



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2007

Ο πίνακας στο εξώφυλλο είναι έργο του Vincent van Gogh

Νεκρή Φύση με Μήλα, Αχλάδια, Λεμόνια και Σταφύλια (1887)

Λάδι σε μουσαμά (46,5 x 55,2 cm)

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Γενικό Τμήμα – Εργαστήριο Χημείας

Μαρία Ι. Αναστασιάδη

Χημικός

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Σ. Χαρουτουιάν (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Μέλη: Γ. Ι. Νυχάς (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Σ. Μητάκου (Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Πολυσίου(Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Γ.-Ι. Νυχάς (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Σ. Χαρουτουιάν (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Α.-Λ. Σκαλτσούνης (Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)
Κ. Γεωργίου(Αναπλ. Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Σ. Μητάκου (Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)
Π. Μαγιάτης (Λέκτορας Ε.Κ.Π.Α)

ΑΘΗΝΑ 2007

“Η έγκριση της διδακτορικής διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του εργαστηρίου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

Θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς την επταμελή επιτροπή που δέχθηκε να κρίνει τη διατριβή μου:

Καθηγητή Μ. Πολυσίου

Καθηγητή Γ.-Ι. Νυχά

Καθηγητή Σ. Χαρουτουνιάν (επιβλέπων)

Καθηγητή Α.-Λ. Σκαλτσούνη

Αν. Καθηγητή Κ. Γεωργίου

Αν. Καθηγήτρια Σ. Μητάκου

Λέκτορα Π. Μαγιάτη

Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουνιάν, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την συνεχή παρακολούθηση, την έμπρακτη υποστήριξη και καθοδήγηση του και την αμεσότητα στην επικοινωνία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη για την αρμονική συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, παρέχοντας μου την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Ε.Κ.Π.Α.

Το Δόκτορα Δημήτριο Κλέτσα, επικεφαλής του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για την φιλοξενία και την εμπιστοσύνη του και για τη δημιουργία ευχάριστου και ζεστού κλίματος εργασίας.

Το Δόκτορα Χαράλαμπο Πρατσίνη, ερευνητή του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος για τη βοήθεια που μου προσέφερε, τη συνεχή καθοδήγηση του, την αμέριστη συμπαράσταση, τη γενναιοδωρία και τη φιλία του.

Τον Καθηγητή του Παν/μίου Πατρών Αντώνιο Τσαρμπόπουλο και το Δόκτορα Βαγγέλη Γκίκα για τη λήψη των φασμάτων LC- MS.

Τον Καθηγητή του ΓΠΑ Γεώργιο Ιωάννη Νυχά, για την πραγματοποίηση των αντιμικροβιακών τεστ στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων και Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ.

Τον υποψήφιο Διδάκτορα του ΓΠΑ Νικόλαο Χωριανόπουλο για τη βοήθεια του στην πραγματοποίηση των αντιμικροβιακών τεστ και τη φιλία του.

Τον Αν. Καθηγητή του ΓΠΑ Κων/νο Γεωργίου για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές του.

Τη Δόκτορα του ΓΠΑ Σοφία Κουλοχέρη για την άψογη συνεργασία μας και τη φιλική της διάθεση.

Τη Δόκτορα του ΕΚΠΑ Μαρία Χαλαμπαλάκη για τη συνεργασία και τη βοήθεια της στη χρήση και εκμάθηση του συστήματος HPLC.

Τον Οινολόγο της Ένωσης Θηραϊκών Προϊόντων κ. Κανελλακόπουλο για την άψογη συνεργασία μας σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, δίχως την οποία δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Το Δόκτορα του ΓΠΑ Κων/νο Κασιώτη και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Χαράλαμπο Κανάκη για το πνεύμα καλής συνεργασίας και συναδελφικότητας που επέδειξαν και για τη φιλική και ευχάριστη ατμόσφαιρα που δημιούργησαν.

Τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας Δόκτορα Γεώργιο Καζαντζόγλου, την υποψήφια Διδάκτορα Άννα Παληογιάννη, τον Δόκτορα Raphael Grougnet και την υποψήφια Διδάκτορα Μαρίνα Κριτσανίδα για τη συνεργασία τους, το ευχάριστο κλίμα εργασίας και τη φιλική διάθεση που επέδειξαν.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για την ενθάρρυνση, την καθοδήγηση και την ηθική και υλική υποστήριξη που μου προσέφεραν από την αρχή των σπουδών μου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 227 (2001) χρηματοδοτούμενο από τη ΓΓΕΤ και την ΚΕΟΣΟΕ.

SUMMARY

The beneficial health effects of grape berries (*Vitis vinifera* L.) are well established through various epidemiological, clinical and *in vitro* studies. These activities have been attributed to the presence of polyphenols, a class of widespread metabolites. Objective of this study was the assay of polyphenolic content in different grape parts and products of the Greek grapevine production. For this purpose an optimized ultrasound extraction procedure was developed using liquid solvents. Interest of our research was focused on the following issues:

- 1) Qualitative and quantitative determination of the polyphenolic profile of the most important Greek grape varieties.
- 2) Determination of grape skin and seeds polyphenolic content.
- 3) Qualitative and quantitative determination of the polyphenolic profile of varietal Greek wines.
- 4) Qualitative and quantitative determination of the polyphenolic content of vinification by-products.
- 5) Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from grape berries and vinification by-products.
- 6) Evaluation of the antioxidant activity of Greek wines and extracts from grape parts and vinification by-products.

The polyphenolic composition of each extract was characterized by HPLC-DAD. Reference compounds were used for the quantification of the major polyphenolic substances. The total polyphenolic content (TPC) was determined photometrically using the Folin-Ciocalteu method.

The antimicrobial activity of selected extracts was evaluated using a) plate counts and b) conductance measurements.

All samples were evaluated for their free radical scavenging abilities against the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), for “ferric reducing antioxidant power” (FRAP), for their ability to inhibit CuSO₄- induced LDL oxidation and total

polyphenolic content (TPC). All of the above methods were modified to be used in 96-well plates.

Furthermore other aspects which were examined were the following:

- ♦ Correlation of grape variety with the polyphenolic content of grape berries.
- ♦ Seasonal variation of grape berries, skins and seeds polyphenolic content.
- ♦ Yearly variation of grape berries, skins and seeds polyphenolic content.
- ♦ Correlation of geographical place of a certain grape variety with the polyphenolic content.
- ♦ Qualitative and quantitative determination of wall-bound phenolic acids.
- ♦ Differences between white and red wines concerning their polyphenolic profile.
- ♦ Influence of fining procedures in the polyphenolic content of red and white table wines.
- ♦ Study of the polyphenolic content of sweet wines.
- ♦ Correlation of antioxidant activity with the polyphenolic content of wines and extracts.
- ♦ Correlation between different antioxidant methods.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Άμπελος η οиноφόρος (<i>Vitis Vinifera</i> L.)	1
1.1.1 Συστηματική κατάταξη	1
1.2 Μορφολογία του φυτού <i>V. Vinifera</i> . L.....	2
1.2.1 Ριζικό σύστημα.....	2
1.2.2 Φύλλα.....	3
1.2.3 Κλάδεμα.....	3
1.2.4 Άνθη.....	3
1.2.5 Καρποί	4
1.2.6 Εδαφικές και κλιματικές συνθήκες	5
1.2.7 Ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών	7
1.2.8 Χημική σύσταση σταφυλιών και οίνων.....	8
1.2.9 Ράγες.....	9
1.2.10 Χημική σύσταση Οίνου	10
1.3 Ιστορία και διάδοση της αμπελουργίας και της οινοποίησης.....	13
1.4 Οίνος.....	13
1.5 Ο Οίνος ως φάρμακο	20
1.6 Σύγχρονη Γνώση	23
1.7 Βιοσύνθεση φαινολικών φυτοχημικών.....	23
1.7.1 Οδός Σικιμικού οξέος	25
1.7.2 Οδός φαινυλαλανίνης /υδροξυκινναμωμικού οξέος.....	30
1.7.3 Βιοσύνθεση Φαινυλοπροπανίων	30
1.7.4 Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών	34
1.7.5 Βιοσύνθεση Στιλβενίων	38
1.7.6 Τανίνες.....	40
1.7.6.1 Διμερείς προανθοκυανιδίνες	41
1.7.6.2 Ανώτερα μέλη των προανθοκυανιδινών.....	42
1.7.7 Βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών οξέων.....	42
1.8 Βιολογική δράση πολυφαινολών–Αντιοξειδωτική δράση.....	44
1.8.1 Εισαγωγή.....	44
1.8.2 Αντιαθηρωματική δράση	44
1.8.3 Αντιμικροβιακή δράση	45
1.8.4 Αντική δράση	46
1.8.5 Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών	47
1.8.5.1 Επιδημιολογικές μελέτες.....	47
1.8.5.2 Αντικαρκινική δράση κυριότερων πολυφαινολών στον οίνο	48
1.8.6 Αντιαγγειογενετική δράση	50
1.8.7 Οιστρογονική δράση.....	50
1.8.8 Πιθανές ανεπιθύμητες δράσεις των πολυφαινολών	51
1.8.8.1 Προοξειδωτική Δράση.....	51
1.9 Σχέση δομής –αντιοξειδωτικής ικανότητας	52
1.9.1.1 Φλαβονοειδή	53
1.9.1.2 Φαινολικά οξέα	54
1.10 Βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολισμός των πολυφαινολών.....	55
1.11 Επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων	57
Βιβλιογραφία Ιου κεφαλαίου	58

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	75
2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	75
2.1.1 Εισαγωγή.....	75
2.1.2 Τύποι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης	76
2.1.2.1 Υγρή-υγρή χρωματογραφία κατανομής στήλης.....	76
2.1.2.2 Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης	78
2.1.2.3 Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RP HPLC).....	78
2.1.3 Οργανολογία HPLC.....	80
2.1.3.1 Ανιχνευτής UV-Vis	81
2.1.4 Κριτήρια επιλογής κινητής φάσης.....	82
2.1.4.1 Επίδραση του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό.....	83
2.2 Πειραματική Διαδικασία.....	85
2.2.1 Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC για προσδιορισμό Πολυφαινολών	85
2.2.1.1 Εισαγωγή.....	85
2.2.1.2 Εξοπλισμός.....	86
2.2.1.3 Αναλώσιμα	86
2.2.2 Προετοιμασία Διαλυμάτων	87
2.2.2.1 Παρασκευή κινητής φάσης	87
2.2.2.2 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολικών ουσιών	87
2.2.2.3 Συνθήκες ανάλυσης	88
2.2.4 Προσδιορισμός Φαινολικών ουσιών με HPLC.....	92
2.3 Φασματομετρία Μαζών	97
2.3.1 Εισαγωγή.....	97
2.3.2 Οργανολογία MS.....	98
2.3.3 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο 18.....	98
2.3.4 Ανάπτυξη Μεθόδου LC-MS Ταυτοποίηση Πολυφαινολών	99
2.3.4.1 Εξοπλισμός.....	99
2.3.4.2 Παρασκευή Κινητής Φάσης.....	100
2.3.4.3 Συνθήκες ανάλυσης	100
2.3.4.4 Προετοιμασία διαλύματος παρακαταθήκης.....	101
2.3.5 Προσδιορισμός Φαινολικών ουσιών	102
2.4 Τεχνικές Μέτρησης Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	104
2.4.1 Εισαγωγή.....	104
2.4.2 In vitro Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος	105
2.4.3 Πειραματική Διαδικασία:.....	107
2.4.3.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	107
2.4.3.2 Πειραματική διαδικασία:	107
2.4.4 In vitro Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος FRAP	109
2.4.5 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:	111
2.4.5.1 Πειραματική διαδικασία:	112
2.4.6 Μέθοδος Ολικών Φαινολικών –Folin Ciocalteu.....	114
2.4.7 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:	116
2.4.7.1 Πειραματική διαδικασία:	116
2.4.8 In vitro Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος οξείδωσης LDL.....	117
2.4.9 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:	118
2.4.9.1 Πειραματική Διαδικασία.....	119
2.4.10 Μέθοδος ενδοκυτταρικών ROS	120
2.4.11 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:	121
2.4.12 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας.....	123
2.4.13 Μελέτη Αντιβακτηριακής Δράσης	124
2.4.13.1 Μέθοδος Αγωγιμότητας.....	124

2.4.13.2	Μέθοδος Τρυβλίων.....	125
2.4.13.3	Ανάλυση Δεδομένων.....	125
2.4.13.4	Υπολογισμός της ΕΑΣ.....	125
2.4.14	Πειραματική Διαδικασία.....	127
2.4.14.1	Μικροοργανισμός.....	127
2.4.14.2	Προετοιμασία κυψελίδων αντίδρασης.....	127
2.4.14.3	Προετοιμασία εκχυλισμάτων.....	127
2.5	Βιβλιογραφία 2ου Κεφαλαίου.....	129
3.ΟΙΝΟΣ	134
3.1	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	134
3.1.1	Εισαγωγή.....	134
3.1.2	Αποβοστρύχωση.....	135
3.1.3	Σύνθλιψη.....	135
3.1.4	Προσθήκη διοξειδίου του θείου.....	135
3.1.5	Εκχύλιση.....	135
3.1.6	Πίεση.....	137
3.1.7	Απολάσπωση.....	137
3.1.8	Ζύμωση.....	137
3.1.9	Μετάγγιση.....	138
3.1.10	Ωρίμανση - παλαίωση.....	138
3.1.11	Διαύγαση.....	139
3.1.12	Εμφιάλωση.....	139
3.2	Πολυφαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών και των οίνων.....	140
3.2.1	Εισαγωγή.....	140
3.2.2	Μη φλαβονοειδή:.....	141
3.2.2.1	Υδροξυβενζοϊκά οξέα.....	142
3.2.2.2	Υδροξυκιναμωμικά οξέα.....	142
3.2.2.3	Στιλβένια.....	143
3.2.3	Φλαβονοειδή.....	143
3.2.3.1	Φλαβονόλες.....	143
3.2.3.2	Ανθοκυανίνες.....	144
3.2.3.3	Φλαβανόλες.....	145
3.2.4	Προανθοκυανιδίνες.....	146
3.2.5	Χημικές αντιδράσεις πολυφαινολών κατά την οινοποίηση.....	147
3.3	Βιολογικές ιδιότητες Οίνου.....	148
3.3.1	Εισαγωγή.....	148
3.3.2	Οίνος - Επιδημιολογικές Μελέτες.....	149
3.3.2.1	Σύγκριση του οίνου με άλλα αλκοολούχα ποτά.....	150
3.3.3	Αντιαθηρωματική Δράση.....	151
3.3.4	Αντιμικροβιακή Δράση.....	155
3.3.5	Αντικαρκινική Δράση.....	157
3.3.6	Αντιοξειδωτική Δράση.....	159
3.4	Πειραματική Διαδικασία.....	162
3.4.1	Πειραματικός σχεδιασμός.....	162
3.4.2	Συλλογή Δειγμάτων.....	162
3.4.2.1	Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων.....	162
3.4.3	Ανάλυση των οίνων με απευθείας εισαγωγή στο HPLC.....	164
3.5	Αποτελέσματα- Συμπεράσματα.....	167
3.5.1	Κύρια πολυφαινολικά συστατικά των οίνων.....	167
3.5.2	Ανάλυση οίνου με LC/MS.....	170

3.5.2.1	Προετοιμασία Δείγματος	170
3.5.3	Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο	172
3.5.4	Μεταβολή πολυφαινολών κατά τη διάγνωση.....	173
3.5.5	Σύγκριση οίνων διαφορετικών ποικιλιών της ίδιας περιοχής.....	177
3.5.6	Ετήσια μεταβολή πολυφαινολών οίνων της ίδιας ποικιλίας.....	179
3.5.7	Σύγκριση οίνων από διαφορετικές περιοχές.	182
3.5.8	Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου γλυκών οίνων.....	185
3.5.9	Μεταβολή πολυφαινολών κατά την παλαίωση στη φιάλη	189
3.6	Ανάλυση οίνων μετά από κατεργασία με ρητίνες.....	192
3.6.1	Συζήτηση.....	193
3.7	Βιβλιογραφία 3ου κεφαλαίου.....	196
4.	ΣΤΑΦΥΛΙΑ (Vitis Vinifera L.).....	208
4.1	Ποικιλίες που μελετήθηκαν	208
4.1.1	Λευκές ποικιλίες.....	208
4.1.2	Ερυθρές Ποικιλίες	210
4.2	Βιολογική δράση των σταφυλιών.....	213
4.2.1	Εισαγωγή.....	213
4.2.2	Αντιαθροματική δράση	213
4.2.3	Αντιβακτηριακή δράση.....	214
4.2.4	Αντικαρκινική δράση.....	215
4.2.5	Αντική δράση	216
4.2.6	Αντιοξειδωτική Δράση	217
4.3	Διαδικασία Παραλαβής Πολυφαινολών από Φυτά	221
4.3.1	Εισαγωγή.....	221
4.3.2	Εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών	222
4.3.2.1	Εκχύλιση με υπερήχους	223
4.3.3	Τεχνικές διαχωρισμού και απομόνωσης πολυφαινολών	223
4.3.3.1	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)	223
4.3.3.2	Εκχύλιση υγρής-στερεάς φάσης.....	224
4.3.4	Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμων υγρών (SFE)	224
4.4	Πειραματική Διαδικασία.....	225
4.4.1	Συλλογή Δειγμάτων.....	225
4.4.1.1	Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων	226
4.4.2	Εκχύλιση ραγών:	227
4.4.3	Εκχύλιση γιγάρτων-φλοιών	228
4.4.4	Έλεγχος ανάκτησης πολυφαινολών	232
4.4.5	Υδρόλυση εστέρων των φαινολικών οξέων.....	233
4.5	Μέθοδοι Εκχύλισης	235
4.5.1	Βελτιστοποίηση μεθόδων υγρής-υγρής εκχύλισης	235
4.5.1.1	Συμπεράσματα.....	237
4.5.2	Δοκιμές Εκχυλίσεων με χρήση Ρητινών και SPE.	238
4.5.2.1	Συμπεράσματα.....	240
4.6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	240
4.6.1	ΡΑΓΕΣ	240
4.6.2	Συζήτηση.....	241
4.6.2.1	Κυριότερες πολυφαινόλες ραγών	241
4.6.2.2	Διαφορές ανά περιοχή.....	244
4.6.2.3	Εποχική Διακύμανση.....	245
4.6.2.4	Ετήσια διακύμανση	249
4.6.3	ΓΙΓΑΡΤΑ-ΦΛΟΙΟΙ	251

4.6.3.1	Αποτελέσματα	251
4.6.3.2	Κυριότερες πολυφαινόλες γιγάρτων.....	251
4.6.3.3	Κυριότερες πολυφαινόλες φλοιών.....	252
4.6.3.4	Σύγκριση περιεχομένου ραγών-φλοιών και γιγάρτων.....	253
4.6.3.5	Εποχιακή Διακύμανση γιγάρτων.....	255
4.6.3.6	Ετήσια διακύμανση γιγάρτων	259
4.6.3.7	Εποχική Διακύμανση φλοιών.....	260
4.6.4	Φαινολικά οξέα από υδρόλυση εστέρων	263
4.7	Βιβλιογραφία 4ου κεφαλαίου.....	264
5.	ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	272
5.1.1	Εισαγωγή	272
5.1.2	Ανάλυση Υποπροϊόντων Οινοποίησης.....	274
5.2	Αποτελέσματα.....	278
5.2.1	Στέμφυλα	278
5.2.2	Οινολάσπες	282
5.2.3	Βόστρυχοι	283
5.3	Βιβλιογραφία 5ου Κεφαλαίου	290
6.	ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΙΝΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	291
6.1	Αντιβακτηριακή δράση.....	291
6.1.1	Εισαγωγή.....	291
6.1.2	Αποτελέσματα	292
6.1.2.1	Υπολογισμός ΕΑΣ.....	295
6.2	Αντιοξειδωτική Δράση	296
6.2.1	Εισαγωγή.....	296
6.3	Αποτελέσματα	298
6.4	Οίνοι.....	298
6.4.1.1	Αντιοξειδωτική δράση λευκών - ερυθρών οίνων.....	298
6.4.1.2	Μεταβολή φαινολικού περιεχομένου κατά τη διαύγαση.....	299
6.4.1.3	Σύγκριση οίνων διαφορετικών ποικιλιών, ίδιας περιοχής.....	301
6.4.1.4	Ετήσια διακύμανση αντιοξειδωτικής ικανότητας οίνων	302
6.4.1.5	Σύγκριση μεθόδων Folin-Ciocalteu και Frap.....	305
6.4.1.6	Συσχέτιση αποτελ. μεθόδων Folin-Ciocalteu και DPPH.....	306
6.5	Εκχυλίσματα.....	308
6.5.1	Ράγες	308
6.5.1.1	Εποχική μεταβολή αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων	309
6.5.2	Γίγαρτα.....	309
6.5.3	Φλοιοί	310
6.5.4	Υποπροϊόντα	314
6.5.4.1	Αντιοξειδωτική Ικανότητα Προτύπων Ενώσεων	315
6.5.5	Αποτελέσματα μεθόδων LDL και Ενδοκυτταρικών ROS.....	318
6.5.5.1	Αποτελέσματα μεθόδου LDL.....	319
6.5.5.2	Συσχέτιση μεθόδων LDL και DPPH	320
6.5.5.3	Συσχέτιση μεθόδων LDL και Folin-Ciocalteu	320
6.5.5.4	Αποτελέσματα μεθόδου ενδοκυτταρικών ROS	321
6.5.5.5	Σύγκριση μεθόδου ROS με τις μεθόδους LDL και DPPH	322
6.6	Βιβλιογραφία 6ου Κεφαλαίου.....	326

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Άμπελος η οиноφόρος (*Vitis Vinifera* L.)

1.1.1 Συστηματική κατάταξη

Η Άμπελος η οиноφόρος (*Vitis Vinifera* L.), ανήκει στο γένος *Vitis* και αποτελεί ένα από τα έντεκα γένη της οικογένειας *Vitaceae*, η οποία μαζί με τις οικογένειες *Leeaceae* και *Rhamnaceae* συνιστούν την τάξη των *Rhamnales*¹.

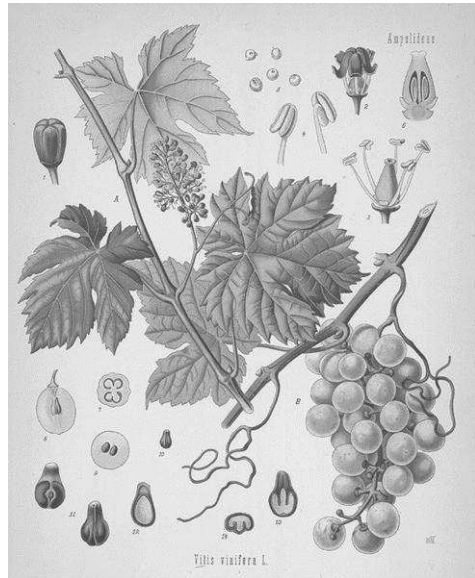
Στο γένος *Vitis* υπάγονται τα παρακάτω δύο υπογένη:

1) *Euvinis* (το κοινό σταφύλι), με κύριο εκπρόσωπο το είδος *Vitis Vinifera* και διάφορα ασιατικά ή αμερικανικά είδη, με χαρακτηριστικότερα τα *V. Berlandieri*, *V. Riparia* και *V. Rupestris*.

2) *Muscadinia*, που περιλαμβάνει κυρίως είδη της Β. Αμερικής και έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τους την αντοχή στις προσβολές της φυλλοξήρας, των νηματωδών και στον ιό του μολυσματικού εκφυλισμού³.

Ειδικότερα, στο γένος *Vitis* περιλαμβάνονται περισσότερα από 60 αναγνωρισμένα είδη που συναντώνται κατά κύριο λόγο στην εύκρατη ζώνη του Βορείου Ημισφαιρίου. Πρέπει δε να σημειωθεί ότι η παγκόσμια παραγωγή οίνου στηρίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο είδος αυτό (*V. Vinifera* L., Εικόνα 1.1) το οποίο ορίζεται γενικά ως το Ευρωπαϊκό σταφύλι και αποτελεί γηγενές είδος περιοχών όπως η Μικρά Ασία, η Μαύρη και η Κασπία θάλασσα. Το είδος *V. Vinifera* διακρίνεται περαιτέρω στα υποείδη *V. Vinifera silvestris* (άγριο αμπέλι) και *V. Vinifera sativa* (όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες). Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι το δεύτερο υποείδος αποτελεί μετεξέλιξη του πρώτου.

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη του είδους *V. Vinifera*.



Εικόνα 1.1 Μέρη του φυτού *Vitis Vinifera*²

Πίνακας 1.1 Συστηματική κατάταξη του φυτού *V. Vinifera*. L².

Βασίλειο (Kingdom):	<i>Plantae</i>
Φύλο (Division):	<i>Magnoliophyta</i>
Κλάση (Class):	<i>Magnoliopsida</i>
Τάξη (Order):	<i>Vitales</i>
Οικογένεια (Family):	<i>Vitaceae</i>
Γένος (Genus):	<i>Vitis</i>
Είδος (Species):	<i>V. Vinifera</i>
Διώνυμο όνομα (Σύμφωνα με το Λινναίο):	<i>Vitis Vinifera</i> L.
Όνομα φυτού σύμφωνα με τον Θεόφραστο:	Άμπελος
Κοινή ονομασία	Αμπέλι

1.2 Μορφολογία του φυτού *V. Vinifera*. L

Η άμπελος είναι φυτό θαμνώδες και αναρριχώμενο, με κορμό και βραχίονες που αποτελούν το κυρίως φυτό και λεπτές–κυλινδρικές διακλαδώσεις (τις κληματίδες) που είναι οι βλαστοί του τελευταίου έτους. Οι κληματίδες διαίρονται κατά το μήκος τους σε κόμβους ή γόνατα, από τα οποία φύονται τα φύλλα, τα μάτια, οι έλικες και οι ταξιανθίες.

1.2.1 Ριζικό σύστημα

Μέσα στη γη –με ανάλογη προς το υπέργειο σύστημα ανάπτυξη– σχηματίζεται και το ριζικό σύστημα του φυτού. Στην περίπτωση πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα ή καταβολάδες, οι ρίζες αναπτύσσονται συνήθως από τους κόμβους και διακλαδίζονται για να σχηματίσουν τελικά πάνω στις διακλαδώσεις τα λεπτότατα απορροφητικά ριζίδια. Τα τελευταία αναπτύσσονται κατά χιλιάδες σε κάθε φυτό κατά τη διάρκεια μιας βλαστικής περιόδου. Το μεγαλύτερο μέρος των ριζών βρίσκεται σε βάθη 30-150 cm, ανάλογα με τη σύσταση του εδάφους και τη γεωτροπική γωνία των κυρίων ριζών. Τα υποκείμενα με μικρή γεωτροπική γωνία είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ξηρασία, αφού οι ρίζες τους αναπτύσσονται σε βαθύτερα στρώματα.

Η ταχύτητα ανάπτυξης του ριζικού συστήματος εξαρτάται αφενός από το είδος του αμπελιού και αφετέρου από τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες. Η πλήρης ανάπτυξή του συνήθως ολοκληρώνεται σε 6–8 χρόνια μετά την εγκατάσταση του αμπελιού³.

1.2.2 Φύλλα

Τα φύλλα –όπως και οι καρποί– εμφανίζονται στους κόμβους των κληματίδων και είναι εναλλασσόμενα έμμισχα και παλαμοσχιδή, είτε τρίλοβα ή πεντάλοβα. Η επιδερμίδα της πάνω επιφάνειάς τους είναι σχετικά λεία και στερείται στοματίων, ενώ η κάτω επιφάνεια είναι συνήθως χνοώδης. Το μεταξύ των δύο επιδερμίδων παρέγχυμα αποτελείται από κύτταρα πλούσια σε χλωροπλάστες με μεγάλες ποσότητες χλωροφύλλης. Είναι όμως χαρακτηριστικό ότι η σχετική αναλογία φύλλων–καρπών διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία⁴.

1.2.3 Κλάδεμα

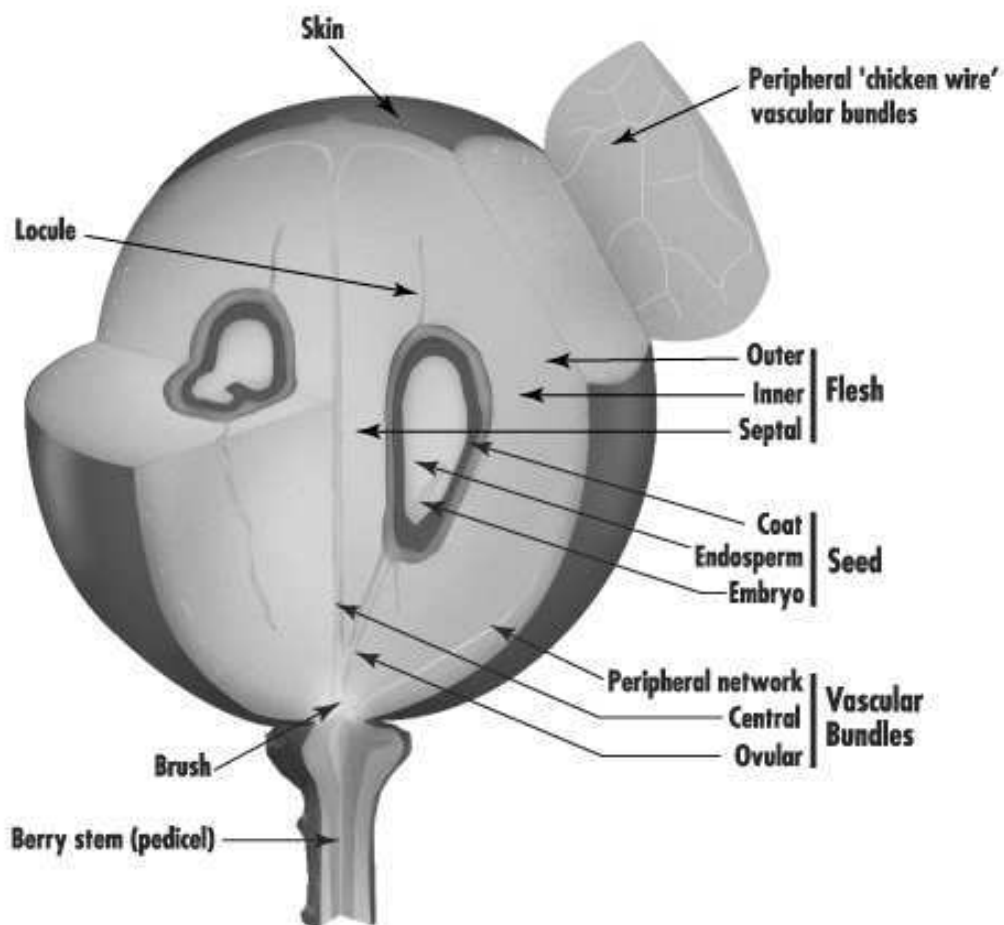
Οι μέθοδοι στήριξης και κλαδέματος καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα και την ποιότητα της παραγόμενης σοδειάς⁵. Τα βασικά συστήματα στήριξης είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να επιτυγχάνεται το καλύτερο δυνατό σχήμα για ένα δεδομένο κλήμα σε συγκεκριμένες κλιματολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα, εάν υπάρχει ο κίνδυνος παγωνιάς τα κλήματα συνήθως στήνονται ψηλά. Αντίθετα, όταν για να ωριμάσουν οι καρποί είναι επιθυμητή η ζέστη που αναδύεται από το χώμα, τα κλήματα τοποθετούνται χαμηλά. Το κλάδεμα βοηθάει στην επίτευξη ισορροπίας μεταξύ απόδοσης της σοδειάς και της ανάπτυξης του αμπελιού.

1.2.4 Άνθη

Τα άνθη είναι συγκεντρωμένα σε βοτριώδεις ταξιανθίες που εμφανίζονται στους κόμβους των καρποφόρων κληματίδων και συγκεκριμένα από τον 3^ο έως τον 6^ο κόμβο. Βρίσκονται δε ακριβώς απέναντι από τα φύλλα όπως και οι έλικες –τα όργανα βοηθούν στη στερέωση των κληματίδων πάνω σε στηρίγματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού.

1.2.5 Καρποί

Τα μικρά πρασινωπά άνθη του αμπελιού είναι συνήθως αρρενοθήλεα γόνιμα. Μετά τη γονιμοποίησή τους σχηματίζονται οι ράγες των σταφυλιών σε διάφορα σχήματα και μεγέθη, κυρίως ανάλογα με την ποικιλία³. Στην Εικόνα 1.2 απεικονίζονται σχηματικά τα μέρη μιας τυπικής ράγας σταφυλιού, δείχνοντας παράλληλα τις πηγές των διαφόρων –σημαντικών για την οινοποίηση– μερών της.



Εικόνα 1.2 Μέρη ράγας κατά το στάδιο της ωρίμανσης⁶.

Η ράγα του σταφυλιού είναι στην πραγματικότητα ένα ανεξάρτητο βιοχημικό εργοστάσιο, αφού εκτός των πρωτογενών μεταβολιτών που είναι αναγκαίοι για την επιβίωση του φυτού (νερό, σάκχαρα, αμινοξέα), έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει ένα πλήθος επιπλέον συστατικών, τα οποία συμβάλουν στη γεύση και το άρωμα του

παραγόμενου οίνου. Στην οινοποίηση σημαντικό ρόλο παίζουν οι παρακάτω ιστοί των ραγών των σταφυλιών: α) σάρκα, β) φλοιός και γ) γίγαρτα. Η σύσταση –σε φυτοχημικά– των παραπάνω ιστών είναι τελείως διαφορετική, με αποτέλεσμα έκαστος να επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό τα χαρακτηριστικά και τη σύσταση του τελικά παραγόμενου προϊόντος (οίνος). Είναι δε χαρακτηριστικό ότι το μέγεθος της ράγας επηρεάζει άμεσα τη σύσταση του οίνου. Έτσι, τα σταφύλια με μικρότερες ράγες δίνουν οίνους με μεγαλύτερη συμμετοχή των συστατικών του φλοιού και των γιγάρτων. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη σύσταση του οίνου είναι ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα. Ως ‘τέλειος’ αριθμός θεωρούνται τα τέσσερα γίγαρτα ανά ράγα, στην πράξη όμως ο αριθμός αυτός κυμαίνεται από 1 έως 4.

1.2.6 Εδαφικές και κλιματικές συνθήκες

Η άμπελος (*Vitis Vinifera* L.), ανήκει στα είδη που ευδοκούν στην εύκρατη ζώνη και δεν μπορεί να αντέξει το δριμύ ψύχος του χειμώνα. Η καλύτερη δυνατή ανάπτυξη του φυτού επιτυγχάνεται σε περιοχές με μακρύ και αρκετά ζεστό καλοκαίρι και δροσερό χειμώνα. Συνεπώς είναι γενικά αποδεκτό ότι οι καλύτερες περιοχές για την αμπελουργία βρίσκονται μεταξύ των γεωγραφικών πλατών 30° και 50° στο Βορρά και 30° και 20° στο Νότο. Αυτά, εμπίπτουν στις ισόθερμες των 10° C και 20° C που αντιστοιχούν με τις θερμές εύκρατες ζώνες⁷. (Εικόνα 1.3).

Η ανάπτυξη της αμπελουργίας σε περιοχές κοντά στον ισημερινό –επαρχίες της Βολιβίας και της Τανζανίας– οφείλεται κυρίως στο μεγάλο υψόμετρο που συνεπάγεται περισσότερο δροσερό κλίμα, ενώ η αμπελοκαλλιέργεια σε τροπικές περιοχές οδηγεί στην ανάπτυξη αιθαλών αμπέλων –χωρίς λανθάνουσα περίοδο– με πολύ μικρές σοδειές και χαμηλή ποιότητα σταφυλιών⁴.

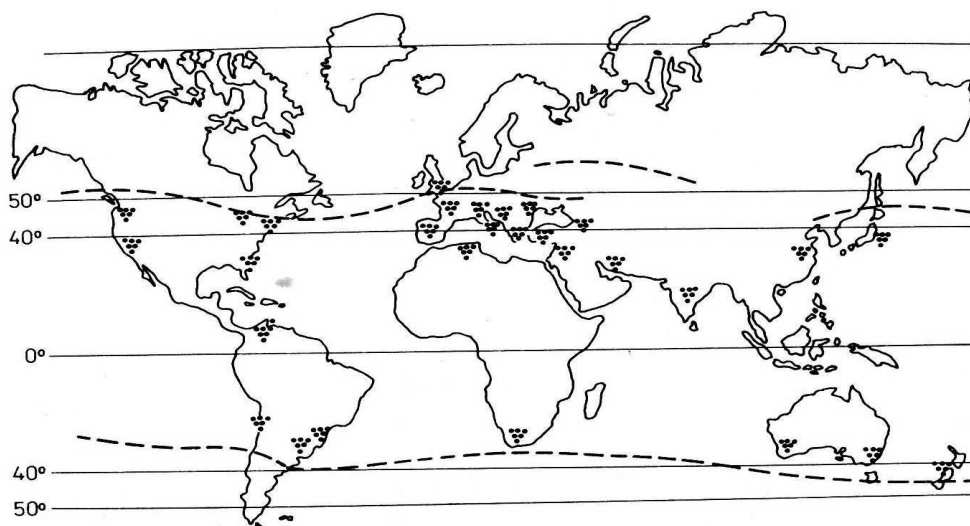
Όμως η αμπελοκαλλιέργεια κυρίως ανθεί σε Μεσογειακά κλίματα, που χαρακτηρίζονται από ζεστά ξηρά καλοκαίρια και ήπιους υγρούς χειμώνες. Άλλωστε, η λεκάνη της Μεσογείου αποτελεί μια από τις κυριότερες σταφυλοπαραγωγικές περιοχές στον κόσμο. Παρόμοια κλίματα βρίσκονται στα παράλια της Ν. Αφρικής, τη Ν. Αυστραλία, την Καλιφόρνια και τη Χιλή.

Όσον αφορά την Ελλάδα, η συνολική έκταση των αμπελοκαλλιεργειών προσεγγίζει τα 190.000 εκτάρια (1 εκτάριο = 10 στρέμματα) παράγοντας περίπου έξι εκατομμύρια εκατόλιτρα οίνου. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται η ανά

περιφέρεια έκταση, παραγωγή και τα καλλιεργούμενα υποείδη αμπέλου που αντιστοιχούν στις περιφέρειες της ελληνικής επικράτειας.

Πίνακας 1.2 Στατιστικά στοιχεία της καλλιέργειας αμπέλου και της οινοποιητικής παραγωγής στην Ελλάδα ⁹.

Περιφέρεια	Αμπελουργική Έκταση Σε Εκτάρια (ha)	Παραγωγή Οίνων Σε Εκατόλιτρα (hL)	Κύριες Καλλιεργούμενες Ποικιλίες
Πελοπόννησος	60.419	1.525.590	Αγιωργίτικο, Κορινθιακή (σταφίδα), Μοσχάτο λευκό, Μοσχοφίλερο, Ρεφόσκο, Ροδίτης, Σουλτανίνα (σταφίδα)
Κρήτη	50.581	959.480	Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Λιάτικο, Μαντηλαριά, Ρωμέϊκο
Στερεά Ελλάδα & Εύβοια	28.849	1.988.790	Σαββατιανό
Μακεδονία & Θράκη	15.500	514.760	Ασύρτικο, Αθήρι, Ροδίτης, Λημινό, Ξινόμαυρο, Νεγκόσκα, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc
Θεσσαλία	8.696	423.910	Κρασάτο, Μαύρο Μεσενικόλα, Μοσχάτο Αμβούργου, Μπατίκι, Ξινόμαυρο, Σταρωτό
Νησιά Ιονίου Πελάγους	8.716	215.840	Βερτζαμί, Μαυροδάφνη, Μοσχάτο λευκό, Ρομπόλλα
Νησιά Αιγαίου Πελάγους	9.131	151.300	Αϊδάνι, Ασύρτικο, Λιμιό, Μαντηλαριά, Μονεμβασία, Μοσχάτο Αλεξανδρείας
Δωδεκάνησα	3.438	128.850	Αθήρι, Μαντηλαριά, Μοσχάτο λευκό
Ήπειρος	1.022	30.620	Ντεμπίνα, Cabernet Sauvignon
Σύνολο Ελλάδος	186.352	5.939.140	

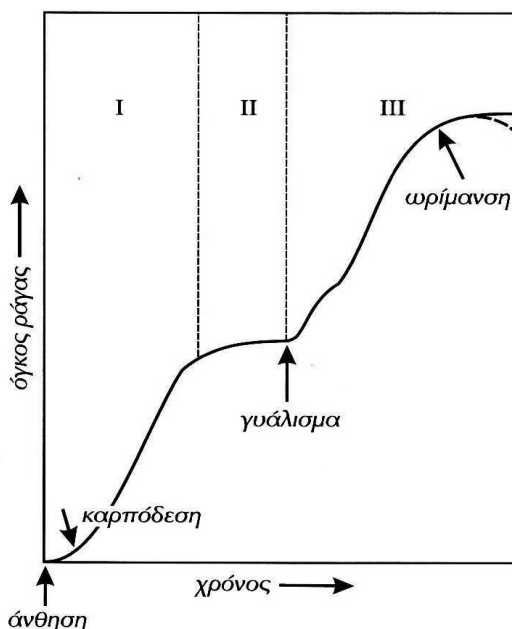


Εικόνα 1.3 Περιοχές της εύκρατης ζώνης όπου έχει εξαπλωθεί η αμπελοκαλλιέργεια.⁸

1.2.7 Ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών

Η άμπελος έχει ένα ιδιαίτερα ξεχωριστό ετήσιο κύκλο, παραμένοντας σε λανθάνουσα κατάσταση έως ότου η μέση ημερήσια θερμοκρασία ξεπεράσει τους 10 °C. Την άνοιξη, με την αύξηση της θερμοκρασίας οι βλαστοί μεγαλώνουν με ταχείς ρυθμούς, σε ένα διάστημα περίπου οκτώ εβδομάδων. Στο τέλος της φάσης αυτής επέρχεται η άνθηση, όταν πλέον η μέση τιμή της θερμοκρασίας προσεγγίσει τους 20 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί η γονιμοποίηση, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν με ταχύ ρυθμό οι καρποί (καρπόδεση) ενώ ακολουθεί το στάδιο της ωρίμανσης (γυάλισμα). Τέλος, επιταχύνεται και πάλι η ανάπτυξη του καρπού με αποτέλεσμα να αυξηθούν τα επίπεδα των σακχάρων και να μειωθεί η οξύτητα, ενώ διαμορφώνεται και το χρώμα των ερυθρών ποικιλιών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η περίοδος ωρίμανσης των σταφυλιών εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία του αμπελιού και τον αριθμό των ημερών κατά την εποχή της ανάπτυξης που η μέση θερμοκρασία ξεπερνά τους 10 °C.⁴ Κατά τη διάρκεια του χειμώνα το κλίμα παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση και προστατεύεται από την παγωνιά με τα συσσωρευμένα σάκχαρα που υπάρχουν στο φυτό. Το κλίμα όταν βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση μπορεί να αντέξει μέχρι και -18 °C για σύντομα διαστήματα, όμως την άνοιξη είναι πολύ πιο ευάλωτο και θερμοκρασίες των -2 °C μπορούν να νεκρώσουν τα νέα φύλλα και να βλάψουν τα άνθη. Όμως είναι γενικά αποδεκτό ότι τα σταφύλια ωριμάζουν κατά

μέσο όρο και είναι έτοιμα για συγκομιδή, περίπου εκατό ημέρες μετά την ανθοφορία τους, αν και σε μεγάλο βαθμό το διάστημα αυτό καθορίζεται από την αναλογία σακχάρων και οξύτητας που χρειάζεται ένας συγκεκριμένος οίνος. Στο Διάγραμμα 1.1 απεικονίζονται τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του σταφυλιού.



Διάγραμμα 1.1 Στάδια ανάπτυξης των σταφυλιών από την καρπόδεση μέχρι την ωρίμανση ³.

Όταν πλέον τα σταφύλια έχουν ωριμάσει, το βάρος των φρέσκων ραγών κατανέμεται στους επιμέρους ιστούς τους ως εξής: **σάρκα 74,88%**, **φλοιός 13,8%**, **γίγαρτα 13,4%** (1).

1.2.8 Χημική σύσταση σταφυλιών και οίνων

Η επιστημονική γνώση για τη χημική σύσταση των σταφυλιών και του οίνου έχει προχωρήσει θεαματικά τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που οφείλεται στην μεγάλη ανάπτυξη ποικίλων αναλυτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως η Υγρή και Αέρια χρωματογραφία (HPLC, GC), η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR), καθώς και ο συνδυασμός ορισμένων από αυτές με τη φασματομετρία μαζών (MS), όπως η Υγρή χρωματογραφία (HPLC-MS) και η Αέρια χρωματογραφία (GC-MS). ¹⁰

1.2.9 Ράγες

Η χημική σύσταση των ραγών στο στάδιο της ωρίμανσης και κατ'έπекταση της οινοποίησης είναι αυτή που κατά κύριο λόγο καθορίζει την ποιότητα του παραγόμενου οίνου, με αποτέλεσμα να ενδιαφέρει άμεσα την επιστήμη της οιнологίας. Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζεται η τυπική χημική σύσταση των ραγών (κατά το στάδιο στις συγκομιδής) και του αντίστοιχου μούστου.

Πίνακας 1.3 Χημική σύσταση ως % ποσοστό επί του βάρους των ραγών και του μούστου. ¹

Συστατικά	Ράγες	Μούστος
Νερό	74	76
Ανόργανα άλατα	0,5	0,4
Υδατάνθρακες	24	23
Αλκοόλες	0	0
Οξέα	0,6	0,7
Φαινολικά συστατικά	0,2	0,01
Νιτρικές ουσίες	0,2	0,1
Λιπίδια	0,2	0,01
Τερπενοειδή	0,02	0,01
Άλλες πτητικές ουσίες	0,01	0,01
Διάφορες άλλες ουσίες π.χ. βιταμίνες	0,1	0,01
Σύνολο	100	100

Όσον αφορά την κατανομή των παραπάνω ουσιών στα διάφορα μέρη του σταφυλιού (κατά τη φάση της ωρίμανσης) είναι ως κατωτέρω:

α) Σάρκα αποτελείται κατά 70-80% από νερό, σάκχαρα, οξέα και πηκτίνες. Τα κυριότερα από τα σάκχαρα που εμπεριέχονται είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν το υπόστρωμα για την παραγωγή της αιθανόλης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Τέλος, συμμετέχουν κατά κάποιο βαθμό και στο άρωμα του τελικού προϊόντος. Στο στάδιο της ωρίμανσης, το περιεχόμενο σε σάκχαρα των ραγών της *V. Vinifera* συνήθως φτάνει τα 22-24° Brix (1° Brix = 1 % w/v). Οι πηκτίνες είναι

παράγωγα του πολυγαλακτουρονικού οξέος, το οποίο ευθύνεται για την υφή του καρπού, ανέρχονται στο 0,02—0,6% του βάρους μιας ώριμης ράγας, ενώ τα κυριότερα οξέα που εμπεριέχονται είναι το τρυγικό και το μηλικό οξύ και σε πολύ μικρότερο ποσοστό κιτρικό, οξαλικό και φωσφορικό οξύ.

β) Φλοιδός αντιστοιχεί περίπου στο 5–12% του συνολικού βάρους μιας ώριμης ράγας, περιέχοντας αφενός τις χρωστικές και αφετέρου ένα σημαντικό ποσοστό των ταννινών που τελικά ανιχνεύονται στους οίνους.

γ) Γύαρτα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% του βάρους της ράγας και αποτελούνται από πικρίζουσες ταννίνες, έλαια και ρητινώδη υλικά που σε γενικές γραμμές είναι ανεπιθύμητα σε ένα οίνο ⁴.

1.2.10 Χημική σύσταση Οίνου

Η χημική σύσταση του οίνου εξαρτάται κυρίως από:

- α) Το είδος των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για την οινοποίηση
- β) Την τεχνική της οινοποίησης
- γ) Τη δράση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Στον οίνο εμπεριέχονται περισσότερες από 500 ουσίες, η συγκέντρωση των οποίων κυμαίνεται από 10^{-1} — 10^{-6} mg/L. Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζεται η κατά μέσο όρο η χημική σύσταση λευκών και ερυθρών (επιτραπέζιων και επιδόρπιων) οίνων. Αναλυτικότερα, τα σάκχαρα που εμπεριέχονται είναι απαραίτητα για την αλκοολική ζύμωση, ενώ μεταβολίζονται και σε ανώτερες αλκοόλες, εστέρες λιπαρών οξέων και αλδεύδες δίνοντας στον οίνο το ξεχωριστό αρωματικό χαρακτήρα του ¹⁰. Ο κυρίαρχος ζυμομύκητας της αλκοολικής ζύμωσης, ο *Saccharomyces cerevisiae*, λαμβάνει τη μεταβολική του ενέργεια κυρίως από τα σάκχαρα του μούστου (γλυκόζη και φρουκτόζη). Τα σάκχαρα που απομένουν μετά τη ζύμωση είναι γενικά πεντόζες, όπως η αραβινόζη, η ραμνόζη και η ξυλόζη, των οποίων η συγκέντρωση δεν ξεπερνά τα 1,5 mg/L.

Πίνακας 1.4 Εκτίμηση τυπικής χημικής σύστασης οίνου (% βάρους)¹⁰.

Συστατικά	Επιτραπέζιοι οίνοι		Επιδόρπιοι οίνοι	
	Λευκοί	Ερυθροί	Λευκοί	Ερυθροί
Νερό	87	87	76	74
Αιθανόλη	10	10	14	14
Άλλα πτητικά	0,04	0,04	0,05	0,05
Στερεά	2,6	2,7	10,1	12,2
Σάκχαρα	0,05	0,05	8	10
Πηκτίνες	0,3	0,3	0,25	0,25
Γλυκερόλη	1,1	1,1	0,9	0,9
Οξέα	0,7	0,6	0,5	0,05
Τύρφη	0,2	0,2	0,2	0,2
Φαινόλες	0,01	0,2	0,01	0,02
Αμινοξέα	0,25	0,25	0,2	0,2
Λίπη, Τερπενοειδή	0,01	0,02	0,01	0,02
Βιταμίνες	0,01	0,01	0,01	0,01
Σύνολο	100	100	100	100

Η συγκέντρωση της αιθανόλης στον οίνο κυμαίνεται μεταξύ 10–13%, εκτός των επιδόρπιων οίνων (λικέρ), στους οποίους το ποσοστό ανέρχεται σε 15% περίπου. Η παρουσία της αιθανόλης έχει κρίσιμη σημασία για τη σταθεροποίηση, την παλαίωση και τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του οίνου. Κατά την ερυθρά οινοποίηση –στην οποία ο μούστος μένει σε επαφή με τα στέμφυλα– η παραγόμενη αλκοόλη λειτουργεί ως διαλύτης εκχύλισης των φαινολικών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια, ενώ παράλληλα εμποδίζει τα πτητικά συστατικά να διαφύγουν^{8, 10}

Τα οξέα του οίνου διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε πτητικά και μη πτητικά. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει όλα τα οξέα που απομακρύνονται κατά την απόσταξη, ενώ η δεύτερη τα καρβοξυλικά οξέα, όπως τρυγικό, λακτικό, οξαλικό, φουμαρικό και κιτρικό οξύ, που παραμένουν και καθορίζουν το τελικό pH του οίνου.

Μια πολύ σημαντική ομάδα φυτοχημικών μορίων που εμπεριέχονται στους οίνους είναι τα φαινολικά παράγωγα, η συγκέντρωση των οποίων είναι πολύ μεγαλύτερη στους ερυθρούς οίνους σε σχέση με τους λευκούς. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός στις χρωστικές ουσίες (ανθοκυάνες) που υπάρχουν στο φλοιό των

κόκκινων σταφυλιών και αφετέρου στη διαδικασία της ερυθράς οινοποίησης. Η τελευταία –σε αντίθεση με τη λευκή– περιλαμβάνει την παραμονή των στερεών υπολοίπων (στεμφύλων) μέσα στη δεξαμενή της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να εκχυλίζεται ένα μεγάλο ποσοστό από τα φαινολικά παράγωγα που υπάρχουν στις ράγες. Αντίστοιχα μόρια μπορούν να προέλθουν και από το φλοιό, τα γίγαρτα και τους βόστρυχους των σταφυλιών ή από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών και παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων.

1.3 Ιστορία και διάδοση της αμπελουργίας και της οινοποίησης.

Ο οίνος προέρχεται από την άμπελο, η οποία σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους έχει προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Ακόμα και πριν από την εποχή των παγετώνων, είναι γνωστό ότι η άμπελος ευδοκίμωσε στην πολική ζώνη, κυρίως στην Ισλανδία, στη Βόρεια Ευρώπη και τη βορειοδυτική Ασία. Όμως οι παγετώνες περιόρισαν σημαντικά την εξάπλωσή τους και κατά κάποιο τρόπο επέβαλαν την γεωγραφική απομόνωση πολλών ποικιλιών, μέρος των οποίων εξελίχθηκε σε διαφορετικά είδη. Στην πορεία των χρόνων, διάφοροι πληθυσμοί άγριων αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες, κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του νοτίου Καυκάσου. Στην περιοχή αυτή, μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος άμπελος η οινοφόρος (*Vitis Vinifera* L.)¹¹.

1.4 Οίνος

Οίνος ονομάζεται το προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης του μούστου. Η διαδικασία παρασκευής του αποτελεί μια φυσική διεργασία που λαμβάνει χώρα όταν ο χυμός των ώριμων σταφυλιών έλθει σε επαφή με τις άγριες ζύμες που υπάρχουν στον φλοιό τους.¹² Χρονολογικά, η καλλιέργεια της αμπέλου για την παρασκευή οίνου τοποθετείται μεταξύ 5.000-6.000 πΧ, στην ορεινή περιοχή μεταξύ της Μαύρης και της Κασπίας Θάλασσας. Η πλέον πιθανή θεωρία για τη δημιουργία του



αναφέρει ότι ο πρώτος οίνος ανακαλύφθηκε τυχαία, όταν ο άνθρωπος ήπια χυμό άγριων σταφυλιών που είχαν συλλεχθεί και αποθηκευθεί σε ένα δοχείο. Το περιστατικό αυτό αναφέρεται περίπου στο 10.000–8.000 πΧ και προηγήθηκε κατά πολύ της σκόπιμης καλλιέργειας του αμπελιού. Ως πιθανό λίκνο της αμπελουργίας εντοπίζεται η περιοχή βόρεια των μεγάλων πεδιάδων του Τίγρη και του Ευφράτη, που σχημάτιζε τον πυρήνα των αυτοκρατοριών των Σουμερίων, των Ακκάδων, των Ασσυρίων και των Βαβυλωνίων, καθώς και ανατολικά από το επίκεντρο της αυτοκρατορίας των Χετταίων, στην ιστορική Αρμενία.⁴

Έως πρόσφατα οι παλαιότερες και εγκυρότερες αποδείξεις για την ύπαρξη οίνου στην ευρύτερη αυτή περιοχή, αναγόταν στην τέταρτη χιλιετία πΧ. Στο πλαίσιο αυτό, πρώτος ο R. H. Michel¹³ χρησιμοποίησε την υπέρυθη φασματοσκοπία (FT-IR) για να αποδείξει ότι οι ερυθρές κηλίδες σε δοχεία από την αρχαιολογική τοποθεσία Godin Terpe της δυτικής Περσίας –που ανάγονται μεταξύ 3500–2900 πΧ– περιείχαν ένα καρβοξυλικό οξύ, κατά πάσα πιθανότητα τρυγικό οξύ, το οποίο ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες μόνο στα σταφύλια. Εσχάτως, οι ρίζες της οινοποίησης τοποθετήθηκαν μακρύτερα στο χρόνο, αφού το 1996 ο McGovern¹⁴ χρησιμοποιώντας παρόμοιες τεχνικές κατάφερε να προσδιορίσει ίχνη οίνου (στο οποίο είχε προστεθεί ρετσίνι από φιστίκια) σε δοχεία που χρονολογούνται περί το 5400–5000 πΧ, σε νεολιθική ανασκαφή στην περιοχή Chatzi Firuz Terpe της Περσίας. Οι ανακαλύψεις αυτές υποδηλώνουν ότι η οινοποίηση άρχισε κατά τη νεολιθική εποχή παράλληλα με τις άλλες μορφές πρώιμης καλλιέργειας, όταν δηλαδή συντελέστηκε η αγροτική επανάσταση.

Αναλυτικότερα, η ιστορία της αμπελοκαλλιέργειας και της παραγωγής οίνου ανά περιοχή του αρχαίου κόσμου είναι:

Μεσοποταμία

Στις αρχές της τρίτης χιλιετίας πΧ, με την κυριαρχία των Σουμερίων στη νότια Μεσοποταμία, υπάρχουν σαφή στοιχεία για την καλλιέργεια αμπελώνων. Ο οίνος όμως δε φαίνεται ότι ήταν γνωστός. Πιθανότατα οι κλιματολογικές συνθήκες ήταν ο λόγος που η αμπελουργία δε γνώρισε μεγάλη άνθηση στην περιοχή.

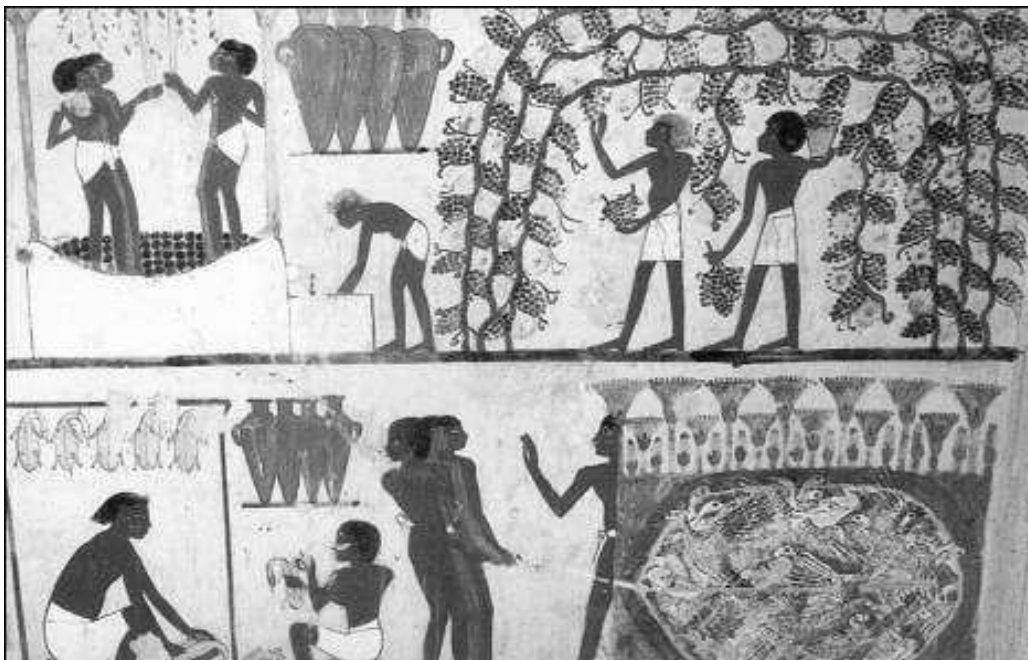
Με την κατάρρευση όμως της Σουμερικής αυτοκρατορίας, –στις αρχές της δεύτερης χιλιετίας– και την άνοδο των Ασσυρίων, το κέντρο της πολιτικής και οικονομικής εξουσίας μετακινήθηκε σε βορειότερες περιοχές η οποίες ήταν

καταλληλότερες για την καλλιέργεια αμπελιών. Όπως αναφέρει ο κώδικας του Χαμουραμί που χρονολογείται το 1700πΧ, ο οίνος ήταν απαραίτητος σε ορισμένες θρησκευτικές τελετουργίες και καταναλώνονταν μόνο από την άρχουσα τάξη, ενώ το ποτό των λαϊκών μαζών ήταν η μπύρα.¹⁵

Στην πρώτη χιλιετία πΧ, με την άνοδο της νέας αυτοκρατορίας των Ασσυρίων η ισορροπία των δυνάμεων μετατοπίστηκε ακόμα βορειότερα με αποτέλεσμα να υπάρχουν αρκετά στοιχεία που μαρτυρούν ανθίζουσα αμπελοκαλλιέργεια και οινοπαραγωγή. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι η πόλη Νινευή – κοντά στους πρόποδες των βουνών, όπου κατά πάσα πιθανότητα εξημερώθηκαν πρώτη φορά τα αμπέλια – έγινε ξακουστή για τους οίνους της.

Αίγυπτος

Σε αντιστοιχία με τη Μεσοποταμία, το κύριο αλκοολούχο ποτό της αρχαίας Αιγύπτου ήταν η μπύρα.. Όμως, από τα τέλη της τέταρτης και τις αρχές της τρίτης χιλιετίας φαίνεται ότι ο οίνος αρχίζει να χρησιμοποιείται από τους βασιλείς και τους ιερείς. Οι αμπελώνες κατά κύριο λόγο ανήκαν στο Φαραώ, τον κλήρο και κάποιους από τους υψηλούς αξιωματούχους. Ο τάφος του Άμωσι στις Θήβες (1450 π.Χ.) μας προσφέρει μια άριστη περιγραφή του τρυγητού της εποχής αυτής (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Τοιχογραφία σε νεκρικό θάλαμο στην Αίγυπτο με περιγραφές τρυγητού και παρασκευής οίνου

Παρά το γεγονός ότι η Αίγυπτος παρήγαγε δικό της οίνο έκανε και εισαγωγές μεγάλων ποσοτήτων, αφού σύμφωνα με αναφορές Ελλήνων και Ρωμαίων συγγραφέων, οι αιγυπτιακοί οίνοι δεν ήταν καλής ποιότητας. Προφανώς η ζύμωση στο θερμό κλίμα της Αιγύπτου πραγματοποιείτο με μεγάλη ταχύτητα με συνέπεια να μην ήταν δυνατή η παραγωγή οίνων καλής ποιότητας.¹⁶

Συρία και Ανατολία

Οι τέχνες της αμπελουργίας και της οινοποίησης ήταν επίσης διαδεδομένες στη Συρία και την Παλαιστίνη, όπου οι περιβαλλοντοκλιματολογικές συνθήκες ήταν προσφορότερες για την ανάπτυξη της αμπελοκαλλιέργειας. Άλλωστε, τόσο το Ταλμούδ όσο και η Βίβλος αναφέρονται στην άμπελο και τον οίνο ως αναπόσπαστα τμήματα του τοπίου και της καθημερινής ζωής του εβραϊκού λαού. Στο βιβλίο της Γένεσης, η προέλευση της αμπελουργίας συμπίπτει κατά πολύ με τις ανακαλύψεις των επιστημόνων σε παλαιοντολογικό επίπεδο. Είναι χαρακτηριστική η αναφορά της Παλαιάς Διαθήκης, ότι όταν η κιβωτός του Νώε κατέληξε στο όρος Αραράτ και στράγγισαν τα νερά του κατακλυσμού (Γένεση VIII:4), "*ήρξατο Νώε άνθρωπος γεωργός γης και εφύτευσεν αμπελώνα*" (Γένεση, IX:20).

Όμως η ευρεία εξάπλωση του οίνου στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου οφείλεται στους Φοίνικες, ένα ναυτικό λαό που ήκμασε στις αρχές της πρώτης χιλιετίας πΧ. Με έδρα τις πόλεις του Λιβάνου Άραδο, Βύβλο, Βηρυτό, Σιδών και Τύρο (σημαντικότερη όλων) έκαναν εκτεταμένο εμπόριο οίνων σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου. Η εξαγωγή Φοινικικού οίνου είχε ως κύριο αποδέκτη την Αίγυπτο, αλλά σύμφωνα με το Διόδωρο το Σικελιώτη (πρώτος αιώνας πΧ), έφτανε μέχρι τη Βόρειο Αφρική, την Αραβία, την ανατολική Αφρική και την Ισπανία.

Ελλάδα

Συγχρόνως με την Αίγυπτο, μια άλλη πηγή ζήτησης οίνου ήταν ο Μινωικός πολιτισμός της Κρήτης, κυρίως κατά την ύστερο-Μινωική εποχή (μετά το 1700π.Χ), με κύριες χώρες παραγωγής τη Συρία και την Αίγυπτο. Όμως τον 15^ο αιώνα πΧ η κατάκτηση της Κρήτης από τους Μυκηναίους είχε ως αποτέλεσμα την διάδοση της αμπελουργίας στο νησί⁴. Το αρχαιότερο πιεστήριο οίνου έχει βρεθεί στην τοποθεσία Βαθύπετρο, στις Αρχάνες



Εικόνα 1.5 Πέτρινο πιεστήριο οίνου στον αρχαιολογικό χώρο Βαθύπετρο στο Ηρακλείο Κρήτης

Ηρακλείου και χρονολογείται από το 1600 πΧ (Εικόνα 1.5).

Αντίστοιχα, στην κυρίως Ελλάδα η επέκταση της Μυκηναϊκής κυριαρχίας προς ανατολάς και το νότο, συνέβαλλε στην καθιέρωση της αμπελουργίας με αποτέλεσμα η άμπελος να αποκτήσει εξέχουσα θέση –δίπλα στο σιτάρι και την ελιά– ως ένα από τα τρία βασικά προϊόντα της αγροτικής οικονομίας στη Μεσόγειο.

Οι αρχαίοι Έλληνες έπιναν τον οίνο με διάφορους τρόπους, συνήθως όμως αναμεμιγμένο με νερό σε αναλογίες 1:3, 1:2 ή και 2:3. Είχαν δε ειδικά σκευή τόσο για την ανάμειξη (κρατήρες και κύαθους, δηλαδή μακριές, βαθιές κουτάλες) όσο και για τη ψύξη του πριν από την κατανάλωση (ψυκτήρες). Όμως η κύρια θερμοκρασία κατανάλωσης ήταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αφού η ψύξη με πάγο από τα βουνά ήταν μεγάλη πολυτέλεια. Η κατανάλωση ανέρωτου οίνου ("άκρατου οίνου"), θεωρείτο ως βαρβαρότητα και συνηθιζόταν μόνο από τους αρρώστους ή κατά τη διάρκεια ταξιδιών ως τονωτικό-δυναμωτικό. Στην τελευταία περίπτωση προσέθεταν και μέλι, ενώ συχνά αρωμάτιζαν τους οίνους τους με διάφορα μυρωδικά. Η προσθήκη αψινθίου στον οίνο (παρασκευή βερμούτ) ήταν γνωστή μέθοδος που αποδίδεται στον Ιπποκράτη, αφού το βερμούτ της εποχής ονομαζόταν ως "Ιπποκράτειος οίνος". Η προσθήκη ρητίνης (παρασκευή ρετσίνας) γινόταν σπάνια –όχι μόνο χάριν της ιδιάζουσας γεύσης– αλλά κυρίως για λόγους συντήρησης. Τέλος, προσέθεταν και άλλα μπαχαρικά, όπως π.χ. θυμάρι, μέντα, γλυκάνισο, πιπέρι ή σμύρνα.

Ο τρόπος παραγωγής του οίνου στην αρχαία Ελλάδα δε διαφέρει ουσιαστικά από τον σύγχρονο, αφού η αμπελουργία είχε φτάσει σε υψηλά επίπεδα τέχνης.

Μάλιστα κυκλοφορούσαν ειδικά βιβλία αμπελουργία, από τα οποία διασώθηκε το βιβλίο του Θεοφράστου, από το οποίο μαθαίνουμε ότι οι Έλληνες (σε αντίθεση με τους Ρωμαίους) συνήθως καλλιεργούσαν το αμπέλι απλωμένο στη γη, χωρίς υποστηρίγματα –τεχνική που ακόμη και σήμερα είναι σε χρήση σε κάποιες περιοχές (π.χ. η κουλούρα στη Σαντορίνη). Επίσης οι Έλληνες γνώριζαν την παλαιώση του οίνου και την άφηναν να γίνει σε θαμμένα πιθάρια σφραγισμένα με γύψο και ρετσίνι, ίσως έτσι –κατά τύχη– να ανακαλύφθηκε και η επίδραση της προσθήκης ρετσινιού.

Ο οίνος στην αρχαιότητα ήταν κεντρικό αντικείμενο της οικονομικής ζωής, των τεχνών και της θρησκείας. Το εμπόριο των ελληνικών οίνων ήταν μία



από τις σημαντικότερες οικονομικές δραστηριότητες και απλωνόταν σε ολόκληρη τη Μεσόγειο, έως την Ιβηρική χερσόνησο και φυσικά στον Εύξεινο Πόντο. Τα ομηρικά έπη φανερώνουν την ευρύτατη χρήση του οίνου σε σπονδές και γιορτές, τόσο κατά τη Μυκηναϊκή εποχή στην οποία αναφέρονται, όσο και τον 8^ο αιώνα πΧ που έζησε ο Όμηρος. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι ενώ ο οίνος έχει εξέχουσα θέση στα ομηρικά έπη, σπανίως αναφέρεται ο θεός του οίνου Διόνυσος, υποδηλώνοντας ότι παρότι κατά τον 8^ο αιώνα πΧ η αμπελουργία και η οινοπαραγωγή ήταν γνωστές δραστηριότητες, η λατρεία του Διονύσου δεν είχε ακόμα εξαπλωθεί. Η άποψη ότι η Διονυσιακή λατρεία διαδόθηκε στην Ελλάδα πολύ μετά την αμπελοκαλλιέργεια και την οινοποίηση βασίζεται το έργο του Ευριπίδη *Βάκχαι*. Πραγματικά δεν είναι βέβαιο το πότε εισήχθη η νέα αυτή θρησκεία στην Ελλάδα, σύμφωνα όμως με τον Ευριπίδη η αρχική πατρίδα του Διονύσου βρισκόταν στα βουνά της Λυδίας και της Φρυγίας. Η άποψη αυτή ενισχύεται από την παραδοχή ότι η λέξη Βάκχος είναι η λυδική αντίστοιχη του Διονύσου ¹⁷. Ωστόσο πιστεύεται ότι η λατρεία του Διονύσου έκανε την εμφάνιση της στη Θράκη και από εκεί διαδόθηκε στη Βοιωτία και τη νησιωτική χώρα για να καταλήξει στην Αττική και την Πελοπόννησο. Αρχικά ο Διόνυσος ήταν απλώς ο θεός του οίνου, δανειζόμενος όμως κάποια άλλα γνωρίσματα από άλλους ξένους θεούς, ιδίως από τον κρητικό θεό Ζαγρέα, το θεό της Φρυγίας Σαβάξιο και της Λυδίας Βασσαρέα. Όμως η σφαίρα της επιρροής του και η αξία του μεγάλωσαν με αποτέλεσμα να ενσωματωθεί τελικά στο Ολυμπιακό πάνθεον.

Ανάμεσα στις πρώτες γιορτές που σχετίζονταν με το Διόνυσο ήταν τα Αγρίωνα, τα οποία γιορτάζονταν αρχικά στη Βοιωτία και οι Βάκχες θυσίαζαν ένα μικρό αγόρι. Ανθρωποθυσίες λάμβαναν χώρα και στη Χίο και τη Λέρο, αργότερα όμως αντικαταστάθηκαν από τη μαστίγωση.⁴

Όσον αφορά τους τύπους των οίνων της αρχαιότητας, θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι γνωστά πολλά πράγματα για τους τύπους και το πλήθος των οίνων. Συγκεκριμένες πληροφορίες υπάρχουν για το Μαρεωτικό, που παραγόταν από αμπέλια της περιοχής που αργότερα χτίστηκε η Αλεξάνδρεια της Αιγύπτου. Ήταν λευκός, ελαφρύς, ευχάριστος και με αρωματικό χαρακτήρα. Άλλος γνωστός οίνος της ίδιας περιοχής ήταν ο Ταινιωτικός οίνος που ήταν ένας λευκός οίνος ελαφρά άγουρος, σχετικά στιφός, λιπαρός και αρωματικός, θεωρείτο δε ως καλύτερος από τον προηγούμενο.

Από διάφορες πηγές έχουν απαριθμηθεί περίπου τριάντα οίνοι της αρχαίας Ελλάδας. Οι πλέον γνωστοί, που υμνήθηκαν από τους ποιητές της εποχής, είναι ο Ισμαρικός ή Μαρώνειος, ο μαύρος γλυκός οίνος που μέθυσε τον κύκλωπα Πολύφημο και έδωσε την ελευθερία στον Οδυσσέα και τους συντρόφους του, οι γλυκοί και μαλακοί οίνοι της Θήρας και της Κρήτης, οι λεπτότατοι οίνοι της Κύπρου και της Ρόδου, οι φαρμακευτικοί της Πισιδίας, οι μελισσόχρωμοι και γλυκείς της Φρυγίας, ο χαριέστατος εις παλαιώσιν Κερκυραϊκός, ο υπνωτικός Θάσιος, ο Κνίδιος αίματος γεννητικός, οι ευώδεις της Λέσβου και ο ονομαστός Αρτιούσιος της Χίου.⁹

1.5 Ο Οίνος ως φάρμακο

Ένας από τους λόγους που το οίνος έχαιρε μεγάλης εκτίμησης στον αρχαίο κόσμο, ήταν η χρήση του για ιατρικούς σκοπούς. Σύμφωνα με έναν αρχαίο μύθο, ο οίνος ανακαλύφθηκε τυχαία στην αυλή ενός Πέρση βασιλιά και αρχικά θεωρήθηκε ως δηλητήριο. Όταν όμως μια από τις παλλακίδες του βασιλιά θέλησε να αυτοκτονήσει πίνοντας το δηλητηριώδες αυτό υγρό, για να απαλλαγεί από τους πονοκεφάλους που τη βασάνιζαν, όχι μόνο δεν πέθανε αλλά θεραπεύτηκε. Ο ίδιος ο βασιλιάς δοκίμασε το νέο ποτό και το ανακήρυξε ως το “Βασιλικό Φάρμακο”.¹⁸ Αργότερα



ανακαλύφθηκαν και άλλες ευεργετικές ιδιότητες του οίνου στην υγεία, με αποτέλεσμα σε πολλές πρώιμες κοινωνίες, όπως της Μεσοποταμίας και της Αιγύπτου, η κατανάλωση του οίνου θεωρείτο προνόμιο αποκλειστικά της άρχουσας τάξης και είχε αποκλειστεί από τις λαϊκές μάζες.

Η αρχαιότερη γραπτή μαρτυρία για τις φαρμακευτικές χρήσεις του οίνου που έχει διασωθεί, είναι ένα Σουμερικό χειρόγραφο που χρονολογείται το 2200—2100 πΧ και συνιστά για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών τη χρήση οίνου σε συνδυασμό με άλλα υλικά όπως το μέλι.¹⁹ Αντίστοιχα, στους αιγυπτιακούς παπύρους υπάρχουν αρκετές αναφορές για τον οίνο ως φάρμακο, αλλά και ως μέσον ανάμιξης και εκχύλισης με σκοπό την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων. Για παράδειγμα, έχουν διασωθεί συνταγές στις οποίες ο οίνος χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στον τοκετό ή την ανορεξία (αφού θεωρείτο καλή πηγή θρεπτικών ουσιών).

Στην αρχαία Ελλάδα η κατανάλωση του οίνου εξαπλώθηκε στις μάζες, με αποτέλεσμα να γίνει απαραίτητο μέρος αφενός της διατροφής τους και αφετέρου της ιατρικής πρακτικής. Στα ομηρικά έπη αφθονούν οι αναφορές στον οίνο ως τονωτικού. Ο Ιπποκράτης (450—370 πΧ), ο διασημότερος γιατρός της αρχαιότητας, το χορηγούσε για την επάλειψη πληγών, ως θρεπτικό ποτό, αντιπυρετικό, καθαρτικό και διουρητικό. Ο Διοσκουρίδης (40—90 μΧ), Έλληνας στρατιωτικός γιατρός στην

υπηρεσία του Νέρωνα, το 77μΧ συνέγραψε το ιατρικό εγχειρίδιο De Universa Medicina. Αυτό αποτελείτο από πέντε βιβλία και αναφερόταν σε περισσότερο από 1.000 φάρμακα και αποτέλεσε το βασικό εγχειρίδιο ιατρικής για τους επόμενους δεκαέξι αιώνες. Ο Διοσκουρίδης χρησιμοποιούσε τον οίνο σε πολλές περιπτώσεις, αναφέροντας χαρακτηριστικά: ‘ο οίνος γενικά ζεσταίνει το σώμα, είναι εύπεπτος, αυξάνει την όρεξη, βοηθάει στον ύπνο και αναζωογονεί το οργανισμό’.

Ο Claudius Galenus γνωστός και ως Γαληνός ο Ένδοξος ή Κλαύδιος (130–201 μ.Χ.), ήταν ένας ακόμα διάσημος Έλληνας γιατρός που έκανε εκτεταμένη χρήση των φαρμακευτικών οίνων. Υπήρξε θεραπευτής των μονομάχων με συνέπεια να περιποείται αμέτρητα σοβαρά τραύματα. Σε σοβαρούς μάλιστα τραυματισμούς και εγχειρίσεις δε δίσταζε να βυθίζει τα εσωτερικά όργανα σε οίνο, πριν τα τοποθετήσει πίσω στο σώμα. Μετά την κατάρρευση της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, η φαρμακευτική χρήση του οίνου διασώθηκε έως και τη βυζαντινή περίοδο, μέσω του έργου του Γαληνού. Ο Γαληνός συνιστούσε τη χρήση του οίνου για τη φροντίδα των πληγών, αλλά και ως αντιπυρετικό ή τονωτικό, πρακτικές που υιοθετήθηκαν ευρέως στη Μεσαιωνική Ευρώπη.

Όμως και στα βιβλικά κείμενα αφθονούν οι αναφορές για τον οίνο ως φάρμακο. Στην παραβολή του καλού Σαμαρείτη (Λουκάς 10:304), ο Ιησούς αναφέρεται στις φαρμακευτικές χρήσεις του οίνου, αφού ο καλός Σαμαρείτης έπλυνε τις πληγές του τραυματισμένου ταξιδιώτη με λάδι και οίνο για να προλάβει τη μόλυνση. Ακόμη και σήμερα, στη Μέση Ανατολή χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό στις πληγές ένα μείγμα ελαιολάδου και οίνου, που ονομάζεται Samaritan balm. Στην Καινή Διαθήκη ο Απόστολος Παύλος συνιστά στον Τιμόθεο να πίνει λίγο οίνο για το στομάχι και τις αρρώστιες. (Τιμοθέου 5:23)

Στον Αραβικό κόσμο, οι θεραπευτές χρησιμοποιούσαν τον οίνο ως φάρμακο, παρόλο που η θρησκεία απαγόρευε την κατανάλωσή του. Ο γιατρός Rhazes (860–932 μΧ) που πρωτοπεριέγραψε την ιλαρά, ήταν ο πρώτος –εκτός από τους Κινέζους– που απέσταξε την αιθανόλη από τον οίνο για να τη χρησιμοποιήσει ως αντισηπτικό. Ο Αβικέννας (980–1037 μΧ) έγραψε το κύριο ιατρικό σύγγραμμα της δυτικής και ανατολικής ιατρικής (the canon of medicine) που χρησιμοποιήθηκε ευρέως έως το 1650. Στο σύγγραμμα του αφιερώνει ένα ολόκληρο κεφάλαιο στον οίνο, περιγράφοντας τις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία και τις ιατρικές του χρήσεις. Στους βυζαντινούς χρόνους οι θεραπευτές συνέχισαν την παράδοση της

ελληνικής και ρωμαϊκής ιατρικής. Τα τέλη του Μεσαίωνα, το έργο *Liber de Vinis*, που γράφτηκε από τον Arnaldus de Villanova περί το 1235–1311, εδραίωσε τη χρήση του οίνου ως αναγνωρισμένης μεθόδου θεραπείας.²⁰ Στην εκτεταμένη λίστα των ενδεικνυόμενων χρήσεων του οίνου περιλαμβάνονταν η χρήση του ως αντισηπτικού, τονωτικού και στον καθαρισμό του μολυσμένου νερού. Οι *θηριακοί* όπως ονομάζονταν οι φαρμακευτικοί οίνοι που παρασκευάστηκαν αρχικά από τους Έλληνες Νίκανδρο και Μυθριδάτη, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για τη θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας ασθενειών.

Μετά τον Μεσαίωνα ο οίνος εξακολούθησε να χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς. Το μολυσμένο νερό, από το οποίο μεταδίδονταν ασθένειες όπως η χολέρα και ο τύφος, ήταν η αιτία χορήγησης αλκοολούχων ποτών –κυρίως οίνου– στους ασθενείς. Η πρώτη *Φαρμακοποιία (Pharmacopoeia)* του Λονδίνου που εκδόθηκε το 1618 περιελάμβανε τρεις ιατρικούς οίνους (*vina medicata*). Στη συνέχεια, η *Pharmacopoeia Universalis* της Χαϊδεμβέργης στην έκδοση του 1835 απαριθμούσε 170 οίνους, η *Pharmacopoe Universelle* του Παρισιού το 1840 περιελάμβανε 164 οίνους, ενώ πρώτη *Pharmacopoeia* των Ηνωμένων Πολιτειών που εκδόθηκε το 1820 περιελάμβανε εννέα ιατρικούς οίνους. Ο Louis Pasteur περιέγραψε τον οίνο ως το πλέον υγιεινό και ευεργετικό ρόφημα. Το 1892 ο καθηγητής Alois Pick του Ινστιτούτου Υγιεινής της Βιέννης, συνέστησε την προσθήκη οίνου στο νερό προκειμένου να αποφευχθεί η εξάπλωση επιδημίας της χολέρας που έπληξε το Αμβούργο. Η σύγχρονη έρευνα έχει δείξει ότι η αποτελεσματικότερη αντιμικροβιακή δράση του οίνου σε σχέση με την καθαρή αιθανόλη, οφείλεται στην επιπλέον παρουσία των φαινολών. Ο Παράκελσος έκανε τη χρήση του σιδήρου και του αντιμονίου στον οίνο δημοφιλή. Το *vinum ferri* χρησιμοποιείτο στη θεραπεία της αναιμίας έως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ενώ το μίγμα οίνου με αντιμόνιο χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα ως εμετικό.

Όμως, τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, το κίνημα κατά του αλκοολισμού κέρδισε έδαφος στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Μεγάλη Βρετανία, με αποτέλεσμα το 1916 να αποσυρθούν όλοι οι οίνοι από την Αμερικάνικη Φαρμακοποιία. Στη συνέχεια, το 1932, έγινε το ίδιο και με την αντίστοιχη Βρετανική. Τα επόμενα χρόνια οι φαρμακευτικές χρήσεις του οίνου υποκαταστάθηκαν από τα νέα φάρμακα που παρήγαγαν οι φαρμακοβιομηχανίες και με αποτέλεσμα να ατονήσει σταδιακά ο ιατρικός του ρόλος.

1.6 Σύγχρονη Γνώση

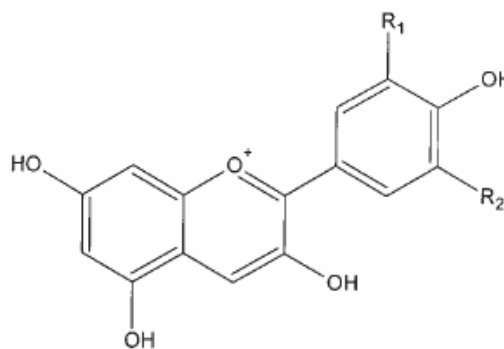
Το ενδιαφέρον για τον οίνο αναζωπυρώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Αιτία ήταν πολλές επιστημονικές παρατηρήσεις που συνέδεσαν την κατανάλωση ερυθρού οίνου –σε λογικές ποσότητες ημερησίως– με το μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων.²¹ Η υπόθεση αυτή προτάθηκε ως μια πιθανή εξήγηση για τη σχετικά χαμηλή θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα που παρατηρούνται στη Γαλλία, παρά τους υψηλούς δείκτες επικινδυνότητας –όπως κάπνισμα, υψηλή αρτηριακή πίεση, διατροφή πλούσια σε κεκορεσμένα λιπαρά, παχυσαρκία– που επίσης καταγράφονται. Το επιδημιολογικό αυτό εύρημα ονομάστηκε Γαλλικό Παράδοξο (French Paradox).²² Η ευεργετική αυτή δράση των ερυθρών οίνων αποδόθηκε στην παρουσία των βιοδραστικών φαινολών, που βρίσκονται σε αυξημένο ποσοστό στον ερυθρό οίνο. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί πλήθος επιδημιολογικές και κλινικές έρευνες με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μεγάλο πλήθος ενδείξεων και αποδείξεων που στηρίζουν την υπόθεση αυτή, αφού η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα είναι γενικά μικρότερη σε χώρες με αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και ιδιαίτερα οίνου.^{23–25} Βέβαια δεν είναι αυταπόδεικτο ότι εφόσον η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα σε μια χώρα είναι μικρή και η κατανάλωση οίνου αυξημένη, αυτά τα δύο συνδέονται απαραίτητως.

1.7 Βιοσύνθεση φαινολικών φυτοχημικών

Τα φαινολικά φυτοχημικά είναι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθενται από τα φυτά τόσο κατά τη φυσιολογική τους ανάπτυξη, όσο και σε περιπτώσεις στρες, όπως για παράδειγμα οι μολύνσεις από μικροοργανισμούς, η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, ο τραυματισμός των ιστών.²⁶ Παρότι τα περισσότερα μόρια της κατηγορίας αυτής έχουν ήδη αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί κατά την κλασική περίοδο της οργανικής χημείας, όμως η αναγνώρισή τους ως ξεχωριστής ομάδας συγγενών γενετικά φυτικών μεταβολιτών έγινε το 1957, με την ίδρυση στη Μ. Βρετανία του Plant Phenolic Group που στη συνέχεια μετεξελίχθηκε σε Phytochemical Society of Europe.²⁷ Τα μόρια αυτά βρίσκονται σε αφθονία στα

φυτά και προκύπτουν από την οδό του σικιμικού οξέος και του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανίων.^{26–27}

Μια από τις πρώτες επιτυχίες της επιστήμης στην κατανόηση του μεταβολισμού των μορίων αυτών στα φυτά, ήταν οι έρευνες για το χημικό υπόβαθρο της ποικιλίας των χρωμάτων στα άνθη.²⁸ Στην εργασία αυτή συνεργάστηκαν γενετιστές, βιοχημικοί και



Σχήμα 1.1 Βασικός σκελετός ανθοκυανιδινών

χημικοί για να αποδείξουν ότι οι γενετικές διαφορές στο χρώμα των ανθοκυανινών οφείλεται κυρίως σε μικρές δομικές διαφοροποιήσεις που είναι αποτέλεσμα απλών χημικών μεταβολών (υδροξυλίωση, μεθυλίωση) στο βασικό μόριο της ανθοκυανιδίνης^{29–30} (Σχήμα 1.1). Ιδιαίτερη ώθηση στην αναγνώριση και περιγραφή της δομής των φαινολικών παραγώγων στα φυτά δόθηκε από τη συνδυασμένη χρήση τεχνικών της χρωματογραφίας και της ραδιοσήμανσης.^{28,31} Έκτοτε, το ενδιαφέρον για τη βιοχημεία του μεταβολισμού των πολυφαινολών κυριολεκτικά άνθησε, με αποτέλεσμα σήμερα να έχουν περιγραφεί λεπτομερειακά τα βιοσυνθετικά μονοπάτια για τις κυριότερες κατηγορίες των φυτικών φαινολικών μορίων, ενώ πρόσφατα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα ένζυμα που συμμετέχουν στα διάφορα στάδια των βιοχημικών αυτών διαδικασιών.

Η βιοσύνθεση των φαινολικών μορίων πραγματοποιείται μέσω των παρακάτω πέντε διαφορετικών βιοσυνθετικών οδών:

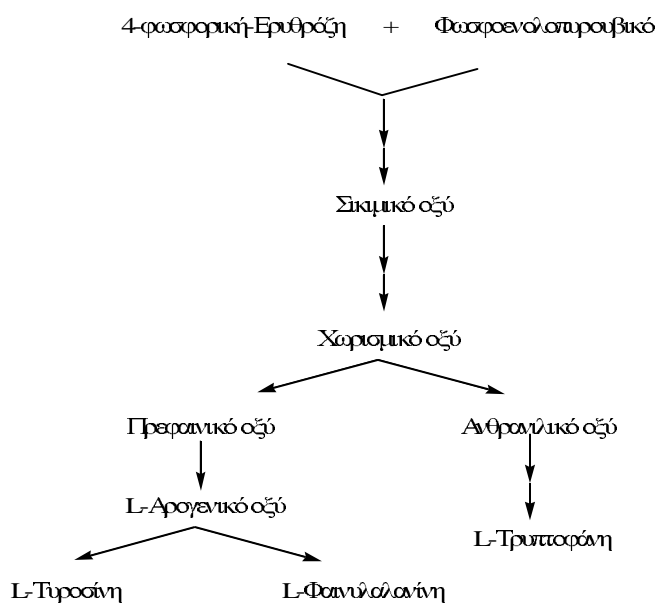
- Η Γλυκόλυση
- Η οδός της Φωσφορικής Πεντόζης
- Η οδός του Σικιμικού οξέος
- Η οδός του Οξικού-Μαλονικού οξέος (ή οδός των πολυακετιδίων)
- Η οδός του Οξικού-Μεβαλονικού οξέος

Οι τρεις τελευταίες βιοσυνθετικές οδοί μπορούν να ενσωματωθούν στο γενικότερο πλαίσιο του αρωματικού μεταβολισμού, ενώ οι οδοί του σικιμικού και του οξικού-μαλονικού οξέος είναι οι πλέον σημαντικές για τη βιοσύνθεση των φυτικών

φαινολικών μορίων.³² Στη συνέχεια ακολουθεί η παρουσίαση των διαφόρων βιοχημικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα φυτά κατά τη βιοσύνθεση των φαινολικών μορίων.

1.7.1 Οδός Σικιμικού οξέος

Η οδός του σικιμικού οξέος περιγράφηκε πρώτη φορά το 1885 από τον Eykman,³³ και είναι το μονοπάτι που οδηγεί στη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη και L-τρυπτοφάνη. Τα αμινοξέα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των απαραίτητων, τα οποία ενώ βιοσυντίθενται από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, στα ζώα πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν σημαντικές πρόδρομες ουσίες των αυξητικών φυτοορμονών και ποικίλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως των φαινυλο-προπανοειδών.



Σχήμα 1.2 Περιληπτική αναπαράσταση της οδού του Σικιμικού οξέος³²

Σύμφωνα δε με τους Kubitzki και Gottlieb³⁴ και Kubitzki³⁵ η καταγωγή και η πρόιμη εξέλιξη των χερσαίων φυτών,

πρέπει να συνδέεται με την επέκταση του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών (οδός σικιμικού οξέος).

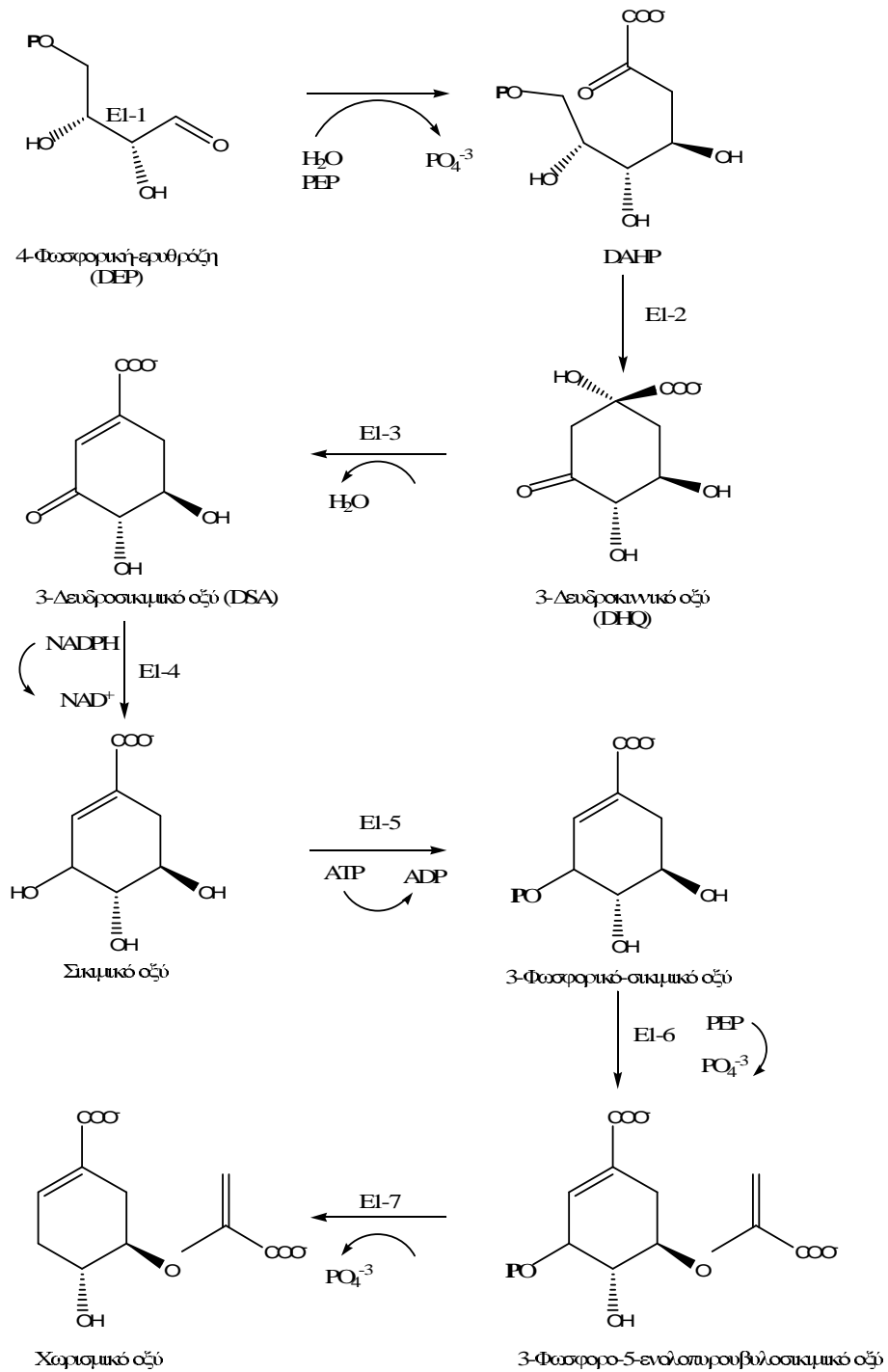
Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται περιληπτικά η σειρά των αντιδράσεων που οδηγούν στη σύνθεση της L-φαινυλαλανίνης και L-τυροσίνης. Στην πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων συμμετέχουν συνολικά τα έντεκα ένζυμα του Πίνακα 1.5.

Πίνακας 1.5

Ενζυμα που συμμετέχουν στην οδό του Σικιμικού οξέος	
E1-1	2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (=DAHP synthase)
E1-2	3-Dehydroquinate synthase
E1-3	3-Dehydroquinate dehydratase
E1-4	Shikimate 3-dehydrogenase
E1-5	Shikimate kinase
E1-6	3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (=EPSP synthase)
E1-7	Chorismate synthase
E1-8	Chorismate mutase
E1-9	Prephenate aminotransferase
E1-10	Arogenate dehydrogenase
E1-11	Arogenate dehydratase
E1-12	Anthranilate Synthase
E1-13	Anthranilate Phosphoribosyl transferase
E1-14	Phosphoribosylanthranilate isomerase
E1-15	Indol-3-glycerol phosphate synthase
E1-16	Tryptophan synthase a-subunit
E1-17	Tryptophan synthase b-subunit

Το μονοπάτι του σικιμικού αρχίζει με δύο αντιδράσεις συμπύκνωσης που οδηγούν στο σχηματισμό του εξαμελούς δακτυλίου. Η πρώτη (ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση), καταλύεται από τη συνθετάση του DAHP και αφορά τη συμπύκνωση της 4-φωσφορικής ερυθρόζης (DEP, ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου της φωσφορικής πεντόζης) με φωσφοενολοπυρουβικό οξύ (PEP, ενδιάμεσο της γλυκόλυσης). Το προϊόν της συμπύκνωσης είναι ένα σάκχαρο με C₇ ανοιχτή αλυσίδα (DAHP). Στη συνέχεια το DAHP μετατρέπεται σε 3-δεϋδροκινικό οξύ (DHQ) μέσω μιας σύνθετης αλυσίδας αντιδράσεων που περιλαμβάνουν οξείδωση, β-απόσπαση και μια ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση, έτσι ώστε τελικά να σχηματιστεί η κυκλική δομή. Ακολουθεί αναγωγή με NADH δίνοντας το 3-δεϋδροκινικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αφυδατώνεται ενζυμικά σε 3-δεϋδροσικιμικό οξύ (DSA). Το τελευταίο ανάγεται από μια αφυδρογονάση σε σικιμικό οξύ που αφού φωσφορυλιωθεί σε 3-φωσφοσικιμικό οξύ, αντιδρά με το PEP για την παραγωγή του 3-φωσφο-5-ενολοπυρουβυλοσικιμικού οξέος (EPSP). Τέλος, με απόσπαση του φωσφορικού

οξέος από το EPSP παράγεται το χωρισμικό οξύ. Στο Σχήμα 1.3 απεικονίζονται σχηματικά οι αντιδράσεις για τη βιοσύνθεση του χωρισμικού οξέος.

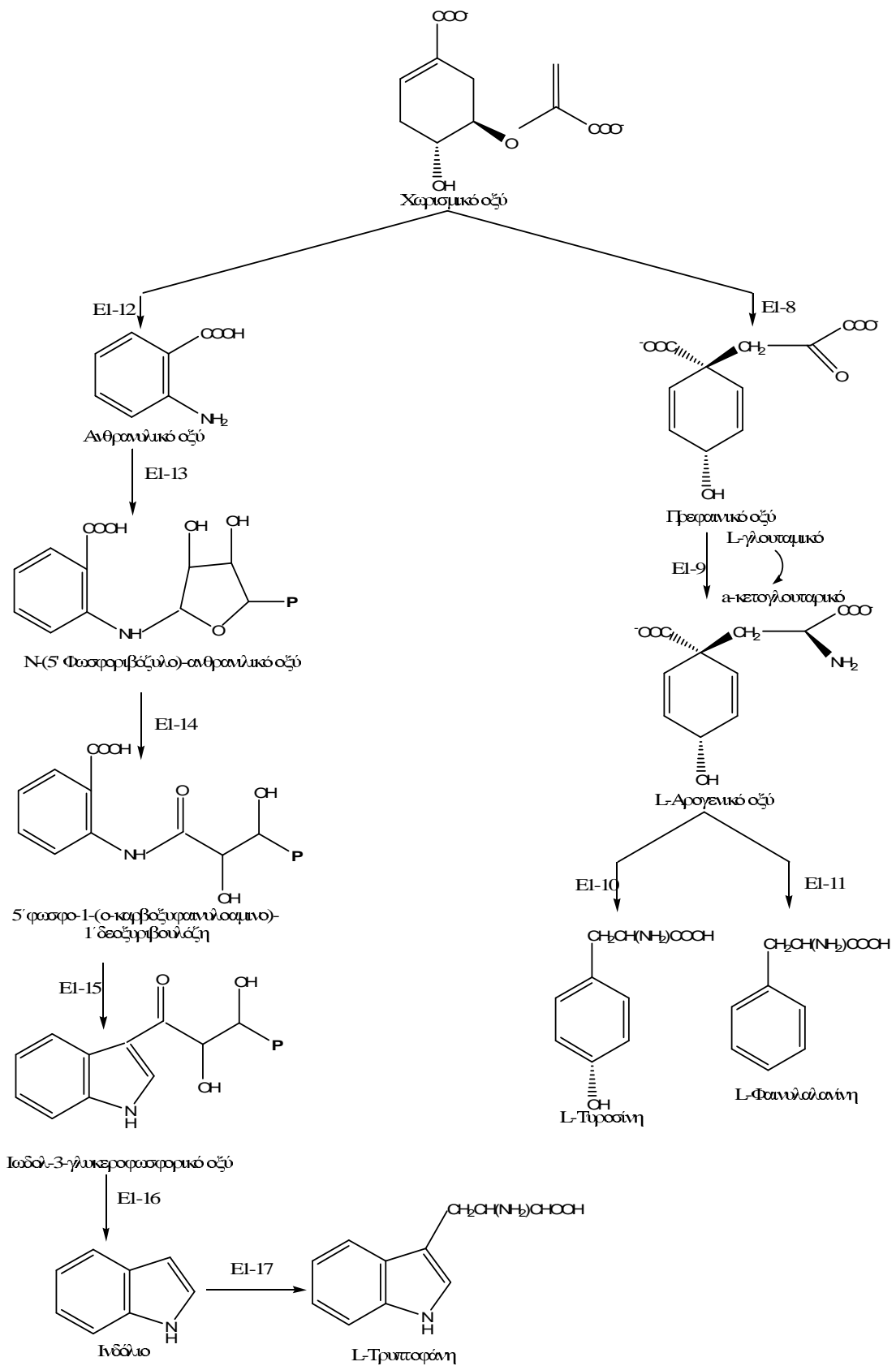


Σχήμα 1.3 Βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος-βιοσύνθεση χωρισμικού οξέος.³²

Οι δύο επόμενες ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν στη δημιουργία της πρώτης μεγάλης διακλάδωσης της οδού του σικιμικού οξέος, αφού η ανθρανιλική συνθετάση οδηγεί στη σύνθεση της τρυπτοφάνης, ενώ η μουτάση του χωρισμικού οδηγεί στη σύνθεση της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης.

Συγκεκριμένα, η μουτάση του χωρισμικού καταλύει μια περικυκλική μετάθεση Claisen που παράγει το πρεφαινικό οξύ. Στην αντίδραση αυτή η πυρουβική πλευρική αλυσίδα του χωρισμικού οξέος μεταφέρεται από τον C-1 στον C-5, συνθέτοντας τον βασικό φαινυλοπροπανοϊκό σκελετό των μορίων αυτών. Τα επόμενα βήματα που οδηγούν από το πρεφαινικό οξύ στην φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του οργανισμού.^{32, 36-37} Στα ανώτερα φυτά το πλέον χαρακτηριστικό μονοπάτι είναι αυτό του αρογενικού οξέος (arogenate) και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.4.

Η μετατροπή του πρεφαινικού σε αρογενικό οξύ καταλύεται παρουσία γλουταμικού οξέος από μια αμινοτρανσφεράση. Οι επακόλουθες δύο διακλαδώσεις από το αρογενικό καταλύονται από τα ένζυμα αρογενική αφυδρογονάση και αρογενική αφυδρατάση, που οδηγούν στη σύνθεση της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης αντίστοιχα. Αυτή η διακλάδωση λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας της σύνθεσης των δύο αμινοξέων, αφού η δράση της αφυδρατάσης παρεμποδίζεται από την παρουσία της φαινυλαλανίνης και της αφυδρογονάσης από την παρουσία τυροσίνης. Επιπλέον, τα δύο αυτά αμινοξέα παρεμποδίζουν τη δράση της μουτάσης του χωρισμικού.³³



Σχήμα 1.4. Βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων L-τρυπτοφάνη, L-τυροσίνη και L-φαινυλαλανίνη από το χωρισμικό οξύ.^{32,33,58}

1.7.2 Οδός φαινυλαλανίνης /υδροξυκινναμωμικού οξέος.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φαινυλαλανίνη λαμβάνει μέρος αφενός στην πρωτεϊνοσύνθεση και αφετέρου στη σύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Η οδός της φαινυλαλανίνης/υδροξυκινναμωμικού, ορίζεται ως ο “Γενικός Μεταβολισμός Φαινυλοπροπανίων” και περιλαμβάνει αντιδράσεις που οδηγούν στον μετασχηματισμό της L-φαινυλαλανίνης, σε υδροξυκινναμικά οξέα, θειοεστέρες του συνενζύμου A (CoA) και 1-Ο-ακυλογλυκοσίδες.³³

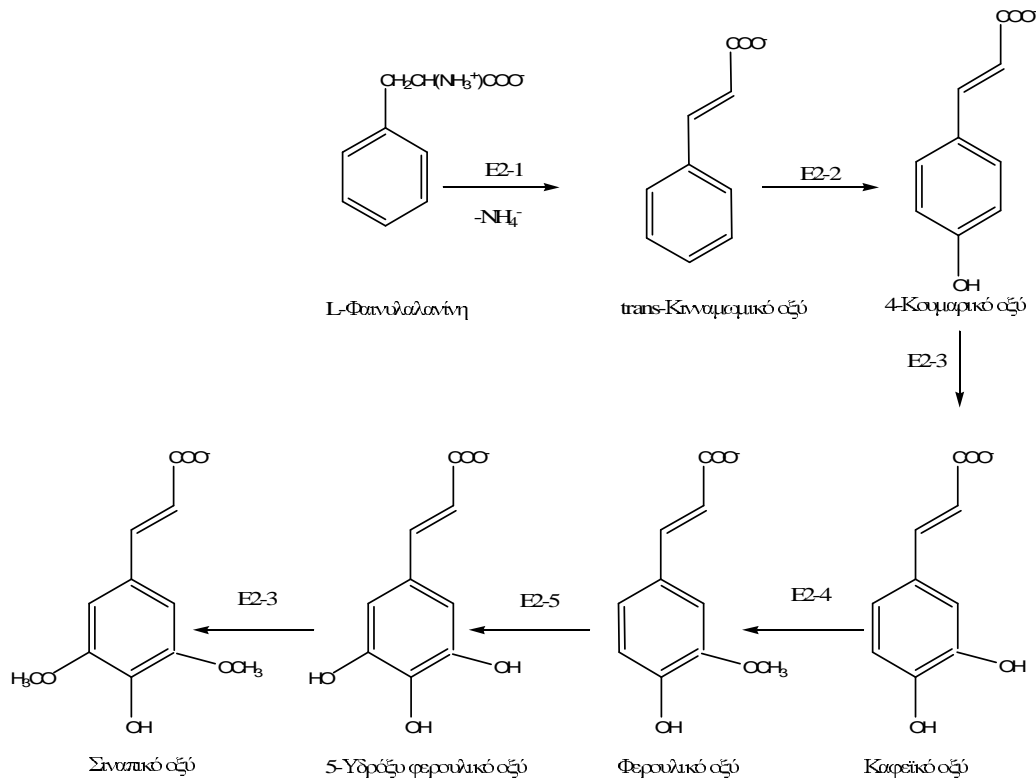
Η αλληλεπίδραση μεταξύ της φαινυλαλανίνης και των δευτερογενών φαινυλοπροπανίων ελέγχεται από μια λυάση (phenylalanine ammonia lyase, PAL).³⁸. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μη οξειδωτική αποαμίνωση της φαινυλαλανίνης, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό του *trans*-κινναμωμικού οξέος. Στη συνέχεια με ενζυματική υδροξυλίωση παράγεται το 4-κουμαρικό οξύ που αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση μιας σειράς φαινολικών φυτοχημικών, όπως των εστέρων των φαινυλοπροπανίων, των φλαβονοειδών, των ανθοκυανινών και των λιγνινών.

1.7.3 Βιοσύνθεση Φαινυλοπροπανίων

Μια σειρά από αντιδράσεις μεθυλίωσης και υδροξυλίωσης έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε τέσσερα από τα πλέον συνηθισμένα κινναμωμικά οξέα που περιλαμβάνουν τον χαρακτηριστικό C-3, C-6 φαινυλοπροπανικό σκελετό. Αναλυτικότερα τα οξέα αυτά είναι το 4-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ (Σχήμα 1.5). Παρότι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα συνήθως βρίσκονται σε *trans* (E) διαμόρφωση, όμως και τα *cis* (Z) ισομερή τους είναι δυνατόν να προκύψουν μέσω φωτοχημικού ή ενζυμικού ισομερισμού.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι παρασκευής των φαινυλοπροπανίων αποτελεί το αρχικό στάδιο για τη σύνθεση των περισσότερο περίπλοκων δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτό επιτυγχάνεται με την “ενεργοποίηση” των υδροξυκινναμικών οξέων, μέσω του σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ υδροξυκινναμικών και συνενζύμου A (hydroxycinnamoyl-CoA), τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες επιμέρους αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα η συμπύκνωση των φαινυλοπροπανίων με το μαλονυλο-συνένζυμο A (για τη σύνθεση των φλαβονοειδών των ισοφλαβονοειδών και των στυλβενίων),³⁹ οι αντιδράσεις αναγωγής με το NADPH

(για το σχηματισμό των λιγνινών) και οι αντιδράσεις σύζευξης (οδηγούν στο σχηματισμό εστέρων και αμιδίων τους).

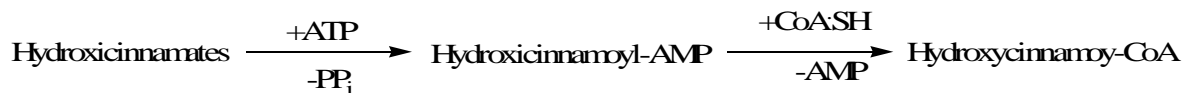


Σχήμα 1.5 Βιοσύνθεση υδροξυκινναμικών οξέων από τη φαινυλαλανίνη^{32,58}

Πίνακας 1.6

Ενζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των υδροξυκινναμικών οξέων	
E2-1	Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL)
E2-2	4-Coumarate 3-hydroxylase
E2-3	Caffeate 5-hydroxyferulate methyltransferase
E2-4	Ferulate 5-hydroxylase

Ο σχηματισμός των συμπλόκων hydroxycinnamoyl-CoA είναι ανάλογος με την ενεργοποίηση των λιπαρών οξέων με ATP και CoA:

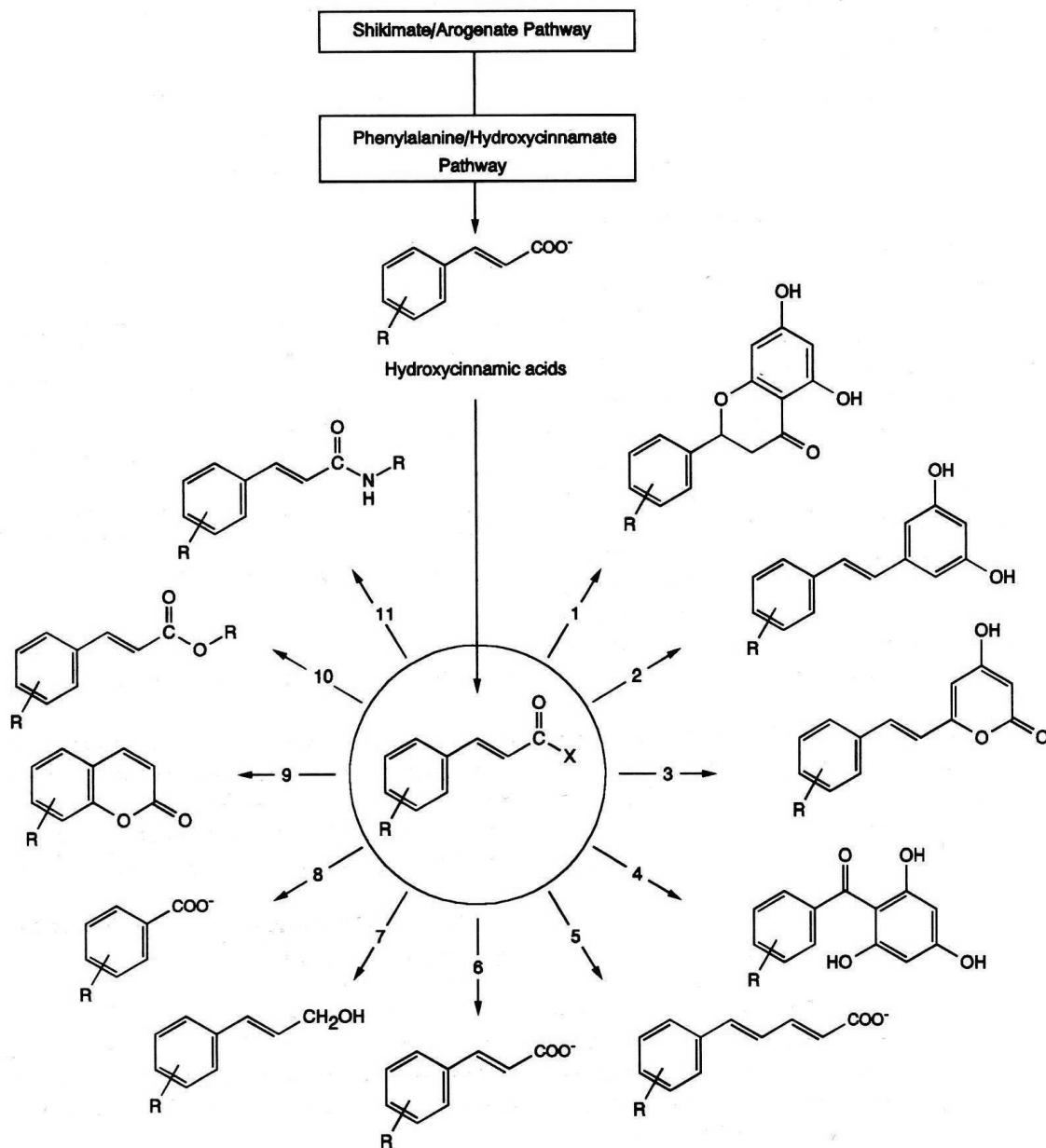


Στη συνέχεια, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα μεταβολίζονται μέσω ποικίλων βιοσυνθετικών οδών με αντίδραση της πλευρικής τους αλυσίδας μέσω:

- α) συμπύκνωσης, που οδηγούν στη σύνθεση φλαβονοειδών
- β) διάσπασης, που οδηγούν στη σύνθεση υδροβενζοϊκών οξέων
- γ) αναγωγής, που οδηγούν στη σύνθεση υδροξυκινναμωμικών αλκοόλων και πρόδρομων ενώσεων των λιγνινών
- δ) σύζευξης, που οδηγούν στη σύνθεση εστέρων, αμιδίων και γλυκοζιτών.

Στα φυτά, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, αφού συνήθως είναι ως εστέρες ή αμίδια. Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζεται διαγραμματικά ο κεντρικός τους ρόλος στη γενικότερη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Από αυτά, οι λιγνίνες, τα υδροξυκινναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στα ανώτερα φυτά, ενώ άλλες τάξεις όπως τα ισοφλαβονοειδή και τα στιλβένια έχουν περιορισμένη παρουσία στο φυτικό βασίλειο.

Η φυσιολογική δράση των φαινυλοπροπανίων ποικίλει ανάλογα με τη διαμόρφωσή τους. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να έχουν το ρόλο χρωστικού, φυτοαλεξίνης, φωτοπροστατευτικού ή ως μέσου μετάδοσης μηνυμάτων μεταξύ φυτών και μικροβίων. Επιπλέον έχουν τη δυνατότητα να πολυμεριστούν συμβάλλοντας στη σταθερότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και εμποδίζοντας την αφυδάτωση των φυτών.⁴⁰⁻⁴¹



Σχήμα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση του κεντρικού ρόλου των υδροξυκιναμμωμικών οξέων στην βιοσύνθεση διαφόρων φαινυλοπροπανίων

Οι αντιδράσεις **1** έως **5** αφορούν την επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας. Αναλυτικά, η αντίδραση **1** οδηγεί στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, η **2** των στίλβενιων, η **3** των στυρυλοπυρονών, η **4** των βενζοφαινονών που στη συνέχεια κυκλοποιούνται σε ζανθόνες και η **5** των υδροξυκιναμμωμικών οξέων με επιμηκυμένη πλευρική αλυσίδα..

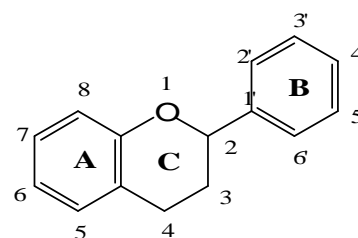
Η αντίδραση **6** οδηγεί σε διυδροκιναμμωμικά οξέα, η **7** σε υδροξυκιναμμωμικές αλκοόλες, η **8** σε υδροξυβενζοϊκά οξέα, η **9** σε υδροξυκουμαρίνες, η **10** οδηγεί στους εστέρες των υδροξυκιναμμωμικών οξέων και η **11** σε αμίδια των υδροξυκιναμμωμικών οξέων.³²

Στη συνέχεια θα εξεταστεί με περισσότερη λεπτομέρεια η βιοσύνθεση των φαινολικών παραγώγων που απαντώνται συχνότερα στα σταφύλια και τους οίνους.

1.7.4 Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια σχετικά ξεχωριστή υποκατηγορία αρωματικών ενώσεων που βιοσυντίθενται από τη φαινυλαλανίνη (η οποία προέρχεται από την οδό του σικιμικού οξέος) και το μαλονυλοσυνένζυμο Α, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του οξικού–μαλονικού οξέος.^{42–44} Τα φλαβονοειδή συνιστούν την πλέον πολυπληθή ομάδα φυτοχημικών φαινολικών, αριθμώντας περίπου τα μισά από τα συνολικά 8.000 φαινολικά παράγωγα που απαντώνται στα φυτά.⁴⁵

Έξι είναι οι κύριες ομάδες των φλαβονοειδών που συναντώνται στην πλειοψηφία των ανώτερων φυτών, δηλαδή οι: χαλκόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανδιόλες, ανθοκυανίνες και συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανιδίνες). Μια έβδομη ομάδα αποτελούν οι ορόνες, που όμως δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες. Η χημική δομή των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ένα σκελετό 15 ατόμων C ($C_6.C_3.C_6$)



Σχήμα 1.17

Σκελετός φλαβονοειδών

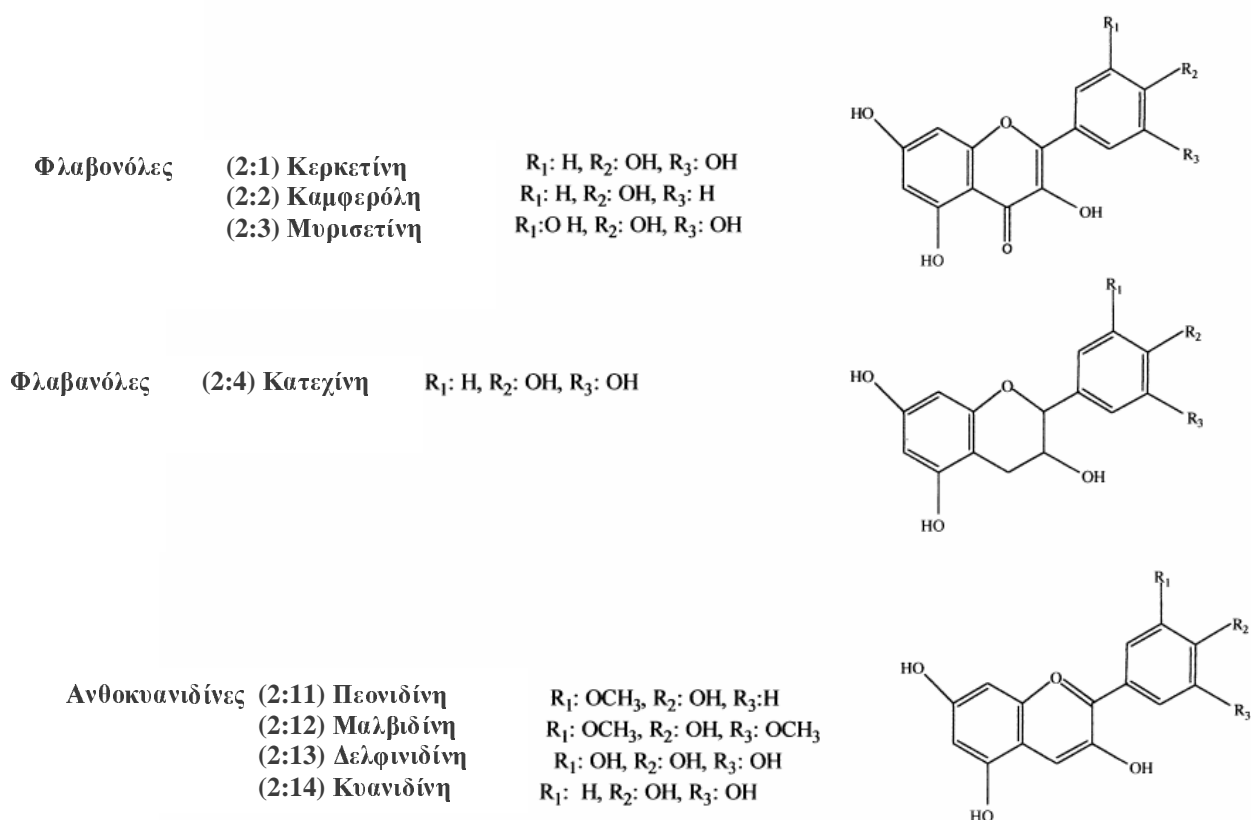
(Σχήμα 1.7). Ο αρωματικός δακτύλιος Α είναι συμπυκνωμένος με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C), ο οποίος είναι υποκατεστημένος με έναν επιπλέον αρωματικό δακτύλιο στις θέσεις 2, 3 ή 4.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ο εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος είναι δυνατόν να αντικατασταθεί από ένα πενταμελή (ορόνες) ή έχει ανοίξει.²⁸ Πειράματα με χρήση ισοτόπων έδειξαν ότι ο δακτύλιος Α των φλαβονοειδών προέρχεται από τη μεταβολική οδό του οξικού–μαλονικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος Β από τη φαινυλαλανίνη, δηλαδή την οδό του σικιμικού οξέος.⁴⁶

Η οξειδωτική κατάσταση του δακτυλίου C είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατάταξη των φλαβονοειδών. Στο Σχήμα 1.8 παρουσιάζεται σε γενικές γραμμές η δομή των κυριότερων φλαβονοειδών με το χαρακτηριστικό ότι οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες και δομικά διαφοροποιημένες μορφές.⁴⁵ Στη φύση, τα περισσότερα φλαβονοειδή –εκτός από τις φλαβαν-3-όλες–

βρίσκονται ως γλυκοζυλιωμένα υδατοδιαλυτά παράγωγα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα κενοτόπια των κυττάρων.^{26, 43, 45, 47–48}

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα, με τη δράση των ενζύμων που συνδέονται με τις ενδοπλασματικές μεμβράνες, όπου τα ένζυμα σχηματίζουν ένα μεγάλο μακρομοριακό σύμπλεγμα.^{49–50} Στο Σχήμα 1.9 παριστάνεται διαγραμματικά η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ενώ ο Πίνακας 1.7 εμπεριέχει όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή.



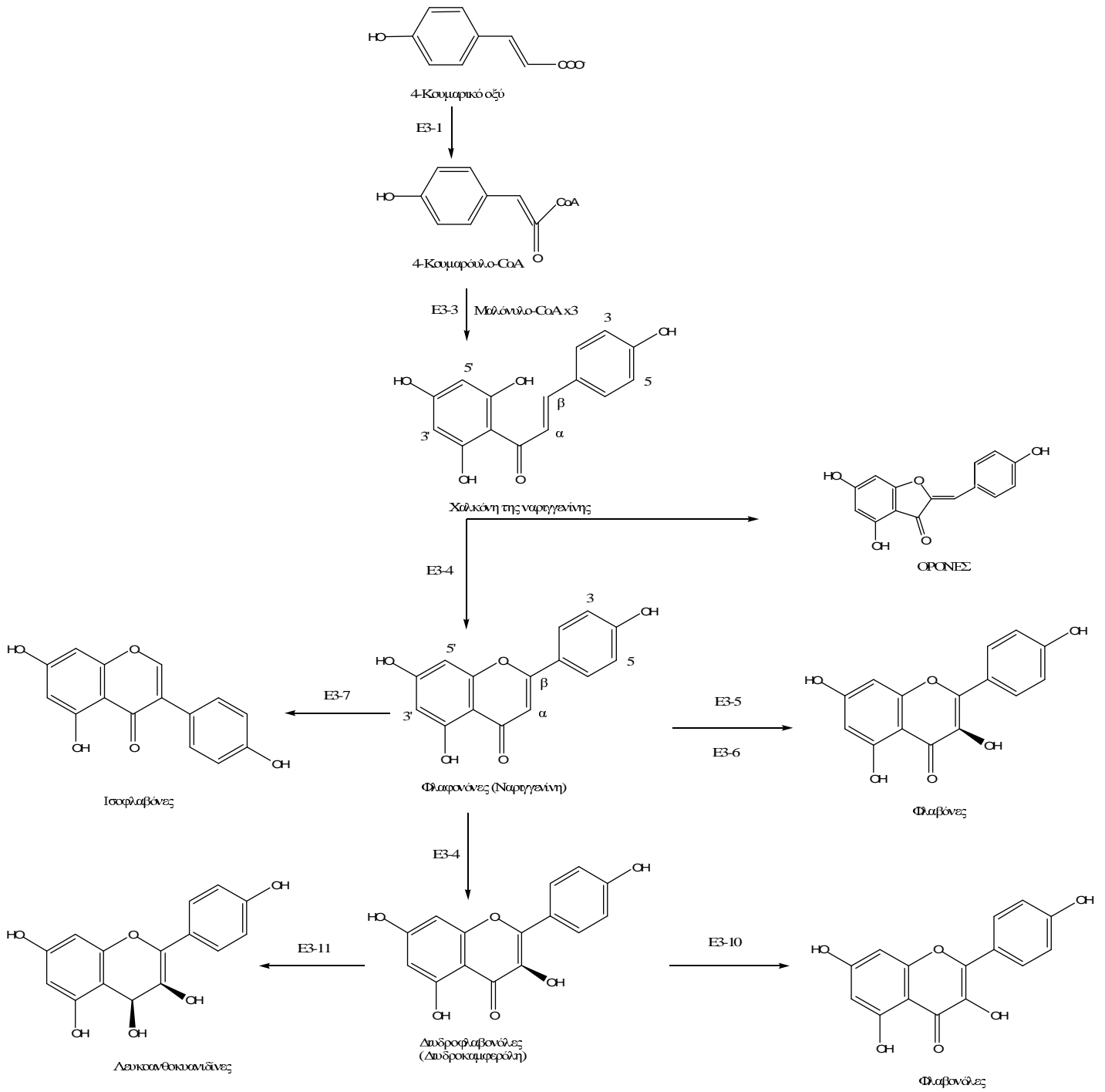
Σχήμα 1.8 Κυριότερες ομάδες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια και τους οίνους⁵¹.

