



**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

---

**Αξιολόγηση των ελληνικών ποικιλιών σταφίδας ως  
διατροφικής πηγής αντιοξειδωτικών συστατικών**

**Πτυχιακή Μελέτη  
Πρεβέντη Φανή**



**Τριμελής Επιτροπή:**  
Ανδρικόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής  
Καραθάνος Βάιος, Αναπληρωτής Καθηγητής  
Χίου Αντωνία, Λέκτορας

**Επιβλέπων Καθηγητής:**  
Καραθάνος Βάιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή μελέτη αυτή εκπονήθηκε από τη φοιτήτρια Πρεβέντη Φανή του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Το ερευνητικό μέρος της μελέτης διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Χημείας, Φυτικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2004-2005 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος κ. Καραθάνου Βάϊου.

Στον κύριο Ανδρικόπουλο οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την πολύτιμη καθοδήγησή του και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συνεργαστώ με το εργαστήριο Χημείας, Φυτικοχημείας και Βιοχημείας τροφίμων.

Ευχαριστώ επίσης το κύριο Καραθάνο για το αμείωτο ενδιαφέρον του και την ηθική και ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Η συνεργασία μου μαζί του ξεπέρασε κατά πολύ τις προσδοκίες μου. Μου άνοιξε ορίζοντες που δεν πίστευα ποτέ ότι θα μπορέσω να πλησιάσω. Θεωρώ ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι πίστεψε στις δυνατότητές μου και με βοήθησε να σχεδιάσω τις μελλοντικές μου επιλογές. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που μου εμπιστεύτηκε μία τόσο σημαντική εργασία, με πολλές προοπτικές και ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Χίου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη καθώς και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να την ευχαριστήσω που με βοήθησε να μάθω να εργάζομαι μεθοδικά και αποτελεσματικά. Αποτελεί για εμένα παράδειγμα προς μίμηση, τόσο για το επιστημονικό της υπόβαθρο και τις ερευνητικές της ικανότητες όσο και για το ήθος της. Θεωρώ ότι εκτός από ικανότατη διδάσκαλος είναι και χαρισματική παιδαγωγός. Η συνεργασία μου μαζί της έχει για εμένα ανεκτίμητη αξία. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της δεν θα ήταν εφικτή η διεξαγωγή της μελέτης αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μυλωνά για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε για τη συγκεκριμένη μελέτη, την συμμετοχή της στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους και για τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια διδάκτορα Κουντούρη Αγγελική που ήταν κοντά μου στις ατελείωτες εργαστηριακές ώρες και μου συμπαραστάθηκε ηθικά και ψυχολογικά σε πολλές δύσκολες στιγμές που

προέκυψαν κατά τη διάρκεια της τελευταίας χρονιάς και για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Σάλτα Φωτεινή για το ενδιαφέρον της και την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Δημήτρη και Γεωργία Πρεβέντη και τον αδερφό μου Παναγιώτη για την ανοχή τους και για την ηθική συμπαράσταση σε κάθε δυσκολία που παρουσιάζεται στη ζωή μου.

Ακόμα, ευχαριστώ τις φίλες μου Βεντούρη Μαρίζα και Οικονομοπούλου Μπίλλιω που πιστεύουν στις δυνατότητές μου και με στηρίζουν σε όλες μου τις επιλογές.

Ευχαριστώ τέλος το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για το επίπεδο των σπουδών που μου προσέφερε, τη διάθεση των ερευνητικών χώρων και την παραχώρηση των οργάνων για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους καθώς και όλο του προσωπικού του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμο να με βοηθήσει σε όποιο πρόβλημα προέκυπτε. Θεωρώ ότι ο τρόπος εργασίας των μελών του εργαστηρίου είναι υποδειγματικός και θα έπρεπε να αποτελεί παράδειγμα μεθοδικότητας και συνεργασίας.

Πρεβέντη Φανή

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε πολλές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει διαπιστωθεί η θετική επίδραση της κατανάλωσης τροφίμων και ποτών πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως τα σταφύλια και το κρασί. Οι σταφίδες, ένα άλλο προϊόν της αμπέλου το οποίο παράγεται σχεδόν αποκλειστικά στη Νότια Ελλάδα και χρησιμοποιείται ευρέως στη Μεσογειακή διατροφή, δεν έχει ακόμη μελετηθεί ως προς το αντιοξειδωτικό του περιεχόμενο. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της παρουσίας αντιοξειδωτικών συστατικών στις σταφίδες καθώς και η ταυτοποίηση συγκεκριμένων πολυφαινολών.

Οι σταφίδες που μελετήθηκαν ανήκουν στις ποικιλίες της κορινθιακής σταφίδας και της σουλτανίνας. Οι κορινθιακής ποικιλίας σταφίδες που μελετήθηκαν προέρχονται από τρεις περιοχές την Νότιας Ελλάδας: τη Βοστίτσα Αιγίου, τη Ζάκυνθο και τη Μεσσηνία. Οι σουλτανίνες προέρχονται από την Κρήτη και την Τουρκία.

Οι σταφίδες αυτές εκχυλίστηκαν και τα εκχυλίσματά τους αναλύθηκαν ως προς το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Επίσης, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρύλουδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH\*). Ακόμη πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων πολυφαινολών με τις μεθόδους της υγρής και της αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών. Προηγήθηκε απομόνωση των πολυφαινολικών συστατικών μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης και δημιουργία παραγώγων.

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu περίπου στα 142-228 mg /100 g νωπού προϊόντος εκφρασμένο σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Η ποσότητα του εκχυλίσματος της σταφίδας που απαιτείται ώστε η αρχική ποσότητα DPPH\* να μειωθεί κατά 50% (EC50) αντιστοιχεί σε 5-10 mg του προϊόντος που μελετήθηκε.

Στη μελέτη αυτή για πρώτη φορά ανιχνεύτηκαν και ταυτόχρονα προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις 16- 18 πολυφαινολικών συστατικών. Οι σταφίδες που προέρχονταν από την κορινθιακή ποικιλία παρουσίασαν υψηλότερο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο αλλά σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από τις σουλτανίνες. Τέλος, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη στην οποία διεξήχθη ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυφαινολικών

συστατικών της σταφίδας με τη μέθοδο Folin- Ciocalteau και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος με τη μέθοδο DPPH\*.

## ABSTRACT

Several studies have revealed the beneficial health effect of polyphenol rich food and beverages consumption. Although grapes and wine have been shown to be good sources of phenolic antioxidants, currants, another vineyard product produced almost exclusively in Southern Greece and widely used in Mediterranean diet, have not been studied yet for their antioxidant content.

The objective of this study is the investigation of the presence of antioxidant polyphenolic compounds in currants as well as identification and quantification of individual polyphenols in currants obtained from several regions of Greece. For this purpose two main varieties of Greek raisins were investigated: Currants (Corinthian variety) including raisins from Southern Greece such as from Aeghion (Vostizza) and Messinia in Peloponnesse and island of Zante and Sultanina variety originated from island Crete and Turkey.

Samples of currants were extracted, their total phenolic content was determined by Folin Ciocalteu assay and their antioxidant activity was estimated by DPPH radical scavenging method. The total polyphenolic content was found to vary between 142 and 228 mg/100 g fresh weight, expressed as caffeic acid equivalent. Moreover the quantity of currant extract needed to decrease the initial DPPH\* concentration to 50% (EC50) corresponds to 5-10 mg of product studied. Furthermore polyphenolic composition of the above currant varieties was determined and quantified by GC MS for the first time allowing intercomparison of the above 5 currant varieties.

As a result, currants seem to be a quite good source of polyphenolic compounds that may contribute to the daily dietary intake of antioxidants in the Mediterranean – and not only – diet.

# Περιεχόμενα

|                    |                                                                                                       |           |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Κεφάλαιο 1:</b> | <b>Η ΣΤΑΦΙΔΑ</b>                                                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1.               | Γενικά                                                                                                | 1         |
| 1.2.               | Κορινθιακή σταφιδάμπελος                                                                              | 2         |
| 1.3.               | Σουλτανίνα                                                                                            | 4         |
| 1.4.               | Επεξεργασία της σταφίδας                                                                              | 6         |
| 1.5.               | Αποθήκευση της σταφίδας                                                                               | 8         |
| 1.6.               | Τα συστατικά της σταφίδας                                                                             | 8         |
| 1.7.               | Φυσιολογικές δράσεις της σταφίδας                                                                     | 10        |
| 1.8.               | Η θέση της σταφίδας στη Μεσογειακή διατροφή                                                           | 11        |
| <br>               |                                                                                                       |           |
| <b>Κεφάλαιο 2:</b> | <b>ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>                                                                                | <b>12</b> |
| 2.1.               | Γενικά                                                                                                | 12        |
| 2.2.               | Κατηγορίες και χημικοί τύποι                                                                          | 12        |
| 2.3.               | Πηγές πολυφαινολών                                                                                    | 13        |
| 2.4.               | Απορρόφηση και μεταβολισμός πολυφαινολών                                                              | 14        |
| 2.5.               | Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών                                                                         | 15        |
| 2.6.               | Φυσιολογικές δράσεις των πολυφαινολών                                                                 | 15        |
| 2.7.               | Τα αντιοξειδωτικά στη σταφίδα                                                                         | 17        |
| 2.8.               | Τα αντιοξειδωτικά στα σταφύλια                                                                        | 17        |
| 2.9.               | Αλλαγές στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των<br>σταφυλιών και του κρασιού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης | 21        |
| 2.10.              | Τα αντιοξειδωτικά στο κρασί                                                                           | 21        |
| 2.11.              | Φυσιολογικές δράσεις των πολυφαινολών του κρασιού                                                     | 26        |
| <br>               |                                                                                                       |           |
| <b>Κεφάλαιο 3:</b> | <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                                                              | <b>28</b> |
| 3.1.               | Προκατεργασία δειγμάτων σταφίδας (αφυδάτωση)                                                          | 28        |
| 3.2                | Επιλογή τρόπου προσδιορισμού του πολυφαινολικού<br>περιεχομένου της σταφίδας                          | 28        |
| 3.2.1.             | Παραλαβή πολυφαινολικών συστατικών                                                                    | 28        |
| 3.2.2.             | Επεξεργασία των μεθανολικών εκχυλισμάτων της σταφίδας                                                 | 28        |

|                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Καθαρισμός μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας                                                                                   | 29        |
| 3.3. Πειραματικές διαδικασίες                                                                                                         | 29        |
| 3.3.1. Παραλαβή πολυφαινολικών συστατικών                                                                                             | 29        |
| 3.3.2. Εξάτμιση διαλυτών                                                                                                              | 30        |
| 3.3.3. Επεξεργασία μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας                                                                                  | 31        |
| 3.3.3. Α. Όξινη υδρόλυση                                                                                                              | 31        |
| 3.3.3. Β. Ενζυμική υδρόλυση: Κατεργασία με $\beta$ -γλυκοζιδάση                                                                       | 32        |
| 3.3.4. Καθαρισμός μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας                                                                                   | 33        |
| 3.3.4. Α. Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)                                                                                                | 33        |
| 3.3.4. Β. Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)                                                                                                  | 34        |
| 3.3.5. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού<br>περιεχομένου με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu                                           | 35        |
| 3.3.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη<br>δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρύλουδράζυλο ελεύθερης<br>ρίζας (DPPH*) | 36        |
| 3.3.7. Χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης ( HPLC )                                                                                  | 37        |
| 3.3.8. Ποιοτικός προσδιορισμός ταυτοποιημένων πολυφαινολών<br>με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)                          | 39        |
| 3.3.9. Ποσοτικός προσδιορισμός ταυτοποιημένων πολυφαινολών                                                                            | 39        |
| <b>Κεφάλαιο 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>                                                                                                       | <b>45</b> |
| 4.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση                                                                                           | 45        |
| 4.2. Αποτελέσματα του προσδιορισμού του συνολικού<br>πολυφαινολικού περιεχομένου                                                      | 45        |
| 4.3. Αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας                                                                         | 47        |
| 4.4. Ανάλυση των εκχυλισμάτων σταφίδας με HPLC χρωματογραφία                                                                          | 48        |
| 4.5. Ανάλυση των εκχυλισμάτων σταφίδας με GC-MS χρωματογραφία                                                                         | 52        |
| <b>Κεφάλαιο 5: ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>                                                                                       | <b>62</b> |
| 5.1. Εκχύλιση πολυφαινολών                                                                                                            | 62        |
| 5.2 Επεξεργασία του δείγματος                                                                                                         | 62        |
| 5.3. Παραλαβή πολυφαινολικών συστατικών                                                                                               | 63        |
| 5.4. Υγρασία σταφίδας                                                                                                                 | 63        |
| 5.5. Η μέθοδος FOLIN- CIOCALTEAU                                                                                                      | 64        |



|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| 5.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα της σταφίδας | 64        |
| 5.7. Αποτελέσματα GC-MS                    | 66        |
| <b>Κεφάλαιο 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>            | <b>71</b> |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>                        | <b>73</b> |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

# Η ΣΤΑΦΙΔΑ

### 1.1 Γενικά

Το γνωστό αμπέλι είναι ένα πανάρχαιο θαμνώδες φυτό που ανήκει στο γένος *Vitis* της οικογένειας των αμπελίδων (*Ampelidae*, *Vitaceae*). Το γένος περιλαμβάνει πολλά είδη με σημαντικότερο αυτών την άμπελο την οиноφόρο ή *Vitis Vinifera*, η οποία καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του πλανήτη (19).

Η Ελλάδα καταλαμβάνει την πρώτη θέση στη παραγωγή μαύρης σταφίδας και τη τρίτη μετά τις Η.Π.Α και την Τουρκία στη παραγωγή σταφίδων γενικά. Για την παραγωγή σταφίδας οι καλλιεργούμενες ποικιλίες είναι η κορινθιακή σταφιδάμπελος και η σουλτανίνα.

Με τη λέξη σταφίδα οι αρχαίοι Έλληνες εννοούσαν γενικώς τα αποξηραμένα σταφύλια της αμπέλου. Σήμερα η λέξη σταφίδα περιλαμβάνει τους αποξηραμένους καρπούς σταφυλιών κάθε ποικιλίας. Σύμφωνα με τον Στραυρακάκη (1986), σταφίδα, υπό την ευρεία έννοια, ονομάζεται το αποξηραμένο με κάθε τρόπο, προϊόν της αμπέλου. Έχει επικρατήσει όμως διεθνώς ο ορισμός αυτός να αποδίδεται στα αποξηραμένα σταφύλια ορισμένων μόνο ποικιλιών της αμπέλου και συγκεκριμένα της σουλτανίνας, της κορινθιακής σταφίδας και του Μοσχάτου Αλεξανδρείας, που συνιστούν την ομάδα ποικιλιών της εμπορικής σταφίδας. Στη χώρα μας σταφιδοποιούνται σταφύλια των δύο πρώτων ποικιλιών

Η λέξη σταφίς ή ασταφίς έφτασε μέχρι την εποχή μας από την αρχαιότητα. Παλαιότερα ονομαζόταν οσταφίς. Η ονομασία αυτή προήλθε από το γεγονός ότι η ρίζα της αμπέλου είναι οστεώδης, με την έννοια του ξηρού και του σκληρού. Σκληρά αντικείμενα θεωρούνταν το οστό, ο αστακός και το όστρακο. Έτσι η πιθανότερη εκδοχή είναι πως με αυτό τον τρόπο πήρε την ονομασία της η σταφίδα, λόγω της ιδιότητάς της να είναι ξηρή.

## 1.2. Κορινθιακή σταφιδάμπελος

Τα σταφύλια τα οποία προορίζονται για σταφιδοποίηση αποκαλούνται: Κορινθιακή σταφίδα, Raisin de Corinthe (γαλλ.), Currant (αγγλ.), Passolina, Passerina (ιταλ.). Λόγω ομοιότητας του συγκεκριμένου φρούτου με τους καρπούς ορισμένων θαμνοειδών φυτών (του γένους *Ribes*, οικογένειας *Grossulariaceae*), δόθηκε σε αυτά η αγγλική ονομασία του φυτού “currant”. (5)

Η Κορινθιακή σταφιδάμπελος αποτελεί το πρώτο από άποψη αρχαιότητας εθνικό προϊόν. Δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς εμφανίστηκε, ωστόσο σταφίδες, ασταφίδες και οσταφίδες αναφέρονται από αρχαιωτάτων χρόνων. Ο Ιπποκράτης αναφέρει τη σταφίδα και ασταφίδα της οποίας διακρίνει δύο είδη, τη λευκή και τη μαύρη στα β' και γ' «περί νουσών» βιβλία του και στο «περί γυναικείας φύσεως».

Η ανάπτυξη, της κορινθιακής σταφίδας χρονολογείται τον 14<sup>ο</sup> αιώνα (1340 μ.Χ) όπου αναφέρονται ως εξαγωγικοί λιμένες της κορινθιακής σταφίδας το Κατάκωλο και η Κόρινθος. Το εμπόριο φαίνεται να ακμάζει τον 14<sup>ο</sup> και 15<sup>ο</sup> αιώνα οπότε και η σταφίδα είναι πλέον αναγνωρισμένο είδος εμπορίας στην Ευρώπη.

Η σταφιδάμπελος, είναι σαφές ότι προϋπήρχε στην Πελοπόννησο. Πρώτη σχετική μαρτυρία συναντάμε στα «Προβλήματα» του Αριστοτέλη, ο οποίος αναφέρει ότι πρόκειται για ατελή σταφύλια με μικρές ράγες, τα οποία στερούνται πυρήνα ή διαθέτουν πολύ μικρό σε μέγεθος πυρήνα (13).

Η Κορινθιακή σταφίδα αποτελεί ένα από τα βασικότερα αγροτικά εξαγωγικά προϊόντα της Ελλάδας. Σήμερα οι εξαγωγές σταφίδας αποτελούν το 2%-3% της αξίας των συνολικών εξαγωγών με σταθερή ή και ανερχόμενη τάση λόγω μείωσης του όγκου των συνολικών ελληνικών εξαγωγών. Κατά το τελευταίο τέταρτο του 19<sup>ου</sup> αιώνα αποτέλεσε το βασικό μοχλό εκσυγχρονισμού της οικονομίας και των μεγάλων έργων (διώρυγα Κορίνθου, σιδηροδρομικό δίκτυο) επειδή αποτελούσε το 70% των ελληνικών εξαγωγών.

Η Κορινθιακή σταφίδα απολαμβάνει διεθνώς πολύ καλύτερων τιμών πώλησης από ομοειδή προϊόντα όπως η Σουλτανίνα που σήμερα καλλιεργείται πλέον στην Μικρά Ασία και το Ιράν. Η κορινθιακή σταφίδα καλλιεργείται μόνο στην Ελλάδα από την αρχαία εποχή (ακόμη και σήμερα σε ποσοστό πάνω από 80% της παγκόσμιας παραγωγής). Δυστυχώς, το προϊόν αυτό δεν έτυχε του ενδιαφέροντος πολλών επιστημόνων λόγω του περιορισμένου γεωγραφικού ενδιαφέροντός του.

Η ανάλυση των μικροσυστατικών της σταφίδας, των θετικών επιδράσεων στην υγεία των καταναλωτών αλλά και της επίδρασης της επεξεργασίας στην διατήρηση των αντιοξειδωτικών και της εν γένει θρεπτικής αξίας της σταφίδας αποτελεί βασικό εργαλείο για τη διατήρηση των ελληνικών εξαγωγών, ενώ μπορεί να στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον προς ένα αποκλειστικής ελληνικής προελεύσεως προϊόν.

Σήμερα, υπό τις συνθήκες που επικρατούν στην Ελλάδα η κορινθιακή σταφίδα καλλιεργείται στους νομούς Κορινθίας, Αχαΐας, Ηλείας, Μεσσηνίας, Ζακύνθου και Κεφαλληνίας σε έκταση 400.000 στρεμμάτων περίπου και καταλαμβάνει την πρώτη θέση μεταξύ των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπελιού στην Ελλάδα. Καλλιεργείται επίσης σε μικρή κλίμακα στην Αυστραλία και στη Ν. Αφρική. Κατά Αμερικανούς αμπελογράφους, ο πιο αντιπροσωπευτικός τύπος κορινθιακής σταφίδας απαντάται στην περιφέρεια του χωριού Παναρίτη, στη περιοχή της Αιγιαλείας (12).

Υπάρχουν τρεις υποποικιλίες κορινθιακής σταφίδας: η μαύρη, η λευκή και η κόκκινη. Σε μεγαλύτερη έκταση καλλιεργείται η μαύρη ποικιλία, η οποία είναι η πιο παραγωγική. Η λευκή απαντάται διεσπαρμένα κατά κύριο λόγο στους αμπελώνες της Ζακύνθου. Η κόκκινη που είναι μικρότερης παραγωγικότητας, σπανίζει αλλά απαντάται στη Κεφαλονιά (13).

Η κορινθιακή σταφιδάμπελος είναι ζωηρότατη και παραγωγική ποικιλία και καρποφορεί ακόμα και σε ξερό ξύλο. Η σταφυλή είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, πυκνόραγη και συνήθως διπλή. Ο ποδίσκος είναι μετρίου μεγέθους και πάχους και εύκολα αποκοπτόμενος. Το μέσο βάρος είναι περίπου 200 g και οι μικρές σφαιρικές ράγες αποτελούν το 98% του ολικού βάρους του σταφυλιού. Ο φλοιός της ράγας είναι λεπτός, χρώματος κυανόμαυρου και η σάρκα λευκή και μαλακή. Η ωρίμανση για σταφιδοποίηση γίνεται από τις αρχές Αυγούστου στα πεδινά μέχρι τέλη Σεπτεμβρίου στα ορεινά και η συγκομιδή της γίνεται με τη μορφή του σταδιακού τρυγητού (19).

Η μέση ετήσια παραγωγή μαύρης σταφίδας φτάνει τα τελευταία χρόνια τους 45000 τόνους από τους οποίους οι 55.000 εξάγονται στην Αγγλία. Επίσης ένα μέρος διατίθεται στη βιομηχανία για τη παρασκευή οينوπνεύματος. Η ποιότητα του παραγόμενου σταφιδόκαρπου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και χαρακτηρίζεται από την περιοχή προέλευσης: VOSTIZZA (Αιγίου) , GULF (περιοχή κορινθίας-Νεμέας-Κιάτου, ZANTE (Ζακύνθου) κ.α.

Η καλλιέργεια της κορινθιακής σταφίδας σε άλλες χώρες, δεν ευνοήθηκε. Μόνο στον ελλαδικό χώρο, όπου και διαμορφώθηκε η ποικιλία αυτή, παράγονται οι πιο εύμορφες από πλευράς χρώματος και ανάπτυξης καθώς και οι πιο εύγευστες σταφίδες.

*Διαδικασία ξήρανσης της Κορινθιακής σταφίδας (19):* Η ξήρανση γίνεται στον ήλιο με διάφορες μεθόδους ή στη σκιά.

Η ξήρανση στον ήλιο είναι η πιο διαδεδομένη. Γίνεται σε ακάλυπτα χωμάτινα ξηραντήρια (αλώνια) επάνω σε σταφιδόχαρτο, σε ξηραντήρια από σκυρόδεμα και σε τζιβιέρες (σιδερένια ή ξύλινα πλαίσια με συρμάτινη επιφάνεια). Επίσης μπορεί να γίνει σε χαμωτά ξηραντήρια με κάλυψη. Η διάρκεια της ξήρανσης στα ακάλυπτα ξηραντήρια κυμαίνεται από 10-12 ημέρες.

Η ξήρανση στη σκιά δίνει σταφίδα ανώτερης ποιότητας και συνίσταται συνήθως στην ανάρτηση των σταφυλιών σε σύρματα, σε μόνιμο ξηραντήριο-στέγαστρο. Παραλλαγή της είναι η ξήρανση που γίνεται υπό τη σκιά του φυλλώματος του πρεμνού. Η ξήρανση στη σκιά διαρκεί περίπου 20 ημέρες και ολοκληρώνεται με μετέπειτα έκθεση στον ήλιο για 2 ημέρες.

*Μετά τη ξήρανση* γίνεται το «τρίψιμο» (19), η απομάκρυνση δηλαδή των βοστρύχων και στη συνέχεια ακολουθεί το «λίχνισμα» και το κοσκίνισμα με ρίψη της σταφίδας από ορισμένο ύψος και απαλλαγή της, λόγω ρεύματος αέρος, από ξερούς μίσχους, σκόνη και ξένες ύλες, ενώ πραγματοποιείται και διαλογή του τελικού προϊόντος. Ακολουθεί ενσάκωση των σταφίδων σε σάκους από λινάτσα χωρητικότητας περίπου 80 Kg. Σήμερα η σταφίδα μεταφέρεται σε μεγάλα πλαστικά κιβώτια.

### **1.3. Σουλτανίνα**

Η καλλιεργούμενη Σουλτανίνα καθώς και οι παραλλαγές της κατάγονται από το γεωφυτικό κέντρο της Εγγύς Ανατολής (Μικρά Ασία, Περσία). Η πρώτη αναφορά στη σουλτανίνα εντοπίζεται το 12<sup>ο</sup> αιώνα. Η σουλτανίνα ή σουλτάνα φαίνεται να πήρα το όνομα της από την ομώνυμη επαρχία της Περσίας Σουλτανιέ από την οποία και μεταφέρθηκε στις ακτές της Ιωνίας την εποχή των Σελτζούκων Τούρκων. Αρχικά καλλιεργήθηκε στη περιοχή της Μαγνησίας της Μ. Ασίας και στη συνέχεια διαδόθηκε γρήγορα στη Σμύρνη και όλες τις παράκτιες περιοχές (13). Η παραγωγή και το εμπόριο της σουλτανίνας ήταν σχεδόν αποκλειστικά στα χέρια των Ελλήνων της Μ. Ασίας.

