμπάκια) που διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα ανάλογα την ποικιλία, ενώ κάθε ρώγα είναι κολλημένη με μικρό μίσχο, τον ποδίσκο που μπαίνει στο εσωτερικό της σάρκας της με ένα μικρό θύσανο (πινέλο). Το σταφύλι αποτελείται από ρώγες σε ποσοστό περίπου 95% w/w ή 75% w/v και από τα τσάμπουρα ή βόστρυχες σε ποσοστό περίπου 5% w/w ή 25% w/v (Κουράκου – Δραγώνα).



Εικόνα 1 : Μορφολογία – Φυσιολογία *Vitis Vinifera* (κληματίδα – φύλλα – έλικες – άνθη - σταφύλι – γίγαρτα)

Μορφολογία και σύσταση του βοστρύχου

Ο βόστρυχος της σταφυλής, κοινώς κοτσάνι, αποτελεί το σκελετό της, ο οποίος απαρτίζεται από τον κεντρικό άξονα της ταξιανθίας, που καλείται ράχη και διακλαδίζεται σε δευτερεύοντες και τριτεύοντες άξονες. Από τις τελευταίες διακλαδώσεις εκφύονται δύο έως πέντε ποδίσκοι στην άκρη των οποίων προσφύεται ο πραγματικός καρπός που είναι οι ράγες. Το τμήμα της ράχης από το σημείο που εκφύεται από το βλαστό μέχρι την πρώτη διακλάδωση καλείται μίσχος. Ο βόστρυχος αποκτά τις οριστικές του διαστάσεις κατά τον περκασμό, δηλαδή κατά την

έναρξη της ωρίμανσης των ραγών, και στην συνέχεια δεν μεταβάλλεται. Το τελικό μέγεθος της σταφυλής εξαρτάται ουσιαστικά από το μέγεθος που αποκτά σ' αυτή τη φάση ο βόστρυχος και συγκεκριμένα ο κεντρικός άξονας της ταξιανθίας. Εκτός από το μέγεθος, ο βόστρυχος διαμορφώνει με τις διακλαδώσεις του το σχήμα της σταφυλής (κυλινδρική, κωνική, πτερυγωτή, διπλή, κλαδωτή κ.λπ.) και την πυκνότητά της. Μέχρι την έναρξη της ωριμάνσεως, ο μίσχος έχει ποώδη υφή, αλλά με την πάροδο του χρόνου ξυλοποιείται και το χρώμα του από πρασινόφαιο παίρνει απόχρωση ερυθρωπή. Δεν είναι όμως λίγες οι περιπτώσεις που διατηρείται στην ποώδη κατάσταση μέχρι την ωριμότητα και σπάζει με ελαφρά περιστροφή, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ποικιλίας ***ξινόμαυρο***. Με την πάροδο του χρόνου μπορεί να επέλθει μερική ξυλοποίηση και στις πρώτες διακλαδώσεις του βοστρύχου, ενώ οι ποδίσκοι και η κολλύρα παραμένουν πάντοτε πράσινα με ποώδη υφή.

Η εκατοστιαία αναλογία του βοστρύχου επί του βάρους της σταφυλής διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία και κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 7,5% w/w. Το ποσοστό αυτό αφορά σε υγιείς καταστάσεις, γιατί σε περιπτώσεις έντονης ανθόρροιας, σήψης των σταφυλιών κ.λπ. το κατά βάρος ποσοστό των βοστρύχων αυξάνεται σημαντικά.

Από πλευράς χημικής σύστασης ο βόστρυχος περιέχει αρχικά νερό σε ποσοστό μέχρι 90% περίπου, αλλά αργότερα, ανάλογα με την ξυλοποίηση των ιστών ή και τον βαθμό αποξήρανσής του, το ποσοστό του νερού περιορίζεται στα 70-80%. Σε ορισμένες δε περιπτώσεις, η εκατοστιαία αναλογία είναι ακόμα μικρότερη. Η ξηρά ουσία που αυξάνεται κατ' ακολουθία από 10% περίπου, σε 20-30% ή και περισσότερο (Κουράκου – Δραγώνα), αποτελείται από:

- Ξυλώδεις ιστούς κατά το μεγαλύτερο μέρος (10-15%)
- Ρητίνες (περίπου 1%)
- Αζωτούχες ουσίες (μέχρι 2,5%)
- Ανόργανες ενώσεις (τέφρα 5-6%, πλούσια σε κάλιο)
- Φαινολικά παράγωγα μέχρι 3% (οι βόστρυχοι των ερυθρών σταφυλιών είναι πολύ πιο πλούσιοι σε σύγκριση με τους βοστρύχους των λευκών)
- Ελευθέρα οργανικά οξέα, κυρίως όμως υπό μορφή αλάτων με κάλιο, περίπου 2-3% (το pH του χυμού των βοστρύχων είναι υψηλότερο από 4).

Στους βόστρυχες δεν ανευρίσκονται σάκχαρα μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης (περκασμός). Αργότερα, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, από τον βόστρυχο διέρχονται τα σάκχαρα που συσσωρεύονται στις ρώγες, περιορίζονται όμως εκ νέου όσο πλησιάζει η

ωριμότητα, κατά την οποία οι βόστρυχες περιέχουν σάκχαρα λιγότερα από 10 g/kg. Επίσης, το ελάχιστο άμυλο που ανιχνεύεται αρχικά, εξαφανίζεται στο τέλος της περιόδου ωρίμανσης.

Εξαιτίας της χημικής σύστασης των βοστρύχων είναι σκόπιμο να σημειωθεί ότι στην Ελλάδα αποφεύγεται συστηματικά η διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης παρουσία τους. Μετά από συνεχείς μετρήσεις παρατηρήθηκε πως η προσθήκη μέρους ή του συνόλου των βοστρύχων κατά την οινοποίηση οδηγεί στην μείωση της οξύτητας του παραγόμενου οίνου και σε ταυτόχρονη αύξηση του pH. Οι μεταβολές αυτές είναι απόλυτα σύμφωνες με την σύσταση των βοστρύχων (pH υψηλότερο από 4 λόγω υψηλής συγκέντρωσης καλίου) (Κουράκου – Δραγώνα).

Από πλευράς περιεκτικότητας σε φαινολικά παράγωγα, αρκεί να μασήσει κανείς ένα βόστρυχο, για να διαπιστώσει την τραχιά, χορτώδη και στυφή γεύση που οφείλεται κατά βάση στη φύση των τανοειδών ουσιών και κυρίως στην προκυανιδίνη. Πρόκειται γι' αυτό που στην πράξη ονομάζεται «γεύση βοστρύχων» και χαρακτηρίζει κυρίως οίνους που προέρχονται από σταφύλια, τα οποία γλευκοποιήθηκαν με κακής ποιότητας μηχανήματα (π.χ. "μάσημα" βοστρύχων από το θλιπτήριο).

Μορφολογία και σύσταση της ρώγας

Η ρώγα είναι ο κύριος καρπός της αμπέλου και η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή του κρασιού. Τα επιμέρους τμήματά της είναι ο φλοιός (10 – 20%), η σάρκα (74-87%) και τα γίγαρτα (3-4%) που σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να απουσιάζουν.

Ο φλοιός αποτελείται σε ποσοστό 75-80% κατά βάρος από νερό (Κουράκου – Δραγώνα), ενώ περιέχει και τα ακόλουθα συστατικά:

- Τανίνες: 1-2% w/w
- Όξινες ενώσεις: 1- 1,5% w/w
- Ανόργανες ενώσεις: 1,5 – 2 % w/w
- Αζωτούχες ενώσεις: 1,5 – 2% w/w
- Λοιπές ουσίες: 10 – 15% w/w

Η σάρκα αποτελεί το κύριο συστατικό του γλεύκους και τα σημαντικότερα συστατικά της είναι:

- Νερό: 65- 80% w/w

- Σάκχαρα: 10 – 30% w/w
- Άλλες ουσίες: 5-6% w/w, μεταξύ των οποίων οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτινικές ύλες, αρωματικές ουσίες, χρωστικές και τανίνες (Κουράκου – Δραγώνα).

Μορφολογία και σύσταση των γιγάρτων

Τα γίγαρτα, κοινώς κουκούτσια, είναι οι σπόροι της αμπέλου. Δεδομένου ότι η ωοθήκη του άνθους σχηματίζεται από την ένωση δύο καρπόφυλλων, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει δύο σπερματικές βλάστες, κάθε ρώγα πρέπει να περικλείει θεωρητικά 4 γίγαρτα. Καθώς, όμως, δεν αναπτύσσονται και οι τέσσερεις σπερματοβλάστες, απαντώνται συνήθως 1-3 και σπάνια 4 γίγαρτα ανά ρώγα, ενώ υπάρχουν και ρώγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Εξάλλου, δεδομένου ότι σε ορισμένες ποικιλίες η ωοθήκη σχηματίζεται από την ένωση περισσότερων καρπόφυλλων, ο αριθμός των γιγάρτων μπορεί να είναι και μεγαλύτερος του θεωρητικού αριθμού.

Επίσης, ο αριθμός των γιγάρτων ανά ρώγα επηρεάζεται -εκτός από την ποικιλία- και από τις κλιματικές συνθήκες κατά την ανθοφορία, γι' αυτό ο αριθμός τους μπορεί να διαφέρει σημαντικά από έτος σε έτος, ειδικότερα σε περιοχές που μπορεί να επικρατήσουν δυσμενείς συνθήκες κατά την περίοδο ανθοφορίας.

Στην εγκάρσια τομή ενός γιγάρτου διαπιστώνεται ότι αυτό αποτελείται από τη σάρκα ή λευκωματώδη ιστό πού προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος ή επισπέρμιο και εμπεριέχει το έμβρυο.

Ο *λευκωματώδης ιστός*: Η σάρκα του γιγάρτου ή λευκωματώδης ιστός αποτελείται από μεγάλα πολυγωνικά κύτταρα με σχετικά παχιά και ανθεκτική μεμβράνη, τα οποία περιέχουν ελαιώδεις ουσίες πλούσιες σε φυτοστερόλες και κόκκους αλευρώνης. Γενικά, ο ιστός αυτός είναι πλούσιος σε αποθησαυριστικές ουσίες που εξασφαλίζουν την αύξηση του εμβρύου κατά τη βλάστηση του γιγάρτου.

Το *έμβρυο*: Το έμβρυο, που αποτελείται από κύτταρα πλούσια σε άλατα, βρίσκεται στο ράμφος του γιγάρτου.

Το *κέλυφος* ή επισπέρμιο αποτελείται από τρεις χιτώνες:

α) Ο εξωτερικός χιτώνας έχει μαλακά κύτταρα με λεπτά τοιχώματα κυτταρικής φύσεως που καλύπτονται εξωτερικά από παχιά εφυμενίδα. Μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης, τα κύτταρα

αυτά είναι πλούσια σε άμυλο, μικρές ποσότητες του οποίου διατηρούνται και μεταγενέστερα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης εμπλουτίζονται σε φαινολικά παράγωγα, που παρουσιάζονται και υπό τη μορφή κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου. Καθώς έχει την ιδιότητα να απορροφά μεγάλες ποσότητες νερού, το μαλακό αυτό στρώμα εξασφαλίζει κατά την βλάστηση των γιγάρτων την υγρασία που τους χρειάζεται για να βλαστήσουν.

β) Ο ενδιάμεσος χιτώνας ή κερατοειδής ιστός έχει χρώμα καστανοκίτρινο και αποτελείται συνήθως από δύο στιβάδες πασσαλοειδών κυττάρων με πολύ παχιά τοιχώματα, πλούσια σε ταννοειδείς ουσίες. Ο χιτώνας αυτός προσδίδει στα γίγαρτα το χρώμα και την σκληρότητά τους και παρεμποδίζει την είσοδο του νερού.

γ) Ο εσωτερικός χιτώνας ή πρωτεϊνική μεμβράνη, περιλαμβάνει 2-3 στιβάδες κυττάρων μικρών διαστάσεων με λεπτά και μαλακά τοιχώματα, τα οποία περιέχουν λίγο άμυλο.

Από άποψη χημικής σύστασης (Κουράκου – Δραγώνα), η εκατοστιαία κατά βάρος σύσταση των γιγάρτων έχει ως εξής:

- Νερό 25-45%
- Σάκχαρα και πολυσακχαρίτες 34-36%
- Ελαιούχες ουσίες και λιπαρά οξέα 13-20%
- Φαινολικά παράγωγα 4-6%
- Αζωτούχες ουσίες 4-6,5%
- Ανόργανα συστατικά 2-4%

Όταν τα γίγαρτα ωριμάσουν (φυσιολογική ωριμότητα των σταφυλιών) αρχίζουν να χάνουν άζωτο προς όφελος της σάρκας της ρώγας. Μπορεί δε να χάσουν υπό μορφή αμμωνιακού αζώτου, μέχρι και το 1/5 του αζώτου που περιέχουν υπό μορφή αζωτούχων ενώσεων. Εξάλλου, ορισμένα από τα συστατικά των γιγάρτων, όπως είναι τα φαινολικά παράγωγα, οι αζωτούχες ενώσεις και οι ανόργανες ουσίες, διαχέονται μερικώς στο ζυμούμενο γλεύκος κατά την οινοποίηση παρουσία στεμφύλων, εμπλουτίζοντάς το με χρήσιμα συστατικά.

Στα σύγχρονα οινοποιεία αποφεύγεται η «βάναυση» μεταχείριση της πρώτης ύλης που είχε, παλαιότερα, ως συνέπεια τον εμπλουτισμό του γλεύκους με ανεπιθύμητα συστατικά των φλοιών και των γιγάρτων. Εάν από κακή έκθλιψη και πίεση των στεμφύλων σπάσει μέρος των γιγάρτων, τότε ελαιώδεις ουσίες, λιπαρά οξέα και κακής ποιότητας τανίνες, περνούν στο γλεύκος και αλλοιώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του παραγόμενου οίνου.

Υποπροϊόντα οινοποιείου

Η αειφόρος ανάπτυξη στους τομείς της Γεωργίας και της Βιομηχανίας με χαρακτηριστικά που την καθιστούν κοινωνικά δίκαιη και περιβαλλοντικά βιώσιμη βρίσκεται μεταξύ των Κοινοτικών στόχων. Δυστυχώς σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όπως και στην Ελλάδα, σε αντίθεση με τις στρατηγικές προστασίας του περιβάλλοντος, γεωργικά υποπροϊόντα και υπολείμματα γεωργικών βιομηχανιών και λοιπών γεωργικών δραστηριοτήτων απορρίπτονται συνήθως ως άχρηστα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται συχνά σοβαρά προβλήματα ρύπανσης και μόλυνσης του περιβάλλοντος. Μεγάλο μέρος αυτών των υποπροϊόντων και υπολειμμάτων θα μπορούσε μετά από κατάλληλη επεξεργασία να αποτελέσει νέο οικονομικό πόρο, ικανοποιώντας ταυτόχρονα τους κανόνες περιβαλλοντικής προστασίας. Μέσω της αξιοποίησης αυτής, που επιτυγχάνεται με χαμηλού έως αρνητικού κόστους διαδικασίες, μπορεί να μειωθεί το κόστος παραγωγής ανά μονάδα και παράλληλα να δημιουργηθούν νέες θέσεις εργασίας.

Η παραγωγή σταφυλιών προς οινοποίηση στην Ελλάδα σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας (www.minagric.gr) για τη χρονική περίοδο 2003-2006 ήταν κατά μέσο όρο 550.000 τόνοι. Η μέση ετήσια παραγωγή οίνου στην ίδια περίοδο ήταν 401.500 τόνοι (≈73% του βάρους των σταφυλιών). Από την παραπάνω ποσότητα οίνου οι 140.000 τόνοι προέρχονται από την χωρική οινοποίηση, ενώ οι 261.500 τόνοι από οργανωμένα οινοποιεία. Τα στέμφυλα (νωπή πούλπα, γίγαρτα, βόστρυχες) αποτελούν υποπροϊόντα των οινοποιείων και η αξιοποίησή τους παρουσιάζει ενδιαφέρον.

Αν λάβουμε υπόψη ότι από 100 kg σταφύλια προς οινοποίηση τα νωπά στέμφυλα αποτελούν περίπου το 27%, στην Ελλάδα, μετά από μελέτες που έγιναν στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος Dionysos (2003-2006) (www.pharm.uoa.gr), υπολογίζεται ότι παράγονται ανά έτος περίπου 148.500 τόνοι στεμφύλων, 65% των οποίων προήλθαν από τα οργανωμένα οινοποιεία και 35% από την χωρική οινοποίηση. Αν ληφθεί υπόψη πως υπάρχει και μία μεγάλη ποσότητα υπολειμμάτων που παράγεται από τα επιτραπέζια σταφύλια (απόρογα), η συνολική ποσότητα των υποπροϊόντων είναι ακόμα μεγαλύτερη.

Υπολογίζεται πως από 100 kg νωπά στέμφυλα παραλαμβάνονται 30 kg νωπής πούλπας, 25 kg νωπά γίγαρτα και 20 kg βόστρυχες. Τα υπόλοιπα αντιπροσωπεύουν απώλειες κυρίως σε υγρή μορφή. Συνεπώς από τους 148.500 τόνους νωπών στέμφυλων έχουμε για αξιοποίηση περίπου 44.550 τόνους νωπή πούλπα, 37.125 τόνους γίγαρτα και 29.700 τόνους βόστρυχες. Αυτά τα υποπροϊόντα δεν αξιοποιούνται βιομηχανικά, παρά μόνο σε πολύ μικρό ποσοστό για ζωοτροφές και την παραγωγή τσίπουρου.

Για καλύτερη αξιοποίηση, η πούλπα θα μπορούσε να κομποστοποιηθεί ύστερα από ανάμειξη με άλλα ανόργανα συστατικά και να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα ή αναβαθμισμένη ζωοτροφή, κάτι που γίνεται ήδη στην Γαλλία (Pardo et al., 2007). Ο γιγαρτοπολτός μετά την παραλαβή του γιγαρτελαίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή. Επίσης υδατικά εκχυλίσματα των στεμφύλων οινοποιίας μπορεί να ζυμωθούν με ειδικές καλλιέργειες και να παραχθούν ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας και καθαρότητας όπως ο πολυσακχαρίτης πουλουλάνη (Israilides et al., 1999) ή και να γίνει αλκοολική ζύμωση για παραλαβή της αλκοόλης.

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει πως τα υποπροϊόντα οινοποιείου (λάσπες και στέμφυλα) μπορεί να επιδράσουν αρνητικά παρουσιάζοντας φυτοτοξικότητα σε καλλιέργειες (Moldes et al., 2007a, 2008) και σε υδροβιότοπους (Arienzo et al., 2009). Ο Grismer και οι συνεργάτες του, (2003), εστίασαν το ενδιαφέρον τους στα υδατικά απόβλητα των οινοποιείων, τα οποία κρίθηκαν υπεύθυνα για την επιμόλυνση των υπόγειων υδάτινων πόρων.

Η χημική ανάλυση των υποπροϊόντων έδειξε ότι πρόκειται για απορρίμματα με διαφορετική σύσταση ανάλογα με την προέλευσή τους (λευκές/κόκκινες ποικιλίες, γίγαρτα, βόστρυχες, φλοιοί, οινολάσπες, υποπροϊόντα απόσταξης) τα οποία είναι πλούσια σε μακροσυστατικά, κυρίως K (11,9-72,8 g Kg^{-1}), και φαινολικά συστατικά (1,2-19,0 g Kg^{-1}) και χαμηλό ποσοστό μικροσυστατικών και βαρέων μετάλλων (Bustamante et al., 2008).

Η σύστασή τους είναι ένας από τους κυριότερους λόγους που τα καθιστά μη συμβατά με τις γεωργικές απαιτήσεις και καθιστά απαραίτητη την επεξεργασία τους πριν την χρήση τους. Η μέχρι τώρα κατεργασία των υποπροϊόντων έχει δώσει ως αποτελέσματα την παραγωγή διαφόρων χρήσιμων ουσιών όχι μόνο για την φαρμακοβιομηχανία αλλά τόσο για την γεωργία όσο και για την βιομηχανία τροφίμων. Με την χρήση διαφορετικών διεργασιών κάθε φορά, παραλαμβάνονται ή παράγονται διαφορετικά προϊόντα. Με την διαδικασία της κομποστοποίησης από τα στέμφυλα έχει παραχθεί υπόστρωμα για τα φυτά (Paradelo et al., 2010, Manios et al., 2007, Pardo et al., 2009, Garcia-Martinez et al., 2009), ειδικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια των μανιταριών (Pardo et al., 2007) καθώς επίσης αποχρωστικές ουσίες (Paradelo et al., 2009).

Με την βοήθεια ζύμωσης με την χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών αλλά και διαφορετικής κατεργασίας (υδρόλυσης ή μη) έχει μέχρι τώρα παραχθεί γαλακτικό οξύ (Portilla et al., 2008, 2009), βίο-γαλακτωματοποιητές (Portilla et al., 2010), υδρολυτικά ένζυμα (Diaz et al., 2009, 2010) βίο-αιθανόλη (Rodriguez et al., 2010), ενώ με την διαδικασία της εκχύλισης έχουν παραληφθεί τανίνες (Jiang et al., 2011), πολυφαινόλες (Vatai et al., 2009, Conde et al., 2011., Ping et al., 2011, Fiori et al., 2010) και αντιαλλεργιογόνα (Tominaga et al., 2010).

Κεφάλαιο 2^{ο}

Πολυφαινόλες

Φυσικά και σύνθετα αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν ή να αποτρέπουν την οξείδωση άλλων ουσιών. Ως οξείδωση ορίζεται η χημική αντίδραση κατά την οποία παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ουσία σε ένα οξειδωτικό σώμα. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να καταστρέψουν τα κύτταρα. Τα αντιοξειδωτικά σταματούν αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις απομακρύνοντας τις ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες, και αναστέλλοντας άλλες αντιδράσεις οξείδωσης με το να οξειδώνονται αυτά.

Χαρακτηρίζονται λοιπόν ως αντιοξειδωτικά, αναγωγικά σώματα όπως οι θειόλες, το ασκορβικό οξύ, οι πολυφαινόλες. Τα αντιοξειδωτικά, εκτός από την ευεργετική τους δράση στην ανθρώπινη υγεία, έχουν πολλές χρήσεις στη βιομηχανία, ως συντηρητικά τροφίμων, καλλυντικών καθώς και στην προστασία άλλων ουσιών.

Πρόσφατες μελέτες αναφερόμενες στον ρόλο των αντιοξειδωτικών στην βιολογία, εστιάζουν στη χρήσης τους για την προστασία των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να μετρηθεί απλά, τοποθετώντας τα λιπαρά σε ένα κλειστό περιέκτη με οξυγόνο και μετρώντας την κατανάλωση του οξυγόνου. Ο χαρακτηρισμός των βιταμινών Α, C και Ε, ως αντιοξειδωτικών, ήταν αυτός που οδήγησε στην απόδειξη ότι τα αντιοξειδωτικά είναι πολύ σημαντικά στη βιοχημεία των ζώντων οργανισμών.

Πιθανοί μηχανισμοί της δράσης των αντιοξειδωτικών μελετήθηκαν όταν διαπιστώθηκε πως μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση είναι πιθανόν να αυτοξειδώνεται. Έρευνες, για το πώς η βιταμίνη Ε αποτρέπει την διαδικασία της οξείδωσης των λιπιδίων, οδήγησαν στην ταυτοποίηση των αντιοξειδωτικών ως αναγωγικών σωμάτων που προστατεύουν από τις οξειδωτικές αντιδράσεις, από τα ενεργά μόρια οξυγόνου πριν αυτά καταστρέψουν τα κύτταρα.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος παραγωγής αντιοξειδωτικών είναι η δημιουργία τους από διάφορους μικροοργανισμούς, μύκητες, και φυτά. Τα αντιοξειδωτικά αυτά ονομάζονται φυσικά. Προτιμώνται από τους περισσότερους καταναλωτές επειδή είναι φυσικά προϊόντα. Τα φυτά τα παράγουν για δικό τους όφελος και προστασία κατά των παρασίτων, των μικροοργανισμών και

των σαπρόφυτων [Butler, 1993]. Τα σαπρόφυτα επιλέγουν, τυχαία, τα φυτά που έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά, λόγω του ότι έχουν λιγότερο επιθετική οσμή.

Ένας άλλος τρόπος παραγωγής αντιοξειδωτικών είναι η σύνθεση ή βιοσύνθεση των αντιοξειδωτικών στην βιομηχανία. Τα αντιοξειδωτικά αυτά ονομάζονται συνθετικά και σε αντίθεση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά, έχουν παραχθεί για να βελτιώσουν τις ευεργετικές ιδιότητες των φυσικών, συμπεριλαμβανομένων των πλεονεκτημάτων που παρέχουν στους παραγωγούς, τους τεχνολόγους τροφίμων και τους ερευνητές, οι οποίοι μπορούν να τα διαχειριστούν καλύτερα στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Ακόμα, έχουν δοκιμαστεί για την ασφάλεια τους προκειμένου να διασφαλίσουν τους καταναλωτές από πιθανές επιπλοκές στην υγεία τους, καθώς και τους παραγωγούς από πιθανά παράπονα καταναλωτών.

Η τρίτη κατηγορία ουσιών περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά ίδια με τα φυσικά, που βρίσκονται στα τρόφιμα, αλλά έχουν συντεθεί στην βιομηχανία. Αυτά χαρακτηρίζονται ως «nature-identical» αντιοξειδωτικά. Σε αντίθεση με τα φυσικά, είναι καθαρές ουσίες, σχετικά φθηνές, εύκολα διαθέσιμες και έχουν τις ίδιες ιδιότητες, μεταξύ των οποίων και η αντιοξειδωτική δράση. Επομένως, συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των σύνθετων και των φυσικών αντιοξειδωτικών.

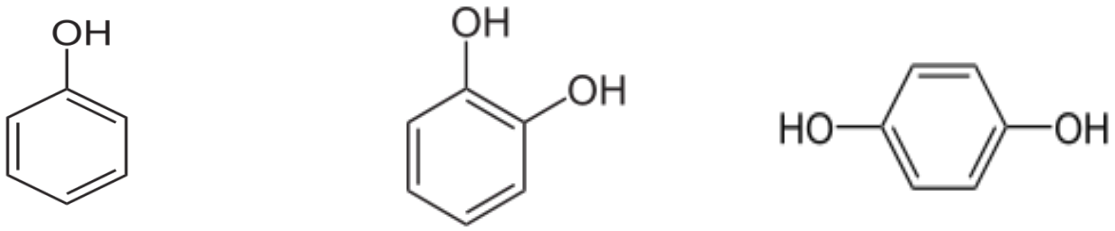
Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για δύο διαφορετικούς λόγους: 1. για την καταστολή της διαδικασίας δημιουργίας ελευθέρων ριζών στα τρόφιμα κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους ή της θερμικής τους επεξεργασίας π.χ. το τηγάνισμα και 2. για να μειώσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό (in vivo) μετά την κατανάλωσή τους.

Συγκρίνοντας τα είδη των αντιοξειδωτικών βλέπουμε πως τα φυσικά έχουν χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, κατά μέσο όρο, απ’ ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Επίσης δεν είναι καθαρές ουσίες και έχουμε ανεπαρκείς πληροφορίες για την ασφάλειά τους.

Γενικότερα θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση αντιοξειδωτικών όταν αυτό είναι εφικτό και όταν η χρήση τους δεν είναι απολύτως απαραίτητη. Θα ήταν προτιμότερη η χρήση φυτικών λιπαρών και ελαίων υψηλών σε ελαϊκό οξύ, όπως το ελαιόλαδο, αντί των ελαίων που έχουν υψηλό ποσοστό πολυακόρεστων οξέων έτσι ώστε να αποφευχθεί υψηλό ποσοστό ελευθέρων ριζών. Η κατανάλωση τροφίμων, που περιέχουν υψηλά ποσοστά φυσικών αντιοξειδωτικών, δεν είναι ιδιαίτερα ευχάριστη λόγω της ιδιαίτερης γεύσης τους σε αντίθεση με κάποια άλλα τρόφιμα, που δημιουργούν τις προϋποθέσεις για μια καλύτερη και μακροβιότερη ζωή (Jan Pokorny, 2007).

Χημεία και βιοχημεία των πολυφαινολών

Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου, όπως η απλή **φαινόλη** και οι διάφορες **διφαινόλες** όπως η **πυροκατεχόλη** και η **υδροκινόνη.**



Φαινόλη *Πυροκατεχόλη* *Υδροκινόνη*

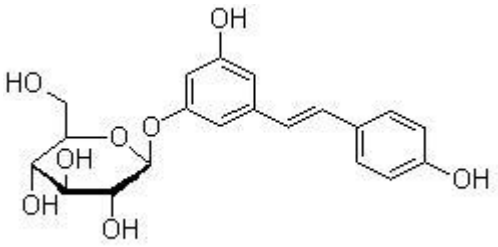
Σχήμα 1 : Δομή φαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις, σύμφωνα με την μεταβολική τους προέλευση, μαζί με τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή, είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και γι' αυτό αποτελούν χαρακτηριστικό συστατικό τους, ή ακόμα και κάποιου συγκεκριμένου οργάνου ή ιστού του φυτού (Scalbert et al., 2000) και οφείλουν το όνομά τους στον αρωματικό δακτύλιο που φέρουν στο μόριό τους, ο οποίος περιέχει ένα η περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίων (Morton et al., 2000). Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους (Manach et al., 2004). Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν διακρίνονται σε απλές φαινόλες, όταν έχουν ένα φαινολικό δακτύλιο, και σε πολυφαινόλες όταν έχουν δύο ή περισσότερους. Με βάση την χημική δομή τους οι φαινόλες κατατάσσονται σε απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόνες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, κουμαρίνες/ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθοκινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες/νεολιγνάνες/λιγνίνες. Οι φαινολικές ενώσεις συναντώνται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ενωμένες με μόρια γλυκόζης ή άλλα σάκχαρα (γλυκοζίτες) ενώ πολλές περιλαμβάνουν αμίνες, οργανικά οξέα, λιπίδια και άλλα συστατικά (Manach et al., 2004, Zern et al., 2005). Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα πολυφαινολών και αποδίδουν στα φρούτα και στα λαχανικά μεγάλο μέρος της γεύσης και του χρώματός τους.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και βρίσκονται σε αφθονία στην επιδερμίδα πολλών φρούτων, όπως τα μήλα, τα αχλάδια, τα ροδάκινα κ.α., σε λαχανικά, όπως το κρεμμύδι και το σπανάκι, στο πράσινο και το μαύρο τσάι, στο κόκκινο κρασί, στο κακάο και στην σοκολάτα (Morton et al., 2000, Kurosawa et al., 2005). Η περιεκτικότητα των διαφόρων φυτικών τροφίμων σε πολυφαινόλες εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως το είδος, η ποικιλία, η έκθεση στο φως, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Duthie & Parsey, 2000).

Στην οινολογία, τα φαινολικά συστατικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο εφόσον είναι υπεύθυνα για το χρώμα, και για την γεύση τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών κρασιών. Επιπρόσθετα παρουσιάζουν ιδιότητες αντιβακτηριδιακές και αντιοξειδωτικές. Η τελευταία ιδιότητα θεωρείται ότι προστατεύει τους καταναλωτές από καρδιαγγειακές παθήσεις (Ribereau-Gayon et al., 1998). Ο Βαλαβανίδης (2006) έδειξε πως οι βιταμίνες (ασκορβικό οξύ, βιταμίνη Ε, κ.λπ.) και οι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως η ρεσβερατρόλη και οι πολυφαινόλες, ιδιαίτερα σε φυτά, συμμετέχουν ενεργά στην αντιοξειδωτική άμυνά τους και στην πρόληψη εξωγενών βλαβών λόγω εξωτερικών παραγόντων (π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες, έντομα, μύκητες, έκθεση σε τοξικές ουσίες, κ.λπ.). Με τον τρόπο αυτό προστατεύουν τα βασικά βιομόρια, όπως τις πρωτεΐνες, τα σάκχαρα, τα λιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων και το DNA των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες (Βαλαβανίδης, 2006).

Στο σταφύλι και κατ' επέκταση στο κρασί έχει βρεθεί μία ουσία, η ρεσβερατρόλη, –ένα στιλβένιο- η οποία παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει οξυγονούχες ρίζες και οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος. Λόγω αυτής της ιδιότητας έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες για την ρεσβερατρόλη και παράγωγά της με περισσότερα υδροξύλια (Ovesna et al., 2006). Σύμφωνα με τις έρευνες αυτές αποδείχθηκε πως η ρεσβερατρόλη διαθέτει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Wu et al., 2001). Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στην εξουδετέρωση δραστικών ριζών (μέσω προσφοράς ατόμου υδρογόνου) και στη δημιουργία μη δραστικών ριζών, λόγω δομής, συντονισμού, σχηματισμού κινονών ή συμπλοκοποίησης μετάλλων, με τα δύο υδροξύλια σε ο- ή p-θέση.



Σχήμα 2 : Χημικός τύπος της γλυκοζυλιωμένης ρεσβερατρόλης.

Έρευνες σε πειραματόζωα έδειξαν πως η ρεσβερατρόλη έχει επίσης ισχυρή αντικαρκινική δράση, με σημαντικό ρόλο στην αναστολή διεργασιών στην πρώτη (οξειδωτικό stress, φλεγμονώδεις καταστάσεις) και δεύτερη φάση (προαγωγή της καρκινογένεσης με συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA), ακόμη και με παρέμβαση στην έκφραση γονιδίων (Soleas et al., 2002, Schulz, 2004). Η χημειοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης είναι επίσης μία ακόμη πλευρά της πολύπλευρης δράσης της (Jang, 1997, Asensi et al, 2002). Αποτελέσματα ορισμένων μελετών προτείνουν ότι οι υψηλές δόσεις της ρεσβερατρόλης θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης και αρτηριοσκλήρωσης. Έχει, επίσης, την ικανότητα διατήρησης του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της απόπτωσης και παρεμπόδισης της αγγειογένεσης. Επιπλέον έχει αντιφλεγμονώδη δράση και μπορεί να παρεμποδίσει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Kenneth et al, 1988). Τέλος δείχθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη τροφής, η υψηλή κατανάλωση θερμίδων και η παχυσαρκία σε ποντίκια δεν είχαν αρνητικές επιπτώσεις στο μέσο όρο διάρκειας ζωής, αν μαζί με την τροφή ελάμβαναν και ποσότητες ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι εξαιρετικώς ευνοϊκά αν και θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με επιπλέον έρευνες (Kaeberlein et al, 2006, Baur et al, 2006).

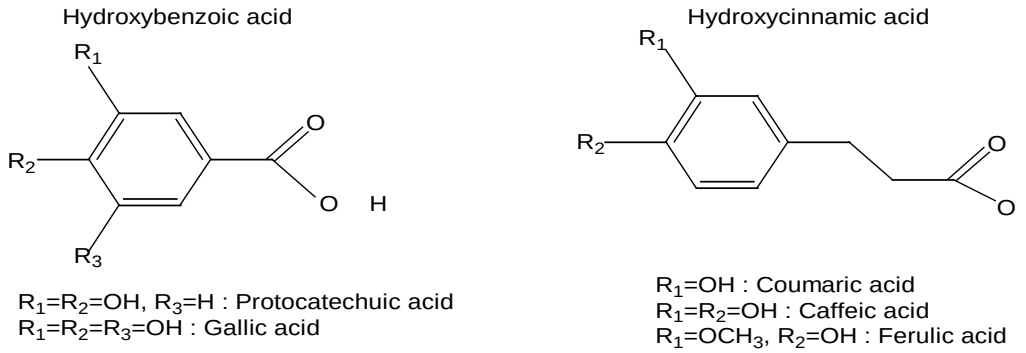
Πηγές πολυφαινολών (ανά κατηγορία)

***Φαινολικά Οξέα*:** Μπορούν να διαχωριστούν σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και σε παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Η περιεκτικότητα του υδροξυβενζοϊκού οξέος στα εδώδιμα φυτά είναι σχετικά χαμηλή, με εξαίρεση το τσάι, τα κρεμμύδια, τα κόκκινα φρούτα και τα ραπανάκια, που μπορούν να έχουν μια περιεκτικότητα της τάξεως των 10 mg/kg νωπού τροφίμου. Συνήθως, αποτελούν δομικά συστατικά σύνθετων μορίων, όπως οι υδρολυμένες τανίνες, με πιο αντιπροσωπευτικές τις γαλλοτανίνες στα μάγκο και τις ελλαγιταννίνες στα κόκκινα φρούτα (φράουλες, μούρα, βατόμουρα κτλ). Επειδή τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος, τόσο στην ελεύθερη όσο και στη δεσμευμένη μορφή τους, εντοπίζονται μόνο σε πολύ

λίγα εδώδιμα φυτά, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και μέχρι πρόσφατα δεν ήταν ανάμεσα στις πολυφαινόλες που είχαν υψηλό διατροφικό ενδιαφέρον.

Τα παράγωγα του υδροξυ-κινναμωμικού οξέος απαντώνται πιο συχνά στα τρόφιμα σε σύγκριση με εκείνα του βενζοϊκού οξέος. Αποτελούνται από το πάρα-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και το σιναπικό οξύ (Manach et al., 2004). Οι πολυφαινόλες αυτές απαντώνται κυρίως εστεροποιημένες με ένα σάκχαρο, συνήθως τη γλυκόζη ή με το κυνικό οξύ, το σικιμικό οξύ ή το τρυγικό, και σπάνια σε ελεύθερη μορφή (Scalbert et al., 2000). Σε ελεύθερη μορφή βρίσκονται κυρίως σε τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως ψύξη, θέρμανση ή ζύμωση. Το καφεϊκό αντιδρά με το κυνικό οξύ προς χλωρογενικό οξύ, το οποίο απαντάται σε πολλά φρούτα και λαχανικά και σε μεγάλη περιεκτικότητα στον καφέ (Manach et al., 2004). Το φερουλικό οξύ, χαρακτηριστικό των δημητριακών, βρίσκεται συνδεδεμένο ως *trans* φερουλικό οξύ, μέσω εστερικών δεσμών με μόρια ημικυτταρίνης και αραβινοξυλάνες στο περικάρπιο (Scalbert et al., 2000). Τα παράγωγα του υδροξυ-κινναμωμικού οξέος αν και βρίσκονται σε όλα τα μέρη των φρούτων και των δημητριακών, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απαντώνται στο εξωτερικό κυρίως τμήμα του καρπού (Manach et al., 2004).

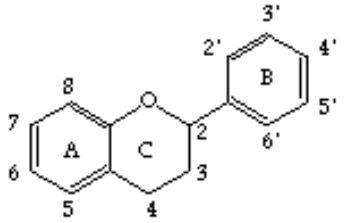
Τα σταφύλια των ερυθρών ποικιλιών περιέχουν περισσότερα φαινολοξέα από τις λευκές ποικιλίες και τα συναντάμε όχι μόνο στους φλοιούς αλλά και στην σάρκα των σταφυλιών με κυριότερους αντιπροσώπους τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος (Makris et al., 2007b, Psarra et al., 2002).



Σχήμα 3 : Δομή φαινολικών οξέων

Φλαβονοειδή: Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις κίτρινου χρώματος μεγαλύτερης ή μικρότερης έντασης, με βασική δομή δύο βενζολικούς δακτυλίους που ενώνονται μεταξύ τους με τρία άτομα

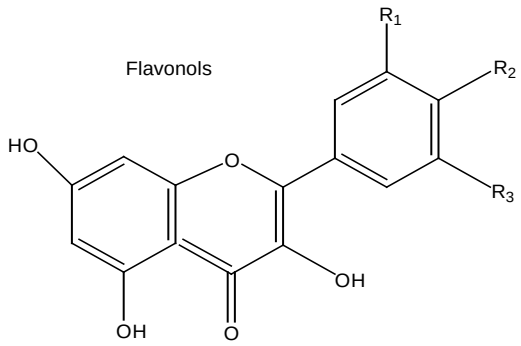
άνθρακα προς ένα οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (Ross & Kasum, 2002, Ribereau-Gayon et al., 1998). Οι διαφορές στον ετεροκυκλικό δακτύλιο είναι αυτές που καθορίζουν τις υποκατηγορίες των φλαβονοειδών (Hollman, 1997). Έτσι, έχουμε τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τα ισοφλαβονοειδή, τις φλαβανόλες, που περιλαμβάνουν τις κατεχίνες και τις προανθοκυανιδίνες και τις ανθοκυανίνες (Manach et al., 2004; Hollman, 1997). Τα ισοφλαβονοειδή είναι φλαβονοειδή τα οποία έχουν τον Β φαινολικό δακτύλιο στη θέση 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που τον έχουν στη θέση 2 (Hollman, 1997). Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερείς, διμερείς ή ολιγομερείς ενώσεις, που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία μοριακού βάρους. Τα πολυμερή παράγωγα ονομάζονται τανίνες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους: σε συμπυκνωμένες (πολυμερή των φλαβονοειδών) και υδρολυμένες τανίνες, συμπεριλαμβανομένου του γαλλικού οξέος (Vinson, 1999).



Σχήμα 4 : Γενική δομή φλαβονοειδών

Οι ***φλαβονόλες*** έχουν κίτρινο χρώμα και είναι τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα, με κύριους εκπροσώπους την *κερκετίνη* και την *καμπφερόλη*. Οι πλουσιότερες πηγές αυτών είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα και το κινέζικο λάχανο. Βρίσκονται κυρίως συνδεδεμένα με μόρια γλυκόζης, ραμνόζης ή/και γαλακτόζης, αραβινόζης, ξυλόζης και γλυκουρονικού οξέος. Η βιοσύνθεσή τους ενεργοποιείται από το φως, με αποτέλεσμα να βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των φρούτων, στην επιδερμίδα και στα φύλλα. Έτσι, διαφορές στην περιεκτικότητά τους εμφανίζονται μεταξύ των φρούτων του ίδιου δέντρου, ανάλογα με την έκθεσή τους στο φως. Τα τοματάκια π.χ. έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονολών σε σύγκριση με τις μεγάλες τομάτες λόγω της διαφορετικής αναλογίας επιφάνειας/όγκου. Στα φυλλώδη λαχανικά, η συγκέντρωσή τους είναι δέκα φορές μεγαλύτερη στα εξωτερικά πράσινα φύλλα σε σχέση με τα εσωτερικά ελαφρώς χρωματισμένα φύλλα (Manach et al., 2004). Στα σταφύλια βρίσκονται στον φλοιό τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών καθώς επίσης και στα προϊόντα τους σε διάφορες συγκεντρώσεις ανάλογα

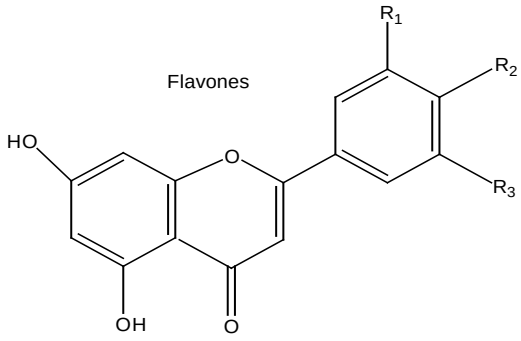
τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες, καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας των προϊόντων (Makris et al., 2006, Ledda et al., 2009)



R_2=OH, R_1=R_3=H : Kaempferol
R_1=R_2=OH, R_3=H : Quercetin
R_1=R_2=R_3=OH : Myricetin

Σχήμα 5 : Δομή φλαβονολών

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

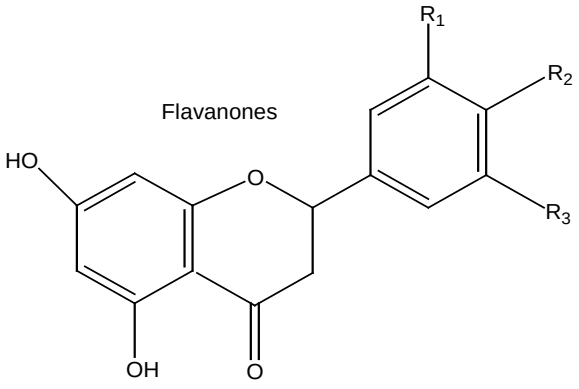


R_1=H, R_2= OH : Apigenin
R_1=R_2=OH : Luteolin

Σχήμα 6 : Δομή φλαβονών

Οι ***φλαβανόνες*** βρίσκονται κυρίως στα κίτρα, στις τομάτες και σε συγκεκριμένα αρωματικά φυτά, όπως η μέντα. Γενικά γλυκοζυλιώνονται με δισακχαρίτες, που μπορεί να είναι είτε νεοεσπεριδόζη που προσδίδει μία πικρή γεύση, είτε ρουτινόζη, στη θέση 7 (Manach et al., 2004). Είναι ισομερείς με τις χαλκόνες, που είναι μόρια με παρόμοια δομή με τις φλαβανόνες μόνο που πρόκειται για ακόρεστες ενώσεις, οι οποίες έχουν έναν ανοικτό δακτύλιο και η

αρίθμησή τους είναι διαφορετική από αυτή των υπόλοιπων φλαβονοειδών. Οι φλαβανόνες μετατρέπονται σε χαλκόνες κάτω από αλκαλικές συνθήκες, όπως κατά τη διέλευσή τους από το πεπτικό σύστημα και αντίστροφα οι χαλκόνες μετατρέπονται σε φλαβανόνες σε όξινο περιβάλλον. Οι κύριες φλαβανόνες που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή είναι η *ναριγκενίνη* στα γκρέιπ-φρουτ, η *εσπεριδίνη* στα πορτοκάλια και η *εριοδικτυόλη* στα λεμόνια. Στο λεμόνι, το γλυκολέμονο και στα μανταρίνια, κυρίως η *τανζερίνη* και στα γλυκά πορτοκάλια, κυρίως η *εσπεριδίνη*, είναι γλυκοζυλιωμένες με ρουτινοζίτη, ενώ στα πικρά πορτοκάλια (*ναριγκενίνη)* και στο γκρέιπφρουτ (*ναριγκενίνη, νεοεριοδικτυόλη και νεοεσπεριτίνη)* επικρατεί ο γλυκοζίτης με νεοεσπεριδίνη. Η *εσπεριδίνη* και οι ελεύθερες *εσπεριτίνη*, *ναριγκενίνη και εριοδικτυόλη* έχουν βρεθεί σε διάφορα βότανα, ενώ οι δύο τελευταίες αναφέρονται και ως συστατικά της πατάτας. Φλαβονόνες έχουν βρεθεί επίσης και σε προϊόντα που περιέχουν λυκίσκο όπως η μπίρα και το τσάι. Γενικά η περιεκτικότητα των φρούτων σε φλαβονόνες είναι μεγαλύτερη στους διάφορους ιστούς παρά στο χυμό τους και η περιεκτικότητα αυτή μειώνεται κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων. Είναι λιγότερο διαλυτές σε σύγκριση με τις χαλκόνες και καταβυθίζονται σε χαμηλό pH. Το ίζημα αυτό είναι αδιάλυτο στο νερό, στη μεθανόλη, στην αιθανόλη και στην ακετόνη, ενώ για τη σωστή ανάκτησή τους είναι απαραίτητη η θέρμανση ή η χρήση ισχυρών διαλυτών (Tomas-Barberan & Clifford, 2000).