Αναλυτικότερα, η συνθετάση της χαλκόνης είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση των υδροξικιναμωμικών οξέων για το σχηματισμό του βασικού σκελετού 15 C στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών. Η αντίδραση που καταλύει είναι η συμπύκνωση του 4-κουμαροϋλοσυνένζυμου A με τρία μόρια μαλονυλοσυνένζυμου A σχηματίζοντας τη χαλκόνη της ναριγενίνης που αποτελεί το πρώτο ενδιάμεσο προϊόν που διαθέτει το δακτύλιο B, ο οποίος αποτελεί το χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των φλαβονοειδών³³. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της παραπάνω αντίδρασης αναφέρεται

στη σταδιακή προσθήκη μορίων οξικού οξέος από το μαλονυλοσυνένζυμο Α στο 4-κουμαρούλοσυνένζυμο Α. Ο “τυχαίος προσανατολισμός” των μονάδων του οξικού δημιουργεί το δακτύλιο Α των φλαβοβοειδών, ενώ το μαλόνυλοσυνένζυμο Α συμμετέχει στη σύνθεση της χαλκόνης από την καρβοξυλάση του ακετυλοσυνενζύμου Α, η οποία καταναλώνει ΑΤΡ. Αυτή είναι μια τυπική ενζυματική αντίδραση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων και θεμελιώδης για τη σύνθεση των φλαβονοειδών. Στη συνέχεια, η κυκλοποίηση της χαλκόνης προς τη φλαβονόνη ναριγγενίνη καταλύεται από την ισομεράση της χαλκόνης. Η ναριγγενίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την ενζυματική σύνθεση ποικίλων φλαβονοειδών.³³ Η διάκριση των φλαβονοειδών όπως ήδη αναφέρθηκε εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του πυρανικού δακτυλίου C.

Πίνακας 1.7

Ενζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών	
E3-1	4-Coumarate coenzyme A ligase
E3-2	Naringenin chalcone synthase
E3-3	Acetylo-CoA carboxylase
E3-4	Chalcone isomerase
E3-5	Flavone synthase I
E3-6	Flavone synthase II
E3-7	Isoflavone synthase
E3-8	Flavanone 3-hydroxylase (dioxygenase)
E3-9	Dihydroflavonol/dihydroflavone 4-reductase
E3-10	Flavonol synthase
E3-11	Flavan-3,4-diol 4-reductase



Σχήμα 1.9 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών³²⁻³³

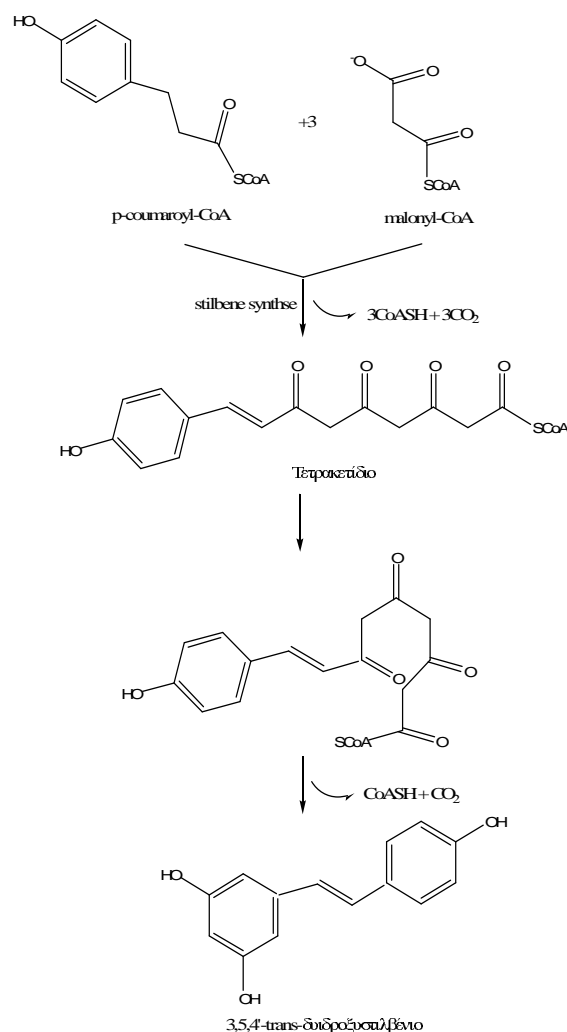
1.7.5 Βιοσύνθεση Στιλβενίων

Τα στιλβένια είναι φαινολικά παράγωγα μικρού μοριακού βάρους που προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη κατά τη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Το κυριότερο μέλος της οικογένειας των στιλβενίων που απαντώνται στα σταφύλια και τους οίνους είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, (3, 5, 4'-*trans*-υδροξυστιλβένιο). Αυτή ανήκει σε μια κατηγορία ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως *φυτοαλεξίνες*, αφού παράγονται σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία.⁵³⁻⁵⁵

Η ρεσβερατρόλη παράγεται από πολύ περιορισμένο αριθμό φυτών –περίπου 31 γένη– στα οποία περιλαμβάνονται τα γένη: *Vitis*, *Arachis* and *Pinus*.

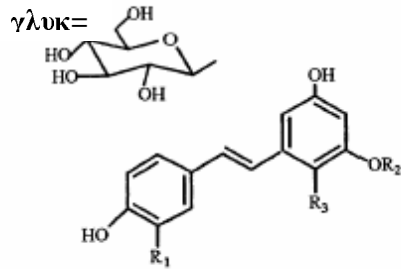
Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μορφές *cis* και *trans*, αλλά και ως γλυκοζίτης (πικειδής, *riceid*). Επίσης αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση μιας σειράς μορίων, όπως τα μεθυλιωμένα της παράγωγα (περοστυλβένια)⁵⁵ ή τα ολιγομερή της παράγωγα (α και ε βινιφερίνη)⁵⁶ Είναι δε χαρακτηριστικό ότι μερικά από τα μόρια αυτά εμφανίζουν υψηλότερη μυκυτοστατική δράση από την ίδια τη ρεσβερατρόλη.

Η γλυκοσιδίωση της ρεσβερατρόλης έχει αναφερθεί ότι λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην ενζυματική οξείδωση του μορίου, με αποτέλεσμα να επεκτείνεται ο χρόνος ημιζωής του μορίου στα κύτταρα.⁵⁷ Η *trans*-ρεσβερατρόλη συντίθεται από π-κουμαροϋλοσυνένζυμο Α και τρία μόρια μαλονυλοσυνενζύμου Α. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση των

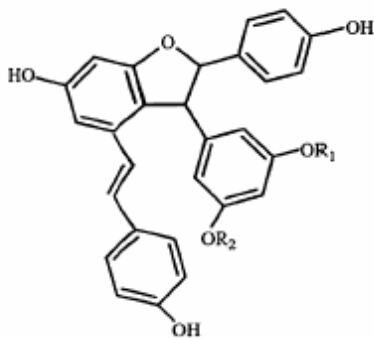


Σχήμα 1.10 Βιοσύνθεση *trans*-ρεσβερατρόλης⁵⁸.

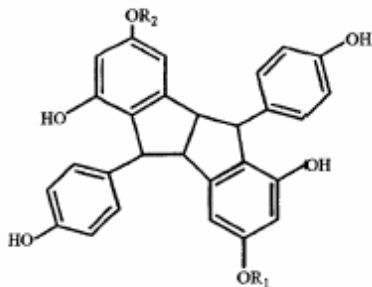
στιλβενίων, ενώ όλη η διαδικασία της βιοσύνθεσης της *trans*-ρεσβερατρόλης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.10



Στιλβένια	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη	H	H	H
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη-3- <i>O</i> -γλυκοσίδης (πικεΐδης)	H	γλυκ	H
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη-2- <i>C</i> -γλυκοσίδης	H	H	γλυκ
<i>Trans</i> -αστιρινγίνη	OH	γλυκ	H



Διμερή Στιλβενίων	R ₁	R ₂
<i>Trans</i> -ε-βνιφερίνη	H	H
<i>Trans</i> -ε-βνιφερίνη-διγλυκοσίδης	γλυκ	γλυκ



Διμερή Στιλβενίων	R ₁	R ₂
Παλλιδόλη	H	H
Παλλιδόλη 3- <i>O</i> -γλυκοσίδης	γλυκ	H
Παλλιδόλη 3-3''-διγλυκοσίδης	γλυκ	γλυκ

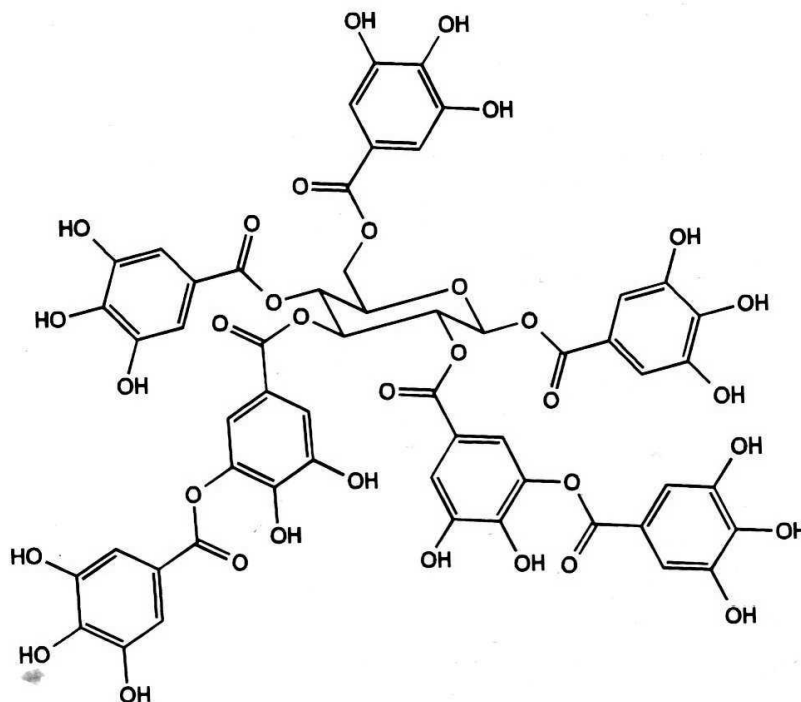
Σχήμα 1.11 Στιλβένια και παράγωγα αυτών⁵¹.

1.7.6 Τανίνες

Οι ευδιάλυτες στο νερό φυτικές πολυφαινόλες που προκαλούν καταβύθιση των πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα, ονομάζονται τανίνες.³³ Είναι ολιγο ή πολυμερή προϊόντα της βιοσύνθεσης των φλαβαν-3-ολών και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: σε υδρολύμενες και μη-υδρολύμενες τανίνες. Τα μόρια της δεύτερης κατηγορίας ονομάζονται και προανθοκυανιδίνες, επειδή παρουσία οξέων δίνουν ανθοκυανιδίνες.

Οι υδρολύμενες τανίνες διακρίνονται στις γαλλοτανίνες και τις ελλαγιτανίνες. Η τυπική δομή τους χαρακτηρίζεται από ένα κεντρικό πολυ-υδροξυλικό σκελετό, συνήθως το μόριο της β-D-γλυκοπυρανόζης, του οποίου οι υδροξυλομάδες έχουν στην πλειοψηφία τους εστεροποιηθεί με γαλλικό (ή σπανιότερα υδροξυκινναμωμικό) οξύ (Σχήμα 1.12).

Οι προανθοκυανιδίνες αλληλεπιδρούν ισχυρά με τις πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι των ζώων, λόγω της στυφής τους γεύσης.



Σχήμα 1.12 Δομή υδρολύμενων τανινών³²

1.7.6.1 Διμερείς προανθοκυανιδίνες

Οι σημαντικότερες διμερισμένες προανθοκυανιδίνες που έχουν απομονωθεί αποτελούνται από τα παρακάτω φλαβονοειδή:

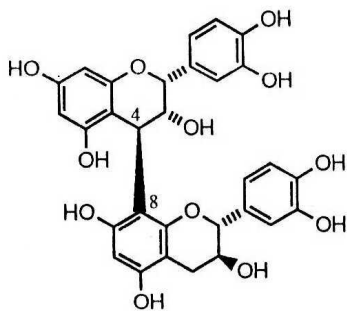
Προκυανιδίνη Β-1, επικατεχίνη (4β→8) κατεχίνη

Προκυανιδίνη Β-2, επικατεχίνη (4β→8) επικατεχίνη

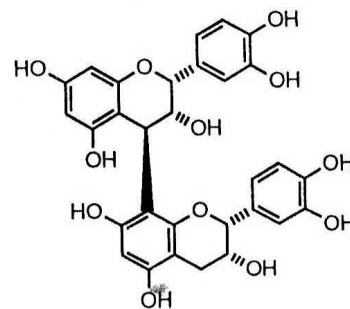
Προκυανιδίνη Β-3, κατεχίνη (4α→8) κατεχίνη

Προκυανιδίνη Β-4, κατεχίνη (4α→8) επικατεχίνη

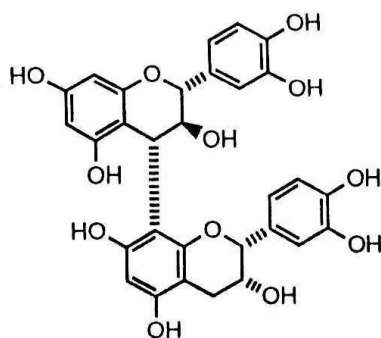
Άλλες ολιγομερείς προανθοκυανιδίνες, σχηματίζονται κατά παρόμοιο τρόπο με την αλληλεπίδραση φλαβονοειδών⁵⁹⁻⁶⁰.



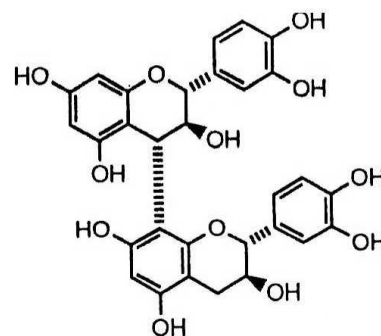
Προκυανιδίνη Β1



Προκυανιδίνη Β2



Προκυανιδίνη Β3

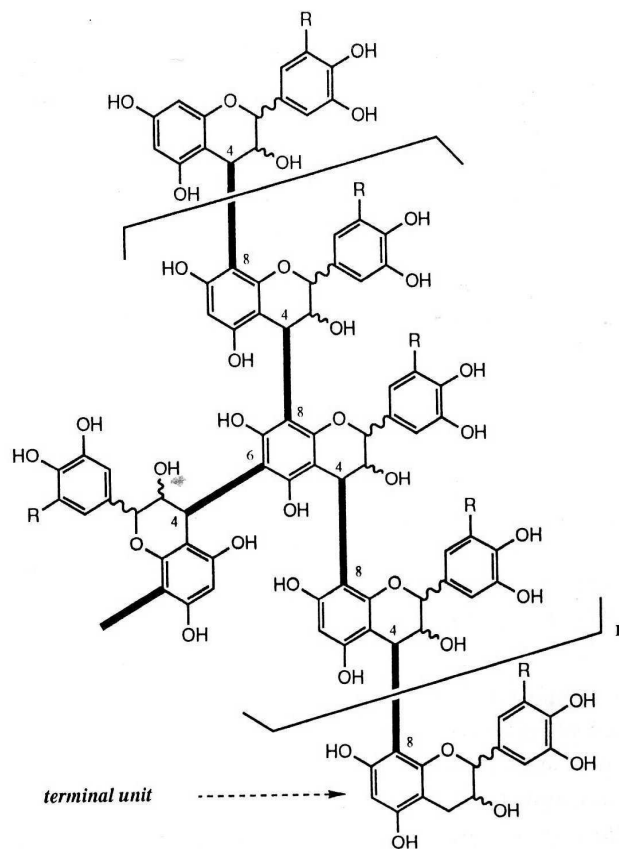


Προκυανιδίνη Β4

Σχήμα 1.13 Δομή των κυριότερων διμερών προανθοκυανιδινών³².

1.7.6.2 Ανώτερα μέλη των ολιγομερών και πολυμερών προανθοκυανιδινών

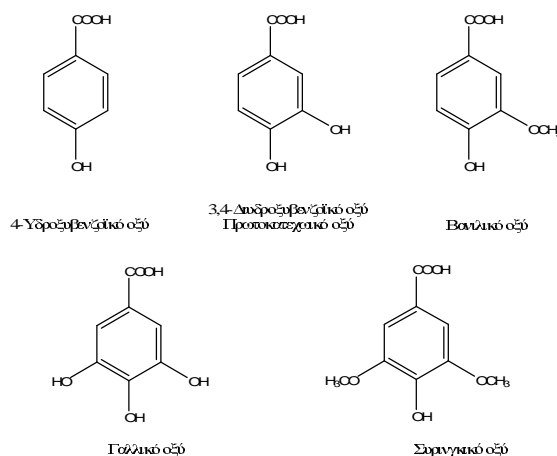
Οι μεγάλοι μοριακού βάρους προανθοκυανιδίνες αποτελούν την πλειοψηφία των μορίων αυτών στη φύση, και όπως έχει φανεί από τις έως τώρα έρευνες, η δομή τους ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με αυτό των διμερών και τριμερών. Ο συνδετικός δεσμός των φλαβονοειδών στις προανθοκυανιδίνες πάντοτε περιλαμβάνει τον C-4. Συνηθέστερα αναπτύσσεται ο δεσμός μεταξύ των C-4 και C-8, οδηγώντας στο σχηματισμό ευθύγραμμη διαμόρφωσης. Αντίστοιχα, οι δεσμοί μεταξύ C-4 και C-6 οδηγούν σε διακλαδωμένες σφαιρικές διαμορφώσεις. Τα προϊόντα αυτά έχουν μοριακό βάρος μεταξύ 2.000-7.000 και συσσωρεύονται στα κενοτόπια.³³ Στο Σχήμα 1.14 φαίνεται η γενική δομή των πολυμερών προανθοκυανιδινών.²⁸



Σχήμα 1.14 Δομή ανώτερων μελών προανθοκυανιδινών²⁸

1.7.7 Βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών οξέων

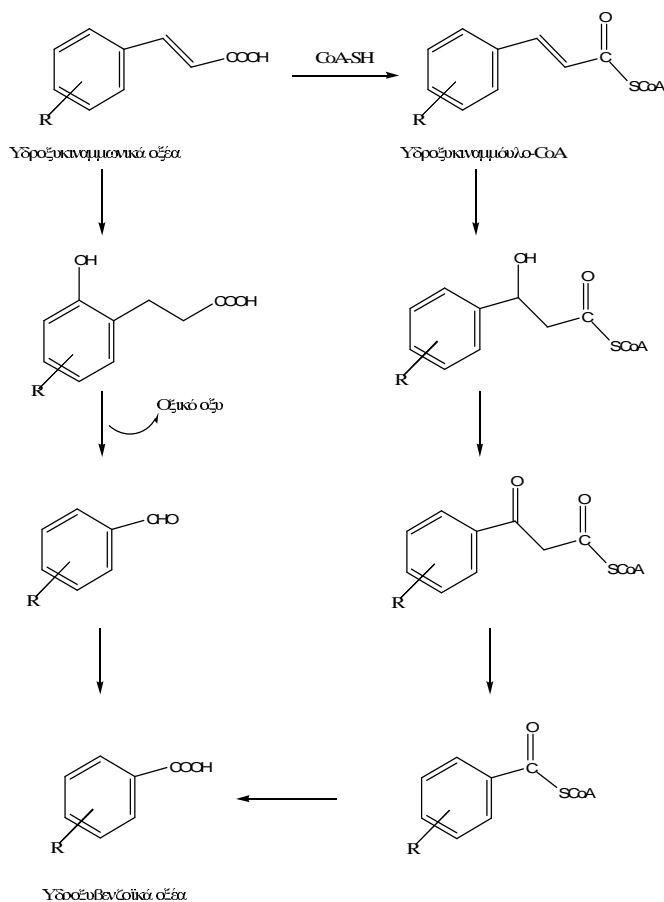
Η παρουσία των υδροξυβενζοϊκών οξέων (C6-C1) είναι σημαντική στα φυτά. Δομικά, τα μόρια αυτά είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, με κυριότερους εκπροσώπους το 4-υδροξυβενζοϊκό, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό, βανιλικό, γαλλικό και συριγγικό οξύ που εικονίζονται στο Σχήμα 1.15. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται είτε σε



Σχήμα 1.15 Δομή κυριότερων υδροξυβενζοϊκών οξέων που βρίσκονται στα φυτά³²

υδατοδιαλυτές τους μορφές ή προσκολλημένα σε τμήματα των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών οξέων, πιθανολογείται ότι υπάρχουν περισσότεροι του ενός βιοσυνθετικοί οδοί που οδηγούν στα επιμέρους οξέα, διαφέροντας ανάλογα με το είδος του φυτού. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κύρια οδός αφορά τη διάσπαση των υδροξυκινναμωμικών οξέων με παράλληλη αποβολή μορίων οξικού οξέος, με αλληλουχία αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μέσω των εστέρων του συνενζύμου A (σχήμα 1.16), κατά τρόπο ανάλογο με τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων³³. Όμως δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη και μιας δεύτερης βιοσυνθετικής οδού η οποία δεν προϋποθέτει τη συμμετοχή των ενεργοποιημένων από το συνένζυμο A υδροξικινναμικών οξέων. Για παράδειγμα,



Σχήμα 1.16 Βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών οξέων³²

τα υδροξυβενζοϊκά οξέα μπορεί να προκύψουν και από τη διάσπαση των φλαβονοειδών, ενώ το γαλλικό οξύ είναι δυνατόν να συντεθεί μέσω μιας διακλάδωσης της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος. Άλλωστε, η αρωματοποίηση της ενολικής μορφής του 3-δεϋδροσικιμικού οξέος είναι πιθανότατα η βασική βιοσυνθετική οδός του γαλλικού οξέος στα φυτά.^{33,61}

1.8 Βιολογική δράση πολυφαινολών–Αντιοξειδωτική δράση

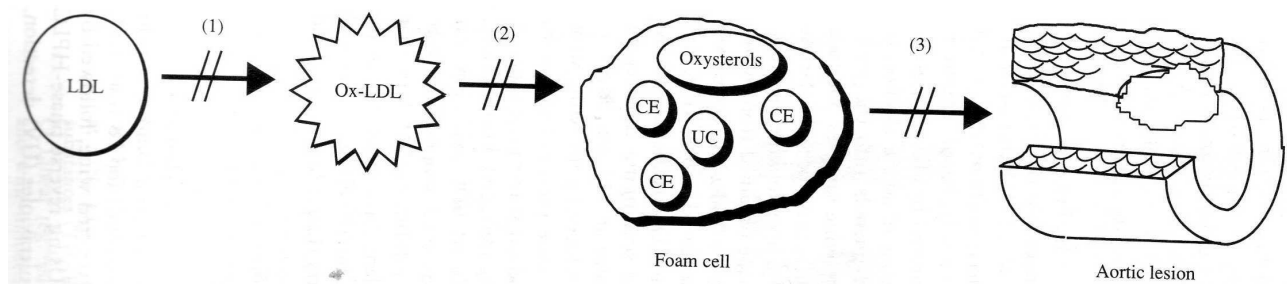
1.8.1 Εισαγωγή

Οι φαρμακολογικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών – μορίων που διαθέτουν περισσότερες από μια φαινόλες– έχουν κατά καιρούς διερευνηθεί σε βάθος, με αποτέλεσμα να έχουν προκύψει σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη βιοδραστικότητα των μορίων αυτών. Στο πλαίσιο αυτό, διαπιστώθηκε ότι τα μόρια αυτά διαθέτουν σημαντική αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, αντιμεταλλαξιγόνο και αγγειοδιασταλτική δράση. Πολλές από τις παραπάνω ιδιότητες ανάγονται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, δηλαδή στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, δηλαδή τα ιόντα του υπεροξειδίου και τις υπεροξυ ρίζες των λιπιδίων^{62, 63, 64, 65}. Τα οξειδωτικά αυτά παράγωγα συντίθενται στα κύτταρα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών. Επιπλέον, οι φαινόλες έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν αντική δράση έναντι των ιών HIV, Herpes simplex, Influenza και Rhinovirus,^{66–68} ενώ παράλληλα δρουν και ως αναστολείς των κινασών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

1.8.2 Αντιαθηρωματική δράση

Η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφικής οδού έχει αναφερθεί ότι μειώνει τα ποσοστά εμφάνισης συμβαμάτων των στεφανιαίων νόσων.⁶⁹ Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι φαινόλες συμβάλουν στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι η παρεμπόδιση της οξείδωσης της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη)–χοληστερόλης. Σύμφωνα με την υπόθεση της οξειδωτικής τροποποίησης της αθηροσκλήρωσης, η οξείδωση της LDL συμβάλει καθοριστικά στην αρχική γένεση της αθηρωμάτωσης.^{70–72} Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από αναφορές ότι η οξείδωση της LDL–χοληστερόλης λαμβάνει χώρα *in vivo*^{73–74}, και συμβάλλοντας σημαντικά στην κλινική εκδήλωση της αθηρωμάτωσης. Η οξειδωμένη μορφή της LDL είναι περισσότερο επικίνδυνη για την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης –σε σχέση τη μη οξειδωμένη– αφού συμβάλει και στην ενδοκυτταρική συσσώρευση οξειδωμένων λιπιδίων και στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Οι πολυφαινόλες

μπορούν να αποτρέψουν την οξείδωση των λιπιδίων της LDL, είτε μέσω της εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών ή της συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων, ή τέλος προστατεύοντας τα αντιοξειδωτικά συστήματα που συνδέονται με την LDL. Επιπλέον, η παρουσία των πολυφαινολών μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες αφού είναι δυνατόν να παρεμποδίσει τη δράση των κυτταρικών οξυγενασών, όπως της NADPH-οξειδάσης ενεργοποιώντας τη δράση των κυτταρικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, όπως το σύστημα της γλουταθειόνης⁷⁵⁻⁷⁶. Στο Σχήμα 1.17 παρουσιάζεται σχηματικά η προστατευτική επίδραση των πολυφαινολικών παραγώγων στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.



Σχήμα 1.17 Προστατευτική δράση των πολυφαινολών στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας.⁷⁰

Μια από τις συναφείς ιδιότητες των πολυφαινολών που συμβάλει στην πρόληψη της αθηρωμάτωσης αναφέρεται στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο ενδοθήλιο των αγγείων. Το NO παράγεται από την αργινίνη, μέσω ενός πολύπλοκου ενζυματικού συστήματος, θεωρείται δε ως ένας από τους πρωτεύοντες παράγοντες της αγγειοδιαστολής.^{10, 77} Το 1993 οι Fitzpatrick⁷⁸ και συνεργάτες, έδειξαν ότι ο οίνος, ο χυμός σταφυλιών και το εκχύλισμα από φλοιό σταφυλιών, εμποδίζουν τη συστολή των αορτικών δακτυλίων σε ποντίκια. Αντίστοιχο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποίησαν μόρια κερκετίνης και ρεσβερατρόλης υποδεικνύοντας ότι πιθανότατα η παρουσία των δυο αυτών πολυφαινολών είναι η αιτία για τη δράση αυτή.

1.8.3 Αντιμικροβιακή δράση

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα φυτικής προέλευσης φυσικά προϊόντα (φυτοχημικά) διαθέτουν μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μικροβιακής προέλευσης, όπως για παράδειγμα τα αντιβιοτικά.⁷⁹⁻⁸⁰ Όμως

η επιτακτική ανάγκη για την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών έχει στρέψει το ενδιαφέρον και προς την κατεύθυνση της μελέτης των φυτοχημικών. Για το σκοπό αυτό, η μελέτη των πολυφαινόλων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική, αφού είναι διαπιστωμένη η ικανότητά τους να εμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων των παθογόνων μικροοργανισμών στα φυτά. Επομένως είναι υπό έρευνα η δυνατότητα χρησιμοποίησης των μορίων αυτών στην αντιμετώπιση των παθογόνων για τον άνθρωπο μυκήτων, όπως τα παθογόνα *Candida albicans* και *Aspergillus flavus*.⁸¹

Οι περισσότερες έρευνες στον τομέα αυτό αφορούν τα εκχυλίσματα των φυτών που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, ενώ έχει μελετηθεί και η αντιμικροβιακή δράση των ορισμένων καθαρών μορίων, όπως για παράδειγμα της (+)-κατεχίνης, *trans*-ρεσβερατρόλης, απιγενίνης, ναριγενίνης, κερκετίνης και των γλυκοζιτών της, του γαλλικού και καφεϊκού οξέος κλπ⁸². Στο πλαίσιο αυτό, αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι οι πολυφαινόλες επιδεικνύουν συνεργιστική δράση με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες κατά ανθεκτικών στελεχών των βακτηρίων^{83–85}, ενώ αρκετοί χρησιμοποιούν συνθετικά παράγωγα των φλαβονών⁸⁵, όπως για παράδειγμα οι Wang και συνεργάτες⁸⁹ που συνδύασαν την 5-υδροξυ-7,4-διμεθοξυφλαβόνη με μέταλλα μετάπτωσης ανακαλύπτοντας ότι έτσι αυξάνει η αντιβακτηριακή τους ικανότητα.. Όμως μόνο δυο είναι οι έρευνες που αφορούν την *in vivo* χορήγηση των φλαβονοειδών. Σε μια από αυτές⁸⁸ η χορήγηση από το στόμα κερκετίνης σε ινδικά χοιρίδια σε δόσεις των 142,9 mg/kg και 214,3 mg/kg, τα προστατέυσε από μόλυνση με τον παθογόνο μικροοργανισμό *shigella*, ενώ οι αντίστοιχοι μάρτυρες πέθαναν.

Πρέπει να αναφερθεί ότι παρά το πλήθος των ερευνών, αρκετά αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, γεγονός που θα πρέπει να αποδοθεί στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης.

1.8.4 Αντική δράση

Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερευνητική προσπάθεια για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των φλαβονοειδών, ιδιαίτερα κατά των ιών που καταστέλλουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για παράδειγμα ο HIV (Human Immunodeficiency Virus) και ιδιαίτερα το στέλεχος HIV-1 και τα ένζυμα του. Για το σκοπό αυτό, ποικίλες *in vitro* έρευνες έδειξαν ότι το φλαβονοειδές βαϊκαλίνη –που έχει απομονωθεί από κινέζικά βότανα– εμποδίζει τη μόλυνση και τη

αναπαραγωγή του ιού.^{89–90} Όμως και η κατεχίνες έχει βρεθεί ότι αδρανοποιούν την ανάστροφη αντιγραφάση του ιού, όμως επειδή παράλληλα αδρανοποιούν και άλλες πολυμεράσες του DNA, θεωρούνται ως μη ειδικές για την καταστολή των ενζύμων του HIV-1⁹¹. Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι και οι φλαβονόλες μυρισετίνη και κερκετίνη παρεμποδίζουν το ένζυμο ιντεγγραφή του ιού,⁹² ενώ σε έρευνα των Hu και συνεργατών⁹³, βρέθηκε ότι το φλαβονοειδές χρύσινο οδηγεί σε καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με 21 φυσικά και 13 συνθετικά φλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν προστατευτική δράση και έναντι άλλων ιών. Για παράδειγμα η κερκετίνη, η ρουτίνη, η διυδροκερκετίνη, η μορίνη, η λευκοκυανιδίνη, η πελαργονιδίνη και η κατεχίνη, έχει αποδειχθεί ότι είναι δραστικά κατά διαφόρων τύπων ιών, όπως οι herpes simplex virus (HSV), poliovirus και sindbis virus.^{94–95}

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν συνεργιστική δράση μεταξύ τους αλλά και με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες. Για παράδειγμα η καμπερόλη σε συνδυασμό με τη λουτεολίνη είναι περισσότερο αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του HSV.⁹⁶

1.8.5 Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών

1.8.5.1 Επιδημιολογικές μελέτες

Το πλήθος των επιδημιολογικών μελετών για την προστατευτική δράση των πολυφαινολών στην πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου είναι εντυπωσιακό.⁹⁷ Σε μια έρευνα που διεχρήχθη στη Σαγκάη μεταξύ 1996 έως 1998, και περιελάμβανε 250 γυναίκες με καρκίνο του μαστού, οι Dai και συνεργάτες⁹⁸ ανέφεραν ότι η συγκέντρωση ισοφλαβονοειδών και λιγνανίων στα ούρα των γυναικών αυτών ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αντίστοιχο δείγμα γυναικών που δεν είχαν αναπτύξει καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι δίαιτα πλούσια σε φλαβονοειδή πιθανόν να σχετίζεται με μειωμένη εμφάνιση καρκίνου του στήθους.

Σε μια μεγάλη πληθυσμιακή έρευνα στη Φινλανδία η οποία διήρκεσε 25 χρόνια και περιελάμβανε άτομα 15–90 ετών —τα οποία αρχικά δεν είχαν καρκίνο— βρέθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα και άλλων κακοήθων όγκων, σε σύγκριση με τα άτομα που το διαιτολόγιό τους ήταν φτωχό σε πολυφαινόλες.⁹⁹ Αναλύοντας τα δεδομένα οι ερευνητές βρήκαν ότι στον ανδρικό

πληθυσμό αυξημένη πρόσληψη σε κερκετίνη μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, ενώ αυξημένη πρόσληψη σε μυρισετίνη συνδεόταν με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλες επιδημιολογικές μελέτες,^{100–101} ενώ επιπλέον βρέθηκε ότι η πρόσληψη πολυφαινόλων μειώνει σε ποσοστό 70% το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του φάρυγγα, του οισοφάγου και της στοματικής κοιλότητας.¹⁰²

1.8.5.2 Αντικαρκινική δράση κυριότερων πολυφαινόλων στον οίνο

Κερκετίνη

Η φλαβονόλη κερκετίνη επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικής δραστηριότητας, αφού είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει την ανάπτυξη κυττάρων από καρκινικούς όγκους του ανθρώπου, όπως από τους καρκίνους του στομάχου,¹⁰³ του παχέος εντέρου,^{104–105} του προστάτη¹⁰⁶ και του μαστού.¹⁰⁷ Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι καταστέλλει σε μύες την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου, της μήτρας,¹⁰⁸ του μελανώματος¹⁰⁹ και του εντέρου¹¹⁰. Κατά τη φάση ένα των κλινικών ερευνών η κερκετίνη που χορηγήθηκε σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου των ωοθηκών μειώνοντας κατά έξι φορές τη συγκέντρωση στο πλάσμα του καρκινικού πρωτεϊνικού δείκτη CA125. Σε άλλους ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο στο ήπαρ, η χορήγηση κερκετίνης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του καρκινικού δείκτη φετοπρωτεΐνη στον ορό του αίματος.¹¹¹ Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, χορήγηση υδατοδιαλυτής πρόδρομης ένωσης της κερκετίνης ήταν αναποτελεσματική, πιθανότατα λόγω κακής απορρόφησης.¹¹²

(+)-Κατεχίνη

Κλινικές έρευνες έχουν δείξει ότι η φλαβονόνη κατεχίνη είναι αποτελεσματική στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανθρώπινων κυτταρικών σειρών που προέρχονται από καρκίνο του προστάτη και του μαστού,^{106–107, 113} όπως επίσης και στην παρεμπόδιση καρκινογένεσης στο ήπαρ των μυών¹¹⁴. Νεότερες έρευνες έδειξαν ότι η (+)-κατεχίνη μειώνει κατά 75% την εμφάνιση όγκων σε μύες με ελαττωματική σειρά γονιδίων, η οποία προκαλεί την αυτόματη ανάπτυξη όγκων στο έντερο.¹¹⁵

Trans-Ρεσβερατρόλη

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες της *trans*-ρεσβερατρόλης έχουν ερευνηθεί σε βάθος. Το 1997 αναφέρθηκε ότι η χορήγηση 1–25 μM *trans*-ρεσβερατρόλης παρεμπόδισε την έναρξη και εξάπλωση καρκίνων του δέρματος και του μαστού σε μύες.¹¹⁶ Επίσης έγινε έρευνα σχετικά με την αντιμεταλλαξιγόνο δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης.¹¹⁷ Είναι όμως χαρακτηριστικό ότι αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη διαθέτει ιδιαίτερα αποτελεσματικές αντικαρκινικές ιδιότητες σε ποικίλα σημεία της διαδικασίας για την ανάπτυξη των νεοπλασιών.¹¹⁸ Η εξήγηση της ιδιαίτερης δραστηριότητας της *trans*-ρεσβερατρόλης σχετίζεται πιθανότατα με τη διαπιστωμένη ιδιότητά της να ενεργοποιεί σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<1 μM), μηχανισμούς που σχετίζονται είτε με την απόπτωση ή με το σύστημα των υποδοχέων των αρυλο-υδρογονανθράκων, ενός μηχανισμού που επάγει την πρόληψη της καρκινογένεσης.^{119–121}

Τέλος, η *trans*-ρεσβερατρόλη εμποδίζει τη μετάσταση των πρώιμων όγκων σε μύες μέσω παρεμπόδισης της αγγειογένεσης, ενός μηχανισμού που επάγει την εξάπλωση των αιμοφόρων αγγείων στους καρκινικούς ιστούς, αποκόποντας έτσι τα μεταλλαγμένα κύτταρα από μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών.¹²¹

Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων και είναι ευρέως διαδεδομένο σε φρούτα και λαχανικά. Το γαλλικό οξύ και οι εστέρες του έχει βρεθεί ότι διαθέτουν σημαντική κυτταροστατική δράση σε όγκους του πνεύμονα, στομάχου και έντερου των ζώων και σε λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου^{122–124}. Οι ενώσεις του γαλλικού οξέος έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού και τις μεταλλάξεις σε μύες, ενώ επάγουν την απόπτωση σε λεμφοκύτταρα του ανθρώπινου αίματος και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη.^{125–128}

Καφεϊκό και Φερουλικό οξύ

Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, επιδεικνύουν αξιολογική προστατευτική δράση κατά της καρκινογένεσης, πιθανότατα μέσω της παρεμπόδισης του σχηματισμού των N-νιτροσοπροϊόντων στον οργανισμό. Σε *in vitro* πειράματα, τα οξέα αυτά έδειξαν ότι αντιδρούν με NO_2 , ενώ σε *in vivo* δοκιμασίες ανέστειλαν το σχηματισμό της νιτροζαμίνης. Αντίστοιχα, σε προσομοιώσεις του γαστρικού υγρού, τα οξέα αυτά αντέδρασαν ταχύτατα και ποσοτικά με ισομοριακή ποσότητα NaNO_2 . Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι όσο στα *in vivo* όσο και στα *in vitro* πειράματα, το

καφεϊκό πάντοτε παρουσίασε υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με το φερουλικό.^{10,129}

1.8.6 Αντιαγγειογενετική δράση

Η αγγειογένεση αναφέρεται στη διαδικασία ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων εμπλεκόμενη σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η επούλωση των τραυμάτων, οι αναπαραγωγικοί κύκλοι, αλλά και η ανάπτυξη των καρκινικών όγκων, οι μεταστάσεις, ο διαβήτης και οι χρόνιες λοιμώξεις. Επομένως, η καταστολή της ανώμαλης αγγειογένεσης μπορεί να αποτελέσει βασική στρατηγική για τη θεραπεία των αντίστοιχων νοσημάτων.¹³⁰

Αρκετές φυσικής προέλευσης πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν τη ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον αρκετά από τα μόρια αυτά έχει διαπιστωθεί ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων σε ζώα. Για παράδειγμα, η *trans*-ρεσβερατρόλη καταστέλλει τη *in vivo* αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες FGF-2 (fibroblast growth factor-2) και VEGF (vascular endothelial growth factor).¹³¹ Επίσης, αναστέλλει άμεσα *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μεταφορά/ανάπτυξη καρκινικών όγκων¹³². Ένας από τους στόχους της ρεσβερατρόλης στα κύτταρα του ενδοθηλίου είναι το μονοπάτι των κινασών της MAP (mitogen activated protein), όπως είναι εμφανές από πειράματα για την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης των κινασών της MAP.¹³¹ Αντίστοιχα, η κερκετίνη, επιδεικνύει παρόμοιες ιδιότητες με την *trans*-ρεσβερατρόλη, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις.¹³² Η παρεμποδιστική δράση αυτών των μορίων αυτών μπορεί να συνδεθεί με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους και την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τις πρωτεάσες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, όπως για παράδειγμα οι MMPs (matrix metalloproteinases).¹³³

1.8.7 Οιστρογονική δράση

Αρκετές πολυφαινόλες διαθέτουν αγωνιστική οιστρογονική δράση αφού συναγωνίζονται τα ενδογενή οιστρογόνα, κυρίως στην πρόσδεση με τους οιστρογονικούς υποδοχείς β (ER β), με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών οδών των οιστρογόνων. Στα μόρια με οιστρογονική δράση περιλαμβάνονται οι ισοφλαβόνες, τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες με

χαρακτηριστικότερους εκπροσώπους τις κερκετίνη, απιγενίνη, γενιστεΐνη και *trans*-ρεσβερατρόλη¹³⁰. Η οιστρογονική δράση των μορίων αυτών στον οργανισμό συσχετίζεται με την ικανότητα τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ορμονοεξαρτώμενων (από οιστρογόνα) καρκινικών κυττάρων.^{134, 135}

1.8.8 Πιθανές ανεπιθύμητες δράσεις των πολυφαινολών

Παρά τις εκτεταμένες μελέτες για τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών στην υγεία, η πιθανή τους τοξικότητα είναι ένα πεδίο που δεν έχει ακόμη διερευνηθεί σε βάθος. Μια επιπλέον επιφύλαξη που διατυπώνεται για τα μόρια αυτά αφορά την πιθανή αρνητική τους επίδραση στην απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα άλλων επωφελών διατροφικών συστατικών, κυρίως των πρωτεϊνών. Η μείωση της απορρόφησης των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την απευθείας καθίζηση των πρωτεϊνών είτε μέσω της παρεμπόδισης των ενζύμων τους¹³⁶. Για παράδειγμα, οι τανίνες σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και ένζυμα^{137, 138}, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία τους μειώνει την απορρόφηση ιχνοστοιχείων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός^{139, 140}. Παρά τις παρατηρήσεις αυτές, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η συμπλοκοποίηση με τα μέταλλα αυτά είναι ορισμένες φορές ωφέλιμη, αφού αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους εκδηλώνεται ο αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών.

1.8.8.1 Προοξειδωτική Δράση

Οι πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής έχουν εμφανίσει και προοξειδωτική δράση σε συστήματα που περιλαμβάνουν μεταλλικά ιόντα. Για παράδειγμα, παρουσία O₂ τα μέταλλα μετάπτωσης όπως ο Cu και ο Fe καταλύουν αντιδράσεις των φαινολικών ουσιών που οδηγούν στην απελευθέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και φαινοξυλο ριζών που είναι δυνατόν να βλάψουν το DNA, τα λιπίδια και άλλα βιολογικά μόρια.¹⁴¹ Οι φαινοξυλο ρίζες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης, μέσω της καταλυτικής οξείδωσης της τυροσίνης σε μια ρίζα της τυροσόλης, η οποία στη συνέχεια οξειδώνει την LDL-χοληστερόλη.¹⁴² Είναι γεγονός ότι η υπερβολική πρόσληψη πολυφαινολών, μπορεί συσχετιστεί με ποικίλα –ανεπιθύμητα για την υγεία– αποτελέσματα, όπως η

καρκινογένεση, η γονιδιοτοξικότητα, οι αλληλεπιδράσεις με άλλες φαρμακευτικές ουσίες, η τοξική επίδραση στο θυρεοειδή και η οιστρογονική δράση.^{136, 143}

Σε πειράματα διαρροής μυών από τους Ray και συνεργάτες,¹⁴⁴ με χορήγηση εκχυλίσματος σταφυλιών πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες σε ποσότητες από 0,5 έως 2 g ανά kg σωματικού βάρους, δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα. Αντίθετα, η χορήγηση υψηλών δόσεων κερκετίνης (2%—4%), σε διαφορετικού τύπου μύες, οδήγησε στην ανάπτυξη χρόνιας νευροπάθειας,¹⁴⁵ ενώ σε μια άλλη έρευνα η χορήγηση κερκετίνης κατά 0,1% στη διατροφή μείωσε σημαντικά το προσδόκιμο ζωής των μυών.¹⁴⁶ Αντίστοιχα, η προσθήκη 2% καφεϊκού οξέος στη διατροφή διαφόρων τύπων μυών, προκάλεσε την ανάπτυξη καρκινικών όγκων στο στομάχι και τα νεφρά.¹⁴⁷ Σε δόσεις 0,1%—1% οι κατεχίνες που περιέχονται στο πράσινο τσάι ενισχύουν στην ανάπτυξη όγκων στο ορθό των αρσενικών αρουραίων, ενώ η κερκετίνη σε υψηλές δόσεις παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, σε μικρές δόσεις (1—5 μmol/L) ενισχύει τον πολλαπλασιασμό τους.^{48, 149}

Τέλος, η οιστρογονική δράση ορισμένων πολυφαινολών—κυρίως ισοφλαβονών— ενώ έχει θετικά αποτελέσματα οδηγεί όμως και σε ανεπιθύμητες παρενέργειες, αφού η μεγάλη πρόσληψη ισοφλαβονών έχει συνδεθεί με τη μειωμένη γονιμότητα στα ζώα και την αναστολή παραγωγής της ωχρινοτρόπου ορμόνης στις γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση.^{50, 151, 152} Επίσης έχουν προκύψει ερωτηματικά σχετικά με τη σεξουαλική ωρίμανση των αρρένων νηπίων, των οποίων η διατροφή περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες ισοφλαβονών (κυρίως στις Ασιατικές χώρες).^{153–154}

Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι οι περισσότερες από αυτές τις έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί είτε *in vitro* ή σε ζώα, με αποτέλεσμα τα ευρήματά τους να μην έχουν ακόμα συνδεθεί με τον ανθρώπινο οργανισμό.

1.9 Σχέση δομής –αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, είναι η πλέον μελετημένη βιολογική τους λειτουργία. Η δραστηριότητα των πολυφαινολών ως ισχυρών εκκαθαριστών των ελευθέρων ριζών *in vitro* έχει αποδειχθεί τόσο με τη χρήση συνθετικών ελευθέρων ριζών (ABTS, DPPH) όσο και σε ρίζες που παράγονται με φυσιολογικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα οι υπεροξυ και υδρόξυλο ρίζες και τα υπεροξειδία.¹⁵⁵

Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν ένα φαινολικό παράγωγο ως αντιοξειδωτικό είναι οι παρακάτω:

- Η δράση της ως δότης υδρογόνου ή ηλεκτρονίων, δηλαδή το αναγωγικό δυναμικό της.
- Η σταθερότητα της προκύπτουσας φαινολικής ρίζας, γεγονός που συνδέεται με την ικανότητα σταθεροποίησης και απεντοπισμού του ηλεκτρονιακού ζεύγους.
- Η δυνατότητα αντίδρασης με άλλες αντιοξειδωτικά

Η χημική δομή των πολυφαινολών σχετίζεται άμεσα με την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, γεγονός στο οποίο έγκειται η αντιοξειδωτική τους δράση.⁶²

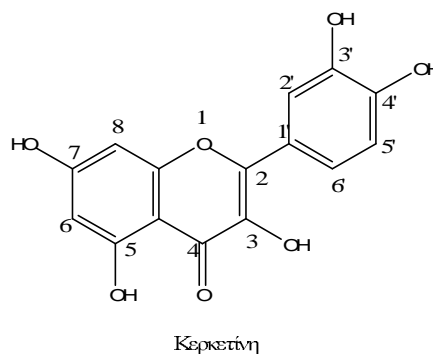
1.9.1.1 Φλαβονοειδή

Είναι γνωστό ότι τα φλαβονοειδή τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών δίνοντας υδρογονοάτομα στις υπεροξυ ρίζες, οπότε προκύπτουν ρίζες των φλαβονοειδών που με τη σειρά τους αντιδρούν με άλλες ελεύθερες ρίζες τερματίζοντας έτσι την αλυσίδα των αντιδράσεων.⁵⁶ Εκτός από την αντιοξειδωτική τους ικανότητα κάποια φλαβονοειδή έχουν την ιδιότητα να δρουν ως συμπλοκοποιητές μετάλλων, παρεμποδίζοντας την αντίδραση Fenton που αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS).¹⁵⁷

Γενικά, η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών παραγώγων εξαρτάται από τον αριθμό¹⁵⁸. Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, τα δομικά χαρακτηριστικά που προάγουν την αντιοξειδωτική δράση τους μορίων είναι τα παρακάτω:

- Η παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C. Μόρια όπως η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη (φλαβανόνες), η κερκετίνη, και η μυρισετίνη (φλαβονόλες) που διαθέτουν υδροξυλομάδα στον C-3, διαθέτουν μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σύγκριση με άλλα φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη (φλαβόνη) και η ναριγενίνη (φλαβανόνη) που δεν έχουν υδροξύλιο στη θέση αυτή.¹⁵⁹
- Η ύπαρξη διπλού δεσμού μεταξύ C2-C3 στο δακτύλιο C. Η υδρογόνωση αυτών των δεσμών μειώνει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου¹⁵⁵.
- Ο συνολικός αριθμός των υδροξυλομάδων του μορίου. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών των φλαβονοειδών αυξάνει με τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο δακτύλιο B και ιδιαίτερα στη θέση C-3'. Αντίστοιχα, μειώνεται δραματικά όσο ελαττώνεται ο αριθμός τους.¹⁶⁰

- Η θέση των υδροξυλομάδων, αφού η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις C-5 και C-7 του δακτυλίου A, στις θέσεις C-3' και C-4' του δακτυλίου B και C-3 του δακτυλίου C, συνεισφέρει σημαντικά στην παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιπιδίων.¹⁵⁶
- Η παρουσία γλυκοζιτικών δεσμών. Οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών διαθέτουν μειωμένη *in vitro* ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα άγλυκα μόρια, αφού η ύπαρξη γλυκοζιτικού δεσμού μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των γειτονικών υδροξυλίων λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.^{62, 161}
- Η παρουσία μεθοξυ υποκαταστατών –λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης– μειώνει επίσης την *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών.¹⁵⁶
- Τα φλαβονοειδή που διαθέτουν ταυτόχρονα καρβονυλομάδα στον C-4 και υδροξυλομάδα σε C-3 ή C-5, όπως η κερκετίνη και η ρουτίνη, σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα όπως για παράδειγμα τα ιόντα σιδήρου¹⁶². Η ικανότητά τους αυτή πιθανόν να συμβάλει και στην παρεμπόδιση της παραγωγής ελευθέρων ριζών μέσω του συστήματος Fenton, όπως ήδη αναφέρθηκε. Επιπλέον τα φλαβονοειδή διατηρούν την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, ακόμα και όταν βρίσκονται σε σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου.¹⁵⁷



Σύμφωνα με τα παραπάνω η κερκετίνη αποτελεί ένα πρότυπο αντιοξειδωτικό μόριο, πληρώνοντας όλες τις προϋποθέσεις για αποτελεσματική εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.⁶²

1.9.1.2 Φαινολικά οξέα

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους είναι συνάρτηση του αριθμού των υδροξυλομάδων εκάστου μορίου. Έτσι, τα υδροξυλωμένα κινναμωμικά οξέα είναι καλύτεροι δότες πρωτονίων από τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά.⁶² Αντίθετα, η καρβοξυλομάδα των βενζοϊκών οξέων έχει αρνητική επίδραση στην ικανότητα των μορίων να προσφέρουν υδρογόνα.

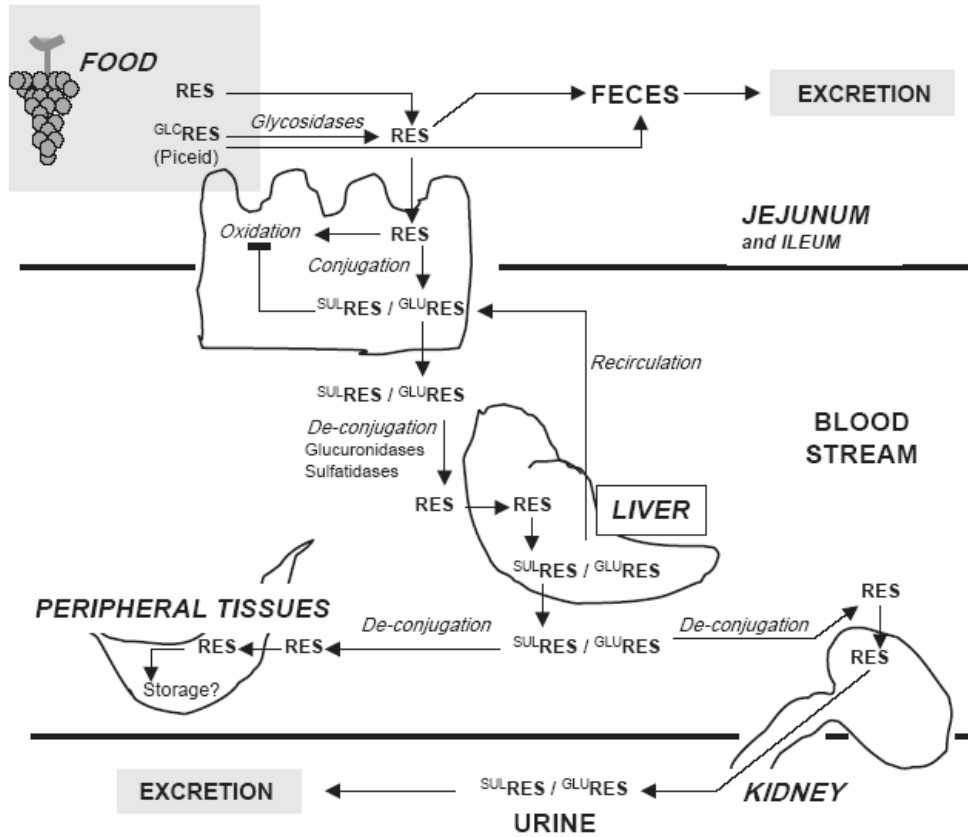
1.10 Βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολισμός των πολυφαινολών

Οι επωφελείς για την υγεία επιδράσεις από την πρόσληψη των φαινολικών παραγώγων είναι σε άμεση συνάρτηση με το βαθμό απορρόφησής τους από τον οργανισμό και το μεταβολισμό τους.^{163, 136} Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει η δομή, ο βαθμός πολυμερισμού, η πιθανή σύνδεση με σάκχαρα, το μοριακό βάρος και η διαλυτότητά τους¹⁶⁴. Η επικρατούσα άποψη ότι η απουσία γλυκολυτικών ενζύμων στο έντερο επιτρέπει την απορρόφηση μόνο των άγλυκων φαινολών¹⁶⁵ αναθεωρήθηκε, αφού νεότερα ευρήματα έδειξαν ότι και οι γλυκοζίτες των πολυφαινολών μπορούν να περάσουν από τα τοιχώματα του εντέρου. Έτσι αποδείχθηκε ότι η απορρόφηση των γλυκοζιτών της κερκετίνης των τηγανητών κρεμμυδιών ήταν σχεδόν διπλάσια σε σύγκριση με την απορρόφηση της κερκετίνης που δίνεται από το στόμα.¹⁶⁶ Υπάρχει επίσης ο ισχυρισμός ότι η βιοδιαθεσιμότητα των γλυκοζιτών της κερκετίνης εξαρτάται από το είδος των σακχάρων που έχει ως υποκαταστάτες. Για παράδειγμα η γλυκόζη ως υποκαταστάτης αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα.¹⁶⁷ Αντίστοιχα ευρήματα έδειξαν ότι ο πικεΐδης (γλυκοζίτης της ρεσβερατρόλης), είναι σταθερότερος, περισσότερο υδατοδιαλυτός και απορροφάται καλύτερα από το έντερο σε σύγκριση με το άγλυκο του τμήμα (ρεσβερατρόλη)⁵². Βέβαια η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών παραγώγων επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως είναι οι διαφοροποιήσεις στα κυτταρικά τοιχώματα και η θέση των πολυφαινολών στα κύτταρα.¹⁶⁸

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η απορρόφηση των γλυκοζιτών των φαινολικών παραγώγων από τη γαστροεντερική οδό δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, όμως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή ποικίλων πρωτεϊνών και ενζύμων (πχ υδρολάσες, ενεργοί μεταφορείς σακχάρων) στη διαδικασία αυτή.¹⁶⁸⁻¹⁷¹

Γενικά εκτιμάται ότι περίπου το 5-10% της συνολικής προσλαμβανομένης ποσότητας των πολυφαινολών απορροφάται από το λεπτό έντερο. Από τη χλωρίδα του εντέρου εκλύονται ένζυμα που υδρολύουν τους γλυκοζίτες, διασπούν τις μεγάλου μοριακού βάρους πολυφαινόλες, ενώ παράλληλα διασπούν και τους ετεροκυκλικούς δακτυλίους που περιέχουν οξυγόνο.¹⁷²⁻¹⁷³ Όσα από τα φαινολικά δεν απορροφώνται στο έντερο, μαζί με τις ουσίες που μεταβολίζονται στο ήπαρ, εισέρχονται στο ορθόν.^{171, 173}

Κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού οι πολυφαινόλες υπόκεινται μετατροπές, όπως μεθυλίωση ή θείωση, παράγοντας μεταβολίτες με μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού πλέον διαθέτουν λιγότερες υδροξυλομάδες.^{172, 174} Στο σχήμα 1.18 περιγράφεται ο μεταβολισμός της *trans*-ρεσβερατρόλης στον ανθρώπινο οργανισμό.



Σχήμα 1.18 Μεταβολισμός της *trans*-ρεσβερατρόλης στον οργανισμό⁵²

1.11 Επίδραση των πολυφαινολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων

Οι πολυφαινόλες συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών πολλών τροφίμων. Η στυφή γεύση που τους προσδίδουν αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην καταβύθιση των γλυκοπρωτεϊνών του σιέλου και των πολυσακχαριτών επάνω στη γλώσσα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των αισθημάτων της ξηρότητας και τραχύτητας.¹⁷⁵⁻¹⁷⁶

Οι πολυφαινόλες σχηματίζουν μη υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με τις πλούσιες σε προλίνη πρωτεΐνες του σιέλου, οι οποίες είναι χαρακτηριστικό ότι παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με τα φαινολικά παράγωγα.¹⁷⁷ Η ένταση της στυφής αίσθησης είναι σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό των οργανοληπτικών των ερυθρών οίνων και αποδίδεται στην παρουσία των προανθοκυανιδινών (φλαβόνες) και των υδρολυόμενων τανινών¹⁷⁸ (παρ.1.7.6). Έτσι είναι πολύ σημαντικό να επιτυγχάνεται η σωστή αναλογία αντιοξειδωτικών φαινολικών συστατικών στον οίνο έτσι ώστε να μην επηρεαστούν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

Βιβλιογραφία 1^ο κεφαλαίου

- 1) Boulton R. B., Vernon L. S., Bisson L. F. and Kunkee R. E. Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall, N.Y. **1996**.
- 2) <http://www.wikipedia.org>
- 3) Δημητράκης Κ. Γ. Αμπελουργία.. Εκδ. Καλλιεργητής, Αθήνα **1995**.
- 4) Unwin T. Οίνος και Άμπελος. Εκδ. Ίων, Αθήνα **2003**.
- 5) Smart R. and Robinson M. Sunlight into wine : a handbook for winegrape canopy management. Adelaide : Winetitles **1991**.
- 6) www.practicalwinery.com
- 7) Mullins M. G., Bouquet A. and Williams L. E. Biology of the Grapevin. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge. **1992**.
- 8) Farkas J. Technology and Biochemistry of Wine, Gordon and Breach Science Publishers, N.Y. **1988**.
- 9) <http://w4u.eexi.gr/~oinos/GRGEO.HTM>
- 10) Soleas G. J., Diamandis E. P. and Goldberg D. M. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **1997**, *11*, 287—313.
- 11) <http://el.wikipedia.org>
- 12) Renfrew J. M. Archaeology and the origins of wine production in: Wine a scientific exploration. eds Sandler M. and Pinder R., Taylor & Francis, 2nd ed., N.Y. and London **2003**.
- 13) Michel R. H., McGovern P. E., Badler V. R. The First Wine& Beer: Chemical Detection Of Ancient Fermented Beverage. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, (8), 408A—413A.
- 14) McGovern P. E., Glusker D. L., Exner L. J., Voigt M. M. Neolithic resinated wine. *Nature* **1996**, *381*, 480—481.

- 15) Hyams E. Dionysus: a Social History of the Wine Tine. 2nd edn, London, Sidgwick& Jackson **1987**.
- 16) Younger W. Gods, Men and Wine. London: The Wine and Food Society **1966**.
- 17) Dodds E. R., Ed. Euripides Bacchae, 2nd ed. Oxford University Press **1960**.
- 18) Johnson H. The story of wine. Ed. Mitchell Beazly, London **1989**.
- 19) Norrie P.A. The history of wine as a medicine, in: Wine a scientific exploration. eds Sandler M. and Pinder R., Taylor & Francis, 2nd ed., N.Y. and London **2003**.
- 20) Lucia S. P. A history of Wine as Therapy, Philadelphia: J.B. Lippincott **1963**.
- 21) German J. B. The Health Benefits Of Wine. *Ann. Rev. Nutr.* **2000**, 20, 561—593.
- 22) Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, 339, 523—536.
- 23) Criqui M. H. and Ringel B. L. Does diet or alcohol explain the French paradox?, *Lancet* **1994**, 344, 1719—1723.
- 24) Gronbaek M. Alcohol, Type of Alcohol, and All-Cause and Coronary Heart Disease Mortality. *Ann. New Yor. Acad. Sci.* **2002**, 957, 16—20.
- 25) Renaud S. C., Guéguen R., Siest G., Salamon R. Wine, Beer, and Mortality in Middle-aged Men From Eastern France. *Arch. Intern. ed.* **1999**, 159, 1865—1870.
- 26) Naczk M. and Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 95—111.
- 27) Robards K. and Antonovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. A Review. *Analyst* **1997**, 122, 11R-34R.
- 28) Haslam E. Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, 1st edn, Cambridge **1998**.
- 29) Harborne J. B. The genetic variation of anthocyanin pigment in plant tissues, Phenolics in Plants in Health and Disease, ed J. B Pridham, Pergamon Press: Oxford and London **1960**.

- 30) Scott-Moncrieff R. The classical period in chemical genetics. *Notes Rec. Royal Soc. London* **1981**, 36 (1), 125—154.
- 31) Simpson T. J. Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Pathway. *Top. Cur. Chem.* **1998**, 195, 1—48.
- 32) Dey P. M. and Harborne J. B., Editors. Plant biochemistry , Academic Press London, U.K. **1997**.
- 33) Strack D. Phenolic Metabolism in: *Plant Biochemistry*, Ed. Dey P.M. and Harborne J.B. Academic Press, 1st edn, London and San Diego **1997**.
- 34) Kubitzki K. and Gottlieb O. R. Phytochemical aspects of angiosperm origin and evolution. *Acta Botanica Neerlandica* **1984**, 33, 457—468.
- 35) Kubitzki K. Phenylpropanoid metabolism in reaction to land plant origin and diversification. *J. Plant Phys.* **1987**, 131, 17—24.
- 36) Bonner C. A. and Jensen R. A. Novel features of prephenate aminotransferase from cell cultures of *Nicotiana glauca*. *Arc. Biochem. Biophys.* **1985**, 238 (1), 237—246.
- 37) Jung E., Zamir L. O. and Jensen R.A. Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, 83 (19), 7231—7235.
- 38) Achnine L., Blancaflor E. B., Rasmussen S. and Dixon R. A. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis, *The Plant Cell* **2004** 16, 3098—3109.
- 39) Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defense—a genomics perspective. *Mol. Plant Path.* **2002**, 3 (5), 371—390.
- 40) Hrazdina G., T, Zobel A. M., and Hoch H. C. Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8966—8970.

- 41) Hahlbrock K. and Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, *40*, 347–369.
- 42) Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485–493.
- 43) Bohm, B. A. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers **1998**.
- 44) Merken, H. M., & Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577–599.
- 45) Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (eds.). Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). London: Taylor & Francis **1999**.
- 46) H. Grisebach, *Z. Naturforsch. Teil B*, **1957**, *12*, 227.
- 47) Seigler D. Flavonoids. Plant Secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts **1998**.
- 48) Harborne, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry*, vol.1 Plant Phenolics, London: Academic Press **1989**.
- 49) Burbulis I. E. and Winkel-Shirley B. Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Biol.* **1999**, *96* (22), 12929–12934.
- 50) Koes R., Verweij W. and Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10* (5), 236–242.
- 51) Monagas M., Bartolome B. and Gomez-Cordoves C. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 85–118.

- 52) Signorelli P. and Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 449—466.
- 53) Langcake P. and Pryce R.J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **1977**, *33*, 151—152.
- 54) Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **2001**, *411*, 843—847.
- 55) Langcake P., Cornford C. A. , Pryce R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochem.* **1979**, *18*, 1025—1027.
- 56) Douillet-Breuil A.C., Jeandet P., Adrian M., Bessis R., (), Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47* (10), 4456—4461.
- 57) Regev-Shoshani G., Shoseyov O., Bilkis I., Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 157—163.
- 58) <http://biocyc.org>
- 59) Haslam E. Plant Polyphenols-Vegetable Tannins Revisited. Cambridge University Press: Cambridge **1989**.
- 60) Porter L. J. Flavans and Proanthocyanidins. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, ed J. B. Harborne, Chapman and Hall, London **1988**.
- 61) Dewick P. M. and Haslam E. Phenol Biosynthesis in Higher Plants: Gallic acid. *Biochem. J.* **1969**, *113*, 537—542
- 62) Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganda G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, *20* (7), 900—956.
- 63) Duarte J., Perez-Vizcainom F., Utrilla P., Jimenes J., Tanargo J. and Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* **1993a**, *24*, 857—862.
- 64) Duarte J., Perez-Vizcainom F., Zarzuelo A., Jimenes J. and Tanargo J. Vasodilatory effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **1993b**, *239*, 1-7.

- 65) Cody V., Middleton E., Harborne J. B and Beretz A. (eds). Plant flavonoids in biology and medicine II-Biological, cellular and medicinal properties, Liss A. R., New York **1988**.
- 66) Nonaka G., Nishioka I., Nishizawa M., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman G. E., Bodner A. J., Kilkuskie R. E., Cheng Y.-C. and Lee K.-H. Anti-AIDS agents 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cels. *J. Natl. Prod.* **1990**, *53*, 587–595.
- 67) Nakane H. and Ono K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2841–2845.
- 68) Khana M. T. H., Ather A.,Thompson K. D. and Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses, *Antiv. Res.* **2005**, *67*, 107–119.
- 69) Hertog M. G., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M, Simic B. S., Toshima H., Feskens E.J.M, Hollman P. C. H., Katan M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven country study. *Arch. Int. Medic.* **1995**,*155*, 381–386.
- 70) Aviram M. and Fuhrman. Wine flavonoids, LDL, cholesterol oxidation and atherosclerosis, in: Wine A Scientific Exploration, eds Sandler M. and Pinder R., Taylor & Francis, 2nd ed., N. Y. and London **2004**.
- 71) Witztum J. L. and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1785–1792.
- 72) Parthasarathy S., Santanam N., Auye N. Oxidized low density lipoprotein, a two faced janus in coronary artery disease? *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 279–284.
- 73) Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprptein with machrophages in atherosclerosis and the antiatherogenisity of antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1996**, *34*, 599–608.

- 74) Herttuala S. Y. Is oxidized low density lipoprotein present in vivo? *Cur. Opin. Lipidol.* **1998**, 9, 337–344.
- 75) Elliott A. J., Scheiber S. A., Thomas C. and Pardini R. S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, vol. 44, 1603–1608.
- 76) Rosenbalt M., Belinky P., Vaya J., Levy R., Hayek T., Coleman R., Merchav S., Aviram M. Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin, inhibits NADPH oxidase-induced cell mediated oxidation of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13790–13799.
- 77) Keaney J. F. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Progr. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38, 129–154.
- 78) Fitzpatrick DF, Hirschfield SL and Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* **1993**, 265, H774–H778.
- 79) Cushnie T. P. T. and Lamb A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Intern. J. Antimicrob. Agents* **2005**, 26, 343–356.
- 80) Yamada H. Natural products of commercial potential as medicines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, 2, 203–210.
- 81) Harborne J. B. and Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* **2000**, 55, 481–504.
- 82) Vaquero M. J. R., Alberto M. R. and Manca de Nadra M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **2007**, 8, 93–101.
- 83) Hamilton-Miller J. M. T. and Shah S. Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46, 852–853.
- 84) Shiota S, Shimizu M, Mizushima T, et al. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, 22, 1388–1390.

- 85) Stapleton P.D., Shah S., Anderson J.C., Hara Y., Hamilton-Miller J.M.T., Taylor P.W. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 23, 462–467.
- 86) Alcarad L. E., Blanco S. E., Puig O. N., Tomas F., and Ferretti F. H. Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.* **2005**, 205, 231–240.
- 87) Wang S. X., Zhang F.J., Feng Q.P., Li Y.L. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5- hydroxy-7,4_ dimethoxyflavone. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, 46, 251–257.
- 88) Vijaya K. and Ananthan S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian J. Pharm. Sci.* **1996**, 58, 191–193.
- 89) Wang J. M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 534–538.
- 90) Li B. Q., Fu T., Yan Y. D., Baylor N. W., Ruscetti F.W., Kung H. F. Inhibition of HIV infection by baicalin — a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine, *Cell Mol Biol Res.* **1993**, 39,119–124.
- 91) Moore P. S. and Pizza C. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem. J.* **1992**, 288, 717–719.
- 92) Ono K., Nakane H., Fukushima M., Chermann J. C., Barre-Sinoussi F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 190, 469–476.
- 93) Hu C. Q., Chen K., Shi Q., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure–activity correlation with some related flavonoid. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 42–51.
- 94) Middleton J. E. and Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, In: Harborne J.B.,

- editor. The flavonoids: advances in research since 1986. London, UK: Chapman & Hall **1993**.
- 95) Selway J. W. T. Antiviral activity of flavones and flavans In: Cody V. Middleton E, Harborne J. B., editors. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure–activity relationships. New York, NY: Alan R. Liss, Inc **1986**.
- 96) Amoros M., Simoes C. M., Girre L., Sauvager F., Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55,1732–1740.
- 97) Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med. Res. Rev.* **2003**, vol. 23,(4), 519–534.
- 98) Dai Q., Franke A. A., Jin F., Shu X.-O., Hebert J. R., Custer L. J., Cheng J., Gao Y.-T., and Zheng W. Urinary Excretion of Phytoestrogens and Risk of Breast Cancer among Chinese Women in Shanghai, *Cancer Epidemiol., Biomark. Prevent.* **2002**, 11, 815–821.
- 99) Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellewaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, 146, 223–230.
- 100) Le Marchand L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92,154–160.
- 101) De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M., Carzoglio J.C. Ronco A., Olivera L. Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* **1999**, 34, 100–110.
- 102) De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-II. Nutrients. *Oral Oncol.* **1999**, 35, 22–26.
- 103) Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N., Marui N., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A., The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett.* **1990**, 260,10–13.

- 104) Hosokawa N., Hosokawa Y., Sakai T., Yoshida M., Aoike A., Kawai K., Nishino H., Fukushima M. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possible cell-cycle-related 17 kDa protein in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 1119–1124.
- 105) Pawlikowska-Pawlega B., Jakubowicz-Gil J., Rzymowska J., Gawron A. The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2001**, *39*, 217–218.
- 106) Kampa M., Hatzoglou A., Notas G., Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P. M., Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* **2000**, *37*, 223–233.
- 107) Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P. M., Castanas E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **2000**, *78*, 429–441.
- 108) De S., Chakraborty J., Chakraborty R. N., Das S. Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice, *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 347–351.
- 109) Caltagirone S., Rossi C., Poggi A., Ranelletti F. O., Natali P. G., Brunetti M., Aiello F. B., Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 595–600.
- 110) Mahmoud N. N., Carothers A. M., Grunberger D., Bilinski R. T., Churchill M. R., Martucci C., Newmark H. L., Bertagnolli M. M. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 921–927.
- 111) Ferry D. R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D. W., De Takats P. G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics, and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 659–268.

- 112) Mulholland P. J., Ferry D. R., Anderson D., Hussain S.A., Young A. M., Cook J. E., Hodgkin E., Seymour L. W., Kerr D. J. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Ann Oncol.* **2001**, *12*, 245–248.
- 113) Chung L.Y., Cheung T. C., Kong S. K., Fung K. P., Choy Y. M., Chan Z. Y., Kwok T. T. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.*, **2001**, *68*, 1207–1214.
- 114) Liu L, Castonguay A. Inhibition of the metabolism and genotoxicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rat hepatocytes by (+)-catechin. *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 1203–1208.
- 115) Weyant M. J., Carothers A. M., Dannenberg A. J., Bertagnolli M. M. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation, and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res* **2001**, *61*, 118–125.
- 116) Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K.V., Thomas C. F., Beecher C.W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science* **1997**, *275*, 218–220.
- 117) Uenobe F., Nakamura S-I, Miyazawa M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat. Res.* **1997**, *373*, 197–200.
- 118) Hiroyuki N., Yasuhiko K., Yoshiko U., Hideto S., Nobuaki S., Koshiro H., Airo T. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2001**, *127*, 258–264.
- 119) Ciolino H. P., Daschner P. J., Yeh G. C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5707–5712.
- 120) Casper R. F., Quesne M., Rogers I. M., Shirota T. , Jolivet A. , Milgrom E., Savouret J. F. , (). Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 84–90.

- 121) Kimura Y., Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth, and metastasis to lung, and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr.* **2001**, *131*, 1844–1849.
- 122) Serrano A., Palacios C., Roy G., Cespon C., Villar M. L., Nocito M., Gonzalez-Porque P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 49–54.
- 123) Roy G., Lombardia M., Palacios C., Serrano A., Cespon C., Ortega E., Eiras P., Lujan S., Revilla Y., Gonzalez-Porque P. Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. *Arch Biochem Biophys.* **2000**, *383*, 206–214.
- 124) Saeki K., Yuo A., Isemura M., Abe I. I., Seki T., Noguchi H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1391–1394.
- 125) Liang Y. C., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., Lin J. K. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Cell Biochem.* **1999**, *75*, 1–12.
- 126) Muto S., Yokoi T., Gondo Y., Katsuki M., Shioyama Y., Fujita K., Kamataki T. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the lung of rpsL transgenic mice. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 421–424.
- 127) Li H. C., Yashiki S., Sonoda J., Lou H., Ghosh S. K., Byrnes J. J., Lema C., Fujiyoshi T., Karasuyama M., Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis *in vitro* in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**, *91*, 34–40.
- 128) Gupta S., Ahmad N., Nieminen A. L., Mukhtar H. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *164*, 82–90.
- 129) Kuenzig W., Chan J., Norkus E., et al. Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 309–313.

- 130)Cao Y. , Cao R., Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 380—390.
- 131)Brakenhielm E. Cao R., Cao Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes, *FASEB J.* **2001**, *15* , 1798—1800.
- 132)Igura K., Ohta T., Kuroda Y., Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* **2001**, *171*,11—16.
- 133)Garbisa S., Biggin S., Cavallarin N., Sartor L. Benelli R., Albini A. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1216.
- 134)Ranelletti, F. O., Ricci R., Larocca L. M., Maggiano N., Capelli A., Scambia G., P. Benedetti-Panici P., Mancuso S., Rumi C., and Piantelli M. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors, *Int. J. Cancer* **1992**, *50*, 486—492.
- 135)Shao Z. M., Alpaugh M.L., Fontana J. A., Barsky S. H. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/ CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J. Cell Biochem.* **1998**, *69*, 44—54.
- 136)Balasundram N., Sundram K., Samman S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* **2006**, *99*, 191—203.
- 137)Naczka, M., Oickle, D., Pink, D., Shahidi, F. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin, and protein concentrations., *J. Agric Food Chem.* **1996**, *44*, 2144—2148.
- 138)Naurato, N., Wong, P., Lu, Y., Wroblewski, K., & Bennick, A. Interaction of tannin with human salivary histatins. *J. Agric Food Chem.* **1999**, *47*, 2229—2234.
- 139)Reddy, M. B., & Cook, J. D. Assessment of dietary determinants of nonheme iron absorption in humans and rats, *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *54*, 723—728.

- 140) Samman, S., Sandstrom, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S. S., et al. Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption, *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 607–612.
- 141) Galati G. and O'Brien P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary Phenolics: significance for their chemopreventive and Anticancer properties. *Free Rad. Biol. Medic.* **2004**, *37*, (3) 287–303,.
- 142) Heinecke, J. W.; Li, W.; Francis, G. A.; Goldstein, J. A. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyses the oxidative cross-linking of proteins. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 437–444.
- 143) Mennen L. I., Walker R., Bennetau-Pelissero C., and Scalbert A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr.* **2005**, *81* (suppl), 326S–329S.
- 144) Ray S., Bagchi D., Lim P. M., et al. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **2001**, *109*, 165–197.
- 145) Dunnick J. K. and Hailey J. R. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1992**, *19*, 423–431.
- 146) Jones E. and Hughes R. E. Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. *Exp. Gerontol.* **1982**, *17*, 213–217.
- 147) Hagiwara A., Hirose M., Takahashi S., Ogawa K., Shirai T., Ito N. Forestomach and kidney carcinogenicity of caffeic acid in F344 rats and C57BL/6N – C3H/HeN F1 mice. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5655–5660.
- 148) Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, Shirai T. Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2- dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett.* **2001**, *168*, 23–29.
- 149) Van der Woude H., Gliszczynska-Swiglo A., Struijs K., Smeets A., Alink G. M., Rietjens I. M. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* **2003**, *200*, 41–47.

- 150) Bennetau-Pelissero C., Breton B. B., Bennetau B., et al. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2001**, *121*, 173–187.
- 151) Setchell K. D. R., Gosselin S. J., Welsh M. B., et al. Dietary estrogens: a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs, *Gen. Comp. Endocrinol.* **1987**, *93*, 225–233.
- 152) Cassidy A., Bingham S., Setchell K. D. R. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 333–340.
- 153) Setchell K. D. R., Zimmer-Nechemias L., Cai J., Heubi J. E. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* **1997**, *350*, 23–27.
- 154) Mendez M. A., Anthony M. S., Arab L. Soy-based formulae and infant growth and development. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2127–2130.
- 155) Rice-Evans C. and Packer L. (eds). *Flavonoids in health and Disease*. 2nd ed., Marcel Dekker, Inc, New York **2003**.
- 156) Cook N.C. and Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
- 157) Afanasev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., and Potapovitch, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1763–1769.
- 158) Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q. Corke H., Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* **2006**, *78*, 2872 –2888.
- 159) Das, N. P. and Ratty, A. K. Effect of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation, In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, New York **1986**.

- 160) Ratty, A. K. and Das, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **1988**, *39*, 69–79.
- 161) Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure– activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13* (10), 572– 584.
- 162) Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., and Yong, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *9*, 19–21
- 163) Parr, A. J., & Bolwell, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 985–1012.
- 164) Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317–333.
- 165) Kuhnau, J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Dietit.* **1976**, *24*, 117–191.
- 166) Hollman, P. C. H., de Vries, J. H. M., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. B., & Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1276–1282.
- 167) Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 937–942.
- 168) Hollman P. C., Van Trijp J. M., Mengelers M. J., De Vries J.H., Katan M.B. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man, *Cancer Lett.* **1997**, *114* (1-2), 139–140.
- 169) Clifford, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1103–1114
- 170) Murota, K., & Terao, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *417*, 12–17.

- 171) Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M.-T., & Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381–406.
- 172) Hollman, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?, *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 842–852.
- 173) Scalbert, A. and Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **2000**, *130*, 2073S–2085S.
- 174) Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, (5), 727–747.
- 175) Haslam, E., & Lilley, T. H. Natural astringency in foodstuffs: A molecular interpretation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1988**, *27*, 1–40.
- 176) Condelli N., Dinnella C., Cerone A., Monteleone E., Bertuccioli M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples, *Food Qual. Prefer.*, **2006**, *17*, 96–107.
- 177) Haslam E. Plant Polyphenols (*syn.* Vegetable Tannins) And Chemical Defense-- A Reappraisal. *J. Chem. Ecol.* **1998**, *14*, (10), 1789–1805.
- 178) Vidal, S., Leigh, F., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E., Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 57–65.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

2.1.1 Εισαγωγή

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων μιας *στατικής* και μιας *κινητής* φάσης οι οποίες βρίσκονται στη χρωματογραφική στήλη.¹⁻² Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, το μέγεθος των μορίων.³

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1903, από το Ρώσο Βοτανολόγο Tswett, στην προσπάθεια του να διαχωρίσει τις χρωστικές των πράσινων φύλλων χρησιμοποιώντας μια στήλη από CaCO₃.

Έκτοτε η τεχνική εξελίχθηκε και βελτιώθηκε καθιστώντας τη χρωματογραφία την πρώτη από τις ενόργανες τεχνικές ανάλυσης.

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης (LC), η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της κινητής φάσης μέσα από τη στατική επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών χαμηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από σχετικά μεγάλης διαμέτρου σωματίδια που παρουσιάζουν μικρή αντίσταση (κλασσική υγρή χρωματογραφία στήλης), είτε με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης υψηλής διαχωριστικής απόδοσης σωματίδια.³ Η τελευταία περίπτωση αποτελεί την **Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης** (High Performance Liquid Chromatography HPLC), η οποία αποτελεί μια γρήγορη τεχνική για την ανάλυση μιγμάτων ουσιών, παρέχοντας άμεσα τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό της κάθε ουσίας ξεχωριστά.

2.1.2 Τύποι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

Οι τεχνικές της HPLC, μπορούν να διαχωριστούν στους εξής τύπους με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού:³⁻⁴

- 1) Χρωματογραφία προσροφήσεως:
- 2) Χρωματογραφία κατανομής στήλης
- 3) Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
- 4) Χρωματογραφία ιονανταλλαγής
- 5) Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων
- 6) Χρωματογραφία συγγενείας

2.1.2.1 Υγρή-υγρή χρωματογραφία κατανομής στήλης

Στη χρωματογραφία κατανομής το στερεό υλικό της στήλης λειτουργεί αποκλειστικά ως υλικό στήριξης μιας λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσεως η οποία συνήθως είναι πολικού χαρακτήρα. Ως υλικά στήριξης χρησιμοποιούνται υλικά όπως: πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, γη διατόμων, κυτταρίνη, πολυστυρένιο.²

Ο μηχανισμός διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος είναι η κατανομή. Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών διαφορετικής πολικότητας, της στατικής και της κινητής φάσης και διαλύονται. Το ποσοστό διάλυσης σε κάθε μια φάση, δηλαδή η πολικότητα των ουσιών, καθορίζει την ταχύτητα έκλουσης τους από τη στήλη. Οι ουσίες που διαλύονται ισχυρά στην υγρή στατική φάση συγκρατούνται στη στήλη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις ουσίες που διαλύονται ισχυρότερα στην κινητή φάση. Οι υγρές στατικές φάσεις υψηλής πυκνότητας είναι λιγότερο αποτελεσματικές από της χαμηλής πυκνότητας, καθώς η διάχυση και η μεταφορά μάζας λαμβάνουν χώρα με αργό ρυθμό.⁵

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος εξηγείται από τη “**Θεωρία των πλακών**”. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, κάθε στήλη χρωματογραφίας αποτελείται από ένα διαφορετικό αριθμό θεωρητικών ζωνών ή θαλάμων εξισορρόπησης μέσα από τους οποίους διέρχονται τα συστατικά και κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Κάθε θάλαμος αποτελεί μια θεωρητική πλάκα, η οποία είναι ο όγκος

της στήλης που απαιτείται προκειμένου να αποκατασταθεί ισορροπία κατανομής της ουσίας ανάμεσα στη στατική και κινητή φάση. Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από το συντελεστής κατανομής K , που ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στη στατική φάση C_s , προς τη συγκέντρωση της στην κινητή φάση C_m ³:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Σχέση (2.1)}$$

Ο θάλαμος εξισορρόπησης αποτελεί μια φανταστική έννοια που δε σχετίζεται με τις πραγματικές διαστάσεις της στήλης, βοηθάει όμως στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της στήλης καθώς όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών τόσο μεγαλύτερη είναι η αποτελεσματικότητα της στήλης.⁶

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) για μια ουσία μπορεί να υπολογιστεί από τη Σχέση 2.2:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_1} \right)^2 \quad \text{Σχέση (2.2)}$$

όπου t_R = ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας (retention time),

και w = το εύρος της κορυφής της ουσίας

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών εκφράζει την διεύρυνση των κορυφών είναι καθαρός αριθμός, ενώ οι όροι t_R και w μετρούνται σε cm ή mm καταγραφικού χάρτη ή σε μονάδες χρόνου min ή s.

Μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών σημαίνει οξείες κορυφές και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στήλης.

Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία κατανομής διαίρεται σε δύο κατηγορίες: τη χρωματογραφία **κανονικής φάσης**, στην οποία η στατική φάση είναι περισσότερο πολική από τη στατική, και στη **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης**, με την οποία επιτυγχάνονται καλύτεροι συντελεστές κατανομής K .

2.1.2.2 Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση αποτελείται από ένα πολικό υγρό, το οποίο διαβρέχει και καλύπτει το υλικό στήριξης, δημιουργώντας μια λεπτή στιβάδα, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα λιγότερο πολικό υγρό.³

2.1.2.3 Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RP HPLC)

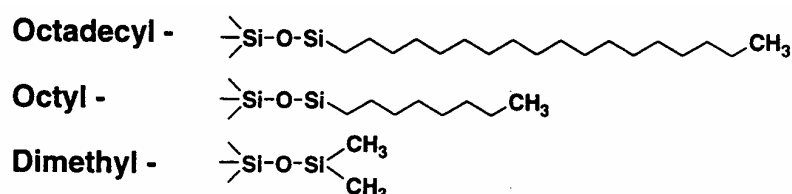
Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης καλύπτει την πλειονότητα των χρωματογραφικών εφαρμογών. Η διαφορά της από τη χρωματογραφία κανονικής φάσης έγκειται στο γεγονός ότι η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση. Σε αυτή την περίπτωση, τα συστατικά με μεγάλη πολικότητα παρουσιάζουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη, καθώς διαλύονται ισχυρά στην κινητή φάση, ενώ τα συστατικά με μικρή πολικότητα εκλούνται αργότερα, καθώς συγκρατούνται στη στατική φάση.³ Ως υγρή στατική φάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας οργανικός διαλύτης, όπως υδρογονάνθρακας ή διμεθυλοσιλοξάνιο, ενώ η κινητή συνήθως αποτελείται από μίγματα μεθανόλης, ακετονιτριλίου ή τετραυδροφοϋρανίου με νερό, τα οποία παρουσιάζουν συνήθως μεγαλύτερο ιζώδες από τους καθαρούς διαλύτες.

Επειδή οι υψηλή πίεση και οι μεγάλες ταχύτητες ροής που χρησιμοποιούνται στην HPLC, μπορεί να προκαλέσουν μηχανική απομάκρυνση μέρους της υγρής στατικής φάσης από το υλικό στήριξης, έχουν αναπτυχθεί υλικά πλήρωσης με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις που αποτελούν και τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσης στην HPLC. Αυτές οι στατικές φάσεις συνήθως αποτελούνται από πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, της οποίας οι ελευθερες ομάδες σιλανόλης συνδέονται ομοιοπολικά με την υγρή στατική φάση. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος σύνδεσης περιλαμβάνει την αντίδραση των ομάδων σιλανόλης (-Si-OH) με οργανοχλωροσιλάνια οπότε προκύπτει ο δεσμός (Si-O-Si-R₃) που είναι πολύ ισχυρός.² Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη στατική φάση στην RP HPLC, είναι αυτή όπου ο υποκαταστάσης R- είναι μια οκτυλο ή μια οκταδέκυλο ομάδα $R = -C_8H_{17}$ ή $R = -C_{18}H_{37}$ διαμορφώνοντας μια εξαιρετικά χαμηλής πολικότητας στατική φάση.

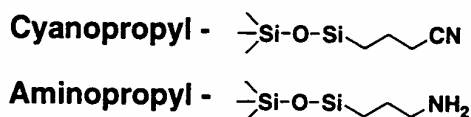
Χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται και στην χρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου ο υποκαταστάτης R- μπορεί να είναι: $R = -(CH_2)_3NH_2$ ή $R = -(CH_2)_3CN$. (Σχήμα 2.1)

Υπάρχουν δύο τεχνικές έκλουσης η ισοκρατική, κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή, και η βαθμιδωτή στην οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με σταθερό ρυθμό. Συνήθως στην RP HPLC επιτυγχάνονται καλύτεροι διαχωρισμοί με χρήση βαθμιδωτής έκλουσης.⁷

Η χρωματογραφία αντίστροφης χρησιμοποιείται πλέον για το μεγαλύτερο μέρος των αναλύσεων στη φαρμακευτική βιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό διαχωρισμό συστατικών όπως αμινοξέα, βιταμίνες, λιπαρά οξέα, στεροειδή, αλκαλοειδή, τετρακυκλίνες, προσταγλαδίνες κ.τ.λ. Αντίθετα οι χρήσεις της χρωματογραφίας κανονικής φάσης περιορίζεται στην ανάλυση μη ιονικών συστατικών που διαλυτοποιούνται μόνο σε άπολους διαλύτες, όπως το εξάνιο, και για το διαχωρισμό ισομερών.²



NORMAL PHASE:

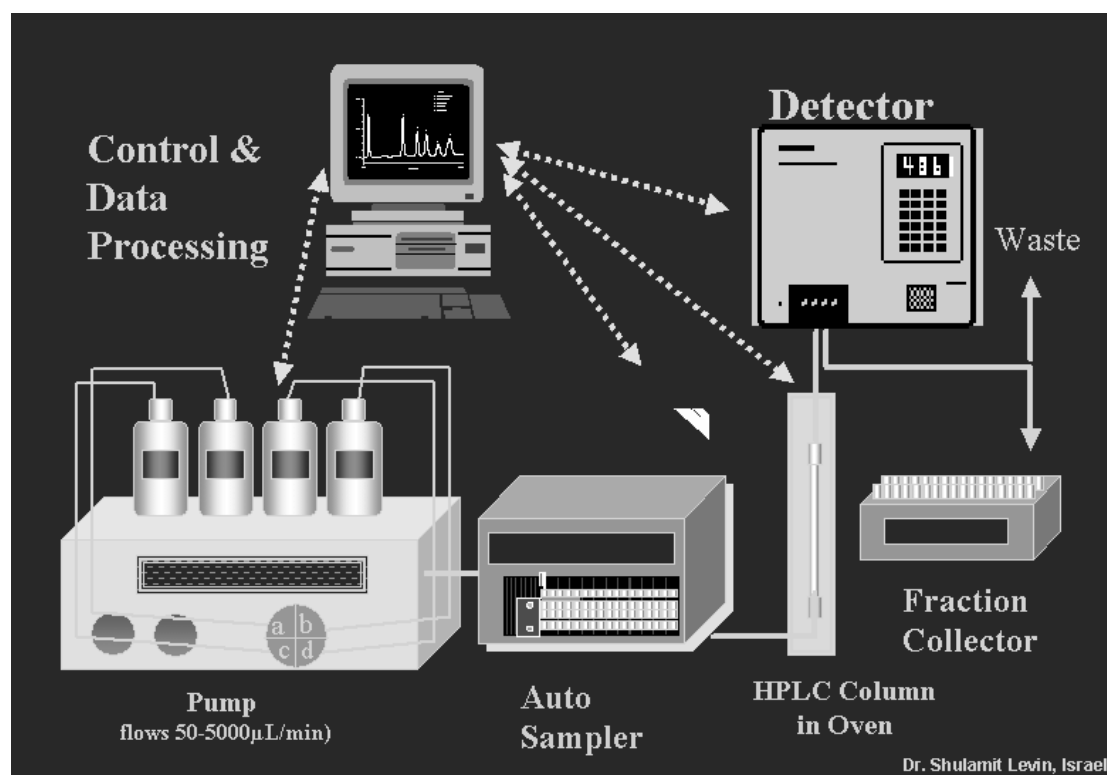


Σχήμα 2.1 Χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης και κανονικής φάσης.

2.1.3 Οργανολογία HPLC

Η ταχεία ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας τις τελευταίες δεκαετίες και η ανάγκη για ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ευκολία και ταχύτητα στην ανάλυση, οδήγησε στην παραγωγή συστημάτων υψηλής τεχνολογίας σχεδόν πλήρως αυτοματοποιημένων.

Τα βασικά εξαρτήματα ενός συστήματος HPLC είναι: περιέκτες για την αποθήκευση της κινητής φάσης, μια αντλία για τη διακίνηση των διαλυτών, ένας θάλαμος απαέρωσης της κινητής φάσης, μια συσκευή εισαγωγής του δείγματος που μπορεί να λειτουργεί και αυτοματοποιημένα, μια στήλη, ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές και ένα σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων. Η στήλη (που περιέχει τη στατική φάση), συνδέεται με το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και με τον ανιχνευτή. Το μικρό μέγεθος (3–10 μm), του πληρωτικού υλικού των σύγχρονων στηλών HPLC, η αντλία πρέπει να είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να αντέχει πιέσεις μέχρι 6000 psi. Καθώς η κινητή φάση περνάει διαμέσου της στήλης, τα διαχωριζόμενα συστατικά του δείγματος εισέρχονται στον ανιχνευτή όπου παράγεται ένα σήμα, το οποίο καταγράφεται στο υπολογιστικό πρόγραμμα με τη μορφή κορυφών. Η χρήση διαφορετικών ανιχνευτών σε σειρά προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η πληροφορία που λαμβάνεται σε μια ανάλυση, είναι συνηθισμένη πρακτική στην HPLC. Το σήμα στον ανιχνευτή δημιουργείται από μια χαρακτηριστική ιδιότητα του δείγματος, όπως απορρόφηση φωτός στην περιοχή UV/Vis, φθορισμός, αγωγιμότητα.



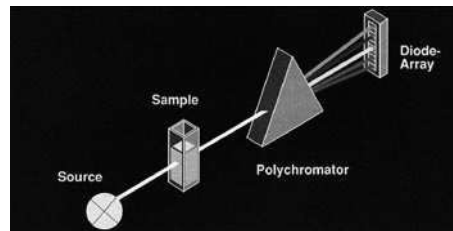
Εικόνα 2.1 Αναπαράσταση των τμημάτων μιας συσκευής HPLC

2.1.3.1 Ανιχνευτής UV-Vis

Οι ανιχνευτές UV-Vis είναι οι πλέον διαδεδομένοι στην υγρή χρωματογραφία. Η αρχή λειτουργίας του είναι η ίδια με αυτή των φασματοφωτομέτρων. Μια δέσμη φωτός περνάει μέσα από ένα μονοχρωμάτορα και κατευθύνεται στην κινητή φάση η οποία εξέρχεται από τη στήλη. Η ποσότητα του προσπίπτοντος φωτός μετράται με τη βοήθεια ενός φωτοανιχνευτή είτε, σε άλλες περιπτώσεις, μιας σειράς φωτοανιχνευτών. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση οργανικών μορίων που απορροφούν φως στην περιοχή συχνοτήτων, του υπεριώδους και ορατού

Οι ανιχνευτές UV-Vis συνήθως έχουν τη δυνατότητα να μετρήσουν απορρόφηση σε εύρος 200 έως 700 nm και ανάλογα με τις δυνατότητες τους χωρίζονται σε στις εξής κατηγορίες:

- 1) Ανιχνευτές σταθερού μήκους κύματος: αποτελούν τον πιο απλό τύπο ανιχνευτή και μετρούν απορρόφηση σε ένα μόνο μήκος κύματος
- 2) Ανιχνευτές διαφόρων μηκών κύματος, στους οποίους το μήκος κύματος μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να πλησιάζει την τιμή στην οποία έχουν τη μέγιστη απορρόφηση οι ουσίες που αναλύονται.
- 3) Ανιχνευτές σάρωσης, οι οποίοι δημιουργούν ένα φάσμα απορρόφησης της ουσίας που εκλύεται, επιτρέποντας αφενός την ταυτοποίηση της βάσει του χαρακτηριστικού της προφίλ και αφετέρου γίνεται δυνατή η εκτίμηση της καθαρότητας της.
- 4) Ανιχνευτές PDA (photodiode-array detectors). Αποτελούν εξέλιξη των ανιχνευτών σάρωσης, και έχουν τη δυνατότητα να μετρούν απορρόφηση σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος ταυτόχρονα.



2.1.4 Κριτήρια επιλογής κινητής φάσης

Η σωστή επιλογή κινητής φάσης είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ενός μίγματος. Βασικά κριτήρια που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι τα εξής⁴:

- **Το ιξώδες:** χαμηλή τιμή ιξώδους της κινητής φάσης προκαλεί μείωση της εφαρμοζόμενης πίεσης και επιτρέπει ταχύτερη μεταφορά μάζας.
- **Απορρόφηση στο υπεριώδες:** στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ανιχνευτής UV-Vis, η κινητή φάση πρέπει να μη απορροφά στο μήκος κύματος των προσδιοριζόμενων συστατικών.
- **Καθαρότητα διαλυτών:** οι διαλύτες που επιλέγονται για την κινητή φάση πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας ώστε να αποφεύγεται παρουσία συστατικών που επηρεάζουν την απόκριση του ανιχνευτή ή τη βαθμιδωτή έκλυση.
- **Αδράνεια σε σχέση με τα συστατικά του δείγματος:** ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά με τις ουσίες του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Σε περιπτώσεις

που η κινητή φάση προκαλεί οξειδώσεις, προστίθεται μικρή ποσότητα κάποιας αντιοξειδωτικής ουσίας όπως BHT (2,6 τερτ-βουτυλο-π-κρεσόλη).

- **Τοξικότητα διαλυτών:** ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στους χλωριομένους διαλύτες οι οποίοι απελευθερώνουν φωσγένιο και στο βενζόλιο που αντικαθίσταται από τολουόλιο.
- **Κόστος διαλυτών**

2.1.4.1 Επίδραση του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό

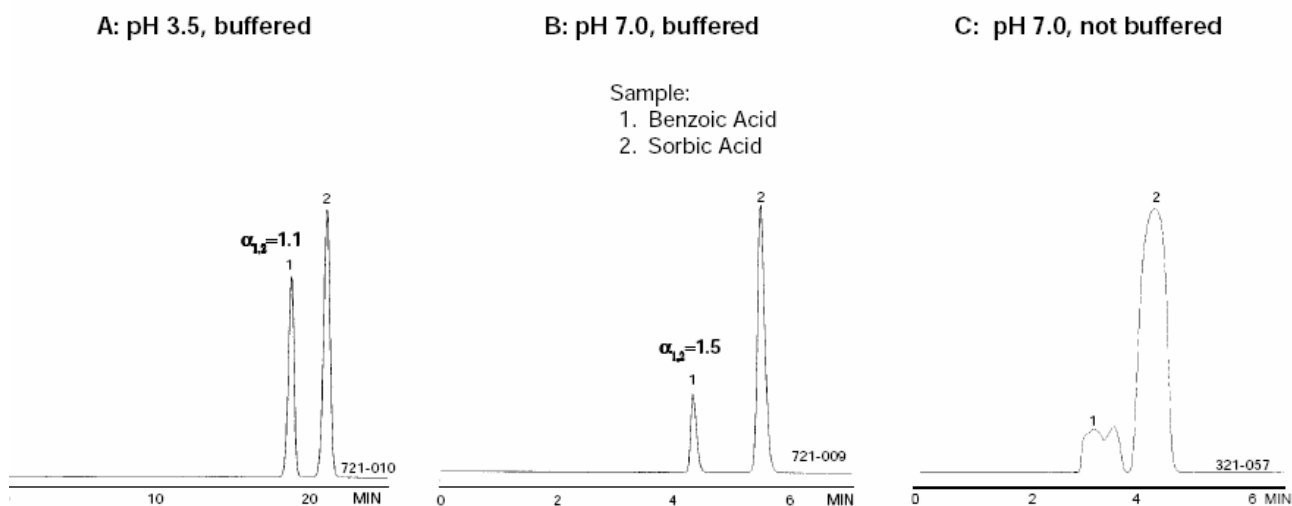
Στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης, κατά την ανάλυση ιονιζόμενων συστατικών είναι σημαντικό να ελέγχεται το pH της κινητής φάσης, καθώς ακόμη και μικρές αλλαγές επιφέρουν σημαντική μεταβολή στο συντελεστή κατανομής K των ουσιών. Για το λόγο αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που εξασφαλίζουν τη σταθερότητα του pH της κινητής φάσης. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα είναι αυτά του φωσφορικού οξέος. Για να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος, το pH της κινητής φάσης θα πρέπει να καθορίζεται μεταξύ ± 1 μονάδων από την τιμή pK_a του οξέος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος.⁸ Στον Πίνακα 2.1 δίνονται οι τιμές pK_a για τις πιο συνηθισμένες ουσίες που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Τα οργανικά οξέα συνήθως αναλύονται σε όξινο pH προκειμένου να βρίσκονται στη μη ιονισμένη τους μορφή. Κάποιες φορές όμως απαιτείται ουδέτερο pH εξαιτίας της τάσης των δειγμάτων (sample matrix) να καθιζάνουν σε συνθήκες χαμηλού pH. Η μείωση της διαλυτότητας των οργανικών οξέων σε συνθήκες χαμηλού pH, κάνει αναγκαία την αύξηση του ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Για τα οργανικά οξέα ο χρόνο συγκράτησης στη στήλη αυξάνει όσο αυξάνει η τιμή του pH. Όταν το pH της κινητής φάσης είναι μεγαλύτερο από το pK_a του οργανικού οξέος, αυτό είναι ιονισμένο και συμπεριφέρεται σαν ένα εξαιρετικά πολικό μόριο, επομένως η κινητή φάση πρέπει να έχει πολύ μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη. Σε τιμές pH μικρότερες από το pK_a της ουσίας, αυτή είναι ουδέτερη και περισσότερο υδρόφοβη. Υπό αυτές τις συνθήκες τα οργανικά οξέα εκκλούνται αργότερα και η ανάλυση είναι πιο ικανοποιητική.

Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζεται η επίδραση του pH της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης και στο σχήμα των κορυφών του σορβικού και βενζοϊκού οξέος.⁹

Πίνακας 2.1 Ιδιότητες ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως¹⁰

Ρυθμιστικό Δ/μα	pK _a	Εύρος pH
Φωσφορικού οξέος	pK ₁	2,1
	pK ₂	7,2
	pK ₃	12,3
Κιτρικού οξέος	pK ₁	3,1
	pK ₂	4,7
	pK ₃	5,4
Φορμικού οξέος	3,8	2,8-4,8
Οξικό οξέος	4,8	3,8-5,8
Αμμωνίας	9,2	8,2-10,2
Βορικού οξέος	9,2	8,2-10,2
Διαυθλαμίνης	10,5	9,5-11,5



Εικόνα 2.2 Επίδραση του pH της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης και στο σχήμα των κορυφών δύο οργανικών οξέων.⁹

2.2 Πειραματική Διαδικασία

2.2.1 Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός Πολυφαινολών

2.2.1.1 Εισαγωγή

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών προσφέροντας ευκολία, εξοικονόμηση χρόνου στον ερευνητή εφόσον η ανάλυση είναι αρκετά σύντομη και τα δείγματα δεν απαιτείται να έχουν υποστεί ιδιαίτερη κατεργασία πριν από την ανάλυση. Για τους λόγους αυτούς οι εφαρμογές της έχουν επεκταθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες και έχει σχεδόν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές χρωματογραφικές τεχνικές όπως τη χρωματογραφία χάρτου (PC) και τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC).

Αν και σε κάποιες περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης για το διαχωρισμό φαινολικών ουσιών από διάφορα φρούτα και λαχανικά¹¹ η τεχνική αυτή δεν είναι η ενδεικνυόμενη, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος συστατικά υψηλής πολικότητας να παραμείνουν μόνιμα στη στήλη αλλοιώνοντας τα χαρακτηριστικά της στήλης και την διαχωριστική της ικανότητα. Αντίθετα η υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) αποτελεί πλέον την πρώτη επιλογή για το διαχωρισμό μίγματος φαινολικών ουσιών με χρήση στηλών C₈ ή C₁₈, καθώς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Η χρησιμότητα της RP-HPLC έχει γίνει φανερή στο διαχωρισμό όλων των ομάδων φαινολικών ουσιών αλλά κυρίως των ανθοκυανινών οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολικές και ο διαχωρισμός τους δεν ήταν δυνατός με χρωματογραφία κανονικής φάσης.¹²

Υπό τις συνηθισμένες συνθήκες ανάλυσης στην RP-HPLC, οι περισσότερο πολικές ουσίες εκλύονται πρώτες. Επομένως οι γλυκοζίτες με περισσότερες μονάδες σακχάρων εκλύονται πρώτες, ακολουθούν οι μονογλυκοζίτες και τέλος τα άγλυκα συστατικά. Επίσης η σειρά έκλυσης των φλαβονοειδών είναι

φλαβανόνες<φλαβονόλες<φλαβόνες. Τέλος τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι πιο πολικά από τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και επομένως εκλούνται πρώτα.

Η ανίχνευση των φαινολικών ουσιών στην HPLC βασίζεται συνήθως στη μέτρηση της απορρόφησης τους στο UV-Vis σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες απορροφούν στα 515–520 nm και οι φλαβονόλες στα 280 nm, ενώ η αναγνώριση τους γίνεται με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του χαρακτηριστικού τους φάσματος απορρόφησης με αυτό των πρότυπων ουσιών.

2.2.1.2 Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Thermo Finnigan 3000 με αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P4000), απαερωτή, αυτόματο δειγματολήπτη (AS3000), ανιχνευτή UV-Vis πολλαπλού μήκους κύματος, ανιχνευτή Diode Array. Το λογισμικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το ChromQuest.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Merck τύπου Lichrosphere C₁₈ με 250 mm x 4,6 mm εσωτερική διάμετρο και διάμετρο σωματιδίων 5μm. Επίσης χρησιμοποιήθηκε προστήλη με τα ίδια χαρακτηριστικά.

Η παραγωγή υπερκάθαρου νερού για HPLC, έγινε με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus, ενώ η διήθηση των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της κινητής φάσης έγινε με σύστημα διήθησης υπο κενό με χρήση συσκευής Millipore. Το ψηφιακό pH-μετρο που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του pH της κινητής φάσης ήταν της Metrohm 654 pH-Meter.

2.2.1.3 Αναλώσιμα

Οι πρότυπες φαινολικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich και ήταν οι ακόλουθες:

(+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, προκυανιδίνη B1, προκυανιδίνη B2, γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, συριγγικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχικό οξύ), *trans*-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, καμφερόλη, ρουτινοσίδης της κερκετίνης (ρουτίνη), 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-

γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη), 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη).

Η ένωση ε-βινιφερίνη παραχωρήθηκε από το εργαστήριο φαρμακογνωσίας της φαρμακευτικής σχολής Αθηνών.

Η ένωση προκυανιδίνη Β3 απομονώθηκε από εκχύλισμα γιγάρτων με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία αντίστροφου φάσεως και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.

Οι ενώσεις υδροξυμεθυλοφουρουράλη και *trans*-καφταρικό οξύ απομονώθηκαν από εκχύλισμα οίνου με παρασκευαστική χρωματογραφία χάρτου (TLC) και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.

Οι διαλύτες μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και οξικό οξύ αγοράσθηκαν από τη J. T. Baker και ήταν καθαρότητας HPLC .

2.2.2 Προετοιμασία Διαλυμάτων

2.2.2.1 Παρασκευή κινητής φάσης

Διαλύτης Α: Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COONa 20 mM με pH 2,7 .

Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 2,72g CH_3COONa και διαλυτοποιούνται σε 1L nanopure νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 2,7 με προσθήκη CH_3COOH . Το διάλυμα διηθείται υπό κενό μέσω φίλτρου ώστε να κατακρατηθούν τα στερεά σωματίδια και να γίνει απαέρωση του διαλύματος προκειμένου να μη δημιουργηθούν υπερβολικές φυσαλίδες κατά την ροή του διαμέσου της στήλης.

Διαλύτης Β: Ακετονιτρίλιο HPLC. Ο διαλύτης διηθείται υπό κενό μέσω φίλτρου, πριν χρησιμοποιηθεί για τη χρωματογραφική ανάλυση.

2.2.2.2 Διαλύματα παρακαταθήκης φαινολικών ουσιών

Τα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solution), παρασκευάζονται ως εξής:

Διάλυμα (+)-κατεχίνης : Ζυγίζονται 50mg ουσίας σε ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml στην οποία προστίθεται μεθανόλη μέχρι πλήρώσεως του όγκου της. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι $5 \cdot 10^3$ mg/L.

Διάλυμα (-)-επικατεχίνης: Ζυγίζονται 40mg ουσίας σε ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml στην οποία προστίθεται μεθανόλη μέχρι πληρώσεως του όγκου της. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι $4 \cdot 10^3$ mg/L.

Διάλυμα γαλλικού οξέος: Ζυγίζονται 30mg ουσίας σε ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml στην οποία προστίθεται μεθανόλη μέχρι πληρώσεως του όγκου της. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι $3 \cdot 10^3$ mg/L.

Διάλυμα υπολοίπων ουσιών: Ζυγίζονται 30mg ουσίας σε ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10ml στην οποία προστίθεται μεθανόλη μέχρι πληρώσεως του όγκου της. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10^3 mg/L.

Τα διαλύματα αυτά φυλάσσονται στους -20 °C απουσία φωτός. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν πολυπρότυπα διαλύματα φαινολικών ουσιών διαφόρων συγκεντρώσεων προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς.

2.2.2.3 Συνθήκες ανάλυσης

Ο διαχωρισμός των φαινολικών ουσιών από τα εκχυλίσματα ή τα δείγματα των οίνων γίνεται με βαθμιδωτή έκλυση η οποία διαρκεί 95min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στηρίχθηκε σε αυτή των Tsao & Yang¹³, με ορισμένες τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των ουσιών. Το χρονοδιάγραμμα της ανάλυσης φαίνεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2

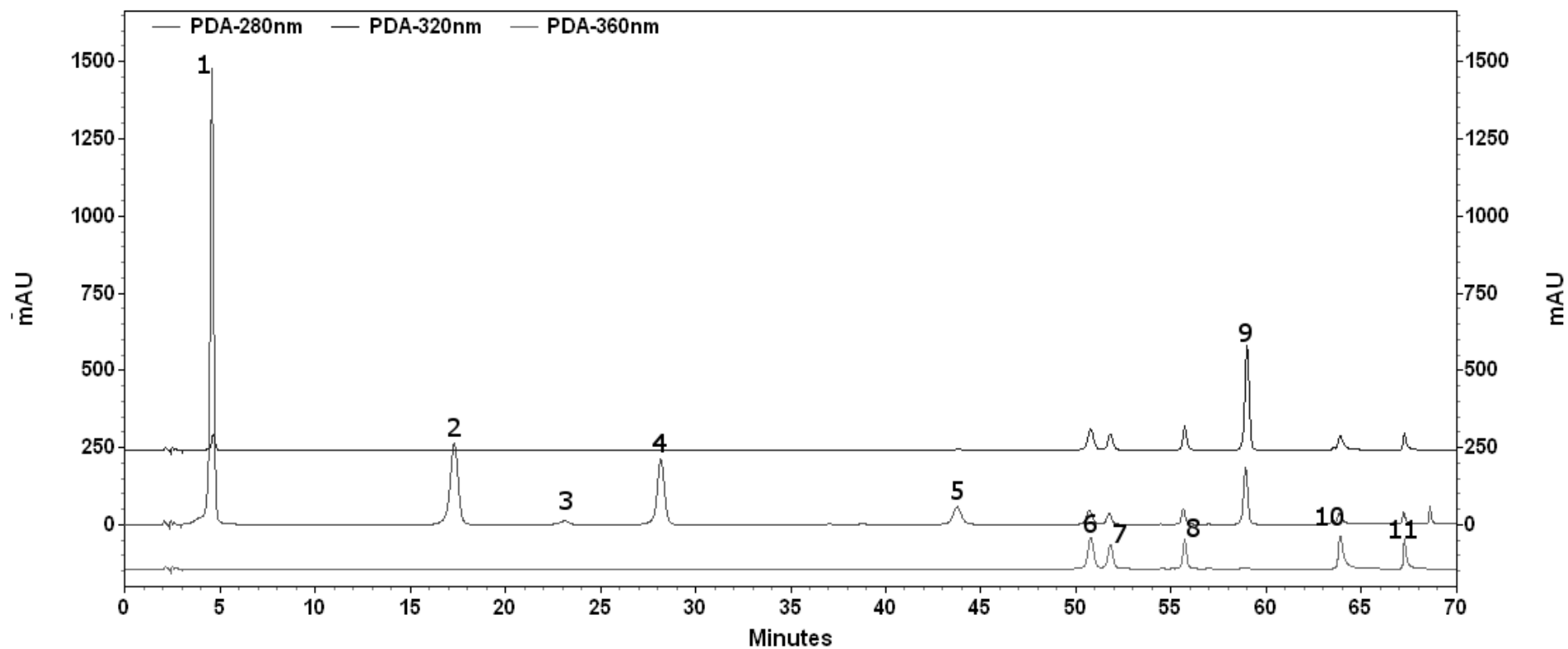
Χρόνος (min)	Διαλύτης A(%)	Διαλύτης B(%)	Ροή ml/min
0	95	5	1,0
45	85	15	1,0
60	65	35	1,0
65	50	50	1,0
70	0	100	1,0

Πριν την έναρξη της ανάλυσης προηγείται έκπλυση των καναλιών (purge) με διαλύτη με ροή 5 mL/min για να απομακρυνθεί ο προηγούμενος διαλύτης και τυχόν φυσαλίδες από το σύστημα. Ακολουθεί ενεργοποίηση της στήλης με την αρχική αναλογία διαλυτών και εξισορρόπηση της για τουλάχιστον 60 min. Ο όγκος του δείγματος που εισέρχεται στη στήλη μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη είναι 20 μ L, η ροή του διαλύτη παραμένει σταθερή και ίση με 1,0 ml/min σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και η απορρόφηση των συστατικών παρακολουθείται σε τρία μήκη κύματος ταυτόχρονα (280 nm, 320 nm και 360 nm).

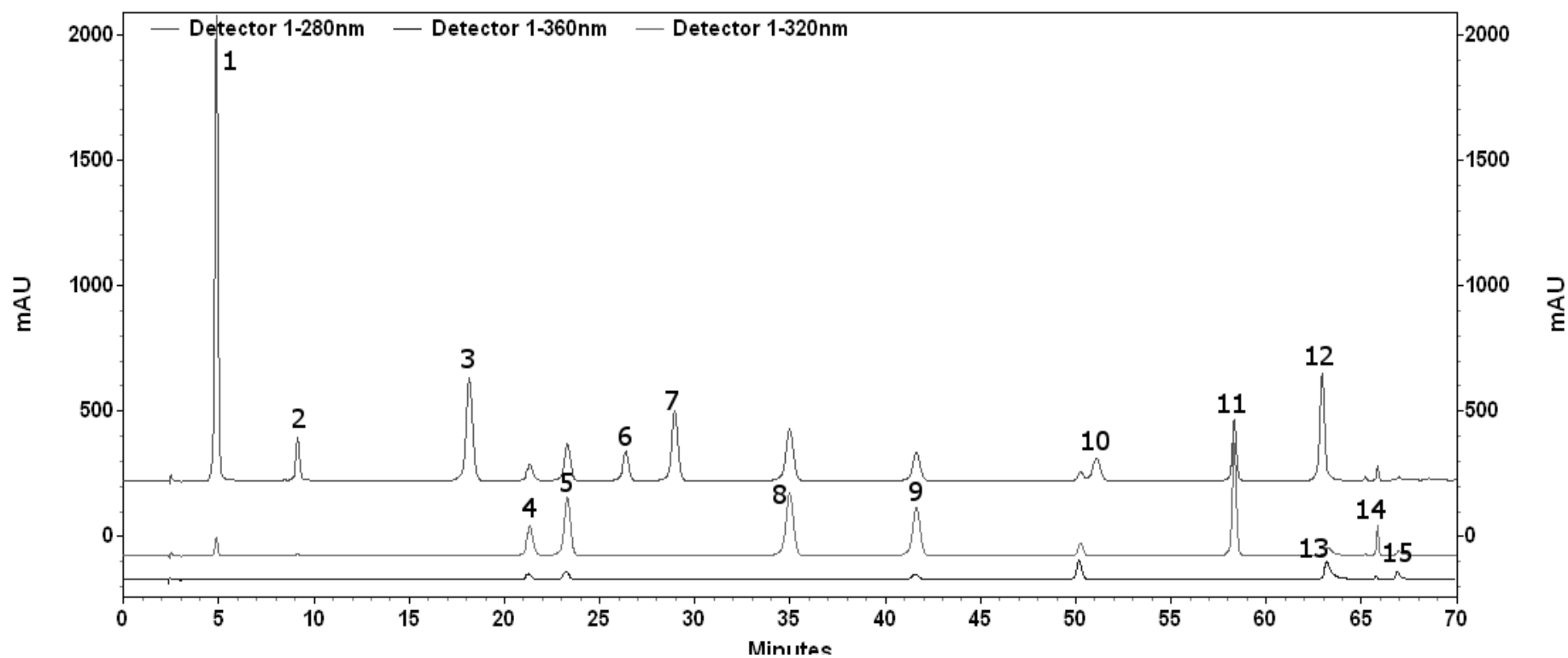
Ο πραγματικός χρόνος της ανάλυσης διαρκεί 70 min κάθε ένεση όμως διαρκεί 95 min καθώς μετά το πέρας της ανάλυσης μεσολαβεί ένα διάστημα 25min στα οποία περνάει διαδοχικά 100% ακετονιτρίλιο (5 min) από τη στήλη και 100% H₂O (5 min) προκειμένου να εκλουσθούν τυχόν εναπομένουσες ουσίες, και τέλος επανέρχεται η αρχική αναλογία διαλυτών (95% A και 5% B) για 15 min προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση της στήλης πριν την επόμενη ένεση. Η διοχέτευση του H₂O εκτός από το να καθαρίσει τη στήλη αποσκοπεί και στην απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη καθώς η απότομη αλλαγή από 100% ACN σε 95% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα θα προκαλούσε καταβύθιση των μορίων του άλατος μέσα στη στήλη με αρνητικές συνέπειες για τη στήλη και την ποιότητα της ανάλυσης.

Μετά το πέρας των αναλύσεων ακολουθεί πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με H₂O / ACN και τα κανάλια των διαλυτών ξεπλένονται με H₂O για 10 min τουλάχιστον ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα οξέος και άλατος.

Στις Εικόνες 2.3-2.4, παρουσιάζονται δύο τυπικά χρωματογραφήματα προτύπων ουσιών που αναλύθηκαν με την προηγούμενη μέθοδο.



Εικόνα 2.3 Χρωματογράφημα προτύπων ουσιών: **1.**γαλλικό οξύ, **2.** (+)κατεχίνη, **3.** προκυανιδίνη Β2, **4.** (-)-επικατεχίνη, **5.** γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης **6.** 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, **7.**3-β-D- γλυκοσίδης της κερκετίνης, **8.** 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης, **9.** trans-ρεσβερατρόλη, **10.** κερκετίνη, **11.** καμφερόλη.



Εικόνα 2.4 Χρωματογράφημα προτύπων ουσιών: **1.**γαλλικό οξύ, **2.** πρωτοκατεχικό οξύ, **3.** (+)-κατεχίνη, **4.** χλωρογενικό οξύ, **5.** καφεϊκό οξύ, **6.** συριγγικό οξύ, **7.** (-)-επικατεχίνη, **8.** π-κουμαρικό οξύ, **9.** φερουλικό οξύ, **10.**ρουτίνη, **11.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **12.** *trans*-κινναμωμικό οξύ, **13.** κερκετίνη, **14.** ε-βινιφερίνη, **15.** καμφερόλη.

2.2.3

2.2.4 Προσδιορισμός Φαινολικών ουσιών-Αξιολόγηση μεθόδου HPLC

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών πραγματοποιήθηκε βάσει του χρόνου κατακράτησης (Retention time) και του φάσματος απορρόφησης των προτύπων ουσιών. Οι φαινολικές ουσίες ανάλογα με τη δομή τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis, για το λόγο αυτό η ανάλυση τους πραγματοποιείται σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος. Συγκεκριμένα τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι φλαβονόλες και οι προκυανιδίνες ανιχνεύονται στα 280 nm, τα στυλβένια, τα υδρόξυ κινναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους, αναλύονται στα 320 nm, ενώ οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους στα 360 nm. Στις Εικόνες 2.5-2.8 φαίνονται τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης των παραπάνω ομάδων φαινολικών ουσιών.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των προτύπων ουσιών για χαμηλές και για υψηλές συγκεντρώσεις, μέσω των οποίων προσδιορίζεται η συγκέντρωση τους στα δείγματα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προκυανιδίνης B1 και B3, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της (+)-κατεχίνης και επομένως εκφράστηκαν σε μονάδες κατεχίνης, ενώ για τον ποσοτικό προσδιορισμό του *trans*-καφταρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος και εκφράστηκε σε μονάδες καφεϊκού.

3.2.4.1.1 Προσδιορισμός του Ορίου Ανίχνευσης και του Ορίου Ποσοτικοποίησης κάθε ουσίας^{7, 14}

Για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης (Detection Limit) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit) κάθε ουσίας χρησιμοποιήθηκαν οι σχέσεις:

$$D.L. = \frac{3,3SD}{b} \quad (\text{Σχέση 2.3})$$

$$Q.L. = \frac{10SD}{b} \quad (\text{Σχέση 2.4})$$

όπου: SD= η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της καμπύλης αναφοράς

και: b= η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Ο συντελεστής 3,3 αναφέρεται στο ότι υπάρχει πιθανότητα 0,05% να εκληφθεί σήμα από το τυφλό ως απορρόφηση της ουσίας.

Ο συντελεστή 10 είναι ο παράγοντας που καθορίζει την επιθυμητή ακρίβεια στο χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

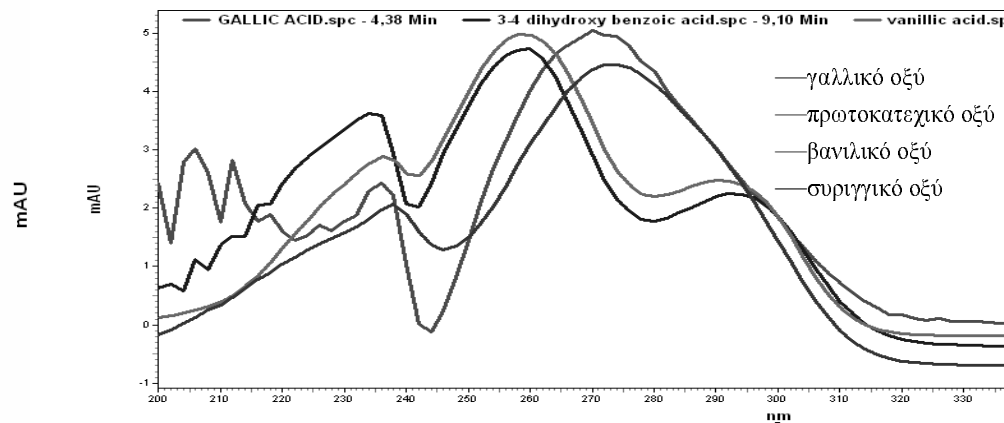
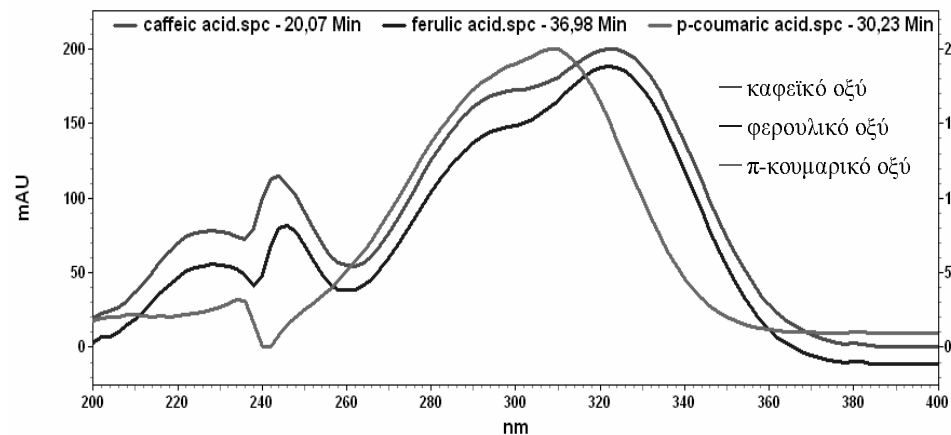
Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για κάθε ουσία με συγκεντρώσεις στην περιοχή του ορίου ανίχνευσης.

Η ακρίβεια της μεθόδου προσδιορίστηκε υπολογίζοντας την % σχετική μεταβολή του χρόνου συγκράτησης των προτύπων ουσιών και του εμβαδού των κορυφών τους.