Η πρώτη γνωστή εισαγωγή Σουλτανίνας ανάγεται στο 1838 σε κτήματα του Ναυπλίου. Στη συνέχεια εντοπίζεται στην Ανατολική Κρήτη (1900 Πισκοκέφαλο Σητείας). Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της επεκτείνεται μετά την εγκατάσταση των Ελλήνων της Μ. Ασίας. Σήμερα καλλιεργείται κυρίως στο νομό Ηρακλείου Κρήτης αλλά και στους νομούς Κορινθίας, Λασιθίου, Ρεθύμνης, Χανίων, Ηλείας και Δωδεκανήσου σε έκταση 340.000 στρεμμάτων περίπου. Επίσης εκτός της Ελλάδας καλλιεργείται στην Καλιφόρνια, την Τουρκία, την Αυστραλία, το Ιράν, το Αφγανιστάν, τη Ν. Αφρική, την Κύπρο και αλλού.

Η σουλτανίνα είναι μία ποικιλία ζωνρή και παραγωγική και ευδοκimei σε μαργώδη εδάφη καλά αποστραγγιζόμενα. Στα πλούσια εδάφη παρέχει τις καλύτερες αποδόσεις. Αβαθή και στεγνά εδάφη είναι ακατάλληλα. Χαρακτηριστικά της σταφύλης είναι το μεγάλο μέγεθος (μέσο βάρος 500 g), το κυλινδροκωνικό σχήμα και το ότι είναι μετρίως πυκνόραγη. Ο ποδίσκος της κατά την ωρίμανση ξυλοποιείται. Η ράγα είναι ελλειψοειδής, μετρίου ή μεγάλου μεγέθους. Ο φλοιός είναι μετρίου πάχους, χρώματος κίτρινου χρυσίζοντος κατά τη πλήρη ωρίμανση και η επιδερμίδα λεπτή καλυμμένη από λεπτό στρώμα άχνης. Η σάρκα είναι μετρίως ανθεκτική και χυμώδης. Πλήρης ωριμότητα για σταφιδοποίηση αποκτάται περί τα μέσα Αυγούστου (19).

*Τύποι σταφίδων Σουλτανίνας (18):* Ανάλογα με τη μέθοδο ξήρανσης διακρίνονται οι παρακάτω τύποι σταφυλιών:

1. Thomson Seedless: Σταφίδες που παράγονται από σταφύλια Σουλτανίνας και ξηραίνονται με φυσικές συνθήκες χωρίς προηγούμενη εμβάπτιση σε αλκαλικά διαλύματα. Με τη μέθοδο αυτή παράγεται το 90% των σταφίδων της Καλιφόρνιας που είναι γνωστές με την ονομασία natural ή και απλά seedless.
2. Sultana: Πριν τη ξήρανση οι σταφίδες εμβαπτίζονται σε διάλυμα ανθρακικού καλίου στο οποίο προστίθεται ποσότητα ελαίου. Σε πολλές χώρες η απόκτηση του επιθυμητού χρώματος επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της θείωσης.
3. Golden- bleached: Παράγονται με τη μέθοδο Golden- bleached.
4. Sulfur- bleached: Παράγονται με τη προηγούμενη μέθοδο με τη διαφορά ότι ξηραίνονται με απ' ευθείας έκθεση στον ήλιο και όχι σε θερμό ρεύμα αέρα.
5. Soda- oil- dipped: Τα σταφύλια πριν την ξήρανση εμβαπτίζονται σε καυστικό διάλυμα που περιέχει μικρή ποσότητα ελαιολάδου.

6. Soda- dipped: Κατά τη μέθοδο αυτή τα σταφύλια εμβαπτίζονται σε διάλυμα σόδας, σε θερμοκρασία περίπου 100 °C και ξηραίνονται στον ήλιο.

*Διαδικασία ξήρανσης της Σουλτανίνας (18):* Η ξήρανση των σταφυλιών της Σουλτανίνας στη χώρα μας γίνεται με την απ'ευθείας έκθεση τους στον ήλιο, σε ξηραντήρια διαφόρων μορφών και τύπων. Πολύ μικρές ποσότητες παράγονται με ξήρανση των σταφυλιών στη σκιά (Κορινθία).

Οι κύριοι τύποι των ξηραντηρίων που χρησιμοποιούνται για τη ξήρανση της Σουλτανίνας στη χώρα μας είναι: Τα *χαμωτά* και τα *κρεμαστά* ξηραντήρια. Τα κρεμαστά ξηραντήρια επικρατούν των χαμωτών στη εξοικονόμηση χώρου, ενώ μειονεκτούν λόγω του υψηλού κόστους κατασκευής.

Για την επιτάχυνση της διαδικασίας της ξήρανσης έχει επικρατήσει στη χώρα μας η εμβάπτιση των σταφυλιών της Σουλτανίνας σε αλκαλικά διαλύματα πριν τη ξήρανσή τους. Τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα ονομάζονται «ψυχρά» επειδή έχουν τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Με την εμβάπτιση των σταφυλιών στα ψυχρά αλκαλικά διαλύματα ο χρόνος αποξήρανσης μειώνεται κατά 2-4 φορές σε σχέση με τα μη εμβαπτισμένα σταφύλια. Σήμερα για τη παρασκευή αλκαλικών διαλυμάτων χρησιμοποιείται κατά κανόνα το ένυδρο ανθρακικό κάλιο που κυκλοφορεί στο εμπόριο με τη μορφή κρυσταλλικής σκόνης αδιάλυτης στο νερό. Με τη χρήση αλκαλικών διαλυμάτων ο χρόνος ξήρανσης κυμαίνεται από 7 έως 10 ημέρες.

#### **1.4 Επεξεργασία της σταφίδας**

Η επεξεργασία της σταφίδας γίνεται σε ειδικούς χώρους, τα σταφιδεργοστάσια.

*Πρόπλυση –Στράγγισμα:*

Αποσκοπεί στην απαλλαγή της σταφίδας από ξένες ύλες, την απομάκρυνση κούφιων ραγών, τη διάσπαση των σβόλων σταφίδας και το καθαρισμό της επιφάνειας από τα σάκχαρα, που προέρχονται από τους τραυματισμούς των ραγών (19). Η Κορινθιακή σταφίδα πλένεται περίπου για ένα λεπτό ώστε να μην απορροφηθεί νερό. Απεναντίας, η ύγρανση της Σουλτανίνας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχημένη θείωση που ακολουθεί. Το στράγγισμα επιτυγχάνεται με ταλαντευόμενα κόσκινα και συνδυάζεται με απομάκρυνση ποσοστού μίσχων και λοιπών ξένων υλών.

1. *Θείωση – πλύση – ρύθμιση υγρασίας (μόνο για τη Σουλτανίνα)*

Η θείωση της σταφίδας έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του χρώματος (λεύκανση), την αύξηση του χρόνου διατήρησης και την απαλλαγή από έντομα της αποθήκης. Το πλύσιμο που ακολουθεί απομακρύνει την περίσσεια θειώδους από την επιφάνεια της σταφίδας. Τελικά η σταφίδα οδηγείται στο ξηραντήριο. Το ξηραντήριο είναι μία συνεχής σήραγγα με κυλιόμενη συρμάτινη μεταφορική ταινία. Η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά από τους 85 °C στους 60 °C κατά τη διάρκεια της ξήρανσης που ποικίλει μέχρι η τελική υγρασία να ρυθμιστεί στο 15%. Στο τέλος της ρύθμισης, η σταφίδα δέχεται την επίδραση ψυχρού ρεύματος αέρα, για τη μείωση της θερμοκρασίας της.

## *2. Απομίσχυση – στίλνωση*

Για την απομίσχυση συνήθως χρησιμοποιούνται μηχανήματα που περιλαμβάνουν διάτρητα κόσκινα μέσα στα οποία περιστρέφονται πτερύγια και απομακρύνουν τους μίσχους. Στο στάδιο αυτό η σταφίδα υφίσταται αρκετές ζημιές που εξαρτώνται από το ποσοστό υγρασίας των σταφίδων και τις συνθήκες λειτουργίας των μηχανημάτων. Για να μειωθούν οι κακώσεις και να αποκτήσει το προϊόν κάποια στιλπνότητα χρησιμοποιούνται διάφορες ελαιώδεις ουσίες. Η χρήση των ουσιών αυτών βοηθά επίσης στη παρεμπόδιση του σβολιάσματος και στην τόνωση του χρωματισμού. Τα έλαια που χρησιμοποιούνται είναι: (α) Ελαιόλαδο ραφινέ σε πυρηνέλαιο χαμηλής οξύτητας σε ποσοστό έως 0,3%. (β) Παραφινέλαιο σε αναλογία 0,3-0,5% του ξηρού βάρους της σταφίδας. (γ) Εμπορικά σκευάσματα όπως το Sultanol, το Durkex-500, το Migryol, το Mytaget κ.α. Η εφαρμογή των σκευασμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα ανεπιθύμητων οσμών.

## *3. Τυποποίηση – Συσκευασία*

Η τυποποίηση της σταφίδας γίνεται ανάλογα με το μέγεθος και επιτυγχάνεται με το πέρασμα των σταφίδων από σειρά κόσκινων με τρύπες ανάλογες των επιζητούμενων ποιοτικών τύπων. Στην Ελλάδα οι κατηγορίες Σουλτανίνας θειωμένης ή μη διακρίνονται σε:

- Σταφίδες χονδρές No 00, 0, 1, 2, 3, 4, 5
- Σταφίδες ψιλές No 21, 22, 24

Με καλύτερη ποιότητα τον τύπο 00. Η κατάταξη των ραγών λαμβάνει υπόψη το ποσοστό των ραγών καστανόμαυρου χρώματος. Τα κριτήρια χρώματος αλλάζουν αν η σταφίδα είναι θειωμένη. Η συσκευασία γίνεται σε κιβώτια 3-15 Kg ή σε μικροσυσκευασία σακιδίων από σελοφάν ή πλαστικό.



Η Κορινθιακή σταφίδα κατατάσσεται σε μία από τις εξής ποιοτικές κατηγορίες: Extra Choicest, Choicest και Choice. Η κατάταξη αυτή γίνεται βάσει του χρώματος, της περιεχόμενης υγρασίας, των ξένων υλών και του ποσοστού ισχνών, κόκκινων βεβλαμένων, πολύ χονδρών ή πολύ ψιλών και αναπομίσχωτων ραγών. Επίσης κατατάσσεται σύμφωνα με το μέγεθος σε Bold, Medium, Small, Siltings, Ungraded. Στην εμπορική πρακτική έχουν καθιερωθεί τα τοπωνυμικά σήματα όπως Vostizza, Gulf, Zanta, Patras κ.α. Η συσκευασία γίνεται σε χάρτινα κιβώτια με πλαστικά σακουλάκια ή σε μικροσυσκευασία πλαστικών ή σελοφάν.

### **1.5. Αποθήκευση της σταφίδας**

Η σταφίδα διατηρείται μέχρι την τελική της επεξεργασία σε αποθήκες, για εξισορρόπηση της υγρασίας της (19). Οι αποθήκες πρέπει να είναι κατάλληλων προδιαγραφών, με ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, αερισμού και φωτισμού για την αποτροπή αλλοιώσεων. Οι κυριότερες αλλοιώσεις είναι το ζαχάρωμα, το σβόλιασμα, η αλλοίωση του χρώματος και οι προσβολές από έντομα και μύκητες. Σημαντικό ρόλο στη διατηρησιμότητα των σταφίδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παίζει η μέθοδος αποξήρανσης των σταφυλιών και η περιεκτικότητά τους σε υγρασία. Η υγρασία που πρέπει να έχουν οι σταφίδες ώστε να διατηρηθούν σε καλή κατάσταση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης κυμαίνεται από 13 έως 15%. Στη χώρα μας κατά την παράδοση από τον παραγωγό στο εργοστάσιο, η εκτίμηση της περιεκτικότητας σε υγρασία γίνεται με εμπειρικά κριτήρια. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης, κυρίως τα τελευταία χρόνια, οδηγεί σε ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος.

### **1.6. Τα συστατικά της σταφίδας**

Η σταφίδα, και ειδικά η έντονης ερυθρής αποχρώσεως Κορινθιακή σταφίδα είναι μάλλον πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά. Παράλληλα η ύπαρξη ιχνοστοιχείων, όπως του καλίου και του ασβεστίου, μικρού μοριακού βάρους σακχάρων (35% φρουκτόζη) και οι πλούσιες φυτικές ίνες (7% κ.β.) λογικά συνιστούν ένα διατροφικώς άριστο προϊόν. Δυστυχώς δεν υπάρχουν σημαντικά βιβλιογραφικά δεδομένα για την περιεκτικότητα της (Κορινθιακής) σταφίδας στα ανωτέρω συστατικά. Τα υπάρχοντα στοιχεία σε βασικά διατροφικά μακρο- και μικρο-συστατικά (κυρίως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) προέρχονται από τις χημικές αναλύσεις και τις προδιαγραφές προϊόντων (Παναιγιάλειος Ένωση Συνεταιρισμών,

2001). Δεν υπάρχει ένδειξη του επιπέδου διατήρησης των διαφόρων συστατικών κατά την επεξεργασία, όπως η έψηση (π.χ. για παραγωγή μπισκότων ή αρτοσυσκευασμάτων). Αποδείχθηκε, ωστόσο, ότι η υψηλή ή και μέτρια επίδραση θέρμανσης προκαλεί αποσύνθεση κάποιων σακχάρων, όπως η φρουκτόζη ενώ η γλυκόζη πρακτικά διατηρείται (Karathanos, 1999).

Περίπου 3-4 Kg σταφυλιών αποδίδουν 1 Kg οποιασδήποτε ποικιλίας σταφίδας. Οι σταφίδες είναι πλούσιες σε απλά σάκχαρα όπως φρουκτόζη και γλυκόζη, τα οποία και αποδίδουν ενέργεια άμεσα. Η παρουσία των σακχάρων κινητοποιεί μία αλκαλική αντίδραση με την οποία πραγματοποιείται εξουδετέρωση των οξέων που σχηματίζονται στον οργανισμό μετά από τη κατανάλωση τροφών όπως το κρέας και τα αυγά.

**Πίνακας 1.1 Θρεπτική αξία της σταφίδας Βοστίτσας**

| Κορινθιακή Σταφίδα (33) |                   |                                |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------|
|                         | Σύσταση ανά 100 g | Σύσταση ανά μικρομερίδα (18 g) |
| Ενέργεια (Kcal)         | 320               | 57,6                           |
| Υδατάνθρακες (g)        | 75                | 13,5                           |
| Πρωτεΐνες (g)           | 2,5               | 0,45                           |
| Λιπαρά (g)              | 0,4               | 0,07                           |
| Φυτικές ίνες (g)        | 6,7               | 1,2                            |
| Απλά σάκχαρα (g)        | 68                | 12,2                           |
| Βιταμίνη Α (μg)         | √                 | √                              |
| Βιταμίνη Β2 (mg)        | 0,038             | 0,007                          |
| Βιταμίνη Β6(mg)         | √                 | √                              |
| Βιταμίνη Β12(mg)        | √                 | √                              |
| Βιταμίνη C(mg)          | 1,3               | 0,234                          |
| Βιταμίνη Ε(mg)          | √                 | √                              |
| Κάλιο (g)               | 0,7               | 0,13                           |
| Μαγνήσιο (mg)           | 30                | 5,4                            |
| Νάτριο (mg)             | 2,5               | 0,45                           |
| Σίδηρος mg)             | 4                 | 0,72                           |

|                  |         |      |
|------------------|---------|------|
| Ψευδάργυρος (mg) | 0,6     | 0,11 |
| Ασβέστιο (mg)    | 10      | 1,8  |
| Μαγνήσιο (mg)    | 0,5     | 0,09 |
| Χαλκός (mg)      | 0,7     | 0,13 |
| Φώσφορος (mg)    | 180     | 32,4 |
| Υγρασία          | 14-17%% |      |
| Συνολικά στερεά  | 84-87%  |      |

**Πίνακας 1.2 Θρεπτική αξία σταφίδας τύπου raisin**

| Σταφίδα τύπου raisin (34) |                   |                                   |
|---------------------------|-------------------|-----------------------------------|
|                           | Σύσταση ανά 100 g | Σύσταση ανά<br>μικρομερίδα (18 g) |
| Ενέργεια (Kcal)           | 330               | 54                                |
| Υδατάνθρακες (g)          | 78                | 14,2                              |
| Πρωτεΐνες (g)             | 3,3               | 0,6                               |
| Λιπαρά (g)                | 0,6               | 0,1                               |
| Φυτικές ίνες (g)          | 3,9               | 0,7                               |
| Απλά σάκχαρα (g)          | 65                | 11,7                              |

### 1.7. Φυσιολογικές δράσεις της σταφίδας

Σύμφωνα με έρευνα (6) η οποία αναφέρεται στον τύπο σταφίδας raisin, ο οποίος διαφέρει βέβαια από τις ελληνικές ποικιλίες, η σταφίδα μπορεί να έχει θετική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα μέσω των φρουκτανών που περιέχει. Οι φρουκτάνες που είναι επίσης γνωστές και ως φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), μπορούν να αποτελέσουν φραγμό για τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και περαιτέρω να εμποδίσουν τη σύνθεση χοληστερόλης.

Επίσης η σταφίδα φαίνεται να έχει αντιοξειδωτικές δράσεις οι οποίες οφείλονται στο πολυφαινόλικό της περιεχόμενο. Περισσότερες λεπτομέρειες θα παρατεθούν παρακάτω.

### **1.8. Η θέση της σταφίδας στη Μεσογειακή διατροφή**

Η σταφίδα όπως αναφέρθηκε αποτελεί ένα προϊόν το οποίο καλλιεργείται στη λεκάνη της Μεσογείου και ιδιαίτερα σε μεγαλύτερο βαθμό στον ελλαδικό χώρο. Αυτό το γεγονός καθιστά τη σταφίδα σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής. Τα πρότυπα της Μεσογειακής διατροφής προτείνουν κατανάλωση 3 μικρομερίδων φρούτων την ημέρα. Μία μικρομερίδα σταφίδας ισοδυναμεί με ποσότητα ίση με 2 κουταλιές της σούπας του συγκεκριμένου προϊόντος (~18 g) (33). Συνεπώς στην περίπτωση που όλες τις προτεινόμενες μικρομερίδες φρούτων καλυφθούν από την κατανάλωση σταφίδας, ο καταναλωτής θα καταναλώσει περίπου 54 g σταφίδας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

# ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

### 2.1. Γενικά

Με τον όρο πολυφαινόλες χαρακτηρίζεται μια μεγάλη ετερογενής ομάδα ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό ότι φέρουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απ'ευθείας σε ένα ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς πυρήνες. Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Συνήθως συναντώνται στη φύση συνδεδεμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα σάκχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό σάκχαρο που απαντάται είναι η γλυκόζη. Άλλα σάκχαρα είναι: γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικά, γαλακτορονικά οξέα κλπ.

### 2.2 Κατηγορίες και χημικοί τύποι

Με βάση τη χημική δομή τους οι πολυφαινόλες κατατάσσονται σε 10 κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κιναμμωμικά οξέα, κουμαρίνες/ίσοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες/νεολιγνάνες/λιγνίνες.

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα πολυφαινολών και αποδίδουν στα φρούτα και τα λαχανικά ένα πολύ μεγάλο μέρος του αρώματος και του χρώματός τους. Έχουν αναφερθεί περισσότερα από 5000 διαφορετικά είδη φλαβονοειδών. Τις έξι κυριότερες υποκατηγορίες φλαβονοειδών αποτελούν: οι *φλαβόνες* (π.χ. απιγενίνη, λουτεόλη), οι *φλαβόνες* (π.χ. κερκετίνη, μυρισετίνη), οι *φλαβανόνες* (π.χ. ναριγκενίνη, εσπεριδίνη), οι *κατεχίνες* ή *φλαβανόλες* (π.χ. επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη οι οποίες αν πολυμεριστούν δημιουργούν τις ταννίνες και τις προανθοκυανιδίνες), οι *ανθοκυανιδίνες* (π.χ.

κυανιδίνη, πελαργονιδίνη) και οι *ισοφλαβόνες* (π.χ. γενιστεΐνη, δαΐνδεΐνη). Τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή που περιέχονται στα φυτά είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα (γλυκοζίτες), παρόλο που περιστασιακά παρουσιάζονται και ως αγλυκόνες. Η Αντιοξειδωτική τους ικανότητα οφείλεται κυρίως στον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων πάνω στο μόριο (2). Το ενδιαφέρον για τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες έχει αυξηθεί λόγω της πιθανής αντιοξειδωτικής τους δράσης η οποία τους αποδίδεται μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, όπως έχει παρατηρηθεί *in vitro*. Δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα μερικών φλαβονοειδών είναι μεγαλύτερη από αυτή που αρχικά είχε εκτιμηθεί. Παρόλα αυτά οι επιδημιολογικές έρευνες που μελετούν το ρόλο των φλαβονοειδών στην υγεία του ανθρώπου δεν μας οδηγούν σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα. Κάποιες έρευνες υποστηρίζουν πως η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φλαβονοειδή έχουν προστατευτικές ιδιότητες έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Άλλες έρευνες δεν δείχνουν ότι παρουσιάζεται καμία επίδραση στον οργανισμό από την κατανάλωση φλαβονοειδών και λίγες αναφέρονται σε πιθανή αρνητική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (1).

### **2.3. Πηγές πολυφαινόλων**

Οι πολυφαινόλες είναι αρκετά διαδεδομένες στα φυτικά τρόφιμα (λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, ξηροί καρποί, φρούτα κλπ) καθώς και στα ποτά (κρασί, μπύρα, τσάι, κακάο). Τα επίπεδα των πολυφαινόλων παρουσιάζουν πολλές διακυμάνσεις ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους. Ακόμα, η παρουσία των πολυφαινόλων στα φυτικά τρόφιμα επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Άλλοι παράγοντες όπως ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση επηρεάζουν το περιεχόμενο των φαινολικών παραγώγων των φυτών.

Οι πολυφαινόλες είναι εν μέρει υπεύθυνες για τις αντιτροφικές ιδιότητες των φυτών. Η στύφή και πικρή γεύση των τροφίμων και των ποτών εξαρτάται από τη περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Η οξείδωση των πολυφαινόλων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης έχει ως αποτέλεσμα είτε ωφέλιμα, είτε ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά στα τρόφιμα.

Στα όσπρια και τα δημητριακά οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ταννίνες. Στα όσπρια τη μεγαλύτερη

περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν οι σκούρες ποικιλίες, όπως κόκκινα και μαύρα φασόλια και τα μαύρα ρεβίθια. Τα όσπρια περιέχουν επίσης ισοφλαβόνες, ενώ τα λαχανικά περιέχουν κυρίως φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Αυτοί εμφανίζονται στα εξωτερικά τμήματα των φυτών. Οι ρίζες και οι βολβοί έχουν κατά κανόνα χαμηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, με εξαίρεση κάποια φυτά όπως τα κρεμμύδια και τη γλυκόριζα. Τα μούρα χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανιδίνες, ενώ φρούτα όπως τα μήλα και διάφορα εσπεριδοειδή περιέχουν κατά κύριο λόγο φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή αντίστοιχα.

#### **2.4. Απορρόφηση και μεταβολισμός πολυφαινολών**

Προκειμένου οι πολυφαινόλες να επιδείξουν τις προστατευτικές τους δράσεις πρέπει να προσληφθούν από τον οργανισμό. Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα η απορρόφηση των φλαβονοειδών από τη προσλαμβανόμενη τροφή θεωρούνταν αμελητέα, αφού με εξαίρεση της κατεχίνες, τα φλαβονοειδή είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα με τη μορφή γλυκοζιτών. Μόνο ελεύθερα φλαβονοειδή με τη μορφή αγλυκονών θεωρείτο ότι μπορούσαν να διαπεράσουν το εντερικό τοίχωμα, αφού επικρατούσε η πεποίθηση ότι κανένα ένζυμο που θα μπορούσε να σπάσει τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς δεν εκκρίνεται στο έντερο και ή εδράζεται στο εντερικό τοίχωμα. Βέβαια, υπήρχε η πεποίθηση ότι η υδρόλυση που πραγματοποιείται στο κόλον αποικοδομεί τα φλαβονοειδή και έτσι πραγματοποιούνταν κάποια μικρή απορρόφηση της τάξεως του 1%. Όμως τα τελευταία χρόνια έρευνες που πραγματοποιήθηκαν αρχικά στα ποντίκια και αργότερα στον ανθρώπινο οργανισμό απέδειξαν ότι πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη απορροφώνται από το λεπτό έντερο ακόμη και σε ποσοστό 52

Μετά την απορρόφησή τους από το έντερο ο επακόλουθος μεταβολισμός των πολυφαινολών είναι κυρίως γνωστός από έρευνες σε ζώα και σε πολύ μικρότερο βαθμό από έρευνες στους ανθρώπους. Ομάδες υδροξυλίων υφίστανται σύζευξη με γλυκορουνικά οξέα ή σουλφονικές ομάδες στο ήπαρ. Επίσης η έκκριση γλυκουρονιδίων ή σουλφατιδίων στη χολή φαίνεται να είναι σημαντική. Βακτήρια στο κόλον υδrolύουν συμπλέγματα ή γλυκοζίτες αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την απορρόφηση των αγλυκονών. Έτσι, διάφορα σύμπλοκα μπορεί να επαναπορροφηθούν και να περάσουν στην εντεροηπατική κυκλοφορία. Τα φαινολικά οξέα αποβάλλονται από τον οργανισμό με τη μορφή ουρίας (10).

Το κατά πόσον θα απορροφηθεί και θα μεταβολιστεί μία πολυφαινόλη από τον οργανισμό εξαρτάται από παράγοντες όπως: η χημική της δομή(βαθμός γλυκοζυλίωσης/ ακυλίωσης), τη βασική δομή (βενζολικός ή φλαβονοειδικός πυρήνας), σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες, τη μοριακή της μάζα, το βαθμό πολυμερισμού και τη διαλυτότητά της.