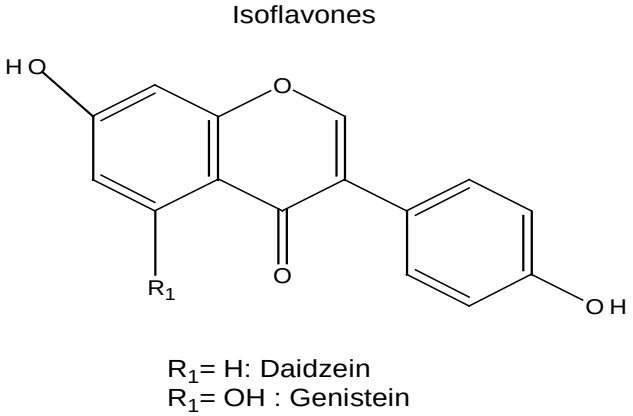


R_1=H, R_2=OH : Naringenin
R_1=R_2=OH : Eriodictyol
R_1=OH, R_2=OCH_3 : Hesperetn

Σχήμα 7 : Δομή Φλαβανονών

Ισοφλαβόνες: Πρόκειται για φλαβονοειδή που έχουν δομή παρόμοια με τα οιστρογόνα. Αν και δεν είναι στεροειδή, στις θέσεις 7 και 4 του φαινολικού δακτυλίου έχουν ¯OH, ανάλογα με αυτά στο μόριο της οιστραδιόλης. Αυτό τους προσδίδει ψευδοορμονικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητάς τους να συνδέονται στους υποδοχείς οιστρογόνων (Cassidy et al., 2000), χαρακτηρίζοντάς τις και ως διφαινολικά φυτοοιστρογόνα (Zheng et al.,

2003). Το μόριό τους είναι σχετικά άκαμπτο, και η μόνη δυνατότητα περιστροφής είναι γύρω από τον φαινολικό ισοφλαβονικό δεσμό (Cassidy et al., 2000). Βρίσκονται κυρίως στα όσπρια, με κύρια πηγή τη σόγια και τα προϊόντα της. Η *γενιστεΐνη, δαϊζεΐνη* και η *γλυσιτεΐνη* είναι οι κύριες ισοφλαβόνες στα τρόφιμα αυτά και βρίσκονται κυρίως με τη μορφή γλυκοζυλιωμένων παραγώγων, τα οποία υδρολύονται προς ελεύθερα μόρια με ζύμωση που πραγματοποιείται κατά την παρασκευή προϊόντων σόγιας (Zubik et al., 2003). Εκτός από τη γλυκοζυλιωμένη μορφή, που είναι και η επικρατέστερη, τα ισοφλαβονοειδή μπορούν να εμφανίζονται και ως ελεύθερα μόρια, ως ακέτυλο-γλυκοζίτες, και ως γλυκοζίτες του μηλεϊνικού οξέος. Η μορφή των ισοφλαβονοειδών εξαρτάται από τις μεθόδους επεξεργασίας των τροφίμων (Zubik et al., 2003).

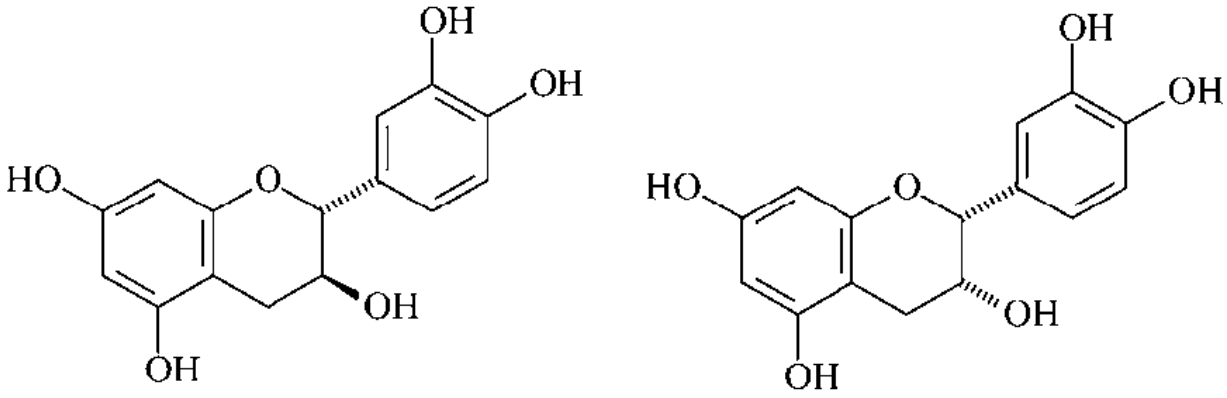


Σχήμα 8 : Δομή Ισοφλαβονών

Οι ***Φλαβανόλες ή τανίνες*** υπάρχουν με τη μονομερή τους μορφή, τις *κατεχίνες ή προκυανιδίνες*, και με την πολυμερή τους μορφή, τις *προανθοκυανιδίνες* (Manach et al., 2004). Το μόριό τους αποτελείται συνήθως από 12-16 φαινολικές ομάδες και 5-7 αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000 μονάδες μοριακού βάρους (ΜΒ). Αυτό, σε συνδυασμό με το μεγάλο ΜΒ, είναι που τις διαφοροποιεί από τα μονομερή φλαβονοειδή και τα χαμηλού ΜΒ φαινολικά οξέα στη δομή και τις ιδιότητές τους. Πρόκειται για πολυμερείς φλαβαν-3-όλες, οι οποίες ενώνονται με δεσμούς C-C, ή περιστασιακά C-O-C. Οι φλαβαν-3-όλες έχουν ως βασική δομή ένα C6-C3-C6 σκελετό. Οι κύριες πηγές τους είναι τα βερίκοκα, το πράσινο τσάι και η σοκολάτα, και ακολουθεί το κόκκινο κρασί και το μαύρο τσάι. Το μαύρο τσάι περιέχει λιγότερες μονομερείς φλαβανόλες, οι οποίες, κατά τη θέρμανση που υφίστανται τα φύλλα του τσαγιού, οξειδώνονται προς σύνθετες συμπυκνωμένες πολυφαινόλες, τις διμερείς θεαφλαβίνες και τα πολυμερή θεαρουβιγίνες (Scalbert et al., 2000) που παραμένουν σταθερές όταν το περιβάλλον είναι όξινο. Μπορεί να φέρουν στο μόριό τους ένα μόριο ακετυλίου ή σακχάρου. Το πιο αντιπροσωπευτικό ακέτυλο-υποκατάστατο είναι το γαλλικό οξύ, το οποίο συνήθως ενώνεται ως εστέρας με το OH της θέσης C_3, όπως συμβαίνει στο τσάι. Το σάκχαρο μπορεί να φέρεται στη θέση C_3 ή C_5 και

είναι συνήθως γλυκόζη (Rasmussen et al., 2005). Ωστόσο, οι Manach et al. (2004) αναφέρουν ότι σε αντίθεση με τα άλλα φλαβονοειδή, οι φλαβανόλες δε βρίσκονται γλυκοζυλιωμένες μέσα στα τρόφιμα. Οι κατεχίνες και επικατεχίνες είναι ομάδες φλαβανολών που συναντώνται στα φρούτα, ενώ η γαλλοκατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη κι ο εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, βρίσκονται σε συγκεκριμένα όσπρια, στα σταφύλια και στο τσάι.

Η κατεχίνη έχει 2 ασύμμετρα άτομα άνθρακα και ως εκ τούτου δίνει 4 ισομερή: την (+) και (-) κατεχίνη, την (+) και (-) επικατεχίνη, καθώς και 2 ρακεμικά. Στην φύση απαντώνται όλες οι μορφές, αλλά στο σταφύλι και στον οίνο απαντούν κυρίως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη.

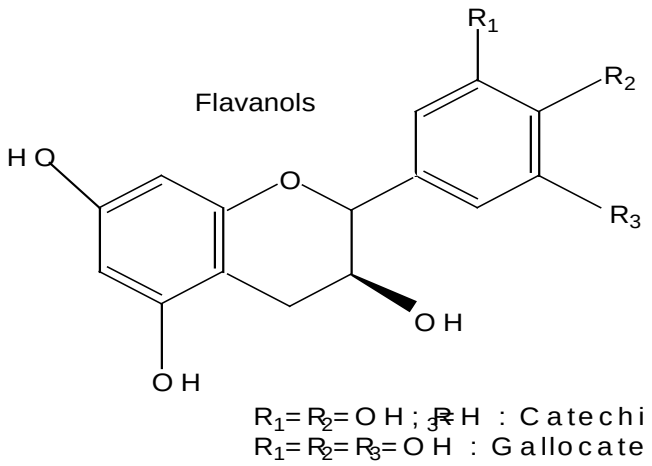


Σχήμα 9 : Δομή (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης

Οι *Προανθοκυανιδίνες*, που επίσης είναι γνωστές και ως συμπυκνωμένες τανίνες, διμερή, ολιγομερή και πολυμερή των κατεχινών, που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς μεταξύ των ατόμων C_4 και C_8 (ή C_6) (δεσμός τύπου B). Υπάρχει επίσης και η δυνατότητα σχηματισμού δεσμού μεταξύ των ατόμων C_2 και C_7 ή C_5 (δεσμός τύπου A) (Rasmussen et al., 2005; Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Ο βαθμός του πολυμερισμού στα διάφορα τρόφιμα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή ανάλογα με τον αριθμό των OH στους δύο αρωματικούς δακτυλίους, και τη στερεοχημεία των ασύμμετρων ατόμων C του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Οι προανθοκυανιδίνες που συναντάμε πιο συχνά στα τρόφιμα είναι οι προδελφινιδίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία 3 ομάδων OH στις θέσεις 3΄, 4΄ και 5΄ του B δακτυλίου (Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της (επί)-γαλλοκατεχίνης (EGC) στο μόριό τους (Rasmussen et al., 2005). Εδώ ανήκουν επίσης και οι προπελαργονιδίνες, οι οποίες έχουν ένα OH στη θέση 4΄ του B δακτυλίου. Αυτές συναντώνται πιο σπάνια σε σχέση με τις κατεχίνες και τις προδελφινιδίνες. Μέσω της δέσμευσής τους με πρωτεΐνες του σιέλου, οι συμπυκνωμένες τανίνες, είναι υπεύθυνες για τη στυφή γεύση που χαρακτηρίζει κάποια φρούτα, όπως τα μήλα, τα αχλάδια, τα σταφύλια, τα

ροδάκινα και τα βατόμουρα, και κάποια ποτά-ροφήματα, όπως η μπίρα, το κρασί και το τσάι, αλλά και για την πικρή γεύση της σοκολάτας. Η στυφότητα αλλάζει κατά την ωρίμανση του τροφίμου και φαίνεται να εξαφανίζεται κατά την τελική ωρίμανση του, που οφείλεται σε αντιδράσεις πολυμερισμού των τανινών με μόρια ακεταλδεΰδης στο τρόφιμο. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού φαίνεται να είναι υπεύθυνες και για τη μείωση της συγκέντρωσης των τανινών που εμφανίζεται κατά την ωρίμανση του τροφίμου (Manach et al., 2004).

Απ' όλα τα μέρη του σταφυλιού, τα γίγαρτα είναι αυτά που περιέχουν τις περισσότερες κατεχίνες και προκυανιδίνες. Οι βόστρυχες και οι φλοιοί δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγάλες διαφορές ενώ ο χυμός είναι απαλλαγμένος από τις ουσίες αυτές. Η συγκέντρωση των κατεχινών και των προκυανιδινών διαφέρει σημαντικά από ποικιλία σε ποικιλία. Έτσι οι ερυθρές ποικιλίες είναι πλουσιότερες των λευκών αλλά ταυτόχρονα οι ποικιλίες με μεγάλο ποσοστό γιγάρτων - λόγω πολύ μικρών ρωγών ή μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ρώγα- είναι φυσικό να περιέχουν πολλές κατεχίνες και προκυανιδίνες (Κουράκου- Δραγώνα, 1998).



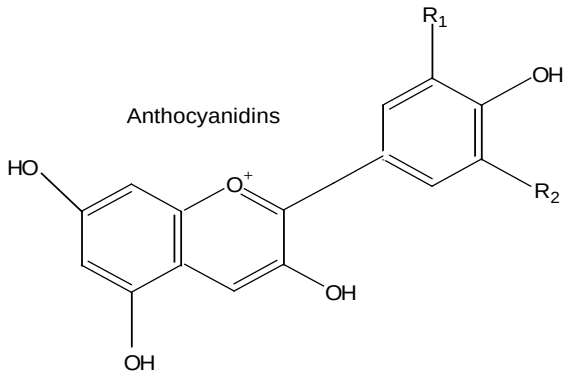
Σχήμα 10 : Δομή Φλαβανολών

Οι ***Ανθοκυανίνες*** είναι υδατοδιαλυτά μόρια που βρίσκονται κυρίως στα χυμοτόπια, στους επιδερμικούς ιστούς των λουλουδιών και των φυτών. Η κάθε μια από αυτές μπορεί να μετατρέπεται γρήγορα σε άλλες ταυτομερείς μορφές. Ανάλογα με το pH, τη θερμοκρασία και τη δομή (βαθμός ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, αριθμός OH στο μόριο) της ανθοκυανίνης επικρατεί η μία ή η άλλη μορφή. Οι ταυτομερείς μορφές αποτελούνται από το έγχρωμο κατιόν της βάσης του φλαβυλίου και τρεις δευτεροταγείς δομές, την κουϊνιδάλη, την καρβινόλη και την χαλκόνη (Clifford, 2000). Σε αυτές άλλωστε οφείλουν το ροζ, κόκκινο, μπλε ή μοβ χρώμα τους διάφορα λαχανικά. Υπάρχουν σε διάφορες μορφές, με χαρακτηριστικό σκελετό C6-C3-C6, όπου μπορούν

να είναι έγχρωμες ή μη, ανάλογα με το pH και την παρουσία άλλων χρωστικών στο περιβάλλον τους. Οι διαφορές έγκεινται κυρίως: (α) στον αριθμό και στη θέση των υδρόξυ- και μεθόξυ-υποομάδων, (β) στην ταυτότητα, στον αριθμό και στη θέση των σακχάρων που είναι εστεροποιημένα στο σκελετό τους, και τέλος (γ) στο βαθμό ακετυλίωσης του σακχάρου και την ταυτότητα των παραγόντων ακετυλίωσης (Clifford, 2000). Η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη είναι τα κύρια σάκχαρα με τα οποία γλυκοζυλιώνονται κυρίως στη θέση 3 ή/και 5. Επίσης κι άλλα, πιο πολύπλοκα σάκχαρα, όπως οι ρουτινοζίτες, καθώς και μερικοί 3,7 διγλυκοζίτες και τριγλυκοζίτες, μπορεί να δημιουργούν γλυκοζιτικούς δεσμούς με τις ανθοκυανίνες. Ομάδες ακετυλίωσης μπορεί να είναι απλές φαινόλες, όπως το κινναμωμικό οξύ, το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπικό και το π-κουμαρικό οξύ, ελεύθερα ή/και στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή ή αλειφατικά οξέα, όπως το οξικό, το οξαλικό, το μηλεϊνικό, το μηλικό και το ηλεκτρικό οξύ (Clifford, 2000).

Οι ανθοκυανίνες στα φυτά απαντώνται στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή και είναι σταθερές στο φως, στο pH και σε οξειδωτικές συνθήκες. Η γλυκοζυλίωση με ένα μόριο γλυκόζης στη θέση 3 ή η εστεροποίηση με τα προαναφερθέντα φαινολικά ή/και οργανικά οξέα (κιτρικό και μηλικό οξύ) ή η δημιουργία συμπλόκων με άλλα φλαβονοειδή, είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα των μορίων. Ο βαθμός ακορεστότητας, υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης και πολυμερισμού ποικίλλει στα διάφορα μόρια των ανθοκυανιδινών (άγλυκο τμήμα) κι αυτό επηρεάζει και τις βιοχημικές ικανότητες των μορίων καθώς επίσης και τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Milbury et al., 2002; Clifford, 2000).

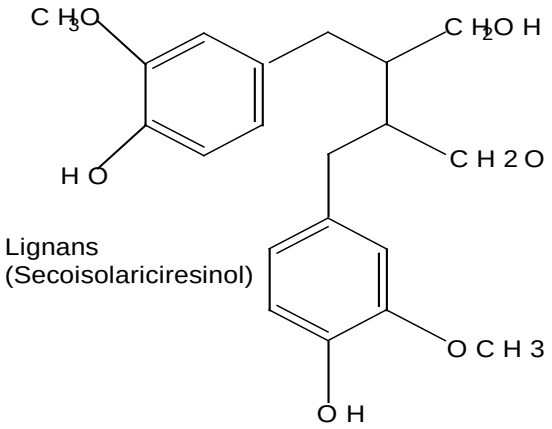
Κύριες πηγές ανθοκυανινών είναι το σταφύλι, το κόκκινο κρασί, συγκεκριμένες ποικιλίες δημητριακών και τα φυλλώδη-ριζώδη λαχανικά, όπως η μελιτζάνα, το λάχανο, τα φασόλια, οι κόκκινες πατάτες και οι μωβ γλυκοπατάτες, ο βασιλικός, ο μάραθος, το κόκκινο μαρούλι, τα κρεμμύδια και τα ραδίκια. Σε μεγαλύτερη αφθονία συναντώνται στα φρούτα, όπως στα κόκκινα πορτοκάλια, στα μούρα, στα σταφύλια, στις φράουλες και στα κεράσια. Βρίσκονται κυρίως στον φλοιό του τροφίμου, με εξαίρεση συγκεκριμένα κόκκινα φρούτα, όπως οι φράουλες και τα κεράσια, που περιέχονται και στη σάρκα τους. Η περιεκτικότητά τους είναι ανάλογη με την ένταση-πυκνότητα του χρώματος και η πιο αντιπροσωπευτική είναι η κυανιδίνη παρόλο που είναι η πιο ασταθής λόγω φαινολικών –ΟΗ σε ο-θέση (Manach et al., 2004, Κουράκου-Δραγώνα, 1998).



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

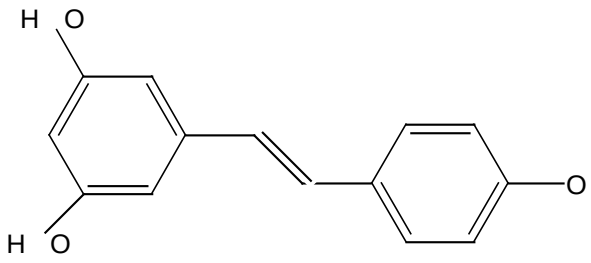
Σχήμα 11 : Δομή Ανθοκυανιδινών

Λιγνάνες: Μαζί με τις ισοφλαβόνες και τα στιλβένια, ανήκουν κι αυτές στα φυτοοιστρογόνα, έχουν όμως μελετηθεί λιγότερο από τις ισοφλαβόνες, λόγω της δυσκολίας στην απομόνωση, ποσοτικοποίηση και ανάλυσή τους από τις διάφορες πηγές. Όταν βρίσκονται στα φυτά συμπεριφέρονται ως αδρανή οιστρογόνα και μόνο μετά το μεταβολισμό τους από τη μικροχλωρίδα του εντέρου μετατρέπονται σε δραστικές λιγνάνες (Cassidy et al., 2000). Συντίθενται από δύο μόρια φαινυλ-προπανόνης (Manach et al., 2004) και είναι εμφανείς σε τρόφιμα πλούσια σε φυτικές ίνες. Ο λιναρόσπορος είναι η πλουσιότερη πηγή λιγνανών με κύριες τις σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και ματερερινόλη. Ακολουθούν τα φρούτα, τα δημητριακά και ορισμένα λαχανικά που περιέχουν μόνο ίχνη. Στον οργανισμό μεταβολίζονται προς εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Επειδή οι συγκεντρώσεις σεκοϊσολαρισιρεσινόλης και ματερερινόλης σε μια φυσιολογική δίαιτα είναι χαμηλές, σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις εντεροδιόλης και εντερολακτόνης στο αίμα και στα ούρα, η ύπαρξη άλλων λιγνανών -πρόδρομων ενώσεων των μεταβολιτών αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό- είναι προφανής (Kountouri 2007). Οι Thompson et al. (1991) αναφέρουν ότι ο λιναρόσπορος είναι η κύρια πηγή λιγνανών, ενώ ακολουθούν οι φακές, δημητριακά όπως το σιτάρι, λαχανικά όπως το σκόρδο, τα καρότα και τα σπαράγγια και τέλος φρούτα, κυρίως αχλάδια και δαμάσκηνα.



Σχήμα 12 : Δομή Λιγνανών

Στιλβένια: Είναι κυρίως 1,2-διακετυλοαιθένια. Στο δακτύλιο Α φέρουν κυρίως δύο υδροξύλια στη μέτα- θέση, ενώ στον Β δακτύλιο το υδροξύλιο ή οι μεθόξυ-ομάδες (methoxy-groups) βρίσκονται σε ο-, μ- ή/και π- θέση. Συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, του οποίου οι ομάδες-υποκατάστατα καθορίζουν τις ομάδες υποκατάστατα του δακτυλίου Β των στιλβενίων. Βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στα φυτά και στα τρόφιμα είτε ως μονομερή στιλβένια, είτε ως διμερή, τριμερή ή πολυμερή, τις λεγόμενες βινιφερίνες (Cassidy et al., 2000). Συντίθενται από ένα εύρος φυτών τα οποία δεν καταναλώνονται συχνά από τον άνθρωπο ή από μη βρώσιμα μέρη φυτών κι εντοπίζονται συχνότερα στη ρίζα, στα φύλλα και στο φλοιό. Χαρακτηριστικά είναι τα φυτά των οικογενειών *Dipterocarpaceae, Cyperaceae, Gnetaceae, Pinaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Moraceae, Fagaceae, Liliaceae* και *Vitaceae*. Τα σταφύλια, ο χυμός σταφυλιών, το κρασί και το έλαιο φιστικιών ή το φιστικοβούτυρο είναι από τις βασικότερες διατροφικές πηγές στιλβενίων. Η ρεσβερατρόλη, στην οποία έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές ιδιότητες, έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα στιλβένια και βρίσκεται κυρίως στην επιδερμίδα του σταφυλιού και σε μικρές ποσότητες στη σάρκα του σταφυλιού και στο κρασί. Είναι μια φυτοαλεξίνη που παράγεται από τα φυτά όταν αυτά βρεθούν σε συνθήκες στρες, τραυματισμού, μυκητιακής μόλυνσης και υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Είναι μία λιποδιαλυτή ένωση που εμφανίζεται σε *trans* και *cis* διαμόρφωση. Και οι δύο διαμορφώσεις της εμφανίζονται ως γλυκοζυλιωμένες (Nonier, et al., 2005).



Resveratrol

Σχήμα 13 : Δομή Στιλβενίων (απεικόνιση ρεσβερατρόλης)

Προσδιορισμός πολυφαινολών

Ο προσδιορισμός των πολυφαινολών γίνεται με ένα πλήθος τεχνικών ανάλογα με το είδος και τις ιδιότητες που θέλει να προσδιορίσει κανείς. Για τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα εφαρμόζονται φασματοφωτομετρικές τεχνικές όπως οι Folin-Ciocalteu και Prussian Blue που βασίζονται στην αναγωγική δραστικότητα των μορίων αυτών (Balentine et al., 1997).

Πολλές χρωματογραφικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στα φυσικά προϊόντα. Για αναλύσεις ρουτίνας η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης (reserved-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (ultraviolet-visible, UV-Vis), αποτελεί την πρώτη μέθοδο ανάλυσης (Romani et al., 1999) με την αποδοχή της Ένωσης Αναλυτικών Χημικών (AOAC). Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με την σύγκριση των καταγραφομένων κορυφών με αυτές γνωστών διαλυμάτων προτύπων ουσιών. Με την μέθοδο αυτή έχουν διαχωριστεί και ποσοτικοποιηθεί κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου (Akasbi et al., 1993), κερκετίνη, καμπφερόλη και λουτεολίνη σε εκχύλισμα τσαγιού (Bronner et al., 1998) καθώς επίσης και φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και στιλβένια σε σταφύλια και σε κρασί (Gomez-Alonso et al., 2007).

Η εξέλιξη της φασματοσκοπίας μάζας (mass spectroscopy, MS) επιτρέπει την ταυτοποίηση πολικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες. Έχει αποδειχθεί ότι η απευθείας ανάλυση ολικού εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού με φασματομετρία ιονισμού μάζας, ελάχιστα μπορεί να οδηγήσει σε ταυτοποίηση πολυφαινολών και άλλων μικροσυστατικών (Poon et al., 1998).

Την απάντηση σε αυτό δίνουν οι Miketova et al. (1998) που έδειξαν πως ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών μπορεί να γίνει με υψηλή ακρίβεια με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, LC-ESIMS). Η μέθοδος αυτή βρήκε μεγάλη εφαρμογή στα φυτικά προϊόντα χαρακτηρίζοντας πολυφαινόλες παρθένων ελαιόλαδων στην Ισπανία (Brenes et al., 1999), ανθοκυανίνες σε ποικιλίες σταφυλιών (Huang et al., 2009), το πολυφαινολικό δυναμικό φύλλων λευκής φράουλας (Simirgiotis et al., 2010) ακόμα και τον προσδιορισμό του φαινολικού δυναμικού των βοστρύχων (Karvela et al., 2009).

Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Σύγχρονες μελέτες *in vitro* και *in vivo* αποδεικνύουν ότι οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες (Frankel et al., 1993, Visioli et al., 1998**).** Η αντιοξειδωτική δράση τους οφείλεται στο γεγονός ότι τα μόρια αυτά, υπό μορφή ρίζας, σταθεροποιούνται από την μετατόπιση ηλεκτρονίου τους δια μέσου του συστήματος ***π*** (Kanner et al., 1994). Οι ιδιότητες αυτές παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων (Kawanishi et al., 2002), των χρόνιων φλεγμονών και του καρκίνου (Sachidanandame et al., 2005, Dedoussis et al., 2005). Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι παθολογικές αυτές καταστάσεις δημιουργούνται, συμπεριλαμβάνει γενικά μια οξειδωτική αλλοίωση των φυσιολογικά κρίσιμων μορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και των νουκλεϊκών οξέων, μαζί με τη διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης και την φλεγμονώδη αντίδραση. Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει αναπτύξει αμυντικά συστήματα για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Αυτά περιλαμβάνουν διάφορα ενζυμικά συστήματα, κυρίως της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης, υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και συστήματα θειοredοξίνης, τα οποία αναγνωρίζονται ως ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην αποτοξίνωση από τις επονομαζόμενες ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Τα κύρια, μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο ανθρώπινο οργανισμό είναι η γλουταθειόνη, η χολερυθρίνη, οι οιστρογόνες ορμόνες του φύλου, το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q, η μελανίνη, η μελατονίνη, η α-τοκοφερόλη και το λιποϊκό οξύ (Laguerre et al., 2007).

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι τα εξωγενή αντιοξειδωτικά, κυρίως προερχόμενα από την τροφή, είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Αυτά τα αντιοξειδωτικά κυρίως προέρχονται από φυτά, και είναι φαινολικές ενώσεις

(φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και αλκοόλες, στιλβένια), τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, ασκορβικό οξύ και καροτενοειδή.

Γενικά η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, όπως των φλαβονοειδών. Αυτά αποτελούν τα αναγκαία χαρακτηριστικά για το χαρακτηρισμό μιας πολυφαινόλης ως αντιοξειδωτικής (Williams et al., 2004).

Η αναζήτηση φυσικών αντιοξειδωτικών για χρήση διατροφική, καλλυντική και φαρμακευτική, έχει γίνει μια σημαντική βιομηχανική και επιστημονική πρόκληση έρευνας κατά τα τελευταία 20 χρόνια. Εκχυλίσματα, αρωματικά βότανα (Yanishlieva et al., 2006), το τσάι, τα σταφύλια και τα παράγωγα προϊόντα, τα εσπεριδοειδή, φλούδες καρπών και των σπόρων τους, είναι μεταξύ των πηγών φυσικών αντιοξειδωτικών που έχουν μελετηθεί περισσότερο.

Οι πολυφαινόλες φαίνεται να έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Ο βασικός μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης τους μπορεί να περιλαμβάνει την παρεμπόδιση ενζύμων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, όπως οι κυκλοξυγονάσες (COX-1, COX-2) (Martin et al., 2004, Yonsei et al., 2005), οι λιποξυγονάσες (LOX) (Madhavi et al., 1996), και άλλα, όπως οι PPAR, NOS, NFκB και NAG-1 (Lin et al., 1997; Madhavi et al., 1996).

Η αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών, μελετημένη σε πολλά όργανα, αποδίδεται στο γεγονός ότι επηρεάζουν σημαντικά όλα τα στάδια της καρκινογένεσης: το στάδιο της έναρξης, της προαγωγής-προώθησης, της εξέλιξης-εγκατάστασης και της μετάστασης (Ioannides & Yoxall, 2003). Ως αποτέλεσμα, πολυφαινόλες όπως η EGCG του πράσινου και του μαύρου τσαγιού και η ρεσβερατρόλη του κόκκινου κρασιού μπορούν να συνδεθούν με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, να ρυθμίσουν την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένων των p53 και των κασπασών, καθώς και των υποδοχέων των παραγόντων ανάπτυξης και να επηρεάσουν στην αναδιοργάνωση της ακτίνης, οδηγώντας έτσι στον κυτταρικό θάνατο (Lambert et al., 2005; Larossa, 2003).

Η αδυναμία μίας πολυφαινόλης *in vitro* να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες δε συνεπάγεται ότι η ένωση αυτή δεν έχει αντιοξειδωτική δράση *in vivo* και το αντίστροφο. Η δράση των πολυφαινολών φαίνεται να σχετίζεται με την κυτταρική σειρά ή το όργανο και με την παθολογική κατάσταση (Ferguson, 2001; Masella et al., 2005).

Τρόπος δράσης των πολυφαινολών

Το κρασί, κυρίως το κόκκινο, τα σταφύλια και τα υποπροϊόντα των σταφυλιών, χαρακτηρίζονται ως πλούσιες πηγές πολυφαινολών, το προφίλ των οποίων επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως η ποικιλία των σταφυλιών, η έκθεση στον ήλιο, οι τεχνικές οινοποίησης κ.α. Εντούτοις, ποικίλει η αντιοξειδωτική ικανότητα, από πλευράς στοιχειομετρικών αντιδράσεων και κινητικής. (Lugasi et al., 2003).

Τα φαινολικά συστατικά δρουν σαν αντιοξειδωτικά τόσο στις αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων όσο και των ελευθέρων ριζών, διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις χάρη στην ιδιότητά τους να δίνουν το υδρογόνο τους είτε στα λιπίδια είτε στις ελεύθερες ρίζες (Lugasi et al., 2003). Ακόμα, έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν μέταλλα τα οποία καταλύουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων όπως στη περίπτωση του ταννικού οξέος, που δημιουργώντας σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου, παρεμποδίζει τη σύνθεση ριζών υδροξυλίου από την αντίδραση Fenton (Lopes et al., 1999). Οι πολυφαινόλες δρουν κυρίως ως δότες ατόμου Η στις ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδραση:

$$\mathbf{RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet}}$$

όπου $O^{\bullet}$ το σχηματιζόμενο ενδιάμεσο, η φαινοξυ-ρίζα $P^{\bullet}$, είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο και δύσκολα επιτρέπει μία νέα αλυσιδωτή αντίδραση με την επίδραση του O_2. Η ρίζα αυτή σταθεροποιείται με διασπορά των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό δακτύλιο κατά το φαινόμενο του συντονισμού (Shahidi & Wanasundara, 1992). Επίσης μπορεί να δράσει ως τερματιστής της αλυσιδωτής αντίδρασης των ριζών αντιδρώντας με άλλες ρίζες όπως την παρακάτω αντίδραση:

$$\mathbf{RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \rightarrow ROPP}$$

Προκειμένου μία πολυφαινόλη να θεωρείται αντιοξειδωτική πρέπει να ικανοποιεί δύο προϋποθέσεις: Πρώτον να είναι ικανή να καθυστερεί ή να εμποδίζει την αυτοξείδωση ή τη επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση σε επίπεδα χαμηλά, και δεύτερον, η ρίζα που

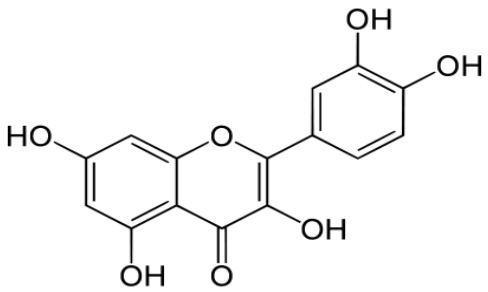
δημιουργείται να είναι σταθερή, μέσω ενδομοριακής δέσμευσης του Η σε περαιτέρω οξείδωση (Rice-Evans et al., 1996).

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ROS (Reactive Oxygen Species) και αζώτου, RNS (Reactive Nitrogen Species) προκύπτουν ως προϊόντα μεταβολισμού του οργανισμού (με δράση μεταλλοϊόντων) ή παράγονται από το κάπνισμα, τις καταστάσεις άγχους και την ακτινοβολία. Ο οργανισμός διαθέτει εσωτερική άμυνα εναντίον των ελευθέρων ριζών αποτελούμενη από τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH) και καταλάση.

Η εσωτερική αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού ενισχυμένη από τα αντιοξειδωτικά της τροφής (βιταμίνες C και E, σελήνιο, φαινολικά συστατικά), οδηγεί στη διατήρηση ισορροπίας μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών. Στην περίπτωση που οι ελεύθερες ρίζες υπερισχύουν και μέσω κάποιων μηχανισμών προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών και καταστροφή του DNA του κυττάρου, εμφανίζεται το φαινόμενο του οξειδωτικού stress το οποίο επηρεάζει τα κύτταρα των στεφανιαίων αρτηριών της καρδιάς και οδηγεί στην απόπτωση των καρδιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την καρδιακή δυσλειτουργία και την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Booyse et al., 2007, Miwa et al., 2004). Οι ROS δρουν συνήθως μέσω της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των λιποπρωτεϊνών, και ιδίως της LDL, με αποτέλεσμα την οξείδωση της LDL, γεγονός που προωθεί την αθηροσκλήρυνση (Hermann et al., 1992).

Η δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τη μορφή των πολυφαινολών και μειώνεται με την παρουσία σακχάρου στο μόριό τους. Παρότι οι συζευγμένες πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις και να δεσμεύουν ενεργά μόρια οξυγόνου ή αζώτου, η ικανότητά τους αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες πολυφαινόλες (Williams et al., 2004). Η θέση στην οποία είναι δεσμευμένο το σάκχαρο είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική δράση του μορίου, καθώς η αναγωγική ικανότητα του Β-δακτυλίου, είναι πιο μικρή από αυτή του Α-δακτυλίου.

Στην ομάδα των φλαβονοειδών ανήκουν πολυφαινόλες με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, με κύριο εκπρόσωπο και ευρύτερα μελετημένη την κερκετίνη (Σχήμα 14). Η κερκετίνη είναι μία από τις πιο σημαντικές πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται κυρίως: α) στην ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον αποεντοπισμό των ηλεκτρονίων από τον Β δακτύλιο, β) στην παρουσία του ο-διφαινολικού τμήματος στον Β δακτύλιο, που είναι ικανό να λειτουργήσει ως δότης Η για να σταθεροποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες και γ) στις ομάδες ΟΗ στη θέση 3 και 5, που αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών.



Σχήμα 14 : Δομή Κερκετίνης

Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης

Υπάρχουν αυξανόμενα δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες, ιδιαίτερα οι ROS και τα RNS, εμπλέκονται σε πολλές φλεγμονώδεις και εκφυλιστικές ασθένειες. Σε ανθρώπους, η οξειδωτική βλάβη συνήθως δεν περιλαμβάνεται στη έναρξη χρόνιων ασθενειών, αν και μπορεί να θεωρηθεί υποκινητής της ασθένειας (Rice-Evans & Diplock, 1992). Επομένως, υπάρχει κλιμάκωση ενδιαφέροντος για την αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών μορίων που περιέχονται σε μεγάλο ποσοστό στα τρόφιμα.

Στα τρόφιμα, τα αντιοξειδωτικά έχουν οριστεί ως «ουσίες που σε μικρές ποσότητες είναι σε θέση να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν σημαντικά την οξείδωση των εύκολα οξειδώσιμων υλών όπως τα λίπη» (Madhavi et al., 1996) κατά συνέπεια στο πεδίο της επιστήμης των τροφίμων τα αντιοξειδωτικά ταυτίζονται συνήθως με αναστολείς των αλυσιδωτών αντιδράσεων (chain-breaking) της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Πολλά αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί σε ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των ποτών (Becker και συν., 2004).

Σε βιολογικά συστήματα, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «κάθε ουσία η οποία, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνες ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί ή εμποδίζει σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος» (Halliwell., 1990, 1997). Αυτός είναι ένας ευρύτερος ορισμός που περιλαμβάνει πολλά ευάλωτα μακρομόρια (π.χ. DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες) που μπορούν να επηρεαστούν από την οξείδωση. Από βιολογικής απόψεως, είναι αποδεκτό ότι οποιοδήποτε μόριο που μπορεί να καθυστερήσει ή να εμποδίσει τη δράση των οξειδωτικών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως αντιοξειδωτικό (Scott, 1997).

Κανένας από τους ανωτέρω ορισμούς δεν καθορίζει την αντιοξειδωτική δραστικότητα. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος ορισμός, διεθνώς αποδεκτός,

για τα αντιοξειδωτικά και την αντιοξειδωτική δράση. Οι ορισμοί που βασίζονται στο μηχανισμό των αντιοξειδωτικών είναι συνήθως επικεντρωμένοι στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να είναι δότες υδρογόνου ή δότες ηλεκτρονίων και αναφέρουν συχνά δοκιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας που μπορούν γενικά να ταξινομηθούν είτε ως δοκιμασίες μεταφοράς υδρογόνου είτε ενός ηλεκτρονίου. Αυτές οι δοκιμές μετρούν τη ικανότητα απενεργοποίησης μιας ρίζας ή τη μείωση της ικανότητας, αντίστοιχα, και όχι την προληπτική αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Αντιοξειδωτική δραστικότητα και αντιοξειδωτική ικανότητα είναι όροι που χρησιμοποιούνται συχνά, αλλά θα πρέπει να αναγνωριστεί ότι έχουν διαφορετική σημασία. Η δραστικότητα αναφέρεται στην σταθερά της αντίδρασης μεταξύ ενός συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού και ενός συγκεκριμένου οξειδωτικού. Αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ένα μέτρο του ποσού (σε γραμμομόρια) μιας δεδομένης ελεύθερης ρίζας που μπορεί να δεσμευθεί από ένα δείγμα. Μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποδίδουν το ποσό του ετερογενούς μίγματος αντιοξειδωτικών που αντιδρούν από κοινού για να παράγουν τη συνολική ή καθαρή ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών του δείγματος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε μεμονωμένου συστατικού του μίγματος δεν μπορεί να υπολογιστεί ξεχωριστά (Lesley et al., 2006).

Θα πρέπει επίσης να αναγνωριστεί ότι η αντιοξειδωτική ιδιότητα του δείγματος θα διαφέρει ανάλογα με τα διάφορα οξειδωτικά που μετρώνται. Αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών, έχουν διαφορετικές σταθερές ταχύτητας και ως εκ τούτου η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλλει (Ghiselli et al., 2000). Πρέπει επίσης να γνωρίζουμε ότι οι αναλυτικές μέθοδοι και οι προϋποθέσεις βάσει των οποίων έχει γίνει η ανάλυση μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα για τα ίδια είδη τροφίμων.

Όταν χρησιμοποιούνται δοκιμές για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, λαμβάνονται υπόψη πολλές παράμετροι. Για τον λόγο αυτό, ενδέχεται να χρησιμοποιηθεί ποικιλία μεθόδων και ποικιλία συνθηκών, ώστε να περιγραφεί σωστά η *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ένωσης ή ενός εκχυλίσματος. Είναι απαραίτητο να υποστηριχθούν τα *in vitro* δεδομένα με δεδομένα *in vivo*, για να υπάρξει εγκυρότητα αποτελεσμάτων. Ομοίως, είναι δύσκολο να συγκριθούν τα αποτελέσματα από μελέτες που χρησιμοποιούν διαφορετικές και μη συγκρίσιμες μεθόδους. Ως εκ τούτου, θα έπρεπε να επιλέγονται μέθοδοι έγκυρες, επικυρωμένες, και που έχουν ευρέως δημοσιευθεί (Lesley et al., 2006).

Κεφάλαιο 3^{ο}

Εκχύλιση Διαλυμάτων και Αιωρημάτων

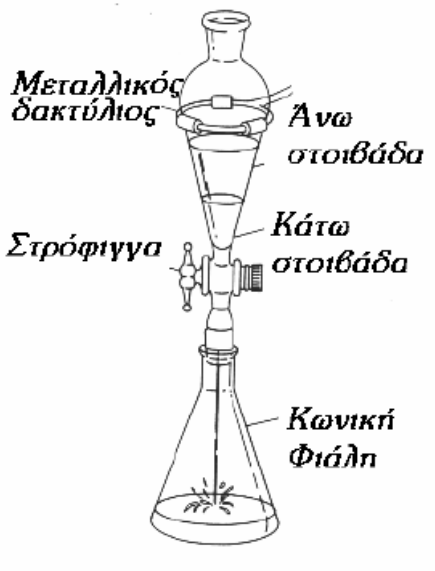
Γενικά

Ως *εκχύλιση* νοείται η διαδικασία μεταφοράς μιας ουσίας από μια φάση όπου αρχικά ευρίσκεται -είτε υπό μορφή διαλύματος είτε διασποράς- σε μια υγρή φάση. Με την τεχνική της εκχύλισης, η απομόνωση μιας ουσίας από ένα μίγμα γίνεται με τη επαφή του με ένα διαλυτικό μέσο το οποίο την διαλύει επιλεκτικά. Το αρχικό μίγμα μπορεί να είναι ένα στερεό ή υγρό φυσικό υλικό ή ένα ακατέργαστο μίγμα μιας αντίδρασης. Ανάλογα με την περίπτωση εφαρμόζεται και διαφορετική τεχνική.

Στην οργανική χημεία η διαδικασία της εκχύλισης είναι μια από τις κυριότερες εργαστηριακές τεχνικές. Η επεξεργασία ενός ακατέργαστου μίγματος μιας χημικής αντίδρασης περιλαμβάνει συνήθως και απλές εκχυλίσεις για την μεταφορά των οργανικών ενώσεων σε έναν οργανικό διαλύτη. Μια άλλη σπουδαία εφαρμογή είναι ο διαχωρισμός ενός μίγματος οργανικών ενώσεων σε όξινα, βασικά και ουδέτερα συστατικά.

Απλή εκχύλιση

Στην συνθετική οργανική χημεία προκύπτει συνήθως ένα ακατέργαστο μίγμα αντίδρασης σαν υδατικό διάλυμα ή αιώρημα μαζί με ανόργανα άλατα, πρώτες ύλες που δεν αντέδρασαν και διάφορα παραπροϊόντα. Γενικότερα, η παραλαβή των οργανικών ουσιών από διαλύματα και αιωρήματα, γίνεται με ανάμιξη του υδατικού μίγματος με έναν μη μιγνυόμενο με το νερό οργανικό διαλύτη. Το προϊόν μεταφέρεται στην οργανική στοιβάδα και μπορεί να ανακτηθεί με την απομάκρυνση του διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανάμιξη των δύο φάσεων γίνεται σε ένα διαχωριστικό χωνί, όπου αναταράσσονται έτσι ώστε να έλθουν σε στενή επαφή και να αποκατασταθεί ισορροπία των διαλυμένων ουσιών στις δυο φάσεις, οπότε και διαχωρίζονται (Σχήμα 15). Η γενική αρχή στην οποία στηρίζεται η εκχύλιση είναι ο γνωστός νόμος κατανομής του Nernst, σύμφωνα με τον οποίο ο λόγος των συγκεντρώσεων μιας ουσίας διαλυμένης σε δύο μη αναμειγνυόμενες υγρές φάσεις Α και Β, στην κατάσταση ισορροπίας είναι σταθερός για μια δεδομένη θερμοκρασία $K=C_a/C_b$.



Σχήμα 15 : Διαχωριστικό χωνί για απλή εκχύλιση

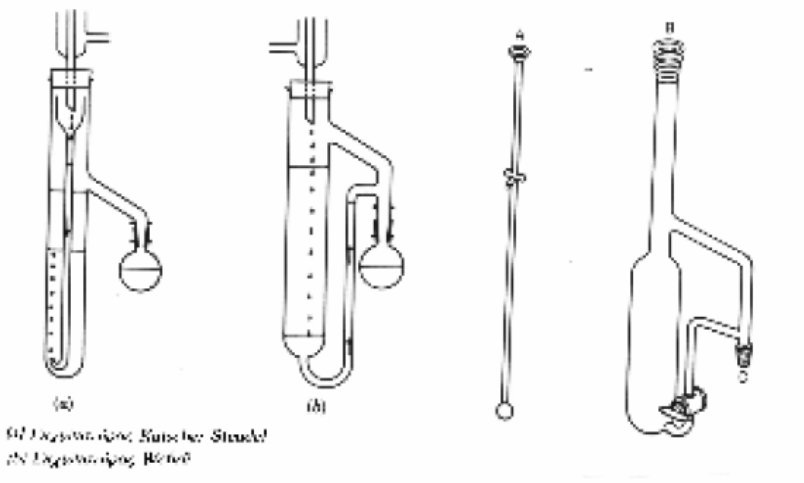
Η σχέση αυτή ισχύει για μικρές συγκεντρώσεις (ιδανικές συνθήκες) και όταν η διαλυμένη ουσία δεν υφίσταται καμία αλλαγή κατά την διάλυσή της, έχει δηλαδή την ίδια φυσικοχημική σύσταση και στις δύο φάσεις. Η σταθερά λέγεται **συντελεστής κατανομής** και είναι μια χαρακτηριστική σταθερά για τη δεδομένη ένωση και το ζεύγος των διαλυτών σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Είναι ένα αδιάστατο μέγεθος.