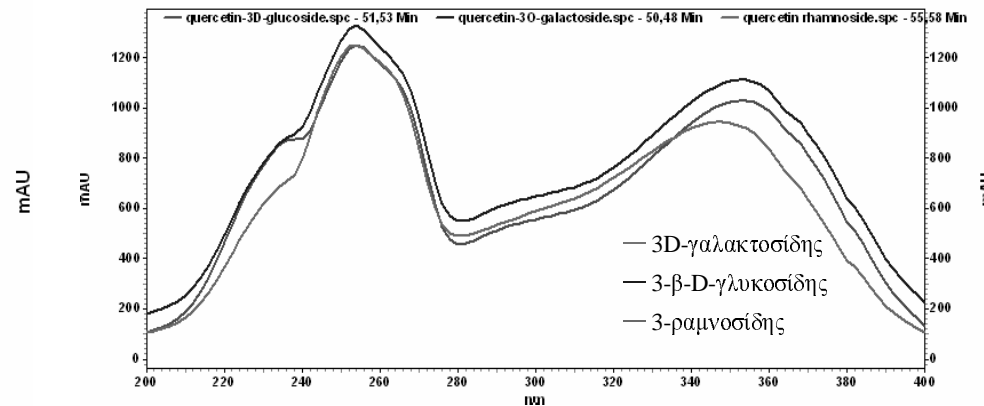
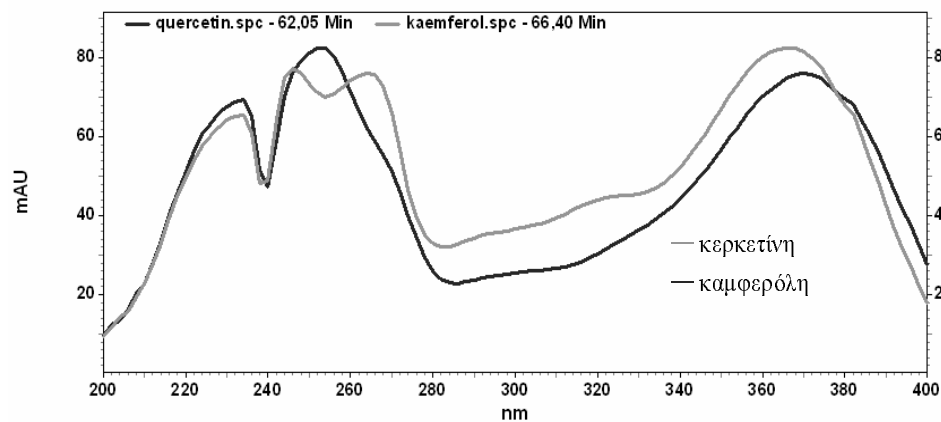
Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, οι χρόνοι κατακράτησης των προτύπων ουσιών, τα όρια ανίχνευσης και τα στοιχεία αξιολόγησης της μεθόδου. Στις καμπύλες αναφοράς το σύμβολο X αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αναλυτή, ενώ το σύμβολο Y, το εμβαδό της κορυφής στο χρωματογράφημα.

Πίνακας 2.3 Στοιχεία αξιολόγησης της μεθόδου ανάλυσης πολυφαινόλων με HPLC

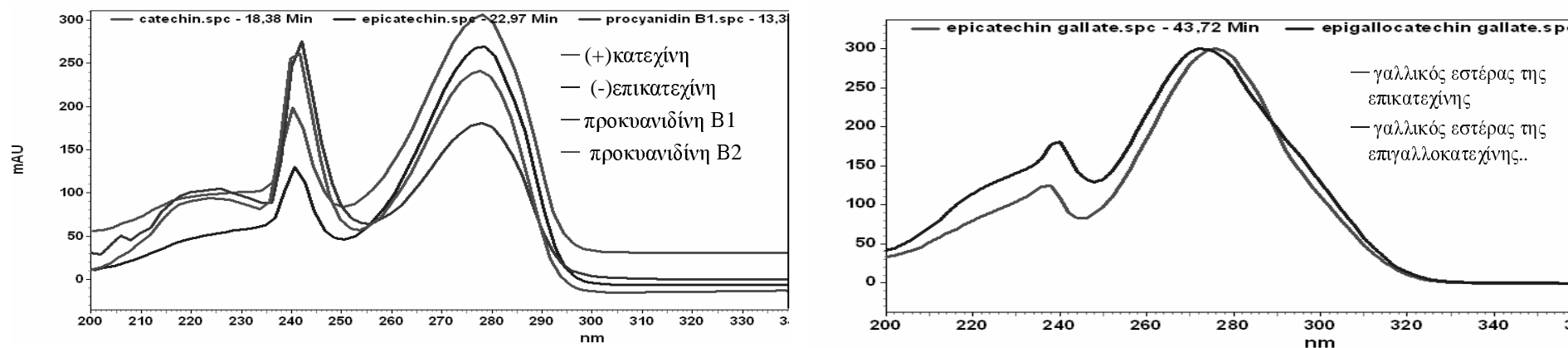
Πρότυπη Ουσία	Μήκος κύματος (nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/L)	Εξίσωση	R ²	Όριο ανιχνεύσης (mg/L)	Όριο ποσοτικοποίησης (mg/L)	R.S.D. % χρόνου έκλουσης (n=7)	R.S.D. % εμβαδού κορυφής (n=7)
Γαλλικό οξύ	280	30-0,47	$y = 2498287(\pm 785,6) - 13898(\pm 845,7)$	0,9999	0,019	0,059	0,08	0,51
(+)-κατεχίνη	280	50-0,78	$y = 617997(\pm 17,4) - 13619(\pm 270,5)$	0,9999	0,025	0,076	0,26	0,77
(-)-επικατεχίνη	280	40-0,62	$y = 657043(\pm 153,3) - 111642(\pm 1808,2)$	0,9999	0,159	0,477	0,22	2,48
ΠροκυανιδίνηB2	280	10-0,156	$y = 754543(\pm 2385,8) - 107413(\pm 420,58)$	0,9981	0,032	0,097	0,90	4,96
Γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης	280	10-0,156	$y = 3579657(\pm 3577,9) - 13301(\pm 337)$	0,9997	0,0054	0,016	0,66	2,53
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	320	5-0,078	$y = 6394853(\pm 1739,5) - 89383(\pm 12,1)$	0,9999	0,002	0,006	0,06	1,02
Κερκετίνη	360	5-0,078	$y = 2420527(\pm 2031,3) - 23628(\pm 436,6)$	0,9959	0,01	0,031	0,03	6,74
Καμφερόλη	360	5-0,078	$y = 298613(\pm 2097) - 9211(\pm 819,4)$	0,9997	0,016	0,048	0,02	1,35
Γαλακτοσίδης της κερκετίνης	360	10-0,156	$y = 252815(\pm 534,3) + 100035(\pm 535,5)$	0,9991	0,012	0,037	0,42	0,50
Γλυκοσίδης της κερκετίνης	360	10-0,156	$y = 1564653(\pm 219,2) + 76967(\pm 377)$	0,9993	0,014	0,042	0,33	0,45
Ραμνοσίδης της κερκετίνης	360	10-0,156	$y = 1506067(\pm 542,7) - 8547,7(\pm 627,8)$	1	0,024	0,072	0,18	0,87
Καφεϊκό οξύ	320	10-0,156	$y = 4600983(\pm 847,7) - 151228(\pm 1303,1)$	0,9999	0,016	0,049	0,26	0,91
π -κουμαρικό οξύ	320	40-0,62	$y = 7238367(\pm 1583,7) - 654417(\pm 2540)$	1	0,02	0,061	0,19	0,52
Φερουλικό οξύ	320	10-0,312	$y = 4526883(\pm 114,7) - 4922(\pm 2326,2)$	1	0,03	0,089	0,15	0,38
Πρωτοκατεχικό οξύ	280	10-0,156	$y = 1392677(\pm 203,9) - 85069(\pm 751,6)$	0,9997	0,031	0,093	0,10	0,28
Βανιλικό οξύ	280	10-0,156	$y = 1458723(\pm 779,4) - 1077669(\pm 1070)$	0,9997	0,042	0,127	0,18	5,62



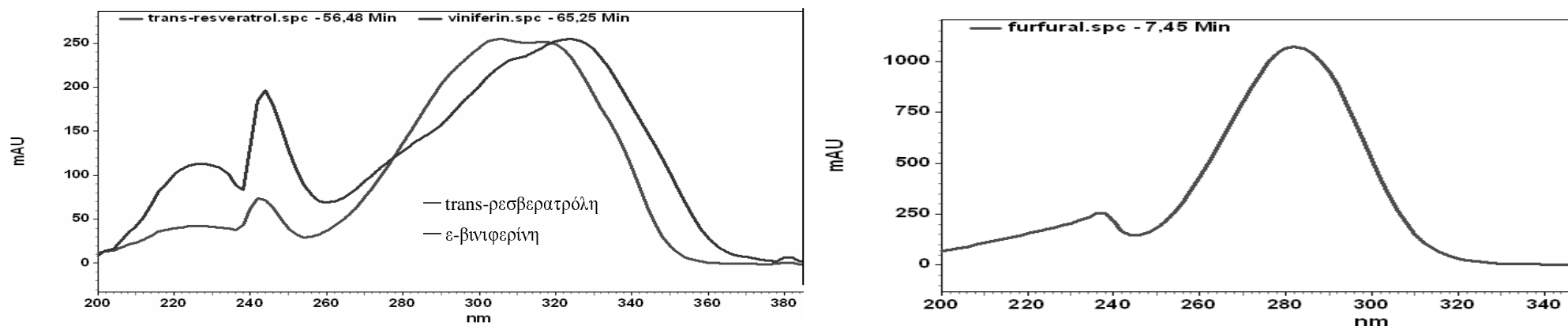
Εικόνα 2.5 Φάσμα απορρόφησης στο UV των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκιναμωμικών οξέων



Εικόνα 2.6 Φάσμα απορρόφησης στο UV φλαβονολών και των γλυκοζιτών της κερκετίνης



Εικόνα 2.7 Φάσμα απορρόφησης στο UV φλαβανολών



Εικόνα 2.8 Φάσμα απορρόφησης στο UV των στυλβενίων : trans-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη και της 5-υδροξυφουρφουράλης

2.3 Φασματομετρία Μαζών

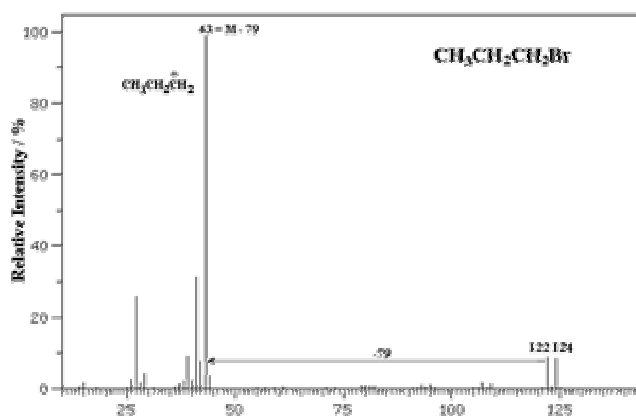
2.3.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μαζών βασίζεται στην παραγωγή δέσμης ιοντικών θραυσμάτων με βομβαρδισμό των εξεταζόμενων μορίων συνήθως με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα παραγόμενα θραύσματα στη συνέχεια διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου ή με συνδυασμό και των δύο. Ο διαχωρισμός βασίζεται στον διαφορετικό λόγο μάζας-προς-φορτίο (m/z) κάθε ιοντικού θραυσματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα θραύσματα είναι μονοφορτισμένα ($z=1$) και για τον λόγο αυτό ο όρος "λόγος μάζα-προς-φορτίο" αντικαθίσταται από τον πλέον εύχρηστο όρο μάζα¹⁵.

Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται *φάσμα μαζών*.³ Στην Εικόνα 2.9 δίνεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα μαζών μιας οργανικής ένωσης (1-βρωμοπροπάνιο).

Η μορφή του φάσματος μαζών που λαμβάνεται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της. Στη σύγχρονη εποχή η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής μιας οργανικής ένωσης κατά τη συνθετική πορεία και για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων όπως δραστικών συστατικών πολλών δρογών).³

Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυαστεί με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή την υγρή χρωματογραφία (LC), παρέχοντας στον αναλυτή τις ονομαζόμενες συνδυασμένες τεχνικές GC/MS ή LC/MS, που πλέον αποτελούν τις συνηθέστερες τεχνικές για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων οργανικών ενώσεων.



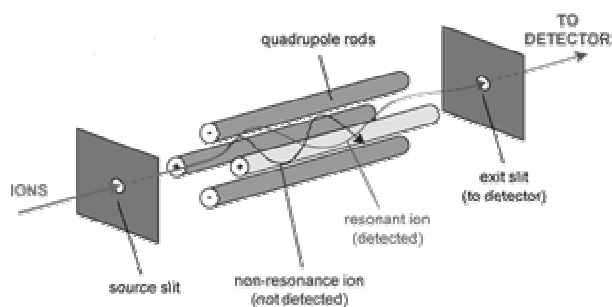
Εικόνα 2.9 Τυπική μορφή φάσματος μαζών μιας οργανικής ένωσης.¹⁶

2.3.2 Οργανολογία MS

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μαζών είναι ο *τετραπολικός ανιχνευτής μαζών* (quadrupole mass analyzer) (Εικόνα 2.10)

Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, χαμηλότερο κόστος και είναι μηχανικά σταθερότερο από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επιπλέον ο χρόνος λήψης των φασμάτων επιτυγχάνεται σε

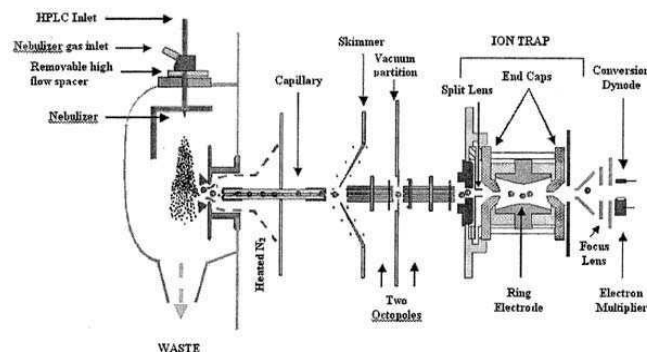
λιγότερο από 100 s εξαιτίας των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης. Η λειτουργία του τετραπολικού φασματομέτρου στηρίζεται στις τέσσερις παράλληλες ράβδους οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό μεταξύ 5 και 10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι στο μεταλλάκτη φτάνουν μόνο τα ιόντα των οποίων οι τιμές m/z , βρίσκονται σε ένα στενό εύρος τιμών. Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μια μονάδα μάζας.¹⁸



Εικόνα 2.10 Τετραπολικό φασματομέτρο μαζών¹⁷

2.3.3 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό¹⁸

Η φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization / mass spectrometry, ESI/MS), αποτελεί σήμερα μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις μεγαλομορίων (πολυπεπίδια, πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια) και για το χαρακτηρισμό ανόργανων ενώσεων και συνθετικών πολυμερών.



Σχήμα 2.2 Συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία, σε μια συσκευή όπως αυτή του Σχήματος 2.2 . Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας, η οποία βρίσκεται σε ηλεκτρικό δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που την περιβάλλει. Οι δημιουργούμενες φορτισμένες μικρές σταγόνες διέρχονται μέσω ενός τροχοειδούς , όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Καθώς οι σταγόνες μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα φορτίου αυξάνει και πραγματοποιείται εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον αέριο. Πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι η θραύση μεγάλων και θερμικά ευαίσθητων βιομορίων είναι περιορισμένη. Επιπλέον τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή, οπότε οι τιμές m/z , είναι αρκετά μικρές και ανιχνεύονται εύκολα με τετραπολικά όργανα που καλύπτουν περιοχή μοριακών βαρών ≤ 1500 .

Ένα ακόμη πλεονέκτημα του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, είναι ότι εύκολα προσαρμόζεται σε συστήματα άμεσης εισαγωγής δείγματος από στήλες υγρής χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές.

2.3.4 Ανάπτυξη Μεθόδου LC-MS Ταυτοποίηση Πολυφαινολών

2.3.4.1 Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων Υγρής Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μαζών (LC-MS), χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας τύπου Τριπλού Τετραπόλου Finnigan TSQ.

Το σύστημα αποτελείται από αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P4000), απαερωτή, ανιχνευτή UV-Vis διπλού μήκους κύματος (UV 2000), και εισαγωγέα δείγματος Rheodyne 7725i, με βρόγχο εισαγωγής δείγματος 20 μ L. Το λογισμικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το Excalibur 1.2.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Waters XTerra RP-C₁₈ (150mm x 2,1mm) και διάμετρο σωματιδίων 3,5 μ m. Επίσης χρησιμοποιήθηκε προστήλη με τα ίδια χαρακτηριστικά (150mm x 2,1mm) και φίλτρο κινητής φάσης σε σειρά με μέγεθος πόρων 0,5 μ m για την προστασία της στήλης (Upchurch Scientific stainless steel frit).

Η παραγωγή υπερκάθαρου νερού για HPLC, έγινε με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus, ενώ η διήθηση των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της κινητής φάσης έγινε με σύστημα διήθησης υπό κενό με χρήση συσκευής Millipore.

2.3.4.2 Παρασκευή Κινητής Φάσης

Διαλύτης Α: Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,005% v.v..

Διαλύτης Β: Ακετονιτρίλιο HPLC.

Η απαέρωση των διαλυτών επετεύχθη με διήθηση υπό κενό μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,2 μ m (Titan Millipore filters) , τοποθέτηση σε υπέρηχους για 5min και απαέρωση κατά την ανάλυση μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης.

2.3.4.3 Συνθήκες ανάλυσης

Ο διαχωρισμός των φαινολικών ουσιών από τα εκχυλίσματα ή τα δείγματα των οίνων γίνεται με βαθμιδωτή έκλουση η οποία διαρκεί 125min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στηρίχθηκε σε αυτή των Alonso-Salces και συνεργατών,¹⁹ με ορισμένες τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των ουσιών. Το χρονοδιάγραμμα της ανάλυσης φαίνεται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α(%)	Διαλύτης Β(%)	Ροή ml/min
0	95	5	0,2
10	95	5	0,2
50	85	15	0,2
70	85	15	0,2
100	70	30	0,2
125	40	60	0,2

Πριν την έναρξη της ανάλυσης προηγείται έκπλυση των καναλιών (purge) με διαλύτη με ροή 5 mL/min για να απομακρυνθεί ο προηγούμενος διαλύτης και τυχόν φυσαλίδες από το σύστημα. Ακολουθεί ενεργοποίηση της στήλης με την αρχική αναλογία διαλυτών και εξισορρόπηση της για τουλάχιστον 60min. Ο όγκος του δείγματος που εισέρχεται στη στήλη μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη είναι 20μL, η ροή του διαλύτη παραμένει σταθερή και ίση με 0,2 ml/min σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και η απορρόφηση των συστατικών παρακολουθείται σε δύο μήκη κύματος ταυτόχρονα (254 nm και 360 nm).

Τα φάσματα μαζών πλήρους σάρωσης ελήφθησαν με εφαρμογή της τεχνικής του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιώντας αρνητικό ιονισμό (πηγή API2). Οι τυπικές τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Θερμοκρασία θερμαινόμενου μεταλλικού τριχοειδούς (heated capillary temperature) 350 °C.

Δυναμικό ηλεκτροψεκασμού 4,5 kV

Δυναμικό μεταλλικό τριχοειδούς 13,4V

Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού εστίασης 91,8V.

Δυναμικό φακού 1-1 -15,1V.

Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ως αέριο αποδιαλυτοποίησης, άζωτο υψηλής καθαρότητας παραγόμενο από αντλία αζώτου, ομοαξονικά με τη χρωματογραφική ροή, με πίεση 60 psi

Για την επίτευξη της αποσυσσωμάτωσης (declustering) και μερικής θραυσματοποίησης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θραυσματοποίησης μέσω συγκρούσεων στην περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης (sCID-in source Collision Induced Dissociation), χρησιμοποιώντας δυναμικό 10 V.

2.3.4.4 Προετοιμασία διαλύματος παρακαταθήκης

Πραγματοποιήθηκε προετοιμασία πολυπρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

- Διάλυμα γαλλικού οξέος 180 mg/L
- Διάλυμα (+)-κατεχίνης 300 mg/L
- Διάλυμα (-)-επικατεχίνης 200 mg/L
- Διάλυμα *trans*-ρεσβερατρόλης 20 mg/L
- Διάλυμα κερκετίνης 10 mg/L
- Διάλυμα καμφερόλης 10 mg/L

- Διάλυμα 3-D-γαλακτοσίδη της κερκετίνης 20 mg/L
- Διάλυμα 3-β-D-γλυκοσίδη της κερκετίνης 20 mg/L

Το αντίστοιχο διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε με αραιώση του παραπάνω πολυπρότυπου διαλύματος σε υπερκάθαρο νερό σε αναλογία 1/10 v/v.

2.3.5 Προσδιορισμός Φαινολικών ουσιών

Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με βάση α) το χρόνο συγκράτησης των προτύπων στη χρωματογραφική διαδικασία και β) το m/z του αποπρωτονιωμένου μοριακού ιόντος των αναλυτών. Το m/z υπολογίστηκε με

$$\text{εφαρμογή της σχέσης } m/z = \frac{MB - 1}{1} \quad (\text{Σχέση 2.5})$$

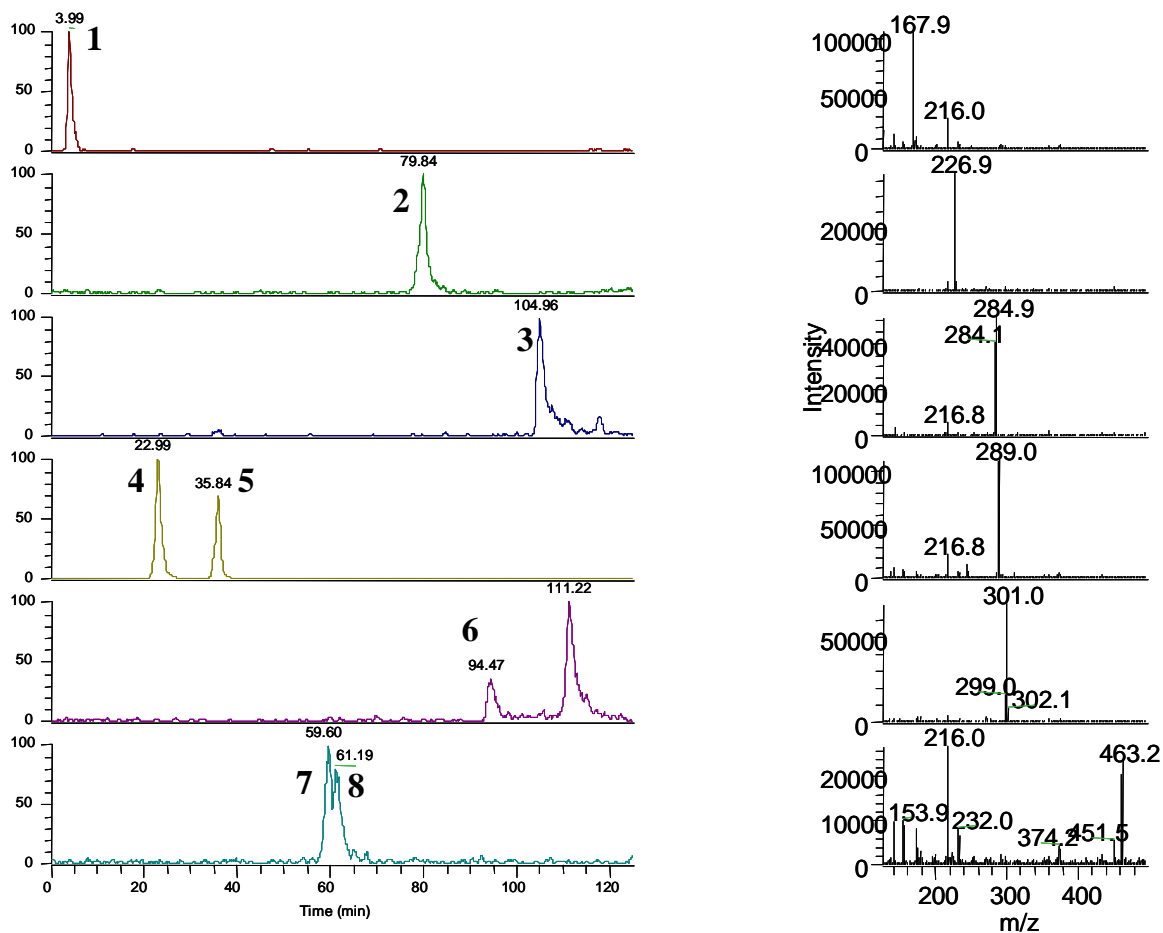
όπου M.B.= το μοριακό βάρος του αναλύτη.

Στον Πίνακα 2.5, παρουσιάζονται τα M.B. και τα αποπρωτονιομένα μοριακά ιόντα, των προτύπων ουσιών καθώς και των πολυφαινολικών ουσιών οι οποίες θεωρείται πιθανό να περιέχονται στους οίνους βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πολυπρότυπο διάλυμα εργασίας το οποίο περιγράφεται ανωτέρω.

Πίνακας 2.5

ΕΝΩΣΗ	M.B.	m/z
Γαλλικό οξύ	170,12	169,12
(+)-κατεχίνη	290,27	289,27
(-)-επικατεχίνη	290,27	289,27
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	228,24	227,24
Κερκετίνη	302,24	301,24
Καμφερόλη	286,24	285,24
3-D-γαλακτοσίδη της κερκετίνης	464,38	463,38
3-β-D-γλυκοσίδη της κερκετίνης	464,38	463,38

Στην Εικόνα 2.11 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των προτύπων ενώσεων που προκύπτει με τη μέθοδο XIC (Extracted Ion Chromatogram) και το αντίστοιχο φάσμα μαζών τους



Εικόνα 2.11 Χρωματογράφημα και φάσμα μαζών πρότυπων φαινολικών ενώσεων: 1. Γαλλικό οξύ, 2. *trans*-ρεσβερατρόλη, 3. Καμφερόλη, 4. (+)-κατεχίνη, 5. (-)-επικατεχίνη, 6. Κερκετίνη, 7. 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 8. 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης

2.4 Τεχνικές Μέτρησης Αντιοξειδωτικής Δράσης

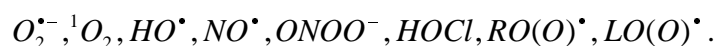
2.4.1 Εισαγωγή

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Ως αποτέλεσμα έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών ουσιών και εκχυλισμάτων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Δεδομένης όμως της πολυπλοκότητας των βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνονται στις οξειδωτικές διαδικασίες στα κύτταρα καθώς και κάποιων μειονεκτημάτων στην πειραματική διαδικασία, δύσκολα κάποια από αυτές τις μεθόδους μπορεί να θεωρηθεί απόλυτα ακριβής και να καθιερωθεί ως πρότυπη μέθοδος.²⁰ Για το λόγο αυτό συνήθως η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάποιου συστήματος γίνεται με μια σειρά από τεστ που σκοπό έχουν να καλύψουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο εύρος παραγόντων που συμμετέχουν στις οξειδωτικές διαδικασίες.

Μέσα στα βιολογικά συστήματα υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις κατηγορίες αντιοξειδωτικών:

- 1) Ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η περοξυδάση της γλουταθειόνης και διάφορες καταλάσες
- 2) Μεγαλομόρια όπως η φερριτίνη, η αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες.
- 3) Μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, τα καροτενοειδή, η τοκοφερόλη και οι πολυφαινόλες.
- 4) Κάποιες ορμόνες, όπως η μελατονίνη, τα οιστρογόνα και η αγγιοτενσίνη.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν πολλαπλές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών προϊόντων όπως



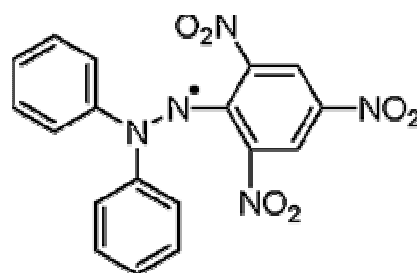
Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες μπορούν να δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς, ανάλογα με το σύστημα, ή να εκδηλώνουν την

αντιοξειδωτική τους δράση με διαφορετικούς μηχανισμούς ακόμα και στο ίδιο σύστημα.²¹

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τέσσερα διαφορετικά τεστ για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, και των καθαρών ουσιών, τα οποία περιγράφονται στη συνέχεια.

2.4.2 In vitro Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος *DPPH*[•]

Η ρίζα *DPPH*[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), είναι μια από τις λίγες σταθερές αζωτούχες οργανικές ρίζες. Η δομή της φαίνεται στο Σχήμα 2.3. Το χρώμα της είναι βαθύ ιώδες, και το φάσμα της απορρόφησης της στο UV-Vis παρουσιάζει μέγιστο στα 515 nm. Κατά την αναγωγή της η ρίζα χάνει σταδιακά το χρώμα της καταλήγοντας σε ανοιχτό κίτρινο. Η αντίδραση μπορεί να καταγραφεί από EPR (Electron Spin Resonance) ή φασματοφωτόμετρο. Στην Εικόνα 2.12 απεικονίζεται η μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης της ρίζας συναρτήσει του χρόνου. Η μέθοδος *DPPH*[•], βασίζεται στην μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας των υπό εξέταση δειγμάτων, ως προς τη ρίζα *DPPH*[•]. Η μέθοδος παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τους Brand-Williams και συνεργάτες,²² και έκτοτε έχει γίνει πολύ δημοφιλής ως μια γρήγορη και εύχρηστη μέθοδος για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro*. Η τυπική διαδικασία έχει ως εξής:



Σχήμα 2.3 δομή ρίζας *DPPH*[•]

Παρασκευάζεται διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης *DPPH*[•], σε μεθανόλη ή αιθανόλη (25 mg/L). Στη συνέχεια 3,9 ml διαλύματος *DPPH*[•], αναμιγνύονται με 0,1 ml διαλύματος του δείγματος σε κατάλληλο διαλύτη (συνήθως αιθανόλη ή μεθανόλη).

Η πορεία της αντίδρασης μεταβολή της απορρόφησης του μείγματος παρακολουθείται με μέτρηση της απορρόφησης του μίγματος στα 515 nm για 30 min, ή μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή της απορρόφησης.

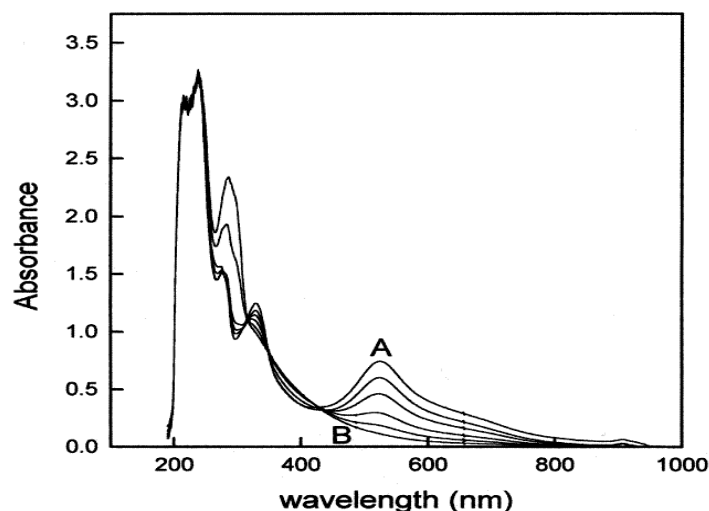
Το ποσοστό του εναπομείναντος *DPPH*[•], υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% DPPH^{\bullet}_{REM} = 100 \cdot [(DPPH^{\bullet}_{REM}) / (DPPH^{\bullet}_{T=0})] \quad (\text{Σχέση 2.6})$$

Η συγκέντρωση του εναπομείναντος $DPPH^{\bullet}$, είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού. Η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί αναγωγή του $DPPH^{\bullet}$ κατά 50%, ορίζεται ως “Αποτελεσματική Συγκέντρωση” ή IC_{50} (Inhibitory Concentration).

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι ο μηχανισμός αναγωγής του $DPPH^{\bullet}$ περιελάμβανε αντίδραση μεταφοράς υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό στη ρίζα, πρόσφατα όμως προτάθηκε από τους Foti και συνεργάτες²³, ότι στην πραγματικότητα πρόκειται για αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Η μέθοδος $DPPH^{\bullet}$, παρουσιάζει προβλήματα όταν εμπλέκονται ουσίες που απορροφούν στα 515 nm, καθώς είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα καροτενοειδή.²⁴ Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ότι η ρίζα $DPPH^{\bullet}$, δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με τις ενεργές περοξυ ρίζες που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπιδίων, με αποτέλεσμα πολλά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν ταχέως με τις περοξυ ρίζες, αντιδρούν αργά ή δεν αντιδρούν καθόλου με το $DPPH^{\bullet}$ λόγω στερικού παρεμποδισμού.



Εικόνα 2.12 Μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ συναρτήσει του χρόνου²⁵
A: t=0, B: t=30min

2.4.3 Πειραματική Διαδικασία:

2.4.3.1 Υλικά και Μέθοδοι

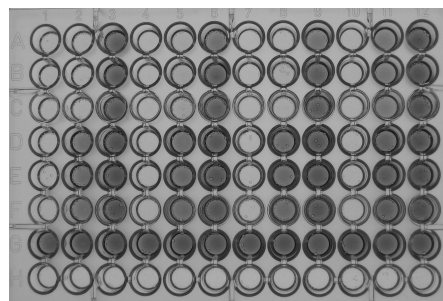
Για την πραγματοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) της Sigma. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στη μέθοδο των Brand-Williams και συνεργατών.²² με τις κατάλληλες τροποποιήσεις ώστε να μετατραπεί σε μικρομέθοδο.

Οι υποδοχείς δειγμάτων (microplates) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν U bottom 96 θέσεων της Greiner

Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με χρήση του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού 96 θέσεων Fluostar Galaxy με αναλυτή μικροπλακών (BMG Labtechologies)

2.4.3.2 Πειραματική διαδικασία:

Πριν από την ανάλυση παρασκευάζεται διάλυμα *DPPH*^{*} συγκέντρωσης 5 mM σε καθαρή EtOH (Panreac), το οποίο φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C απουσία φωτός. Από τα εκχυλίσματα των δειγμάτων παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/ml σε διαλύτη



MeOH καθαρότητας HPLC. (JT Baker) και στη συνέχεια γίνονται 6 διαδοχικές αραιώσεις σε διαλύτη H₂O/EtOH (85:15). Σε κάθε οπή των πλακιδίων εισάγονται 50 μL δείγματος εις τριπλούν για κάθε αραιώση προκειμένου να εξαχθεί ο μέσος όρος των μετρήσεων. Για το τυφλό χρησιμοποιείται διαλύτης H₂O/EtOH (85:15) χωρίς προσθήκη δείγματος. Στην περίπτωση που ελέγχεται η αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων οίνου, χρησιμοποιούνται κατάλληλες αραιώσεις σε διαλύτη H₂O/EtOH (85:15). Στη συνέχεια με τη βοήθεια πολυπιπέτας 8 θέσεων, προστίθενται ταυτόχρονα 50 μl διαλύματος *DPPH*^{*} σε κάθε οπή και η απορρόφηση καταγράφεται στα 492 nm για χρόνο t=0 min και t=30 min. Η μείωση της απορρόφησης

υποδηλώνει τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των εκχυλισμάτων και των οίνων.

Το ποσοστό της ελεύθερης ρίζας που έχει απομείνει στο διάλυμα της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί για κάθε χρονική στιγμή από τη σχέση:

$$\% I(DPPH^{\bullet}) = \left(\frac{A_{sample}}{A_{blank}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Σχέση 2.7})$$

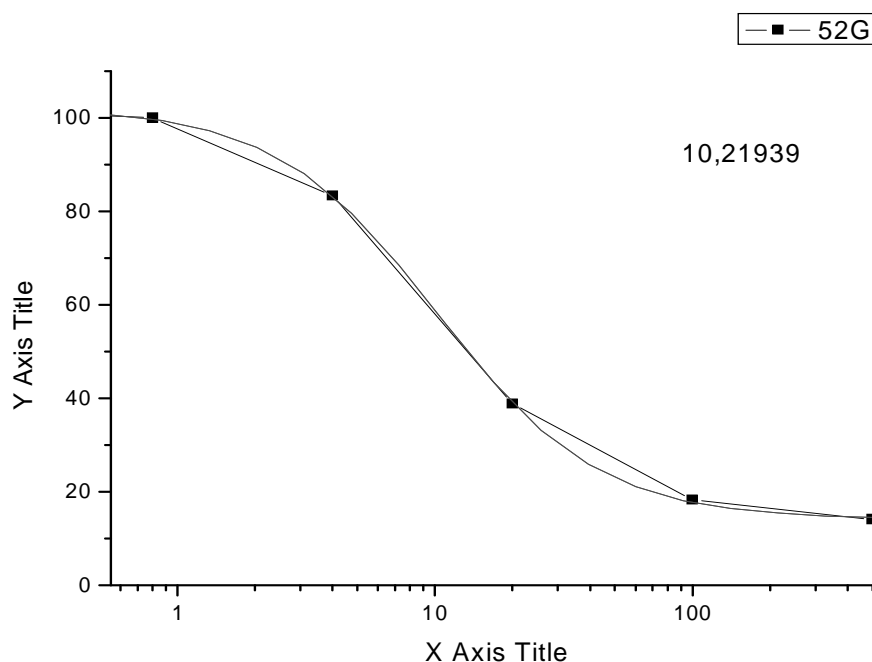
όπου: A_{sample} = η απορρόφηση του δείγματος

και A_{blank} = η απορρόφηση του τυφλού

Στη συνέχεια σχηματίζεται γραφική παράσταση του ποσοστού της ελεύθερης ρίζας (% I) συναρτήσεως της συγκέντρωσης του δείγματος σε $\mu\text{g/mL}$ από την οποία εξάγεται η τιμή IC_{50} (Inhibitory Concentration), η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του δείγματος η οποία είναι ικανή για τη δέσμευση του 50% της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ στο μίγμα της αντίδρασης. Στο Σχήμα 2.4 δίνεται παράδειγμα μιας τέτοιας καμπύλης.

Για τον υπολογισμό του IC_{50} , χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα OriginPro 7.0.

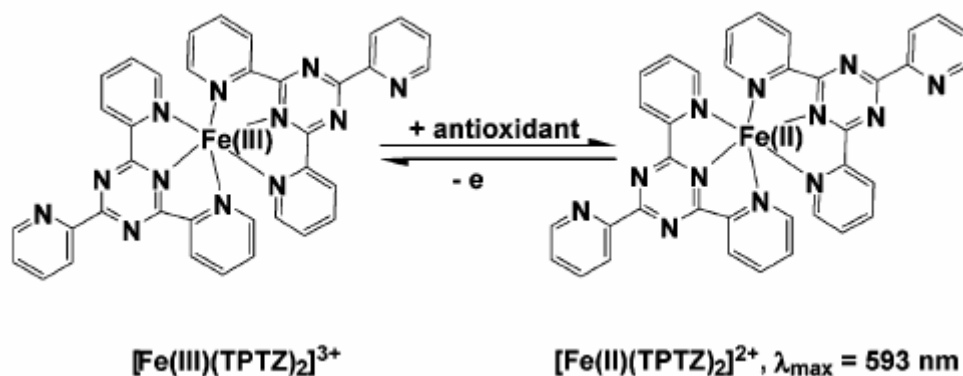
Εκτός από τα εκχυλίσματα και τους οίνους μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο $DPPH^{\bullet}$ και καθαρών πολυφαινολών που αποτελούν συστατικά των σταφυλιών και των οίνων.



Σχήμα 2.4 Χαρακτηριστική καμπύλη % ποσοστού εναπομείνας ρίζας $DPPH^{\bullet}$ συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξειδωτικού, για $t=30\text{min}$

2.4.4 *In vitro* Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), αναπτύχθηκε αρχικά από τους Benzie και Strain²⁶ για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, στη συνέχεια όμως τροποποιήθηκε και βρήκε ευρεία εφαρμογή στην μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων.²⁷⁻³¹ Η μέθοδος στηρίζεται στις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (singlet electron transfer SET). Η αντίδραση περιλαμβάνει την αναγωγή του άχρωμου συμπλόκου $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$, ($TPTZ=2,4,6\text{-tripyridyl-s-triazine}$), προς ένα έγχρωμο προϊόν (βαθύ κυανό). Σχήμα 2.5



Σχήμα 2.5 Αντίδραση αναγωγής του $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ ²⁰

Η αντίδραση ανιχνεύει ουσίες που έχουν αναγωγικό δυναμικό $<0,7 \text{ V}$, που είναι το αναγωγικό δυναμικό του TPTZ, συνεπώς η FRAP είναι μια κατάλληλη μέθοδος για την εκτίμηση της ικανότητας διατήρησης της αναγωγικής ισορροπίας στα κύτταρα και τους ιστούς. Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό υδροξυλίωσης και το βαθμό σύζευξης της, όπως για παράδειγμα στις πολυφαινόλες. Παρόλα αυτά η μέθοδος FRAP δε μπορεί να ανιχνεύσει ουσίες που δρουν μέσω προσφοράς υδρογόνου, ειδικά τις θειόλες και τις πρωτεΐνες.³²

Η τυπική πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

Το οξειδωτικό διάλυμα, παρασκευάζεται με ανάμιξη ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος (pH 3.6), με διάλυμα TPTZ (10 mM σε 40 mM HCl), και διάλυμα FeCl_3 σε αναλογία όγκων 10:1:1. Το προκύπτον διάλυμα είναι γνωστό ως “αντιδραστήριο FRAP”. Το pH του διαλύματος είναι όξινο προκειμένου να εξασφαλιστεί η διαλυτότητα του σιδήρου. Στη συνέχεια 3 mL του αντιδραστηρίου FRAP, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί στους $37 \text{ }^\circ\text{C}$ αναμιγνύονται με 100 μL διαλύματος δείγματος και 300 μL ύδατος. Η απορρόφηση του μίγματος μετράται στα 593 nm κάθε 15 sec για χρονικό διάστημα 15min.³³

Η μεταβολή στην απορρόφηση: $\Delta A = (A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}})$, υπολογίζεται και συγκρίνεται με την αντίστοιχη μεταβολή για πρότυπο διάλυμα Fe(II) . Η ΔA είναι εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Μια “μονάδα FRAP”, ορίζεται ως η αναγωγή 1mol Fe(III) σε Fe(II) .

Η μικρή συσχέτιση που εμφανίζεται συχνά σε σχέση με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους αποδίδεται στο γεγονός ότι η ικανότητα αναγωγής του Fe(III) δεν έχει σχέση με τις αντιδράσεις μεταφοράς ατόμων υδρογόνου στις οποίες συμμετέχουν συνήθως τα αντιοξειδωτικά σε άλλες μεθόδους. Ο μηχανισμός στη μέθοδο FRAP είναι καθαρά μεταφορά ηλεκτρονίων οπότε σε συνδυασμό με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους μπορεί να συμβάλει στην αποσαφήνιση του κυρίαρχου μηχανισμού σε κάθε περίπτωση.^{20,33} Επιπλέον, επειδή τα ανηγμένα μέταλλα είναι ενεργοποιητές των αλυσιδωτών αντιδράσεων των ριζών, μέσω σχηματισμού RO^{\bullet} , φαίνεται ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ υψηλών τιμών FRAP και της τάσης των πολυφαινόλων να δρουν ως προοξειδωτικοί παράγοντες υπό ορισμένες συνθήκες.³⁴

Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι τα 4 min δεν είναι πάντοτε αρκετός χρόνος για να ολοκληρωθεί η αντίδραση αναγωγής. Στην πραγματικότητα κάποιες πολυφαινόλες αντιδρούν πολύ αργά και απαιτούν περισσότερο από 30 min προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ως αποτέλεσμα η σειρά δραστηριότητας διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το χρονικό διάστημα για το οποίο παρακολουθείται η ανάλυση.

2.4.5 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε στηρίχθηκε σε αυτή των Firuzi και συνεργατών³⁵ οι οποίοι τροποποίησαν τη μέθοδο των Benzie & Strain²⁶ ώστε να τη μετατρέψουν σε μικρομέθοδο. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) \geq 98% Sigma
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ reagent grade Sigma \geq 98% Sigma
- $FeSO_4$ FIXANAL, Riedel de Haën
- CH_3COOH Glacial J. T. Baker
- CH_3COONa \geq 99% Sigma-Aldrich
- HCl 37 % ACS reagent, (Sigma-Aldrich)

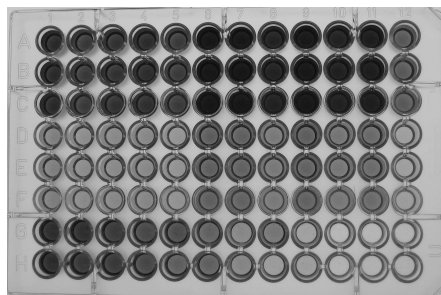
Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ με pH 3,6 παρασκευάζεται με ανάμιξη 1,55 g CH_3COONa και 8 ml CH_3COOH και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα TPTZ 10 mM, το οποίο παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 312 mg TPTZ σε υδατικό διάλυμα HCl συγκέντρωσης 0,04N και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 100 ml.
- Διάλυμα FeCl_3 συγκέντρωσης 20 mM, το οποίο παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 540 mg σε απεσταγμένο νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 100 ml.
- Αντιδραστήριο FRAP, παρασκευάζεται με ανάμιξη 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος με 1 ml διαλύματος TPTZ και 1ml διαλύματος FeCl_3 . Το αντιδραστήριο FRAP πρέπει να παρασκευάζεται καθημερινά πριν από την ανάλυση.
- Διάλυμα FeSO_4 0,1 M από το οποίο ετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς.

Τα πλακίδια (microplates) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν U bottom 96 θέσεων της Greiner με αναλυτή μικροπλακών (BMG Labtechnologies)

2.4.5.1 Πειραματική διαδικασία:

Πριν από την ανάλυση παρασκευάζονται 20 ml από το αντιδραστήριο FRAP και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Από τα διαλύματα των εκχυλισμάτων σε MeOH συγκέντρωσης 10 mg/ml (stock solutions) παρασκευάζονται κατάλληλες αραιώσεις



(συνήθως 200 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (85:15). Οι αραιώσεις κρίνονται απαραίτητες προκειμένου η απορρόφηση να είναι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου

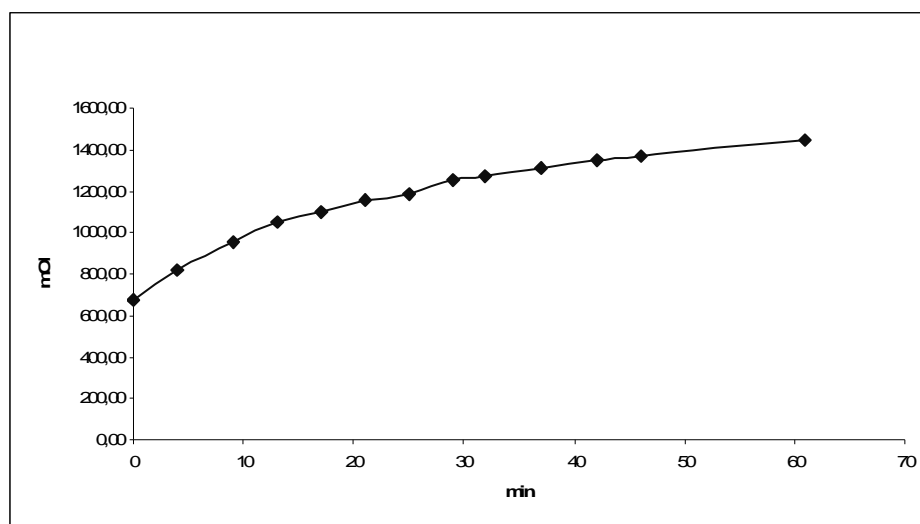
και να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert. Από αυτές τις αραιώσεις τοποθετούνται 25 μL εις τριπλούν στις οπές των υποδοχέων 96 θέσεων U bottom. Επίσης παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος FeSO_4 στην περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 125-20 μM .

Με την αυτόματη πολύπιπέτα 8 θέσεων τοποθετούνται 175 μL αντιδραστηρίου FRAP και το πλακίδιο εισάγεται στο plate-reader Fluostar Galaxy, το οποίο διαθέτει θερμοστάτη και ρυθμίζεται στους 37°C. Η αύξηση της απορρόφησης καταγράφεται στα 595 nm από $t = 0\text{min}$ έως $t = 30\text{min}$ κάθε 3min. Επίσης καταγράφεται η απορρόφηση σε χρόνο $t = 45\text{min}$, 1h και 1,5 h. Με τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση δείγματος, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2.1

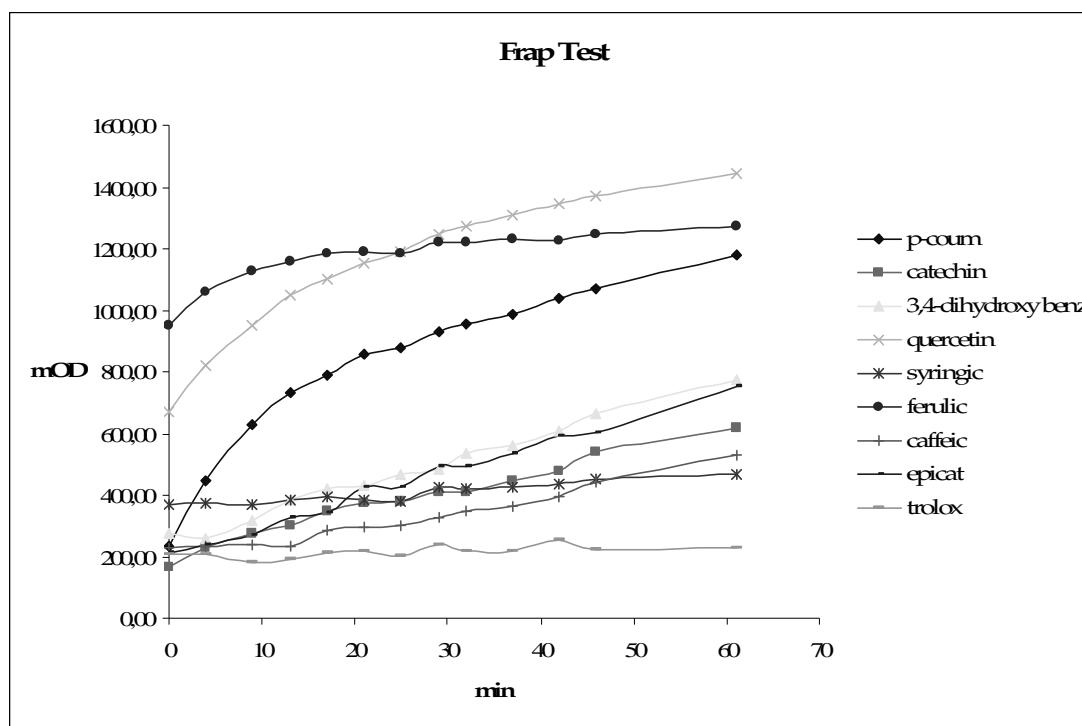
Η αναγωγική ικανότητα των δειγμάτων εκφράζεται με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς σε $\mu\text{M FeSO}_4$, αφού πρώτα διορθωθεί ως προς την αραιώση. Για τα εκχυλίσματα η αναγωγική ικανότητα (“Τιμή FRAP”), είναι η μέγιστη συγκέντρωση διαλύματος Fe(III) , που μπορεί να αναχθεί πλήρως σε Fe(II) , από ένα διάλυμα εκχυλίσματος 100 $\mu\text{g/ml}$.³⁶

Κατά αντιστοιχία στους οίνους η “Τιμή FRAP”, αναφέρεται στην ικανότητα του αδιάλυτου οίνου, να προκαλέσει αναγωγή του $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$.

Εκτός από την αναγωγική ικανότητα των δειγμάτων, μετρήθηκε και η αναγωγική ικανότητα των καθαρών φαινολικών ουσιών (Γράφημα 2.2).



Γράφημα 2.1 Μεταβολή της απορρόφησης στο διάλυμα ενός εκχυλίσματος γιγάρτων συναρτήσει του χρόνου



Γράφημα 2.2 Μεταβολή της απορρόφησης σε διαλύματα προτύπων ουσιών συναρτήσει του χρόνου

2.4.6 Μέθοδος Ολικών Φαινολικών –Folin Ciocalteu

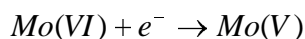
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C), για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, είναι μια φωτομετρική μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε αρχικά το 1927, για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης, σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν.³⁷ Στη συνέχεια οι Singleton και Rossi³⁸ βελτίωσαν τη μέθοδο και τη χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών στο κρασί. Η μέθοδος έγινε πολύ δημοφιλής και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου διαφόρων φυσικών προϊόντων.

Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος F-C, χρησιμοποιείται για των προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών, στην πραγματικότητα προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος καθώς η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι οξειδαναγωγική. Ως εκ τούτου η παραπάνω μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί και ως μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας..

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ανήκει στην κατηγορία της μεταφοράς ηλεκτρονίων, γι' αυτό δεν πρέπει να ξαφνιάζει το γεγονός ότι το “πολυφαινολικό προφίλ” που προσδιορίζεται με αυτή τη μέθοδο παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα με τη FRAP.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, παρασκευάζεται με ανάμιξη $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, π. HCl , 85% H_3PO_4 και ύδωρ και βράσιμο για 10 h. Κατόπιν προστίθεται $Li_2SO_4 \cdot 4H_2O$, το οποίο δίνει στο αντιδραστήριο το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα.

Η ακριβής χημική σύσταση του αντιδραστήριου δεν είναι γνωστή, η αντίδραση όμως που συμβαίνει περιλαμβάνει αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου.²⁰



Προφανώς η παραπάνω αντίδραση δεν είναι επιλεκτική μόνο για τις φαινόλες και μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία και άλλων αναγωγικών παραγόντων (βιταμίνη C, Cu(I), κ.τ.λ.). οι φαινολικές ουσίες αντιδρούν με το αντιδραστήριο F-C μόνο σε βασικό περιβάλλον, για το λόγο πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου F-C, το pH του δείγματος γίνεται βασικό ($pH \approx 10$) με προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 . Η απόσπαση ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαινολικού ανιόντος που ανάγει το αντιδραστήριο F-C σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε σύμπλοκο που απορροφά σε μήκος κύματος 745-750 nm.

Η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται από τους Singleton και Rossi³⁸ έχει ως εξής: 1 ml δείγματος κατάλληλα αραιωμένου, αναμιγνύεται με 60 ml ύδατος και 5 ml αντιδραστήριου F-C. Στη συνέχεια προστίθενται 15ml διαλύματος Na_2CO_3 και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100ml με προσθήκη ύδατος. Μετά από επώαση για 2 h απουσία φωτός, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται γαλλικό οξύ ως πρότυπη ουσία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος FC είναι απλή, επαναλήψιμη και εύκολη, επομένως έχει εξελιχθεί σε μια μέθοδο ρουτίνας τόσο για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτική δράσης.

2.4.7 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:

Η μέθοδος των Singleton και Rossi³⁸, τροποποιήθηκε ώστε να μετατραπεί σε μικρομέθοδο. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

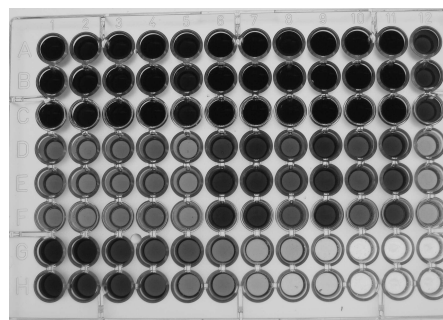
- Αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu's phenol reagent 2N (Fluka)
- Na_2CO_3 anhydrous powder (Aldrich)
- Γαλλικό οξύ (Sigma)

Οι υποδοχείς δειγμάτων (microplates) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 96-θέσεων U bottom της Greiner.

Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στο Fluostar Galaxy με αναλυτή μικροπλακών (BMG Labtechnologies)

2.4.7.1 Πειραματική διαδικασία:

Από τα διαλύματα των εκχυλισμάτων σε MeOH συγκέντρωσης 10 mg/ml (stock solutions) παρασκευάζονται κατάλληλες αραιώσεις (συνήθως 1000 και 200 μ g/ml) σε διαλύτη $H_2O/EtOH$ (85:15). Οι αραιώσεις κρίνονται απαραίτητες προκειμένου η απορρόφηση να είναι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου και να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert. Από αυτές τις αραιώσεις τοποθετούνται 50 μ L εις τριπλούν στις οπές των υποδοχέων. Επίσης παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος γαλλικού οξέος στην περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 160-32 mg/L προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς. Στη συνέχεια προστίθενται 50 μ L απεσταγμένου νερού και 100 μ L διαλύματος Na_2CO_3 20% w.v. μετά από 10 min προστίθενται 50 μ L αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu αραιωμένου με απεσταγμένο νερό 1:1. Το

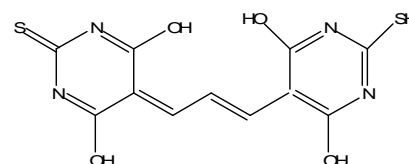


micropplate καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και αφήνεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Η απορρόφηση των δειγμάτων καταγράφεται στα 595 nm. Η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών προσδιορίζεται βάσει της καμπύλης αναφοράς σε mg γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος ή mg γαλλικού οξέος ανά L οίνου.

2.4.8 *In vitro* Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος οξείδωσης LDL

Αυτή η μέθοδος συνίσταται στην προκαλούμενη οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) από Cu(II). Η ανίχνευση της οξείδωσης γίνεται με προσδιορισμό της συγκέντρωσης της μαλοναλδεύδης (MDA) που απελευθερώνεται στο μίγμα της αντίδρασης, η οποία είναι ένα δευτερογενές προϊόν της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Σε όξινες συνθήκες και υπό θέρμανση, η MDA που σχηματίζεται μπορεί να αντιδράσει με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), σχηματίζοντας ένα έγχρωμο προϊόν, που μπορεί να ανιχνευθεί είτε με μέτρηση της απορρόφησης στα 532 nm είτε με φθορισμομετρία.³⁹⁻⁴⁰ (Η LDL-χοληστερόλη που χρησιμοποιείται απομονώνεται από ανθρώπινο πλάσμα και διατηρείται στους 4°C σε ρυθμιστικό διαλύμα φωσφορικού οξέος με pH 7,4 (PBS), το οποίο περιέχει EDTA για την αποφυγή της αυτοοξείδωσης της LDL). Πριν την πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται απομάκρυνση του EDTA συνήθως με χρήση μεμβράνης. Η πειραματική διαδικασία συνοπτικά έχει ως εξής: διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος LDL και Cu(II), ο όγκος συμπληρώνεται με PBS, οπότε σχηματίζεται ένα γαλάκτωμα και οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. ένας δοκιμαστικός σωλήνας χωρίς Cu(II), χρησιμεύει ως θετικό control, ενώ ένας δοκιμαστικός σωλήνας χωρίς αντιοξειδωτικό χρησιμεύει ως αρνητικό control.

Προκειμένου να παρακολουθηθεί η πορεία της αντίδρασης, κάθε 2 h περίπου απομακρύνονται 0,5 ml μίγματος, στα οποία προστίθενται 0,25 ml διαλύματος TBA (1% 50 mM σε NaOH) και 0,25 ml διαλύματος TCA (2,8%). Τα δείγματα επωάζονται



Σχήμα 2.6 Έγχρωμο προϊόν αντίδρασης TBA και MDA¹⁵

σε θερμοκρασία 95°C για 45 min, οπότε σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν (Σχήμα 2.6)

Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 532 nm, αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα που σχηματίζεται. Η ποσοτικοποίηση της παραγόμενης MDA, γίνεται με καμπύλη αναφοράς πρότυπης ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις.

2.4.9 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:

Η πειραματική διαδικασία στηρίχθηκε στη μέθοδο των Yu και συνεργατών⁴⁰ με ορισμένες τροποποιήσεις. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της μεθόδου ήταν:

- Lipoprotein low density from human plasma (LDL) ≥ 95% solution (Sigma)
- 2-Thiobarbituric acid (TBA) ≥ 98% (Sigma-Aldrich)
- Trichloroacetic acid (TCA) *Biochemica Ultra* ≥ 99,5% (Fluka)
- Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 Aldrich
- 2,2(thienylmethylene)malonaldehyde (MDA) Aldrich
- CuSO₄ anhydrous powder ≥ 99,99%, Aldrich
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) anhydrous ≥ 99,99%, Aldrich

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Εμπορικό διάλυμα LDL το οποίο αραιώθηκε με διάλυμα PBS σε τελικό όγκο 4,43 mL ώστε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι 1,12 mg/mL.
- Διάλυμα CuSO₄ 0,2 mM που παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση 25 mg CuSO₄ σε απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 500 mL.
- Διάλυμα TCA 2,8% v.v που παρασκευάστηκε με προσθήκη 700 μL TCA 100% σε απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 25 mL.

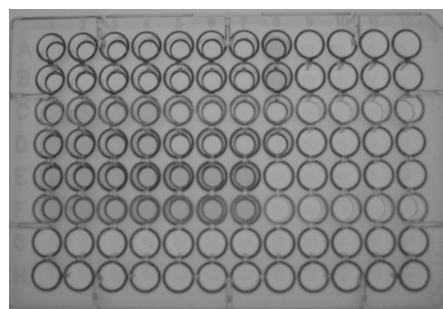
- Διάλυμα TBA 1% w.v. που παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση 250mg σε διάλυμα NaOH 50 mM με θέρμανση και ανάδευση. Ο όγκο προσαρμόστηκε στα 25 mL.
- Διάλυμα MDA συγκέντρωσης 200 mM σε DMSO (stock solution), το οποίο παρασκευάστηκε με προσθήκη 40 μ L MDA ($d=0,92$) σε 760 μ L DMSO. Από το πυκνό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε διαλύτη PBS με συγκεντρώσεις μεταξύ 40-2,5 nM προκειμένου να παρασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς.

Τα πλακίδια (microplates) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν U bottom 96 θέσεων της Greiner με αναλυτή μικροπλακών (BMG Labtechnologies)

2.4.9.1 Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

Από τα εκχυλίσματα των δειγμάτων παρασκευάζονται πυκνά διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/ml σε διαλύτη DMSO (stock solutions). Από το πυκνό διάλυμα στη



συνέχεια παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις συγκέντρωσης 1000 μ g/mL, 100 μ g/mL και 10 μ g/mL σε διαλύτη DMSO. Σε eppendorf tubes χωρητικότητας 1,5 mL, τοποθετούνται 36 μ L διαλύματος LDL, στη συνέχεια προστίθενται 20 μ L από κάθε αραιώση εκχυλίσματος και 100 μ L CuSO_4 0,2 mM. Τέλος προστίθενται 44 μ L PBS ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 200 μ L. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών στο μίγμα της αντίδρασης είναι: 200 μ g protein/mL, 100 nM CuSO_4 , και 100 μ g/mL, 10 μ g/mL ή 1 μ g/mL δείγματος. Επίσης παρασκευάζεται ένα θετικό control χωρίς CuSO_4 αλλά με 100 μ L H_2O και ένα αρνητικό χωρίς δείγμα αλλά με 20 μ L DMSO. Τα eppendorf tubes σκεπάζονται και αφήνονται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός. Στη συνέχεια σε κάθε μίγμα προστίθενται 100 μ L δ /τος TBA 1% w.v. και 100 μ L δ /τος TCA 2,8% v.v και τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 95°C για 1h. Αφού η φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου φυγοκεντρούνται για 10 min στις 12000 rpm και θερμοκρασία 4°C, ώστε να καταβυθιστούν τα αιωρούμενα

σωματίδια. Στη συνέχεια 100 μL από την κάθε συγκέντρωση τοποθετούνται σε υποδοχείς δειγμάτων (microplates) 96-θέσεων U bottom εις τριπλούν και λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 550 nm με αναλυτή μικροπλακών (μήκος κύματος αναφοράς 690 nm). Το ποσοστό της LDL που οξειδώθηκε σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% LDL_{ox} = \left(\frac{A_{sample} - A_{positive}}{A_{negative} - A_{positive}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Σχέση 2.8})$$

όπου: LDL_{ox} = η οξειδωμένη LDL-χοληστερόλη

A_{sample} = η απορρόφηση του δείγματος

$A_{positive}$ = η απορρόφηση του θετικού control

$A_{negative}$ = η απορρόφηση του αρνητικού control

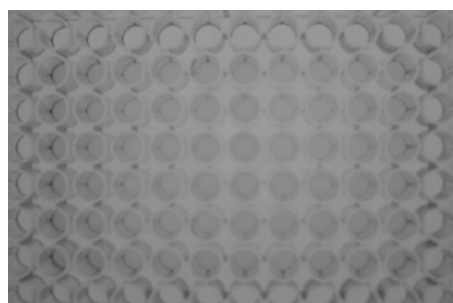
Στη συνέχεια σχηματίζεται γραφική παράσταση του ποσοστού της οξειδωμένης LDL ($\%LDL_{ox}$) συναρτήσεως της συγκέντρωσης του δείγματος σε $\mu\text{g/ml}$ από την οποία εξάγεται η τιμή IC_{50} (Inhibitory Concentration), η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του δείγματος η οποία είναι ικανή να προστατεύσει το 50% της LDL από την οξείδωση.

Για τον υπολογισμό του IC_{50} , χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα OriginPro 7.0.

Επίσης η ποσότητα της μαλοναλδεύδης που παράχθηκε κατά την οξείδωση της LDL μπορεί να υπολογιστεί βάσει της καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζεται με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις MDA ως προς την απορρόφηση.

2.4.10 *In vitro* Αντιοξειδωτική Δράση-Μέθοδος ενδοκυτταρικών ROS

Οι περισσότερες τεχνικές μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας εφαρμόζονται σε εξωκυτταρικά συστήματα, με συνέπεια να μη λαμβάνονται υπόψη οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την απόκριση των κυττάρων και



πιθανόν να διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο. Επομένως για την περιγραφή της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός προϊόντος με όρους πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή πειραμάτων σε κυτταρικό επίπεδο. Η ουσία Dichlorodihydrofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών ROS. Πρόκειται για μη πολική ουσία η οποία διαχέεται γρήγορα στον ενδοκυττάριο χώρο. Οι εστεράσες των κυττάρων υδρολύουν την $H_2DCF-DA$ στη μη φθορίζουσα ουσία H_2DCF η οποία είναι πολική με αποτέλεσμα να παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατά την οξείδωση της H_2DCF παράγεται το DCF που φθορίζει ισχυρά. Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι η οξείδωση της H_2DCF συμβαίνει μόνο παρουσία H_2O_2 , όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι στην πραγματικότητα η διαδικασία παραγωγής του DCF, είναι πολύ πιο περίπλοκη. Η H_2DCF μπορεί να οξειδωθεί από ένα πλήθος προοξειδωτικών παραγόντων όπως περοξειδάσες, και συμπαραγόντες (σίδηρος, οξειδάση της ξανθίνης και κυτοχρώματα)⁴¹. Περαιτέρω η διάσπαση της H_2DCF από τις εστεράσες μπορεί να απελευθερώσει H_2O_2 που προκαλεί την αυτοοξείδωση της. Σαν αποτέλεσμα το σήμα της DCF ενισχύεται. Επομένως η $H_2DCF-DA$ είναι μια ουσία κατάλληλη για την ανίχνευση ενός μεγάλου εύρους οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα όταν τα κύτταρα τελούν υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.⁴²

2.4.11 Πειραματική Διαδικασία-Υλικά και Μέθοδοι:

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές ανθρώπινων αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων HVTs-SM1, τα οποία είχαν αναπτυχθεί στο εργαστήριο κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γήρανσης του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.⁴³⁻⁴⁴

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στην ιδανική θερμοκρασία των 37°C σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), εφοδιασμένο με νεομυκίνη (G418 200 $\mu\text{g/ml}$, Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) καθώς και με πενικιλίνη (100 U/ml), στρεπτομυκίνη (100 $\mu\text{g/ml}$) και 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Τα κύτταρα HVTs-SM1 όταν έφτασαν σε ποσοστό πυκνότητας, περίπου 80%-90%, ανακαλλιεργήθηκαν με θρυψίνη-κιτρικού οξύ (0.25%-0.3%, αντίστοιχα). Το επίπεδο των ενδοκυτταρικών ROS, υπολογίστηκε με τη μέθοδο των Athanasas και συνεργατών.⁴¹

Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής:

Αρχικά τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε microplates 96-θέσεων με επίπεδο πυθμένα, σε συγκέντρωση 10,000 κύτταρα/οπή. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ξανά στους θαλάμους επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 18 h, χρονικό διάστημα αρκετό ώστε τα κύτταρα να προσαρμοστούν και να αρχίσουν να μεγαλώνουν. Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) των εκχυλισμάτων σε DMSO συγκέντρωσης 10^4 μg/ml. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις στο μέσο της καλλιέργειας (MEM 10% FBS). Από κάθε αραιώση τοποθετήθηκαν 25 μL εις τριπλούν στις οπές των microplates, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων να είναι 100 μg/ml, 33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml και 3,7 μg/ml. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο, με το ίδιο ποσοστό DMSO, όπως οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 h και στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε με απόχυση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate buffered saline) και σε κάθε οπή προστέθηκαν 100μL διαλύματος DCFH-DA 10μM. Μετά από επώαση 3 h στους 37°C, ο φθορισμός μετρήθηκε με χρήση του φωτομέτρου Fluostar Galaxy με αναλυτή μικροπλακών, για τιμές διέγερσης 485 nm και εκπομπής 520 nm.

Σαν θετικό control, χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες ουσίες (+)-κατεχίνη, κερκετίνη, τρόλοξ ($((\pm)$ -6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, $\geq 98\%$ Fluka)) και ένα εμπορικό εκχύλισμα πεύκου (πυκνογενόλη, Vilco).

Η αξιολόγηση της μεταβολή των ενδοκυτταρικών ROS, πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με τις τιμές φθορισμού του μάρτυρα για κάθε συγκέντρωση και χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη σχέση:

$$\%ROS = \left(\frac{F_{sample}}{F_{control}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Σχέση 2.9})$$

όπου:

F_{sample} = η τιμή φθορισμού του δείγματος

$F_{control}$ = η τιμή φθορισμού του control

Στη συνέχεια σχηματίζεται γραφική παράσταση του ποσοστού των ενδοκυτταρικών ROS (%ROS) συναρτήσει της συγκέντρωσης του δείγματος σε $\mu\text{g/ml}$ από την οποία εξάγεται η τιμή IC_{50} (Inhibitory Concentration), η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του δείγματος η οποία είναι ικανή να μειώσει το ποσοστό των ενδοκυτταρικών ROS κατά 50% .

Για τον υπολογισμό του IC_{50} , χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα OriginPro 7.0.

2.4.12 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας

Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε με την δοκιμασία τετραζολίου για μικροκαλλιέργειες. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υποδοχείς δειγμάτων (microplates) 96-θέσεων με επίπεδο πυθμένα σε συγκέντρωση περίπου 10,000 κυττάρων / οπή και επώστηκαν για 24 h σε 37 °C. Ακολούθως εκτέθηκαν σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεκαπέντε εκχυλισμάτων -σταφυλιών, φλοιών, γιγάρτων και βοστρύχων- εντός DMSO. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100 $\mu\text{g/ml}$, 33,3 $\mu\text{g/ml}$, 11,1 $\mu\text{g/ml}$, 3,7 $\mu\text{g/ml}$ και 1,1 $\mu\text{g/ml}$. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο, με το ίδιο ποσοστό DMSO, όπως οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων. Από κάθε αραιώση τοποθετήθηκαν 25 μL σε κάθε οπή εις τριπλούν και τα κύτταρα επώστηκαν για 48 h. το επωαστικό μέσον αντικαταστάθηκε από MTT (Sigma) συγκέντρωσης 1 mg/mL εντός DMEM (Biochrom KG) και η επώση συνεχίστηκε για 4 h. Κατόπιν το MTT διαλύθηκε εντός 2-προπανόλης και μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 550 nm, με αναλυτή μικροπλακών (μήκος κύματος αναφοράς 690 nm). Για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκε ο λόγος της απορρόφησης για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος προς την απορρόφηση του μάρτυρα. Για όλα τα δείγματα ο λόγος αυτός είχε τιμή $\leq 1,0$ επομένως θεωρείται ότι στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα.

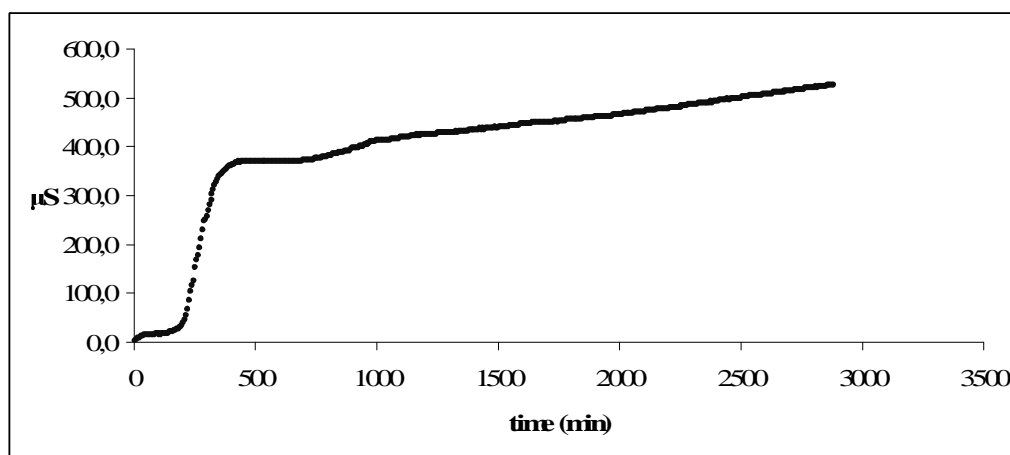
2.4.13 Μελέτη Αντιβακτηριακής Δράσης

Η αντιβακτηριακή δράση των υπό εξέταση εκχυλισμάτων μελετήθηκε με τις ακόλουθες μεθόδους:

- 1) Μέθοδος Αγωγιμότητας,
- 2) Μέθοδος Τρυβλίων

2.4.13.1 Μέθοδος Αγωγιμότητας

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρακολουθώντας τις μεταβολές αγωγιμότητας που συμβαίνουν στο μέσο ανάπτυξης εξαιτίας της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Η μέτρηση της αγωγιμότητας πραγματοποιείται με το σύστημα Malthus (Διεθνές Ραδιόμετρο, Κοπεγχάγη, Δανία). Ένα χαρακτηριστικό σωληνάκι αγωγιμότητας Malthus περιέχει ηλεκτρόδια πλατίνας, που επιτρέπουν την μέτρηση της αγωγιμότητας του μέσου ανάπτυξης. Το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων είναι 6min και η παρακολούθηση της ανάπτυξης διαρκεί συνολικά 48 h. Η μετρούμενη αγωγιμότητα εκφράζεται σε μονάδες μS (microsiemens). Η γραφική απεικόνιση των τιμών αγωγιμότητας συναρτήσει του χρόνου ονομάζεται καμπύλη αγωγιμότητας (Εικόνα 2.13).



Εικόνα 2.13 Χαρακτηριστική καμπύλη αγωγιμότητας μικροοργανισμού

2.4.13.2 Μέθοδος Τρυβλίων

Πρόκειται για την κλασσική μέθοδο απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου, η οποία στηρίζεται στην ανάπτυξη αποικιών του μικροοργανισμού πάνω σε στερεό θρεπτικό μέσο και καταμέτρηση του αριθμού τους. Η γραφική απεικόνιση του πληθυσμού του μικροοργανισμού συναρτήσει του χρόνου ονομάζεται καμπύλη ανάπτυξης.

2.4.13.3 Ανάλυση Δεδομένων

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της αγωγιμότητας βασίζεται στην σύγκριση της περιοχής (εμβαδό) κάτω από την καμπύλη αγωγιμότητας με αυτό του μάρτυρα.⁴⁵ Η αποτελεσματικότητα του αντιμικροβιακού συστήματος που εξετάζεται, προκύπτει από την τιμή του λόγου του εμβαδού κάτω από την καμπύλη αγωγιμότητας του αντιμικροβιακού δια του εμβαδού κάτω από την καμπύλη αγωγιμότητας του μάρτυρα.⁴⁶ Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη υπολογίζεται με τη μέθοδο των τραπεζίων και ο λόγος τους καλείται κλασματική περιοχή FA (fractional area) και είναι καθαρός αριθμός.⁴⁶ Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του FA, τόσο μεγαλύτερη δράση έχει η ουσία που εξετάζεται.

Κατά αντιστοιχία το FA μπορεί να υπολογιστεί και στην περίπτωση που εφαρμόζεται η τεχνική των τρυβλίων, όπου χρησιμοποιούνται τα εμβάδα κάτω από τις καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού που κατασκευάζονται βάσει των τιμών πυκνότητας πληθυσμού (cfu/mL) συναρτήσει του χρόνου.

2.4.13.4 Υπολογισμός της ΕΑΣ

Για τον προσδιορισμό της ΕΑΣ (Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης MIC), δηλαδή της μικρότερης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού που απαιτείται προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη συνάρτηση του Gompertz.⁴⁶⁻⁴⁸

Η εξίσωση αυτή συνδέει την τιμή του FA (y) με το δεκαδικό λογάριθμο της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού (x) και έχει τη μορφή:

$$y = A + C \cdot \exp\{-\exp[B(x - M)]\} \quad (\text{Σχέση 2.10})$$

όπου

A: η χαμηλότερη ασύμπτωτη της γραφικής παράστασης $y(x)$

B: η κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της γραφικής παράστασης $y(x)$

C: η απόσταση μεταξύ της μεγαλύτερης και της μικρότερης ασύμπτωτης της γραφικής παράστασης $y(x)$

M: ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης στο σημείο καμπής της γραφικής παράστασης $y(x)$

Η τιμή της ΕΑΣ, ορίζεται ως το σημείο τομής της ευθείας $y=A + C$, με την εφαπτομένη στο σημείο $(M, (A + Ce^{-1}))^{46}$ και δίνεται από την εξίσωση:

$$ΕΑΣ = 10^{(M + \frac{1}{B})} \quad (\text{Σχέση 2.11})$$

Οι τιμές των παραμέτρων A, C, B και M, προκύπτουν από μια μη-ευθύγραμμη διαδικασία προσαρμογής (non-linear fitting procedure)⁴⁶ Για τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω τιμών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Fig.P 2.5.

2.4.14 Πειραματική Διαδικασία

2.4.14.1 Μικροοργανισμός

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *L. monocytogenes* Scott A (ορολογικός τύπος 4b), το οποίο παρελήφθη από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα κύτταρα του μικροοργανισμού επώαστηκαν για μια νύχτα σε υγρό θρεπτικό μέσο BH (Merck cat. No 1.100493), σε θερμοκρασία 30 °C, ιδανική για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση (3000 rpm για 15min στους 4 °C). Ακολούθησε απόχυση του υπερκείμενου υγρού, έκπλυση των κυττάρων δύο φορές και μεταφορά τους σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε θρεπτικό μέσο BH (LabM) ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι της τάξης $10^6 - 10^7$ cfu/mL.

2.4.14.2 Προετοιμασία κυψελίδων αντίδρασης

2ml από το υγρό θρεπτικό μέσο BH τοποθετήθηκε στις γυάλινες κυψέλες του malthus, που φέρουν τα ηλεκτρόδια, πωματίστηκαν και αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 min.

2.4.14.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση, ήταν εκχυλίσματα ραγών, γιγάρτων, στεμφύλων και βοστρύχων δύο ερυθρών και μιας λευκής ποικιλίας της Σαντορίνης. Από κάθε εκχύλισμα προετοιμάστηκαν τρία διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) σε DMSO, με συγκεντρώσεις 6%, 5% και 4% w/v αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν επτά διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις στις κυψελίδες του malthus σε υγρό θρεπτικό μέσο BH, καλύπτοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων από 3% έως 0,03125% w/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο, με το ίδιο ποσοστό DMSO, όπως οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων.

Οι κυψελίδες επώαστηκαν στους 30 °C για 30 min και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με 0,2 ml από μια καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού *L.*

monocytogenes Scott A, που είχε επωαστεί για 18 h στους 30 °C και η συγκέντρωση της ήταν 10³ CFU/ml. Οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν στο malthus και επώαστηκαν στους 30 °C για 48 h.

2.5 Βιβλιογραφία 2^ο Κεφαλαίου

- 1) Szepesi G. How to use Reverse Phase HPLC, VCH, Publishers, Inc., New York **1992**.
- 2) Robards K., Haddad P. R., Jackson P. E. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Academic Press Limited, 2nd ed., London **1997**.
- 3) Χατζηιωάννου Θ. Π. και Κουμπάρη Μ. Α. Ενόργανη Ανάλυση, 2^η έκδοση, Αθήνα **1997**.
- 4) Kazakevich Y.V. and LoBrutto R (eds). HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley and Sons, New York. **2007**.
- 5) Meyer V. R. Practical High Performance Liquid Chromatography, Sond edition, John Wiley and Sons, New York **1993**.
- 6) Meyer V. R. Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York. **2006**.
- 7) Rubinson, K.A., Rubinson, J.F. Contemporary Instrumental Analysis, Prentice Hall Inc **2000**.
- 8) Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Practical HPLC Method Development, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York **1997**.
- 9) Heyrman A.N. and Henry R.A. Importance of Controlling Mobile Phase pH in Reversed Phase HPLC. <http://www.hplcsupply.com/>
- 10) Weast R.C., ed. Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press: Cleveland, **1974**.
- 11) Galensa, R., and Herrmann, K. Analysis of flavonoids by HPLC. *J. Chromatogr.*, **1980**, 189, 217.
- 12) Robards K. and Antonovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, A Review. *Analyst* **1997**, 122, 11R—34R.

- 13) Tsao R. and Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1018, 29–40.
- 14) Bresselle F., Browet-Petit M., Audrau M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* **1996**, 686, 3–10.
- 15) www.chem.uoa.gr
- 16) www.chem.ucalgary.ca
- 17) www.bris.ac.uk
- 18) Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 5^η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκης **2002**, Αθήνα.
- 19) Alonso-Salces R.M., Ndjoko K., Queiroz E.F., Ioset J.R., Hostettmann K., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1046, (1-2), 89-100.
- 20) Prior R. L., Wu X. And Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (10), 4290–4302
- 21) Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., Flavonoids protect neuronal cells from oxidant stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 30, 433–446.
- 22) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25–30.
- 23) Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2309–2314.
- 24) Noruma, T., Kikuchi, M., Kawakami, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, 42 361–370.

- 25) Abuin E. Lissi E., Ortiz P. and C. Henriquez C. Uric Acid Reaction With DPPH Radicals At The Micellar Interface. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **2002**, *47*, 145—149.
- 26) Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70—76.
- 27) Benzie, I. F. F.; Szeto, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 633—636.
- 28) Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *50* 3122—3128.
- 29) Gil, M. I. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4581—4589.
- 30) Pellegrini, P., Serafini, M., Colombi B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2812—2819.
- 31) Proteggente, A. R.; Pannala, A. S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van De Put, F.; Dacombe, C.; Rice- Evans, C. A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Res.* **2002**, *36*, 217—233.
- 32) Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *48*, 3396—3402.
- 33) Huang D., Ou B. And Prior R. L., (), The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.* **2005** *53*, 1841—1856
- 34) Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *22*, 749—760.

- 35) Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry, *Biochim. t Biophys. Acta* **2005**, 1721, 174–184.
- 36) Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **2006**, 94, 550–557.
- 37) Folin, O. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J. Biol. Chem.* **1927**, 73, 672–649.
- 38) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144–158.
- 39) Singh R. P., Chidambara Murthy K. N. and Jayaprakasha G. K. Studies on the activity of pomegranate (*punica granatum*) Peel and seed extracts using in vitro models, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 81–86
- 40) Yu L. L., Zhou K. K. and Parry J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry and hemp seed oil, *Food Chem.* **2005**, 91, (4), 723–749.
- 41) Athanasas K, Magiatis P, Fokialakis N, Skaltsounis A.L, Pratsinis H, Kletsas D. Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 973–977.
- 42) Mayer D., Muhlhofer A., Biesalski H.-K. A modified system to evaluate the potency of anti-oxidative compounds in different cell types in vitro. *Eur J Med Res.* **2001**, 6, 201–208.
- 43) Hsieh J.K, Kletsas D., Clunn G, Hughes A.D. Schachter M., Demoliou-Mason C. p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in the proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vas.c Biol.* **2000**, 20, 973–981
- 44) Gorgoulis V.G., Pratsinis H., Zacharatos P., Demoliou C., Sigala F., Asimacopoulos P.J., Papavassiliou A.G., Kletsas D. p53-dependent ICAM-1

- overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Lab Invest.* **2005**, *85*, 502—511.
- 45) Chorianopoulos, N.G., Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Evergetis, E.T., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E. A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 778—786.
- 46) Lambert, R.J.W., Pearson, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values, *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 784—790.
- 47) Mackey, B.M., Derrick, C.M. The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* **1982**, *53*, 243—251.
- 48) Lambert, R.J.W., Skandamis, P., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 453—462.

3. ΟΙΝΟΣ

3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

3.1.1 Εισαγωγή

Η διαδικασία της οινοποίησης συνεπάγεται την εφαρμογή μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών, οι οποίες είναι σε απευθείας συνάρτηση με το είδος του υπό παραγωγή οίνου. Επιπλέον, ο εκσυγχρονισμός των οινοποιείων έχει επιτρέψει την ανάπτυξη και εφαρμογή νέων τεχνικών που διασφαλίζουν καλύτερο έλεγχο των συνθηκών οινοποίησης, ενώ η μεγάλη πρόοδος της βιοτεχνολογίας έχει κάνει δυνατή τη χρήση βελτιωμένων στελεχών ζυμομυκήτων για την παραγωγή ποιοτικότερων οίνων.

Παραδοσιακά, η οινοποίηση είναι δυνατόν να διαχωριστεί στους παρακάτω δύο τύπους, την:

1. Λευκή
2. Ερυθρά/Ροζέ

Επιπλέον υπάρχουν και ορισμένες ειδικές κατηγορίες οινοποίησης, οι οποίες αποσκοπούν στην παραγωγή οίνων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως¹:

1. Αφρώδεις
2. Γλυκείς
3. Τύπου Nouveau
4. Αρωματισμένοι

Στη συνέχεια παρουσιάζονται –σε γενικές γραμμές– τα σημαντικότερα στάδια της οινοποιητικής διαδικασίας που εφαρμόζονται στα σύγχρονα οινοποιεία.

3.1.2 Αποβοστρύχωση

Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους (τρυγητό), τα σταφύλια οδηγούνται στις εγκαταστάσεις του οινοποιείου και οδηγούνται, ανάλογα με την ποικιλία τους, στις αντίστοιχες σταφυλοδόχους. Εκεί λαμβάνει χώρα το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας τους, η αποβοστρύχωση που αφορά το μηχανικό διαχωρισμό των ραγών από τον κύριο κορμό των σταφυλιών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο εκραγιστήριο.^{1,2} Η απομάκρυνση των βοστρύχων και των φύλλων –από το πρώτο στάδιο της οινοποίησης– αποσκοπεί στην αποφυγή της εκχύλισης των τανινών τους στο μούστο, επειδή αυτές προσδίδουν στυφή και πικρή γεύση που είναι ανεπιθύμητη. Επιπλέον, η απομάκρυνση των φύλλων περιορίζει την παραγωγή αλδευδών και αλκοολών κατά την ενζυματική οξείδωση του λινολεϊκού και λινολενικού οξέος.³

3.1.3 Σύνθλιψη

Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η σύνθλιψη των ραγών προκειμένου να αποφευχθεί η μικροβιακή μόλυνση και να η περιοριστεί η οξείδωση. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι ράγες περνούν ανάμεσα από τους κυλίνδρους του θλιπτηρίου, όπου συνθλίβονται. Στη συνέχεια ο χυμός και η σταφυλόμαζα συλλέγονται σε δεξαμενές. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα σύγχρονα οινοποιεία η σύνθλιψη γίνεται με ήπιο τρόπο έτσι ώστε να παραμείνουν ανέπαφα τα γίγαρτα, αφού η εκχύλιση των ελαίων ή/και των τανινών τους επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

3.1.4 Προσθήκη διοξειδίου του θείου

Η προσθήκη SO₂ λειτουργεί προστατευτικά κατά της οξείδωσης και της δράσης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Η πρώτη προσθήκη γίνεται πριν τη ζύμωση, ενώ η τελευταία κατά το στάδιο της εμφιάλωσης. Όμως δεν αποκλείεται και η προσθήκη κατά τα ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας με στόχο να εξασφαλιστεί η παρουσία ικανής ποσότητας SO₂.¹

3.1.5 Εκχύλιση

Στο στάδιο αυτό διαφοροποιείται η λευκή από την ερυθρά οινοποίηση. Για την παραγωγή ερυθρών και ροζέ κρασιών, ο σταφυλοπολτός οδηγείται σε συγκεκριμένες

δεξαμενές όπου ο χυμός παραμένει σε επαφή με τα στέμφυλα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των χρωστικών και των αρωματικών συστατικών. Αρχικά η εκχύλιση πραγματοποιείται με τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων που απελευθερώνονται κατά την έκθλιψη των ραγών,⁴ αφού αυτά συμμετέχουν στην αποδέσμευση και διαλυτοποίηση των συστατικών που βρίσκονται προσκολλημένα στα κύτταρα του φλοιού της σάρκας και των γιγάρτων.³

Η ένταση του ερυθρού χρώματος εκάστου οίνου εξαρτάται αποκλειστικά από το χρονικό διάστημα που διαρκεί η εκχύλιση. Πρακτικά, για τους ροζέ οίνους απαιτούνται λιγότερες από 24 h, ενώ για τους ερυθρούς οίνους η εκχύλιση μπορεί να διαρκέσει 3—5 ημέρες. Τέλος, ορισμένοι οίνοι που προορίζονται για παλαίωση είναι δυνατόν να διατηρηθούν υπό τις συνθήκες αυτές για 21 ημέρες.

Η εκχύλιση στην ερυθρά οινοποίηση ουσιαστικά λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με τη ζύμωση. Έτσι στη διαδικασία της εκχύλισης παίζει πρωτεύοντα ρόλο και η παραγόμενη αιθανόλη, τόσο μέσω της αλκοολικής εκχύλισης, όσο και της αιθανόλυσης. Η αιθανόλη είναι σημαντική για την εκχύλιση των ανθοκυανινών—που προσδίδουν το χρώμα στον οίνο— και των άχρωμων πολυφαινόλων (όπως φλαβονοειδή, προανθοκυανίνες και φαινολικά οξέα) από τους φλοιούς και τα γιγάρτα,. Επίσης η αιθανόλη προσροφά αρωματικά συστατικά από τους φλοιούς και τη σάρκα των σταφυλιών, διαμορφώνοντας τα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων.¹

Έως πρόσφατα, η ζύμωση λάμβανε χώρα κυρίως με τη δράση των ενδογενών ζυμών που υπήρχαν στην επιφάνεια των ραγών. Όμως η εξέλιξη της βιοτεχνολογίας έχει πλέον επιτρέψει τη χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμών, τα οποία εξασφαλίζουν την ανάπτυξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών του οίνου και αποτρέπουν τη μικροβιακή αλλοίωση του προϊόντος από τη δράση των ανεξέλεγκτων μικροοργανισμών.

Στη λευκή οινοποίηση, το στάδιο της εκχύλισης είναι κατά πολύ βραχύτερο. Έτσι, η ποσότητα των πολυφαινόλων που εκχυλίζονται στο γλεύκος είναι σε άμεση συνάρτηση με τη θερμοκρασία που εφαρμόζεται και το χρόνο επαφής των στεμφύλων με το χυμό.^{1,3}

3.1.6 Πίεση

Μετά το στάδιο της εκχύλισης, η σταφυλόμαζα οδηγείται στα πιεστήρια, όπου μέσω της πίεσης που ασκείται –συνήθως με τη χρήση αέρα– ολοκληρώνεται η παραγωγή του χυμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι καλύτερης ποιότητας οίνοι παράγονται από χυμούς “ελευθέρας ροής”, δηλαδή τους χυμούς που συλλέγονται πριν εφαρμοστεί πίεση. Από τους χυμούς αυτούς παράγονται οι εμφιαλωμένοι οίνοι υψηλής ποιότητας.

3.1.7 Απολάσπωση

Το γλεύκος που παραλαμβάνεται από το πιεστήριο, οδηγείται σε δεξαμενές, όπου παραμένει για 12–24 h σε θερμοκρασία 5-8 °C, προκειμένου να διαυγάσει. Η διαδικασία στηρίζεται στη βαρύτητα, αφού αυτή είναι το αίτιο που βοηθά στην καθίζηση των αιωρούμενων σωματιδίων.

3.1.8 Ζύμωση

Μετά την απολάσπωση το γλεύκος οδηγείται στις δεξαμενές, όπου θα πραγματοποιηθεί η ζύμωση (ή θα συνεχιστεί/ολοκληρωθεί, για τους ερυθρούς οίνους).

Κατά την αλκοολική ζύμωση εκλύεται θερμική ενέργεια με αποτέλεσμα να αυξηθεί η θερμοκρασία. Η ιδανική θερμοκρασία ζύμωσης είναι 25–28 °C για τους ερυθρούς και 15–18 °C για τους λευκούς οίνους, αφού η επίτευξη υψηλότερων θερμοκρασιών συνεπάγεται απώλεια των αρωματικών συστατικών. Έτσι, η διαδικασία της ζύμωσης γίνεται υπό ψύξη, σε δεξαμενές με διπλά τοιχώματα μέσα στα οποία κυκλοφορεί νερό που ψύχει το σύστημα.

Μετά την ολοκλήρωση της αλκοόλης ζύμωσης είναι δυνατόν να λάβει χώρα και μια δευτέρα, η μηλογαλακτική που προκαλείται από τη δράση των βακτηρίων. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος για την παραγωγή των ερυθρών οίνων, ιδιαίτερα σε περιοχές με ψυχρό κλίμα, όπου η αυξημένη οξύτητα του γλεύκους προκαλεί προβλήματα στην οινοποίηση. Κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό, με αποτέλεσμα να γίνεται ηπιότερη η γεύση του παραγόμενου οίνου.¹

3.1.9 Μετάγγιση

Μετά το τέλος της ζύμωσης, ο οίνος αφήνεται μέσα σε δεξαμενές για 2 περίπου εβδομάδες, κατά τη διάρκεια των οποίων καθιζάνουν τα στερεά υπολείμματα των σταφυλιών και τα νεκρά κύτταρα των ζυμών. Ακολουθεί η μετάγγιση του καθαρού οίνου από την επιφάνεια των δεξαμενών σε άλλες καθαρές δεξαμενές. Η μετάγγιση συμβάλει στην επίτευξη μεγαλύτερης διαύγειας του οίνου, επιπρόσθετα όμως η σύντομη επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο επηρεάζει θετικά τον οίνο.

3.1.10 Ωρίμανση - παλαίωση

Συχνά ο φρέσκος οίνος δεν είναι έτοιμος προς κατανάλωση, αφού τα γευστικά του χαρακτηριστικά δεν έχουν ισορροπήσει ακόμη. Για το λόγο αυτό απαιτείται ένα χρονικό διάστημα προκειμένου να ωριμάσει. Η ωρίμανση του οίνου γίνεται είτε σε ανοξείδωτες δεξαμενές είτε σε δρύινα βαρέλια. Οι ανοξείδωτες δεξαμενές δεν επηρεάζουν το χαρακτήρα του παραγόμενου οίνου, αποτρέπουν όμως την επαφή του με το οξυγόνο. Αντίθετα, τα βαρέλια εμπλουτίζουν τον οίνο με αρώματα από το ξύλο, όμως το πορώδες υλικό τους επιτρέπει την επαφή με το οξυγόνο και συνεπώς την ταχύτερη ωρίμανσή τους. Ο χρόνος παλαίωσης κυμαίνεται από λίγες εβδομάδες έως αρκετά χρόνια. Κατά τη διαδικασία της παλαίωσης επέρχονται μεταβολές στο χρώμα, την οσμή και τη γεύση του οίνου. Ο οίνος γίνεται «απαλός» στη γεύση, χάνει την οσμή της «ζύμης» και αποκτά μια ευωδία που με την πάροδο του χρόνου γίνεται περισσότερο σύνθετη. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται κυρίως στις βραδείες χημικές αντιδράσεις (οξειδώσεις, αναγωγές και εστεροποιήσεις) των συστατικών του οίνου, οι οποίες πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της παραμονής του είτε στα δρύινα βαρέλια ή/και στις φιάλες. Επιπλέον, κατά την παλαίωση παρατηρείται μια μείωση της περιερχόμενης αλκοόλης λόγω εξάτμισης, μείωση της οξύτητας λόγω καταβύθισης των αλάτων του τρυγικού οξέος και σε ορισμένες περιπτώσεις μια μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας, δηλαδή παραγωγή οξικού οξέος που σχετίζεται με τη δραστηριοποίηση των βακτηρίων της οξικής ζύμωσης.¹

Η παλαίωση αφορά κυρίως τους ερυθρούς και μόνο λευκούς οίνους υψηλής ποιότητας. Η διάρκειά της ποικίλει, ανάλογα με το κρασί, αποσκοπώντας πάντα στη βελτίωσή του. Οι παλαιωμένοι ερυθροί οίνοι αποκτούν ένα έντονο κεραμιδί χρώμα, ενώ οι λευκοί έντονο κίτρινο (κεχριμπαρένιο) χρώμα.

3.1.11 Διαύγαση

Πριν από την εμφιάλωση προηγείται το στάδιο της διαύγασης, που αποτελείται από μια σειρά διαδικασιών που συνολικά αποσκοπούν στην απαλλαγή του οίνου από τα αιωρούμενα σωματίδια που προκαλούν θόλωση. Στο πλαίσιο αυτό, οι συνηθέστερες διαδικασίες που πραγματοποιούνται είναι οι παρακάτω:

- 1) Σταθεροποίηση: πραγματοποιείται με την ψύξη του οίνου σε θερμοκρασίες κάτω από το μηδέν, έτσι ώστε να καταβυθιστούν τα τρυγικά άλατα
- 2) Κολλάρισμα: αποσκοπεί στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών που προκαλούν τη θόλωση, αλλά και στη μείωση των επιπέδων των τανινών που δημιουργούν ιζήματα και επηρεάζουν αρνητικά τα γευστικά χαρακτηριστικά του οίνου. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου, κυρίως στους λευκούς οίνους. Για τη πραγματοποίηση του κολλαρίσματος χρησιμοποιούνται διάφορες ομάδες μορίων, όπως πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη, καζεΐνη), συνθετικά πολυμερή (π.χ. PVPP, nylon), πολυσακχαρίτες (π.χ. άγαρ, κόμμεα), πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, μετεονίτης, καολίνης κλπ².
- 3) Φιλτράρισμα: είναι μια προαιρετική διαδικασία που έχει ως σκοπό την απομάκρυνση από τον οίνο των αιωρούμενων σωματιδίων και των μικροοργανισμών. Αρκετοί οινοποιοί αποφεύγουν την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής, καθώς το φιλτράρισμα μπορεί να αφαιρέσει “σώμα” και αρωματικές ουσίες από ένα κρασί. Πάντως, η λογική χρήση του φιλτραρίσματος αφήνει το κρασί σχεδόν ανέπαφο.

3.1.12 Εμφιάλωση

Πριν την εμφιάλωση πραγματοποιείται μια τελευταία προσθήκη διοξειδίου του θείου. Ο εμφιαλωμένος οίνος είναι πλέον έτοιμος προς πώληση και κατανάλωση.

3.2 Πολυφαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών και των οίνων

3.2.1 Εισαγωγή

Οι οίνοι εμπεριέχουν μια μεγάλη ποικιλία πολυφαινολών, οι περισσότερες από τις οποίες εκχυλίζονται από τα σταφύλια. Η παρουσία των πολυφαινολών έχει ιδιαίτερη σημασία αφού το ποιοτικό και ποσοτικό τους περιεχόμενο συμβάλλει στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ενός οίνου, ενώ στους ερυθρούς οίνους το πολυφαινολικό περιεχόμενο καθορίζει το χρώμα και επιτρέπει την παλαίωση λειτουργώντας ως συντηρητικά.⁵ Εξάλλου, χάρη στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους,⁶⁻⁹ οι βιοδραστικές πολυφαινόλες των οίνων έχουν συνδεθεί με διάφορα οφέλη για την υγεία.

Οι διαφορετικές τεχνικές που εφαρμόζονται κατά την ερυθρά και λευκή οινοποίηση έχουν ως αποτέλεσμα να εκχυλίζεται πολύ μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών από τα σταφύλια στους ερυθρούς οίνους σε σύγκριση με τους αντίστοιχους λευκούς οίνους. Εκτός από την τεχνική της οινοποίησης, καθοριστικό λόγο για τη διαμόρφωση του ποιοτικού και ποσοτικού περιεχομένου των πολυφαινολών στους οίνους παίζουν η προς οινοποίηση ποικιλία, οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, οι καλλιεργητικές τεχνικές και η προσβολή των αμπελιών από διάφορες ασθένειες. Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να τονιστεί ξανά ότι ο ερυθρός οίνος αποτελεί προϊόν εκχύλισης του συνόλου των σταφυλιών, ενώ ο λευκός οίνος αποτελεί προϊόν μόνο του χυμού των σταφυλιών. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη ότι το μεγαλύτερο μέρος των πολυφαινολών κατανέμεται στο φλοιό και τα γίγαρτα των σταφυλιών, είναι φυσικό οι ερυθροί οίνοι να περιέχουν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών σε σχέση με τους λευκούς. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε ένα ποτήρι ερυθρού οίνου περιέχονται κατά μέσο όρο 200 mg πολυφαινολών, σε σύγκριση με τα μόλις 40 mg πολυφαινολών που περιέχονται σε ένα ποτήρι λευκού οίνου.⁵ Στον Πίνακα 3.1 αναφέρονται οι περιεκτικότητες ερυθρών και λευκών οίνων σε πολυφαινόλες βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων. Οι τιμές αυτές είναι ενδεικτικές και παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις.

Πίνακας 3.1 Τυπική πολυφαινολική σύσταση λευκών και ερυθρών επιτραπέζιων οίνων⁵.

ΕΙΔΟΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ		ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ	
	Φρέσκοι	Παλαιωμένοι	Φρέσκοι	Παλαιωμένοι
Μη φλαβονοειδή	mg/L		mg/L	
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	154	130	165	60
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	10	15	60	60
Στιλβένια	0,5	0,5	7	7
Ταννίνες από το βαρέλι	0	100	0	250
Σύνολο	164,5	245,5	232	377
Φλαβονοειδή	mg/L		mg/L	
Μονομερείς φλαβανόλες	25	15	200	100
Προανθοκυανιδίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες	20	25	750	1000
Φλαβονόλες	-	-	100	100
Ανθοκυανίνες	-	-	400	90
Διάφορα φλαβονοειδή	-	-	50	75
Σύνολο	45	40	1500	1365
Συνολικές πολυφαινόλες	209,5	285,5	1732	1742

Οι πολυφαινόλες των οίνων και των σταφυλιών μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με τον ανθρακικό τους σκελετό, σε φλαβονοειδή και σε μη φλαβονοειδή φαινολικά παράγωγα. Από αυτά, τα φλαβονοειδή περιέχονται κυρίως στους φλοιούς, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους, ενώ τα μη φλαβονοειδή συναντώνται κυρίως στη σάρκα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κύριοι τύποι των μορίων που ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες και έχουν ανιχνευθεί στους οίνους και τα παράγωγα τους.⁶

3.2.2 Μη φλαβονοειδή:

Τα κυριότερα μη φλαβονοειδή φαινολικά παράγωγα που συναντώνται στους οίνους, είναι τα φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμμωμικά οξέα) και τα στιλβένια.

3.2.2.1 Υδροξυβενζοϊκά οξέα

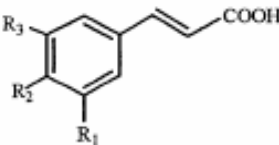
Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, στους οίνους έχουν ανιχνευθεί το γαλλικό, το π-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό (3,4-διδροξυβενζοϊκό), το βανιλικό, το συριγγικό και το γενιστικό οξύ.⁶ Εκτός από τα ελεύθερα υδροξυβενζοϊκά οξέα, με χρήση της φασματοσκοπίας μαζών έχει διαπιστωθεί ότι στους οίνους εμπεριέχονται και ποικίλα παράγωγά τους, όπως οι εστέρες και οι γλυκοσίδες.¹⁰⁻¹¹

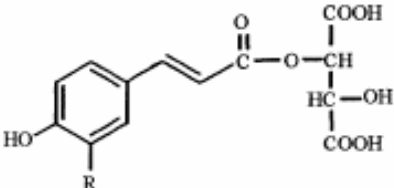
Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, μόνο το γαλλικό έχει αποδειχθεί ότι εμπεριέχεται και στα σταφύλια, είτε ως ελεύθερο οξύ ή ως γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης.¹²

3.2.2.2 Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (καφεϊκό, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ), βρίσκονται στα κενοτόπια του φλοιού και της σάρκας των σταφυλιών, ως εστέρες του τρυγικού οξέος. Κατά κύριο λόγο οι παραπάνω εστέρες βρίσκονται με τη μορφή του *trans* ισομερούς και μόνο ένα μικρό τους ποσοστό είναι υπό τη μορφή του *cis* ισομερούς.⁶ Επίσης στα σταφύλια έχει αναφερθεί και η παρουσία γλυκοζιτών των υδροξυκινναμωμικών οξέων.¹³

Στους οίνους, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα ανιχνεύονται ως ελεύθερα, αλλά και ως εστέρες¹⁴ (Σχήμα 3.1).

Υδροξυκινναμωμικό οξύ	R ₁	R ₂
	H	OH
π-Κουμαρικό	H	OH
Καφεϊκό	OH	OH
Φερουλικό	OCH ₃	OH
Σινναπικό	OCH ₃	OH

Εστέρας	R ₁
	
<i>Trans</i> -καφεοστρυγικό οξύ (καφταρικό οξύ)	OH
<i>Trans</i> -π-κουμαροτρυγικό οξύ (κουταρικό οξύ)	H
<i>Trans</i> -φερουλοτρυγικό οξύ (φερταρικό οξύ)	OCH ₃

Σχήμα 3.1 Υδροξυκινναμωμικά οξέα και εστέρες αυτών που συναντώνται στους οίνους⁶

3.2.2.3 Στιλβένια

Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των στιλβενίων είναι φυτοαλεξίνες οι οποίες παράγονται στα σταφύλια, κυρίως στο φλοιό, τα φύλλα, τους βοστρύχους και τις ρίζες, ως αντίδραση σε παθογενείς καταστάσεις, όπως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και η προσβολή από μύκητες και βακτήρια.¹⁵⁻¹⁷ Η *trans* και η *cis* μορφές της ρεσβερατρώλης, όπως και τα αντίστοιχα γλυκοζιτικά τους παράγωγα – *trans* και *cis* πικεΐδης– έχουν ανιχνευτεί πολλές φορές τόσο σε σταφύλια όσο και σε οίνους.¹⁸⁻²⁰ Το 2002 οι Landrault και συνεργάτες²¹ για πρώτη φορά κατάφεραν να ποσοτικοποιήσουν, σε οίνους διάφορων τύπων, την παρουσία των διμερών στιλβενίων παλλιδόλης και ε-βινιφερίνης.

3.2.3 Φλαβονοειδή

Οι κύριοι τύποι φλαβονοειδών που εμπεριέχονται στα σταφύλια και τους οίνους είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυανίνες, ενώ σε μικρότερο βαθμό συναντώνται οι φλαβανονόλες και οι φλαβόνες. Οι ενώσεις αυτές υπάρχουν τόσο υπό τη μορφή των άγλυκων, όσο και με τη μορφή γλυκοζιτών.

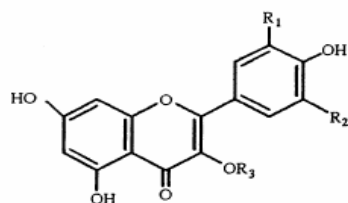
3.2.3.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι κίτρινες χρωστικές που βρίσκονται κυρίως στα κενотоπία των επιδερμικών ιστών. Στο είδος *Vitis vinifera* απαντώνται τα μόρια κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη και ισοραμνετίνη με τη μορφή των 3-Ο-γλυκοζιτών τους. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί οκτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες στους φλοιούς των σταφυλιών⁶ (Σχήμα 3.2).

Το περιεχόμενο των οίνων σε φλαβονόλες διαφοροποιείται σε σύγκριση με το αντίστοιχο των σταφυλιών, λόγω της παρουσίας σε αυξημένες ποσότητες και των άγλυκων μορίων, τα οποία κατά πάσα πιθανότητα προκύπτουν από την υδρόλυση των γλυκοζιτών κατά τις διαδικασίες της οινοποίησης, ωρίμανσης ή/και παλαίωσης των οίνων.²²⁻²⁴

Φλαβονόλη	R ₁	R ₂
Καμφερόλη	H	H
Καμφερόλη-3-Ο- γλυκοσίδης	H	H
Καμφερόλη-3-Ο- γαλακτοσίδης	H	H
Καμφερόλη-3-Ο- γλουκουρονίδιο	H	H
Κερκετίνη	OH	H
Κερκετίνη-3-Ο- γλυκοσίδης	OH	H
Κερκετίνη-3-Ο- γλουκουρονίδιο	OH	H
Μυρισετίνη	OH	OH
Μυρισετίνη-3-Ο- γλυκοσίδης	OH	OH
Μυρισετίνη-3-Ο- γλουκουρονίδιο	OH	OH
Ισοραμνετίνη	OCH ₃	H
Ισοραμνετίνη-3-Ο- γλυκοσίδης	OCH ₃	H

γαλ= γαλακτόζη,
 γλυκ= γλυκόζη,
 γλουκ=
 γλουκουρονικό οξύ



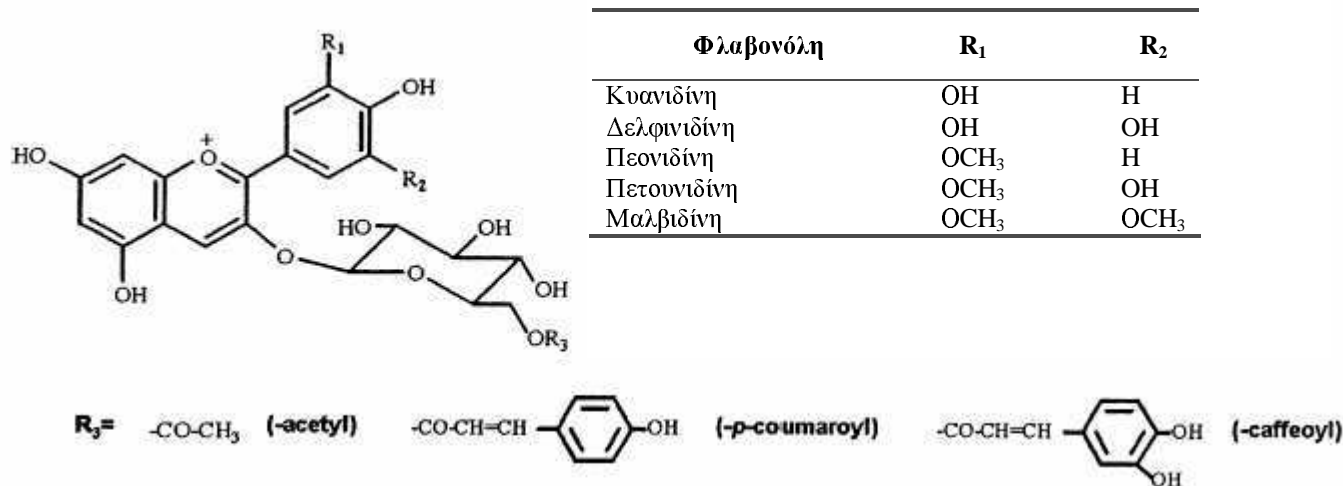
Σχήμα 3.2 Χαρακτηριστικές φλαβονόλες οίνων⁶.

Ο ρόλος των φλαβονολών είναι προστατευτικός κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα η παρουσία τους είναι αυξημένη σε σταφύλια που είναι άμεσα εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία.²⁵ Σύμφωνα με τους McDonald και συνεργάτες,²⁶ οι ποικιλίες σταφυλιών που έχουν παχύ φλοιό ή μεγάλη τιμή λόγου φλοιού/όγκου ράγας οδηγούν στην παραγωγή οίνων με μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβονόλες, οι παρουσία των οποίων συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα του χρώματος του οίνου.

3.2.3.2 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές που βρίσκονται κατά κύριο λόγο στο φλοιό των σταφυλιών και είναι υπεύθυνες για το χρώμα των ερυθρών σταφυλιών και οίνων. Οι ανθοκυανίνες που βρίσκονται στο είδος *Vitis vinifera*, είναι οι 3-Ο-

μονογλυκοσίδες (τα ακετυλιωμένα τους παράγωγα) των παρακάτω πέντε ανθοκυανιδινών: δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη, κυανιδίνη και μαλβιδίνη.



Σχήμα 3.3 Χαρακτηριστικές ανθοκυανίνες οίνων⁶

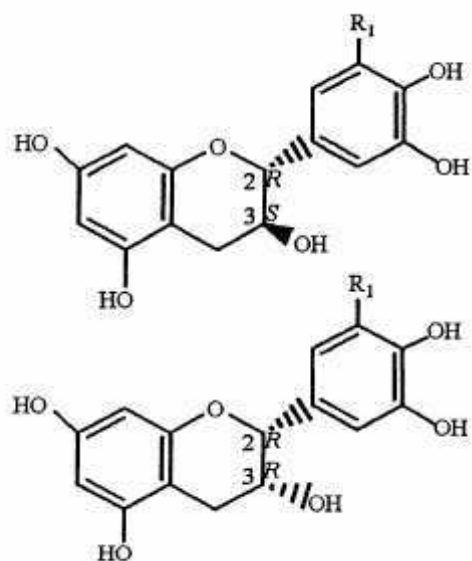
3.2.3.3 Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες βρίσκονται στα γίγαρτα, τους φλοιούς και τους βοστρύχους των σταφυλιών, υπό τη μορφή μονομερούς, ολιγομερούς και πολυμερούς. Τα τελευταία αναφέρονται και ως προανθοκυανιδίνες ή αδιάλυτες τανίνες.

Μονομερή:

Οι μονομερείς φλαβανόλες που ανιχνεύονται στο είδος *Vitis vinifera*, είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η (+)-γαλλοκατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Η (-)-επικατεχίνη ανιχνεύεται και ως εστέρα του γαλλικού οξέος (3-Ο-γαλλικός εστέρα της επικατεχίνης). Η παρουσία της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης και του γαλλικού της εστέρα έχει επίσης πιστοποιηθεί στα γίγαρτα και στους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ μόνο τα δυο πρώτα μόρια έχουν αναφερθεί ως συστατικά των βοστρύχων.²⁷

Στους οίνους έχει αναφερθεί η παρουσία της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης, του 3-Ο-γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, της (+)-γαλλοκατεχίνης και του γαλλικού εστέρα της γαλλοκατεχίνης.²⁸⁻²⁹



Φλαβαν-3-όλη	R ₁	C-2	C-3
(+)-Κατεχίνη	H	R	S
(+)-Γαλλοκατεχίνη	OH	R	S
(-)-Επικατεχίνη	H	R	R
(-)-Επιγαλλοκατεχίνη	OH	R	R

Σχήμα 3.4 Χαρακτηριστικές φλαβανόλες οίνων⁶.

3.2.4 Προανθοκυανιδίνες

Οι προανθοκυανιδίνες με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες (30). Στα σταφύλια του είδους *Vitis vinifera* έχει αναφερθεί η παρουσία των παρακάτω δύο διαφορετικών ειδών προανθοκυανιδινών, οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος των ανθοκυανιδινών που απελευθερώνεται κατά τη διάσπασή τους:

- α) **προκυανιδίνες**, οι οποίες αποτελούνται από μονάδες (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης, και
- β) **προδελφινιδίνες** που αποτελούνται από μονάδες (+)-γαλλοκατεχίνης και (-)-επιγαλλοκατεχίνης.

Στα γίγαρτα εμπεριέχονται μόνο προκυανιδίνες, ενώ στους φλοιούς υπάρχουν τόσο προκυανιδίνες όσο και προδελφινιδίνες. Τέλος, στους οίνους ανιχνεύονται προανθοκυανιδίνες και τα δυο είδη.⁶

3.2.5 Χημικές αντιδράσεις πολυφαινολών κατά την οινοποίηση

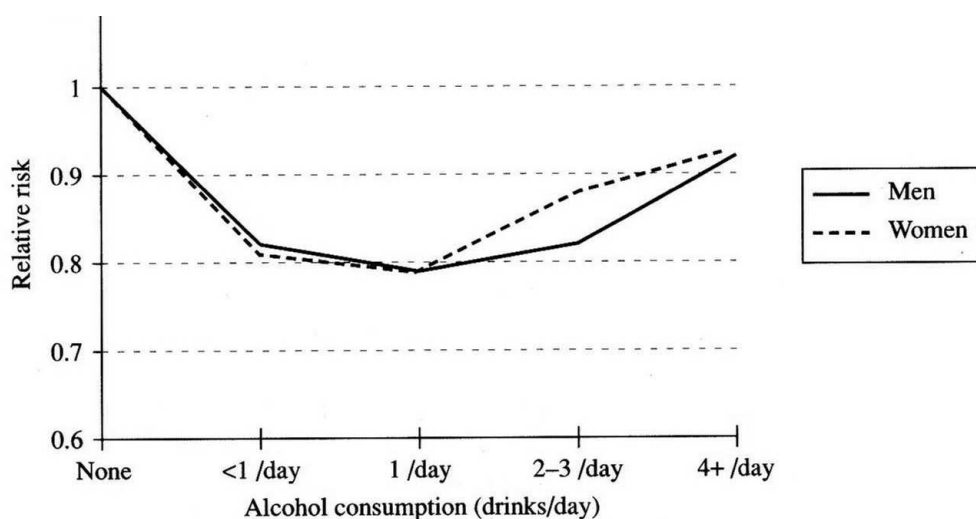
Οι κυριότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της οινοποίησης είναι είτε ενζυματικές και χημικές αντιδράσεις οξείδωσης ή αντιδράσεις συμπύκνωσης. Μερικές από τις τελευταίες αναφέρονται σε αντιδράσεις συμπύκνωσης ανθοκυανινών με τανίνες, τανινών με τανίνες, με τη συμμετοχή ακεταλδεύδης, αντιδράσεις συμπύκνωσης φλαβανολών, αντιδράσεις συμπύκνωσης ανθοκυανινών-πυρουβικού οξέος κλπ. Οι αντιδράσεις αυτές δεν παρουσιάζονται διεξοδικά, αφού δεν εμπίπτουν στο άμεσο ενδιαφέρον της διατριβής.

3.3 Βιολογικές ιδιότητες Οίνου

3.3.1 Εισαγωγή

Σε όλες σχεδόν τις επιδημιολογικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί τις τελευταίες δεκαετίες με στόχο τη διασαφήνιση της σχέσης μεταξύ θνησιμότητας και κατανάλωσης αλκοόλ, κατά τη γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων προκύπτει μια καμπύλη σχήματος **U** ή **J**. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι η κατανάλωση αλκοόλ –σε λογικές ποσότητες ημερησίως– έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας από οποιαδήποτε φυσιολογική αιτία σε άνδρες και γυναίκες, σε σχέση με άτομα που δεν καταναλώνουν αλκοόλ.^{31–36} Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση μεταξύ σχετικού κινδύνου θνησιμότητας και ημερήσιας κατανάλωσης αλκοόλ, σε μια έρευνα που διεξήχθη από τους Thun και συνεργάτες,³⁶ στις Η.Π.Α.

Ο ορισμός της “μέτριας κατανάλωσης” αλκοόλ μεταφράζεται σε 1-4 ποτά ημερησίως για τους ενήλικες άνδρες και 1-2 ποτά ημερησίως για τις γυναίκες.³⁷ Οι ποσότητες που αντιστοιχούν σε ένα ποτό γενικώς ορίζονται ως: 45 mL λικέρ, 150 mL οίνου ή 360 mL μύρας.³⁸



Σχήμα 3.5 Γραφική παράσταση σχετικού κινδύνου θνησιμότητας και ημερήσιας κατανάλωσης αλκοόλ.³⁶

3.3.2 Οίνος - Επιδημιολογικές Μελέτες

Οι πρώτες αναφορές για τα οφέλη της κατανάλωσης οίνου στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων ανάγονται στα τέλη της δεκαετίας του '70. Πρώτος ο St Leger και συνεργάτες³⁹ το 1979, έδειξε ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του ποσοστού θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα και της κατανάλωσης οίνου σε 18 χώρες του Δυτικού κόσμου. Στη συνέχεια, ευρείες μεταγενέστερες επιδημιολογικές έρευνες επιβεβαίωσαν αυτή την παρατήρηση.⁴⁰⁻⁴⁴

Το 1987 ο Richard⁴⁴ ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο “Γαλλικό Παράδοξο” για να υπογραμμίσει την αντίφαση μεταξύ του χαμηλού ποσοστού θνησιμότητας από νόσους της στεφανιαίας στη Γαλλία και της παραδοσιακής τους διαίτας που είναι πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά. Οι Renaud & de Lorgeril⁴³ το 1992, έκαναν ευρέως γνωστό τον όρο με τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων της έρευνας τους που έδειχνε πολύ μικρά ποσοστά θνησιμότητας από ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις στη Γαλλία, παρά τα υψηλά ποσοστά πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων μέσω της διατροφής τους. Τα τελευταία είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα ποσά που καταγράφονται για τη διατροφή στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Βρετανία. Ενδεικτικά, σε δείγμα 100.000 ανδρών ηλικίας 35—64 ετών, ο ετήσιος ρυθμός θνησιμότητας ήταν 78 στην Τουλούζη, 348 στο Μπέλφαστ και 380 στη Γλασκόβη.

Η υπόθεση της υπεροχής του οίνου σε σχέση με τα άλλα οινοπνευματώδη ποτά ενισχύθηκε περαιτέρω από τα αποτελέσματα μιας εκτεταμένης έρευνας που διεξήχθη στη Δανία και είναι γνωστή ως “Copenhagen Heart Study”. Η έρευνα αυτή διήρκεσε περισσότερο από 12 χρόνια και συμμετείχαν 13.285 άνδρες και γυναίκες.⁴⁶ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, στα άτομα με χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση οίνου, ο κίνδυνος θανάτου από καρδιαγγειακές παθήσεις μειώθηκε στο μισό σε σχέση με αυτούς που δεν κατανάλωναν καθόλου αλκοόλ. Τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο θετικά για τα άτομα που κατανάλωναν μπύρα ή αποστάγματα.

Η αξία των αποτελεσμάτων αυτών ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο όταν η ίδια ομάδα διεξήγαγε περαιτέρω έρευνες, στις οποίες πέραν του είδους του οινοπνευματώδους ποτού ελήφθησαν υπόψη και άλλοι παράγοντες όπως εάν τα άτομα ήταν καπνιστές, το μορφωτικό τους επίπεδο, η φυσική τους δραστηριότητα και ο δείκτης μάζας του σώματος.³⁵ Στην έρευνα αυτή, τα άτομα που κατανάλωναν κάποιο άλλο αλκοολούχο ποτό σε λογικές ποσότητες, είχαν σχετικό ποσοστό

κινδύνου θνησιμότητας από όλες τις αιτίες 0,9 ενώ στα άτομα που κατανάλωναν οίνο το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 0,6.

3.3.2.1 Σύγκριση του οίνου με άλλα αλκοολούχα ποτά.

Όσον αφορά τη σύγκριση του οίνου με άλλα οινοπνευματώδη ποτά, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Τα έως τώρα ερευνητικά αποτελέσματα δεν έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα ως προς την υπεροχή ή όχι του οίνου, σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά στη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας. Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες αναφέρουν ότι ο οίνος –ιδιαίτερα ο ερυθρός– υπερέχει σε σχέση με την καθαρή αλκοόλη και τα άλλα οινοπνευματώδη ποτά,^{35, 44} υπάρχουν όμως και άλλες που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ οίνου και άλλων οινοπνευματωδών ποτών.⁴⁷⁻⁴⁹ Αρκετοί ερευνητές όπως οι Klatsky και συνεργάτες,⁵⁰ βρήκαν ότι η κατανάλωση αλκοόλ γενικά έχει προστατευτική δράση στις νόσους της στεφανιαίας, με τη μύρα να διαθέτει ένα ελαφρό προβάδισμα στους άνδρες και τον οίνο στις γυναίκες. Όμως μια περισσότερο πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο οίνος πιθανότατα υπερέχει στον τομέα αυτόν έναντι των άλλων οινοπνευματωδών ποτών.⁵¹ Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί από ευρωπαίους ερευνητές υποστηρίζουν τα οφέλη του οίνου, ενώ οι περισσότερες έρευνες στις Ηνωμένες πολιτείες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στη δράση μεταξύ των οινοπνευματωδών ποτών.³⁸ Ένας λόγος που πιθανόν να εξηγεί τις διαφορές αυτές είναι η υπόθεση ότι οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των ερυθρών οίνων διαφοροποιούνται ανάλογα με την ποικιλία, τη χώρα προέλευσης και τον τύπο τους.⁵²⁻⁵³ Επιπλέον, η φύση των επιδημιολογικών μελετών οδηγεί σε μια σειρά από μειονεκτήματα που αναφέρονται τόσο στον τρόπο διεξαγωγής τους, όσο και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων τους. Έτσι είναι κατά κάποιο τρόπο φυσιολογικό να μην είναι δυνατή η εξαγωγή ενιαίων συμπερασμάτων. Για παράδειγμα μια επιδημιολογική έρευνα που διεξήχθη πρόσφατα στην Ιταλία αποκάλυψε ότι η μείωση στα ποσοστά θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερη όταν η κατανάλωση οίνου συνοδεύταν από την κατανάλωση φαγητού.⁵⁴

Στις επόμενες παραγράφους συνοψίζονται οι πληροφορίες που έχουν προκύψει από έρευνες που αφορούν στη βιολογική δράση του οίνου και των εκχυλισμάτων του.