## **2.5. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών**

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών διαφέρει αρκετά ανάμεσα στα διάφορα είδη. Έτσι ακόμα και αυτές που βρίσκονται σε αφθονία στη διατροφή μας δεν είναι απαραίτητα αυτές που διαθέτουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενεργών μεταβολιτών στους ιστούς- στόχους. Σε ανασκόπηση (14) στην οποία μελετήθηκαν 97 έρευνες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό, εξετάστηκε η κινητική και η έκταση της απορρόφησης των πολυφαινολών σε ενήλικες, μετά από κατανάλωση καθαρής ουσίας ή εκχυλίσματος ή με τη μορφή τροφίμου ή ροφήματος. Η παραπάνω ανασκόπηση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γαλλικό οξύ και οι ισοφλαβόνες αποτελούν τις καλύτερα απορροφήσιμες πολυφαινόλες. Ακολουθούν οι κατεχίνες, οι φλαβανόλες και οι γλυκοζίτες της κερκετίνης. Οι λιγότερο απορροφήσιμες πολυφαινόλες είναι οι προανθοκυανιδίνες, οι εστέρες κατεχινών τσαγιού σε γαλλικό οξύ και οι ανθοκυανιδίνες. Τέλος τα δεδομένα είναι περιορισμένα για τα υδροξυκινναμωμικά οξέα καθώς και πολλές άλλες πολυφαινόλες

## **2.6. Φυσιολογικές δράσεις των πολυφαινολών**

### ■ Αντιοξειδωτική δράση

Διάφορες έρευνες δείχνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό προκαλούν οξειδωτικές διαδικασίες σε διάφορα μόρια όπως τα λιποειδή, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στην αρχική φάση ορισμένων εκφυλιστικών ασθενειών. Συνεπώς τα αντιοξειδωτικά που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών όπως καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα, καταρράκτης, ασθένειες του εγκεφάλου και ρευματοειδής αρθρίτιδα.

Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν διάφορα αντιοξειδωτικά συστατικά όπως οι βιταμίνες C και E και τα καροτενοειδή, των οποίων οι ιδιότητες



έχουν εδραιωθεί τα τελευταία χρόνια. Όμως τα μόρια αυτά δεν είναι τα μοναδικά που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική δράση των φρούτων και των λαχανικών. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και οι πολυφαινόλες που περιέχονται σ' αυτά όπως για παράδειγμα τα φλαβονοειδή.

- Επίδραση στη πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών:

Κυρίως οι πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων) με αποτέλεσμα τη καθυστέρηση της απορρόφησής τους.

- Επίδραση στην απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων:

Παρεμποδίζουν τα ιόντα που συμβάλλουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, κυρίως από φλαβονοειδή που προκαλούν μείωση της απορρόφησης Fe, Cu, Zn, Na, Al υπό τη δημιουργία συμπλόκων.

- Επίδραση στα επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα

Κυρίως από ταννίνες και πολυφαινόλες του ελαιολάδου.

- Προστασία επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος

- Αύξηση των επιπέδων της HDL και μείωση των επιπέδων LDL

- Αντικαρκινική δράση

- Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση

Παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων

- Αντιαλλεργικές ιδιότητες

- Αγγειοδιασταλτική δράση.

Διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO

- Προστασία του DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές

Πέρα από τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες τους, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πρόσθετο ενδιαφέρον για τη μαγειρική, την κοσμετική και τη φαρμακοβιομηχανία, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα συνθετικών αντιοξειδωτικών.

## 2.7. Τα αντιοξειδωτικά στη σταφίδα

Μελέτες σχετικές με την παρουσία αντιοξειδωτικών στην Κορινθιακή σταφίδα και τη Σουλτανίνα δεν έχουν πραγματοποιηθεί. Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχει μόνο μία αναφορά στο πολυφαινόλικό περιεχόμενο της σταφίδας (7) η οποία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα σταφίδας με την ονομασία raisins και Thompson Seedless grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Sultanina) από τη Καλιφόρνια των Η.Π.Α. Στη μελέτη αυτή ανιχνεύτηκαν:

Στα δείγματα τύπου *raisin* οι πολυφαινόλες: οξειδωμένα κινναμωμικά οξέα, υδροξυμεθυλοφουρουράλη, πρωτοκατεχικό οξύ, καφταρικό οξύ, κουταρικό οξύ, ρουτίνη, γλυκοζίτες της κερκετίνης, γλυκοζίτες της καμπερόλης

Στα δείγματα τύπου Thompson Seedless grapes οι πολυφαινόλες: cis-κουταρικό οξύ, κουταρικό οξύ, cis-κουταρικό οξύ, κουταρικό οξύ, ρουτίνη, γλυκοζίτες της κερκετίνης, γλυκοζίτες της καμπερόλης, κατεχίνη, επικατεχίνη και οι προανθοκυανιδίνες B3, B1, B4, B2, τριμερή και τετραμερή προκυανιδίνης.

Στη μελέτη αυτή (7) ελέγχθηκε και η πιθανότητα παρουσίας ρεσβερατρώλης στη σταφίδα αφού υπάρχει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε μεγάλες ποσότητες στα σταφύλια και στο κρασί. Όμως δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη πολυφαινόλη στη σταφίδα. Το γεγονός αυτό πιθανολογείται ότι οφείλεται στο ότι τα σταφύλια χάνουν την ικανότητά τους να παράγουν ρεσβερατρώλη κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Επίσης μελετήθηκε και η πιθανότητα παρουσίας ελλαγικού οξέος. Το ελλαγικό οξύ παράγεται συχνά σε καρπούς και φρούτα όπως οι φράουλες και τα βατόμουρα. Όμως δε βρέθηκαν στην έρευνα αυτή αξιόλογες ποσότητες ελλαγικού οξέος στα δείγματα.

Ακόμη, σε πρόσφατη έρευνα (6) αναφέρεται ότι η σταφίδα τύπου raisin αποτελεί πλούσια πηγή των ισοφλαβονών δαϊσδεΐνη και γενιστεΐνη σε ποσότητα ίση με 1840 mg /Kg νωπού τροφίμου και ότι περιέχει πολύ υψηλές ποσότητες υδρόξυ-κινναμωμικού οξέος (περίπου 100 ppm) .

## 2.8. Τα αντιοξειδωτικά στα σταφύλια

Σε μία μελέτη των Alonso et al. (8) στην οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση των συστατικών κόκκινων και λευκών ποικιλιών σταφυλιού με τη μέθοδο HPLC βρέθηκε ότι τόσο στα κόκκινα όσο και στα λευκά σταφύλια εμπεριέχονται οι

πολυφαινόλες κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, καφταρικό οξύ, cis- και trans- κουταρικό οξύ.

Γενικά σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τα αντιοξειδωτικά των σταφυλιών έχουν βρεθεί πολλές και διαφορετικής δομής πολυφαινόλες (9). Συγκεκριμένα, τις πιο απλές δομές αποτελούν μόνο-, δι- και τρι-φαινόλες όπως η πυροκατεχόλη, η ρεσορκινόλη, η βανιλίνη, p-υδροξυ-βενζαλδεϋδες, βενζοϊκά οξέα όπως το γαλλικό, το βανιλλικό, το σαλικυλικό και το συριγγικό οξύ. Ακόμη περιέχονται υδρόξυ-κιναιμωμικά οξέα όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το p-κουμαρικό καθώς και εστέρες p-κουμαρικού οξέος που σχηματίζονται μετά από αντίδραση με το τρυγικό οξύ. Κάποιες περισσότερες πολύπλοκες πολυφαινόλες των σταφυλιών έχουν δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Τέτοιες είναι οι κουμαρίνες, οι βενζοπυρόνες και τα κατιόντα φλαβυλίου οι οποίες και σχηματίζουν φλαβονόλες, φλαβονόλες (γλυκοζίτες καμπερόλης, κερκετίνης και μυρισετίνης) και ανθοκυανιδίνες. Οι γλυκοζίτες της καμπερόλης, της κερκετίνης και της μυρισετίνης, στα κόκκινα κρασιά αντιδρούν με τις ανθοκυανιδίνες προς το σχηματισμό ταννινών οι οποίες είναι οι κύριες υπεύθυνες για το λευκό χρώμα των σταφυλιών και των κρασιών. Οι ανθοκυανιδίνες διαθέτουν στη δομή τους κατιόν βενζοπυρολλίου σαν βασικό σκελετό. Αυτό είναι υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα τόσο του σταφυλιού όσο και του κρασιού. Επιπλέον, στα σταφύλια εντοπίζονται και οι φλαβανοτριόλες κατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη. Τέλος οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που περιέχονται στο κρασί είναι οι γλυκοζίτες της δελφινιδίνης, της μαλβιδίνης, της πετουνιδίνης και της κυανιδίνης.

Σε έρευνα στην οποία μελετήθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο κόκκινων και λευκών επιτραπέζιων σταφυλιών (20), βρέθηκαν τα εξής πολυφαινολικά συστατικά: *Ανθοκυανιδίνες*: γλυκοζίτες της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της πεονιδίνης και της μαλβιδίνης. Σε όλες της ποικιλίες η πεονιδίνη βρέθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα από τις υπόλοιπες ανθοκυανιδίνες. Σε αντίθεση, η κύρια ανθοκυανιδίνη στις ποικιλίες οινοποιίας είναι η μαλβιδίνη. Άλλες ανθοκυανιδίνες που βρίσκονται σε αφθονία είναι οι γλυκοζίτες της μαλβιδίνης και της κυανιδίνης. Η δελφινιδίνη και η πετουνιδίνη είναι οι λιγότερο εμφανιζόμενες ανθοκυανιδίνες με συνεισφορά 2-3% στο συνολικό ανθοκυανιδικό περιεχόμενο. *Φλαβονόλες*: γλυκορουνίδια και γλυκοζίτες της κερκετίνης. *Παράγωγα του υδρόξυ-κιναιμωμικού οξέος*: καφεϋλοτριγύκο και p-κουμαρόϋλοτριγικό οξύ. *Στιλβένια*:

trans-ρεσβερατρόλη. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα στυλβένια χρειάζονται αρκετό χρόνο ώστε να σχηματιστούν και γι αυτό είναι λογικό να παρουσιάζεται έλλειψη σε σταφύλια που αναλύθηκαν πολύ γρήγορα μετά τη συγκομιδή.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών με σκοπό το προσδιορισμό του περιεχομένου τους σε ανθοκυανιδίνες (21), βρέθηκε ότι το επικρατές συστατικό ήταν οι γλυκοζίτες της μαλβιδίνης, ακολουθούν τα κουμαρικά παράγωγά της, οι γλυκοζίτες της πεονιδίνης, της πετουνιδίνης και της δελφινιδίνης. Σε αντίθεση, οι γλυκοζίτες της κυανιδίνης εμπεριέχονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο βαθμός ωρίμανσης των σταφυλιών επηρεάζει και το περιεχόμενό τους σε ανθοκυανιδίνες, γι αυτό και οι ποσότητες των ανθοκυανιδινών που προκύπτουν μπορεί να διαφέρουν σε σταφύλια της ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικού επιπέδου ωρίμανσης.

Σε πρόσφατες έρευνες (15, 20, 21) στις οποίες μελετήθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο λευκών και κόκκινων ποικιλιών σταφυλιού βρέθηκε ότι τα κόκκινα σταφύλια έχουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από τα λευκά. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης δε φαίνεται σαφώς κάποια αλλαγή της πολυφαινολικής σύστασης. Ανάμεσα σε κόκκινα και λευκά σταφύλια τα οποία είχαν τον ίδιο συνολικό πολυφαινολικό δείκτη (χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu) βρέθηκαν μεγάλες διαφορές ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα με καλύτερα τα κόκκινα.

**Πίνακας 2.1**

Ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών σε κόκκινες και λευκές ποικιλίες σταφυλιών (mg/ Kg σταφυλιών)

|                  | Κόκκινες<br>ποικιλίες | Λευκές<br>ποικιλίες |
|------------------|-----------------------|---------------------|
| Κατεχίνη         | 22,87-586,86          | 5,99-87,18          |
| Επικατεχίνη      | 12,05-137,12          | 1,41-14,03          |
| Επιγαλλοκατεχίνη | 1,12-41,73            | 0,50-19,77          |
| Καφταρικό οξύ    | 0,51-28,6             | 0,24-39,88          |
| c-Κουταρικό οξύ  | 0,10-14,6             | 0,09-1,84           |
| t-Κουταρικό οξύ  | 0,16-4,89             | 0,06-8,08           |
| Κερκετίνη        | 5,0-37,3              |                     |

|             |            |  |
|-------------|------------|--|
| Καμπφερόλη  | Ίχνη-12,3  |  |
| Δελφινιδίνη | 1,1-109,3  |  |
| Κυανιδίνη   | N.D.-66,3  |  |
| Πετουνιδίνη | N.D -72,6  |  |
| Πεονιδίνη   | 21,3-192,7 |  |
| Μαλβιδίνη   | 8,8-1202,6 |  |

ND: μη ανιχνευθέν

Στο παρακάτω πίνακα παρατίθενται στοιχεία πρόσφατης έρευνας (17) σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα και το πολυφαινολικό περιεχόμενο χυμών λευκών και κόκκινων σταφυλιών.

**Πίνακας 2.2 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και τιμή ORAC-FL σε χυμούς σταφυλιών και ξύδι**

|                                 | Ολικές πολυφαινόλες <sup>a</sup> | ORAC-FL value <sup>b</sup> | Εύρος συγκέντρωσης (μg/mL) |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Χυμοί κόκκινων σταφυλιών</i> |                                  |                            |                            |
|                                 | 705-1177                         | 14.6-25.0                  | 0.07–0.33                  |
| <i>Χυμοί λευκών σταφυλιών</i>   |                                  |                            |                            |
|                                 | 151-474                          | 3.5-11.1                   | 0.20–2.00                  |
| <i>ξύδι</i>                     |                                  |                            |                            |
|                                 | 306-867                          | 6.9-11.5                   | 0.20–1.43                  |

<sup>a</sup> Εκφρασμένα σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος/L

<sup>b</sup> Εκφρασμένα σε μmol of trolox-equivalents/mL.

## **2.9. Αλλαγές στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών και του κρασιού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης**

Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης των σταφυλιών τα σάκχαρα συναθροίζονται με ταχείς ρυθμούς. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την αλλαγή στη υφή του καρπού, αφού αυτός γίνεται πιο μαλακός και τη συσσώρευση ανθοκυανιδινών (στις κόκκινες ποικιλίες). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι όσο εξελίσσεται η διαδικασία της ωρίμανσης η αντιοξειδωτική ικανότητα των σταφυλιών πιθανώς να μειώνεται. Αυτό όμως που επιβεβαιώνεται από αρκετές έρευνες είναι ότι, ανεξαρτήτως ποικιλίας, τα λιγότερο ώριμα σταφύλια διαθέτουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα πιο νεαρά σταφύλια έχουν μεγαλύτερη αναλογία (φλοιού και σπόρου)/σάρκα. Γενικά, υπάρχει η πεποίθηση ότι στο φλοιό και τα κουκούτσια βρίσκονται οι περισσότερες πολυφαινόλες που ενισχύει τη προηγούμενη πρόταση.

Σε αρκετές έρευνες αναφέρεται πως κατά την ωρίμανση του κρασιού πραγματοποιούνται αντιδράσεις συμύκνωσης των ανθοκυανιδινών με φλαβονόλες με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερών σχηματισμών (22-24) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το χρώμα του κρασιού και τη σταθερότητα του (22). Ακόμη αντιδράσεις συμύκνωσης ανθοκυανιδινών και φλαβονολών με άλλα μόρια μικρότερου μοριακού βάρους, όπως πυροσταφυλικό οξύ, βινυλφαινόλη ή γλυοξυλικό οξύ σχηματίζουν καινούριες χρωμοφόρες ενώσεις που είναι περισσότερο σταθερές και διατηρούν το χρώμα του κρασιού για μεγαλύτερες περιόδους. Επιπρόσθετα, πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν νέα είδη μπλε ανθοκυανιδινών σε κρασιά (23). Οι σχηματισμοί αυτοί προκύπτουν από αντίδραση μεταξύ ανθοκυανιδινών και πυροσταφυλικού οξέος και βινυλοφλαβονολών. Όλες αυτές οι αντιδράσεις όχι μόνο τροποποιούν το χρώμα αλλά και επιφέρουν αλλαγές στο στυφό και πικρό άρωμα δημιουργώντας μια πιο απαλή γεύση.

## **2.10. Τα αντιοξειδωτικά στο κρασί**

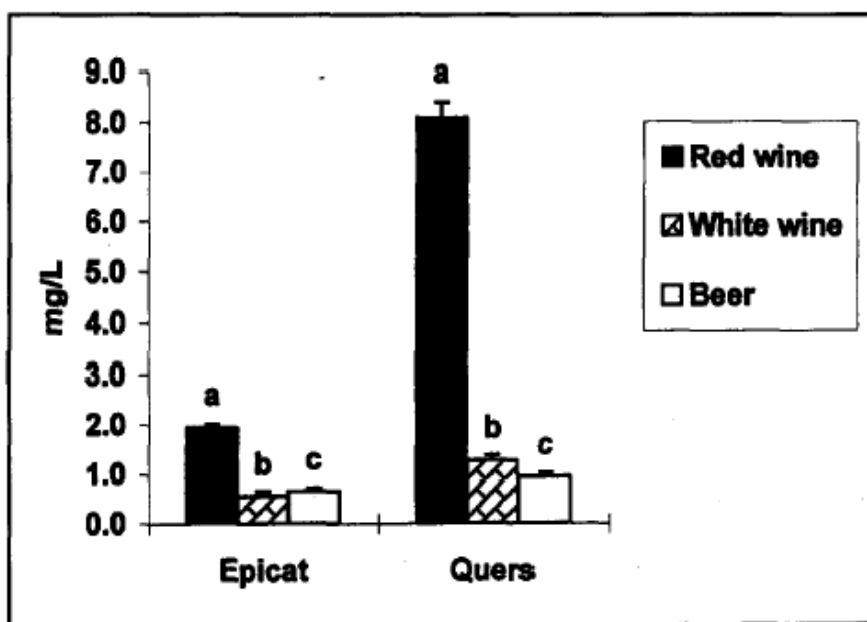
Πολλές εργασίες έχουν υποστηρίξει την ευεργετική επίδραση της λελογισμένης κατανάλωσης κρασιού, ιδιαίτερα του κόκκινου, στην υγεία (*French paradox*). Η θετική δράση του κρασιού αποδίδεται σε μικρο-συστατικά του σταφυλιού, όπως η ρεσβερατρόλη, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο κρασί είναι φλαβονόλες όπως κερκετίνη και μυρισετίνη, απιγενίνη, φλαβανόλες όπως κατεχίνη,

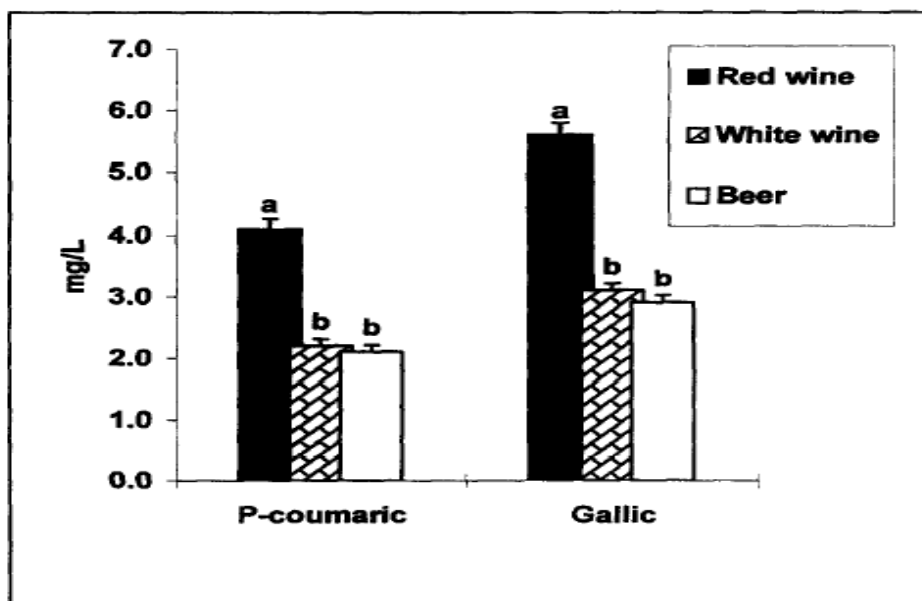
επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη, στιλβένια όπως η ρεσβερατρόλη, η παλλιδόλη, ταννίνες και πολυμερή ανθοκυανινών (25-26). Σε πολλές ποικιλίες κρασιών έχει μελετηθεί το περιεχόμενό τους σε ανθοκυανιδίνες. Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που απαντώνται είναι η μαλβινιδίνη, η πεονιδίνη, η πετουνιδίνη, η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη (26). Ακόμη στα κρασιά περιέχονται φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό, το καφεϊκό, το καφεϋλοτριγικό, το p-κουμαρικό, το p-κουμαρούλοτριγικό και το 2,5 δι-S-γλουταθειόνυλο-καφταρικό (26).

Έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στο κρασί και σε κρασί χωρίς αλκοόλ (11), δείχνει ότι το αλκοολικό περιεχόμενο του κρασιού μπορεί να προσδίδει ένα επιπλέον όφελος στο λιπιδαιμικό προφίλ. Κάποιες έρευνες υποστηρίζουν ότι τέτοια οφέλη μπορεί να μη σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κόκκινου κρασιού. Σε πρόσφατη έρευνα στην οποία πραγματοποιούνταν παρεμβάσεις σε ανθρώπους παρατηρήθηκε ελάττωση του επιπέδου της οξείδωσης της LDL σε συμμετέχοντες που κατανάλωναν κόκκινο κρασί χωρίς αλκοόλ (41). Σε προηγούμενες έρευνες, το κόκκινο κρασί το οποίο είναι πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες από το λευκό φάνηκε να παρεμποδίζει σε μεγαλύτερο βαθμό την οξείδωση της LDL. Το κατά πόσο το αλκοολικό περιεχόμενο του κρασιού βοηθά την απορρόφηση των πολυφαινολών από το κόκκινο κρασί δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Σε πρόσφατη έρευνα αναλύθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο του λευκού και του κόκκινου κρασιού καθώς και της μύρας (16). Στην έρευνα αυτή, τόσο το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάθε ποτού, όπου μελετήθηκε διαπιστώθηκε σαφώς μεγαλύτερο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο στα κόκκινα κρασιά, όσο και το περιεχόμενο των ποτών αυτών σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες που βρέθηκε να περιέχονται σε αυτά τα ποσά παρατίθενται στα παρακάτω σχήματα.

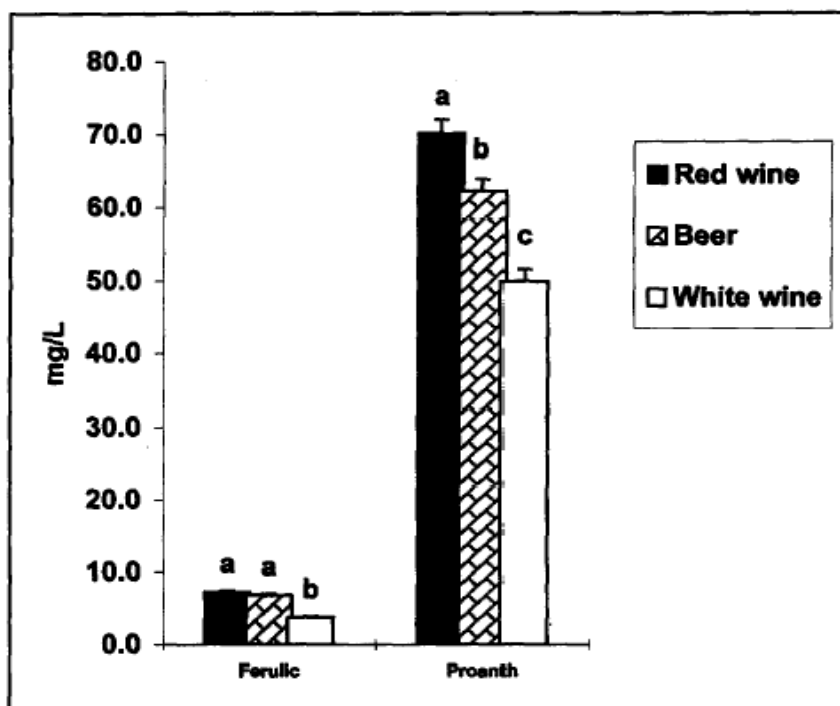


Σχήμα 1 Σύγκριση ποσοτήτων επικατεχίνης και κερκετίνης στα λευκά και τα κόκκινα κρασιά και στη μύρα.



Σχήμα 2 Σύγκριση ποσοτήτων p-κουμαρικού και γαλλικού οξέος στα λευκά και τα κόκκινα κρασιά και στη μύρα.