Πολλαπλή εκχύλιση

Η εκχύλιση μιας ουσίας από ένα οργανικό διαλύτη είναι τόσο ευκολότερη όσο μεγαλύτερη είναι η διαλυτότητά της σε σχέση με την αντίστοιχη στο νερό. Για k >100 πρακτικά αρκεί μια μόνο εκχύλιση, για την παραλαβή μιας ουσίας, ενώ για k < 100 δεν αρκεί συνήθως μια απλή εκχύλιση, αλλά απαιτούνται περισσότερες. Πολλές φορές προκύπτει το ερώτημα, αν θα αρκεστούμε με μία δεδομένη ποσότητα εκχυλιστικού υγρού σε μια εκχύλιση, ή θα κάνουμε περισσότερες με παράλληλη διαίρεση του διαλύτη σε μικρότερα ποσά.

Στην πράξη, μια οργανική ουσία σε ένα σύστημα νερού/οργανικού διαλύτη, με συντελεστή κατανομής μεγαλύτερο του 4, παραλαμβάνεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της με δύο ή τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις. Σε οριακές περιπτώσεις σημαντική βοήθεια στην παραλαβή από το νερό είναι η προσθήκη στην υδατική στοιβάδα ενός ανόργανου άλατος π.χ. NaCl. Η προσθήκη αυτή έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα την δραματική μείωση της διαλυτότητας της οργανικής

ουσίας στο νερό και την διευκόλυνση της παραλαβής της από τον οργανικό διαλύτη. Η διαδικασία αυτή λέγεται **εξαλάτωση** (*salting out*).



Σχήμα 16 : Συσκευές συνεχούς εκχυλίσεως υγρών

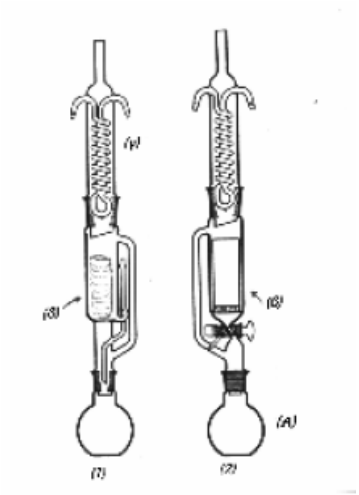
Στην περίπτωση όπου η διαλυτότητα στο νερό είναι μεγαλύτερη από ότι στον οργανικό διαλύτη (k μικρότερο της μονάδας), δεν είναι δυνατή η ποσοτική παραλαβή μιας ουσίας με ασυνεχείς, απλές εκχυλίσεις, ή με εξαλάτωση. Αν π.χ. σε μια απλή εκχύλιση παραλαμβάνεται μόνο το 2-5 % της ουσίας, η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα και επίπονη. Για το λόγο αυτό έχουν επινοηθεί διατάξεις συνεχούς εκχύλισης ανάλογες με την συσκευή Soxhlet που περιγράφεται στην εκχύλιση των στερεών. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι συσκευών συνεχούς εκχύλισης που αφορούν αντίστοιχα ελαφρύτερους και βαρύτερους του νερού οργανικούς διαλύτες που δίνονται διαγραμματικά στο Σχήμα 16.

Εκχύλιση των στερεών

Η εκχύλιση οργανικών ουσιών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Στην κατηγορία αυτή των εκχυλίσεων μπορούν να αναφερθούν σπουδαίες βιομηχανικές διαδικασίες όπως η παραλαβή της ζάχαρης από τα τεύτλα ή το ζαχαροκάλαμο, η παραλαβή ελαίων από ορισμένους ελαιούχους σπόρους και πολλές άλλες βιομηχανικές διαδικασίες παραλαβής φυσικών προϊόντων. Σημειώνεται ότι η εκχύλιση είναι συνήθως η κύρια διαδικασία παραλαβής των αλκαλοειδών από τα φυτά (φύλλα, ρίζες, καρπούς κλπ), των γευστικών συστατικών από διάφορους σπόρους, των

αρωμάτων από άνθη κλπ. Μια απλή εκχύλιση ενός στερεού μπορεί να γίνει θερμαίνοντας την ουσία με ένα διαλύτη και πραγματοποιώντας στη συνέχεια απόχυση ή διήθηση του θερμού μίγματος. Για μικρές ποσότητες ουσίας η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με προσαρμοσμένο ένα μακρύ γυάλινο σωλήνα σαν κάθετο ψυκτήρα και αυτό να επαναληφθεί πολλές φορές. Ένας ακόμα απλούστερος τρόπος είναι να αφεθεί για εκχύλιση ένα στερεό σε επαφή με έναν κατάλληλο διαλύτη σε μια πωματισμένη φιάλη για κάποιο χρονικό διάστημα.

Σε εργαστηριακό επίπεδο η εκχύλιση από στερεά μίγματα γίνεται συνήθως με την εκχυλιστική συσκευή Soxhlet, η οποία περιγράφεται διαγραμματικά στο **Σχήμα 17**. Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο υποδοχέα στο επίθεμα Β της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα Γ και επαναρρέουν επί του χάρτινου υποδοχέα του στερεού μίγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη μέχρι το ύψος του κεκκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός, ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη Α και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη Α με τα διαλυτά συστατικά του στερεού μίγματος. Η τεχνική αυτή με παρατεταμένη λειτουργία είναι κατάλληλη για την παραλαβή ακόμη και ελάχιστα διαλυτών ουσιών.



Σχήμα 17 : Εκχυλιστικές συσκευές στερεών

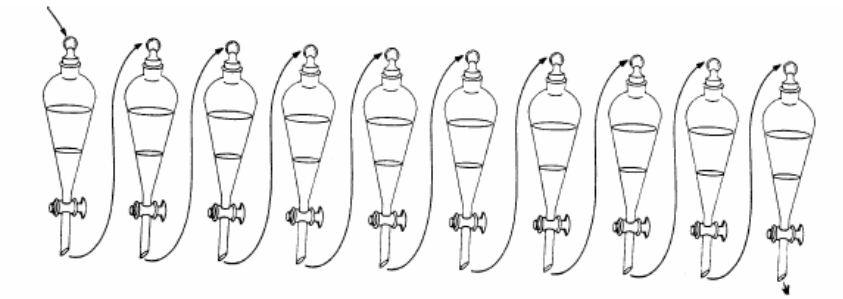
Εκτός από την συσκευή Soxhlet που περιγράφηκε κυκλοφορούν εμπορικά διάφορες παραλλαγές της. Μια από αυτές τις παραλλαγές είναι η συσκευή Thielepape (**Σχήμα 17**), όπου το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται στον υποδοχέα όπου υφίσταται την εκχύλιση με θερμότερο διαλύτη, επειδή το στερεό μίγμα εκτίθεται κατά συνεχή τρόπο στην επίδραση και μη

συμπυκνωθέντων ατμών διαλύτη. Το επίθεμα της συσκευής Thielepape (**Σχήμα 17**) είναι πολλαπλών χρήσεων και μπορεί με την τοποθέτηση καταλλήλων υποδοχέων να λειτουργήσει και σαν συσκευή εκχύλισης υγρού-υγρού για διαλύτες είτε βαρύτερους είτε ελαφρότερους από την άλλη υγρή φάση.

Πολλαπλή κατανομή

Η πολλαπλή κατανομή είναι μια διαδικασία εκχύλισης πολλών σταδίων με την οποία μπορούν να διαχωριστούν τελικά μίγματα οργανικών ουσιών, με βάση τις διαφορές τους στους συντελεστές κατανομής, σε ένα σύστημα δύο μη μιγνυομένων υγρών. Στην πολλαπλή κατανομή οι δύο υγρές φάσεις βρίσκονται σε αντιρροή, με την έννοια ότι μερικά εμπλουτισμένο εκχύλισμα (οργανική φάση με διαλελυμένες οργανικές ουσίες) έρχεται σε επαφή με αμιγές αρχικό διάλυμα και μερικά εκχυλισμένο διάλυμα έρχεται σε επαφή με αμιγή διαλύτη, σε μια σειρά από εκχυλιστικές μονάδες.

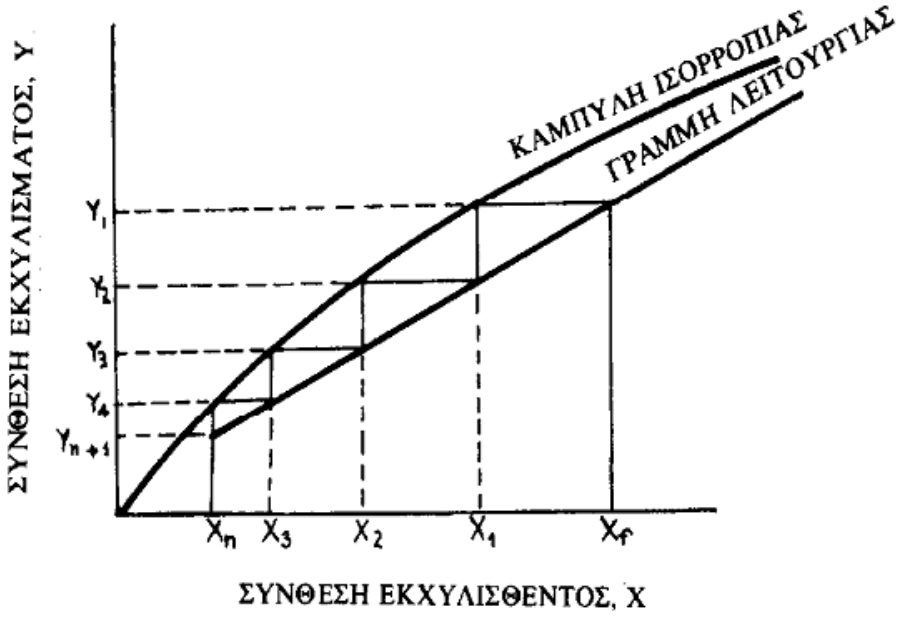
Για να γίνει κατανοητή η διαδικασία της πολλαπλής κατανομής, ας θεωρηθούν δέκα εκχυλιστικές μονάδες (π.χ. διαχωριστικά χωνιά) στις οποίες έχουν τοποθετηθεί από 100 ml νερού στο καθένα. (**Σχήμα 18**).



Σχήμα 18 : Συστοιχία πολλαπλής κατανομής

Στην πρώτη εκχυλιστική μονάδα φέρεται ένα διάλυμα μιας ουσίας Α σε 100 ml χλωροφορμίου και ανακινούνται μέχρι εξισορροπήσεως. Κατόπιν η στοιβάδα του χλωροφορμίου μεταφέρεται στην δεύτερη εκχυλιστική μονάδα, ενώ στην πρώτη προστίθενται 100 ml χλωροφορμίου. Τα δύο χωνιά ανακινούνται, η οργανική στοιβάδα του δεύτερου χωνιού μεταφέρεται στο τρίτο χωνί, η οργανική στοιβάδα του πρώτου στο δεύτερο, ενώ στο πρώτο προστίθεται νέα ποσότητα από 100 ml $CHCl_3$. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται διαδοχικά μέχρις ότου και στις δέκα εκχυλιστικές μονάδες υπάρχουν από 100 ml υδατικού διαλύματος και

100 ml $CHCl_3$. Αν θεωρηθεί, για λόγους απλότητας, ότι ο συντελεστής κατανομής της διαλελυμένης ουσίας είναι ίσος με 1 τότε η κατανομή βαρών της ουσίας στις 10 εκχυλιστικές μονάδες θα έχει την μορφή μιας κωδωνοειδούς καμπύλης, στην οποία το μεγαλύτερο ποσοστό θα βρίσκεται στην κεντρική εκχυλιστική μονάδα και τα μικρότερα ποσοστά στις ακραίες. Εάν ο συντελεστής κατανομής είναι μικρότερος της μονάδας, το μέγιστο είναι μετατοπισμένο προς την ακραία αρχική εκχυλιστική μονάδα, ενώ για ουσίες με συντελεστή κατανομής μεγαλύτερο της μονάδας, το μέγιστο είναι μετατοπισμένο προς την ακραία τελική εκχυλιστική μονάδα.



Σχήμα 19 : Γραφική μέθοδος, για τον υπολογισμό του ορισμού βαθμίδων χρησιμοποιώντας μη αναμίξιμους διαλύτες.

Όταν στο αρχικό διάλυμα υπάρχουν περισσότερες ουσίες, κάτω από ιδανικές συνθήκες κατανομής, κατανέμονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Συνεπώς, τα μέγιστα στις αντίστοιχες καμπύλες κατανομής των βαρών θα εντοπίζονται σε διαφορετικές εκχυλιστικές μονάδες. Όταν ο αριθμός των εκχυλιστικών μονάδων είναι περιορισμένος, οι καμπύλες αυτές θα τέμνονται. Με την αύξηση όμως των εκχυλιστικών μονάδων οι καμπύλες απομακρύνονται αμοιβαία και είναι δυνατόν να επέλθει ο πλήρης διαχωρισμός τους.

Βασικός παράγοντας για τον διαχωρισμό με την διαδικασία της πολλαπλής κατανομής είναι ο λόγος των συντελεστών κατανομής για το δεδομένο σύστημα διαλυτών. Όταν ο **διαχωριστικός παράγοντας $\beta = K_1/K_2$** για ένα μίγμα π.χ. δύο ουσιών, είναι διάφορος της μονάδας, ο διαχωρισμός είναι κατ' αρχήν δυνατός. Ο παράγων αυτός είναι τυπικά ανάλογος με τον αντίστοιχο παράγοντα της σχετικής πτητικότητας που καθορίζει την αποτελεσματικότητα ή

μη μιας κλασματικής απόσταξης. Σημειώνεται επίσης η τυπική ομοιότητα των εκχυλιστικών μονάδων της πολλαπλής κατανομής και των θεωρητικών πλακών της κλασματικής στήλης. Είναι προφανές πως για έναν παράγοντα β μεγαλύτερο του 100 αρκεί μόνο μια εκχύλιση για να γίνει ο διαχωρισμός. Η πολλαπλή κατανομή όμως σαν πειραματική διαδικασία διαχωρισμού ακόμη και με δέκα εκχυλιστικές μονάδες είναι υπερβολικά επίπονη, χρονοβόρα και πιθανόν άνευ πρακτικής σημασίας. Τη λύση δίνουν αυτόματες εκχυλιστικές διατάξεις (συσκευή Craig) που έχουν αναπτυχθεί και κυκλοφορούν, στις οποίες οι ανακινήσεις και μεταφορές γίνονται αυτόματα. Οι συσκευές αυτές λειτουργούν με συστοιχίες ακόμη και εκατοντάδων εκχυλιστικών μονάδων με άριστα αποτελέσματα.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί πως η διάταξη της πολλαπλής κατανομής αποτελεί το αρχέτυπο της χρωματογραφίας κατανομής (χάρτου ή αέρια χρωματογραφία) όπου και εκεί οι ουσίες κατανέμονται σε μια κινητή και μια κινούμενη φάση και οι διαφορές στους επιμέρους συντελεστές κατανομής καθορίζουν και την ταχύτητα κίνησής τους στην χρωματογραφική διάταξη.

Διαλύτες εκχύλισης

Είναι προφανές, ότι καθοριστικός παράγοντας στην διαδικασία της εκχύλισης είναι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης. Ένας κατάλληλος διαλύτης θα πρέπει να διαλύει, αν είναι δυνατόν επιλεκτικά, την οργανική ουσία που πρόκειται να εκχυλιστεί, να μην αντιδρά με αυτήν, να απομακρύνεται εύκολα και να μην είναι εύφλεκτος ή τοξικός. Τα δύο τελευταία κριτήρια παρόλο που είναι επιθυμητά, δεν είναι πάντα εύκολο να ικανοποιηθούν και οι εργασίες της εκχύλισης θα πρέπει να γίνονται με την μεγαλύτερη δυνατή προσοχή. Ανάλογα με το είδος και την φυσικοχημική κατάσταση του ακατέργαστου υλικού από όπου θα γίνει η εκχύλιση διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες διαλυτών, οι υδατικοί και οι οργανικοί.

(α) **Πολικοί διαλύτες:** Οι διαλύτες αυτοί (νερό, αραιά διαλύματα ανόργανων οξέων και βάσεων) χρησιμοποιούνται για την παραλαβή από μια οργανική, μη αναμίξιμη με το νερό, φάση πολικών ενώσεων, όπως οξέων και βάσεων υπό ιονική μορφή αλλά και άλλων ιονικών ή ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Η χρήση τους θα εξεταστεί στον διαχωρισμό μίγματος όξινων βασικών και ουδετέρων συστατικών.

(β) **Μή πολικοί διαλύτες.** Οι διαλύτες αυτοί είναι οι κοινοί μη αναμίξιμοι με το νερό οργανικοί διαλύτες (αιθέρας, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο, κλπ), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την παραλαβή μη πολικών οργανικών ουσιών από υδατικά διαλύματα ή αιωρήματα. Είναι οι

κατεξοχήν οργανικοί διαλύτες εκχύλισης, Παρομοίως, σ' αυτές τις περιπτώσεις η τελική πράξη της εκχύλισης αφορά στην παραλαβή των οργανικών συστατικών που γίνεται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3**) δίνονται μερικοί από τους πιο κοινούς διαλύτες εκχύλισης και μερικές από τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 3 : Κοινοί διαλύτες εκχύλισης

Είδος Διαλύτη	**Σημείο Ζέσεως (^{0}C)**	**Πυκνότητα (g*ml^{-1})**	**Τοξικότητα**	**Χρήσεις**
Αιθανόλη	78	0,789	-	Πολικός, προτικός, κατάλληλος να αντικαταστήσει την τοξική μεθανόλη
Εξάνιο	68.7	0.65	+	Διαλύτης κυρίως για μη πολικές ενώσεις. Ακατάλληλος για πολικές
Αιθέρας	34.6	0.71	+++	Πολύ καλός διαλύτης για γενικές χρήσεις. Διαλύει μέχρι 1.5% νερό. Ιδιαίτερα κατάλληλος για εκχυλίσεις ενώσεων που περιέχουν οξυγόνο
Χλωροφόρμιο	61.7	1.48	+++	Τοξικός διαλύτης, με πολύ μεγάλη διαλυτική ικανότητα. Ξηραίνεται εύκολα, η χρήση του όμως αποφεύγεται. Έχει την τάση να σχηματίζει γαλακτώματα
Διχλωρομεθάνιο	39.7	1.31	++	Καλός διαλύτης γενική χρήση. Ξηραίνεται εύκολα αλλά σχηματίζει γαλακτώματα. Αντικαθιστά συνήθως στις εκχυλίσεις το χλωροφόρμιο
Οξικός Αιθυλεστέρας	77.1	0.89	+	Καλός διαλύτης για πολικές ενώσεις. Μειονέκτημα ότι συγκρατεί πολύ νερό
n-Βουτανόλη	118	0.81	+	Τελευταία επιλογή για εκχύλιση ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Διαλύεται πάνω από 20% νερό.

Μέθοδοι εκχύλισης πολυφαινολών

Η εκχύλιση είναι το βασικότερο στάδιο απομόνωσης των μεμονωμένων και των ολικών πολυφαινολών από φυτικούς ιστούς. Ο σκοπός του διαλύτη είναι να μεταφέρει τις πολυφαινόλες από τον φυτικό ιστό στην υγρή φάση. Οι πολυφαινόλες είναι περισσότερο διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες οι οποίοι είναι λιγότερο πολικοί από το νερό. Μία αποδοτική εκχύλιση από φυτικό ιστό εξαρτάται από την σωστή επιλογή του διαλύτη, την αυξημένη θερμοκρασία και το μηχανισμό ανάδευσης, έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής του διαλύτη με την πρώτη ύλη.

Η διαλυτότητά τους εξαρτάται από τις ιδιότητες των πολυφαινολών και κατά συνέπεια από τη σωστή επιλογή του διαλύτη.

Οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των πολυφαινολών από φυτικό υλικό είναι μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρεας και τα υδατικά τους διαλύματα. Η μεθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εκχύλιση πολυφαινολών από διάφορα φρούτα και λαχανικά, όπως μήλα (Oleszek et al., 1988), σταφύλια (Lee & Jaworski, 1990), κρεμμύδια (Park & Lee, 1996), δαμάσκηνα και χυμό από δαμάσκηνα (Donovan et al., 1998) και βράκτια μπανάνας (Pazmino-Duran et al., 2001). Η ακετόνη έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολυφαινολών από μήλα (Eberhardt et al., 2000), δαμάσκηνα και χυμό από δαμάσκηνα (Nakatani et al., 2000) και βατόμουρα (Stintzing et al., 2002). Η αιθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολυφαινολών από μήλα (Coseteng & Lee, 1987), σταφύλια (Jaworski & Lee, 1987) και σιτηρά (Kreft et al., 1999). Πολυφαινόλες από κρασί και από ελαιόλαδο έχουν εκχυλιστεί με αποτελεσματικό τρόπο κάνοντας χρήση οξικού αιθυλεστέρα (Lesage-Meessen et al., 2001). Πολυφαινόλες όπως οι κατεχίνες, οι επικατεχίνες και οι προκυανιδίνες έχουν εκχυλιστεί από βύνη ζυθοποιίας με τη χρήση ζεστού νερού (Wang et al., 2000a,b).

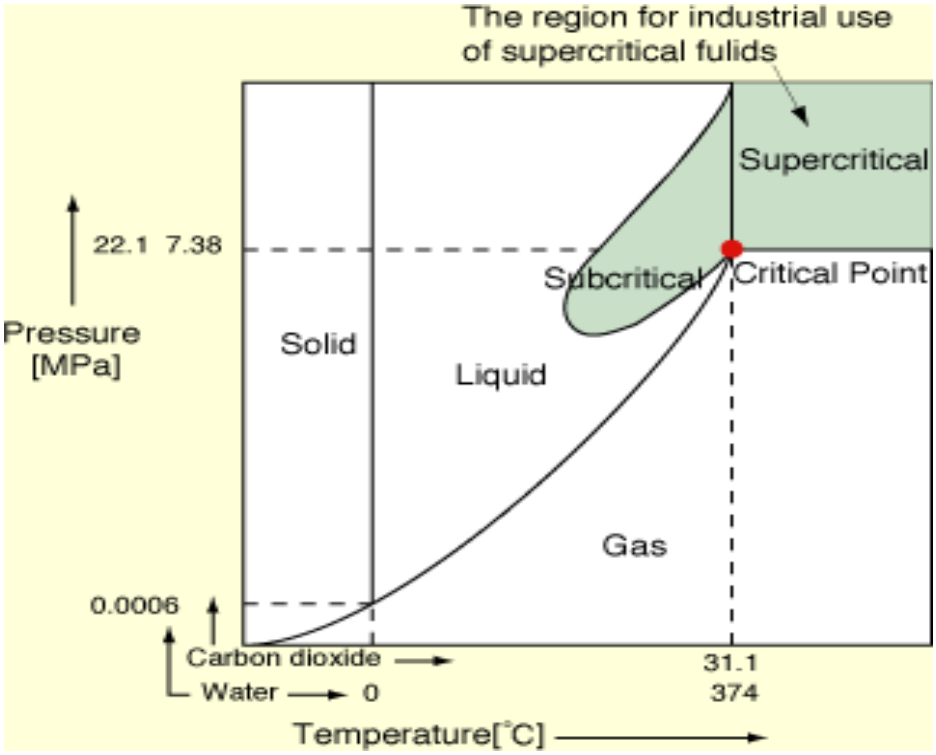
Ανάλογα με το είδος της πρώτης ύλης, διαφέρει και ο τρόπος εκχύλισης των πολυφαινολών. Έτσι, εάν πρόκειται για λυοφιλοποιημένο φυτικό ιστό, χρησιμοποιούμε υδραλκοολικό ή υδρομεθανολικό μείγμα (ανάλογα με τον εάν μας ενδιαφέρει η τοξικότητα του διαλύτη) και λουτρό υπερήχων. Από την άλλη, όταν αναφερόμαστε σε φρέσκο ιστό θα ήταν καλύτερα να χρησιμοποιήσουμε σκέτο τον οργανικό διαλύτη με ταυτόχρονη ομογενοποίηση, γεγονός που μειώνει τον χρόνο εκχύλισης. Στην δεύτερη περίπτωση, αλληλεπιδρώντα συστατικά όπως σάκχαρα και οργανικά οξέα εκχυλίζονται σε πολύ μικρότερο βαθμό. Ανάλογα με το pH του διαλύματος που χρησιμοποιούμε επηρεάζουμε την εκχυλισιμότητα των διαφορετικών συστατικών, έτσι τα φαινολικά οξέα είναι τελείως ιονισμένα σε pH 7,0 και μη ιονισμένα σε pH 2.0 (Ronald et al., 2005).

Εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical fluid extraction)

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση (Supercritical fluid extraction, SFE) είναι μία καινοτόμος μεθοδολογία, η οποία θεωρείται ότι μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική λύση των συμβατικών μεθόδων διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή εκχύλιση και η απόσταξη. Οι κύριοι λόγοι που έχουν

οδηγήσει στην μελέτη της χρήσης υπερκρίσιμων ρευστών, είναι η ραγδαία αύξηση του κόστους ενέργειας και οι αυστηροί κανονισμοί που έχουν θεσπιστεί, όσον αφορά στην χρήση των οργανικών διαλυτών (McHugh & Krukonis, 1986). Με βάση τα παραπάνω, τα τελευταία χρόνια ερευνάται συστηματικά η χρήση της υπερκρίσιμης εκχύλισης, κυρίως για την παραλαβή πολύτιμων συστατικών από φυσικές πρώτες ύλες (Reverchon et al., 2006, Herrero et al., 2006).

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μια μέθοδός διαχωρισμού η οποία χρησιμοποιεί ένα υπερκρίσιμο ρευστό σαν διαλύτη, όπως αιθάνιο, προπάνιο, διοξείδιο του άνθρακα, κ.α. Το CO_2 χρησιμοποιείται περισσότερο διότι είναι ένα υλικό μη εύφλεκτο, πτητικό, φθηνό, διαθέσιμο σε αφθονία, λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και χρειάζεται μικρή κατανάλωση ενέργειας. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι πτητικοί καθώς υπάρχει εκλεκτικότητα για την επιλογή των ουσιών που θέλουμε να εκχυλίσουμε.



Σχήμα 20 : Αρχή της μεθόδου υπερκρίσιμης εκχύλισης.

Παρ' όλα αυτά, η αναγκαία χρήση υψηλών πιέσεων αποτελεί, ακόμα και σήμερα, βασική τροχοπέδη για την βιομηχανική εφαρμογή της SFE, η οποία εφαρμόζεται κυρίως για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ, την παραλαβή πολύτιμων συστατικών (αιθέρια έλαια, χρωστικές, αρωματικές και φαρμακευτικές ουσίες, αντιοξειδωτικά) από βότανα και μπαχαρικά

και την κλασματοποίηση φυτικών ελαίων (Perut et al., 2004). Ταυτόχρονα το υψηλό πάγιο κόστος, η ευφλεκτότητα των διαλυτών, η ασυνεχής λειτουργία καθώς και η μοντελοποίηση της τεχνικής, αποτελούν μειονεκτήματα που καθιστούν δύσκολη την ευρεία χρήση της τεχνικής αυτής.

Αξίζει να σημειωθεί πως η τεχνολογία της υπερκρίσιμης εκχύλισης έχει και άλλες εφαρμογές, όπως η παρασκευή υπέρλεπτων σωματιδίων, βάσει των οποίων έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα διεργασιών, κυρίως από φαρμακευτικές ή χημικές εταιρίες (Klinksiek et al., 2004).

Κεφάλαιο 4^{ο}

Λίπη, Έλαια και Λιποσώματα Λεκιθίνης

Λίπη και έλαια στα τρόφιμα

Στην Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων με τον όρο «έλαια» εννοούμε τα εδώδιμα λίπη και έλαια και εν μέρει τα αιθέρια έλαια. Μια λιπαρή ύλη χαρακτηρίζεται ως λίπος ή έλαιο ανάλογα με το αν στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι στερεή ή υγρή (ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος). Τα λίπη και τα έλαια αποτελούνται κυρίως από γλυκερίδια ή ακυλογλυκερόλες, όπως πιο σωστά πρέπει να καλούνται οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Στη φύση απαντώνται σε μεγάλη αναλογία τα τριγλυκερίδια, δηλαδή ενώσεις στις οποίες και τα τρία υδροξύλια της αλκοόλης είναι εστεροποιημένα.

Τα λίπη και τα έλαια ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων που συναντάμε στη φύση, τα λιπίδια. Τα διάφορα λιπίδια, από χημικής άποψης ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες. Το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες όπως ο αιθέρας, ο πετρελαϊκός αιθέρας, το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο κ.λπ. ενώ είναι αδιάλυτα στο νερό. Πολλά λιπίδια είναι παράγωγα λιπαρών οξέων. Άλλα όπως π.χ. η βιταμίνη Α, οι τοκοφερόλες, το σκουαλένιο, δεν αποτελούν παράγωγα λιπαρών οξέων και η δομή τους διαφέρει κατά πολύ από εκείνη των γλυκεριδίων.

Οι λιπαρές ύλες συμβάλλουν στην οσμή και γεύση του φαγητού και προσθέτουν στις τροφές ικανότητα κορεσμού. Χρησιμοποιούμενες στη μαγειρική παίζουν το ρόλο ενός ελεγχόμενου μέσου εναλλαγής θερμότητας και επηρεάζουν ευνοϊκά τη γεύση του φαγητού.

Οι ιδιότητες των λιπών και ελαίων εξαρτώνται από τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα και την κατανομή των οξέων αυτών στα μόρια των ακυλογλυκερολών. Τα συστατικά τους είναι: λιπαρά οξέα (κορεσμένα, ακόρεστα), φωσφατίδια, λιποσώματα, μόνο- και διγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κηρώδη συστατικά, αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, χρωστικές, βιταμίνες.

Οξείδωση των λιπών και των ελαίων που περιέχονται στα τρόφιμα

Τα λιπίδια περιέχονται σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα και τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στην μορφή των τριγλυκεριδίων, τα οποία είναι εστέρες των λιπαρών οξέων με την γλυκερόλη. Τα φυσικά λιπαρά οξέα, που αποτελούνται από ευθείες ανθρακικές αλυσίδες άρτιων αλειφατικών καρβοξυλικών οξέων, μπορεί να είναι είτε κορεσμένα είτε ακόρεστα με έναν έως και έξι διπλούς δεσμούς. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας καθώς και ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων, είναι βασικό κριτήριο για να προσδιορίσει κανείς την σταθερότητα των λιπιδίων.

Τα λιπίδια υφίστανται μεταβολές διαφόρων ειδών κατά την παρασκευή, τον χειρισμό και την αποθήκευση των προϊόντων. Δύο από τις βασικότερες μεταβολές είναι: η υδρόλυση, κατά την οποία προκύπτουν ελεύθερα λιπαρά οξέα και μόρια γλυκερόλης, και η οξείδωση. Η αντίδραση αυτή επιταχύνεται από τις υψηλές θερμοκρασίες, την παρουσία λιπολυτικών ενζύμων, οξέων και από το υψηλό ποσοστό μικροοργανισμών στα έλαια φυτικής προέλευσης.

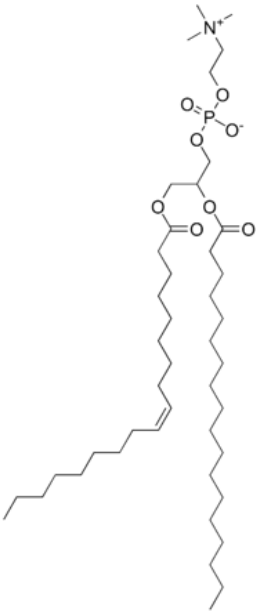
Τα λιπίδια είναι επιρρεπή στις οξειδώσεις που προκαλούνται στους ακόρεστους δεσμούς των λιπαρών οξέων. Οι αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων είναι αρκετά πιο πολύπλοκες από την απλή προσθήκη οξυγόνου που οδηγεί στην οξείδωση των μετάλλων. Παρ’ όλα αυτά, αναγνωρίζεται ως το πιο συχνό φαινόμενο μεταβολής των λιπιδίων, με αποτέλεσμα την αλλαγή της σύστασης των ελαίων, τον πολυμερισμό, την δημιουργία μη επιθυμητών οσμών, την αναστροφή και ένα πλήθος αντιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου ζωής των προϊόντων και της θρεπτικής τους αξίας.

Σε διατροφικά συστήματα οι αντιδράσεις οξείδωσης μπορούν να διαχωριστούν σε εκείνες των υψηλά ακόρεστων λιπαρών οξέων (πολυακόρεστων) και σε εκείνες των λιγότερο ακόρεστων λιπαρών οξέων. Το αποτέλεσμα των οξειδώσεων αυτών είναι ο σχηματισμός είτε πολυμερισμένων τελικών προϊόντων είτε την δημιουργία υποπροϊόντων που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, όπως η οσμή και η γεύση (Stuckey, 1972).

Ορισμός και ιδιότητες λεκιθίνης

Ο όρος λεκιθίνη αναφέρεται σε μείγματα ουσιών που υπάρχουν σε κάθε ζωντανό οργανισμό, καθώς αποτελούν μέρος των κυττάρων και των τοιχωμάτων των κυττάρων. Η λεκιθίνη απομονώνεται εμπορικά κυρίως από τη σόγια και τον κρόκο αυγών. Η χημική σύνθεση των λεκιθινών από τις δύο αυτές πηγές προέλευσης διαφέρει αρκετά, γεγονός που καθορίζει τις εφαρμογές του προϊόντος.

Χημικά ως λεκιθίνη ορίζεται μια φωσφατιδυλοχολίνη, (φωσφολιπίδιο που περιέχει χολίνη). Η εμπορική λεκιθίνη, προερχόμενη από σόγια, φιστίκι και αραβόσιτο, είναι ένα μείγμα από φωσφολιπίδια με κυριότερο την φωσφατιδυλοχολίνη. Στα τρόφιμα χρησιμοποιείται κυρίως ως γαλακτωματοποιητής όπως, στις σάλτσες για τις σαλάτες, τα επεξεργασμένα τυριά και τις σοκολάτες καθώς και στα λάδια που χρησιμοποιούνται για τηγάνισμα (Benders' Dictionary of Nutrition and Food Technology 1999).



Σχήμα 21 : Δομή μίας φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφολιπιδίων που υπάρχουν στη λεκιθίνη

Η λεκιθίνη έχει χρησιμοποιηθεί για εμπορικούς σκοπούς σε τρόφιμα που απαιτούν ένα φυσικό γαλακτωματοποιητή ή λιπαντικό καθώς επίσης σε φαρμακευτικά προϊόντα όπως προστατευτικά καλύμματα. Για παράδειγμα η λεκιθίνη είναι ο γαλακτωματοποιητής που κρατά το κακάο και το βούτυρο για να μην διαχωριστούν. Σε μαργαρίνες, ειδικά εκείνες που περιέχουν υψηλά επίπεδα λίπους (>75%), η λεκιθίνη προστίθεται ως «anti-spattering» για καλό τηγάνισμα.

Η λεκιθίνη θεωρείται ως μια ανεκτή και μη τοξική τασιενεργή ουσία. Έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής για ανθρώπινη κατανάλωση χαρακτηριζόμενη ως «Γενικά Αναγνωρισμένη ως Ασφαλής». Είναι αποδεκτή από την Ε.Ε. ως πρόσθετο τροφίμων με τον αριθμό Ε322. Η λεκιθίνη μπορεί να μεταβολιστεί πλήρως, έτσι ώστε να είναι μη τοξική από τον ανθρώπινο οργανισμό ενώ ορισμένοι άλλοι γαλακτωματοποιητές μπορούν να απεκκριθούν μόνο μέσω των νεφρών. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η λεκιθίνη που προέρχεται από σόγια έχει σημαντικές επιπτώσεις στη μείωση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων αυξάνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα της HDL στο αίμα (Iwata et al., 1993, Jimenez et al., 1990).

Στην παρούσα εργασία η λεκιθίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη λιπαρή ύλη για την καλύτερη μελέτη των αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν περιέχονται σε εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποιίας και είναι υδατοδιαλυτές ουσίες με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαλυθούν εύκολα σε λιπαρές ύλες. Με την χρήση της λεκιθίνης παρακάμπτονται αυτές οι δυσκολίες χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα ένα οικονομικό υπόστρωμα (Makris et al., 2001)

Οξείδωση των λιπιδίων

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που προκαλείται από το οξυγόνο συνεργούντων και άλλων παραγόντων όπως η θερμότητα, οι ελεύθερες ρίζες, το φως, φωτοευαίσθητες χρωστικές ουσίες και ιόντα μετάλλων. Υπάρχουν τρεις πιθανές οδοί αντίδρασης:

i. Μη-ενζυμική αυτοξείδωση παρουσία ελευθέρων ριζών

ii. Μη-ενζυμική και απουσία ελευθέρων ριζών φωτοξείδωση

iii. Ενζυμική οξείδωση

Οι δύο πρώτοι τύποι οξείδωσης αποτελούνται από ένα συνδυασμό αντιδράσεων στους οποίους συμμετέχει οξυγόνο τριπλής βασικής κατάστασης $^3O_2$, η οποία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως a μια μη διεγερμένη διπλή ρίζα ˙OO˙, και το οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης $^1O_2$, το οποίο αντιστοιχεί σε μια διεγερμένη κατάσταση του μορίου. Υπάρχουν πολλές πηγές $^1O_2$ αλλά η παρουσία του είναι συχνά συνδεδεμένη με την επίδραση ακτίνων UV παρουσία φωτοευαισθητοποιητών. Σύμφωνα με τον Frankel (1998) υπάρχουν 2 τύποι φωτοευαισθητοποιητών: ο τύπου Ι για την ριβοφλαβίνη και ο τύπου ΙΙ για την χλωροφύλλη και

την ερυθροσίνη. Ο μηχανισμός της φωτοξείδωσης εξαρτάται από το είδος του φωτοευαισθητοποιητή. Στις οξειδώσεις τύπου ΙΙ, το οξυγόνο τριπλής βασικής κατάστασης, λειτουργώντας ως φωτοευαισθητοποιητής (^{3}sens), απορροφά φωτόνια και μεταπίπτει σε απλή διεγερμένη κατάσταση, και στην συνέχεια, μεταφέρει την ενέργεια του στο μοριακό οξυγόνο το οποίο γίνεται 1500 φορές πιο δραστικό από το $^3O_2$.

$$^3\text{sens} \rightarrow {}^1\text{sens} + {}^3O_2 \rightarrow {}^1O_2$$

Το οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen) που έχει σχηματιστεί, έχει την τάση να δεσμεύεται απ' ευθείας από τον διπλό δεσμό C=C με ταυτόχρονο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων. Αυτός ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται ως φωτοξείδωση απουσία ελευθέρων ριζών (Cillard et al., 2006). Μετά το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων συνεχίζεται πλέον η αντίδραση με το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών.

Ο μηχανισμό της αυτοξείδωσης είναι αρκετά πολύπλοκος. Γενικά δεχόμαστε ότι η αυτοξείδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που χωρεί με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Έχει τρία στάδια, την έναρξη (initiation), τη διάδοση (propagation) και τον τερματισμό (termination) (Μπόσκου, 2004, Laguerre et al., 2007). Στο στάδιο της διάδοσης κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο και δίνει μια νέα ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα αντιδρά με άλλο μόριο κ.ο.κ., με αποτέλεσμα η αντίδραση να συνεχίζεται από μόνη της μέχρι να σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον ελεύθερες ρίζες.

Έναρξη $\rightarrow$ $R^{\cdot}$ (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση $R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ (ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow R' + ROOH$

$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R - R$ (Αδρανές προϊόν)

Τερματισμός $ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow ROOR$ (Αδρανές προϊόν)

$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$

Όπως φαίνεται από το σχήμα η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στον σχηματισμό των πρώτων ελευθέρων ριζών δηλαδή ομάδων με μονήρες ηλεκτρόνιο. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοξείδωσης είναι τα υδροϋπεροξείδια. Αυτά στην συνέχεια δίνουν νέες ρίζες

υπεροξειδίων, άλλα υδροϋπεροξείδια και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με την σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτερο ρυθμό (Frankel, 1998, Gordon et al.,1990, Barclay et al., 1981).

Τα υδρογόνα α- ως προς τον διπλό δεσμό είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονικής κατανομής στο δεσμό αυτό. Έτσι στο στάδιο της διάδοσης τα υδρογόνα αυτά εύκολα απομακρύνονται και σχηματίζονται δευτερογενή υδροϋπεροξείδια στο άτομο άνθρακα α- ως προς το διπλό δεσμό.

Από τα υπεροξείδια ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων όπως μη πτητικές αλδεΰδες, οξειδωμένες τριακυλογλυκερόλες και τα πολυμερή τους, αλδεΰδες, αλκοόλες και πτητικές κετόνες (Laguerre et al., 2007). Από τα παραπάνω, τα οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και οι αλδεΰδες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής.

Μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης

Τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την οξείδωση με δύο διαφορετικούς τρόπους: Με την προστασία των λιπιδίων κατά την φάση της έναρξης της οξείδωσης ή διακόπτοντας τη φάση διάδοσης. Στην πρώτη περίπτωση, τα λεγόμενα προληπτικά αντιοξειδωτικά εμποδίζουν τον σχηματισμό των ROS ή δεσμεύουν είδη που είναι υπεύθυνα για την έναρξη της οξείδωσης ($O_2^{\cdot}$, $^1O_2$, κ.λπ.). Στη δεύτερη περίπτωση, τα λεγόμενα «breaking chain» αντιοξειδωτικά είτε παρεμποδίζουν τις ρίζες υπεροξειδίου ($ROO^{\cdot}$) είτε παρεμβαίνουν έμμεσα στην αλυσιδωτή αντίδραση των ριζών. Παρακάτω θα μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών αλλά θα πρέπει να γνωρίζουμε πως τα αντιοξειδωτικά δρουν μέσω μικτών μηχανισμών που συνδυάζουν διάφορους τύπους.

Αντιοξειδωτικά που προλαμβάνουν τις οξειδώσεις

Υπάρχουν πάρα πολλοί «προστατευτικοί» τρόποι κατά των οξειδώσεων, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας των διαθέσιμων ενώσεων που συμβάλλουν στην έναρξη των οξειδώσεων. Η προστασία κατά της οξείδωσης μπορεί να περιλαμβάνει χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα μεταπτώσεως (Transient metal chelators), απενεργοποίηση του οξυγόνου της απλής διεγερμένης κατάστασης, ενζυμική εξουδετέρωση των ROS, αναστολή των προοξειδωτικών ενζύμων κ.α. Οι πιο γνωστοί τρόποι παρουσιάζονται παρακάτω.

Χηλικές ενώσεις μετάλλων

Ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων μετάλλων, όπως του χαλκού και του σιδήρου, μπορεί να αναστείλει την οξείδωση δημιουργώντας σύμπλοκα μόρια με τα μέταλλα και με πρωτεΐνες. Η έκταση αυτού του τύπου αντιοξειδωτικών φαίνεται, ωστόσο, να εξαρτάται άμεσα από τις ουσίες-στόχους που πρόκειται να προστατευτούν.

Αντιοξειδωτικά που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών

Στη κατηγορία αυτή, η βιταμίνη C και οι πολυφαινόλες έχουν αρκετά υψηλά ποσοστά αντιοξειδωτικής δράσης (Belyakov et al., 1995). Υπάρχουν μάλιστα έρευνες που αποδεικνύουν συνεργιστική δράση μεταξύ βιταμίνης C και α-τοκοφερόλης (Tappel et al., 1968).

Αποδιεγέρτες του οξυγόνου απλής κατάστασης (Singlet Oxygen)

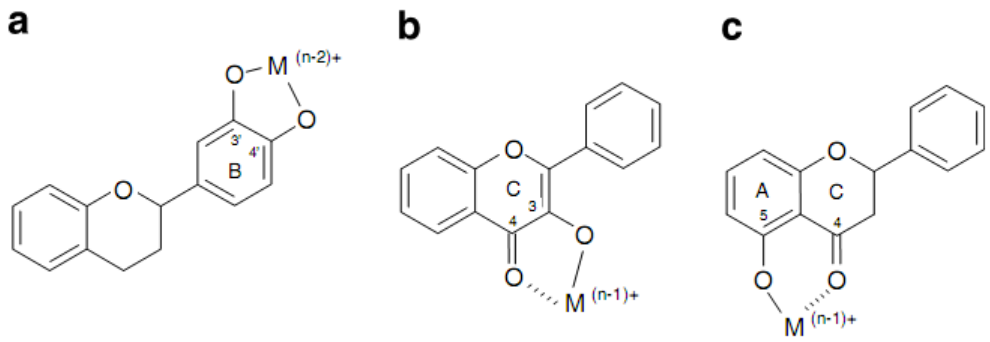
Απ' όσα γνωρίζουμε μέχρι στιγμής, τα καροτενοειδή είναι τα πιο δραστικά μόρια ως προς την ικανότητα αποδιέγερσης του $^1O_2$. Υπάρχουν περίπου 600 φυσικά καροτενοειδή, τα περισσότερα εκ των οποίων αποτελούνται από 40 άτομα άνθρακα. Μπορούν να είναι υδρογονάνθρακες, όπως το λυκοπένιο, β-καροτένιο, κλπ., ή να περιλαμβάνουν οξυγονωμένη λειτουργική ομάδα, όπως οι ξανθοφύλλες (ασταξανθίνη, λουτεΐνη, κ.λπ.) (Krinsky et al;., 1998). Τα καροτενοειδή, όπως και πολλά αντιοξειδωτικά, έχουν αντιοξειδωτική δράση, μέσω διαφόρων μηχανισμών οι οποίοι όμως είναι σε μεγάλο βαθμό αλληλένδετοι μεταξύ τους, π.χ. αντιοξειδωτικά που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και αποδιεγέρτες του $^1O_2$. Ο τελευταίος αυτός μηχανισμός δράσης γίνεται μέσω της απενεργοποίησης του $^1O_2$ σε $^3O_2$.

$$^1O_2 + \beta\text{-καροτένιο} \rightarrow {}^3O_2 + \beta\text{-καροτένιο}^*$$

Μέσα από το συζευγμένο σύστημα των μορίων αυτών, η πλεονάζουσα ενέργεια που δημιουργείται στην διεγερμένη μορφή (β-καροτένιο*) απορροφάται μέσω αλληλεπιδράσεων δόνησης και περιστροφής με τον διαλύτη ή το περιβάλλον (Krinsky et al., 1998).

$$\beta\text{-καροτένιο}^* \rightarrow \beta\text{-καροτένιο} + \text{θερμότητα}$$

Το β-καροτένιο που έχει δημιουργηθεί μπορεί να αρχίσει μια νέα αποδιέγερση $^1O_2$, μέσω αυτής της ενέργειας (θερμότητα) μέσω του μηχανισμού της διάχυσης και έτσι γίνεται ένας μη-στοιχειομετρικός αποδιεγέρτης. Εκτιμάται ότι κάθε μόριο καροτενοειδούς θα μπορούσε να αποσβέσει περίπου 1000 μόρια $^1O_2$.