3.3.3 Αντιαθηρωματική Δράση

Η πλειοψηφία των ερευνών για τις βιολογικές δράσεις του οίνου, έχει επικεντρωθεί στις ευεργετικές του ιδιότητες στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, οι οποίες παραμένουν ως μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες.³⁸ Οι αρχικές ενδείξεις έχουν προέλθει από επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες όμως στη συνέχεια υποστηρίχθηκαν από κλινικές μελέτες με αποτέλεσμα πλέον να έχουν αποδειχθεί με πειραματικά ευρήματα. Στο πλαίσιο αυτό, μια σειρά *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων έδειξαν ότι, εκτός από την αιθανόλη που περιέχει ο οίνος, τα φαινολικά παράγωγα που εμπεριέχονται σε αυτόν παίζουν ενεργό παρεμποδιστικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Στον Πίνακα 3.1 συνοψίζονται οι κύριες ομάδες των φαινολικών παραγώγων που περιέχονται στους λευκούς και τους ερυθρούς οίνους. Όπως τονίστηκε και προηγουμένως, η περιεκτικότητα των φαινολών είναι κατά πολύ μεγαλύτερη στους ερυθρούς οίνους, γεγονός στο οποίο αποδίδονται οι καλύτερες βιολογικές δράσεις των ερυθρών οίνων.

Ενίσχυση λειτουργίας του ενδοθηλίου

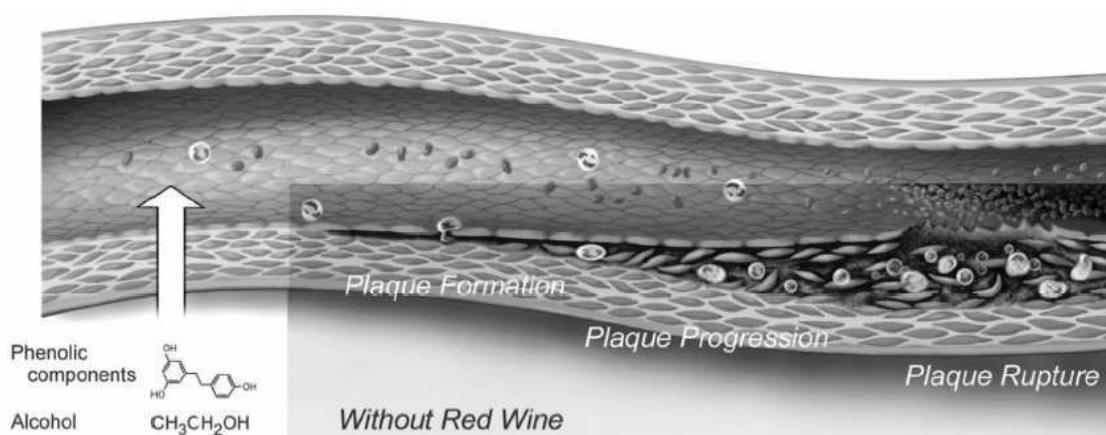
Το ενδοθήλιο των αγγείων –που βρίσκεται στην επιφάνεια των ιστών και του αίματος– είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αλλαγές που παρατηρούνται στους αιμοδυναμικούς δείκτες της καρδιάς, όπως στη ροή του αίματος και την αρτηριακή πίεση. Το ενδοθήλιο ανταποκρίνεται στις αλλαγές αυτές συνθέτοντας και στη συνέχεια απελευθερώνοντας στην κυκλοφορία του αίματος αγγειοενεργές ουσίες. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται η ομοιόσταση των αγγείων.³⁸

Η διαταραχή της ισορροπίας που περιγράφηκε, οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αρτηριών. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι το τραυματισμένο ενδοθήλιο είναι πλέον επιρρεπές στο σχηματισμό αθηρωμάτωσης.

Η αθηρωμάτωση δημιουργείται όταν τα μονοκύτταρα –ορισμένα λευκοκύτταρα του αίματος– κινούμενα μέσω της αιματικής οδού και του τραυματισμένου ενδοθηλίου μιας αρτηρίας, καταλήγουν στο τοίχωμά της όπου υφίστανται διαφοροποίηση μετατρέπόμενα σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα είναι εφοδιασμένα με τους ονομαζόμενους υποδοχείς αποκάθαρσης, οι οποίοι συνδέονται και εσωτερικοποιούν τα μόρια της LDL και ιδιαίτερα τα μόρια της οξειδωμένης μορφής της LDL. Με τον τρόπο αυτό, τα μακροφάγα φορτίζονται με χοληστερόλη

και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Ταυτόχρονα όμως, τα λεία μυϊκά κύτταρα κινούνται από το μέσο χιτώνα προς το ενδοθήλιο όπου και πολλαπλασιάζονται, ενώ κάτω από το ενδοθήλιο συσσωρεύονται ως συνδετικός/ελαστικός ιστός, ποικίλα νεκρά κύτταρα, κρύσταλλοι χοληστερόλης και ασβέστιο. Αυτή η συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων και άλλων υλικών διαμορφώνει μια ετερόκλητη συσσώρευση, την αποκαλούμενη αθήρωμα ή αθηρωσκληρυντική πλάκα. Καθώς η πλάκα μεγαλώνει από τη συνεχή εναπόθεση των ανωτέρω υλικών, αυξάνει σε όγκο και καταλαμβάνει το εσωτερικό της αρτηρίας. Αυτό δημιουργεί τοπικά στένωση της αρτηρίας που εμποδίζει την ομαλή ροή του αίματος.⁵⁵

Η αιθανόλη και οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στους ερυθρούς οίνους έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν θετικά την ομαλή λειτουργία του ενδοθηλίου, περιορίζοντας τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Μάλιστα υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι δρουν μεταξύ τους και συνεργιστικά.⁵⁶ Στο σχήμα 3.6 φαίνεται η ευεργετική επίδραση της αλκοόλης και των φαινολικών παραγώγων στη διατήρηση της δομής του ενδοθηλίου των αρτηριών.



Σχήμα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση του προστατευτικού ρόλου των συστατικών του οίνου στην πρόληψη δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας στις αρτηρίες.³⁸

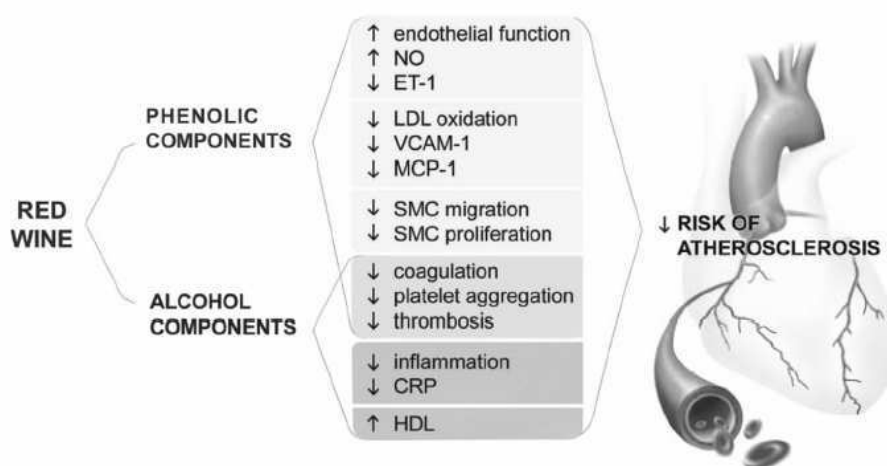
Ο συνολικός μηχανισμός της αντιαθηρωματικής δράσης των ερυθρών οίνων αποτελεί συνισταμένη των παρακάτω δράσεων των συστατικών του⁵⁸:

1. Αντιοξειδωτική
2. Αντιθρομβωτική

3. Αγγειοδιασταλτική

Μελέτες των Corder και συνεργατών,⁵⁸ (2001), έδειξαν ότι η κατανάλωση ερυθρού οίνου μπορεί να επιβραδύνει την παραγωγή της ενδοθυλίνης-1, ενός σημαντικού μορίου που παράγεται από τα κύτταρα του ενδοθηλίου και εμπλέκεται στη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου. Η υπερβολική παραγωγή αυτής προκαλεί αθηρωσκλήρυνση.

Η Εικόνα 3.7 περιέχει τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα συστατικά του ερυθρού οίνου –αιθανόλη και φαινολικά παράγωγα– συμβάλουν στη μείωση του κινδύνου αθηρωσκλήρυνσης.



Σχήμα 3.7 NO= μονοξείδιο του αζώτου, ET-1= ενδοθυλίνη-1, LDL= λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, VCAM-1= vascular adhesion molecule-1, MCP-1= χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων, SMC= λεία μυϊκά κύτταρα, CRP= ενεργή πρωτεΐνη-C, HDL= υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη.³⁸

Έρευνες σε ζώα

Μια από τις πρώτες έρευνες σε ζώα διεξήχθη από τους Klurfeld και Kritchevsky.⁵⁹ Σε αυτήν, κουνέλια τράφηκαν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά και νερό (μάρτυρες) ή ένα από πέντε διαφορετικά είδη οينوπνευματωδών ποτών με ίση περιεκτικότητα αιθανόλης. Μετά την παρέλευση τριών μηνών όλοι οι μάρτυρες και τα ζώα που έπιναν μύρα, είχαν αναπτύξει ενδοθηλιακές κακώσεις στη στεφανιαία αρτηρία. Τα υπόλοιπα ζώα που κατανάλωναν

άλλα οينوπνευματώδη ποτά παρουσίασαν μειωμένα περιστατικά ενδοθηλιακών κακώσεων σε σχέση με τους μάρτυρες. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι τα ζώα που κατανάλωναν ερυθρό οίνο επέδειξαν τα πλέον εντυπωσιακά αποτελέσματα, αφού οι κακώσεις μειώθηκαν στο 40% σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η υπεροχή του ερυθρού σε σχέση με το λευκό οίνο και το χυμό σταφυλιών έγινε εμφανέστερη με την έρευνα των Demrow και συνεργατών,⁵⁵ στην οποία χρησιμοποιήθηκαν σκυλιά με μηχανική στένωση στεφανιαίων αρτηριών. Σε αυτά επάγονταν περιοδικά η δημιουργία οξείας θρόμβωσης, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την κυκλική μείωση της ροής του αίματος στη στεφανιαία αρτηρία. Όμως το φαινόμενο αυτό εξαλείφθηκε εντελώς με τη χορήγηση ερυθρού οίνου που πραγματοποιήθηκε είτε ενδοφλεβίως σε ποσότητα 1,62 mL/kg ή ενδογαστρικά σε ποσότητα 4,0 mL/kg. Για την επίτευξη αντίστοιχου αποτελέσματος απαιτήθηκε η ενδοφλέβια χορήγηση 2,04 mL/kg χυμού σταφυλιού ή 10 mL/kg ενδογαστρικά. Η χορήγηση λευκού οίνου δεν έδειξε κανένα αξιολογικό αποτέλεσμα, ακόμα και σε δόσεις 2,0 mL/kg και 4,0 mL/kg αντίστοιχα.

Σε μια άλλη ερευνητική προσπάθεια από τους Diebolt και συνεργάτες,⁶⁰ διερευνήθηκε η επίδραση ενός εκχυλίσματος ερυθρού οίνου στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την αγγειακή δραστηριότητα των μυών. Σε αυτά χορηγήθηκαν καθημερινά 20 mg/kg εκχυλίσματος ερυθρού οίνου ενδογαστρικά, ενώ στους μάρτυρες εδόθη 5% γλυκόζη. Το εκχύλισμα του οίνου προκάλεσε μείωση της συστολικής πίεσης σε διάστημα 4 ημερών. Οι αρτές των μυών παρουσίασαν αυξημένη χαλάρωση στην ακετυλοχολίνη, φαινόμενο που αποδόθηκε στην απελευθέρωση αυξημένης ποσότητας NO στο ενδοθήλιο. Σε γενετικό επίπεδο παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή NO-συνθετάσης και κυκλοοξυγενάσης-2 στα αρτηριακά τοιχώματα.

Έρευνες σε ανθρώπους

Οι επιδημιολογικές μελέτες αναμφισβήτητα είναι χρήσιμες, κυρίως λόγω του μεγάλου δείγματος ανθρώπων που αναφέρονται και της πληθώρας των πληροφοριών που παρέχουν. Όμως επειδή οδηγούν αναπόφευκτα σε γενικεύσεις, είναι απαραίτητη και η διεξαγωγή ερευνών σε συγκεκριμένα άτομα προκειμένου να αξιολογηθούν καλύτερα οι επιδράσεις του οίνου στην υγεία και να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί δράσης του.

Οι Seigneur και συνεργάτες,⁶¹ διερεύνησαν την επίδραση του ερυθρού και λευκού οίνου και ενός αποστάγματος σε 16 υγιείς ενήλικες. Η χορήγησή τους για ένα διάστημα 15 ημερών είχε ως αποτέλεσμα το απόσταγμα να μειώσει τη συγκέντρωση της LDL, να ενισχύσει τη συσσώρευση αθηρωματικής πλάκας και να αυξήσει τη συγκέντρωση της apo-AI στον ορό του αίματος. Στους ενήλικες που χορηγήθηκε λευκός οίνος παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης της LDL και της HDL-χοληστερόλης, ενώ η κατανάλωση ερυθρού οίνου προκάλεσε μείωση της αθηρογένεσης και αύξησε τη συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης.

Οι Lavy και συνεργάτες,⁶² πραγματοποίησαν μια έρευνα σε 20 υγιείς ενήλικες άνδρες, οι μισοί από τους οποίους κατανάλωσαν 400 mL ερυθρού οίνου και οι υπόλοιποι 400 mL λευκού οίνου. Η σύγκριση μεταξύ τους κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο ερυθρός οίνος αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση της HDLC και της apo- AI στο πλάσμα.

Οι Struck και συνεργάτες,⁶³ διερεύνησαν την επίδραση του λευκού και ερυθρού οίνου στη συγκέντρωση των λιπιδίων του ορού καθώς και στη δημιουργία αθηρωμάτωσης και οξειδωτικών προϊόντων στο αίμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο ο ερυθρός όσο και ο λευκός οίνος εμπόδισαν σημαντικά τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, μέσω της λειτουργίας της θρομβίνης, ενώ ταυτόχρονα προκάλεσαν μείωση στα επίπεδα της LDL και της οξειδωμένης της μορφής στο αίμα.

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την έρευνα των Goldberg και συνεργατών,⁶³ (1996) που είχε ως αντικείμενο την ικανότητα του ερυθρού και λευκού οίνου να προλαμβάνουν τη συσσώρευση αθηρωματική πλάκας εμποδίζοντας την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και τη σύνθεση των εικοσανοειδών.

Αντίθετα, έρευνες των Fuhrman και συνεργατών,⁶⁵ έδειξαν ότι η κατανάλωση ερυθρού οίνου μειώνει σημαντικά την πιθανότητα οξείδωσης της LDL στον ορό ενηλίκων, παρουσία οξειδωτικών συστημάτων όπως ελευθέρων ριζών και ιόντων Cu^{2+} . Σε αντίστοιχο πείραμα, η χορήγηση λευκού οίνου αύξησε την πιθανότητα των λιπιδίων του πλάσματος και της LDL να υποστούν οξείδωση.

3.3.4 Αντιμικροβιακή Δράση

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του οίνου είναι γνωστές από την αρχαιότητα, καθώς ο οίνος χρησιμοποιείτο ευρύτατα στην απολύμανση των πληγών. Όμως οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του οίνου δεν οφείλονται αποκλειστικά στην

περιεκτικότητα του σε αιθανόλη, αλλά και στις πολυφαινόλες που εμπεριέχει, κυρίως στον ερυθρό οίνο. Υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικές με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του οίνου και των εκχυλισμάτων του.

Το 1995 οι Weisse και συνεργάτες,⁶⁶ συνέκριναν δείγματα ερυθρών και λευκών οίνων, σαλικυλικού βισμούθιου, αιθανόλης και ενός αλκοολούχου αποστάγματος σε σχέση με την παρεμποδιστική τους ικανότητα στην ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων *Salmonella*, *Shigella* και *Escherichia coli*, που ευθύνονται για την εμφάνιση τροφικών δηλητηριάσεων κυρίως στους ταξιδιώτες. Η απευθείας χρησιμοποίηση δειγμάτων οίνου (λευκού και ερυθρού) και σαλικυλικού βισμούθιου έδειξαν την καλύτερη βακτηριοστατική δράση, ενώ όταν εξετάστηκαν αραιωμένα, τα δείγματα του οίνου ήταν περισσότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα του σαλικυλικού βισμούθιου.

Σε ένα διαφορετικό πείραμα οι Dolara και συνεργάτες,⁶⁷ παρασκεύασαν οργανικό ερυθρό οίνο χωρίς την προσθήκη SO₂, σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του οίνου κατά την αρχαιότητα. Σκοπός ήταν η σύγκριση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του οίνου αυτού σε σχέση με τις αντίστοιχες ιδιότητες των οίνων του εμπορίου στην καταπολέμηση των μικροοργανισμών *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* και *Staphylococcus aureus*. Επίσης, προσδιόρισαν και τη βακτηριοστατική δράση της αιθανόλης (συγκέντρωση 3% στο θρεπτικό μέσο), του HCl (τιμή pH 3,5), μίγματος πολυφαινολών που εμπεριέχεται σε οίνους (0,75 g/L) και του οξικού οξέος (συγκέντρωση 0,15 g/L, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που βρίσκεται φυσιολογικά στους οίνους). Η αιθανόλη, το HCl και οι πολυφαινόλες δεν άσκησαν καμία παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αντίθετα, οι εμπορικοί οίνοι (ερυθροί και λευκοί) ήταν περισσότερο αποτελεσματικοί, ενώ και ο οργανικός οίνος έδειξε αξιόλογη βακτηριοστατική δράση, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των οίνων δεν οφείλονται αποκλειστικά στο SO₂ που περιέχουν. Τέλος, το διάλυμα του οξικού οξέος έδειξε δράση ανάλογη με αυτή των οίνων. Αυτή θα μπορούσε να είναι μια εξήγηση της αντιμικροβιακής δράσης των οίνων, καθώς το οξικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, πιθανόν παρεμβαίνοντας στην μεταγραφή των γονιδίων.⁶⁸

Οι Rodriguez-Vaquero και συνεργάτες,⁶⁹ μελέτησαν την ικανότητα αρκετών ερυθρών οίνων και των απομονωμένων φαινολικών παραγώγων που εμπεριέχουν, στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών *Proteus*

mirabilis, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, και διάφορων στελεχών *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Πριν από την εφαρμογή τους, οι οίνοι είχαν υποστεί συμπύκνωση σε διαφορετικό βαθμό και είχε εξατμιστεί η αιθανόλη τους. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε οίνος από τον οποίο είχαν αφαιρεθεί οι πολυφαινόλες και η αιθανόλη. Έτσι, ο μικροοργανισμός *E. Coli* ήταν ο περισσότερο ευαίσθητος ενώ ο *Flavobacterium sp.* εμφάνισε τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα τόσο στους οίνους όσο και στις καθαρές πολυφαινόλες. Όλοι οι οίνοι που μελετήθηκαν έδειξαν αντιμικροβιακή δράση, η οποία ήταν ανάλογη του βαθμού συμπύκνωσης, ενώ ο μάρτυρας δεν εμφάνισε καμία δράση. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε πειράματα με τον Gram(+) μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.⁷⁰

3.3.5 Αντικαρκινική Δράση

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των πολυφαινολικών συστατικών του οίνου, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα οδηγώντας σε εντυπωσιακά ευρήματα, ιδιαίτερα για την *trans*-ρεσβερατρόλη και την κερκετίνη (70). Όσον αφορά τον οίνο ως σύνολο, τα στοιχεία για τις πιθανές αντικαρκινικές του ιδιότητες προέρχονται κυρίως από επιδημιολογικές και δημογραφικές μελέτες, οι οποίες συνήθως έχουν αντιφατικά αποτελέσματα. Όμως όλα τα στατιστικά στοιχεία συνδέουν την κατανάλωση αλκοόλ με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ορισμένων μορφών καρκίνου, όπως οι καρκίνοι του πνεύμονα και του μαστού.^{72–75} Δεν έχει όμως ακόμα αποσαφηνιστεί εάν υπάρχει διαφοροποίηση ανάλογη με το είδος του οινοπνευματώδους ποτού που καταναλώθηκε.

Καρκίνος των πνευμόνων

Οι Prescott και συνεργάτες,⁷⁵ αναλύοντας τα στοιχεία από τρεις επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν στη Δανία τα έτη 1964–1992, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υψηλή κατανάλωση αλκοολούχων αποσταγμάτων και μπύρας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα στους άνδρες, ενώ η κατανάλωση οίνου δρα πιθανώς προστατευτικά. Για τις γυναίκες δεν προέκυψαν αρκετά στοιχεία για να τεκμηριώσουν αντίστοιχη παρατήρηση.

Οι Gronbaek και συνεργάτες,³⁵ βρήκαν ότι ο κίνδυνος θνησιμότητας από καρκίνο, αυξάνει όσο αυξάνει η κατανάλωση αλκοόλ, είναι όμως μικρότερος για όσους προτιμούν τον οίνο σε σχέση με τα άλλα οινοπνευματώδη.

Καρκίνος του μαστού

Η συσχέτιση μεταξύ καρκίνου του μαστού και κατανάλωσης αλκοόλ –ακόμη και σε χαμηλή περιεκτικότητα– με την ανάπτυξη καρκίνου στο μαστό έχει τεκμηριωθεί από πολλές έρευνες⁷⁶⁻⁷⁸ και αποδίδεται στη διαταραχή των επιπέδων των ορμονών που προκαλεί η κατανάλωση αλκοόλ. Ακόμη και 1–2 ποτά ημερησίως αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού κατά 30-50%. Πρόσφατα οι Terry και συνεργάτες,⁷⁴ διεξήγαγαν μια μεγάλη πληθυσμιακή έρευνα η οποία επιβεβαίωσε τις παραπάνω παρατηρήσεις και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση οίνου δεν μειώνει το ποσοστό του κινδύνου. Αντίθετα, πειράματα με συμπυκνωμένο ερυθρό οίνο –απαλλαγμένο από αιθανόλη– έδειξαν αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα από καρκίνο του μαστού, ακόμη και σε πολύ μεγάλες αραιώσεις.⁷⁹

Καρκίνος των ωοθηκών

Με βάση διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών είτε δεν επηρεάζεται,^{80, 81} ή μειώνεται σε γυναίκες που καταναλώνουν αλκοόλ, σε σχέση με αυτές που δεν έχουν τη συνήθεια αυτή. Οι Webb και συνεργάτες,⁸² που διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ της εμφάνισης του καρκίνου των ωοθηκών και της κατανάλωσης αλκοόλ στον πληθυσμό της Αυστραλίας για το διάστημα 1990-1993, επιβεβαίωσαν την αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ καρκίνου τα των ωοθηκών και κατανάλωσης αλκοόλ. Επίσης, παρατήρησαν ότι η μείωση του κινδύνου ήταν μεγαλύτερη για τις γυναίκες που καταλάωναν οίνο και ειδικά ερυθρό οίνο. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Goodman και Tung⁸³ γεγονός που αποδίδεται στην αυξημένη παρουσία των αντιοξειδωτικών πολυφαινολών στους ερυθρούς οίνους.

3.3.6 Αντιοξειδωτική Δράση

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών προϊόντων. Όσον αφορά τον οίνο, έχουν γίνει οι παρακάτω μελέτες:

In vitro δοκιμασίες

Οι μελέτες που αφορούν την αντιοξειδωτική δράση του οίνου επικεντρώνονται κυρίως στην προστασία της οξείδωσης της LDL, παρουσία ιόντων Cu^{2+} , λόγω της συσχέτισής της με το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας και την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται συνήθως με τον προσδιορισμό των συζευγμένων διενίων που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL.^{84, 85}

Οι ερυθροί οίνοι συνήθως εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους λευκούς, γεγονός που αντανακλά το πλούσιο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.⁶⁵ Οι Frankel και συνεργάτες,⁹ έδειξαν ότι ένας αραιωμένος κατά 10^3 φορές ερυθρός οίνος ανέστειλε πολύ αποτελεσματικότερα την οξείδωση της LDL σε σχέση με την α -τοκοφερόλη. Οι Landrault και συνεργάτες,⁸⁶ συνέκριναν την αντιοξειδωτική δράση των ερυθρών οίνων με οίνων που προέρχονται από τη λευκή ποικιλία Chardonnay που είχαν παρασκευαστεί με ειδική μέθοδο οινοποίησης, παρόμοια με εκείνης των ερυθρών οίνων. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι οι λευκοί έδειξαν δραστηριότητα συγκρίσιμη με την αντίστοιχη των ερυθρών οίνων. Σε ένα αντίστοιχο πείραμα ευρέθη ότι οι γλυκείς οίνοι είχαν 1,7 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους ξηρούς. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αυτοματοποιημένη μέθοδος Randox που βασίζεται στην επώαση του ABTS (2,2'-αζινοδινο-3-αιθυλοβενζοθειαζολινικό σουλφονικό αλάτι) παρουσία μιας υπεροξυδάσης και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της κατιονικής ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$, η οποία έχει κυανό χρώμα και απορροφά στα 600nm.

Οι Kerry και Abbey⁸⁷ μελέτησαν την ικανότητα δειγμάτων από ερυθρό οίνο, καθαρή αιθανόλη και οίνο χωρίς πολυφαινόλες, να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL παρουσία Cu^{2+} και αζωενώσεων. Η επώαση της LDL με ερυθρό οίνο συγκέντρωσης 0,025-20 mg/L μονάδων γαλλικού οξέος για 3 h πριν από την

επίδραση των οξειδωτικών παραγόντων, είχε ως αποτέλεσμα i) την αύξηση περιόδου επώασης (lag-phase) για το σχηματισμό των συζευγμένων διενίων, ii) την αναστολή της παραγωγής των TBARS (δραστικά συστατικά θειοβαρβιτουρικού οξέος thiobarbituric acid reactive substances) και iii) τη μείωση της ηλεκτροφορητικής ικανότητας της LDL. Το μέγεθος των παραπάνω επιδράσεων ήταν σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών, ενώ κανένα από αυτά δεν παρατηρήθηκε κατά την επώαση της LDL με καθαρή αιθανόλη ή με οίνο χωρίς πολυφαινόλες, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση του ερυθρού οίνου οφείλεται στην παρουσία των πολυφαινολών. Στην ίδια έρευνα, η επώαση με πλάσμα ερυθρού οίνου (75 mg/L μονάδες γαλλικού οξέος) στους 37 °C οδήγησε στην επιμήκυνση κατά 60% την περίοδο επώασης για το σχηματισμό των συζευγμένων διενίων. Αντίστοιχα, η πρόσληψη της LDL, που απομονώθηκε από αυτό το πλάσμα, από καλλιέργειες μακροφάγων J774 ήταν 3 φορές χαμηλότερη σε σχέση με το LDL που δεν είχε επωαστεί παρουσία οίνου. Είναι ενδεικτικό ότι η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών που απαιτείται για την *in vitro* αναστολή κατά 60% της οξείδωσης της LDL αντιστοιχεί σε περίπου 0,15 mg/L γαλλικού οξέος ενώ η *in vivo* συγκέντρωση που απαιτείται για το ίδιο αποτέλεσμα είναι 75 mg/L, δηλαδή 500 φορές μεγαλύτερη, γεγονός που οφείλεται στη μικρή επιφάνεια επαφής των πολυφαινολών του οίνου με την λιποπρωτεΐνη.

In vivo δοκιμασίες

Ο *in vivo* προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του οίνου παρουσιάζει ορισμένες επιπλοκές που αποδίδονται στην προοξειδωτική δράση της αιθανόλης και οδηγούν στην εξαγωγή αντικρουόμενων αποτελεσμάτων.

Συγκεκριμένα, το 1995 οι Fuhrman και συνεργάτες,⁶⁵ μελέτησαν την ικανότητα του λευκού και ερυθρού οίνου να αυξάνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σε υγιείς εθελοντές. Μετά από δύο εβδομάδες λήψης ερυθρού οίνου, η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος –παρουσία ενός συστήματος παραγωγής ελευθέρων ριζών– μειώθηκε κατά 20%. Επιπλέον, η επώαση της LDL που απομονώθηκε από το πλάσμα των εθελοντών που κατανάλωσαν ερυθρό οίνο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 46% της παραγωγής των TBARS, την κατά 54% μείωση της παραγωγής συζευγμένων διενίων και την κατά 72% μείωση της παραγωγής υπεροξειδίων των λιπών. Αντίθετα, η κατανάλωση λευκού οίνου είχε ως αποτέλεσμα

την κατά 34% αύξηση της τάσης του πλάσματος να υποστεί οξείδωση των λιπιδίων, ενώ αυξήθηκε κατά 41% η οξείδωση της LDL. Η εξήγηση που προτάθηκε είναι ότι ορισμένες από τις πολυφαινόλες του ερυθρού οίνου προσροφώνται στην LDL του πλάσματος αποτρέποντας την οξείδωση της.

Οι Van Golde και συνεργάτες,⁸⁸ σε *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι ο ερυθρός οίνος έχει την ιδιότητα να επιμηκύνει σημαντικά την lag-phase της οξείδωσης της LDL από ιόντα Cu^{2+} . Σε αντίστοιχα *in vivo* πειράματά τους, η κατανάλωση ερυθρού οίνου μετά από δύο εβδομάδες επέδρασε δραματικά στη μείωση της περιόδου επώασης, ενώ η κατανάλωση λευκού οίνου και καθαρής αλκοόλης μείωσαν το χρόνο που μεσολαβεί για την οξείδωση της LDL. Τέλος, ενώ σε *in vitro* συνθήκες ο χυμός ερυθρών σταφυλιών παρουσιάζει μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με αυτήν του ερυθρού οίνου, σε *in vivo* πειράματα η σχέση αντιστρέφεται, γεγονός που πιθανόν να συνδέεται με την προοξειδωτική δράση της αιθανόλης.

Οι de Rijke και συνεργάτες,⁸⁹ χορήγησαν σε υγιείς εθελοντές 550 mL ημερησίως ερυθρό ή λευκό οίνο μειωμένης περιεκτικότητας σε αλκοόλ με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση της αιθανόλης. Μετά από χορήγηση για 4 εβδομάδες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση των οίνων δεν προκάλεσε καμία σημαντική αλλαγή στο οξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος. Επιπλέον οι συγκεντρώσεις του ασκορβικού και ουρικού οξέος, όπως και της γλουταθειόνης στο πλάσμα έμειναν ανεπηρέαστες σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Οι Serafini και συνεργάτες,⁹⁰ διεξήγαγαν ένα πείραμα που αναφέρονταν στη χορήγηση σε δέκα υγιείς εθελοντές 113 mL ερυθρού οίνου χωρίς αλκοόλ (αντιστοιχεί σε 300 mL κανονικού οίνου) και τη λήψη δειγμάτων αίματος μετά από 30, 50 και 120 min. Το πείραμα επαναλήφθηκε μετά από μια εβδομάδα –με τους ίδιους εθελοντές– με λευκό οίνο χωρίς αλκοόλ και μετά από δύο εβδομάδες με νερό. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος αξιολογήθηκε με τη μέθοδο TRAP (υπολογισμός του συνολικού δυναμικού δέσμευσης των αντιοξειδωτικών) που βασίζεται στη μέτρηση του ποσοστού διάσπασης της φθορίζουσας ουσίας R-φυτοερευθρίνης κατά την πραγματοποίηση αντιδράσεων υπεροξειδωσίας. Έτσι, στην περίπτωση της κατανάλωσης του ερυθρού οίνου οι τιμές TRAP του πλάσματος αυξήθηκαν προοδευτικά φθάνοντας τη μέγιστη τιμή στα 50 min. Αντίθετα κατά την κατανάλωση λευκού οίνου ή νερού δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή. Σε αντίστοιχα *in vitro* πειράματα οι τιμές TRAP ήταν 20 φορές μεγαλύτερες για τον ερυθρό οίνο σε σχέση με τον λευκό.

3.4 Πειραματική Διαδικασία

3.4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Κύριο αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο προσδιορισμός με HPLC των κυριότερων πολυφαινολών που εμπεριέχονται στους ερυθρούς και λευκούς οίνους της εγχώριας παραγωγής, με το ενδιαφέρον να εστιάζεται κυρίως στους οίνους που προέρχονται από ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών.

3.4.2 Συλλογή Δειγμάτων

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής αναλύθηκαν μόνο μονοποικιλιακοί οίνοι, των οποίων η πλειοψηφία προερχόταν από ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τις οινοποιητικές περιόδους 2003-2005, με τη συνεργασία της ΚΕΟΣΟΕ και των τοπικών οινοποιητικών συνεταιρισμών στα πλαίσια του προγράμματος 2001 ΠΕΝΕΔ 227.

3.4.2.1 Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων

Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C απουσία φωτός μέχρι την ανάλυσή τους. Οι περιοχές και οι ποικιλίες των σταφυλιών από τις οποίες ελήφθησαν τα δείγματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.2:

Πίνακας 3.2

Περιοχή	Συνεταιρισμός-Εταιρεία	Ποικιλίες Οίνων
Σαντορίνη	Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων (SantoWines)	Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο, Βοηδόματο, Αθήρι, Ασύρτικο, Αηδάνι
Ρόδος	Καΐρ-Ρόδος Α.Ε.	Μανδηλαριά, Αθήρι, Μοσχάτο
Κρήτη	Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Σητείας	Λιάτικο, Βηλάνα
Πελοπόννησος	Κτήμα Σπυρόπουλου	Αγιωργίτικο, Μοσχοφίλερο
Θεσσαλία	Συνεταιρισμός αγροτικών προϊόντων Τυρνάβου	Μοσχάτο Αμβούργου, Ροδίτης, Μπαντίκι
Νάουσα	Κτήμα Κυρ-Γιάννη	Ξινόμαυρο, Merlot, Syrah

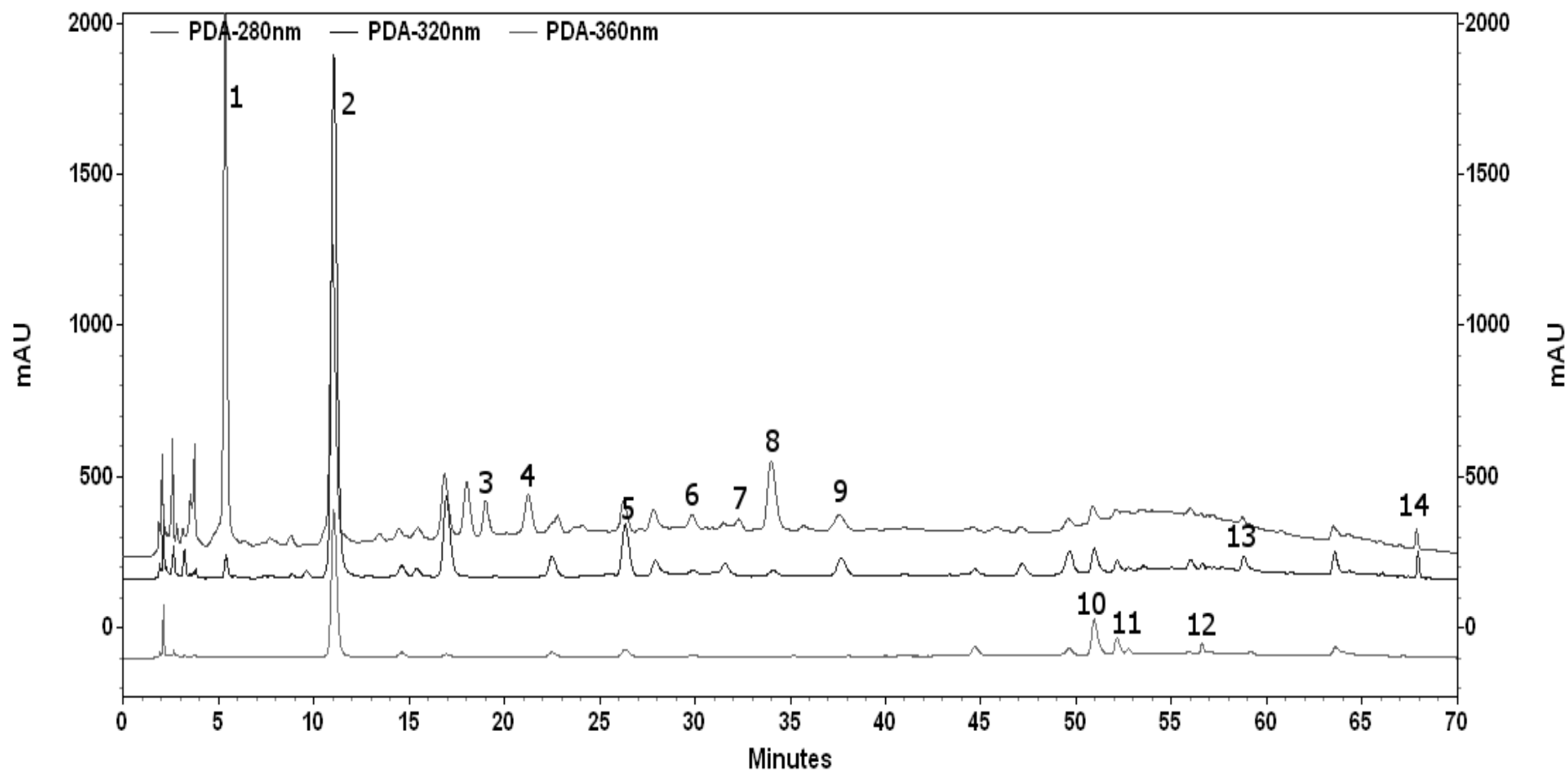
Αναλώσιμα

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των εκχυλισμάτων των οίνων ήταν αναλυτικής καθαρότητας και αγοράστηκαν από την εταιρεία J. T. Baker. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των εκχυλισμάτων και των προτύπων διαλυμάτων, ως και στην παρασκευή της κινητής φάσης της υγρής χρωματογραφίας ήταν καθαρότητας HPLC και αγοράστηκαν επίσης από την εταιρεία J. T. Baker. Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό, ενώ για το HPLC χρησιμοποιήθηκε δισαπεσταγμένο νερό που παρήχθη με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus. Το L(+)- τρυγικό οξύ αγοράστηκε από την εταιρεία Fluka καθαρότητας $\geq 99,5\%$. Οι μη ιονικές πολυμερείς ρητίνες XAD4 και XAD7, ήταν της Amberlite.

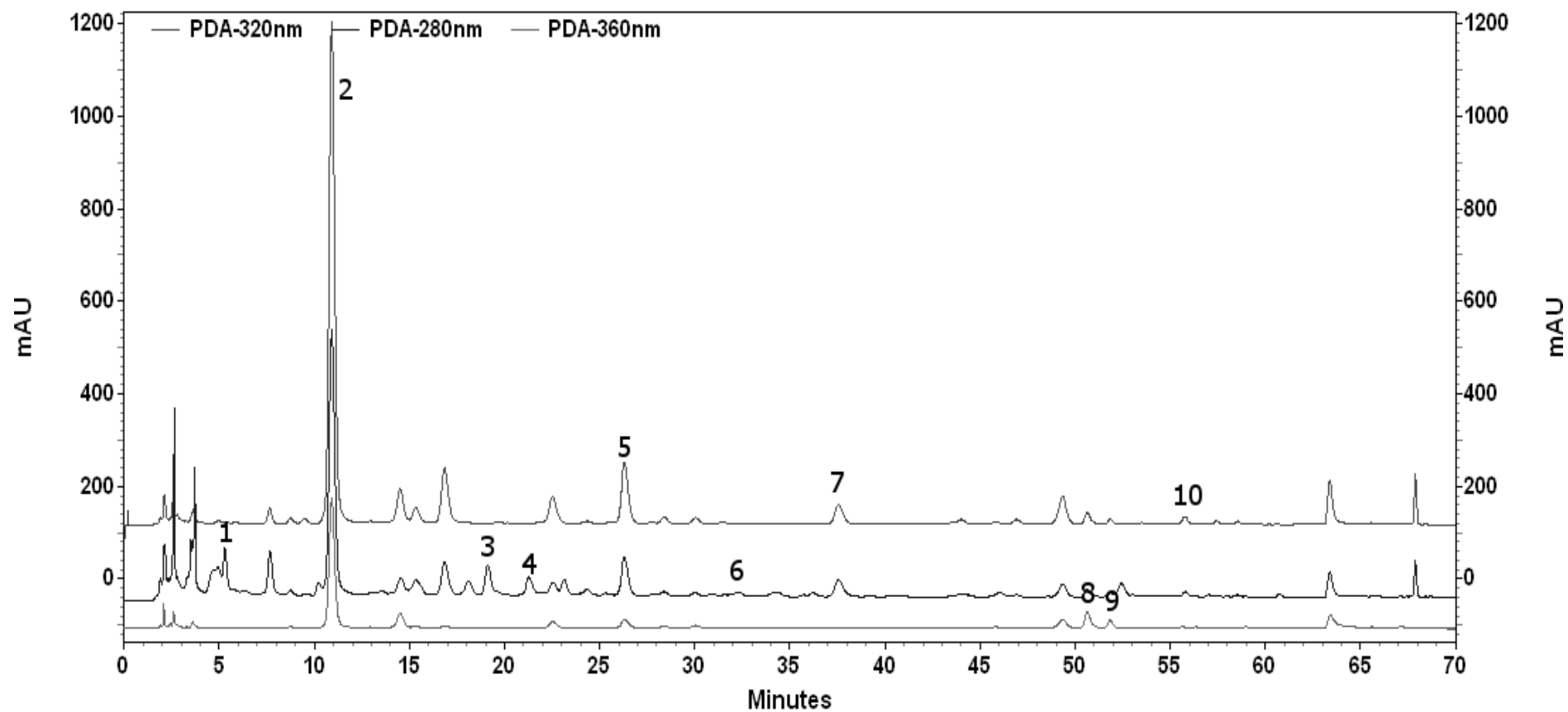
3.4.3 Ανάλυση των οίνων με απευθείας εισαγωγή στο HPLC

Η ανάλυση των οίνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.2.3. Πριν από κάθε ανάλυση προηγήθηκε διήθηση των δειγμάτων με φίλτρα σύριγγας τύπου PVDF με διάμετρο πόρων 0,45μm και στη συνέχεια τα δείγματα εισήχθησαν με απευθείας ένεση στο HPLC. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν μεθανολικά μίγματα διαλυμάτων από τις πρότυπες ουσίες, από τα οποία πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις σε μίγμα αιθανόλης 15% v/v σε υδατικό διάλυμα L(+)-τρυγικού οξέος συγκέντρωσης 3 g/L (synthetic wine matrix)⁹¹. Στις Εικόνες 3.1-3.2 παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα ερυθρού και λευκού οίνου.

Οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών εκφρασμένες ως mg/L οίνου παρουσιάζονται στους Πίνακες 1A-3A του Παρατήματος Α. Τα αποτελέσματα έχουν ομαδοποιηθεί βάσει του τύπου των οίνων. Στους ίδιους πίνακες επίσης αναφέρεται το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των οίνων ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg γαλλικό οξύ /L οίνου) και ο μέσος όρος της κάθε ουσίας για τους διάφορους τύπους οίνων.



Εικόνα 3.1 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ερυθρού οίνου: **1.** γαλλικό οξύ, **2** trans-καφταρικό οξύ, **3** προκυανιδίνη B1, **4.** (+)κατεχίνη, **5.** καφεϊκό οξύ, **6.** συριγγικό οξύ, **7.** (-)επικατεχίνη, **8.** φλαβανόλη-1, **9.** π-κουμαρικό οξύ, **10.** 3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης, **11.** 3-β-D- γλυκοσίδης κερκετίνης, **12.** 3-ραμνοσίδης κερκετίνης, **13.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **14.** ε-βινιφερίνη



Εικόνα 3.2 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα λευκού οίνου: **1.** γαλλικό οξύ, **2** trans-καφταρικό οξύ, **3.** προκυανιδίνη B1 **4.**(+)-κατεχίνη οξύ, **5.**καφεϊκό οξύ, **6.** (-)-επικατεχίνη, **7.** π-κουμαρικό οξύ, **8.** 3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης, **9.**3-β-D- γλυκοσίδης κερκετίνης, **10.** trans-ρεσβερατρόλη

3.5 Αποτελέσματα- Συμπεράσματα

Το περιεχόμενο και η συγκέντρωση των πολυφαινολών είναι πολύ μεγαλύτερο στους ερυθρούς οίνους σε σχέση με τους λευκούς, γεγονός που οφείλεται στις διαφορετικές τεχνικές οινοποίησης που ακολουθούνται. Από τους λευκούς οίνους, η μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών παρατηρήθηκε για τους οίνους που προέρχονται από την ποικιλία Ασύρτικο της Σαντορίνης, ενώ από τους ερυθρούς οίνους αυτοί που προέρχονται από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης.

3.5.1 Κύρια πολυφαινολικά συστατικά των οίνων

Από τις διάφορες ομάδες πολυφαινολών που μελετήθηκαν, στους οίνους πιστοποιήθηκε η παρουσία των παρακάτω:

Φλαβανόλες

Από τις μονομερείς φλαβανόλες προσδιορίστηκαν τα μόρια (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη. Οι ποσότητες που προσδιορίστηκαν στους ελληνικούς ερυθρούς οίνους είναι αντίστοιχες με προηγούμενες αναφορές,⁹² ενώ εμφανίζονται μικρότερες σε σχέση με αυτές που προσδιόρισαν οι Kallithraka και συνεργάτες^{93, 94} και Arnous και συνεργάτες⁹⁵ (2001), κυρίως όσον αφορά τις συγκεντρώσεις της (-)-επικατεχίνης. Οι διαφορές αυτές δικαιολογούνται λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα των παραγόντων που επηρεάζουν την πολυφαινολική σύσταση των οίνων, όπως είναι η ποικιλία, η οινοποιητική τεχνική που εφαρμόζεται, οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν και παλαίωση των οίνων.

Από τις διμερείς προκυανιδίνες σε μεγαλύτερη ποσότητα ανιχνεύθηκε η προκυανιδίνη B1 με συγκέντρωση κατά μέσο όρο 72,4 mg/L στους ερυθρούς οίνους, κατά αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των Kallithraka και συνεργάτες.⁹³ Η παρουσία της προκυανιδίνης B2 ανιχνεύθηκε μόνο στους ερυθρούς οίνους, όμως ο ποσοτικός προσδιορισμός παρουσίασε επίσης προβλήματα, αφού κατά την ανάλυση με HPLC δεν έγινε δυνατόν να διαχωριστεί ικανοποιητικά η κορυφή της προκυανιδίνης B2 από την κορυφή του καφεϊκού οξέος, το οποίο γενικά βρισκόταν σε μεγαλύτερες ποσότητες με αποτέλεσμα να υπάρχει αλληλεπικάλυψη.

Επίσης, στα χρωματογραφήματα των περισσότερων ερυθρών οίνων καθώς και σε αρκετούς λευκούς οίνους αμέσως μετά την (–)–επικατεχίνη εμφανίστηκε μια μεγάλη κορυφή, της οποίας ο χρόνος κατακράτησης και το υπεριώδες φάσμα ήταν ταυτόσημες με του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης. Πιθανόν να αποτελεί προϊόν αντίδρασης συμπύκνωσης φλαβονόλης με γαλλικό οξύ, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την οινοποίηση και η σχετικά μεγάλη της ποσότητα υπαγόρευσε την μέτρησή που πραγματοποιήθηκε με χρήση καμπύλης αναφοράς του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης για την ποσοτικοποίησή της. Αναφέρεται όμως ως φλαβανόλη–1.

Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Το γαλλικό οξύ –σε ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή– είναι το υδροξυβενζοϊκό οξύ με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους οίνους. Η συγκέντρωσή του στους ερυθρούς οίνους είναι κατά μέσο όρο 86,5 mg/L, ενώ στους λευκούς 3,3 mg/L. Επίσης ανιχνεύτηκε η παρουσία συριγγικού οξέος, ενώ σε ορισμένους οίνους πιστοποιήθηκε η παρουσία μικρών ποσοτήτων πρωτοκατεχικού και βανιλικού οξέος, οι οποίες όμως δεν παρουσιάζονται στους πίνακες καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις βρισκόταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Οι σχετικές αναλογίες και οι τιμές που προσδιορίστηκαν σε γενικές γραμμές βρίσκονται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες που προσδιόρισαν οι Kallithraka και συνεργάτες.⁹⁴

Υδροξυκιναμμομικά οξέα

Από τα υδροξυκιναμμομικά οξέα, το καφεϊκό και το π-κουμαρικό οξύ, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους οίνους, ενώ ανιχνεύθηκε και η παρουσία σε μικρές ποσότητες του φερουλικού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα ευρήματα των Kallithraka και συνεργάτες,⁹⁴ αν και η συγκεντρώσεις π-κουμαρικού που ευρέθησαν είναι κατά πολύ μικρότερες.

Επίσης στους οίνους έχει αναφερθεί η παρουσία εστέρων του τρυγικού με υδροξυκιναμμομικά οξέα (σε μορφές *cis* και *trans*), όπως για παράδειγμα το *trans*-κουταρικό οξύ (εστέρας του π-κουμαρικού οξέος) και το *trans*-φερτατικό οξύ (εστέρας του φερουλικού οξέος). Οι συγκεντρώσεις τους όμως είναι πολύ μικρότερες από το *trans*-καφταρικό οξύ.^{98, 99}

Στους συγκεκριμένους προσδιορισμούς, σε μεγαλύτερη ποσότητα ανιχνεύθηκε η παρουσία του *trans*-καφταρικού οξέος (εστέρας του καφεϊκού με το τρυγικό οξύ)

το οποίο βρίσκεται σε αφθονία τόσο στους ερυθρούς όσο και στους λευκούς οίνους με μέσο όρο συγκέντρωσης 36,16 mg/L και 22,47 mg/L αντίστοιχα.

Φλαβονόλες

Στους οίνους ανιχνεύθηκαν οι φλαβονόλες κερκετίνη και καμφερόλη καθώς και οι γλυκοζίτες 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη), με τα δύο πρώτα μόρια να προσδιορίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι κατά την ανάλυση των προτύπων ουσιών δεν έγινε δυνατό να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών του ρουτινοσίδη της κερκετίνης (ρουτίνη) και του 3-β-D-γλυκοσίδη της κερκετίνης, με αποτέλεσμα να συνεκλούνται. Επομένως δεν αποκλείεται η παρουσία ρουτίνης στους οίνους, η οποία όμως ποσοτικοποιήθηκε ως 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης.

Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ στα σταφύλια η κερκετίνη και η καμφερόλη βρίσκονται σε ίχνη, στους οίνους η συγκέντρωσή τους είναι αυξημένη, ενώ μειώνεται αντίστοιχα η συγκέντρωση των γλυκοζιτών της κερκετίνης που ανιχνεύονται. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι κατά την οινοποίηση υδρολύονται οι γλυκοζίτες των φλαβονολών. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κερκετίνης βρέθηκαν στην ποικιλία Syrah, από την περιοχή της Νάουσας (16,54 mg/L), κατά αντιστοιχία με προηγούμενα ευρήματα.^{92, 94}

Στιλβένια

Από τα στιλβένια στους οίνους προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης και της ε-βινιφερίνης, σε ερυθρούς κυρίως οίνους. Ενώ η συγκέντρωση της ε-βινιφερίνης είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα σταφύλια και στα στέμφυλα που απομένουν μετά την οινοποίηση, στους οίνους ανιχνεύεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που δείχνει ότι το μόριο αυτό –λόγω χαμηλής διαλυτότητας– δεν εκχυλίζεται ικανοποιητικά στον οίνο.

Όπως έχουν παρατηρήσει και άλλοι ερευνητές, η συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ακόμη και ανάμεσα σε οίνους της ίδιας ποικιλίας,^{100, 101} ενώ η συγκέντρωσή της είναι μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση την κερκετίνη. Σε γενικές όμως γραμμές, οι συγκεντρώσεις της *trans*-ρεσβερατρόλης που προσδιορίστηκαν στους ελληνικούς οίνους βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί.^{92, 101–103}

3.5.2 Ανάλυση οίνου με LC/MS

Εκτός από την ανάλυση με τη μέθοδο HPLC, που περιγράφεται ανωτέρω, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση με LC/MS σε ένα δείγμα ερυθρού οίνου, προκειμένου να ταυτοποιηθούν και άλλες πολυφαινόλες οι οποίες πιθανόν βρίσκονται στους οίνους και για τις οποίες δε διατίθενται πρότυπες ενώσεις εμπορικά. Ο οίνος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν εσοδείας 2005 από την ποικιλία μανδηλαριά Σαντορίνης.

Για την ανάλυση οίνων στο LC/MS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XIC (Extracted Ion Chromatogram) η οποία αναπτύχθηκε με σκοπό το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πολυφαινολών και περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.4. του Κεφαλαίου 2.

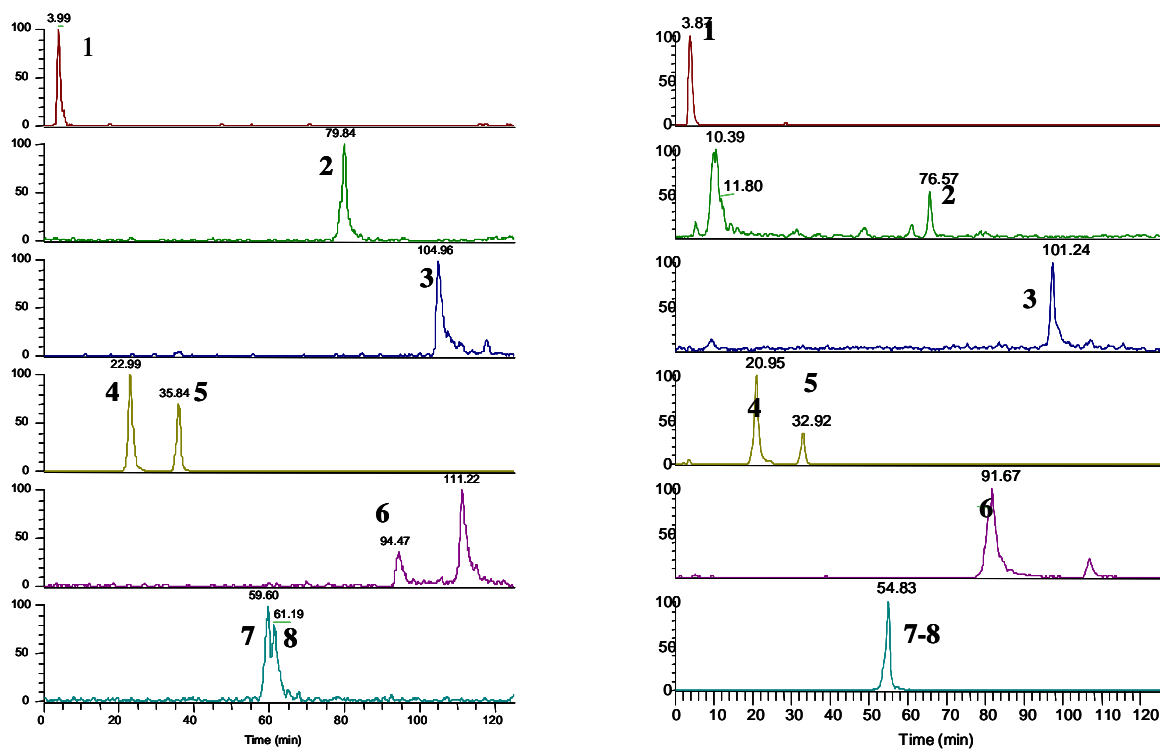
3.5.2.1 Προετοιμασία Δείγματος

Πριν την ανάλυση, το δείγμα του οίνου φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 3 min και εισήχθη απευθείας με έγχυση στη χρωματογραφική στήλη.

Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα προτύπων ενώσεων σε σύγκριση με το χρωματογράφημα του οίνου, όπως αναλύθηκαν με τη μέθοδο XIC.

Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με βάση α) το χρόνο συγκράτησης των προτύπων στη χρωματογραφική διαδικασία και β) το m/z του αποπρωτονιωμένου μοριακού ιόντος των αναλυτών.

Στον Πίνακα 3.3, παρουσιάζονται τα MB και τα αποπρωτονιομένα μοριακά ιόντα, των ουσιών που αναγνωρίστηκαν στο δείγμα του οίνου.



Εικόνα 3.3 Χρωματογράφημα και φάσμα μαζών πρότυπων φαινολικών ενώσεων: 1. Γαλλικό οξύ, 2. *trans*-ρεσβερατρόλη, 3. Καμφερόλη, 4. (+)-κατεχίνη, 5. (-)-επικατεχίνη, 6. Κερκετίνη, 7. 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 8. 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης

Πίνακας 3.3

ΕΝΩΣΗ	M.B.	m/z
Γαλλικό οξύ	170,12	169,12
(+)-κατεχίνη	290,27	289,27
(-)-επικατεχίνη	290,27	289,27
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	228,24	227,24
Κερκετίνη	302,24	301,24
<i>Trans</i> -καφταρικό οξύ	311	310
Καμφερόλη	286,24	285,24
3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης	464,38	463,38

3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης	464,38	463,38
3-O-γλυκοσίδης της καμφερόλης	448,38	447,38
Ρουτινοσίδης της κερκετίνης	610,52	609,52
3-β-D-Γλουκουρονίδιο της κερκετίνης	478,36	477,36
3-O-γλυκοσίδης της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης	390,24	389,24
Προκυανιδίνη B1	578,52	577,52
Προκυανιδίνη B2	578,52	577,52
Προκυανιδίνη B3	578,52	577,52
(-)-Γαλλοκατεχίνη	306,27	305,27
(-)-Επιγαλλοκατεχίνη	306,27	305,27

Στις Εικόνες 1Α-7Α του **Παραρτήματος Α**, παρουσιάζονται οι κορυφές των πολυφαινολών που αναγνωρίστηκαν στο χρωματογράφημα του οίνου καθώς και το φάσμα μάζας της κάθε μίας.

Οι καινούργιες ενώσεις οι προσδιορίστηκαν είναι οι ακόλουθες:

1. 3-O-γλυκοσίδης της *trans*-ρεσβερατρόλης (πικεΐδης),
2. 3-β-D-Γλουκουρονίδιο της κερκετίνης,
3. Ρουτινοσίδης της κερκετίνης,
4. (-)-γαλλοκατεχίνη,
5. (-)-επιγαλλοκατεχίνη
6. Προκυανιδίνη B3,
7. 3-O-γλυκοσίδης της καμφερόλης.

Η εφαρμογή της τεχνικής LC-MS συνέβαλλε πολύ στον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου των οίνων, καθώς κατέστη δυνατή η ανίχνευση και άλλων σημαντικών πολυφαινολικών ενώσεων για τις οποίες δεν υπήρχαν πρότυπες ουσίες. Επιπλέον προσδιορίστηκε η ύπαρξη ενώσεων, όπως ο ρουτινοσίδης και το γλουκουρονίδιο της κερκετίνης, για τις οποίες δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί ικανοποιητικός χρωματογραφικός διαχωρισμός με αποτέλεσμα να συνεκλούνται με άλλες ενώσεις.

3.5.3 Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των οίνων, προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu και εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος/ L οίνου,

όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.5. Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των επιμέρους πολυφαινολών και των ολικών πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν για τους διάφορους τύπους οίνων που αναλύθηκαν. Όπως ήταν αναμενόμενο οι ερυθροί οίνοι, έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε σχέση με τους λευκούς. Το γεγονός σχετίζεται αφενός στις διαφορετικές τεχνικές που εφαρμόζονται κατά την ερυθρά και την λευκή οινοποίηση, επιτρέποντας την εκχύλιση μεγάλων ποσοτήτων πολυφαινολών στους ερυθρούς οίνους, και αφετέρου στην παρουσία των ανθοκυανινών στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών οι οποίες λόγω –υδατοδιαλυτότητας– εκχυλίζονται σε μεγάλες ποσότητες στο μούστο συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των ερυθρών οίνων. Είναι χαρακτηριστικό ότι η μέση τιμή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ερυθρών οίνων είναι σχεδόν οκτώ φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή για τους λευκούς. Επίσης πρέπει να τονιστεί το υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο των ερυθρών οίνων από ελληνικές γηγενείς ποικιλίες, το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτό ξένων ποικιλιών.^{104, 105, 106} Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της βιολογικής δραστηρότητας των οίνων, καθώς όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 6. το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο είναι ευθέως ανάλογο της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πίνακας 3.4 Μέσοι όροι συγκεντρώσεων πολυφαινολών και ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου σε ελληνικούς οίνους

mg/L	Γαλλικό οξύ	(+)/κατεχίνη	(-)/επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	φλαβονόλη-1	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	Συγγενικό οξύ	καφεϊκό	καφαρικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-D-γλυκοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσίδης κερακτίνης	κερακτίνη	καμφερόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ	86,47	52,99	27,23	72,87	10,22	68,13	0,93	2,12	3,91	6,21	36,16	3,85	0,33	8,89	5,30	3,13	5,73	0,78	2521,6
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ	3,29	9,37	3,45	15,21	0,91	3,15	0,32	0,34	0,19	2,94	22,47	1,45	0,40	2,45	2,33	0,59	1,25	0,45	326,2
ΕΡΥΘΡΟΙ ΓΛΥΚΕΙΣ ΟΙΝΟΙ	42,31	15,93	13,96	10,77	ΔΑ**	22,80	1,25	0,41	6,19	6,91	66,74	11,44	0,52	4,60	1,54	1,57	3,08	0,68	2328,7
ΛΕΥΚΟΙ ΓΛΥΚΕΙΣ ΟΙΝΟΙ	8,35	9,91	7,96	11,07	ΔΑ	8,18	0,55	0,34	0,62	4,10	38,92	3,04	0,32	3,61	2,23	0,61	2,16	0,47	802,1

*= mg γαλλικού οξέος/L οίνου

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

3.5.4 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών κατά τη διαύγαση

Στα πλαίσια της διατριβής μελετήθηκε και η επίδραση των διαφόρων διαδικασιών διαύγασης στη συγκέντρωση των πολυφαινολών των λευκών και

ερυθρών οίνων. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.1.11, η διαύγαση αποσκοπεί στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των τανινών που ευθύνονται για τη θόλωση και επηρεάζουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους λευκούς οίνους, όπου η διαύγαση επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών, ενώ στους ερυθρούς οίνους συχνά η διαύγαση επιτυγχάνεται μέσω της φυσιολογικής διαδικασίας της καταβύθισης λόγω βαρύτητας.

Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν δείγματα λευκών και ερυθρών οίνων –ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο– σε διάφορα στάδια της διαδικασίας διαύγασης, μέχρι την εμφιάλωση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. Όπως παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις, η διαδικασία της διαύγασης επιφέρει μείωση τόσο στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο όσο και στις επιμέρους πολυφαινόλες των οίνων.

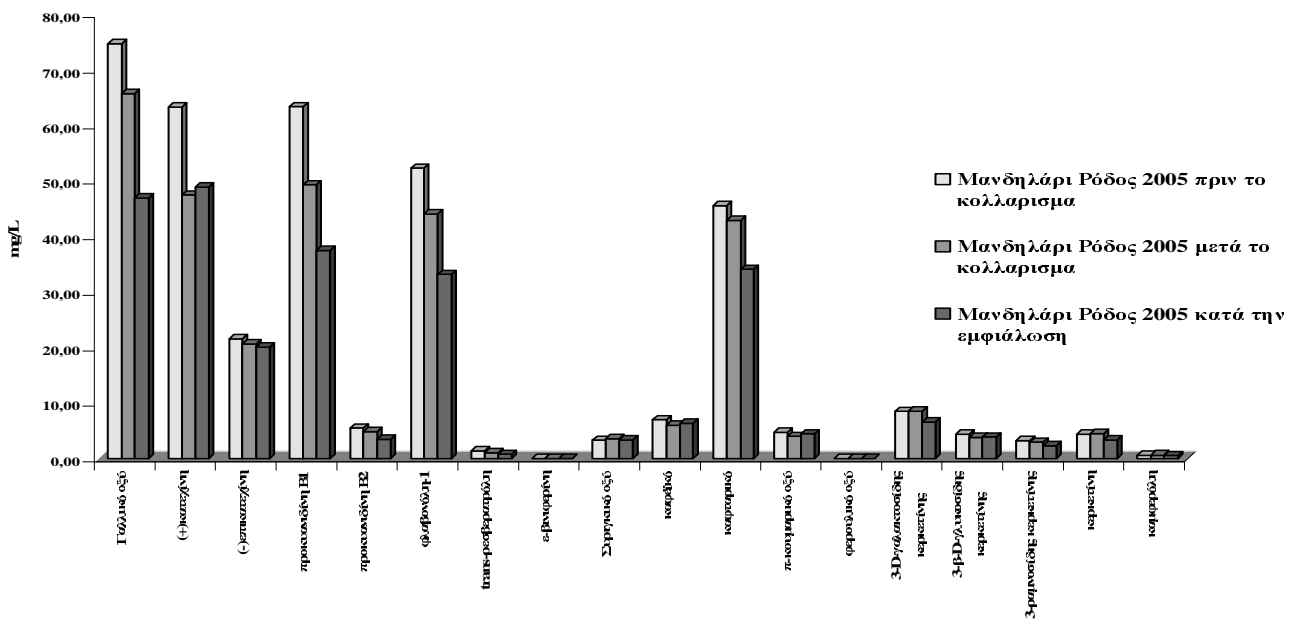
Στα Διαγράμματα 3.1-3.2, παρουσιάζεται η μεταβολή των πολυφαινολών κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας για ένα ερυθρό και ένα λευκό οίνο, εσοδείας 2005.

Πίνακας 3.5 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινόλων σε λευκούς και ερυθρούς οίνους στα διάφορα στάδια επεξεργασίας μετά τη ζύμωση

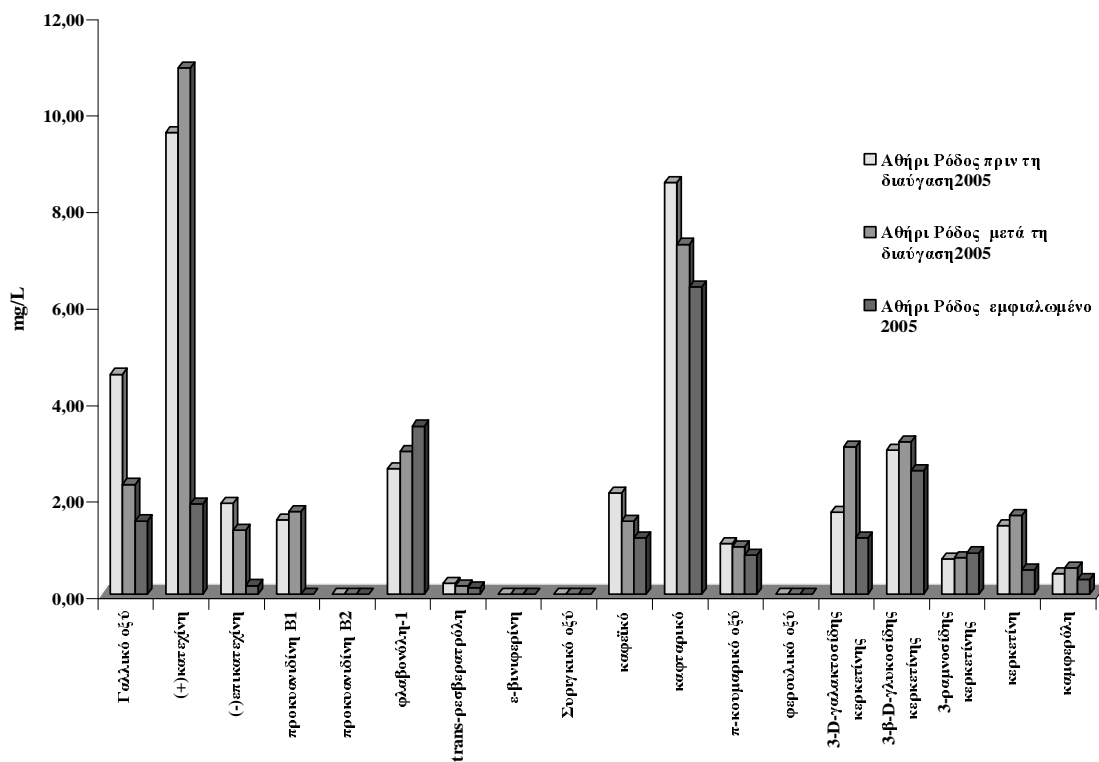
mg/L	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβανόλη-1	trans-ρσεβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	συργκικό οξύ	καφεϊκό	καφτανικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλακτοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσιδής κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	Ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 πριν το κολλαρισμα	74,72	63,32	21,58	63,35	5,44	52,31	1,37	ΔΑ**	3,28	6,98	45,55	4,72	ΔΑ	8,47	4,32	3,17	4,35	0,58	2507,8
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 μετά το κολλαρισμα	65,74	47,44	20,64	49,31	4,84	44,08	0,97	ΔΑ	3,57	5,99	42,90	3,95	ΔΑ	8,54	3,80	2,90	4,50	0,61	2299,4
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 κατά την εμφιάλωση	46,94	48,92	20,07	37,46	3,43	33,17	0,73	ΔΑ	3,31	6,36	34,09	4,41	ΔΑ	6,52	3,89	2,28	3,35	0,52	1843,5
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Αθήρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2005	4,56	9,58	1,89	1,53	ΔΑ	2,61	0,23	ΔΑ	ΔΑ	2,09	8,53	1,05	ΔΑ	1,70	2,99	0,74	1,42	0,42	299,0
Αθήρι Ρόδος μετά τη διαύγαση 2005	2,27	10,91	1,33	1,71	ΔΑ	2,96	0,17	ΔΑ	ΔΑ	1,52	7,26	0,98	ΔΑ	3,05	3,16	0,75	1,62	0,55	302,0
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2005	1,52	1,87	0,18	ΔΑ	ΔΑ	3,48	0,14	ΔΑ	ΔΑ	1,18	6,38	0,80	ΔΑ	1,17	2,56	0,85	0,51	0,30	166,1
Αθήρι Ρόδος πριν διαύγαση 2004	3,71	10,77	3,76	15,96	ΔΑ	6,02	0,38	ΔΑ	0,16	2,23	8,21	1,08	0,46	2,75	1,27	0,35	0,73	2,10	307,6
	3,72	11,59	11,43	ΔΑ	ΔΑ	5,48	0,38	ΔΑ	ΔΑ	2,22	10,17	1,06	0,48	2,86	1,36	0,34	2,65	0,72	280,3
Αθηρι Ρόδος μετα τη διαύγαση 2004	1,95	4,40	3,31	12,41	ΔΑ	4,75	0,31	0,34	ΔΑ	1,46	9,31	0,49	0,38	1,33	1,70	0,51	ΔΑ	ΔΑ	198,4
	2,49	4,75	2,56	17,74	ΔΑ	ΔΑ	0,33	ΔΑ	0,37	1,96	9,78	0,47	ΔΑ	1,39	1,84	0,52	0,87	0,25	202,6
	2,08	4,59	6,81	1,21	ΔΑ	4,99	0,37	ΔΑ	0,14	1,54	10,08	0,49	0,43	1,35	1,76	0,54	0,85	0,26	195,3
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2004	1,97	4,62	7,02	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,00	ΔΑ	0,00	1,59	10,17	0,51	0,44	1,37	1,79	0,51	0,88	0,24	208,5
Ασύρτικο Σαντορίνη 2005	3,12	15,08	1,43	24,06	ΔΑ	1,36	0,21	ΔΑ	ΔΑ	4,24	43,13	1,26	ΔΑ	5,19	4,53	0,94	1,32	0,42	515,6
Ασυρτικο Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	3,71	21,27	5,22	34,86	ΔΑ	1,34	0,71	ΔΑ	0,25	2,69	48,42	1,62	ΔΑ	5,01	3,24	0,61	1,93	0,40	430,0
Ασύρτικο Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	3,78	14,95	1,24	16,00	ΔΑ	1,96	0,15	ΔΑ	ΔΑ	3,13	38,61	1,20	ΔΑ	4,05	4,41	1,10	0,63	0,34	495,02

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 3.1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας μετά τη ζύμωση σε ερυθρό οίνο



Γράφημα 3.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας μετά τη ζύμωση σε λευκό οίνο

3.5.5 Σύγκριση οίνων διαφορετικών ποικιλιών της ίδιας περιοχής

Προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση της ποικιλίας στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των οίνων, έγινε μελέτη/σύγκριση τριών λευκών και τριών ερυθρών μονοποικιλιακών οίνων της Σαντορίνης. Όλα τα δείγματα αναφέρονται στην οινοποιητική περίοδο 2005 και στο στάδιο της εμφιάλωσης, τα δε αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Όπως είναι εμφανές μεταξύ των λευκών οίνων, το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζει η ποικιλία ασύρτικο, ενώ μεταξύ των ερυθρών η ποικιλία μανδηλαριά. Το γεγονός αυτό συμφωνεί και με τα ευρήματα για τις πολυφαινόλες που περιέχονται στα αντίστοιχα δείγματα σταφυλιών που μελετώνται στο Κεφάλαιο 4.

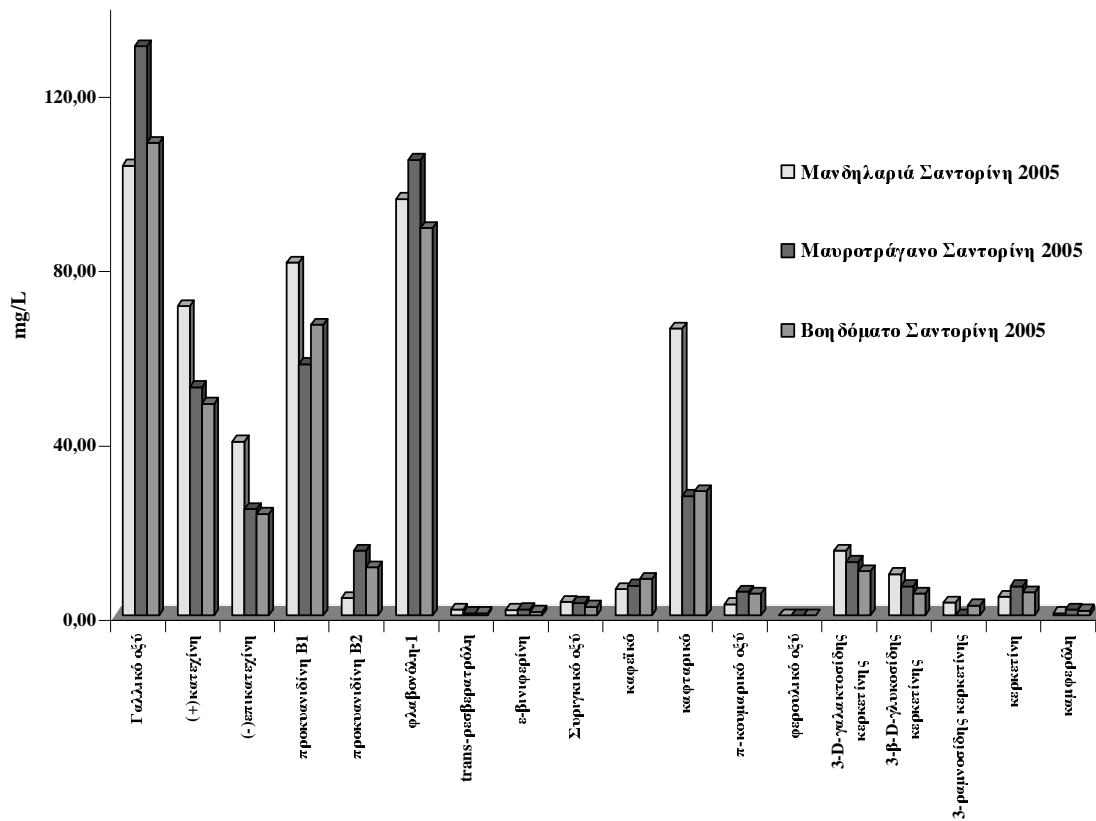
Στα Διαγράμματα 3.3-3.4 παρουσιάζεται η γραφική αναπαράσταση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

Πίνακας 3.6 Εξάρτηση πολυφαινολικής σύστασης οίνων από την ποικιλία

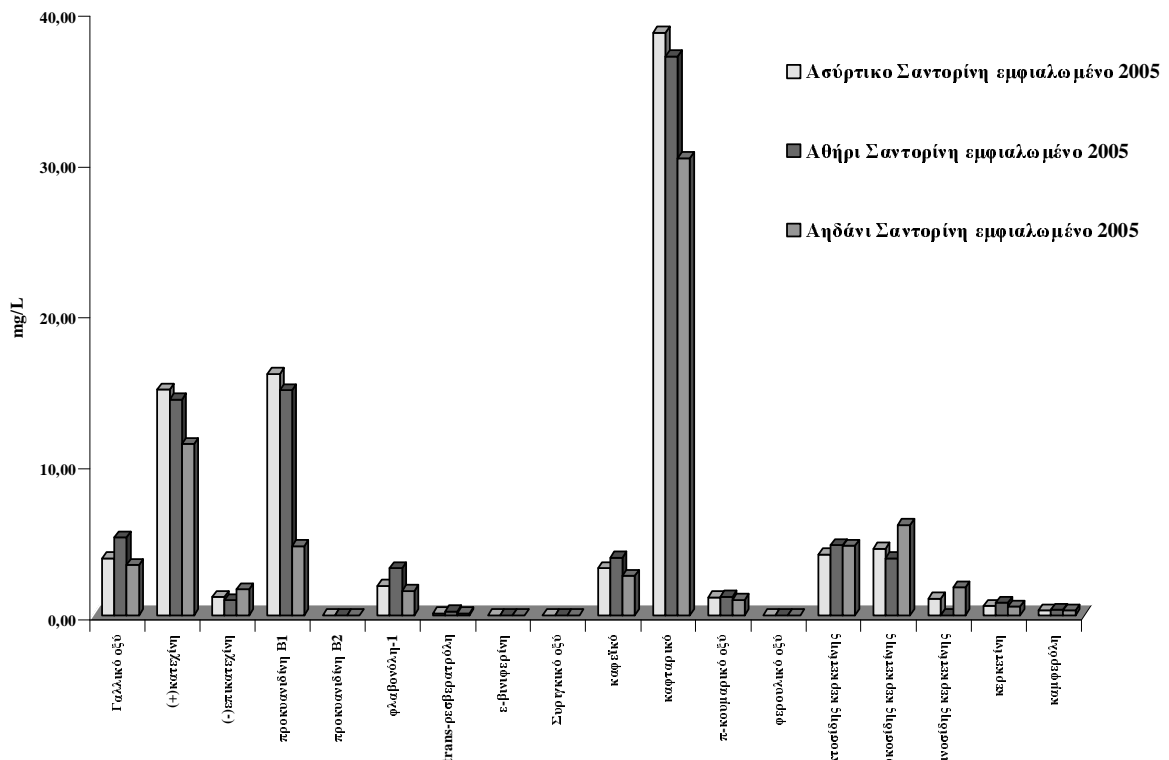
Οίνοι Σαντορίνης 2005 (mg/L)	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	φύσβαλονόλη-1	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	συγγινικό οξύ	καφεϊκό	καφτανικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γαλακτοσίτης κερκετίνης	3-β-D-γλακτοσίτης κερκετίνης	3-ραμνοσίτης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
	ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																		
Μανδηλαριά	103,20	71,00	39,98	80,99	4,03	95,56	1,38	ΔΑ**	3,11	6,09	65,87	2,67	ΔΑ	14,88	9,55	3,02	4,25	0,57	3667,1
Βοηδόματο	108,55	48,62	23,38	66,77	11,04	88,91	0,54	ΔΑ	2,01	8,37	28,52	5,00	ΔΑ	10,23	4,96	2,34	5,30	1,10	2579,0
Μαυροτράγανο	130,72	52,47	24,45	57,70	14,89	104,58	0,49	ΔΑ	2,87	6,85	27,40	5,50	ΔΑ	12,28	6,76	0,00	6,71	1,34	3052,2
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Ασύρτικο	3,78	14,95	1,24	16,00	ΔΑ	1,96	0,15	ΔΑ	ΔΑ	3,13	38,61	1,20	ΔΑ	4,05	4,41	1,10	0,63	0,34	495,0
Αηθάνι	3,34	11,35	1,73	4,58	ΔΑ	1,63	0,15	ΔΑ	ΔΑ	2,64	30,29	1,02	ΔΑ	4,62	5,99	1,86	0,59	0,32	423,9
Αθήρι	5,16	14,29	1,00	14,93	ΔΑ	3,12	0,27	ΔΑ	0,00	3,81	37,02	1,26	ΔΑ	4,65	3,78	0,00	0,84	0,37	405,1

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 3.3 Σύγκριση πολυφαινολικής σύστασης ερυθρών οίνων, διαφορετικής ποικιλίας



Γράφημα 3.4 Σύγκριση πολυφαινολικής σύστασης λευκών οίνων, διαφορετικής ποικιλίας

3.5.6 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών οίνων της ίδιας ποικιλίας σε διαφορετικά έτη

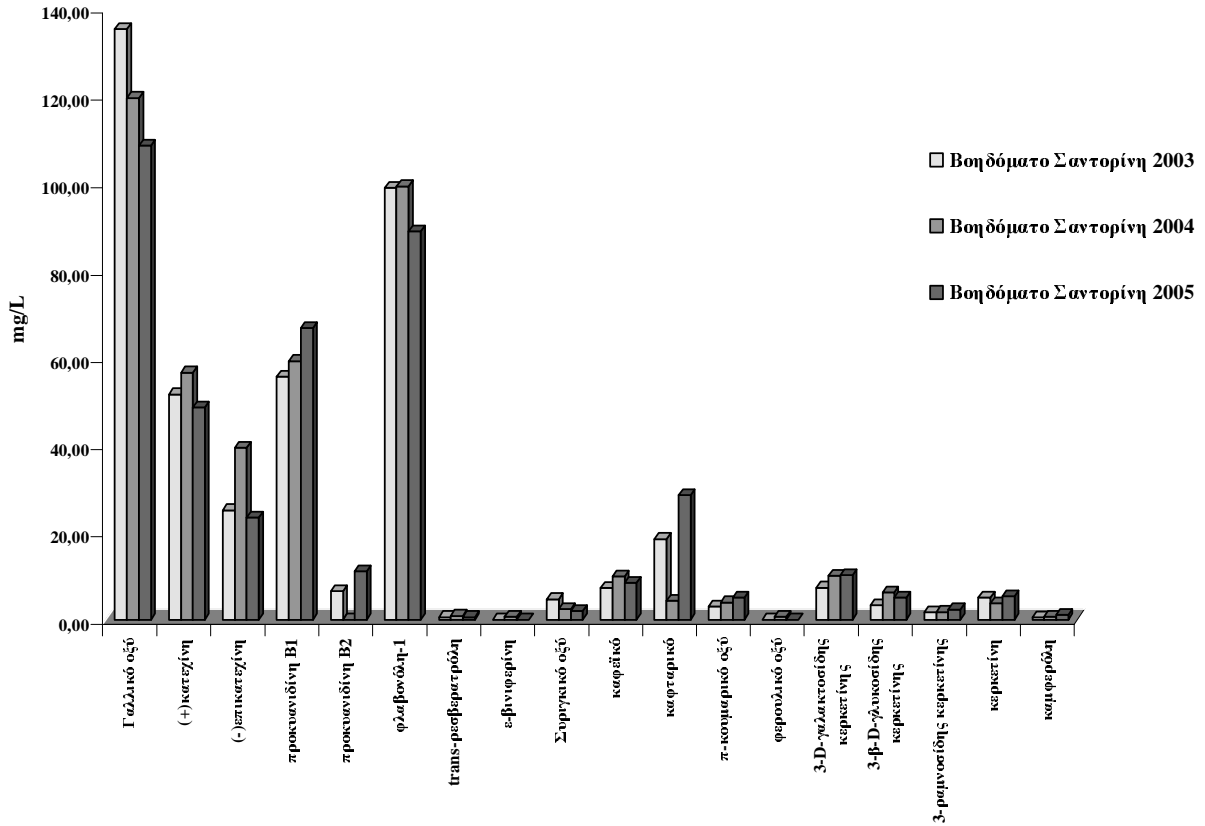
Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε για τους ερυθρούς και λευκούς μονοποικιλιακούς οίνους που παράχθηκαν στην ίδια περιοχή σε διαδοχικά έτη. Η διακύμανση των επιμέρους και των ολικών πολυφαινολών φαίνεται στα Γραφήματα 3.5-3.7 Θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχουν γενικά μεγάλες διαφορές μεταξύ διαφόρων ετών, χωρίς όμως να διαμορφώνεται κάποια συγκεκριμένη τάση για κάθε χρονιά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κλιματολογικές συνθήκες και ασθένειες των αμπελιών –που διαφοροποιούνται σημαντικά ανά έτος– παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του πολυφαινολικού περιεχομένου των οίνων.

Πίνακας 3.7 Μεταβολή των πολυφαινόλων για οίνους της ίδιας ποικιλίας και της ίδιας περιοχής σε διαφορετικές χρονιές

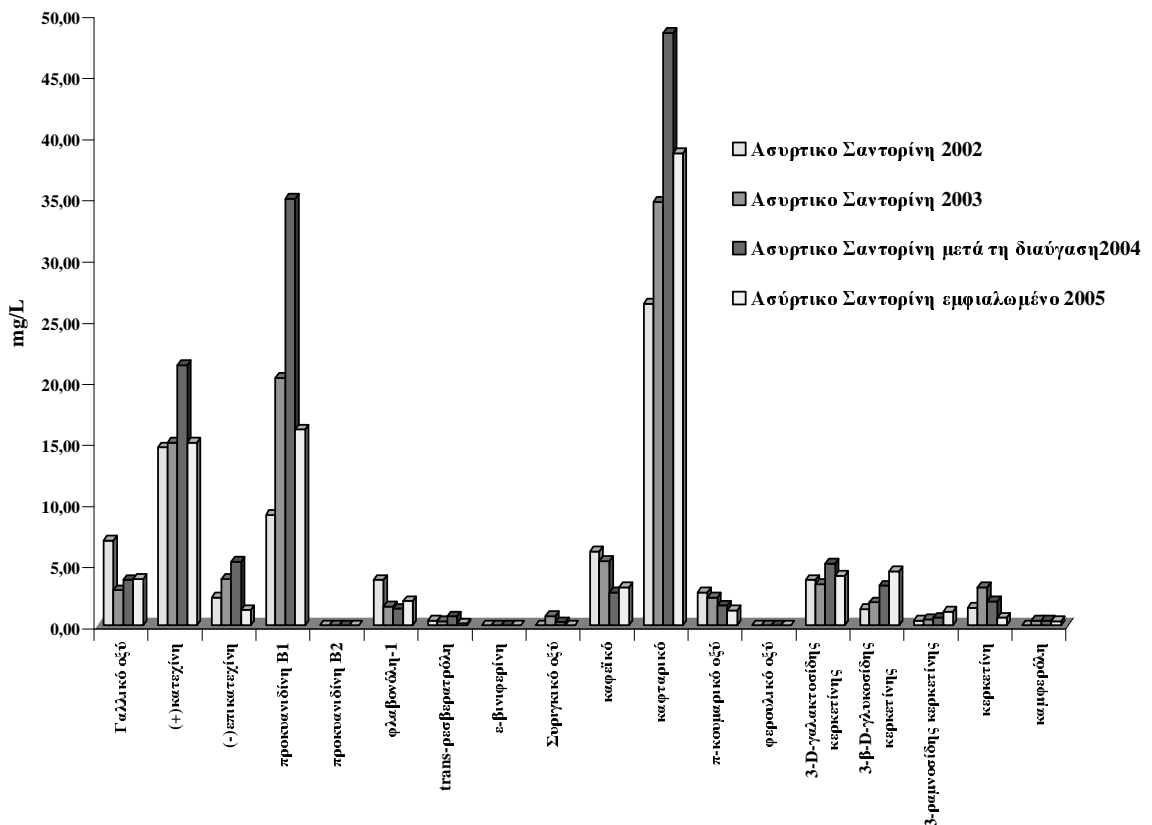
mg/L	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβανόλη-1	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	στυργλικό οξύ	καφεϊκό	trans-καφαρικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γλακτοσίδης κερακτίνης	3-β-D-γλακτοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσίδης κερακτίνης	κερακτίνη	καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	135,36	51,64	25,06	55,65	6,52	98,91	0,50	ΔΑ	4,67	7,27	18,47	3,04	ΔΑ	7,30	3,27	1,67	5,00	0,47	2896,5
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	119,52	56,62	39,37	59,18	ΔΑ	99,27	0,88	0,63	2,38	9,82	4,23	3,90	0,62	10,02	6,24	1,73	3,73	0,68	2711,8
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	108,55	48,62	23,38	66,77	11,04	88,91	0,54	ΔΑ	2,01	8,37	28,52	5,00	ΔΑ	10,23	4,96	2,34	5,30	1,10	2579,0
Μανδηλαρία Σαντορίνη 2002	191,54	91,03	45,46	176,10	ΔΑ	193,93	1,67	ΔΑ	ΔΑ	11,13	63,35	4,83	ΔΑ	12,63	5,14	2,69	9,97	0,73	4084,6
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	113,12	83,86	62,61	41,00	6,15	106,18	1,48	0,23	5,07	6,99	57,30	3,15	ΔΑ	11,20	6,88	1,90	3,30	0,34	3956,1
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	103,20	71,00	39,98	80,99	4,03	95,56	1,38	ΔΑ	3,11	6,09	65,87	2,67	ΔΑ	14,88	9,55	3,02	4,25	0,57	3667,1
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	38,40	47,67	28,40	40,28	2,55	34,11	0,56	ΔΑ	3,43	2,85	17,21	1,99	ΔΑ	6,77	4,97	2,42	4,06	0,52	925,7
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	105,05	41,04	36,25	59,04	ΔΑ	94,69	1,13	0,54	2,55	3,54	8,54	6,99	1,05	10,92	9,21	2,56	3,88	0,69	2082,4
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	130,72	52,47	24,45	57,70	14,89	104,58	0,49	ΔΑ	2,87	6,85	27,40	5,50	ΔΑ	12,28	6,76	0,00	6,71	1,34	3552,2
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Αστυρτικο Σαντορίνη 2002	6,95	14,57	2,27	9,02	ΔΑ	3,72	0,36	ΔΑ	ΔΑ	6,04	26,30	2,69	ΔΑ	3,71	1,32	0,35	1,44	ΔΑ	484,6
Αστυρτικο Σαντορίνη 2003	2,87	14,94	3,80	20,23	ΔΑ	1,54	0,32	ΔΑ	0,74	5,26	34,60	2,28	ΔΑ	3,36	1,89	0,49	3,12	0,41	489,8
Αστυρτικο Σαντορίνη 2004	3,71	21,27	5,22	34,86	ΔΑ	1,34	0,71	ΔΑ	0,25	2,69	48,42	1,62	ΔΑ	5,01	3,24	0,61	1,93	0,40	430,0
Αστυρτικο Σαντορίνη 2005	3,78	14,95	1,24	16,00	ΔΑ	1,96	0,15	ΔΑ	ΔΑ	3,13	38,61	1,20	ΔΑ	4,05	4,41	1,10	0,63	0,34	495,0
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2004	1,97	4,62	7,02	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,00	1,59	10,17	0,51	0,44	1,37	1,79	0,51	0,88	0,24	208,5
Αθήρι Σαντορίνη 2005	5,16	14,29	1,00	14,93	ΔΑ	3,12	0,27	ΔΑ	0,00	3,81	37,02	1,26	ΔΑ	4,65	3,78	0,00	0,84	0,37	405,1
Τυρναβος Ροδίτης 2004	4,29	7,62	3,77	33,68	ΔΑ	ΔΑ	0,50	ΔΑ	ΔΑ	1,66	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,84	ΔΑ	291,7
Ροδίτης Τυρνάβου 2005	3,89	3,39	0,91	0,22	ΔΑ	0,98	0,17	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,36	0,00	ΔΑ	0,39	ΔΑ	ΔΑ	0,41	0,26	270,0

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

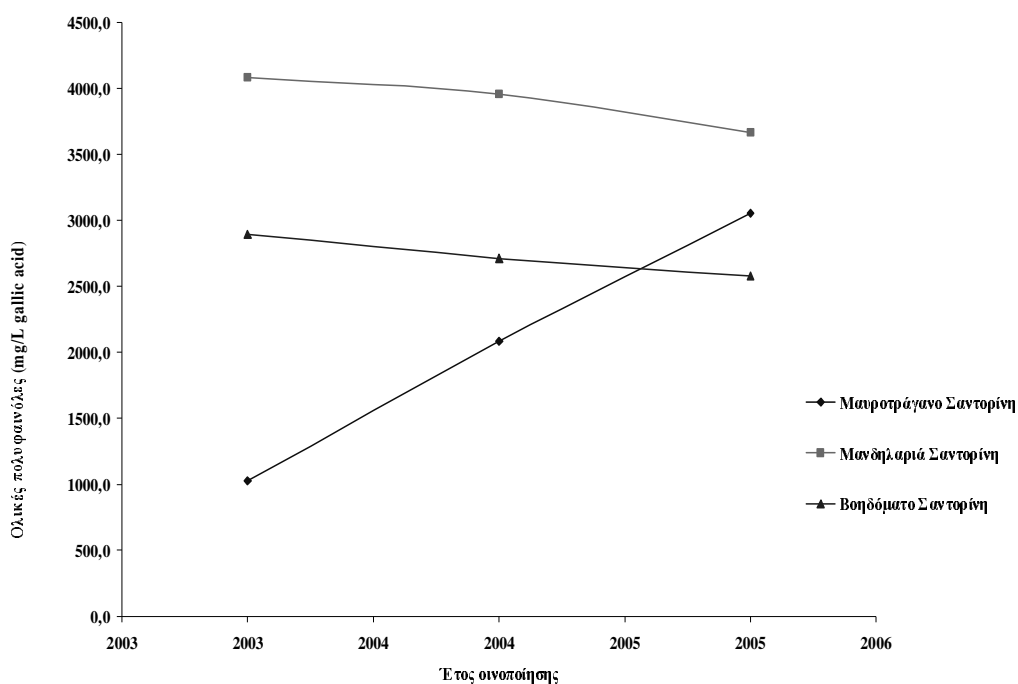
**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 3.6 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολικής σύστασης λευκού οίνου μεταξύ των ετών 2003-2005



Γράφημα 3.5 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολικής σύστασης ερυθρού οίνου μεταξύ των ετών 2003-2005



Γράφημα 3.7 Ετήσια διακύμανση ολικών πολυφαινολών σύστασης ερυθρών μονοποικιλιακών οίνων

3.5.7 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου οίνων ίδιας ποικιλίας από διαφορετικές περιοχές.

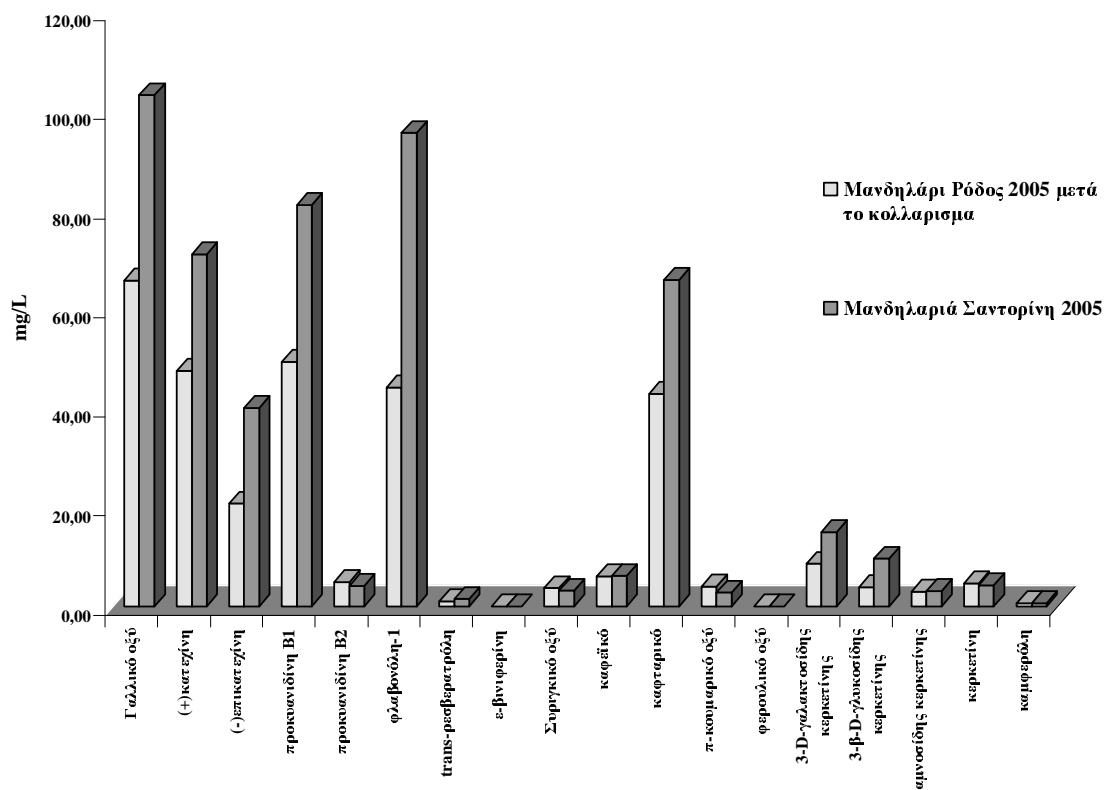
Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο λευκών και ερυθρών μονοποικιλιακών οίνων που παράχθηκαν το ίδιο έτος σε διαφορετικές οινοποιητικές περιοχές της Ελλάδας. Όπως γίνεται φανερό το πολυφαινολικό περιεχόμενο των οίνων της Σαντορίνης, είναι υψηλότερο σε σχέση με άλλες περιοχές. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές οινοποιητικές τεχνικές που εφαρμόζονται, αλλά κυρίως στο υψηλότερο πολυφαινολικό φορτίο της αρχικής ύλης (σταφυλιών), όπως αναλύεται στο Κεφάλαιο 4 και αφορά τις ιδιαίτσες κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής. Οι τελευταίες –ηλιοφάνεια, ύψος βροχής, υγρασία, αέρας, θερμοκρασία– φαίνεται ότι επιδρούν καθοριστικά στο σχηματισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου. Στα διαγράμματα 3.8-3.9 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα για δύο ερυθρούς και δύο λευκούς οίνους.

Πίνακας 3.8 Σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου οίνων της ίδιας ποικιλίας και χρονιάς από διαφορετικές περιοχές

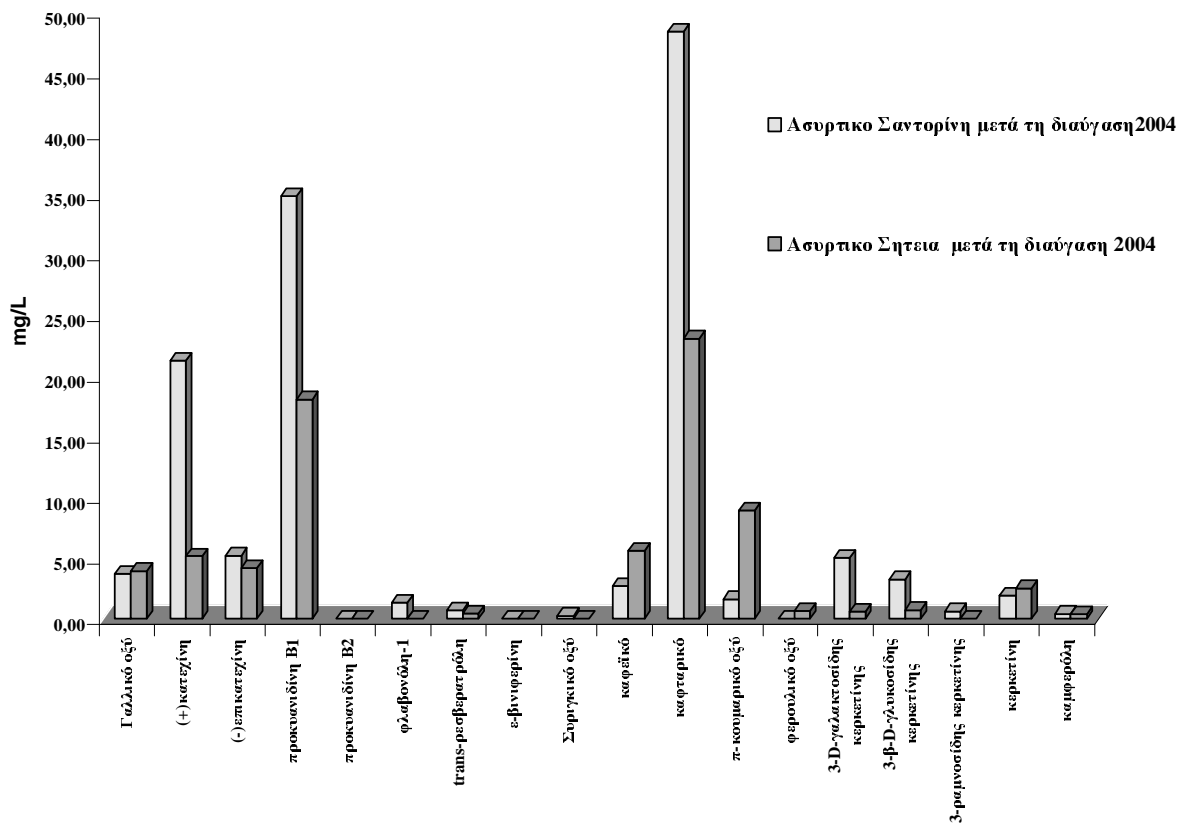
mg/L οίνου	Γαλλικό οξύ	(+)-κατεχίνη	(-)-επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβονόλη-1	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφραίνη	Στυργικό οξύ	καφαϊκό	trans-καφτανικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-β-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσιδίης κερακτίνης	κερακτίνη	καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Μανδηλάρι Ρόδος 2005	74,72	63,32	21,58	63,35	5,44	52,31	1,37	ΔΑ**	3,28	6,98	45,55	4,72	ΔΑ	8,47	4,32	3,17	4,35	0,58	2507,8
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	103,20	71,00	39,98	80,99	4,03	95,56	1,38	ΔΑ	3,11	6,09	65,87	2,67	ΔΑ	14,88	9,55	3,02	4,25	0,57	3667,1
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Αθήρι Ρόδος 2005	1,52	1,87	0,18	ΔΑ	ΔΑ	3,48	0,14	ΔΑ	0,00	1,18	6,38	0,80	ΔΑ	1,17	2,56	0,85	0,51	0,30	166,1
Αθήρι Σαντορίνη 2005	5,16	14,29	1,00	14,93	ΔΑ	3,12	0,27	ΔΑ	0,00	3,81	37,02	1,26	ΔΑ	4,65	3,78	0,00	0,84	0,37	405,1
Αστυκό Σαντορίνη 2004	3,71	21,27	5,22	34,86	ΔΑ	1,34	0,71	ΔΑ	0,25	2,69	48,42	1,62	ΔΑ	5,01	3,24	0,61	1,93	0,40	430,0
Αστυκό Σητεία 2004	3,94	5,16	4,18	18,10	ΔΑ	ΔΑ	0,42	ΔΑ	ΔΑ	5,6	23,12	8,93	0,63	0,59	0,72	0,00	2,51	0,37	329,4

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 3.8 Σύγκριση πολυφαινόλικου περιεχομένου ερυθρών οίνων ποικιλίας μανδηλαριά Ρόδου και Σαντορίνης



Γράφημα 3.9 Σύγκριση πολυφαινόλικου περιεχομένου λευκών οίνων ποικιλίας ασύρτικο Ρόδου και Σαντορίνης

3.5.8 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου γλυκών οίνων

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πολυφαινολική σύσταση των επιδόρπιων οίνων που αναλύθηκαν. Οι οίνοι αυτοί έχουν κατηγοριοποιηθεί σε λευκούς και ερυθρούς, ενώ τα αποτελέσματα εμπεριέχονται στον Πίνακα 3Α του Παραρτήματος Α. Αντίστοιχα, στα Γραφήματα 3.10-3.11 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των ερυθρών και λευκών επιδόρπιων οίνων. Όσον αφορά τους λευκούς οίνους, το Βινσάντο της Σαντορίνης φαίνεται να υπερέχει, ιδίως στη συγκέντρωση του γαλλικού και του *trans*-καφταρικού οξέος, ενώ το συνολικό του περιεχόμενο σε πολυφαινόλες είναι πολλαπλάσια σε σχέση με τους υπόλοιπους οίνους, προσεγγίζοντας τις τιμές των ερυθρών οίνων. Από τους ερυθρούς ιδιαίτερα πλούσιο σε πολυφαινόλες εμφανίζεται το ερυθρό Βινσάντο Σαντορίνης.

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ ξηρών και γλυκών οίνων, η γενική τάση είναι οι λευκοί γλυκοί να εμφανίζουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με τους ξηρούς, ενώ στους ερυθρούς οίνους παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση μεταξύ ξηρών και γλυκών οίνων της ίδιας ποικιλίας. Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζεται η πολυφαινολική σύσταση ερυθρού οίνου της ποικιλίας μανδηλαριάς Σαντορίνης και λευκού οίνου της ποικιλίας ασύρτικο καθώς και των αντίστοιχων γλυκών οίνων που παράγονται από τις ποικιλίες αυτές. Το ερυθρό και το λευκό Βινσάντο. Η παραγωγή των οίνων Βινσάντο, στηρίζεται στην έκθεση των σταφυλιών στον ήλιο για διάστημα περίπου 15 ημερών πριν την οινοποίηση τους προκειμένου να αυξηθεί το περιεχόμενο τους σε σάκχαρα. Επίσης οι παραγόμενοι οίνοι αφήνονται προς παλαίωση περίπου ένα χρόνο πριν την εμφιάλωση τους.

Όπως παρατηρείται στους ερυθρούς οίνους, το ερυθρό βινσάντο εμφανίζει σαφή μείωση σχεδόν σε όλες τις πολυφαινόλες που ανιχνεύθηκαν με HPLC, εκτός από το *trans*-καφταρικό οξύ, το οποίο έχει διπλάσια συγκέντρωση. Η ίδια μείωση εμφανίζεται και στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Η μείωση αυτή, μπορεί να σχετίζεται με την οξειδωση μέρους των πολυφαινολών, κατά τη διαδικασία της ξήρανσης των σταφυλιών, καθώς και στην παλαίωση του οίνου. Η επίδραση της παλαίωσης στους ερυθρούς οίνους αναλύεται στην επόμενη παράγραφο.

Στους λευκούς οίνους, οι συγκεντρώσεις των περισσότερων πολυφαινολών στον ξηρό και τον γλυκό οίνο είναι συγκρίσιμες, εκτός από τις συγκεντρώσεις των

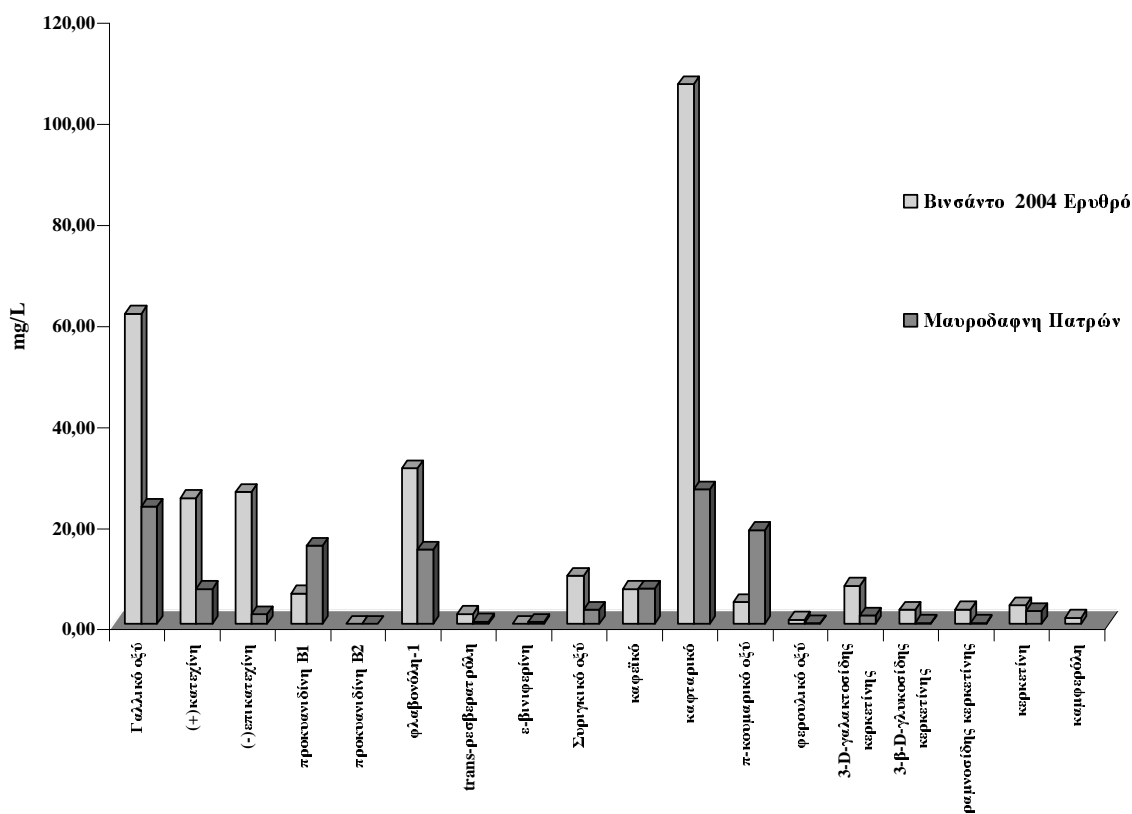
φλαβονολών που είναι μικρότερες στο λευκό βινσάντο. Αντίθετα οι ολικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν πολύ μεγάλη αύξηση όπως ήδη παρατηρήθηκε. Το φαινόμενο, αυτό ίσως οφείλεται σε πολυφαινόλες που εκχυλίστηκαν από το ξύλο, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης.

Πίνακας 3.9 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου, ξηρών και γλυκών οίνων της ίδιας ποικιλίας

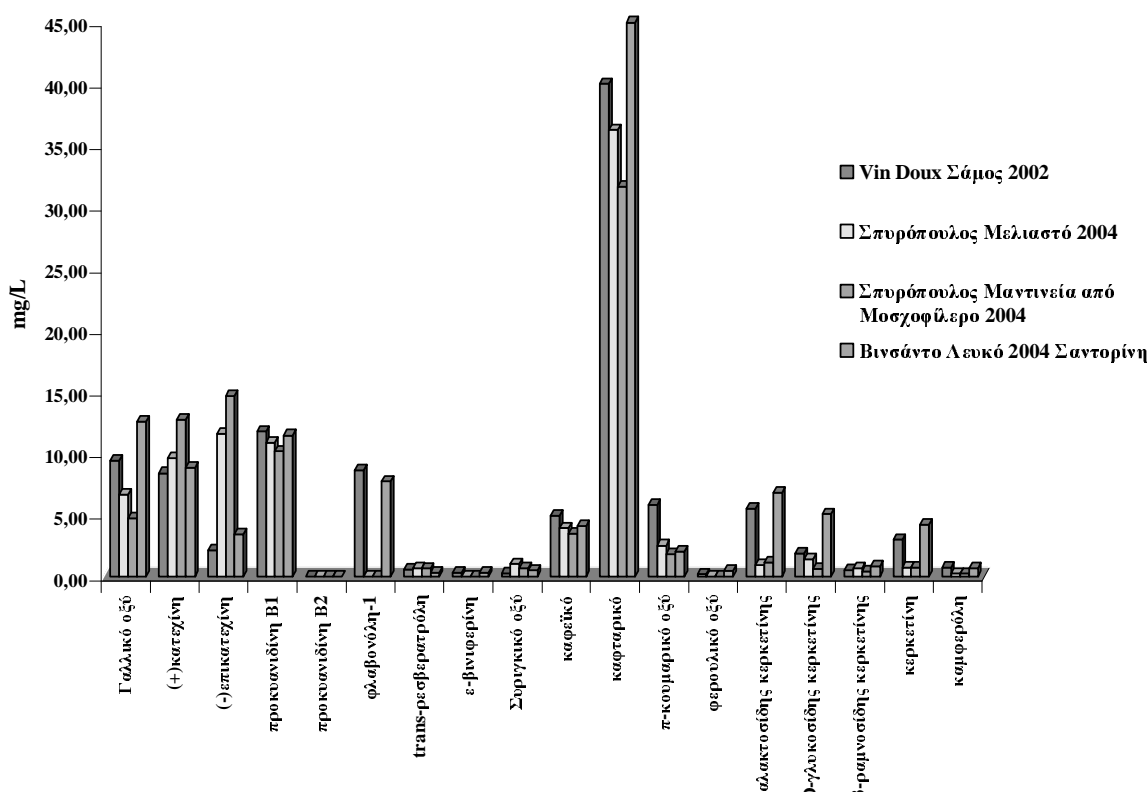
mg/L	Γαλλικό οξύ	(+)/κατεχίνη	(-)/επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβανόλη-1	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	Συγγλυκικό οξύ	καφεϊκό	trans -καφεοϋρικό	π-κουμφορικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γαλακτοσιδής κερακετίνη	3-β-D-γλυκοσιδής κερακετίνη	3-ραμνοσιδής κερακετίνη	κερακετίνη	καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	113,12	83,86	62,61	51,00	6,15	106,18	1,48	0,23	5,07	6,99	57,30	3,15	ΔΑ**	11,20	6,88	1,90	3,30	0,34	3956,1
Βινσάντο Ερυθρό 2003	61,40	24,95	26,07	6,03	ΔΑ	30,82	1,99	ΔΑ	9,50	6,88	106,8	4,31	0,86	7,53	2,84	2,90	3,67	1,20	2760,0
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Ασυρτικό Σαντορίνη 2003	2,87	14,94	3,80	20,23	ΔΑ	1,54	0,32	ΔΑ	0,74	5,26	34,60	2,28	ΔΑ	3,36	1,89	0,49	3,12	0,41	455,9
Βινσάντο Λευκό 2004 2003	12,59	8,84	3,43	11,46	ΔΑ	7,72	0,34	0,34	0,50	4,10	47,76	2,02	0,46	6,81	5,06	0,85	4,19	0,67	2033,8

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 3.10 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου επιδόρπιων οίνων Μαυροδάφνης Πατρών και Βινσάντο Σαντορίνης



Γράφημα 3.11 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου επιδόρπιων οίνων από λευκές ποικιλίες σταφυλιών

Φουράνια:

Εκτός από τις πολυφαινόλες στους γλυκείς οίνους ανιχνεύθηκε και η παρουσία της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης. Αυτή ήταν ιδιαίτερα αισθητή στους παλαιωμένους οίνους. Το μόριο αυτό είναι μια κυκλική αλδεΐδη που παράγεται από την όξινη αποικοδόμηση των μονοσακχάρων και είναι δυνατό να αποτελέσει πειστήριο, αλλά και δείκτη παλαίωσης ενός οίνου. Στον Πίνακα 3.10 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης στους γλυκείς οίνους που μελετήθηκαν.

Πίνακας 3.10. Συγκέντρωση υδροξυμεθυλοφουρφουράλης σε γλυκείς οίνους.

Οίνος	Υδροξυμεθυλο- φουρφουράλη
Μαυροδάφη Πατρών	17,91
Vin Doux Σάμος 2001 (μοσχάτο)	5,91
Βισάντο 2004 Ερυθρό (μανδηλαριά)	0,58
Βισάντο Λευκό 2004 Σαντορίνη (ασύρτικο)	0,81
Σπυρόπουλος Μελιαστό 2004 (μοσχοφίλερο)	0,13
Σπυρόπουλος Μαντινεία από Μοσχοφίλερο 2004	0,14

Όπως αναμενόταν η συγκέντρωση της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης αυξάνει με την παλαιότητα του οίνου. Η μεγαλύτερη ποσότητα αυτής ανιχνεύθηκε στη μαυροδάφη, Πατρών, η οποία εμφανίζεται μετά από παραμονή στο βαρέλι για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης βρέθηκε στον οίνο Vin Doux της Σάμου, εσοδείας 2001. Στους νεότερους οίνους η παρουσία της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης ήταν σε πολύ μικρή ποσότητα.

Βιβλιογραφικά, οι Ho και συνεργάτες,¹⁰⁷ έχουν προσδιορίσει την παρουσία της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης σε γλυκείς οίνους τύπου Πόρτο, σε συγκεντρώσεις 33,3 mg/L σε οίνους παλαιωμένους για 10 χρόνια και 168,7 mg/L για οίνους παλαιωμένους 30 χρόνια. Αντίστοιχα αποτελέσματα βρήκαν και οι Camara και συνεργάτες,¹⁰⁸ σε οίνο Μαλβαζία παλαιωμένο κατά 25 χρόνια.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρουσία φουρανίων έχει αναφερθεί και στους επιτραπέζιους οίνους που παλαιώνουν σε βαρέλια.^{109, 110}

3.5.9 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών κατά την παλαίωση στη φιάλη

Η μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου, των οίνων κατά την παλαίωση τους στη φιάλη, μελετήθηκε για ερυθρούς μονοποικιλιακούς οίνους της Σαντορίνης οι οποίοι ήταν εσοδείας 2003. η αρχική ανάλυση στο HPLC, έγινε σε διάστημα 2 μηνών από την παραγωγή τους. Οι υπόλοιπες σφραγισμένες φιάλες, αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό και δροσερό μέρος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις ακόμη, μετά από διάστημα 18 μηνών και 36 μηνών. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε ως προς το περιεχόμενο σε (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, trans-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη και φαινολικά οξέα, καθώς και ως προς το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11, ενώ στο Διάγραμμα 3.12 απεικονίζεται γραφικά η μεταβολή των πολυφαινολικών συστατικών για την ποικιλία μανδηλαριά κατά την παλαίωση στη φιάλη.

Όπως γίνεται φανερό η πιο δραματική μείωση παρατηρείται στη συγκέντρωση των φλαβονόλων (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη κατά την ωρίμανση. Τα επίπεδα των φαινολικών οξέων δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση κατά την παλαίωση, με εξαίρεση τον εστέρα *trans*-καφταρικό, ο οποίος στις ποικιλίες βοηδόματο και μανδηλαριά, παρουσίασε σημαντική μείωση κατά την παλαίωση, ενώ για την ποικιλία μαυροτράγανο, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή. Σταθερή παραμένει και η τάση για τις φλαβονόλες κερκετίνη και καμφερόλη.

Οι ολικές πολυφαινόλες εμφανίζουν μικρή μεταβολή μετά από παραμονή 18 μηνών στη φιάλη -μάλιστα στην ποικιλία μανδηλαριά παρατηρείται μικρή αύξηση- ενώ αντίθετα στους 36 μήνες παρατηρείται έντονη πτώση (Διάγραμμα 3.13).

Τα παραπάνω ευρήματα μπορούν σε γενικές γραμμές να συσχετιστούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών. Οι Roginsky και συνεργάτες¹¹¹, παρατήρησαν μείωση των μονομερών και ολιγομερών φαινολικών παραγώγων κατά την παλαίωση 21 ερυθρών οίνων, ενώ αντίθετα αυξήθηκε το ποσοστό των πολυμερών φαινολικών παραγώγων, γεγονός που υποδηλώνει την πραγματοποίηση αντιδράσεων συμπύκνωσης κατά την παλαίωση. Οι Zafrilla και συνεργάτες,²⁴ κατά την παρακολούθηση των μεταβολών του πολυφαινολικού περιεχομένου λευκών και ερυθρών οίνων κατά την παλαίωση σε διάστημα 7 μηνών, παρατήρησαν μείωση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ερυθρών οίνων, λόγω κυρίως της διάσπασης των ανθοκυανινών που περιέχονται σε αυτό σε ποσοστό 80%. Η διάσπαση των ανθοκυανινών ευθύνεται και για τη μεταβολή του χρώματος των παλαιωμένων

οίνων από βαθύ ερυθρό σε κεραμιδί. το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των λευκών οίνων παρέμεινε σταθερό, όπως και οι συγκεντρώσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων και των φλαβονολών.

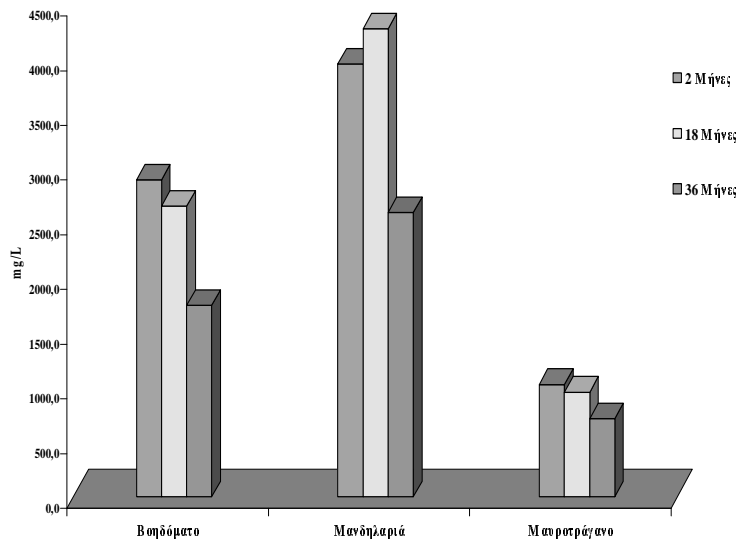
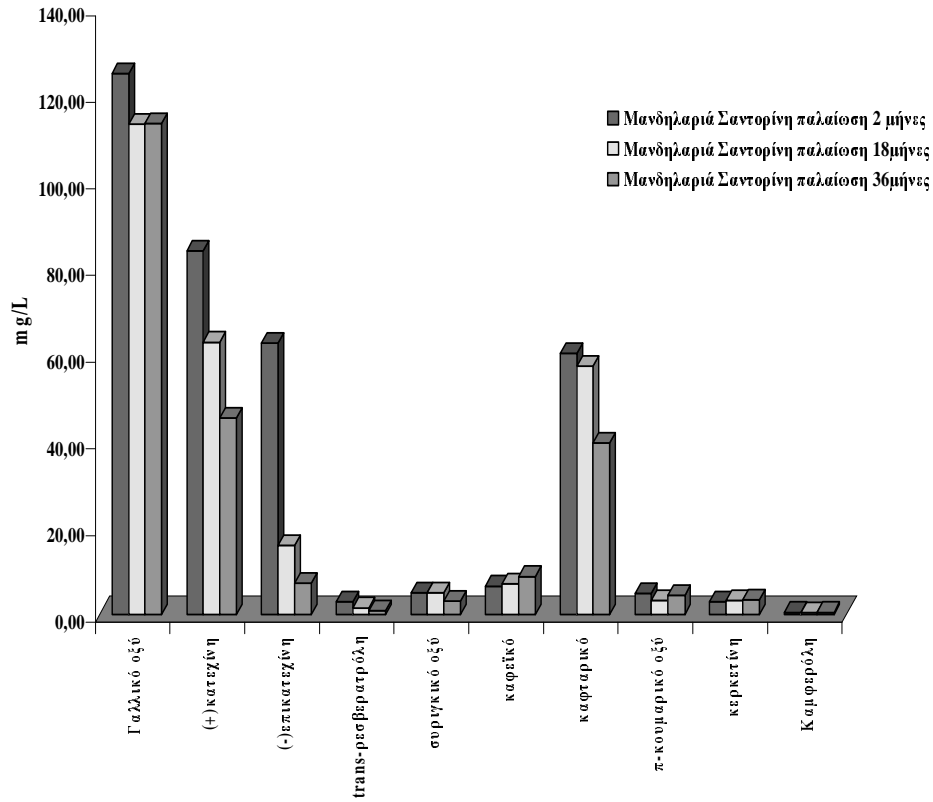
Οι Monagas και συνεργάτες,¹¹² οι οποίοι μελέτησαν με φωτομετρικές μεθόδους το περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και κατεχίνες, ερυθρών οίνων κατά την παλαίωση τους στη φιάλη για διάστημα 24 μηνών, παρατήρησαν επίσης απότομη μείωση του ποσοστού των ανθοκυανινών από τους πρώτους μήνες, της παλαίωσης. Αντίθετα για τις ολικές πολυφαινόλες η τάση ήταν αυξομειούμενη με τη μεγαλύτερη πτώση να παρατηρείται τους 12 πρώτους μήνες, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε άνοδος και πάλι πτώση μετά τους 20 μήνες παλαίωσης. Οι ολικές κατεχίνες παρουσίασαν μάλλον αυξητική τάση καθ' όλη την περίοδο παλαίωσης.

Γίνεται επομένως φανερό ότι οι βιοχημικές διεργασίες συνεχίζονται ακόμη και μετά το τέλος της ζύμωσης, διαμορφώνοντας τον τελικό χαρακτήρα των οίνων.