Σχήμα 3 Σύγκριση ποσοτήτων φερουλικού οξέος και προανθοκυανιδινών στα λευκά και τα κόκκινα κρασιά και στη μύρα.

| <b>Πίνακας 2.3.</b><br><b>Ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών σε κόκκινες και λευκές ποικιλίες κρασιού (mg/L κρασιού)</b> |                       |                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
|                                                                                                                     | Κόκκινες<br>ποικιλίες | Λευκές<br>ποικιλίες |
| Κατεχίνη                                                                                                            | 1,4-85,1              | 2,3-28,7            |
| Επικατεχίνη                                                                                                         | N.D-195,1             | 0,2-71,7            |
| Κερκετίνη                                                                                                           | 1,5-12,8              | 1,29                |
| Απιγενίνη                                                                                                           | <0,2-4,7              |                     |
| Μυρισετίνη                                                                                                          | 1,5-8,0               |                     |
| Αστιλβίνη                                                                                                           | 6,4-15,6              | 0,6-4,4             |
| 3-O- ρανμοζίτης της διυδρομυρισετίνης                                                                               | 20,9-69,1             | 1,8-6,0             |
| Αστριγκίνη                                                                                                          | N.D.-38,1             | N.D-8,5             |
| Trans-πισειδη                                                                                                       | 0,1-26                | N.D-2,9             |
| Cis- πισειδη                                                                                                        | N.D.-24,1             | N.D-0,9             |
| Trans-ρεσβερατρόλη                                                                                                  | 0,9-3,8               | N.D-0,2             |
| Cis-ρεσβερατρόλη                                                                                                    | N.D.-0,9              | N.D-0,1             |
| Παλλιδόλη                                                                                                           | 0,5-4,8               | N.D                 |
| Επιγαλλοκατεχίνη                                                                                                    |                       |                     |
| Γαλλικό οξύ                                                                                                         | 5,6-70,0              | 3,1                 |
| Καφεϊκό οξύ                                                                                                         | 2,5-17,9              |                     |
| καφεοϋλοτρυγικό                                                                                                     | 2,8-37,7              |                     |
| p- κουμαρικό                                                                                                        | 0,9-16,0              | 2,2                 |
| p-κουμαρόϋλοτριγικό                                                                                                 | 1,3-10,9              |                     |
| 2,5 δι-S-γλουταθειόνυλο<br>-καφταρικό                                                                               | 2,2-9,2               |                     |
| Φερουλικό οξύ                                                                                                       | 7,2                   | 3,9                 |
| Πολυφαινολικό Περιεχόμενο<br>(Μέθοδος Folin-Ciocalteu<br>εκφρασμένο σε mg/ L γαλλικού οξέος)                        | 364,2-858             | 77,1-436,2          |
| Αντιοξειδωτική Ικανότητα<br>( μέθοδος DPPH* εκφρασμένη σε mM Trolox)                                                | 0,73-1,37             |                     |

## 2.11. Φυσιολογικές δράσεις των πολυφαινολών του κρασιού

Η σημασία του κόκκινου κρασιού στη διατροφή και η ευεργετική επίδρασή του στην υγεία έχει τονιστεί σε αρκετές δημοσιεύσεις. Σε μία έρευνα (31) έχειδειχθεί ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία και μειώνει τα επίπεδα ινωδογόνου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο κρασί προερχόμενα από τα σταφύλια, παρεμποδίζουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης (in vitro και in vivo) μέσω διαφόρων μηχανισμών (32). Το κόκκινο κρασί, φαίνεται ακόμα ότι συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης, προωθεί την αγγειοδιαστολή, παρεμποδίζει το πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την αγγειακή υπερπλασία.

Σε πολλές έρευνες έχει κατά καιρούς μελετηθεί η πιθανή αντικαρκινική δράσης των πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού (30). Συχνά, η δράση αυτή έχει αποδοθεί σε βιοχημικούς μηχανισμούς όπως η προώθηση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, η διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων σε ένα ή περισσότερα στάδια του κύκλου ζωής τους, η παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA τους και η διαμόρφωση μονοπατιών μεταφοράς μηνυμάτων μέσω της αλλαγής ένζυμων-κλειδιών όπως οι κυκλοξυγενάσες και οι πρωτεϊνικές κινάσες.

Πιο συγκεκριμένα, η κερκετίνη διαθέτει ένα μεγάλο εύρος αντικαρκινικών ιδιοτήτων όπως η αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων που είχαν απομονωθεί από ανθρώπινους καρκινικούς όγκους από σημεία όπως το στομάχι, το κόλον, ο προστάτης και ο μαστός. Επιπρόσθετα, καταστέλλει την ανάπτυξη και την εξάπλωση μελανωμάτων και εντερικών όγκων σε ποντίκια.

Η κατεχίνη, είναι αποτελεσματική στο να διακόπτει την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών οι οποίες προέρχονται από τον προστάτη και το μαστό. Επιπλέον, εμποδίζει τη καρκινογένεση που προκαλείται από τον καπνό σε ηπατοκύτταρα αρουραίων (30).

Σύμφωνα με μελέτες (35,36) η ρεσβερατρόλη, εμποδίζει την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος καθώς και την εξέλιξη καρκίνου του μαστού σε ποντίκια. Επιπλέον της έχει αποδοθεί πιθανή αντιμιτογόνης δράση. Η αντικαρκινική της δράση έχειδειχθεί και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μεταξύ των οποίων κυττάρων μαστού (39), προστάτη (38), κόλου και στόματος. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η ρεσβερατρόλη στρέφεται εναντίων των καρκινικών κυττάρων είναι η συμμετοχή της στην κυτταρική

απόπτωση (40), η παρεμπόδιση της μετάστασης πρώιμων όγκων σε ποντίκια και η ικανότητά της να καταστέλλει την αύξηση του αριθμού των αιμοφόρων αγγείων μέσα στο καρκινικό ιστό. Με αυτό τον τρόπο στερεί τα κακοήθη κύτταρα από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά (30).

Το γαλλικό οξύ συμμετέχει στην αντικαρκινική διαδικασία ενισχύοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Η δράση αυτή έχει εντοπιστεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα των πνευμόνων, του στομάχου και του κόλου, καθώς και λευκαϊμικών κυττάρων(30).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **3.1. Προκατεργασία δειγμάτων σταφίδας (αφυδάτωση)**

Προκειμένου να γίνει επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων σταφίδας έγινε πολτοποίηση και στη συνέχεια στη λυοφιλοποίηση ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε συσκευή λυοφιλοποίησης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το δείγμα της σταφίδας ψύχεται στους  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περισσότερο από 24 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται στο λυοφιλοποιητή και εφαρμόζεται στο δείγμα  $\Theta = -50\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $P = 1-2 \cdot 10^{-1}\text{ mBarr}$ . Το δείγμα παραμένει στο λυοφιλοποιητή για περίπου 72 ώρες

#### **3.2 Επιλογή τρόπου προσδιορισμού του πολυφαινολικού περιεχομένου της σταφίδας**

Προκειμένου να καταλήξουμε στη μέθοδο προσδιορισμού του πολυφαινολικού περιεχομένου της σταφίδας πραγματοποιήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες:

##### **3.2.3. Παραλαβή πολυφαινολικών συστατικών**

Η παραλαβή των πολυφαινολικών συστατικών έγινε με εκχύλιση. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες:

- Μεθανόλη
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Μεθανόλη / Νερό (8:2)
- Μεθανόλη / Ακετόνη / νερό (7:2:1)

Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε ανάλυση με HPLC ή /και GC

##### **3.2.4. Επεξεργασία των μεθανολικών εκχυλισμάτων της σταφίδας**

- Όξινη υδρόλυση
- Ενζυμική υδρόλυση

### 3.2.3. Καθαρισμός μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας

Αρχικά έγινε συμπύκνωση μεθανολικού εκχυλίσματος, αναδιάλυση σε νερό και ακολούθως:

- παραλαβή πολυφαινολών με εκχύλιση υγρού-υγρού (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*)
- παραλαβή πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (*Solid Phase Extraction, SPE*) και έκλυση με οξικό αιθυλεστέρα
- παραλαβή πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (*Solid Phase Extraction, SPE*) και έκλυση με μεθανόλη

Για το καθορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου του δείγματος, από τις παραπάνω διαδικασίες επιλέχθηκαν οι εξής:

- Εκχύλιση του δείγματος με μεθανόλη, καθαρισμός δείγματος με εκχύλιση στερεής φάσης (*SPE*) με διαλύτη έκλυσης οξικό αιθυλεστέρα και ανάλυση με υγρή και αέρια χρωματογραφία.
- Εκχύλιση του δείγματος σταφίδας με μεθανόλη, όξινη υδρόλυση, καθαρισμός δείγματος με εκχύλιση στερεής φάσης (*SPE*) με διαλύτη έκλυσης οξικό αιθυλεστέρα και ανάλυση με υγρή και αέρια χρωματογραφία.

## 3.3. Πειραματικές διαδικασίες

### 3.3.1. Παραλαβή πολυφαινολικών συστατικών

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Λυοφιλοποιημένα δείγματα σταφίδας Βοστίτσας, Κρήτης, Τουρκίας, Μεσσηνίας, Ζακύνθου

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O

ΟΡΓΑΝΑ

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Αναδευτήρας VORTEX

Λουτρό υπερήχων (BRANSON 2210)

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (HermLe 2320)

Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (rotary evaporator)

Φυγοκεντρικός εξατμιστής κενού (speed vacuum, **LABCONCO**), “**speed vac**”

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα ζυγίζεται από το δείγμα σταφίδας, ποσότητα ίση με 0,5 g με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
2. Στο δείγμα προστίθεται μεθανόλη (5 mL).
3. Ο δοκιμαστικός σωλήνας πωματίζεται και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε συσκευή Vortex για 2 min.
4. Ακολουθεί παραμονή του δείγματος για 24 ώρες
5. Επαναλαμβάνεται ισχυρή ανάδευση σε συσκευή Vortex για 5 min
6. Το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή υπερήχων για 10 min.
7. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 3000 στροφές.
8. Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη (250 mL).
9. Στο παραμένον δείγμα του σταδίου 8 προστίθεται μεθανόλη (5 mL) και ακολουθούν τα στάδια 5-8
10. Η διαδικασία 9 επαναλαμβάνεται για 3 ακόμη φορές (εκχύλιση 4 φορές επί συνόλου). Το τέταρτο εκχύλισμα συλλέγεται χωριστά.

Η ανωτέρω διαδικασία (στάδια 1-10) επαναλαμβάνεται 4 φορές για κάθε σταφίδα. Εκχυλίζονται συνολικά 2,5 g σταφίδας από τα οποία προκύπτουν 75 mL μεθανολικού εκχυλίσματος που συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη 250 mL.

Σημείωση: Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται η εκχύλιση και με τη χρήση άλλων διαλυτών, δηλαδή οξικό αιθυλεστέρα, Μεθανόλη / Νερό(8:2), Μεθανόλη / Ακετόνη / νερό (7:2:1)

### 3.3.2. Εξάτμιση διαλυτών

1. Η σφαιρική φιάλη που περιέχει το εκχύλισμα σταφίδας τοποθετείται στη συσκευή rotary evaporator, όπου ισχύουν οι εξής συνθήκες:  $\Theta = 40^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 300\text{ mBar}$
2. Όταν στη σφαιρική φιάλη απομείνουν ~2-3 mL εκχυλίσματος, γίνεται μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα.

3. Ακολουθεί έκπλυση της φιάλης με 3x0.5 mL μεθανόλης τα οποία μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα συλλογής.
4. Το δείγμα μεταφέρεται στη συσκευή εξάτμισης **speed vac**. όπου και εξατμίζεται μέχρι ξηρού.

Σημείωση: Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα έχει όγκο ~ 2mL.

### 3.3.3. Επεξεργασία μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας

#### 3.3.3. Α. Όξινη υδρόλυση

##### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας συμπυκνωμένα μέχρι ξηρού αναδιαλυμένα σε δις απεσταγμένο νερό (5 mL, 0,5 g σταφίδας/ mL)

Διάλυμα HCl 3M

Ρυθμιστικό διάλυμα K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M

##### ΟΡΓΑΝΑ

Λουτρό υπερήχων (BRANSON 2210)

Υδρόλουτρο

##### Προετοιμασία δείγματος

- Το εκχύλισμα αναδιαλύεται με δις απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 5 mL. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός όμοιου σωλήνα με το σωλήνα συλλογής, τον οποίο γεμίζουμε με 5 mL H<sub>2</sub>O και συγκρίνουμε τους όγκους.
- Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο Vortex και χρήση υπερήχων μέχρι το δείγμα να ομογενοποιηθεί.
- Το μίγμα αυτό έχει συγκέντρωση  $C = 2,5\text{gr}/5\text{mL} = 0,5\text{ gr/mL}$

##### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΟΞΙΝΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ

1. Λαμβάνονται 0,5 mL δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα.
2. Προστίθεται διάλυμα. HCl 3M (0,25 mL)
3. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex.
4. Το μίγμα τοποθετείται σε υδρόλουτρο στους 80° C για 1 ώρα.



5. Μετά την πάροδο 1 ώρας και τη παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ψυχθεί, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα  $K_2HPO_4$  1M (0,5 mL) και ακολουθεί ανάδευση στο vortex.

### 3.3.3. Β. Ενζυμική υδρόλυση: Κατεργασία με $\beta$ -γλυκοζιδάση

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας που έχει συμπυκνωθεί μέχρι ξηρού.

Ρυθμιστικό διάλυμα, (ρ.δ.)  $CH_3COOH/CH_3COONa$  100 mM (0,1 mol/L)

Ένζυμο  $\beta$ -γλυκοζιδάση δραστηριότητας 12,4 U/ mg (Sigma G 0395)

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ Ρ.Δ

Ζυγίζεται  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$  (M.B=136) 136 mg (1mmol)

Προστίθεται δις απεσταγμένο νερό (9 mL)

Ρυθμίζεται το pH με HCl 1M στο 5,0.

Συμπληρώνουμε με δις απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 mL.

#### ΟΡΓΑΝΑ

Υδρόλουτρο

Αναδευτήρας Vortex

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίζεται ένζυμο (5 mg) και προστίθεται Ρ.Δ οξικών (1 mL).
2. Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex.
3. Το όλο τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει συμπυκνωμένο μέχρι ξηρού μεθανολικό εκχύλισμα (0,5 mL).
4. Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex.
5. Το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες σε υδρόλουτρο στους 37° C.

Σημείωση: Η επόμενη διαδικασία ξεκινά αμέσως μετά την επώαση ώστε να εξασφαλιστεί η διακοπή της ενζυμικής δράσης.

### 3.3.4. Καθαρισμός μεθανολικών εκχυλισμάτων σταφίδας

#### 3.3.4. Α. Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)

##### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE): Isolute C8 (EC), 500 mg, 3 mL

Οξικός αιθυλεστέρας

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας συμπυκνωμένα μέχρι ξηρού αναδιαλυμένα σε δις απεσταγμένο νερό. (βλ. πορεία 4.3.1, προετοιμασία δείγματος)

##### ΟΡΓΑΝΑ

Συσκευή SPE

Αναδευτήρας Vortex

Φυγοκεντρικός εξατμιστής κενού (speed vacuum, **LABCONCO**), “speed vac”

##### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Προετοιμασία της στήλης:

- Η στήλη C-8 τοποθετείται στη συσκευή SPE

-Γίνεται *καθαρισμός* και ενεργοποίηση της στήλης με τη χρήση οργανικών διαλυτών (3mL EtOAc και 3 mL MeOH)

-Ακολουθεί *εξισορρόπηση* της στήλης με απιονισμένο νερό (5 mL), αφού το δείγμα που τοποθετούμε στη συνέχεια στη στήλη είναι διαλυμένο σε νερό. Η στήλη είναι έτοιμη για χρήση όταν το νερό φθάσει οριακά στο προσροφητικό υλικό (δεν αφήνουμε τη στήλη να στεγνώσει).

Ανάλυση δείγματος:

1. Το δείγμα (0,5 mL) τοποθετείται στη στήλη πάνω από σωλήνα συλλογής.
2. Αφήνεται να διέλθει εξ ολοκλήρου από τη στήλη
3. Εφαρμόζεται στη συσκευή κενό μέσω αντλίας ξήρανσης ώστε να στεγνώσει εντελώς η στήλη και να απομακρυνθούν όλα τα μη προσροφημένα συστατικά.
4. Τοποθετείται νέος σωλήνας συλλογής και προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (3 mL) προκειμένου να παραληφθούν τα πολυφαινολικά συστατικά.
5. Η διέλευση του οξικού αιθυλεστέρα από τη στήλη γίνεται αρχικά με την επίδραση της βαρύτητας και στη συνέχεια με χρήση κενού (αντλία ξήρανσης)

6. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη σε speed vac. και αναδιάλυση σε μεθανόλη (0,5 mL)

Σημείωση: Προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία εναπομείναντων πολυφαινολικών συστατικών, προστίθεται στη στήλη, μετά τη συλλογή του οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλη (3 mL) και ακολουθεί συλλογή σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα.

### 3.3.4. B. Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Συμπυκνωμένο μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας

Οξικός αιθυλεστέρας

#### ΟΡΓΑΝΑ

Πιπέττες Pasteur

Αναδευτήρας VORTEX

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (HermLe 2320)

Φυγοκεντρικός εξατμιστής κενού (speed vacuum, LABCONCO), “speed vac”

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1. Σε συμπυκνωμένο μέχρι ξηρού μεθανολικό εκχυλίσματα σταφίδας προερχόμενο από εκχύλιση 0,5 g σταφίδας προστίθεται νερό δις απεσταγμένο (1 mL)
2. Στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (3mL)
3. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 5 min.
4. Φυγοκέντρωση για 5 min.
5. Συλλογή της υπερκείμενης στοιβάδας.
6. Οι διαδικασίες 2-5 επαναλαμβάνονται άλλες 4 φορές.
7. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται μαζί και ο διαλύτης απομακρύνεται στο φυγοκεντρικό εξατμιστή κενού
8. Το δείγμα αναδιαλύεται σε μεθανόλη (2 mL) που περιέχει BHT 150 ppm.

### 3.3.5. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)

Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35%w/v)

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας Βοστίτσας, Κρήτης, Τουρκίας, Ζακύνθου,

Μεσσηνίας αναδιαλυμένα σε νερό (βλέπε πορεία 4.3.1, προετοιμασία δείγματος)

#### ΟΡΓΑΝΑ

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Kontron

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα χωρητικότητας 10mL

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1. Το δείγμα σταφίδας αραιώνεται 1:5 με μεθανόλη (100μL από το δείγμα και 400μL μεθανόλη σε vial)
2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL τοποθετούνται 100 μL αραιωμένου δείγματος από το περιεχόμενο του vial και προστίθεται απιονισμένο νερό (5 mL) και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,5 mL). Ανακινούμε καλά και αναμένουμε 3 min.
3. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35%w/v, 1 mL) και το όλο συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου 10 mL με απιονισμένο νερό.
4. Τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι για 1 ώρα.
5. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων, τοποθέτηση σε κυψελίδες και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 750 nm.
6. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο δείγμα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος.

Σημείωση: Παράλληλα με τη παραπάνω επεξεργασία των δειγμάτων, πραγματοποιείται τυφλός προσδιορισμός, ακολουθώντας τα στάδια 2-5, με τη διαφορά ότι στο στάδιο 2 προστίθεται μόνο μεθανόλη (100 μL).

### 3.3.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρύλυδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH\*)

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας Βοστίτσας, Κρήτης, Τουρκίας, Ζακύνθου,

Μεσσηνίας αναδιαλυμένα σε νερό (βλέπε πορεία 4.3.1, προετοιμασία δείγματος)

Διάλυμα DPPH 1mM. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονται 3 mL και προστίθεται μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 50mL (DPPH: 0,06mM)

#### ΟΡΓΑΝΑ

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Kontron

Ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 10mL

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

- Το δείγμα αραιώνεται 1:5 με μεθανόλη (100μL από το δείγμα και προσθέτουμε 400μL μεθανόλη).
- Σε σωλήνες ειδικούς για την εκτέλεση του πειράματος (1-7) εκτελούνται διαδοχικές 1:1 αραιώσεις του δείγματος σταφίδας κατά τέτοιο τρόπο ώστε κάθε φορά να παραμένουν 100μL δείγματος σταφίδας σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα όπως φαίνεται στο πίνακα που ακολουθεί:

**Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε εκχύλισμα σταφίδας και MeOH**

|                                                                | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b>        | <b>4</b>        | <b>5</b>        | <b>6</b>        | <b>7</b>        |
|----------------------------------------------------------------|----------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Δείγμα Σταφίδας (μL)</b>                                    | 100      | 100      | 100 μL από το 2 | 100 μL από το 3 | 100 μL από το 4 | 100 μL από το 5 | 100 μL από το 6 |
| <b>MeOH (μL)</b>                                               |          | 100      | 100             | 100             | 100             | 100             | 100             |
| <b>Ποσότητα εκχυλίσματος σταφίδας/ ογκομετρικό σωλήνα (μL)</b> | 100      | 50       | 25              | 12,5            | 6,25            | 3,125           | 1,5625          |

- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται DPPH\* (3,9mL)
- Τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι για 2 ώρες ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.
- Τα δείγματα, αναδεύονται και τοποθετούνται σε κυψελίδες. Ακολούθως φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 515 nm.

Σημείωση: Παράλληλα γίνεται φωτομέτρηση του διαλύματος DPPH\* που χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο των πειραμάτων.

### 3.3.7. Χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης ( HPLC )

Μέθοδος Ανάλυσης HPLC: Χρωματογραφία HPLC αναστρόφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση.

Στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6×125mm, 5 μm)

Ανιχνευτής: UV-Vis σειράς φωτοδιοδίων (DAD 214, 280, 254, 330 nm) και φθορισμομετρικός ανιχνευτής (0-23min:  $\lambda_{ex}$ =275 nm,  $\lambda_{em}$ =360 nm, 23-37min:  $\lambda_{ex}$ =260 nm,  $\lambda_{em}$ =420 nm, 37-45min:  $\lambda_{ex}$ =295 nm,  $\lambda_{em}$ =330 nm, 45-62min:  $\lambda_{ex}$ =281 nm,  $\lambda_{em}$ =316 nm, 62-90min:  $\lambda_{ex}$ =265 nm,  $\lambda_{em}$ =420 nm)

Ροή διαλυτών: 1 mL/min

Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλυσης:

| Χρόνος (min)     | %A | %B |
|------------------|----|----|
| Αρχικές συνθήκες | 90 | 10 |
| 10               | 82 | 18 |
| 20               | 72 | 28 |
| 25               | 72 | 28 |
| 42.5             | 69 | 31 |
| 45               | 66 | 34 |
| 55               | 66 | 34 |
| 60               | 60 | 40 |
| 62.5             | 60 | 40 |
| 70               | 30 | 70 |
| 80               | 20 | 80 |
| 90               | 90 | 10 |

A = υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3

B = Μεθανόλη,

Όγκος δείγματος έγχυσης: 10  $\mu$ L.

### **3.3.8. Ποιοτικός προσδιορισμός ταυτοποιημένων πολυφαινολών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)**

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριου χρωματογράφου- φασματομέτρου μαζών (GC-MSD) της Agilent (Wallborn, Germany) HP 6890-MSD 5973. Το φασματοφωτόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής ήταν ηλεκτρονιακού ιονισμού στα 70 eV. Επίσης για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν εισαγωγέας split-splitless και αυτόματος δειγματολήπτης HP 7683.

- Πριν την ανάλυση μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας. (0,1 mL) συμπυκνώνονται υπό ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Ακολουθεί παραγωγοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη BSTFA 250  $\mu$ L και θέρμανση στους 70  $^{\circ}$ C για 20 λεπτά.
- Ποσότητα του παραπάνω διαλύματος ίση με 1  $\mu$ L εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο σε λόγο σχάσης 1:20.
- Το δείγμα διαχωρίζεται με τη χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0,25 mm x 250  $\mu$ ).
- Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ροή 0,6 mL / min.
- Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς ρυθμίστηκε στους 280  $^{\circ}$ C και 300 $^{\circ}$ C αντίστοιχα.
- Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίστηκε ως εξής: Αρχικά εφαρμόζεται θερμοκρασία 70  $^{\circ}$ C για 5 λεπτά. Ακολουθεί αύξηση από τους 70 $^{\circ}$ C στους 130  $^{\circ}$ C με ρυθμό 15  $^{\circ}$ C / λεπτό, από τους 130  $^{\circ}$ C στους 160  $^{\circ}$ C με ρυθμό 4  $^{\circ}$ C / λεπτό οποία και διατηρείται για 15 λεπτά και τελικά ακολουθεί αύξηση από τους 170  $^{\circ}$ C στους 300  $^{\circ}$ C με ρυθμό 10  $^{\circ}$ C / λεπτό, η οποία και διατηρείται για 15 λεπτά..
- Για το προσδιορισμό των 25 πολυφαινολικών συστατικών και των τερπενοϊδών που ελέγχονται χρησιμοποιείται η μέθοδος selective ion monitoring (SIM) GC / MS

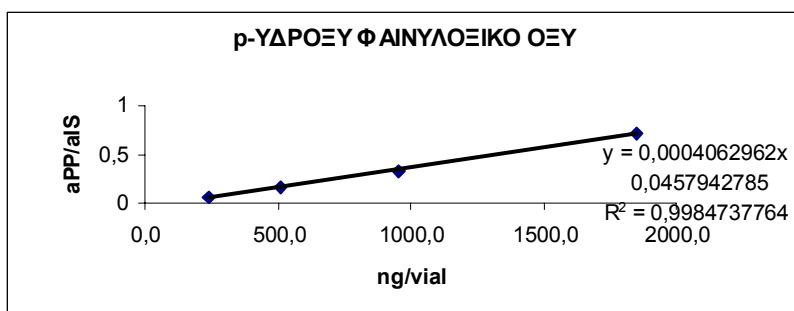
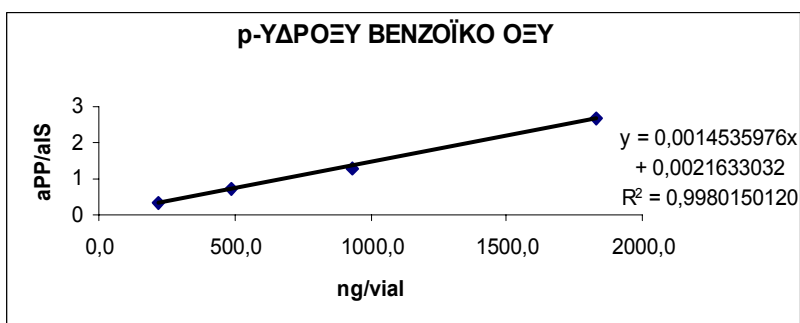
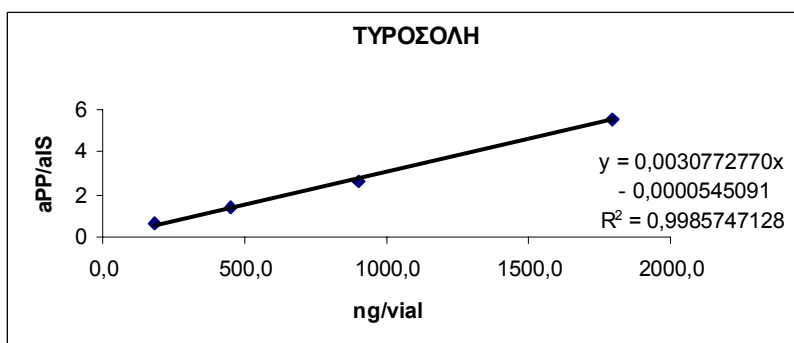
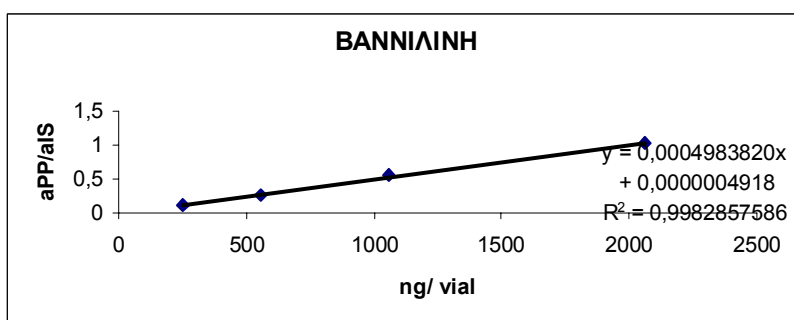
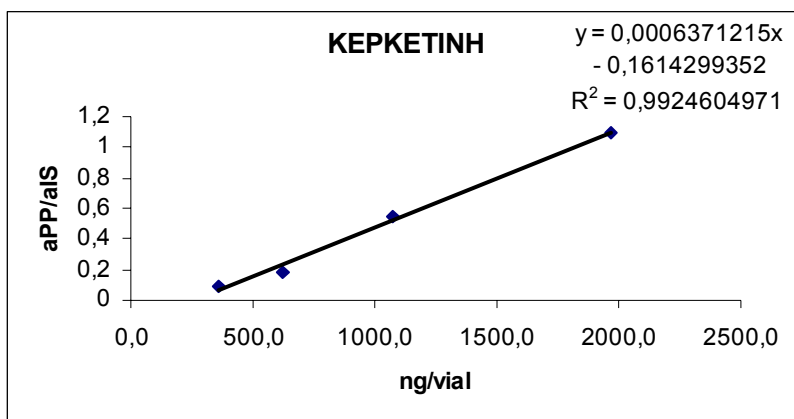
Ο προσδιορισμός των πολυφαινολών βασίζεται στη παρουσία 2 ή 3 ιόντων για κάθε πολυφαινόλη σε χρόνο κατακράτησης  $\pm 0,05$  του χρόνου κατακράτησης του αντίστοιχου προτύπου. Το ιόν στο οποίο βασίστηκε ο ποσοτικός