Σχήμα 22 : Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με φλαβονοειδή μέσω 3΄-4΄ο-διφαινολικής ομάδα σε Β δακτύλιο (a) και κετολ- δομές 4-κετο,3-υδροξυ σε C δακτύλιο (b) ή 4-κετο, 5-υδρόξυ στον C και A δακτύλιο (c). (Laguerre και συν., 2007).

Εκτός από τα καροτενοειδή υπάρχουν και άλλοι αποδιεγέρτες του $^1O_2$, όπως οι τοκοφερόλες και οι θειόλες. Ο Di Mascio και οι συνεργάτες του, (1990), διαπίστωσαν πως ορισμένα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να αδρανοποιούν την πρωτογενή μορφή του $^1O_2$ με θερμοδιάσπαση του ενδοπεροξειδίου του 3,3'-(1,4-ναφθυλιδενο)-διπροπιονίνη. Η δραστικότητά τους παρουσιάζεται με φθίνουσα σειρά ως εξής: λυκοπένιο > β-καροτένιο > ζεαξανθίνη > λουτεΐνη > χολερυθρίνη > τοκοφερόλες > θειόλες. Ωστόσο, οι ερευνητές επισημαίνουν ότι οι λιγότερο ενεργοί αναστολείς παρουσιάζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε βιολογικούς ιστούς. Συνεπώς οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή συμβάλλουν εξίσου στην προστασία των ιστών από τις καταστροφικές επιπτώσεις του $^1O_2$, αφού η *in vivo* δράση των τοκοφερολών υπολογίζεται ότι είναι περίπου 30 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του β-καροτενίου.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η παραλαβή, η μελέτη χρήσιμων συστατικών από τρείς ελληνικές οινοποιήσιμες ποικιλίες (Σαββατιανό, Αγιωργίτικο, Μοσχοφίλερο) με διαφορετικό τερπενικό υπόβαθρο και πως αυτό επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση, προκειμένου να μειωθεί ο μεγάλος όγκος των υποπροϊόντων της διαδικασίας οινοποίησης.

Οι στόχοι της είναι:

1. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης υποπροϊόντων οινοποιίας σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία αιθανόλης : νερού στο εκχυλιστικό μέσο και το pH του διαλύματος, έτσι ώστε να ληφθούν εκχυλίσματα με το υψηλότερο φαινολικό δυναμικό. Τα εκχυλίσματα αυτά αξιολογούνται με προσδιορισμό ολικών πολυφαινολών, ολικών φλαβανολών, ολικών φλαβονών, και προανθοκυανιδινών, ενώ μετράται και η αντιοξειδωτική τους δράση με 2 διαφορετικές δοκιμές, και λαμβάνει χώρα ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός πολυφαινολικών συστατικών με HPLC και LC/MS.

2. Η μελέτη της πιθανής συνέργειας ή ανταγωνισμού μεταξύ των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα και αυτών που συναντώνται ως πρόσθετα στα τρόφιμα, όπως ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη. Η μελέτη περιλαμβάνει την προσθήκη διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων των βέλτιστων εκχυλισμάτων μαζί με μικρές ποσότητες ισχυρών αντιοξειδωτικών σε αιωρήματα λεκιθίνης και την εν συνεχεία μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους στο τελικό μίγμα, ώστε να παρατηρηθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις τους.

3. Η γίνεται εφαρμογή των αντιοξειδωτικών που έχουν απομονωθεί από τα υποπροϊόντα οινοποιίας σε πρότυπη λιπαρή ύλη (λιποσώματα λεκιθίνης) και μελέτη της δράσης τους (προοξειδωτική ή αντιοξειδωτική). Για το σκοπό αυτό μετρώνται και αξιολογούνται οι δείκτες οξείδωσης των λιπών ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο δράσης τους.

Μέρος Β΄: Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 5^{ο}

Βελτιστοποίηση εκχύλισης και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων

Υλικά και Μέθοδοι

Παραλαβή και προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών

Παραλαβή δείγματος

Οι ποικιλίες σταφυλιών, των οποίων τα γίγαρτα και οι βόστρυχες χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, αποτελούν χαρακτηριστικές ποικιλίες της ελληνικής αμπελουργίας και επελέγησαν βάσει της συχνότητας που συναντώνται στις αμπελουργικές περιοχές της χώρας μας. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκαν να εξετασθούν: μία λευκή (Σαββατιανό), μια κόκκινη (Αγιωργίτικο) και μία «γκρίζα» (Μοσχοφίλερο -κόκκινη ποικιλία που παράγει λευκό κρασί).

Αναλυτική πορεία

Η συλλογή της πρώτης ύλης έγινε από οινοποιείο που βρίσκεται στη περιοχή της Νεμέας. Από το οινοποιείο συλλέχθηκαν στέμφυλα (γίγαρτα – φλοιοί) αμέσως μετά τον διαχωρισμό τους από το γλεύκος -για την λευκή και την «γκρίζα» ποικιλία- ενώ για την ερυθρή η παραλαβή έγινε μετά την ολοκλήρωση της οινοποίησης. Πριν τη λυοφιλίωση και μέχρι τον διαχωρισμό των γιγάρτων από τα στέμφυλα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20^{o}C μαζί με τους βόστρυχες. Η διαδικασία λυοφιλίωσης περιγράφεται στη συνέχεια.

Λυοφιλίωση

Η μέθοδος της ξήρανσης των τροφίμων με λυοφιλίωση, συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν την εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να παραχθεί το αφυδατωμένο προϊόν. Η μέθοδος της λυοφιλίωσης πλεονεκτεί των υπολοίπων μεθόδων αφυδάτωσης καθώς δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου και επιπλέον διατηρεί τα πτητικά αρωματικά συστατικά του, συντηρεί καλύτερα τα χαρακτηριστικά της δομής και εμφάνισης καθώς η συρρίκνωση είναι αμελητέα, τα δείγματα δεν

αφρίζουν, δεν σκληραίνουν, δεν οξειδώνονται και δεν υφίστανται καμία μεταβολή στην μικροχλωρίδα τους κατά την επεξεργασία αυτή. Μέσω αυτής της επεξεργασίας επιτυγχάνουμε την μέγιστη απόκτηση φαινολικών συστατικών που περιέχονται στους υπό εξέταση ιστούς.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,000 g)
Λυοφιλοποιητής
Δοχεία λυοφιλίωσης

Αναλυτική πορεία

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος μέσα σε ειδικά προζυγισμένες φιάλες λυοφιλιωτή. Οι φιάλες τοποθετούνται για 24 h στους –40 ^{o}C και στη συνέχεια στους δίσκους του λυοφιλιωτή και σε θερμοκρασία -40 ^{o}C για 24 ώρες. Απομακρύνεται το νερό και στην συνέχεια επανατοποθετείται παγωμένο το δείγμα για ένα ακόμα εικοσιτετράωρο ώστε να απομακρυνθεί όσον το δυνατόν περισσότερη υγρασία. Μετά την πάροδο 72 h η φιάλη του λυοφιλιωτή, που περιέχει το δείγμα, ζυγίζεται ξανά για να βρεθεί η υγρασία του δείγματος. Ακολουθεί η κονιορτοποίηση του δείγματος, με blender οικιακής χρήσης, και η αποθήκευσή του στους -40 ^{o}C σε ειδικά δοχεία.

Παραλαβή φαινολικών συστατικών

Αντιδραστήρια - Όργανα

Λυοφιλιωμένα δείγματα
Αιθανόλη υψηλής καθαρότητας
Δισαπεσταγμένο H_2O
Εξάνιο
Διχλωρομεθάνιο
Υδροχλωρικό οξύ
Καυστικό νάτριο
Κιτρικό οξύ

Κιτρικό νάτριο

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS) ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αναδευτήρας VORTEX

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (HermLe 2320)

Ογκομετρικοί σωλήνες όγκου 10 mL, ογκομετρικές φιάλες των 250 mL, κωνικές φιάλες 250 mL, ποτήρια ζέσεως 100 mL, γυάλινο χωνί

Διηθητικός ηθμός

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική εκχυλισιμότητα των ουσιών σε υδραλκοολικά διαλύματα, διαφορετικής συγκέντρωσης, σε συνάρτηση με το pH και τον χρόνο εκχύλισης (Cacace & Mazza, 2003, Durling et al., 2007, Fiori, 2010, Japon-Lujan et al., 2006, Ju & Howard, 2005, Luque-Rodriguez et al., 2006, Mylonaki et al., 2008).

Αναλυτική πορεία

Εντός κωνικής φιάλης ζυγίζονται από το δείγμα των λυοφιλιωμένων γιγάρτων 20 g περίπου. Στο δείγμα προστίθενται 100 mL εξανίου (και γίνεται ανάδευση για 1 h) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπαρών υλών (το γιγαρτέλαιο περιέχει μεγάλη ποσότητα λινελαϊκού οξέος και γενικά είναι πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα). Οι εκχυλίσεις επαναλαμβάνονται 3 φορές και γίνεται παραλαβή του στερεού υπολείμματος. Στην συνέχεια, ζυγίζεται από το δείγμα λυοφιλιωμένων γιγάρτων, ποσότητα ίση με 0,5 g. Στο δείγμα προστίθενται 10 mL διαλύτη αιθανόλη/νερό ανάλογου pH (ρυθμισμένο με την χρήση κιτρικού οξέος και καυστικού νατρίου) και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα για τον αντίστοιχο χρόνο (από 1 h έως 3 h) απουσία φωτός. Στη συνέχεια διηθείται, με την βοήθεια ηθμού, και παραλαμβάνεται η υδραλκοολική φάση σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα. Τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα από κάθε εκχύλιση συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκαν στους -40 ^{o}C.

Με τον ίδιο τρόπο έγιναν και οι εκχυλίσεις για τα δείγματα βοστρύχων, με τη διαφορά ότι πριν από τις εκχυλίσεις με τα υδραλκοολικά διαλύματα, αντί για εξάνιο έγιναν εκπλύσεις με διχλωρομεθάνιο, προκειμένου να απομακρυνθεί η χλωροφύλλη που περιέχεται στα δείγματα. Η υπόλοιπη διαδικασία επαναλαμβάνεται όπως στα δείγματα των γιγάρτων και τα υδραλκοολικά εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -40 ^{o}C μέχρι την ανάλυσή τους.

Το πλήθος των εκχυλίσεων και ο συνδυασμός των μεταβλητών προσδιορίσθηκαν με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος JMP 5.1 (Advanced Data Analysis and Visualization for Statistical Discovery) με σκοπό την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής παραλαβής συστατικών, μεταβάλλοντας το ποσοστό αλκοόλης, το pH των διαλυμάτων και τον χρόνο εκχύλισης.

Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων

Χρησιμοποιήθηκε ένας 2^3 πλήρης παραγοντικός (full-factorial) πειραματικός σχεδιασμός για τον προσδιορισμό των σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών της διαδικασίας της εκχύλισης και της σύστασης των εκχυλισμάτων, με σκοπό τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης. Ως βασικοί παράγοντες αξιολόγησης της εκχύλισης, ορίστηκαν για την μελέτη αυτή τέσσερις δείκτες που αφορούν την σύσταση των εκχυλισμάτων: ολικές πολυφαινόλες (TP), ολικές φλαβανόλες (TFl), ολικές φλαβόνες (TFn) και προανθοκυανιδίνες (PC). Οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές ή παράγοντες της εκχύλισης που μελετήθηκαν είναι το ποσοστό αιθανόλης [X_1, που κυμάνθηκε μεταξύ 40 και 60% (v / v)], το pH (X_2, που κυμάνθηκε μεταξύ 2 και 6) και ο χρόνος εκχύλισης (X_3, που κυμάνθηκε μεταξύ 1 και 5 ωρών). Κάθε μεταβλητή κωδικοποιήθηκε σε τρία επίπεδα, -1, 0 και 1 (Πίνακας 5).

Πίνακας 4 : Κωδικοποίηση και πειραματικές τιμές για τις ανεξάρτητες μεταβλητές που μελετήθηκαν για τον 2^3 πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό.

Ανεξάρτητες Μεταβλητές	**Κωδικοί Μεταβλητών**	**Επίπεδα κωδικοποιημένων μεταβλητών**		
		-1	**0**	**1**
Ποσοστό αιθανόλης (%)	X_1	40	50	60
pH (ή θερμοκρασία)	X_2	2	4	6
Χρόνος (h)	X_3	1	3	5

Οι 3 ανεξάρτητες μεταβλητές κωδικοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρακάτω εξίσωση:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, \quad x_i = 1, 2, 3$$

όπου x_i και X_i η προσληφθείσα και η πειραματική τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής i, X_0 η πραγματική αξία της ανεξάρτητης μεταβλητής i στο κεντρικό σημείο και ΔXi, το σημείο αλλαγής που αντιστοιχεί σε διακύμανση του θεωρητικού μεγέθους.

Τα δεδομένα, από τον κεντρικό σχεδιασμό του πειράματος, υποβάλλονται σε ανάλυση βασιζόμενα στον συντελεστή συσχέτισης (R^2) για την απόκτηση των παραμέτρων σε μαθηματικά μοντέλα. Το Student's *t*-test επιτρέπει τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των συντελεστών συσχέτισης που θα προκύψουν από το μοντέλο. Επιπρόσθετα εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των τιμών που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα. Οι αποκρίσεις σε «επιφάνειες» (Response surface plots) παρελήφθησαν χρησιμοποιώντας διαμορφωμένα μοντέλα, στα οποία φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ τους.

Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (TF)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC)

Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3, 20% w/v)

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αυτόματες πιπέτες (100-1000 μL) και (10-100 μL)

Tips

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL

Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

Διάλυμα Γαλλικού οξέος μητρικό: Ζυγίζονται 1mg GA και διαλύονται σε 1 mL μεθανόλης

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arnous et al., (2002). Σε σωλήνες Eppendorf των 1,5 mL προστίθεται

απιονισμένο νερό όγκου 0,79 mL κι έπειτα 0,01 mL διαλύματος πολυφαινολών (g/L) που έχουν παραληφθεί όπως περιγράφεται προηγουμένως. Στην συνέχεια προστίθεται 0,05 mL αντιδραστήριο FC στο μίγμα. Κατόπιν ανάδευσης και μετά την πάροδο 1 min, προστίθενται 0,15 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3. Το μίγμα ανακινείται ξανά και φυλάσσεται σε σκοτάδι για 120 min. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750 nm ως προς δείγμα ελέγχου, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γαλλικό οξύ (GA). Δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αντικαθιστώντας το δείγμα με νερό.

Προσδιορισμός των ολικών φλαβανολών (TFl)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αντιδραστήριο 4-Dimethylamino-cinnamaldehyde (DMACA, 0,2% σε μεθανόλη)
Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl, 0,24 N σε μεθανόλη)
Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης
Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)
Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)
Tips
Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
Κατεχίνη (Catechin, CT)
Διάλυμα κατεχίνης μητρικό 32 mg/Lσε μεθανόλη

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός του συνολικού περιεχομένου σε φλαβανόλες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Nigel & Glories, (1991). Σε Eppendorf σωλήνα των 1,5 mL προστίθενται 0,2 mL εκχυλίσματος κατάλληλα διαλυμένου σε μεθανόλη. Στην συνέχεια προστίθενται 0,5 mL HCl, (0,24 N σε μεθανόλη) και 0,5 mL DMACA (0,2 % σε μεθανόλη). Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 640 nm ως προς δείγμα ελέγχου, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με κατεχίνη (CTE). Δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αντικαθιστώντας το δείγμα με μεθανόλη και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμου κατεχίνης (CTE) ανά 100 gr φρέσκου ιστού.

Προσδιορισμός ολικών φλαβονών (TFn)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα χλωριούχου αργιλίου (2% $AlCl_3$ σε 5% οξικού οξέος σε μεθανόλη)

Διάλυμα οξικού οξέος (5% σε μεθανόλη)

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)

Αυτόματη πιπέτα (10-100 μL)

Tips

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 250 mL

Ρουτίνη (Rutin, Rut.)

Διάλυμα ρουτίνης μητρικό 100 mg/L σε μεθανόλη

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός του συνολικού περιεχομένου σε φλαβόνες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Cvek et al., (2007). Σε Eppendorf σωλήνα των 1,5 mL προστίθενται 0,05 mL διαλύματος χλωριούχου αργιλίου (2% $AlCl_3$ σε 5% οξικού οξέος σε μεθανόλη) και 0,5 mL εκχυλίσματος. Στην συνέχεια προστίθενται 0,5 mL διαλύματος οξικού οξέος (5% σε μεθανόλη) και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 415 nm ως προς δείγμα ελέγχου, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με ρουτίνη (Rut.E.). Δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αντικαθιστώντας το δείγμα με μεθανόλη και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμου ρουτίνης (Rut.E) ανά 100 gr ξηρού βάρους.

Προσδιορισμός Προανθοκυανιδινών (PC)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα βουτανόλης (70 mg $FeSO_4$, 5 ml HCl 11,5 M σε n-butanol ώστε $V_{τελ}$=100 ml)

Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (HCl 11,5 M)

Κανονική βουτανόλη (n-butanol)

Θειικός σίδηρος ($FeSO_4$)

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Υδατόλουτρο

Eppendorf σωλήνες (2 mL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)

Αυτόματη πιπέτα (10-100 μL)

Tips

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός των προανθοκυανιδινών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Makris et al., (2008). Σε Eppendorf σωλήνα των 2 mL προστίθενται 0,05 mL εκχυλίσματος και 0,7 mL διαλύματος βουτανόλης(70 mg $FeSO_4$, 5 ml HCl 11,5 M σε βουτανόλη ώστε $V_{τελ}$=100 ml). Στην συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 95 ^{0}C για 45 min. Κατόπιν προστίθενται 0,25 mL κανονικής βουτανόλης και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 550 nm ως προς δείγμα ελέγχου. Δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αντικαθιστώντας το δείγμα με κανονική βουτανόλη και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα κυανιδίνης (Cy.E) ανά 100 gr ξηρού βάρους σύμφωνα με τον τύπο του Beer-Lambert :

$$A=\varepsilon \times c \times l$$

$$C = A/\varepsilon \times l$$

Όπου: A= απορρόφηση

ε = 26.900

MW = 449,2 για την κυανιδίνη

L = 1×cm

Προσδιορισμός πολυφαινολών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος 0,05 % (TFA)

Διάλυμα ακετονιτριλίου (MeCN σε 0,05 % TFA)

Υγρός χρωματογράφος με αυτόματο δειγματολήπτη: HP- 1090 series II

Ανιχνευτές: σειράς φωτοδιόδων λυχνιών φθορισμού (HP-1090) ρυθμιζόμενη και βαθμονομούμενη με το λογισμικό ChemStation της Agilent.

Χρωματογραφική στήλη: Phenomenex Synergi Hydro RP18,4 μm, 250×4,6×mm

Ροή: 1 mL/min

Αναλυτική πορεία

Για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών, τόσο στα εκχυλίσματα των βοστρύχων όσο και στα εκχυλίσματα των γιγάρτων, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα 2 διαλυτών, αποτελούμενο από 0,05% υδατικό διάλυμα TFA (διάλυμα Α) και MeCN σε 0,05 % TFA (διάλυμα Β) με βαθμιδωτή έκλουση. Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης είχε ως εξής: 5 min 5 % διαλύτης Β και στην συνέχεια για 65 min 50% διαλύτης Β. Η ανίχνευση έγινε στα ακόλουθα μήκη κύματος: 275, 290, 320 και 369 nm.

Προσδιορισμός πολυφαινολών με Υγρή Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μάζας (LC/MS)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα οξικού οξέος 2,5 % (διαλύτης Α)

Μεθανόλη (διαλύτης Β)

Υγρός χρωματογράφος με αυτόματο δειγματολήπτη:Finnigan MAT Spectra System P4000

Ανιχνευτές: σειράς φωτοδιόδων λυχνιών UV6000LP και φασματογράφος μάζας τύπου Finnigan AQA.

Χρωματογραφική στήλη: Superspher RP-18, 125×2 mm, 4 μm (Macherey-Nagel, Germany)

Αναλυτική πορεία

Με την μέθοδο αυτή μελετήθηκαν μόνο τα βέλτιστα εκχυλίσματα των βοστρύχων και των γιγάρτων, δηλαδή αυτά που παρουσίασαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στα φωτομετρικά τεστ. Οι αναλύσεις έγιναν με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization ESI), οι συνθήκες του οποίου είχαν ως εξής:

1. Θετικός ιονισμός
2. Δυναμικό τριχοειδούς 3,5 kV
3. Θερμοκρασία 400°C
4. Δυναμικό φακών ιόντων 650 V
5. Ροή 0,33 mL/min

Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης είχε ως εξής: 0-5 min 0% διαλύτης Β, στην συνέχεια για χρόνο 5-30 min 100% διαλύτης Β και τέλος 100% διαλύτης Β.

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR})

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (100 μM σε μεθανόλη)
Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης
Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000g)
Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)
Αυτόματη πιπέτα (10-100 μL)
Tips
Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
Trolox (ισοδύναμο βιταμίνης Ε)
Διάλυμα Trolox μητρικό 1,6 mM σε μεθανόλη

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arnous et al., (2002). Σε Eppendorf σωλήνα των 1,5 mL προστίθενται 0,025 mL δείγματος ανάλογα διαλυμένου και 0,975 mL διαλύματος DPPH (100 μM σε μεθανόλη) και αναμειγνύονται. Η απορρόφηση μετράται στην αρχή και μετά από 30 min στα 515 nm ως προς δείγμα ελέγχου. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται καθαρή μεθανόλη και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα mM Trolox ανά 100 gr ξηρού βάρους.

Μέτρηση της αναγωγικής δύναμης με την μέθοδο FRAP (P_R)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα χλωριούχου σιδήρου ($FeCl_3$) (3 mM σε 5 mM HCl)
Διάλυμα 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine TPTZ (1 mM σε 0,05M HCl)
Πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl
Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
Απεσταγμένο νερό
Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης
Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)
Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)
Αυτόματη πιπέτα (10-100 μL)
Tips
Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
Ασκορβικό οξύ (Ascorbic Acid)
Διάλυμα ασκορβικού οξέος μητρικό 0,5 mM σε νερό

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης με την μέθοδο FRAP πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Makris et al., (2007). Σε σωλήνα Eppendorf των 1,5 mL προστίθενται 0,05 mL δείγματος ανάλογα διαλυμένο και 0,05 mL διαλύματος $FeCl_3$ (3 mM σε 5 mM HCl). Επωάζονται σε υδατόλουτρο για 30 min στους 37^0C. Στην συνέχεια προστίθενται 0,9 mL διαλύματος TPTZ (1 mM σε 0,05 M HCl) και αναδεύονται. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 620 nm ως προς δείγμα ελέγχου, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με ασκορβικό οξύ. Δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αντικαθιστώντας το διαλύματος $FeCl_3$ (3 mM σε 5 mM HCl) με απεσταγμένο νερό και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα mM ασκορβικού οξέος ανά 100 gr ξηρού βάρους.

Επίδραση των εκχυλισμάτων σε πρότυπη λιπαρή ύλη

Παρασκευή λιποσωμάτων

Δημιουργία λιποσωμάτων λεκιθίνης (πρότυπη λιπαρή ύλη)

Διάλυμα λιποσώματος (0,5%w/v). Για την Παρασκευή των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Afanas'ev et al., (1989), όπως τροποποιήθηκε από τους Makris & Rossiter (2001). 500 mg λεκιθίνης διαλύονται σε 10 mL χλωροφορμίου. Ο διαλύτης εξατμίζεται παρουσία αζώτου και στη συνέχεια προστίθενται 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος με pH 2, 4, 6, 8 αντιστοίχως. Τα μείγματα διαλύονται καλά με την βοήθεια υπερήχων για 1 min και το εναιώρημα χρησιμοποιείται ως μητρικό διάλυμα λιποσώματος.

Διαδικασία

Σε 9,5 ml λιποσώματος προστίθενται 0,5 ml διαλύματος αντιοξειδωτικού έτσι ώστε να σχηματιστούν διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 25, 50, 100 και 200 μg/ml. Το μείγμα αναδεύεται και διανέμεται σε 7 σωλήνες Eppendorf και επωάζονται απουσία φωτός σε υδατόλουτρο στους 45 ^{0}C επί επτά (7) ημέρες. Θετικά δείγματα ελέγχου δημιουργούνται με BHT (Butylated hydroxytoluene) και κερκετίνη ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται ταυτόχρονα δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί αντιοξειδωτική ουσία. Κάθε μέρα γίνεται δειγματοληψία ενός σωλήνα Eppendorf και μέτρηση συζυγών διενίων.

Προσδιορισμός συζυγών διενίων (Conjugated Dienes) (CD)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Ισοοκτάνιο

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Eppendorf σωλήνες (1,5 mL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)

Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μL)

Αυτόματη πιπέτα (10-100 μL)

Tips

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός των συζυγών διενίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Wrolstad, (2005). Σε σωλήνα Eppendorf των 1,5 mL προστίθενται 10 μl δείγματος και 1000 μl διαλύτη (ισοοκτάνιο). Αναμειγνύονται καλά και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 233 nm ως προς δείγμα ελέγχου. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται ο καθαρός διαλύτης. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$[CD] = A_{233} / \varepsilon \times l$$

$$\text{CD value} = [CD] \times (0.1 \times 10^4) / W \quad \textbf{(1)}$$

Όπου : [CD] η συγκέντρωση συζυγών διενίων σε M

A_{233} η μοριακή απορροφητικότητα του λιπιδικού διαλύματος στα 233 nm

ε η μοριακή απορρόφηση του υδροϋπεροξειδίου του λινελαϊκού οξέος ($2,525 \times M^{-1} cm^{-1}$)

l το μήκος της κυψελίδας σε cm (1 cm)

0.1×10^4 συντελεστής που περιλαμβάνει τον όγκο του διαλύτη (0,1 ml)

W το βάρος του δείγματος σε γραμμάρια.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκχυλισμάτων και πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών

Δημιουργία μιγμάτων: Εκχυλίσματα- Πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες

Προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των φαινολών, που περιέχονται στα βέλτιστα εκχυλίσματα, με πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες, παρασκευάσθηκαν διαλύματα ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν καθορίστηκαν από έναν 3×3 πειραματικό σχεδιασμό (factorial design) για τον προσδιορισμό της σχέσης που υπάρχει μεταξύ των λειτουργιών ανταπόκρισης και τις μεταβλητές της διαδικασίας. Ως βασικός παράγοντας για τη μελέτη αυτή ορίστηκε ένας από τους πιο χαρακτηριστικούς δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, η μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR}). Οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές που

χρησιμοποιήθηκαν είναι οι συγκεντρώσεις των βέλτιστων εκχυλισμάτων [X_1, οι τιμές κυμαίνονται: 5, 55 και 105 mg/L] και οι συγκεντρώσεις των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών [X_2, οι τιμές που λαμβάνουν είναι 5, 55 και 105 mg/L] (Πίνακας 7). Διαλύτης των εκχυλισμάτων ήταν διάλυμα αιθανόλης/νερού (1/1) ενώ για τις πρότυπες ουσίες χρησιμοποιήθηκε καθαρή αιθανόλη.

Πίνακας 5 : Κωδικοποίηση και πειραματικές τιμές για τις ανεξάρτητες μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον 3×3 πειραματικό σχεδιασμό.

Ανεξάρτητες Μεταβλητές	**Κωδικοί Μεταβλητών**	**Επίπεδα κωδικοποιημένων μεταβλητών**		
		-1	**0**	**1**
Μίγμα Εκχυλίσματος/Ασκορβικού οξέος				
[TP] / mg L^{-1}	X_1	5	55	105
[AA] / mg L^{-1}	X_2	5	55	105

Ανεξάρτητες Μεταβλητές	**Κωδικοί Μεταβλητών**	**Επίπεδα κωδικοποιημένων μεταβλητών**		
		-1	**0**	**1**
Μίγμα Εκχυλίσματος/α-Τοκοφερόλης				
[TP] / mg L^{-1}	X_1	5	55	105
[α-Tcp] / mg L^{-1}	X_2	5	55	105

[AA]: συγκέντρωση ασκορβικού οξέος σε mg L^{-1}, [α-Tcp]: συγκέντρωση α-τοκοφερόλης σε mg L^{-1}, [TP]: συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών των εκχυλισμάτων των βοστρύχων σε mg L^{-1}

Οι 2 ανεξάρτητες μεταβλητές κωδικοποιήθηκαν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, \quad x_i = 1, 2, 3 \qquad (2)$$

όπου x_i και X_i το αδιάστατο και η πραγματική τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής i, X_0 η πραγματική τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής i στο κεντρικό σημείο και ΔXi, το σημείο αλλαγής που αντιστοιχεί σε διακύμανση του αδιάστατου μεγέθους.

Τα δεδομένα, από τον κεντρικό σχεδιασμό του πειράματος, υποβάλλονται σε ανάλυση χρησιμοποιώντας τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) για την απόκτηση μαθηματικών μοντέλων που συνδυάζουν τις διαφορετικές παραμέτρους. Το Student's *t*-test επιτρέπει τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των συντελεστών προσδιορισμού που προκύπτουν από το μοντέλο. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας του υποδείγματος.

Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (A_{AR})

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω (σελ. 83).

Προσδιορισμός Αλληλεπιδράσεων (Mixture Effect, ME)

Σύμφωνα με τους Peyrat-Maillard, et al., (2003), ως αλληλεπίδραση δύο αντιοξειδωτικών (ΜΕ) μπορεί να οριστεί η πειραματική τιμή, διαιρούμενη από την θεωρητικά υπολογίσιμη τιμή, η οποία ορίζεται ως το άθροισμα των επιδράσεων των αντιοξειδωτικών του καθενός ξεχωριστά. Εάν η αναλογία αυτή είναι μεγαλύτερη από την μονάδα (>1), τότε λέγετε πως παρατηρείται συνέργεια. Στην περίπτωση που η αναλογία αυτή είναι μικρότερη από την μονάδα (<1), τότε θεωρείται ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των αντιοξειδωτικών ουσιών. Στην περίπτωση της δοκιμής DPPH αυτή η σχέση μπορεί να εκφραστεί μαθηματικά ως ακολούθως:

$$ME = \frac{\%\Delta A_{515}^{AA+PA}}{\%\Delta A_{515}^{AA} + \%\Delta A_{515}^{PA}} \quad \textbf{(3)}$$

Όπου ΑΟ: αντιοξειδωτική ουσία (ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη)

%ΔΑ : ποσοστό μείωση δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας και

Extr: το εκχύλισμα των βοστρύχων

Στατιστική επεξεργασία

Εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης

Για τις καθαρές αντιοξειδωτικές ουσίες και τα εκχυλίσματα των βοστρύχων ξεχωριστά η μεταβολή ($\%\Delta A_{515}$) μετράται συναρτήσει της συγκέντρωσης των διαλυμάτων και δίνεται η γραμμική συνάρτηση καθώς επίσης και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2). Για τα μίγματα αντιοξειδωτικά/εκχυλίσματα γίνεται συσχέτιση με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των διαλυμάτων

Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν και δίνονται οι τιμές των μέσων όρων μαζί με την τυπική απόκλιση (±SD). Η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης έγινε σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Για τις στατιστικές επεξεργασίες χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα JMP™ 8 (Advanced Data Analysis and Visualization for Statistical Discovery) και SigmaPlot™ 11.

Μέρος Γ΄: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κεφάλαιο 6^{ο}

Βελτιστοποίηση εκχύλισής και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων

Βόστρυχες

Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Ο πειραματικός σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της επιρροής τριών παραγόντων: α) τη συγκέντρωση αιθανόλης, β) το pH και γ) το χρόνο εκχύλισης. Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές και τα κωδικοποιημένα επίπεδα των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών της διαδικασίας εκχύλισης, που χρησιμοποιούνται για το 2^3- πλήρη παραγοντικό πειραματικό σχεδιασμό που εφαρμόζεται.

Πίνακας 6 : Πειραματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα των χρησιμοποιούμενων ανεξάρτητων μεταβλητών για το 2^3 πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό.

Ανεξάρτητες μεταβλητές	**Κωδικοί**	**Κωδικοποιημένα επίπεδα μεταβλητών**		
		-1	**0**	**1**
Ποσοστό EtOh (%)	X_1	40	50	60
pH	X_2	2	4	6
Χρόνος (h)	X_3	1	3	5

Οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών της εξεταζόμενης διαδικασίας εκχύλισης (X_1, X_2 και X_3), οι τιμές των μετρήσεων και οι εκτιμώμενες τιμές για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιηθήκαν (TP, TFl, TFn και PC), δίνονται αναλυτικά στους **Πίνακες 7-10**.

Πίνακας 7 : Πειραματικές και Εκτιμώμενες τιμές ολικών πολυφαινολών (TP) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες Μεταβλητές**			**(TP, mg GAE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	12960	12807	6495	6436	9095	9504
2	-1	-1	1	10053	9649	5975	5962	10712	10400
3	-1	1	-1	9819	9742	6022	6113	8404	8225
4	-1	1	1	9883	9845	6667	6948	9408	9728
5	1	-1	-1	10659	10591	7140	6966	10035	9693
6	1	-1	1	9644	9615	7025	7042	10483	10640
7	1	1	-1	8529	8827	5640	5761	8932	9222
8	1	1	1	11065	11112	6979	7146	11207	10776
9	-1	0	0	8605	9278	7151	6852	8926	8688
10	1	0	0	9052	8804	7347	7216	8981	9307
11	0	-1	0	9258	9912	8565	8794	9270	9358
12	0	1	0	9357	9128	9344	8685	9567	8786
13	0	0	-1	12189	12565	5700	5721	10779	10601
14	0	0	1	11703	12128	6628	6177	11561	11826
15	0	0	0	10820	10317	6728	7588	9745	9755
16	0	0	0	10664	10317	6701	7588	9940	9755

Πίνακας 8 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβανολών (TFl) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες Μεταβλητές**			**(TFl, mg CTE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	3158	3139	2302	2303	3661	3712
2	-1	-1	1	2814	2927	2206	2248	3713	3646
3	-1	1	-1	2646	2709	1949	1903	3914	3902
4	-1	1	1	2566	2587	1959	1997	3280	3377
5	1	-1	-1	3318	3342	2863	2838	3646	3554
6	1	-1	1	3713	3696	2593	2652	3901	3918
7	1	1	-1	3149	3081	1957	1928	3564	3636
8	1	1	1	3460	3525	1880	1891	3588	3542
9	-1	0	0	3485	3308	1854	1820	4045	3976
10	1	0	0	3882	3878	2051	2034	3931	3980
11	0	-1	0	3531	3430	2395	2318	3933	4024
12	0	1	0	3210	3130	1711	1737	4042	3931
13	0	0	-1	3031	2988	1594	1693	3680	3660
14	0	0	1	3285	3104	1797	1647	3602	3579
15	0	0	0	3167	3397	1666	1702	3922	3957
16	0	0	0	3264	3397	1636	1702	3952	3957

Πίνακας 9 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβονών (TFn) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες μεταβλητές**			**(TFn, mg RtE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	332.9	305.8	155.1	136.8	399.5	420.1
2	-1	-1	1	374.4	385.9	197.9	214.4	382.9	380.1
3	-1	1	-1	455.8	441.6	326.4	329.7	569.1	537.4
4	-1	1	1	676.1	671.7	514.8	502.8	494.2	505.8
5	1	-1	-1	229.3	222.5	144.9	153.7	340.5	330.9
6	1	-1	1	247.5	250.5	159.0	152.5	409.9	443.6
7	1	1	-1	262.5	239.7	156.4	136.8	355.6	360.5
8	1	1	1	401.9	417.7	216.0	231.1	500.2	481.6
9	-1	0	0	463.5	497.8	362.8	373.3	546.3	548.7
10	1	0	0	318.4	329.2	243.7	245.9	502.4	492.0
11	0	-1	0	236.2	255.6	146.3	145.8	398.5	356.6
12	0	1	0	381.5	407.1	268.5	281.6	400.4	434.2
13	0	0	-1	328.3	399.2	193.1	218.9	492.5	508.3
14	0	0	1	554.2	528.3	318.0	304.9	572.8	548.9
15	0	0	0	481.9	420.8	294.9	276.5	474.7	505.9
16	0	0	0	449.8	420.8	283.4	276.5	521.0	505.9

Πίνακας 10 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές προανθοκυανιδινών (PC) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες μεταβλητές**			**(PC, mg CyE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	237.2	241.3	156.8	153.1	272.7	283.7
2	-1	-1	1	259.5	254.2	172.1	169.0	298.5	289.1
3	-1	1	-1	149.6	141.5	144.7	135.4	256.6	248.2
4	-1	1	1	160.5	173.7	159.3	157.5	223.5	226.9
5	1	-1	-1	238.8	222.1	202.5	203.3	285.3	281.0
6	1	-1	1	223.9	228.4	191.6	199.9	311.8	319.4
7	1	1	-1	194.9	196.7	161.9	164.0	241.2	249.8
8	1	1	1	230.1	222.4	164.2	166.8	273.4	261.5
9	-1	0	0	211.7	207.8	115.3	133.2	222.8	226.2
10	1	0	0	204.4	222.5	176.7	163.0	264.1	242.2
11	0	-1	0	229.3	242.7	207.1	204.8	304.9	300.0
12	0	1	0	188.9	189.8	173.0	179.4	245.0	253.3
13	0	0	-1	202.8	221.7	159.2	169.4	295.1	288.3
14	0	0	1	245.6	241.0	184.7	178.7	286.6	296.9
15	0	0	0	242.1	226.3	177.0	172.8	264.9	266.8
16	0	0	0	239.1	226.3	177.0	172.8	275.6	266.8

Οι πειραματικές τιμές όλων των προσδιορισμών αναλύθηκαν μέσω της διαδικασίας της πολλαπλής παλινδρόμησης, με εφαρμογή των δευτεροβάθμιων πολυωνυμικών εξισώσεων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11** και επιβεβαιώνονται από τους συντελεστές συσχέτισης (R^2).

Πίνακας 11 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών κατά την ανάκτηση πολυφαινολών διαφορετικών τάξεων οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 2^3 πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού.

Μετρήσιμοι Παράγοντες	**Δευτεροβάθμια πολυωνυμική εξίσωση**	R^2	***p***
Μοσχοφίλερο			
TP (mg GAE/100 g dw)	$10317 - 237X_1 - 392X_2 - 218X_3 + 325X_1X_2 + 546X_1X_3 + 815X_2X_3 - 1276X_1^2 - 797X_2^2 + 2029X_3^2$	0,91	0,0369
TFl (mg CTE/100 g dw)	$3397 + 285X_1 - 150X_2 + 58X_3 + 42X_1X_2 + 141X_1X_3 + 23X_2X_3 + 196X_1^2 - 117X_2^2 - 351X_3^2$	0,90	0,0421
TFn (mg RtE/100 g dw)	$420.8 - 84.3X_1 + 75.8X_2 + 64.5X_3 - 29.6X_1X_2 - 13.0X_1X_3 + 37.5X_2X_3 - 7.4X_1^2 - 89.5X_2^2 + 42.9X_3^2$	0,94	0,0057
PC (mg CyE/100 g dw.)	$226.3 + 7.4X_1 - 26.5X_2 + 9.6X_3 + 18.6X_1X_2 - 1.6X_1X_3 + 4.8X_2X_3 - 11.2X_1^2 - 10.1X_2^2 + 5.0X_3^2$	0,86	0,0467
Σαββατιανό			
TP (mg GAE/100 g dw)	$7588 + 182X_1 - 55X_2 + 228X_3 - 221X_1X_2 + 137X_1X_3 + 327X_2X_3 - 554X_1^2 + 1152X_2^2 - 1639X_3^2$	0,88	0,0693
TFl (mg CTE/100 g dw)	$1702 + 107X_1 - 290X_2 - 23X_3 - 127X_1X_2 - 33X_1X_3 + 37X_2X_3 + 225X_1^2 + 325X_2^2 - 32X_3^2$	0,97	0,0006
TFn (mg RtE/100 g dw)	$276.5 - 63.7X_1 + 67.9X_2 + 43X_3 - 52.5X_1X_2 - 19.7X_1X_3 + 23.9X_2X_3 + 33.1X_1^2 - 62.8X_2^2 - 14.6X_3^2$	0,98	0,0002
PC (mg CyE/100 g dw)	$172.8 + 14.9X_1 - 12.7X_2 + 4.7X_3 - 5.4X_1X_2 - 4.8X_1X_3 + 1.6X_2X_3 - 24.7X_1^2 + 19.3X_2^2 + 1.2X_3^2$	0,88	0,0370
Αγιωργίτικο			
TP (mg GAE/100 g dw)	$9755 + 309X_1 - 286X_2 + 613X_3 + 202X_1X_2 + 12.8X_1X_3 + 152X_2X_3 - 757X_1^2 - 683X_2^2 + 1459X_3^2$	0,91	0,0356
TFn (mg RtE/100 g dw)	$3957 + 2X_1 - 47X_2 - 40X_3 - 27X_1X_2 + 108X_1X_3 - 115X_2X_3 + 21X_1^2 + 20X_2^2 - 338X_3^2$	0,90	0,0417
TFl (mg CTE/100 g dw)	$505.9 - 28.3X_1 + 38.8X_2 + 20.3X_3 - 21.9X_1X_2 + 38.2X_1X_3 + 2.1X_2X_3 + 14.4X_1^2 - 111X_2^2 + 22.7X_3^2$	0,90	0,0179
PC (mg CyE/100 g dw.)	$266.8 + 8.0X_1 - 23.3X_2 + 4.3X_3 + 1.1X_1X_2 + 8.3X_1X_3 - 6.7X_2X_3 - 32.6X_1^2 + 9.9X_2^2 + 25.8X_3^2$	0.,92	0,0305

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις σε σχέση με τις εξισώσεις, οι οποίες ήταν στατιστικά αποδεκτές σε επίπεδο σημαντικότητας 95% ($p < 0,05$), με εξαίρεση TP για την ποικιλία Σαββατιανό ($p < 0,0693$). Το γεγονός αυτό δείχνει μια ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των πειραματικών τιμών και των τιμών που προβλέπονται από τις αντίστοιχες εξισώσεις, γεγονός που αποδεικνύει πως οι πολυωνυμικές εξισώσεις μπορούν αξιόπιστα να προβλέψουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Η χρήση των μοντέλων πρόβλεψης επιτρέπει τον υπολογισμό των

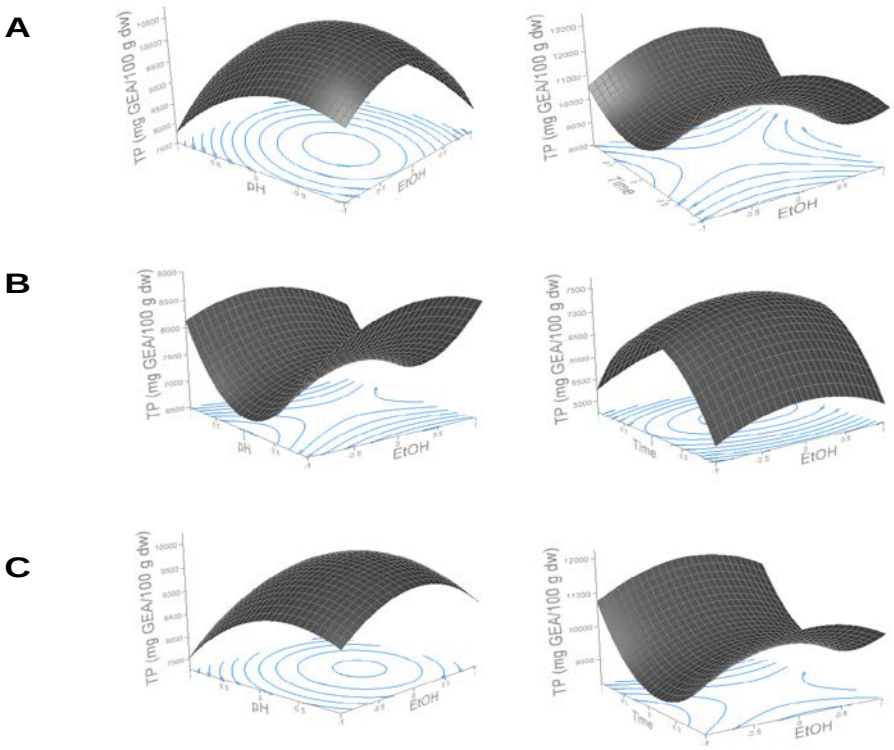
βέλτιστων συνολικών συνθηκών, κάτω από τις οποίες θα μπορούσαν να επιτευχθούν οι μέγιστες τιμές **(Πίνακας 12)**.

Πίνακας 12 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και προβλεφθείσες τιμές για την παραλαβή πολυφαινολών.