Πίνακας 3.11 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου ερυθρών οίνων κατά την παλαίωση στη φιάλη

Οίνοι εσοδείας 2003	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	<i>trans</i> -ρεβερατρούλη	συγγειακό οξύ	καφεϊκό	<i>trans</i> -καφεοαρτικό	<i>p</i> -κουμαρικό οξύ	κερκετίνη	Καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*#
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ											
Βοηδόματο Σαντορίνη παλαίωση 2 μήνες	139,09	63,97	80,20	0,50	4,43	8,12	22,89	3,90	2,68	0,36	2896,5
Βοηδόματο Σαντορίνη παλαίωση 18μήνες	135,36	51,64	25,06	0,50	4,67	7,27	18,47	3,04	5,00	0,47	2656,8
Βοηδόματο Σαντορίνη παλαίωση 36μήνες	128,60	37,04	13,20	0,31	3,21	8,51	9,99	3,40	3,05	0,54	1747,20
Μανδηλαριά Σαντορίνη παλαίωση 2 μήνες	124,84	83,81	62,61	1,48	4,98	6,53	60,21	4,87	2,89	0,50	3956,1
Μανδηλαριά Σαντορίνη παλαίωση 18μήνες	113,12	62,86	15,88	1,13	5,07	6,99	57,30	3,15	3,30	0,34	4278,8
Μανδηλαριά Σαντορίνη παλαίωση 36μήνες	113,24	45,35	7,21	0,76	3,08	8,81	39,56	4,39	3,36	0,47	2596,3
Μαυροτράγανο Σαντορίνη παλαίωση 2 μήνες	42,93	45,68	28,46	1,33	3,31	3,10	15,89	1,55	2,86	1,20	1025,7
Μαυροτράγανο Σαντορίνη παλαίωση 18μήνες	38,40	47,67	9,40	0,56	3,43	2,85	17,21	1,99	4,06	0,52	955,30
Μαυροτράγανο Σαντορίνη παλαίωση 36μήνες	37,36	21,58	4,89	0,41	2,45	3,20	13,52	2,53	3,06	0,65	814,10

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου



Γράφημα 3.12 Μεταβολή της συγκέντρωσης των επιμέρους και των ολικών πολυφαινολών ερυθρών οίνων κατά την παλαίωση στη φιάλη

3.6 Ανάλυση οίνων μετά από κατεργασία με ρητίνες

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν μελέτες αντιοξειδωτικής ικανότητας οίνων σε καλλιέργειες κυττάρων με τη μέθοδο μέτρησης των ενδοκυτταρικών ROS –τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 6- παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα οίνων με τη χρήση πολυμερών ρητινών προσρόφησης.

Η διαδικασία παραλαβής των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε ως εξής: 150 mL οίνου αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 300 mL. Το μίγμα αυτό πέρασε μέσω στήλης διαμέτρου 3 cm, η οποία προηγουμένως είχε πληρωθεί με 10g ρητίνης XAD4 και είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχικό πέρασμα 100 mL απεσταγμένου νερού, 100 mL μεθανόλης και 100 mL απεσταγμένου νερού. Η ταχύτητα ροής του δείγματος από τη στήλη προσαρμόστηκε στα 1 mL /min.

Μετά τη διέλευση του διαλύματος του οίνου, η στήλη εκπλύθηκε με 200 mL απεσταγμένου νερού προκειμένου να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και στέγνωσε με διέλευση ρεύματος αέρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διέλευση 50 mL μεθανόλης από τη στήλη με ταχύτητα ροής 1mL/min. Το μεθανολικό κλάσμα συλλέχθηκε, εξατμίστηκε υπό κενό δίνοντας ένα στερεό υπόλειμμα που αφού ζυγίστηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη (συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ακολούθησε διήθηση από φίλτρο σύριγγας PVDF με διαμέτρου πόρων 0.45 μm και στη συνέχεια αναλύθηκε με HPLC. Η καμπύλη αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας μίγματα των προτύπων μορίων σε μεθανόλη.

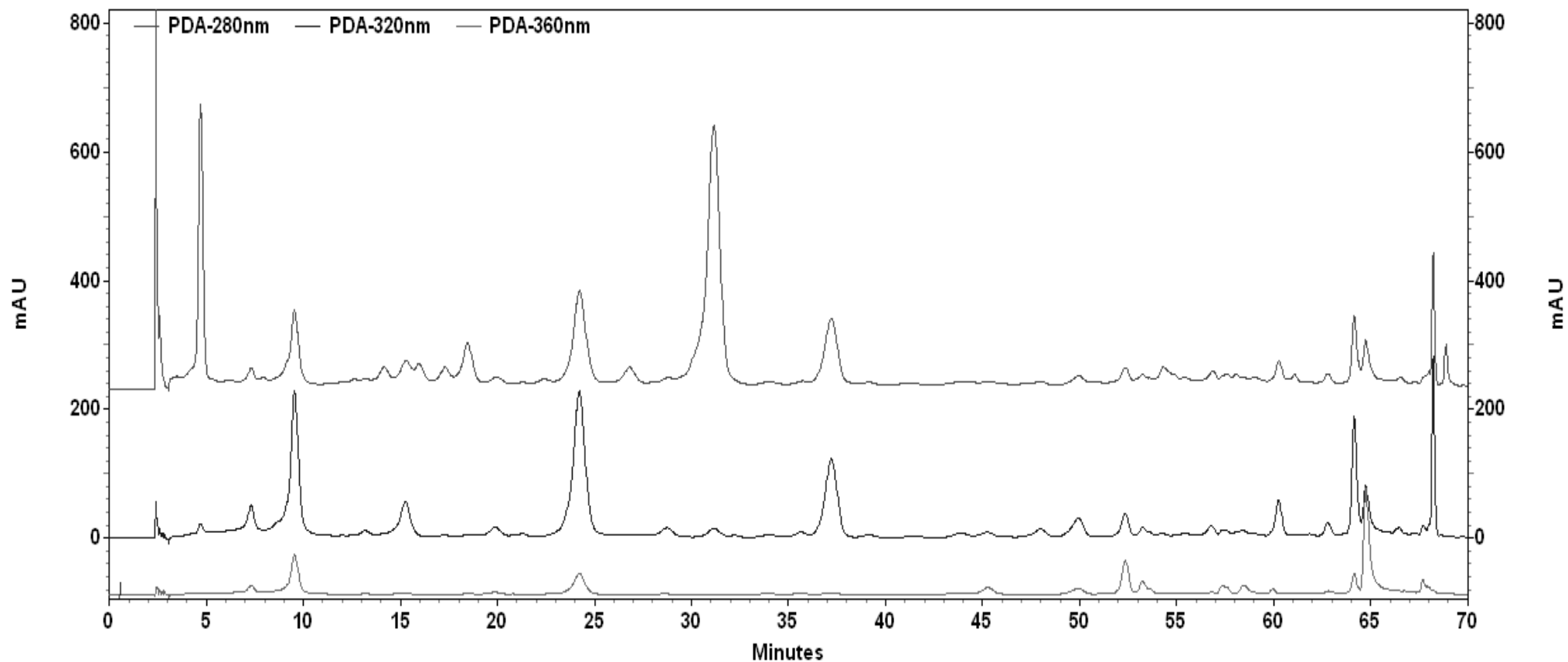
Το αντίστοιχο υδατικό έκλουσμα της στήλης, μετά από το πέρασμα του οίνου από τη στήλη, συλλέχθηκε και στη συνέχεια διήλθε μέσω στήλης διαμέτρου 3cm, η οποία προηγουμένως είχε πληρωθεί με 10g ρητίνης XAD7 και είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχικό πέρασμα 100 mL απεσταγμένου νερού, 100 mL μεθανόλης και 100 mL απεσταγμένου νερού. Η ταχύτητα ροής του δείγματος από τη στήλη προσαρμόστηκε στα 1m mL /min. Ακολούθησε η διαδικασία που ήδη περιγράφηκε και για το μεθανολικό κλάσμα της στήλης. Το στερεό υπόλειμμα αφού ζυγίστηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη (συγκέντρωση 10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ακολούθησε διήθηση από φίλτρο σύριγγας PVDF με διαμέτρου πόρων 0.45 μm και στη συνέχεια αναλύθηκε με HPLC.

Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα ενός εκχυλίσματος που προέκυψε μετά από πέρασμα ερυθρού οίνου ποικιλίας Μανδηλαριάς Σαντορίνης, από στήλη XAD4. Στους Πίνακες 3.12–3.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για δύο ερυθρούς και ένα λευκό οίνο εκφρασμένα σε mg/g εκχυλίσματος και σε mg/L οίνου.

3.6.1 Συζήτηση

Σε γενικές γραμμές τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την XAD4 έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες σε σχέση με εκείνα της XAD7. Όπως όμως φαίνεται από τον Πίνακα 3.13 το βάρος των εκχυλισμάτων της XAD7 για τους ερυθρούς οίνους, είναι πολύ μεγαλύτερο των αντίστοιχων της XAD4, λόγω της ικανότητας της πρώτης να συγκρατεί τις ανθοκυανίνες, οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους.

Κατά την αναγωγή των αποτελεσμάτων σε mg/L οίνου προκύπτει ότι η ανάκτηση της (+)-κατεχίνης, του γαλλικού και του *trans*-καφταρικού οξέος, καθώς και των γλυκοζιτών της κερκετίνης είναι πολύ χαμηλή για τα εκχυλίσματα της XAD4.



Εικόνα 3.4 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ερυθρού οίνου: **1.** γαλλικό οξύ, **2** trans-καφταρικό οξύ, **3.**προκυανιδίνη B1, **4.** (+)κατεχίνη, **5.** καφεϊκό οξύ, **6.** συριγγικό οξύ, **7.** (-)επικατεχίνη, **8.** φλαβανόλη-1, **9.** π-κουμαρικό οξύ, **10.** 3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης, **11.**3-β-D- γλυκοσίδης κερκετίνης, **12.** 3-ραμνοσίδης κερκετίνης, **13.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **14.** ε-βινιφερίνη

Πίνακας 3.12 Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων οίνων

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ mg/g εγκ	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβανόλη-1	trans- ρεβερατρούλη	ε-βιταφερρίνη	Συγγλυκικό οξύ	καφεϊκό	trans-καφαταρικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμπερόλη	Βάρος εκχυλισματος (mg)
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2002 XAD4	16,58	19,86	18,33	4,94	ΔΑ	107,83	1,10	1,50	1,94	11,39	6,46	3,81	0,23	2,52	1,10	0,49	6,41	0,58	353
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2002 XAD7	5,40	6,73	0,23	1,01	ΔΑ	0,81	ΔΑ	ΔΑ	0,02	0,10	0,39	ΔΑ	ΔΑ	0,26	0,14	0,35	0,16	0,05	2416
Μανδηλαριά Ρόδος 2004 XAD4	5,25	2,32	0,26	ΔΑ	ΔΑ	22,94	0,84	ΔΑ	2,00	2,91	6,06	2,09	0,09	2,53	2,87	0,40	5,29	0,30	302
Μανδηλαριά Ρόδος 2004 XAD7	5,87	5,51	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,20	0,26	4,46	ΔΑ	ΔΑ	2,20	1,01	0,58	ΔΑ	0,07	1020
Ασύρτικο Σαντορίνη 2002 XAD4	0,52	4,73	0,46	ΔΑ	ΔΑ	2,47	ΔΑ	ΔΑ	0,13	6,92	5,20	4,51	0,32	2,04	0,60	ΔΑ	2,80	0,05	231
Ασύρτικο Σαντορίνη 2002 XAD7	6,81	4,39	1,88	ΔΑ	ΔΑ	0,28	0,02	ΔΑ	0,06	0,33	22,27	0,05	ΔΑ	1,85	0,41	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	74

ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 3.13 Πολυφαινολικό περιεχόμενο οίνων όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυση των εκχυλισμάτων τους

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ mg/L οίνου	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	φλαβανόλη-1	trans- ρεβερατρούλη	ε-βιταφερρίνη	Συγγλυκικό οξύ	καφεϊκό	trans-καφαταρικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D- γλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμπερόλη
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2002 XAD4	19,51	23,36	21,57	5,82	ΔΑ	126,87	1,29	1,75	2,28	13,41	7,60	4,49	0,27	2,97	1,29	0,57	7,55	0,68
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2002 XAD7	43,50	18,70	1,84	8,15	ΔΑ	6,53	ΔΑ	ΔΑ	0,03	0,83	3,17	ΔΑ	ΔΑ	2,07	1,13	2,83	1,29	0,41
Μανδηλαριά Ρόδος 2004 XAD4	5,21	18,74	0,26	ΔΑ	ΔΑ	22,79	0,83	ΔΑ	1,98	2,89	6,02	2,08	0,09	2,52	2,85	0,40	5,26	0,30
Μανδηλαριά Ρόδος 2004 XAD7	19,96	6,69	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,68	0,87	15,16	ΔΑ	ΔΑ	7,47	3,43	1,96	ΔΑ	0,22
Ασύρτικο Σαντορίνη 2002 XAD4	0,40	3,64	0,36	ΔΑ	ΔΑ	1,90	ΔΑ	ΔΑ	0,10	5,33	4,01	3,47	0,25	1,57	0,46	ΔΑ	2,15	0,04
Ασύρτικο Σαντορίνη 2002 XAD7	1,68	1,08	0,46	ΔΑ	ΔΑ	0,07	0,01	ΔΑ	0,01	0,08	5,49	0,01	ΔΑ	0,46	0,10	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ

ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

3.7 Βιβλιογραφία 3^{ου} κεφαλαίου

- 1) <http://www.hepo.gr/Condows/oinos/oinos3.htm>
- 2) <http://www.greekwinemakers.com>
- 3) Soleas G. J., Diamandis E. P., and Goldberg D. M. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention *J. Clin. Labor. Anal.* (1997), 11, 287–313.
- 4) Jackson R.S. Modern Biotechnology of winemaking in: Wine a scientific exploration, eds Sandler M. and Pinder R., Taylor & Francis, 2nd ed., N.Y. and London 2003.
- 5) Waterhouse A. L. Wine Phenolics, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 2002, 957, 21–36.
- 6) Monagas M., Bartolome B. and Gomez-Cordoves C. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 85–118.
- 7) Frankel, E., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., and Kinsella, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet* 1993, 341, 454–457.
- 8) Teissedre P. L., Frankel E. N., Waterhouse A. L., Peleg, H., and German J. B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines, *J. Sci. Food Agric.* 1996, 70, 55–61.
- 9) Stoclet J.C., Kleschyov A., Andriambelason E., Dielbolt M. and Andriantsitohaina R., Endothelial NO₃ release caused by red wine polyphenols. *J. Physiol. Pharmacol.* 1999, 50, 535–540.
- 10) Baderschneider B. and Winterhalter, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity, *J. Agric. Food Agric.* 2001, 49, 2788–2798.

- 11) Lu, Y. and Foo, Y. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* **1999**, *65*, 1–8.
- 12) Su C. T. and Singleton, V. L. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochem.* **1969**, *8*, 1553–1558.
- 13) Reschke, A. and Herrmann, K. Occurrence of 1-*O*-hydroxy-cinnamoyl- β -D-glucoses in fruits. 15. Phenolic constituents of fruits, *Z. Lebensm, Unters. Forsch.* **1981**, *173*, 458–463.
- 14) Fernandez de Simon, B., Hernandez, T., and Estrella, I. Phenolic composition of white grapes (Var. Airen), Changes during ripening. *Food Chem.* **1993**, *47*, 47–52.
- 15) Langcake P. and Pryce R. J. A new class of phytoalexins from grapevines, *Experientia.* **1977**, *33*, 151–152.
- 16) Jeandet P., Bessis R., and Gautheron B, The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 41–46.
- 17) Korhammer S., Reniero F., and Mattivi F. An oligostilbene from *Vitis* Roots, *Phytochem.* **1995**, *38*, 1501–1504.
- 18) Waterhouse A. L. and Lamuela-Raventos R. M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 571–573.
- 19) Goldberg, D. M., E. N., Karumanchiri A., Yan J., Diamandis E. P., and Soleas, G. J. Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1995**, *708*, 89–98.
- 20) Mattivi F., Reniero F., and Korhammer S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1820–1823
- 21) Landrault N., Larronde F., Delaunay J.-C., Castagnino C., Vercauteren J., et al., Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2046–2052.

- 22) Revilla E., Alonso E., and Estrella I. Analysis of flavonol aglycones in wine extracts by high performance liquid chromatography, *Chromatographia*, **1986**, *22*, 157–159.
- 23) Garcia-Viguera C. and Bridle P. Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* **1995**, *4*, 349–352.
- 24) Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Cayuela J. M., Martinez-Cacha A., Pardo F. and Lopez -Nicolas, J. M., Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4694–4700.
- 25) Flint S.D., Jorda P. W., and Caldwell M. M. Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: Leaf optical properties of photosynthesis, *Photochem. Photobio.* **1985**, *41*, 95–99.
- 26) McDonald M. S., Hughes M., Burns, J., Lean M. E. J., Matthews D., and Croziers A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 368–375.
- 27) Jordao A. M., Ricardo da Silva, J. M., and Laureano, O. Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.), *Vitis* **2001**, *40*, 17–22.
- 28) Ricardo da Silva, J. M., Rosec, J.P., Bourzeix M., and Heredia N. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high-performance reversed-phase liquid chromatography, *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *53*, 85–92.
- 29) De Pascual-Teresa, S., Treutter, D., Rivas-Gonzalo, J.C., and Santos-Buelga, C. Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4209–4213.
- 30) Porter, L. J., Hirstich, L. N., and Chang, B.G The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 223–230.
- 31) Bobak M. and Marmot M., Wine and heart disease: a statistical approach in: Wine a scientific exploration, eds Sandler M. and Pinder R., Taylor & Francis, 2nd ed., N.Y. and London **2003**.

- 32) Marmot M. G., Alcohol and coronary heart disease, *Internat. J. Epidemiol.* **1984**, *13*, 160—167.
- 33) Camargo C. A., Jr, Hennekens C. H., Gaziano J. M., Manson J.E., Goldhaber S. Z., and Hennekens C. H. Prospective study of moderate alcohol consumption and mortality in US male physicians, *Arch, Intern, Med.* **1997**, *157*, 79—85.
- 34) Fuchs C.S, Stampfer M. J., Colditz G. A., Giovannucci E. L., Manson J. E., Kawachi I., Hunter D. J., Hankinson S.E., Hennekens C.H., and Rosner B. Alcohol consumption and mortality among women, *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1245—1250.
- 35) Gronbaek M., Becker U., Johansen D., et al. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer, *Ann. Intern. Med.* **2000**, *133*, :411—419.
- 36) Thun M. J., Peto R., Lopez AD, Monaco J. H., Henley S. J., Heath C.W. J. and Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults, *N. Engl. J. Med.* **1997**, *337*, 1705—1714.
- 37) Lorimier, A. A. Alcohol, wine, and health. *Am. J. Surg.* **2000**, *180*, 357—361.
- 38) Szmítko P. E. and Verma S. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *288*, H2023—H2030.
- 39) St Léger A.S. Cochrane A. L., Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* **1979**, *1*, 1017—1020.
- 40) Nanji A A. Alcohol and ischemic heart disease: Wine, beer, or both?, *Int. J. Cardiol.* **1985**, *8*, 487—489.
- 41) Nanji A. A and French S. W. Alcoholic beverages and coronary heart disease, *Atherosclerosis* **1986**, *60*, 197—198.
- 42) Hegsted D. M., Ausman L. M. Diet, alcohol and coronary heart disease in men, *J. Nutr.* **1986**, *118*, 1184—1189.
- 43) Renaud S. and de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet* **1992**, *339*, 1523—1526.

- 44) Renaud S., C. René Guéguen R., Conard P., Lanzmann-Petithory D., Orgogozo J. M. and Henry O. Moderate wine drinkers have lower hypertension-related mortality: a prospective cohort study in French men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 621–625.
- 45) Richard J. L. Les facteurs de risque coronarien. Le paradoxe français. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **1987**, *80* (suppl 1), 17–21.
- 46) Grønbaek M., Deis A., Sørensen, T. I. A., Becker U., Schnohr P., Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *BMJ.* **1995**, *310*, 1165–1169.
- 47) Gaziano J. M., Buring J. E., Breslow, Goldhaber S. Z., Rosner B., Vandenburg M., Willett W., and Hennekens C. H. Moderate alcohol intake, increased levels of high density lipoproteins, and decreased risks of myocardial infarction. *N Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1829–1834.
- 48) Rimm E. B., Klatsky A., Grobbee D., Stampfer M. J. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? *BMJ.* **1996**, *312*, 731–736.
- 49) Friedman G. D, Klatsky A.L. Is alcohol good for your health? *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1882–1883.
- 50) Klatsky A. L., Armstrong M A., Friedman G. D. Red wine, white wine, liquor, beer, and risk for coronary artery disease hospitalization, *Am J Cardiol.* 1997, *80*, 416–20.
- 51) Klatsky A. L., Friedman G. D., Armstrong, M. A., Kipp, H. Wine, Liquor, Beer, and Mortality. *Am. J Epidemiol.* **2003**, *158*(6), 585–595.
- 52) Vogel R. A. Vintners and vasodilators: are French red wines more cardioprotective? *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *41*, 479–481.
- 53) Wallerath T., Poleo D., Li H., and Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *41*, 471–478.
- 54) Trevisan M., Schisterman, E., Mennotti A., Farchi G., Conti S. Risk Factor And Life Expectancy Research Group Drinking Pattern and Mortality: The Italian Risk

Factor and Life Expectancy Pooling Project. *Ann. Epidemiol.* **2001**, *11* (5), 312—319.

55) <http://www.incardiology.gr>

56) Demrow H. S, Slane P. R., Folts J. D. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **1995**, *91*, 1182—1188.

57) Broustet J-P, Wine and health. *Heart* 1999, *81*,459-460

58) Corder R., Douthwaite J. A., Lees D. M., Khan N.Q., Viseu Dos Santos A. C., Wood E. G., and Carrier M. J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* **2001**, *414*, 863, 2001.

59) Klurfeld D. M., Kritchevsky D. Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits. *Exp. Mol. Pathol.* **1981**, *34*, 62—71.

60) Diebolt M., Bucher B., Andriantsitohaina R. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. *Hypertension.* **2001**, *38*,159—165.

61) Seigneur M., Bonnet J., Dorian B., Benchimol D., Drouillet F., Gouverneur G., Larrue J., Crockett R., Boisseau M.-R., Ribereau-Gayon P., Bricaud H. Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on platelet function and serum lipids. *J. Appl. Cardiol.* **1990**, *5*, 215—222.

62) Lavy A., Furhman B., Markel A., Dankner G., Ben-Amotz A., Presser D., Aviram M. Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry, hematology, and coagulation: Favourable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. *Ann. Nutr. Metab.* **1994**, *38*, 287—294.

63) Struck M., Watkins T., Tomeo A., Halley J., Bierenbaum M. Effect of red and white wine on serum lipids, platelet aggregation, oxidation products and antioxidants: A preliminary report. *Nutr Res.* **1994**, *14*,1811—1819.

64) Goldberg D. M., Garovic-Kocic V., Diamandis E. P., Pace-Asciak C. R. Wine: Does the colour count? *Clin Chim Acta*, **1996**, *246*, 183—193.

- 65) Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation, *Am J Clin Nutr.* **1995**, *61*, 549–554.
- 66) Weisse M. E., Eberly B., Person D. A. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *Br. Med. J.* **1995**, *311*, 1657–1660.
- 67) Dolara P., Arrigucci S., Cassetta M. I., Fallani S. and Novelli A. Inhibitory activity of diluted wine on bacterial growth: the secret of water purification in antiquity, *Int J Antimicrob Agents* **2005**, *26* (4), 338–340.
- 68) Lesley J. A. and Waldburger C. D. Repression of *Escherichia coli* PhoP–PhoQ signaling by acetate reveals a regulatory role for acetyl coenzyme. *A. J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2563–2570.
- 69) Rodriguez Vaquero M. J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **2007**, *18*, 93–101.
- 70) Rodriguez Vaquero M. J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Food Control* **2006**, *in press*.
- 71) Soleas G. J., Grass L., Joseph P. D., Goldberg D. M., Diamandis E. P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols, *Clin. Biochem.* **2006**, *39*, 492–497
- 72) Bandera E.V., Freudenheim J. L., Graham S., Marshall J. R., Haughey B. P., Swanson M., Brasure J. and Wilkinson G. Alcohol consumption and lung cancer in white males. *Cancer Causes. Control* **1992**, *3*, 361–369.
- 73) Potter J. D., McMichael A. J., Hartshorne J. M.. Alcohol and beer consumption in relation to cancers of bowel and lung: an extended correlation analysis. *J. Chron. Dis.* **1982**, *35*, 833–842.
- 74) Terry M. B., Zhang F. F., Kabat G., Britton J. A., Teitelbaum S. L., Neugut A. I., And Gammon M. D. Lifetime Alcohol Intake And Breast Cancer Risk, *AEP*, **2006**, *16*, (3), 230–240.

- 75) Prescott E., Gronbaek M., Becker U. and Sorensen T. I. A. Alcohol Intake and the Risk of Lung Cancer: Influence of Type of Alcoholic Beverage. *Am. J. Epidemiol.* **1999**, *149*, (5), 463–470.
- 76) Bowlin S. J., Leske M. C., Varma A., Nasca P., Weinstein A., Caplan L. Breast cancer risk and alcohol consumption: results from a large case-control study. *Intern. J. Epidemiol.* **1997**, *26*, 915–923.
- 77) Smith-Warner S. A., Spiegelman D., Yaun S. S., Van den Brandt P. A., Folsom A. R., Goldbohm A., Graham S., Holmberg L., Howe G. R., Marshall J. R., Miller A. B., Potter J. D., Speizer F. E., Willett W. C., Wolk A., Hunter D. J. Alcohol and breast cancer in women: A pooled analysis of cohort studies. *JAMA.* **1998**, *279*, 535–540.
- 78) Longnecker M.P., Berlin J.A., Orza M.J., Chalmers T.C. A meta-analysis of alcohol consumption in relation to risk of breast cancer, *JAMA.* **1988**, *260*, 652–656.
- 79) Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C.,¹ Kouroumalis E, Martin P.-M., Castanas E. Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells, *J. Cell. Biochem.* **2000**, *78*, 429–441.
- 80) Gwinn M, Webster L., Lee N., Layde P., Rubin G. Alcohol consumption and ovarian cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* **1986**, *123*, 759–66.
- 81) Kushi L. H., Mink P.J., Folsom A. R., et al. Prospective study of diet and ovarian cancer, *Am J Epidemiol.* **1999**, *149*, 21–31.
- 82) Webb P. M., Purdie D. M., Bain C. J.,² and Green A. C. Alcohol, Wine, and Risk of Epithelial Ovarian Cancer *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2004**, *13* (4), 592–599.
- 83) Goodman M.T., Tung K.H. Alcohol consumption and the risk of borderline and invasive ovarian cancer, *Obstet Gynecol.* (**2003**), *101*, 1221–1228.
- 84) Chopra M., Fitzsimons P. E.E., Strain J.J., Thurnham D.I., and Howard A., N., Nonalcoholic Red Wine Extract and Quercetin Inhibit LDL Oxidation without

- Affecting Plasma Antioxidant Vitamin and Carotenoid Concentrations, *Clin. Chem.* **2002**, *46* 1162–1170.
- 85) Carbonneau M.-A. , Leger C. L., Descomps B., Michel F., Monnier L. J. Improvement in the antioxidant status of plasma and low-density lipoprotein in subjects receiving a red wine phenolics mixture, *Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, (2), 235–240.
- 86) Landrault N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G. and Teissedre P.-L. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3341–3348.
- 87) Kerry N. L. and Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* **1997**, *135* , 93–102.
- 88) Van Golde P. H. M., Sloots L. M., Vermeulen W. P., Wielders J. P. M., Hart H. C., Bouma B. N. and Van de Wiel A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* **1999**, *147* (2), 365–370.
- 89) De Rijke Y. B. , Demacker P. N. M., Assen N. A., Sloots L. M., Katan M. B., and Stalenhoef A. F. H. Red wine consumption does not affect oxidizability of low density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr.* **1996**, *63*, 329–334.
- 90) Serafini M., Maiani G. and Ferro-Luzzi A. Alcohol-Free Red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans, *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1003–1007.
- 91) Rodriguez-Delgado MA, Malovana S, Perez JP, Borges T, Garcia Montelongo F.J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *912*, 249–257.
- 92) Sakkiadi A.-V., Stavrakakis M.N, Haroutounian S.A. Direct HPLC Assay of Five Biologically Interesting Phenolic Antioxidants in Varietal Greek Red Wines, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* **2001**, *34*, (6) 410–413.
- 93) Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E. and Psarra, E. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of

- principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chem.* **2001a**, *73*, 501–514.
- 94) Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.* **2006**, *99*, 784–793.
- 95) Arnous, A., Makris, D.P. And Kefalas, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5736–5742.
- 96) Fernandez-Pachon M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C., Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 101–108.
- 97) Guendez R., Stamatina Kallithraka S., Dimitris P. Makris D. P., Panagiotis Kefalas P. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera*) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. *Phytochem. Analys.* **2005**, *16*, 17–23.
- 98) Peña-Neira A., Hernández T., García-Vallejo C., Estrella I., Suarez J. A. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin, *Eur. Food Res. and Technol.* **2000**, *210* (6), 1438–2385
- 99) Makris, D.P., Psarra, E., Kallithraka, S. And Kefalas, P. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Res. Intern.* **2003**, *36*, 805–814.
- 100) Careri M., Corradini C., Elviri L., Nicoletti I., and Zagnoni I. Direct HPLC Analysis of Quercetin and *trans*-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (18), 5226–5231.
- 101) Kallithraka S., Arvanitoyannis I., El-Zajouli A., Kefalas P. The application of an improved method for *trans*-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chem.* **2001b**, *75* (3) 355–363.
- 102) Dourtoglou, V.G., Makris, D.P., Bois-Dounas, F. And Zonas, C. *Trans*-resveratrol concentration in wines produced in Greece. *J. Food Compos. Anal.* **1999**, *12*, 227–233.

- 103) Gerogiannaki-Christopoulou M., Athanasopoulos P., Kyriakidis N., Gerogiannaki I. A., Michalis Spanos M. Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties, *Food Control* **2006**, *17*, 700–706.
- 104) Fernandez-Pachon M. S., Villano D., Garcia-Parilla M. C., Troncoso A. M., Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition, *Analyt. Chim. Acta*, **2004**, *513*, 113–118.
- 105) Minussi R. C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotillo D., Pastore G. M., Duran N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chem.* **2003**, *82*, 409–416.
- 106) Sanchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R. L. Anthocyanin and procyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with non-traditional wines obtained from highbush blueberry, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4889–4896.
- 107) Ho P., Hogg T.A., Silva M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines *Food Chem.* **1999**, *64* (1)115–122.
- 108) Camara J. S., Alves M. A. and Marques J. C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing, *Analyt. Chim. Acta*, **2005**, *563*, (1-2), 188–197.
- 109) Moutounet M., Rabier P., Puech J.,-L. Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Science des Aliments* **1989**, *9*, 35–51.
- 110) Laszlavik M., Lajos Gál L., Misik S., and László Erdei L. Phenolic Compounds in Two Hungarian Red Wines Matured in *Quercus robur* and *Quercus petraea* Barrels: HPLC Analysis and Diode Array Detection, *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46* (1) 67–74.
- 111) Roginsky V., de Beer D., Harbertson J. F., Kilmartin P. A., Barsukova T. and O Adams D. The antioxidant activity of Californian red wines does not correlate with wine age. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 834–840.

- 112) Monagas M., Gomez-Cordoves C., Bartolome B., Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.* **2006**, 95 405–412.

4. ΣΤΑΦΥΛΙΑ (*Vitis Vinifera* L.)

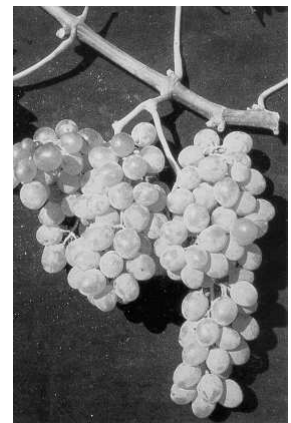
4.1 Ποικιλίες που μελετήθηκαν

Οι ποικιλίες οινοποιήσιμων σταφυλιών του είδους *Vitis vinifera* L. που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της διατριβής παρουσιάζονται στη συνέχεια, χωρισμένα σε λευκές και ερυθρές ποικιλίες.

4.1.1 Λευκές ποικιλίες

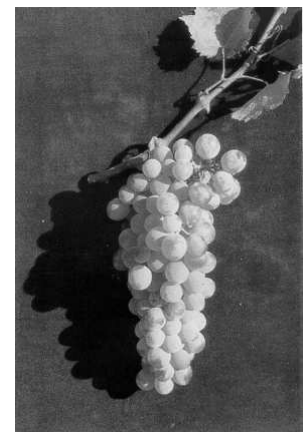
Αθήρι

Πρόκειται για λευκή ποικιλία που καλλιεργείται ευρύτατα στα νησιά του Αιγαίου και ιδιαίτερα τη Ρόδο.^{1,3} Στην ηπειρωτική Ελλάδα, καλλιεργείται κυρίως στη Πελοπόννησο και τη Χαλκιδική. Η μελέτη της ποικιλίας αυτής παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της αρχαίας καταγωγής του. Αν και δεν είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο, θεωρείται ότι η ποικιλία αθήρι ταυτίζεται με τη *θηριακή άμπελο* της αρχαιότητας, που είχε λάβει την ονομασία αυτή από τη Θήρα.^{1,2} Παραδοσιακά, το αθήρι συνοινοποιείται με άλλες λευκές ποικιλίες, με εξαίρεση την παραγωγή της Ρόδου, όπου ο συνδυασμός της γεωγραφικής τοποθεσίας του νησιού και του μικροκλίματος παράγει αθήρι που είναι έχει τη δυνατότητα μονοποικιλιακής οινοποίησης. Εκτός της Ρόδου η Σαντορίνη είναι μια ακόμα περιοχή όπου παράγεται μονοποικιλιακός οίνος από αθήρι.



Ασύρτικο

Η ποικιλία ασύρτικο θεωρείται ως η καλύτερη ελληνική για την παραγωγή λευκού οίνου.³ Η καλλιέργεια του ασύρτικου είναι παραδοσιακή μόνο στη Σαντορίνη—όπου καλύπτει περίπου το 70% των αμπελώνων— γεγονός ασυνήθιστο για την ελληνική αμπελουργία. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι σχετικά πρόσφατα εισήχθη η καλλιέργεια της ποικιλίας αυτής στη Σαντορίνη. Σύμφωνα με μια μη εξακριβωμένη εκδοχή, η



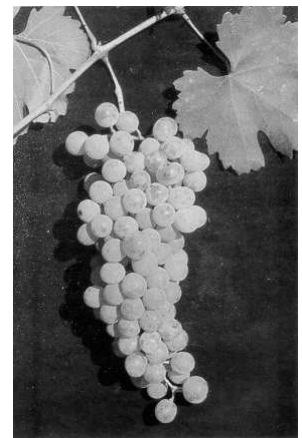
καλλιέργεια της ποικιλίας αυτή ήρθε στο νησί από την περιοχή Jerez της Ισπανίας.¹

Το ασύρτικο έχει την ξεχωριστή ιδιαιτερότητα –σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες που ευδοκιμούν στη νότια Μεσόγειο– να διατηρεί υψηλή οξύτητα κατά την ωρίμανσή του. Το κρασί που παράγεται από το ασύρτικο είναι πλούσιο σε φαινολικά παράγωγα, με αποτέλεσμα να είναι επιρρεπές στην οξείδωση. Η ιδιαιτερότητα αυτή του ασύρτικου, δηλαδή να αποκτά σκούρο χρώμα και να αναπτύσσει βαθιά αρώματα ως αποτέλεσμα της ελεγχόμενης οξείδωσης, βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην παραγωγή του Vinsanto, του πασίγνωστου γλυκού οίνου της Σαντορίνης².

Αηδάνι

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται σε περιορισμένη κλίμακα μόνο στις Κυκλάδες, κυρίως τη Σαντορίνη και την Πάρο. Θεωρείται σχεδόν βέβαιο ότι πρόκειται για την “εδάνη άμπελο” που αναφέρει ο λεξικογράφος Ησύχιος γύρω στον 5^ο αιώνα μ.Χ.¹

Συνήθως συνοινοποιείται μαζί με το ασύρτικο, σε σχέση με το οποίο διαθέτει πολύ χαμηλότερη οξύτητα και περιεχόμενο σακχάρων με αποτέλεσμα να συμβάλει στην ανάπτυξη εξωτικών αρωμάτων στο κρασί που τελικά απάγεται.² Παρότι δεν είναι σημαντική σε μέγεθος η καλλιέργεια της ποικιλίας αυτής, εντούτοις παίζει σημαντικό ρόλο στην οινοποιητική παραγωγή Σαντορίνης, αφού συμμετέχει –μαζί με το ασύρτικο και το αθήρι– στην παραγωγή ξηρών και ημίξερων οίνων, καθώς και στην παραγωγή του Vinsanto. Στην Νάξο χρησιμοποιείται –σε συνδυασμό με το αθήρι– στην παραγωγή του παραδοσιακού γλυκού οίνου, του Απίρανθου. Τέλος, θεωρείται ότι, όπως και το αθήρι, συμμετείχε στην παρασκευή του οίνου *Μαλβαζία* κατά τους Μεσαιωνικούς χρόνους.²



Ροδίτης

Καλλιεργείται κυρίως στη βόρειο Πελοπόννησο, όμως είναι όμως διαδεδομένη και στην υπόλοιπη Ελλάδα. Στην πραγματικότητα, ο ροδίτης είναι μια οικογένεια συγγενών κλώνων που διαφέρουν μεταξύ τους στο χρώμα της επιδερμίδας, από λευκό έως ερυθρό. Βέβαια διαφοροποιούνται ανάλογα και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε παραγόμενου οίνου. Συχνά χρησιμοποιείται για την παραγωγή είτε ξηρών λευκών οίνων, όπως οι ΟΠΑΠ Αγχιάλου και Πατρών, ή έγχρωμων ρετσίνωμένων στη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο.¹

Γουστολίδι

Η ποικιλία είναι σημαντική για την οινοποιητική παράδοση των Ιονίων νησιών και ιδιαίτερα της Ζακύνθου, όπου στο παρελθόν αποτελούσε το κυριότερο συστατικό στο *Λιανορόγγι*, ένα γλυκό οίνο που έχαιρε ιδιαίτερης εκτίμησης. Επίσης χρησιμοποιείται για την παρασκευή του Βερντέα, ενός είδος οίνου που επιβιώνει στα Ιόνια νησιά έως τις μέρες μας.²

Βηλάνα

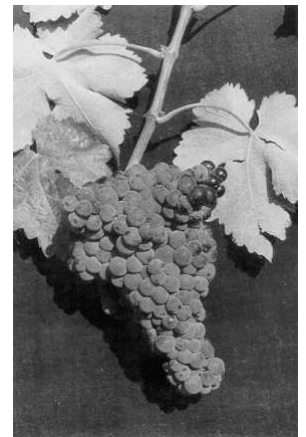
Αποτελεί τη σπουδαιότερη λευκή ποικιλία της ανατολικής και κεντρικής Κρήτης. Πρόκειται για μια παλιά τοπική ποικιλία, το όνομα της οποίας ανάγεται στην εποχή της Ενετοκρατίας στην Κρήτη, αφού βηλάνα αποκαλείται ένα είδος κάστρου στην Κρήτη.

Επειδή η ποικιλία βηλάνα παράγει ιδιαίτερα ευοξειδωτους οίνους, αυτοί εμφιαλώνονται άμεσα χωρίς προηγούμενη παραμονή σε βαρέλια.¹

4.1.2 Ερυθρές Ποικιλίες***Μανδηλάρι***

Πρόκειται για την πλέον διαδεδομένη στα νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη ερυθρά ποικιλία. Έχει αιγαιοπελαγίτικη καταγωγή και μάλιστα στη Ρόδο αναφέρεται ως “αμοργιανό”, γεγονός που πιθανόν να υποδηλώνει τον τόπο της καταγωγής της.¹

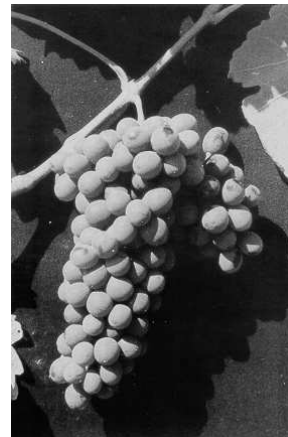
Είναι ποικιλία ιδιαίτερα πλούσια σε τανίνες και χρωστικές, δίνει δε οίνους με χαμηλό ποσοστό αιθανόλης το οποίο δεν αρκεί για την παραγωγή μονοποικιλιακών οίνων. Για το λόγο αυτό συνήθως οινοποιείται μαζί με άλλες ποικιλίες, όπως για παράδειγμα στα Πεζά και τις Αρχάνες της Κρήτης αναμιγνύεται σε ποσοστό 20%-40% με την ντόπια ποικιλία κοτσιφάλι, δημιουργώντας οίνους που ενδείκνυνται ιδιαίτερα για παλαίωση (2). Αντίστοιχα, στη Σαντορίνη η μανδηλαριά αναμιγνύεται με την ποικιλία μαυροτράγανο, ενώ στη Χίο παράγουν από τη μανδηλαριά ένα γλυκό μαύρο οίνο, γνωστό ως κουρουνιώτικο, αφού πρώτα τα σταφύλια λιαστούν για μια εβδομάδα.² Μοναδική εξαίρεση είναι η Ρόδος, όπου η όψιμης ωρίμανσης μανδηλαριά αφήνεται να ωριμάσει πλήρως στους σχετικά χαμηλού υψομέτρου αμπελώνες με αποτέλεσμα



να είναι δυνατή η παραγωγή μονοποικιλιακών οίνων που περιέχουν ικανό ποσοστό αιθανόλης.¹

Κοτσιφάλι

Το κοτσιφάλι είναι μια ιδιαίτερη ποικιλία που καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στην Κρήτη και ευδοκμεί σε αργιλώδη, ασβεστολιθικού χαρακτήρα εδάφη. Πρόκειται για μια ποικιλία καθαρά μεσογειακή που όταν χειριστεί κατάλληλα, δίνει οίνους ανώτερης ποιότητας που ωφελούνται ιδιαίτερα από την παλαίωση. Όπως αναφέρθηκε πριν, οι τυπικοί ερυθροί οίνοι των Αρχανών και των Πεζών παρασκευάζονται με ανάμιξη μανδηλαριάς με κοτσιφάλι. Η παρουσία της μανδηλαριάς μειώνει την οξύτητα, μετριάζει το αλκοολικό περιεχόμενο και αυξάνει το περιεχόμενο σε τανίνες. Επιπλέον κάνει το χρώμα βαθύτερο και σταθερότερο.¹⁻²



Αγιωργίτικο

Πρόκειται για την ελληνική ποικιλία με τις μεγαλύτερες δυνατότητες παραγωγής ποιοτικού οίνου. Καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή Νεμέα της Πελοποννήσου και είναι τόσο καλά προσαρμοσμένο στο περιβάλλον του, ώστε απέτυχαν παταγωδώς όλες οι προσπάθειες να μεταφτευθεί η καλλιέργεια και σε άλλες περιοχές.¹



Βάσει των ερευνών που έχει διεξάγει το Ελληνικό Ινστιτούτο Οίνου, είναι δυνατό –με βάση το υψόμετρο– να οριοθετηθούν τρεις ζώνες παραγωγής του αγιωργίτικου στην περιοχή της Νεμέας. Η πρώτη ζώνη είναι σε υψόμετρο 450-650 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας και παράγει τους πλέον φημισμένους οίνους, με πλούσιο σώμα και βαθύ χρώμα που δίνουν στο αγιωργίτικο το προσωνύμιο “αίμα του Ηρακλή” ή “αίμα του λιονταριού”. Η περιεκτικότητά τους σε αιθανόλη φτάνει συνήθως τους 13 βαθμούς και προσφέρονται για παλαίωση σε βαρέλι. Σε χαμηλότερο υψόμετρο, τα σταφύλια ωριμάζουν πολύ ταχύτερα δίνοντας οίνους με αλκοολικό δυναμικό 14-15 βαθμούς, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα. Έτσι έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή γλυκών οίνων.¹

Λιάτικο

Πρόκειται για ποικιλία η προέλευση της οποίας ανάγεται στους αρχαίους χρόνους. Οι αμπελογράφοι θεωρούν πως το λιάτικο είναι συγγενές με την κορινθιακή σταφυλή που χρησιμοποιούσαν από την αρχαιότητα για την παραγωγή της μαύρης σταφίδας. Καλλιεργείται στην ανατολική Κρήτη, στην περιοχή της Σητείας. Η ονομασία της είναι συντετμημένος τύπος του “ιουλιάτικου” που αναφέρεται στον Ιούλιο μήνα για να περιγράψει την πρωιμότητα της ποικιλίας.¹⁻²

Λημνιό

Η ποικιλία λημνιό θεωρείται παγκοσμίως ότι πρόκειται για την αρχαία ποικιλία Λημνία, η οποία αναφέρεται από τον Ισίδοδο.^{2,3} Η ονομασία του δηλώνει τον τόπο προέλευσης του, τη Λήμνο, στην οποία έχει την τοπική ονομασία “Καλαμπάκι”. Όμως η χρήση της στην σύγχρονη οινοποιεία της Λήμνου έχει περιοριστεί, λόγω της επικράτησης της καλλιέργειας στο νησί της ποικιλίας *Μοσχάτο Αλεξανδρείας*. Το λημνιό καλλιεργείται συστηματικά στην περιοχή Ραψάνη της Θεσσαλίας, όπου χρησιμοποιείται για την παραγωγή τοπικού οίνου, γνωστού με την ονομασία *λημνιώνα*.²

Μαυροδάφνη

Η μαυροδάφνη είναι πιθανότατα η πλέον γνωστή ερυθρή ελληνική ποικιλία στην Ευρώπη.² Παρόλο που η μαυροδάφνη αντλεί την καταγωγή της από τα Ιόνια νησιά, η καλλιέργεια της συναντάται σχεδόν αποκλειστικά στην Αχαΐα, όπου και παράγεται ένας από τους γνωστότερους ελληνικούς οίνους, η “Μαυροδάφνη Πατρών”. Πρόκειται για ένα γλυκό ερυθρό οίνο, περιεκτικότητας σε αλκοόλη περίπου 15% v/v.

Η μαυροδάφνη που καλλιεργείται στην Αχαΐα έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε σύγκριση με αυτή των Επτανήσων. Έτσι, για να παραχθεί η Μαυροδάφνη Πατρών, συνοινοποιείται η μαυροδάφνη Αχαΐας με την ποικιλία που παράγει την μαύρη κορινθιακή σταφίδα, η οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα Βέβαια, ο οίνος που δικαιούται να φέρει την ονομασία «ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑΣ» πρέπει να έχει παρασκευαστεί κατά τουλάχιστον 50% από την ποικιλία μαυροδάφνη.¹

4.2 Βιολογική δράση των σταφυλιών

4.2.1 Εισαγωγή

Τα σταφύλια (*V. Vinifera*) είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, ουσίες με αξιόλογη αντιοξειδωτική και βιολογική δράση, στην παρουσία των οποίων αποδίδονται κατά κύριο λόγο οι θετικές για την υγεία επιδράσεις του ερυθρού κυρίως οίνου. Η πλειοψηφία των φαινολικών αυτών παραγώγων εντοπίζεται στο φλοιό, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους των σταφυλιών. Ως εκ τούτου, τα σταφύλια αποτελούν σημαντική φυσική πηγή πρόσληψης –μέσω της διατροφής– των βιοδραστικών αυτών μορίων. Όμως και τα υποπροϊόντα της οινοποίησης (βόστρυχοι, γίγαρτα και στέμφυλα) μπορούν να αξιοποιηθούν για την παρασκευή εκχυλισμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες. Στη συνέχεια συνοψίζονται οι βιολογικές δράσεις που έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν τα σταφύλια και τα υποπροϊόντα της οινοποίησης.

4.2.2 Αντιαθηρωματική δράση

Ο χυμός των σταφυλιών, όπως και τα εκχυλίσματα των φλοιών και των γιγάρτων, έχει αναφερθεί ότι εμποδίζουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες. Σε πειράματα με ζώα, η χορήγηση χυμού από ερυθρά σταφύλια εμπόδισε σημαντικά την *ex vivo* διαδικασία σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και των θρομβώσεων στη στεφανιαία αρτηρία.^{4–6} Αντίστοιχο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και σε ανθρώπους με τη χορήγηση είτε 700 mL χυμού ερυθρών σταφυλιών ή 350 mL ερυθρού οίνου.^{7–8}

Συγκρίνοντας τη βιοδραστικότητα του χυμού των ερυθρών σταφυλιών, με αυτήν των χυμών πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ, οι Keenil και συνεργάτες⁹ ανακάλυψαν ότι μόνο η πρόσληψη χυμού σταφυλιών για διάστημα 7-10 ημερών, μειώνει αποτελεσματικά το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας στο αίμα υγιών ανθρώπων.

Αντίστοιχα, οι Shanmuganayagam και συνεργάτες⁵ μελέτησαν σε σκυλιά (*ex vivo*) και σε ανθρώπινο αίμα (*in vitro*) την επίδραση στην αθηρογένεση των εκχυλισμάτων από φλοιούς και γίγαρτα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ξεχωριστά τα εκχυλίσματα έδειξαν ελάχιστη ή μέτρια (σε μεγάλες συγκεντρώσεις) επίδραση. Ο

συνδυασμός τους όμως μείωσε δραματικά το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας σε ποσοστό έως 56%.

4.2.3 Αντιβακτηριακή δράση

Οι μελέτες για τον προσδιορισμό των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων από σταφύλια ή τα επιμέρους συστατικά τους είναι σχετικά περιορισμένες. Αναλυτικότερα, οι Jayarakashia και συνεργάτες,¹⁰ μελέτησαν την επίδραση μεθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων από γίγαρτα κατά των βακτηρίων: *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τα πειράματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ανέστειλαν εντελώς την ανάπτυξη των Gram (+) βακτηρίων σε συγκεντρώσεις 850–1000 ppm, ενώ για τα Gram(–) βακτήρια απαιτήθηκαν συγκεντρώσεις της τάξης των 1250–1500 ppm.

Αντίστοιχα, οι Baydar και συνεργάτες,¹¹ (2004) διερεύνησαν την αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων από γίγαρτα και στέμφυλα –που εκχυλίστηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και πριν– εναντίον ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών όπως: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. Amyloliquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. Το εκχύλισμα των γιγάρτων σε συγκέντρωση 20%, ανέστειλε την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων, εκτός από τον *B. Amyloliquefaciens*, ενώ το εκχύλισμα των στεμφύλων δεν επέδειξε καμία δράση.

Έρευνα των Thuille και συνεργάτες,¹² έδειξε ότι ένα εκχύλισμα γιγάρτων, σε συγκέντρωση 1 mg/mL, μπορεί να σκοτώσει σε διάστημα 30-90 min ποικίλα Gram (+) βακτήρια, όπως τα *Staphylococcus pyogenes*, *S. aureus*. Επίσης, ο χυμός των ερυθρών σταφυλιών και τα εκχυλίσματα των γιγάρτων, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.¹³ Γενικά, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα Gram(+) βακτήρια επιδεικνύουν μεγαλύτερη ευαισθησία, ενώ τα Gram(–) και οι μύκητες είναι περισσότερο ανθεκτικά. Έτσι, τα εκχυλίσματα των γιγάρτων, χάρη στις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, θα μπορούσαν από μόνα τους (ή σε συνδυασμό με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες) να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά τροφίμων.

Τέλος, ο χυμός των άγουρων σταφυλιών (περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ 2,8% και pH 2,5) έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella typhimurium* σε εμβολιασμένα λαχανικά.¹⁴

4.2.4 Αντικαρκινική δράση

Οι Agarwal και συνεργάτες,¹⁵⁻¹⁷ σε πειράματα με κυτταρικές καλλιέργειες και ποντίκια ανέφεραν ότι τα εκχυλίσματα των γιγάρτων παρεμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη, ενώ παράλληλα επιταχύνουν τη διαδικασία της απόπτωσης. Επίσης πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα για να προσδιοριστούν οι αντικαρκινικές ιδιότητες εκχυλισμάτων από σταφύλια και τσάι σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Στο πλαίσιο αυτό βρέθηκε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των φλοιών διαθέτει σημαντική αντικαρκινική δράση, ενώ ο συνδυασμός των εκχυλισμάτων από σταφύλι και τσάι διαθέτει μεγαλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα σε σύγκριση με κάθε ένα εκχύλισμα ξεχωριστά. Το εύρημα αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη της συνεργιστικής δράσης που διαθέτουν οι πολυφαινόλες του σταφυλιού και οι κατεχίνες του τσαγιού¹⁸. Άλλωστε έχει βρεθεί ότι ο στόχος των παραπάνω φυτοχημικών είναι η πρωτεΐνη t-NOX, η οποία ρυθμίζει την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης αυτής έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και την αδυναμία τους να διαιρεθούν, με αποτέλεσμα μετά από κάποιες ημέρες να υφίστανται τη φυσιολογική διαδικασία της απόπτωσης.

Οι Zhao και συνεργάτες,¹⁹ έδειξαν ότι το εκχύλισμα γιγάρτων μπορεί να αποτρέψει τη διαδικασία της ογκογένεσης στο δέρμα των μυών επί των οποίων είχε εφαρμοστεί ένα πρωτόκολλο επαγωγής καρκινογένεσης σε δύο στάδια. Η αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος βρέθηκε ότι ήταν ανάλογη της δόσης, αφού η χορήγηση 1,5 mg εκχυλίσματος είχε ως αποτέλεσμα την κατά 60% μείωση του ποσοστού ογκογένεσης και την κατά 87% μείωση του μεγέθους του όγκου. Από τη ξεχωριστή μελέτη εκάστου συστατικού του εκχυλίσματος προέκυψε ότι ο γαλλικός εστέρας της προκυανιδίνης B5-3 διαθέτει τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση.

Οι Sharma και συνεργάτες,²⁰ μελέτησαν την αντικαρκινική δράση ενός μίγματος που αποτελείτο από εκχύλισμα γιγάρτων και δοξορουμπικίνη, ένα μόριο που χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία για την καταπολέμηση του καρκίνου του

μαστού. Το μίγμα δοκιμάστηκε σε διάφορους συνδυασμούς συγκεντρώσεων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τύπου είτε MCF-7 που είναι θετικά στους υποδοχείς των οιστρογόνων ή/και MDA-MB468 που είναι αρνητικά στους υποδοχείς των οιστρογόνων. Η χορήγηση για 48 ώρες μίγματος 100μg/mL από εκχύλισμα γιγάρτων και 25–27 nM δοξορουμπικίνης ήταν η πλέον αποτελεσματική, δείχνοντας αφενός ένα ισχυρό συνεργιστικό αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου ένα πολύ σημαντικό προσθετικό αποτέλεσμα στις διαδικασίες που προκαλούσαν το θάνατο των κυττάρων.

Η δράση των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του DNA που οδηγεί σε μεταλλάξεις και αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της καρκινογένεσης. Η κατανάλωση –σε καθημερινή βάση– χυμών από σταφύλια έχει βρεθεί ότι μειώνει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και περιορίζει την καταστροφή του DNA στα περιφερειακά λεμφοκύτταρα.²¹

Τέλος, *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι εκχυλίσματα από στέμφυλα, λευκών και ερυθρών ποικιλιών, διαθέτουν χημειοπροστατευτικό ρόλο. Συγκεκριμένα, παρεμποδίζουν τη δράση των τοποϊσομεράση I και Μιτομυκίνης C, δυο παραγόντων που ευθύνονται για τη διάσπαση των αλυσίδων του DNA.²²

4.2.5 Αντική δράση

Οι Konowalchuk & Spreirs,^{23,24} έδειξαν ότι τα υδατικά εγχύματα από ολόκληρα σταφύλια, φλοιούς και γιγάρτα, διαθέτουν ιδιαίτερα αποτελεσματική δράση για την αναστολή διαφόρων εντερικών ιών, όπως των coxsackievirus, poliovirus και echovirus, καθώς και του ιού herpes simplex τόσο σε ουδέτερο, όσο και σε φυσιολογικό–όξινο pH. Επίσης, προσδιορίστηκε ότι οι εμπορικοί χυμοί σταφυλιών παρεμποδίζουν πλήρως τη μολυσματική δράση του ιού της πολιομυελίτιδας. Μια νεότερη έρευνα των Cohen & Lipson²⁵, έδειξε ότι ο χυμός των σταφυλιών είναι ικανός να αδρανοποιήσει πλήρως διάφορους βακτηριοφάγους και να αποτρέψει τη μόλυνση από τον ιό ρετροϊού *simian*. Τέλος, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το εκχύλισμα των γιγάρτων ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζοντας την παραγωγή των κυτοκινινών της Th-1.²⁶

4.2.6 Αντιοξειδωτική Δράση

Όμως οι περισσότερες βιολογικές μελέτες αφορούν τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων των γίγαρτων, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες διμερών και ολιγομερών προανθοκυανιδινών που διαθέτουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι Jayaprakasha και συνεργάτες,²⁷ συνέκριναν την *in vitro* αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων των γιγάρτων που είχαν προκύψει με χρήση διαφόρων διαλυτών όπως ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα, μεθανόλη, νερό και μιγμάτων τους. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας έγινε με τη μέθοδο του λινολεϊκού οξέος / β-καροτενίου, σε συγκεντρώσεις της τάξης των 100 ppm. Πολλά από τα εκχυλίσματα έδειξαν αναστολή 65 έως 90% στην οξείδωση του λινολεϊκού οξέος, την υψηλότερη όμως δράση έδειξε ότι διαθέτει το εκχύλισμα με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-νερού (17:3). Μια άλλη ερευνητική προσπάθεια των Jayaprakasha και συνεργατών¹⁰, είχε ως αντικείμενο τη σύγκριση της *in vitro* αντιοξειδωτικής δράσης δύο εκχυλισμάτων γίγαρτων, τα οποία είχαν προκύψει από τη χρήση μιγμάτων ακετόνης, νερού, οξικού οξέος (90:9,5:0,5) και μεθανόλης, νερού, οξικού οξέος (90:9,5:0,5) αντίστοιχα. Στο πείραμα αυτό, η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH, η οποία προσδιορίζει τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας ως συνέπεια μεταβολής της απορρόφησης στα 517 nm. Το ακετονικό εκχύλισμα παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, αφού σε συγκέντρωση 50 ppm επέδειξε ποσοστό εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας περίπου 85%. Στο μεθανολικό η αντίστοιχη αναστολή ήταν περίπου 75%. Η παρατήρηση αυτή ήταν σε συμφωνία και με την ποσοτική ανάλυση του περιεχομένου τους που έδειξε ότι το ακετονικό εκχύλισμα είχε πλουσιότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό διαθέτουν και τα στέμφυλα που προκύπτουν ως υποπροϊόντα της οινοποίησης και της παραγωγής χυμού σταφυλιού. Οι Ruberto και συνεργάτες,²⁶ μελέτησαν την *in vitro* ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών από μεθανολικά εκχυλίσματα από στέμφυλα διαφόρων ποικιλιών με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Όλα τα εκχυλίσματα έδειξαν ότι διαθέτουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, η οποία ήταν σε άμεση συνάρτηση με το υψηλό πολυφαινολικό του περιεχόμενο. Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και η έρευνα των Yilmaz και Toledo²⁸ σε εκχυλίσματα στεμφύλων χρησιμοποιώντας ποικιλία διαλυτών και τη μέθοδο ORAC_{PE} (Oxygen Radical Absorbance Capacity) για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν τα

εκχυλίσματα μεθανόλης–νερού και ακετόνης–νερού, τα οποία είναι χαρακτηριστικό ότι διέθεταν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών.

Συντήρηση τροφίμων

Το 2006 ο Shaker³⁰ μελέτησε τις αντιοξειδωτικές ικανότητες των αιθανολικών εκχυλισμάτων από γίγαρτα και φλοιούς σταφυλιών, σε σχέση με την ικανότητα τους να αναστέλλουν την πρωτογενή και δευτερογενή οξείδωση των λιπαρών οξέων ηλιελαίου και συζευγμένου ηλιελαίου. Η παρακολούθηση της οξείδωσης πραγματοποιήθηκε απουσία φωτός στους 60 °C για χρονικό διάστημα 7 ημερών και με εφαρμογή τριών μεθόδων: α) μέτρηση των συζευγμένων διενίων (CD), για την παρακολούθηση της πρωτογενούς οξείδωσης β) SHGC (Static headspace gas chromatography) και γ) PYR-MS (proton transfer reaction-mass spectrometry) για την παρακολούθηση της παραγωγής των προϊόντων της δευτερογενούς οξείδωσης (προπανάλη, εξανάλη, οκτανάλη και 1-πεντεν-3-όνη). Προκειμένου να συγκριθεί απευθείας η δράση τους, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 200 ppm σε ισοδύναμο ολικό φαινολικό περιεχόμενο από κάθε εκχύλισμα. Το εκχύλισμα του φλοιού ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αναστολή της δευτερογενούς οξείδωσης του συζευγμένου ηλιελαίου κατά ποσοστό 41%, ενώ κανένα από τα εκχυλίσματα δεν έδειξε δράση στη φάση του σχηματισμού των συζευγμένων διενίων (πρωτογενής οξείδωση). Αντίθετα, στο ηλιέλαιο και τα δύο εκχυλίσματα εμφάνισαν προοξειδωτική δράση κατά τη δευτερογενή φάση της οξείδωσης.

Οι Razos και συνεργάτες,³¹ απομόνωσαν κλάσματα φαινολικών ουσιών από αιθανολικό εκχύλισμα στεμφύλων και διερεύνησαν την ικανότητά τους να προλαμβάνουν την παραγωγή δυσάρεστων οσμών (που οφείλονται στην οξείδωση των λιπαρών οξέων) σε κατεψυγμένα ψάρια,. Επίσης δοκίμασαν τη δράση τους σε ιχθυέλαιο και γαλακτώματα ιχθυελαίου–νερού. Το κλάσμα με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν αυτό που περιείχε ολιγομερείς φλαβανόλες (προκυανιδίνες), οι οποίες φαίνεται ότι διαθέτουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τις μονομερείς.

Η χρήση των εκχυλισμάτων από γίγαρτα διερευνήθηκε και στη συντήρηση διαφόρων τύπων κρέατος, ιδιαίτερα λευκού κρέατος όπως των πουλερικών το οποίο είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά.³² Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση ενός εμπορικού εκχυλίσματος γιγάρτων σε κρέας γαλοπούλας

με τη μέτρηση του ποσοστού των δραστικών συστατικών του θειοβαρβιτουρικού (TBARS, Thiobarbituric Reactive Substances) και του σχηματισμού πτητικών ενώσεων που προέρχονται από την οξείδωση των λιπών, όπως εξανάλη, πεντανάλη, οκτανάλη, 1-οκτεν-3-όλη, 2-οκτεν-1-όλη κ.τ.λ. Είναι χαρακτηριστικό ότι η προσθήκη του εκχυλίσματος πριν από τη διαδικασία του μαγειρέματος ενίσχυσε σημαντικά τη σταθερότητα των ακόρεστων λιπαρών οξέων του κρέατος, τόσο κατά τη θέρμανση όσο και κατά την αποθήκευσή του σε συσκευασία κενού. Σε ένα άλλο πείραμα, η προσθήκη σε κρέας γαλοπούλας εκχυλίσματος γιγάρτων σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,2%, μείωσε κατά 10 φορές το ποσοστό των TBARS σε σχέση με το μάρτυρα.³³ Τέλος, οι Ahn και συνεργάτες,³⁴ διαπίστωσαν ότι η προσθήκη εκχυλίσματος γιγάρτων σε μαγειρεμένο κρέας βοδινού μείωσε σημαντικά την παραγωγή TBARS και εξανάλης, ενώ βελτίωσε τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Μελέτες in vivo

Οι Kotamballi και συνεργάτες,³⁵ συνέκριναν τις αλλαγές που επάγει στο οξειδωτικό δυναμικό του οργανισμού η χορήγηση CCl₄ σε μύες που διατρέφονται με κανονικό σιτηρέσιο, σε σύγκριση με άλλους στων οποίων η διατροφή έχει εμπλουτιστεί με μεθανολικό εκχύλισμα στεμφύλων. Έτσι, η χορήγηση μίας μόνο δόσης CCl₄ (1,25 mL/kg σωματικού βάρους) προκάλεσε δραματική μείωση της λειτουργίας της καταλάσης, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) και της υπεροξειδάσης, ενώ σχεδόν τριπλασιάστηκε το ποσοστό των οξειδωμένων λιπών. Αντίθετα, η προσθήκη εκχυλίσματος γιγάρτων στο σιτηρέσιο είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της λειτουργίας της καταλάσης, της υπεροξειδάσης και της SOD σε ποσοστό 44%, 73% και 54% αντίστοιχα, ενώ η οξειδωτική κατάσταση των λιπιδίων παρέμεινε σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των μαρτύρων.

Τα εκχυλίσματα γιγάρτων διαθέτουν και πιθανή νευροπροστατευτική δράση. Η *in vivo* χορήγησή τους σε μύες είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της καταστροφής του DNA που προκαλεί –λόγω γήρανσης– η συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου.³⁶

Σε ένα διαφορετικό πείραμα, οι Nuttall και συνεργάτες,³⁷ μελέτησαν την επίδραση που προκαλεί σε νέους εθελοντές η χορήγηση, με τη μορφή κάψουλας, ενός εμπορικού εκχυλίσματος σταφυλιών πλούσιου σε πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα προσδιόρισαν την επίδραση στο αντιοξειδωτικό δυναμικό και τα επίπεδα των

βιταμινών C και E του ορού του αίματος. Έτσι, η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα των βιταμινών ενώ αύξησε σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού μετά από 5 ημέρες λήψης. Το ίδιο προϊόν χορηγήθηκε σε καπνιστές για διάστημα 4 εβδομάδων προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του στην οξείδωση της LDL. Οι μισοί εθελοντές λάμβαναν το εκχύλισμα ενώ οι υπόλοιποι όχι (placebo). Οι εθελοντές που έλαβαν το σκεύασμα εμφάνισαν σημαντικά μειωμένα ποσοστά των δραστικών συστατικών του θειοβαρβιτουρικού (TBARS), ενώ επιμηκύνθηκε η διάρκεια παραγωγής των συζευγμένων διενίων. Τέλος, δεν αναφέρθηκε καμία παρενέργεια.

4.3 Διαδικασία Παραλαβής Πολυφαινολών από Φυτά

4.3.1 Εισαγωγή

Τα φαινολικά παράγωγα κατανέμονται, ανάλογα με τη δομή τους, στους διάφορους ιστούς των φυτών. Έτσι, οι διαλυτές πολυφαινόλες χαμηλού μοριακού βάρους βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων. Αντίστοιχα, τα αδιάλυτα φαινολικά παράγωγα, όπως οι πολυμερείς λιγνίνες, αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων συμβάλλοντας στη σταθερότητα και τη μορφολογία των φυτών, καθώς και την απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στρες.³⁸ Τα φαινολικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό και το φερουλικό, συνήθως βρίσκονται υπό τη μορφή μη υδατοδιαλυτών εστέρων, όπως πηκτίνες και αραβινοξυλάνες, ή παρεμβάλλονται ως ενδιάμεσα μόρια στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων με τη μορφή διμερών όπως το δεϋδροφερουλικό και το τρουξιλικό οξύ.

Η διαδικασία της εκχύλισης αποσκοπεί στην απελευθέρωση των φαινολικών παραγώγων από τα κύτταρα και τους ιστούς στους οποίους βρίσκονται, με σκοπό τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Η διαδικασία που ακολουθείται συνήθως περιλαμβάνει τη ρήξη των κυτταρικών ιστών και τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, με τη χρήση ενός ομογενοποιητή. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εμβάπτιση σε κατάλληλο διαλύτη, με σκοπό την παραλαβή των φαινολικών παραγώγων μέσω διάχυσης.³⁹

Η παραλαβή των πολυφαινολών από το φυτικό υλικό επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων, όπως η χημική σύσταση, η εφαρμοζόμενη διαδικασία εκχύλισης, οι συνθήκες και ο χρόνος αποθήκευσης, το μέγεθος των σωματιδίων και η παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών. Συνήθως τα εκχυλίσματα αποτελούνται από μίγματα ποικίλων πολυφαινολών που είναι διαλυτές στο σύστημα διαλυτών, όμως περιέχουν και μόρια που είναι ανεπιθύμητα, όπως λίπη, κηροί, τερπένια, και χλωροφύλλες. Για να απομακρυνθούν τα τελευταία απαιτούνται συχνά επιπλέον διαδικασίες, όπως η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) ή η κλασματοποίηση με βάση την πολικότητα των ουσιών.⁴⁰

Η διαλυτότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται, το βαθμό πολυμερισμού τους καθώς και η αλληλεπίδραση τους με άλλες ουσίες όπως πρωτεΐνες προς σχηματισμό αδιάλυτων προϊόντων. Για τους παραπάνω λόγους δεν υπάρχει μια ενιαία διαδικασία για την παραλαβή από ένα

φυτικό δείγμα όλων των φαινολικών παραγώγων ή μιας μόνο κατηγορίας φαινολών³⁸. Οι πλέον συνηθισμένες τεχνικές που εφαρμόζονται για την παραλαβή των φαινολικών παραγώγων από τα φυτά αναφέρονται στην εκχύλιση με τη χρήση: α) διαλυτών, και β) υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluid Extraction, SFE).

4.3.2 Εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για να εκχυλιστούν οι πολυφαινόλες είναι η μεθανόλη και η τα μίγματα μεθανόλης-νερού. Ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται και άλλοι διαλύτες όπως αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας ή και μίγματά τους, με μικρότερες όμως αποδόσεις.

Οι συνηθέστεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης των πολυφαινολών είναι:

- Το pH του εκχυλιστικού μέσου, το οποίο επιδρά στη διαλυτότητα των ευδιάλυτων συστατικών και επηρεάζει τη διαλυτοποίηση των υδρολυόμενων φαινολικών παραγώγων. Η εκχύλιση σε όξινες συνθήκες αποσκοπεί στην υδρόλυση των γλυκοζιτών των φαινολών, ενώ η εκχύλιση σε αλκαλικό περιβάλλον αποσκοπεί στην υδρόλυση των εστέρων των φαινολών και την παράλληλη απελευθέρωση των πολυφαινολών που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα.⁴¹
- Η θερμοκρασία. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες εξασφαλίζει καλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά παράγωγα. Όμως επειδή οι πολυφαινόλες είναι θερμοευαίσθητα μόρια που διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως η θερμοκρασία της εκχύλισης δεν πρέπει να ξεπερνά τους 25 °C.
- Ο αριθμός των διαδοχικών εκχυλίσεων και ο όγκος του διαλύτη. Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνει με τον αριθμό των διαδοχικών εκχυλίσεων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι για συγκεκριμένο όγκο διαλύτη είναι προτιμότερη η πραγματοποίηση πολλαπλών εκχυλίσεων χρησιμοποιώντας μικρότερους όγκους σε σύγκριση με μία μόνο εκχύλιση που χρησιμοποιεί το σύνολο του διαλύτη. Γενικά, η ποσοτική παραλαβή των φαινολικών παραγώγων απαιτεί 3–5 διαδοχικές εκχυλίσεις.

Για δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό –όπως τα σταφύλια– συνιστάται η κατάψυξη τους πριν από τη διαδικασία της εκχύλισης, προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι ενζυμικές λειτουργίες και να προστατευθούν οι ασταθείς πολυφαινόλες. Επιπλέον, η εκχύλιση των πολυφαινολών διευκολύνεται όταν έχει προηγηθεί κατάψυξη των δειγμάτων, καθώς οι κρύσταλλοι του νερού που σχηματίζονται καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα ευνοώντας την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου υλικού. Τέλος, μια άλλη πρακτική που ακολουθείται είναι η λιοφυλίωση των δειγμάτων, η οποία πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και αφήνει ανέπαφες τις πολυφαινόλες, επιτρέποντας τη διατήρηση των δειγμάτων για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

4.3.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους

Η εκχύλιση των πολυφαινολών με τη χρήση διαλυτών, συχνά υποβοηθείται με τη χρήση υπερήχων, η οποία εξασφαλίζει μεγαλύτερες αποδόσεις. Η διαδικασία αυτή είναι ταχύτερη και αποδοτικότερη σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές, οι οποίες στηρίζονται στην απλή διάχυση των συστατικών, αφού η επιφάνεια επαφής μεταξύ της υγρής και της στερεής φάσης αυξάνει σημαντικά λόγω της διάσπασης των σωματιδίων που συνεπάγεται η χρήση τους^{42,43} Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης των υπερήχων αφορά στη μείωση του συνολικού χρόνου της εκχύλισης, η οποία μπορεί να ολοκληρωθεί ακόμη και εντός 30min.⁴¹ Επίσης η χρήση των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη καλύτερων αποδόσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες, σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, γεγονός πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της σταθερότητας των πολυφαινολών.⁴⁴

4.3.3 Τεχνικές διαχωρισμού και απομόνωσης πολυφαινολών

4.3.3.1 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)

Πρόκειται για μια ταχεία μέθοδο, σε σχέση με την εκχύλιση με διαλύτες, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολυφαινολών από υγρά δείγματα ή συμπληρωματικά στην εκχύλιση δειγμάτων με τη χρήση διαλυτών, με σκοπό το διαχωρισμό των πολυφαινολών με βάση την οξύτητά τους.

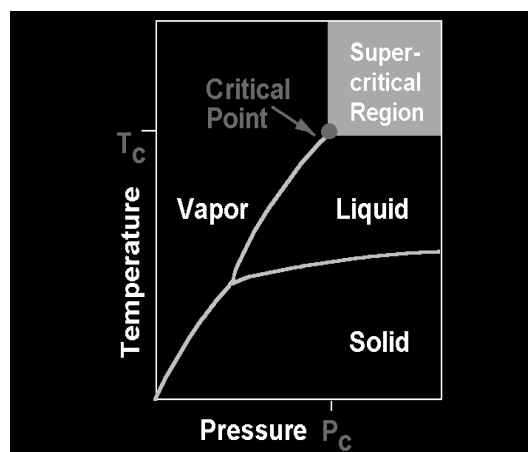
Η εκχύλιση στερεάς φάσης με τη χρήση στηλών αντιστρόφου φάσης με υλικό πλήρωσης το C_{18} έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την επιλεκτική εκχύλιση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών από δείγματα οίνων και σταφυλιών.⁴⁵⁻⁴⁶

4.3.3.2 Εκχύλιση υγρής-στερεάς φάσης

Τα εκχυλίσματα πολυφαινολών που έχουν προκύψει μετά την εκχύλιση με διαλύτες είναι δυνατόν να καθαριστούν περαιτέρω με τη χρήση ιονανταλλακτικών ρητινών.³⁸

4.3.4 Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμων υγρών (SFE)

Παρότι η συγκεκριμένη τεχνική αυτή αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1960, εφαρμόστηκε πρόσφατα για την εκχύλιση φαινολικών παραγώγων³⁷. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρησιμοποίηση των υγρών και αερίων ιδιοτήτων του εκχυλιστικού. Συγκεκριμένα, κάθε καθαρό μόριο είναι δυνατόν να μετατραπεί σε υπερκρίσιμο υγρό, όταν οι τιμές της πίεσης και της θερμοκρασίας ξεπεράσουν το κρίσιμο σημείο, δηλαδή τη μέγιστη τιμή πίεσης και θερμοκρασίας στην οποία το



Σχήμα 4.1 Καμπύλη πίεσης θερμοκρασίας ενός μορίου.⁴⁷

μόριο υπάρχει σε ισορροπία υγρής και αέριας μορφής. Πέρα από τις συνθήκες αυτές, το μόριο βρίσκεται σε μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ υγρού και αερίου και χαρακτηρίζεται ως υπερκρίσιμο υγρό (Σχήμα 4.1). Σε θερμοκρασίες πέραν του κρίσιμου σημείου, το μόριο δε μπορεί πλέον να μεταβεί σε υγρή κατάσταση, όσο μεγάλη πίεση και αν εφαρμοστεί. Τα υπερκρίσιμα υγρά διατηρούν τις εκχυλιστικές ιδιότητες των υγρών διαλυτών και τις ικανότητες μεταφοράς μάζας των αερίων, γεγονός που τα καθιστά άριστα εκχυλιστικά μέσα.

Το χαμηλό ιξώδες των υπερκρίσιμων υγρών ενισχύει την ικανότητα διάχυσής τους, διευκολύνοντας την απελευθέρωση των φαινολικών παραγώγων που

βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα. Επιπλέον, η σχετικά μεγάλη τους πυκνότητα ενισχύει την εκχυλιστική τους “δύναμη”, καθιστώντας την εκχύλιση γρήγορη και αποδοτική. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου αναφέρεται στην ελαχιστοποίηση των αντιδράσεων οξείδωσης και ισομερισμού των πολυφαινόλων, που λαμβάνουν χώρα κατά την εφαρμογή των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης.

Ο πλέον κοινός διαλύτης εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά είναι το CO₂, το οποίο παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα, όπως χημική αδράνεια, χαμηλή τοξικότητα και μειωμένα προβλήματα υπόλειμματικότητας και ρύπανσης. Όμως επειδή όμως το CO₂ είναι άπολος διαλύτης, η εφαρμογή τους θα πρέπει να συνδυαστεί με ένα πολικότερο διαλύτη (πχ μεθανόλη), προκειμένου να καταστεί δυνατή η εκχύλιση σχετικά πολικών μορίων όπως είναι οι πολυφαινόλες.

4.4 Πειραματική Διαδικασία

4.4.1 Συλλογή Δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων των σταφυλιών πραγματοποιήθηκε κατά τις οινοποιητικές περιόδους 2003-2005 –με τη συνεργασία της ΚΕΟΣΟΕ και των τοπικών οινοποιητικών συνεταιρισμών στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 227 (2001) – λαμβάνοντας δείγματα από διάφορα στάδια ωρίμανσης.

Οι περιοχές από τις οποίες παρελήφθησαν τα δείγματα και οι αντίστοιχες ποικιλίες των σταφυλιών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 4.1:

Πίνακας 4.1

Περιοχή	Συνεταιρισμός-Εταιρεία	Ποικιλίες
Σαντορίνη	Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων SantoWines	Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο, Βοηδόματο, Αθήρι, Ασύρτικο, Αηδάνι
Ρόδος	Καΐρ-Ρόδος Α.Ε.	Μανδηλαριά, Ασύρτικο
Κρήτη	Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Πεζών Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Σητείας	Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι Λιάτικο, Βηλάνα
Πελοπόννησος (Νεμέα)	Κτήμα Σπυρόπουλου	Αγιωργίτικο, Μοσχοφίλερο
Θεσσαλία (Τύρναβος)	Συνεταιρισμός αγροτικών προϊόντων Τυρνάβου	Μοσχάτο Αμβούργου, Ροδίτης
Αττική (Βοτανικός)	Αμπελώνας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών	Μαυροδάφνη, Λημιό, Λημιώνα, Ρωμέικο, Αγιαννιώτικο, Γουστολίδι, Ξινόμαυρο, Βερτζαμί, Ροδίτης, Γουστολίδι, Φιλέρι
Χίος	Συνεταιρισμός αγροτικών προϊόντων Χίου	Μανδηλαριά, Μπεγλέρι

4.4.1.1 Συνθήκες φύλαξης και εκχύλισης δειγμάτων

Η φύλαξη των δειγμάτων έγινε σε θερμοκρασία $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, απουσία φωτός μέχρι την ανάλυση τους. Σε κάθε δείγμα ράγας προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε σάκχαρα (σε μονάδες $^{\circ}\text{Brix}$, κλίμακα $^{\circ}\text{Brix}$ 0,0-32,0 %). Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ραγών σε σάκχαρα χρησιμεύει για να προσδιοριστεί το στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών.

Πριν από την εκχύλισή τους, οι ράγες αποκολλήθηκαν μηχανικά και αφού καταγράφηκε ο αριθμός τους, χωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη που ζυγίστηκαν επακριβώς. Το πρώτο μέρος (περίπου 250g) λυοφιλοποιήθηκε παράγοντας ένα

κολλώδες στερεό υπόλειμμα που ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί το βάρος επί ξηρού. Το δεύτερο μέρος διαχωρίστηκε σε φλοιούς και γίγαρτα. Τα γίγαρτα ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και ξηράθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα. Στη συνέχεια, αφού καταμετρήθηκε ο αριθμός τους ζυγίστηκαν και κονιοποιήθηκαν. Οι φλοιοί ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και λυοφιλοποιήθηκαν. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν για να προσδιοριστεί το βάρος τους επί ξηρού.

Αναλώσιμα-Συσκευές:

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις των δειγμάτων ήταν βαθμού αναλυτικής καθαρότητας και η προμήθειά τους έγινε από την εταιρεία J. T. Baker. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων και την παρασκευή της κινητής φάσης ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC της εταιρείας J. T. Baker. Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο ύδωρ, ενώ στη χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιήθηκε δισαπεσταγμένο ύδωρ που παρήχθη με τη χρήση συσκευής Milli-Q Plus. Το ψηφιακή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του pH των δειγμάτων ήταν της εταιρείας Metrohm μοντέλο 654pH-Meter. Η περιεκτικότητα των σταφυλιών σε σάκχαρα προσδιορίστηκε με τη χρήση διαθλασιμέτρου χειρός (ATAGO N-1α) σε μονάδες °Brix (κλίμακα °Brix 0,0-32,0 %), προσαρμοσμένες σε θερμοκρασία 20 °C.

4.4.2 Εκχύλιση ραγών:

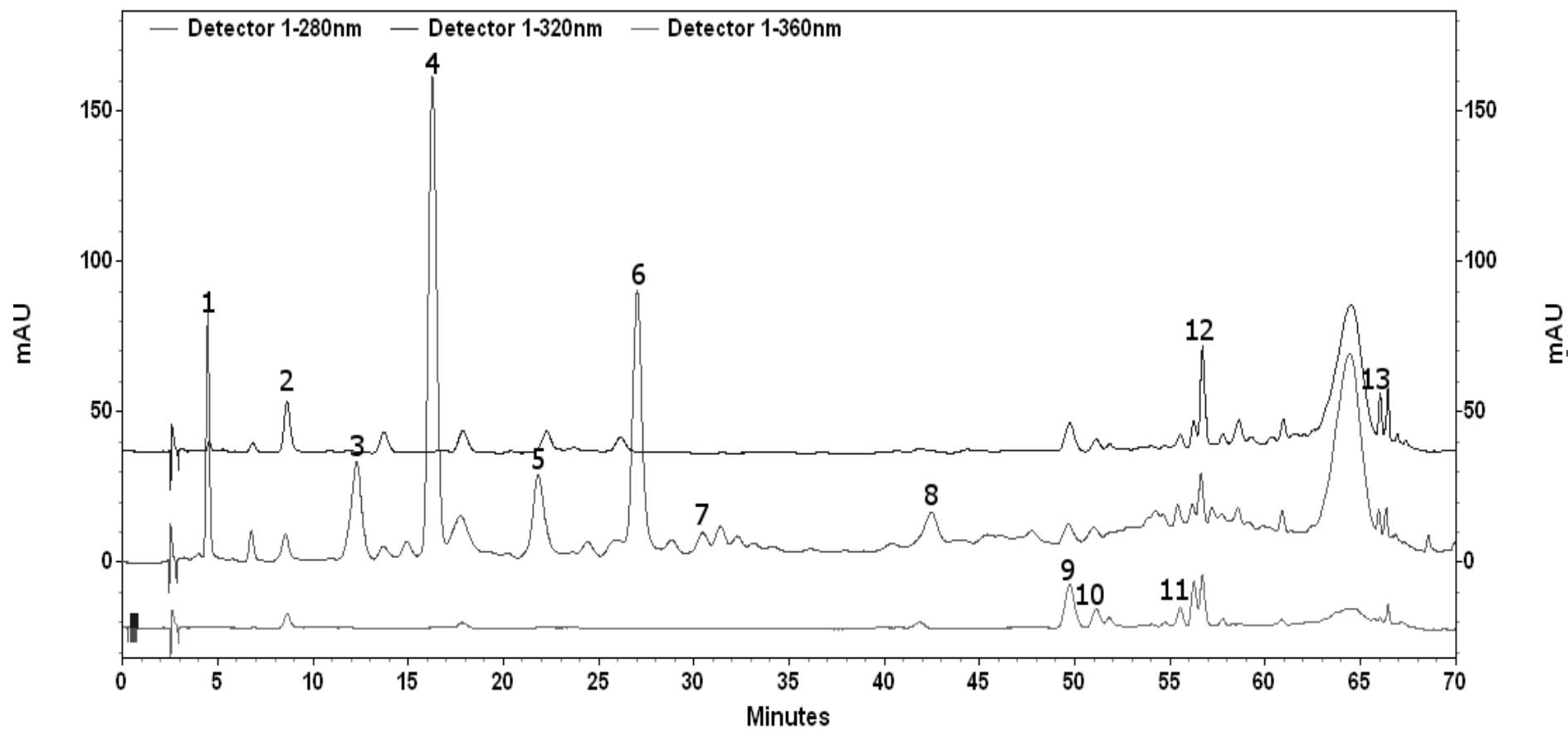
Το στερεό υπόλειμμα μετά τη λυοφυλίσιοποίηση επαναζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε για να κονιοποιηθούν τα περιεχόμενα γίγαρτα. Στη συνέχεια, εκχυλίστηκε με μίγμα MeOH-H₂O-HCl 0,1N (90:9,5:0,5), σε λουτρό υπερήχων με μέριμνα να μην υπερβεί η θερμοκρασία τους 25 °C. Έκαστο δείγμα εκχυλίστηκε τέσσερις φορές χρησιμοποιώντας 100 mL διαλύτη κάθε φορά. Εκάστη εκχύλισης διήρκεσε 30min και μετά ακολούθησε διήθηση από ηθμό Wattman. Τα εκχυλίσματα αφού ενώθηκαν, στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C δίνοντας ένα υπόλειμμα που επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και φυγοκεντρήθηκε με σκοπό να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με πετρελαϊκό αιθέρα –για την απομάκρυνση των λιπών και των χλωροφυλλών– και τέλος η μεθανόλη απομακρύνθηκε ξανά με εξάτμιση υπό κενό (κάτω των 35°C), δίνοντας ένα

κολλώδες στερεό. Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε με τη βοήθεια υπερήχων σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και εκχυλίστηκε τέσσερις φορές διαδοχικά με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανική φάσες ενώθηκαν, ξηράθηκαν με προσθήκη Na₂SO₄ (για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της υγρασίας) και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα αφού ζυγίστηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ μg/mL. Τέλος, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF με διάμετρο πόρων 0.45 μm για να είναι πλέον κατάλληλο να εγχυθεί στη συσκευή HPLC.

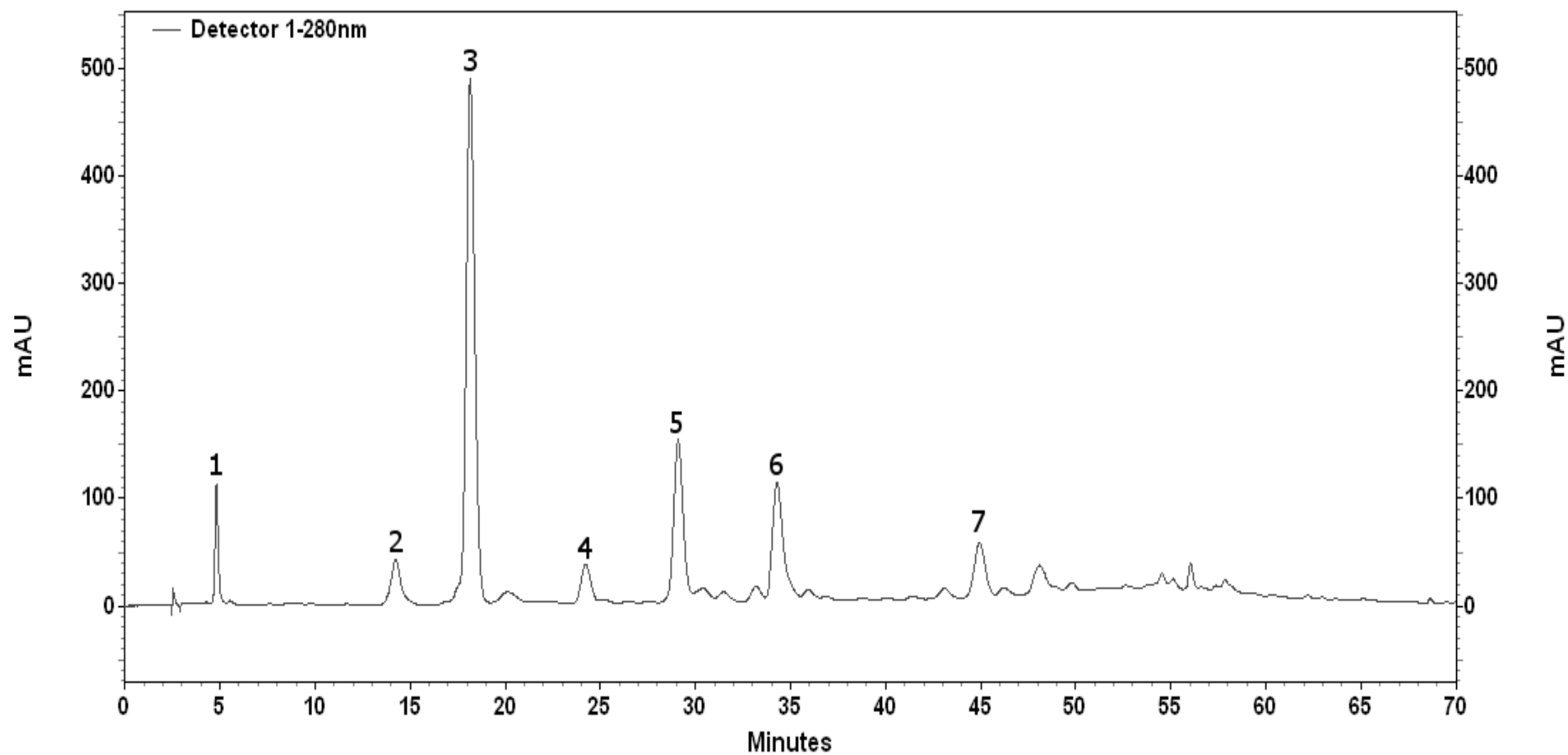
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών παραγώγων έγινε με σύγκριση με πρότυπη καμπύλη αναφοράς η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνθετο μίγμα προτύπων μορίων διαλυμένων σε μεθανόλη. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων εκφράστηκαν σε mg/g εκχυλίσματος και σε mg/Kg φρέσκων ραγών και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β. Στην Εικόνα 4.1, παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ραγών.

4.4.3 Εκχύλιση γιγάρτων-φλοιών

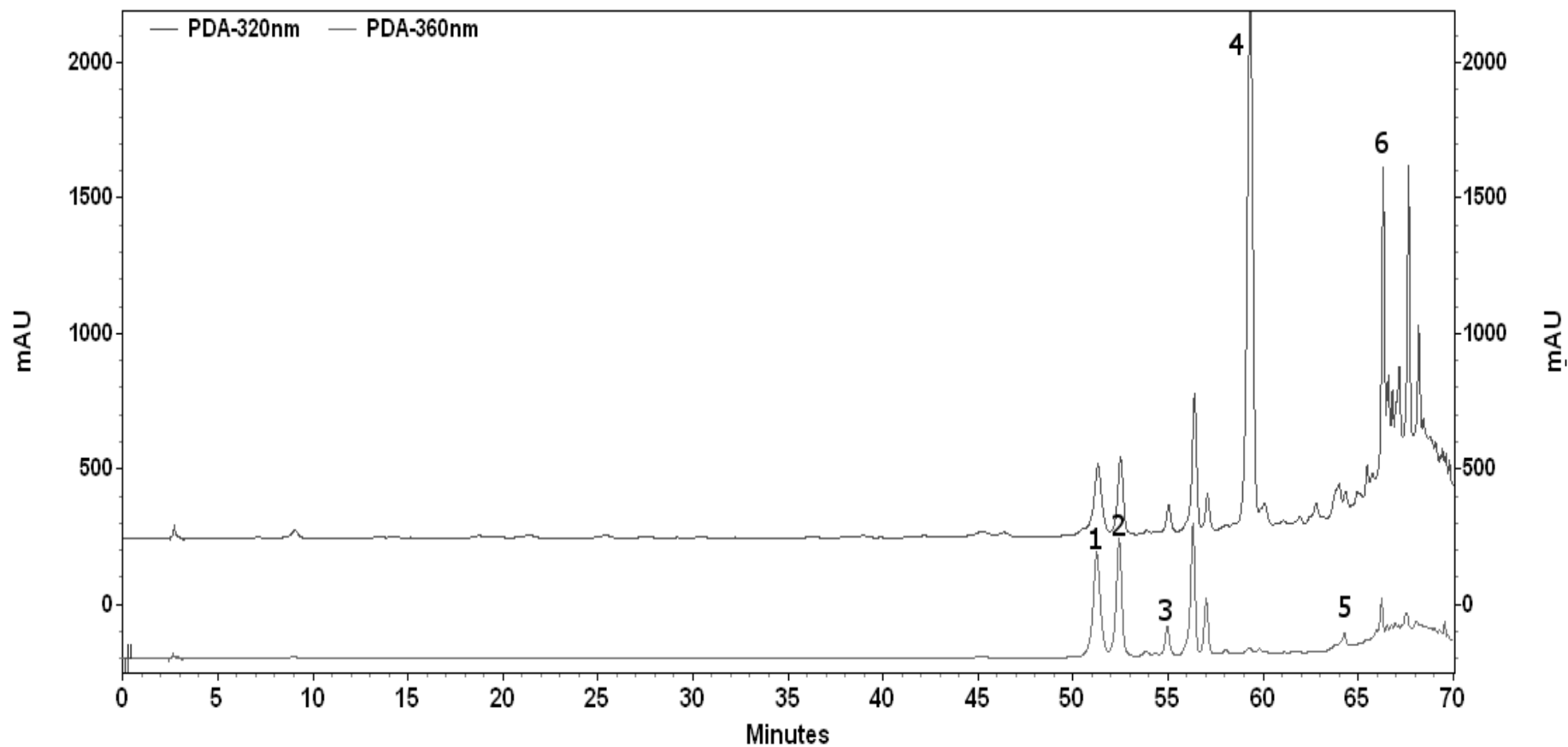
Η εκχύλιση των φλοιών και των γιγάρτων, πραγματοποιήθηκε με μέθοδο παραπλήσια αυτής που περιγράφηκε για την εκχύλιση των ραγών. Μετά το τέλος της εκχύλισης, τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10^3 μg/mL για τα γίγαρτα και 10^4 μg/mL για τους φλοιούς. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων σε HPLC, εκφράστηκαν σε mg/g εκχυλίσματος για τους φλοιούς και σε mg/100g για τα γίγαρτα και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β. Στις Εικόνες 4.2—4.3, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων των φλοιών και των γιγάρτων



Εικόνα 4.1 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ραγών: **1.** γαλλικό οξύ, **2.** *trans*-καφταρικό οξύ, **3.** προκυανιδίνη B1, **4.** (+)-κατεχίνη, **5.** προκυανιδίνη B2, **6.** (-)-επικατεχίνη, **7** προκυανιδίνη B3, **8.** γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, **9.** 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, **10.** 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης, **11.** 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης, **12.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **13.** ε-βινιφερίνη



Εικόνα 4.2 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος γιγάρτων: **1.** γαλλικό οξύ, **2.** προκυανιδίνη B1, **3.** (+)κατεχίνη, **4.** προκυανιδίνη B2, **5.** (-)επικατεχίνη, **6.** προκυανιδίνη B3, **7.** γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης



Εικόνα 4.3 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος φλοιού . **1.** 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, **2.** 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης, **3.** 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης, **4.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **5.** κερκετίνη, **6.** ε-βινιφερίνη.

4.4.4 Αξιολόγηση της μεθόδου (έλεγχος ανάκτησης των πολυφαινολών)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια της μεθόδου και να ελεγχθεί ο βαθμός ανάκτησης των βασικών πολυφαινολών που μελετήθηκαν κατά την προηγούμενη μέθοδο εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα σταφυλιών που αφού αποψύχθηκε και διαχωρίστηκαν οι ράγες, χωρίστηκε σε τρία ίσα μέρη βάρους 200g έκαστο. Το πρώτο μέρος αναλύθηκε με τη μέθοδο που ήδη περιγράφηκε και πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι πολυφαινόλες. Στο δεύτερο τμήμα προστέθηκε ποσότητα μίγματος πρότυπων ουσιών (γαλλικού οξέος, (+)-κατεχίνης, (-)-επικατεχίνης, *trans*-ρεσβερατρόλης, κερκετίνη), διαλυτοποιημένες σε μικρή ποσότητα μεθανόλης, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι διπλάσια αυτής που προσδιορίστηκε για το αρχικό δείγμα. Τέλος, στο τρίτο τμήμα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα προτύπων έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή να είναι τριπλάσια αυτής του αρχικού. Τα εμβολιασμένα αυτά δείγματα εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν ποσοτικά χρησιμοποιώντας την ίδια βασική μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για το πρώτο τμήμα. Έτσι, η **% ανάκτηση** προσδιορίστηκε από τη Σχέση

$$\% \text{Ανάκτηση} = \frac{\text{πειραματική συγκέντρωση}}{\text{θεωρητική συγκέντρωση}} \cdot 100 \quad \text{Σχέση. 4.1}$$

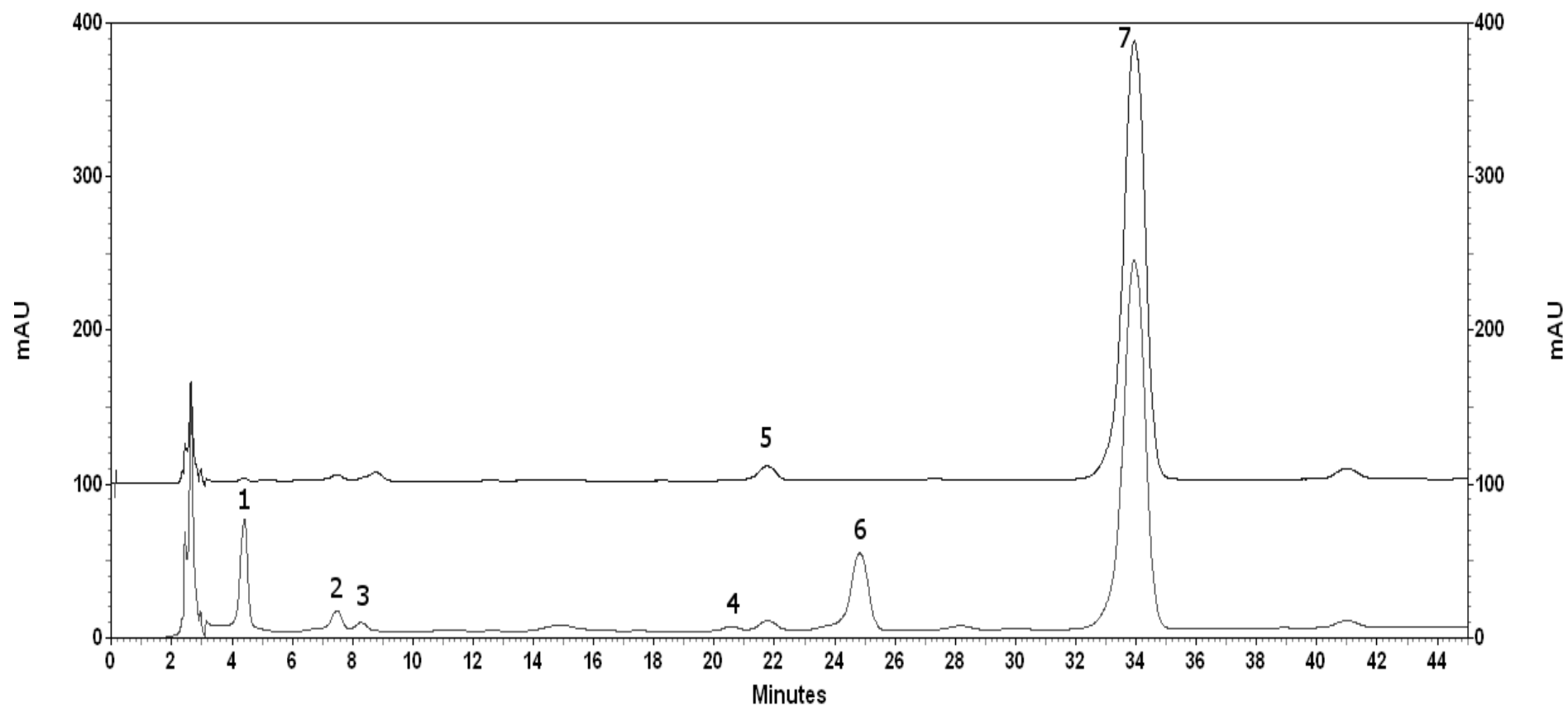
Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι θεωρητικά αναμενόμενες συγκεντρώσεις και οι πειραματικές συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν. Στην Τρίτη στήλη εμφανίζεται η % ανάκτηση των υπό μελέτη μορίων.

Πίνακας 4.2 Αξιολόγηση Μεθόδου Εκχύλισης

Πρότυπη Ουσία	Θεωρητική Συγκέντρωση mg/L	Πειραματική Συγκέντρωση mg/L	% Ανάκτηση
Εμβολιασμός 1 ^{ου} δείγματος			
(+)κατεχίνη	4,27	4,62	108,2
(-)επικατεχίνη	99,34	100,45	101,1
Κερκετίνη	0,52	0,55	105,7
trans-ρεσβερατρόλη	0,21	0,25	119,0
Εμβολιασμός 2 ^{ου} δείγματος			
(+)-κατεχίνη	8,54	9,02	105,6
(-)-επικατεχίνη	198,68	185,29	93,26
Κερκετίνη	1,04	1,20	115,4
trans-ρεσβερατρόλη	0,42	0,51	121,4

4.4.5 Υδρολύση εστέρων των φαινολικών οξέων

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια τροποποίηση της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την παραλαβή των φαινολικών οξέων από κυτταρικά τοιχώματα⁴¹. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κατεργασία με πυκνό διάλυμα NaOH (4 N) του στερεού υπολείμματος που απέμεινε μετά από το τέλος της εκχύλισης των δειγμάτων με το μεθανολικό διάλυμα. Έτσι έγινε δυνατό να υδρολυθούν οι αδιάλυτοι εστέρες των φαινολικών οξέων, που όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.3.1 υπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Το διάλυμα αναδεύτηκε για 4h και στη συνέχεια το pH του δείγματος ρυθμίστηκε στην τιμή 2,0 με τη προσθήκη διαλύματος HCl (6N). Το διάλυμα διηθήθηκε από ηθμό Whattman και εκχυλίστηκε διαδοχικά τέσσερις φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα ενώθηκαν και διαχειρίστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί και το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε αφού επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, διηθήθηκε από ηθμό σύριγγας PVDF 0,45 μm. Ακολούθησε ποσοτική ανάλυση με HPLC, της οποίας τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/g εκχυλίσματος και σε mg/Kg φρέσκου δείγματος και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β. Στην Εικόνα 4.4 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα υδρολυμένου εκχυλίσματος ραγών.



Εικόνα 4.4 Χρωματογράφημα υδρολυμένου κλάσματος ραγών: **1.**γαλλικό οξύ, **2.**πρωτοκατεχικό οξύ **3.** άγνωστο προϊόν, **4.** βανίλλικό οξύ, **5.** καφεϊκό οξύ **6.** συριγγικό οξύ **7.** π-κουμαρικό οξύ **8.** φερουλικό οξύ.

4.5 Μέθοδοι Εκχύλισης

4.5.1 Βελτιστοποίηση μεθόδων εκχύλισης με χρήση υγρών διαλυτών

Για να προσδιοριστεί η βέλτιστη διαδικασία εκχύλισης με τη χρήση υγρών διαλυτών, σε ένα δείγμα σταφυλιού (250g ραγών) εφαρμόστηκε η διαδικασία εκχύλισης που περιγράφηκε παραπάνω, μέχρι το στάδιο της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα. Μετά την εξάτμιση της μεθανόλης, το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 100mL απεσταγμένου νερού με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια, το δείγμα χωρίστηκε σε πέντε κλάσματα, ένα από τα οποία περιέχει 20mL υδατικού διαλύματος. Αυτά υπέστησαν τις παρακάτω κατεργασίες:

- 1) **Κλάσμα (Α):** Ξήρανση με λιοφυλιοποίηση έδωσε ένα κολλώδες στερεό που αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη έτσι ώστε να δώσει διάλυμα συγκέντρωσης 10^4 $\mu\text{g/mL}$. Αυτό διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.
- 2) **Κλάσμα (Β):** Εκχύλιση τέσσερις φορές διαδοχικά με βουτανόλη (n-ButOH). Τα οργανικά κλάσματα συνενώθηκαν και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία έως 35 °C. Το στερεό υπόλειμμα αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας nylon 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.
- 3) **Κλάσμα (Γ):** Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος NaOH 0,1 N, έτσι ώστε το pH να γίνει 5 και εκχύλιση τέσσερις φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Συνένωση των οργανικών φάσεων, ξήρανση με Na₂SO₄ και εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη έδωσε ένα στερεό υπόλειμμα. Το τελευταίο, αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη για να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.
- 4) **Κλάσμα (Δ):** Οξίνιση με διάλυμα HCl 0,1N έτσι ώστε το pH να γίνει 2 και τέσσερις διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Συνένωση των οργανικών φάσεων, ξήρανση με Na₂SO₄ και εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη έδωσε

ένα στερεό υπόλειμμα. Το τελευταίο, αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη για να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.

- 5) **Κλάσμα (E):** Οξίνιση με διάλυμα HCl 0,1N ώστε το pH να γίνει 1 και θέρμανση στους 90°C υπό ανάδευση απουσία φωτός για 2h. Στη συνέχεια, τέσσερις διαδοχικές εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα, συνένωση των οργανικών φάσεων, ξήρανση με Na₂SO₄ και εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη. Το στερεό υπόλειμμα αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη για να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g/mL}$, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.
- 6) **Κλάσμα (ΣΤ):** Η υδατική φάση που απέμεινε μετά την εκχύλιση του κλάσματος Γ (20mL), πέρασε -με εφαρμογή πίεσης- από στήλη αντιστρόφου φάσης RP18 (Merck), η οποία προηγουμένως είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχική δίοδο 10mL μεθανόλης και 10mL απεσταγμένου νερού. Η στήλη εκλύθηκε με 20 mL απιονισμένο ύδωρ και στη συνέχεια διαβιβάστηκαν 50mL μίγματος μεθανόλης-νερού (50:50). Το έκλουσμα συλλέχθηκε και εξατμίστηκε υπό κενό δίνοντας ένα στερεό υπόλειμμα που ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη για να επιτευχθεί συγκέντρωση 10^4 $\mu\text{g/mL}$, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF 0,45 μm και αναλύθηκε με HPLC.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράστηκαν σε mg/Kg ραγών και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3 Σύγκριση απόδοσης μεθόδων εκχύλισης

Κλάσμα	γαλλικό οξύ	προκουανιδίνη B1	(+)-κατεχίνη	προκουανιδίνη B2	(-)-επικατεχίνη	προκουανιδίνη B3	Γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρσβερστρούλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδη της κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδη της κερκετίνης	ρομνοσίδη της κερκετίνης
	mg/Kg Ραγών												
A	10,9	61,9	858,1	65,14	246,0	97,93	135,5	20,57	0,17	2,33	22,2	8,0	0,12
B	9,33	26,8	851,8	86,10	273,0	83,87	181,6	1,60	0,26	3,23	26,9	11,7	1,17
Γ	11,6	49,8	810,4	61,57	255,4	85,80	169,4	0,72	0,28	2,64	9,9	9,8	1,24
Δ	11,8	75,6	839,5	99,50	238,1	86,75	227,6	21,60	0,34	2,90	18,9	9,4	8,79
E	11,6	68,7	305,9	78,42	106,7	69,65	145,2	21,47	0,23	2,04	14,4	5,2	5,30
ΣΤ	0,2	16,8	13,25	13,83	5,95	* ΔΑ	ΔΑ	0,27	ΔΑ	ΔΑ	14,1	0,7	ΔΑ

* ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

4.5.1.1 Συμπεράσματα

Οι μεγαλύτερες πειραματικές τιμές συγκέντρωσης (mg/Kg ραγών) προσδιορίστηκαν για τα κλάσματα A, B και Δ, γεγονός που υποδηλώνει μεγάλο ποσοστό ανάκτησης για τις αντίστοιχες μεθόδους εκχύλισης. Κριτήριο για την επιλογή μιας από αυτές τις μεθόδους, αποτέλεσε η συγκέντρωση των παραπάνω ουσιών στα εκχυλίσματα. Το μεθανολικό και το βουτανολικό εκχύλισμα (A και B αντοίσιχα) είναι πολύ αραιά σε αντίθεση με το εκχύλισμα Δ που είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένο, καθώς είναι απαλλαγμένο από το μεγαλύτερο ποσοστό των σακχάρων και των πρωτεϊνών του σταφυλιού. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για την παρασκευή εκχυλισμάτων που εμφανίζουν αυξημένη βιοδραστικότητα.

Όσον αφορά τις μεθόδους εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν για το κλάσμα Δ, στο οποίο η υδατική φάση είχε οξινιστεί. Το κλάσμα Γ έχει μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το Δ και ειδικά για τις ουσίες: προκουανιδίνη B1, B2, γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, trans-καφταρικό οξύ και το γαλακτοσίδη της κερκετίνης. Οι ουσίες αυτές πρέπει να

παραμένουν στην υδατική φάση, όπως άλλωστε φαίνεται από τη σύσταση του κλάσματος ΣΤ, που προέκυψε με εκχύλιση στερεάς φάσης του υδατικού υπολείμματος. Επομένως οι καλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται όταν κατά την εκχύλιση νερού-οξικού αιθυλεστέρα, το pH της υδατικής φάσης είναι περίπου 2,0.

Στην περίπτωση του κλάσματος Ε, όπου πριν από την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα είχε προηγηθεί οξίνιση και θέρμανση στους 90°C, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν είναι εμφανώς χαμηλότερες, από αυτές του κλάσματος Δ, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πολυφαινόλες καταστρέφονται κατά τη θέρμανση. Επιπλέον δεν επιτεύχθηκε υδρόλυση των γλυκοζιτών, καθώς η κερκετίνη που απελευθερώθηκε είναι σε πολύ μικρή ποσότητα.

4.5.2 Δοκιμές Εκχυλίσεων με χρήση Ρητινών και Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE).

Ένα δείγμα στεμφύλων (50g ραγών) εκχυλίστηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως, έως το στάδιο της εκχύλισης σε πετρελαϊκό αιθέρα. Μετά την εξάτμιση της μεθανόλης, το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100mL απεσταγμένου ύδατος με τη βοήθεια υπερήχων και διηθήθηκε από ηθμό Whatman (για την απομάκρυνση των στερεών αιωρημάτων). Στη συνέχεια, το δείγμα χωρίστηκε σε τέσσερα κλάσματα, ένα από τα οποία περιέχει 30mL υδατικού διαλύματος. Αυτά υπέστησαν τις παρακάτω κατεργασίες:

Κλάσμα (Α): Οξίνιση προσθήκη διαλύματος HCl 0,1N ώστε το pH να γίνει 1 και . τέσσερις διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Επεξεργασία με βάση τη μέθοδο που έχει περιγραφεί έδωσε ένα στερεό υπόλειμμα που αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ μg/mL, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF με διάμετρο πόρων 0.45μm και αναλύθηκε με HPLC.

Κλάσμα (Β): Πέρασμα μέσω στήλης διαμέτρου 3cm, η οποία προηγουμένως είχε πληρωθεί με 10g ρητίνης τύπου **XAD4** και ενεργοποιηθεί με διαδοχική διέλευση 100mL απεσταγμένου ύδατος, 100mL μεθανόλης και 100mL απεσταγμένου ύδατος. Η ταχύτητα ροής του δείγματος από τη στήλη προσαρμόστηκε στα 1mL/min. Μετά τη διέλευση του διαλύματος του οίνου, η στήλη εκπλύθηκε με 200mL απεσταγμένο

ύδωρ με σκοπό να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και στέγνωσε με εφαρμογή ρεύματος αέρα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στη στήλη 50 mL μεθανόλης με ροή 1mL/min. Το μεθανολικό κλάσμα που συλλέχθηκε, εξατμίστηκε υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε, αφού ζυγίστηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ mg/mL, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF με διάμετρο πόρων 0.45μm και αναλύθηκε με HPLC.

Κλάσμα (Γ): Πέρασμα 10mL υδατικού διαλύματος από στήλη στήλης αντίστροφης φάσης C18 -με εφαρμογή πίεσης- η οποία προηγουμένως είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχική διέλευση 5 mL μεθανόλης και 5mL απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια, η στήλη εκπλύθηκε με διέλευση 10 mL απιονισμένου ύδατος και στέγνωσε με διαβίβαση ρεύματος αζώτου. Στη συνέχεια διαβιβάστηκαν 10mL μίγματος μεθανόλης και το έκλουσμα της συλλέχθηκε και εξατμίστηκε υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε αφού ζυγίστηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση $2 \cdot 10^3$ mg/mL, διηθήθηκε από φίλτρα σύριγγας PVDF με διάμετρο πόρων 0.45μm και αναλύθηκε με HPLC. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράστηκαν σε mg/Kg ξηρού βάρους και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4 Σύγκριση ανάκτησης πολυφαινολών με εφαρμογή διαφόρων τεχνικών εκχύλισης

Ουσία	Κλάσμα Α EtOAc	Κλάσμα Β XAD4	Κλάσμα Γ SPE
Γαλλικό οξύ	146,85	92,40	109,51
(+)-κατεχίνη	25,43	28,46	24,16
(-)-επικατεχίνη	36,37	33,34	32,55
Φλαβονόλη-1	60,98	69,15	57,93
<i>trans</i> -καφαρικό οξύ	36,78	7,34	8,46
Καφεϊκό οξύ	3,47	4,93	0,80
<i>π</i> -κουμαρικό οξύ	4,82	3,81	1,11
Φερουλικό οξύ	3,57	2,72	*ΔΑ
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	12,75	7,56	10,73
<i>ε</i> -βινιφερίνη	78,56	54,70	62,27
3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης	14,05	8,20	12,36
3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης	10,60	6,97	8,48
3-ραμνοσίδης της κερκετίνης	8,21	3,38	7,55
Κερκετίνη	19,42	21,65	21,36

* ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

4.5.2.1 Συμπεράσματα

Το κλάσμα Α, εμφανίζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τις ουσίες που μελετήθηκαν. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με πέρασμα από ρητίνη ΧΑD4 και εκχύλιση στερεάς φάσης, εμφανίζουν πολύ μικρό ποσοστό ανάκτησης των φαινολικών οξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι δε συγκατατούνται από τη στήλη και περνάνε στην υδατική φάση. Περαιτέρω η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι εφικτή μόνο για πολύ μικρές ποσότητες δείγματος (περίπου 4g στεμφύλων), καθώς οι στήλες που διατίθεται εμπορικά έχουν ποσότητα πληρωτικού υλικού C-18 μέχρι 1g. Επίσης η διέλευση του υδατικού διαλύματος από τη στήλη, παρουσιάζει προβλήματα, λόγω των αιωρούμενων σωματιδίων που προκαλούν κλείσιμο των πόρων της στήλης.

4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.6.1 ΡΑΓΕΣ

Στους Πίνακες 1B—8B του Παραρτήματος Β, περιέχεται η συγκέντρωση των κυριότερων πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν με HPLC για τα δείγματα ραγών που αναλύθηκαν την οινοποιητική περίοδο 2003-2005 καθώς και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα σε ερυθρές και λευκές ποικιλίες. Η συγκέντρωση των επιμέρους πολυφαινολών εκφράζεται σε mg/Kg αρχικού δείγματος και mg/g εκχυλίσματος, ενώ αντίστοιχα το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά Kg αρχικού δείγματος και mg γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος. Επίσης δίνεται το % ποσοστό σε σάκχαρα του κάθε δείγματος (σε βαθμούς °Brix) προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός ωρίμανσης.

4.6.2 Συζήτηση

4.6.2.1 Κυριότερες πολυφαινόλες ραγών

Οι κυριότερες επιμέρους πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ραγών που συλλέχθηκαν τα έτη 2004-2005 ανήκαν στην κατηγορία των φλαβονοειδών.

Φλαβανόλες

Σε μεγαλύτερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν τα μονομερή (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, ενώ σε σημαντικές ποσότητες προσδιορίστηκαν και οι προκυανιδίνες B1, B2, B3 και ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης.

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες κερκετίνη και καμφερόλη υπήρχαν σε πολύ μικρές ποσότητες και δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθούν. Αντίθετα σε σημαντικές ποσότητες βρέθηκαν οι γλυκοζίτες 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη). Στα σταφύλια έχει προσδιοριστεί ένα πλήθος γλυκοζιτών των φλαβονολών. Το πιο άφθονο φαίνεται να είναι το 3-O-γλουκουρονίδιο της κερκετίνης και ο 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης. Ο 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης έχει αναφερθεί από τους Osmiaski και Lee,⁴⁸ στις ποικιλίες σταφυλιών Concord και Chanauc με μέσο όρο συγκέντρωσης 34,95 mg/Kg, και από τους Pena-Neira και συνεργάτες.⁴⁹ Ο γλυκοζίτης 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης έχουν βρεθεί στα σταφύλια σε συγκεντρώσεις μεταξύ 32,6–84 mg/Kg.⁵⁰

Όσον αφορά τις άλλες φλαβονόλες, έχουν βρεθεί διάφοροι γλυκοζίτες τους, όπως 3-D-γλυκοσίδης της μυρισετίνης, της καμφερόλης και της ισοραμνετίνης, ο 3-ρουτινοσίδης της καμφερόλης κ.α.

Οι συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η βιοσύνθεση των φλαβονολών έχει αποδειχθεί ότι επάγεται από την ηλιακή ακτινοβολία. Έτσι σταφύλια που είναι άμεσα εκτεθειμένα στον ήλιο παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονολών.⁵¹

Φαινολικά οξέα

Από τα φαινολικά οξέα σε ελεύθερη μορφή προσδιορίστηκε μόνο το γαλλικό οξύ σε σημαντικές ποσότητες, ενώ από τους εστέρες των φαινολικών οξέων, ανιχνεύθηκε το *trans*-καφταρικό οξύ που αποτελεί εστέρα του καφεϊκού οξέος με τρυγικό οξύ. Στα σταφύλια έχει επίσης προσδιοριστεί το *cis*-καφταρικό οξύ, καθώς και εστέρες του τρυγικού και με άλλα υδροξυκιναμμωμικά οξέα όπως το *π*-κουμαρικό (κουταρικό οξύ), και το φερουλικό (φερταρικό οξύ) τόσο σε *cis*- όσο και σε *trans*- μορφή^{52, 53} όμως το *trans*-καφταρικό βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως και στους οίνους. Επίσης στους φλοιούς και το χυμό των σταφυλιών έχουν βρεθεί και ελεύθερα φαινολικά οξέα, όπως το πρωτοκατεχικό, το φερουλικό, το *π*-κουμαρικό και το συριγγικό το οποίο έχει ανιχνευθεί σε μεγαλύτερη αφθονία.

Στιλβένια

Στα δείγματα ραγών που αναλύθηκαν προσδιορίστηκαν τα στιλβένια *ε*-βινιφερίνη και *trans*-ρεσβερατρόλη. Η *trans*-ρεσβερατρόλη γενικά υπήρχε σε πολύ μικρές ποσότητες στα περισσότερα με μέγιστη συγκέντρωση τα 7,08 mg/Kg φρέσκου δείγματος. Αντίθετα η *ε*-βινιφερίνη ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Οι Pastrana-Bonilla και συνεργάτες,⁵³ βρήκαν αντίστοιχα πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις *trans*-ρεσβερατρόλη σε σταφύλια του είδους *Vitis rotundifolia*, ενώ σε κάποια δείγματα δεν ανιχνεύθηκε καθόλου. Η σύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλη είναι γνωστό ότι εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όμως η χαμηλή της συγκέντρωση στα σταφύλια, μπορεί να οφείλεται και στο σχηματισμό γλυκοζιτών της κατά αντιστοιχία με τους γλυκοζίτες των φαλβονολών. Πράγματι οι γλυκοζίτες της *trans*- και *cis*-ρεσβερατρόλης (*trans*- και *cis*-πισειδής) έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί από το φλοιό και τους βόστρυχους σταφυλιών.⁵⁴⁻⁵⁷ Οι Roldan και συνεργάτες,⁵⁸ βρήκαν ότι σε υγιή σταφύλια η συγκέντρωση των γλυκοζιτών της *ρεσβερατρόλης* είναι δεκαπλάσια σε σχέση με την ελεύθερη μορφή (14,20 και 1,45 mg/Kg φλοιού αντίστοιχα). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές η συγκέντρωση και της γλυκοσιλωμένων και των ελεύθερων μορφών της *ρεσβερατρόλης*, αύξανε σημαντικά ανάλογα με το βαθμό προσβολής από βοτρυτή (*botrytis cinerea*).

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων που προσδιορίστηκαν για τις επιμέρους και τις ολικές πολυφαινόλες, για ερυθρές και λευκές ποικιλίες στο στάδιο της ωρίμανσης μεταξύ των ετών 2003—2005.

Όσον αφορά τη σύσταση και τη συγκέντρωση των συγκεκριμένων πολυφαινολών δε φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερος διαχωρισμός μεταξύ ερυθρών και λευκών ποικιλιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σύγκριση δεν αφορά τις ανθοκυανίνες οι οποίες υπάρχουν μόνο στις ερυθρές ποικιλίες. Αντίθετα, ο παράγοντας που διαμορφώνει καθοριστικά το πολυφαινολικό προφίλ, είναι η ποικιλία. Μεταξύ των ερυθρών ποικιλιών το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει η ποικιλία Μανδηλαριά, ενώ μεταξύ των λευκών η ποικιλία Ασύρτικο.

Τα δείγματα του 2003 –τα οποία εκχυλίστηκαν με ανέπαφα τα γίγαρτα– παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις φλαβονολών σε σχέση με τα ομοειδή τους (ίδιος τόπος και ποικιλία) των ετών 2004–2005, ενώ η συγκέντρωση των υπολοίπων πολυφαινολών κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Από αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο μέρος των φλαβονολών υπάρχει στο ενδοσπέρμιο των γιγάρτων και δεν εκχυλίζονται κατά την οινοποίηση όπου η σύνθλιψη των γιγάρτων είναι ανεπιθύμητη, όπως ήδη αναφέρθηκε.

Πίνακας 4.5 Μέσοι όροι συγκεντρώσεων πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν σε ερυθρές και λευκές ποικιλίες σταφυλιών.

Ράγες mg/Kg	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	προκυανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφεοαρικό οξύ	trans-ρεβερατρόλη	ε-βιταφρίνη	3-D-γλακτοσίδη κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδη κερκετίνης	3-ραμνοσίδη κερκετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
2003														
Ερυθρές ποικιλίες	3,83	63,04	41,96	4,10	11,52	ΔΑ**	3,31	0,79	1,05	3,56	5,82	4,97	4,47	319,62
Λευκές ποικιλίες	2,34	33,49	21,85	4,00	10,04	ΔΑ	4,87	1,41	0,18	1,85	10,80	11,28	6,10	204,07
2004														
Ερυθρές ποικιλίες	8,70	121,36	88,41	24,14	39,57	15,00	23,46	1,63	0,82	3,70	12,33	11,77	11,27	715,94
Λευκές ποικιλίες	4,48	103,69	56,34	24,54	27,63	13,25	25,17	4,84	0,10	0,45	10,79	11,50	8,84	900,39
2005														
Ερυθρές ποικιλίες	6,415	67,44	72,09	22,5	26,15	20,89	6,12	3,756	1,429	2,14	6,58	16,94	7,726	474,06
Λευκές ποικιλίες	4,207	84,79	49,24	29,92	31,93	11,91	16,43	7,183	0,133	0,31	17,89	16,88	11,89	1052,2

* mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

4.6.2.2 Διαφορές ανά περιοχή

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε και βρέθηκε ότι συμβάλλει σημαντικά στην τελική συγκέντρωση πολυφαινολών σε μια ποικιλία, ήταν η περιοχή απ' όπου προήλθαν τα δείγματα μιας συγκεκριμένης ποικιλίας. Έτσι επιλέχθηκε να μελετηθεί η ποικιλία Μανδηλαριά η οποία αποτελεί την πιο διαδεδομένη ποικιλία στο Νότιο Αιγαίο και την Κρήτη.