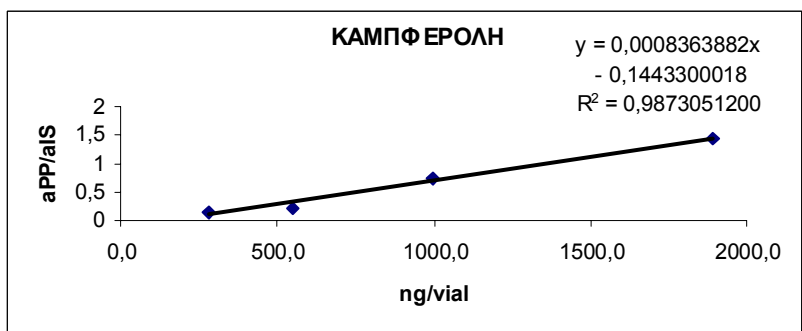
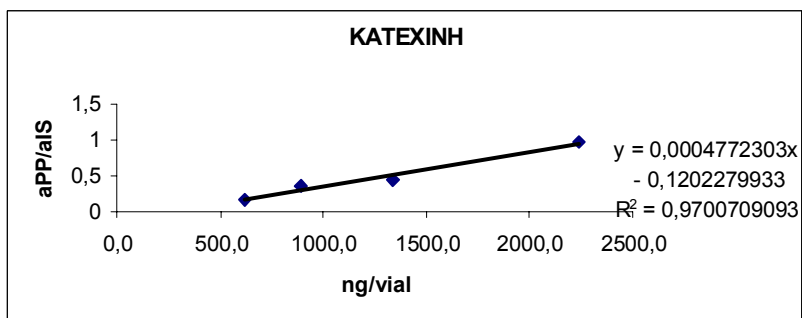
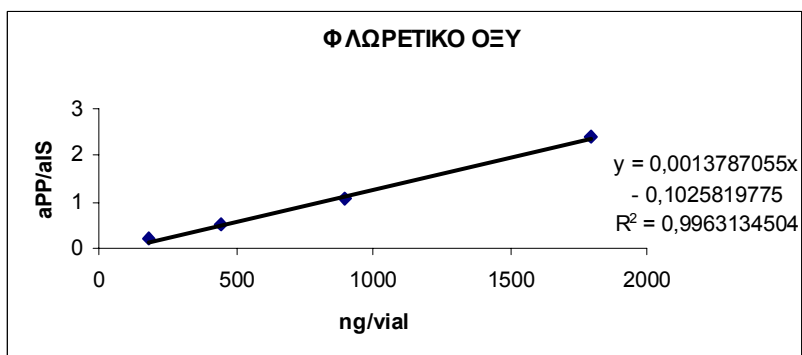
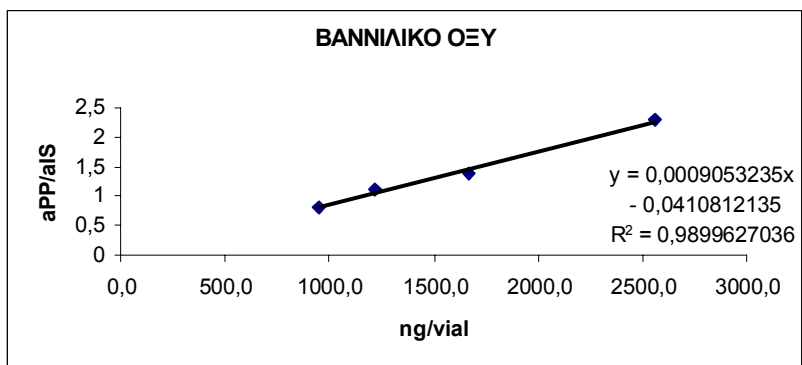
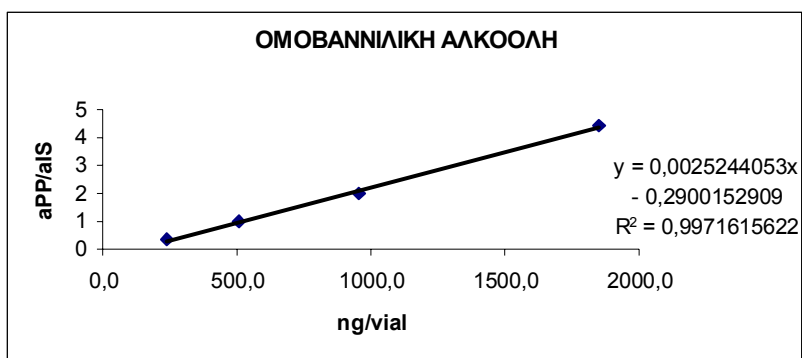
προσδιορισμός συμβολίζεται με T ενώ τα ιόντα που καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας κάθε πολυφαινόλης στο δείγμα συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται (T, Q1, Q2) για καθεμία από τις 20 πολυφαινολικές ενώσεις είναι τα παρακάτω: βανιλίνη: 194, 209, κινναμωμικό οξύ: 205, 220, τυροσόλη: 179, 267, 282, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ: 267, 223, 193, p-υδροξυφαινυλοξικό: 252, 296, 281, βανιλλικό οξύ: 297, 267, 312, πρωτοκατεχικό οξύ: 193, 355, 370, ομοβανιλλικό οξύ: 326, 267, 311, p-κουμαρικό οξύ: 308, 293, 147, γαλλικό οξύ: 281, 458, 443, φερουλικό οξύ: 338, 323, 308, συριγγικό οξύ: 327, 342, 312, καφεϊκό οξύ: 396, 219, 381, ρεσβερατρόλη: 444, 445, 443, επικατεχίνη: 368, 355, 474, κατεχίνη: 368, 355, 474, καμπφερόλη: 599, 560, χλωρογενικό οξύ: 345, 307, 324, κερκετίνη: 647, 559, 575. Η 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο στο κύριο ιόν m/z 206 και βοηθητικά ιόντα τα m/z 191 και 179. Επίσης πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός και ο προσδιορισμός ενός τερπενοειδούς, του ολεανολικού οξέος: 203, 320, 482.

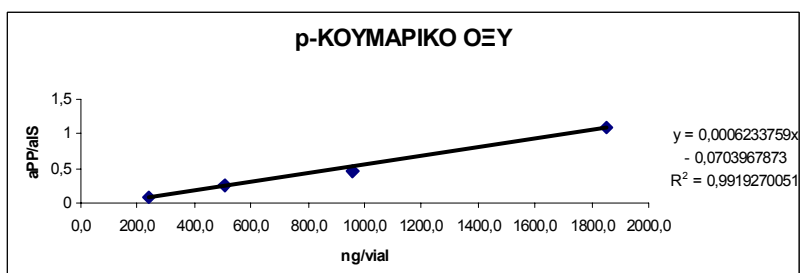
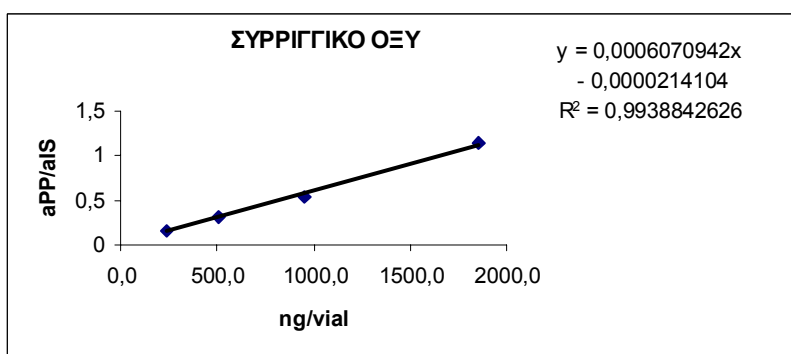
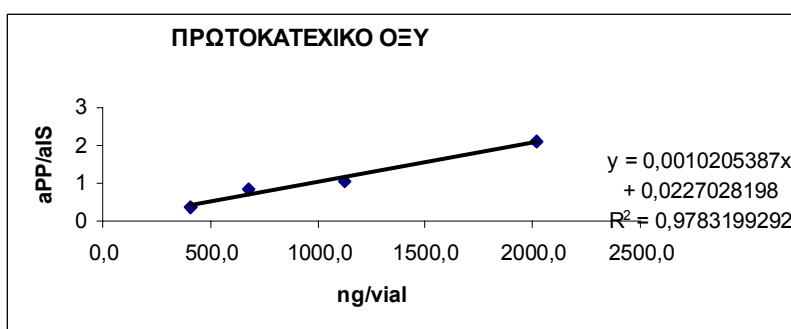
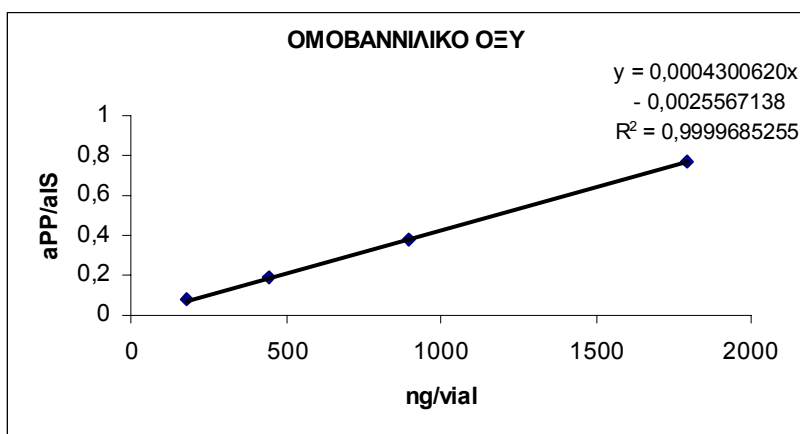
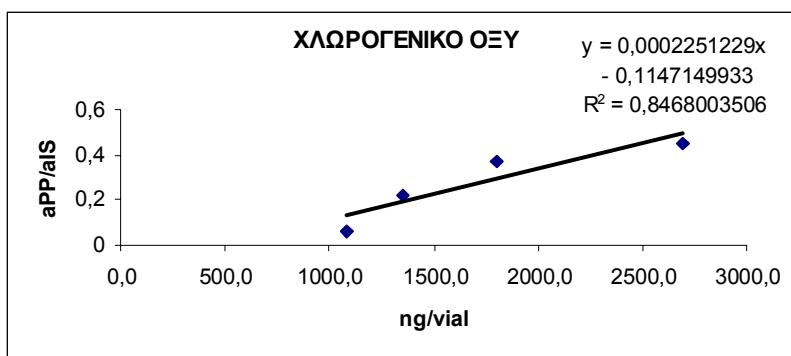
### **3.3.9. Ποσοτικός προσδιορισμός ταυτοποιημένων πολυφαινολών**

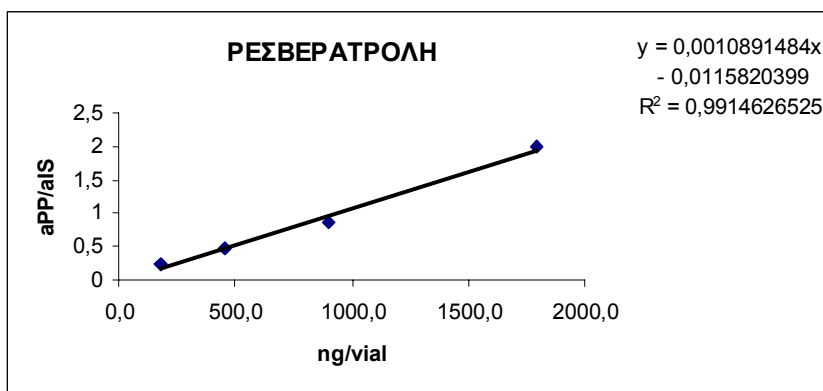
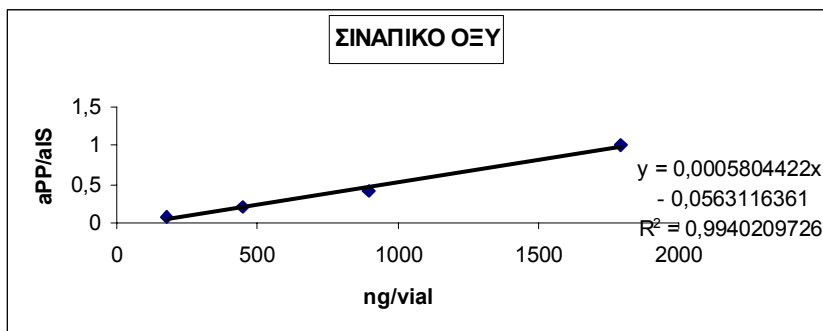
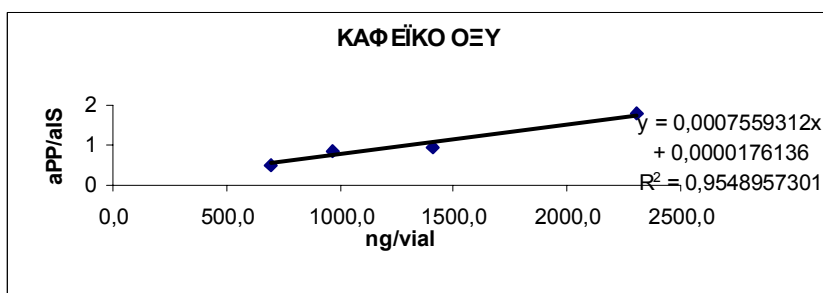
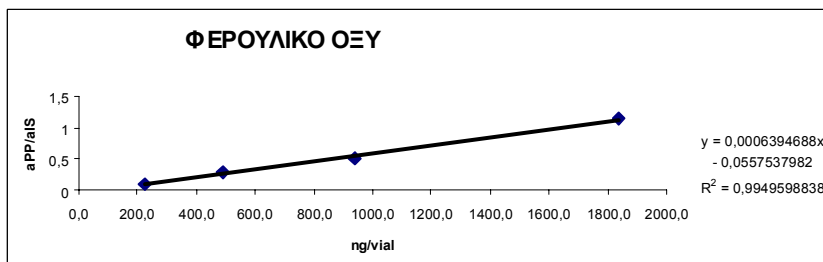
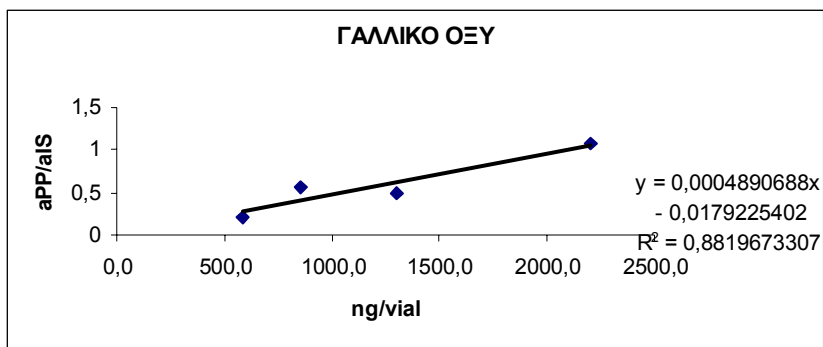
Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των ταυτοποιημένων πολυφαινολών, μετρήσαμε την ανάκτηση πρότυπων πολυφαινολών μετά από τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε εκχυλισμένο δείγμα σταφίδας, ξηραμένο και αναδιαλυμένο σε 0,5 mL νερό. Πριν από την εκχύλιση στερεάς φάσης προστέθηκαν στο δείγμα 4 διαφορετικές γνωστές ποσότητες πρότυπων πολυφαινολών και μετρήθηκαν οι ανακτημένες ποσότητες. Βάσει αυτών δημιουργήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς κάθε πολυφαινόλης ξεχωριστά, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στο δείγμα. Οι καμπύλες αυτές παρατίθενται στη συνέχεια.

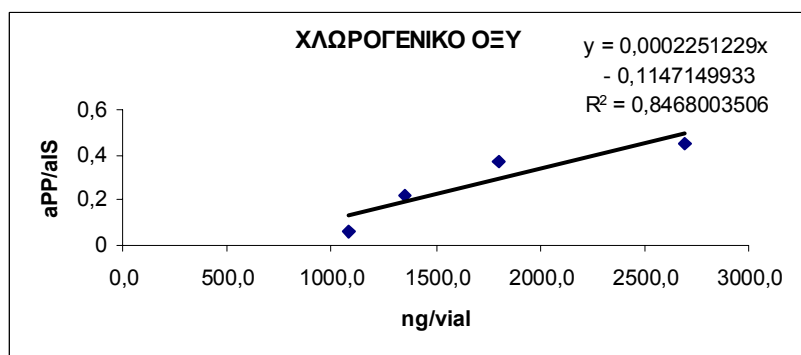
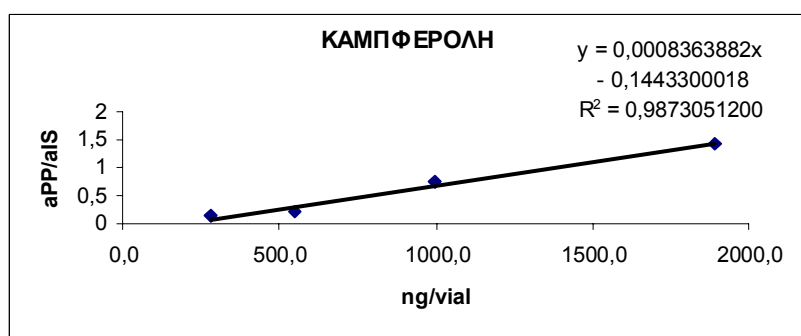
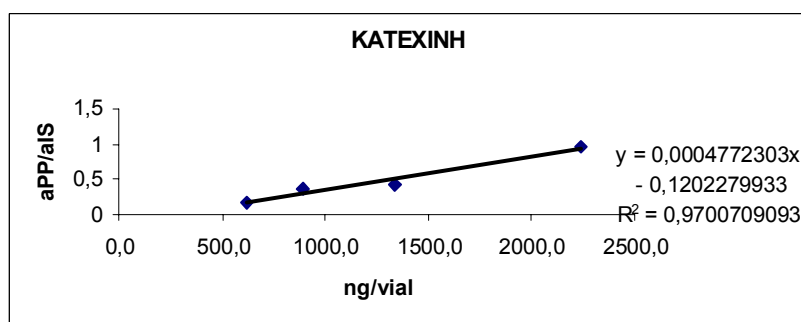
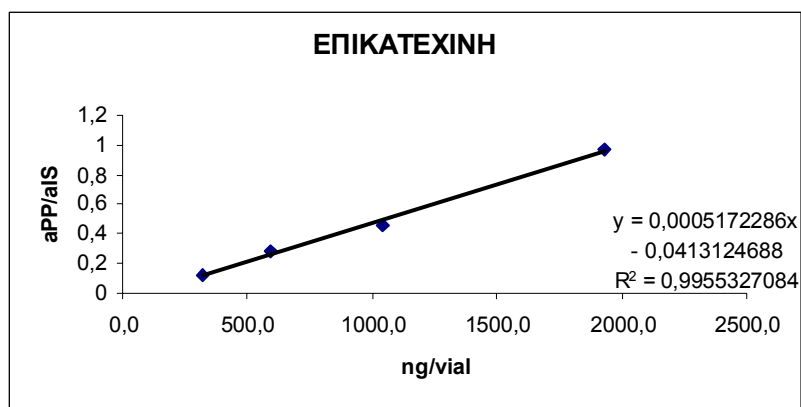












## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες ποικιλίες σταφίδας οι οποίες προκειμένου να αναλυθούν υποβλήθηκαν αρχικά σε αφυδάτωση. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα υποβλήθηκαν σε λυοφιλοποίηση.

##### Πίνακας 4.1

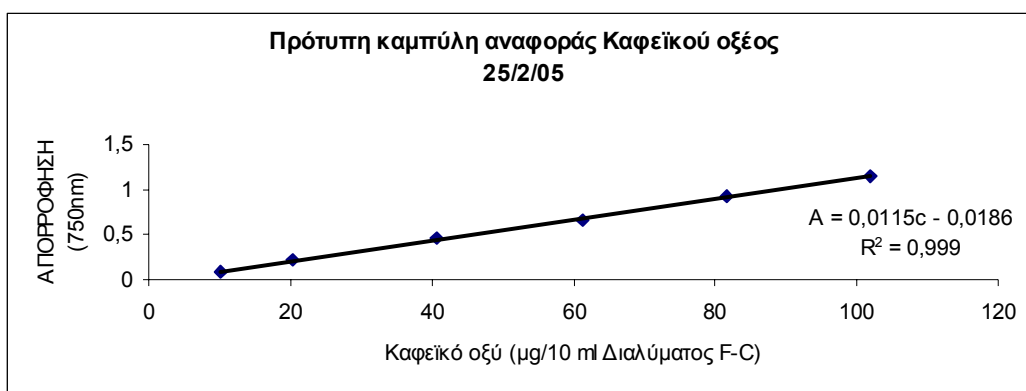
Περιεχόμενη υγρασία στη σταφίδα υπολογισμένη με διαδικασία λυοφιλοποίησης

| Ποικιλία   | Δείγμα σταφίδας | Βάρος δείγματος (g) | Συνολικό βάρος λυοφιλοποιημένου προϊόντος(g) | Όγκος Νερού (mL) | %υγρασία |
|------------|-----------------|---------------------|----------------------------------------------|------------------|----------|
| Κορινθιακή | Βοστίτσας       | 34,25               | 31,931                                       | 2,33             | 6,8      |
| Κορινθιακή | Ζακύνθου        | 38,7                | 36,57                                        | 2,13             | 5,5      |
| Κορινθιακή | Μεσσηνίας       | 32,5                | 29,91                                        | 2,59             | 8,0      |
| Σουλτανίνα | Κρήτης          | 40                  | 36,9                                         | 3,10             | 7,75     |
| Σουλτανίνα | Τουρκίας        | 38,75               | 33,99                                        | 4,76             | 12,28    |

#### 4.2. Αποτελέσματα του προσδιορισμού του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Παρακάτω παρατίθενται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μέτρηση.