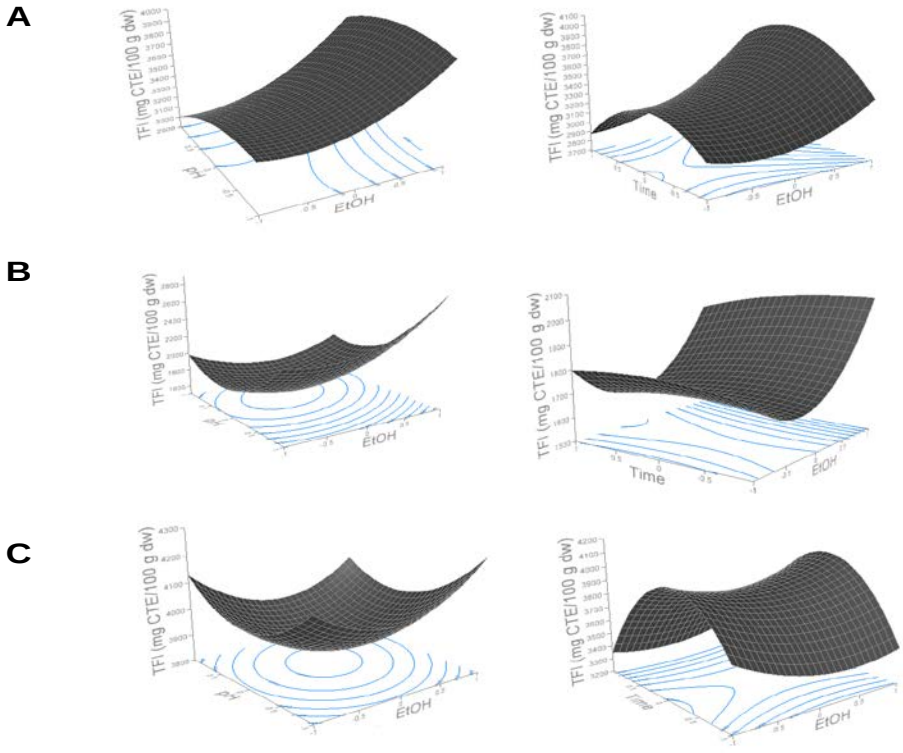
Μετρήσιμοι Παράγοντες	**Μέγιστες προβλεπόμενες τιμές**	**Βέλτιστες συνθήκες**		
		EtOH (%)	**pH**	**t (h)**
Μοσχοφίλερο				
TP	13235±1406	46,9	3,5	1
TFl	3928±353	60	3	3,5
TFn	675,3±99,1	40	5,6	5
PC	256,2±36,0	44,2	2	5
Σαββατιανό				
TP	8757±1085	54,4	2	3
TFl	2838±212	60	2	1
TFn	502,8±48,9	40	6	5
PC	211,6±25,3	53,1	2	5
Αγιωργίτικο				
TP	11864±891	52,2	3,9	5
TFl	4098±258	60	2	3,5
TFn	597,0±75,8	40	4,5	1
PC	338,6±31,8	52,3	2	5

TP, εκφρασμένα σε mg GAE / 100 g dw,
TFl, εκφρασμένα σε mg CTE / 100 g dw,
TFn, εκφρασμένα σε mg RTE / 100 g dw,
PC, εκφρασμένα σε mg CyE / 100 g dw

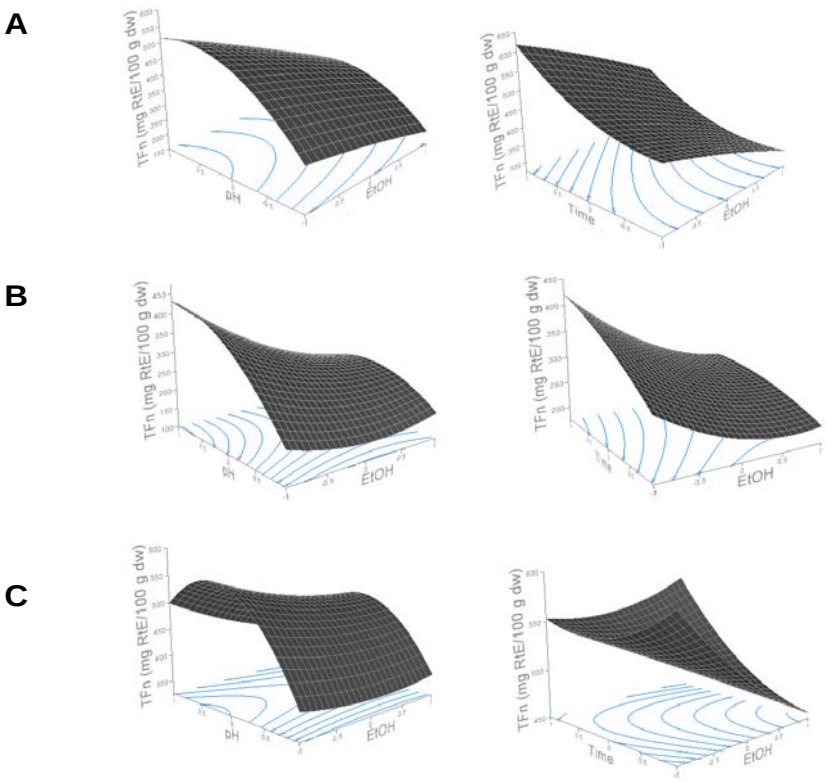
Οι τάσεις που παρουσιάστηκαν στην κάθε περίπτωση, καταγράφηκαν υπό μορφή τρισδιάστατων διαγραμμάτων (**Γραφήματα 1-4**), όπου αριστερά παρουσιάζεται, ταυτόχρονα, η επίδραση των διακυμάνσεων του pH και της αιθανόλης, και δεξιά η ταυτόχρονη επίδραση των αντίστοιχων διακυμάνσεων του χρόνου και της αιθανόλης.



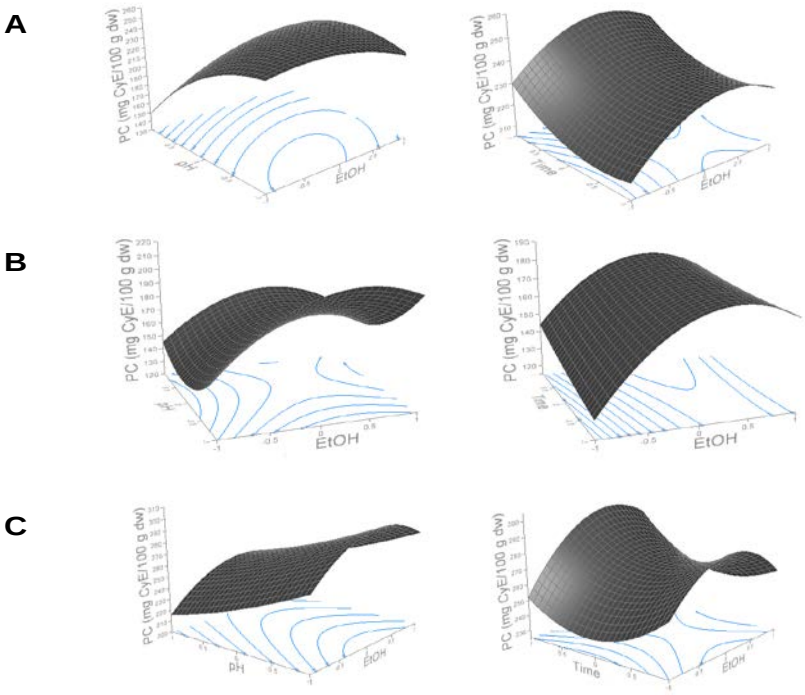
Γράφημα 1 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών πολυφαινολών (TP). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο.



Γράφημα 2 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβανολών (TFl). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο.



Γράφημα 3 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβονών (TFn). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο.



Γράφημα 4 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των προανθοκυανιδινών (PC). A: Μοσχοφίλερο, B: Σαββατιανό, C: Αγιωργίτικο.

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων ανά κατηγορία φαινολικών κλάσεων

***Ολικές πολυφαινόλες*:** Όσον αφορά στην εκχυλισιμότητα των ολικών πολυφαινολών (ΤΡ), για την ποικιλία Μοσχοφίλερο, όπως βλέπουμε και στο σχήμα 1Α, στον ίδιο χρόνο, τόσο η αλλαγή του pH όσο και η αλλαγή του ποσοστού της αιθανόλης, επιτυγχάνουν τη μέγιστη εκχυλισιμότητα στις ενδιάμεσες τιμές pH και αιθανόλης (EtOH). Σε υψηλότερα επίπεδα pH και EtOH, η εκχυλισιμότητα των ΤΡ παρουσίασε μειωμένη τάση. Η ίδια επίδραση παρατηρήθηκε για την ποικιλία Αγιωργίτικο **(Γράφημα 1C).** Αντίθετα, για την ποικιλία Σαββατιανό **(Γράφημα 1Β)**, οι ενδιάμεσες τιμές του pH έδωσαν μικρότερη απόδοση εκχύλισης των ολικών πολυφαινολών, ενώ όσο προσέγγιζε τις πιο ακραίες τιμές η απόδοση της εκχυλισιμότητας είναι μεγαλύτερη. Σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης, τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στις εκχυλίσεις μικρής διάρκειας για την ποικιλία Μοσχοφίλερο, ενώ για τις ποικιλίες Σαββατιανό και Αγιωργίτικο οι ενδιάμεσες και υψηλές τιμές, αντιστοίχως, αποδείχθηκαν περισσότερο ευνοϊκές. **(Πίνακας 12)**.

Ολικές Φλαβανόλες: Η εκχυλισιμότητα των ολικών φλαβανολών τόσο για το Σαββατιανό όσο και για το Αγιωργίτικο ακολουθούν παρόμοιες τάσεις, οι οποίες διαφοροποιούνται όμως από εκείνες της ποικιλίας Μοσχοφίλερο **(Γράφημα 2Α –C)**. Ειδικότερα, η εκχύλιση των ολικών φλαβανολών από τους βόστρυχες των δύο πρώτων ποικιλιών έγιναν ευκολότερα σε pH 2, ενώ για την ποικιλία Μοσχοφίλερο η βέλτιστη τιμή pH είναι 3. Ωστόσο, υπάρχει μία συνέπεια στο ποσοστό της αιθανόλης, με αποτέλεσμα να παρατηρούμε ότι το υψηλότερο ποσοστό της (60%) δίνει τη βέλτιστη εκχύλιση σε όλες τις περιπτώσεις. Η ιδανική διάρκεια εκχύλισης κυμαίνεται από 1 έως 3,5 ώρες **(Πίνακας 12)**.

Ολικές Φλαβόνες: Σε όλες τις περιπτώσεις, φαίνεται πως τα χαμηλά ποσοστά της αιθανόλης σε συνάρτηση με σχετικά υψηλές τιμές pH (4,5-6) αποτελούν ιδανικές συνθήκες για την ανάκτηση των φλαβονών **(Γράφημα 3Α – C)**. Σε αντίθεση με τις ολικές πολυφαινόλες και τις ολικές φλαβανόλες, οι χαμηλές τιμές pH θεωρούνται μη ευνοϊκές για την εκχύλιση των δομών αυτών. Η μεγάλη διάρκεια της εκχύλισης φαίνεται να αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα, με εξαίρεση το Αγιωργίτικο όπου η ιδανική εκχυλισιμότητα παρατηρήθηκε σε μικρότερης διάρκειας εκχυλίσεις.

Προανθοκυανιδίνες: Όσον αφορά στην επίδραση του pH και του χρόνου, τα αποτελέσματα για όλες τις ποικιλίες είναι σε συμφωνία, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι χαμηλές τιμές pH και η παρατεταμένη περίοδος εκχύλισης είναι αναγκαία έτσι ώστε να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά

προανθοκυανιδινών **(Γράφημα 4A-C)**. Από την άλλη πλευρά, τα ενδιάμεσα επίπεδα αιθανόλης ήταν αποτελεσματικότερα για την ανάκτηση των PC τόσο στους βόστρυχες του Σαββατιανού όσο και σε εκείνους του Αγιωργίτικου με εξαίρεση τους βόστρυχες του Μοσχοφίλερου όπου η βέλτιστη ανάκτηση επιτεύχθηκε στα χαμηλότερα επίπεδα αιθανόλης **(Πίνακας 12).**

Συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση

Τα παραγόμενα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ταυτόχρονα με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας δύο αντιπροσωπευτικές μεθόδους: Αναγωγική δύναμη (Reducing Power, P_R) και Ικανότητα δέσμευσης των Ελευθέρων Ριζών (Antiradical Activity A_{AR}). Οι πειραματικές τιμές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν συσχετίστηκαν με όλες τις τιμές των φαινολικών ομάδων, χρησιμοποιώντας ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

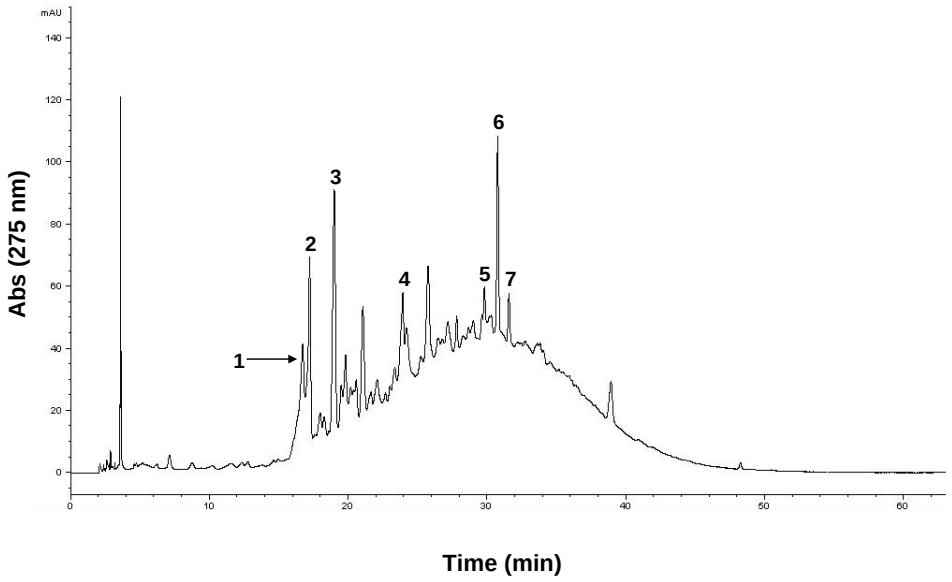
Πίνακας 13 : Στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν τη συσχέτιση των διαφόρων πολυφαινολικών δομών με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες (A_{AR} and P_R). Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης.

Μετρήσιμοι Παράγοντες	**Αντιοξειδωτικοί παράγοντες**			
	A_{AR}		**P_R**	
Μοσχοφίλερο	**R^2**	***p***	**R^2**	***p***
TP	0,27	0,039	0,24	0,057
TFl	0,00	0,841	0,02	0,567
TFn	0,10	0,232	0,04	0,471
PC	0,21	0,078	0,62	< 0,001
Σαββατιανό				
TP	0,19	0,094	0,20	0,083
TFl	0,05	0,388	0,16	0,128
TFn	0,07	0,337	0,19	0,091
PC	0,14	0,155	0,48	0,003
Αγιωργίτικο				
TP	0,06	0,342	0,01	0,681
TFl	0,09	0,256	0,08	0,277
TFn	0,15	0,146	0,10	0,234
PC	0,32	0,023	0,14	0,151

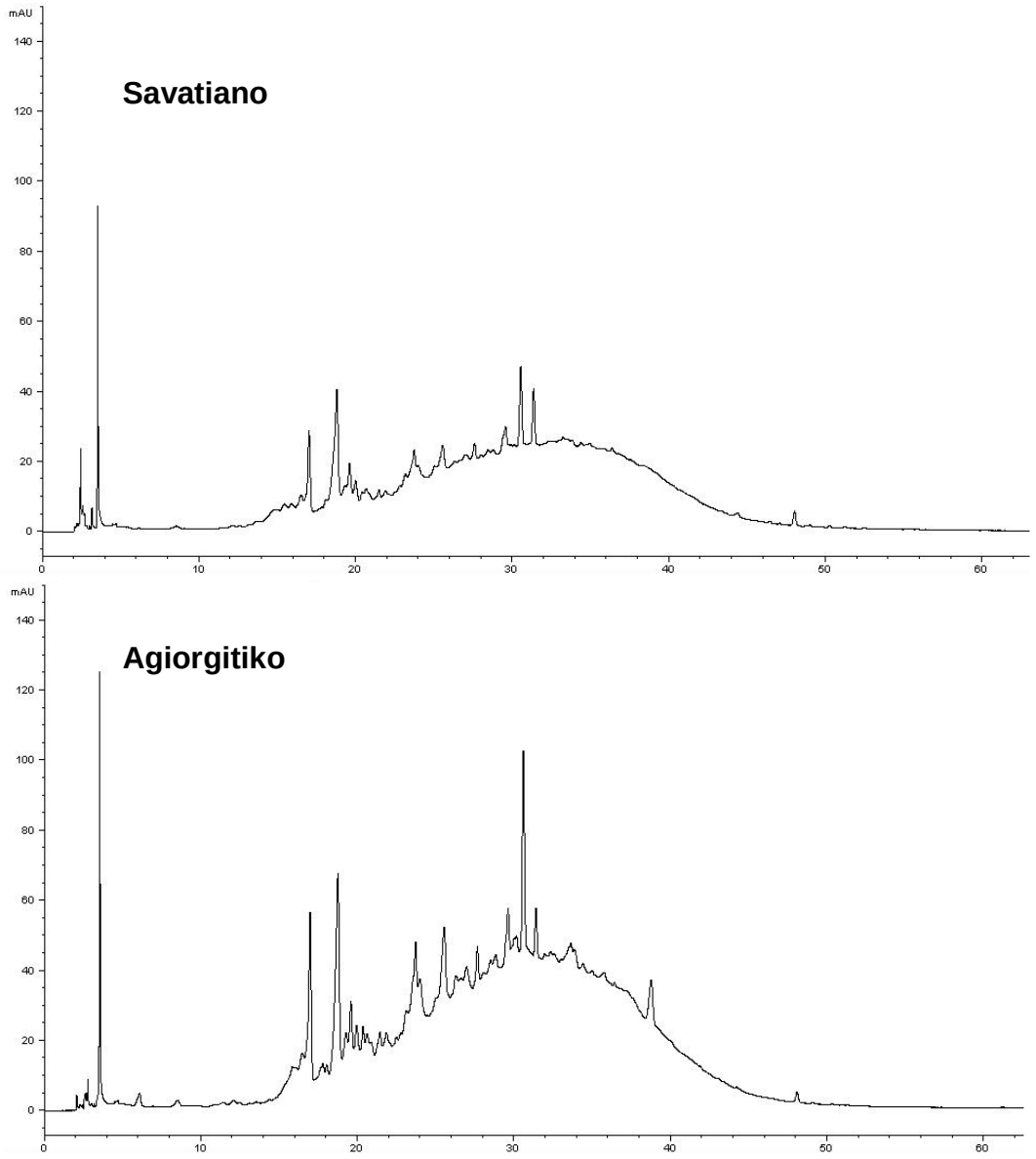
Στον **Πίνακα 13**, παρουσιάζονται οι στατιστικές παράμετροι που έχουν υπολογιστεί για όλες τις συσχετίσεις που έχουν πραγματοποιηθεί. Διαπιστώνουμε λοιπόν πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προανθοκυανιδινών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς επίσης και για τις ολικές πολυφαινόλες του Μοσχοφίλερου, οι οποίες είχαν μια στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) αλλά χαμηλό συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0,27$). Ιδιαίτερα, για το Μοσχοφίλερο και το Σαββατιανό, η συσχέτιση των προανθοκυανιδινών με την P_R είναι πολύ σημαντική ενώ για το Αγιωργίτικο παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ PC και A_{AR} (**Πίνακας 13**).

Πολυφαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων

Η ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας (HPLC) πραγματοποιήθηκε με ανίχνευση στα 275nm, μήκος κύματος όπου όλες οι τάξεις των πολυφαινολών που συναντάμε στους βόστρυχες απορροφούν. Τα χρωματογραφήματα των βοστρύχων δείχνουν τη γενική πολυφαινολική κατανομή των εκχυλισμάτων (**Γραφήματα 5, 6**).

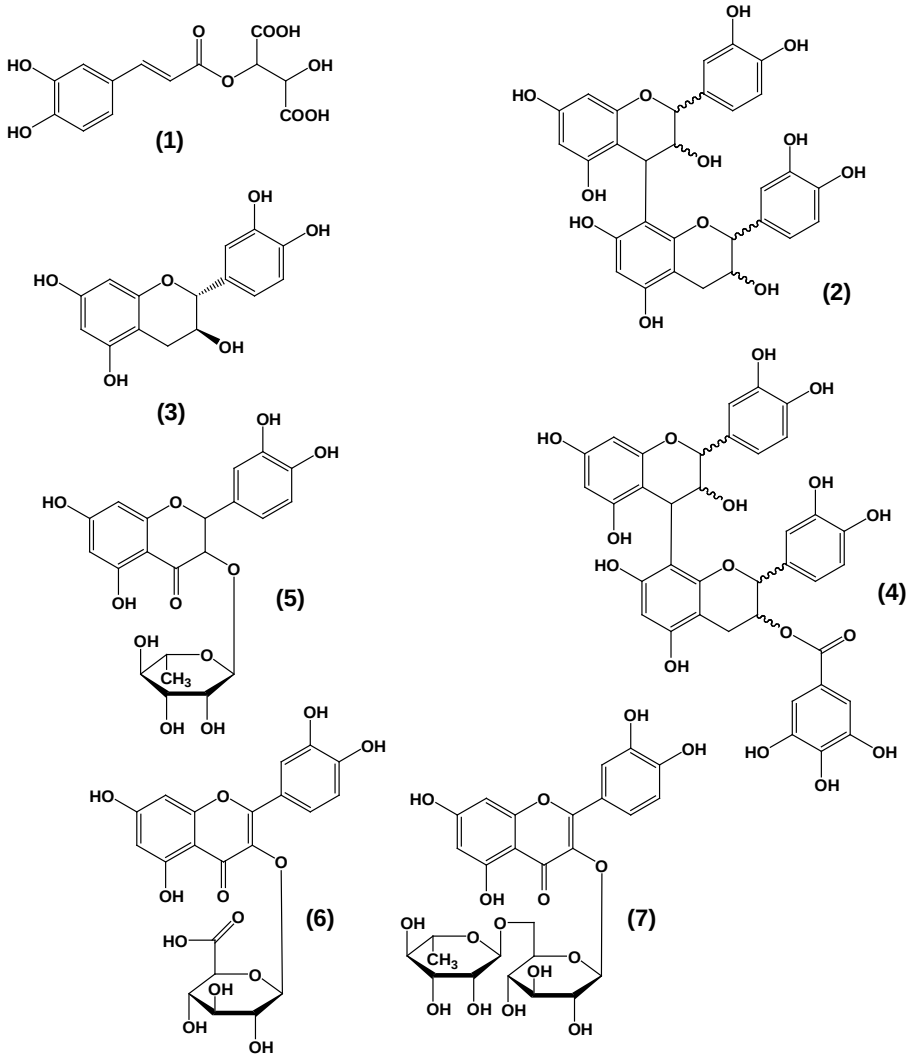


Γράφημα 5 : Ενώσεις των ολικών πολυφαινολών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που περιέχονται στα εκχυλίσματα σύμφωνα με την ανάλυση με HPLC. Καταγραφή κορυφών: 1: καφταρικό οξύ (καφεϊκό παράγωγο του τρυγικού οξέος), 2: διμερές φλαβανολών, 3:κατεχίνη, 4: γαλλικά παράγωγα διμερών φλαβανολών, 5: αστιλβίνη (ραμνοζίτης της διυδρόξυκερκετίνης), 6: 3-*O*-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης, και 7: ρουτίνη (3-*O*-ρουτινοζίτης της κερκετίνης).



Γράφημα 6 : Χρωματογραφήματα από εκχυλίσματα Σαββατιανού και Αγιωργίτικου τα οποία παρουσιάζουν το μεγαλύτερο φαινολικό δυναμικό.

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μάζας, με χρήση θετικών ιόντων, επέτρεψε τον προσδιορισμό σχεδόν όλων των βασικών κορυφών, επιτρέποντας μια, εις βάθος, μελέτη της φαινολικής σύστασης των βέλτιστων εκχυλισμάτων. Στο **Γράφημα 5**, απεικονίζεται το φαινολικό προφίλ του εκχυλίσματος των βοστρύχων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο (**Πίνακας 7**), το οποίο περιέχει το υψηλότερο ποσοστό ολικών πολυφαινολών. Οι χημικές δομές των ενώσεων που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο **Σχήμα 23**, αριθμημένες σύμφωνα με την αρίθμηση των κορυφών του σχήματος.



Σχήμα 23 : Δομές των πολυφαινολικών φυτοχημικών που προσδιορίστηκαν στο βέλτιστο εκχύλισμα του Μοσχοφίλερου.

Φαινολικά οξέα: Η κορυφή 1 παρουσιάζει ένα μοριακό ιόν στα *m/z* 313, ένα σύμπλοκο νατρίου στα *m/z* 335, και ένα προϊόν αφυδάτωσης στα *m/z* 295. Η ένωση αυτή ορίστηκε ως καφταρικό οξύ (caffeoyl tartaric acid) **(Πίνακας 14).**

Πίνακας 14 : UV-vis και χαρακτηριστικά φασματοσκοπίας μάζας από τις κύριες δομές των φυτοχημικών πολυφαινολών που παρατηρήθηκαν στα εκχυλίσματα βοστρύχων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο (*V. vinifera*).

Κορυφή	**λ_{max} (nm)**	**$[M+H]^+$**	**Άλλα ιόντα (*m/z*)**	**Συστατικά**
1	328	313	335 $[M + Na]^+$, 295 $[M – H_2O + H]^+$	Caftaric acid
2	278	579	601 $[M + Na]^+$	(epi)Catechin-(epi)Catechin
3	278	291	-	Catechin
4	278	731	753 $[gDm + Na]^+$, 291 $[(epi)CT+ H]^+$	(epi)Catechin –(epi)Catechin gallate
5	290	451	305 (aglycone), 473 $[M + Na]^+$	Dehydroquercetin rhamnoside (astilbin)
6	254, 354	479	501 $[M + Na]^+$, 303	Quercetin glucuronide
7	254, 354	611	303 (aglycone), 465 $[M – 146 + H]^+$, 633 $[M + Na]^+$	Quercetin rutinoside (rutin)

Φλαβανόλες: Η κορυφή 2 δίνει ένα μοριακό ιόν στα *m/z* 579, και το διαγνωστικό σύμπλεγμα του νατρίου στα *m/z* 601. Η ένωση αυτή ταυτοποιήθηκε ως διμερής φλαβανόλη. Η κορυφή 4 δίνει ένα μοριακό ιόν στα *m/z* 731, το σύμπλεγμα του νατρίου στα *m/z* 753 και ένα χαρακτηριστικό σχηματισμό στα *m/z* 291 ο οποίος αποδίδεται ως επικατεχίνη. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα γαλλικά παράγωγα διμερών φλαβανολών (Makris et al., 2008). Η κορυφή 3 που ταυτοποιήθηκε ήταν η κατεχίνη, η οποία επιβεβαιώθηκε από την σύγκρισή της με τον χρόνο κατακράτησης από αρχικό πρότυπο διάλυμα.

Διυδροφλαβανόλες: Η κορυφή 5, ένα μοριακό ιόν που παρουσιάζεται στα *m/z* 451, το οποίο κατά την αυξανόμενη ενέργεια σύγκρουσης (70 eV) παρήγαγε ένα θυγατρικό ιόν στα *m/z* 305. Ένα ιόν χαρακτηριστικό στην δομή του στα *m/z* 473, το οποίο αποδόθηκε ως σύμπλεγμα νατρίου, ήταν αυτό της αστιλβίνης (ραμνοζίτης της διυδρόξυ- κερκετίνης) (Makris et al., 2008).

Φλαβονόλες: Οι κορυφές 6 και 7 αντιπροσωπεύουν μοριακά ιόντα στα *m/z* 479 και 611 από τα οποία φαίνεται να παράγουν το ίδιο θυγατρικό ιόν (*m/z* 303), και τα οποία αντιστοιχούν στα σύμπλοκα του νατρίου στα *m/z* 501 και 633. Η κορυφή 7, δίνει επίσης ένα χαρακτηριστικό σύμπλεγμα στα *m/z* 465, το οποίο δείχνει την απώλεια της ραμνοζυλ- ομάδας (146 Da). Τα

συστατικά αυτά ταυτοποιήθηκαν ως 3-O- γλουκουρονίδιο της κερκετίνης και 3-O- ρουτινοζίτη της κερκετίνης (ρητίνη), αντίστοιχα (Makris et al., 2008).

Γίγαρτα

Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Ο πειραματικός σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε ήταν πανομοιότυπος με εκείνον που πραγματοποιήθηκε κατά την εκχύλιση των βοστρύχων και αξιολόγησε την επίδραση των ίδιων παραγόντων: α) τη συγκέντρωση αιθανόλης, β) το pH και γ) το χρόνο εκχύλισης (**Πίνακας 4).**

Οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών της εξεταζόμενης διαδικασίας εκχύλισης (X_1, X_2 και X_3), οι τιμές των μετρήσεων και οι εκτιμώμενες τιμές για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιηθήκαν στα γίγαρτα των διαφόρων ποικιλιών (TP, TFl, και PC) δίνονται αναλυτικά στους **Πίνακες 15-18**.

Οι πειραματικές τιμές όλων των προσδιορισμών αναλύθηκαν, όπως και στην περίπτωση των βοστρύχων, μέσω της διαδικασίας της ελάχιστης επαναληψιμότητας, που χρησιμοποιείται σε δευτεροβάθμιες πολυωνυμικές εξισώσεις όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 18** με βάση τους συντελεστές συσχέτισης (R^2).

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με τις εξισώσεις, οι οποίες ήταν στατιστικά αποδεκτές σε επίπεδο σημαντικότητας 95% ($p < 0,05$), με εξαίρεση τις ολικές φλαβανόλες (TFl) για την ποικιλία Σαββατιανό. Το γεγονός αυτό δείχνει μια ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των πειραματικών τιμών και των τιμών που προβλέπονται, γεγονός που αποδεικνύει πως οι θεωρητικές εξισώσεις μπορούν αξιόπιστα να προβλέψουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Η χρήση των μοντέλων πρόβλεψης επιτρέπει τον θεωρητικό υπολογισμό των βέλτιστων συνολικών συνθηκών, κάτω από τις οποίες θα μπορούσαν να επιτευχθούν οι μέγιστες τιμές **(Πίνακας 19)**.

Πίνακας 15 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών πολυφαινολών (TP) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες μεταβλητές**			**Αποτελέσματα (TP, mg GAE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	13320	13255	13127	13199	8673	8708
2	-1	-1	1	13596	13655	8925	8876	4370	4513
3	-1	1	-1	10714	10770	12047	11677	8049	7784
4	-1	1	1	10730	10727	11299	10895	5315	5641
5	1	-1	-1	12149	12345	9700	10026	9384	8979
6	1	-1	1	10910	11047	7107	7400	8290	8476
7	1	1	-1	11620	11754	8755	8727	7905	7683
8	1	1	1	9757	10014	9792	9642	9347	9233
9	-1	0	0	13593	13546	9748	10499	7253	7014
10	1	0	0	13459	12735	8727	8286	8390	8945
11	0	-1	0	11980	11653	7164	6521	7611	7651
12	0	1	0	10338	9894	5928	6880	7292	7567
13	0	0	-1	13992	13671	12200	12565	8305	9162
14	0	0	1	13450	13000	10552	10861	8380	7839
15	0	0	0	11745	12777	9284	8875	8792	8231
16	0	0	0	12267	12777	9084	8875	8302	8231

Πίνακας 16 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές ολικών φλαβανολών (TFl) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες μεταβλητές**			**Αποτελέσματα (TFl, mg CTE/100 g dw)**					
				Μοσχοφίλερο		**Σαββατιανό**		**Αγιωργίτικο**	
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**	**Πειραματικά**	**Εκτιμώμενα**
1	-1	-1	-1	5327	5418	3955	4039	2519	2621
2	-1	-1	1	5533	5642	2505	2757	1686	1758
3	-1	1	-1	4907	4798	3732	3943	2015	1927
4	-1	1	1	3608	3615	3507	3306	1815	1923
5	1	-1	-1	5359	5413	3925	4134	3558	3373
6	1	-1	1	4746	4915	3798	3595	3074	3085
7	1	1	-1	5957	5909	3584	3340	3250	3101
8	1	1	1	4036	4005	3524	3447	3851	3672
9	-1	0	0	4851	4752	3584	3239	3373	3180
10	1	0	0	5089	4944	3041	3356	3931	4432
11	0	-1	0	5806	5383	3463	3121	2210	2340
12	0	1	0	4438	4618	2687	2999	1979	2287
13	0	0	-1	5748	5759	3663	3403	3529	3849
14	0	0	1	5174	4919	2586	2816	3714	3702
15	0	0	0	5115	5112	3033	2949	4081	3606
16	0	0	0	4622	5112	2804	2949	3747	3606

Πίνακας 17 : Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές προανθοκυανιδινών (PC) προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός σχεδιασμός	Ανεξάρτητες μεταβλητές			Αποτελέσματα (PC, mg CyE/100 g dw)					
				Μοσχοφίλερο		Σαββατιανό		Αγιωργίτικο	
	X_1	X_2	X_3	Πειραματικά	Εκτιμώμενα	Πειραματικά	Εκτιμώμενα	Πειραματικά	Εκτιμώμενα
1	-1	-1	-1	585.0	595.7	350.3	342.3	267.6	284.6
2	-1	-1	1	564.1	574.0	255.5	264.8	213.8	217.9
3	-1	1	-1	479.2	468.6	255.1	248.5	182.4	173.7
4	-1	1	1	333.9	344.9	255.1	252.8	148.7	153.2
5	1	-1	-1	577.4	571.2	339.0	339.3	306.8	303.5
6	1	-1	1	529.9	545.3	274.8	279.4	263.4	273.2
7	1	1	-1	584.7	579.6	276.4	265.1	221.5	218.5
8	1	1	1	457.6	451.7	281.0	287.1	250.3	234.4
9	-1	0	0	534.1	513.1	272.0	279.6	247.3	230.4
10	1	0	0	552.4	554.3	294.9	295.2	268.0	280.4
11	0	-1	0	609.6	579.9	264.9	258.7	297.4	269.8
12	0	1	0	459.0	469.6	201.5	215.6	172.0	195.0
13	0	0	-1	591.9	603.1	267.5	293.1	251.1	249.0
14	0	0	1	558.6	528.3	283.1	265.3	226.1	223.6
15	0	0	0	546.1	553.9	275.5	259.4	252.1	245.9
16	0	0	0	523.6	553.9	259.0	259.4	230.6	245.9

Πίνακας 18 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών κατά την ανάκτηση πολυφαινολών διαφορετικών τάξεων οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 2^3 πλήρους παραγοντικού συστήματος.

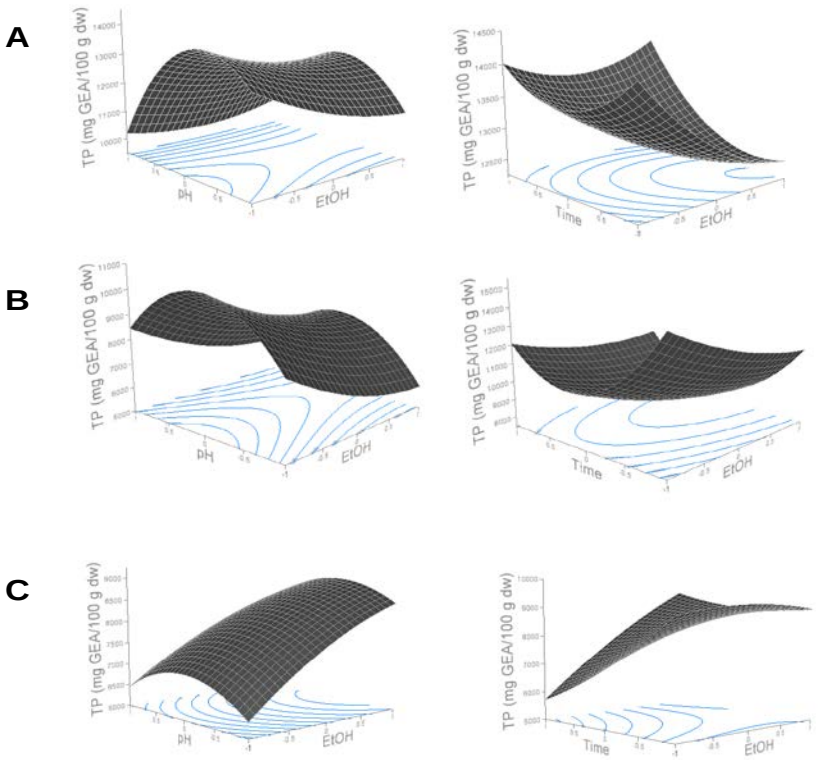
Μετρήσιμοι Παράγοντες	Δευτεροβάθμια πολυώνυμη εξίσωση	R^2	*p*
Μοσχοφίλερο			
TP (mg GAE/100 g dw)	$12777 - 406X_1 - 880X_2 - 335X_3 + 474X_1X_2 - 424X_1X_3 - 111X_2X_3 + 364X_1^2 - 2003X_2^2 + 559X_3^2$	0.90	0.0179
TFl (mg CTE/100 g dw)	$5112 + 96X_1 - 383X_2 - 420X_3 + 279X_1X_2 - 180X_1X_3 - 352X_2X_3 - 263X_1^2 - 111X_2^2 + 228X_3^2$	0.90	0.0207
PC (mg CyE/100 g dw)	$553.9 + 20.6X_1 - 55.2X_2 - 37.4X_3 + 33.9X_1X_2 - 1.1X_1X_3 - 25.5X_2X_3 - 20.2X_1^2 - 29.2X_2^2 + 11.8X_3^2$	0.94	0.0046
Σαββατιανό			
TP (mg GAE/100 g dw)	$8875 - 1107X_1 + 180X_2 - 852X_3 + 56X_1X_2 - 424X_1X_3 - 886X_2X_3 + 517X_1^2 - 2175X_2^2 + 2838X_3^2$	0.94	0.0133
TFl (mg CTE/100 g dw)	$2949 + 59X_1 - 61X_2 - 294X_3 - 174X_1X_2 + 186X_1X_3 + 162X_2X_3 + 349X_1^2 + 112X_2^2 + 161X_3^2$	0.75	0.2057
PC (mg CyE/100 g dw)	$259.4 + 7.8X_1 - 21.5X_2 - 13.9X_3 + 4.9X_1X_2 + 4.4X_1X_3 + 20.4X_2X_3 + 28.0X_1^2 - 22.3X_2^2 + 19.8X_3^2$	0.89	0.0269
Αγιωργίτικο			
TP (mg GAE/100 g dw)	$8231 + 966X_1 - 42X_2 - 661X_3 - 93X_1X_2 + 923X_1X_3 + 513X_2X_3 - 252X_1^2 - 622X_2^2 + 269X_3^2$	0.92	0.0128
TFl (mg CTE/100 g dw)	$3606 + 626X_1 - 27X_2 - 73X_3 + 106X_1X_2 + 144X_1X_3 + 215X_2X_3 + 200X_1^2 - 1293X_2^2 + 169X_3^2$	0.91	0.0324
PC (mg CyE/100 g dw)	$245.9 + 25X_1 - 37.4X_2 - 12.7X_3 + 6.5X_1X_2 + 9.1X_1X_3 + 11.5X_2X_3 + 9.5X_1^2 - 13.5X_2^2 - 9.6X_3^2$	0.90	0.0206

Πίνακας 19 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και θεωρητικά υπολογισμένες τιμές για την απόκτηση πολυφαινολών διαφόρων τάξεων.

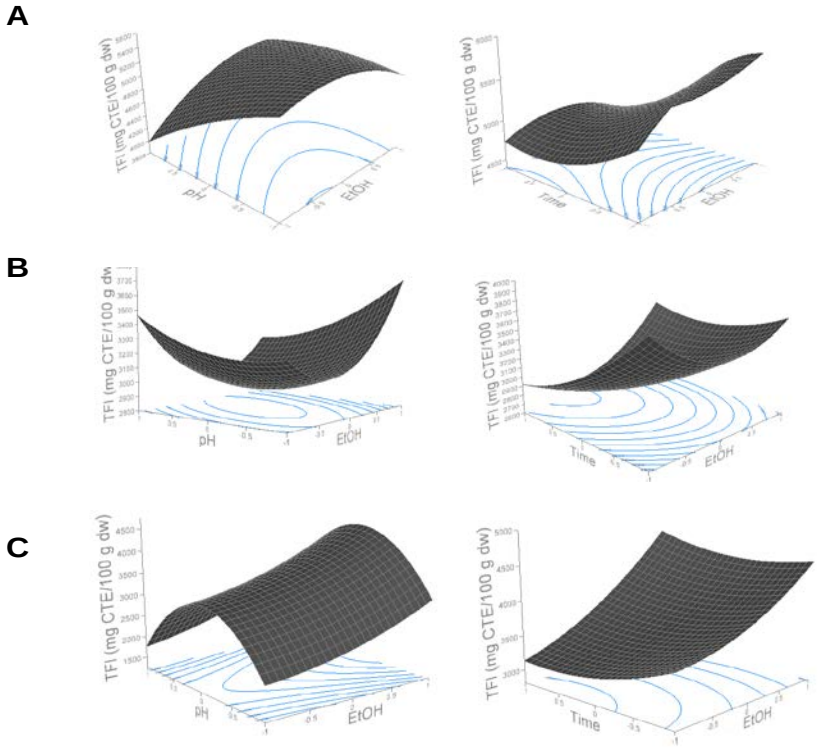
Μετρήσιμοι Παράγοντες	**Βέλτιστες προβλεφθείσες τιμές**	**Βέλτιστες συνθήκες**		
		EtOH (%)	**pH**	**t (h)**
Μοσχοφίλερο				
TP	14461±1338	40	3,26	5
TFl	5679±665	40	2	1
PC	604,5±55,3	52,1	3,23	1
Σαββατιανό				
TP	14679±1888	40	3,64	1
TFl	4134±839	60	2	1
PC	342,3±38,9	60	2,93	1
Αγιωργίτικο				
TP	9534±1248	60	4,56	5
TFl	4688±1001	60	4,23	5
PC	303,5±47,0	60	2	1,42

TP, εκφρασμένα σε mg GAE / 100 g dw,
TFl, εκφρασμένα σε mg CTE / 100 g dw,
PC, εκφρασμένα σε mg CyE / 100 g dw

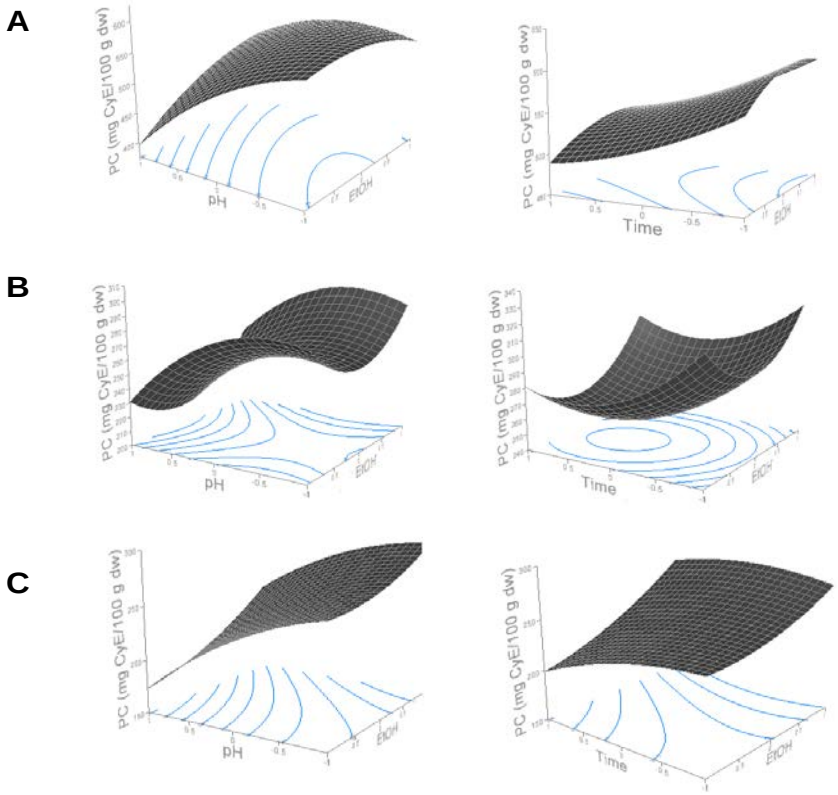
Οι τάσεις που παρουσιάστηκαν στην κάθε περίπτωση, καταγράφηκαν υπό μορφή τρισδιάστατων διαγραμμάτων (**Γραφήματα 7-9**), όπου αριστερά παρουσιάζεται την ίδια στιγμή η επίδραση των διακυμάνσεων του pH και της αιθανόλης, και δεξιά η ταυτόχρονη επίδραση των αντίστοιχων διακυμάνσεων του χρόνου και της αιθανόλης.



Γράφημα 7 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών πολυφαινολών (TP). A, Μοσχοφίλερο, B, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο.



Γράφημα 8 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των ολικών φλαβανολών (TFl). A, Μοσχοφίλερο, B, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο.



Γράφημα 9 : Τρισδιάστατες πλάκες-επιφάνειας που παρουσιάζουν την επίδραση της αιθανόλης/pH (αριστερά) και αιθανόλης/χρόνου (δεξιά), αλληλεπίδραση στην εκχύλιση των προανθοκυανιδινών (PC). Α, Μοσχοφίλερο, Β, Σαββατιανό, C, Αγιωργίτικο.

Συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση

Τα παραγόμενα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ταυτόχρονα με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, οι οποίες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας δύο αντιπροσωπευτικές μεθόδους: Αναγωγική δύναμη (Reducing Power, P_R) και Ικανότητα δέσμευσης των Ελευθέρων Ριζών (Antiradical Activity A_{AR}), όπως και αυτά των βοστρύχων. Οι πειραματικές τιμές των μεθόδων (**Παράρτημα**) που χρησιμοποιήθηκαν συσχετίστηκαν με όλες τις τιμές των φαινολικών ομάδων, χρησιμοποιώντας ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Στον **Πίνακα 20**, παρουσιάζονται οι στατιστικές παράμετροι που έχουν υπολογιστεί για όλες τις συσχετίσεις που έχουν πραγματοποιηθεί. Για το Μοσχοφίλερο, διαπιστώνουμε πως υπάρχει στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των ολικών πολυφαινολών, των ολικών φλαβανολών και των προανθοκυανιδινών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρουσιάζεται και από τα 2 τεστ (A_{AR}, P_R), αλλά για το Αγιωργίτικο παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα μόνο για την μέτρηση της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (A_{AR}). Για την ποικιλία Σαββατιανό, σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε

για τις ολικές πολυφαινόλες (TP) και τις ολικές φλαβανόλες (TFl) και την μέτρηση της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (A_{AR}).

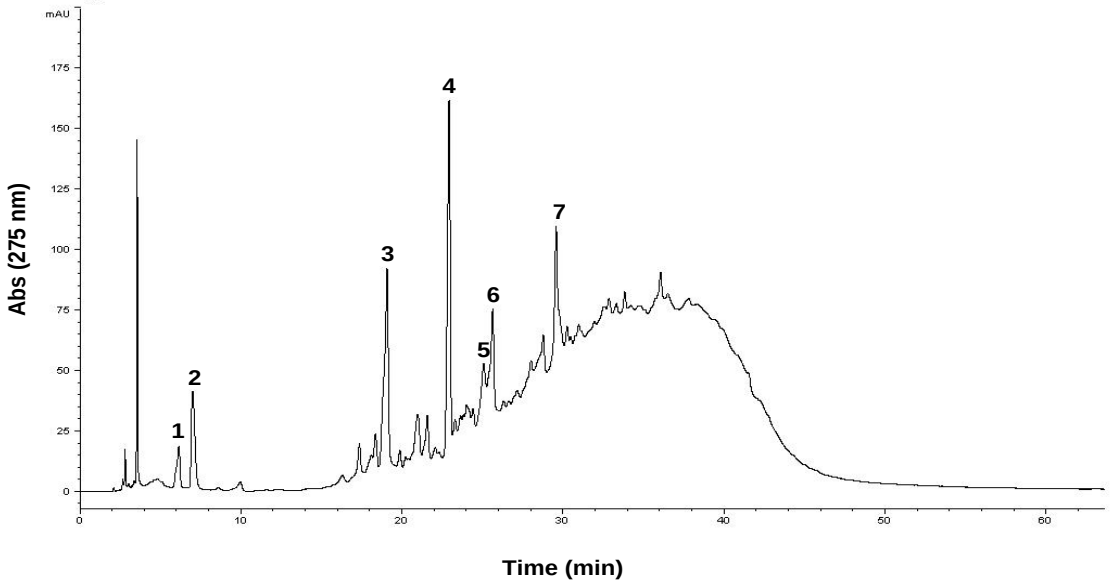
Πίνακας 20 : Στατιστικοί παράμετροι που περιγράφουν την συσχέτιση των διαφόρων πολυφαινολικών δομών με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες(A_{AR} and P_R). Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης.

Μετρήσιμοι παράγοντες	**Αντιοξειδωτικοί παράγοντες**			
	A_{AR}		**P_R**	
Μοσχοφίλερο	**R^2**	***p***	**R^2**	***p***
TP	0,31	< 0,05	0,47	< 0,05
TFl	0,59	< 0,001	0,65	< 0,001
PC	0,57	< 0,001	0,69	< 0,001
Σαββατιανό				
TP	0,56	< 0,001	0,08	0,273
TFl	0,28	< 0,05	0,25	0,051
PC	0,20	0,092	0,10	0,232
Αγιωργίτικο				
TP	0,57	< 0,001	0,24	0,054
TFl	0,37	< 0,05	0,17	0,117
PC	0,65	< 0,001	0,18	0,104

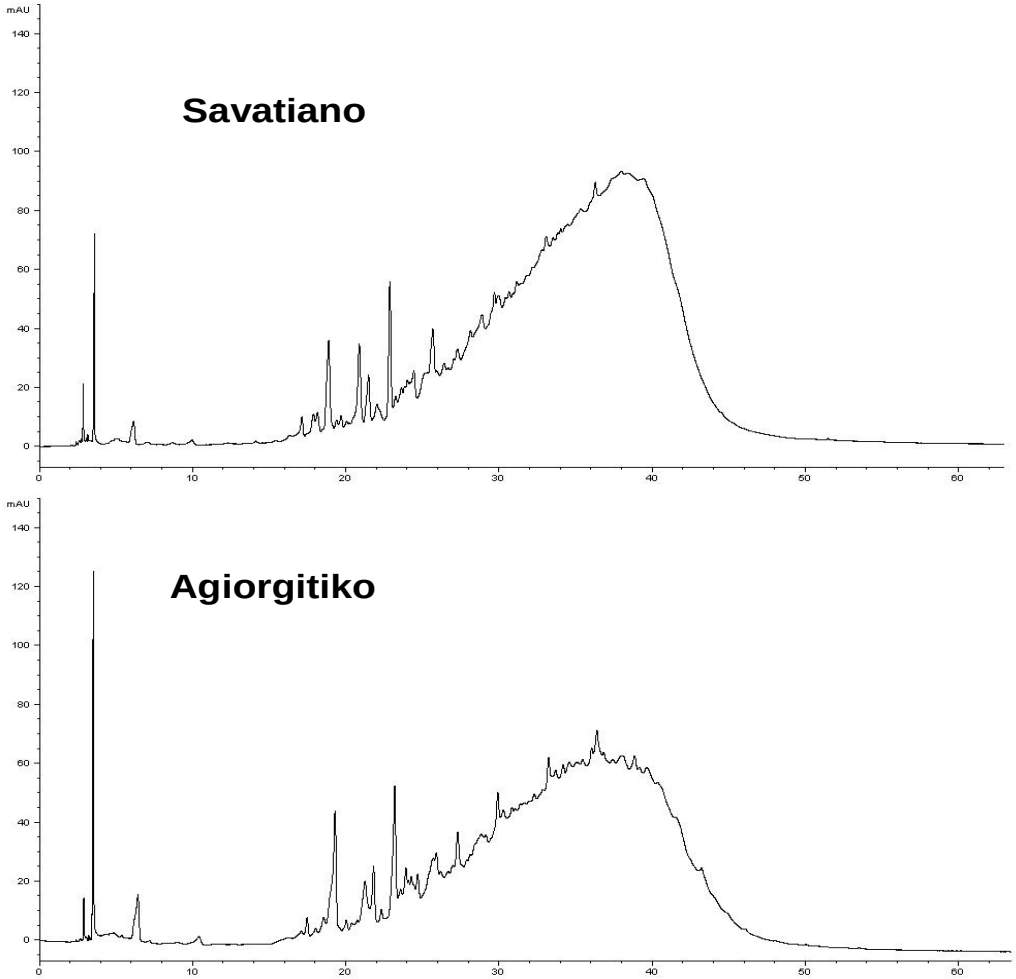
Κατανομή πολυφαινολών στα εκχυλίσματα

Η μέσω HPLC ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 275nm, όπου όλες οι κλάσης των πολυφαινολών που συναντάμε στα γίγαρτα δείχνουν μια ικανοποιητική απορρόφηση. Τα χρωματογραφήματα δείχνουν το γενικό πολυφαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων των γιγάρτων (**Γραφήματα 10, 11**).

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μάζας, με χρήση θετικών ιόντων, επέτρεψε τον προσδιορισμό σχεδόν όλων των βασικών κορυφών, επιτρέποντας μια, εις βάθος, μελέτη της φαινολικής σύστασης των βέλτιστων εκχυλισμάτων. Στο **Γράφημα 10**, απεικονίζεται το φαινολικό προφίλ του εκχυλίσματος των γιγάρτων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, το οποίο περιέχει το υψηλότερο ποσοστό ολικών πολυφαινολών.

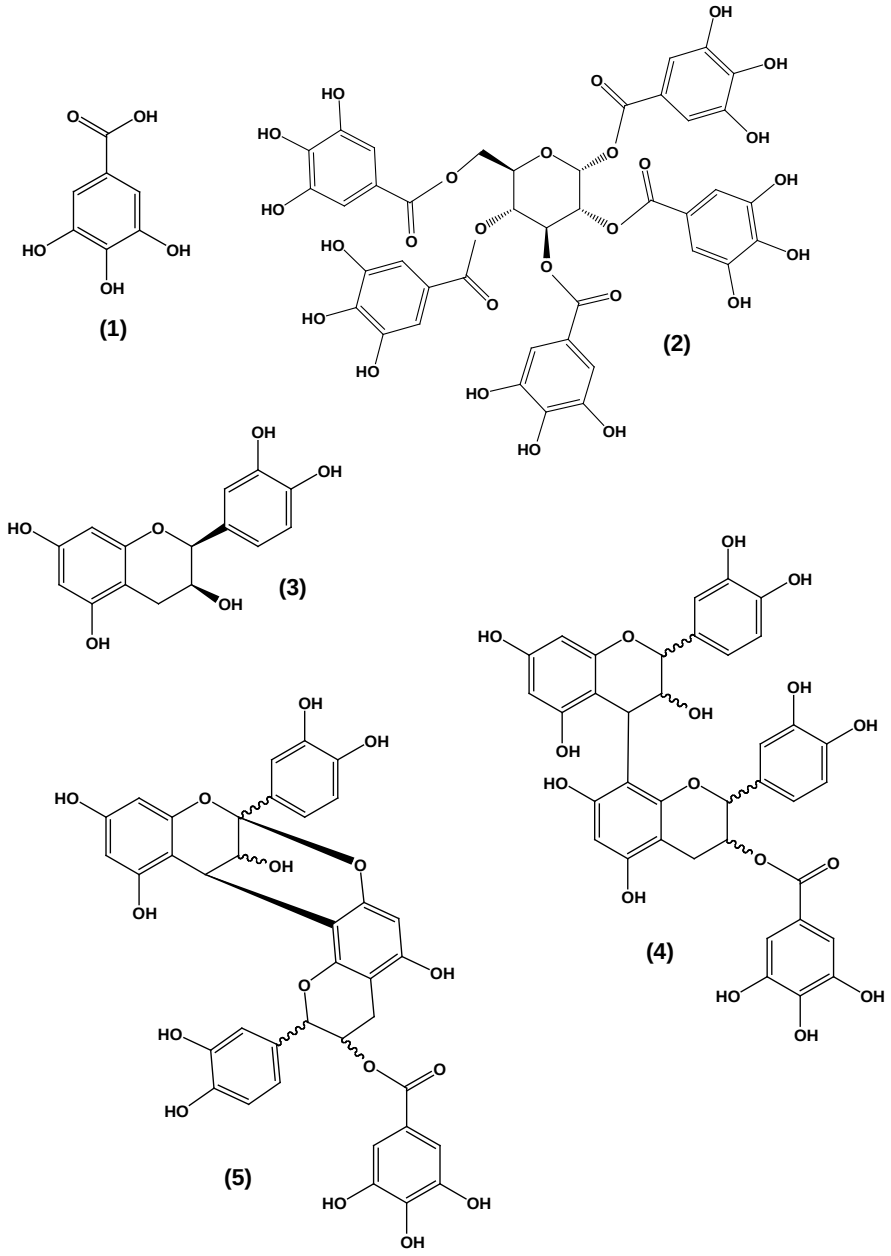


Γράφημα 10 : Ενώσεις των ολικών πολυφαινολών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που περιέχονται στα εκχυλίσματα σύμφωνα με την ανάλυση με HPLC (Μοσχοφίλερο). Καταγραφή κορυφών: 1: γαλλικό οξύ, 2: ταννικό οξύ, 3:κατεχίνη, 4,5 και 7: γαλλικά παράγωγα διμερών φλαβανολών, 6: Α-τύπος γαλλικού παραγώγου διμερών φλαβανολών.



Γράφημα 11 : Χρωματογραφήματα από τα βέλτιστα εκχυλίσματα (μέγιστο φαινολικό δυναμικό) γιγάρτων Σαββατιανού και Μοσχοφίλερου

Οι χημικές δομές των ενώσεων που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο **Σχήμα 24**, αριθμημένες σύμφωνα με την αρίθμηση των κορυφών του σχήματος.



Σχήμα 24 : Δομές των πολυφαινολικών φυτοχημικών που προσδιορίστηκαν στο βέλτιστο εκχύλισμα του Μοσχοφίλερου.

Φαινολικά οξέα: Οι κορυφές 1 και 2 **(Γράφημα 10)** προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τα UV χαρακτηριστικά τους και τον χρόνο κατακράτησης τους με εκείνα των αυθεντικών ενώσεων. Αποτέλεσμα των συγκρίσεων αυτών είναι να ταυτοποιηθούν με το γαλλικό και το ταννικό οξύ αντίστοιχα.

Φλαβανόλες: Η κορυφή 3 **(Γράφημα 10)**, αντιπροσωπεύει την κατεχίνη, ένωση η οποία επιπλέον επιβεβαιώθηκε συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησής της με εκείνον της πρότυπης ουσίας. Η κορυφή 4 δίνει ένα μοριακό ιόν στα *m/z* 731, σύμπλεγμα νατρίου στα *m/z* 753 και ένα διαγνωστικό σύμπλεγμα στα *m/z* 603, 577 και 291. Αυτή η ένωση ταυτοποιήθηκε ως γαλλικό παράγωγο των διμερών φλαβανολών (Makris et al., 2008). Στην κορυφή 5 βρίσκεται ένα μοριακό ιόν στα *m/z* 731, ένα σύμπλεγμα νατρίου στα *m/z* 753 και χαρακτηριστικές δομές στα *m/z* 603 and 291. Τα δεδομένα αυτά αντιστοιχούν σε γαλλικά παράγωγα των διμερών φλαβανολών σύμφωνα με τους Makris et al. (2008). Στο ίδιο φάσμα, η κορυφή 7, χαρακτηρίζεται ως διμερές παράγωγο γαλλικού οξέος, με τις χαρακτηριστικές του δομές στα *m/z* 289, το οποίο προφανώς προέρχεται από την διάσπαση του μεθιδίου της κιννόνης (Li & Deinzer, 2007). Τέλος, η κορυφή 6 έχει χαρακτηριστεί ως γαλλικό παράγωγο Α-τύπου, το οποίο θα μπορούσε να αντέξει έως τα *m/z* 443 δια μέσου ενός ανάστροφου δακτυλίου διάσπασης (RDA) (Li & Deinzer, 2007).

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Υδραλκοολικά διαλύματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση ανθοκυανινών από φλοιούς ηλίανθων (Gao and Mazza, 1996) και της μαύρης σταφίδας (Cacace and Mazza, 2003), φαινολικών από φλοιούς αμυγδάλων και πεύκου (Pinelo et al., 2004), βλαστούς αμπελιών (Luque-Rodriguez et al., 2006), φύλλα ελιάς (Japón-Luján et al., 2006, Mylonaki et al., 2008), αποξηραμένο φασκόμηλο (Durling et al., 2007), πολτό γιγάρτων σταφυλιού (Shi et al., 2003), γιγάρτων σταφυλιού (Yilmaz & Toledo, 2006), γιγάρτων λευκών σταφυλιών, φλοιών και στεμφύλων (Makris et al., 2007), φλοιών κόκκινων σταφυλιών (Makris et al., 2008), κριθαριού (Madhujith and Shahidi, 2006) και φύλλων *Inga edulis* (Silva et al., 2007).

Οι τάσεις που καταγράφηκαν σε κάθε περίπτωση, καθώς επίσης και οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα αιθανόλης, υποδεικνύουν πως η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης από ιστούς με διαφορετική φαινολική σύσταση, βασίζονται σε πειραματικές προσπάθειες και πως δεν υπάρχει ένα γενικό μοντέλο εκχύλισης που να παρουσιάζει τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν. Υπό αυτές τις συνθήκες, η παρούσα μελέτη εστίασε σε ιδιαίτερα υποπροϊόντα οινοποιίας, προερχόμενα από διαφορετικές ποικιλίες και η έρευνα βασίστηκε στην βελτιστοποίηση εκχύλισης συγκεκριμένων πολυφαινολικών ομάδων και όχι στις ολικές πολυφαινόλες, υπό την προϋπόθεση ότι ακολουθήθηκε ένα πολυπαραγοντικό σύστημα εκχυλιστικής ικανότητας.

Βόστρυχες

Βελτιστοποίηση εκχύλισης και επιδρώσες παράμετροι

Το σύνολο των μετρήσεων που έγιναν, έδειξε για πρώτη φορά ότι τα διάφορα είδη πολυφαινολών και οι διαφορετικές περιεκτικότητες στους ιστούς, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις συνθήκες εκχύλισης. Κατά την διαδικασία βελτιστοποίησης, έγινε εμφανές ότι η εκχύλιση των φλαβανολών απαιτεί υψηλό ποσοστό αιθανόλης (60%), σε αντίθεση με τις φλαβόνες όπου με ποσοστό αιθανόλης 40% έχουμε ανακτήσει το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής της τάξης πολυφαινολών **(Πίνακας 12)**. Όσον αφορά τις προανθοκυανιδίνες (PC), που περιλαμβάνουν ολιγομερείς και πολυμερείς φλαβανόλες, ενδιάμεσα ποσοστά αιθανόλης μεταξύ 44,2% και 53,1% θεωρούνται περισσότερο ικανοποιητικά. Μια άλλη σημαντική διαφορά, παρατηρήθηκε στην επίδραση του pH. Όσον αφορά στην εκχύλιση των φλαβανολών τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρήθηκαν σε τιμές pH μεταξύ 2-3 ενώ η κατηγορία των φλαβονών

είχε καλύτερη εκχυλισιμότητα σε τιμές pH 4,5-6. Τα αποτελέσματα για την κατηγορία των προανθοκυανιδινών ήταν σχεδόν ταυτόσημα με εκείνα των φλαβανολών μιας και η βέλτιστη τιμή pH ήταν στο 2. Όσον αφορά στο χρόνο εκχύλισης των προανθοκυανιδινών, παρατηρείται μια αντίστοιχη επίδραση όπως εκείνη του pH. Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης για όλα τα δείγματα των βοστρύχων ήταν οι 5 ώρες. Από την άλλη πλευρά, ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης των ολικών φλαβανολών και των ολικών φλαβονών ήταν 1-3,5 και 1-5 ώρες, αντιστοίχως, δείχνοντας ότι γενικά η εκχύλιση μεγάλων ποσοστών φλαβονών απαιτεί παρατεταμένη διάρκεια εκχύλισης σε σύγκριση με τις ολικές φλαβανόλες.

Το γεγονός ότι η μέγιστη απόδοση των ολικών φλαβανολών επιτυγχάνεται σε υψηλότερα ποσοστά αιθανόλης απ' ότι εκείνα των ολικών φλαβανονών δεν μπορεί να αιτιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις πολικότητες των μορίων αυτών. Στην πραγματικότητα, οι φλαβανόλες είναι περισσότερο πολικές από τους γλυκοζίτες των φλαβονολών, παρ' όλα αυτά η ικανότητα παραλαβής τους όπως βλέπουμε στο χρωματογράφημα (**Γράφημα 5**), είναι ένα παράδοξο φαινόμενο. Στην περίπτωση αυτή, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως το αποτέλεσμα είναι συνδυασμός πολλών παραγόντων και όχι μόνο της πολικότητας των μορίων.

Υποθετικά, αν αυξηθούν οι τιμές του pH μπορεί να επηρεαστεί η διαλυτότητα των πολυφαινολών, έτσι ώστε να ενισχύεται η διάσταση των περισσότερο όξινων φαινολικών ομάδων -OH, οι οποίες καθιστούν περισσότερο διαλυτές τις πολυφαινόλες σε υδραλκοολικά συστήματα (Mylonaki et al., 2008). Μια τέτοια υπόθεση μπορεί να εξηγήσει την τάση που παρουσιάζουν οι φλαβόνες **(Σχήμα 22)**, και το υψηλό ποσοστό εκχυλισιμότητας που παρουσιάζουν στις τιμές pH μεταξύ 4,5 και 6 **(Πίνακας 12).** Αντιθέτως, η εκχύλιση των φλαβανολών και των προανθοκυανιδινών διευκολύνεται σε τιμές pH 2, γεγονός που δείχνει την τάση που έχουν αυτού του είδους οι πολυφαινόλες να οξειδώνονται ευκολότερα, κάτω από συγκεκριμένες τιμές pH, γεγονός που θα μπορούσε να περιορίσει την ανάκτησή τους [Mylonaki et al., 2008, Makris et al., 2008, Zhang et al., 2007].

Ο απαιτούμενος χρόνος για να επιτευχθούν τα βέλτιστα επίπεδα είναι, κατά μέσο όρο, μικρότερος για τις φλαβανόλες (2,67 ώρες), λίγο μεγαλύτερος για τις ολικές φλαβόνες (3,67 ώρες) και ακόμα μεγαλύτερος για τις προανθοκυανιδίνες (5 ώρες). Κρίνοντας σύμφωνα με την πολικότητα των ενώσεων, φαίνεται πώς οι πολικές μονομερείς/πολυμερείς φλαβανόλες, όπως εκείνες που προσδιορίστηκαν στα εκχυλίσματα **(Γράφημα 5)**, είναι εκείνες που περιμένουμε να απελευθερωθούν πρώτες στο μέσο εκχύλισης και θα ακολουθήσουν οι λιγότερο πολικές φλαβόνες. Η απελευθέρωση των προανθοκυανιδινών από τους ιστούς απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης, πιθανότατα διότι έχουν την τάση να ενώνονται με άλλες μεγαλομοριακές ενώσεις

όπως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, που παρεμποδίζουν την ταχεία διαλυτοποίηση των προανθοκυανιδινών.

Πολυφαινολική σύσταση και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η σύσταση των βοστρύχων σε πολυφαινόλες δεν έχει χαρακτηριστεί, σε αντίθεση με την σύσταση των φλοιών και των γιγάρτων, και στην μελέτη αυτή έγινε μια μεγάλη προσπάθεια για τον ποιοτικό προσδιορισμό τους. Οι βόστρυχες περιέχουν παράγωγα του υδρόξυ-κινναμωμικού οξέος, όπως το καφταρικό και το κουταρικό οξύ, καθώς επίσης φλαβανόλες και γλυκοζίτες των διυδροξυφλαβονολών (Souquet et al., 2000). Επιπλέον, οι βόστρυχες μπορούν να περιέχουν σημαντική ποσότητα στιλβενίων, εκτός από την trans-ρεσβερατρόλη και τα διμερή της, ε-βινιφερίνη, πολυάριθμους άλλους στιλβενικούς μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένων της γ-ρεσβερατρόλης και Ο-γλυκοζίτες, καθώς επίσης τριμερών και τετραμερών τους (Pussa et al., 2006). Αν και πρόσφατες μελέτες, οι οποίες αναφέρονται στην φαινολική σύσταση των βοστρύχων του Ροδίτη (γηγενής ελληνική ποικιλία *Vitis vinifera*), δείχνουν πως η trans-ρεσβερατρόλη και η βινιφερίνη περιέχονται σε αρκετά υψηλά ποσοστά (Makris et al., 2008), στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν στιλβένια σε καμμία από τις τρεις εξεταζόμενες ποικιλίες. Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται η ύπαρξη παραγώγων γαλλικού οξέος, των φλαβανολών, αστιλβίνης, γλυκοζιτών της κερκετίνης.

Στον **Πίνακα 20**, όπου φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα, παρατηρούμε πως στα εκχυλίσματα του Μοσχοφίλερου, οι μόνοι στατιστικά σημαντικοί συσχετισμοί ήταν εκείνοι που βρέθηκαν μεταξύ προανθοκυανιδινών (PC) και P_R, ενώ για την ποικιλία Αγιωργίτικο σημαντικός συσχετισμός αποδεικνύεται μεταξύ προανθοκυανιδινών (PC) και A_{AR}. Για την ποικιλία Μοσχοφίλερο, η συσχέτιση μεταξύ ολικών πολυφαινολών TP ήταν σημαντική αλλά χαμηλή.

Μια πιθανή εξήγηση για τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, μπορεί να είναι το γεγονός ότι τα μόρια των προανθοκυανιδινών συντίθενται από ποικίλες μονομερείς μονάδες (συνήθως 2 με 7), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία είναι ανάλογη των υδρόξυ-ομάδων που περιέχονται (Tourino et al., 2005). Κατά συνέπεια, η αυξανόμενη αντιοξειδωτική ικανότητα των ουσιών είναι συνδεδεμένη με τον αυξανόμενο αριθμό μονομερών, μέχρι 7, αλλά η αμφισβητούμενη συμπεριφορά ήταν αποτέλεσμα κάποιων μονομερών που έχουν συνδεθεί με μόρια γαλλικού οξέος (Jerez et al., 2007). Έχει επίσης υποστηριχτεί ότι οι κινόνες των προανθοκυανιδινών, που διαμορφώθηκαν από τις αρχικές ρίζες των ημικινονών μετά από την αφαίρεση υδρογόνου, είναι ικανές να δημιουργήσουν ολιγομερή

συστατικά μέσω διαφόρων μεταβολικών οδών. Οι αντιδράσεις αυτές της σύζευξης (ή πυρηνόφιλες προσθήκες), που διατηρούν τον αριθμό των υδροξύ ομάδων, είναι ο κύριος υπεύθυνος για την ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των μορίων αυτών (Bors et al., 2000).

Μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει πως οι προανθοκυανιδίνες, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, παρουσιάζουν μια σημαντική ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Oki et al., 2002, Guendez et al., 2005, Makris et al., 2007). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικές σε σχέση με άλλες μονομερείς φλαβανόλες (Muselik et al., 2007). Πολύ πιθανόν λοιπόν, η υψηλή περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών στους βόστρυχες να καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες.

Γίγαρτα

Βελτιστοποίηση εκχύλισης και επιδρούσες Παράμετροι

Υπό τις παρούσες συνθήκες, η μελέτη αυτή εστίασε σε γίγαρτα διαφορετικών ποικιλιών και διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Μελετήθηκαν τρεις (3) διαφορετικοί φαινολικοί δείκτες και όχι μόνο το σύνολο των φαινολών, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα μιας πολύπλευρης αξιολόγησης της εκχυλιστικής ικανότητας των διαφορετικών συνθηκών.

Στον **Πίνακα 19**, γίνεται αντιληπτό ότι με την βέλτιστη εκχύλιση επιτυγχάνεται ανάκτηση μέχρι και 14,7% επί ξηρού βάρους μετά τ. Οι τιμές αυτές ξεπερνούν τις προαναφερθείσες έως τώρα τιμές που δεν υπερέβαιναν το 13,8%, οι οποίες επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας μονοπαραγοντικές προσεγγίσεις, βελτιστοποιώντας τις συνθήκες εκχύλισης (Makris et al., 2007a). Αξίζει να σημειωθεί, στο σημείο αυτό, ότι τα γίγαρτα από την ποικιλία Αγιωργίτικο παρελήφθησαν μετά από την τυπική διαδικασία ερυθρής οινοποίησης σύμφωνα με την οποία παρέμειναν σε επαφή με το εν ζυμώσει γλεύκος για ένα διάστημα 12 ημερών. Η διαδικασία αυτή οδήγησε αναπόφευκτα στην μερική εκχύλιση φαινολικών συστατικών, προς το γλεύκος το οποίο σταδιακά εμπλουτίζονταν από αιθανόλη, με αποτέλεσμα να μειωθεί το ποσοστό των φαινολικών συστατικών στα γίγαρτα.

Δεδομένου ότι το εν ζυμώσει γλεύκος μπορεί να θεωρηθεί ουσιαστικά ένα υδατικό μέσο, θα περιμέναμε να έχουμε εκχύλιση των περισσότερο πολικών φαινολών από τα γίγαρτα. Πράγματι, η εκχύλιση των ολικών πολυφαινολών (TP) από τα γίγαρτα του Αγιωργίτικου απαιτεί μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης σε σύγκριση με τα γίγαρτα της ποικιλίας Μοσχοφίλερου και

εκείνα του Σαββατιανού, αποδεικνύοντας πως στον ιστό αυτό περιέχονταν λιγότερο πολικές ενώσεις.

Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται ότι αυξάνοντας την τιμή του pH μπορεί να αυξηθεί η διαλυτότητα τον πολυφαινολών ενισχύοντας τη διάσταση των πιο όξινων φαινολικών ομάδων–OH, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλότερη διαλυτότητα σε υδραλκοολικό περιβάλλον (Mylonaki et al., 2008). Μια τέτοια υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει τους λόγους για τους οποίους οι ολικές πολυφαινόλες (TP) και οι ολικές φλαβανόλες (TFl) από τα γίγαρτα της ποικιλίας Αγιωργίτικο παρουσιάζουν μεγαλύτερη εκχυλισιμότητα σε υψηλότερα επίπεδα pH.

Ο απαιτούμενος χρόνος για να επιτύχουμε την βέλτιστη εκχυλισιμότητα, κατά μέσο όρο, ήταν μικρότερος για τις προανθοκυανιδίνες PC (1,14 ώρες) και σχεδόν ο διπλάσιος για τις ολικές φλαβανόλες (TFl) (2,33 ώρες). Σύμφωνα με την πολικότητα των μορίων, θα έπρεπε να είχαμε παρατηρήσει πως οι διμερείς φλαβανόλες οι οποίες έχουν ενωθεί με ομάδες γαλλικού οξέος, όπως αυτές που παρατηρήθηκαν στα εκχυλίσματα **(Σχήμα 24)**, μπορεί να είναι τα πρώτα μόρια που απελευθερώθηκαν στο μέσο εκχύλισης, ακολουθούμενες από μονομερείς ενώσεις όπως η κατεχίνη και η επικατεχίνη.

Φαινολική σύσταση και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Παρατηρώντας την συσχέτιση μεταξύ του εκχυλίσματος των γιγάρτων του Μοσχοφίλερου, το οποίο περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ολικών φλαβανολών (TFl) και προανθοκυανιδινών (PC), και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας διαπιστώνουμε πως παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα τόσο με την δέσμευση των ελευθέρων ριζών A_{AR} όσο και με την αναγωγική τους δύναμη P_R αλλά μικρό συντελεστή συσχέτισης. Αντίθετα, για την ποικιλία Αγιωργίτικο συσχετισμός παρατηρείται μεταξύ ολικών πολυφαινολών, ολικών φλαβανολών και προανθοκυανιδινών μόνο με την δέσμευση των ελευθέρων ριζών (A_{AR}) ενώ για το Σαββατιανό μόνο οι ολικές φαινόλες (TP) και οι ολικές φλαβανόλες (TFl) παρουσιάζουν συσχέτιση με την δέσμευση των ελευθέρων ριζών (A_{AR}) **(Πίνακας 20**). Τα αποτελέσματα αυτά δεν οδηγούν σε κάποιο συγκεκριμένο συμπέρασμα με συνέπεια να θεωρήσουμε ότι ίσως η αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων φλαβανολών είναι αυτές που μάλλον καθορίζουν την γενική αντιοξειδωτική δύναμη των εκχυλισμάτων.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε λευκά κρασιά έδειξαν ότι η μείωση της αναγωγικής δράσης μπορεί να οφείλεται στις φλαβανόλες, σε αντίθεση με την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών A_{AR}, η οποία επηρεάστηκε από το σύνολο των φαινολικών

ομάδων, φαινόμενο που αποδόθηκε σε συνέργεια (Psarra et al., 2002). Επιπρόσθετα με τα παραπάνω, επισημαίνεται ότι οι φλαβανόλες ίσως επηρεάζουν περισσότερο την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των γιγάρτων των σταφυλιών, με σημαντικότερη επίδραση εκείνη της προκυανιδίνης B_1 (Guendez et al., 2005b). Κατά συνέπεια, οι διαφορές που βρέθηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε διαφορετικές φλαβανόλες.

Πράγματι, η δοκιμή διασποράς διαφορετικών φλαβανολών και των παραγώγων τους με το γαλλικό οξύ σε λινελαϊκό οξύ έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική τους δράση σε φθίνουσα σειρά έχει ως εξής: επιγαλλοκατεχίνη (EGC) > επικατεχίνη (EC) > κατεχίνη (CT) (Peyrat-Maillard, Cuvelier, & Berset, 2003). Επιπλέον, η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιώντας $DPPH^{\bullet}$ αποδεικνύει ότι οι διμερείς φλαβανόλες μπορεί να είναι περισσότερο δραστικές από τις μονομερείς, με την ακόλουθη σειρά: προκυανιδίνη B_1 (PCB_1) > προκυανιδίνη B_2 (PCB_2) > επικατεχίνη ECT > κατεχίνη CT (Villaño, Fernández-Pachón, Moyá, Troncoso, & García-Parrilla, 2007).

Όπως παρουσιάζεται από τους Bors et al., (2000), μία γραμμική αύξηση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφρασμένης σε trolox ισοδύναμα (TEAC) και του βαθμού δημιουργίας ολιγομερών παραγώγων έχει καταγραφεί για τις προανθοκυανιδίνες και συνέβαλε στην αύξηση των υδρόξυ- ομάδων, η οποία διπλασιάζεται σε κάθε διμερισμό. Αυτή η σαφής γραμμική σχέση που παρατηρείται για τις φλαβανόλες και τις προανθοκυανιδίνες σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα και τον αριθμό των ενεργών υδροξυ- ομάδων (χαρακτήρας κατεχόλης ή πυροκατεχόλης) υποδεικνύουν σαφώς κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στην οξείδωση μοντέλων λιπαρών υλών

Παραγωγή διαλυμάτων από εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποίησης

Τα διαλύματα που παρήχθησαν από τα εκχυλίσματα των βοστρύχων και των γιγάρτων, έχουν προέλθει χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης (όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 6).

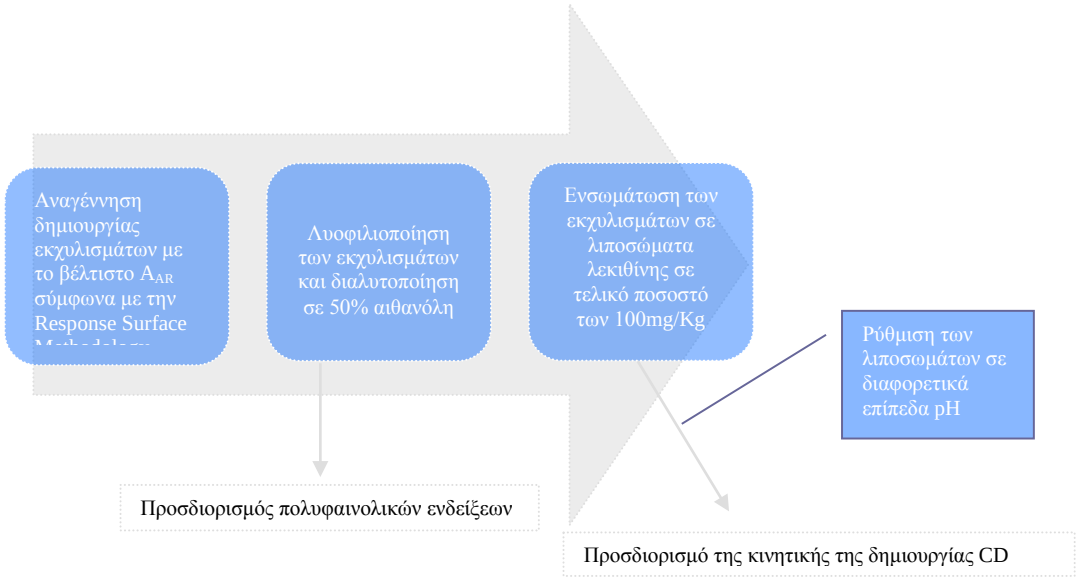
Σε αυτά τα πειράματα, υδραλκολικά διαλύματα που περιέχουν κιτρικό οξύ, ρυθμισμένα σε διαφορετικές τιμές pH, χρησιμοποιούνται για διαφορετικό χρονικό διάστημα προκειμένου να παράγουν εκχυλίσματα με το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο. Εντούτοις, από την στιγμή που αποδείχθηκε ότι η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών δεν συναρτάται με τις κύριες φαινολικές ομάδες αυτών των εκχυλισμάτων από τα υποπροϊόντα, ή η συσχέτιση ήταν μικρή, κρίθηκε καταλληλότερο να χρησιμοποιηθούν οι συνθήκες που παράγουν εκχυλίσματα με την μέγιστη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (A_{AR}). Οι συνθήκες παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 21**.

Πίνακας 21 : Βέλτιστες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση εκχυλισμάτων με το υψηλότερο A_{AR}.

Εκχύλισμα	**Βέλτιστες συνθήκες**		
	EtOH (%)	**pH**	**t (h)**
Βόστρυχες			
Μοσχοφίλερο	50	4	3
Σαββατιανό	40	6	5
Αγιωργίτικο	40	2	5
Γίγαρτα			
Μοσχοφίλερο	50	2	3
Σαββατιανό	40	6	1
Αγιωργίτικο	50	2	3

Τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευαστούν διαλύματα, που προορίζονται για την ενσωμάτωση σε λιποσώματα λεκιθίνης (πρότυπο λιπαρής ύλης), ώστε να

δοκιμαστεί η δραστικότητά τους στην πρόληψη της οξείδωσης των λιπιδίων. Μια συνολική εικόνα του πειραματικού σχεδιασμού παρουσιάζεται στο **Σχήμα 25**.



Σχήμα 25 : Σχηματική αναπαράσταση των σταδιακών βημάτων που ακολουθούνται για αξιολογηθεί η ικανότητα των αντιοξειδωτικών διαλυμάτων που δημιουργήθηκαν για να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων σε πρότυπο μοντέλο λιποσωμάτων λεκιθίνης.

Μια γενική εικόνα των εκχυλισμάτων παρουσιάζεται στον **Πίνακα 22** όπου προσδιορίστηκαν μερικές βασικές πολυφαινολικές παράμετροι, σε συνάρτηση με την ικανότητά των εκχυλισμάτων να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες A_{AR}. Στον πίνακα αυτό φαίνεται πως τα αντιοξειδωτικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν από το εκχύλισμα των βοστρύχων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο είχαν το υψηλότερο ποσοστό ολικών πολυφαινολών (TP) και υψηλά επίπεδα ολικών φλαβανολών (TFl). Επιπλέον, τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν από τα εκχυλίσματα των γιγάρτων της ποικιλία Μοσχοφίλερο και Αγιωργίτικο είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση προανθοκυανιδινών (PC). Αυτά τα εκχυλίσματα παρουσίασαν την μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (A_{AR}).

Πίνακας 22 : Πολυφαινολικές παράμετροι και τιμές A_{AR} των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν από τα εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποίησης.

Αντιοξειδωτικά διαλύματα	Φαινολικοί και αντιοξειδωτικοί δείκτες			
	TP[a]	**TFl**[a]	**PC**[b]	**A_{AR}**[c]
Βόστρυχες				
Μοσχοφίλερο	64,21±0,55	11,27±0,03	17,22±0,25	67,35±0,46
Σαββατιανό	2,90±0,29	1,21±0,01	6,46±0,12	38,67±0,80
Αγιωργίτικο	11,95±0,46	4,50±0,11	34,90±0,57	14,35±0,14
Γίγαρτα				
Μοσχοφίλερο	30,96±3,59	11,99±0,07	44,68±0,08	291,13±3,08
Σαββατιανό	4,66±0,14	1,80±0,03	12,35±0,15	54,93±0,29
Αγιωργίτικο	24,10±1,96	7,18±0,04	42,69±0,54	226,21±9,46

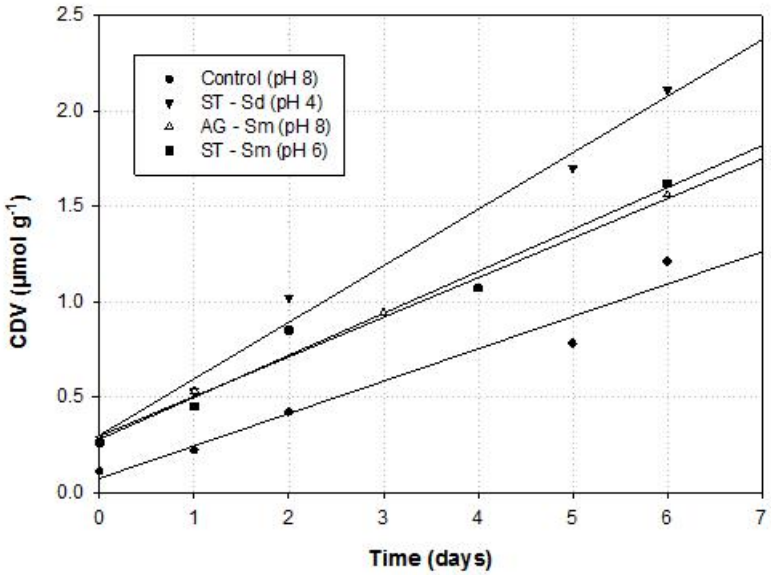
[a] Εκφρασμένα σε g ανά 100 g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

[b] Εκφρασμένα σε mg ανά 100 g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

[c] Εκφρασμένα σε ισοδύναμα mM trolox (TRE) ανά 100 g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

Δραστικότητα των εκχυλισμάτων στην παραγωγή συζυγών διενίων

Η οξείδωση των λιπιδίων καθορίστηκε από τον προσδιορισμό των συζυγών διενίων (CDV). Παρατηρώντας την εξέλιξη του σχηματισμού των συζυγών διενίων κατά την περίοδο 6 ημερών, βρέθηκε ότι υπήρχε γραμμική συνάρτηση με τον χρόνο, με συντελεστής συσχέτισης που ποικίλει από 0,90 έως 0,99 παρουσιάζοντας μια εικόνα κινητικής μηδενικής τάξης. Κατά συνέπεια η αρχή της δημιουργίας των συζυγών διενίων θα μπορούσε να περιγραφεί με κινητική μηδενικής τάξης βάση της οποίας υπολογίσθηκαν οι σταθερές της κινητικής από την κλίση των γραμμικών παλινδρομήσεων που παρατηρήθηκαν **(Γράφημα 12).**



Γράφημα 12 : Τυπικό παράδειγμα κινητικής μηδενικής τάξης της δημιουργίας συζυγών διενίων (CDV) σε λιποσώματα λεκιθίνης, ορών αντιοξειδωτικών διαλυμάτων, σε διαφορετικό pH. Συνδυασμοί: ST-Sd: εκχύλισμα γιγάρτων από την ποικιλία Σαββατιανό (*V. Vinifera),* AG-Sm: εκχύλισμα βοστρύχων από την ποικιλία Αγιωργίτικο (*V. vinifera*), ST-Sm: εκχύλισμα βοστρύχων από την ποικιλία Σαββατιανό (*V. vinifera*).

Οι παράμετροι τις κινητικής που υπολογίστηκαν ήταν: οι σταθερές κινητικής (*k*) και ο χρόνος ημιζωής ($t_{½}$). Στους **Πίνακες 23-25** δίνονται αναλυτικά οι τιμές των παραμέτρων για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Επειδή οι τιμές του χρόνου ημιζωής ($t_{½}$) εξαρτώνται από την αρχική συγκέντρωση, και η αρχική περιεκτικότητα σε CDV ποικίλλει σημαντικά στα δείγματα, κρίθηκε σωστότερο η σύγκριση να γίνει με βάση το *k*.

Στον **Πίνακα 23** φαίνεται ο συντελεστής *k* για τα τυφλά δείγματα (χωρίς την προσθήκη διαλύματος) και για τις πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες, κερκετίνη και ΒΗΤ. Ο αρχικός σχηματισμός των CDV βρέθηκε να αυξάνει σταδιακά από pH 2 έως 8, αλλά στα λιποσώματα που περιέχουν κερκετίνη σε pH 4, το ποσό των συζυγών διενίων (CDV) μειώθηκε κατά 51% σε σύγκριση με το τυφλό. Παρ' όλα αυτά, είναι χαρακτηριστικό ότι σε όλες τις τιμές pH στα διαλύματα κερκετίνης επιταχύνεται η υπεροξείδωση των λιπιδίων με την αύξηση της παραγωγής CDV. Αντίθετα από τα παραπάνω, το ΒΗΤ αποδείχτηκε περισσότερο δραστικό σε σχεδόν όλες τις τιμές pH που δοκιμάστηκαν (με εξαίρεση το pH 2) και στις τιμές pH 6 και 8, το *k* μειώθηκε από 47 μέχρι 71,8%, αντιστοίχως.

Πίνακας 23 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξεως υπολογισμένες για τα τυφλά δείγματα και τα καθαρά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν.

	k (μmol g^{-1} d^{-1}) × 10^{-2}	$t_{½}$ (d)	R^2
Τυφλό			
pH 2	12,4	3,51	0,969
pH 4	13,9	3,27	0,970
pH 6	16,6	4,37	0,978
pH 8	17,0	0,32	0,955
Κερκετίνη			
pH 2	14,2	1,73	0,958
pH 4	6,8	7,57	0,974
pH 6	27,2	0,24	0,994
pH 8	18,2	1,35	0,997
BHT			
pH 2	12,7	0,24	0,966
pH 4	12,0	2,46	0,971
pH 6	8,8	6,02	0,995
pH 8	4,8	17.5	0,992

Τα εκχυλίσματα των βοστρύχων παρουσίασαν δραστικότητα σε συνάρτηση με το pH και η αναστολή της δημιουργίας των συζυγών διενίων (CD) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα Μοσχοφίλερου σε pH 8 (61,2%), εκχυλίσματα Αγιωργίτικου σε pH 4 και 6 (34,5 και 27,1%, αντίστοιχα) και εκχυλίσματα Σαββατιανό pH 4 και 8 (11,27% και 38,2%) **(Πίνακας 24)**. Αντιθέτως, όλα τα εκχυλίσματα των γιγάρτων έδειξαν μια ισχυρότερη προοξειδωτική δράση, όπως δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση η παρεμπόδιση του σχηματισμού των συζυγών διενίων (CD), εκτιμώντας ότι το *k* αυξήθηκε από 9,7 έως 308,9%. Οι αυξήσεις αυτές είναι pH-εξαρτώμενες, όντας εντονότερες σε pH 8, όπου *k* αυξήθηκε κατά 140% (Μοσχοφίλερο), 107,6% (Αγιωργίτικο) και 102,4% (Σαββατιανό) **(Πίνακας 25).**

Πίνακας 24 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξης υπολογισμένες για τα δείγματα των βοστρύχων.

	k (µmol g^{-1} d^{-1}) × 10^{-2}	$t_{½}$ (d)	R^2
Μοσχοφίλερο			
pH 2	38,6	1,42	0,998
pH 4	27,5	2,60	0,999
pH 6	26,1	3,33	0,987
pH 8	6,6	6,52	0,978
Αγιωργίτικο			
pH 2	31,0	1,37	0,995
pH 4	9,1	3,46	0,900
pH 6	12,1	0,83	0,951
pH 8	20,7	0,68	0,995
Σαββατιανό			
pH 2	20,2	2,80	0,985
pH 4	8,7	6,21	0,998
pH 6	22,0	0,59	0,975
pH 8	10,5	0,57	0,981

Πίνακας 25 : Παράμετροι κινητικής μηδενικής τάξης υπολογισμένες για τα δείγματα των γιγάρτων.