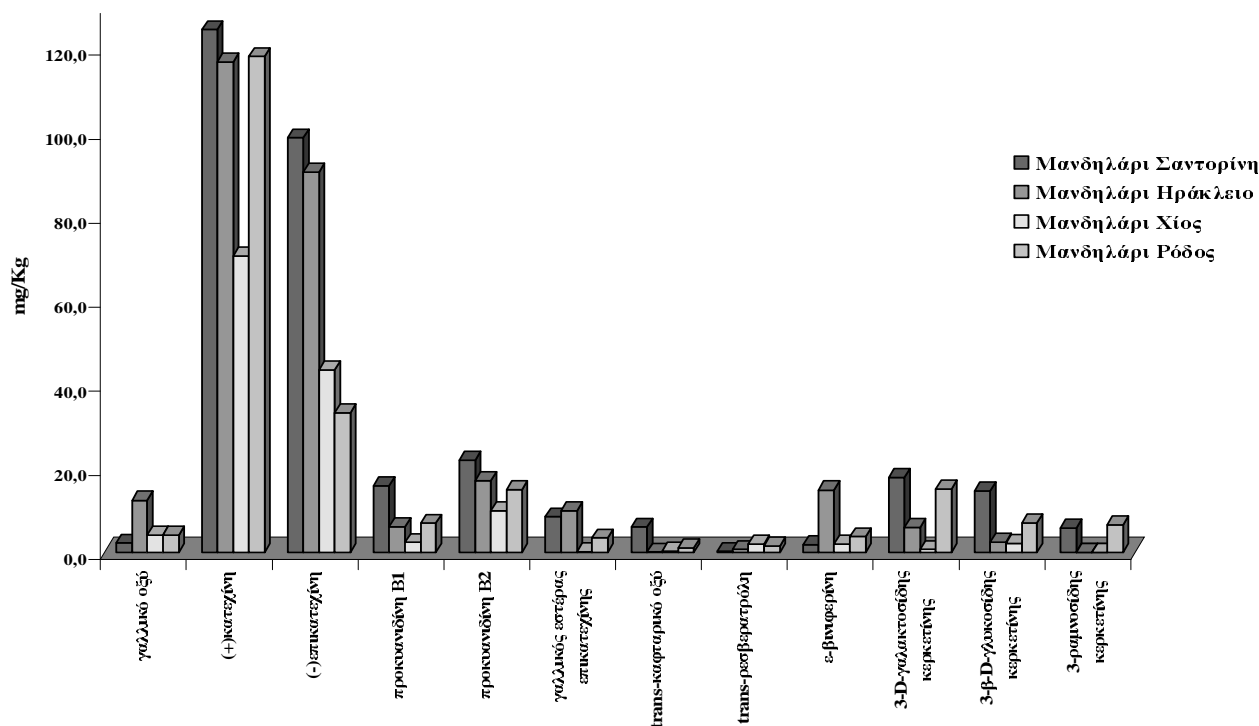
Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η συγκέντρωση σε πολυφαινόλες, τεσσάρων δειγμάτων μανδηλαριάς στο στάδιο της ωρίμανσης, οι οποίες συλλέχθηκαν από τα νησιά της Σαντορίνης, της Κρήτης, της Ρόδου και της Χίου τον Αύγουστο του 2003. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των επιμέρους πολυφαινολών φαίνεται στο Γράφημα 4.1

Το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο γενικά εμφανίζουν η μανδηλαριά Σαντορίνης και Κρήτης. Η μανδηλαριά Σαντορίνης εμφανίζει αυξημένη συγκέντρωση σε (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και προκυανιδίνες, καθώς και σε γλυκοζίτες της κερκετίνης. Η συγκέντρωση των στιλβενίων δεν παρουσιάζει συγκεκριμένη τάση μεταξύ των δειγμάτων και σχετίζεται με το γεγονός ότι πρόκειται για *φυτοαλεξίνες* που συντίθενται σε καταστάσεις στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία..

Πίνακας 4.6 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου ραγών της ποικιλίας Μανδηλαριά από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)-κατεχίνη	(-)-επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρεβερατρούλη	ε-βανιφερίνη	3-D-γυαλακτοϊδής κερκετίνης	3-β-D-γυαλοϊδής κερκετίνης	3-ραμνοϊδής κερκετίνης
Μανδηλαριά Σαντορίνη	19	2,30	124,51	98,78	15,85	21,97	8,51	6,07	0,23	1,89	17,90	14,67	5,84
Μανδηλαριά Κρήτη	17	12,50	116,75	90,53	6,16	17,05	9,92	0,14	0,74	14,92	5,93	2,42	0,05
Μανδηλαριά Χίος*	17	4,13	70,58	43,43	2,39	9,97	0,16	0,31	2,05	2,05	0,73	2,13	0,04
Μανδηλαριά Ρόδος	17	4,12	118,07	33,20	6,97	15,00	3,44	1,17	1,56	3,73	15,07	7,11	6,57

*Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στους μέσους όρους των τριών δειγμάτων που συλλέχθηκαν από διαφορετικούς αμπελώνες



Γράφημα 4.1 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου ραγών της ποικιλίας μανδηλαριάς από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

4.6.2.3 Εποχική Διακύμανση

Προκειμένου να καθοριστεί η διακύμανση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των ραγών και των επιμέρους πολυφαινολών στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των ραγών, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν δείγματα από την ίδια ποικιλία και περιοχή για το διάστημα Ιούλιος—Σεπτέμβριος 2003. Ο βαθμός ωρίμανσης προσδιορίστηκε βάσει του ποσοστού σακχάρων και οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν ως mg/Kg φρέσκων ραγών. Όπως γίνεται φανερό από τους Πίνακες 1B—2B και 5B—6B του Παραρτήματος Β, το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των ραγών, όσο και η συγκέντρωση των επιμέρους πολυφαινολών, μειώνεται όσο αυξάνει η περιεκτικότητα των ραγών σε σάκχαρα. Η μείωση είναι πολύ έντονη όταν πλέον τα δείγματα έχουν φτάσει σε πλήρη ωρίμανση.

Όσον αφορά τις επιμέρους πολυφαινόλες η ίδια πτωτική τάση παρατηρείται για τις μονομερείς και διμερείς φλαβονόλες, αντίθετα οι γλυκοζίτες της κερκετίνης εμφανίζουν μάλλον ανοδική τάση, ενώ τα οξέα και τα στυλβένια παρουσιάζουν διακυμάνσεις. Οι Fernandez de Simon και συνεργάτες,⁵² παρατήρησαν μείωση της

συγκέντρωσης των φλαβονολών και των εστέρων των κινναμωμικών οξέων κατά την ωρίμανση, εκτός από τα ελεύθερα φαινολικά οξέα στους φλοιούς, που παρουσίασαν αύξηση. Η μείωση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου είναι συνέπεια της αύξησης του βάρους των ραγών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης λόγω συσσώρευσης νερού και σακχάρων. Η αύξηση του ποσοστού σακχάρων συμβαίνει κατά αναλογία με την αύξηση του μεγέθους των ραγών, επομένως το ποσοστό συμμετοχής των γιγάρτων και του φλοιού στο συνολικό βάρος των ραγών μειώνεται. Αντίθετα όσον αφορά τους γλυκοζίτες στα πρώιμα δείγματα η συγκέντρωση τους είναι χαμηλή, λόγω χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων και αυξάνει σταδιακά.

Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι στη μανδηλαριά Σαντορίνης, το πολυφαινολικό περιεχόμενο παραμένει αρκετά υψηλό ακόμα και στο στάδιο της ωρίμανσης, γεγονός που αποδίδεται αφενός στον μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα και αφετέρου στο σχετικά χαμηλό ποσοστό σακχάρων στο στάδιο ωρίμανσης.

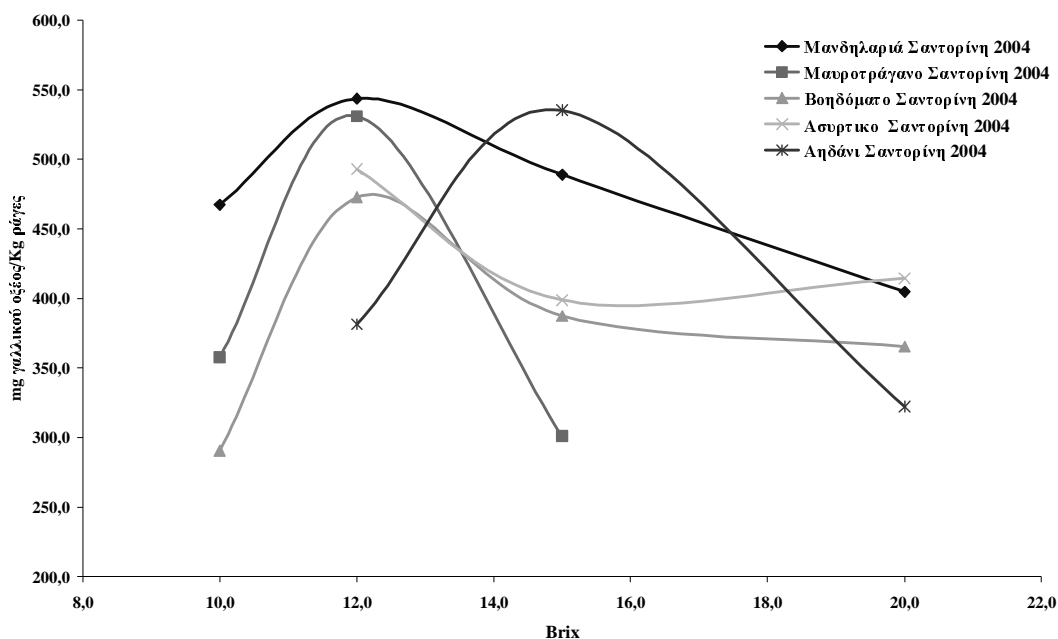
Η μείωση στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών κατά την ωρίμανση έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές. Οι Lee και Jaworski⁵⁹, ενώ αρχικά προσδιόρισαν αυξημένες συγκεντρώσεις εστέρων των υδροοξικινναμωμικών οξέων σε πέντε αμερικάνικες ποικιλίες σταφυλιών, στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταθερή μείωση μέχρι την ωρίμανση και τη συγκομιδή. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των μονομερών και ολιγομερών φλαβονολών (εκφρασμένες σε mg/L), η τάση είναι ανοδική μέχρι τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης οπότε και σταματά η βιοσύνθεση αυτών των πολυφαινολών ενώ στη συνέχεια παρατηρείται απότομη πτώση. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα των Romeyer και συνεργατών⁶⁰, και De Freitas και συνεργατών⁶¹, σε γαλλικές ποικιλίες σταφυλιών.

Ενδεικτικά στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζεται η εποχική διακύμανση των επιμέρους και των ολικών πολυφαινολών για την ερυθρά ποικιλία μανδηλαριά και την λευκή ποικιλία αηδάνι Σαντορίνης κατά τη διάρκεια του έτους 2004, ενώ στα Διαγράμματα 4.2—4.4 παρουσιάζεται η διακύμανση των ολικών και των επιμέρους πολυφαινολών για διάφορες ποικιλίες της Σαντορίνης.

Πίνακας 4.7 Εποχική διακύμανση πολυφαινόλων στην ερυθρά ποικιλία μανδηλαριά Σαντορίνης

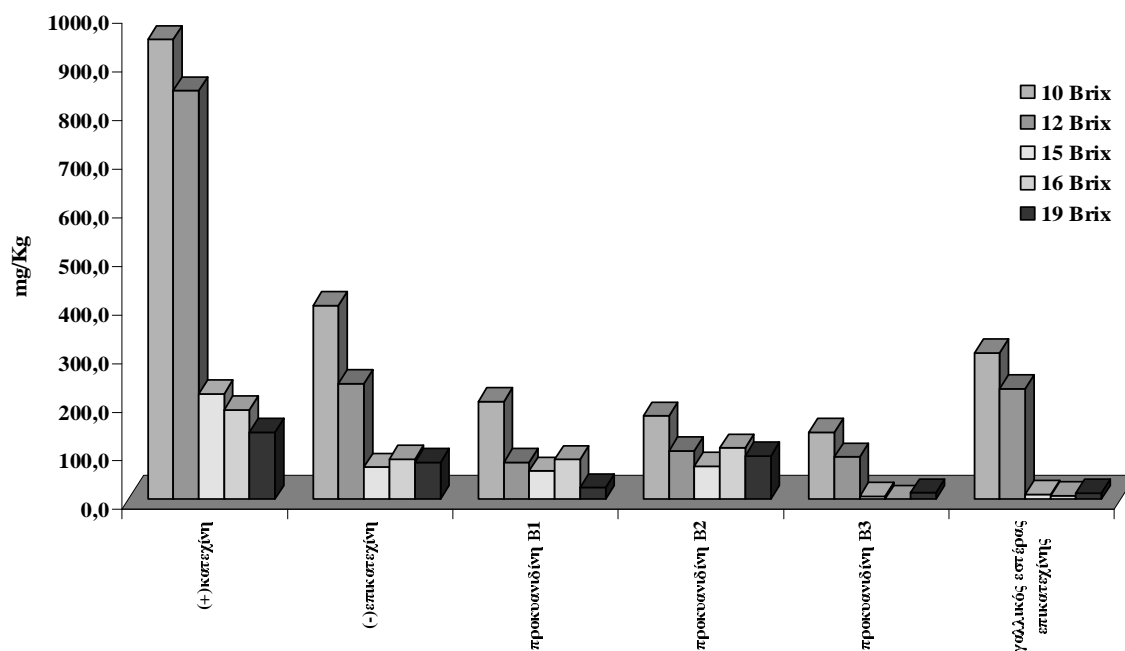
ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)														
	(+)κατεζίνη	(-)επικατεζίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	προκουανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικατεζίνης	γαλλικό οξύ	trans-καφαορικό οξύ	trans-ρεβερατρόλη	ε-βιναφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσίδης κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες	
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	10,0	945,45	399,08	200,63	171,53	137,42	301,33	17,18	8,04	ΔΑ	4,35	20,96	8,28	2,78	3583,2
	12,0	839,5	238,1	75,57	99,5	86,75	227,6	11,79	21,6	0,34	2,9	18,97	9,41	8,79	3043,7
	15,0	216,97	66,36	57,83	68,07	6,28	10,75	7,64	6,13	0,08	4,19	20,75	9,33	4,19	1174,4
	16,0	183,73	82,88	81,50	105,95	0,00	7,96	7,16	5,56	0,24	ΔΑ**	15,84	7,79	3,45	1004,5
	19,0	138,39	75,75	24,24	88,90	13,75	13,38	7,49	2,04	0,47	ΔΑ	13,30	5,75	2,88	751,2
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	14,0	490,90	187,36	48,53	46,41	63,61	108,83	4,13	3,29	0,03	ΔΑ	6,66	4,50	2,23	1307,6
	15,0	409,81	174,92	30,31	40,92	47,24	80,57	5,15	2,02	0,06	ΔΑ	6,83	6,36	5,02	1114,6
	17,0	95,83	39,41	20,48	50,98	6,44	12,80	6,82	0,26	ΔΑ	ΔΑ	6,75	17,83	14,93	506,6

* mg γαλλικού οξέως / Kg ραγών
 ** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

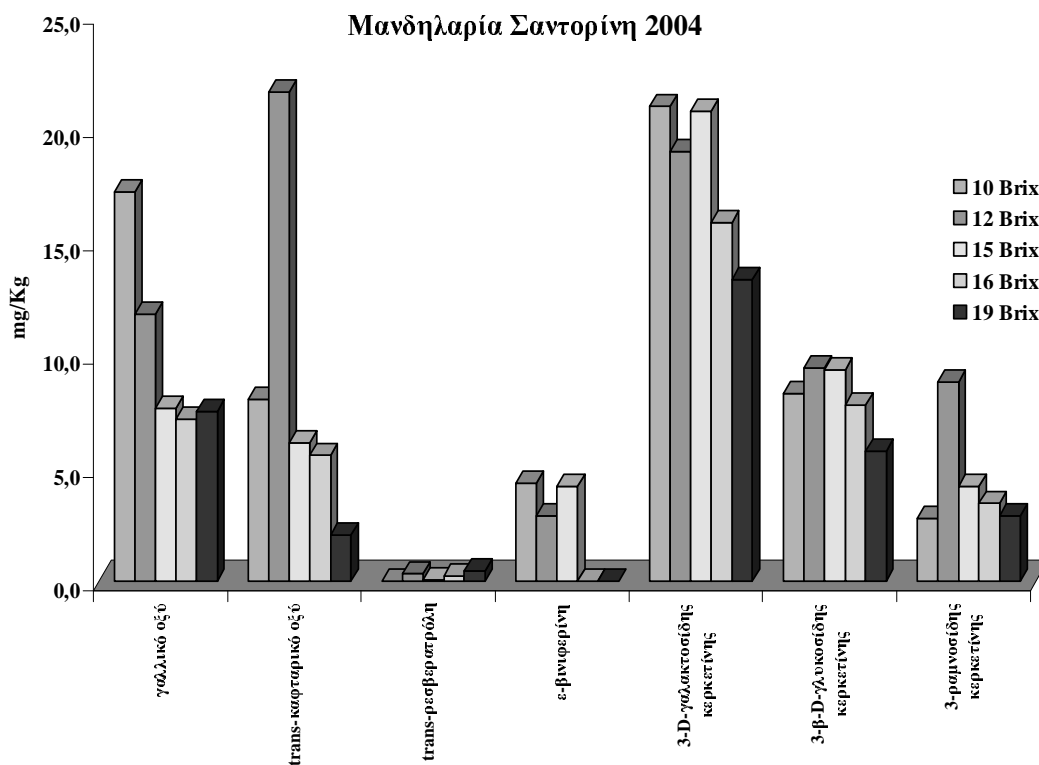


Γράφημα 4.2 Μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου ραγών σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

Μανδηλαρία Σαντορίνη 2004



Μανδηλαρία Σαντορίνη 2004



Γραφήματα 4.3-4.4 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολών της ποικιλίας μανδηλαρία Σαντορίνη

4.6.2.4 Ετήσια διακύμανση

Η ετήσια διακύμανση του πολυφαινολικού περιεχομένου ομοειδών δειγμάτων (ίδια ποικιλία, ποσοστό σακχάρων και τόπος) μελετήθηκε για διαφορετικές ερυθρές και λευκές ποικιλίες μεταξύ των ετών 2004–2005. Ενδεικτικά στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο δύο ερυθρών και δύο λευκών ποικιλιών της Σαντορίνης στο στάδιο της ωρίμανσης. Από τις τιμές του πίνακα δεν προκύπτει κάποια συγκεκριμένη τάση διακύμανσης. Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο παραμένει σταθερό και στις δύο χρονιές. Στα Γραφήματα 4.5–4.6 φαίνεται η μεταβολή των επιμέρους πολυφαινολών για τις ποικιλίες μαυροτράγανο και αηδάνι.

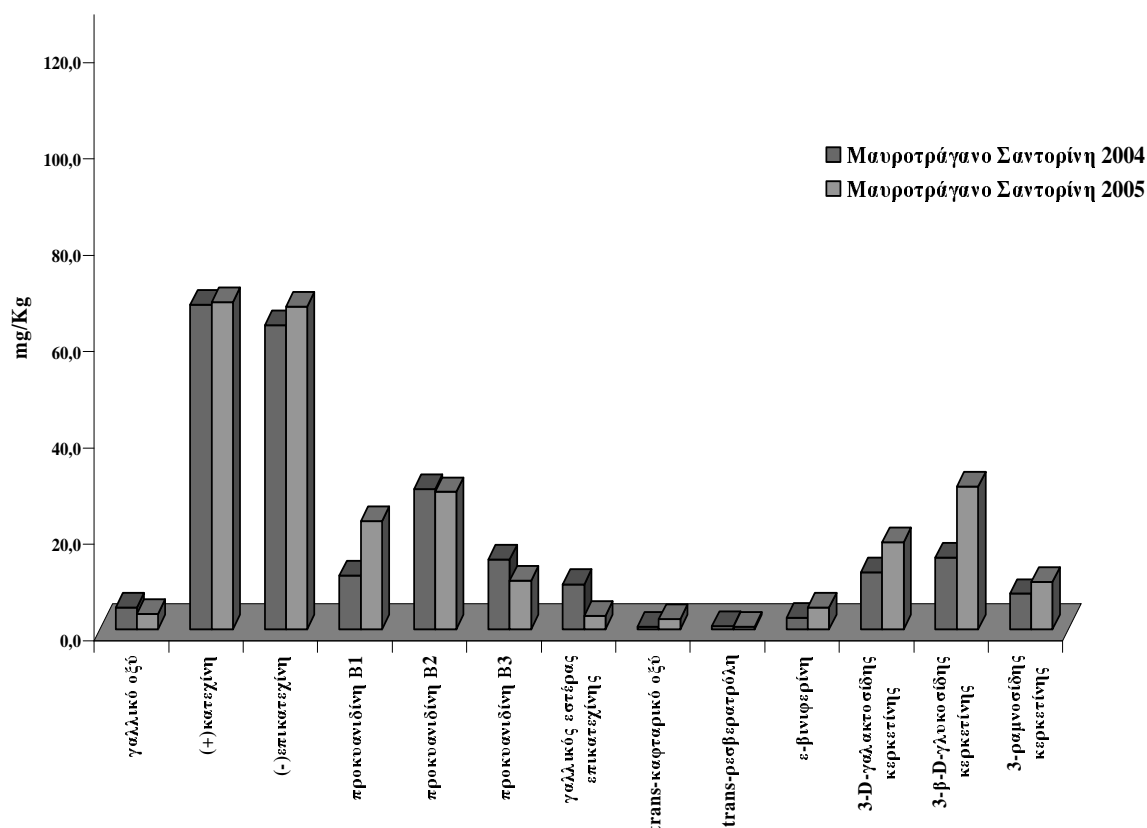
Οι αιτίες που θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν το πολυφαινολικό προφίλ των ραγών είναι μεταβολή των κλιματολογικών συνθηκών, προσβολή των φυτών από ασθένειες κ.τ.λ.

Πίνακας 4.7 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολών σε ερυθρές και λευκές ποικιλίες Σαντορίνης

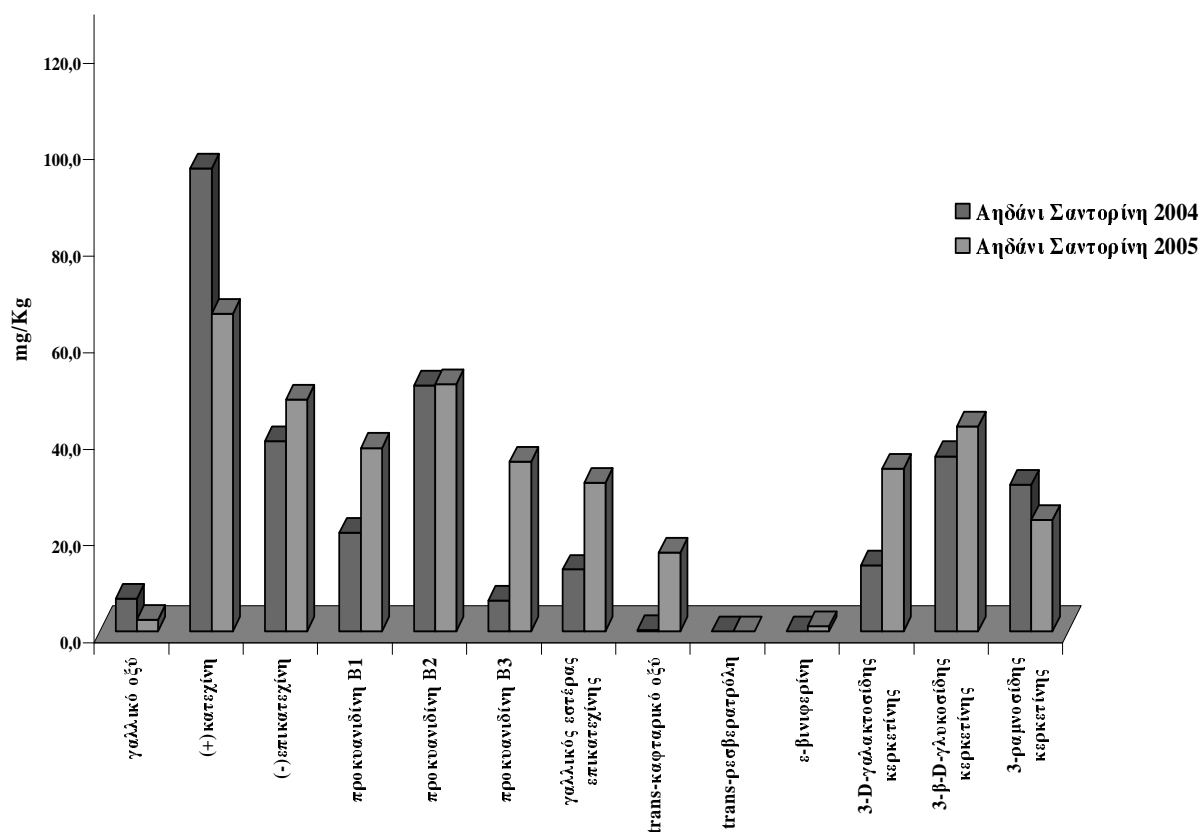
ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)καταζίνη	(-)επικαταζίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	προκουανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικαταζίνης	trans-καφαρικό οξύ	trans-ρεβερτρούλη	ε-βιταφερίνη	3-D-γλακτοσιδής κερακτίνης	3-β-D-γλοκοσιδής κερακτίνης	3-ρεμνοσιδής κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	19,0	7,49	138,4	75,7	24,2	88,9	13,7	13,4	2,0	0,5	ΔΑ**	13,3	5,75	ΔΑ	951,2
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	19,0	4,26	151,9	35,9	46,1	52,4	10,9	4,9	0,5	ΔΑ	1,8	22,4	16,41	6,1	1086,0
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	20,0	4,51	67,4	63,2	11,3	29,1	14,5	9,4	0,5	0,7	2,4	11,8	14,96	7,4	917,4
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	22,5	3,13	68,0	67,0	22,5	28,5	10,1	2,7	2,2	0,6	4,5	18,1	29,72	9,9	900,8
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	21,0	6,8	95,8	39,4	20,5	51,0	6,4	12,8	0,3	ΔΑ	ΔΑ	13,7	36,3	30,4	706,6
Αηδάνι Σαντορίνη 2005	21,0	2,4	65,8	48,0	38,0	51,2	35,2	30,8	16,3	ΔΑ	1,1	33,7	42,5	23,1	933,4
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	21,0	5,0	172,3	49,5	28,9	35,5	7,8	12,1	2,3	0,1	0,4	19,5	10,0	6,7	941,5
Ασύρτικο Σαντορίνη 2005	19,0	5,4	186,4	64,3	43,1	35,1	10,1	13,6	19,9	0,2	0,3	23,7	7,1	2,7	1047,3

* mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 4.5 Ετήσια μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου ραγών της ποικιλίας μαυροτράγανο



Γράφημα 4.6 Ετήσια μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου ραγών της ποικιλίας αηδάνι

4.6.3 ΓΓΑΡΤΑ-ΦΛΟΙΟΙ

Στους Πίνακες 9B–12B του Παραρτήματος Β, περιέχεται η συγκέντρωση των κυριότερων πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν με HPLC για τα δείγματα γιγάρτων και φλοιών που αναλύθηκαν την οινοποιητική περίοδο 2003-2005 καθώς και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα σε ερυθρές και λευκές ποικιλίες. Η συγκέντρωση των επιμέρους πολυφαινολών εκφράζεται σε mg/100g γιγάρτων ή φλοιών σε mg/g εκχυλίσματος, ενώ αντίστοιχα το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά 100g γιγάρτων ή φλοιών και mg γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος.

4.6.3.1 Αποτελέσματα

4.6.3.2 Κυριότερες πολυφαινόλες γιγάρτων

Οι κυριότερες επιμέρους πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν στα δείγματα γιγάρτων που απομονώθηκαν από τα δείγματα ραγών των ετών 2004-2005 ήταν μονομερείς και διμερείς φλαβονόλες. Η μεγαλύτερη σε αφθονία πολυφαινόλη, ήταν η (+)-κατεχίνη ακολουθούμενη από την (-)-επικατεχίνη. Σε αρκετά μεγάλες ποσότητες προσδιορίστηκαν και οι προκυανιδίνες Β1, Β2, Β3 και ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης. Οι φλαβονόλες κερκετίνη και καμφερόλη και οι γλυκοζίτες 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη) υπήρχαν σε πολύ μικρές ποσότητες και δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθούν. Από τα φαινολικά οξέα ανιχνεύθηκε μόνο το γαλλικό οξύ.

Οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των ολικών και των επιμέρους πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν για τα γίγαρτα σταφυλιών στο στάδιο της ωρίμανσης φαίνονται στον Πίνακα 4.8 Από τις τιμές των συγκεντρώσεων φαίνεται ότι το πολυφαινολικό περιεχόμενο των γιγάρτων είναι ιδιαίτερα υψηλό. Όπως και στις ράγες δεν προκύπτει κάποιος διαχωρισμός στη σύσταση μεταξύ ερυθρών και λευκών ποικιλιών, αλλά μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών. Το μεγαλύτερο

πολυφαινολικό δυναμικό εμφανίζει η ποικιλία μανδηλαριά Σαντορίνης και η ποικιλία ασύρτικο Σαντορίνης.

Πίνακας 4.8 Μέσοι όροι πολυφαινολικού περιεχομένου γιγάρτων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/100g γιγάρτων)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	προκυανιδίνη B3	γαλλικός αστεράς επικατεχίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	17,79	285,84	204,03	59,01	112,34	28,68	19,97	2085,16
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	17,33	271,37	129,76	63,92	98,93	31,56	28,55	1905,54

*mg γαλλικού οξέος / 100g γιγάρτων

Αντίστοιχες μελέτες ως προς την πολυφαινολική σύσταση γιγάρτων ελληνικών ποικιλιών σταφυλιών είναι πολύ λίγες. Οι Guendez και συνεργάτες^{62,63} προσδιόρισαν ανάλογες συγκεντρώσεις πολυφαινολών σε εκχυλίσματα γιγάρτων, ελληνικών ποικιλιών, τα οποία προέκυψαν με απευθείας εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Τα γίγαρτα της ποικιλίας μανδηλαριάς βρέθηκαν να έχουν το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο σε αντίθεση με τις ποικιλίες λημιό και ξινόμαυρό που ήταν εξαιρετικά φτωχές. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τις δικές μας παρατηρήσεις. Άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τις αντίστοιχες ουσίες σε γίγαρτα ξένων ποικιλιών⁶⁴, ενώ οι Pastrana-Bonilla και συνεργάτες⁵³, προσδιόρισαν σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις σε γίγαρτα του είδους *Vitis rotundifolia*

Εκτός από τις παραπάνω πολυφαινόλες στα γίγαρτα έχουν προσδιοριστεί μια πληθώρα флаβονολών, κυρίως διμερείς, τριμερείς και τετραμερείς προκυανιδίνες που αποτελούνται από μονάδες (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης καθώς και εστέρες των προκυανιδινών με γαλλικό οξύ.^{56, 65-67}

4.6.3.3 Κυριότερες πολυφαινόλες φλοιών

Οι κυριότερες επιμέρους πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν στα δείγματα γιγάρτων που απομονώθηκαν από τα δείγματα ραγών των ετών 2004-2005 ανήκαν στην κατηγορία των флаβονολών και των στιλβενίων. Σε μεγαλύτερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν οι γλυκοζίτες 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοζίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη). Από τα

στιλβένια βρέθηκαν οι ουσίες trans-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη. Από τα φαινολικά οξέα σε ελεύθερη μορφή προσδιορίστηκε μόνο το γαλλικό οξύ σε σημαντικές ποσότητες ενώ σε ίχνη ανιχνεύθηκαν και τα οξέα καφεϊκό και συριγγικό οξύ και δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθούν. Από τους εστέρες των φαινολικών οξέων, ανιχνεύθηκε το trans-καφταρικό οξύ. Επίσης σε μικρές ποσότητες βρέθηκαν οι φλαβονόλες (+)κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη και οι προκυανιδίνες B1 και B2. Στους πίνακες του παραρτήματος δεν αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των προκυανιδινών που ανιχνεύθηκαν, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν μη ποσοτικοποιήσιμες.

Οι Fernandez de Simon και συνεργάτες⁵³, προσδιόρισαν μόνο (+)-κατεχίνη στους φλοιούς σταφυλιών, όμως άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι στους φλοιούς υπάρχουν μονομερείς φλαβονόλες και προκυανιδίνες σε σημαντικές ποσότητες. Εξαιρέση αποτελεί η (-)-επικατεχίνη η οποία ανιχνεύεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στους φλοιούς συγκριτικά με την (+)-κατεχίνη, σε αντίθεση με τα γιγάρτα που οι συγκεντρώσεις τους είναι της ίδιας τάξης μεγέθους.^{64,68} Σε γενικές γραμμές ο προσδιορισμός των διαλυτών φλαβονολών στους φλοιούς παρουσιάζει προβλήματα καθώς βρίσκονται σε χαμηλότερες ποσότητες συγκριτικά με άλλες πολυφαινολικές ουσίες όπως οι φλαβονόλες, οι ανθοκυανίνες και τα παράγωγα των υδροξυκιναμωμικών οξέων. Για το λόγο αυτό συνήθως εφαρμόζονται διάφορες πολύπλοκες τεχνικές διαχωρισμού τους από τους φλοιούς. Επίσης οι φλαβονόλες στους φλοιούς συνήθως έχουν μεγάλο βαθμό πολυμερισμού και απελευθερώνονται με θειόλυση.⁶⁸⁻⁶⁹

4.6.3.4 Σύγκριση περιεχομένου ραγών-φλοιών και γιγάρτων

Στον Πίνακα 4.9 φαίνεται η πολυφαινολική σύσταση όπως προσδιορίστηκε με HPLC για τις ράγες δύο λευκών και δύο ερυθρών ποικιλιών και οι τιμές που προέκυψαν κατά την πρόσθεση των συγκεντρώσεων των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν ξεχωριστά για τα γιγάρτα και τους φλοιούς των ίδιων δειγμάτων. Οι συγκεντρώσεις έχουν εκφραστεί σε mg/Kg φρέσκων ραγών

Όπως γίνεται φανερό η πολυφαινολική σύσταση των ραγών, στην ουσία αποτελεί συνδυασμό της σύστασης των γιγάρτων και του φλοιού, καθώς στις ράγες ανιχνεύονται οι ίδιες ουσίες ποιοτικά και ποσοτικά που βρίσκονται στα γιγάρτα και

τους φλοιούς και επομένως η σάρκα έχει πολύ μικρή συμμετοχή στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των ραγών. Η καλύτερη συσχέτιση βρέθηκε για τις μονομερείς φλαβανόλες εκτός από τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης, ο οποίος βρέθηκε σε χαμηλότερη συγκέντρωση στα γίγαρτα σε σχέση με τις αντίστοιχες ράγες. Το γεγονός αυτό μάλλον οφείλεται σε χαμηλή ανάκτηση της συγκεκριμένης ουσίας κατά τη διαδικασία εκχύλισης των γιγάρτων καθώς δεν υπάρχουν αναφορές ανίχνευσης της στο χυμό των σταφυλιών. Επίσης το trans-καφταρικό οξύ βρέθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στις ράγες σε σχέση με το φλοιό, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη συγκέντρωση τους στο χυμό.

Ένα σημαντικό εύρημα που προκύπτει είναι ότι το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των γιγάρτων είναι σχεδόν ταυτόσημο με των ραγών, ενώ η συμμετοχή των φλοιών είναι πολύ μικρή.

Πίνακας 4.9 Σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου που προσδιορίζεται με εκχύλιση των ραγών σε σχέση με αυτό που προσδιορίζεται κατά την εκχύλιση των γιγάρτων και του φλοιού των αντίστοιχων δειγμάτων

(mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	προκουανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρσεβατραόλη	ε-βινφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερεκτίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερεκτίνης	3-ραμνοσίδης κερεκτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	19,0	7,5	138,4	75,8	24,2	88,9	13,7	13,4	2,0	0,5	ΔΑ**	13,3	5,8	ΔΑ	751,2
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004 γίγαρτα	19,0	13,6	156,2	60,4	33,8	61,7	11,1	4,0	ΔΑ**	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	659,9
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004 φλοιός	19,0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,1	0,8	7,8	5,9	2,9	123,2
Μανδηλαριά Ηράκλειο 2004	17,0	10,0	170,8	119,3	25,4	60,7	ΔΑ	7,5	2,0	0,8	4,5	4,6	2,5	3,6	1362,8
Μανδηλαριά Ηράκλειο 2004 γίγαρτα	17,0	6,8	158,4	103,7	38,1	46,7	6,3	0,4	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1396,8
Μανδηλαριά Ηράκλειο 2004 φλοιός	17,0	0,1	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,2	1,5	6,7	5,1	3,5	1,7	119,5

(mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη B1	προκυανιδίνη B2	προκυανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρεβερατρούλη	ε-βιοφερίνη	3-D-γλαυκοσιδής κερετίνης	3-β-D-γλαυκοσιδής κερετίνης	3-ραμνοσιδής κερετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	17,0	6,8	95,8	39,4	20,5	51,0	6,4	12,8	0,3	ΔΑ	ΔΑ	6,7	17,8	14,9	506,6
Αηδάνι Σαντορίνη 2004 γιγάρτα	17,0	3,7	86,2	35,7	17,7	51,1	12,9	3,0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	412,4
Αηδάνι Σαντορίνη 2004 φλοιός	17,0	0,1	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,1	0,0	0,2	4,0	8,0	8,4	28,9
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	3,3	488,7	101,0	79,0	34,3	45,2	130,2	13,9	ΔΑ	0,5	11,2	3,6	15,2	1587,7
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 γιγάρτα	11,0	2,6	597,5	123,5	79,3	26,9	45,4	118,0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1312,1
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 φλοιός	11,0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,7	0,1	0,2	5,8	1,2	0,2	13,8

* mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

4.6.3.5 Εποχιακή Διακύμανση γιγάρτων

Στα περισσότερα δείγματα που αναλύθηκαν, το πολυφαινολικό περιεχόμενο των γιγάρτων παρουσίαζε συνολικά πτωτική τάση, σε συνάρτηση με την ωρίμανση των σταφυλιών, δηλαδή αύξανε το περιεχόμενο σε σάκχαρα. Η αλλαγή αυτή παρατηρήθηκε τόσο στις ολικές πολυφαινόλες, όσο και στη συγκέντρωση των επιμέρους πολυφαινολών που αναλύθηκαν και ήταν ιδιαίτερα έντονο όταν τα δείγματα έφταναν στο στάδιο της ωρίμανσης. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με προηγούμενα ευρήματα άλλων ερευνητών. Για παράδειγμα οι De Freitas & Glorie,⁶⁴ αναφέρουν ότι κατά την ωρίμανση των σταφυλιών -και κατ' επέκταση των γιγάρτων- μειώνεται το περιεχόμενο τόσο σε μονομερείς φλαβονόλες όσο και σε προκυανιδίνες, με εξαίρεση την προκυανιδίνη B2, η οποία παρουσιάζει αύξηση. Στην παρούσα μελέτη όμως, δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο. Οι Kennedy και συνεργάτες,⁷⁰ οι οποίοι μελέτησαν το περιεχόμενο σε μονομερείς φλαβονόλες και προκυανιδίνες γιγάρτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και κατά την εφαρμογή διαφορετικών καλλιεργητικών τεχνικών, παρατήρησαν μείωση των πολυφαινολών κατά την ωρίμανση, η οποία ήταν περισσότερο έντονη, στα δείγματα τα οποία είχαν αρδευτεί. Σε επόμενη έρευνα οι Kennedy και συνεργάτες⁷¹,

οι οποίοι μελέτησαν τη διακύμανση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών σε γίγαρτα της ποικιλίας Shiraz –για όλα τα στάδια της ανάπτυξης– ανέφεραν ότι τα γίγαρτα αποκτούν το μέγιστο περιεχόμενο σε προκυανιδίνες τρεις εβδομάδες πριν από την πλήρη ωρίμανση. Στη συνέχεια το πολυφαινολικό περιεχόμενο μειώνεται απότομα. Αντίθετα οι μονομερείς φλαβονόλες συνεχίζουν να αυξάνουν ή παραμένουν σχεδόν σταθερές μέχρι την ωρίμανση και στη συνέχεια μειώνονται εκθετικά. Ως πιθανή εξήγηση της απότομης μείωσης του πολυφαινολικού περιεχομένου των γιγάρτων όταν φτάσουν στην πλήρη ωρίμανση, προτάθηκε η θεωρία ότι οι φλαβονόλες οξειδώνονται σύμφωνα με τους παρακάτω δύο τρόπους:

- α) την ελεγχόμενη ή “προγραμματισμένη” οξείδωση
- β) την “μη προγραμματισμένη” οξείδωση.

Στην πρώτη περίπτωση παύει η βιοσύνθεση των φλαβονολών και δίνεται το σήμα για την παραγωγή φαινοξυλικών ριζών. Για τη μέτρηση του φαινομένου χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία EPR (Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy). Το στάδιο αυτό συμπίπτει με την σκλήρυνση και την αλλαγή χρώματος στο εξωτερικό κάλυμμα των γιγάρτων.

Στη δεύτερη περίπτωση, τα επίπεδα και η σύσταση των πολυφαινολών παραμένουν σε σταθερά επίπεδα αν και εξακολουθούν να υπάρχουν οι φαινοξυλικές ρίζες. Αντίθετα οι μονομερείς φλαβονόλες εμφανίζονται πλέον ανθεκτικές απέναντι στην οξείδωση, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στις **π-π** αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών Β-δακτυλίων.⁷² Παράλληλα οι Guo και συνεργάτες,⁷³ ανίχνευσαν σταθερές ρίζες φαινοξυλίου-προκυανιδινών σε γίγαρτα.

Το φαινόμενο αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση του συνολικού βάρους ευθύνεται για την απότομη μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου στις ράγες κατά το στάδιο της ωρίμανσης, η οποία αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.6.1.1.3.

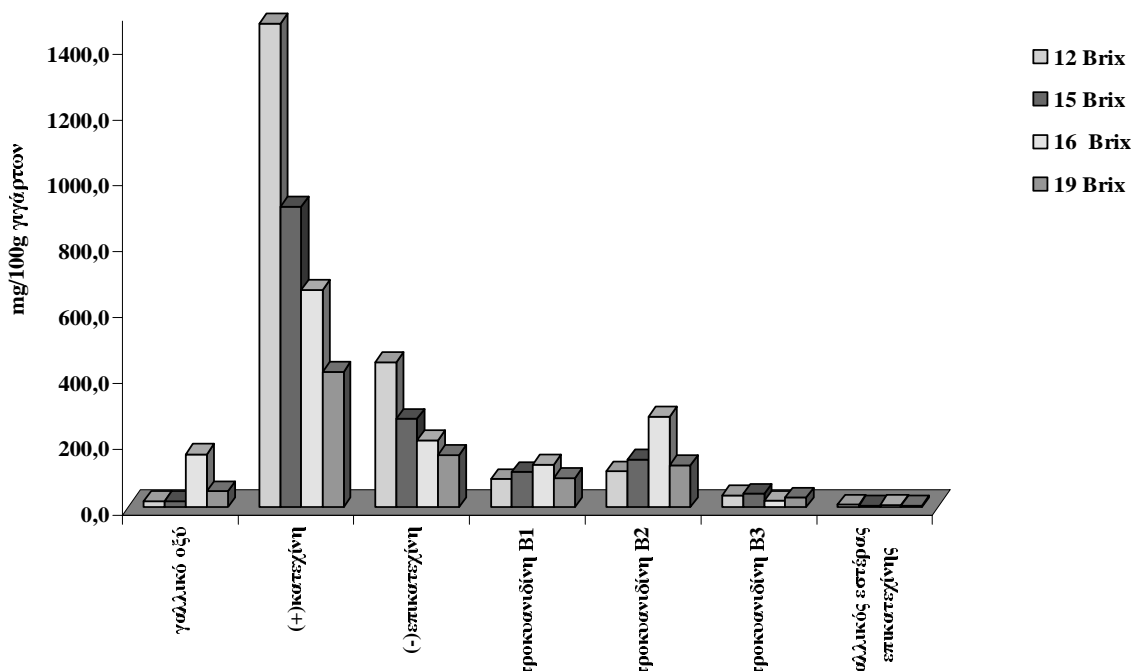
Στον πίνακα 4.10, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση γιγάρτων από ερυθρές ποικιλίες της Σαντορίνης σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των ραγών. Ο βαθμός ωρίμανσης καθορίζεται από τους βαθμούς °Brix. Επίσης στα Γραφήματα 4.7-4.10 φαίνεται η εποχική διακύμανση των επιμέρους πολυφαινολών και των ολικών πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν σε γίγαρτα διαφόρων ποικιλιών της Σαντορίνης.

Πίνακας 4.10 Εποχιακή διακύμανση πολυφαινολών από γίγαρτα ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/100g γιγάρτων)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)καταεζίνη	(-)επικατεζίνη	προκουανιδίνη B1	προκουανιδίνη B2	προκουανιδίνη B3	γαλλικός εστέρας επικατεζίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2004	12,0	18,08	1470,89	440,18	86,3	109,8	36,2	7,8	3586,5
	15,0	19,3	914,4	269,6	107,7	145,1	41,1	5,9	2210,1
	16,0	161,7	661,2	203,3	129,2	275,3	20,4	7,2	2612,5
	19,0	48,6	411,1	158,9	89,0	128,6	29,2	5,5	1736,6
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	33,4	214,5	221,1	73,5	160,6	72,6	18,8	1732,2
	16,5	35,9	279,9	183,5	100,3	143,0	62,6	16,5	1684,4
	20,0	1,5	219,3	168,3	35,2	126,0	31,2	8,8	1808,8
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	7,22	1067,04	220,5	172,41	74,79	98,59	284,2	3313,5
	16,0	29,75	1505,21	450,3	146,32	69,57	73,16	118,1	5199,5
	20,0	8,89	403,35	116,0	83,12	58,82	22,52	6,06	2711,7
Ληδανι Σαντορίνη2004	14,0	19,4	513,5	126,3	32,6	82,0	99,5	49,2	1281,2
	15,0	10,9	555,0	168,3	55,6	73,7	146,8	38,5	1127,8
	17,0	9,35	143,63	89,21	44,37	127,86	32,21	7,39	824,8

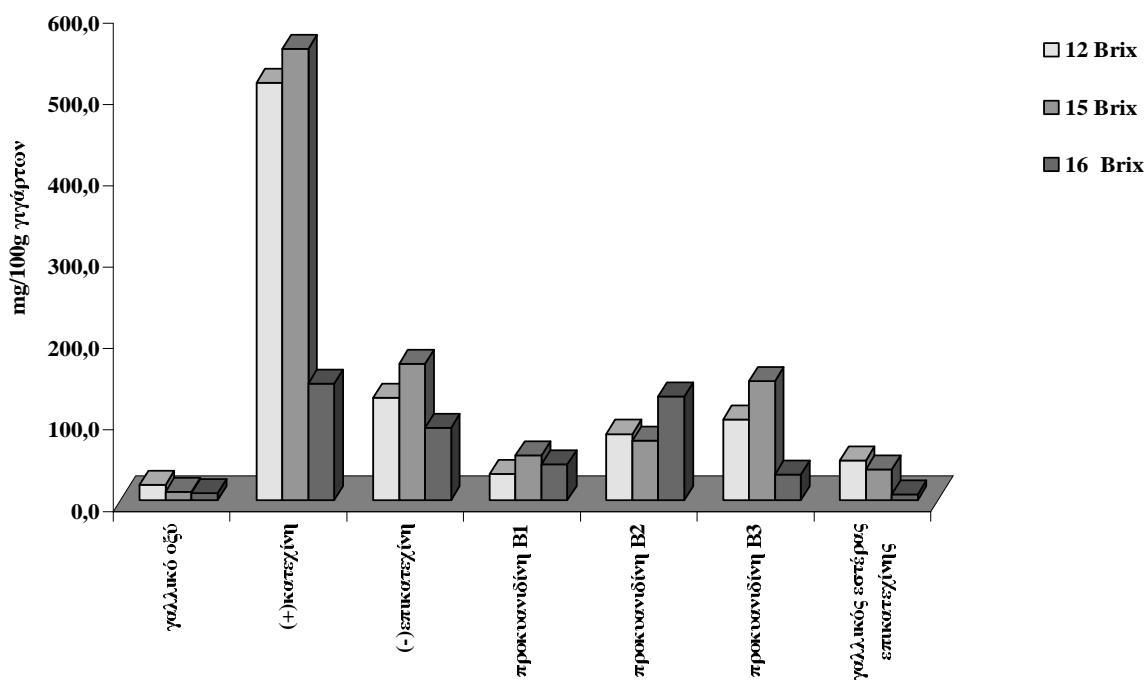
*mg γαλλικού οξέος / 100g γιγάρτων

Γίγαρτα μανδηλαριάς Σαντορίνης



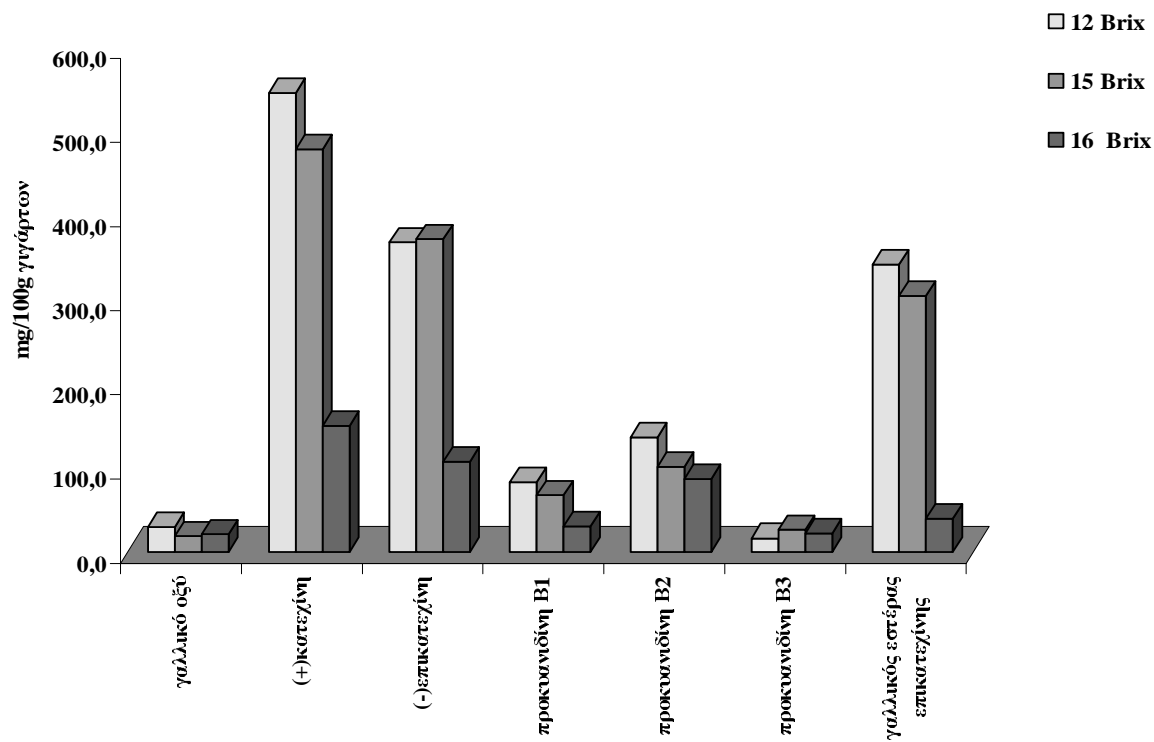
Γράφημα 4.7 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου γιγάρτων μανδηλαριάς στα διάφορα στάδια ωρίμανσης των σταφυλιών

Γιγάρτα αηδάνι Σαντορίνης

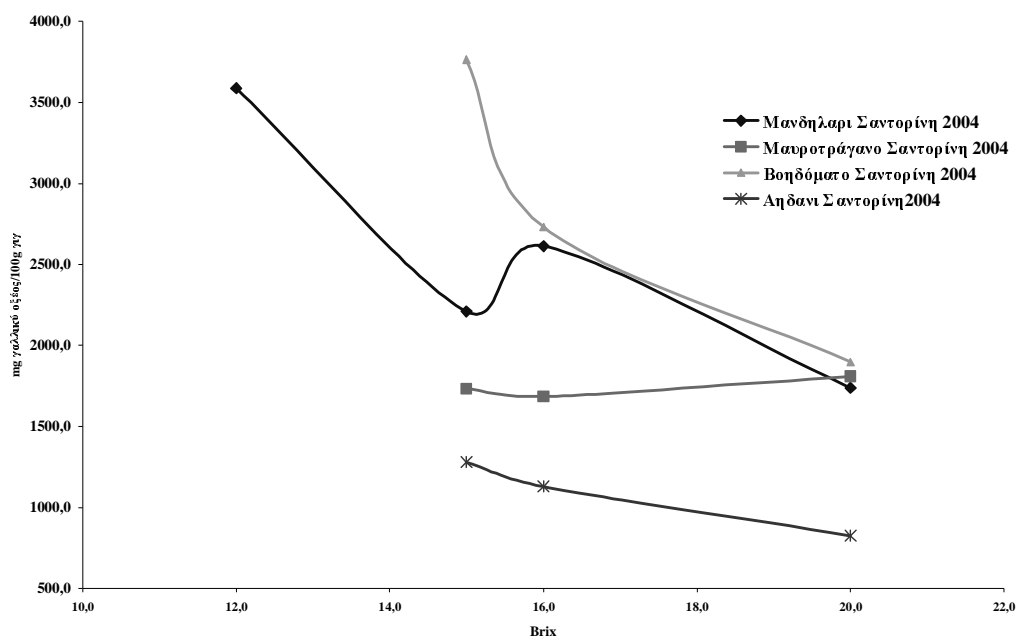


Γράφημα 4.8 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου γιγάρτων αηδάνι στα διάφορα στάδια ωρίμανσης των σταφυλιών

Γιγάρτα βοηδόματο Σαντορίνης



Γράφημα 4.8 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου γιγάρτων αηδάνι στα διάφορα στάδια ωρίμανσης των σταφυλιών



Γράφημα 4.10 Μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου γιγάρτων σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

4.6.3.6 Ετήσια διακύμανση γιγάρτων

Στον Πίνακα 4.11 παρουσιάζεται η ετήσια διακύμανση των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν για γιγάρτα ερυθρών ποικιλιών της Σαντορίνης μεταξύ των ετών 2004–2005 κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Όπως είναι εμφανές η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών για κάθε ποικιλία παραμένει σχεδόν σταθερή, ενώ μεταξύ των επιμέρους πολυφαινολών υπάρχουν κάποιες διακυμάνσεις, χωρίς όμως να διαμορφώνεται κάποια συγκεκριμένη τάση.

Πίνακας 4.11 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολών γιγάρτων

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/100g γιγάρτων)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	γαλλικός στέβρος επικατεχίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2004	19,0	48,6	411,1	158,9	89,0	128,6	29,2	5,5	1936,6
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2005	19,0	15,4	481,3	173,7	84,4	144,1	7,9	7,0	2199,0
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	20,0	1,5	219,3	168,3	35,2	126,0	31,2	8,8	1808,8
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	24,0	0,1	181,1	192,0	45,9	112,0	16,6	16,2	1826,3
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	20,0	21,3	150,1	107,6	30,9	87,4	22,1	40,2	1898,2
Βοηδοματο Σαντορίνη 2005	26,5	0,2	151,5	309,2	39,4	121,6	46,0	27,9	2279,5

*mg γαλλικού οξέος / 100g γιγάρτων

4.6.3.7 Εποχική Διακύμανση φλοιών

Σε αντίθεση με τις ράγες και τα γίγαρτα, η συγκέντρωση των πολυφαινολών που ανιχνεύονται στους φλοιούς εμφανίζει μάλλον ανοδική τάση, τόσο στις συνολικές όσο και στις επιμέρους πολυφαινόλες. Οι κυριότερες πολυφαινόλες που εντοπίστηκαν στους φλοιούς ήταν γλυκοζίτες της κερκετίνης και στιλβένια. Τα στιλβένια δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη τάση, καθώς η βιοσύνθεση τους ευνοείται σε συνθήκες στρες για το φυτό. Η ε-βινιφερίνη εντοπίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την *trans*-ρεσβερατρόλη. Η *trans*-ρεσβερατρόλη εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε δείγματα τα οποία έχουν προσβληθεί από ασθένειες-κυρίως βοτρυτή- και η μέγιστη συγκέντρωση στην οποία ανιχνεύθηκε είναι 6,18 mg/100g φλοιού.

Οι γλυκοζίτες της κερκετίνης αυξάνουν όσον αυξάνει η συγκέντρωση των σακχάρων στις ράγες, φτάνοντας στη μέγιστη συγκέντρωση στο στάδιο της ωρίμανσης. Άλλωστε σύμφωνα με τους Coombe και McCarthy⁷⁴, η φάση της πλήρους ωρίμανσης, χαρακτηρίζεται εκτός από το μέγιστο περιεχόμενο των ραγών σε νερό και σάκχαρα και από συσσώρευση μη-ανθοκυανινών- γλυκοσιδών.

Η αύξηση των ολικών πολυφαινολών είναι πιο έντονη στις ερυθρές ποικιλίες και αυτό οφείλεται κυρίως στην σύνθεση των ανθοκυανινών, των χρωστικών που εντοπίζονται στην επιδερμίδα των ερυθρών σταφυλιών.

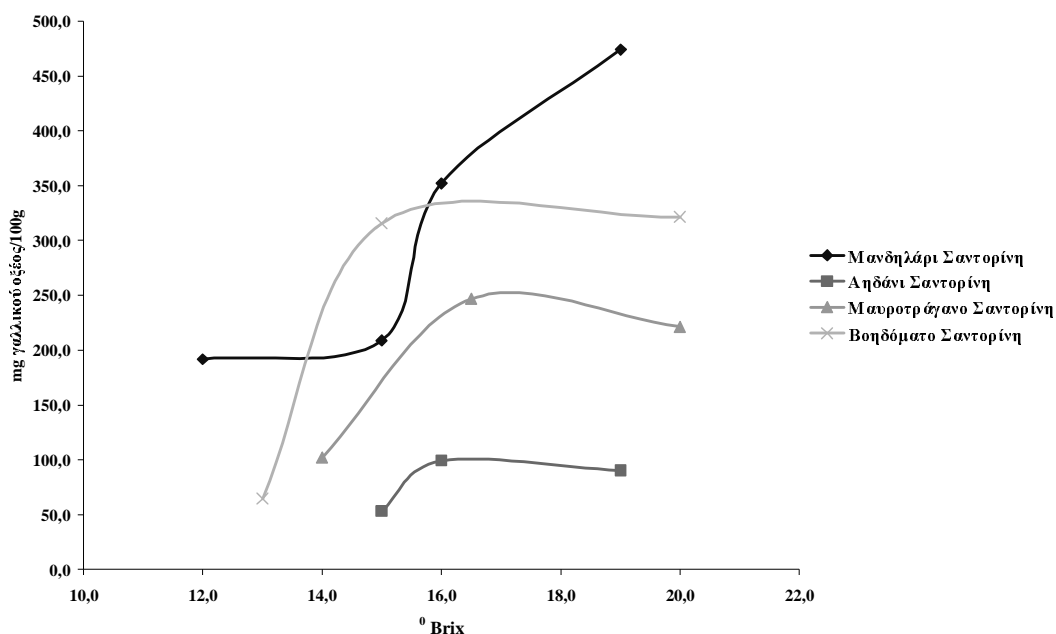
Στα Γραφήματα 4.11-4.13 εμφανίζεται η εποχική μεταβολή των ολικών και των επιμέρους πολυφαινολών του φλοιού για ερυθρές και λευκές ποικιλίες σταφυλιών.

Πίνακας 4.12 Εποχιακή διακύμανση πολυφαινολικής σύστασης φλοιών ερυθρών και λευκών ποικιλιών

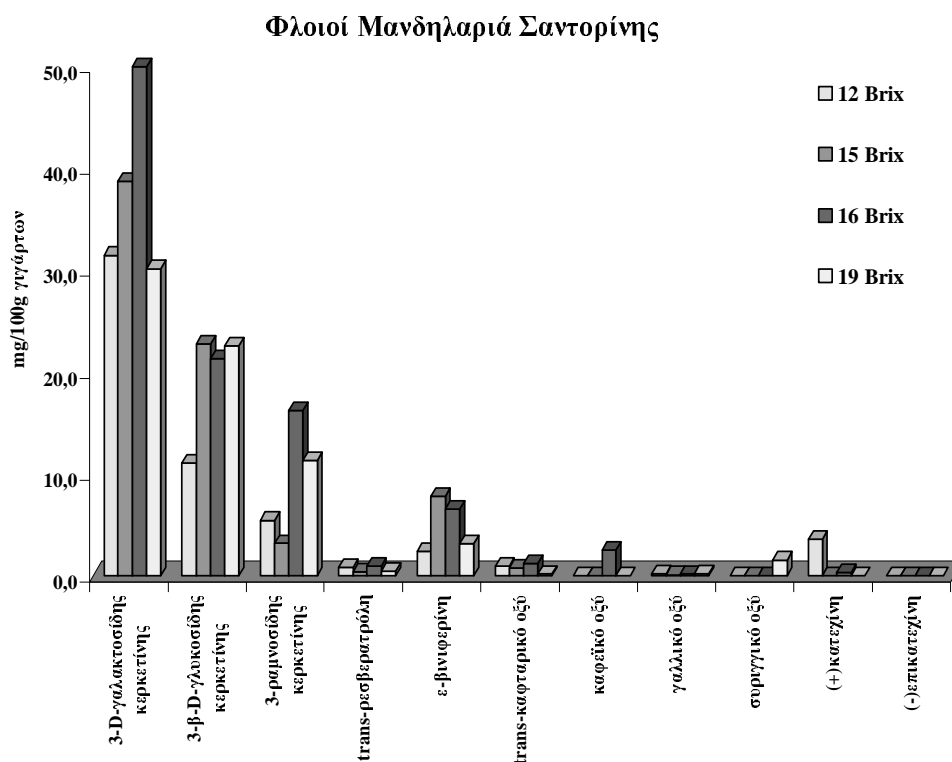
ΦΛΟΙΟΙ (mg/100g φλοιού)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	3-D-γαλακτοσίδης κερακτινής	3-β-D-γλυκοσίδης κερακτινής	3-ραμνοσίδης κερακτινής	κερακτινική	καμφορόλη	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	trans-καφαρυμικό οξύ	καφεϊκό οξύ	γαλλικό οξύ	συγγυτικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	12,0	31,45	11,06	5,45	ΔΑ**	0,51	0,85	2,38	0,95	ΔΑ	0,22	ΔΑ	3,58	ΔΑ	191,7
	15,0	38,72	22,72	3,19	ΔΑ	ΔΑ	0,40	7,82	0,77	ΔΑ	0,11	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	208,7
	16,0	49,94	21,28	16,24	ΔΑ	1,10	0,93	6,53	1,20	2,50	0,17	ΔΑ	0,35	ΔΑ	352,0
	19,0	30,14	22,56	11,31	0,08	0,33	0,44	3,14	0,18	ΔΑ	0,19	1,55	ΔΑ	ΔΑ	473,9
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	10,90	7,91	2,61	ΔΑ	ΔΑ	0,04	1,10	0,09	0,49	0,12	0,34	ΔΑ	ΔΑ	102,0
	16,5	26,29	21,91	16,97	2,12	0,15	ΔΑ	2,27	0,34	0,32	0,77	1,20	2,18	ΔΑ	246,7
	20,0	23,71	26,64	15,30	ΔΑ	0,16	ΔΑ	1,77	0,26	0,34	0,69	1,30	2,37	ΔΑ	221,4
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	14,0	16,48	6,12	4,33	0,17	0,19	0,07	0,61	2,04	0,13	0,62	ΔΑ	8,14	1,71	53,2
	15,0	9,57	3,87	3,91	0,69	0,45	ΔΑ	0,28	0,45	ΔΑ	2,23	ΔΑ	3,31	1,73	99,3
	17,0	6,53	12,84	13,47	ΔΑ	0,38	ΔΑ	0,51	0,16	ΔΑ	0,02	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	90,4
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	50,07	10,72	1,95	0,17	ΔΑ	1,18	1,71	5,86	ΔΑ	0,18	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	119,3
	16,0	56,66	16,70	2,73	ΔΑ	ΔΑ	0,04	2,20	3,87	ΔΑ	0,09	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	167,7

* mg γαλλικού οξέος / 100g φλοιού

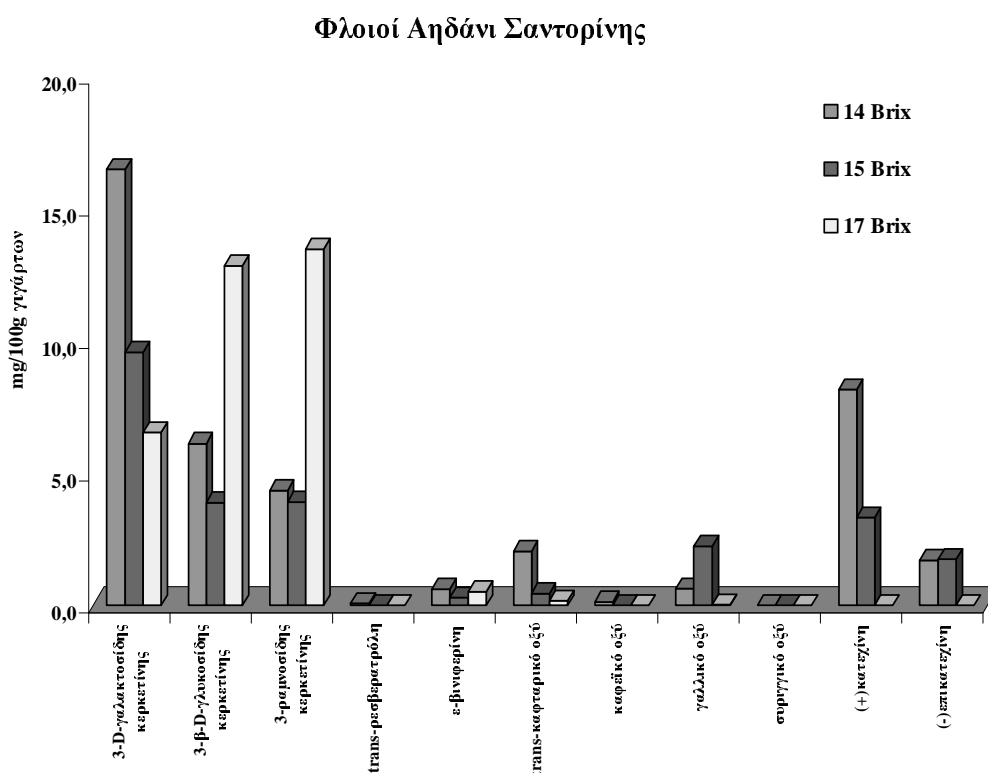
** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε



Γράφημα 4.13 Μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου φλοιών σε διάφορα στάδια ωρίμανσης



Γράφημα 4.11 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου φλοιών μανδηλαριάς στα διάφορα στάδια ωρίμανσης



Γράφημα 4.12 Μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου φλοιών αηδάνι στα διάφορα στάδια ωρίμανσης

4.6.4 Φαινολικά οξέα από υδρόλυση εστέρων

Στους Πίνακες 13B–15B του παραρτήματος Β παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων που απελευθερώθηκαν κατά την υδρόλυση των εστέρων τους στα δείγματα ραγών, φλοιών, γιγάρτων και στεμφύλων που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg/kg ραγών και στεμφύλων και mg/100g γιγάρτων ή φλοιών.

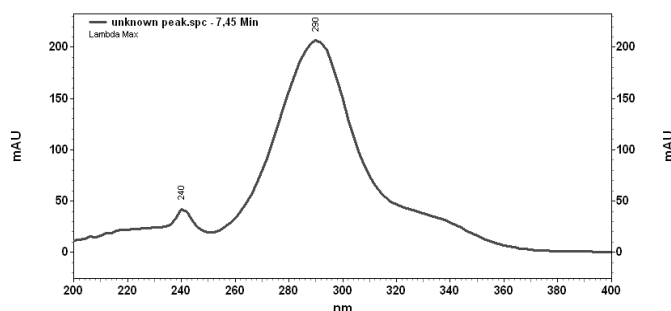
Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα ανιχνεύθηκαν: γαλλικό, πρωτοκατεχικό, βανιλικό και συριγγικό οξύ.

Από τα υδροξυκιναμμομικά οξέα ευρέθησαν: καφεϊκό, π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ.

Τέλος στα χρωματογραφήματα πολλών δειγμάτων εμφανίστηκε μια κορυφή με μέγιστο απορρόφησης στα 290 nm, η οποία δεν έγινε δυνατό να ταυτοποιηθεί. (Εικόνα 4.6). Για την ποσοτικοποίηση αυτής της κορυφής χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των προσδιορισμών, είναι αξιοσημείωτο ότι σε ελεύθερη μορφή ανιχνεύθηκε στις ράγες μόνο το γαλλικό οξύ, ενώ μετά τη διαδικασία της υδρόλυσης απελευθερώθηκαν σημαντικές ποσότητες φαινολικών οξέων. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα φαινολικά οξέα, στους φυτικούς ιστούς, βρίσκεται με τη μορφή εστέρων.

Το γαλλικό και το π-κουμαρικό οξύ ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλα τα δείγματα σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις. Το συριγγικό οξύ, βρέθηκε σε μεγάλες ποσότητες στις ερυθρές ποικιλίες ως συστατικό του φλοιού, αντίθετα το πρωτοκατεχικό βρέθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στους φλοιούς των λευκών σταφυλιών.



Εικόνα 4.6 Φάσμα απορρόφησης στο UV της άγνωστης κορυφής που εμφανίζεται στα χρωματογραφήματα των υδρολυμένων φαινολικών οξέων.

4.7 Βιβλιογραφία 4^ο κεφαλαίου

- 1) Lambert-Gocs M. Τα ελληνικά κρασιά, οδοιπορικό στη χώρα του Διονύσου, Τρίαινα εκδοτική, Αθήνα **1993**.
- 2) <http://www.greekwinemakers.com>
- 3) Κούσουλας Κ. Αμπελουργία, Εκδοτική Αγροτεχνική ΑΕ, Αθήνα **1995**.
- 4) Demrow H. S., Slane P. R., Folts J.D. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **1995**, *91*, 1182–1188.
- 5) Shanmuganayagam, D., Warner, T. & Folts, J. D. Effect of purple grape juice on platelet activity and development of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *FASEB J.* **1999**, *13*: 239A
- 6) Vinson, J. A., Teufel, K. & Wu, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* **2001**, *156*, 67–72.
- 7) Folts J. Antithrombotic potential of grape juice and red wine for preventing heart attacks. *Pharm. Biol.* **1998** *36*: 1–7.
- 8) Folts J. D., Demrow, H. S., Slane, P. R. Two glasses of red wine but not white wine inhibit *ex vivo* platelet aggregation and increase bleeding time in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1994**, *66* A:Abstract.
- 9) Keevil K., Osman H. E., Reed J. D. and Folts J. D. Grape Juice, But Not Orange Juice or Grapefruit Juice, Inhibits Human Platelet Aggregation. *J. Nutr.* **2000**, *13*, 53–56.
- 10) Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakariah K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Internat.* **2003**, *36*, 117–122.
- 11) Baydar N. G., Ozkan G., Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Contr.* **2004**, *15*, 335–339.

- 12) Thuille N., Fille M., Nagl M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, *206*, 217–221.
- 13) Rhodes P.L., Mitchell J.W., Wilson M.W. and Melton L.D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier, *Internat. J. Food Microbiol.* **2006**, *107*, 281–286.
- 14) Karapinar M. and Sengun I. Y. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape—*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food Control* **2006**, article in press.
- 15) Agarwal,C., Sharma,Y. and Agarwal,R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol. Carcinog.* **2000a**, *28*, 129–138.
- 16) Agarwal,C., Sharma,Y., Zhao,J. and Agarwal,R. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation. *Clin. Cancer Res.* **2000b**, *6*, 2921–2930.
- 17) Agarwal C., Singh R. P and Agarwa R. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome *c* release. *Carcinogenesis* **2002**, *23* (11), 1869–1876.
- 18) Morre D. M. And Morre D. J. Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. *Cancer Lett.* **2006**, *238*, 202–209.
- 19) Zhao J., Wang J., Chen Y. and Agarwal R. Antitumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (9), 1737–1745.
- 20) Sharma G., Tyagi A. K., Singh R. P., Daniel C. F., Chan D. C. F. and Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res. Treatm.* **2004**, *85*, (1–12).

- 21) Park Y. K., Park E., Kima J-S, Kang M-H. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mut. Res.* **2003**, 529, 77–86.
- 22) Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, 15 (6), 1013–1022.
- 23) Konowalchuk J. And Speirs J. I. Virus Inactivation By Grapes And Wines. *Appl. Envir. Microbiol.* **1976**, 6, 757–763.
- 24) Konowalchuk, J. and Speirs, J.I. Antiviral effect of commercial juices and beverages. *Appl. Envir. Microbiol.* **1978**, 35, 1219–1220.
- 25) Cohen, Pl, Phillips, S-A., Lipson, S. M. The training of undergraduate science majors in virological techniques: research application to anti-viral activity by comestible juices. *ASMCUE* **2004**, abstract, 17-B
- 26) Nair N., Mahajan S., Chawda R., Kandaswami C. Shanahan T. C., and Stanley A. Schwartz S. A. Grape Seed Extract Activates Th1 Cells In Vitro, *Clin. Diagn. Labor. Immunol.* **2002**, 9 (2), 470–476.
- 27) Jayaprakasha G. K., Singh R. P., Sakariah K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.* **2001**, 73, (3), 285–290.
- 28) Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V, Spatafora C., Tringali C., De Tommasi N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem.* **2007**, 100, 203–210.
- 29) Yilmaz Y., Toledo R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Comp. Anal.* **2006**, 19, 41–48.
- 30) Shaker E. S. Antioxidative effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. *LWT* **2006**, 39, 883–892.

- 31) Pazos M., Gallardo J. M., Torres J. L., Medina I. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* **2005**, *92*, 547–557.
- 32) Mielnik M.B., Olsen E., Vogt G, Adeline D., Skrede G. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT* **2006**, *39*, 191–198.
- 33) Lau D. W. and King A. J. Pre- and Post-Mortem Use of Grape Seed Extract in Dark Poultry Meat To Inhibit Development of Thiobarbituric Acid Reactive Substances. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1602–1607.
- 34) Ahn J., Grün I.U., and Fernando L.N. Antioxidant Properties of Natural Plant Extracts Containing Polyphenolic Compounds in Cooked Ground Beef. *J. Food Sci.* **2002**, *67* (4), 1364–1369.
- 35) Kotamballi N. Murthy C., Singh R P. and K. Jayaprakasha G. K. Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, (21) 5909 –5914.
- 36) Balu M., Sangeetha P., Murali G., Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res. Bull.* **2006**, *68*, 469–473
- 37) Nuttall S. L., Kendall M. J., Bombardelli E., Morazzoni P. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leuctoselect, *J. Clin. Pharm. Theraup.* **1998**, *23*, 385–389.
- 38) Naczki M. and Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1054*, 95–111.
- 39) Santos-Buelga C., ed. Methods in polyphenol analysis, Universidad de Salamanca, Spain **2003**.
- 40) Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887.
- 41) Krygier K., Sosulski F. and Hogge L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30* 330–334.

- 42) Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching, *Trends Analyt. Chem.* **2003**, 22 (1), 41–47.
- 43) Palma M. and Barroso C. G. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 458, 119–130.
- 44) Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.I., Lazurca D., Mason T.J. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason. Sonochem.* **1997**, 4, 135–139
- 45) Chilla C., Guillen D.A., Barroso C.G., Perez-Bustamante J.A. Automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine. *J. Chromatogr. A* **1996**, 750, 209–214.
- 46) Negro C., Tommasi L. and Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Biores. Technol.*, **2003**, 87, (1), 41–44.
- 47) <http://www.nottingham.ac.uk/supercritical/scintro.html>
- 48) Oszmianski J. and Lee C. Y. Isolation and HPLC Determination of Phenolic Compounds in Red Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, (3), 204–206
- 49) Pena-Neira A., Duenas M., Duarte A., Hernandez T., Estrella I., Loyola E. Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis* **2004**, 43 (2) 51–57.
- 50) Andrade P. B., Mendes G., Falco V., Valentao P., Seabra R., M. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. *Food Chem.* **2001**, 73, 397–399.
- 51) Spayd S. E. , Tarara J. M., Mee D. L., and Ferguson J. C. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, (3), 171–182.
- 52) Fernandez de Simon B., Hernandez T., Estrella I. and Gomez-Cordoves C. Variation in phenol content in grapes during ripening: low-molecular-weight phenols. *Z Lebensm Unters Forsch* **1992**, 194, 351–354.

- 53) Pastrana-Bonilla E., Akoh C.C., Sellappan S., and Krewer G. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (18), 5497–5503.
- 54) Waterhouse A. L and Lamuela-Raventos, R. M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* **1994**, *37* (2), 571–573.
- 55) Waterhouse A. L., Romero-Perez, A. I., Lamuela-Raventos, R. M. Direct HPLC Analysis of *cis*- and *trans*-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis vinifera* Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 281–283.
- 56) Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Cheze, C., Vercauteren, J. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *964*, 123–128.
- 57) Cantos E., Garcia-Viguera C., De Pascual-Teresa S., Tomas-Barberan F. A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem*, **2000**, *48*, 4606–4612.
- 58) Roldan A., Palacios V., Caro I., Perez L. Resveratrol content of Palomino fino grapes influence of vintage and fungal infection. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1464–1468.
- 59) Lee C. Y. and Jaworski A. Major Phenolic Compounds in Ripening White Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*(1), 43–46.
- 60) Romeyer F. M., Macheix J. J., Goiffon J. P., Reminiac C. C. and Sapis J. C. The Browning Capacity of Grapes. 3. Changes and Importance of Hydroxycinnamic Acid-Tartaric Acid Esters during Development and Maturation of the Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 346–349.
- 61) De Freitas V. A. P., Glories Y. and A. Monique A. Developmental Changes of Procyanidins in Grapes of Red *Vitis vinifera* Varieties and Their Composition in Respective Wines, *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51* (4), 397–403.
- 62) Guendez R., Kallithraka S., Makris D. P., Kefalas P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. *Food Chem.* **2005a**, *89* (1), 1–9.

- 63) Guendez R., Kallithraka S., Makris D. P., Kefalas P. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera*) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals, *Phytochem. Anal.* **2005b**, *16*, 17–23.
- 64) De Freitas V. A. P., and Yves Glories Y. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79* (12), 1601–1606.
- 65) Fuleki T. and Ricardo da Silva J. M. Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (4), 1156–1160.
- 66) Escribano-Bailon T., Gutierrez-Fernandez Y., Rivas-Gonzalo J. C., and Santos-Buelga C. S. Characterization of Procyanidins of *Vitis vinifera* Variety Tinta del Pais Grape Seeds. *J. Agric. Food Chem.* (**1992**, *40*, 1794-1799
- 67) De Freitas V. A. P., Glories Y., Bourgeois G. and Vitry C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry* **1998**, *49* (5), 1435-1441.
- 68) Escribano-Bailon M. T., Guerra M. T., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Z Lebensm Unters Forsch.* **1995**, *200*, 221-224.
- 69) Souquet J.-M., Cheynier V., Brossaud F. and Moutounet M. Polymeric Proanthocyanidins From Grape Skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, (2) 509-512.
- 70) Kennedy, J.A., Matthews, M.A. and Waterhouse, A.L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochem.* **2000a**, *55*, 77–85.
- 71) Kennedy J. A., Troup G. J., Pilbrow J. R., Hutton D. R., Hewitt D., Hunter C. R., Ristic R., Iland P., G., and Jones G. P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000b**, *6*, 244–254.
- 72) Hatano, T. and Hemingway, R.W. Conformational isomerism of phenolic procyanidins: preferred conformations in organic solvents and water. *J. Royal Soc. Chem. Perkin Transactions* **1997**, *2*, 1035–1043.

- 73) Guo, Q., Zhao, B. and Packer L. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27, 1308–1312.
- 74) Coombe B.G. and McCarthy, M.G. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, 6, 131–135.

5. ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

5.1.1 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια των σταφυλιών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη παγκοσμίως, κυρίως στις χώρες της εύκρατης ζώνης αποτελώντας έναν ιδιαίτερα δυναμικό κλάδο της οικονομίας. Το 2004 η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών, έφτασε τα 61 εκατομμύρια τόνους και ήταν δεύτερη σε μέγεθος παραγωγή υπολειπόμενη κατά ένα μικρό ποσοστό της παραγωγής των πορτοκαλιών¹. Είναι αξιοσημείωτο ότι το 80% περίπου της παραγωγής αυτής χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, με αποτέλεσμα να παράγονται ετησίως από τα οινοποιεία τεράστιες ποσότητες οργανικών υποπροϊόντων – λυμάτων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, τανίνες και άλλες οργανικές ενώσεις. Τα σύνολο των υποπροϊόντων ανά έτος αντιστοιχεί περίπου σε 10 εκατομμύρια τόνους που ισοδυναμεί με το 17% του βάρους των σταφυλιών που οινοποιούνται. Το ποσοστό αυτό συνεχώς μεγεθύνεται, ως αποτέλεσμα της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης για την παραγωγή οίνων ανώτερης ποιότητας. Αντίστοιχα, στην Ελλάδα οινοποιούνται –από 400 οινοποιεία– 520.000 τόνοι σταφυλιών ανά έτος παράγοντας



Εικόνα 5.1 Στέμφυλα που έχουν απορριφθεί μετά την οινοποίηση



Εικόνα 5.2 Οινολάσπες που παράγονται κατά τη διαδικασία της οινοποίησης².

περίπου 120.000 τόνους υποπροϊόντων

Παγκοσμίως, τα περισσότερα οινοποιεία είναι μικρής κλίμακας επιχειρήσεις που είναι διάσπαρτες σε επαρχίες και δεν έχουν τα μέσα και τις δυνατότητες να διαχειριστούν κατάλληλα τα οργανικά τους απόβλητα. Έτσι είναι συνήθης πρακτική να τα εναποθέτουν σε αγρούς με στόχο τη μετατροπή τους σε λίπασμα με αερόβια διάσπαση (βιοαποικοδόμηση). Τα στερεά απόβλητα κατά τη διαδικασία αυτή παραμένουν εκτεθειμένα, αποτελώντας σημαντική εστία μόλυνσης, κυρίως λόγω του όγκου και των πολλών φυσικών προϊόντων που εμπεριέχουν. Άλλωστε θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι παράγονται μαζικά μέσα σε ελάχιστο χρονικό διάστημα (όσο διαρκεί ο τρυγητός και η οινοποίηση). Το μεγαλύτερο μέρος τους αντιστοιχεί στα στέμφυλα (περισσότερο από το 50% του συνολικού βάρους), ακολουθούμενο από τους βόστρυχους και τις οινολάσπες³. Ένας επιπλέον παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι το γεγονός ότι το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο διαθέτει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση των βακτηρίων που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση. Έτσι, η μάζα αυτή παραμένει στο περιβάλλον δημιουργώντας σημαντική όχληση και συμβάλλοντας στην εμφάνιση φυτοτοξινών φαινομένων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών, την υποβάθμιση της ποιότητας του πόσιμου ύδατος, τον θάνατο των ευπαθών θαλάσσιων ζωικών οργανισμών κλπ

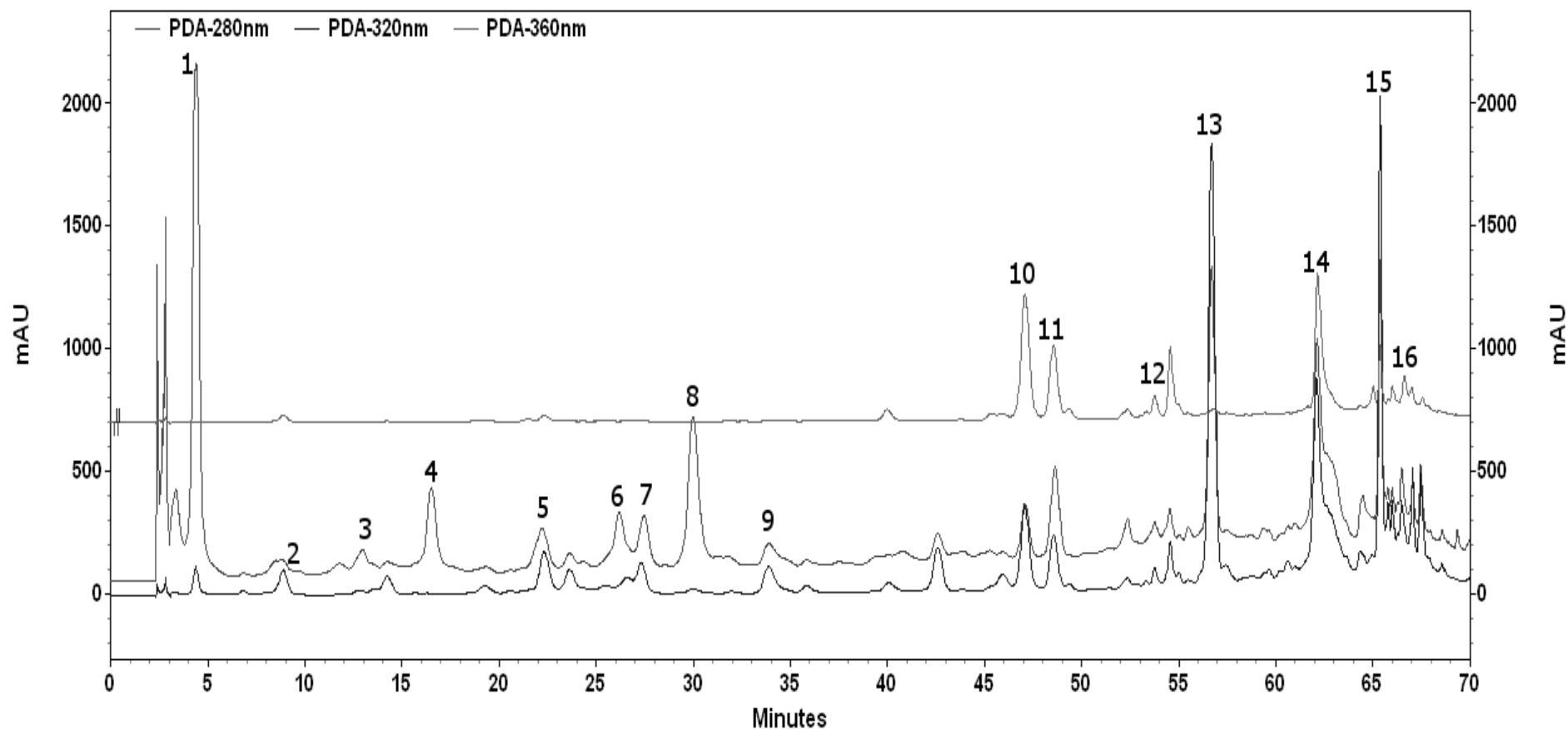
Ο χαρακτηρισμός των οργανικών αυτών αποβλήτων ως υποπροϊόντων της οινοποίησης υποδηλώνει ότι υπάρχει σημαντική δυνατότητα αξιοποίησής τους για την παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων, όπως για παράδειγμα ποικίλων αποσταγμάτων (τσίπουρο, ρακί κλπ), καθαρής αιθανόλης, ζωοτροφών και οργανικού λιπάσματος. Εκτός όμως από τις παραδοσιακές και περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος αυτές χρήσεις, το ενδιαφέρον για τη διαχείριση των υποπροϊόντων της οινοποίησης έχει τα τελευταία χρόνια ανανεωθεί, αφού αυτά αποτελούν μια πλούσια πηγή για την ανάκτηση από αυτά των βιοδραστικών μορίων (κυρίως πολυφαινολών) υψηλής βιολογικής και οικονομικής αξίας. Είναι γνωστό ότι τα σταφύλια, περιέχουν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών, οι οποίες κατανέμονται κυρίως στα στερεά μέρη του φυτού (φλοιοί, γίγαρτα, βόστρυχοι). Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών εκχυλίζεται στον παραγόμενο οίνο –κυρίως κατά την ερυθρά οινοποίηση– ενώ οι υπόλοιπες καταλήγουν στα υποπροϊόντα της οινοποίησης. Οι παρουσία των πολυφαινολών σε αυτά, σε συνδυασμό με την τάση αντικατάστασης των συνθετικών χημικών με αντίστοιχα φυτικής προέλευσης, έχει

εγκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών για την αξιοποίηση του υλικού αυτού, προς την κατεύθυνση της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

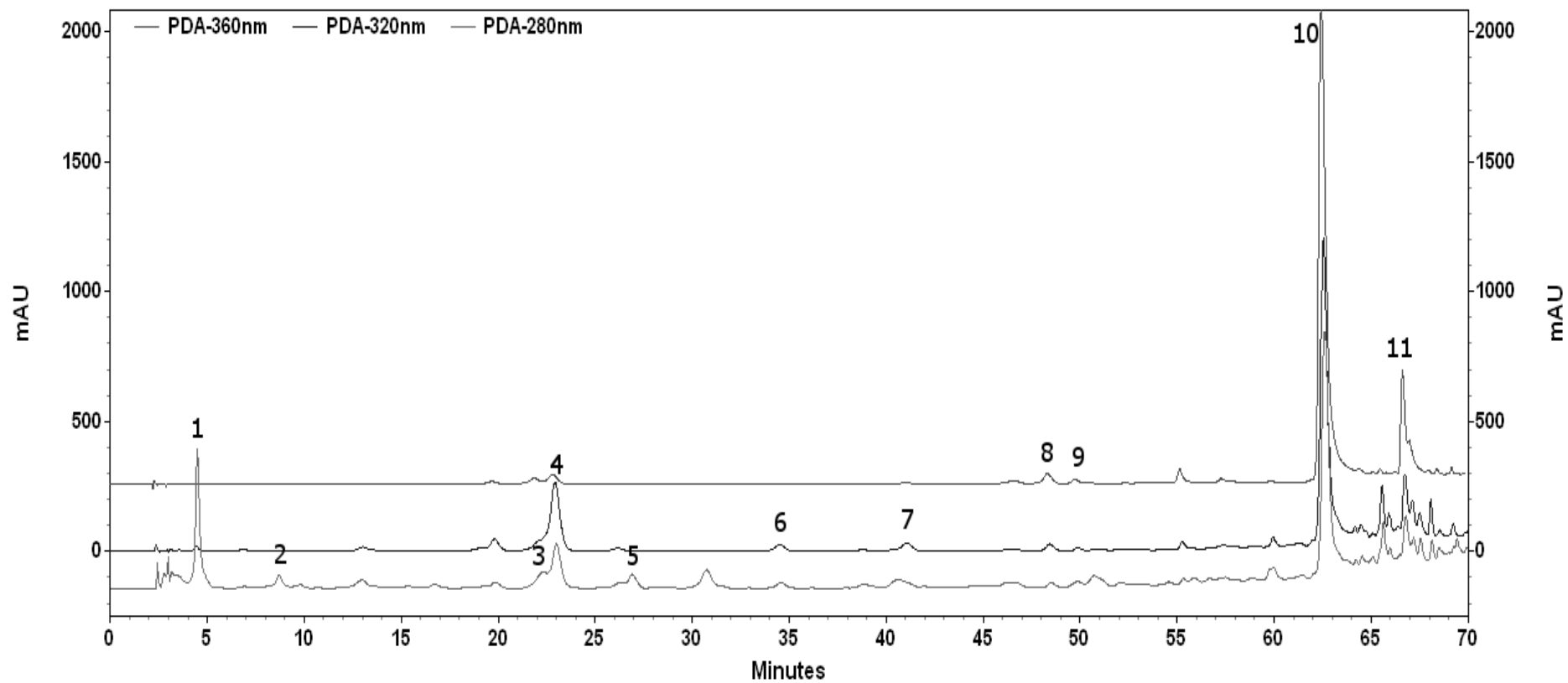
Ένας από τους στόχους της διατριβής είναι η διερεύνηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των υποπροϊόντων της οινοποίησης που παράγονται από ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών και ο προσδιορισμός του αντιοξειδωτικού τους δυναμικού.

5.1.2 Ανάλυση Υποπροϊόντων Οινοποίησης

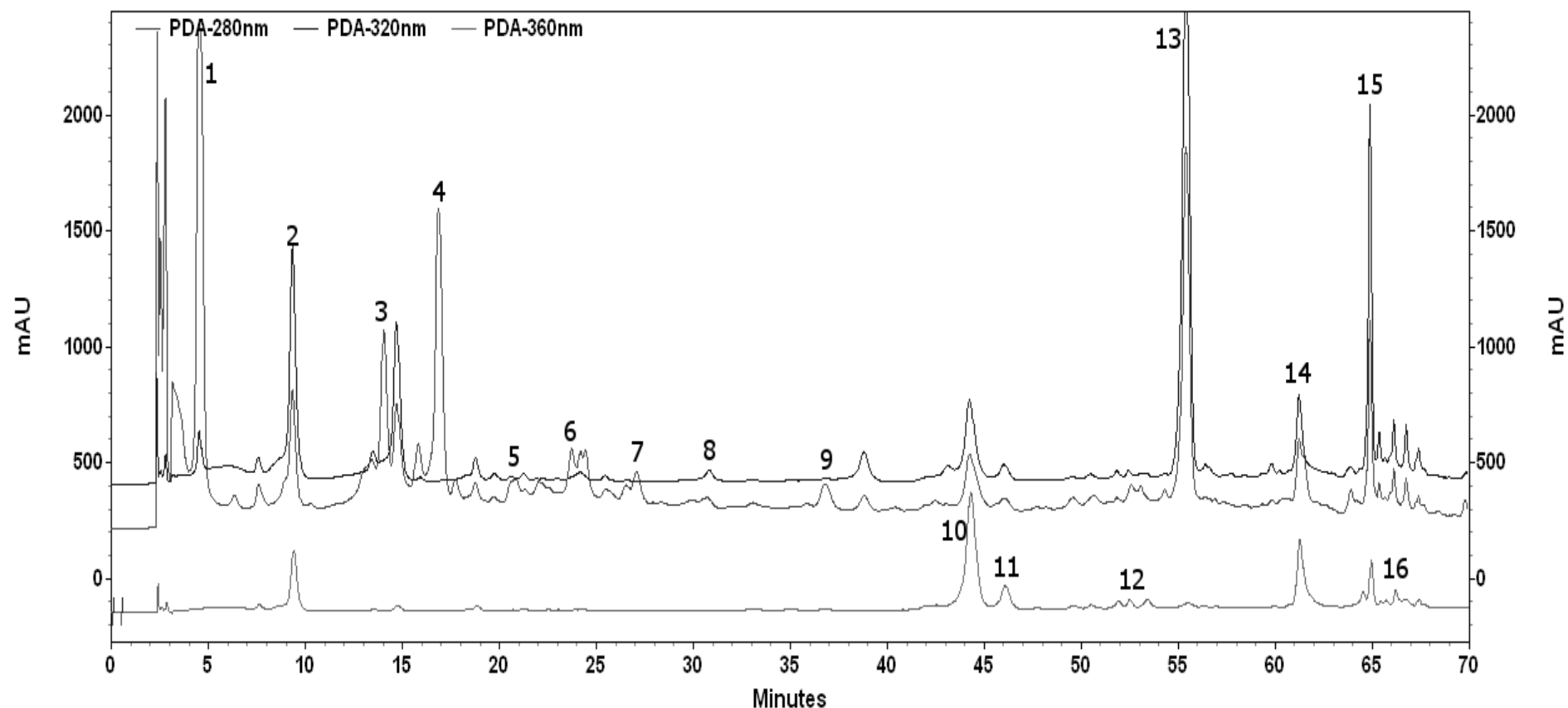
Τα δείγματα των υποπροϊόντων της οινοποίησης που μελετήθηκαν (βόστρυχοι, γιγάρτα, στέμφυλα και οινολάσπες) συλλέχθηκαν από διάφορα οινοποιεία κατά τις οινοποιητικές περιόδους 2003 και 2004. Τα δείγματα των βοστρύχων, γιγάρτων και στεμφύλων ξηράθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα, σε προστατευμένο χώρο απουσία φωτός. Στη συνέχεια, κονιοποιήθηκαν σε μύλο και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός μέχρι την ανάλυση τους. Οι οινολάσπες διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη (– 24 °C). Πριν την εκχύλιση ζυγίστηκε ποσότητα 50g από ένα δείγμα (200g για τις οινολάσπες), η οποία εκχυλίστηκε σε λουτρό υπερήχων, σύμφωνα με τη διαδικασία που ήδη περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4. Μετά το τέλος της εκχύλισης το στερεό υπόλειμμα ζυγίστηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, φιλτραρίστηκε με φίλτρα σύριγγος PVDF 0,45μm ώστε να αναλυθεί στο HPLC. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/g εκχυλίσματος και σε mg/100g ξηρού δείγματος και παρουσιάζονται αναλυτικά στο **Παράρτημα Γ**. Στις Εικόνες 5.3–5.5, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα στεμφύλων, βοστρύχων και οινολάσπης.



Εικόνα 5.3 Χρωματογράφημα στεμφύλων: **1.** γαλλικό οξύ, **2.** *trans*-καφταρικό οξύ, **3.** προκυανιδίνη Β1, **4.** (+)-κατεχίνη, **5.** καφεϊκό οξύ, **6.**, συριγγικό οξύ, **7.** (-)-επικατεχίνη, **8.** φλαβανόλη-1, **9.** π-κουμαρικό οξύ, **10.** γαλακτοσίδη της κερκετίνης, **11.** γλυκοσίδη της κερκετίνης, **12.** ραμνοσίδη της κερκετίνης, **13.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **14.** κερκετίνη, **15.** ε-βινιφερίνη, **16.** καμφερόλη.



Εικόνα 5.4 Χρωματογράφημα γλεουκολασίας: 1.γαλλικό οξύ, 2. πρωτοκατεχικό οξύ, 3. βανιλικό οξύ, 4. καφεϊκό οξύ, 5. συριγγικό οξύ, 6. π-κουμαρικό οξύ, 7. φερουλικό οξύ, 8. γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 9. γλυκοσίδης της κερκετίνης, 10. κερκετίνη, 11. καμφερόλη.



Εικόνα 5.5 Χρωματογράφημα βοστρύχων: **1.** γαλλικό οξύ, **2.** *trans*-καφταρικό οξύ, **3.** προκυανιδίνη B1, **4.** (+)-κατεχίνη, **5.** προκυανιδίνη B2, **6.** (-)-επικατεχίνη, **7.** προκυανιδίνη B3, **8.** π-κουμαρικό οξύ, **9.** γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης **10.** γαλακτοσίδης της κερκετίνης, **11.** γλυκοσίδης της κερκετίνης, **12.** ραμνοσίδης της κερκετίνης, **13.** *trans*-ρεσβερατρόλη, **14.** κερκετίνη, **15.** ε-βιτινιφερίνη, **16.** καμφερόλη.

5.2 Αποτελέσματα

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη φαινολική σύσταση των υποπροϊόντων της οινοποίησης είναι περιορισμένες, σε πλήρη αντίθεση με τις εργασίες που έχουν εκπονηθεί για τα σταφύλια και τους οίνους. Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται τα ευρήματα των μελετών που εκπονήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής και αφορούν την παρουσία και συγκέντρωση των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με τα βιβλιογραφικά στοιχεία.

5.2.1 Στέμφυλα

4.2.1.1.1 Κυριότερες πολυφαινόλες των στεμφύλων

Στα στέμφυλα ανιχνεύθηκε ένα πλήθος πολυφαινολών, οι κυριότερες (από άποψη ποσότητας) των οποίων είναι οι:

Φλαβανόλες:

Η παρουσία των μονομερών (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη ανιχνεύθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα στέμφυλα, όπως και αυτή των προκυανιδινών B1, B2 και B3. Επίσης προσδιορίστηκε η παρουσία του εστέρα του γαλλικού οξέως με την επικατεχίνη, όπως και η ίδια ουσία που ευρέθη σε μεγάλες ποσότητες στους οίνους και χαρακτηρίστηκε ως φλαβανόλη-1 .

Φλαβονόλες:

Στα στέμφυλα προσδιορίστηκε η παρουσία –σε σημαντικές ποσότητες– διαφόρων φλαβονολών. Τα μόρια αυτά υπάρχουν είτε σε άγλυκη μορφή (κερκετίνη, καμφερόλη) ή ως γλυκοζίτες. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει τα παρακάτω μόρια: 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη). Σε στέμφυλα έχουν αναγνωριστεί και άλλοι γλυκοζίτες των φλαβονολών όπως το 3-γλουκουρονίδιο της κερκετίνης, ο 3- D-γλυκοσίδης και ο 3-D-γαλακτοσίδης της καμφερόλης. Τέλος, έχουν αναγνωριστεί και οι 3- D-γλυκοσίδες της διυδροκερκετίνης (αστιλβίνη) και της καμφερόλης (εγγελετίνη)⁴.

Στους προδιορισμούς της διατριβής πιστοποιήθηκε η παρουσία της κερκετίνης σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με την καμφερόλη. Η διαφορά αυτή ήταν σε αντιστοιχία με αυτή που συναντώνται στους οίνους. Το γεγονός ότι τα μόρια αυτά σπάνια απαντώνται σε ελεύθερη μορφή στα σταφύλια, υποδηλώνει ότι κατά την οινοποίηση υδρολύεται μέρος των γλυκοζιτών τους και απελευθερώνονται στο μούστο, περνώντας τελικά στα στέμφυλα.

Φαινολικά οξέα:

Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα πιστοποιήθηκε η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γαλλικού και συριγγικού οξέος, ενώ σε ορισμένα δείγματα βρέθηκαν σε μικρές ποσότητες πρωτοκατεχικό και βανιλλικό οξύ. Από τα υδροξυκιναμωμικά οξέα ανιχνεύθηκαν το καφεϊκό, π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ, καθώς επίσης και ο εστέρας του καφεϊκού με το τρυγικό οξύ, *trans*-καφταρικό. Η ύπαρξη των οξέων αυτών στα στέμφυλα και τους οίνους αποδίδεται –όπως και προηγουμένως– στην υδρόλυση των εστέρων των φαινολικών οξέων που υπάρχουν στα σταφύλια κατά τη διαδικασία της οινοποίησης.

Σε στέμφυλα έχει επίσης πιστοποιηθεί η παρουσία των φαινολικών οξέων σιναπικό και π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και οι *cis* και *trans* μορφές των εστέρων του τρυγικού με το π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ, κουταρικό και φερταρικό οξύ^{4, 5}. Σε μικρές ποσότητες ανιχνεύθηκε και η παρουσία της αλδεύδης υδρόξυμέθυλοφουρφουράλη, η οποία όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 3., ανιχνεύεται σε παλαιωμένους επιδόρπιους οίνους.

Σε στέμφυλα έχουν ανιχνευτεί και γλυκοζίτες των φαινολικών οξέων, όπως 4-γλυκοσίδης του γαλλικού οξέος και ο 3-γλυκοσίδης του γαλλικού οξέος. Οι Lu & Foo⁴, ανίχνευσαν για πρώτη φορά σε στέμφυλα, με φασματοσκοπία NMR, την παρουσία γλυκοζιτών του γαλλικού οξέος, τον 2-υδροξυ-5-(2-υδροξυαιθυλο) φαινυλογλυκοσίδα και τα *cis* και *trans* ισομερή του κουταρικού οξέος.

Στιλβένια:

Από τα στιλβένια έχει διαπιστωθεί η παρουσία σε ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις –σε σχέση με τις ποσότητες που ανιχνεύονται στα σταφύλια– των μορίων *trans*-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη. Η παρατήρηση αυτή είναι δυνατόν να συσχετιστεί με το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των στιλβενίων των σταφυλιών είναι υπό τη μορφή γλυκοζιτών. Έτσι κατά τη διαδικασία της οινοποίησης ένα μέρος τους υδρολύεται. Επίσης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα στα στέμφυλα

περιλαμβάνονται και οι ποδίσκοι των ραγών, που αποτελούν τμήμα των βοστρύχων. Αυτοί –όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια–είναι ιδιαίτερα πλούσιοι σε *trans*-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη. Όμως αν και οι ποσότητες της *trans*-ρεσβερατρόλης και ε-βινιφερίνης στα στέμφυλα παρουσιάζονται αυξημένες, δεν παρατηρείται αντίστοιχη συγκέντρωση των μορίων αυτών στους ερυθρούς οίνους, οι οποίοι οινοποιούνται παρουσία των στεμφύλων. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού αφορά την μικρή ικανότητα των μορίων αυτών να εκχυλίζονται, λόγω μειωμένης πολικότητας. Σε στέμφυλα έχει προσδιοριστεί και το στιβένιο *trans*-πολυδατίνη, σε συγκεντρώσεις 15,5mg/Kg επί ξηρού βάρους⁵.

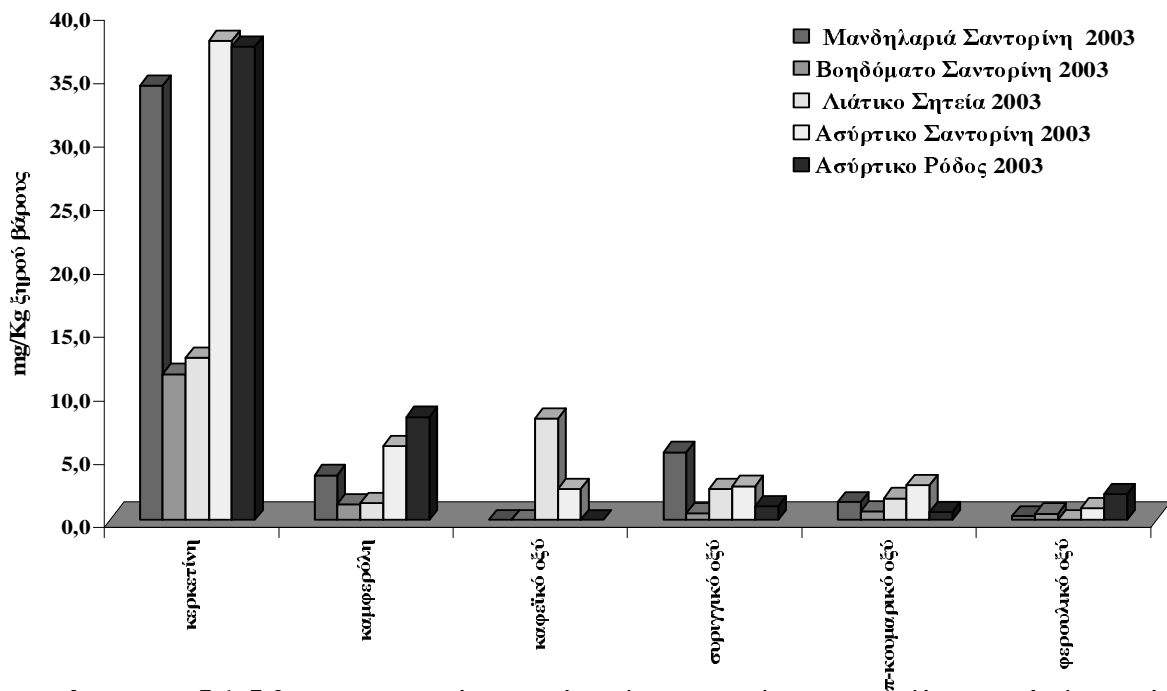
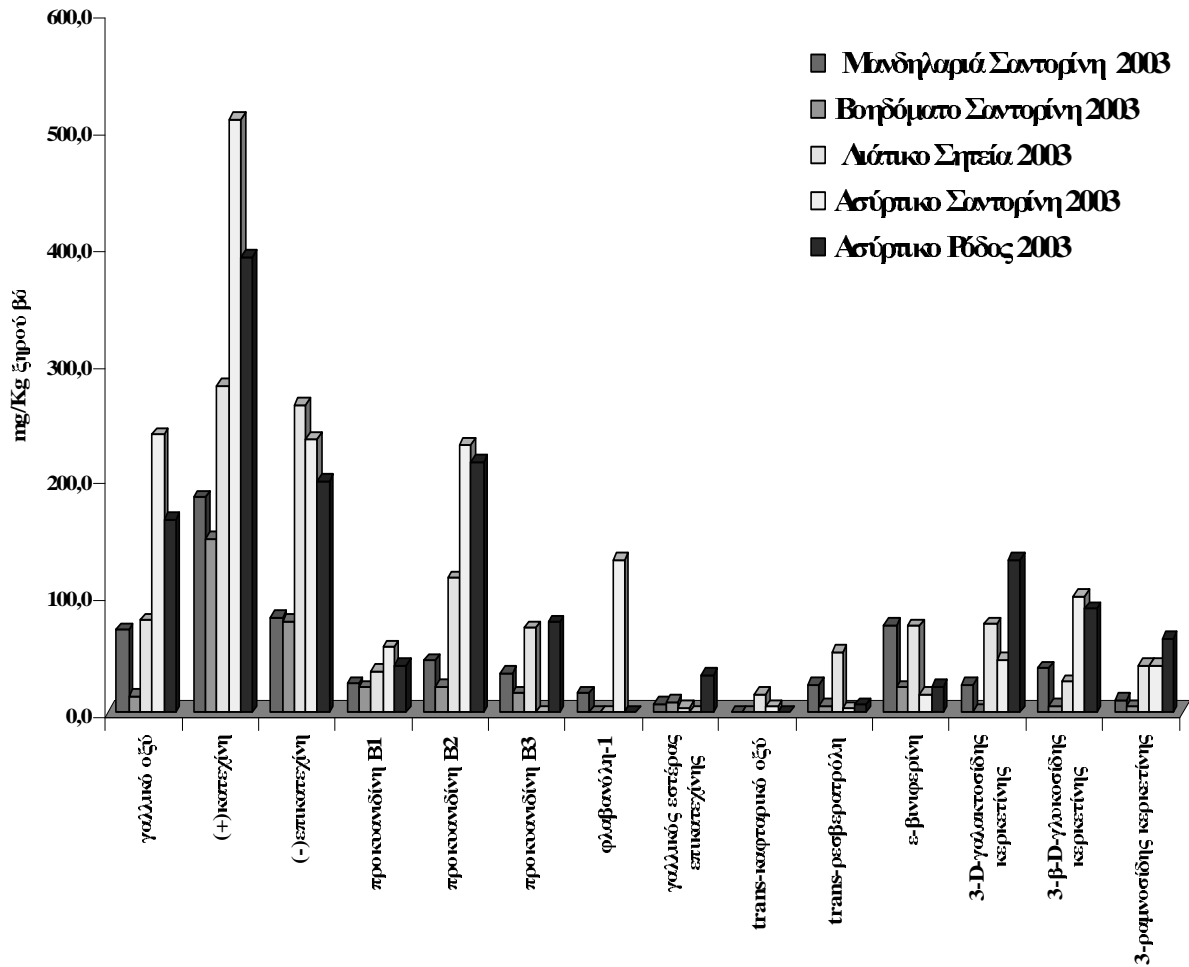
Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι μετά το πέρας της οινοποίησης των ερυθρών ποικιλιών, στα στέμφυλα παραμένει ένα μεγάλο ποσοστό από ανθοκυανίνες, οι οποίες συμβάλλουν στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των στεμφύλων.

4.2.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ ποικιλιών

Από τις ερυθρές ποικιλίες που μελετήθηκαν, το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο παρουσίασαν τα στέμφυλα της ποικιλίας λιάτικο Σητείας και μανδηλαριάς Σαντορίνης ενώ από τις λευκές τα στέμφυλα της ποικιλίας ασύρτικο Σαντορίνης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ανάλογα με τα αντίστοιχα ευρήματα για τα σταφύλια, που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 4. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι τα στέμφυλα του ασύρτικου Σαντορίνης εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες ακόμα και από τα στέμφυλα της μανδηλαριάς. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός στο υψηλό αρχικό πολυφαινολικό φορτίο των σταφυλιών της ποικιλίας αυτής και αφετέρου στην οινοποιητική τεχνική που εφαρμόζεται στους λευκούς οίνους, η οποία δεν επιτρέπει την εκτεταμένη εκχύλιση των πολυφαινολών από τα σταφύλια στο μούστο, όπως γίνεται κατά την ερυθρά οινοποίηση.

Στα Γραφήματα 5.1–5.2 γίνεται σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου στεμφύλων ερυθρών και λευκών ποικιλιών κατά την οινοποιητική περίοδο 2003.

Στεμφύλα Σαντορίνης



Γράφηματα 5.1-5.2 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου στεμφύλων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

4.2.1.1.3 Ετήσια διακύμανση στεμφύλων

Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζεται η ετήσια διακύμανση των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν σε δείγματα στεμφύλων από την ίδια ποικιλία και οινοποιητική περιοχή (Σαντορίνη) κατά δύο διαδοχικά έτη (2003-2004). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται άνοδος στη συγκέντρωση –τόσο των επιμέρους όσο και των ολικών πολυφαινολών– για το έτος 2004. Η διαφορά είναι ιδιαίτερα μεγάλη για την ποικιλία βοηδόματο. Έτσι, για μια ακόμα φορά καταδεικνύεται πόσο πολύ επιδρούν οι ανά έτος διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες (έτος οινοποίησης), στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των προϊόντων και υποπροϊόντων οινοποίησης.

5.2.2 Οινολάσπες

4.2.2.1.1 Κυριότερες πολυφαινόλες οινολασπών

Για τις ανάγκες υλοποίησης της διατριβής αναλύθηκαν οινολάσπες ερυθράς οινοποίησης, οι οποίες παρελήφθησαν με δυο διαφορετικές τεχνικές, η πρώτη με απλό φιλτράρισμα και η δεύτερη με τη χρήση φιλτροπρέσας (διήθηση υπό πίεση). Οι κυριότερες πολυφαινόλες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν ανήκαν στις ομάδες των φλαβονολών και των φαινολικών οξέων. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε η κερκετίνη, ενώ σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν η καμφερόλη και οι γλυκοζίτες 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης και 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης. Από τα υδροξυβενζοϊκά διαπιστώθηκε η παρουσία του γαλλικού, συριγγικού, βανιλλικού και πρωτοκατεχικού οξέος, ενώ από τα υδροξυκιναμμομικά ανιχνεύτηκε το καφεϊκό, π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ. Επίσης σε μικρή ποσότητα βρέθηκε και η φλαβανόλη (+)-κατεχίνη.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός, ότι η συγκέντρωση των παραπάνω πολυφαινολών, ήταν πολλαπλάσια στην οινολάσπη που είχε παραληφθεί από την φιλτρόπρεσα. Έτσι είναι φανερό ότι η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των πλέον υδατοδιαλυτών πολυφαινολών, όπως είναι τα φαινολικά οξέα.

5.2.3 Βόστρυχοι

4.2.3.1.1 Κυριότερες πολυφαινόλες των βοστρύχων

Στους βόστρυχους ανιχνεύθηκε παρουσία πολυφαινολών ποιοτικά αντίστοιχη με αυτές των στεμφύλων αλλά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες. Οι κυριότερες πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν στους βόστρυχους ανήκουν στις παρακάτω κατηγορίες:

Φλαβανόλες:

Η παρουσία της (+)-κατεχίνης στους βόστρυχους ανιχνεύτηκε σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ αντίθετα το ισομερές της (-)-επικατεχίνη υπήρχε σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις και σε κάποια δείγματα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Κατά αντιστοιχία οι Souquet και συνεργάτες⁶, (2000), κατά την ανάλυση βοστρύχων από την ποικιλία Merlot, έχουν προσδιορίσει την παρουσία σε ίχνη της (-)-επικατεχίνης και σε πολύ μικρή ποσότητα της (+)-κατεχίνης.

Από τις προκυανιδίνες στους βόστρυχους προσδιορίστηκαν οι B1, B2 και B3, με την προκυανιδίνη B1 να είναι η επικρατέστερη. Επίσης ανιχνεύθηκε η παρουσία για πρώτη φορά σε βόστρυχους του γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης.

Φλαβονόλες:

Οι βόστρυχοι περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονολών, τόσο υπό τη μορφή άγλυκων (κερκετίνη, καμφερόλη), όσο και με τη μορφή των γλυκοζιτών τους. Από τους τελευταίους διαπιστώθηκε η παρουσία των παρακάτω γλυκοζιτών: 3-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, 3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη) και 3-ραμνοσίδης της κερκετίνης (κερκιτρίνη). Είναι δε χαρακτηριστικό ότι η φλαβονόλη κερκετίνη ανιχνεύεται πάντα σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με την καμφερόλη. Σε προηγούμενη μελέτη των Souquet και συνεργατών⁶, σε δείγματα βοστρύχων διαφόρων ποικιλιών ανέφεραν ότι από τις φλαβονόλες το 3-D-γλουκουρονίδιο της κερκετίνης υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα (200mg/Kg), ενώ ανίχνευσαν και τους γλυκοζίτες της διυδροκερκετίνης αστιλβίνη και εγγελετίνη.

Φαινολικά οξέα:

Από τα υδροξυβενζοϊκά ανιχνεύθηκαν τα οξέα γαλλικό και συριγγικό, ενώ από τα υδροξυκιναμωμικά ανιχνεύθηκαν τα οξέα καφεϊκό, π-κουμαρικό και

φερουλικό οξύ. Τέλος προσδιορίστηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις ο εστέρας του καφεϊκού *trans*-καφταρικό.

Στιλβένια:

Από τα στιλβένια ανιχνεύθηκαν σε ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες τα μόρια *trans*-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη. Σε βόστρυχους έχει αναφερθεί σε σημαντικές ποσότητες και η παρουσία των στιλβενίων παλιδόλη και πισιτανόλη⁷.

Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν σε δείγματα βοστρύχων από ερυθρές και λευκές ποικιλίες της Σαντορίνης για το έτος 2003. Μεταξύ ερυθρών και λευκών ποικιλιών δεν εμφανίζονται αξιοσημείωτες διαφορές. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι το πολυφαινολικό περιεχόμενο των βοστρύχων είναι σε άμεση συνάρτηση με την κάθε μελετώμενη ποικιλία, σε αντιστοιχία με τα υπόλοιπα μέρη των σταφυλιών που αναλύθηκαν προηγουμένως. Σε γενικές όμως γραμμές, το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε στις ποικιλίες μανδηλαριά και ασύρτικο της Σαντορίνης. Στα Γραφήματα 5.3—5.6 γίνεται σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου βοστρύχων ερυθρών και λευκών ποικιλιών.

Πίνακας 5.1 Ετήσια διακύμανση του πολυφαινολικού περιεχομένου στεμφύλων ερυθρών ποικιλιών Σαντορίνης

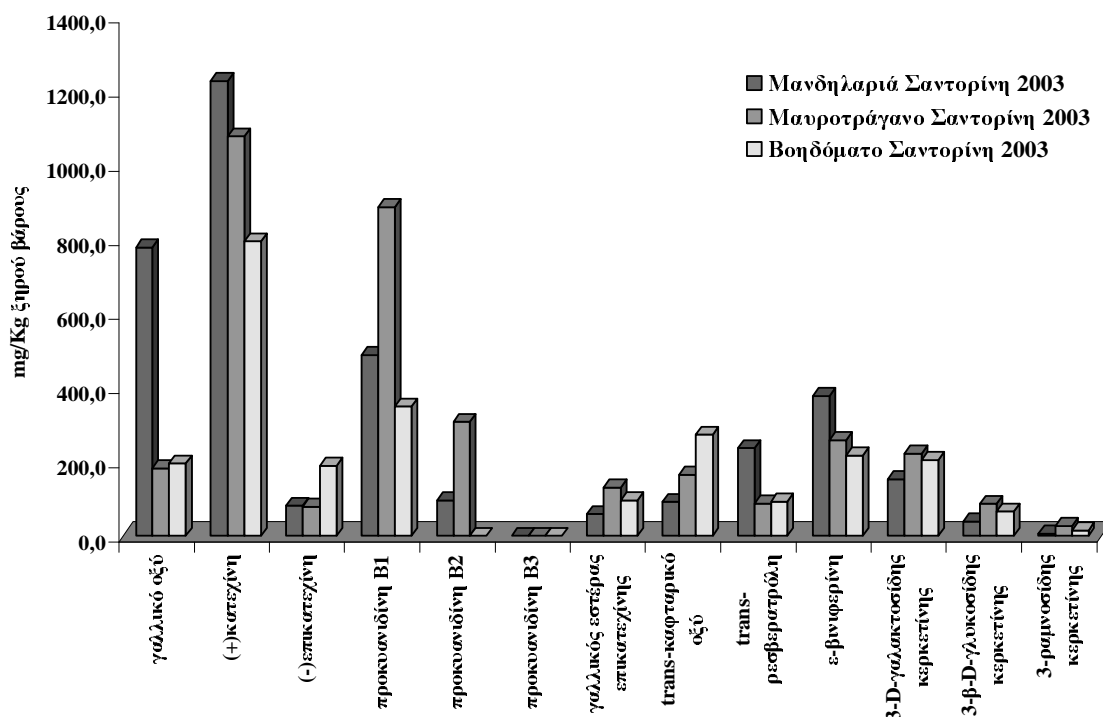
ΣΤΕΜΦΥΛΑ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗ (mg/Kg)	γαλλικό οξύ	(+)-κατεχίνη	(-)-επικατεχίνη	προκυανιδίνη Β1	προκυανιδίνη Β2	προκυανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans- ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλακοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	καφεϊκό οξύ	συγγλυκό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	Φύλλαβανόλη-1	ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																					
Μανδηλαριά 2003	70,5	184,0	81,2	24,8	44,2	34,0	7,2	**ΔΑ	23,8	74,3	23,6	37,5	11,0	34,2	3,5	ΔΑ	5,4	1,4	0,3	16,1	1328,3
Μανδηλαριά 2004	190,3	129,8	121,4	50,2	44,9	ΔΑ	ΔΑ	89,1	27,8	105,1	64,5	36,5	24,8	45,4	0,8	5,3	57,9	6,6	0,9	110,8	2877,9
Μανδηλαριά Λιαστά 2003	168,4	107,0	51,2	21,0	3,2	ΔΑ	ΔΑ	3,3	42,2	109,6	31,9	25,6	18,5	28,7	0,6	5,5	13,3	4,9	1,2	107,1	1408,8
Μανδηλαριά Λιαστά 2004	147,4	355,4	136,6	88,9	148,3	43,2	31,0	42,0	39,9	99,3	126,6	75,9	35,2	34,9	5,2	12,6	32,8	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	3809,0
Βοηδόματο 2003	3,8	149,2	77,5	21,4	21,9	16,4	8,8	ΔΑ	5,7	21,5	0,4	6,1	4,7	11,5	1,2	ΔΑ	0,6	0,7	0,5	ΔΑ	1452,0
Βοηδόματο 2004	255,5	137,0	188,0	51,5	97,9	37,4	18,4	1,5	3,0	25,0	49,5	33,5	10,8	47,8	19,1	ΔΑ	11,8	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	3541,1

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

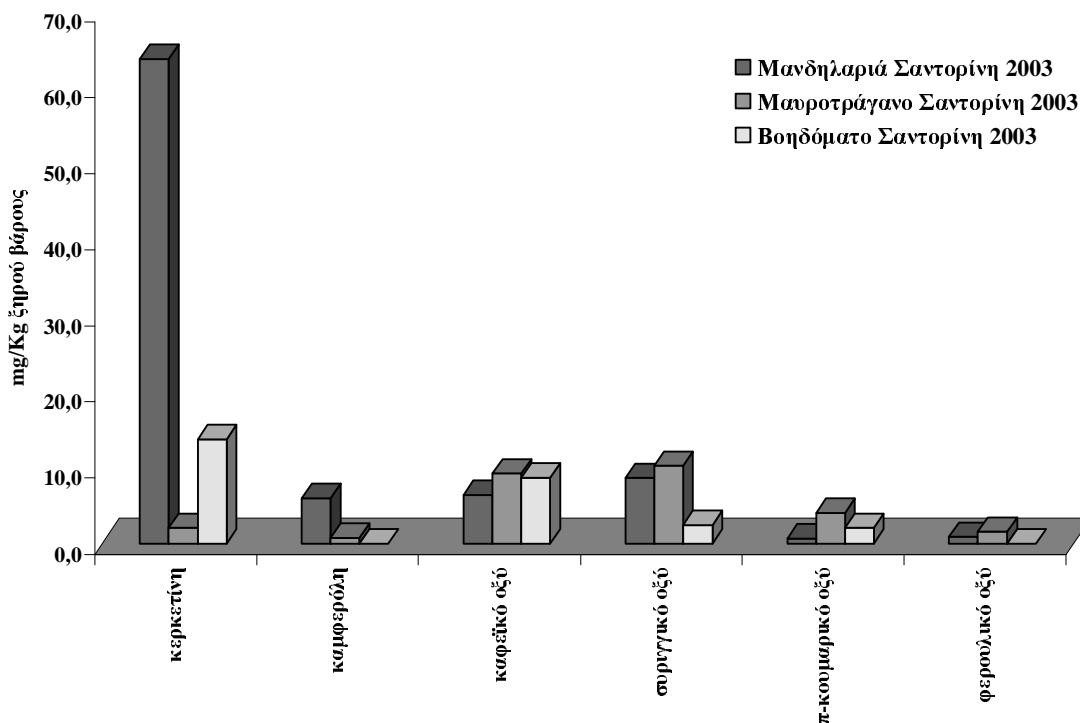
Πίνακας 5.2 Μέσοι όροι πολυφαινολικού περιεχομένου βοστρύχων, ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ (mg/Kg)	γαλλικό οξύ	(+)-κατεχίνη	(-)-επικατεχίνη	προκυανιδίνη Β1	προκυανιδίνη Β2	προκυανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans- ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D- γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D- γλακοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	καφεϊκό οξύ	συγγλυκό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	234,6	1093,8	82,9	477,3	107,9	105,9	83,0	100,9	140,7	299,4	168,8	74,0	12,6	19,3	2,32	4,32	3,25	1,55	0,86	8181,6
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	166,5	1056,6	107,5	362,6	75,9	106,4	66,0	85,0	122,9	247,5	175,8	75,1	15,0	10,0	1,00	0,58	1,21	0,70	1,11	7656,7

Βόστρυχοι Σαντορίνης

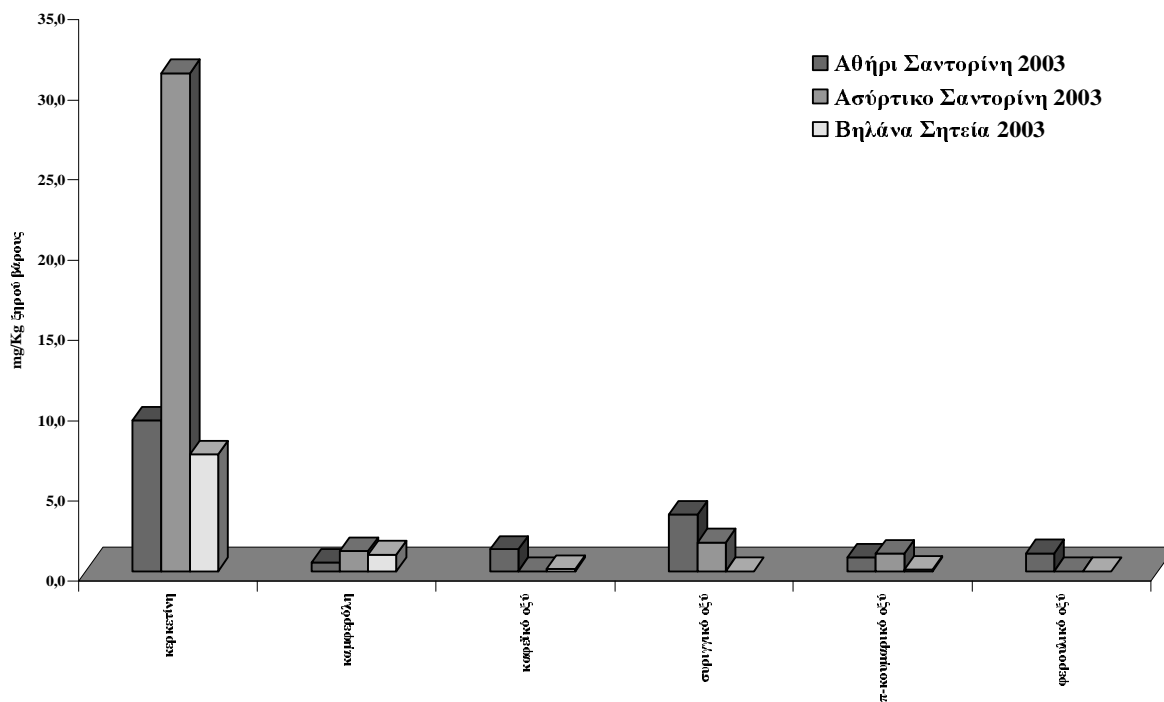
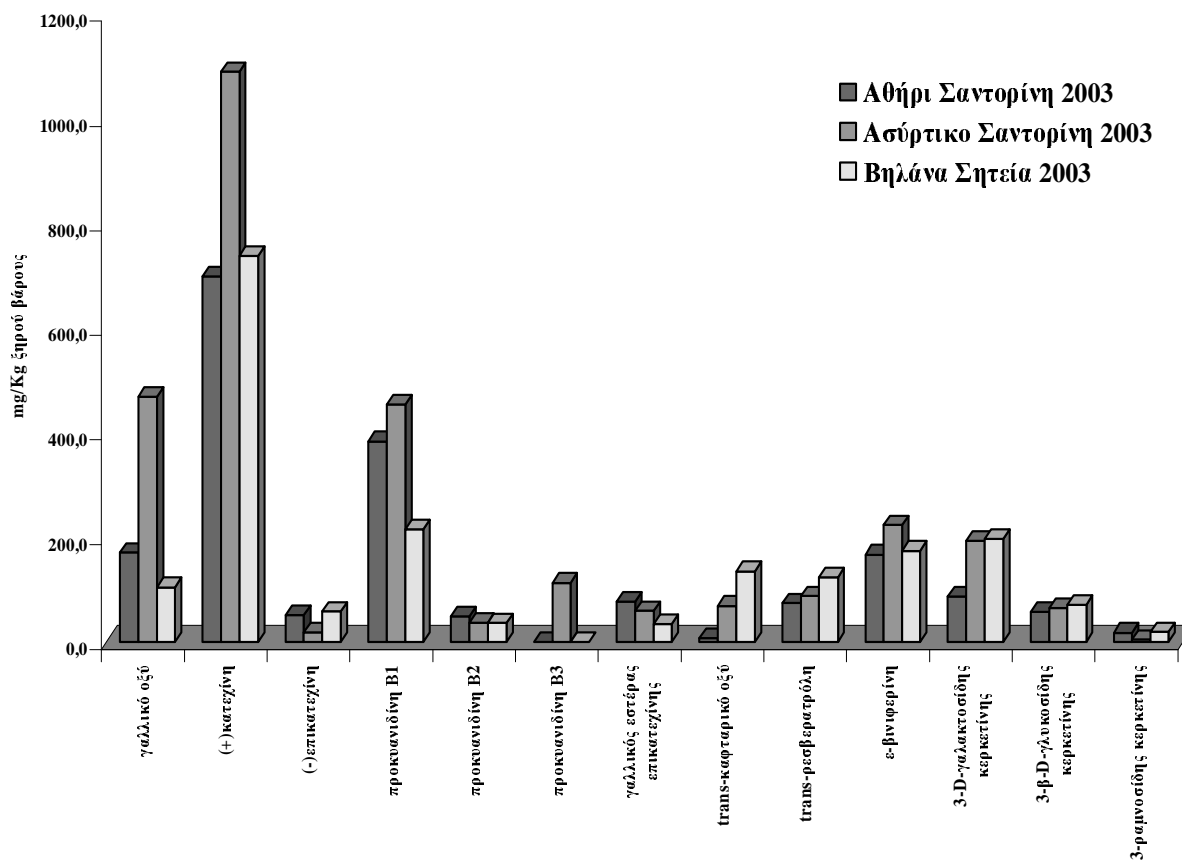


Βόστρυχοι Σαντορίνης



Γράφηματα 5.3-5.4 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου βοστρύχων ερυθρών ποικιλιών

Βόστρυχοι



Γράφηματα 5.5-5.6 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου βοστρύχων λευκών ποικιλιών

4.2.3.1.2 Ετήσια διακύμανση βοστρύχων

Στον Πίνακα 5.3 παρουσιάζεται η ετήσια διακύμανση των πολυφαινολών σε δείγματα βοστρύχων της ίδιας ποικιλίας και οινοποιητικής περιοχής (Σαντορίνη) για δύο διαδοχικά έτη (2003-2004). Στις ερυθρές ποικιλίες παρατηρήθηκε μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου, ενώ για τη λευκή ποικιλία ασύρτικο, παρατηρήθηκε άνοδος. Μάλιστα, η συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης σε ένα από τα δείγματα βοστρύχων του 2004 που αναλύθηκαν προσδιορίστηκε σε 219mg/Kg ξηρού δείγματος.