**Σχήμα 4.1** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος



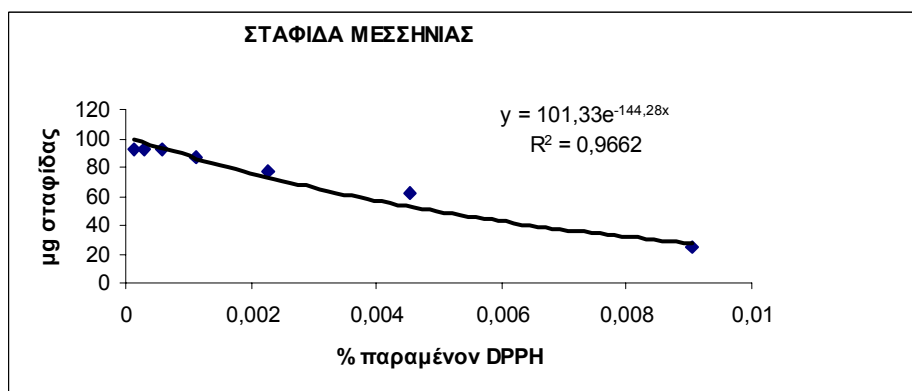
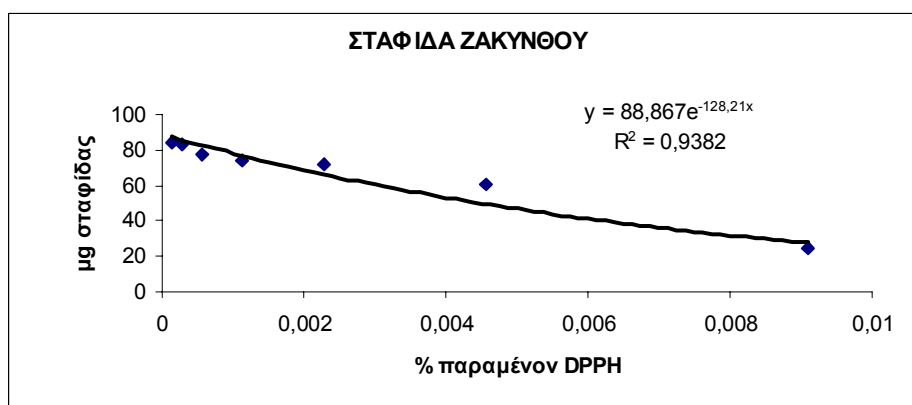
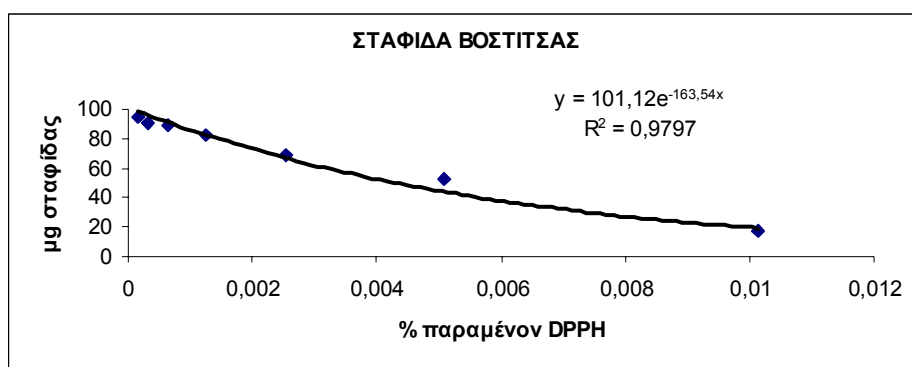
**Πίνακας 4.2** Αποτελέσματα του προσδιορισμού των συνολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin- Ciocaltaeu

| Ποικιλία   | Μεθανολικό εκχύλισμα σταφίδας | Απορρόφηση | mg Καφεϊκού οξέος /100g νωπού προϊόντος | mg Καφεϊκού οξέος /μικρομερίδα (18 g) |
|------------|-------------------------------|------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Κορινθιακή | Βοστίτσας                     | 0,23       | 198,591                                 | 35,746                                |
| Κορινθιακή | Ζακύνθου                      | 0,234      | 227,835                                 | 41,010                                |
| Κορινθιακή | Μεσσηνίας                     | 0,237      | 226,015                                 | 40,683                                |
| Σουλτανίνα | Κρήτης                        | 0,161      | 141,689                                 | 25,504                                |
| Σουλτανίνα | Τουρκίας                      | 0,211      | 176,340                                 | 31,741                                |

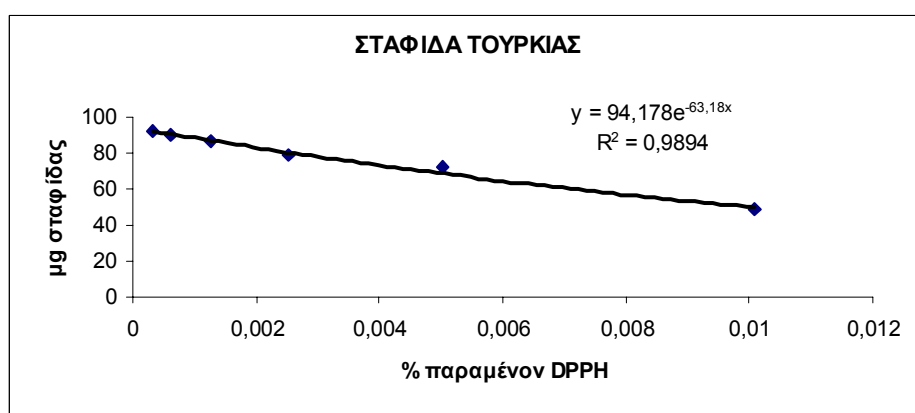
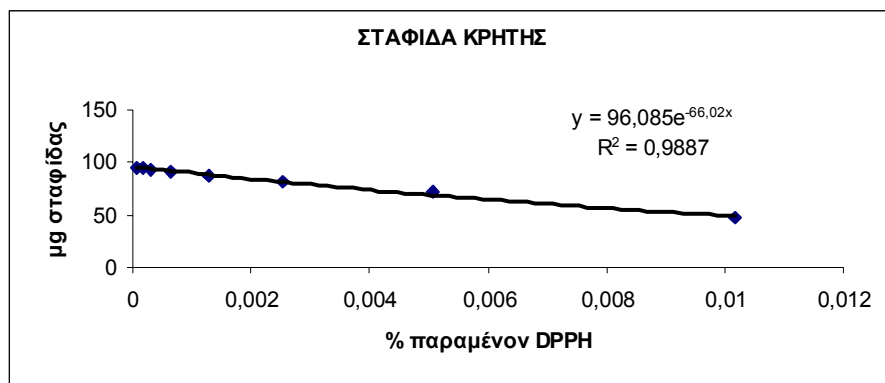
#### 4.3. Αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στα παρακάτω διαγράμματα παρατίθενται οι απορροφήσεις του μίγματος DPPH-εκχυλίσματος σταφίδας για κάθε διαφορετική συγκέντρωση δείγματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ποσότητα του μη αντιδρώντος διαλύματος DPPH σε συνάρτηση με τη ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένη σε μg καφεϊκού οξέος.

Σχήμα 4.2 Δέσμευση ελευθέρων ριζών DPPH\* από το εκχύλισμα σταφίδας



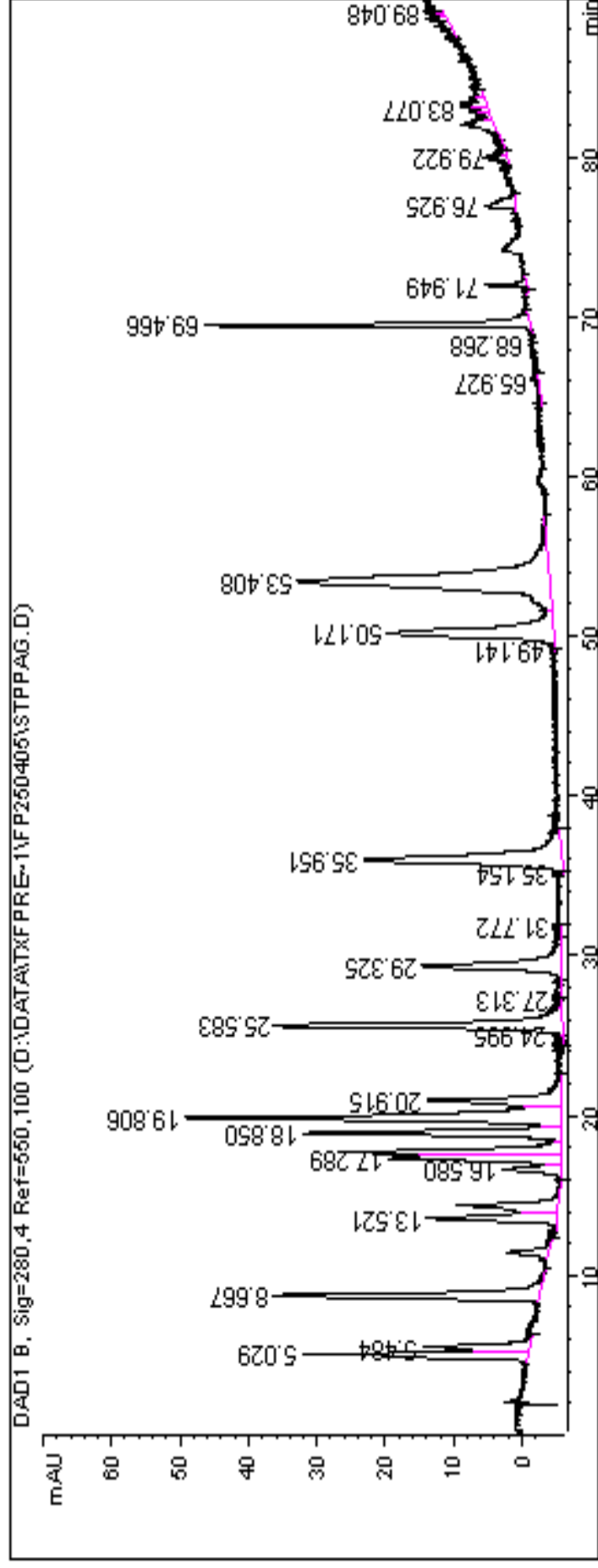




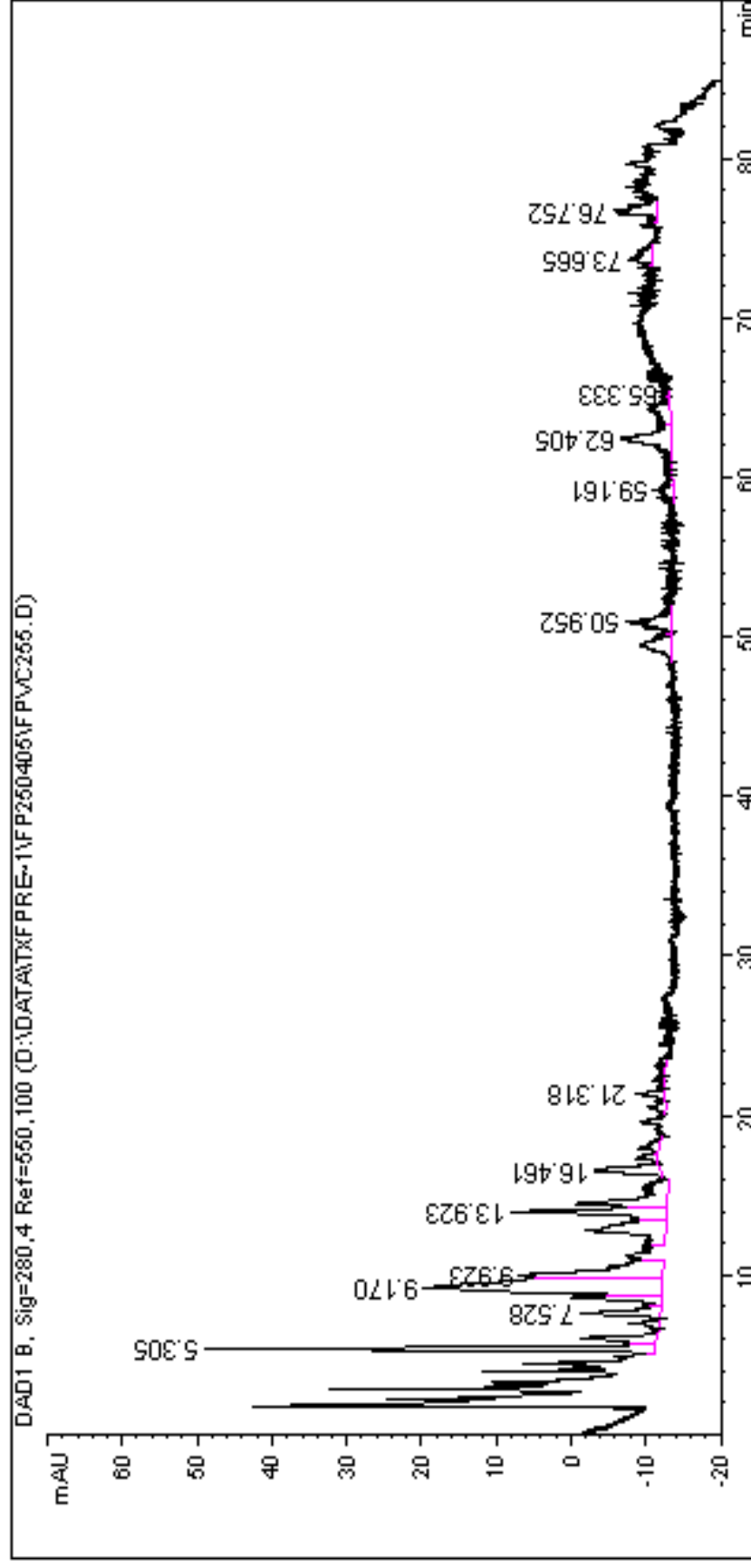
#### 4.4. Ανάλυση των εκχυλισμάτων σταφίδας με HPLC χρωματογραφία

Στα δείγματα σταφίδας που μελετήθηκαν έγινε ανάλυση με χρωματογραφία HPLC τόσο στα συνολικά μεθανολικά εκχυλίσματα όσο και στα δείγματα τα οποία είχαν υποστεί τη διαδικασία καθαρισμού με SPE, πριν και μετά την υδρόλυση. Στα Σχήματα 4.3, 4.4 παρουσιάζονται τυπικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση προτύπων πολυφαινόλων και από την ανάλυση σταφίδας Βοστίτσας απευθείας στο μεθανολικό εκχύλισμα, αντίστοιχα. Στα Σχήματα αυτά η καταγραφή των χρωματογραφημάτων αναφέρεται σε απορροφήσεις των συστατικών σε μήκος κύματος 280 nm. Όσον αφορά στην ανάλυση των απευθείας εκχυλισμάτων (σχήμα 4.3) στο δείγμα της σταφίδας υπάρχουν κορυφές οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε πολυφαινολικά συστατικά, ενώ συγχρόνως ανιχνεύονται και κάποια συστατικά τα οποία δεν αντιστοιχούν στις πολυφαινόλες που ήταν στόχος αυτής της μελέτης. Η

μελέτη των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων σταφίδας βάσει των απορροφήσεων των εκλούμενων συστατικών σε άλλα μήκη κύματος και βάση του φθορισμού υπέδειξε την πιθανή έκλυση και άλλων συστατικών της σταφίδας (π.χ αμινοξέων) στο χρόνο έκλυσης των πολυφαινολών –στόχων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από την αέρια χρωματογραφία συνετέλεσε στον περαιτέρω καθαρισμό των δειγμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσεως. Μετά το στάδιο του καθαρισμού ελήφθησαν λιγότερο πολύπλοκα χρωματογραφήματα στα οποία όμως δεν αποκλείεται η πιθανότητα συμπροσδιορισμού και άλλων ενώσεων μαζί με τις πολυφαινόλες στόχους. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών να γίνει με αέρια χρωματογραφία. Από την ανάλυση με HPLC χρωματογραφία βρέθηκε ότι σε όλα τα δείγματα σταφίδας υπήρχε η 5-υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη (κορυφή με χρόνο κατακράτησης 5.0 min, σχήματα 4.2, 4.3). Η 5-υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη παράγεται από την αφυδάτωση της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ένωση αυτή έχει ταυτοποιηθεί σε δείγματα σταφίδας με την ονομασία raisins (7).



**Σχήμα 4.3:** Χρωματογράφημα μίγματος προτύπων πολυφαινολών. Οι απορροφήσεις αναφέρονται σε  $\lambda=280\text{nm}$ . Οι κορυφές αποδίδονται ως ακολούθως:  $R_t=5,0$ : 5-υδροξυμεθυλοφουρουράλη,  $R_t=5,5$ : γαλλικό οξύ,  $R_t=8,7$ : 3,4-δυδροξυφρανυλοξικό οξύ,  $R_t=13,5$ : τυροσώλη & κατεχίνη,  $R_t=16,6$ : p-υδροξυβενζοϊκό οξύ,  $R_t=17,4$ : βανιλλικό οξύ,  $R_t=17,7$ : γλωργενικό οξύ,  $R_t=19,8$ : φλωρετικό οξύ & καφεϊκό οξύ,  $R_t=20,9$ : επικατεχίνη,  $R_t=25,6$ : p-κουμαρικό & βανιλίνη,  $R_t=29,3$ : φερουλικό οξύ,  $R_t=35,9$ : o-κουμαρικό οξύ,  $R_t=50,1$ : κινναμωμικό οξύ & ρεσβερατρόλη,  $R_t=53,4$ : μυρισετίνη,  $R_t=69,4$ : κερκετίνη,  $R_t=71,9$ : καμπφερόλη



**Σχήμα 4.4:** Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος σταφίδας Βοστίτσας. Η απορροφήσεις αναφέρονται σε  $\lambda=280\text{nm}$

#### **4.5. Ανάλυση των εκχυλισμάτων σταφίδας με GC-MS χρωματογραφία**

Οι ενώσεις οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και τη βοήθεια του φασματογράφου μάζας, καθώς και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός παρουσιάζονται στους πίνακες 4.4 και 4.5 για την κορινθιακή ποικιλία και τη σουλτανίνα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε μεθανολικά εκχυλίσματα, τα οποία έχουν υποστεί εκχύλιση στερεής φάσης. Τέλος τα δείγματα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που έχουν υποστεί όξινη υδρόλυση και σε αυτά που δεν έχουν υποστεί.

**Πίνακας 4.4 Συγκεντρώσεις επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών στις σταφίδες κορινθιακής ποικιλίας.**

|                             | ΒΟΣΤΙΤΣΑΣ         |                 | ΖΑΚΥΝΘΟΥ          |                 | ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ         |                 |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| mg/100g ΝΩΠΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ     |                   |                 |                   |                 |                   |                 |
|                             | υδρολόμενη<br>-μη | υδρολόμενη      | υδρολόμενη<br>-μη | υδρολόμενη      | υδρολόμενη<br>-μη | υδρολόμενη      |
| Βανιλίνη                    | 0,239             | 0,441<br>±0,110 | 0,125<br>±0,001   | 0,453<br>±0,143 | 0,129<br>±0,011   | 0,354<br>±0,006 |
| Κιναμμωμικό οξύ             | ND                | ND              | ND                | ND              | ND                | 0,129<br>±0,008 |
| Τυροσώλη                    | 0,199             | 0,169<br>±0,051 | 0,064<br>±0,000   | 0,086<br>±0,010 | 0,086<br>±0,001   | 0,104<br>±0,010 |
| p-Υδρόξυ<br>Βενζοϊκό οξύ    | 0,153             | 0,478<br>±0,138 | 0,291<br>±0,002   | 0,795<br>±0,025 | 0,369<br>±0,001   | 0,932<br>±0,076 |
| p-Υδρόξυ<br>Φαινυλοξικό οξύ | 0,219             | 0,265<br>±0,015 | 0,252<br>±0,003   | ND              | 0,253<br>±0,001   | ND              |
| Ομοβαννιλική<br>Αλκοόλη     | 0,222             | 0,256<br>±0,016 | ND                | ND              | 0,256<br>±0,001   | ND              |
| Φλωρετικό οξύ               | ND                | 0,229<br>±0,026 | ND                | 0,171<br>±0,005 | 0,162<br>±0,002   | 0,167<br>±0,002 |
| Βαννιλικό οξύ               | 2,265             | 3,549<br>±0,972 | 1,507<br>±0,003   | 2,824<br>±0,005 | 1,691<br>±0,019   | 3,011<br>±0,160 |
| Πρωτοκατεχικό οξύ           | 0,253             | 1,331<br>±0,398 | 0,839<br>±0,034   | 1,481<br>±0,234 | 1,076<br>±0,010   | 1,796<br>±0,021 |

|                          | ΒΟΣΤΙΤΣΑΣ          |                    | ΖΑΚΥΝΘΟΥ           |                    | ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ          |                    |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| mg/100g ΝΩΠΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ  |                    |                    |                    |                    |                    |                    |
|                          | υδροχλωρικό<br>-μη | υδροχλωρικό<br>-μη | υδροχλωρικό<br>-μη | υδροχλωρικό<br>-μη | υδροχλωρικό<br>-μη | υδροχλωρικό<br>-μη |
| Γαλλικό οξύ              | 0,358              | 0,932<br>±0,238    | 0,818<br>±0,031    | 0,800<br>±0,250    | 0,696<br>±0,047    | 0,560<br>±0,014    |
| Φερουλικό οξύ            | 0,325              | 1,148<br>±0,277    | 0,314<br>±0,006    | 0,804<br>±0,128    | 0,294<br>±0,002    | 0,683<br>±0,070    |
| Καφεϊκό οξύ              | 0,488              | 5,873<br>±1,651    | 0,869<br>±0,032    | 2,324<br>±0,904    | 0,379<br>±0,009    | 1,321<br>±0,217    |
| Σιναπικό οξύ             | ND                 | 0,188<br>±0,014    | ND                 | ND                 | ND                 | ND                 |
| Ρεσβερατρόλη             | 0,156              | ND                 | 0,325<br>±0,026    | ND                 | 0,352<br>±0,020    | 0,026<br>±0,000    |
| Επικατεχίνη              | 0,376              | 0,223<br>±0,027    | 0,314<br>±0,019    | ND                 | 0,181<br>±0,001    | ND                 |
| Κατεχίνη                 | 1,140              | ND                 | 0,804<br>±0,021    | 0,571<br>±0,068    | 0,650<br>±0,012    | ND                 |
| Καμπφερόλη               | 0,391              | 0,600<br>±0,130    | 0,401<br>±0,007    | 0,369<br>±0,002    | 0,477<br>±0,011    | 0,386<br>±0,031    |
| Κερκετίνη                | 0,520              | 0,750<br>±0,130    | 0,571<br>±0,009    | 0,526<br>±0,000    | ND                 | ND                 |
| Άθροισμα<br>Πολυφαινολών | 9,592              | 20,220<br>±4,430   | 9,921<br>±0,036    | 14,431<br>±1,811   | 9,703<br>±0,001    | 13,73<br>±0,643    |

**Πίνακας 4.5 Συγκεντρώσεις επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών στις σουλτανίνες**

|                             | ΚΡΗΤΗΣ                  |                         | ΤΟΥΡΚΙΑΣ                |                         |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| mg/100g ΝΩΠΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ     |                         |                         |                         |                         |
|                             | υδροξυ-<br>μυρί-<br>λιν | υδροξυ-<br>μυρί-<br>λιν | υδροξυ-<br>μυρί-<br>λιν | υδροξυ-<br>μυρί-<br>λιν |
| Βανιλίνη                    | 0,029 ±0,002            | 0,069 ±0,017            | 0,043 ±0,001            | 0,067 ±0,008            |
| Κιναμωμικό οξύ              | 0,175 ±0,018            | 0,161 ±0,031            | ND                      | ND                      |
| Τυροσόλη                    | 0,011 ±0,000            | 0,027 ±0,005            | 0,011 ±0,000            | 0,022 ±0,002            |
| p-Υδρόξυ<br>Βενζοϊκό οξύ    | 0,110 ±0,003            | 0,315 ±0,060            | 0,109 ±0,003            | 0,209 ±0,002            |
| p-Υδρόξυ<br>Φαινυλοξικό οξύ | 0,207 ±0,000            | ND                      | 0,209 ±0,005            | ND                      |
| Φλωρετικό οξύ               | ND                      | 0,162 ±0,006            | 0,139 ±0,001            | 0,146 ±0,011            |
| Βαννιλικό οξύ               | 0,122 ±0,000            | 0,208 ±0,021            | 0,120 ±0,004            | 0,161 ±0,003            |
| Πρωτοκατεχικό οξύ           | 0,106 ±0,00             | 0,594 ±0,004            | 0,517 ±0,099            | 0,736 ±0,077            |
| Συρριγγικό οξύ              | 0,039 ±0,001            | 0,156 ±0,034            | 0,029 ±0,001            | 0,059 ±0,002            |
| p-Κουμαρικό οξύ             | 0,256 ±0,002            | 0,649 ±0,089            | 0,297 ±0,009            | 0,553 ±0,019            |
| Γαλλικό οξύ                 | 0,176 ±0,014            | 0,395 ±0,112            | 0,709 ±0,093            | 0,561 ±0,010            |
| Φερουλικό οξύ               | 0,203 ±0,003            | 0,417 ±0,052            | 0,214 ±0,010            | 0,329 ±0,015            |

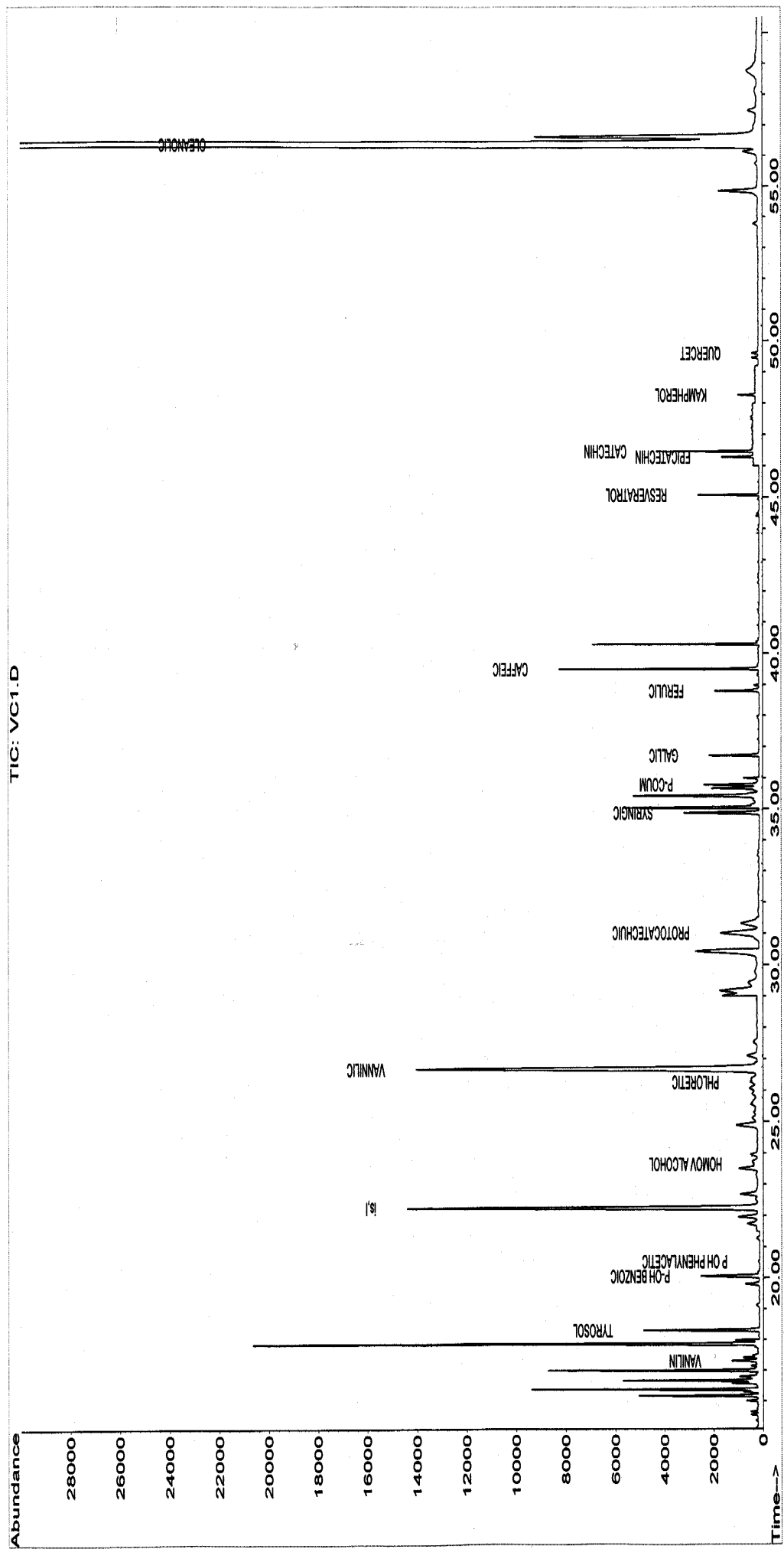


|                         | ΚΡΗΤΗΣ           |              | ΤΟΥΡΚΙΑΣ         |              |
|-------------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| mg/100g ΝΩΠΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ |                  |              |                  |              |
|                         | μλξήαοοοο<br>-λμ | μλξήαοοοο    | μλξήαοοοο<br>-λμ | μλξήαοοοο    |
| Καφεϊκό οξύ             | 0,154 ±0,015     | 0,764 ±0,303 | 0,375 ±0,100     | 1,038 ±0,135 |
| Ρεσβερατρόλη            | 0,180 ±0,018     | ND           | 0,027 ±0,007     | ND           |
| Επικατεχίνη             | 0,160 ±0,002     | ND           | 0,144 ±0,007     | ND           |
| Κατεχίνη                | 0,601 ±0,003     | ND           | 0,459 ±0,028     | ND           |
| Καμπφερόλη              | 0,411 ±0,001     | 0,340 ±0,012 | 0,482 ±0,090     | 0,399 ±0,122 |
| Κερκετίνη               | 0,935 ±0,009     | ND           | 1,179 ±0,492     | 0,444 ±0,004 |
| Άθροισμα Πολυφαινολών   | 5,467 ±0,060     | 6,974 ±0,704 | 6,504± 0,939     | 6,958 ±0,120 |