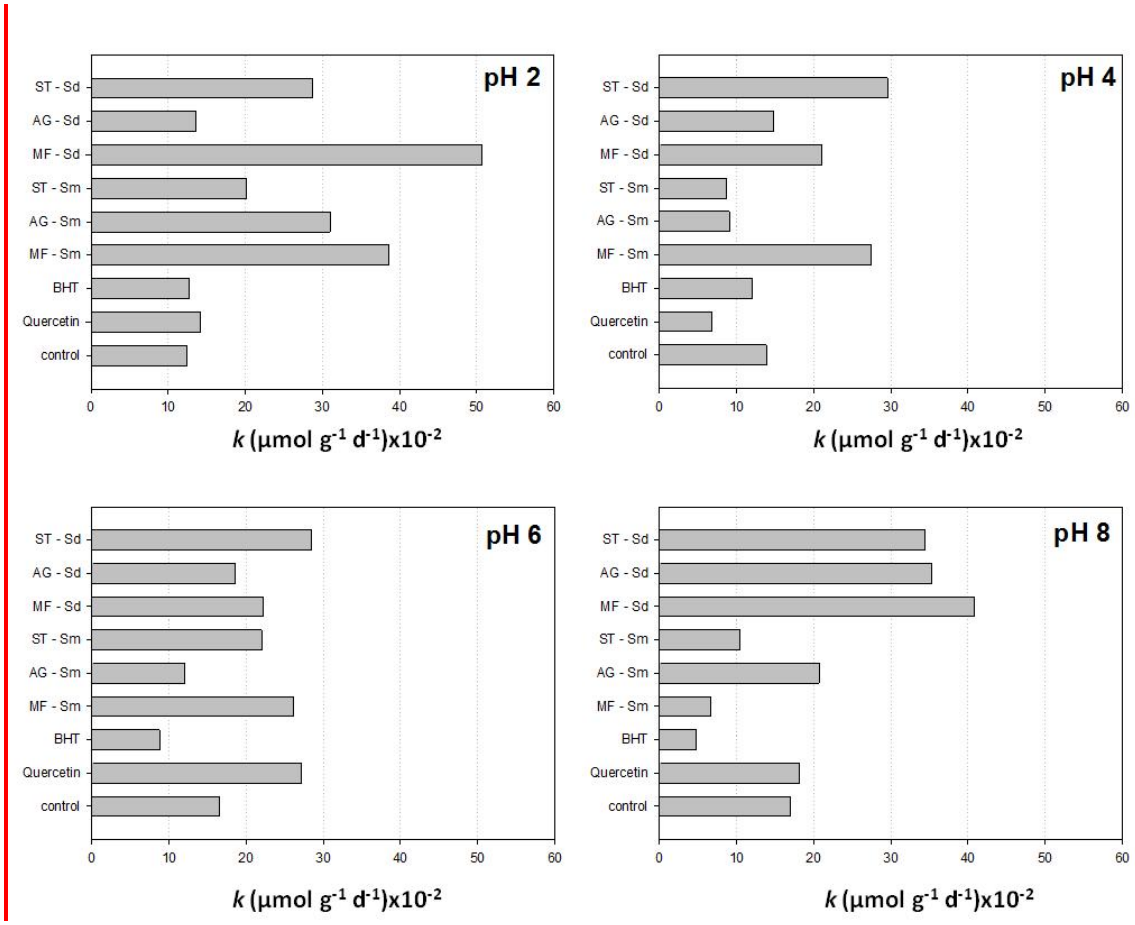
	k (μmol g^{-1} d^{-1}) × 10^{-2}	$t_{½}$ (d)	R^2
Μοσχοφίλερο			
pH 2	50,7	3,79	0,995
pH 4	21,1	4,36	0,950
pH 6	22,2	10,18	0,980
pH 8	40,8	9,85	0,999
Αγιωργίτικο			
pH 2	13,6	2,65	0,996
pH 4	14,8	5,27	0,996
pH 6	18,6	4,35	0,938
pH 8	35,3	5,58	0,978
Σαββατιανό			
pH 2	28,7	8,19	0,981
pH 4	29,6	0,95	0,988
pH 6	28,5	372	0,984
pH 8	34,4	2,44	0,998

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα λιποσώματα λεκιθίνης είναι ένα οικονομικό υλικό που σχετίζεται με τις λιπαρές ύλες τροφίμων. Χάρις στις ιδιότητές τους προτιμώνται για την εξέταση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ενός ευρέως φάσματος φυσικών ουσιών και εκχυλισμάτων, συμπεριλαμβανομένων της ρουτίνης και της κερκετίνης (Afanas'ev *et al*,. 1989), μεγάλης ποικιλίας πολυφαινολικών συστατικών (Heinonen *et al*., 1998), φλαβανολών και προανθοκυανιδινών (Verstraeten *et al*., 2003) και εκχυλισμάτων σταφυλιού (Yi *et al*., 1997).

Αν και υπάρχουν ουσιαστικά δεδομένα που αποδεικνύουν την σημαντική επίδραση του pH στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών (Chen and Hagerman, 2005; Amorati *et al*., 2006), η παράμετρος αυτή μάλλον σπάνια λαμβάνεται υπόψη στις δοκιμές των αντιοξειδωτικών, ενώ σε μερικές παραλείπεται εσφαλμένα. Σε αυτή την μελέτη, μια προσέγγιση σε αυτό το ζήτημα έγινε μελετώντας τα εκχυλίσματα των υποπροϊόντων σταφυλιών που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες.

Στο **Γράφημα 13**, οι τιμές *k* δίνονται για κάθε δοκιμή, ομαδοποιημένες σύμφωνα με το pH. Είναι αναμενόμενο τα εκχυλίσματα να εκφράζουν διαφορετική συμπεριφορά σε διαφορετικές τιμές pH, αλλά είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρουσιάστηκε καμία σημαντική τάση για κανένα από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Το πιο σημαντικό εύρημα ήταν ότι σε pH 2 όλα τα εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένης της κερκετίνης, παρουσίασαν προοξειδωτική δράση, δίνοντας υψηλότερες τιμές *k* από εκείνη του δείγματος ελέγχου. Επιπλέον, σε pH 8 όλα τα εκχυλίσματα των γιγάρτων παρουσιάζουν ισχυρή προοξειδωτική δράση μεταξύ 2 και 2,5 σε αυξημένες τιμές *k*.



Γράφημα 13 : Συγκριτικά διαγράμματα που επεξηγούν τις τιμές *k* της κινητικής της μηδενικής τάξεως παραγωγής των συζυγών διενίων (CDV) στα λιποσώματα λεκιθίνης, παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών σε διαφορετικές τιμές pH.

Η προσπάθεια να συσχετιστούν οι τιμές των πολυφαινολικών ενδείξεων στον **Πίνακα 22** με τις τιμές *k* δεν ήταν και ιδιαίτερα αποτελεσματική, καθώς οι συντελεστές συσχέτισης ήταν χαμηλοί και στατιστικά μη αποδεκτοί ($p > 0.05$). Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι κάθε παρατηρούμενη επίδραση (προοξειδωτική ή αντιοξειδωτική) είναι μάλλον μη συσχετιζόμενη με τις κύριες ομάδες πολυφαινολών που συναντάμε στα εκχυλίσματα πιθανώς εξαιτίας φαινομένων συνέργειας / ανταγωνισμού. Επιπρόσθετα με τα παραπάνω, η διαφορετική συμπεριφορά μεταξύ εκχυλισμάτων γιγάρτων και βοστρύχων δίνει έμφαση στον κύριο ρόλο που παίζει η φαινολική σύσταση.

Οι κύριες πολυφαινόλες στα γίγαρτα είναι οι φλαβανόλες και τα πολυμερή τους (προανθοκυανιδίνες), αλλά οι βόστρυχες περιέχουν επιπλέον υδροξυ-κινναμωμικά παράγωγα και φλαβονόλες. Αυτές οι δύο τελευταίες ομάδες δεν έχουν, μέχρι στιγμής, αναφερθεί στα γίγαρτα. Συνεπώς, θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι οι διαφορές μεταξύ της προοξειδωτικής / αντιοξειδωτικής δράσης σε συνάρτηση με το pH μπορεί να οφείλονται σε διαφορές της σύστασης. Στην πραγματικότητα, είχε προταθεί ότι οι φλαβανόλες, όπως οι επιγαλλοκατεχίνες, οι οποίες συναντώνται στα γίγαρτα και στους βόστρυχες, μπορούν να μετατραπούν σε συστατικά όπως οι κιννόνες με αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων υπεροξειδίου (Kondo *et al*., 1999). Αυτό μετατρέπει παρόμοιες ουσίες σε προοξειδωτικές. Παρομοίως, άλλες αναφορές (Bors *et al*., 2000) επίσης δείχνουν ότι οι φλαβανόλες είναι ιδανικοί δεσμευτές ελευθέρων ριζών, αλλά οι κιννόνες τους έχουν κυρίως προοξειδωτική δράση μέσω παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου που προκύπτουν από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Επιπρόσθετα, αποτελέσματα δείχνουν την επίδραση των ολιγομερών μικρής ανθρακικής αλυσίδας στην αντιοξειδωτική δράση των προανθοκυανιδινών (Lotito *et al*., 2000). Παρατηρήθηκε ότι μονομερείς, διμερείς και τριμερείς ενώσεις είναι πολύ πιο δραστικά αντιοξειδωτικά όταν η οξείδωση των λιποσωμάτων έχει αρχίσει στην υδατική φάση. Παρ' όλα αυτά, όταν η οξείδωση ξεκινάει στην λιπαρή φάση, οι προανθοκυανιδίνες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι περισσότερο δραστικές. Εντούτοις, ο βαθμός της παραγωγής των πολυμερισμένων φλαβανολών είναι ένα ακόμα σημαντικό σημείο της σύστασης των χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων, που μπορεί να ανακλάται στην αντιοξειδωτική τους δράση.

Επιπρόσθετα στης έκφραση της προοξειδωτικής ή αντιοξειδωτικής ικανότητας, η συμπεριφορά των εκχυλισμάτων θα πρέπει να μεταφραστεί με βάση την φαινολική τους σταθερότητα. Αποδείχθηκε ότι αυξάνοντας κατά μια μονάδα την τιμή του pH (από 3,5 σε 4,5) η αυτοξείδωση διαφόρων φλαβανολών αυξάνεται σημαντικά (Lin *et al*. 2007). Φυσικά, λοιπόν, περιμένουμε ότι σε pH 8 η οξείδωση των φλαβανολών είναι σημαντικά αυξημένη κυρίως στα εκχυλίσματα των γιγάρτων. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε επίσης ότι τα λιποσώματα που

περιέχουν λεκιθίνη προστατεύουν τις λιπόφιλες πολυφαινόλες από την οξείδωση. Θεωρώντας ότι οι φλαβόνες που περιέχονται στους βόστρυχες είναι σχετικά περισσότερο λιπόφιλες από τις φλαβανόλες, μπορούμε να πούμε ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχων δεν παρουσιάζουν τόσο εύκολα φαινόμενα αυτοξείδωσης όπως τα εκχυλίσματα των γιγάρτων που περιέχουν μόνο φλαβανόλες.

Μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ εκχυλισμάτων και πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών

DPPH: Εκχυλίσματα Βοστρύχων- Πρότυπες αντιοξειδωτικές ουσίες

Προσέγγιση γραμμικής συσχέτισης

Προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών και των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα εκχυλίσματα, αξιολογήθηκαν, αρχικά, διαλύματα εκχυλισμάτων και αντιοξειδωτικών ουσιών ξεχωριστά. Στον **Πίνακα 26** παρουσιάζονται οι εξισώσεις και οι στατιστικές παράμετροι που δείχνουν την σχέση των αντιοξειδωτικών ουσιών με την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH.

Πίνακας 26 : Εύρος συγκέντρωσης και στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ του $\%\Delta A_{515}$ και καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών αλλά και των εκχυλισμάτων.

Συστατικά	**Εύρος συγκέντρωσης (mg L^{-1})**	**Εξίσωση**	**R^2**
Ασκορβικό οξύ	5 - 80	y = 0,252x – 0,378	0,998
α-τοκοφερόλη	5 - 80	y = 0,122x + 0,768	0,998
Βόστρυχες Μοσχοφίλερο	20- 240*	y = 0,326x + 5,152	0,999
Βόστρυχες Αγιωργίτικο	5 – 120*	y = 0,524x + 4,083	0,993
Βόστρυχες Σαββατιανό	5 – 240*	y = 0,285x + 0,766	0,998

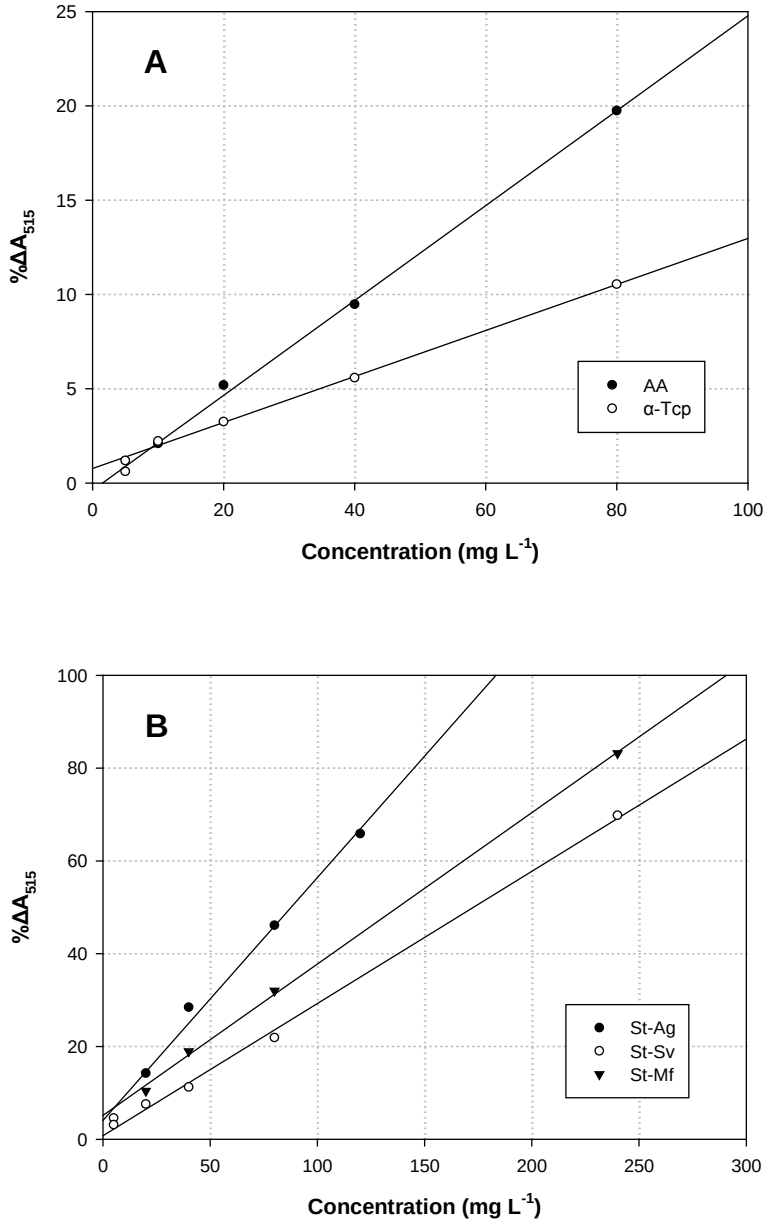
* αφορούν συγκεντρώσεις ολικών πολυφαινολών σε mg GAE/L

$\%\Delta A_{515}$: ποσοστό μείωσης δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

x: συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών/ εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε mg L^{-1}

Σε όλες τις περιπτώσεις, η κλίμακα των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια που να αντιστοιχεί σε γραμμική περιοχή (R^2>0,99). Οι συγκεντρώσεις των ολικών πολυφαινολών των εκχυλισμάτων εκφράστηκαν σε mg GAE/L^{-1} σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Στο παρακάτω σχήμα **(Γράφημα 14)**, παρουσιάζεται σε μορφή διαγράμματος η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών ($\%\Delta A_{515}$) και των συγκεντρώσεων του ασκορβικού οξέος και της α-τοκοφερόλης.

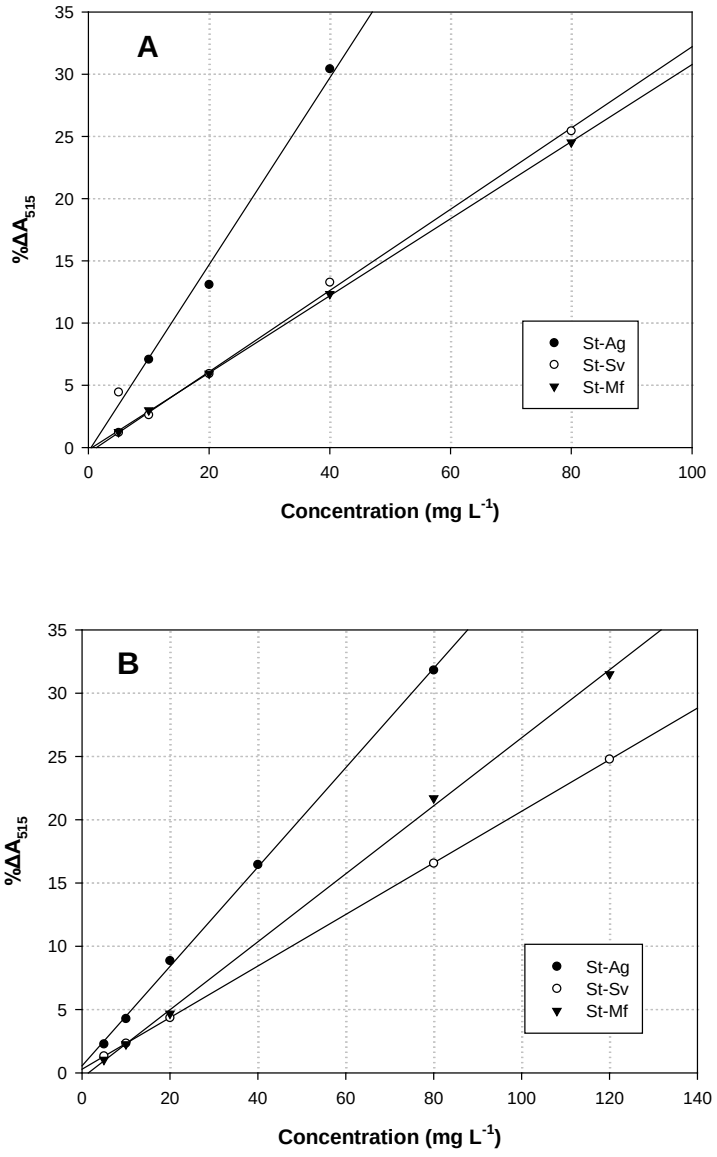


Γράφημα 14 : Γράφημα που περιγράφει τη συσχέτιση μεταξύ του ($\%\Delta A_{515}$) και των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών ασκορβικό οξύ (AA) και α-τοκοφερόλη (α-Tcp) (A) και εκείνη με τα εκχυλίσματα των βοστρύχων (B).

Από τις εξισώσεις που περιγράφουν τη γραμμική συσχέτιση των ουσιών με την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH, στον **Πίνακα 26**, παρατηρείται ότι το ασκορβικό οξύ είναι περισσότερο δραστικό σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη. Επίσης στο **Γράφημα 15** παρατηρείται η συσχέτιση μεταξύ του $\%\Delta A_{515}$ και των ολικών πολυφαινολών (TP) των εκχυλισμάτων. Στην περίπτωση αυτή διαπιστώθηκε πως τα εκχυλίσματα των βοστρύχων

παρουσιάζουν την ακόλουθη φθίνουσα ικανότητα δέσμευσης της αντιοξειδωτικής ρίζας DPPH: Βόστρυχες Αγιωργίτικου (St-Ag) > Βόστρυχες Μοσχοφίλερου (St-Mf) > Βόστρυχες Σαββατιανού (St-Sv).

Ταυτόχρονα υπολογίστηκε θεωρητικά η αντιοξειδωτική ικανότητα μιγμάτων από ίσες ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών και εκχυλισμάτων υπολογίζοντας την γραμμική συσχέτιση των μιγμάτων εκχύλισμα/αντιοξειδωτική ουσία με το $\%\Delta A_{515}$ το οποίο παρουσιάζεται στο **Γράφημα 15**.



Γράφημα 15 : Γράφημα που περιγράφει τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του ($\%\Delta A_{515}$) και της συνολικής συγκέντρωσης (Α) εκχυλισμάτων + ασκορβικό οξύ και (Β) εκχυλισμάτων + α-τοκοφερόλη σε ίσες ποσότητες.

Επιπρόσθετα, δημιουργήθηκαν διαλύματα πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών και των εκχυλισμάτων έτσι ώστε να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρότυπων

αντιοξειδωτικών ουσιών και των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Από τα μίγματα αυτά προέκυψε ο **Πίνακας 27**.

Πίνακας 27 : Εύρος συγκεντρώσεων και στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόζοντας γραμμική συσχέτιση μεταξύ του $\%\Delta A_{515}$ και μιγμάτων καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών/εκχυλισμάτων.

Μίγματα	Εύρος συγκεντρώσεων ($mg\ L^{-1}$)	Εξίσωση	R^2
Βόστρυχες Αγιωργίτικο / Ασκορβικό οξύ	5-40	y = 0,751x – 0,326	0,990
Βόστρυχες Σαββατιανό / Ασκορβικό οξύ	5-80	y = 0,326x – 0,434	0,999
Βόστρυχες Μοσχοφίλερο / Ασκορβικό οξύ	5-80	y = 0,310x – 0,188	1,000
Βόστρυχες Αγιωργίτικο / α- τοκοφερόλη	5-80	y = 0,392x + 0,559	0,999
Βόστρυχες Σαββατιανό / α- τοκοφερόλη	5-120	y = 0,204x + 0,288	1,000
Βόστρυχες Μοσχοφίλερο / α- τοκοφερόλη	5-120	y = 0,269x – 0,385	0,999

Προκειμένου να προσδιορισθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα με τις αντιοξειδωτικές ουσίες (ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη) επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 50 $mg\ L^{-1}$ και χρησιμοποιώντας την εξίσωση του **Πίνακα 26** για το ασκορβικό οξύ προκύπτει ότι $\%\Delta A_{515}$=12,22. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την εξίσωση για τους βόστρυχες του Αγιωργίτικου από τον ίδιο πίνακα προκύπτει $\%\Delta A_{515}$=30,28. Με τον ίδιο τρόπο, αντικαθιστώντας την εξίσωση που αντιπροσωπεύει το μίγμα των βοστρύχων του Αγιωργίτικου με το ασκορβικό οξύ από τον **Πίνακα 27** δίνει $\%\Delta A_{515}$=37,22.

Επιπλέον, αντικαθιστώντας το $\%\Delta A_{515}$ στην σχέση (3) σελίδα 89, προσδιορίζεται η αλληλεπίδραση των ουσιών του μίγματος με αποτέλεσμα να έχουμε αλληλεπίδραση μίγματος, ΜΕ=0,88, που αποδεικνύει ανταγωνισμό μεταξύ τους. Εντούτοις, η υποθετική τιμή, 50 $mg\ L^{-1}$, που έχει επιλεγεί δεν εμπίπτει στα όρια της γραμμικότητας της εξίσωσης των βοστρύχων Αγιωργίτικου/ ασκορβικού οξέος στον **Πίνακα 27**. Αυτό δεν συμβαίνει επειδή η ευρεθείσα τιμή του $\%\Delta A_{515}$ είναι υψηλότερη από το θεωρητικό ανώτερο όριο (100) αλλά επειδή πάνω από τα 40 $mg\ L^{-1}$ ίσως οι αλληλεπιδράσεις να μην ακολουθούν την ίδια γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, οι αλληλεπιδράσεις μελετούνται με την χρήση παραγοντικού σχεδιασμού στον οποίο συμμετέχουν οι συγκεντρώσεις τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των αντιοξειδωτικών ουσιών.

Προσέγγιση μέσω παραγοντικού σχεδιασμού

Οι πειραματικές τιμές $\%\Delta A_{515}$ αναλύθηκαν μέσω της διαδικασίας της ελάχιστης απόκλισης, που χρησιμοποιείται σε δευτεροβάθμιες πολυωνυμικές εξισώσεις όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 28** με βάση τους συντελεστές συσχέτισης (R^2).

Πίνακας 28 : Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο $\%\Delta A_{515}$ για όλα τα αντιοξειδωτικά μίγματα, οι οποίες υπολογίστηκαν με την χρήση του 3×3 παραγοντικού συστήματος

Αντιοξειδωτικά Μίγματα	**Δευτεροβάθμια πολυώνυμη εξίσωση**	R^2	p
Συνδυασμός με ασκορβικό οξύ			
Βόστρυχες Αγιωργίτικου	$50.56 + 9.87X_1 + 25.10X_2 – 3.14X_1X_2 – 1.27X_1^2 – 5.56X_2^2$	0,996	< 0,0001
Βόστρυχες Σαββατιανού	$29.72 + 11.19X_1 + 15.46X_2 – 0.96X_1X_2 – 1.31X_1^2 + 1.55X_2^2$	0,995	< 0,0001
Βόστρυχες Μοσχοφίλερου	$31.96 + 8.81X_1 + 17.32X_2 – 3.25X_1X_2 + 0.02X_1^2 + 0.48X_2^2$	0,996	< 0,0001
Συνδυασμός με α-Τοκοφερόλη			
Βόστρυχες Αγιωργίτικου	$39.82 + 1.05X_1 + 26.63X_2 + 0.89X_1X_2 – 1.93X_1^2 – 6.18X_2^2$	0,999	< 0,0001
Βόστρυχες Σαββατιανού	$18.00 + 0.85X_1 + 14.68X_2 + 0.42X_1X_2 – 0.08X_1^2 + 0.93X_2^2$	0,998	< 0,0001
Βόστρυχες Μοσχοφίλερου	$24.98 + 0.24X_1 + 20.57X_2 – 0.35X_1X_2 + 0.11X_1^2 – 1.59X_2^2$	1,000	< 0,0001

Ο πειραματικός σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε αξιολόγησε την επίδραση 2 παραγόντων: α) της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών, β) της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων των βοστρύχων (**Πίνακας 5)**.

Οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών της εξεταζόμενης διαδικασίας (X_1 και X_2), οι τιμές των μετρήσεων και οι εκτιμώμενες τιμές για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιηθήκαν για το $\%\Delta A_{515}$ δίνονται αναλυτικά στους **Πίνακες 29-34.**

Πίνακας 29 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές (%ΔA_{515}) για το μίγμα βόστρυχες Αγιωργίτικου/ Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες Μεταβλητές**		**Αποτελέσματα (%ΔA_{515})**	
	X_1	**X_2**	**Πειραματικά**	**Προβλεφθέντα**
1	-1	-1	5,83	5,63
2	-1	1	61,71	62,10
3	1	-1	32,01	31,65
4	1	1	75,33	75,57
5	-1	0	39,62	39,43
6	1	0	59,05	59,17
7	0	-1	19,35	19,91
8	0	1	70,74	70,10
9	0	0	51,50	50,56
10	0	0	49,56	50,56

Πίνακας 30 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές (%ΔA_{515}) για το μίγμα βόστρυχες Σαββατιανό/Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	**Ανεξάρτητες Μεταβλητές**		**Αποτελέσματα (%ΔA_{515})**	
	X_1	**X_2**	**Πειραματικά**	**Προβλεφθέντα**
1	-1	-1	3,00	2,35
2	-1	1	34,40	35,20
3	1	-1	28,02	26,65
4	1	1	55,57	55,65
5	-1	0	17,36	17,22
6	1	0	38,30	39,60
7	0	-1	13,79	15,81
8	0	1	47,60	46,73
9	0	0	30,52	29,72
10	0	0	30,08	29,72

Πίνακας 31 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές (%ΔA_{515}) για το μίγμα βόστρυχες Μοσχοφίλερο/Ασκορβικό οξύ προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός	**Ανεξάρτητες Μεταβλητές**	**Αποτελέσματα (%ΔA_{515})**

Σχεδιασμός				
	X_1	X_2	Πειραματικά	Προβλεφθέντα
1	-1	-1	2,12	3,09
2	-1	1	43,23	44,23
3	1	-1	27,57	27,20
4	1	1	55,70	55,36
5	-1	0	25,16	23,18
6	1	0	40,09	40,80
7	0	-1	15,73	15,12
8	0	1	50,43	49,77
9	0	0	32,34	31,96
10	0	0	30,32	31,96

Πίνακας 32 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Αγιωργίτικο/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	Ανεξάρτητες Μεταβλητές		Αποτελέσματα ($\%\Delta A_{515}$)	
	X_1	X_2	Πειραματικά	Προβλεφθέντα
1	-1	-1	5,16	4,92
2	-1	1	56,03	56,40
3	1	-1	6,17	5,24
4	1	1	60,59	60,28
5	-1	0	36,98	36,84
6	1	0	37,69	38,93
7	0	-1	5,85	7,01
8	0	1	60,33	60,27
9	0	0	40,66	39,82
10	0	0	40,07	39,82

Πίνακας 33 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Σαββατιανό/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	Ανεξάρτητες Μεταβλητές	Αποτελέσματα ($\%\Delta A_{515}$)

	X_1	X_2	Πειραματικά	Προβλεφθέντα
1	-1	-1	3,93	3,74
2	-1	1	31,9	32,25
3	1	-1	4,70	4,61
4	1	1	34,33	34,80
5	-1	0	17,25	17,06
6	1	0	19,15	18,77
7	0	-1	3,97	4,25
8	0	1	34,44	33,60
9	0	0	17,12	18,00
10	0	0	18,31	18,00

Πίνακας 34 : Πειραματικές και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για το μίγμα βόστρυχες Μοσχοφίλερο/α-Τοκοφερόλη προσδιορισθείσες για κάθε πειραματικό σχεδιασμό.

Πειραματικός Σχεδιασμός	Ανεξάρτητες Μεταβλητές		Αποτελέσματα ($\%\Delta A_{515}$)	
	X_1	X_2	Πειραματικά	Προβλεφθέντα
1	-1	-1	2,32	2,34
2	-1	1	45,17	44,18
3	1	-1	3,24	3,52
4	1	1	43,72	43,97
5	-1	0	24,88	24,85
6	1	0	25,87	25,34
7	0	-1	3,13	2,82
8	0	1	44,22	43,97
9	0	0	24,74	24,98
10	0	0	24,67	24,98

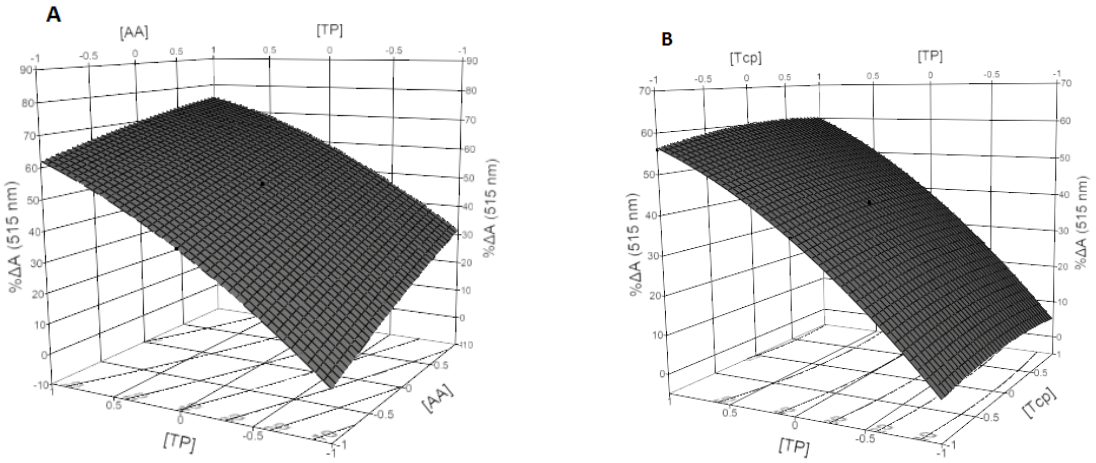
Οι πειραματικές τιμές παρουσίασαν μια καλή συσχέτιση με τις εξισώσεις, οι οποίες ήταν στατιστικά αποδεκτές σε επίπεδο σημαντικότητας τουλάχιστον 99,99% ($p < 0,0001$). Αυτό το γεγονός δείχνει ένα πολύ ικανοποιητικό βαθμό συμφωνίας μεταξύ των πειραματικών και των

προβλεφθέντων αποτελεσμάτων καθώς επίσης και ότι οι εξισώσεις που έχουν δοθεί μπορούν επαρκώς να προβλέψουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Η χρήση των προγνωστικών μοντέλων επέτρεψε τον θεωρητικό υπολογισμό των βέλτιστων συνθηκών, κάτω από τις οποίες μπορεί να επιτευχθεί το μέγιστο $\%\Delta A_{515}$ (**Πίνακας 35**), μέσα στα προκαθορισμένα διαστήματα συγκέντρωσης.

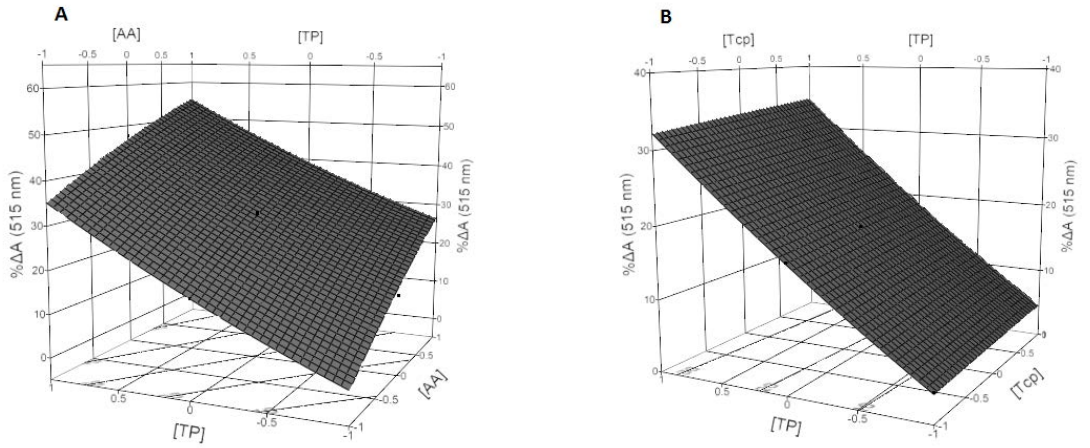
Πίνακας 35 : Βέλτιστες, πειραματικές συνθήκες και προβλεφθείσες τιμές ($\%\Delta A_{515}$) για όλα τα δοκιμασμένα μίγματα, μετά την εφαρμογή του 3x3 παραγοντικού συστήματος.

Μίγματα	**Μέγιστες προβλεφθείσες τιμές**	**Βέλτιστες αναλογίες (mg L^{-1} / mg L^{-1})**
St-Ag / AA	75,31 ± 2,10	105 / 105
St-Sv / AA	55,22 ± 3,85	105 / 105
St-Mf / AA	55,36 ± 3,98	105 / 105
St-Ag / α-Tcp	60,75 ± 2,19	105 / 80.2
St-Sv / α-Tcp	34,80 ± 1,85	105 / 105
St-Mf / α-Tcp	44,18 ± 3,14	105 / 5

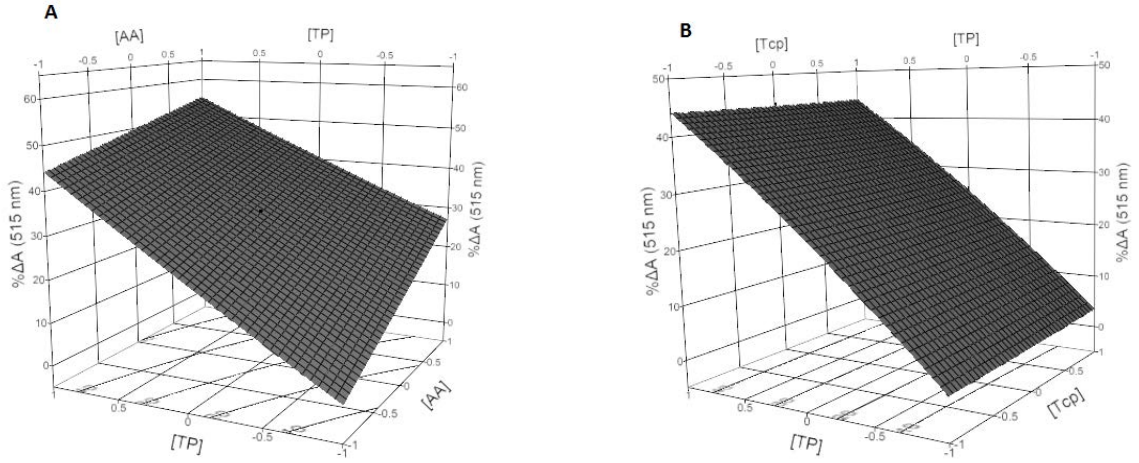
Οι τάσεις που αποκαλύφτηκαν σε κάθε περίπτωση καταγράφηκαν υπό μορφή τρισδιάστατων πλακών (**Γράφημα 16-18**).



Γράφημα 16 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔA515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (A) TP και AA και (B) TP και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Αγιωργίτικου.



Γράφημα 17 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔA515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (A) TP και AA και (B) TP και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Σαββατιανού.



Γράφημα 18 : Τρισδιάστατα διαγράμματα που παρουσιάζουν τις μεταβολές του %ΔA515 με τις ταυτόχρονες μεταβολές των συγκεντρώσεων (A) TP και AA και (B) TP και α-Tcp, για το εκχύλισμα των βοστρύχων του Μοσχοφίλερου.

Προκειμένου να εξεταστεί η ισχύς μοντέλων που δημιουργήθηκαν, ή για να επισημανθούν οι αποκλίσεις από την τάση της γραμμής, έγινε μια ακόμα υπόθεση. Χρησιμοποιήθηκαν ισόποσες, θεωρητικές, συγκεντρώσεις και για τις δύο συμμετέχουσες ουσίες όσον αφορά την εξίσωση του μίγματος βόστρυχες Αγιωργίτικου/ ασκορβικού οξέος (**Πίνακας 28**). Οι κωδικοποιημένες τιμές που αντιστοιχούν σε μια συγκέντρωση 25 mg L^{-1} για το AA και 25 mg /L^{-1} (συνολική συγκέντρωση = 50 mg L^{-1}), έδωσαν σαν αποτέλεσμα $\%\Delta A_{515}$ = 30,58. Ακριβώς όπως στην προσέγγιση γραμμικής παλινδρόμησης, υπολογίζεται ότι η αλληλεπίδραση μίγματος (mixture effect: ME) ισοδυναμεί με τιμές του ME= 0,72 γεγονός που αιτιολογεί ότι οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε ανταγωνισμό. Με τον ίδιο τρόπο και χρησιμοποιώντας όλες τις

εξισώσεις του **Πίνακα 28**, το ΜΕ για όλους τους δοκιμασμένους συνδυασμούς υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 36**. Όπως μπορεί κανείς να δει, οι αλληλεπιδράσεις των εκχυλισμάτων τόσο με το ασκορβικό οξύ (ΑΑ) όσο και με την α-τοκοφερόλη (α-TCP) φανερώνουν ανταγωνιστική αλληλεπίδραση.

Πίνακας 36 : Η αλληλεπίδραση μίγματος (ΜΕ: mixture effect) που παρατηρήθηκε από την αλληλεπίδραση των εκχυλισμάτων και των αντιοξειδωτικών ουσιών.

Αντιοξειδωτικό	**Εκχύλισμα**		
	Βόστρυχες Αγιωργίτικο	**Βόστρυχες Σαββατιανό**	**Βόστρυχες Μοσχοφίλερο**
Ασκορβικό οξύ	0,72	0,60	0,54
α-Τοκοφερόλη	0,60	0,48	0,50

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η "απενεργοποίηση" των οξειδωτικών μορίων από τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά (POH) βασίζεται σε ποικίλους τρόπους όπως έχει ήδη αναφερθεί.

$$PO^{\bullet} + PO^{\bullet} \rightarrow PO\text{-}OP$$

Έχει αναφερθεί πως στα δυαδικά μίγματα αντιοξειδωτικών, εμφανίζονται διάφορα φαινόμενα, μεταξύ των οποίων κάποιες αντιδράσεις αναγέννησης οι οποίες θα μπορούσαν να εξηγήσουν το συντελεστή ΜΕ που παρατηρείται σύμφωνα με τον Peyrat-Maillard (Peyrat-Maillard *et al.*, 2003). Υπό αυτές τις συνθήκες, τα προσδοκώμενα αποτελέσματα θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν (i) συνεργιστική επίδραση εάν το λιγότερο ισχυρό αναγεννά το ισχυρότερο, (ii) ανταγωνιστική επίδραση εάν το αποδοτικότερο μόριο αναπαράγει την λιγότερο αποδοτική ουσία ή (iii) καμία επίδραση, εάν και τα δύο αντιοξειδωτικά έχουν την ίδια αποδοτικότητα. Κατά συνέπεια σε μια δεδομένη αντιοξειδωτική δοκιμή είναι σημαντικό να ταξινομηθούν οι χρησιμοποιούμενες ουσίες, σε μια σειρά κατάταξης με βάση την ισχύ τους, δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις τους είναι βασισμένες στη σχετική αντιοξειδωτική δύναμή τους.

Εξετάζοντας τις κλίσεις των εξισώσεων που περιγράφουν τις γραμμικές σχέσεις στον **Πίνακα 27**, η σειρά της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών είναι η ακόλουθη:

Βόστρυχες Αγιωργίτικου > Βόστρυχες Μοσχοφίλερου > Βόστρυχες Σαββατιανού > Ασκορβικό Οξύ > α-Τοκοφερόλη.

Απ' όλα τα μίγματα που εξετάστηκαν, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση με αποτέλεσμα ο ανταγωνισμός που παρατηρήθηκε να είναι λογικός μιας και είναι πιθανόν να έχει προκληθεί αναγέννηση είτε του ασκορβικού οξέος είτε της α-τοκοφερόλης από τις πολυφαινόλες που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Αυτή η θεωρία μπορεί να αιτιολογηθεί από την παραδοχή ότι, όπως αναφέρεται ανωτέρω, το αποδοτικότερο μόριο αναγεννά το λιγότερο ισχυρό. Λαμβάνοντας υπόψη τα δυναμικά οξείδωσης, ως ανταγωνισμός μπορεί να θεωρηθεί η αναγέννηση μιας ένωσης με υψηλό δυναμικό οξείδωσης, από μία άλλη με χαμηλότερη δυνατότητα οξείδωσης, με προσφορά ατόμων υδρογόνου. Ως εκ τούτου, η αναγέννηση είτε του ασκορβικού οξέος είτε της α-τοκοφερόλης από πολυφαινόλες με συνέπεια τον ανταγωνισμό θα μπορούσε να εμφανιστεί εάν το πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος είχε συνολικά χαμηλότερο δυναμικό οξείδωσης είτε από το ασκορβικό οξύ είτε από την α-τοκοφερόλη.

Μελέτες κατανομής αποδεικνύουν πως πολυφαινόλες όπως οι κατεχίνες, οι οποίες έχουν χαμηλότερο οξειδωτικό δυναμικό από το ασκορβικό οξύ, παρουσία ασκορβικού οξέος μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ικανότητα του να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες (Abou Samra et al., 2011). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, σε προηγουμένη μελέτη, (Karvela *et al*., 2009), η οποία στηριζόταν σε λεπτομερή ανάλυση του φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων, έδειξε πως οι κυρίαρχες πολυφαινολικές ενώσεις είναι οι κατεχίνες και μερικές προανθοκυανιδίνες οι οποίες είναι ολιγομερείς κατεχίνες. Κατά συνέπεια, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η δράση των εκχυλισμάτων παρουσία ασκορβικού οξέος είναι παρόμοια με εκείνη του μίγματος κατεχίνη/ ασκορβικό οξύ.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, οι μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις φλαβανολών/α-τοκοφερόλης αποδεικνύουν ότι τα διάφορα παράγωγα φλαβανολών μπορούν πολύ αποτελεσματικά να αναδημιουργήσουν α-τοκοφερόλη, με υψηλότερο ρυθμό αποδοτικότητας από τις ουσίες που έχουν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση (Mukai et al., 2005). Όσον αφορά τα δεδομένα της αναγέννησης της α-τοκοφερόλης από τις φλαβανόλες είναι σε απόλυτη συμφωνία τόσο για τα φωσφολιπιδικά μοντέλα (Pazos et al., 2009), και φλαβανόλες από τσάι σε λινελαϊκό οξύ (Jia et al., 1998) ή μεθυλεστέρα του λινελαϊκού (Pedrielli & Skibsted, 2002).