Γενικά, θα πρέπει να επισημανθεί ότι, σε σχέση με τα στέμφυλα, οι βόστρυχοι εμφανίζουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό δυναμικό και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον χάρις στην παρουσία υψηλών ποσοτήτων *trans*-ρεσβερατρόλης, ενός μορίου με πολύ μεγάλη βιολογική δράση

Πίνακας 5.3 Ετήσια διακύμανση του πολυφαινολικού περιεχομένου βοστρύχων ερυθρών και λευκών ποικιλιών Σαντορίνης

ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗ (mg/Kg)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρεβερατρούλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γάλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλ.υκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	καφεϊκό οξύ	συγγλυκό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Μαυροτράγαο 2003	181,8	1077,4	79,8	887,3	307,7	**ΔΑ	130,2	166,1	87,8	258,3	222,9	86,5	27,5	ΔΑ	0,7	9,2	10,2	4,0	1,5	10110,8
Μαυροτράγαο 2004	111,6	888,1	69,8	281,9	45,1	ΔΑ	35,9	31,3	64,9	212,0	147,9	78,2	8,5	12,8	2,3	0,7	0,2	1,0	ΔΑ	4933,9
	68,2	1065,2	59,0	204,8	43,5	ΔΑ	90,0	125,4	128,1	258,8	150,8	61,9	8,3	6,1	1,3	0,5	0,4	1,3	ΔΑ	5223,3
Βοηδόματο 2003	195,3	794,5	189,4	349,3	ΔΑ	ΔΑ	95,3	273,8	92,9	217,4	205,0	65,6	15,3	13,7	ΔΑ	8,6	2,4	2,0	ΔΑ	5401,6
Βοηδόματο 2004	278,3	711,7	ΔΑ	138,2	ΔΑ	32,8	64,9	53,9	173,7	414,4	126,2	61,4	23,8	19,6	2,3	0,5	0,0	0,7	ΔΑ	3100,0
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Ασύρτικο 2003	468,8	1089,4	18,2	453,6	36,2	113,7	59,1	69,6	87,6	223,1	193,4	65,1	4,6	31,0	1,3	ΔΑ	1,8	1,1	ΔΑ	6480,7
Ασύρτικο 2004	47,2	1831,5	27,9	798,5	66,1	144,4	86,5	57,2	136,5	227,1	241,7	137,1	18,8	5,0	ΔΑ	0,4	0,0	1,2	ΔΑ	15271,4
	43,6	1884,7	ΔΑ	494,6	163,9	143,0	85,5	234,9	219,0	278,6	368,5	137,3	29,4	6,1	0,8	ΔΑ	0,0	0,2	ΔΑ	7020,8

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

5.3 Βιβλιογραφία 5^ο Κεφαλαίου

- 1) FAOSTAT-FAO Statistical Database, www.fao.org
- 2) <http://winebusiness.com>
- 3) Sort X. Environmental problem of agro-industrial spill, Environmental management, *Electr. J. Environm. Agric. Food Chem.* **2003**, 2 (1).
- 4) Lu Y. and Foo Y. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* **1999**, 25, 1–8.
- 5) Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4360–4367.
- 6) Souquet J-M., Labarbe B., Le Guerneve C., Cheynier V., Moutounet M. Phenolic composition of grape stems, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1076–1080.
- 7) Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Cheze, C., Vercauteren, J. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography, *J. Chromatogr. A* **2002**, 964, 123–128.

6. ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΙΝΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

6.1 Αντιβακτηριακή δράση

6.1.1 Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων συνιστά σημαντικό παράγοντα συνεχούς μελέτης και έρευνας για τη βιομηχανία τροφίμων σε παγκόσμια κλίμακα. Τα τελευταία όμως χρόνια, έχει παρατηρηθεί το ιδιαίτερα ανησυχητικό φαινόμενο της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί στα χρησιμοποιούμενα χημικά συντηρητικά. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και στην φαρμακευτική αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο παθογόνος μικροοργανισμός *Staphylococcus aureus* για τον οποίο θα πρέπει να τονιστεί ότι 50% των στελεχών του βακτηρίου που έχουν απομονωθεί τα τελευταία χρόνια σε περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης στη Μ. Βρετανία, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη μεθισιλίνη.¹

Παράλληλα, η αρνητική στάση των καταναλωτών για τα συνθετικά χημικά συντηρητικά ως και η προσπάθεια υιοθέτησης ενός υγιεινού τρόπου ζωής, έχουν μετατοπίσει το ενδιαφέρον του καταναλωτικού κοινού προς την κατεύθυνση της αναζήτησης και επιλογής φυσικών προϊόντων για την παρασκευή των τροφίμων. Στόχος είναι ο περιορισμός της χρήσης των συνθετικών χημικών συντηρητικών, η ελάττωση της περιεκτικότητας του NaCl και η ελάχιστη δυνατή επεξεργασία προκειμένου να διατηρούνται αναλλοίωτα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η διατροφική αξία των τροφίμων.

Στο πλαίσιο αυτό, αποτελεί πρόκληση για τη μικροβιολογία τροφίμων η ανταπόκριση στις σύγχρονες αυτές απαιτήσεις, εξασφαλίζοντας παράλληλα την ασφάλεια τους από μικροβιολογική άποψη. Έτσι, τα τελευταία χρόνια στις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης των τροφίμων, όπως η θερμική επεξεργασία, η ψύξη/κατάψυξη, η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών και η μείωση της ενεργότητας του νερού, έχει προστεθεί και η χρησιμοποίηση φυσικών αντιμικροβιακών συστημάτων φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης.

Οι πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των μικροοργανισμών είτε θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με την δομή και τη συγκέντρωσή τους. Επιπρόσθετα, η ευαισθησία των μικροοργανισμών στην παρουσία πολυφαινόλων διαφέρει ανάλογα με το είδος τους.² Στη βιβλιογραφία, οι αναφορές για την αντιβακτηριακή δράση των πολυφαινόλων είναι αντικρουόμενες, φαινόμενο που εν μέρει μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές μεθόδους που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλει στις διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων θεωρείται και η έλλειψη σταθερών συνθηκών που είναι απαραίτητη για την επαναληψιμότητα των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αντιβακτηριακής δράσης.³

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια και υποπροϊόντα (γιγάρτων, στεμφύλων, βοστρύχων) της ελληνικής οινοποιητικής παραγωγής.

6.1.2 Αποτελέσματα

Η μελέτη της αντιβακτηριακής ικανότητας των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους: τη μέθοδο της Αγωγιμότητας και τη μέθοδο των Τρυβλίων. Για τα πειράματα επιλέχθηκε ο Gram-(+) μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* ScottA, ένα παθογόνο που εμπλέκεται σε πολλά περιστατικά τροφικών δηλητηριάσεων.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, ήταν εκχυλίσματα ραγών, γιγάρτων, στεμφύλων και βοστρύχων των ερυθρών ποικιλιών μανδηλαριά και βοηδόματο και της λευκής ποικιλίας ασύρτικο Σαντορίνης. Από κάθε εκχύλισμα προετοιμάστηκαν τρία διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) σε DMSO, με συγκεντρώσεις 6%, 5% και 4% w/v αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν επτά διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις σε υγρό θρεπτικό μέσο BH (Brain Heart), καλύπτοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων από 3% έως 0,03125% w/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο, με το ίδιο ποσοστό DMSO, όπως οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων.

Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων για τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν για συγκεντρώσεις 1%, 0,4% και 0,1% w/v. Οι τιμές που αναγράφονται αντιστοιχούν

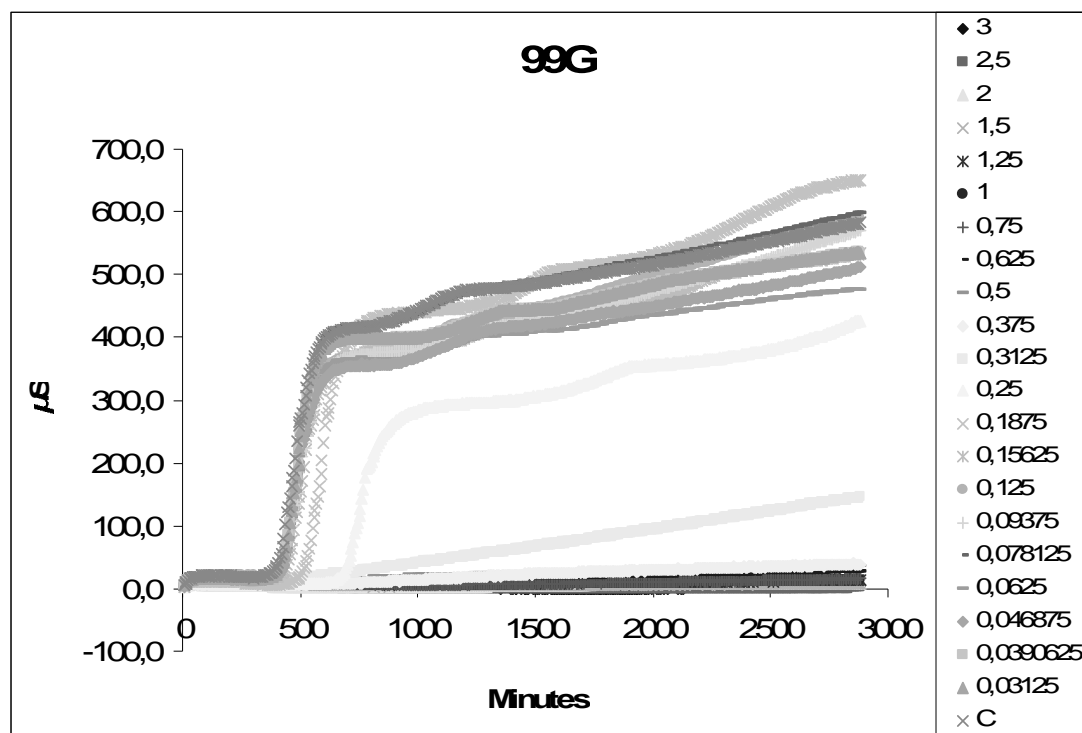
α) Στο χρόνο ανίχνευσης (detection time), ο οποίος ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί έως ότου καταγραφεί μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού

β) Στη μέγιστη τιμή αγωγιμότητας (μS) που καταγράφηκε σε διάστημα 48 h για κάθε συγκέντρωση

γ) Στο δεκαδικό λογάριθμο της πυκνότητας πληθυσμού του μικροοργανισμού μετά τις 48 h όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο των τρυβλίων.

Επίσης παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών πολυφαινόλων όλων των εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος .

Όπως φαίνεται τα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή ικανότητα ήταν το εκχύλισμα γιγάρτων βοηδόματου και το εκχύλισμα βοστρύχων μανδηλαριάς, τα οποία έχουν και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες.



Εικόνα 6.1 Καμπύλες αγωγιμότητας για διάφορες συγκεντρώσεις ενός εκχυλίσματος βοστρύχων.

Πίνακας 6.1 Αντιμικροβιακή ικανότητα εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση, (w/v)	Χρόνος ανίχνευσης (h)	Μέγιστη τιμή Αγωγιμότητας (μS)	Πληθυσμός μικροοργανισμού Log (cfu/ml)	Ολικές πολυφαινόλες*
ΡΑΓΕΣ					
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	472±3,8
	0,40%	19,9±0,7	375±15	8,54	
	0,10%	9,7±0,1	410±10	8,78	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	467,4±8,4
	0,40%	18,4±0,9	390±5	8,57	
	0,10%	9,7±0,1	415±0	8,85	
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	492,7±15,6
	0,40%	38,9±1,7	115±20	6,58	
	0,10%	9,4±0,3	410±10	8,94	
ΓΙΑΡΤΑ					
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	811,9±12,7
	0,40%	—	—	3,22	
	0,10%	10,4±0,3	405±10	8,81	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	1%	43,7±2,3	100±15	6,25	619,48±3,9
	0,40%	11,4±0,9	400±10	8,87	
	0,10%	9,5±0,0	420±0	8,84	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	1%	—	—	<1	325,37±4,7
	0,40%	20,7±1,5	345±15	7,89	
	0,10%	9,3±0,4	400±10	8,85	
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	428,2±9,9
	0,40%	31,3±2,1	135±15	7,22	
	0,10%	9,8±0,2	415±5	8,75	
ΣΤΕΜΦΥΛΑ					
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	367,71±2,84
	0,40%	18,4±0,9	385±5	8,76	
	0,10%	9,7±0,1	420±0	8,88	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	1%	36,7±1,9	115±20	6,74	107,12±1,98
	0,40%	15,1±0,8	395±15	8,47	
	0,10%	9,8±0,1	420±5	8,7	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	437,73±3,99
	0,40%	38,3±1,9	180±20	7,35	
	0,10%	9,3±0,2	410±10	8,92	
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	465,28±3,15
	0,40%	16,3±0,4	390±10	8,85	
	0,10%	9,8±0,2	415±10	8,78	
ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ					
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	1%	39,3±1,9	120±20	7,28	494,2±7,0
	0,40%	12,8±0,9	370±10	8,75	
	0,10%	9,6±0,1	425±5	8,89	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	1%	—	—	<1	484,3±11,2
	0,40%	43,3±2,3	105±15	6,55	
	0,10%	9,8±0,2	415±5	8,89	
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	536,8±11,3
	0,40%	—	—	5,16	
	0,10%	10,5±0,1	410±10	8,8	
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	1%	—	—	<1	367,1±6,5
	0,40%	16,3±0,5	285±15	8,75	
	0,10%	9,9±0,1	415±5	8,86	

* mg γαλλικού οξέος / g εκχυλ

6.1.2.1 Υπολογισμός ΕΑΣ

Για την εξαγωγή της ΕΑΣ (Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση, MIC) επιλέχθηκαν τα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση. Για τον υπολογισμό της ΕΑΣ, χρησιμοποιήθηκε η Σχέση 2.10 $ΕΑΣ = 10^{(M+\frac{1}{B})}$

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε % w.v. συγκέντρωση εκχυλίσματος στο μέσο ανάπτυξης και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2

Πίνακας 6.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση εκχυλισμάτων όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο μέτρησης Αγωγιμότητας και με τη μέθοδο των Τρυβλίων

Εκχυλίσματα	Μέθοδος Αγωγιμότητας* ΕΑΣ %w/v	Μέθοδος Τρυβλίων* ΕΑΣ %w/v
Γιγάρτα Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	0,261±0,008	0,261±0,022
Βόστρυχοι Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	0,339±0,014	0,345±0,019

* Οι τιμές ΕΑΣ αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων

Και τα δύο εκχυλίσματα διαθέτουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση, με το εκχύλισμα των γιγάρτων να εμφανίζει καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε συμφωνία με το υψηλότερο πολυφαινολικό του περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών, ως προς τη δραστηριότητα εκχυλισμάτων γιγάρτων έναντι των Gram-(+) μικροοργανισμών.⁴⁻⁷

Επομένως μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα γιγάρτων και βοστρύχων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες για την συντήρηση των τροφίμων.

Επιπλέον οι τιμές που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της αγωγιμότητας είναι σχεδόν ταυτόσημες με αυτές που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των τρυβλίων η οποία αποτελεί μέθοδο αναφοράς. Συνεπώς η μέθοδος μέτρησης αγωγιμότητας μπορεί να θεωρηθεί ακριβής και επαρκής μέθοδος για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων.

6.2 Αντιοξειδωτική Δράση

6.2.1 Εισαγωγή

Οι πολυφαινόλες, ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών με τη μεγαλύτερη αφθονία και διάδοση στο φυτικό βασίλειο. Παραδοσιακά αποτελούν σημαντικό μέρος της διατροφής του ανθρώπου, καθώς βρίσκονται σε μια πληθώρα φυτικών τροφών όπως φρούτα, λαχανικά, χυμούς, ελαιόλαδο, τσάι και ερυθρό οίνο, τροφές που αποτελούν και τη βάση της Μεσογειακής διατροφής. Η ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής μπορεί να φτάσει έως και 1 g την ημέρα για τους ενήλικες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η ποσότητα αυτή είναι 10 φορές υψηλότερη από την πρόσληψη βιταμίνης C και 100 φορές υψηλότερη από την πρόσληψη βιταμίνης E και καροτενοειδών.⁸ Παρόλα αυτά, έως το μέσον της δεκαετίας του '90 ελάχιστη προσοχή είχε δοθεί στις βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών, κυρίως λόγω της μεγάλης ποικιλότητας και πολυπλοκότητας των χημικών τους δομών. Όμως η ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών επέτρεψε την παράκαμψη των δυσκολιών αυτών επιτρέποντας την απομόνωση και το χαρακτηρισμό της δομής των περισσότερων πολυφαινολών, καθώς και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στα τρόφιμα.

Έτσι, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια κατακόρυφη αύξηση του ενδιαφέροντος για τις πολυφαινόλες, καθώς προκύπτουν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς τις πιθανές προστατευτικές επιδράσεις των ενώσεων αυτών στην υγεία. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν σημαντική συνεισφορά των πολυφαινολών στην πρόληψη ασθενειών όπως νοσήματα του καρδιαγγειακού, καρκινογένεση, οστεοπόρωση, σακχαρώδης διαβήτης καθώς και εκφυλιστικές ασθένειες του νευρικού συστήματος, όπως η νόσος του Alzheimer.⁹ Σε μια πρόσφατη αναφορά του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας αναφέρεται ότι με βάση τα έως τώρα στοιχεία, η θεωρία περί μείωσης του κινδύνου ανάπτυξης ασθενειών μέσω της πρόσληψης πολυφαινολών χαρακτηρίζεται πλέον “πιθανή” για τα καρδιαγγειακά νοσήματα και “ανεπαρκής” για τον καρκίνο¹⁰.

Τα πιθανά οφέλη των πολυφαινολών στην υγεία σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, καθώς θεωρείται ότι προστατεύουν τον

οργανισμό από το οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με αυτό. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η κατάσταση στην οποία ανατρέπεται η ισορροπία προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων στον οργανισμό, εις βάρος των τελευταίων.¹¹⁻¹² Η διαδικασία αυτή έχει αναγνωριστεί ότι εμπλέκεται άμεσα σε διάφορους μηχανισμούς παθογένεσης.

Σε χαμηλά επίπεδα, οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως τα ιόντα υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) και οι υπεροξυ ρίζες ($RO\cdot$), παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό μέσω του αερόβιου μεταβολισμού και ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες και την έκφραση των γονιδίων, μέσω ενδοκυτταρικών σημάτων, που ενεργοποιούνται από εξωτερικά ερεθίσματα.¹³⁻¹⁴ Όταν όμως συσσωρευθούν μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στους ιστούς. Ανάλογα με το είδος των παραγόμενων ROS και την οδό από την οποία προκύπτουν το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες μπορεί να υποδιαιρεθεί σε διάφορες κατηγορίες, όπως α) το μεταβολικό οξειδωτικό στρες, β) το περιβαλλοντικό οξειδωτικό στρες, γ) το φωτοοξειδωτικό στρες.¹⁵ και δ) το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από φαρμακευτικές ουσίες.

Η διατροφή θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες: τα φρούτα, τα λαχανικά και ο ερυθρός οίνος μειώνουν το οξειδωτικό στρες, ενώ τροφές πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά, ευνοούν την εμφάνιση του.¹⁶

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, έγινε προσπάθεια μιας πρώτης αξιολόγησης του αντιοξειδωτικού δυναμικού των ελληνικών οίνων αλλά και εκχυλισμάτων από ελληνικά αμπελοκομικά προϊόντα (σταφύλια, φλοιοί, γίγαρτα) και υποπροϊόντα της οινοποίησης (βόστρυχοι, στέμφυλα). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα διερευνήθηκε ως προς την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, καθώς και της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου (FRAP). Επίσης προσδιορίστηκε η προστατευτική τους δράση κατά της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης από ιόντα χαλκού, καθώς και η επίδρασή τους στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) με χρήση της φθορίζουσας ένωσης DCFH-DA. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων συγκρίθηκε με τη δραστηριότητα καθαρών προτύπων ενώσεων.

6.3 Αποτελέσματα

6.4 Οίνοι

Στον Πίνακα 1Δ του Παραρτήματος Δ, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα –σε δείγματα ελληνικών οίνων– των μεθόδων Frap και DPPH για τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της μεθόδου Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών πολυφαινολικών που περιέχουν.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μεθόδου Frap εκφράζονται σε $\mu\text{M FeSO}_4$ και αντιπροσωπεύουν την αναγωγική ικανότητα του αδιάλυτου οίνου. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH εκφράζονται σε % v/v συγκέντρωση οίνου σε δ/μα EtOH/H₂O (15:85) και αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση οίνου που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μισής ποσότητας της ελεύθερης ρίζας (IC₅₀). Τέλος, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, η μέθοδος Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου δειγμάτων και τα αποτελέσματά της εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος ανά L οίνου, στην πραγματικότητα όμως προσδιορίζει αναγωγική ικανότητα αφού η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι οξειδοαναγωγική.

6.4.1.1 Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης λευκών και ερυθρών οίνων.

Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών των ολικών πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής δράσης για κάθε μέθοδο που εφαρμόστηκε για λευκούς και ερυθρούς οίνους.

Πίνακας 6.3 Μέσοι όροι τιμών ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής δράσης των οίνων που μελετήθηκαν

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	ΤΙΜΗ FRAP $\mu\text{M FeSO}_4$	DPPH IC ₅₀ % οίνος v/v
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ	2257,61	5434,05	1,30
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ	311,23	545,02	15,44
ΓΛΥΚΕΙΣ ΟΙΝΟΙ	1087,99	2183,93	7,26

Όπως ήταν αναμενόμενο, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών οίνων είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με αυτή των λευκών με όλες τις μεθόδους που

εφαρμόστηκαν. Οι μέσες τιμές που προσδιορίστηκαν για τις επιμέρους μεθόδους είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερες στους ερυθρούς οίνους συγκριτικά με τους λευκούς. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε άμεση συνάρτηση με το πολυφαινολικό περιεχόμενο των οίνων, τόσο το ολικό όσο και των συγκεντρώσεων των επιμέρους πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν με HPLC.

Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα αποτελεί η σημαντική αντιοξειδωτική δράση της πλειονότητας των γλυκών οίνων –και ιδιαίτερος των λευκών– των οποίων η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με των αντίστοιχων λευκών ξηρών οίνων.

Μεταξύ των ερυθρών οίνων, η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εντοπίστηκε στους οίνους της Σαντορίνης και ειδικότερα στην ποικιλία μανδηλαριά. Το αποτέλεσμα αυτό αντανακλά άμεσα και το πλούσιο πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων που προέρχονται από την ποικιλία αυτή.

Μεταξύ των λευκών οίνων και πάλι η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εντοπίστηκε στους οίνους της Σαντορίνης και ειδικότερα στην ποικιλία ασύρτικο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τους αντίστοιχους προσδιορισμούς του πολυφαινολικού τους περιεχομένου που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 3.

6.4.1.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των πολυφαινολών κατά τη διαύγαση

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων διαδικασιών διαύγασης στην αντιοξειδωτική δράση ερυθρών και λευκών οίνων, σε επιλεγμένα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4. Όπως γίνεται φανερό σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων μετά τη διαύγαση. Μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στους οίνους της Ρόδου, ιδιαίτερα, για την ποικιλία αθήρι. Αντίθετα για τους λευκούς οίνους της Σαντορίνης παρατηρήθηκε πολύ μικρή μεταβολή στην αντιοξειδωτική πριν και μετά τη διαδικασία της διαύγασης. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές τεχνικές διαύγασης που εφαρμόζονται από τα οινοποιεία αυτά. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αφορούν την μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου των οίνων κατά τη διαύγαση και παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 3.5.11. Επομένως

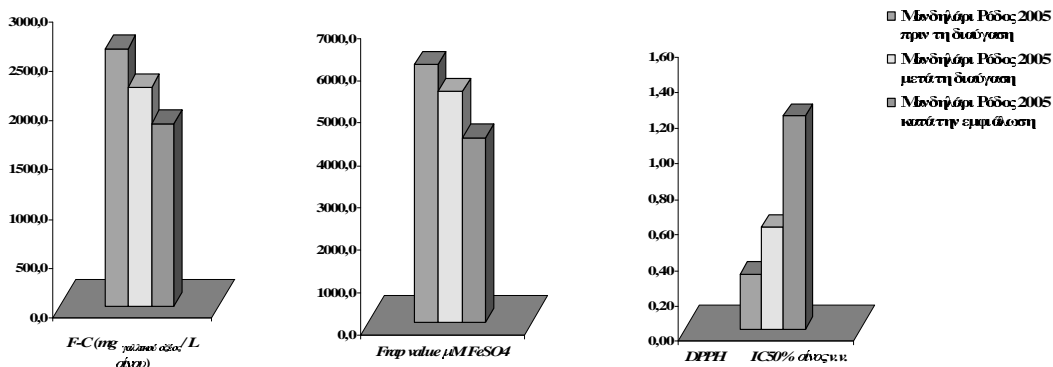
μπορεί με ασφάλεια να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου, οδηγεί σε μείωση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των οίνων.

Πίνακας 6.4 Μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας ερυθρών και λευκών οίνων στα διάφορα στάδια επεξεργασίας μετά τη ζύμωση.

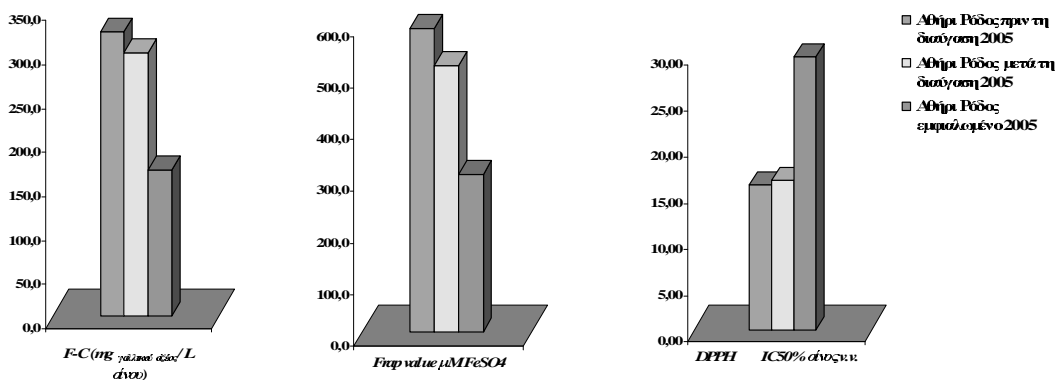
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	FRAP TIMH* μM FeSO ₄	DPPH IC ₅₀ % οίνος v/v
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 πριν τη διαύγαση	2599,4 ± 10,5	6074,2 ± 38,7	0,31 ± 0,06
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 μετά τη διαύγαση	2207,8 ± 37,1	5440,0 ± 98,22	0,58 ± 0,00
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 κατά την εμφιάλωση	1843,5 ± 4,2	4351,9 ± 38,77	1,20 ± 0,21
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Αθήρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2005	322,0 ± 1,6	590,0 ± 2,53	15,70 ± 1,76
Αθήρι Ρόδος μετά τη διαύγαση 2005	299,0 ± 3,56	517,7 ± 2,04	16,17 ± 1,96
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2005	166,1 ± 0,86	306,0 ± 3,56	29,60 ± 4,93
Αθήρι Ρόδος πριν διαύγαση 2004	307,6 ± 5,12	573,0 ± 4,03	22,45 ± 0,24
	290,3 ± 3,36	564,8 ± 4,16	22,48 ± 3,82
Αθήρι Ρόδος μετά τη διαύγαση 2004	198,4 ± 4,02	354,0 ± 1,14	27,20 ± 3,60
	202,6 ± 0,13	311,0 ± 6,11	26,70 ± 2,15
	195,3 ± 3,63	335,0 ± 1,61	27,40 ± 2,08
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2004	208,5 ± 3,86	409,4 ± 2,56	27,81 ± 1,94
Ασυρτικο Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2004	469,4 ± 13,42	807,0 ± 0,79	7,90 ± 0,81
Ασυρτικο Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	430,0 ± 6,22	766,8 ± 7,59	10,20 ± 1,49
Ασύρτικο Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2005	495,02 ± 11,98	887,0 ± 12,71	6,50 ± 0,13
Ασύρτικο Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	515,6 ± 4,9	939,0 ± 13,92	6,14 ± 0,53

* Αναγωγική ικανότητα οίνου

Στα Γραφήματα 6.1–6.2 απεικονίζεται και γραφικά η μεταβολή των ολικών πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για ένα ερυθρό και ένα λευκό οίνο όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, Frap και DPPH.



Διάγραμμα 6.1 Μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ερυθρού οίνου κατά τη διαύγαση



Διάγραμμα 6.2 Μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας λευκού οίνου κατά τη διαύγαση

6.4.1.3 Σύγκριση οίνων διαφορετικών ποικιλιών της ίδιας περιοχής

Προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση της ποικιλίας στην αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων, επιλέχθηκαν τρεις λευκοί και τρεις ερυθροί μονοποικιλιακοί οίνοι από τη Σαντορίνη εσοδείας 2005 κατά το στάδιο της εμφιάλωσης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 6.5. Όπως είναι εμφανές μεταξύ των λευκών οίνων το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει η ποικιλία ασύρτικο, ενώ μεταξύ των ερυθρών η ποικιλία μανδηλαριά. Το γεγονός αυτό συμφωνεί και με τα ευρήματα ως προς την πολυφαινολική σύσταση των σταφυλιών τα οποία παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 4.

Πίνακας 6.5 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής δράσης ερυθρών και λευκών οίνων της Σαντορίνης

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	FRAP ΤΙΜΗ* μM FeSO ₄	DPPH IC ₅₀ % οίνος v/v
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	3667,1 ± 32,4	8909,7 ± 89,93	0,17 ± 0,01
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	3052,2 ± 32,9	7900,0 ± 112,9	0,19 ± 0,03
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	2579,0 ± 61,0	6838,7 ± 47,45	0,22 ± 0,01
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Ασύρτικο Σαντορίνη 2005	515,6 ± 4,9	939,0 ± 13,92	6,14 ± 0,53
Αθήρι Σαντορίνη 2005	405,1 ± 3,35	746,2 ± 9,38	13,13 ± 1,79
Αηδάνι Σαντορίνη 2005	423,9 ± 11,7	783,3 ± 4,77	13,56 ± 0,57

* Αναγωγική ικανότητα οίνου

6.4.1.4 Ετήσια διακύμανση πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας οίνων

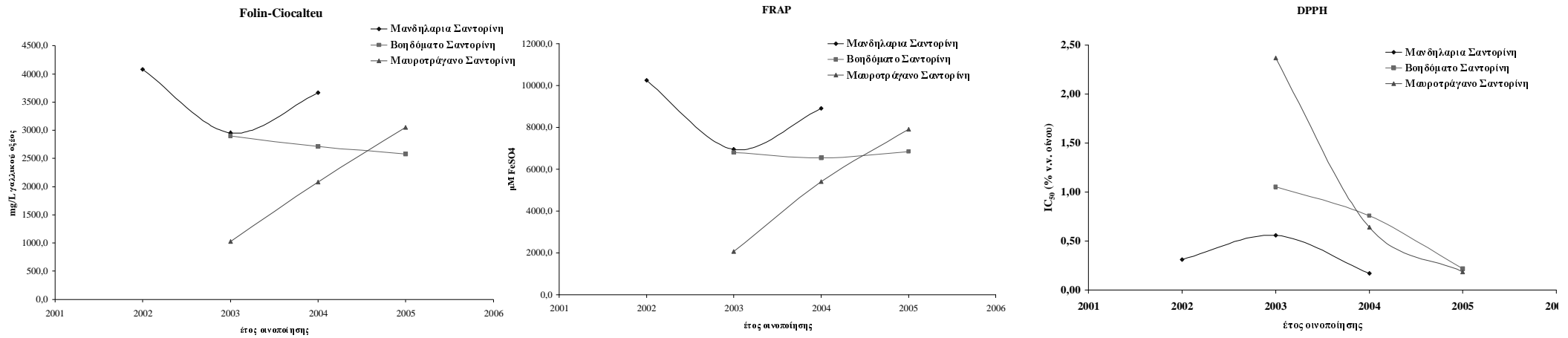
Οίνοι της ίδιας ποικιλίας και περιοχής, από διαφορετική εσοδεία, συγκρίθηκαν ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα *in vitro*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6 ομαδοποιημένα σε ερυθρούς και λευκούς οίνους. Όσον αφορά τους ερυθρούς οίνους, το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο και η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εντοπίζεται στους οίνους εσοδείας 2004, με εξαίρεση τη μανδηλαριά Σαντορίνης εσοδείας 2002 για την οποία προσδιορίστηκε εντυπωσιακά υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα όπως και περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στις κλιματολογικές συνθήκες που επικράτησαν τη συγκεκριμένη χρονιά κατά την περίοδο ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών, οι οποίες ήταν ιδιαίτερα αντίξοες, ευνοώντας τη βιοσύνθεση των πολυφαινολών.

Πίνακας 6.6 Ετήσια διακύμανση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας μονοποικιλιακών οίνων.

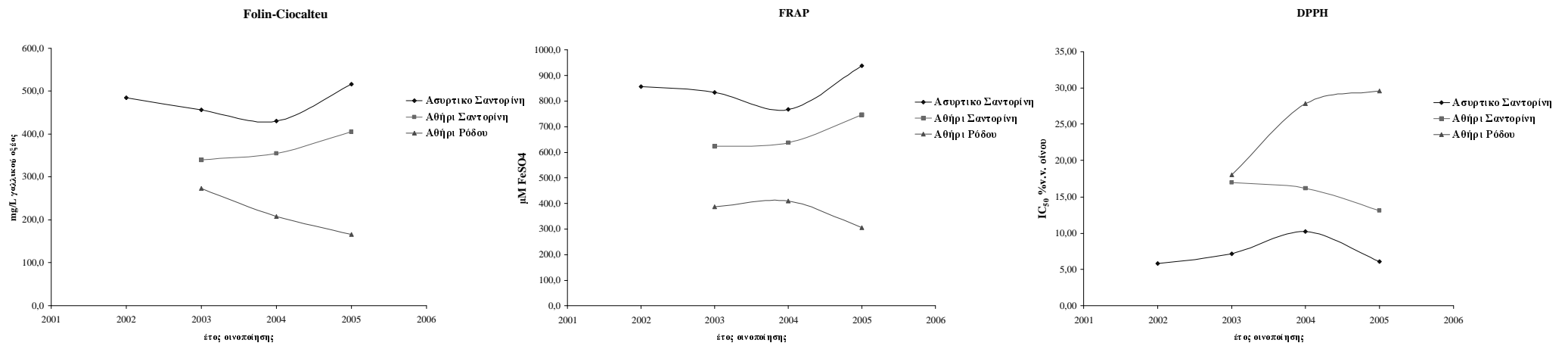
ΑΝΤΙΟΞΕΙΑΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	FRAP ΤΙΜΗ* μM FeSO ₄	DPPH IC ₅₀ % οίνος v/v
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	2896,5 ± 41,5	6800,0 ± 114,4	1,05 ± 0,07
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	2711,8 ± 60,0	6532,9 ± 34,26	0,76 ± 0,06
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	2579,0 ± 61,0	6838,7 ± 47,45	0,22 ± 0,01
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2002	4084,6 ± 82,9	10240,0 ± 19,07	0,31 ± 0,05
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	2956,1 ± 22,3	6935,4 ± 117,9	0,56 ± 0,05
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	3667,1 ± 32,4	8909,7 ± 89,93	0,17 ± 0,01
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	1025,7 ± 28,3	2059,6 ± 32,22	2,37 ± 0,04
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	2082,4 ± 11,4	5392,2 ± 37,47	0,64 ± 0,07
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	3052,2 ± 32,9	7900,0 ± 112,9	0,19 ± 0,03
Μανδηλάρι Ρόδος 2004	2460,0 ± 16,3	5678,3 ± 19,08	0,81 ± 0,12
Μανδηλάρι Ρόδος 2005	2599,4 ± 10,5	6074,2 ± 38,7	0,31 ± 0,06
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Αθήρι Σαντορίνη 2003	339,7 ± 7,92	623,0 ± 7,2	17,00 ± 0,63
Αθήρι Σαντορίνη 2004	355,0 ± 3,08	637,5 ± 11,31	16,20 ± 0,97
Αθήρι Σαντορίνη 2005	405,1 ± 3,35	746,2 ± 9,38	13,13 ± 1,79
Ασυρτικό Σαντορίνη 2002	484,6 ± 8,76	857,0 ± 11,12	5,81 ± 0,53
Ασυρτικό Σαντορίνη 2003	455,9 ± 2,08	834,0 ± 14,61	7,20 ± 0,22
Ασυρτικό Σαντορίνη 2004	430,0 ± 6,22	766,8 ± 7,59	10,20 ± 1,49
Ασύρτικο Σαντορίνη 2005	515,6 ± 4,9	939,0 ± 13,92	6,14 ± 0,53
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	436,3 ± 12,14	807,0 ± 9,81	10,40 ± 1,08
Αηδάνι Σαντορίνη 2005	423,9 ± 11,71	783,3 ± 4,77	13,56 ± 0,57
Αθήρι Ρόδος 2003	273,0 ± 3,18	387,7 ± 6,07	18,00 ± 2,33
Αθήρι Ρόδος 2004	208,5 ± 3,86	409,4 ± 2,56	27,81 ± 1,94
Αθήρι Ρόδος 2005	166,1 ± 0,86	306,0 ± 3,56	29,60 ± 4,93

* Αναγωγική ικανότητα οίνου

Στα Γραφήματα 6.3—6.4 παρουσιάζεται και γραφικά η ετήσια διακύμανση των πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ερυθρών και λευκών οίνων.



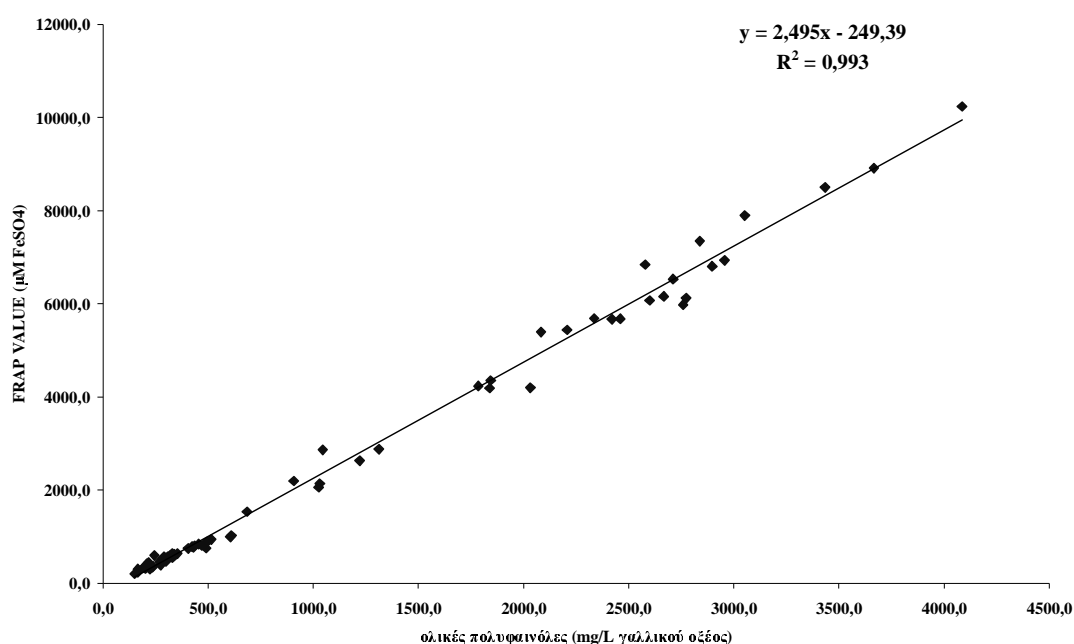
Γράφημα 6.3 Ετήσια μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ερυθρών οίνων



Γράφημα 6.4 Ετήσια μεταβολή του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας λευκών οίνων

6.4.1.5 Σύγκριση μεθόδων Folin-Ciocalteu και Frap

Στο Γράφημα 6.5 φαίνεται η γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των ερυθρών και λευκών οίνων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Frap και ολικών πολυφαινόλων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όπως φαίνεται υπάρχει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων ($R^2 = 0,993$). Κύρια αιτία για το φαινόμενο αυτό αποτελεί το γεγονός ότι ο μηχανισμός και των δύο αντιδράσεων περιλαμβάνει αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων¹⁷ όπως αναλύθηκε διεξοδικά στις παραγράφους 2.3.3 και 2.3.4. Επιπλέον για την ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων των μεθόδων Frap και Folin-Ciocalteu ακολουθείται η ίδια διαδικασία: κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς FeSO_4 και γαλλικού οξέος αντίστοιχα και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς αυτές. Αυτό συμβάλει στην ομοιομορφία των αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 6.5 Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των ολικών πολυφαινόλων των οίνων όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Frap.

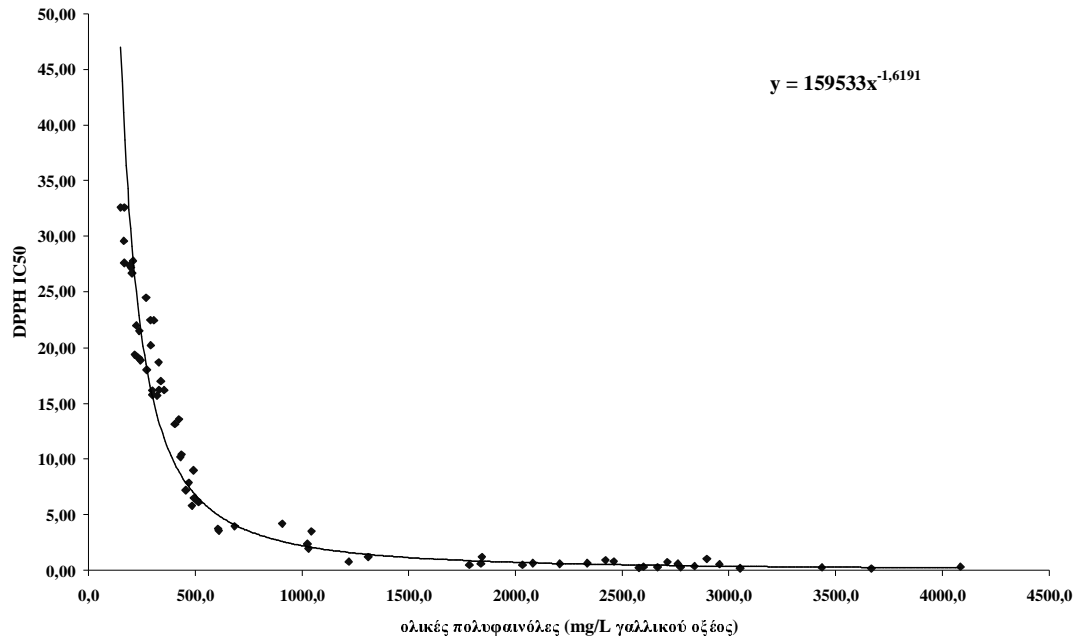
6.4.1.6 Συσχέτιση αποτελεσμάτων μεθόδων Folin-Ciocalteu και DPPH

Στο Γράφημα 6.6 παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC_{50} που υπολογίστηκαν για τους ερυθρούς και λευκούς οίνους με τη μέθοδο DPPH και των ολικών πολυφαινόλων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όπως φαίνεται η σχέση μεταξύ τους δεν είναι γραμμική, αλλά περιγράφεται από υπερβολική συνάρτηση. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται σε δύο παράγοντες:

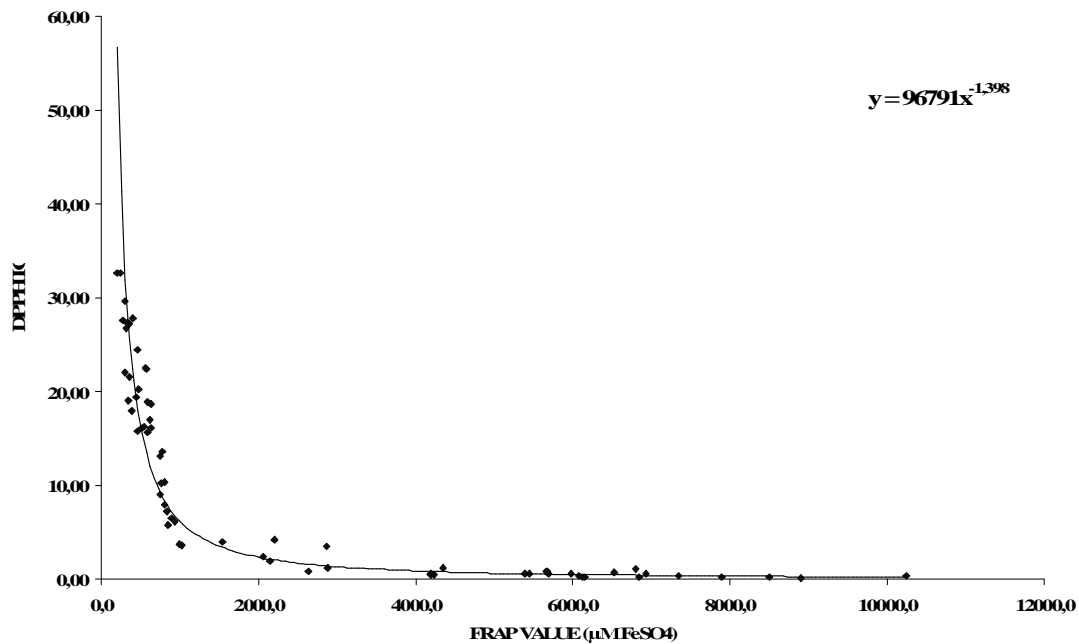
α) Στο διαφορετικό μηχανισμό στον οποίο στηρίζονται οι δύο μέθοδοι καθώς η DPPH μετά την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, ενώ η F-C στηρίζεται σε μια απλή αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων. β) Στο διαφορετικό τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, καθώς στη μέθοδο DPPH, μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποτελεί η τιμή IC_{50} ή “αποτελεσματική συγκέντρωση” η οποία λαμβάνει μικρότερες τιμές όσο αυξάνει η αντιοξειδωτική ικανότητα του υπό εξέταση δείγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα για συγκεντρώσεις ολικών πολυφαινόλων ανώτερες των 1000mg γαλλικού οξέος /L οίνου, η τιμή IC_{50} πρακτικά να προσεγγίζει την τιμή μηδέν, δηλαδή φτάνει σε πλατώ.

Επιπλέον η μέθοδος DPPH, παρουσιάζει προβλήματα, όταν εξετάζονται έγχρωμα δείγματα που απορροφούν στην περιοχή κοντά στα 515nm, περιορίζοντας την ακρίβεια των μετρήσεων.¹⁸

Η ίδια σχέση προκύπτει και κατά την γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου DPPH και της μεθόδου Frap, όπως φαίνεται στο Γράφημα 6.7.



Διάγραμμα 6.6 Συσχέτιση τιμών ολικών πολυφαινόλων των οίνων όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH.



Διάγραμμα 6.7 Συσχέτιση τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως υπολογίστηκαν με τις μεθόδους DPPH και Frap.

6.5 Εκχυλίσματα

Όλα τα εκχυλίσματα σταφυλιών, φλοιών, γιγάρτων και υποπροϊόντων της οινοποίησης που παρασκευάστηκαν αναλύθηκαν ως προς το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους Frap και DPPH. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται στους Πίνακες 2Δ—6Δ του Παραρτήματος Δ.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu εκφράζονται ως mg γαλλικού οξέος /g εκχυλίσματος.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Frap εκφράζονται σε $\mu\text{M FeSO}_4$ και αντιπροσωπεύουν την αναγωγική ικανότητα διαλύματος εκχυλίσματος 100 mg/ml σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O/EtOH}$ (85:15). Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH εκφράζονται σε συγκέντρωση εκχυλίσματος $\mu\text{g/mL}$ σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O/EtOH}$ (85:15) και αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μισής ποσότητας της ελεύθερης ρίζας (IC_{50}).

Τα αποτελέσματα έχουν ομαδοποιηθεί, ανάλογα με το είδος τους σε σταφύλια, φλοιούς γιγάρτα, βόστρυχους, στέμφυλα και οινολάσπες.

6.5.1 Ράγες

Στον Πίνακα 6.9 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών που υπολογίστηκαν κατά την εφαρμογή των μεθόδων Folin-Ciocalteu, Frap και DPPH σε εκχυλίσματα ραγών σταφυλιών.

Πίνακας 6.9 Μέσοι όροι τιμών ολικών πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σταφυλιών

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛ. ΡΑΓΩΝ	F-C mg/g εκχυλ	ΤΙΜΗ FRAP* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	379,79	88,09	15,27
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	341,25	82,98	18,19

* Εκφράζει την Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/mL}$ εκχυλ.

Τα εκχυλίσματα των σταφυλιών παρουσιάζουν υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο, και σημαντική αντιοξειδωτική δράση όπως φαίνεται από τις τιμές που προσδιορίστηκαν. Είναι αξιοσημείωτο, ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφοροποίηση μεταξύ ερυθρών και λευκών ποικιλιών, σε αντίθεση με ότι παρατηρήθηκε για τους οίνους.

6.5.1.1 Εποχιακή μεταβολή αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.6.1.1.3 το πολυφαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών εκφρασμένο σε mg/Kg φρέσκων ραγών, μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στο Γράφημα 6.8 περιγράφεται η μεταβολή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων δύο ποικιλιών ερυθρών σταφυλιών σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης τους. Όπως παρατηρείται και στις δύο ποικιλίες η ωρίμανση συνεπάγεται μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων και στις δύο ποικιλίες σταφυλιών. Αυτό σχετίζεται αφενός με τη μείωση του συνόλου των πολυφαινολών στα σταφύλια και αφετέρου με την αύξηση του ποσοστού των σακχάρων, που έστω και σε μειωμένο ποσοστό περνάνε στα εκχυλίσματα, παρεμποδίζοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου που παρατηρείται στα εκχυλίσματα δεν είναι τόσο δραματική όσο στις φρέσκες ράγες.

6.5.2 **Γιγάρτα**

Στον Πίνακα 6.10 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών που υπολογίστηκαν κατά την εφαρμογή των μεθόδων Folin-Ciocalteu, Frap και DPPH σε εκχυλίσματα γιγάρτων.

Πίνακας 6.10 Μέσοι όροι τιμών ολικών πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων γιγάρτων

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛ. ΓΙΓΑΡΤΩΝ	F-C mg/g εκχυλ.	ΤΙΜΗ FRAP* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	582,49	130,35	7,65
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	506,35	124,83	13,17

* Εκφράζει την Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

Τα εκχυλίσματα γιγάρτων εμφάνισαν το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με όλα τα είδη εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα των γιγάρτων σε φλαβονοειδή και ιδιαίτερα στην παρουσία προκυανιδινών και ολιγομερών φλαβονολών τα οποία θεωρείται ότι διαθέτουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα μονομερή, όπως η (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη. Επιπλέον στα γίγαρτα δεν περιέχονται καθόλου σάκχαρα με αποτέλεσμα να λαμβάνονται εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης πολύ συμπυκνωμένα.

6.5.3 Φλοιοί

Στον Πίνακα 6.11 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών που υπολογίστηκαν κατά την εφαρμογή των μεθόδων Folin-Ciocalteu, Frap και DPPH σε εκχυλίσματα φλοιών.

Πίνακας 6.11 Μέσοι όροι τιμών ολικών πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων φλοιών

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛ. ΦΛΟΙΩΝ	F-C mg/g εκχυλ.	ΤΙΜΗ FRAP* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	149,42	30,49	59,87
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	69,97	13,57	144,65

* Εκφράζει την Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

Τα εκχυλίσματα των φλοιών παρουσιάζουν εξαιρετικά χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, κατά αντιστοιχία με το χαμηλό τους πολυφαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον όπως συζητήθηκε στην παράγραφο 4.6.3.3. η πλειοψηφία των πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στους φλοιούς ήταν γλυκοζίτες της κερκετίνης. Η κερκετίνη αποτελεί ένα φλαβονοειδές το οποίο -σε ελεύθερη μορφή- παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, όπως όμως έχει αποδειχθεί οι γλυκοζίτες της διαθέτουν μειωμένη *in vitro* ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, αφού η ύπαρξη γλυκοζιτικού δεσμού μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των γειτονικών υδροξυλίων λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.¹⁹⁻²¹

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ ερυθρών και λευκών ποικιλιών, τα εκχυλίσματα φλοιών που προέρχονται από ερυθρά σταφύλια, έχουν διπλάσιο πολυφαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα εκχυλίσματα των λευκών. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την παρουσία ανθοκυανινών στο φλοιό των ερυθρών ποικιλιών, αν και η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε δε στόχευε στην παραλαβή τους.

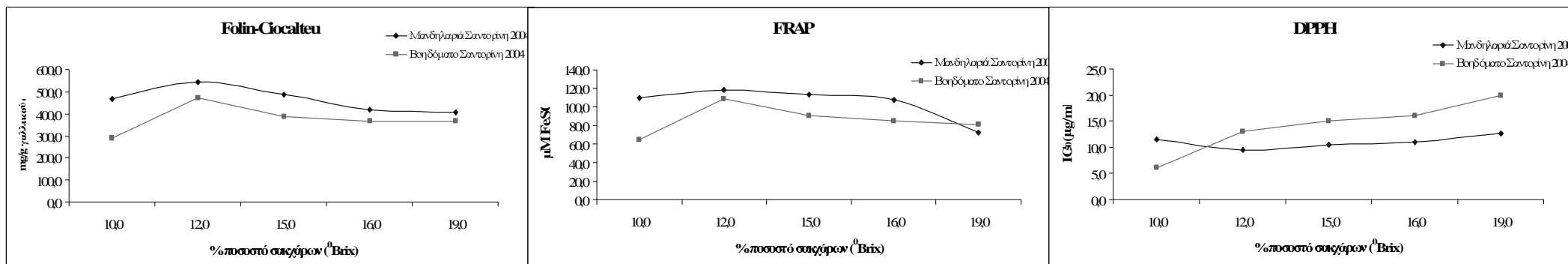
Στον Πίνακα 6.12 πραγματοποιείται σύγκριση του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ραγών και των αντίστοιχων εκχυλισμάτων φλοιών και γιγάρτων που έχουν προέλθει από αυτά.

Πίνακας 6.12 Σύγκριση πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων ραγών, γιγάρτων και φλοιού του ίδιου δείγματος

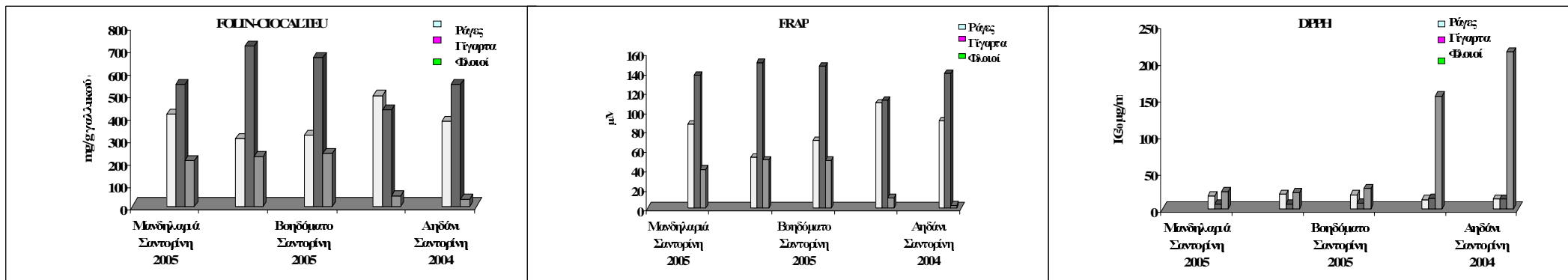
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	F-C (mg/g εκχυλ)	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005			
Ράγες	411,2 \pm 2,5	86,7 \pm 0,31	17,6 \pm 0,76
Γίγαρτα	542,69 \pm 3,3	137,01 \pm 1,16	6,8 \pm 0,64
Φλοιός	204,21 \pm 0,60	40,07 \pm 1,05	23,59 \pm 0,98
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005			
Ράγες	301,0 \pm 3,6	52,2 \pm 0,74	20,2 \pm 0,84
Γίγαρτα	714,39 \pm 7,4	150,20 \pm 4,89	6,6 \pm 3,36
Φλοιός	222,21 \pm 8,47	48,39 \pm 0,14	22,3 \pm 0,27
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005			
Ράγες	317,87 \pm 5,1	69,8 \pm 1,59	19,6 \pm 0,10
Γίγαρτα	660,73 \pm 7,4	146,4 \pm 2,42	7,94 \pm 0,14
Φλοιός	136,53 \pm 0,99	26,88 \pm 0,81	54,42 \pm 1,82
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004			
Ράγες	492,7 \pm 15,6	108,85 \pm 6,00	13,0 \pm 0,58
Γίγαρτα	428,20 \pm 9,9	111,35 \pm 4,18	14,8 \pm 2,46
Φλοιός	47,46 \pm 2,20	10,57 \pm 0,20	117,0 \pm 3,14
Αηδάνι Σαντορίνη 2004			
Ράγες	376,9 \pm 14,0	90,0 \pm 0,67	13,1 \pm 0,8
Γίγαρτα	540,6295 \pm 9,4	126,0 \pm 1,87	13,4 \pm 2,23
Φλοιός	32,31 \pm 2,26	3,10 \pm 0,12	274,2 \pm 2,10

*Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ

Τα αποτελέσματα του πίνακα απεικονίζονται και γραφικά στο Γράφημα 6.9. Όπως παρατηρείται το πολυφαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ραγών και γιγάρτων είναι παρόμοιες, σε αντίθεση με αυτή των φλοιών, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό διαλυτών πολυφαινολών εντοπίζεται στα γίγαρτα των ραγών.



Διάγραμμα 6.8 Εποχιακή διακύμανση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων σταφυλιών.



Διάγραμμα 6.9 Σύγκριση ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ραγών, γύγαρων και φλοιών του ίδιου δείγματος

6.5.4 Υποπροϊόντα

Στον πίνακα 6.13 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των οι μέσοι όροι των τιμών που υπολογίστηκαν κατά την εφαρμογή των μεθόδων Folin-Ciocalteu, Frap και DPPH σε εκχυλίσματα στεμφύλων.

Πίνακας 6.13 Μέσοι όροι τιμών ολικών πολυφαινόλων και αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων υποπροϊόντων της οινοποίησης

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	F-C mg/g εκχυλ.	ΤΙΜΗ FRAP* (μM FeSO ₄)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ			
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	507,71	101,99	13,75
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	481,23	95,15	12,33
ΣΤΕΜΦΥΛΑ			
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	312,35	64,17	25,83
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	351,43	76,79	22,68
ΟΙΝΟΛΑΣΠΕΣ			
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	74,31	16,50	133,32

Όπως φαίνεται τα εκχυλίσματα των βοστρύχων είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ολικές πολυφαινόλες και παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε για τα εκχυλίσματα γιγάρτων.

Τα εκχυλίσματα των στεμφύλων, διαθέτουν και αυτά σημαντικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτικό δυναμικό παραπλήσιο με των εκχυλισμάτων σταφυλιών.

Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ιδιαίτερη αξία, καθώς αναδεικνύουν την πιθανότητα αξιοποίησης των υποπροϊόντων της οινοποίησης προς την κατεύθυνση παραγωγής προϊόντων υψηλής βιολογικής και οικονομικής αξίας.

Τέλος τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών μεθόδων βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την ανάλυση των εκχυλισμάτων στο HPLC, υποδηλώνοντας ότι υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο συνεπάγεται αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

6.5.4.1 Αντιοξειδωτική Ικανότητα Προτύπων Ενώσεων

Εκτός από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των οίνων και των εκχυλισμάτων των αμπελοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων της οινοποίησης, θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθαρών προτύπων ουσιών, που ανιχνεύθηκαν στα παραπάνω δείγματα σε αξιόλογες ποσότητες, προκειμένου να καταστεί δυνατή η σύνδεση του πολυφαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των προτύπων ουσιών διερευνήθηκε ως προς την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, καθώς και της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου (FRAP). Παράλληλα η αντιοξειδωτική ικανότητα των καθαρών πολυφαινολών συγκρίθηκε με την αντιοξειδωτική δράση ενός πρότυπου αντιοξειδωτικού, του τρόλοξ ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) που αποτελεί υδατοδιαλυτό παράγωγο της βιταμίνης E. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται στον Πίνακα 6.10

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Frap εκφράζονται σε $\mu\text{M FeSO}_4$ και αντιπροσωπεύουν την αναγωγική ικανότητα 1mM πρότυπης ένωσης σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O/EtOH}$ (85:15)

Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH εκφράζονται σε συγκέντρωση εκχυλίσματος μM πρότυπης ένωσης σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O/EtOH}$ (85:15) και αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μισής ποσότητας της ελεύθερης ρίζας (IC_{50}).

Πίνακας 6.10 Αντιοξειδωτική ικανότητα προτύπων ενώσεων

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	ΤΙΜΗ FRAP* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC_{50} (μM)
κερκετίνη	1196,7 \pm 13,3	23,06 \pm 0,61
ρουτινοσίδης της κερκετίνης	854,7 \pm 10,9	36,67 \pm 0,68
(-)-επικατεχίνη	967,7 \pm 13,8	23,88 \pm 0,94
(+)-κατεχίνη	928,2 \pm 14,1	24,94 \pm 0,02
γαλλικό οξύ	972 \pm 5,9	23,34 \pm 0,71
συριγγικό οξύ	819,6 \pm 7,1	34,45 \pm 0,03
καφεϊκό οξύ	707,8 \pm 5,3	38,08 \pm 1,18
φερουλικό οξύ	465,9 \pm 2,0	67,71 \pm 2,32
<i>π</i> -κουμαρικό οξύ	71,4 \pm 3,8	>500
τρόλοξ	491,5 \pm 7,1	54,46 \pm 0,64

*Αναγωγική Ικανότητα 1mM πρότυπης ουσίας

Όπως παρατηρείται η συσχέτιση των δύο μεθόδων, είναι αρκετά ικανοποιητική. Στη μέθοδο DPPH η ικανότητα των προτύπων πολυφαινολών να εξουδετερώνουν την ελεύθερη ρίζα ακολουθεί τη σειρά: κερκετίνη>γαλλικό οξύ>(-)-επικατεχίνη>(+)–κατεχίνη>συρριγγικό οξύ>ρουτίνη>καφεϊκό οξύ>τρόλοξ φερουλικό οξύ>π-κουμαρικό οξύ.

Στη μέθοδο Frap, η αναγωγική ικανότητα των προτύπων πολυφαινολών ακολουθεί τη σειρά: κερκετίνη>γαλλικό οξύ>(-)-επικατεχίνη>(+)–κατεχίνη>ρουτίνη >συρριγγικό οξύ> καφεϊκό>τρόλοξ>φερουλικό οξύ>π-κουμαρικό οξύ.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ερμηνεύονται βάσει της δομής των φαινολικών ουσιών, όπως αναλύθηκε διεξοδικά στην παράγραφο 1.9 του Κεφαλαίου 1.

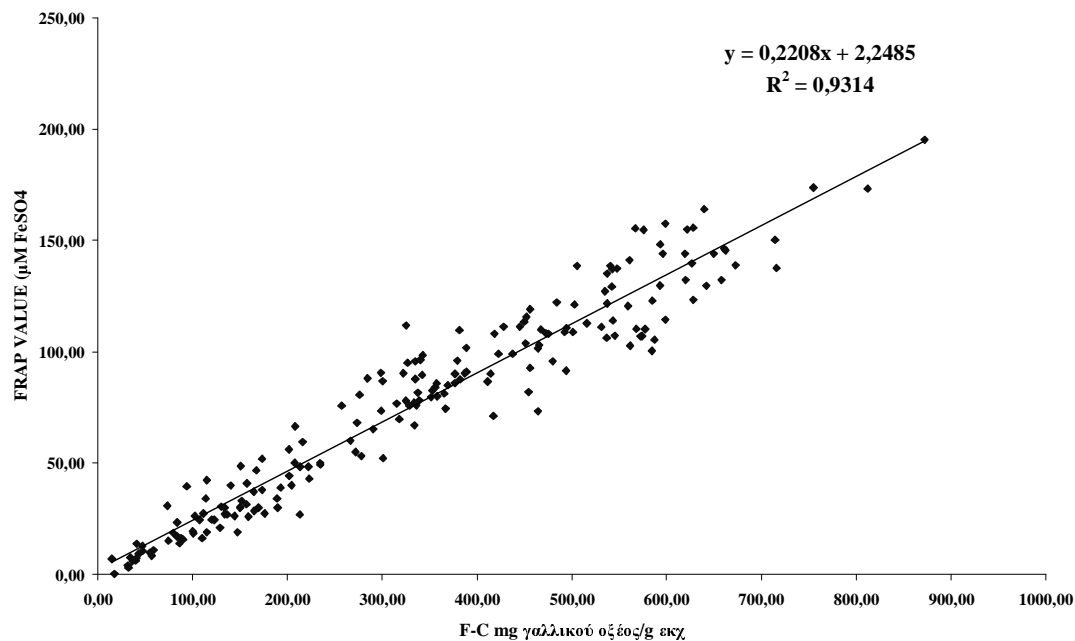
Επίσης ένα πολύ σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες που μελετήθηκαν έχουν μεγαλύτερη *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με το τρόλοξ.

Οι παραπάνω φαινολικές ενώσεις και τα παράγωγα τους (ολιγομερή, πολυμερή, γλυκοζίτες), βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στους οίνους και στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, επομένως η παρουσία τους συνδέονται άμεσα με την αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων αυτών.

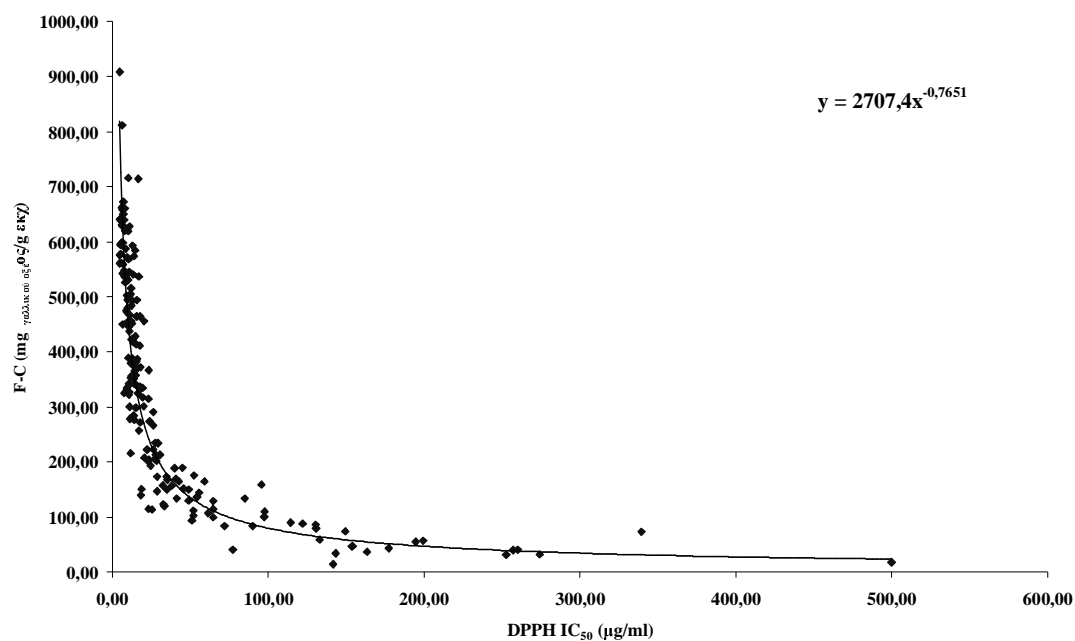
Συσχέτιση μεθόδων Folin-Ciocalteu και Frap

Στο Γράφημα 6.10 φαίνεται η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Frap και ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όπως φαίνεται υπάρχει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων, αντίστοιχη με αυτή που βρέθηκε για τους οίνους.

Παρομοίως η γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της Folin-Ciocalteu και της μεθόδου DPPH παρουσιάζει εικόνα αντίστοιχη με αυτή που βρέθηκε για τους οίνους (Γράφημα 6.11).



Γράφημα 6.10 Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των ολικών πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Frap



Διάγραμμα 6.11 Συσχέτιση τιμών ολικών πολυφαινόλων των οίνων όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH

6.5.5 Αποτελέσματα μεθόδων LDL και Ενδοκυτταρικών ROS

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, για την καλύτερη αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής φράσης ενός συστήματος είναι απαραίτητη η διαξαγωγή μιας σειράς τεστ, τα οποία να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο στις οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δύο *in vitro* τεστ : η μέθοδος οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης παρουσία ιόντων Cu(II) και η μέθοδος προσδιορισμού των ενδοκυτταρικών Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS). Η πρώτη μέθοδος σχετίζεται άμεσα με την περισσότερο μελετημένη ιδιότητα των πολυφαινολών, την αναστολή της οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και κατά συνέπεια την παρεμπόδιση δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας.

Η δεύτερη μέθοδος είναι επίσης σημαντική καθώς σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινα κύτταρα, το οποίο έχει αναγνωρισθεί ως αιτία εμφάνισης πολλών ασθενειών όπως διάφορες μορφές καρκίνου, καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδης διαβήτης, ασθένειες του νευρικού συστήματος κ.α.

Για την διεξαγωγή των συγκεκριμένων τεστ, επιλέχθηκαν από κάθε κατηγορία δειγμάτων τα εκχυλίσματα με το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των οίνων παρασκευάστηκαν στερεά εκχυλίσματα με τη χρήση ρητίνης XAD4, αφενός για να επιτευχθεί συμπύκνωση των περιεχόμενων πολυφαινολών στους οίνους, και αφετέρου για να αποφευχθεί η τοξική επίδραση της αιθανόλης στις καλλιέργειες κυττάρων, καθώς στις συγκεντρώσεις που βρίσκεται στους οίνους, είναι ιδιαίτερος κυτταροτοξική.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών μεθόδων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.

Στον Πίνακα 7Δ του **Παραρτήματος Δ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν, κατά την εφαρμογή των μεθόδων Folin-Ciocalteu, Frap, DPPH, LDL και μεθόδου ενδοκυτταρικών ROS σε όλα τα εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα έχουν ομαδοποιηθεί σε κατηγορίες δειγμάτων, προκειμένου να καταστεί εύκολη η σύγκριση μεταξύ τους.

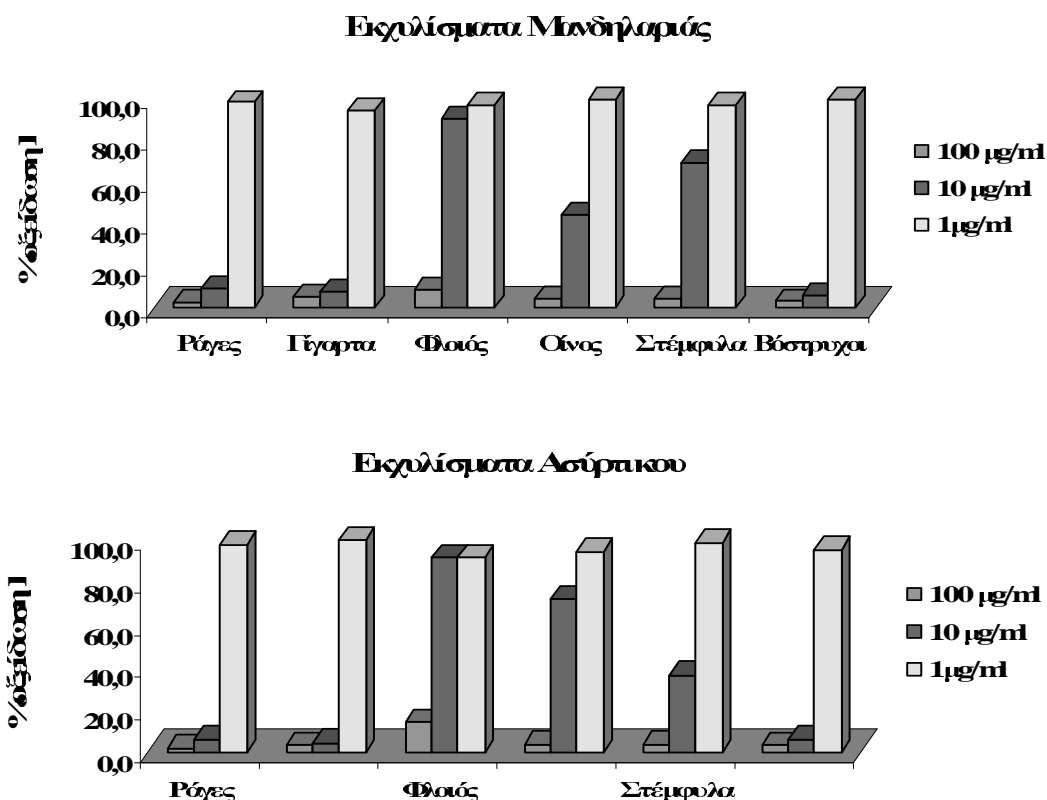
Τα αποτελέσματα της μεθόδου LDL έχουν εκφραστεί σε $\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος, και αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση εκχυλίσματος που απαιτείται για να εμποδίσει την οξείδωση της LDL από ιόντα Cu(II) σε ποσοστό 50% (IC_{50})

Τα αποτελέσματα της μεθόδου των ενδοκυτταρικών ROS, εκφράστηκαν σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος και αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση εκχυλίσματος που απαιτείται για να μειώσει τα ποσοστά των ενδοκυτταρικών ROS σε ποσοστό 25% (IC_{75}).

6.5.5.1 Αποτελέσματα μεθόδου LDL

Τα περισσότερα από τα εκχυλίσματα επέδειξαν μεγάλη ικανότητα αναστολής της οξείδωσης της LDL παρουσία ιόντων $\text{Cu}(\text{II})$, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης υπολογίστηκε το IC_{50} για της καθαρής ένωσης (-)-επικατεχίνη, και υπολογίστηκε **20,9 μM** . Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά καθώς στηρίζουν την υπόθεση της αναστολής της οξείδωσης της LDL στον οργανισμό από τα πολυφαινολικά συστατικά του οίνου και πρόληψη της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας στις αρτηρίες.

Η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε για τα εκχυλίσματα γιγάρτων, σταφυλιών και βοστρύχων, ενώ η χειρότερη για τα εκχυλίσματα φλοιών. Στα Γραφήματα 6.12-6.13 φαίνεται η εξάρτηση του % ποσοστού οξείδωσης της LDL παρουσία εκχυλισμάτων ραγών, γιγάρτων, φλοιών, οίνων, στεμφύλων και βοστρύχων μιας ερυθράς και μιας λευκής ποικιλίας σε συγκεντρώσεις 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 1

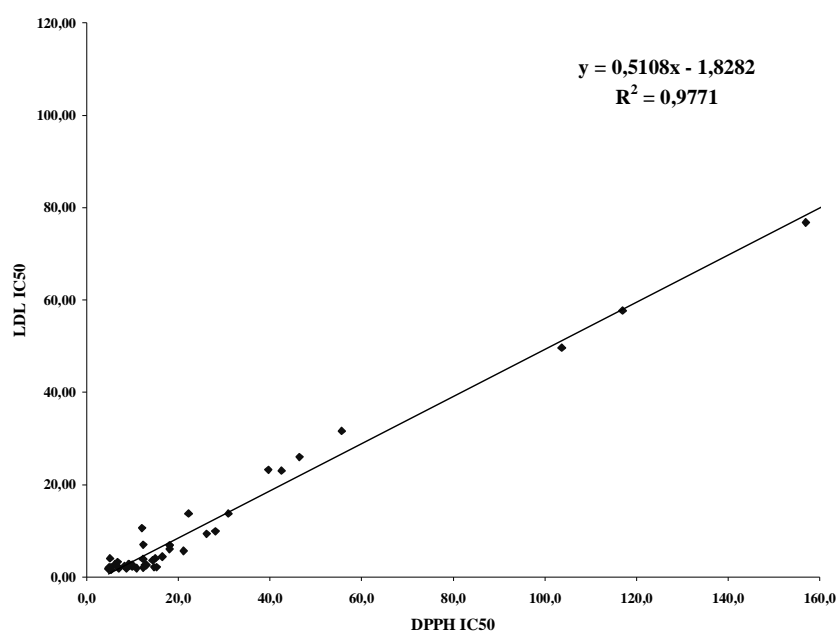


Γράφημα 6.12–6.13 Εξάρτηση του ποσοστού οξείδωσης της LDL από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού

μg/ml εκχυλίσματος. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι για τα περισσότερα δείγματα, επιτυγχάνεται ικανοποιητική αναστολή της οξείδωσης της LDL ακόμη και σε συγκέντρωση 1 μg/ml εκχυλίσματος.

6.5.5.2 Συσχέτιση μεθόδων LDL και DPPH

Στο Γράφημα 6.14 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των τιμών IC_{50} που υπολογίστηκαν με τις μεθόδους DPPH και LDL. Η γραμμική συσχέτιση είναι αρκετά καλή ($R^2 = 0,977$), γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς συνδέει τα αποτελέσματα μιας μεθόδου που σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις βιολογικές διεργασίες στον οργανισμό –δηλαδή την οξείδωση της LDL– με μια μέθοδο που στηρίζεται στην εξουδετέρωση μιας συνθετικής ρίζας (DPPH).

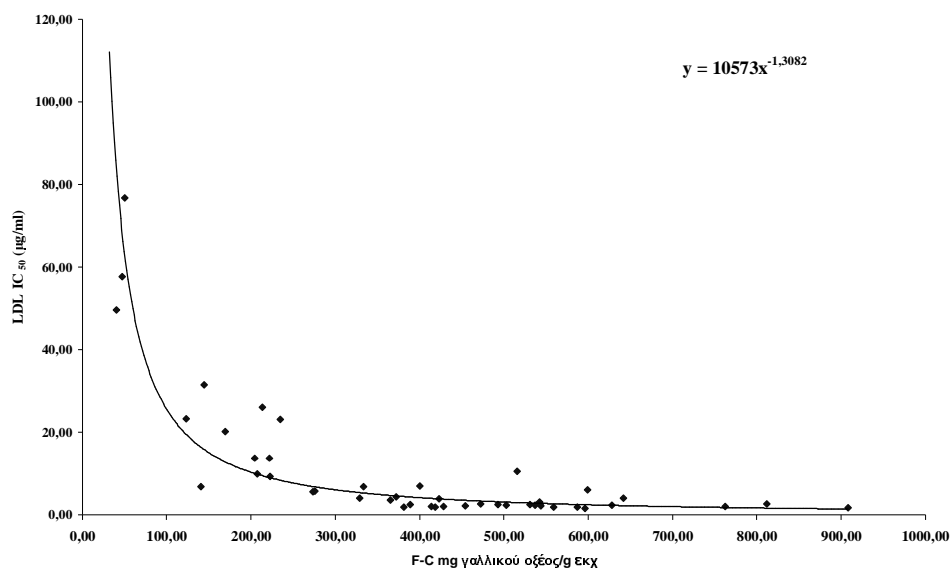


Διάγραμμα 6.14 Γραμμική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων οίνων, αμπελοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων οινοποίησης, όπως αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους LDL και DPPH

6.5.5.3 Συσχέτιση μεθόδων LDL και Folin-Ciocalteu

Στο Γράφημα 6.15 παρουσιάζεται η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της LDL, με το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Όπως φαίνεται για συγκέντρωση πολυφαινολών μεγαλύτερη από 300mg/g εκχυλίσματος, οι τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο LDL παρουσιάζουν πλατώ, δηλαδή τα

εκχυλίσματα αυτά διαθέτουν ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα αναστολής της οξειδωσης της LDL, με αποτέλεσμα οι τιμές IC₅₀ να τείνουν στην τιμή μηδέν. Επιπλέον η μη γραμμική συσχέτιση αποδίδεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο εκφράζονται τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων. Για το λόγο αυτό καλή γραμμική συσχέτιση εμφανίζεται μεταξύ των μεθόδων Frap και Folin-Ciocalteu και αντίστοιχα



μεταξύ των μεθόδων LDL και DPPH.

Διάγραμμα 6.15 Συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων οίνων, αμπελοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων οινοποίησης, όπως αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους LDL και του ολικού του πολυφαινολικού περιεχομένου

6.5.5.4 Αποτελέσματα μεθόδου ενδοκυτταρικών ROS

Σε γενικές γραμμές τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν επέδειξαν μέτρια ικανότητα μείωσης του επιπέδου των ενδοκυτταρικών ROS σε καλλιέργειες λειών μυϊκών κυττάρων. Την καλύτερη δράση έδειξαν τα εκχυλίσματα ραγών και γιγάρτων, ενώ τη χειρότερη επέδειξαν τα εκχυλίσματα φλοιών. Εκτός από τα εκχυλίσματα η μέθοδος εφαρμόστηκε και στις πρότυπες ουσίες (+)-κατεχίνη, κερκετίνη, τρόλοξ καθώς και σε ένα εμπορικό εκχύλισμα πεύκου (πυκνογενόλη ,Vilco) σε εύρος συγκεντρώσεων 250–2,5 µM. Οι τιμές IC₇₅ που υπολογίστηκαν –εκφρασμένες σε µM– παρατίθενται στον Πίνακα 6.11

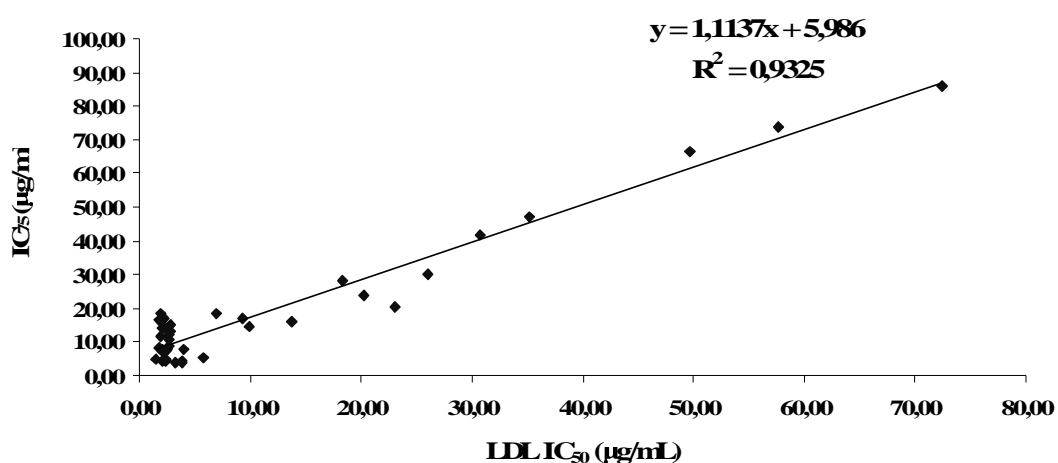
Πίνακας 6.11 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας προτύπων ενώσεων σε καλλιέργειες κυττάρων

Πρότυπη Ένωση	IC ₇₅ μΜ
(+)-Κατεχίνη	12,51± 1,34
Κερκετίνη	8,78± 0,78
Τρόλοξ	>250
Πυκνογενόλη	—

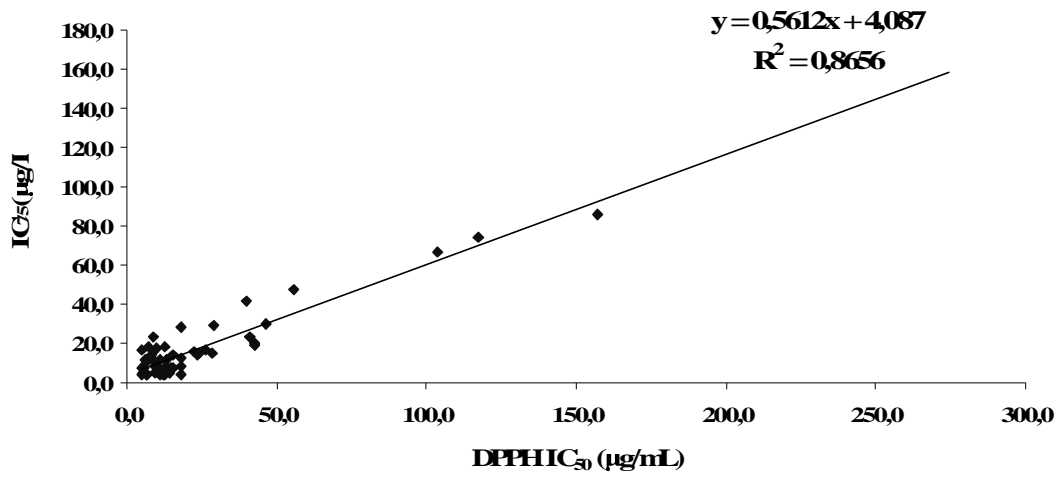
Η κερκετίνη και η (+)-κατεχίνη παρουσίασαν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα σε αντίθεση με το τρόλοξ που αποδείχθηκε ανενεργό σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ενώ η πυκνογενόλη στις μεγάλες συγκεντρώσεις παρουσίασε έντονη κυτταροτοξικότητα, επομένως δεν ήταν δυνατό να εξαχθεί τιμή IC₇₅.

6.5.5.5 Σύγκριση μεθόδου ενδοκυτταρικών ROS με τις μεθόδους LDL και DPPH

Στα Γραφήματα 6.16-6.17 φαίνεται η γραμμική συσχέτιση των τιμών IC₇₅ που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των ενδοκυτταρικών ROS και των τιμών IC₅₀ που υπολογίστηκαν κατά την εφαρμογή των μεθόδων LDL και DPPH αντίστοιχα. Η συσχέτιση είναι καλύτερη μεταξύ των μεθόδων LDL και ROS, ($R^2 = 0,932$) γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στο ότι και οι δύο μέθοδοι αναφέρονται σε βιολογικές διεργασίες



Γράφημα 6.16 Γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων οίνων, αμπελοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων οινοποίησης, όπως αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους LDL και ενδοκυτταρικών ROS.



Διάγραμμα 6.17 Γραμμική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων οίνων, αμπελοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων οиноποίησης, όπως αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους LDL και ενδοκυτταρικών DPPH

Πίνακας 6.12 Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων γιγάρτων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP, DPPH, LDL και DCFHDA

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	FOLIN-CIOCALTEU mg/g εκχυλ.	FRAP VALUE (μM FeSO4)	DPPH IC ₅₀ (μg/ml)	LDL IC ₅₀ (μg/ml)	DCFHDA IC ₇₅ (μg/ml)
ΣΤΕΜΦΥΛΑ					
Ασύρτικο Ρόδος 2003	414,16 ± 7,21	90,17 ± 1,18	15,3 ± 0,53	2,11 ± 0,07	14,32 ± 2,20
Λιατικό Σητεία 2003	333,87 ± 1,42	77,22 ± 0,24	18,1 ± 0,23	6,80 ± 0,42	24,58 ± 0,07
Λευκά Σαντορίνη 2003	273,58 ± 5,62	68,11 ± 0,40	21,2 ± 1,91	5,60 ± 0,51	15,13 ± 0,76
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	222,91 ± 0,98	43,00 ± 1,34	26,2 ± 1,17	9,31 ± 0,82	17,02 ± 1,46
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	207,79 ± 3,73	50,14 ± 0,90	28,1 ± 1,68	9,84 ± 0,16	14,67 ± 0,08
Βινσαντο Σαντορίνη 2003	173,38 ± 3,61	51,92 ± 1,17	28,8 ± 0,40	ΔΜ	38,80 ± 0,42
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	165,00 ± 1,88	28,61 ± 1,20	42,8 ± 1,85	ΔΜ	19,47 ± 1,62
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	50,0 ± 5,0	12,00 ± 1,61	157,0 ± 27,19	76,80 ± 0,50	27,64 ± 2,19
ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ					
Αθήρι Σαντορίνη 2003	559,22 ± 12,33	120,48 ± 2,31	7,0 ± 0,49	1,91 ± 0,03	18,67 ± 0,62
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	536,85 ± 11,28	106,32 ± 1,86	8,3 ± 0,15	2,32 ± 0,02	14,14 ± 1,17
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	587,15 ± 22,57	121,00 ± 0,42	8,7 ± 0,49	1,87 ± 0,44	16,19 ± 1,59
Βινσαντο Σαντορίνη 2003	543,30 ± 37,42	114,09 ± 0,70	9,1 ± 0,15	2,72 ± 0,06	10,44 ± 2,02
Βηλάνα Σητεία 2003	454,40 ± 8,82	90,00 ± 1,29	10,0 ± 0,27	2,21 ± 0,82	17,21 ± 1,25
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	400,00 ± 8,24	103,80 ± 0,91	12,4 ± 0,73	6,93 ± 0,13	18,28 ± 1,57
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	372,29 ± 8,31	97,90 ± 0,24	16,5 ± 0,21	4,40 ± 0,15	4,25 ± 0,66
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	367,10 ± 5,89	74,45 ± 0,54	23,4 ± 0,39	ΔΜ	49,05 ± 5,46
ΓΙΓΑΡΤΑ					
Αγιαννιώτικο ΓΠΑ	908,58 ± 34,60	197,00 ± 4,90	4,8 ± 0,09	1,71 ± 0,45	16,51 ± 3,68
Ροδίτης Τυρναβού /2004	762,16 ± 18,9	175,57 ± 2,2	4,9 ± 0,18	2,04 ± 0,06	4,30 ± 0,25
Μανδηλαρι Ηράκλειο 2004	641,97 ± 12,90	133,00 ± 2,33	5,2 ± 0,05	3,98 ± 0,48	7,69 ± 1,64
Chardonnay Αρκαδία 2004	543,85 ± 7,4	139,68 ± 4,8	5,3 ± 0,73	2,14 ± 0,14	7,16 ± 1,86
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	595,93 ± 13,0	144,13 ± 0,8	5,3 ± 2,20	1,53 ± 0,53	4,72 ± 1,81
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	811,95 ± 12,7	172,0 ± 1,5	6,2 ± 0,21	2,72 ± 0,09	23,54 ± 4,31
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	714,4 ± 7,45	150,20 ± 4,89	6,6 ± 3,36	ΔΜ	11,23 ± 1,53
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2004	628,00 ± 12,50	129,00 ± 0,98	6,7 ± 0,19	2,38 ± 0,18	4,57 ± 1,79
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2005	542,69 ± 3,3	137,01 ± 1,2	6,8 ± 0,64	3,20 ± 0,30	3,85 ± 0,18
Αγιοργίτικο Νεμέα 2004	449,92 ± 18,1	113,45 ± 2,3	8,7 ± 0,21	ΔΜ	23,10 ± 8,00
Αγιοργίτικο Αρκαδία	445,26 ± 12,63	111,25 ± 2,18	10,6 ± 2,05	ΔΜ	7,62 ± 1,59
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2003	516,02 ± 10,44	112,83 ± 0,81	12,1 ± 0,43	10,56 ± 0,09	4,37 ± 0,71
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	540,63 ± 9,4	126,0 ± 1,9	13,4 ± 2,23	ΔΜ	11,26 ± 0,47
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	428,20 ± 9,9	111,35 ± 4,2	14,8 ± 2,46	2,11 ± 0,01	7,80 ± 1,19
Βοηδόματο 3δειγμα 2004	599,00 ± 6,9	150,00 ± 3,5	18,1 ± 1,38	6,00 ± 0,23	8,08 ± 0,04

ΦΛΟΙΟΙ					
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	222,21 ± 8,47	48,39 ± 0,14	22,3 ± 0,27	13,71 ± 0,04	16,24 ± 1,60
Μανδηλαρια Σαντορίνη 2005	204,21 ± 10,10	40,07 ± 1,49	30,9 ± 2,94	13,72 ± 0,18	ΔΜ ±
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	234,93 ± 11,42	49,37 ± 1,50	42,5 ± 1,55	23,05 ± 1,02	12,67 ± 0,53
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	213,19 ± 7,01	38,50 ± 6,53	46,4 ± 9,63	26,00 ± 1,26	18,42 ± 0,90
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2004	123,07 ± 5,15	24,51 ± 4,33	39,7 ± 0,58	23,20 ± 0,34	41,93 ± 1,23
	144,31 ± 3,32	26,33 ± 1,89	55,7 ± 0,44	31,60 ± 1,20	50,00 ± 9,58
Αηδάνι Σαντο Σαντορίνη 2004	40,7 ± 1,0	13,86 ± 0,83	103,7 ± 10,17	49,64 ± 3,18	68,00 ± 4,85
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	47,46 ± 2,20	10,57 ± 0,20	117,0 ± 3,14	57,70 ± 8,29	74,02 ± 0,76
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	43,00 ± 5,83	9,30 ± 2,40	177,5 ± 2,00	ΔΜ	>100
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	32,31 ± 2,26	3,10 ± 0,12	274,2 ± 2,10	ΔΜ	>100
ΣΤΑΦΥΛΙΑ					
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	502,8 ± 5,4	121,23 ± 1,61	9,3 ± 0,05	2,33 ± 0,47	4,59 ± 0,08
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	472,43 ± 3,76	108,33 ± 2,73	9,4 ± 0,03	2,73 ± 0,37	8,66 ± 0,17
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	530,93 ± 1,36	111,06 ± 0,21	10,0 ± 0,24	2,57 ± 0,24	7,94 ± 2,75
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	442,8 ± 3,2	98,45 ± 0,63	10,6 ± 0,75	ΔΜ	4,99 ± 1,54
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	322,16 ± 6,3	90,32 ± 0,8	10,6 ± 0,97	ΔΜ	4,03 ± 0,10
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	418,53 ± 2,99	108,04 ± 1,10	10,9 ± 0,13	1,91 ± 0,39	11,67 ± 0,90
Μανδηλ. Σαντο Σαντορίνη 2005	422,77 ± 16,61	99,13 ± 0,81	12,3 ± 0,31	3,85 ± 0,18	3,87 ± 0,35
Αηδανι Σαντορίνη 2004	381,38 ± 4,51	89,00 ± 1,64	12,4 ± 1,12	1,92 ± 0,02	7,75 ± 0,99
Αγιωργιτικο Νεμέα 2004	388,68 ± 7,48	101,73 ± 3,72	12,7 ± 0,63	2,52 ± 0,23	<3,7 ±
Ασυρτικο Σαντορίνη 2004	492,74 ± 15,58	108,85 ± 6,00	13,0 ± 0,58	2,55 ± 0,11	8,21 ± 2,46
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	365,25 ± 8,84	81,21 ± 1,94	14,4 ± 0,33	3,60 ± 0,15	4,90 ± 1,10
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	328,7 ± 1,6	75,73 ± 0,39	15,0 ± 0,75	4,00 ± 0,09	7,30 ± 2,78
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	140,5 ± 5,2	39,96 ± 0,07	18,1 ± 0,84	6,80 ± 0,11	38,61 ± 5,42
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ					
Εκχυλισμα μανδηλαρι 2002 Σαντορινη	382,32 ± 10,7	87,57 ± 1,75	14,1 ± 2,97	8,34 ± 1,98	5,37 ± 0,17
Εκχυλισμα ασυρτικο 2002 Σαντορινη	169,4 ± 4,7	30,00 ± 2,19	40,9 ± 3,84	20,25 ± 0,75	23,71 ± 0,37
Εκχυλισμα μανδηλαρι 2002 Ρόδος	276,0 ± 1,2	77,00 ± 2,70	15,6 ± 0,31	5,79 ± 0,21	<100

Αναγωγική Ικανότητα 100μg/ml εκχυλ

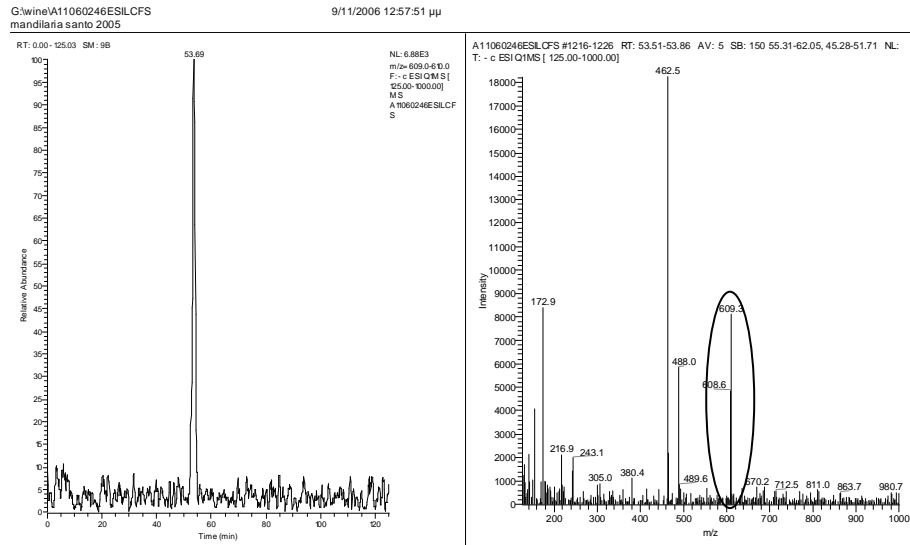
ΔΜ= Δε Μετρήθηκε

6.6 Βιβλιογραφία 6^{ου} Κεφαλαίου

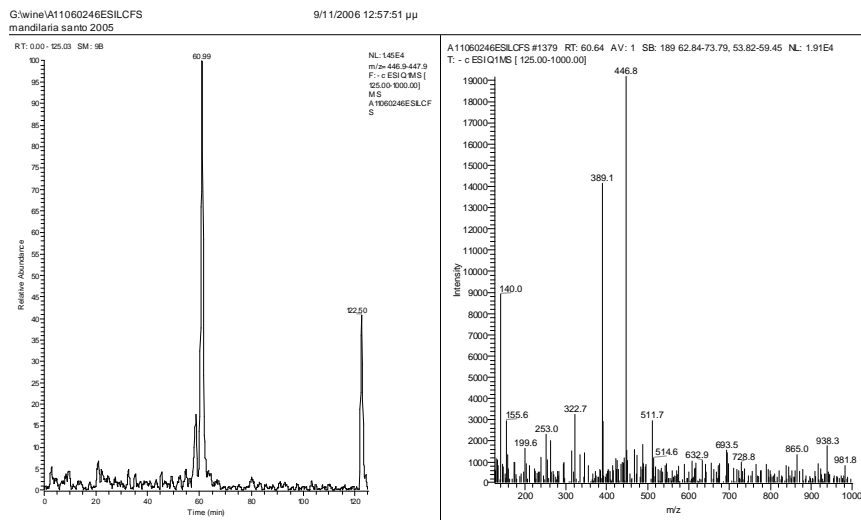
- 1) Adcock H. Pharmageddon: is it too late to tackle growing resistance to anti-infectives? *Pharm. J.* **2002**, 269, 599–600.
- 2) Rodríguez-Vaquero M. J., Alberto M. R., Manca de Nadra M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **2007**, 18, 93–101.
- 3) Cushnie T. P. T. and Lamb A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Intern. J. Antimicrob. Agents* **2005**, 26, 343–356.
- 4) Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakariah K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Internat.* **2003**, 36, 117–122.
- 5) Baydar N. G., Ozkan G., Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Contr.* **2004**, 15, 335–339.
- 6) Thuille N., Fille M., Nagl M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, 206, 217–221.
- 7) Rhodes P.L., Mitchell J.W., Wilson M.W. and Melton L.D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier, *Internat. J. Food Microbiol.* **2006**, 107, 281–286.
- 8) Scalbert A., Johnson I. T. and Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005a**, 81, 215S–217S.
- 9) Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2005b**, 45 (4), 287-306.
- 10) WHO/FAO. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Geneva: World Health Organization, **2003**.
- 11) Sies H., Stahl W. and Sevanian A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress, *J. Nutr.* **2005**, 135, 969–972.
- 12) Urquiaga I. and Leighton F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress, *Biol. Res.* **2000**, 33 (2), 55-64.

- 13) Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 323-333.
- 14) Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **2000**, *153*, 83-104.
- 15) Sies, H. and Stahl, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 173–200.
- 16) Leighton F., Cuevas A., Guasch V, Perez D.D., Strobel P, San Martin A, Urzua U., Diez M. S., Foncea R., Castillo O., Mizon C., Espinoza M. A., Urquiaga I., Rozowski J., Maiz A., Germain A. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1999**, *25*, 133–141.
- 17) Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309–2314.
- 18) Prior R. L., Wu X. And Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53* (10), 4290–4302
- 19) Naczki M. and Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 95—111.
- 20) Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganda G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, *20* (7), 900–956.
- 21) Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure– activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13* (10), 572– 584.

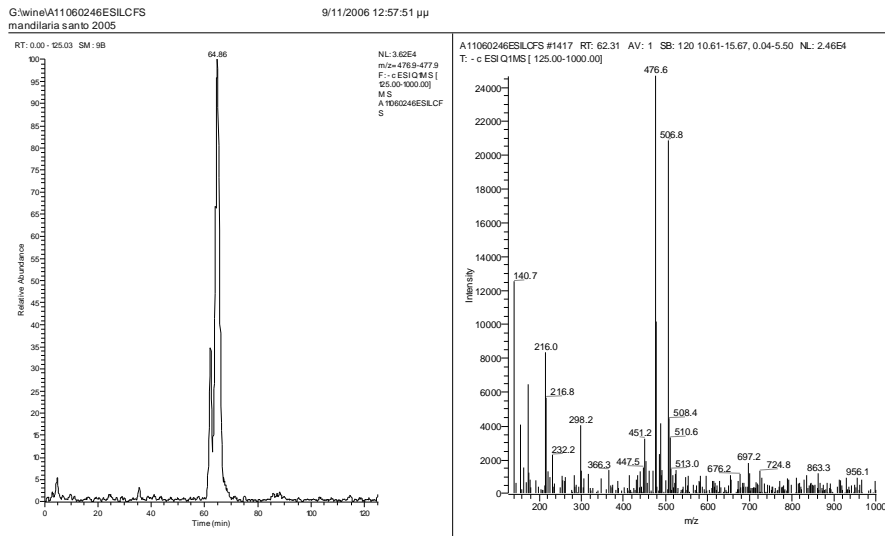
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α



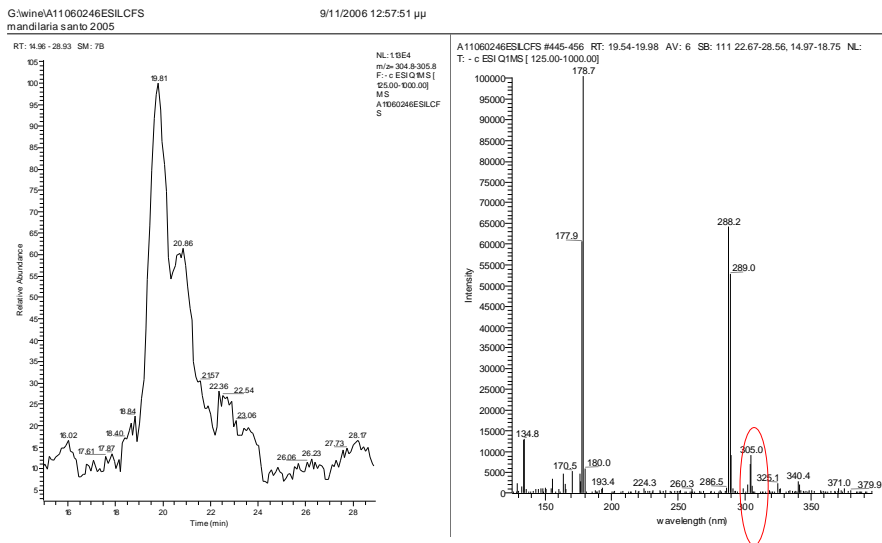
Εικόνα 1-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: ρουτινοσίδης της κερκετίνης



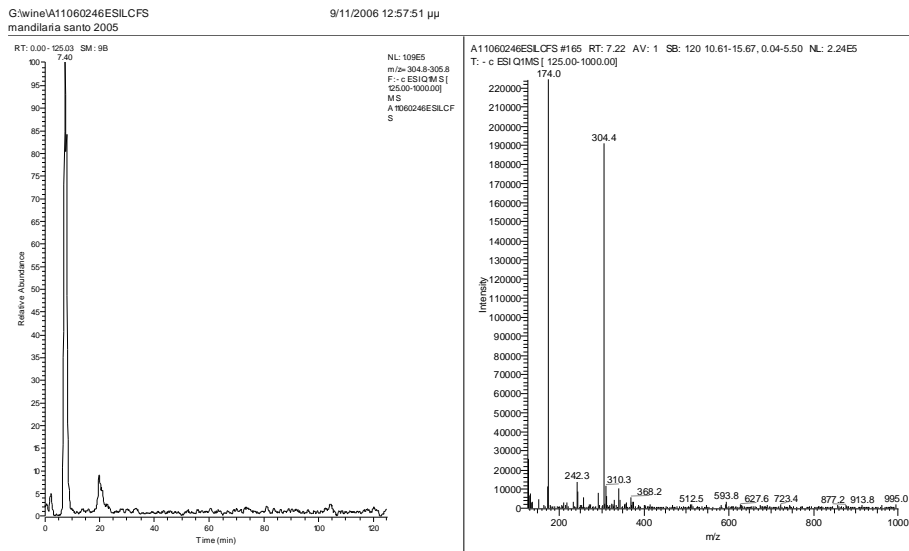
Εικόνα 2-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: 3-Ο-γλυκοσίδης της καμφερόλης.