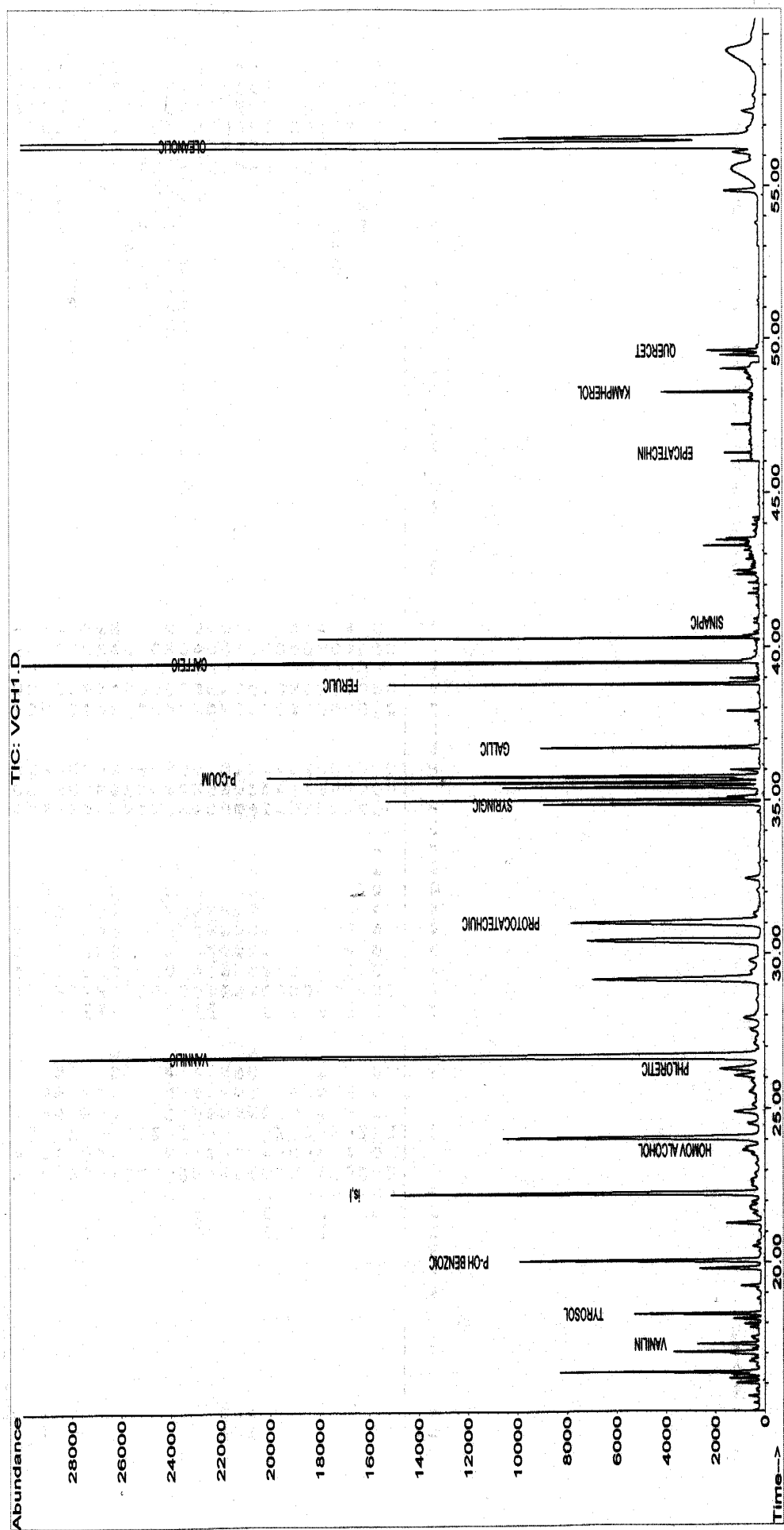
Στον Πίνακα 4.6 παρατίθενται οι πολυφαινόλες στις οποίες παρατηρήθηκε ποσοτική αύξηση μετά την υδρόλυση καθώς και η ποσοστιαία αύξηση που σημειώθηκε.

**Πίνακας 4.6 Ποσοστιαία αύξηση συγκεντρώσεων πολυφαινολικών συστατικών μετά την υδρόλυση**

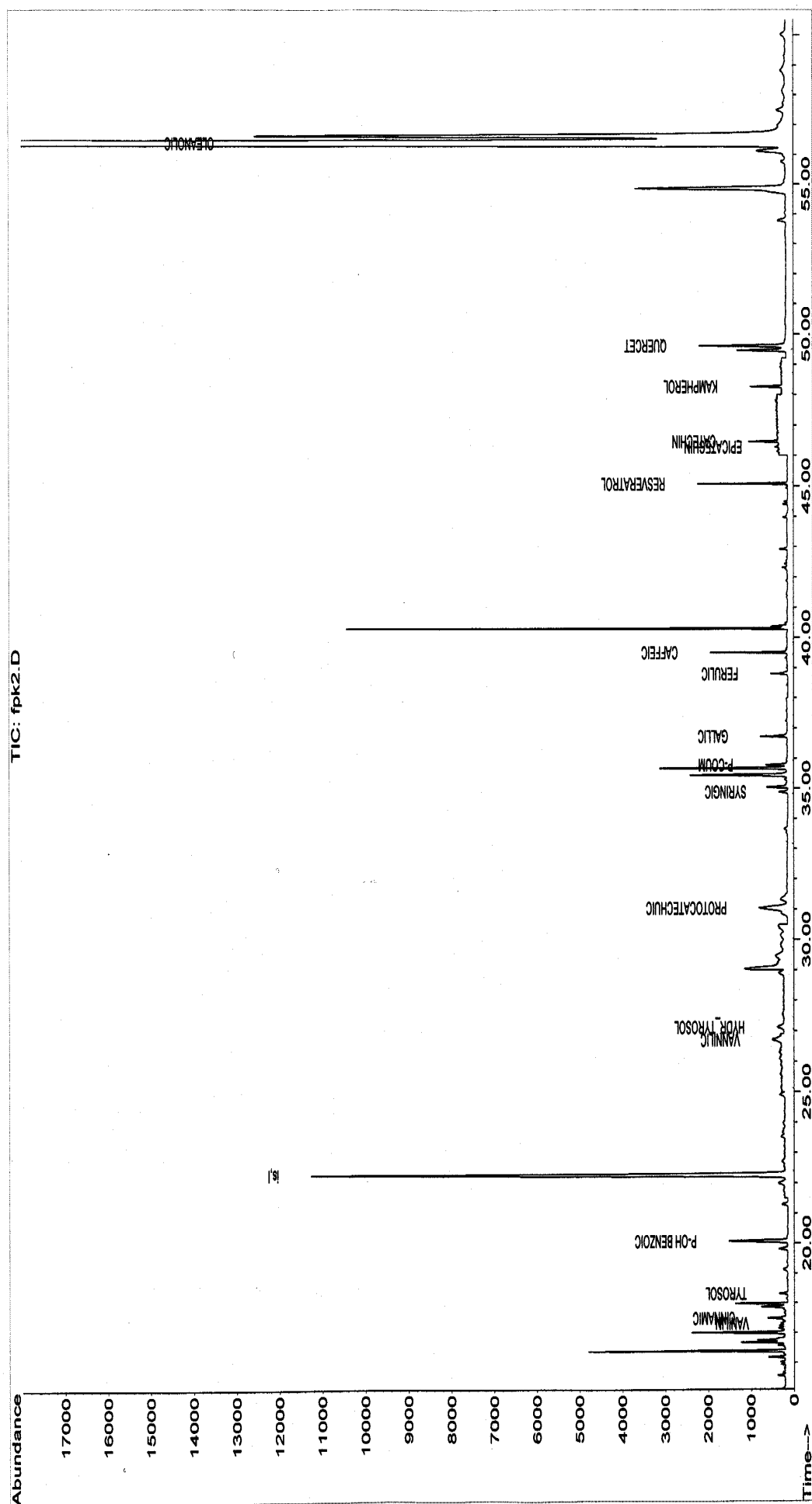
|                                  | <b>Σταφίδα<br/>Βοστίτσας</b> | <b>Σταφίδα<br/>Ζακύνθου</b> | <b>Σταφίδα<br/>Μεσσηνίας</b> | <b>Σταφίδα<br/>Κρήτης</b> | <b>Σταφίδα<br/>Τουρκίας</b> |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <b>Βανιλίνη</b>                  | <b>84,39</b>                 | <b>262,37</b>               | <b>173,73</b>                | <b>137,56</b>             | <b>57,43</b>                |
| <b>p-υδρόξυ<br/>Βενζοϊκό οξύ</b> | <b>211,23</b>                | <b>173,44</b>               | <b>152,88</b>                | <b>186,64</b>             | <b>92,13</b>                |
| <b>Φλορετικό οξύ</b>             | <b>67,51</b>                 | <b>10,93</b>                | <b>3,20</b>                  | <b>19,73</b>              | <b>4,92</b>                 |
| <b>Βαννιλικό οξύ</b>             | <b>56,69</b>                 | <b>87,40</b>                | <b>78,02</b>                 | <b>70,11</b>              | <b>33,80</b>                |
| <b>Ομοβαννιλικό<br/>οξύ</b>      | <b>0,00</b>                  | <b>0,00</b>                 | <b>47,10</b>                 | <b>0,00</b>               | <b>0,00</b>                 |
| <b>Πρωτοκατεχικ<br/>ό οξύ</b>    | <b>426,74</b>                | <b>76,43</b>                | <b>66,93</b>                 | <b>458,51</b>             | <b>42,52</b>                |
| <b>Συριγγικό οξύ</b>             | <b>113,16</b>                | <b>125,41</b>               | <b>85,41</b>                 | <b>305,94</b>             | <b>102,84</b>               |
| <b>p-Κουμαρικό<br/>οξύ</b>       | <b>260,29</b>                | <b>78,10</b>                | <b>142,32</b>                | <b>153,85</b>             | <b>86,10</b>                |
| <b>Φερουλικό οξύ</b>             | <b>253,43</b>                | <b>155,92</b>               | <b>132,43</b>                | <b>105,40</b>             | <b>53,64</b>                |
| <b>Καφεϊκό οξύ</b>               | <b>1102,46</b>               | <b>167,53</b>               | <b>248,67</b>                | <b>395,24</b>             | <b>176,81</b>               |
| <b>Άθροισμα<br/>Πολυφαινολών</b> | <b>110,80</b>                | <b>45,46</b>                | <b>41,51</b>                 | <b>27,55</b>              | <b>6,98</b>                 |



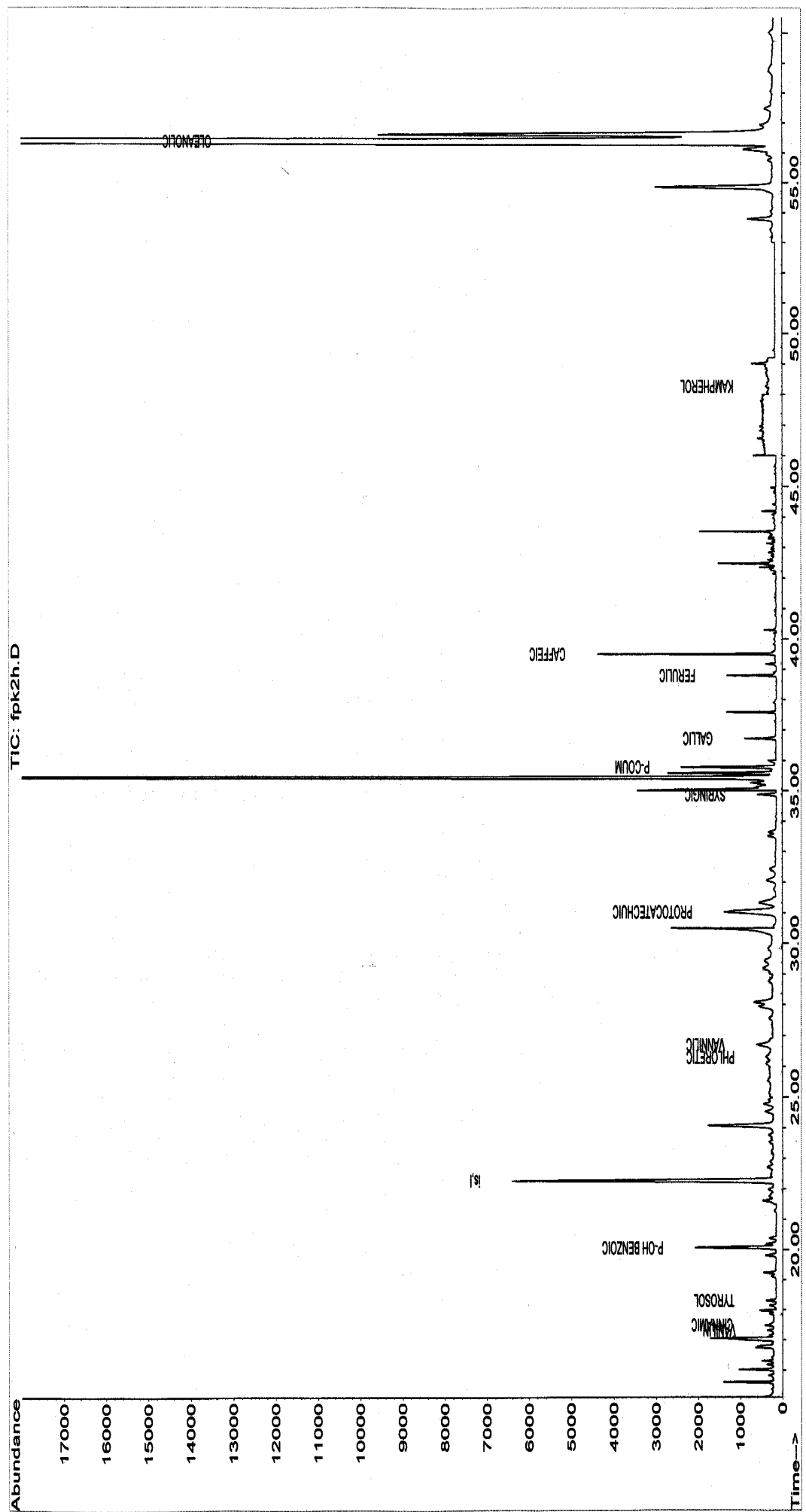
**Σχήμα 4.5** Χρωματογράφημα (GC-MS) μεθανολικού εκχυλίσματος σταφίδας ποικιλίας Βοστίτσας μετά από καθαρισμό με SPE



**Σχήμα 4.6** Χρωματογράφημα (GC-MS) μεθανολικού εκχυλίσματος σταφίδας ποικιλίας Βοστίτσας μετά από όξινη υδρόλυση και καθαρισμό με SPE



Σχήμα 4.7 Χρωματόγραμμα (GC-MS) μεθανολικού εκχυλίσματος σταφίδας ποικιλίας Κρήτης μετά από καθαρισμό με SPE



Σχήμα 4.8 Χρωματόγραμμα (GC-MS) μεθανολικού εκχυλίσματος σταφίδας ποικιλίας Κρήτης μετά από όξινη υδρόλυση και καθαρισμό με SPE

# **ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

## **5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

Για να εκχυλίσουμε το δείγμα δοκιμάσαμε τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών: μεθανόλης, μεθανόλης/ νερού, μεθανόλης/ ακετόνης/ νερού, οξικού αιθυλεστέρα. Ο οξικός αιθυλεστέρας απορρίφθηκε ως λιγότερο πολικός από τη μεθανόλη. Επίσης από τα χρωματογραφήματα φαινόταν ότι παρασύρει πολλά συστατικά που παρεμπόδιζαν το προσδιορισμό των πολυφαινολών. Τα συστήματα διαλυτών τα οποία περιείχαν νερό έκαναν δύσκολη την επεξεργασία του δείγματος διότι απαιτούσαν πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα για να ξηρανθούν. Ακόμη όταν αναλύθηκαν με τις μεθόδους της υγρής και της αέριας χρωματογραφίας έδιναν πολύπλοκα χρωματογραφήματα τα οποία δεν επέτρεπαν το προσδιορισμό των πολυφαινολικών συστατικών του δείγματος. Επειδή η χρήση των συγκεκριμένων συστημάτων διαλυτών δεν επαναλήφθηκε πολλές φορές, δεν μπορούμε να είμαστε απόλυτα σίγουροι ότι δεν αποδίδουν. Εμείς επιλέξαμε τη μεθανόλη ως ένα πολικό διαλύτη ο οποίος έδινε διαυγή διαλύματα, καθιστούσε την επεξεργασία του δείγματος πιο εύκολη από τα υδατικά διαλύματα και έδινε χρωματογραφήματα τα οποία έδειχναν πως μετά από περαιτέρω επεξεργασία θα προσδιόριζαν ικανό αριθμό πολυφαινολικών συστατικών.

## **5.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Στα δείγματα δοκιμάστηκαν οι διαδικασίες της όξινης και της ενζυμικής υδρόλυσης. Τα δείγματα που υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση, δεν έδειξαν αρχικά κάποια διαφορά σε σχέση με τα μη-υδρολυμένα δείγματα. Η όξινη υδρόλυση έδινε αρκετές διαφορές στα τελικά αποτελέσματα σε σχέση με τα αποτελέσματα δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί όξινη υδρόλυση. Αυτό πιθανώς συμβαίνει διότι με τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης πολλές πολυφαινόλες μετασχηματίζονται σε καινούριες ενώσεις. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο προχωρήσαμε



στην όξινη υδρόλυση. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι με τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης υδρολύονται εστέρες του τρυγικού οξέος με καφεϊκό και κουμαρικό οξύ αντίστοιχα. Το καφταρικό και το κουταρικό οξύ είναι βασικά πολυφαινολικά συστατικά των σταφυλιών και του κρασιού. Συνεπώς αναμένεται η παρουσία τους και στη σταφίδα. Λόγω έλλειψης προτύπων των συγκεκριμένων πολυφαινολικών οξέων η όξινη υδρόλυση χρησιμοποιείται ως ένας έμμεσος τρόπος προσδιορισμού τους. Μια αύξηση του καφεϊκού και του κουμαρικού οξέος μετά την υδρόλυση πιθανώς να σημαίνει και τη παρουσία καφταρικού και κουταρικού οξέος στο δείγμα. Με άλλα λόγια αντιλαμβανόμαστε τη παρουσία τους μέσω των παραγώγων ενώσεών τους που προκύπτουν μετά την όξινη υδρόλυση.

### **5.3. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

Επειδή ούτε τα μεθανολικά εκχυλίσματα επέτρεπαν το σαφή εντοπισμό των πολυφαινολών δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι καθαρισμού του δείγματος από μη φαινολικά συστατικά οι οποίες επέτρεπαν τη παραλαβή κυρίως αν όχι αποκλειστικά φαινολικών συστατικών. Οι μέθοδοι αυτές είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης και η εκχύλιση υγρού-υγρού. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της εκχύλισης υγρού-υγρού με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας έδειξε ότι στο χρωματογράφημα που προέκυψε εκτός από πολυφαινόλες ανιχνεύονταν σάκχαρα και λιπαρές ύλες (στους χρόνους μεταξύ 25 και 35 min) οι οποίες δυσχέραιναν το καθορισμό και τον εντοπισμό των πολυφαινολών. Έτσι επιλέχθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης η οποία έδινε περισσότερο ευκρινή χρωματογραφήματα

### **5.4. ΥΓΡΑΣΙΑ ΣΤΑΦΙΔΑΣ**

Συνήθως οι μετρήσεις της υγρασίας της σταφίδας δίνουν τιμές περίπου 13%. Σε όλες τις σταφίδες, εμείς μετρήσαμε ποσοστό υγρασίας μικρότερο του 13%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε (freeze- drying) ή σε κάποια αδυναμία της πειραματικής διαδικασίας γενικότερα. Επιπρόσθετα, υπάρχει το ενδεχόμενο τα δείγματα να αφυδατώθηκαν λόγω της παραμονής τους επί μακρόν σε χώρο σχετικά μικρής υγρασίας αέρα όπως οι κλιματιζόμενοι εργαστηριακοί χώροι.

## **5.5. Η ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN- CIOCALTEAU**

Με τη μέθοδο αυτή, προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων. Μάλιστα, προσδιορίστηκε μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από αυτό που προκύπτει από τις μετρήσεις της αέριας χρωματογραφίας. Βέβαια η μέθοδος αυτή δεν προσδιορίζει μόνο τα πολυφαινολικά συστατικά των δειγμάτων αλλά προσδιορίζονται και μη πολυφαινολικά συστατικά όπως τα αμινοξέα. Επιπλέον, η διαφορά που δίνουν οι δύο αυτές διαφορετικές μετρήσεις επισημαίνουν την ανάγκη καθαρισμού του δείγματος ώστε να επιτευχθεί ο ακριβής προσδιορισμός των πολυφαινολικών συστατικών. Επισημαίνεται ότι οι ολικές πολυφαινόλες που προσδιορίζονται μέσω της αέριας χρωματογραφίας προκύπτουν μόνο από τα πολυφαινολικά συστατικά για τα οποία διατίθενται πρότυπα, άρα αναφερόμαστε ουσιαστικά σε συνολικές ανιχνεύσιμες πολυφαινόλες.

## **5.6. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ**

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της σταφίδας έγινε βάσει της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH\* (1,1-διφαινύλο-2-πικρύλουδράζυλο ελεύθερης ρίζας). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας μετά από κατάλληλη αραίωση. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπολογίστηκε η ποσότητα σταφίδας που απαιτείται για την δέσμευση του 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH\* δηλ. η τιμή EC50 για τη σταφίδα. Όσο η απαιτούμενη ποσότητα σταφίδας για τη δέσμευση του 50% της ελεύθερης ρίζας μειώνεται τόσο αυξάνει η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος, καθώς μικρότερη ποσότητα αντιοξειδωτικών συστατικών απαιτείται για τη δέσμευση της ίδιας ποσότητας DPPH\*. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5.1) παρουσιάζονται οι τιμές EC50 για τις σταφίδες που μελετήθηκαν, οι οποίες εκφράζονται σε ποσότητες του προς κατανάλωση προϊόντος. Για λόγους σύγκρισης στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο όπως εκτιμήθηκε με βάση τη μέθοδο Folin -Ciocalteu.

**Πίνακας 5.1 Τιμές EC50 και Folin -Ciocalteu για το κάθε δείγμα σταφίδας**

| Ποικιλία Σταφίδας | Ολικές πολυφαινόλες βάσει FC | EC50 (mg νωπής σταφίδας) | EC50 (g νωπής σταφίδας) |
|-------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Βοστίτσας         | 198,591                      | 4,31                     | 0,00431                 |
| Ζακύνθου          | 227,835                      | 4,48                     | 0,00448                 |
| Μεσσηνίας         | 226,015                      | 4,89                     | 0,00489                 |
| Κρήτης            | 141,689                      | 9,89                     | 0,00989                 |
| Τουρκίας          | 176,340                      | 10,02                    | 0,01002                 |

οι τιμές FC εκφράζονται ως mg καφεϊκού οξέος /100 g νωπού προϊόντος

**Πίνακας 5.2 Τιμές του EC50 για το κάθε δείγμα σταφίδας και για την ελιά**

| Ποικιλία Σταφίδας | EC50 (mg νωπής σταφίδας) | EC50 (mg ελιάς) |
|-------------------|--------------------------|-----------------|
| Βοστίτσας         | 4,31                     | 30              |
| Ζακύνθου          | 4,48                     |                 |
| Μεσσηνίας         | 4,89                     |                 |
| Κρήτης            | 9,89                     |                 |
| Τουρκίας          | 10,02                    |                 |

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5.1., οι τιμές EC50 είναι παρόμοιες για όλες τις μαύρες σταφίδες που μελετήθηκαν, όπως επίσης είναι παρόμοιες για τις ξανθές σταφίδες Κρήτης και Τουρκίας που ανήκουν στην ποικιλία σουλτανίνας. Αξίζει να σημειωθεί η σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ μαύρων και ξανθών σταφίδων, με τις μαύρες να υπερέχουν. Για την εκδήλωση της ίδιας αντιοξειδωτικής δράσης απαιτείται να καταναλωθεί διπλάσια ποσότητα σουλτανίνας από αυτήν της μαύρης σταφίδας. Η παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας πολυφαινολικών συστατικών στις μαύρες σταφίδες

επιβεβαιώθηκε από τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και υποδυναμείται από τα αποτελέσματα της εκτίμησης του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu. Το γεγονός ότι ο προσδιορισμός των επιμέρους πολυφαινολών και οι μετρήσεις Folin- Ciocalteu δεν συμφωνούν απόλυτα με τις τιμές EC50 που υπολογίστηκαν για την αντιοξειδωτική ικανότητα, δηλ. δεν παρουσιάζεται ακριβώς η αναλογία  $\frac{1}{2}$  για ξανθές/μαύρες σταφίδες, μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό είδος και αναλογία των πολυφαινολικών συστατικών που βρίσκονται στις σταφίδες, όπως κατέδειξε η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.