Εάν και τα ανταγωνιστικά φαινόμενα που έχουν καταγραφεί θα μπορούσαν να επαληθευθούν από τις εξισώσεις που εξήχθησαν από την γραμμική συσχέτιση **(Πίνακες 26-27),** μελέτες που αναφέρονται σε δυαδικά μίγματα αντιοξειδωτικών δείχνουν πως η ικανότητα αναπαραγωγής ενός αντιοξειδωτικού από ένα άλλο εξαρτάται και από την συγκέντρωση των δυο αντιοξειδωτικών μέσα στο μίγμα. Αυτό έχει αποδειχθεί σε μία σειρά από μίγματα φλαβονοειδών χρησιμοποιώντας τις μεθόδους DPPH˙ και FRAP (Hidalgo et al., 2010), συνδυασμούς α-τοκοφερόλης και ασκορβικού οξέος με διάφορες φλαβονόλες (Hiramoto Miura, et al., 2002), κερκετίνη με α-τοκοφερόλη και ασταξανθίνη (Becker et al., 2007), και συνδυασμούς α-τοκοφερόλης και μυρισετίνης (Marinova et al., 2008).

Επομένως, χρησιμοποιώντας ίδιες ποσότητες είτε ασκορβικού οξέος είτε α-τοκοφερόλης και ολικών πολυφαινολών, η αναφερόμενη ένδειξη που προσδιορίζει το μέγεθος του ανταγωνισμού μπορεί να είναι παραπλανητική, δεδομένου ότι η βέλτιστη απόδοση εξαρτάται από τη σχετική αναλογία των αλληλεπιδρώντων συστατικών. Για να ξεπεραστεί αυτή η ανακριβής εκτίμηση των αποτελεσμάτων, εφαρμόσθηκε ένας παραγοντικός σχεδιασμός που είχε σκοπό να ανιχνεύσει τις τάσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε συνδυασμό με τις εναλλαγές των συγκεντρώσεων του ασκορβικού οξέος ή της α-τοκοφερόλης και του φαινολικού δυναμικού των εκχυλισμάτων.

Τα αποτελέσματα από την χρήση του παραγοντικού σχεδιασμού έδειξαν ότι η συγκέντρωση των πολυφαινολών έχει πάντοτε στατιστικά σημαντική συμβολή στην έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των εξετασθέντων μιγμάτων **(Πίνακας 36)**, αλλά στα μίγματα που περιέχουν ασκορβικό οξύ, η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος επηρέαζε και αυτή σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση.

Απ’ την άλλη πλευρά, σε καμία περίπτωση η περιεκτικότητα της α-τοκοφερόλης δεν ήταν σημαντικός παράγοντας, ένα φαινόμενο που θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των βοστρύχων σε σύγκριση με εκείνη της α-τοκοφερόλης **(Πίνακας 25).** Εάν αυτό ισχύει για το ασκορβικό οξύ, φαίνεται πως υπάρχει ένα κατώτατο όριο, κάτω από το οποίο η συγκέντρωση ενός αντιοξειδωτικού δεν έχει καμία σημασία όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα. Πράγματι, κρίνοντας σύμφωνα με τις τιμές του ΜΕ που παρουσιάστηκαν στον **Πίνακα 36**, το μέγεθος του ανταγωνισμού ήταν μεγαλύτερο στα μίγματα που περιείχαν α-τοκοφερόλη. Αυτή η υπόθεση θα πρέπει να διευκρινιστεί από πιο λεπτομερείς μελέτες που περιλαμβάνουν πρότυπες πολυφαινόλες.

Μέρος Ε΄: Συμπεράσματα

Κεφάλαιο 7^{ο}

Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων και αξιολόγηση εκχυλισμάτων

Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν, για πρώτη φορά, πώς οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βελτιστοποίηση της εκχυλισιμότητας των φαινολικών συστατικών από φυτικούς ιστούς, ποικίλλουν ακόμα και όταν πρόκειται για τον ίδιο ιστό που προέρχεται από διαφορετικές ποικιλίες.

Οι βόστρυχες φαίνεται να περιέχουν κυρίως φλαβανόλες και γλυκοζίτες των φλαβονολών, αλλά οι ενώσεις που καθορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων είναι οι ολιγομερείς φλαβανόλες και οι προανθοκυανιδίνες (πολυμερείς φλαβανόλες). Η διαπίστωση, επίσης, πως οι διάφορες κατηγορίες πολυφαινολικών δομών, που υπάρχουν στους βόστρυχες, απαιτούν και διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, είναι σημαντική, μιας και μπορεί να βοηθήσει στην επιλεκτική εκχυλισιμότητα και τον εμπλουτισμό εκχυλισμάτων σε συγκεκριμένα συστατικά. Παρ' όλα αυτά, οι μεγάλες διαφορές των συνθηκών εκχύλισης που παρατηρούνται, θα πρέπει να προσεχθούν σε περιπτώσεις όπου δεν επιθυμούμε μία συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών συστατικών αλλά την μέγιστη παραλαβή φαινολικών ενώσεων από το συγκεκριμένο ιστό.

Όπως και στους βόστρυχες, έτσι και στα γίγαρτα οι συνθήκες βέλτιστης εκχύλισης ποικίλουν όχι μόνο από την προέλευση του ιστού (βόστρυχες, γίγαρτα, φλοιοί), αλλά και από τις ποικιλίες καθώς επίσης και από το διαφορετικό στάδιο επεξεργασίας κατά την οινοποίηση που θα παραληφθούν. Εάν τα γίγαρτα προέρχονται από κόκκινα στέμφυλα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή κόκκινου κρασιού, τότε ενδέχεται να έχουμε μερική εκχύλιση φαινολικών τάξεων. Η ποικιλομορφία αυτή στην σύσταση, ως αποτέλεσμα της οινοποιητικής διαδικασίας, επηρεάζει ουσιαστικά το πολυφαινολικό προφίλ και κατά συνέπεια τις απαιτούμενες συνθήκες για την πιο δραστική ανάκτηση. Τα γίγαρτα των σταφυλιών φάνηκε να περιέχουν κυρίως φλαβανόλες και διμερή φλαβανολών, τα οποία μάλλον καθορίζουν την αντιοξειδωτική δράση των παραγόμενων εκχυλισμάτων.

Συμπεριφορά των εκχυλισμάτων σε οξειδωτικά φαινόμενα λιποσωμάτων λεκιθίνης

Η δημιουργία των συζυγών διενίων σε λιποσώματα λεκιθίνης που επωάστηκαν στους 45°C για 6 ημέρες φαίνεται να υπακούουν σε κινητική μηδενικής τάξεως. Οι κινητικές αυτές φαίνεται να επηρεάζονται από τις τιμές του pH των λιποσωμάτων οι οποίες ποικίλλουν από 2 έως 8.

Τα αντιοξειδωτικά διαλύματα που ετοιμάστηκαν από τα εκχυλίσματα των βοστρύχων σε διαφορετικές τιμές pH παρουσίασαν δραστικότητα στην αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, όταν βρέθηκαν σε λιποσώματα λεκιθίνης. Ανάλογα με το pH τα εκχυλίσματα των βοστρύχων μπορούν να μετατραπούν από αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικά, επομένως επιταχύνουν αντί να παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων. Από την άλλη πλευρά, τα διαλύματα των λιποσωμάτων που προήλθαν από τα εκχυλίσματα των γιγάρτων δεν έδειξαν κάποια αντιοξειδωτική δράση αλλά, ανάλογα με το pH, παρατηρήθηκε σημαντική προοξειδωτική δράση.

Διαπιστώθηκε πως τα εκχυλίσματα των βοστρύχων παρουσιάζουν μια πιο σταθερή εικόνα στην κλίμακα του pH που εξετάστηκε, εξαιτίας της ύπαρξης των φλαβονών, οι οποίες ίσως είναι περισσότερο προστατευτικές στην αυτοξείδωση σαν αποτέλεσμα του πιο λιπόφιλου χαρακτήρα. Αντιθέτως, οι περισσότερο υδρόφιλες φλαβανόλες παραμένουν στην υδατική φάση των λιποσωμάτων, όπου υφίστανται παρατεταμένη αυτοξείδωση, η οποία μπορεί να είναι η αιτία της προοξειδωτικής τους συμπεριφοράς.

Τέλος, όπως ακριβώς τα εκχυλίσματα από τα υποπροϊόντα οινοποίησης που εξετάσαμε σε αυτή την έρευνα, και άλλα εκχυλίσματα από άλλες φυτικές πηγές μπορεί να έχουν διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παρεμπόδιση ή την προώθηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Δεδομένου ότι αυτή η συμπεριφορά εξαρτάται από το pH του υλικού, η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να αξιολογηθεί με ασφάλεια μόνο για κάθε περίπτωση ξεχωριστά.

Συνέργεια ή Ανταγωνισμός

Ένας πρακτικός περιορισμός που προκύπτει από τη χρήση της γραμμικής παρεμβολής για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας ενός αντιοξειδωτικού μίγματος είναι ότι πέρα από μια ορισμένη συγκέντρωση η γραμμικότητα μεταξύ της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών ($\%\Delta A_{515}$) και της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών δεν ισχύει. Για να εξαλειφθεί η έλλειψη της γραμμικότητας, καθώς επίσης και για να καταγραφεί η αντιοξειδωτική συμπεριφορά με την ταυτόχρονη μεταβολή των συγκεντρώσεων και των δύο συστατικών του μίγματος χρησιμοποιήθηκε ένας παραγοντικός σχεδιασμός που δίνει το κατάλληλο μαθηματικό εργαλείο για να εξετασθούν οι αλληλεπιδράσεις των εκχυλισμάτων τόσο με το ασκορβικό οξύ όσο με την α-τοκοφερόλη σε ένα ευρύτερο φάσμα συγκεντρώσεων.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε έδειξε ότι οι πολυφαινόλες που περιέχονται σε εκχυλίσματα από πλούσιες πηγές, όπως βόστρυχες σταφυλιών, εντείνει τον ανταγωνισμό είτε συνδέεται με το ασκορβικό οξύ είτε με την α-τοκοφερόλη. Αξίζει να υπογραμμιστεί, ότι η μέγιστη αποδοτικότητα στα μίγματα είναι αποτέλεσμα μιας ιδανικής αναλογίας των συγκεντρώσεων των ολικών πολυφαινολών και του ασκορβικού οξέος και της α-τοκοφερόλης.

Οι προσεγγίσεις που γίνονται σε αυτήν την μελέτη έρχονται σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε δυαδικά μίγματα αντιοξειδωτικών τόσο συνδυασμένων όσο και προκαθορισμένων αναλογιών. Τα στοιχεία που έχουν προκύψει από τις μέχρι τώρα μελέτες, προτείνουν ότι για να εξακριβωθεί η συμπεριφορά ενός συστήματος που αποτελείται από δύο αντιοξειδωτικές ουσίες θα πρέπει να εφαρμοστεί ένα παραγοντικό σχέδιο το οποίο θα επιτρέπει την αξιόπιστη πρόβλεψη εντός λογικών ορίων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για τα αντιοξειδωτικά που προορίζονται ως πρόσθετα τροφίμων όπου ο στόχος είναι η μέγιστη δυνατή προστασία τους κατά των οξειδώσεων.

Βιβλιογραφία

Abou Samra, M., Chedea, V.S., Economou, A., Calokerinos, A., Kefalas, P. (2011). Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltametry. *Food Chemistry*, 125, 622-629.

Afanas'Ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., and Potapovich, A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38, 1763-1769.

Aksbi, M., Shoeman, D.W., Saari, C.A. (1993). High performance liquid chromatography of selected phenollic compounds in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 367-370.

Amorati, R., Pedulli, G.F., Cabrini, L., Zambonin, L., and Landi, L. (2006). Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic acid and other phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chememistry*, 54, 2932-2937.

Arienzo, M., Christen, E.W., Quayle W.C. (2009). Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 94–99.

Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665.

Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Baño, M.C., Obrador, E., Estrela, J.M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 387-398.

Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M. (1997). The chemistry of the tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 693-704.

Barclay, L.R.C., Ingold, K.U. (1981). Autoxidation of biological molecules. The autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and chlorobenzene. *Journal of the American Chemical Society*, 103, 6478–6485.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-341.

Becker, E.M., Nissen, L.R., Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research & Technology*, 219(6), 561-571.

Becker, E.M., Ntouma, G. & Skibsted L.H. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chemistry*, 103, 1288-1296.

Belyakov, V.A., Roginsky, V.A., Bors, W. (1995). Rate constants for the reaction of peroxyl free radical with flavonoids and related compounds as determined by the kinetic chemiluminescence method. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 2319–2326.

Bender, D.A. & Bender, A.E. (Eds) 7th Edition, Woodhead Publishing Ld and CRC Press, Cambridge England

Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH$^{\bullet}$ free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30, 609-615.

Booyse, F., Pan, W., Grenett, H.E., Parks, D.E., Darley-Usmar, V.M., Bradley, K.M., Tabengwa, E.M. (2007). Mechanism by which Alcohol and Wine Polyphenols Affect Coronary Heart Disease Risk. *Annals of Epidemiology*, 17(5), S24-S31.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. In: Methods in Enzymology, *Academic Press, New York,* 186, 343-355.

Bors, W., Michel, C., & Stettmeier, K. (2000). Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374, 347-355.

Bors, W., Michel, C., and Stettmeier, K. (2000). Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374, 347-355.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., RioaJ, J., Garido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3535-3540.

Bronner, W.E., & Beecher, G.R. (1998). Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 805, 137-142.

Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles J., Pérez-Murcia, M.D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* 28(2), 372–380.

Butler, L. G. (1993). Polyphenols and herbivore diet selection and nutrition. In: Polyphenolic Phenomena. *Edition A. Scalbert*, INRA, Paris (France), 149–154.

Cacace, J.E., & Mazza, G. (2003). Optimisation of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68, 240-248.

Cassidy, A., Hanley, B., Lamuela-Raventos, R.M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1044-1062.

Chen, Y., and Hagerman, A.E. (2005). Reaction pH and protein affect the oxidation products of β-pentagalloyl glucose. *Free Radadical Research*, 39, 117-124.

Chipault, J.R. (1962). Antioxidants for Use in Foods, vol II, Edition by Lundberg W. New York: *Interscience*.

Choe, E., & Min, D.B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 345-358.

Choe, E., & Min, D.B.. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Revieww in Food Science and Food Safety, 5*, 169-186.

Cillard, J., & Cillard P. (2006). Mécanismes de la péroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Les Corps Gras Lipides*, 13, 24–29.

Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins-nature, occurance and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.

Conde, E., Moure, A., Domínguez H., .Parajó, J.C. (2011). Production of antioxidants by non isothermal autohydrolyis of lignocellulosic wastes. *LWT-Food Science and Technology,* 44(2), 436–442.

Coseteng, M.Y., & Lee, C.Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52, 985-989.

Cvek, J., Medić-Šarić, M., Jasprica I., Zubčić, S., Vitali, D., Mornar, A., Vedrina-Dragojević, I., Tomić, S. (2007). Optimisation of an extract procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, 18, 451-459.

Dedoussis, G.V.Z., Kaliora, A.C., Andrikopoulos, N.K. (2005). Effect of different phenols on Natural Killer cell-mediated cell death of K562 human leukemic cell line. *Cell Biology International*, 29(11), 884-889.

Di Mascio, P., Devasagayam, T.P., Kaiser, S., Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions*, 18, 1054–1056.

Díaz, A.B., Bolívar, J., De Ong, I., Caro I., Blandino, A. (2011). Applicability of enzymatic extracts obtained by solid state fermentation on grape marc and orange peels mixtures in must clarification. *LWT – Food Science and Technology*, 44(4), 840–846.

Díaz, A.B., De Ong, I., Caro, I., Blandino, A. (2009). Production of hydrolytic enzymes from grape pomace and orange peels mixed substrate fermentation by *Aspergillus awamori*. *Chemical Engineering Transactions*, 17, 1143–1148.

Donovan, J.L., Meyer, A.S., Waterhouse, A.L. (1998). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prunes juice (Prunes domestica). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1247-1252.

Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry, N.B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101, 1434-1441.

Duthie, G., & Parlsey, G. (1999). Polyphenols and nutritional antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 81, 425-426.

Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903-904.

Fergurson, RL. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability (Review). *Mutation Research*, 475, 89–111.

Fiori, L. (2010). Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: plant and process design, modeling, economic feasibility. *Journal of Chemical Engineering and Processing*, 49(8), 866–872.

Frankel, E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 4(7), 220-225.

Frankel, E.N. (1998). Lipid oxidation. Dundee, UK: *The Oily Press*.

Gámez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J.A., Leyva-Carrillo, L., Ortega-Garcia, J., Bringas-Alvarado, L., Garcia, H.S., and Medina-Juárez, L.A. (2009). Antioxidant activity comparison of Thompson grape pomace extract, rosemary and tocopherols in soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 110-120.

Gao, L., & Mazza, G. (1996). Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science*, 61, 600-603.

García-Martínez, S., Grau, A., Agulló, E., Bustamante, M.A., Paredes, C., Moral, R., Ruiz, J.J. (2009). Use of composts derived from winery wastes in tomato crop. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(1–6), 445–452.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. and Saccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 1106–1114.

Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618-626.

Gordon, M.H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In: Hudson BJF, editor. *Food antioxidants, Amsterdam: Elsevier*; 1–18.

Grismer, M.E., Carr M.A., Shepherd, H.L. (2003). Evaluation of constructed wetland treatment performance for winery wastewater. *Water Environment Research*, 75(5), 412–421.

Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2005a). An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera* sp.) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. *Phytochemical Analysis*, 16, 17-23.

Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2005b). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, 89, 1-9.

Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research*, 9, 1–32.

Halliwell B. (1997). Antioxidants: The basics – what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*, 38, 3–20.

Heinonen, M., Rein, D., Satue-Gracia, M.T., Huang, S.-W., German, J.B., and Frankel, E.N. (1998). Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 917-922.

Hermann E, Janusz G, Herbert P, Günther J. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 341-390.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). 'Sub- and supercritical extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*. 98, 136–148.

Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & De Pascual-Teresa S. (2010). Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121, 691-696.

Hiramoto, K., Miura, Y., Ohnuki, G., Kato, T. & Kikugawa K. (2002). Are water- soluble natural antioxidants synergistic in combination with a-tocopherol? *Journal of Oleo Science*, 51, 569- 576.

Hollman P.C.H. (1997). Bioavailability of flavonoids. *European Journal of Clinical Nutrition*,51(Suppl 1), S66-S69.

Hollman P.C.H., Van Trijp J.M.P., Buysman M.N.C.P., v.d. Gaag M.S., Mengelers M.J.B., de Vries J.H.M., Katan M.B. (1997b). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418, 152-156.

Hollman P.C.H., Van Trijp J.M.P., Mengelers M.J.B., de Vries J.H.M., Katan M.B. (1997a). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters*, 114, 139-140.

Huang Z., Wang B., Williams P. (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 819-824

Ioannides C and Yoxall V. (2003). Antimutagenic acticity of tea: role of polyphenols. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 6, 649–656.

Iwata T, Kimura Y, Tsutsumi K, Furukawa Y, Kimura S. (1993). The effect of various phospholipids on plasma lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, .

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes". *Science*, 275, 218-220.

Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M., Luque de Castro, M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108, 76-82.

Jaworski A.W. and Lee C. Y. (1987). Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 257-259.

Jia, Z.-S., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.-M., & Liu, Z.-L. (1998). Antioxidant synergism of tea polyphenols and α-tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *Journal of Chemical Society-Perkin Transactions* 2, 911-915.

Jiang Y., Simonsen J., Zhao, Y. (2011). Compression-molded biocomposite boards from red and white wine grape pomaces. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(5), 2834–2846.

Jimenez MA, Scarino ML, Vignolini F, Mengheri E. (1990). Evidence that polysaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favourable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrition*, 120 (7), 659-667.

Jorgensen L.V., Madsen H.L., Thomsen M.K., Dragsted L.O., Skibsted L.H. (1999). Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electronichemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radical Research*, 30(3), 207-220.

Ju, Z.Y., & Howard, L.R. (2005). Subcritical water and sulphured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *Journal of Food Science, 70*, 270-276.

Kaeberlein M., & Rabinovitch P.S. (2006). "Grapes versus gluttony. A compound found in red grapes called resveratrol improves the health and lifespan of mice on a high-calorie diet". *Nature*, 444, 280-281.

Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., Carle, R. (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70, 157-163.

Karvela, E., Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., & Karathanos, V.T. (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79, 1311-1321.

Karvela, E., Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T., and Kefalas, P. (2009). Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *European Food Research and Technology*, 229, 731-742.

Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. Free Radical Biology and Medicine, 32, 822–832.

Kenneth H. Inoue, & Ann E. Hagerman. (1988). "Determination of gallotannin with rhodanine", *Analytical Biochemistry*, 169(2), 363-369.

Klinksiek, B., Obendorf, L., Bellinghausen, R., Eichmann, M.. (2004). 'Method for the production of powdered active substance formulations by means of compressible fluids', Patent WO2004037402, *Bayer Technology Services GmbH*.

Kondo, Y., Ohnishi, M., and Kawaguchi, M. (1999). Detection of lipid peroxidation catalyzed by chelated iron and measurement of the antioxidant activity in wine by a chemiluminescence analyzer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1781-1785.

Kreft S., Knapp M., Kreft I. (1999). Extraction of rutin from buckwheat (fagopyrum esculentum Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4649-4652.

Krinsky N.I. (1998). The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Annals of the NY Academy of Sciences,* 854, 443–447.

Kurosawa T, Nozaki A.I.F, Nakano Y, Katsuda S.I, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of antherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 179(2), 237-246.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new treds and challenges. *Progress in lipid Research*, 46, 244-282.

Lambert J.D, Hong J, Yang G.Y, Liao J, Yang C.S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 284S–291S.

Larossa, M., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2003). Grape Polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 Melanoma cells. *Journal of Agricural and Food Chemistry*, 51, 4576-4584.

Ledda S., Sanna G., Manca G., Franco M. A, Porcu A. (2010). Variability in flavonol content of grapes cultivated in two Mediterranean islands (Sardinia and Corsica), *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 580-585.

Lee C.Y. and Jaworski A. (1990). Identification of some phenolic in white grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 87-89.

Leger CL. (2006). Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversite, modes d'action anti-oxydante, interactions. *Corps Gras Lipides*, 13, 59–69.

Lesage-Meessene L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J-L., Asther M., Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a fuction of extraction systems. *Food Chemistry*, 75, 501-507.

Lesley K. M, Wood G.L, Garg L.M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.

Li, H.-J., Deinzer, M.L. (2007). Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analytical Chemistry*, 79, 1739-1748.

Lin Y.L. & Lin J.K. (1997). (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Molecular Pharmacology*, 52: 465-472.

Lin, Q., Wang, J., Qin, D., and Bjorn, B. Influence of amphiphilic structures on the stability of polyphenols with different hydrophobicity. *Science in China Series B: Chemistry*, 50, 121-126.

Lopes G.K., Schulman H.M., Hermes-Lima M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA), 1472, 142-152.

Lotito, S. B., Actis-Goretta, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H., H., Steinberg, F., M., Keen, C., L., and Fraga, C. G. (2000). Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276, 945-951.

Lugasi A, Bíró L, Hóvárie J, Sági V.K, Brandt S, Barna E. (2003). Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. *Nutrition Research*, 23(8), 1035-1044.

Luque-Rodríguez, J., Pérez-Juan, P., Luque de Castro, M.D. (2006). Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8775-8781.

Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K.. (1996). "Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives", ISDN 0-8247-9351-X, Marcel Dekker, Inc., New York.

Madhujith, T., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant and antiproliferelative properties of selected berley (Hordeum vulgarae L.) cultivars and their potential for inhibition og low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8048-8057.

Makris D. P., Boskou G., Andrikopoulos N. K. (2007b). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.

Makris D. P., Boskou G., Chiou A., Andrikopoulos N. K. (2008). An investigation on factors affecting recovery of antioxidant phenolics and anthocyanins from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace employing water/ethanol-based solutions. *American Journal of Food Technology*, 3, 164-173.

Makris P.D, Boskou G, Andrikopoulos N.K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125-132.

Makris P.D., Kallithraka S., Kefalas P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.

Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98, 2963-2967.

Makris, D.P., and Rossiter, J.T. (2001). Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3370-3377.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Manios, T., Maniadakis, K., Boutzakis, P., Naziridis, Y., Lasaridi, K., Markakis, G., Stentiford, E.I. (2007). Methane and carbon dioxide emission in a two-phase olive oil mill sludge windrow pile during composting. *Waste Management.* 27(9), 1092–1098.

Marinova, E., Toneva, A., & Yanishlieva N. (2008). Synergistic antioxidant effect of a-tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 106, 628–633.

Martin AR, Villegas I, La Casa C, De la Lastra CA. (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1399–1410.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Fiseli C, Giovanninni C..(2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577-586.

McHugh, M.A., & Krukonis, V.J. (1986). Supercritical fluid extraction, Butterworths, USA.

Michel Perut. (2004). 'Supercritical fluid extraction/fractionation: Industrial development and economic issues', Chapter 12 in 'State of the art book on *Supercritical Fluids'*, Valencia, Spain.

Miketova, P., Schram, K.H., Whitney, J.T., Kernw, E.H., Valcic, S., Timmerman, B.N., Volk, K.J. (1998). Mass spectrometry of selected cpmponents of biological interest in green tea extracts. *Journal of Natural Products*, 61, 461-467.

Milbury PE, Cao G, Prior RL, Blumberg J. (2002). Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanism of Ageing & Development*, 123, 997-1006.

Miwa S., Yamazaki K., Hyon S-H., Komeda M. (2004). A novel method of 'preparative' myocardial protection using green tea polyphenol in oral uptake. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 3(4), 612-615.

Moldes, A.B., Bustos, G., Torrado, A., Domínguez, J.M. (2007). Comparison between different hydrolysis processes of vine-trimming waste to obtain hemicellulosic sugars for further lactic acid conversion. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 143(3), 244–256.

Moldes, A.B., Vázquez, M., Domínguez, J.M., Díaz-Fierros, F., Barral, M.T. (2008). Negative effect of discharging vinification lees on soils. *Bioresource Technology.* 99(13), 5991–5996.

Molero Gómez, A., Pereyra López, C., De La Martínez Ossa, E. (1996). Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with

conventional solvent extraction. *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 61(3), 227–231.

Montaigne E., Couderc J-P., Hauteville F., Hannin H. Bacchus 2008 : Enjeux, strategies et pratiques dans la filiere vitivinicole. Edition la Vigne, DUNOD.

Morton, L.W., Caccetta, R.A.A., Puddey, I.B., Croft, K.D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Epxerimental Pharmacology and Physiology*, 27, 152-159.

Mukai, K., Mitani, S., Ohara, K., & Nagaoka, S.I. (2005). Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 1243-1256.

Musse, N., Lorenzen, L., Aldrich C. (2007). Cellar waste minimization in the wine industry: a systems approach. *Journal of Cleaner Production*, 15, 417-431.

Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 977-985.

Nakatani, N., Kayano, S.I., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., Mitani, T. (2000). Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (Prunus domestica L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5512-5516.

Nigel, C.W., and Glories, Y. (1991). Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 364-366.

Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I., Sato, T. (2002). Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7524-7529.

Oleszek, W., Lee, C.Y., Jaworski, A.W., Price, K.R.. (1988). Identification of some phenolic compounds in apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 430-432.

Ovesná, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T., Szekeres, T. (2006). Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncology Reports*, 16, 617-624.

Paradelo, R., Moldes, A.B., Barral, M.T. (2010). Utilization of a factorial design to study the composting of hydrolyzed grape marc and vinification lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3085–3089.

Pardo, A., Perona, M.A., Pardo, J. (2007). Indoor composting of vine by-products to produce substrates for mushroom cultivation. *Spanish Journal of Agricultural Research.* **5**(3), 417–424.

Park, Y.K., and Lee, C.Y. (1996). Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 34-36.

Pazmino-Duran, E.A., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., Gloria, M.B.A. (2001). Anthocyanins from bananas bracts (Musa X paradisiaca) as potential food colorants. *Food Chemistry*, 73, 327-332.

Pazos, M., Torres, J.L., Andersen, M.L., Skibsted, L.H., Medina, I. (2009). Galloylated polyphenols efficiently reduce α-tocopherol radicals in a phospholipid model system composed of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5042-5048.

Pedrielli, P., & Skibsted, L.H. (2002). Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7138-7144.

Peyrat-Maillard, M.N, Cuvelier, M.E, & Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2′-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80, 1007-1012.

Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the Americal Oil Chemists' Society*, 80, 1007-1012.

Pezzuto, J.M. (2008). Grapes and human health: a perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6777-6784.

Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skin: significance of cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (11), 579-590.

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez M.J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267-273.

Ping, L., Brousse, N., Chrusciel, L., Navarrete, P., Pizzi, A. (2011). Extraction of condensed tannins from grape marc pomace for use as wood adhesives. *Industrial Crop and Products*, 33(1), 253–257.

Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science & Technology*, 109, 629-642.

Portilla, M., Torrado-Agrasar, A., Carballo, J., Domínguez J.M., Moldes, A.B. (2009). Development of a factorial design to study the effect of the major hemicellulosic sugars on the production of surface-active compounds by *L. pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9057–9062.

Portilla, O., Torrado, A., Domínguez, J.M., Moldes, A.B. (2008). Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8074–8080.

Portilla, O., Torrado, A.M., Domínguez J.M., Moldes, A.B. (2010). Stabilization of kerosene/water emulsions using bioemulsifiers obtained by fermentation of hemicellulosic sugars with *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10162–10168.

Psarra, E., Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas, P. (2002). Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: Correlation with polyphenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1014-1020.

Püssa, T., Floren, J., Kuldkeep, P., Raal, A. (2006). Survey of grapevine Vitis vinifera stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7488-7494.

Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Krogholm, K.S., Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurance, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mololecular Nutrition & Food Research*, 49, 159-174.

Reverchon, E., & De Marko, I. (2006). Supercritcal fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38 (2), 146-166,

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Glories Y., Maujean A. The chemistry of Wine – stabilazation and Treatmants. Handcover, Wiley & Sons, Limited, John.

Rice-Evans, C.A., and Diplock, A.T. (1992). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15, 77–97.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956.

Rodriguez, L., Toro, M., Vázquez, F., Correa-Daneri, M., Gouiric, S., Vallejo, M. (2010). Bioethanol production from grape marc and sugar beet pomaces by solid state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11), 5914–5917.

Rojas, M.C., & Brewer, M.S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of Food Quality*, 31, 173-188.

Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Cimato, A.. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964-967.

Ross, J.A., and Kasum, C.M. (2002). Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metbolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.

Sachidanandame, K., Fagan, S.C., Ergul, A. (2005). Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues. *Cardiovascular Drug Reviews*, 23, 115–32.

Sánchez-Alonso, I., Solas, M.T., & Borderías, A.J. (2007). Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *Journal of Food Science*, 72, 94-101.

Sanchez-Alonso, I., Solas, M.T., and Borderias, A.J. (2007). Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *Journal of Food Science*, 72, 94-101.

Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094-1117.

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and Biavailabillity of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.

Schultz, J. (2004). Resveratrol may be a powerful cancer-fighting ally. *Journal of National Cancer Institute*, 96, 1497-1498.

Scott, G. Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition. Chichester: Albion Publishing 1997.

Sestili, P., Guidarelli, A., Dacha, M., Cantoni, O. (1998). Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 196–200.

Shahidi F & Wanasundara J. (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M., Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food, Agriculture and the Environment*, 1, 42-47.

Shirahigue, L.D., Plata-Oviedo, M., De Alencar, S.M., D'Arce, M.A.B.R., Vieira, T.M.F.S., Oldoni, T.L.C., and Contreras-Castillio, C.J. (2010). Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 863-870.

Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 55:381-387.

Simirgiotis MJ, & Schmeda-Hirschmann G. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (Fragaria chiloensis spp chiloensis form chiloensis) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 545-553.

Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., Diamandis, E.P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119-124.

Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1076-1080.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208.

Stintzing F.C., Stintzing A.S., Carle R., Wrolstad R.E. (2002) A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (Rubus laciniattus Wild). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 396-399.

Stuckey, N. B. Handbook of Food Additives. CRC Press, Boca Raton, FL, 1972;1: 185.

Tappel, A.L. (1968). Will antioxidant nutrients slow aging process? *Geriatrics*, 23, 97–105.

Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, 16, 43-52.

Tomas-Barderan, F.A., & Clifford, M.N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1073-1080.

Van Acker, S.A.B.E., Van Balen, G.P., Van den Berg, D.J., Bast, A., Van der Vijgh, W.J.F. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 56, 935–43.

Vatai, T., Skerget M., Knez, Z. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering.* 90(2), 246–254.

Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 84-92.

Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., & García-Parilla, M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230-235.

Vinson J. (1999). Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 472, 115-130.

Visioli, F., Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4292-4296.

Wang, H., Helliwell, K., You, X. (2000a). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 68, 115-121.

Wang, L.F., Kim, D.M., Lee, C.Y. (2000b). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4227-4232.

Waterman, P.G., and Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publ., Oxford, pp. 83-91.

Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 838-849.

Wrolstad E.R., Acree E.T., Decker A.E., Penner M.H., Reid S.D., Schwartz J.S., Shoemaker F.C., Smith M.D., Sporns P. Handbook of food analytical chemistry. ISBN: 0-471-72187-5, Publised by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Wrolstad, R.E. (2005). Determination of conjugated dienes and trienes. In "Food Analytical Chemistry", Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A, Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D., and Sporns P. Ed., Wiley Interscience, pp. 515-517.

Wu, J.M., Wang, Z.R., Hsieh, T.C., Bruder, J.L., Zou, J.G., Huang, Y.Z. (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *International Journal of Molecular Medicine*, 8, 3-17.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E., Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Techology*, 108, 76-793.
Yi, H.C., Abdalla, D.S.P., Sevanian, A. (1997). Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(2), 202-214.
Yi, O.S., Meyer, A.S., and Frankel, E.N. (1997). Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1301-1307.
Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-48.
Zern, T.L, Fernandez, M.L. (2005). Cardioprotective effect of dietary polyphenols, *Journal of Nutrition*, 135, 2291-2294.
Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z.H., Yang, H.Z. (2007). Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57, 17-24.
Zheng, Y., Hu, J., Murphy, P.A., Alekel, D.L., Franke, W.D., Hendrich, S. (2003). Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *Journal of Nutrition*, 133(3), 110-3116.
Zubik, L., & Meydani, M. (2003). Bioavailability of soyabean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1459-65.

Βαλαβανίδης Α.: "Ελεύθερες Ρίζες και ο Ρόλος τους στα Βιολογικά Συστήματα", Εκδ. ΒΗΤΑ, Αθήνα, 2006.
Ισραηλίδης Κ.Ι. : Αξιοποίηση στερεών οργανικών αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, 1999, Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωπονικών Προϊόντων – ΕΘΙΑΓΕ.
Κουράκου – Δραγώνα Σταυρούλα: Θέματα Οινολογίας 1η έκδοση, ISBN: 960-7809-29-7, εκδόσεις Τροχαλία, 1998
Κούσουλας Ι. Κώστας, : Αμπελουργία, 2η έκδοση, ΕΚΔΟΤΙΚΗ ΑΓΡΟΤΕΧΝΙΚΗ & ΕΜΠΟΡΙΚΗ Α.Ε., 2002.
Μπόσκου Δ. : Χημεία Τροφίμων, 5η έκδοση, ISBN: 960-343-528-7, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε., 2004.
Χαλουλάκος Τζανέτος-Ιωάννης: Μελέτη μεγεθών και διεργασιών που επηρεάζουν την αποθήκευση και τη διακίνηση της Σουλτανίνας. Πτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικών Βιομηχανιών, Αθήνα 1993.

www.fao.org

www.food-info.net

www.oiv.org

www.wikipedia.com

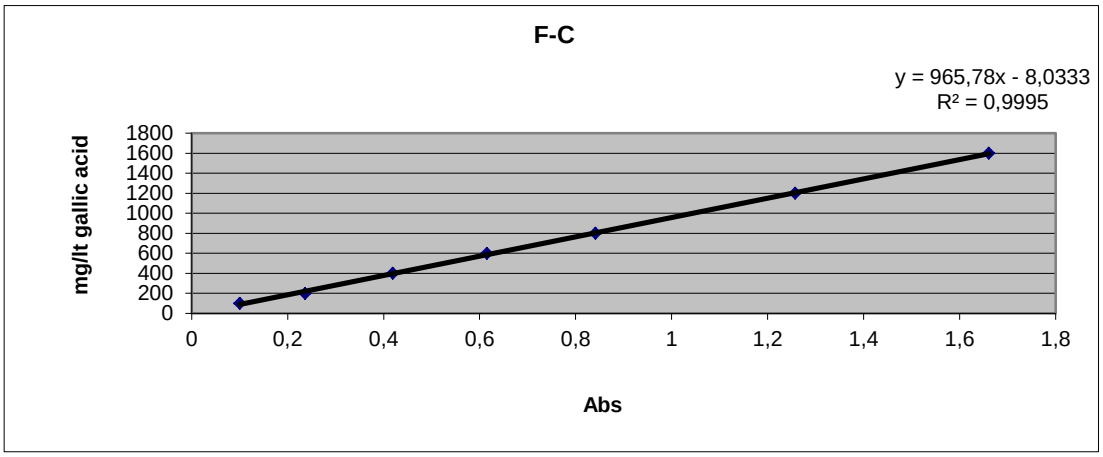
www.minagric.gr

www.pharm.uoa.gr

ПАРАРТНМА

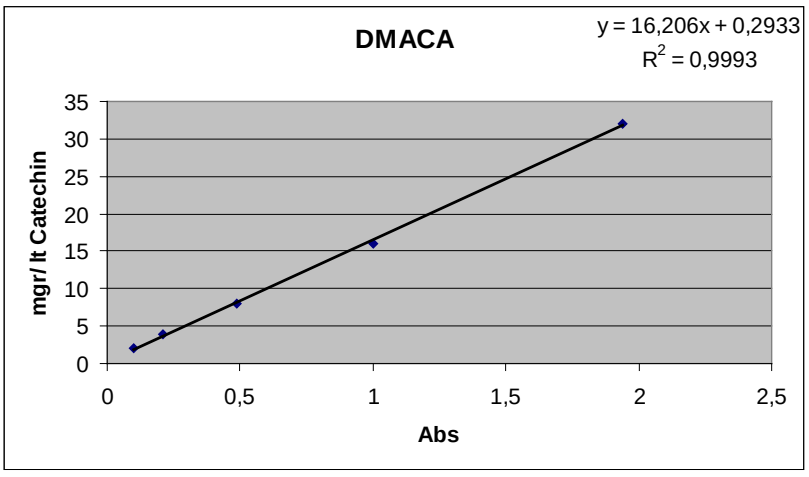
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό ολικών πολυφαινολών:

Από μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος (GA) παρασκευάζεται, με αραίωση, διάλυμα εργασίας 1600mg/L. Από το τελευταίο, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 100, 200, 400, 600, 800, 1200 και 1600mg/L. Ακολουθείται η αναλυτική πορεία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος ψ=f(x), όπου x η απορρόφηση στα 750nm και ψ η ποσότητα του GA σε μg.



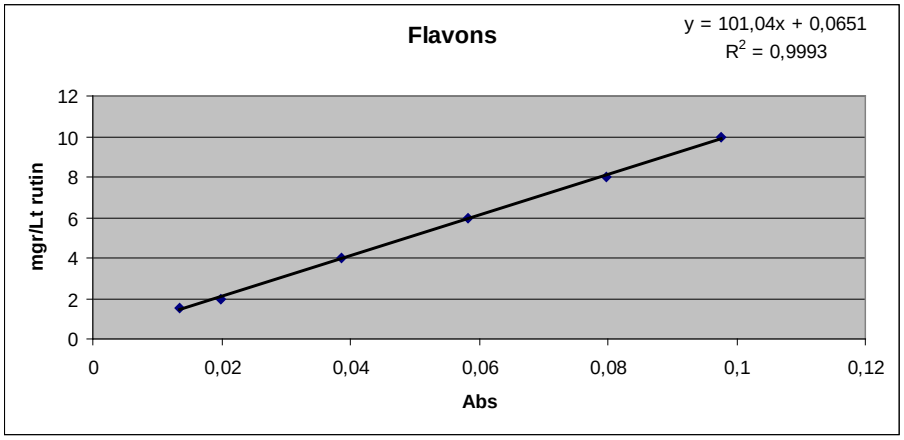
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό ολικών φλαβανολών:

Από το μητρικό διάλυμα κατεχίνης (CTE) παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 2, 4, 8, 16, και 32mg/L. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (αναλυτική πορεία). Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος ψ=f(x),όπου x η απορρόφηση στα 640nm και ψ η ποσότητα του CTE σε mg.



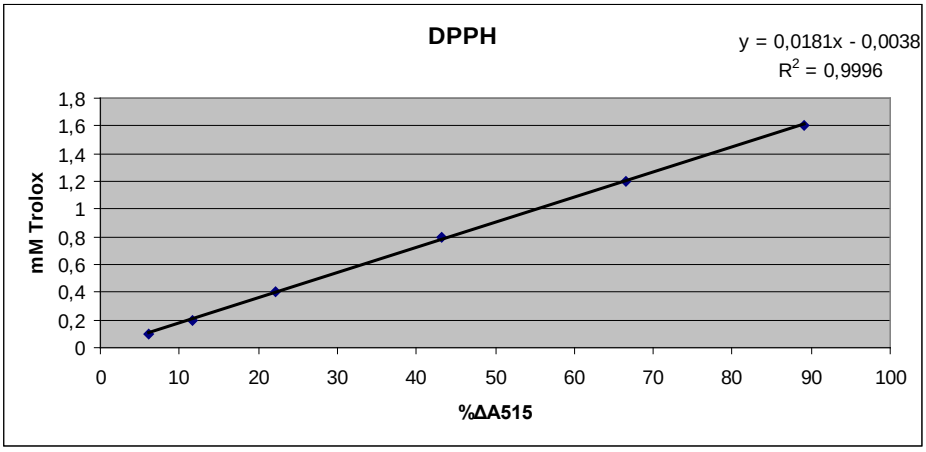
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό ολικών φλαβονών:

Από το μητρικό διάλυμα ρουτίνης (Rut.E) με αραίωση παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας 10mg/L. Από το τελευταίο, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 1.5, 2, 4, 8, και 10mg/L. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος ψ=f(x),όπου x η απορρόφηση στα 415nm και ψ η ποσότητα της Rut. σε mg.



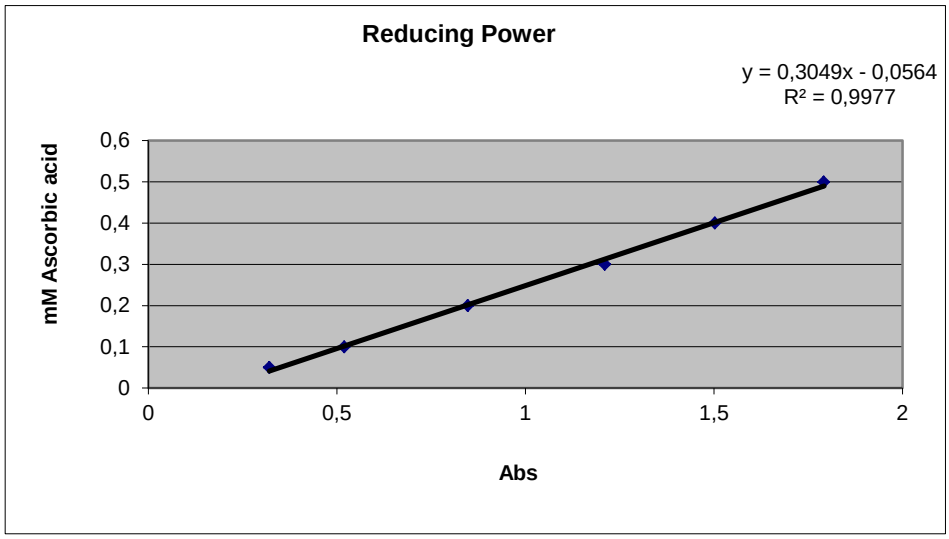
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH:

Από το μητρικό διάλυμα Trolox, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 και 1.6 mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος ψ=f(x),όπου x η μεταβολή της απορρόφησης στα 515nm **$(\%\Delta A = [(A_{515(0)}-A_{515(30))})/A_{515(0)}]\cdot 100$** και ψ η ποσότητα του Trolox σε mM.



Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς αναγωγικής δύναμης με την μέθοδο FRAP:

Από το μητρικό διάλυμα ασκορβικού οξέος, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 και 0.5 mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος ψ=f(x),όπου x η απορρόφηση στα 620nm και ψ η ποσότητα του ασκορβικού οξέος σε mM.



Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε mmol Trolox Equiv./ 100 g d. W. σύμφωνα με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
St-Mf	78,276	64,672	64,688	63,029	75,179	66,080	67,829	83,529	77,210	68,385	72,630	70,407	105,435	124,884	129,927	127,728
St- Sv	49,676	47,189	39,157	63,677	46,397	43,306	40,444	46,458	41,990	45,037	63,364	48,489	39,956	52,729	44,296	41,939
St- Ag	92,182	99,442	91,577	82,628	89,755	91,670	76,478	89,512	46,357	80,647	87,084	83,517	78,181	82,334	66,732	80,980
Sd-Mf	114,729	107,651	113,297	92,391	108,233	94,007	115,577	88,095	103,532	106,615	125,001	95,905	116,822	111,794	107,455	102,916
Sd-Sv	98,597	62,330	110,441	89,394	86,493	79,856	83,555	81,831	79,780	64,555	66,923	55,492	78,518	91,234	89,346	80,017
Sd-Ag	70,164	45,956	53,862	49,783	74,227	63,372	67,538	81,159	69,551	70,688	81,715	61,476	68,118	61,952	68,652	69,693

Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε mmol AAE/ 100g d. W. σύμφωνα με την αναγωγική μέθοδο Reducing Power

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
St-Mf	41,925	45,441	28,377	28,881	39,544	42,405	25,531	37,599	31,894	31,874	31,763	30,611	33,231	34,367	40,927	36,872
St- Sv	23,721	23,100	20,733	18,968	28,158	27,010	19,315	23,481	23,000	21,854	30,678	23,880	23,509	28,080	26,394	23,989
St- Ag	58,003	41,850	51,663	44,599	59,735	61,786	47,995	50,809	41,234	43,672	45,810	33,508	43,805	44,120	39,193	39,148
Sd-Mf	60,230	53,635	50,793	39,608	54,965	48,796	58,416	37,736	52,244	48,922	56,860	36,250	56,955	56,534	51,701	45,161
Sd-Sv	60,523	39,072	51,103	47,128	47,081	40,295	45,428	43,252	42,439	46,647	39,984	30,120	43,924	48,780	44,120	42,292
Sd-Ag	44,465	28,516	30,846	26,621	42,901	36,840	33,743	41,500	35,771	40,122	47,544	29,576	38,386	36,692	33,148	35,725