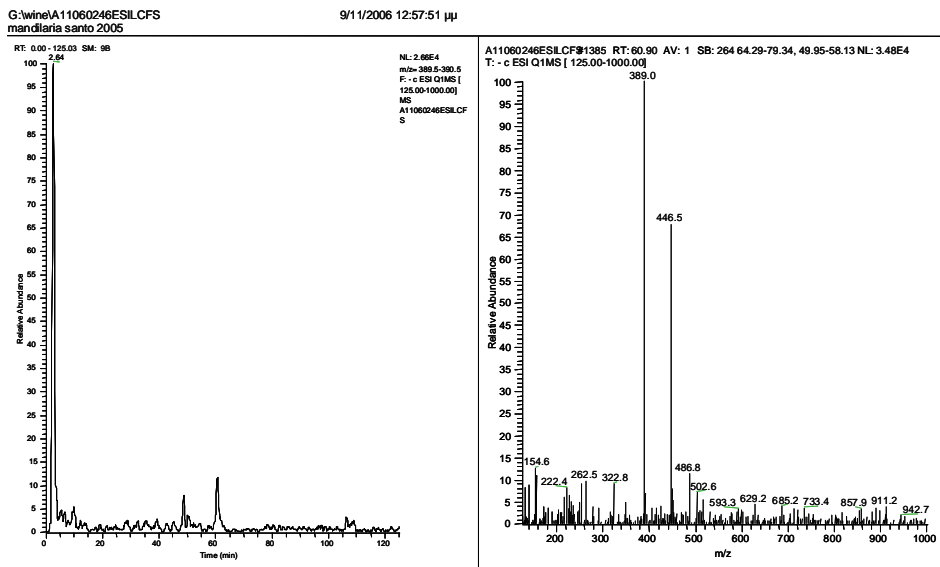
Εικόνα 3-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: 3-β-D-Γλουκουρονίδιο της κερκετίνης,

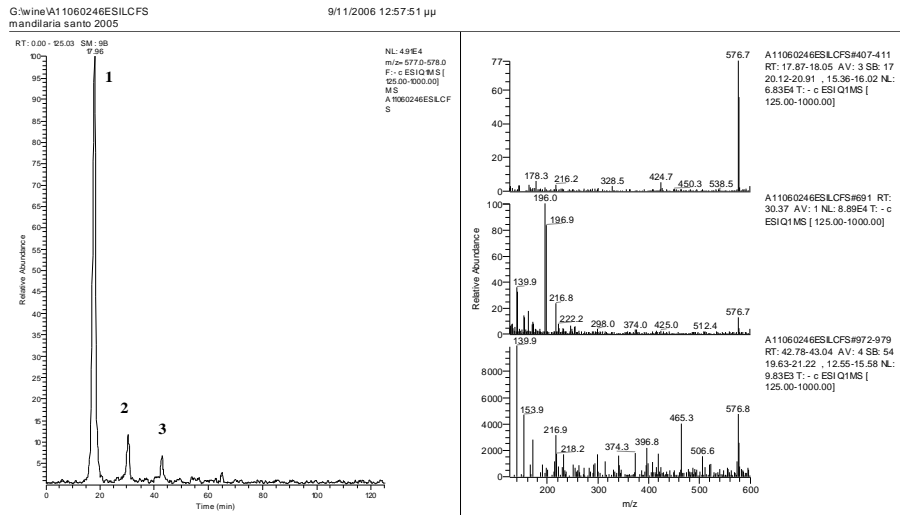


Εικόνα 4-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: (-)-επιγαλλοκατεχίνη



Εικόνα 5-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: (-)-γαλλοκατεχίνη

Εικόνα 6-Α Φάσμα μάζας της ένωσης: 3-Ο-γλυκοσίδης της *trans*-ρεσβερατρόλης (πικεΐδης),



Εικόνα 7-Α Φάσμα μάζας των ενώσεων: 1.Προκυανιδίνη Β1, 2.Προκυανιδίνη Β2, 3.Προκυανιδίνη Β3

Πίνακας 1-Α Συγκεντρώσεις πολυφαινόλων ερυθρών οίνων

ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη Β1	προκυανιδίνη Β2	φλ.αβανόλη-1	trans - ρεσβερατρόλη	ε-βινφερίνη	Συγγλυτικό οξύ	καφεϊκό	trans -καφτανικό	π-κομμαρικό οξύ	φερολικό οξύ	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερκετίνης	3-ρμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ																			
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 πριν τη διαύγαση	74,72	63,32	21,58	63,35	5,44	52,31	1,37	** ΔΑ	3,28	6,98	45,55	4,72	ΔΑ	8,47	4,32	3,17	4,35	0,58	2507,8
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 μετά τη διαύγαση	65,74	47,44	20,64	49,31	4,84	44,08	0,97	ΔΑ	3,57	5,99	42,90	3,95	ΔΑ	8,54	3,80	2,90	4,50	0,61	2299,4
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 εμφιαλωμένο	46,94	48,92	20,07	37,46	3,43	33,17	0,73	ΔΑ	3,31	6,36	34,09	4,41	ΔΑ	6,52	3,89	2,28	3,35	0,52	1843,5
Μανδηλαρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2004	65,85	55,38	27,94	90,52	14,11	41,40	1,66	0,82	1,93	3,68	61,78	2,21	0,26	8,67	4,72	2,78	2,01	0,37	2420,6
	76,99	72,68	15,91	87,78	15,53	48,32	0,34	6,28	3,20	3,66	66,92	2,04	0,37	10,80	5,78	3,34	2,50	0,38	2335,7
	73,14	76,32	15,11	83,39	14,75	45,90	0,32	5,97	3,04	3,47	63,57	1,94	0,35	10,26	5,49	3,17	2,37	0,36	2420,6
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	135,36	51,64	25,06	55,65	6,52	98,91	0,50	ΔΑ	4,67	7,27	18,47	3,04	ΔΑ	7,30	3,27	1,67	5,00	0,47	2896,5
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	119,52	56,62	39,37	59,18	ΔΑ	99,27	0,88	0,63	2,38	9,82	4,23	3,90	0,62	10,02	6,24	1,73	3,73	0,68	2711,8
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	108,55	48,62	23,38	66,77	11,04	88,91	0,54	ΔΑ	2,01	8,37	28,52	5,00	ΔΑ	10,23	4,96	2,34	5,30	1,10	2579,0
Μανδηλαρια Σαντορίνη 2002	191,54	112,03	45,46	176,10	ΔΑ	193,93	1,67	ΔΑ	ΔΑ	11,13	63,35	4,83	ΔΑ	12,63	5,14	2,69	9,97	0,73	4084,6
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	134,12	83,86	62,61	41,00	6,15	106,18	1,48	0,23	5,07	6,99	57,30	3,15	ΔΑ	11,20	6,88	1,90	3,30	0,34	3956,1
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	103,20	71,00	39,98	80,99	4,03	95,56	1,38	ΔΑ	3,11	6,09	65,87	2,67	ΔΑ	14,88	9,55	3,02	4,25	0,57	3667,1
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	38,40	47,67	28,40	40,28	2,55	34,11	0,56	ΔΑ	3,43	2,85	17,21	1,99	ΔΑ	6,77	4,97	2,42	4,06	0,52	1025,7
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	105,05	41,04	36,25	59,04	ΔΑ	94,69	1,13	0,54	2,55	3,54	8,54	6,99	1,05	10,92	9,21	2,56	3,88	0,69	2082,4
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	130,72	52,47	24,45	57,70	14,89	104,58	0,49	ΔΑ	2,87	6,85	27,40	5,50	ΔΑ	12,28	6,76	0,00	6,71	1,34	3052,2
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	91,07	53,70	20,50	45,42	10,20	54,26	0,60	ΔΑ	9,35	3,40	21,99	4,20	ΔΑ	4,29	1,78	0,00	1,83	0,40	2838,50
Syrah Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	38,46	19,64	12,76	67,66	ΔΑ	28,12	0,74	ΔΑ	6,54	10,92	18,92	6,27	ΔΑ	6,55	6,32	9,38	16,54	3,28	1784,5
Syrah Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	49,77	27,27	26,74	67,53	ΔΑ	28,15	0,92	ΔΑ	6,60	4,63	24,03	4,45	ΔΑ	4,98	5,61	8,61	12,95	0,40	1838,1
Merlot Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	72,78	40,85	34,82	90,50	15,10	65,39	1,35	ΔΑ	4,67	9,57	9,38	4,70	0,24	8,51	7,27	7,66	9,07	0,52	2666,0
Ξινόμαυρο υπερώριμο Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	89,38	29,46	17,27	119,28	23,59	56,07	0,48	ΔΑ	5,26	3,76	24,93	1,81	0,19	2,64	1,44	4,14	6,60	0,53	2773,9
Λιάτικο Σητεία 2004	25,55	33,91	13,53	81,37	11,39	17,35	1,40	0,38	1,31	5,14	54,41	3,09	ΔΑ	10,28	3,80	0,00	7,95	2,05	1045,0
Μοσχάτο Αμβούργου Τυρναβός 2004	10,61	13,49	9,46	59,87	ΔΑ	2,56	0,51	0,34	0,57	2,06	14,78	0,54	0,17	2,12	0,37	0,50	0,92	0,24	491,4
M.O.	87,47	53,99	27,23	72,39	10,22	68,13	0,93	2,12	3,91	6,21	36,16	3,85	0,44	8,89	5,30	3,13	5,73	0,78	2515,66

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 2-Α Συγκεντρώσεις πολυφαινόλων λευκών οίνων

ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη Β1	προκυανιδίνη Β2	φλ.αβανόλη-1	trans - ρεσβερατρούλη	ε-βινφερίνη	Συγγαμικό οξύ	καφεϊκό	trans -καφταρικό	π-κομμαρικό οξύ	φερολικό οξύ	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλ.οκτοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφερόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
Αθήρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2005	4,56	9,58	1,89	1,53	ΔΑ	2,61	0,23	** ΔΑ	ΔΑ	2,09	8,53	1,05	ΔΑ	1,70	2,99	0,74	1,42	0,42	299,0
Αθήρι Ρόδος μετά τη διαύγαση 2005	2,27	10,91	1,33	1,71	ΔΑ	2,96	0,17	ΔΑ	0,00	1,52	7,26	0,98	ΔΑ	3,05	3,16	0,75	1,62	0,55	302,0
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2005	1,52	1,87	0,18	ΔΑ	ΔΑ	3,48	0,14	ΔΑ	0,00	1,18	6,38	0,80	ΔΑ	1,17	2,56	0,85	0,51	0,30	166,1
Αθήρι Ρόδος πριν διαύγαση 2004	3,71	10,77	3,76	15,96	ΔΑ	6,02	0,38	ΔΑ	0,16	2,23	8,21	1,08	0,46	2,75	1,27	0,35	0,73	2,10	307,6
	3,72	11,59	11,43	ΔΑ	ΔΑ	5,48	0,38	ΔΑ	0,00	2,22	10,17	1,06	0,48	2,86	1,36	0,34	2,65	0,72	280,3
Αθηρι Ρόδος μετα τη διαύγαση 2004	1,95	4,40	3,31	12,41	ΔΑ	4,75	0,31	0,34	ΔΑ	1,46	9,31	0,49	0,38	1,33	1,70	0,51	ΔΑ	ΔΑ	198,4
	2,49	4,75	2,56	17,74	ΔΑ	ΔΑ	0,33	ΔΑ	0,37	1,96	9,78	0,47	ΔΑ	1,39	1,84	0,52	0,87	0,25	202,6
	2,08	4,59	6,81	1,21	ΔΑ	4,99	0,37	ΔΑ	0,14	1,54	10,08	0,49	0,43	1,35	1,76	0,54	0,85	0,26	195,3
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2004	1,97	4,62	7,02	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,59	10,17	0,51	0,44	1,37	1,79	0,51	0,88	0,24	208,5
Αθήρι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2003	2,84	5,63	2,45	9,66	ΔΑ	2,52	0,14	ΔΑ	ΔΑ	4,34	27,30	1,66	ΔΑ	1,48	1,32	0,43	0,49	0,28	339,7
Αθηρι Σαντορίνη μετά διαύγαση 2004	3,86	11,586	3,1134	13,7271	ΔΑ	4,27	0,44	ΔΑ	0,15	3,27	41,52	0,70	0,22	2,73	1,66	0,33	1,05	0,35	355,0
Αθήρι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	5,16	14,29	1,00	14,93	ΔΑ	3,12	0,27	ΔΑ	0,00	3,81	37,02	1,26	ΔΑ	4,65	3,78	0,00	0,84	0,37	405,1
Ροδίτης Ρόδος μετά τη διαύγαση 2004	0,41	2,31	NF	ΔΑ	ΔΑ	1,75	0,33	ΔΑ	ΔΑ	0,84	2,54	0,48	0,38	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	167,8
Ασυρτικο Σαντορίνη 2002	6,95	14,57	2,27	9,02	ΔΑ	3,72	0,36	ΔΑ	ΔΑ	6,04	26,30	2,69	ΔΑ	3,71	1,32	0,35	1,44	ΔΑ	484,6
Ασυρτικο Σαντορίνη 2003	2,87	14,94	3,80	20,23	ΔΑ	1,54	0,32	ΔΑ	0,74	5,26	34,60	2,28	ΔΑ	3,36	1,89	0,49	3,12	0,41	455,9
Ασυρτικο Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2004	3,83	19,15	5,12	40,35	ΔΑ	1,89	0,75	ΔΑ	0,25	3,64	40,11	1,62	ΔΑ	3,61	3,91	0,72	2,48	0,44	469,4
Ασυρτικο Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	3,71	21,27	5,22	34,86	ΔΑ	1,34	0,71	ΔΑ	0,25	2,69	48,42	1,62	ΔΑ	5,01	3,24	0,61	1,93	0,40	430,0
Ασύρτικο Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2005	3,12	15,08	1,43	24,06	ΔΑ	1,36	0,21	ΔΑ	ΔΑ	4,24	43,13	1,26	ΔΑ	5,19	4,53	0,94	1,32	0,42	515,6
Ασύρτικο Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	3,78	14,95	1,24	16,00	ΔΑ	1,96	0,15	ΔΑ	ΔΑ	3,13	38,61	1,20	ΔΑ	4,05	4,41	1,10	0,63	0,34	495,0
Ασυρτικο Σητεια μετά τη διαύγαση 2004	3,94	5,1602	4,18	18,10	ΔΑ	ΔΑ	0,42	ΔΑ	ΔΑ	5,6	23,119	8,93	0,63	0,59	0,72	0,00	2,51	0,37	329,4
Αηδάνι Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	4,98	7,29	4,80	1,21	ΔΑ	4,95	0,34	0,34	0,31	2,53	36,34	0,82	0,36	1,30	1,77	0,74	0,86	0,37	436,3
Αηδάνι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	3,34	11,35	1,73	4,58	ΔΑ	1,63	0,15	ΔΑ	ΔΑ	2,64	30,29	1,02	ΔΑ	4,62	5,99	1,86	0,59	0,32	423,9
Βηλιόνα Σητεια 2003	1,72	10,78	ΔΑ	28,23	ΔΑ	4,84	0,36	ΔΑ	ΔΑ	6,44	46,54	1,99	ΔΑ	1,21	0,24	0,23	0,73	0,24	329,8
Τυρνάβος Ροδίτης 2004	4,29	7,62	3,77	33,68	ΔΑ	ΔΑ	0,50	ΔΑ	ΔΑ	1,66	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,84	ΔΑ	291,7
Ροδίτης Τυρνάβου 2005	3,89	3,39	0,91	0,22	ΔΑ	0,98	0,17	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,36	0,00	ΔΑ	0,39	ΔΑ	ΔΑ	0,41	0,26	270,0
Μπαντικι Τυρνάβου 2005	ΔΑ	1,04	UD	ΔΑ	0,91	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,30	1,51	4,67	1,75	0,24	0,00	0,28	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	151,5
Μ.Ο.	3,32	9,37	3,45	15,21	0,91	3,15	0,33	0,34	0,21	2,94	22,47	1,45	0,40	2,45	2,33	0,59	1,25	0,45	327,34

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 3-Α Πολυφαινολικό περιεχόμενο γλυκών οίνων και υποπροϊόντων οινοποίησης

	Γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκυανιδίνη Β1	προκυανιδίνη Β2	φλαβονόλη-1	<i>trans</i> - ρεβερατρολόλη	ε-βινφερίνη	Συγγλυκικό οξύ	<i>trans</i> -s-καφεϊκό	καφαραικό	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλαυκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	Καμφορόλη	Ολικές πολυφαινόλες*
ΓΛΥΚΕΙΣ ΟΙΝΟΙ																			
Μαυροδαφνη Πατρών	23,23	6,90	1,85	15,50	** ΔΑ	14,78	0,50	0,41	2,87	6,94	26,65	18,57	0,17	1,67	0,24	0,23	2,50	0,16	1897,3
Βινσάντο 2004 Ερυθρό	61,40	24,95	26,07	6,03	ΔΑ	30,82	1,99	ΔΑ	9,50	6,88	106,83	4,31	0,86	7,53	2,84	2,90	3,67	1,20	2760,0
Βινσάντο Λευκό 2004 Σαντορίνη	12,59	8,84	3,43	11,46	ΔΑ	7,72	0,34	0,34	0,50	4,10	47,76	2,02	0,46	6,81	5,06	0,85	4,19	0,67	2033,8
Vin Doux Σάμος 2002	9,40	8,41	2,14	11,77	ΔΑ	8,64	0,55	0,34	0,26	4,93	40,02	5,79	0,17	5,52	1,86	0,51	2,98	0,73	606,3
Σπυρόπουλος Μελιαστό 2004	6,66	9,64	11,59	10,87	ΔΑ	ΔΑ	0,66	ΔΑ	1,01	3,92	36,26	2,53	ΔΑ	0,95	1,40	0,68	0,73	0,24	300,4
Σπυρόπουλος Μαντινεία από Μοσχοφίλερο 2004	4,74	12,75	14,68	10,17	ΔΑ	ΔΑ	0,65	ΔΑ	0,68	3,47	31,65	1,83	ΔΑ	1,16	0,62	0,42	0,73	0,24	267,9
Μ.Ο.	19,67	11,92	9,96	10,97	ΔΑ	15,49	0,78	0,36	2,47	5,04	48,20	5,84	0,42	3,94	2,00	0,93	2,47	0,54	1310,9
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ																			
Δείγμα προς απόσταξη με στέμφυλα Τύρναβος 2004	27,03	12,38	20,79	22,80	4,90	10,43	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,09	15,85	0,38	ΔΑ	0,21	2,67	0,21	ΔΑ	0,29	1030,5
Δείγμα μετά την απόσταξη με στέμφυλα Τύρναβος 2004	18,31	4,04	13,16	15,08	7,01	3,93	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,11	0,11	0,16	ΔΑ	0,21	0,24	ΔΑ	ΔΑ	0,24	1419,7
Μούστος Μοσχ. Αμβούργου Τύρναβος 2005	4,91	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	18,61	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	245,0

* = mg γαλλικού οξέος / L οίνου

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Πίνακας 1B Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών ερυθρών ποικιλιών σταφυλιών για την οινοποιητική περίοδο 2003

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)													
	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	γαλλικός στέρας επικατεχίνης	trans-καφροϊκό οξύ	trans-ρεβερατρούλη	ε-βινιφερίνη	β-D-γλυκοσιδής κερκετίνης	β-β-D-γλυκοσιδής κερκετίνης	β-ραμνοσιδής κερκετίνης	* ολικές πολυφαινόλες	
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ														
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	13	4,16	133,93	132,30	2,40	19,55	59,61	0,87	0,46	0,63	6,62	4,77	1,71	470,5
	18	1,67	28,95	38,11	3,82	11,09	**ΔΑ	0,29	0,51	ΔΑ	0,11	9,00	3,61	239,8
	21	1,84	21,83	34,34	2,93	13,33	0,98	0,30	0,46	1,82	4,77	4,28	2,13	280,0
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	12	3,86	91,50	67,28	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,79	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	401,1
	18	2,25	39,10	30,81	3,98	11,57	11,72	0,37	1,89	3,67	5,06	11,22	4,39	252,2
	21	1,45	26,63	19,02	0,96	4,17	3,34	0,06	0,21	1,20	4,48	3,13	0,25	402,0
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2003	12	13,17	276,31	126,37	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,05	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1223,7
	16	7,10	257,68	187,46	21,97	37,50	12,53	1,74	0,20	3,62	27,82	16,96	3,45	1188,7
	19	2,30	124,51	98,78	15,85	21,97	8,51	6,07	0,23	1,89	17,90	14,67	5,84	684,8
Μανδηλάρι Ηράκλειο 2003	15	10,06	222,03	109,71	7,62	7,23	9,72	0,87	2,21	1,49	0,60	1,87	ΔΑ	578,9
	17	12,50	116,75	90,53	6,16	17,05	9,92	0,14	0,74	18,92	5,93	2,42	0,05	608,2
Μανδηλάρι Χίος 2003	18	2,71	39,61	26,45	1,66	4,87	0,04	0,31	1,99	0,92	0,72	2,97	ΔΑ	389,2
	19	5,40	72,52	56,51	4,12	17,28	0,30	0,32	3,45	4,75	1,38	1,90	ΔΑ	422,8
	19	4,27	99,61	47,35	1,40	7,75	0,14	0,30	0,72	0,46	0,09	1,52	0,04	489,9
Μανδηλάρι Ρόδος 2003	17	4,12	118,07	33,20	6,97	15,00	3,44	1,17	1,56	3,73	15,07	7,11	6,57	577,4
Κοτσιφάλι Ηράκλειο 2003	18	2,07	28,35	26,91	2,03	9,08	0,06	0,16	0,39	8,99	29,47	7,38	ΔΑ	255,8
	21	3,66	38,60	44,19	2,70	5,35	0,56	0,45	1,21	6,13	9,30	3,67	ΔΑ	180,6
Διάτικο Σητεία 2003	17	2,41	97,13	58,22	1,02	7,45	31,60	0,16	0,52	0,87	21,80	39,16	27,90	398,2
	22	2,58	36,61	26,01	ΔΑ	2,54	3,98	ΔΑ	2,17	4,24	0,31	1,42	1,53	234,9
Αγιαννώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	3,75	53,26	22,41	3,42	8,29	1,41	0,06	1,07	1,49	5,10	4,92	3,08	409,2
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	23	1,56	7,04	7,84	2,48	6,77	ΔΑ	0,08	0,28	0,78	3,75	6,74	3,65	73,5
Λημιό Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	22	2,09	35,98	33,84	5,24	23,50	7,07	ΔΑ	0,86	0,00	2,61	4,20	13,98	224,3
Δ35 ερυθρό Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20	1,88	42,20	22,90	1,78	12,17	ΔΑ	ΔΑ	0,30	0,21	3,96	2,27	12,09	234,3
Αγιωργίτικο Νεμέα 2003	21	7,31	112,46	66,08	5,90	12,69	ΔΑ	0,16	0,57	6,81	11,89	13,37	ΔΑ	467,0
Μ.Ο.		4,34	88,36	58,61	4,97	12,55	9,16	0,73	0,99	3,46	8,12	7,50	5,64	445,29

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 2B Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών λευκών ποικιλιών σταφυλιών για την οινοποιητική περίοδο 2003

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ													
	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)-κατεχίνη	(-)-επικατεχίνη	προκοανιδίνη B1	προκοανιδίνη B2	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφαιρικό οξύ	trans-ρσβερατρούλη	ε-βιταφερίνη	β-D-γλυκκοσιδής κερακτίνης	β-β-D-γλυκκοσιδής κερακτίνης	β-ραμνοσιδής κερακτίνης	* ολικές πολυφαινόλες
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	12	4,59	247,71	85,24	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,03	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	734,4
	18	3,68	95,48	23,44	13,92	9,54	7,08	1,52	0,10	0,43	25,54	12,89	3,34	276,9
	22	4,59	83,61	23,55	5,28	12,98	ΔΑ	5,58	0,10	0,26	11,45	10,33	1,80	265,0
Αθήρι Σαντορίνη 2003	12	1,43	88,86	70,91	6,19	14,52	18,34	1,42	0,03	0,27	14,63	3,68	0,64	309,0
	18	2,02	26,26	26,22	2,11	6,16	14,78	1,66	0,10	0,41	16,02	12,21	7,40	218,8
	23	2,82	10,88	19,18	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	102,8
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	12	5,40	289,18	147,46	37,08	55,81	15,34	3,00	0,07	0,24	20,53	4,67	2,25	1172,2
	18	2,44	39,62	23,41	9,63	21,96	12,10	0,16	0,10	0,00	23,10	34,44	29,06	757,6
	22	1,51	30,88	15,24	6,93	16,19	2,33	0,17	0,08	0,24	5,35	9,54	7,60	273,5
Βηλάνια Σητεία 2003	15	3,73	12,58	19,96	3,58	2,04	7,78	2,48	0,36	2,06	43,38	37,14	36,62	170,4
	17	2,81	7,90	10,01	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,02	0,74	1,96	7,22	8,90	12,40	144,7
Ροδίτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	1,47	7,81	6,71	0,34	2,24	0,82	0,07	0,11	0,21	1,30	3,92	1,73	134,9
Γουστολιδί Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	22	1,99	82,17	69,03	6,25	17,23	11,45	1,55	0,11	0,88	17,96	18,63	13,09	366,2
Μπεγλίερι Χίος 2003	21	1,20	11,22	9,25	1,20	1,56	ΔΑ	0,08	0,00	9,38	32,33	27,62	ΔΑ	175,0
Μ.Ο.		2,83	73,87	39,26	8,41	14,57	10,00	1,56	0,15	1,26	16,83	14,15	9,66	364,38

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 3-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών ερυθρών ποικιλιών σταφυλιών για την οινοποιητική περίοδο 2003

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ.)	% Πυροστέρο σταχυόριον (σΒrix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	γαλλικός εστερός επικατεχίνης	Trans-καφφαρικό οξύ	trans-ρσεβραρρόλη	ε-βιναφερίνη	β-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	β-D-γλυκοσίδης κερκετίνης	β-ραμνοσίδης κερκετίνης	*ολικός πολυφαινόλης
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ														
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	13	3,47	111,61	110,25	2,00	16,29	49,68	0,72	0,38	0,53	5,52	3,97	1,43	326,7
	18	1,67	28,95	38,11	3,82	11,09	0,00	0,29	0,51	ΔΑ	0,11	9,00	3,61	199,8
	21	1,28	15,16	23,85	2,04	9,26	0,68	0,21	0,32	1,26	3,32	2,98	1,48	162,1
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	12	2,41	57,19	42,05	4,72	6,74	4,99	0,84	1,12	ΔΑ	5,41	9,94	1,19	208,90
	18	1,56	27,15	21,39	2,76	8,04	8,14	0,26	1,31	2,55	3,51	7,79	3,05	145,93
	21	0,82	15,13	10,81	0,55	2,37	1,90	0,03	0,12	0,68	2,54	1,78	0,14	190,33
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2003	12	4,58	96,01	43,91	6,98	14,56	6,57	0,89	0,02	0,73	6,57	3,04	0,38	354,3
	16	2,37	85,89	62,49	7,32	12,50	4,18	0,58	0,07	1,21	9,27	5,65	1,15	330,2
	19	1,72	55,88	29,09	11,89	5,98	1,88	4,55	0,17	1,42	13,43	11,00	4,38	178,00
Μανδηλάρι Ηράκλειο 2003	15	5,92	130,61	64,53	4,49	4,25	5,72	0,51	1,30	0,88	0,36	1,10	ΔΑ	383,9
	17	10,41	97,29	75,45	5,13	14,21	8,27	0,12	0,62	15,77	4,94	2,02	0,04	330,8
Μανδηλάρι Χίος 2003	18	3,39	49,51	33,06	2,07	6,09	0,06	0,39	2,48	1,15	0,90	3,71	ΔΑ	189,4
	19	6,75	90,65	70,63	5,15	21,60	0,37	0,40	4,31	5,94	1,72	2,37	ΔΑ	321,9
	19	5,34	124,51	59,18	1,75	9,69	0,18	0,37	0,90	0,58	0,12	1,89	0,05	365,8
Μανδηλάρι Ρόδος 2003	17	3,35	95,99	27,00	5,66	12,19	2,80	0,95	1,27	3,04	12,25	5,78	5,34	352,54
Κοτσιφάλι Ηράκλειο 2003	18	2,20	30,16	28,63	2,16	9,66	0,06	0,17	0,41	9,57	31,35	7,85	ΔΑ	178,3
	21	3,82	40,21	46,03	2,82	5,58	0,59	0,47	1,27	6,38	9,68	3,83	ΔΑ	123,88
Λιάτικο Σητεία 2003	17	4,01	125,21	97,03	1,69	12,42	52,67	0,26	0,87	1,44	36,33	65,26	46,50	354,1
	22	4,29	61,01	43,34	0,00	4,23	6,63	ΔΑ	3,61	7,07	0,52	2,37	2,55	223,2
Αγιαννιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	3,99	56,66	23,84	3,64	8,82	1,50	0,07	1,13	1,59	5,42	5,23	3,28	267,54
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	23	2,61	11,73	13,07	4,14	11,28	0,00	0,14	0,47	1,30	6,25	11,23	6,09	102,12
Λημνιό Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	22	1,39	23,99	22,56	3,49	15,67	4,71	ΔΑ	0,57	ΔΑ	1,74	2,80	9,32	124,62
Δ35 ερυθρό Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20	2,35	52,75	28,62	2,22	15,21	ΔΑ	ΔΑ	0,37	0,26	4,95	2,84	15,12	244,05
Αγιοργίτικο Νεμέα 2003	21	8,12	124,95	73,42	6,55	14,10	ΔΑ	0,18	0,63	7,57	13,21	14,86	ΔΑ	321,98
Μ.Ο.		3,66	67,01	45,35	3,88	10,49	7,34	0,59	1,01	3,38	7,48	7,85	5,84	249,18

Πίνακας 4-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών λευκών ποικιλιών σταφυλιών για την οινοποιητική περίοδο 2003

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκαανιδίνη Β1	προκαανιδίνη Β2	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	Trans-καφτανικό οξύ	trans-ρσβατραρόλη	ε-βιναφερίνη	3-D-γαλακτοσιδής κερακτίνης	3-β-D-γλαυκοσιδής κερακτίνης	3-ραμνοσιδής κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ														
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	12	2,30	123,86	42,62	4,49	3,95	4,77	1,70	0,01	0,15	9,45	2,84	0,95	306,00
	18	3,68	95,48	23,44	13,92	9,54	7,08	1,52	0,10	0,43	25,54	12,89	3,34	230,73
	22	4,88	88,95	25,05	5,62	13,80	0,00	5,93	0,11	0,27	12,18	10,99	1,91	234,9
Αθήρι Σαντορίνη 2003	12	1,19	74,05	59,10	5,16	12,10	15,28	1,18	0,02	0,23	12,19	3,07	0,53	320,12
	18	2,24	29,18	29,13	2,35	6,84	16,42	1,85	0,11	0,46	17,80	13,57	8,22	202,61
	23	4,03	15,54	27,40	0,96	3,80	12,83	3,04	0,17	0,30	15,24	11,41	9,01	122,40
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	12	1,80	96,39	49,15	12,36	18,60	51,14	1,00	0,02	0,08	6,84	1,56	0,75	325,60
	18	1,22	19,81	11,70	4,81	10,98	6,05	0,08	0,05	0,00	11,55	17,22	14,53	315,68
	22	0,75	15,44	7,62	3,47	8,09	1,17	0,09	0,04	0,12	2,68	4,77	3,80	113,96
Βηλάνα Σητεία 2003	15	6,21	20,97	33,27	5,97	3,39	12,97	4,13	0,60	3,43	72,29	61,90	61,04	254,9
	17	1,69	4,74	6,01	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,61	0,45	1,17	4,33	5,34	7,44	89,2
Ροδίτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	2,62	13,94	11,99	0,61	4,00	1,47	0,13	0,19	0,37	2,33	7,00	3,09	234,55
Γουστολίδι Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	22	0,60	24,90	20,92	1,89	5,22	3,47	0,47	0,03	0,27	5,44	5,64	3,97	276,2
Μπεγλέρι Χίος 2003	21	1,34	12,56	10,36	1,34	1,75	ΔΑ	0,09	0,00	10,50	36,21	30,94	ΔΑ	195,0
Μ.Ο.		2,47	45,41	25,55	4,84	7,85	11,05	1,56	0,14	1,27	16,72	13,51	9,12	230,13

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών ερυθρών ποικιλιών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)καταεζίνη	(-)επικατεζίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστερας επικατεζίνης	trans -καφταρικό οξύ	trans -ρεβερατρούλη	ε-βουφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσίδης κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	10,0	17,18	945,45	399,08	200,63	171,53	137,42	301,33	8,04	**ΔΑ	4,35	20,96	8,28	ΔΑ	3583,2
	12,0	11,79	839,5	238,1	75,57	99,5	86,75	227,6	21,6	0,34	2,9	18,97	9,41	8,79	3043,7
	15,0	7,64	216,97	66,36	57,83	68,07	6,28	10,75	6,13	0,08	4,19	20,75	9,33	4,19	1174,4
	16,0	7,16	183,73	82,88	81,50	105,95	ΔΑ	7,96	5,56	0,24	ΔΑ	15,84	7,79	ΔΑ	1004,5
	19,0	7,49	138,39	75,75	24,24	88,90	13,75	13,38	2,04	0,47	ΔΑ	13,30	5,75	ΔΑ	751,2
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	19,0	4,26	151,91	35,95	46,12	52,41	10,90	4,91	0,48	0,00	1,77	22,37	16,41	6,08	1086,0
	21,0	3,60	154,37	44,83	44,06	46,85	3,42	9,97	3,92	ΔΑ	1,28	22,76	14,41	7,15	951,2
	19,0	5,35	172,16	50,89	28,83	56,25	8,67	2,31	0,97	1,11	0,00	20,80	11,86	2,14	945,7
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	6,0	6,22	517,68	365,51	102,08	125,97	135,08	273,58	1,46	0,03	0,77	18,72	10,00	1,36	1827,9
	14,0	11,69	178,61	182,45	62,76	32,92	29,92	59,47	4,79	0,86	4,90	14,68	9,92	3,88	1454,6
	20,0	4,51	67,44	63,17	11,27	29,14	14,50	9,41	0,51	0,69	2,42	11,78	14,96	7,37	917,4
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	24,0	3,29	48,28	42,95	11,52	26,55	6,51	5,41	0,18	5,12	0,92	7,65	9,50	4,85	1052,2
	26,5	3,13	68,01	67,04	22,52	28,55	10,15	2,74	2,20	0,56	4,51	18,07	29,72	9,86	900,8
	24,5	3,38	48,94	38,98	23,51	30,41	9,67	ΔΑ	2,64	0,65	2,10	22,89	27,09	10,38	766,8
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	6,0	0,45	470,35	194,02	138,35	69,94	118,34	349,41	1,95	0,05	0,48	17,00	6,12	14,36	2188,7
	13,0	4,73	243,89	131,58	50,15	38,51	55,22	144,54	0,59	0,16	0,78	7,92	4,14	2,19	1127,4
	15,0	5,33	134,37	104,33	19,01	28,54	7,51	85,51	0,40	0,11	0,53	8,84	5,25	2,65	716,5
	20,0	3,85	113,73	135,35	20,93	51,20	16,61	19,30	0,64	0,21	2,08	9,99	12,37	4,66	928,7
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	27,5	2,32	49,16	78,90	11,17	34,03	21,48	3,22	0,02	0,11	0,57	4,52	10,07	7,36	646,7
	26,5	0,71	37,25	62,25	7,17	29,53	5,80	9,66	0,02	ΔΑ	0,91	6,63	14,88	6,86	438,8
	24,0	0,81	32,40	39,36	17,69	22,97	ΔΑ	10,33	0,10	ΔΑ	1,06	7,19	6,04	2,18	438,4
Κοτσιφάκι Ηράκλειο 2004	16,0	8,58	373,27	184,62	5,77	11,74	62,05	0,94	0,13	0,35	6,12	2,13	0,89	ΔΑ	1284,2
	20,0	2,02	146,77	52,23	2,48	7,62	0,84	ΔΑ	0,33	0,31	6,48	20,25	6,23	ΔΑ	965,1

Πίνακας 5-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών ερυθρών ποικιλιών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)καταεξίνη	(-)επικατεξίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεξίνης	trans -καφταρικό οξύ	trans -ρεβερατρόλη	ε-βουφορίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερακτίνης	3-ραμνοσίδης κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
Μανδηλαρια Ηράκλειο 2004	7,2	9,97	989,34	488,91	41,73	102,94	ΔΑ	491,16	67,12	0,02	1,79	55,89	13,11	ΔΑ	3293,1
	13,0	19,71	265,40	146,95	11,32	58,50	ΔΑ	22,68	14,57	0,08	1,02	23,38	5,25	ΔΑ	2098,3
	17,0	10,00	170,85	119,27	25,44	60,72	ΔΑ	7,53	2,04	0,83	4,53	4,58	2,48	3,60	1362,8
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	18,0	18,09	247,59	226,07	21,01	29,03	50,72	133,44	7,97	0,12	0,41	7,89	4,03	3,81	480,2
	23,0	6,53	100,04	42,10	12,03	18,83	9,94	9,81	0,20	0,08	0,31	13,48	12,67	8,24	493,2
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	17,0	43,67	366,23	352,43	73,66	173,08	21,97	32,22	ΔΑ	0,75	14,62	54,89	41,02	44,40	514,4
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	1,68	7,59	8,51	ΔΑ	5,55	ΔΑ	ΔΑ	2,64	0,59	1,21	14,27	17,00	4,16	273,4
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	0,33	8,10	6,41	2,86	11,77	2,78	3,29	0,10	1,00	8,44	5,98	8,09	3,66	269,4
Βερτζαμι Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	2,90	31,12	16,91	ΔΑ	13,44	2,14	5,59	0,78	1,29	1,02	3,71	17,42	10,29	422,9
Βερτζαμι Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	4,30	49,31	40,81	26,08	12,50	2,11	5,66	4,14	0,27	2,10	3,99	29,34	4,48	614,9
Αγιαννιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	8,70	168,59	49,71	47,30	23,97	18,83	23,95	0,39	3,50	8,24	1,13	8,75	25,99	1107,4
Αυγουσιάτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	22,0	0,55	0,70	1,33	ΔΑ	5,50	0,73	1,74	ΔΑ	ΔΑ	2,73	1,40	6,78	3,18	355,6
Λημνίονα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	3,10	18,65	6,46	2,99	7,41	ΔΑ	1,67	0,36	0,96	0,32	3,57	3,57	8,33	334,9
Ρομέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20,0	4,83	77,16	51,65	ΔΑ	17,28	ΔΑ	0,23	0,28	7,08	0,50	2,53	1,26	0,27	625,9
Ξινόμαυρο Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	21,0	3,16	72,86	54,64	ΔΑ	4,04	ΔΑ	3,87	ΔΑ	0,37	0,30	0,13	0,85	0,39	644,1
Λημνιο Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	2,97	59,22	27,42	15,85	20,55	15,75	6,25	0,46	2,28	3,62	5,42	18,79	ΔΑ	375,1
M.O.		6,82	204,24	112,21	39,57	46,72	29,53	63,91	4,61	0,90	2,71	13,75	11,30	7,33	1063,08

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 6-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών λευκών ποικιλιών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων ("Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans -καφαραικό οξύ	trans -ρεβερπαρόλη	ε-βουφερίνη	β-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	β-β-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	β-ραμνοσίδης κερακτίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Ασυρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	3,31	488,71	101,00	78,96	34,25	45,16	130,15	13,90	**ΔΑ	0,54	11,24	3,60	15,25	1587,7
	16,0	8,81	445,54	133,30	43,31	20,59	21,66	34,95	9,58	0,33	0,63	20,83	4,95	5,27	1417,2
	21,0	4,99	172,27	49,52	35,50	25,12	9,62	14,89	2,79	0,16	0,43	19,45	9,95	6,72	941,5
Ασυρτικο Σαντορίνη 2005	17,0	5,89	202,94	69,96	93,75	31,27	11,03	14,78	21,65	0,16	0,29	25,83	9,69	2,95	1085,5
	19,0	5,42	186,45	64,28	43,07	35,05	10,13	13,58	19,89	0,15	0,27	23,73	7,07	2,71	1047,3
	21,0	4,42	105,79	51,79	29,86	21,05	ΔΑ	6,25	1,98	ΔΑ	ΔΑ	21,40	13,51	3,83	1147,3
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	14,0	4,13	490,90	187,36	48,53	46,41	63,61	108,83	3,29	0,03	ΔΑ	6,66	4,50	2,23	1307,6
	15,0	5,15	409,81	174,92	30,31	40,92	47,24	80,57	2,02	0,06	ΔΑ	6,83	6,36	5,02	1114,6
	21,0	6,82	95,83	39,41	20,48	50,98	6,44	12,80	0,26	ΔΑ	ΔΑ	6,75	17,83	14,93	506,6
Αηδάνι Σαντορίνη 2005	21,0	2,39	65,82	48,03	38,04	51,20	35,16	30,77	16,33	ΔΑ	1,08	33,69	42,46	23,11	933,4
	25,0	6,36	76,55	93,79	19,51	74,94	15,37	29,00	0,93	0,08	0,19	9,51	17,88	12,34	1091,3
	23,0	5,42	87,56	42,52	23,82	42,06	13,29	14,48	1,30	0,20	ΔΑ	30,67	44,73	46,02	1056,2
Αθήρι Σαντορίνη 2004	17,0	3,85	85,28	68,08	23,99	30,14	14,52	23,46	4,55	0,06	0,45	13,21	4,89	4,16	756,6
	19,0	7,56	29,16	32,78	15,30	22,92	14,81	25,88	1,04	ΔΑ	0,87	13,07	8,98	7,89	597,3
Αθήρι Σαντορίνη 2005	16,0	3,77	9,01	24,45	8,61	8,28	6,98	10,05	0,38	0,12	0,29	5,73	7,38	8,49	579,3
	16,0	1,99	9,67	23,73	9,17	14,76	7,37	8,10	0,11	ΔΑ	ΔΑ	3,89	4,90	3,90	643,7
	19,0	2,19	19,36	24,60	3,46	8,72	7,83	20,92	2,09	0,09	0,07	6,58	6,26	3,67	586,0
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	15,0	3,82	117,48	142,72	37,43	55,18	40,59	104,98	1,09	0,22	0,64	1,99	2,77	2,54	1916,7
	19,0	2,10	63,68	28,94	10,99	12,62	15,97	46,23	0,01	0,23	0,36	1,03	5,92	13,11	549,7
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	15,0	5,68	77,60	43,37	13,90	21,08	7,65	10,29	0,16	0,13	ΔΑ	0,20	0,79	0,40	1037,7
	18,0	8,67	56,68	51,33	13,64	14,79	6,09	10,33	0,84	0,11	0,81	1,62	6,37	8,72	1015,6
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	14,0	2,71	70,16	27,73	16,81	18,68	4,89	4,19	UDL	0,11	0,83	2,67	5,87	3,46	542,8
	15,0	2,93	42,41	20,37	9,15	11,79	5,38	3,97	0,50	ΔΑ	0,65	2,38	3,73	1,51	489,1

Πίνακας 6-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο ραγών λευκών ποικιλιών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (^o Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans -καφαρικό οξύ	trans -ρεβερραρόλη	ε-βουφερίνη	β-D-γλυκτοσιδής κερατίνης	β-β-D-γλυκοσιδής κερατίνης	β-ραμνοσιδής κερατίνης	*ολικές πολυφαινόλες
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	19,0	2,35	29,58	6,33	19,49	15,03	ΔΑ	22,62	ΔΑ	ΔΑ	0,29	1,03	2,44	2,64	271,3
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	0,79	35,71	20,05	13,76	9,81	6,88	46,03	17,03	0,03	0,36	4,47	1,93	3,12	588,4
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9,0	0,44	53,30	58,48	26,23	27,08	33,26	43,17	36,09	0,30	ΔΑ	1,96	1,14	2,09	981,4
Ροδίτης Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	21,0	3,87	62,84	63,35	26,54	23,54	5,37	4,68	ΔΑ	ΔΑ	0,09	4,04	21,37	8,03	495,4
M.O.		4,29	132,97	62,67	27,91	28,45	18,25	32,44	6,57	0,14	0,48	10,39	9,90	7,93	899,53

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 7-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (%Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλαυκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	10,0	2,24	95,92	40,49	20,35	17,40	13,94	30,57	1,05	**ΔΑ	0,57	2,73	1,08	ΔΑ	467,4
	12,0	2,61	151,41	57,83	18,87	14,46	16,86	32,62	0,14	0,05	0,51	1,92	1,88	0,24	543,5
	15,0	3,18	90,30	27,62	24,07	28,33	2,61	4,47	2,55	ΔΑ	1,74	8,63	3,88	1,74	488,8
	16,0	2,98	76,55	34,53	33,96	44,14	ΔΑ	3,32	2,32	0,10	ΔΑ	6,60	3,24	ΔΑ	418,5
	19,0	4,04	74,58	40,82	13,06	47,91	7,41	7,21	1,10	0,25	ΔΑ	7,17	3,10	ΔΑ	404,8
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	19,0	0,82	29,12	11,20	21,11	16,32	3,40	2,25	0,22	ΔΑ	0,81	10,24	7,51	2,78	339,0
	21,0	1,60	68,61	19,92	19,58	20,82	1,52	4,43	1,74	ΔΑ	0,66	11,67	7,39	3,67	422,8
	19,0	2,33	74,85	22,13	12,53	24,46	3,77	1,00	0,42	0,48	0,00	9,04	5,15	0,93	411,2
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	6,0	1,22	101,27	71,50	19,97	24,64	26,42	53,52	0,29	0,01	0,15	3,66	1,96	0,27	357,6
	14,0	4,39	65,69	61,54	10,98	28,39	14,12	9,17	0,50	0,68	2,36	11,48	14,57	7,18	530,9
	16,5	2,48	37,93	38,75	13,33	6,99	6,35	12,63	1,02	0,18	1,04	3,12	2,11	0,82	301,0
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	24,0	1,64	24,14	21,47	5,76	13,27	3,26	2,71	0,09	0,07	0,46	3,83	4,75	2,43	300,6
	26,5	0,90	19,43	19,16	6,43	8,16	2,90	0,78	5,77	0,06	1,29	5,16	8,49	2,82	257,4
	24,5	1,48	21,37	17,02	10,27	13,28	4,22	0,00	1,15	2,29	0,92	10,00	11,83	4,53	334,9
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	6,0	0,06	62,42	25,75	18,36	9,28	15,71	46,37	0,26	0,01	0,06	2,26	0,81	1,91	290,5
	13,0	1,98	102,20	55,14	21,01	16,14	23,14	60,57	0,25	0,07	0,33	3,32	1,74	0,92	472,4
	15,0	3,60	90,79	70,50	12,85	19,29	5,08	57,78	0,45	0,12	0,59	5,97	3,55	1,79	387,3
	20,0	8,23	20,14	6,53	44,73	53,23	7,59	0,25	0,08	0,82	3,93	4,87	1,83	0,00	365,3
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	27,5	0,81	17,21	27,61	3,91	11,91	7,52	1,13	0,01	0,04	0,20	1,58	3,52	2,58	226,4
	26,5	0,54	28,66	47,89	5,51	22,72	4,46	7,43	0,01	ΔΑ	0,70	5,10	11,44	5,27	337,6
	24,0	0,59	23,49	28,54	12,82	16,65	4,99	7,49	0,07	ΔΑ	0,77	5,21	4,38	1,58	317,9
Κοτσιφάλι Ηράκλειο 2004	16,0	1,23	62,21	26,37	0,96	1,68	10,34	0,13	0,02	0,05	1,02	0,30	0,15	ΔΑ	280,71
	20,0	0,78	56,45	20,09	0,95	2,93	0,32	ΔΑ	0,13	0,12	2,49	7,79	2,40	ΔΑ	271,9

Πίνακας 7-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφταρικό οξύ	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλακκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
Μανδηλαρια Ηράκλειο 2004	7,2	1,32	29,21	14,44	1,00	0,95	0,59	1,28	0,11	0,29	0,20	0,08	0,25	ΔΑ	389,67
	13,0	6,07	56,67	43,95	2,99	8,28	3,91	4,82	0,07	0,36	9,18	2,88	1,18	0,02	465,3
	17,0	3,06	52,30	36,51	7,79	18,59	0,00	2,31	0,62	0,25	1,39	1,40	0,76	1,10	417,18
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	18,0	6,32	86,49	78,97	7,34	10,14	17,72	46,62	2,78	0,04	0,14	2,75	1,41	1,33	342,8
	23,0	4,45	68,09	28,65	8,19	12,82	6,76	6,68	0,14	0,05	0,21	9,18	8,62	5,61	326,9
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	17,0	7,42	62,26	59,91	12,52	29,42	3,73	5,48	UDL	0,13	2,49	9,33	6,97	7,55	388,7
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	1,02	4,63	5,20	ΔΑ	3,38	ΔΑ	ΔΑ	1,61	0,36	0,74	8,71	10,37	2,54	102,5
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	0,25	6,08	4,81	2,14	8,83	2,08	2,47	0,08	0,75	6,33	4,49	6,06	2,74	202,1
Βερτζάμι Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	1,53	16,41	8,91	ΔΑ	7,09	1,13	2,94	0,41	0,68	0,54	1,96	9,18	5,42	222,9
Βερτζάμι Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	1,20	13,81	11,43	7,30	3,50	0,59	1,59	1,16	0,08	0,59	1,12	8,22	1,25	266,4
Αγιαννώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	2,18	42,31	12,48	11,87	6,01	4,73	6,01	0,10	0,88	2,07	0,28	2,20	6,52	277,9
Αυγουσιτιάτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	22,0	0,19	0,24	0,45	ΔΑ	1,86	0,25	0,59	ΔΑ	ΔΑ	0,92	0,47	2,29	1,07	120,2
Λημνίωνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	1,40	8,39	2,91	1,35	3,33	ΔΑ	0,75	0,16	0,43	16,29	1,61	1,61	3,75	150,7
Ρωμείο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20,0	3,55	56,63	37,91	ΔΑ	12,68	ΔΑ	0,17	0,21	5,19	0,37	1,86	0,93	0,20	450,65
Ξινόμαυρο Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	21,0	1,67	38,58	28,93	ΔΑ	2,14	ΔΑ	2,05	ΔΑ	0,19	0,16	0,07	0,45	0,21	340,98
Λημνιο Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	22,0	1,10	22,00	10,19	5,89	7,63	5,85	2,32	0,17	0,85	1,35	2,01	6,98	ΔΑ	139,34
Μ.Ο.		2,37	50,23	30,21	12,35	15,36	6,86	11,67	0,76	0,50	1,72	4,61	4,47	2,52	336,73

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 8-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ)	% Ποσοστό σακχάρων (%Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καρφαρικό οξύ	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσίδης κερκετίνης	3-ραμνοσίδης κερκετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Ασυρτικό Σαντορίνη 2004	11,0	1,03	151,67	31,35	24,51	10,63	14,01	40,39	4,31	**ΔΑ	0,17	3,49	1,12	4,73	492,7
	16,0	2,48	125,38	37,51	12,19	5,80	6,09	9,84	2,70	0,01	0,18	5,86	1,39	1,48	398,8
	21,0	2,20	61,62	17,72	12,70	8,99	3,44	5,33	1,00	0,06	0,19	8,56	4,38	2,96	414,3
Ασυρτικό Σαντορίνη 2005	19,0	2,95	101,47	34,98	46,88	15,64	5,51	7,39	10,82	0,08	0,15	12,92	3,85	1,48	455,9
	21,0	2,71	85,23	29,38	19,69	16,02	4,63	6,21	9,09	0,07	0,12	10,85	3,23	1,24	389,0
	14,0	1,25	29,96	14,67	8,46	5,96	0,00	1,77	0,56	ΔΑ	ΔΑ	6,06	3,83	1,08	324,9
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	14,0	1,20	143,18	54,65	14,16	13,53	18,55	31,74	0,96	0,01	ΔΑ	1,94	1,31	0,65	381,4
	15,0	2,47	196,71	83,96	14,55	19,64	22,68	38,67	0,97	0,03	ΔΑ	3,28	3,05	2,41	535,0
	17,0	3,11	43,69	17,97	9,34	23,25	2,94	5,83	0,12	ΔΑ	ΔΑ	6,26	16,54	13,85	322,2
Αηδάνι Σαντορίνη 2005	25,0	0,22	5,92	4,32	3,42	4,61	3,16	2,77	1,47	ΔΑ	0,10	3,03	3,82	2,08	173,3
	20,5	1,84	22,12	27,10	5,64	21,65	4,44	8,38	0,27	0,02	0,06	2,75	5,17	3,57	315,3
	23,0	1,63	26,27	12,76	7,15	12,62	3,99	4,34	0,39	0,06	ΔΑ	9,20	13,42	13,81	376,9
Αθήρι Σαντορίνη 2004	19,0	1,87	41,49	33,12	11,67	14,66	7,06	11,41	2,22	0,03	0,22	6,43	2,38	2,02	336,1
	19,0	3,78	14,58	16,39	7,65	11,46	7,41	12,94	0,52	ΔΑ	0,44	6,54	4,49	3,94	298,6
Αθήρι Σαντορίνη 2005	16,0	1,01	2,40	6,52	2,30	2,21	1,86	2,68	0,10	0,03	0,19	3,82	4,92	5,66	234,5
	16,0	0,79	3,87	9,49	3,67	5,91	2,95	3,24	0,05	ΔΑ	ΔΑ	1,87	2,35	1,87	257,5
	19,0	1,00	8,85	11,25	1,58	3,98	3,58	9,56	0,95	0,04	0,03	3,01	2,86	1,68	267,9
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	15,0	1,00	30,82	37,44	9,82	14,47	10,65	27,54	0,29	0,06	0,17	0,52	0,73	0,67	502,8
	19,0	0,83	25,03	11,37	4,32	4,96	6,28	18,17	0,00	0,09	0,14	0,40	2,33	5,15	216,0
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	15,0	1,89	25,87	14,46	4,63	7,03	2,55	3,43	0,05	0,04	ΔΑ	0,07	0,26	0,13	345,9
	18,0	2,81	18,34	16,61	4,41	4,79	1,97	3,34	0,27	0,03	0,26	0,53	2,06	2,82	328,7
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	14,0	1,71	44,22	17,48	10,59	11,77	3,08	2,64	ΔΑ	0,07	0,53	1,68	3,70	2,18	342,1
	15,0	2,13	30,87	14,83	6,66	8,58	3,92	2,89	0,36	ΔΑ	0,47	1,74	2,71	1,10	356,0

Πίνακας 8-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ραγών σταφυλιών για τις οινοποιητικές περιόδους 2004-2005

ΡΑΓΕΣ (mg/g εκχυλ)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καρφαρικό οξύ	trans-ρεσβερατρόλη	ε-βινιφερίνη	3-D-γαλακτοσίδης κερκετίνης	3-β-D-γλυκοσιδής κερκετίνης	3-ραμνοσιδής κερκετίνης	*ολικές πολυφαινόλες
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	19,0	1,80	22,68	4,85	14,94	11,53	ΔΑ	17,34	0,00	ΔΑ	0,23	0,79	1,87	2,03	208,0
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	0,27	12,23	6,86	4,71	3,36	2,36	15,76	5,83	0,01	0,12	1,53	0,66	1,07	201,5
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9,0	0,10	11,78	12,92	5,79	5,98	3,67	9,54	7,97	0,07	ΔΑ	0,43	0,25	0,46	113,6
Ροδίτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	3,56	57,82	58,28	24,42	21,65	4,94	4,31	ΔΑ	ΔΑ	0,08	3,72	19,66	7,39	455,8
Μ.Ο.		1,76	49,78	23,64	10,96	10,77	5,84	11,39	2,05	0,05	0,20	3,97	4,16	3,24	334,99

*mg γαλλικού οξέος / Kg ραγών, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 9-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο γιγάρτων ερυθρών και λευκών ποικιλιών σταφυλιών

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/100g γιγάρτων)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοουαΐνη Β1	προκοουαΐνη Β2	προκοουαΐνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	12,0	18,08	1470,89	440,18	86,3	109,8	36,2	7,8	3586,5
	15,0	19,3	914,4	269,6	107,7	145,1	41,1	5,9	2210,1
	16,0	161,7	661,2	203,3	129,2	275,3	20,4	7,2	2612,5
	19,0	48,6	411,1	158,9	89,0	128,6	29,2	5,5	1736,6
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2005	19,0	13,6	575,0	174,2	95,2	133,6	9,6	9,3	1939,1
	22,2	13,2	596,0	172,3	117,0	150,7	14,4	11,3	2587,6
	19,0	15,4	481,3	173,7	84,4	144,1	7,9	7,0	2199,0
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	33,4	214,5	221,1	73,5	160,6	72,6	18,8	1732,2
	16,5	35,9	279,9	183,5	100,3	143,0	62,6	16,5	1684,4
	20,0	1,5	219,3	168,3	35,2	126,0	31,2	8,8	1808,8
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	24,0	0,1	181,1	192,0	45,9	112,0	16,6	16,2	1826,3
	26,5	24,9	99,8	114,3	34,1	83,2	45,1	31,6	1725,3
	24,5	9,5	160,4	186,2	35,7	82,9	59,5	33,3	1663,8
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	13,0	30,0	545,9	368,1	83,5	136,6	16,7	341,7	3764,5
	15,0	19,0	478,6	371,6	67,7	101,7	26,8	304,6	2732,4
	20,0	21,3	150,1	107,6	30,9	87,4	22,1	40,2	1898,2
Βοηδοματο Σαντορίνη 2005	27,5	1,5	226,0	340,9	41,7	118,5	57,0	49,4	2133,1
	26,5	0,2	151,5	309,2	39,4	121,6	46,0	27,9	2279,5
	24,0	7,6	115,7	262,7	44,1	136,7	76,7	29,7	1594,9
Μανδηλαρια Ηράκλειο 2004	17,0	15,80	368,47	241,14	115,54	108,64	14,55	0,82	5713,5
Αγιοργίτικο Αρκαδία 2004	18,0	29,92	377,36	270,48	39,94	109,87	13,52	6,92	1886,1
	23,0	43,33	92,76	97,05	31,03	88,58	56,54	48,52	1675,6
Αγιοργίτικο Νεμέα 2004	17,0	43,67	366,23	352,43	73,66	173,08	21,97	32,22	2024,6
Λημνιώνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	21,0	0,49	141,69	86,44	27,51	68,93	12,16	1,43	1222,4
Ρομέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	20,0	21,28	305,92	246,82	58,68	18,43	13,04	12,62	1197,1
Μ.Ο.		25,16	383,40	228,48	67,48	122,58	32,94	43,01	2217,36
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	7,22	1067,04	220,5	172,41	74,79	98,59	284,2	3313,5
	16,0	29,75	1505,21	450,3	146,32	69,57	73,16	118,1	5199,5
	20,0	8,89	403,35	116,0	83,12	58,82	22,52	6,06	2711,7
Αηδανι Σαντορίνη2004	14,0	19,4	513,5	126,3	32,6	82,0	99,5	49,2	1281,2
	15,0	10,9	555,0	168,3	55,6	73,7	146,8	38,5	1127,8
	17,0	9,35	143,63	89,21	44,37	127,86	32,21	7,39	824,8
Αθήρι Σαντορίνη 2004	19,0	19,3	105,9	84,5	38,4	92,1	13,3	75,1	1795,6
	19,0	27,7	42,0	66,1	34,7	91,8	45,9	97,1	2363,4
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	14,0	8,90	369,62	192,44	78,39	140,26	8,19	6,76	2397,4
	15,0	10,60	215,27	138,27	48,84	133,00	34,91	7,88	1744,6
	19,0	1,45	285,25	268,66	57,85	170,15	44,68	4,19	2169,7
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	18,0	46,57	1084,21	152,51	182,36	112,56	46,56	0,68	3310,8
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	1,26	7,12	3,69	9,40	ΔΑ	14,11	11,19	648,2
Chardonnay Αρκαδία 2004	21	7,92	143,31	261,15	50,87	158,75	45,89	19,95	1781,0
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	20	29,83	45,56	44,41	17,65	33,05	28,69	45,66	1321,3
Ροδίτης Απελώνας Γεωπονικής 2004	21,0	4,90	189,03	85,26	65,94	45,26	4,29	0,91	871,6
Μ.Ο.		15,25	417,19	154,23	69,92	97,58	47,46	48,29	2053,88

Πίνακας 10-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων γιγάρτων ερυθρών και λευκών ποικιλιών σταφυλιών

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκοανιδίνη Β1	προκοανιδίνη Β2	προκοανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	#ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2004	12,0	3,11	252,91	75,69	18,26	23,04	6,22	2,24	619,48
	15,0	6,21	198,18	54,71	34,73	46,80	6,63	1,90	631,46
	16,0	33,98	75,89	42,70	27,15	57,83	4,29	1,51	628,00
	19,0	16,75	141,68	54,78	30,68	44,31	10,06	1,90	598,53
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2005	19,0	2,61	75,72	33,38	18,24	25,61	1,85	1,79	325,37
	22,2	3,17	142,81	41,28	28,03	36,12	3,44	2,72	620,04
	19,0	3,80	91,63	42,86	20,82	35,55	1,95	1,72	542,69
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	11,12	71,51	73,70	24,50	53,52	24,20	6,27	577,40
	16,5	11,96	93,29	61,17	33,42	47,66	20,85	5,50	561,48
	20,0	0,60	86,60	66,46	13,91	49,75	12,33	3,47	714,40
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	24,0	0,03	95,33	101,06	24,14	58,97	8,74	8,55	537,16
	26,5	7,14	28,62	32,76	9,77	23,85	12,91	9,04	494,50
	24,5	2,85	48,33	56,10	10,74	24,97	17,94	10,05	501,41
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	13,0	6,46	117,75	79,40	18,00	29,46	3,60	73,71	811,95
	15,0	4,00	100,88	78,33	14,28	21,43	5,64	64,20	575,89
	20,0	15,22	33,60	41,38	11,87	33,60	8,51	15,47	451,94
Βοηδοματο Σαντορίνη 2005	27,5	0,39	57,45	86,66	10,60	30,12	14,49	12,55	542,32
	26,5	0,05	44,70	91,24	11,62	35,88	13,57	8,24	672,64
	24,0	3,14	47,94	108,85	18,28	56,61	31,79	12,29	660,73
Μανδηλαρια Ηράκλειο 2004	17,0	1,77	41,27	27,01	12,94	12,17	1,63	0,09	642,0
Αγιοργίτικο Αρκαδία 2004	18,0	8,14	102,71	73,62	10,87	29,91	3,68	1,88	456,1
	23,0	2,28	41,32	75,30	14,67	45,78	13,23	5,75	543,8
Αγιοργίτικο Νεμέα 2004	17,0	8,73	73,25	70,49	14,73	34,62	4,39	6,44	449,9
Λημνιώνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	21,0	0,26	74,14	45,23	14,39	36,07	6,36	0,75	639,6
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	20,0	1,06	15,30	12,34	2,93	0,92	0,65	0,63	598,6
Μ.Ο.		6,19	86,11	61,06	17,98	35,78	9,56	10,35	575,90
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	7,22	1067,04	220,5	172,41	74,79	98,59	284,2	3313,5
	16,0	29,75	1505,21	450,3	146,32	69,57	73,16	118,1	5199,5
	20,0	8,89	403,35	116,0	83,12	58,82	22,52	6,06	2711,7
Αηδανι Σαντορίνη 2004	14,0	19,4	513,5	126,3	32,6	82,0	99,5	49,2	1281,2
	15,0	10,9	555,0	168,3	55,6	73,7	146,8	38,5	1127,8
	17,0	9,35	143,63	89,21	44,37	127,86	32,21	7,39	824,8
Αθήρι Σαντορίνη 2004	19,0	19,3	105,9	84,5	38,4	92,1	13,3	75,1	1795,6
	19,0	27,7	42,0	66,1	34,7	91,8	45,9	97,1	2363,4
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	14,0	8,90	369,62	192,44	78,39	140,26	8,19	6,76	2397,4
	15,0	10,60	215,27	138,27	48,84	133,00	34,91	7,88	1744,6
	19,0	1,45	285,25	268,66	57,85	170,15	44,68	4,19	2169,7
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	18,0	46,57	1084,21	152,51	182,36	112,56	46,56	0,68	3310,8
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	1,26	7,12	3,69	9,40	ΔΑ	14,11	11,19	648,2
Chardonnay Αρκαδία 2004	21	7,92	143,31	261,15	50,87	158,75	45,89	19,95	1781,0
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	20	29,83	45,56	44,41	17,65	33,05	28,69	45,66	1321,3
Ροδίτης Απελώνας Γεωπονικής 2004	21,0	4,90	189,03	85,26	65,94	45,26	4,29	0,91	871,6
Μ.Ο.		15,25	417,19	154,23	69,92	97,58	47,46	48,29	2053,88

Πίνακας 11-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο φλοιών

ΦΛΟΙΟΙ (mg/100g φλοιού)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	β-D-γλακτοσίδης κερατίνη	β-β-D-γλακτοσίδης κερατίνη	β-αμινοσίδης κερατίνη	κερατίνη	καμφορόλη	trans- ρεβερστρούλη	ε-βινιφρίνη	trans-καφταρικό οξύ	καφεϊκό οξύ	γαλλικό οξύ	τυρργλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	12,0	31,45	11,06	5,45	**ΔΑ	0,51	0,85	2,38	0,95	ΔΑ	0,22	ΔΑ	3,58	ΔΑ	191,7
	15,0	38,72	22,72	3,19	ΔΑ	ΔΑ	0,40	7,82	0,77	ΔΑ	0,11	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	208,7
	16,0	49,94	21,28	16,24	ΔΑ	1,10	0,93	6,53	1,20	2,50	0,17	ΔΑ	0,35	ΔΑ	352,0
	19,0	30,14	22,56	11,31	0,08	0,33	0,44	3,14	0,18	ΔΑ	0,19	1,55	ΔΑ	ΔΑ	473,9
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2005	19,0	51,94	24,28	16,07	ΔΑ	0,21	1,02	6,09	0,69	0,97	0,12	0,82	2,40	ΔΑ	435,0
	22,2	36,46	17,05	25,64	ΔΑ	0,33	1,63	4,28	1,09	1,55	0,20	1,31	3,83	ΔΑ	596,4
	19,0	31,11	17,58	8,61	ΔΑ	0,01	3,48	13,72	0,86	0,97	0,67	ΔΑ	12,31	4,13	689,2
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	10,90	7,91	2,61	ΔΑ	ΔΑ	0,04	1,10	0,09	0,49	0,12	0,34	ΔΑ	ΔΑ	102,0
	16,5	26,29	21,91	16,97	2,12	0,15	ΔΑ	2,27	0,34	0,32	0,77	1,20	2,18	ΔΑ	246,7
	20,0	23,71	26,64	15,30	ΔΑ	0,16	ΔΑ	1,77	0,26	0,34	0,69	1,30	2,37	ΔΑ	221,4
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	24,0	73,46	65,05	30,84	ΔΑ	0,13	0,60	1,35	0,92	ΔΑ	0,17	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	620,5
	26,5	67,89	70,01	34,57	ΔΑ	0,63	1,91	9,26	2,35	1,06	0,37	ΔΑ	3,29	2,54	683,7
	24,5	69,53	103,55	33,32	ΔΑ	0,14	6,18	7,42	6,37	ΔΑ	0,25	ΔΑ	4,81	ΔΑ	1258,6
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	13,0	8,84	3,12	3,80	ΔΑ	0,05	0,01	0,54	0,15	ΔΑ	0,05	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	64,5
	15,0	25,17	19,70	8,98	0,01	0,10	0,32	1,11	0,25	ΔΑ	0,28	0,53	1,81	ΔΑ	315,6
	20,0	21,35	23,64	10,77	0,01	0,12	0,38	1,33	0,30	ΔΑ	0,34	0,64	2,17	ΔΑ	321,4
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	27,5	34,89	28,01	9,74	ΔΑ	0,11	0,00	9,23	0,20	ΔΑ	0,45	ΔΑ	3,98	1,08	278,7
	26,5	32,91	33,13	11,10	ΔΑ	0,09	1,29	1,70	0,50	0,23	0,15	ΔΑ	3,71	ΔΑ	258,9
	24,0	34,89	28,01	9,74	ΔΑ	0,11	ΔΑ	9,23	0,20	ΔΑ	0,45	ΔΑ	10,25	1,78	555,2
Μανδηλάρια Ηράκλειο 2004	17,0	12,08	8,45	4,03	ΔΑ	0,66	3,56	15,99	0,41	1,22	0,35	0,54	1,43	1,32	284,5
Αγιωργίτικο Βιολογικό 2004	18,0	49,87	34,72	27,28	ΔΑ	ΔΑ	0,14	0,60	0,55	ΔΑ	0,32	3,05	1,23	0,69	150,5
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	17,0	16,95	13,59	10,57	ΔΑ	ΔΑ	0,65	0,98	0,47	ΔΑ	2,37	0,78	5,17	6,01	106,8
Λημνιώνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	10,56	7,71	1,16	0,17	0,86	2,38	3,46	0,10	ΔΑ	0,64	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	564,0
Ρωμείο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20,0	2,55	5,50	3,61	0,07	0,05	0,15	0,98	0,03	0,00	0,80	0,29	ΔΑ	ΔΑ	49,7
Μ.Ο.		32,98	26,55	13,37	0,41	0,29	1,25	4,68	0,80	0,88	0,43	1,03	3,82	2,51	376,23

Πίνακας 11-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο φλοιών

ΦΛΟΙΟΙ (mg/100g φλοιού)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	β-D-γαλακτοσίδης κερατίνης	β-β-D-γλυκοσίδης κερατίνης	β-ραμνοσίδης κερατίνης	κερατίνη	καμφορόλη	trans- ρεβερσρόλη	ε-βινιφερίνη	trans-καφταρικό οξύ	καφεϊκό οξύ	γαλλικό οξύ	τυρργλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	50,07	10,72	1,95	0,17	ΔΑ	1,18	1,71	5,86	ΔΑ	0,18	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	119,3
	16,0	56,66	16,70	2,73	ΔΑ	ΔΑ	0,04	2,20	3,87	ΔΑ	0,09	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	167,7
Αηδανι Σαντορίνη 2004	14,0	16,48	6,12	4,33	0,17	0,19	0,07	0,61	2,04	0,13	0,62	ΔΑ	8,14	1,71	53,2
	15,0	9,57	3,87	3,91	0,69	0,45	ΔΑ	0,28	0,45	ΔΑ	2,23	ΔΑ	3,31	1,73	99,3
	17,0	6,53	12,84	13,47	ΔΑ	0,38	ΔΑ	0,51	0,16	ΔΑ	0,02	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	90,4
Αθήρι Σαντορίνη 2004	19,0	26,61	12,72	8,54	0,13	0,03	0,03	0,48	0,44	ΔΑ	0,14	ΔΑ	4,43	1,89	125,7
	19,0	21,21	15,54	10,44	0,16	0,04	0,02	0,38	0,12	ΔΑ	0,11	ΔΑ	3,61	1,54	132,8
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	16,80	2,59	3,45	ΔΑ	UDL	ΔΑ	0,31	34,55	ΔΑ	0,17	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	169,7
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9,0	6,489	1,5429	1,429	0,018	0,011	ΔΑ	ΔΑ	25,9	ΔΑ	0,18	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	238,0
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	15,0	10,76	10,99	7,94	ΔΑ	0,25	0,03	0,96	1,62	ΔΑ	0,39	0,12	0,24	0,25	100,4
	19,0	27,56	25,97	12,65	0,139	0,039	ΔΑ	2,012	1,306	ΔΑ	0,07	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	88,0
M.O.		22,61	10,87	6,44	0,21	0,17	0,23	0,95	6,94	0,13	0,38	0,12	3,95	1,43	125,86

*mg γαλλικού οξέος /100g φλοιού

**ΔΑ= ΔενΑνιχνεύθηκε

Πίνακας 12-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων φλοιών

ΦΛΟΙΟΙ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	β-D-γαλακτοσίδης κερακτίνης	β-β-D-γλυκοσίδης κερακτίνης	β-ραμνοσίδης κερακτίνης	κερακτίνη	κνιφερόλη	trans-ρεβεραρόλη	ε-βινιφερίνη	trans-καφταρικό οξύ	καφεϊκό οξύ	γαλλικό οξύ	συρργλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	12,0	20,20	7,10	3,50	**ΔΑ	0,33	0,55	1,53	0,61	ΔΑ	0,14	ΔΑ	2,30	ΔΑ	123,1
	15,0	38,72	22,72	3,19	ΔΑ	ΔΑ	0,40	2,59	0,77	ΔΑ	0,11	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	134,0
	16,0	13,03	5,55	4,24	ΔΑ	0,29	0,24	1,70	0,31	0,65	0,04	ΔΑ	0,09	ΔΑ	144,3
	19,0	12,36	9,25	4,64	0,03	0,13	0,18	1,29	0,07	ΔΑ	0,08	0,63	ΔΑ	ΔΑ	110,0
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2005	19,0	15,39	7,20	4,76	ΔΑ	0,06	0,30	1,80	0,20	0,29	0,04	0,24	0,71	ΔΑ	128,9
	22,2	19,24	8,99	5,95	ΔΑ	0,08	0,38	2,26	0,25	0,36	0,05	0,30	0,89	ΔΑ	138,4
	19,0	16,41	9,27	4,54	ΔΑ	0,01	1,84	7,24	0,46	0,51	0,35	ΔΑ	6,49	2,18	204,2
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	14,0	9,62	6,98	2,31	ΔΑ	0,00	0,03	0,97	0,08	0,43	0,11	0,30	ΔΑ	ΔΑ	90,0
	16,5	26,73	22,28	17,25	2,16	0,18	ΔΑ	2,00	0,30	0,39	0,78	1,47	2,67	ΔΑ	250,9
	20,0	23,79	26,74	15,36	ΔΑ	0,16	ΔΑ	1,78	0,26	0,35	0,69	1,30	2,38	ΔΑ	222,2
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	24,0	18,60	16,47	7,81	ΔΑ	0,03	0,15	0,34	0,23	ΔΑ	0,04	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	157,1
	26,5	21,17	21,83	10,78	ΔΑ	0,20	0,59	2,89	0,73	0,33	0,11	ΔΑ	1,03	0,79	213,2
	24,5	12,98	19,33	6,22	ΔΑ	0,03	1,15	1,39	1,19	ΔΑ	0,05	ΔΑ	0,90	ΔΑ	234,9
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	13,0	5,90	2,08	2,53	ΔΑ	0,03	0,01	0,36	0,10	ΔΑ	0,03	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	43,0
	15,0	16,78	15,48	7,05	0,01	0,08	0,25	0,87	0,20	ΔΑ	0,22	0,42	1,42	ΔΑ	147,3
	20,0	16,78	18,58	8,46	0,01	0,09	0,30	1,05	0,24	ΔΑ	0,27	0,50	1,71	ΔΑ	150,0
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	27,5	5,19	6,24	3,15	ΔΑ	0,00	0,33	0,74	0,04	ΔΑ	0,09	0,42	0,73	0,07	130,0
	26,5	11,92	12,00	4,02	ΔΑ	0,03	0,47	0,62	0,18	0,08	0,05	ΔΑ	1,34	ΔΑ	123,0
	24,0	8,58	6,89	2,39	ΔΑ	0,03	0,00	2,27	0,05	ΔΑ	0,11	ΔΑ	2,52	0,26	136,5
Μανδηλάρια Ηράκλειο 2004	17,0	8,03	5,61	2,68	ΔΑ	0,44	2,36	10,63	0,27	ΔΑ	0,23	0,30	0,93	0,81	189,0
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	18,0	17,81	12,40	9,74	ΔΑ	ΔΑ	0,05	0,21	0,19	ΔΑ	0,12	1,09	0,44	0,25	85,0
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	17,0	16,95	13,59	10,57	ΔΑ	ΔΑ	0,65	0,98	0,47	ΔΑ	2,37	0,78	5,17	6,01	86,1
Δημιώνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21,0	3,5201	2,5705	0,6607	0,0969	0,4895	1,3585	1,9778	0,0588	ΔΑ	0,3652	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	188,0
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	20,0	2,0903	4,5034	2,9546	0,0568	0,038	0,1188	0,8005	0,021	ΔΑ	0,6507	0,2398	ΔΑ	ΔΑ	40,6
Μ.Ο.		15,07	11,82	6,03	0,39	0,13	0,53	2,01	0,30	0,38	0,30	0,62	1,87	1,48	144,6

Πίνακας 12-Β Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων φλοιών

ΦΛΟΙΟΙ (mg/g εκχυλ.)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	β-D-γαλακτοσίδης κερατίνης	β-β-D-γλυκοσίδης κερατίνης	β-ραμνοσίδης κερατίνης	κερατίνη	κιμφορόλη	trans-ρεβερταρόλη	ε-βινιφερίνη	trans-καφταρικό οξύ	καφεϊκό οξύ	γαλλικό οξύ	συγγλυκό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	*ολικές πολυφαινόλες
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ															
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	19,92	4,26	0,78	0,07	ΔΑ	0,47	0,68	2,33	ΔΑ	0,07	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	47,5
	16,0	27,20	8,02	1,31	ΔΑ	ΔΑ	0,02	1,06	1,86	ΔΑ	0,04	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	100,6
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	14,0	12,61	4,68	3,31	0,13	0,14	0,05	0,47	1,56	0,10	0,48	ΔΑ	6,23	1,31	40,7
	15,0	7,17	2,90	2,93	0,52	0,34	ΔΑ	0,21	0,34	ΔΑ	1,67	ΔΑ	2,48	1,30	74,4
	17,0	3,78	7,43	7,80	0,00	0,22	ΔΑ	0,30	0,09	ΔΑ	0,01	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	32,3
Αθήρι Σαντορίνη 2004	19,0	16,86	8,05	5,41	0,08	0,02	0,02	0,31	0,28	ΔΑ	0,09	ΔΑ	2,81	1,20	79,6
	19,0	18,32	13,42	9,02	0,14	0,03	0,02	0,33	0,10	ΔΑ	0,10	ΔΑ	3,12	1,33	114,7
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	3,40	0,52	0,70	ΔΑ	UDL	ΔΑ	0,06	6,99	ΔΑ	0,03	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	34,4
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9,0	3,85	0,92	0,85	0,01	0,01	ΔΑ	ΔΑ	15,38	ΔΑ	0,11	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	30,0
Μοσχοφύλερο Αρκαδία 2004	15,0	8,97	9,16	6,61	ΔΑ	0,21	0,03	0,80	1,35	ΔΑ	0,32	0,10	0,20	0,21	83,7
	19,0	27,564	25,97	12,647	0,1389	0,0391	ΔΑ	2,0119	1,3058	ΔΑ	0,0685	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	88,0
M.O.		12,21	5,94	3,87	0,14	0,14	0,10	0,47	3,03	0,10	0,29	0,10	2,97	1,07	63,8

*mg γαλλικού οξέος /100g φλοιού

**ΔΑ= ΔενΑνιχνεύθηκε

Πίνακας 13-Β Συγκέντρωση σε υδρολυμένα φαινολικά οξέα ραγών και στεμφύλων

ΡΑΓΕΣ/ΣΤΕΜΦΥΛΑ (mg/Kg)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	φυρργλικό οξύ	π-κουμαρικό	προσοκοκτεγγλικό οξύ	βανυλικό οξύ	καφεϊκό οξύ	φερουλικό οξύ	μγνοστο
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	10,0	93,34	ΔΑ	3,69	2,81	ΔΑ	6,84	0,55	0,66
	12,0	9,41	0,90	1,07	1,63	0,64	4,90	0,48	ΔΑ
	15,0	21,88	2,56	2,96	4,32	ΔΑ	10,12	0,76	0,86
	16,0	3,02	9,65	23,72	11,17	ΔΑ	2,91	1,39	9,06
	19,0	1,42	9,01	4,64	0,53	0,78	ΔΑ	0,38	1,91
Μαυροράγανο Σαντορίνη 2004	6,0	8,28	29,24	13,13	21,88	16,43	0,18	1,27	76,89
	14,0	89,66	16,21	9,47	2,35	2,24	7,05	0,42	0,04
	20,0	27,36	10,30	12,35	9,07	4,41	0,93	3,12	9,69
Μανδηλαριά Ηράκλειο 2004	15	3,77	2,14	8,29	2,65	0,22	2,45	0,19	ΔΑ
	17	1,57	0,62	0,13	ΔΑ	ΔΑ	9,05	1,22	ΔΑ
Ρομέικο Αμπελόνας ΓΠΑ 2003	21	23,10	3,21	4,74	ΔΑ	ΔΑ	0,58	0,59	ΔΑ
Ρομέικο Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	22	4,83	3,60	6,03	1,59	1,84	ΔΑ	1,47	11,28
Αγιαννιώτικο Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	17,0	46,18	14,06	16,42	2,23	3,88	7,85	2,16	0,24
Μαυροδάφνη Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	23,0	10,17	44,58	29,72	1,80	ΔΑ	1,46	0,63	1,76
Λημνίονα Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	21,0	7,83	51,17	33,32	27,39	2,71	9,57	1,54	4,51
Ξινόμαυρο Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	21	23,73	7,90	9,77	0,82	ΔΑ	6,32	0,70	1,42
Βερτζαμί Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	23,0	0,47	5,37	17,75	0,99	1,01	0,48	0,69	ΔΑ
Αυγουσιτιάτης Αμπελόνας ΓΠΑ 2004	22,0	4,44	17,45	23,35	6,65	0,88	1,37	1,33	0,65
Αγιοργιτικό Αρκαδία 2004	18,0	15,14	76,15	38,88	10,49	ΔΑ	ΔΑ	0,29	17,95
	23,0	21,82	10,70	6,49	1,88	ΔΑ	0,77	ΔΑ	4,42
Αγιοργιτικό Νεμέα	18	31,50	ΔΑ	4,05	2,01	ΔΑ	4,75	0,25	3,82
M.O.		21,38	16,57	12,86	5,91	3,19	4,31	0,97	9,07
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Merlot Αρκαδία 2004	10,0	14,79	0,13	2,96	14,57	ΔΑ	6,54	0,20	6,15
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9,0	2,55	ΔΑ	6,91	29,79	ΔΑ	ΔΑ	0,38	28,99
Chardonnay Αρκαδία 2004	9	25,91	ΔΑ	0,83	1,46	ΔΑ	1,15	0,34	1,08
Μοσχοφύλερο Αρκαδία 2004	15	22,97	4,88	11,14	114,47	5,43	ΔΑ	3,80	224,24
M.O.		16,55	2,51	5,46	40,07	5,43	3,85	1,18	65,12
ΣΤΕΜΦΥΛΑ									
Λιαστά μανδηλαριά Σαντορίνη 2003		179,45	238,49	183,79	25,32	11,60	21,77	11,61	ΔΑ
Λιαστά μανδηλαριά Σαντορίνη 2004		805,88	ΔΑ	395,00	55,78	ΔΑ	90,37	30,02	ΔΑ
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004		555,47	276,28	264,06	48,39	41,30	55,08	26,40	ΔΑ
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005		341,79	17,59	21,97	87,40	7,33	11,97	5,48	ΔΑ
Βόστρυχοι Μανδηλαριά Ρόδος 2005		152,10	ΔΑ	24,30	62,14	ΔΑ	41,01	33,99	29,05
M.O.		406,9	177,5	177,8	55,8	20,1	44,0	21,5	29,0

ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 14-Β Συγκέντρωση γιγάρτων σε υδρολυμένα φαινολικά οξέα

ΓΙΓΑΡΤΑ (mg/100g)	% Ποσοστό σακχάρων (°Brix)	γαλλικό οξύ	ευργγικό οξύ	π-κουμαρικό	προτοκατεχικό οξύ	βανιλικό οξύ	καφεϊκό οξύ	φερουλικό οξύ	άγνωστο
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	15,0	87,93	ΔΑ	5,04	6,80	ΔΑ	ΔΑ	1,09	ΔΑ
	16,0	2,36	ΔΑ	11,68	7,70	4,55	ΔΑ	1,03	6,59
	19,0	9,57	ΔΑ	2,68	ΔΑ	ΔΑ	0,08	0,28	4,23
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	6,0	59,04	0,97	8,25	35,04	7,76	ΔΑ	1,44	68,85
	14,0	32,74	ΔΑ	0,83	9,31	ΔΑ	ΔΑ	0,25	15,11
	16,5	64,81	ΔΑ	0,29	11,61	ΔΑ	1,43	60,05	7,39
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	37,97	0,24	1,55	3,06	1,03	ΔΑ	3,03	4,25
Ρωμέικο Αμπελώνας Γεωπονικής 2004	22	64,56	1,05	8,16	34,80	4,64	ΔΑ	2,59	85,65
Αγιαννιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	17,0	22,11	ΔΑ	1,28	1,54	0,60	ΔΑ	17,37	1,45
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	39,42	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,00	0,81	2,46	1,60
Μ.Ο.		42,05	0,75	4,42	13,73	3,10	0,77	8,96	21,68
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	21,0	16,15	0,84	5,58	12,09	6,16	ΔΑ	0,89	11,59
	25,0	67,18	ΔΑ	2,19	21,46	ΔΑ	ΔΑ	0,56	46,65
	23,0	49,23	ΔΑ	3,56	10,70	2,23	0,23	1,19	37,47
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	8,29	0,34	0,59	1,40	0,54	ΔΑ	0,00	2,47
	16,0	7,58	ΔΑ	1,95	5,72	0,80	ΔΑ	0,46	29,02
Μ.Ο.		29,69	0,59	2,77	10,28	2,43	0,23	0,62	25,44

ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 15-Β Συγκέντρωση φλοίων σε υδρολυμένα φαινολικά οξέα

ΦΛΟΙΟΙ (mg/100g)	% Ποσοστό σ	γαλλικό οξύ	ευργγικό οξύ	π-κουμαρικό	προτοκατεχικό	βανιλικό οξύ	καφεϊκό οξύ	φερουλικό οξύ	άγνωστο
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	12,0	1,08	16,18	14,31	7,60	2,31	0,70	1,67	5,20
	15,0	2,25	21,27	22,28	20,87	5,55	1,29	3,37	44,33
	16,0	25,00	37,87	46,46	10,10	2,20	6,72	0,46	5,88
	19,0	0,14	79,36	41,98	0,53	5,34	ΔΑ	1,61	16,73
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	20	23,99	75,42	32,73	43,23	12,31	4,10	0,69	24,58
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	20	8,52	68,30	23,25	ΔΑ	16,83	ΔΑ	1,38	ΔΑ
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	21	8,35	6,66	6,79	ΔΑ	0,72	2,70	0,50	ΔΑ
Ρωμέικο Αμπελώνας Γεωπονικής 2004	22	3,65	28,90	18,50	2,84	4,55	ΔΑ	1,56	20,50
Αγιαννιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	17,0	0,05	60,90	10,52	0,63	15,76	ΔΑ	0,79	2,14
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	23,0	7,83	3,12	0,64	ΔΑ	56,89	45,27	6,12	3,06
Ξινόμαυρο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	21	24,41	34,28	27,33	2,46	0,00	8,67	1,19	5,62
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	17	6,86	98,51	63,04	0,00	0,00	4,83	0,99	11,40
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	18	1,01	44,31	21,81	12,18	2,95	ΔΑ	1,55	14,30
Μ.Ο.		8,70	44,24	25,36	10,04	9,65	9,28	1,68	13,98
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
Αηδάνι Σαντορίνη 2004	21,0	0,56	ΔΑ	12,43	1,17	3,55	ΔΑ	6,33	18,76
	25,0	1,90	0,23	18,28	10,80	1,46	0,17	4,32	40,96
	23,0	0,65	0,42	9,22	13,46	ΔΑ	ΔΑ	1,01	24,59
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	11,0	15,12	ΔΑ	7,24	61,75	ΔΑ	ΔΑ	1,72	41,12
	16,0	12,04	2,00	11,12	37,08	ΔΑ	6,88	6,33	43,98
Μοσχοφύλλο Αρκαδία 2004	19	0,82	4,11	10,03	6,23	0,78	ΔΑ	1,70	18,26
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	9	1,34	ΔΑ	26,20	32,20	1,18	ΔΑ	4,28	73,10
Μ.Ο.		4,63	1,69	13,50	23,24	1,74	3,52	3,67	37,25

ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Πίνακας 1-Γ Πολυφαινολικό περιεχόμενο στεμφύλων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΣΤΕΜΦΥΛΑ (mg/Kg)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	φλαβανόλη-1	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφφαρικό οξύ	trans- ρεβερατρούλη	ε-βιτοφερίνη	3-D-γαλακτοσιδής κερκετίνης	3-β-D-γλοκοσιδής κερκετίνης	3-ραμνοσιδής κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συγγλυκό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																					
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	70,5	184,0	81,2	24,8	44,2	34,0	16,1	7,2	**ΔΑ	23,8	74,3	23,6	37,5	11,0	34,2	3,5	ΔΑ	5,4	1,4	0,3	1528,3
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	190,0	129,8	121,4	50,2	44,9	42,7	110,8	13,6	89,1	27,8	105,1	64,5	36,5	24,8	45,4	0,8	5,3	57,9	6,6	0,9	2877,9
Μανδηλαριά Λιαστά Σαντορίνη 2003	168,4	107,0	51,2	21,0	3,2	ΔΑ	107,1	ΔΑ	3,3	42,2	109,6	31,9	25,6	18,5	28,7	0,6	5,5	13,3	4,9	1,2	1408,8
Μανδηλαριά Λιαστά Σαντορίνη 2004	147,4	177,7	68,3	44,5	74,2	21,6	ΔΑ	15,5	42,0	39,9	99,3	126,6	75,9	35,2	34,9	5,2	12,6	32,8	ΔΑ	ΔΑ	2302,3
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	13,8	149,2	77,5	21,4	21,9	16,4	ΔΑ	8,8	ΔΑ	5,7	21,5	0,4	6,1	4,7	11,5	1,2	ΔΑ	0,6	0,7	0,5	1452,0
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	192,1	103,0	141,3	38,7	73,6	28,1	ΔΑ	13,8	1,1	2,3	18,8	37,2	25,2	8,2	36,0	14,4	ΔΑ	8,9	ΔΑ	ΔΑ	2541,1
Βινσάντο Σαντορίνη 2003	150,1	230,9	74,5	45,2	33,7	ΔΑ	45,8	ΔΑ	2,1	4,6	26,8	25,4	30,4	12,4	38,2	0,1	2,4	3,0	4,5	1,0	1612,5
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	137,3	77,7	67,4	18,5	49,2	25,9	ΔΑ	9,9	10,4	4,7	26,6	103,0	76,7	22,2	55,7	16,7	11,5	28,6	2,8	ΔΑ	1516,8
Λιάτικο Σητεία 2003	78,6	279,8	264,2	35,1	115,0	72,0	ΔΑ	3,9	15,7	51,3	74,0	75,7	26,2	40,3	12,8	1,3	8,0	2,5	1,7	ΔΑ	1669,3
Μ.Ο.	134,7	156,9	108,2	34,3	52,0	34,5	87,9	10,9	23,4	22,3	60,2	58,1	37,8	20,8	32,9	5,0	7,5	18,4	3,5	0,9	1922,6
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																					
Λευκές ποικιλίες Σαντορίνη 2003	103,0	73,3	22,1	36,3	2,7	ΔΑ	212,6	ΔΑ	7,8	1,0	51,8	204,6	57,5	18,3	68,5	9,0	0,8	1,3	1,0	0,2	2374,7
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	238,5	509,0	234,3	56,0	229,0	ΔΑ	131,1	ΔΑ	4,8	3,2	15,1	45,6	99,7	40,4	37,8	5,8	2,4	2,7	2,8	0,9	2798,1
	172,5	1689,2	598,3	159,3	384,1	0,0	ΔΑ	46,9	ΔΑ	5,3	13,2	24,9	116,6	53,5	76,0	8,7	0,8	2,6	4,0	0,6	7444,5
Ασύρτικο Ρόδος 2003	164,9	390,2	198,1	39,9	214,6	77,5	ΔΑ	32,4	ΔΑ	6,2	21,9	131,0	88,5	63,3	37,3	8,1	ΔΑ	1,1	0,6	2,0	2052,7
Μ.Ο.	169,8	665,4	263,2	72,9	207,6	38,7	171,8	39,6	6,3	3,9	25,5	101,5	90,6	43,9	54,9	7,9	1,4	1,9	2,1	1,0	3667,5

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 3-Γ Πολυφαινολικό περιεχόμενο γλευκολασίας

ΓΛΕΥΚΟΛΑΣΙΕΣ mg/Kg βάρους επί ξηρού	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	trans- ρεβερατρούλη	3-D- γαλακτοσιδής κερκετίνης	3-β-D- γλοκοσιδής κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συγγλυκό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	φλαβανόλη-1	προτοκατεχλικό οξύ	βανιλλικό οξύ	*ολικές πολυφαινόλες
Γλευκολασία Σαντορίνη από φίλτροπρέσα	12,2	2,0	**ΔΑ	0,9	0,6	42,7	4,4	4,0	1,2	0,4	0,3	8,0	1,4	2,9	111,0
Γλευκολασία Σαντορίνη από φίλτραρισμα	2,1	ΔΑ	ΔΑ	0,3	0,1	13,6	2,9	0,6	0,4	ΔΑ	0,6	ΔΑ	0,9	ΔΑ	65,1

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 2-Γ Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων στεμφύλων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΣΤΕΜΦΥΛΑ (mg/g εκχυλ.)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	φλαβανόλη-1	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφφαρικό οξύ	trans- ρεβερατρούλη	ε-βιοφερίνη	β-D-γαλακτοσιδής κερκετίνης	β-β-D-γλοκοσιδής κερκετίνης	β-ραμνοσιδής κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συργγικό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																					
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	5,71	14,91	3,34	2,01	3,58	2,76	1,30	0,58	**ΔΑ	1,93	6,02	1,91	3,03	0,89	2,77	0,29	ΔΑ	0,44	0,12	0,03	107,12
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	13,64	9,32	8,72	3,61	3,22	1,65	7,96	0,53	6,40	2,00	7,55	4,63	2,62	1,78	3,26	0,06	0,38	4,16	0,47	0,06	207,79
Μανδηλαριά Λιαστά Σαντορίνη 2003	26,64	16,92	8,10	3,32	ΔΑ	ΔΑ	16,95	ΔΑ	0,52	6,67	17,34	5,05	4,06	2,92	4,54	0,09	0,88	2,10	0,77	0,20	222,91
Μανδηλαριά Λιαστά Σαντορίνη 2004	5,56	13,42	5,16	3,36	5,60	1,63	ΔΑ	1,17	1,58	1,51	3,75	4,78	2,87	1,33	1,32	0,19	0,47	1,24	ΔΑ	ΔΑ	369,09
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	0,43	28,32	8,81	2,43	ΔΑ	1,87	ΔΑ	1,00	ΔΑ	0,65	2,45	0,05	0,69	0,54	1,31	0,14	ΔΑ	0,06	0,08	0,06	165,00
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	20,44	10,96	15,04	4,12	7,83	2,99	ΔΑ	1,47	0,12	0,24	2,00	3,96	2,68	0,87	3,83	1,53	ΔΑ	0,95	ΔΑ	ΔΑ	376,71
Βινσάντο Σαντορίνη 2003	16,14	24,83	8,01	4,86	3,62	ΔΑ	4,93	ΔΑ	0,23	0,49	2,88	2,73	3,26	1,33	4,10	0,01	0,26	0,32	0,48	0,10	173,38
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	8,58	4,85	4,21	1,16	1,26	3,08	ΔΑ	1,62	0,62	0,65	0,30	1,66	6,44	4,80	1,39	3,48	1,05	0,72	1,78	0,50	379,20
Λιάτικο Σητεία 2003	15,72	75,96	72,84	7,03	22,99	14,40	ΔΑ	0,78	3,14	16,26	14,80	15,13	5,23	8,06	2,56	0,27	1,60	0,50	0,34	ΔΑ	333,87
Μ.Ο.	12,54	22,17	14,91	3,54	6,87	4,05	7,78	1,02	1,80	3,38	6,34	4,43	3,43	2,50	2,79	0,67	0,77	1,16	0,58	0,16	259,45
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																					
Λευκές ποικιλίες Σαντορίνη 2003	11,87	8,44	2,54	4,19	0,31	ΔΑ	24,49	ΔΑ	0,90	0,11	5,97	23,57	6,63	2,11	7,89	1,04	0,09	0,15	0,12	0,03	273,6
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	22,21	47,40	12,50	5,22	21,32	ΔΑ	12,21	ΔΑ	0,44	0,29	1,41	4,25	4,63	1,90	3,52	0,54	0,23	0,25	0,26	0,09	167,4
Ασύρτικο Ρόδος 2003	10,78	105,57	37,39	9,96	24,01	0,00	ΔΑ	2,93	ΔΑ	0,33	0,83	1,56	7,29	3,34	4,75	0,54	0,05	0,17	0,25	ΔΑ	465,3
Ασύρτικο Ρόδος 2003	13,52	31,98	40,82	3,27	25,79	6,35	ΔΑ	10,85	ΔΑ	0,51	1,79	10,74	15,45	5,19	3,06	0,67	ΔΑ	0,09	0,05	0,17	414,2
Μ.Ο.	14,59	48,35	23,32	5,66	17,86	3,18	18,35	6,89	0,67	0,31	2,50	10,03	8,50	3,13	4,80	0,70	0,12	0,16	0,17	0,09	330,1

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 4-Γ Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων γλευκολασίας

ΓΛΕΥΚΟΛΑΣΙΕΣ mg/g εκχυλ.	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	trans- ρεβερατρούλη	3-D- γαλακτοσιδής κερκετίνης	3-β-D- γλοκοσιδής κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συργγικό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	φλαβανόλη-1	προτοκατεχλικό οξύ	βανυλικό οξύ	*ολικές πολυφαινόλες
Γλευκολασία Σαντορίνη από φίλτροπρέσα	9,8	1,6	**ΔΑ	0,7	0,5	34,2	3,5	3,2	1,0	0,3	0,3	6,4	1,1	2,3	93,7
Γλευκολασία Σαντορίνη από φίλτραρισμα	1,8	ΔΑ	ΔΑ	0,2	0,1	11,9	2,5	0,5	0,4	ΔΑ	0,5	ΔΑ	0,8	ΔΑ	54,9

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους, **ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5-Γ Πολυφαινολικό περιεχόμενο βοστρύχων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ (mg/Kg)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφαρικό οξύ	trans- ραβεβαρρόλη	ε-βουφερίνη	β-D- γλαυκτασίδης κερκετίνης	β-β-D- γλαυκτασίδης κερκετίνης	β-ραμνοσίδης κερκετίνης	κερκετίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συγγιγικό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φερουλικό οξύ	*ολικές πολυφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	777,6	1226,8	81,4	488,0	96,6	**ΔΑ	59,0	91,4	236,8	378,1	153,8	38,7	6,3	63,7	5,9	6,4	8,6	0,7	0,8	9086,4
Λιασσα Μανδηλαρίας Σαντορίνη 2003	193,9	1295,7	6,5	476,4	ΔΑ	60,3	117,4	24,5	265,1	474,5	100,1	69,6	7,0	9,1	3,0	ΔΑ	1,0	1,2	0,5	10253,8
Λιασσα Βινσάντο Σαντορίνη 2003	70,4	1691,1	94,6	992,8	46,4	224,6	71,3	41,1	76,2	181,6	243,3	130,0	4,2	10,3	0,7	ΔΑ	ΔΑ	1,5	0,6	14343,2
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	181,8	1077,4	79,8	887,3	307,7	ΔΑ	130,2	166,1	87,8	258,3	222,9	86,5	27,5	2,0	0,7	9,2	10,2	4,0	1,5	10110,8
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	111,6	888,1	69,8	281,9	45,1	ΔΑ	35,9	31,3	64,9	212,0	147,9	78,2	8,5	12,8	2,3	0,7	0,2	1,0	ΔΑ	4933,9
	68,2	1065,2	59,0	204,8	43,5	ΔΑ	90,0	125,4	128,1	258,8	150,8	61,9	8,3	6,1	1,3	0,5	0,4	1,3	ΔΑ	5223,3
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	195,3	794,5	189,4	349,3	ΔΑ	ΔΑ	95,3	273,8	92,9	217,4	205,0	65,6	15,3	13,7	ΔΑ	8,6	2,4	2,0	ΔΑ	8401,6
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	278,3	711,7	ΔΑ	138,2	ΔΑ	32,8	64,9	53,9	173,7	414,4	126,2	61,4	23,8	19,6	2,3	0,5	0,0	0,7	ΔΑ	3100,0
Μ.Ο.	234,6	1093,8	82,9	477,3	107,9	105,9	83,0	100,9	140,7	299,4	168,8	74,0	12,6	17,2	2,3	4,3	3,3	1,5	0,9	8181,6
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Αθήρι Σαντορίνη 2003	170,6	699,1	51,6	383,3	48,8	ΔΑ	77,0	7,6	74,0	167,3	87,2	57,7	17,3	9,4	0,5	1,4	3,5	0,9	1,1	10725,9
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	468,8	1089,4	18,2	453,6	36,2	113,7	59,1	69,6	87,6	223,1	193,4	65,1	4,6	31,0	1,3	ΔΑ	1,8	1,1	ΔΑ	6480,7
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	47,2	1831,5	27,9	798,5	66,1	144,4	86,5	57,2	136,5	227,1	241,7	137,1	18,8	5,0	ΔΑ	0,4	ΔΑ	1,2	ΔΑ	15271,4
	43,6	1884,7	ΔΑ	494,6	163,9	143,0	85,5	234,9	219,0	278,6	368,5	137,3	29,4	6,1	0,8	ΔΑ	ΔΑ	0,2	ΔΑ	7020,8
Βηλάνα Σητεία 2003	121,5	384,7	ΔΑ	161,0	55,2	24,5	53,9	5,1	96,0	414,9	141,8	50,9	15,8	7,7	1,4	0,5	0,4	0,6	ΔΑ	3998,8
Αθήρι Σαντορίνη 2004	104,8	737,4	58,0	215,2	36,0	ΔΑ	34,2	135,6	124,0	174,3	196,9	71,5	19,3	7,3	1,0	0,1	ΔΑ	0,1	ΔΑ	7219,8
Μ.Ο.	159,4	1104,5	38,9	417,7	67,7	106,4	66,0	85,0	122,9	247,5	204,9	86,6	17,5	11,1	1,0	0,6	1,9	0,7	1,1	8452,9

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους

** ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

Πίνακας 6-Γ Πολυφαινόλικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων βοστρύχων ερυθρών και λευκών ποικιλιών

ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ (mg/g εκχυλ.)	γαλλικό οξύ	(+)κατεχίνη	(-)επικατεχίνη	προκουανιδίνη Β1	προκουανιδίνη Β2	προκουανιδίνη Β3	γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	trans-καφαραικό οξύ	trans- ραβερατρούλη	ε-βουφορίνη	β-D- γαλακτοσίδης κερακτίνης	β-β-D- γαλακτοσίδης κερακτίνης	β-ραμνοσίδης κερακτίνης	κερακτίνη	καμφορόλη	καφεϊκό οξύ	συγγυλικό οξύ	π-κουμαρικό οξύ	φαιρολικό οξύ	*ολικές πολύφαινόλες
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	41,44	65,39	4,34	26,01	5,15	**ΔΑ	3,14	4,87	12,62	20,15	8,20	2,06	0,34	3,40	0,32	0,34	0,46	0,04	0,04	484,3
Λιασσα Βινσάντο Σαντορίνη 2003	2,66	64,06	3,58	37,61	1,76	8,51	2,70	1,56	2,89	6,88	9,22	4,92	0,16	0,39	0,03	ΔΑ	ΔΑ	0,06	0,02	543,3
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	10,55	62,49	4,63	51,47	17,85	0,00	7,55	9,63	5,09	14,98	12,93	5,02	1,60	0,00	0,04	0,53	0,59	0,23	0,09	587,2
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	8,33	66,28	5,21	21,04	3,36	0,00	2,68	2,33	4,85	15,82	11,04	5,84	0,63	0,96	0,17	0,05	0,01	0,07	ΔΑ	584,5
	6,46	100,96	5,59	19,41	4,13	0,00	8,53	11,89	12,14	24,53	14,30	5,87	0,79	0,58	0,12	0,05	0,03	0,12	ΔΑ	464,3
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	11,49	46,74	11,14	20,54	0,00	0,00	5,61	16,11	5,47	12,79	12,06	3,86	0,90	0,80	0,00	0,51	0,14	0,12	ΔΑ	494,2
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	32,96	84,28	0,00	16,36	0,00	3,89	7,68	6,38	20,56	49,08	14,95	7,27	2,82	2,32	0,28	0,06	ΔΑ	0,08	ΔΑ	367,1
Λιασσα Μανδηλαρίας Σαντορίνη 2004	12,84	85,81	0,43	31,55	0,00	4,00	7,78	1,62	17,56	31,42	6,63	4,61	0,46	0,60	0,20	ΔΑ	0,07	0,08	0,03	536,8
Μ.Ο.	16,27	70,03	4,93	27,49	4,61	2,07	5,41	7,54	9,09	20,60	11,81	4,98	1,03	1,21	0,14	0,26	0,25	0,10	0,05	503,55
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																				
Αθήρι Σαντορίνη 2003	8,90	36,49	2,69	20,01	2,55	0,00	4,02	0,40	3,86	8,73	4,55	3,01	0,90	0,49	0,03	0,07	0,18	0,04	0,06	559,2
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	32,65	75,87	1,27	31,59	2,52	7,92	4,12	4,84	6,10	15,54	13,47	4,53	0,32	2,16	0,09	0,00	0,13	0,08	ΔΑ	451,3
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	1,78	68,85	0,00	30,02	2,48	5,43	3,25	2,15	5,13	8,54	9,09	5,15	0,71	0,19	ΔΑ	0,01	ΔΑ	0,04	ΔΑ	574,1
	2,27	98,29	0,00	25,79	8,55	7,46	4,46	12,25	11,42	14,53	19,22	7,16	1,53	0,32	0,04	0,00	ΔΑ	0,01	ΔΑ	367,1
Βηλόνα Σητεία 2003	14,67	46,46	0,00	19,45	6,66	2,96	6,51	0,61	11,60	50,10	17,12	6,15	1,91	0,93	0,17	0,05	0,05	0,07	ΔΑ	454,4
Αθήρι Σαντορίνη 2004	7,25	51,05	4,02	14,90	2,49	0,00	2,37	9,39	8,59	12,07	13,63	4,95	1,34	0,50	0,07	0,01	ΔΑ	0,01	ΔΑ	464,1
Μ.Ο.	11,25	62,84	1,33	23,63	4,21	3,96	4,12	4,94	7,78	18,25	12,85	5,16	1,12	0,77	0,08	0,02	0,12	0,04	0,06	478,38

*mg γαλλικού οξέος /Kg ξηρού βάρους

**ΔΑ= Δεν Ανιχνεύθηκε

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

Πίνακας 1-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	FRAP TIMH* μM FeSO4	DPPH IC50 % οίνος v/v
ΕΡΥΘΡΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 πριν τη διαύγαση	2599,4 ± 10,5	6074,2 ± 38,7	0,31 ± 0,06
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 μετά τη διαύγαση	2207,8 ± 37,1	5440,0 ± 98,22	0,58 ± 0,00
Μανδηλάρι Ρόδος 2005 κατά την εμφιάλωση	1843,5 ± 4,2	4351,9 ± 38,77	1,20 ± 0,21
Μανδηλαρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2004	2460,0 ± 16,3	5678,3 ± 19,08	0,81 ± 0,12
	2335,7 ± 28,0	5688,5 ± 54,28	0,66 ± 0,03
	2420,6 ± 67,7	5666,9 ± 68,89	0,90 ± 0,07
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	2896,5 ± 41,5	6800,0 ± 114,4	1,05 ± 0,07
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	2711,8 ± 60,0	6532,9 ± 34,26	0,76 ± 0,06
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	2579,0 ± 61,0	6838,7 ± 47,45	0,22 ± 0,01
Μανδηλαρια Σαντορίνη 2002	4084,6 ± 82,9	10240,0 ± 19,07	0,31 ± 0,05
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	2956,1 ± 22,3	6935,4 ± 117,9	0,56 ± 0,05
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	3667,1 ± 32,4	8909,7 ± 89,93	0,17 ± 0,01
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	1025,7 ± 28,3	2059,6 ± 32,22	2,37 ± 0,00
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	2082,4 ± 11,4	5392,2 ± 37,47	0,64 ± 0,07
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2005	3052,2 ± 32,9	7900,0 ± 112,9	0,19 ± 0,03
Αγιοργίτικο Αρκαδία 2004	2838,50 ± 20,2	7347,00 ± 55,73	0,40 ± 0,00
Syrah Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	1784,5 ± 29,4	4237,6 ± 1,08	0,48 ± 0,09
Syrah Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	1838,1 ± 21,8	4190,8 ± 67,96	0,61 ± 0,06
Merlot Κτήμα Κυρ Γιάννης 2003	2666,0 ± 56,9	6156,2 ± 102,7	0,30 ± 0,01
Ξινόμαυρο υπερώριμο Κτήμα Κυρ Γιάννης 200	2773,9 ± 15,1	6121,1 ± 20,5	0,28 ± 0,04
Λιάτικο Σητεία 2004	1045,0 ± 28,6	2864,1 ± 51,5	3,50 ± 0,61
Μοσχάτο Αμβούργου Τυρναβος 2004	491,4 ± 10,7	751,5 ± 2,1	9,00 ± 1,41
Μοσχάτο Αμβούργου Τυρναβος 2005	684,9 ± 11,3	1535,3 ± 3,26	3,96 ± 0,26
Θήβα ερυθρό 2002	907,3 ± 18,3	2198,5 ± 43,57	4,19 ± 0,43
Grenache Ρόδος 2002	1311,4 ± 25,8	2875,1 ± 56,2	1,20 ± 0,12
Αμόντας Φλώρινα 2003	3434,5 ± 78,3	8500,0 ± 129,3	0,27 ± 0,05
ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ			
Αθήρι Ρόδος πριν τη διαύγαση 2005	322,0 ± 1,6	590,0 ± 2,53	15,70 ± 1,76
Αθήρι Ρόδος μετά τη διαύγαση 2005	299,0 ± 3,6	517,7 ± 2,04	16,17 ± 1,96
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2005	166,1 ± 0,9	306,0 ± 3,56	29,60 ± 4,93
Αθήρι Ρόδος πριν διαυγαση 2004	307,6 ± 5,1	573,0 ± 4,03	22,45 ± 0,24
	290,3 ± 3,4	564,8 ± 4,16	22,48 ± 3,82
Αθηρι Ρόδος μετα τη διαυγαση 2004	198,4 ± 4	354,0 ± 1,14	27,20 ± 3,60
	202,6 ± 0,1	311,0 ± 6,11	26,70 ± 2,15
	195,3 ± 3,6	335,0 ± 1,61	27,40 ± 2,08
Αθήρι Ρόδος εμφιαλωμένο 2004	208,5 ± 3,9	409,4 ± 2,56	27,81 ± 1,94
Αθήρι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2003	339,7 ± 7,9	623,0 ± 7,2	17,00 ± 0,63
Αθηρι Σαντορίνη μετά διαύγαση 2004	355,0 ± 3,1	637,5 ± 11,31	16,20 ± 0,97
Αθήρι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	405,1 ± 3,4	746,2 ± 9,38	13,13 ± 1,79
Ροδίτης Ρόδος μετά τη διαύγαση 2004	167,8 ± 1,9	240,0 ± 3,98	32,60 ± 1,67
Ασυρτικο Σαντορίνη 2002	484,6 ± 8,8	857,0 ± 11,12	5,81 ± 0,53

Πίνακας 1-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ	F-C mg/L οίνου	FRAP TIMH* μM FeSO4	DPPH IC50 % οίνος v/v
Ασυρτικό Σαντορίνη 2003	455,9 ± 2,1	834,0 ± 14,61	7,20 ± 0,22
Ασυρτικό Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2004	469,4 ± 13	807,0 ± 0,79	7,90 ± 0,81
Ασυρτικό Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	430,0 ± 6,2	766,8 ± 7,59	10,20 ± 1,49
Ασυρτικό Σαντορίνη πριν τη διαύγαση 2005	495,02 ± 12	887,0 ± 12,71	6,50 ± 0,13
Ασυρτικό Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	515,6 ± 4,9	939,0 ± 13,92	6,14 ± 0,53
Ασυρτικό Σητεία μετά τη διαύγαση 2004	329,4 ± 8	637,9 ± 0,33	18,70 ± 0,98
Αηδάνι Σαντορίνη μετά τη διαύγαση 2004	436,3 ± 12	807,0 ± 9,81	10,40 ± 1,08
Αηδάνι Σαντορίνη εμφιαλωμένο 2005	423,9 ± 12	783,3 ± 4,77	13,56 ± 0,57
Βηλάνα Σητεία 2003	329,8 ± 9,9	547,0 ± 5,98	16,23 ± 1,17
Τορναβος Ροδίτης 2004	291,7 ± 7,9	477,8 ± 3,1	20,20 ± 2,80
Ροδίτης Τορνάβου 2005	270,0 ± 6,6	465,6 ± 2	24,48 ± 2,39
Μπαντικι Τορνάβου 2005	151,5 ± 1	205,0 ± 0,37	32,60 ± 6,50
Αιγαιοπελαγίτικος οίνος Σάμος 2003	234,1 ± 3,4	342,6 ± 6,26	19,08 ± 0,25
Δορισσα Λευκό Σαμος	168,6 ± 2,8	275,5 ± 2,57	27,60 ± 0,10
Golden Samena Σάμος 2003	237,5 ± 0,7	362,1 ± 7,16	21,52 ± 0,44
Αθήρι Ρόδος 2003	273,0 ± 3,2	387,7 ± 6,07	18,00 ± 2,33
Μοσχάτο Ρόδος 2002	224,0 ± 0,9	306,0 ± 1,6	22,00 ± 4,09
ΓΑΥΚΕΙΣ ΟΙΝΟΙ			
Βινσάντο 2004 Ερυθρό	2760,0 ± 7,5	5981,9 ± 30,86	0,60 ± 0,02
Βινσάντο Λευκό 2004 Σαντορίνη	2033,8 ± 23	4193,7 ± 24,19	0,50 ± 0,08
Αρκαδία Μελιαστό 2004	300,4 ± 1,9	462,4 ± 0,43	15,78 ± 1,33
Μαντινεία από Μοσχοφίλερο 2004	216,9 ± 0,5	453,4 ± 8,12	19,36 ± 3,34
Vin Doux Σάμος 2001	610,6 ± 16	1022,5 ± 9,71	3,57 ± 0,18
Vin Doux Σάμος 2002	606,3 ± 10	989,8 ± 13,67	3,74 ± 0,12
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ			
Στέμφυλα πριν την απόσταξη με στέμφυλα Τορναβος 2004	1030,5 ± 10,5	2144,0 ± 21,42	1,94 ± 0,23
Στέμφυλα μετά την απόσταξη με στέμφυλα Τορναβος 2004	1219,7 ± 32,0	2630,0 ± 15,55	0,79 ± 0,10
Μούστος Μοσχ Αμβουργου 2005	245,0 ± 7,0	593,9 ± 10,83	18,90 ± 2,98

* Αναγωγική ικανότητα οίνου

Πίνακας 2-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων ραγών προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	F-C mg/g εκχυλ.	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Βοηδοματο Σαντορίνη 2003	176,71 \pm 2,01	79,32 \pm 0,22	25,21 \pm 0,56
	199,80 \pm 2,56	72,56 \pm 0,38	33,74 \pm 0,14
	162,06 \pm 4,17	47,07 \pm 0,42	36,76 \pm 0,70
Μανδηλαρι Σαντορίνη 2003	354,31 \pm 1,25	83,35 \pm 2,28	27,04 \pm 0,24
	330,19 \pm 5,29	82,78 \pm 1,14	25,26 \pm 0,71
	78,00 \pm 0,59	49,88 \pm 0,85	22,85 \pm 0,18
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2003	145,93 \pm 2,88	57,37 \pm 1,21	21,96 \pm 0,44
	190,33 \pm 0,76	55,86 \pm 1,67	31,66 \pm 0,67
Κοτσιφαλι Ηράκλειο 2003	123,88 \pm 1,27	52,99 \pm 0,11	34,63 \pm 0,57
	180,71 \pm 4,76	63,53 \pm 0,19	23,38 \pm 0,23
Μανδηλαρι Ρόδος 2003	352,54 \pm 5,50	79,18 \pm 2,25	13,90 \pm 0,19
Μαυροδαφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	102,12 \pm 0,85	57,50 \pm 0,03	30,64 \pm 0,64
Λημνιο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	124,62 \pm 0,91	45,39 \pm 0,21	25,00 \pm 0,29
Δ/35 Κατερινα Κοκκινο	244,05 \pm 2,54	54,91 \pm 0,14	19,93 \pm 0,47
Ασυρτικο Σαντορίνη 2003	234,43 \pm 1,95	64,32 \pm 1,05	46,69 \pm 0,70
	230,73 \pm 2,45	81,67 \pm 1,43	34,18 \pm 0,86
Αθηρι Σαντορίνη 2003	202,61 \pm 1,49	63,67 \pm 1,60	40,77 \pm 0,68
	122,40 \pm 1,17	51,50 \pm 0,94	39,41 \pm 0,10
Αηδανι Σαντορίνη 2003	325,60 \pm 5,43	70,99 \pm 1,27	25,64 \pm 0,51
	315,68 \pm 4,06	63,02 \pm 1,76	25,98 \pm 0,46
	113,96 \pm 0,53	79,83 \pm 1,49	19,07 \pm 0,55
Μ.Ο.	205,27	64,60	28,75

*Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

Πίνακας 3-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων ραγών προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	F-C (mg/g εκχυλ.)	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	467,4 \pm 8,4	110,0 \pm 0,64	11,5 \pm 0,19
	543,5 \pm 9,8	118,3 \pm 1,20	9,4 \pm 0,25
	488,8 \pm 12,7	112,9 \pm 2,57	10,4 \pm 0,26
	418,53 \pm 3,0	108,04 \pm 1,10	10,9 \pm 0,13
	404,8 \pm 1,1	72,5 \pm 0,36	12,6 \pm 0,33
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	339,0 \pm 5,2	78,2 \pm 1,17	15,6 \pm 0,28
	422,77 \pm 16,6	99,13 \pm 0,81	12,3 \pm 0,31
	411,2 \pm 2,5	86,7 \pm 0,31	17,6 \pm 0,76
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	357,6 \pm 6,8	85,7 \pm 2,34	15,1 \pm 0,55
	530,93 \pm 1,4	111,06 \pm 0,21	10,0 \pm 0,24
	301,0 \pm 3,6	52,2 \pm 0,74	20,2 \pm 0,84
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	300,6 \pm 8,7	86,8 \pm 1,43	11,2 \pm 0,25
	257,4 \pm 1,3	75,8 \pm 0,61	17,2 \pm 0,77
	334,9 \pm 6,0	87,7 \pm 2,17	19,5 \pm 1,31
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	290,5 \pm 4,2	65,2 \pm 0,74	26,3 \pm 0,73
	472,43 \pm 3,8	108,33 \pm 2,73	9,4 \pm 0,03
	387,3 \pm 6,3	90,4 \pm 1,04	16,0 \pm 0,47
	365,25 \pm 8,8	81,21 \pm 1,94	14,4 \pm 0,33
Βοηδοματο Σαντορίνη 2005	226,4 \pm 5,0	68,2 \pm 0,48	23,9 \pm 0,62
	337,6 \pm 5,6	81,6 \pm 1,10	17,7 \pm 0,89
	317,87 \pm 5,1	69,8 \pm 1,59	19,6 \pm 0,10
Μανδηλάρι Ηράκλειο 2004	71,29 \pm 0,8	417,18 \pm 0,11	13,73 \pm 0,65
Κοτσιφάλι Ηράκλειο 2004	271,9 \pm 5,4	55,00 \pm 1,33	17,87 \pm 0,15
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	388,68 \pm 7,5	101,73 \pm 3,72	12,7 \pm 0,63
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	334,3 \pm 3,7	67,00 \pm 1,91	17,48 \pm 0,83
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	442,8 \pm 3,2	98,45 \pm 0,63	10,6 \pm 0,75
Αγιωργίτικο Αρκαδία	98,45 \pm 1,2	342,8 \pm 0,09	10,61 \pm 0,64
Αγιανιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	277,9 \pm 4,7	53,21 \pm 0,06	11,28 \pm 0,60
Αυγουσιιάτης Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	120,2 \pm 1,3	24,59 \pm 0,31	33,423 \pm 1,94
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	102,5 \pm 1,4	26,26 \pm 2,17	52,06 \pm 1,77
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	44,33 \pm 0,1	202,06 \pm 0,66	28,39 \pm 1,93
Βερτζαμί Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	192,9 \pm 1,9	38,91 \pm 0,10	24,534 \pm 1,69
Βερτζαμί Αμπελώνας ΓΠΑ 2005	266,4 \pm 3,0	60,00 \pm 1,21	26,15 \pm 0,23
Λημνίωνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	150,7 \pm 2,6	48,73 \pm 0,16	18,78 \pm 0,61
Μ.Ο.	315,82	99,58	17,60
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	492,7 \pm 15,6	108,85 \pm 6,00	13,0 \pm 0,58
	398,8 \pm 10,4	93,4 \pm 3,06	14,9 \pm 0,5
Ασύρτικο Σαντορίνη 2005	455,9 \pm 14,8	99,7 \pm 0,66	10,5 \pm 0,3
	389,0 \pm 11,9	91,0 \pm 2,94	10,2 \pm 0,4
	324,9 \pm 14,9	78,1 \pm 1,80	16,4 \pm 0,0
Αηδανι Σαντορίνη 2004	381,38 \pm 4,5	89,00 \pm 1,64	12,4 \pm 1,1
	535,0 \pm 4,9	127,1 \pm 2,76	8,8 \pm 0,2
	322,16 \pm 6,3	90,32 \pm 0,84	10,6 \pm 1,0
Αηδανι Σαντορίνη 2005	173,3 \pm 7,0	38,0 \pm 1,11	34,8 \pm 1,7
	315,3 \pm 10,7	76,8 \pm 2,32	23,2 \pm 0,8
	376,9 \pm 14,0	90,0 \pm 0,67	13,1 \pm 0,8

Πίνακας 3-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσμάτων ραγών προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	F-C (mg/g εκχυλ.)	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Αθήρι Σαντορίνη 2004	336,1 \pm 7,3	75,9 \pm 2,95	17,2 \pm 1,0
	298,6 \pm 3,3	90,5 \pm 0,81	15,3 \pm 0,1
Αθήρι Σαντορίνη 2005	234,5 \pm 2,9	50,0 \pm 1,54	29,4 \pm 0,5
	157,5 \pm 2,5	40,9 \pm 0,30	32,5 \pm 1,0
	267,9 \pm 3,7	67,5 \pm 2,65	28,6 \pm 1,2
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	342,1 \pm 14,7	89,60 \pm 2,33	14,173 \pm 0,7
	356,0 \pm 13,3	84,01 \pm 3,08	12,252 \pm 0,7
	208,0 \pm 9,7	66,57 \pm 2,02	20,64 \pm 0,5
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	328,7 \pm 1,6	75,73 \pm 0,39	15,0 \pm 0,8
	455,8 \pm 16,5	92,9 \pm 2,34	12,05 \pm 0,8
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	216,0 \pm 7,7	74,03 \pm 2,69	11,86 \pm 0,0
	502,8 \pm 5,4	121,23 \pm 1,61	9,3 \pm 0,1
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	113,6 \pm 2,7	33,99 \pm 0,90	25,45 \pm 1,0
Merlot Αρκαδία 2004	201,5 \pm 5,4	56,11 \pm 1,03	23,00 \pm 1,0
M.O.	327,4	80,0	17,4

*Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

Πίνακας 4-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων γιγάρτων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	F-C (mg/g εκχυλ.)	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	516,0 \pm 10,9	112,83 \pm 1,38	12,11 \pm 0,72
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	619,48 \pm 3,7	144,07 \pm 3,40	10,22 \pm 0,63
	631,46 \pm 5,5	111,07 \pm 1,30	6,35 \pm 0,01
	628,00 \pm 12,5	129,00 \pm 0,98	6,7 \pm 0,19
	598,53 \pm 9,5	157,52 \pm 2,86	5,97 \pm 0,42
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	325,37 \pm 4,7	111,83 \pm 1,51	7,75 \pm 0,39
	620,04 \pm 5,1	132,2 \pm 2,66	8,07 \pm 0,12
	542,69 \pm 3,3	137,01 \pm 1,16	6,8 \pm 0,64
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	577,40 \pm 5,9	110,16 \pm 1,72	5,58 \pm 0,22
	561,48 \pm 11,0	102,61 \pm 0,22	5,98 \pm 0,08
	714,395 \pm 7,4	150,20 \pm 4,89	6,6 \pm 3,36
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	537,16 \pm 8,6	121,70 \pm 3,47	7,95 \pm 0,15
	494,50 \pm 6,7	110,7 \pm 2,08	9,81 \pm 0,56
	501,41 \pm 1,5	108,9 \pm 2,89	10,89 \pm 0,73
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	811,95 \pm 12,7	172,0 \pm 1,45	6,2 \pm 0,21
	575,89 \pm 4,0	154,79 \pm 2,33	4,82 \pm 0,64
	451,942 \pm 6,1	139,8 \pm 5,59	11,99 \pm 0,03
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	542,322 \pm 9,9	129,23 \pm 3,36	8,57 \pm 0,50
	672,64 \pm 16,4	120,00 \pm 1,62	7,11 \pm 0,49
	660,73 \pm 7,4	146,4 \pm 2,42	7,94 \pm 0,14
Μανδηλαριά 2004 Ηράκλειο	641,97 \pm 12,9	133,00 \pm 2,33	5,2 \pm 0,05
Αγιοργίτικο Νεμέα 2004	449,92 \pm 18,1	113,45 \pm 2,27	8,7 \pm 0,21
Αγιοργίτικο Αρκαδία 2004	456,1 \pm 2,6	119,1 \pm 2,47	20,39 \pm 1,82
	445,26 \pm 12,6	111,25 \pm 2,18	10,6 \pm 2,05
Ξινόμαυρο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	479,8 \pm 10,2	95,67 \pm 3,40	9,78 \pm 0,47
Λημνιό Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	650,0 \pm 12,3	144,00 \pm 2,31	7,13 \pm 0,3
Λημνιόνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	639,6 \pm 11,2	164,0 \pm 0,48	7,55 \pm 0,46
Αγιαννιώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	908,58 \pm 34,6	197,00 \pm 4,90	4,8 \pm 0,09
Μαυροδάφνη Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	545,1 \pm 7,3	107,19 \pm 1,40	10,818 \pm 0,28
Ρωμέικο Αμπελώνας 2003	598,6 \pm 3,9	105,93 \pm 5,06	6,837 \pm 0,1
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	568,1 \pm 14,9	110,32 \pm 3,22	10,527 \pm 0,03
Μ.Ο.	579,56	129,13	8,38
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	428,20 \pm 9,9	111,35 \pm 4,18	14,8 \pm 2,46
	715,99 \pm 20,1	137,6 \pm 0,89	9,22 \pm 0,82
	350,43 \pm 7,5	98,54 \pm 1,42	18,65 \pm 0,25
Αηδανι Σαντορίνη 2004	595,93 \pm 13,0	144,13 \pm 0,82	5,3 \pm 2,20
	537,055 \pm 3,4	135,1 \pm 1,56	17,03 \pm 0,34
	540,63 \pm 9,4	126,0 \pm 1,87	13,4 \pm 2,23
Αηδανι Σαντορίνη 2005	334,77 \pm 6,8	95,79 \pm 0,24	19,33 \pm 1,17
	547,81 \pm 4,1	137,5 \pm 4,13	7,68 \pm 0,49
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	628,1 \pm 15,3	155,7 \pm 0,05	11,06 \pm 0,16
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	621,6 \pm 17,6	155,0 \pm 0,69	9,46 \pm 0,62
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	593,2 \pm 14,5	129,8 \pm 6,03	13,11 \pm 0,60

Πίνακας 4-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων γιγάρτων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	F-C (mg/g εκχυλ)	FRAP ΤΙΜΗ* (μM FeSO4)	DPPH IC₅₀ (μg/ml)
Ροδίτης Τυρναβου 2004	662,2 ± 3,6	145,57 ± 4,76	6,03 ± 0,38
Ροδίτης Τυρναβου 2004	657,8 ± 18,8	112,00 ± 4,14	6,47 ± 0,11
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	526,5 ± 2,5	155,4 ± 3,12	8,44 ± 0,25
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	505,6 ± 12,3	138,6 ± 0,25	11,90 ± 0,16
Chardonnay Αρκαδία 2004	543,85 ± 7,4	139,68 ± 4,75	5,3 ± 0,73
Sauvignon Blanc Αρκαδία 2004	284,4 ± 0,7	88,04 ± 4,07	13,65 ± 0,18
Merlot Αρκαδία 2004	352,9 ± 2,1	82,54 ± 1,13	12,19 ± 0,73
Μ.Ο.	523,7	127,1	11,3

Αναγωγική Ικανότητα 100μg/ml εκχυλ.

Πίνακας 5-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων φλοιών προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΛΟΙΩΝ	F-C mg/g εκχυλ.	FRAP ΤΙΜΗ* ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	123,07 \pm 5,15	24,51 \pm 4,33	39,7 \pm 0,58
	134,00 \pm 2,27	27,09 \pm 1,73	41,43 \pm 1,75
	144,31 \pm 3,32	26,33 \pm 1,89	55,7 \pm 0,44
	110,00 \pm 1,64	16,15 \pm 0,36	97,85 \pm 2,96
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2005	128,90 \pm 2,71	29,65 \pm 1,90	81,56 \pm 4,95
	135,31 \pm 3,69	31,76 \pm 2,22	70,99 \pm 1,98
	204,21 \pm 0,60	40,07 \pm 1,05	23,59 \pm 0,98
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	90,00 \pm 1,47	15,72 \pm 1,05	114,39 \pm 3,54
	250,88 \pm 3,57	53,30 \pm 2,82	27,98 \pm 0,59
	222,21 \pm 8,47	48,39 \pm 0,14	22,3 \pm 0,27
Μαυροτραγανο Σαντορίνη 2005	157,10 \pm 3,91	31,47 \pm 0,85	37,97 \pm 1,24
	234,93 \pm 11,42	49,37 \pm 1,50	42,5 \pm 1,55
	204,21 \pm 10,10	40,07 \pm 1,49	30,9 \pm 2,94
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	43,00 \pm 5,83	9,30 \pm 2,40	177,5 \pm 2,00
	147,26 \pm 1,36	24,70 \pm 1,41	28,87 \pm 0,57
	111,00 \pm 1,14	19,50 \pm 0,26	64,77 \pm 1,47
Βοηδόματο Σαντορίνη 2005	130,04 \pm 2,38	30,47 \pm 1,04	48,93 \pm 0,23
	123,00 \pm 0,49	22,30 \pm 0,03	51,18 \pm 2,39
	136,53 \pm 0,99	26,88 \pm 0,81	54,42 \pm 1,82
Μανδηλάρι Ηράκλειο 2004	189,0 \pm 3,5	30,12 \pm 1,95	49,01 \pm 0,22
Αγιωργίτικο Νεμέα 2004	211,0 \pm 5,7	34,00 \pm 0,07	40,00 \pm 1,83
Αγιωργίτικο Αρκαδία 2004	189,9 \pm 1,2	29,98 \pm 1,36	45,03 \pm 1,04
Αγιαννώτικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	176,1 \pm 2,6	27,44 \pm 0,57	52,39 \pm 1,12
Ξινόμαυρο Αμπελώνα ΓΠΑ 2003	58,7 \pm 1,6	10,86 \pm 0,50	133,03 \pm 0,29
Λημνιόνα Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	188,0 \pm 4,0	30,00 \pm 0,90	35,00 \pm 0,59
Λημνιό Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	129,0 \pm 3,6	21,00 \pm 0,01	64,73 \pm 0,99
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2003	40,6 \pm 1,0	7,15 \pm 0,32	260,00 \pm 13,67
Ρωμέικο Αμπελώνας ΓΠΑ 2004	40,0 \pm 0,9	6,10 \pm 0,06	257,04 \pm 4,49
M.O.	144,73	27,27	73,17
ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	47,46 \pm 2,20	10,57 \pm 0,20	117,0 \pm 3,14
	100,63 \pm 1,90	18,48 \pm 0,62	97,56 \pm 2,46
Αηδανι Σαντορίνη 2004	40,7 \pm 1,0	13,86 \pm 0,83	103,7 \pm 10,17
	74,45 \pm 0,21	15,13 \pm 0,96	149,59 \pm 10,08
	32,31 \pm 2,26	3,10 \pm 0,12	274,2 \pm 2,10
Αθήρι Σαντορίνη 2004	79,58 \pm 2,12	18,63 \pm 1,71	130,63 \pm 6,70
	114,71 \pm 2,21	21,35 \pm 2,00	99,23 \pm 3,42
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	83,7 \pm 0,5	17,11 \pm 0,08	90,00 \pm 5,10
Μοσχοφίλερο Αρκαδία 2004	88,0 \pm 0,4	16,47 \pm 0,29	122,03 \pm 3,62
Merlot Αρκαδία 2004	34,4 \pm 0,9	7,59 \pm 0,56	143,30 \pm 6,98
Μοσχάτο Τυρνάβου 2004	46,8 \pm 0,5	12,80 \pm 0,10	153,78 \pm 7,61
Ροδίτης Τυρνάβου 2004	16,0 \pm 0,3	2,00 \pm 0,14	339,52 \pm 8,40
Sauvignon blanc Αρκαδία 2004	30,0 \pm 0,3	6,94 \pm 0,37	141,68 \pm 3,76
Chardonnay Αρκαδία 2004	115,0 \pm 3,2	19,00 \pm 1,75	64,84 \pm 0,99
M.O.	64,55	13,07	144,79

*Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

Πίνακας 6-Δ Περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων υποπροϊόντων προσδιορισμένη με τη μέθοδο FRAP και DPPH

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	FOLIN- CIOCALTEU mg/g εκχυλ.	FRAP ΤΙΜΗ * ($\mu\text{M FeSO}_4$)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/g εκχυλ.}$)
ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ			
Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	484,3 \pm 11,2	122,2 \pm 0,33	12,3 \pm 0,36
Βινσάντο Σαντορίνη 2003	543,30 \pm 37,4	114,09 \pm 0,70	9,1 \pm 0,15
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2003	587,15 \pm 22,6	121,00 \pm 0,42	8,7 \pm 0,49
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	584,5 \pm 16,5	100,4 \pm 1,92	14,6 \pm 0,4
	464,3 \pm 9,1	101,6 \pm 0,25	17,9 \pm 0,0
Βοηδόματο Σαντορίνη 2003	494,2 \pm 7,0	91,4 \pm 1,02	15,7 \pm 0,4
Βοηδόματο Σαντορίνη 2004	367,10 \pm 5,9	74,45 \pm 0,54	23,4 \pm 0,39
Λιαστα Μανδηλαρίας Σαντορίνη 2004	536,85 \pm 11,3	106,32 \pm 1,86	8,3 \pm 0,15
M.O.	507,7	103,9	13,7
Αθήρι Σαντορίνη 2003	559,22 \pm 12,3	120,48 \pm 2,31	7,0 \pm 0,49
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	400,00 \pm 8,2	103,80 \pm 0,91	12,4 \pm 0,73
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	574,1 \pm 14,9	107,0 \pm 2,9	14,0 \pm 0,26
	367,1 \pm 6,5	74,4 \pm 0,8	18,2 \pm 0,14
Βηλάνα Σητεία 2003	454,40 \pm 8,8	90,00 \pm 1,29	10,0 \pm 0,27
Αθήρι Σαντορίνη 2004	464,1 \pm 9,1	73,3 \pm 1,0	15,6 \pm 0,14
M.O.	471,0	99,2	12,3
ΣΤΕΜΦΥΛΑ			
Μανδηλαρία Σαντορίνης 2003	107,12 \pm 1,98	24,54 \pm 0,46	61,46 \pm 1,64
Μανδηλάρι Σαντορίνη 2004	437,73 \pm 3,99	99,19 \pm 2,27	10,85 \pm 0,18
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2003	222,91 \pm 0,98	43,00 \pm 1,34	26,2 \pm 1,17
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004	207,79 \pm 3,73	50,14 \pm 0,90	28,1 \pm 1,68
	369,09 \pm 9,73	85,00 \pm 1,42	15,61 \pm 0,81
Βοηδόματο Σαντορίνης 2003	165,00 \pm 1,88	28,61 \pm 1,20	42,8 \pm 1,85
Βοηδόματο Σαντορίνης 2004	376,71 \pm 2,84	86,06 \pm 1,49	14,31 \pm 0,31
Βινσάντο Σαντορίνη 2003	173,38 \pm 3,61	51,92 \pm 1,17	28,8 \pm 0,40
Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004	379,2 \pm 8,3	96,07 \pm 1,09	12,09 \pm 0,05
Λιατικό Σητεία 2003	333,87 \pm 1,42	77,22 \pm 0,24	18,1 \pm 0,23
M.O.	277,28	64,17	25,83
Λευκά Σαντορίνη 2003	273,58 \pm 6,57	68,11 \pm 1,48	23,95 \pm 0,33
Ασύρτικο Σαντορίνη 2003	267,42 \pm 2,92	46,66 \pm 0,65	35,18 \pm 0,25
	465,28 \pm 3,15	103,00 \pm 2,71	15,58 \pm 0,31
Ασύρτικο Ρόδος 2003	414,16 \pm 7,21	90,17 \pm 1,18	15,3 \pm 0,53
Ασύρτικο Σαντορίνη 2004	336,7 \pm 8,9	76,00 \pm 0,98	23,38 \pm 0,24
M.O.	351,43	76,79	22,68
ΟΙΝΟΛΑΣΠΕΣ			
Γλυκολασία από φίλτραρισμα 2003	54,92 \pm 0,92	9,68 \pm 0,14	194,66 \pm 5,69
Γλυκολασία από φίλτροπρέσσα 2003	93,71 \pm 2,46	23,33 \pm 0,40	71,98 \pm 1,26

* Αναγωγική Ικανότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλ.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DPPH	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
FRAP	Ικανότητα του πλάσματος να ανάγει το Fe(III)
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
ABTS	2,2'-αζινοδινο-3-αιθυλοβενζοθειαζολινικό σουλφονικό άλας
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
MS	Φασματομετρία μαζών
LC	Υγρή χρωματογραφία
ESI	Ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο
IC	Ανασταλτική συγκέντρωση
MIC	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
TBA	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
MDA	Μαλοναλδεύδη
TCA	Τριφθοροοξικό οξύ
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
ACN	Ακετονιτρίλιο
RT	Χρόνος συγκράτησης
UV-VIS	Υπεριώδες-Ορατό
D.L.	Όριο ανίχνευσης
Q.L.	Όριο ποσοτικοποίησης
SD	Τυπική απόκλιση
A	Απορρόφηση
F	Ένταση φθορισμού
TPTZ	2,4,6-τριπυριδυλ-s-τριαζίνη

DMSO	Διμέθυλοσουλφοξείδιο
H ₂ DCF-DA	2',7'-Διχλωρο-δωδροφλωρεσκεΐνη διοξικό
DCF	Διχλωροφλωρεσΐνη
PBS	Ρυθμιστικό δ/μα φωσφορικού οξέος
FA	Τμηματική περιοχή
TBARS	Δραστικά συστατικά θειοβαρβιτουρικού οξέος
ORAC _{PE}	Ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου
SPE	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
PVDF	πολύ-1,1-διφλωλοαιθένιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
BuOH	Βουτανόλη
M.B.	Μοριακό βάρος
XIC	Χρωματογράφημα εξαγόμενου ιόντος
<i>m/z</i>	Λόγος μάζας-προς-φορτίο