Στο πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι τιμές του EC50 για τη σταφίδα και την ελιά. Βλέπουμε ότι η ελιά (42) απαιτεί 30 mg, οι σουλτανίνες ~10 mg ενώ η κορινθιακή σταφίδα απαιτεί μόλις ~4 mg για να εξουδετερώσει την ελεύθερη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς οι κορινθιακές σταφίδες έχουν 7,5 φορές και οι σουλτανίνες 3 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις ελιές. Άρα η σύγκριση αυτή καθιστά τη σταφίδα ως ένα τρόφιμο υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

## 5.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ GC-MS

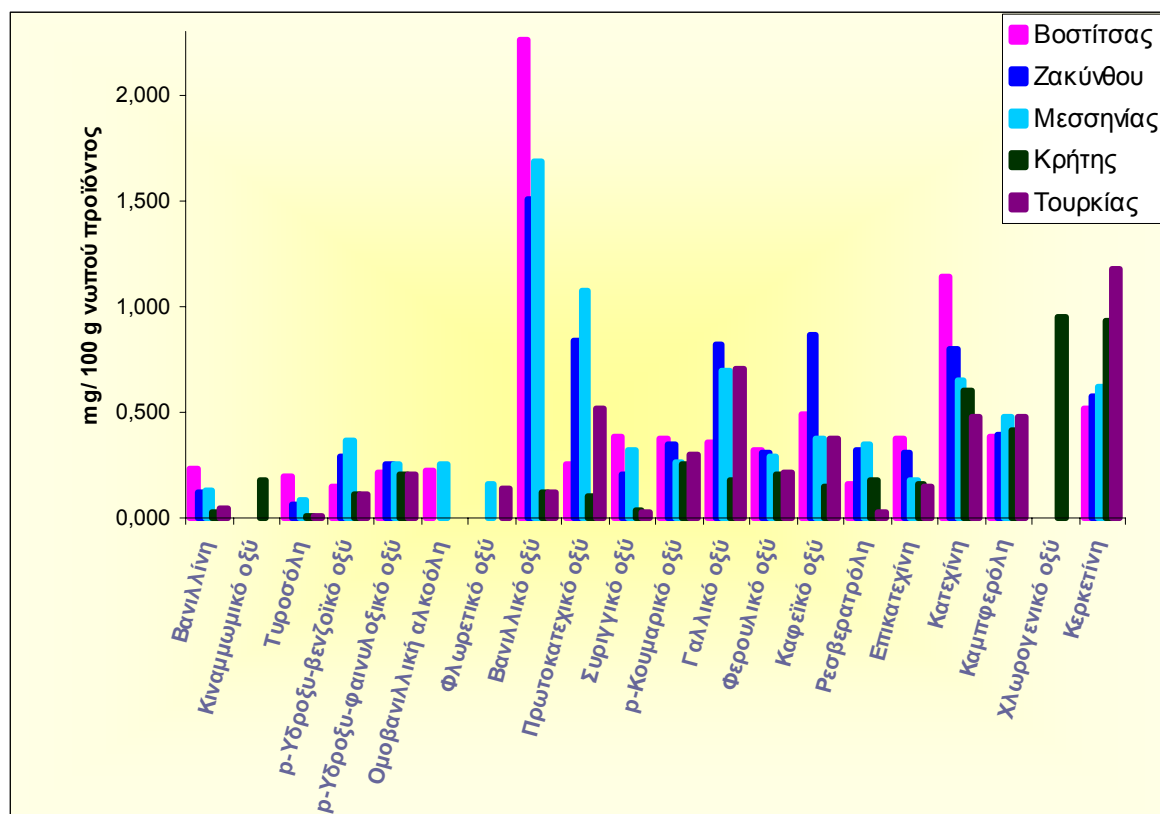
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αέριας χρωματογραφίας προέκυψε η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός 20 πολυφαινολικών συστατικών της σταφίδας μεταξύ των οποίων (υδρόξυ)κιναμμωμικά οξέα, φαινολικά οξέα, απλές φαινόλες, φλαβονόλες, στιλβένια, βενζοϊκά οξέα κ.α.

Στη σταφίδα της Βοστίτσας ανιχνεύτηκαν 18 πολυφαινόλες. Ο ίδιος αριθμός πολυφαινολών ανιχνεύτηκε και στις σταφίδες Μεσσηνίας και Κρήτης. Στις σταφίδες Ζακύνθου ανιχνεύτηκαν 16 πολυφαινολικά συστατικά και στις σταφίδες Τουρκίας 17. Το βανιλλικό οξύ, είναι το πολυφαινολικό συστατικό που ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα υπόλοιπα στις κορινθιακές σταφίδες. Στις σουλτανίνες υπερέχει το χλωρογενικό οξύ στη σταφίδα Κρήτης και η κερκετίνη στη σταφίδα Τουρκίας.

Πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρεσβερατρώλης και στις 2 εξεταζόμενες ποικιλίες. Η ύπαρξη ρεσβερατρώλης ήταν αναμενόμενη στη σταφίδα αφού εμφανίζεται σε σημαντικές ποσότητες στο κρασί. Όμως επειδή η συγκεκριμένη πολυφαινόλη επηρεάζεται από την ωρίμανση, υπήρχε ένα ενδεχόμενο να μην εντοπιστεί. Βέβαια οι ποσότητες στις

οποίες εμφανίζεται στη σταφίδα είναι πολύ μικρότερες από αυτές στις οποίες εντοπίζεται στο κρασί.

**Σχήμα 5.1. Σύγκριση των συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών συστατικών των 5 δειγμάτων σταφίδας.**



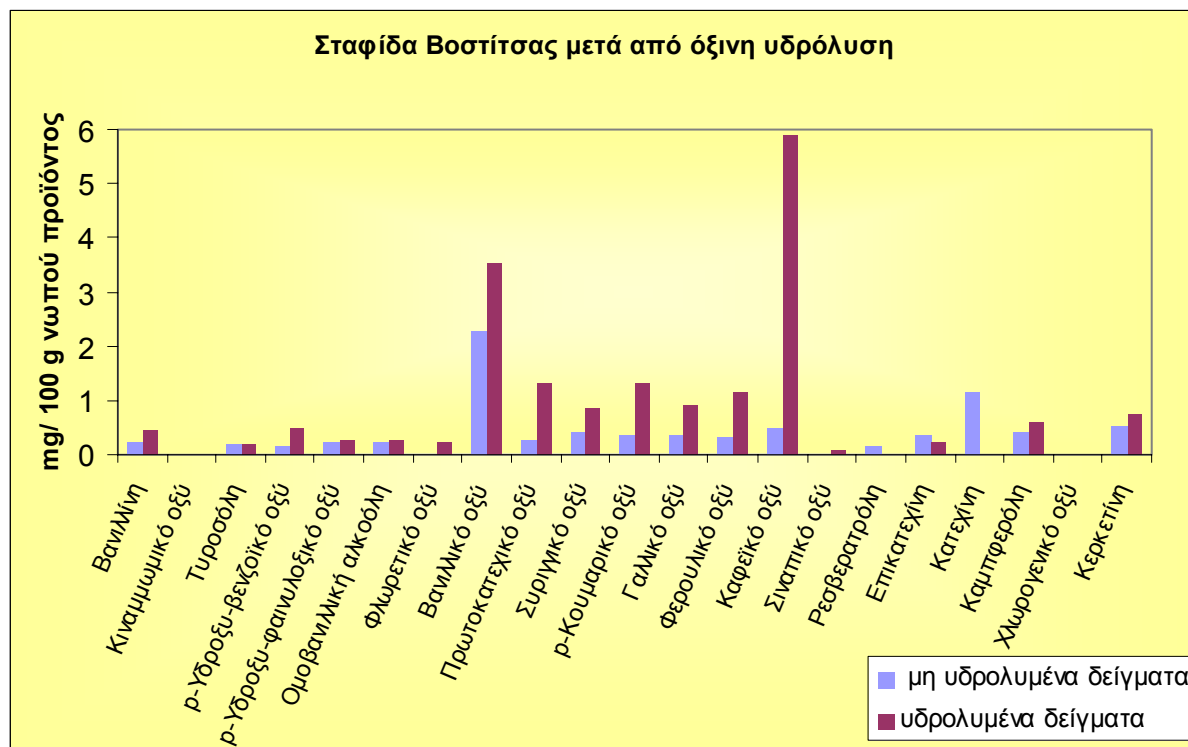
Η σταφίδα της Βοστίτσας περιέχει πολύ περισσότερο βανιλικό οξύ και κατεχίνη από τις υπόλοιπες σταφίδες. Μετά την επεξεργασία της σταφίδας Βοστίτσας με όξινη υδρόλυση παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της ανιχνεύσιμης ποσότητας του καφεϊκού οξέος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διάσπαση του καφταρικού οξέος, όπως προαναφέρθηκε, σε καφεϊκό οξύ. Βέβαια η έλλειψη προτύπων για τα συγκεκριμένα συστατικά δε μας επιτρέπει την ταυτοποίησή τους. Η αύξηση του καφεϊκού οξέος μετά την υδρόλυση θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη για την ύπαρξη καφταρικού οξέος ή άλλων εστέρων του καφεϊκού οξέος στα δείγματα. Εκτός από το καφεϊκό, μετά την υδρόλυση αυξάνεται η ποσότητα και άλλων πολυφαινολών όπως το βανιλικό, το γαλλικό, το φερουλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ γεγονός που θα μπορούσε να σημαίνει την ύπαρξη συζευγμένων μορφών των παραπάνω πολυφαινολών στα δείγματα σταφίδας Βοστίτσας.

Στα υπόλοιπα δείγματα η υδρόλυση επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που αναφέρθηκαν για τη σταφίδα της Βοστίτσας αλλά σε μικρότερη κλίμακα. Αξιοσημείωτη είναι η ανίχνευση ορισμένων πολυφαινολών οι οποίες δεν εμφανίζονταν στο μη υδρολυμένο δείγμα. Παράδειγμα αποτελεί το φλωρετικό οξύ το οποίο ανιχνεύεται τις σταφίδες Βοστίτσας, της Ζακύνθου και της Κρήτης και μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη συζευγμένων μορφών της πολυφαινόλης στο δείγμα.. Επιπλέον, η υδρόλυση επιφέρει και την καταστροφή ορισμένων πολυφαινολών όπως η ρεσβερατρόλη

**Σχήμα 5.2. Σύγκριση των συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών συστατικών των 5 δειγμάτων σταφίδας μετά την όξινη υδρόλυση.**



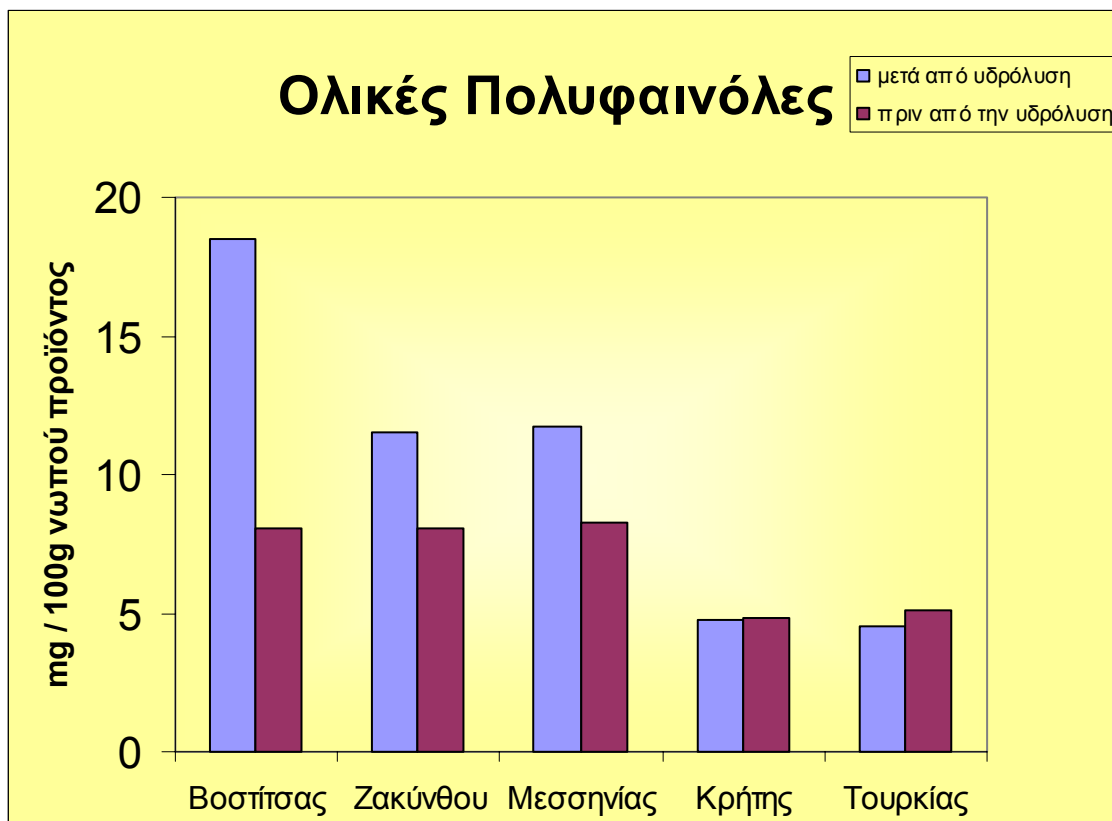
**Σχήμα 5.3. Σύγκριση συγκεντρώσεων πολυφαινολικών συστατικών πριν και μετά την υδρόλυση (σταφίδα Βοστίτσας)**



Η σταφίδα Ζακύνθου διαθέτει τη μεγαλύτερη ποσότητα καφεϊκού ανάμεσα σε όλα τα δείγματα ενώ μόνο σε αυτό το δείγμα ταυτοποιείται το κιναμμωμικό οξύ. Ακόμα, οι σουλτανίνες φαίνεται να διαθέτουν μεγαλύτερες ποσότητες κερκετίνης από τις σταφίδες της κορινθιακής ποικιλίας, ενώ οι κορινθιακές διαθέτουν μεγαλύτερες ποσότητες συριγγικού οξέος, τυροσόλης και βανιλίνης.

Η σύγκριση της ποσότητας των ολικών πολυφαινολών στα 5 δείγματα έδειξε ότι οι σταφίδες της Κορινθιακής ποικιλίας υπερέχουν των σουλτανίνων. Ακόμη διαπιστώσαμε ότι όλες οι σταφίδες της Κορινθιακής ποικιλίας διαθέτουν περίπου την ίδια ποσότητα συνολικών ανιχνεύσιμων πολυφαινολών. Το ίδιο ισχύει και ανάμεσα στις σουλτανίνες. Μετά την όξινη υδρόλυση η συγκέντρωση των πολυφαινολών των σταφίδων της κορίνθιας αυξάνεται, ενώ μειώνεται αυτή των σταφυλιών της σουλτανίνας. Επιπλέον αξιοσημείωτο είναι ότι ανάμεσα στις κορινθιακές σταφίδες μεγαλύτερη αύξηση συγκέντρωσης πολυφαινολών μετά την υδρόλυση εμφανίζει η σταφίδα της Βοστίτσας.

**Σχήμα 5.4. Σύγκριση συνολικών συγκεντρώσεων πολυφαινολικών συστατικών πριν και μετά την υδρόλυση στα 5 δείγματα σταφίδας.**



Επιπλέον, το ολεανολικό οξύ, ένα τερπενοειδές γνωστό από τη βιβλιογραφία για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα σταφίδας που εξετάστηκαν. Η συγκέντρωση του ολεανολικού οξέος εκτιμήθηκε  $>10\text{mg} / 100\text{ g}$  νωπού προϊόντος. Η ποσοτικοποίηση του θα αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω έρευνας.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, ανιχνεύτηκαν και προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά οι συγκεντρώσεις 16- 18 πολυφαινολικών συστατικών (ελεύθερων και συζευγμένων) σε δείγματα κορινθιακής σταφίδας και σουλτανίνας. Για πρώτη φορά εξετάστηκαν ως προς το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο σταφίδες που ανήκουν στη κορινθιακή ποικιλία καθώς και σουλτανίνες που προέρχονται από τις περιοχές της Ν. Ελλάδας. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη είναι η μοναδική στην οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση και των προσδιορισμό συγκεκριμένων πολυφαινολικών συστατικών σε οποιαδήποτε ποικιλία σταφίδας. Η καινοτομία της μελέτης αυτής είναι προφανής από όσα προαναφέρθηκαν και ενισχύεται από το γεγονός ότι η μελέτη αυτή είναι η πρώτη στην οποία διεξήχθη ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυφαινολικών συστατικών της σταφίδας με τη μέθοδο Folin-Ciocalteau και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος με τη μέθοδο DPPH\*.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ποικιλίες σταφίδας διαθέτουν σημαντική ποικιλία αντιοξειδωτικών συστατικών. Συγκεκριμένα στη κορινθιακή σταφίδα της Βοστίτσας ανιχνεύτηκαν 18 πολυφαινόλες. Ο ίδιος αριθμός πολυφαινολών ανιχνεύτηκε και στις κορινθιακές σταφίδες Μεσσηνίας και τις σουλτανίνες της Κρήτης. Στις κορινθιακές σταφίδες Ζακύνθου ανιχνεύτηκαν 16 πολυφαινολικά συστατικά και στις σουλτανίνες της Τουρκίας 17. Ακόμη, παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις ως προς τις συγκεντρώσεις των περιεχόμενων πολυφαινολών. Τα περισσότερα από τα πολυφαινολικά συστατικά που προσδιορίστηκαν, ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά στη σταφίδα. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγεται και η ρεσβερατρόλη. Η ρεσβερατρόλη είναι ένα στυλβένιο, το οποίο περιέχεται σε μεγάλες ποσότητες στο κρασί, και στο οποίο αποδίδεται μεγάλο μέρος της αντικαρκινικής δράσης του κρασιού. Σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν η συγκέντρωση των συνολικών

ανιχνεύσιμων πολυφαινολών αυξάνεται κατά την όξινη υδρόλυση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στις σταφίδες πολλά πολυφαινολικά συστατικά βρίσκονται σε συζευγμένες μορφές (π.χ. γλυκοζίτες). Όπως προέκυψε από τη διεξαγωγή της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, οι κορινθιακής ποικιλίας σταφίδες έχουν σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από τις σουλτανίνες. Επιπρόσθετα, τόσο η μέθοδος Folin- Ciocalteu, όσο και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών πολυφαινολών μέσω της αέριας χρωματογραφίας έδειξαν ότι οι κορινθιακής ποικιλίας σταφίδες υπερέχουν των σουλτανίνων.

Τέλος, η σύγκριση των τιμών EC50 των σταφίδων της κορινθιακής ποικιλίας, των σουλτανίνων και της ελιάς (ένα φυτικό προϊόν γνωστό για το πλούσιο αντιοξειδωτικό του περιεχόμενο) έδειξε ότι η κορινθιακές σταφίδες έχουν 7,5 και οι σουλτανίνες 3 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις ελιές. Συνεπώς η σταφίδα αποτελεί μία ιδιαίτερα πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών συστατικών με αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα που μπορούν να συνεισφέρουν στην ημερήσια κατανάλωση πολυφαινολικών συστατικών στη Μεσογειακή (και όχι μόνο) διατροφή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ross J, Kasum CM: DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition* 2002,22:19-34
2. Alonso MG, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC: Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry* 2004,84(1):13-18
3. Παπαχατζής Α: Ειδική Δενδροκομία (Αμπελουργία), , ΤΕΙ Λάρισας 2001
4. [www.driedfruit-info.com](http://www.driedfruit-info.com)
5. Hutchinson Encyclopedia.
6. Helicon Publishing LTD 2000
7. Camire M., Dougherty MP: Raisin Dietary Fiber Composition and in Vitro Bile Acid Binding. *Agric. Food Chem.* 2003,51 (3):834 -837
8. Karadeniz F, Durst R.W, Wrolstad R.E: Polyphenolic composition of raisins. *J.Agric.Food.Chem.*2000, 48:5343-5350
9. Borbalan A, Zorro L, Barroso GC: Study of the polyphenols content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 2003,1012:31-38
10. Flamini R: Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass spectrometry Reviews*,2003,22:218-250
11. Hollman PCH, Katan MB: Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed and Pharmacother* 1997,51:305-310
12. Howard A, Chorpa M, Thurnham D.I., Strain J.J, Fuhrman B., Aviram M: Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Medical Hypothesis* 2002, 59(1):101-104
13. Β.Δ.Κριμπά: Ελληνική Αμπελογραφία, Αθήνα 1943, 1<sup>ος</sup> τόμος,
14. Λογοθέτης Β.Χ.: Συμβολή της αμπέλου και του οίνου στο πολιτισμό της Ελλάδος και της Ανατολικής Μεσογείου, Θεσσαλονίκη 1975, τόμος ΙΖ'

15. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-242S.
16. Borbala A.M, Zorro L, Dominico A. Guillen D.A, Carmelo García Barroso CG: Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography–mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1012: 31–38
17. Gorinstein S, Caspi A, Zemser M, Trakhtenberg S.: Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. *Nutrition Research* 2000,20(1):135-139
18. Dávalos A, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C: Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*. Article in Press, Corrected Proof
19. Χαλουλάκος Τζανέτος-Ιωάννης: Μελέτη μεγεθών και διεργασιών που επηρεάζουν την αποθήκευση και τη διακίνηση της Σουλτανίνας. Πτυχιακή εργασία. *Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Τμήμα Γεωργικών Βιομηχανιών, Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων*, Αθήνα 1993.
20. Πάσσης Ιωάννης: Η επίδραση της προεπεξεργασίας και του τρόπου ηλιοξήρανσης στη ταχύτητα της ξήρανσης και τη χρωματική κατάσταση της σταφίδας. *Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών προϊόντων*. Αθήνα 1996
21. Cantow E., Espin J.C., Tomas- Barberan F.A.: Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.*,2002, 50:5691-5696
22. Kalithraka S., Mohdary A.A., Makris P.D., Kefalas P.: Determination of major anthocyanin pigment in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *J. of Food Comp and Anal.*,2005, 18:375-386
23. Ryan J.M., Revilla E. :Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stage of ripening. *J. Agric. Food Chem.*2003, 51:3372-3378

24. Wang H., Race J.E., Shrikhande A.J.: Anthocyanin transformation in Gabernet Sauvignon wine during aging. . *Agric. Food Chem.* 2003, 51:7989-7994
25. Perez-Magarino S., Gonzales-San Jose M.L.: Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Agric. Food Chem.* 2004, 52:1181-1189
26. Vitrac X., Monti J.P., Vercauteren J., Deffieux G., Merillon J.M. Q Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavononols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta.* 2002, 103-110
27. Gambeli L., Santorini G.P. : Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *J. of Food Comp. and Anal.* 2004, 17:613-618
28. Campanella L., Bonanni A., Finotti E., Tomassetti M. : Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosensors and Bioelectronics.* 2004, 19:641-651
29. Arnous A., Makris P. D., Kefalas P.: Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. . *of Food Comp. and Anal.* 2002, 15:655-665
30. Χίου Α.Π. Σημειώσεις φροντιστηρίου Φυτικοχημείας και Βιοχημείας τροφίμων. *Χαροκοπείο Πανεπιστήμιο*, Αθήνα 2003.
31. Soleas G.J., Grass L., Joseph D.P, Goldberg D.M., Adamantidis E.P. : A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry* 2002, 35:119-124
32. Karatzi K., Papamichail C., Aznaouridis K., Karatzis E., Lekakis J., Matsouka C., Boskou G., Chiou A., Sitara M., Feliou G., Kontogiannis D., Zampelas A., Mavrikakis M. : Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Pathophysiology and Natural history*, 2004, 15:485-490
33. Cordova A.C., Jackson M., Berke-Schlessel D.W., Sumpio B.E.,: The cardiovascular protective effect of red wine. *J Am Coll Surg*, 2005, 200(3):428-438

34. Wheeler M.L. : Nutrient database for the 2003 exchange list for meal planning. *Journal of the American Dietetic Association*. 2003, 103(7):894-920
35. Παναγιτιάλειος Ένωση Συνεταιρισμών. Προδιαγραφές κορινθιακής σταφίδας. Αίγιο 2004
36. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218–20.
37. Uenobe F, Nakamura S-I, Miyazawa M.: Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat Res* 1997;373:197–200.
38. Ider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raoul F.: Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes, and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2000;158:85–91.
39. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E.: Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* 2000;37:223–33.
40. Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E.: Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2000;78:429–41.
41. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z.: Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 1999;20:237–42.
42. Chopra M., Fitzsimons P., Strain J.J., Thrunham D.I., Howard A.N. : Non alcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamins and carotenoid concentrations. *Clin Chem* 200;46:1162-70
43. Boskou G., Salta F.n., Chrisostomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N.K. Q Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* Article in Press